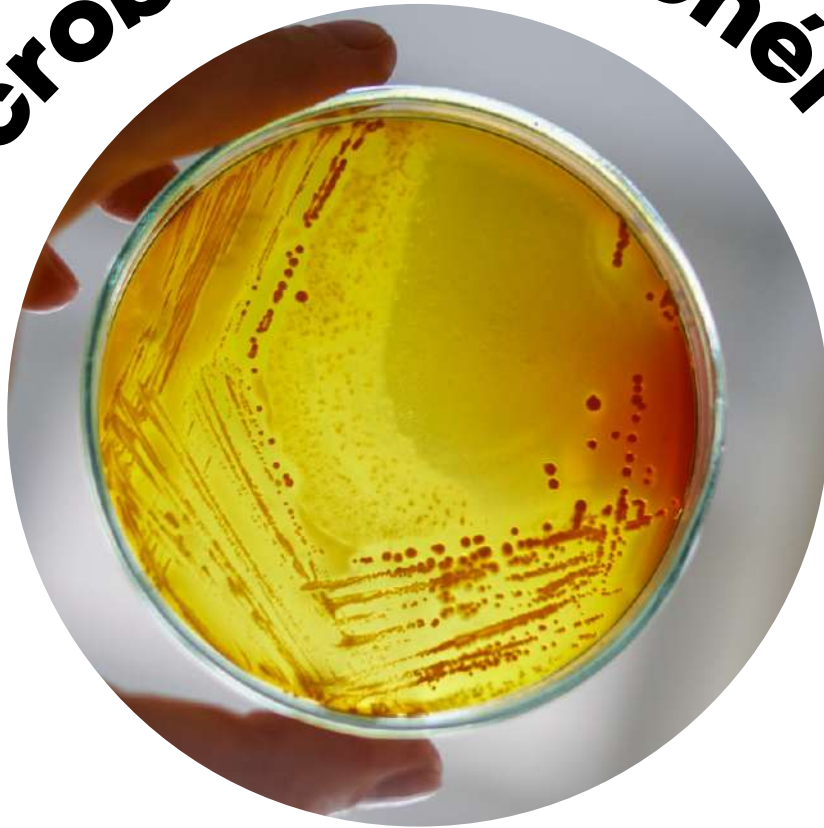


Microbiologie Générale



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

COURS D'INTRODUCTION À LA MICROBIOLOGIE

La microbiologie, étymologiquement « science des microbes », est d'apparition relativement récente. Il fallut en effet attendre l'invention du microscope, au 17^{ème} siècle qui n'était encore qu'une simple loupe grossissant de 50 à 300 fois, pour découvrir l'existence d'êtres vivants aussi petits : leur taille, bien inférieure à 0,1 millimètre, est au-delà de la limite de résolution de l'œil humain. Actuellement elle recouvre un nombre imposant de disciplines, telles que bactériologie, virologie, algologie, parasitologie, cytologie, cytochimie, immunologie, génétique.

I. Définition et Historique

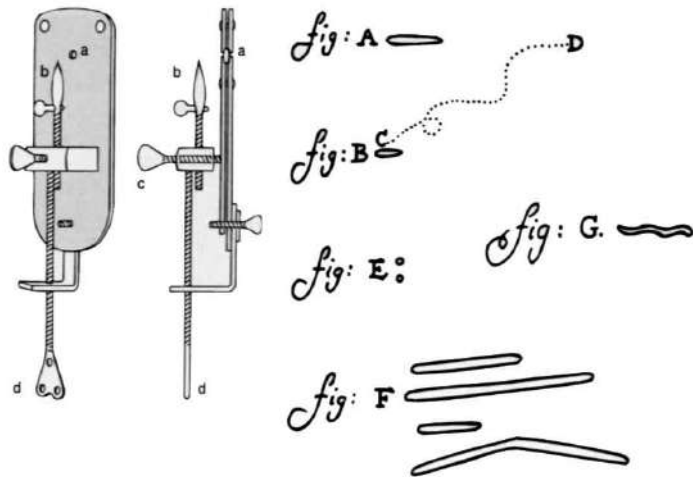
1. Les débuts de la microbiologie

La microbiologie est née avec la découverte du microscope au 17^{ème} siècle par un Hollandais : VAN LEEUWENHOEK. Celui-ci a mis en évidence, dès 1674, dans les milieux naturels (eau, terre...) une diversité d'organismes microscopiques, mobiles ou immobiles, d'organisation très simple : les microorganismes.

Il fait des descriptions extrêmement précises d'embryons de plantes et de petits animaux invertébrés. Il découvre les spermatozoïdes, les globules rouges, la circulation sanguine capillaire et surtout, le monde microbien ou monde des animalcules. Mais l'étude des microbes ne prit son essor qu'avec les travaux de Pasteur, en France, de Koch, en Allemagne, et de leurs contemporains.

(annexe 1)

Il a donc fallu créer un troisième règne pour classer les micro-organismes : on l'a appelé le règne des **protistes**.



2. Définitions

- **Animaux** : les animaux sont animés de mouvement, n'ont pas de paroi et tirent leur énergie de l'oxydation de matériaux organiques.
- **Végétaux** : les végétaux ont une paroi, sont immobiles et utilisent la lumière comme source d'énergie (photosynthèse)
- **Fungi** : les champignons ont une paroi, sont immobiles, non photosynthétiques, ils tirent leur énergie de l'oxydation de composés organiques.
- **Protistes** : regroupent tous les organismes vivants unicellulaires animaux ou végétaux, mais les espèces unicellulaires du règne végétal (les **Protophytes**) sont moins nombreuses que les espèces unicellulaires du règne animal (les **Protozoaires**). Les protistes sont divisés en **protistes supérieurs** (protistes **eucaryotes**) et en **protistes inférieurs** (protistes **procaryotes**).

3. Les travaux de Pasteur et Lister ont fait progresser la microbiologie

Suite à la mise au point par Pasteur du procédé de Pasteurisation. Un chirurgien anglais, Lister met au point :

- les **méthodes d'antisepsie** : ensemble des méthodes employées pour détruire momentanément les microbes qui déterminent des infections sur ou dans les êtres vivants.
- Les **techniques de l'asepsie chirurgicale** : l'asepsie, c'est ensemble des méthodes qui consistent à empêcher les germes de parvenir jusqu'à nous.

II. Classification des micro-organismes

La classification actuelle tend à distinguer cinq règnes : animaux (*Animalia*), végétaux (*Plantae*), champignons (*Fungi*), protistes eucaryotes (*Protista*) et protistes procaryotes (*Procaryotae*).

1. Place des protistes dans la classification des êtres vivants (cf. annexe 2)

Les protistes sont divisés en **protistes supérieurs** (protistes **eucaryotes**) et en **protistes inférieurs** (protistes **procaryotes**).

2. Les protistes eucaryotes ou protistes supérieurs

2.1. Structure et taille

Ce sont des organismes unicellulaires ou multicellulaires dénués de différenciation tissulaire. Chaque cellule se caractérise par un noyau vrai (délimité par une enveloppe nucléaire constituée de deux membranes biologiques) avec deux jeux de chromosomes (cellule **diploïde**), par la présence d'organites spécialisés (mitochondries, dictyosomes de l'appareil de Golgi, centriole...). Leur taille varie de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres.

2.2. Les principaux représentants de ce groupe

- Les **champignons microscopiques** ou **mycètes** (levures et moisissures) : non photosynthétiques, ils tirent leur énergie de l'oxydation de composés organiques. Ils peuvent végéter dans le milieu extérieur (saprophytes) ou parasiter un hôte. Ils ont une structure mycélienne (filaments plus ou moins ramifié ou mycélium). On distingue :
- Les **algues** ou **protophytes** (à l'exception des algues bleues) : photosynthétiques, à paroi souvent cellulosique. Ex: algues vertes, brunes, rouges, diatomées, euglènes.
- Les **protozoaires**, largement répandus dans la nature, se nourrissant de matière organique (donc non photosynthétiques), morte ou vivante, et participant aux processus d'auto épuration ou étant des parasites d'autres organismes, qui se différencient par leur mode de déplacement :

3. Les protistes procaryotes ou protistes inférieurs

3.1. Structure et taille

Ce sont des organismes unicellulaires caractérisés par une organisation rudimentaire.

3.2. Les principaux représentants de ce groupe : les bactéries ou *Procaryotae*

- Les **Gracilicutes**, bactéries à **paroi de type Gram -**.
- Les **Firmicutes**, bactéries possédant une **paroi de type Gram +**.
- Les **Tenericutes**, **bactéries sans paroi** (mycoplasmes).
- Les **Mendosicutes**, bactéries à **paroi « défectueuse »** (Archéobactéries).

4. Cas particulier des virus

4.1. Structure et taille

Les virus constituent un quatrième règne car ils possèdent une organisation non cellulaire. Ils sont constitués par : un génome, une capsid protéique et éventuellement une enveloppe membranaire provenant de la cellule hôte. Leur taille est comprise entre 0.001 µm et 0.1 µm, soit 10 à 100 fois plus petit qu'un protiste procaryote.

4.2. Particularités

Les virus sont incapables de se reproduire seuls, et le font donc aux dépens d'une cellule animale, végétale ou bactérienne qu'ils parasitent, en détournant les synthèses à leur profit. Ce sont donc des **parasites intracellulaires obligatoires**.

III. MÉTHODES D'ÉTUDE

1. Les levures, les moisissures et les bactéries

Ils partagent les mêmes méthodes d'étude :

- Asepsie rigoureuse.
- Isolement et dénombrement sur des milieux de culture.
- Examen microscopique.
- Identification à partir de caractéristiques morphologiques, culturelles, biochimiques, antigéniques

2. Les virus

Ils nécessitent l'utilisation de cultures cellulaires puisqu'ils ne se multiplient qu'à l'intérieur de cellules. Après multiplication, on peut :

- Les identifier au microscope optique en observant leurs effets cytopathogènes sur les cellules hôte.
- Les séparer d'avec la cellule hôte, puis les observer au microscope électronique.
- Étudier leurs acides nucléiques par des techniques de biologie moléculaire.
- Les mettre en évidence par la recherche de leurs antigènes par des techniques immunologiques

IV. LES DOMAINES DE LA MICROBIOLOGIE

1. Les micro-organismes pathogènes

Il s'agit des micro-organismes provoquant ou pouvant provoquer une maladie.

2. Les micro-organismes saprophytes de l'environnement

Il s'agit des micro-organismes vivant sur un hôte sans y provoquer de maladie.

3. Les micro-organismes commensaux de l'homme

Il s'agit des micro-organismes vivant associés à une autre espèce en profitant des débris de ses repas, mais sans lui nuire

V. LES MICRO ORGANISMES UTILES

Notre connaissance des micro-organismes nous permet de détourner et d'utiliser leur métabolisme dans l'industrie. C'est ce que l'on appelle les biotechnologies.

1. Micro organismes de transformation

Ils sont utilisés pour transformer une matière première, grâce à leur métabolisme, en de nouveaux produits différents sur le plan des caractères organoleptiques et nutritionnels.

- **transformation du lait :**
 - Fabrication du **yaourt** : grâce à l'action de deux bactéries: *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*
 - Fabrication des **fromages** : grâce à l'action successive de différents ferments
 - Fabrication du **beurre** : il est obtenu en enrichissant la crème à l'aide de mélanges contenant des ferments acidifiants et des ferments d'arômes
- **Transformation des fruits et légumes :**
 - Fabrication du **vin** : il est obtenu grâce la transformation du jus de raisin par les levures et les bactéries répandues à la surface des grains. Celles-ci transforment le sucre en alcool et en produits aromatiques qui donnent au vin son "bouquet".
 - Le vin peut aussi être transformé en **vinaigre** si on l'ensemence avec *Mycoderma aceti* qui transforme l'alcool en acide acétique.
 - Fabrication de la **choucroute** : après cuisson, le chou estensemencé avec un mélange de ferments lactiques qui acidifient la préparation.
- **Transformation de la viande :** elle se fait grâce à des ferments lactiques comme *Micrococcus*, *Vibriocosticulus* ... On aboutit à diverses charcuteries (saucisse, saucisson ..).
- **Transformation des biomolécules de l'environnement :**
 - Elle se fait grâce aux micro-organismes saprophytes des sols
 - Nitrification de l'azote atmosphérique : certains micro-organismes transforment l'azote gazeux présent dans l'air en nitrates : la forme d'azote utilisable par les plantes.
 - Minéralisation de la matière vivante : les matières organiques (= molécules carbonées) en décomposition sont transformées par les bactéries du sol en CO₂ : la forme de carbone utilisable par les plantes. Les micro-organismes sont donc des maillons indispensables des cycles biologiques.

2. Micro organismes du génie génétique (micro organismes producteurs)

L'homme est aujourd'hui capable de transformer le patrimoine génétique de certaines bactéries ou de certaines levures en leur ajoutant un gène de protéine humaine que les micro-organismes produisent ensuite en grande quantité.

Par exemple, c'est la bactérie *E. Coli* recombinée qui produit aujourd'hui l'insuline indispensable au traitement des diabétiques insulino-dépendants, ou l'hormone de croissance indispensable au traitement du nanisme hypophysaire.

VI. LA BACTÉRIOLOGIE

1. Classification des bactéries

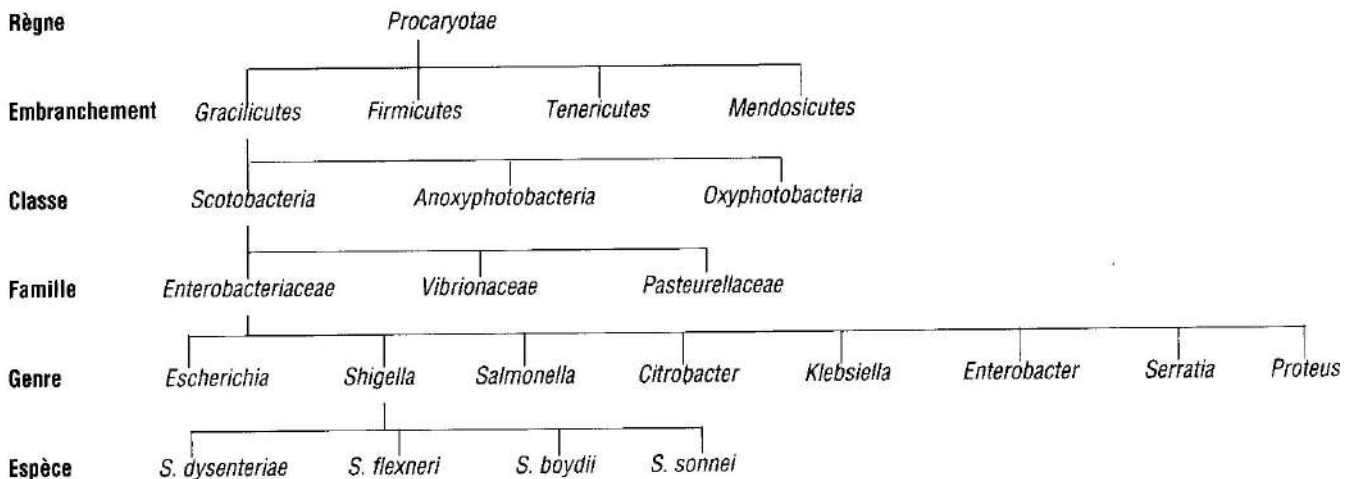
- **Classification nutritionnelle :**
 - selon la source d'énergie
 - selon la source de carbone
- **Classification par groupes physiologiques :** du point de vue écologique
 - groupe du cycle de l'azote
 - groupe du cycle du carbone
 - groupe du cycle du soufre
 - groupe du cycle du fer
- **Classification taxonomique**
 - La taxonomie est la science de la classification. Elle met en jeu
 - la morphologie
 - les caractères biochimiques
 - la structure de l'ADN : en particulier le coefficient de Chargaff (pourcentage guanine + cytosine). Des bactéries appartenant à la même espèce doivent avoir le même coefficient de Chargaff
 - la séquence de l'ARN ribosomal 16S ; des bactéries d'espèce voisine possèdent une séquence proche.

Plusieurs classifications ont été élaborées:

- La classification de **Bergey** (USA) est la plus importante : le livre de référence est le Bergeys manual
- La classification de **Prevot** (France) : dans cette classification, les bactéries constituent l'embranchement des Schizomycètes qui comporte 4 sous-embranchements :
 - Les **Eubactéria** (vraies bactéries)
 - Les **Mycobactéria** (bactérie possédant des caractères communs avec les champignons Inférieurs)
 - Les **Algobactéria** (possédant des caractères communs avec les algues)
 - Les **Protozoobactéria** (proche des protozoaires)

Cette classification se fait selon les principes de Linné (comme pour la classification des plantes et des animaux)

- | | |
|----------------------|----------|
| - Embranchement | - Tribu |
| - Sous embranchement | - Genre |
| - Classe | - Espèce |
| - Ordre | - Souche |
| - Famille | |



2. Notion de genre / espèce et Souche

- **Le genre** : c'est un ensemble d'espèces morphologiquement semblable ou voisine et physiologiquement parentes. Ex : *Corynebacterium*
- **L'espèce** : c'est un groupe de bactéries possédant en commun de nombreux caractères morphologiques et physiologiques. Ex : l'espèce *Corynebacterium diphtheriae*
- **La variété** : à l'intérieur d'une espèce, il peut se produire une variation qui donne naissance à une variété bien caractérisée et stable. La variété se distingue de l'espèce type par quelques caractères biochimiques liés à l'absence ou à la présence de quelques enzymes mineures.
- **La souche** : une souche bactérienne est une culture pure de bactérie issue de la descendance d'un isolement unique, ce qui signifie qu'elle provient d'une colonie isolée absolument pure, constituée d'individus rigoureusement identiques issus à l'origine d'une même cellule. Elle est fréquemment désignée par le nom de l'auteur responsable de son isolement ou par la localisation du laboratoire dans lequel on l'a isolée. Ex: la souche : *Corynebacterium diphtheriae*, souche Park-William.

3. Nomenclature

Les bactéries sont nommées par leur nom de genre écrit avec une majuscule suivi du nom d'espèce écrit avec une minuscule, le tout est en général souligné ou écrit en italique.

Exemple : *Staphylococcus aureus* ou Staphylococcus aureus

Les principaux groupes de bactéries d'intérêt médical

Les spirochètes : de forme hélicoïdale, longueur jusqu'à 500 µm, l'organe locomoteur est un filament axial, mobiles par mouvements ondulatoires, pendulaires ou giratoires. Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme :

Treponema pallidum responsable de la **syphilis**

Leptospira interrogans responsables de la **leptospirose** ictéro-hémorragique

Les bactéries Gram- aérobies ou micro-aérophiles : groupe comprenant de nombreux genres bactériens ayant un rôle dans les cycles de minéralisation de la matière organique, un intérêt médical ou industriel. Exemples d'espèces pathogènes pour l'homme :

Pseudomonas aeruginosa (pathogène opportuniste)

Legionella pneumophila. (maladie du légionnaire)

Neisseria meningitidis (méningite cérébrospinale)

Brucella sp. (brucellose)

Bordetella pertussis (coqueluche)

Francisella tularensis. (tularémie).

Les bactéries Gram- anaérobies facultatives : groupe très important qui réunit les *Entérobacteriaceae*, les *Vibrionaceae* et les *Pasteurellaceae*. Nombreuses espèces pathogènes :

Salmonella typhi (typhoïde)

Shigella dysenteriae (dysenterie bacillaire)

Yersinia pestis (peste)

Vibrio cholerae (choléra)

Pasteurella multocida (méningite, septicémie etc)

Haemophilus influenzae (infections des voies respiratoires)

Actinobacillus actinomycetemcomitans (actinomycose) etc.

Les bactéries Gram- anaérobies : toutes les espèces des *Bacteroidaceae* (bacilles) et des *Veillonellaceae* (coques) sont des parasites de l'homme et de l'animal. Les principaux genres sont *Fusobacterium*, *Veillonella*

Les rickettsies et les chlamydies : ce sont de très petits organismes dont la taille est comprise entre 0,2 µm et 0,7 µm.

Les rickettsies sont des parasites intracellulaires obligatoires de certaines cellules des vertébrés. Les arthropodes (poux, tiques etc...) jouent le rôle de vecteur et d'intermédiaire. Toutes les rickettsies sont potentiellement pathogènes pour l'homme.

- **Les bactéries Gram+ non sporulées** : groupe artificiel renfermant des genres aérobies stricts, anaérobies facultatifs et anaérobies stricts de différentes morphologies.

Cocci : les genres *Staphylococcus* et *Streptococcus* contiennent des espèces d'intérêt industriel ou médical :

Staphylococcus aureus (intoxications alimentaires etc)

Streptococcus pyogenes (angine etc)

Bacilles :

Lactobacillus (genre très important en industrie agroalimentaire : fromages, yoghourts etc)

Listeria monocytogenes (agent de la listériose)

Corynebacterium diphtheriae (diphthérie)

Bifidobacterium (flore intestinale de l'homme adulte).

- **Les bactéries Gram+ sporulées** : les *Bacillus* sont des bactéries de l'environnement. Une espèce est pathogène pour l'homme : *Bacillus anthracis* (charbon). Le genre *Clostridium* regroupe des bactéries anaérobies strictes dont certaines sont pathogènes :

Clostridium botulinum (botulisme)

Clostridium tetani (tétanos)

Clostridium perfringens (gangrène gazeuse).

- **Les actinomycètes** : ce sont des micro-organismes filamenteux fréquents dans le sol, ressemblant aux champignons mais possédant les caractéristiques des bactéries (procaryotes, sensibles aux antibactériens et aux bactériophages mais résistants aux antifongiques).

Mycobacterium tuberculosis est responsable de la tuberculose

Mycobacterium leprae de la lèpre.

Le genre *Streptomyces* est d'une importance majeure car nombre de ses espèces sont productrices d'antibiotique (ex : *Streptomyces griseus* productrice de streptomycine).

Toutes les espèces du genre *Actinomyces* sont responsables de maladies chez l'homme (infections oculaires, dentaires etc).

Les mycoplasmes : ce sont des bactéries sans paroi, très répandues chez l'homme (cavité buccale, tractus urogénital, moelle, sang etc.) dont le pouvoir infectieux est controversé.

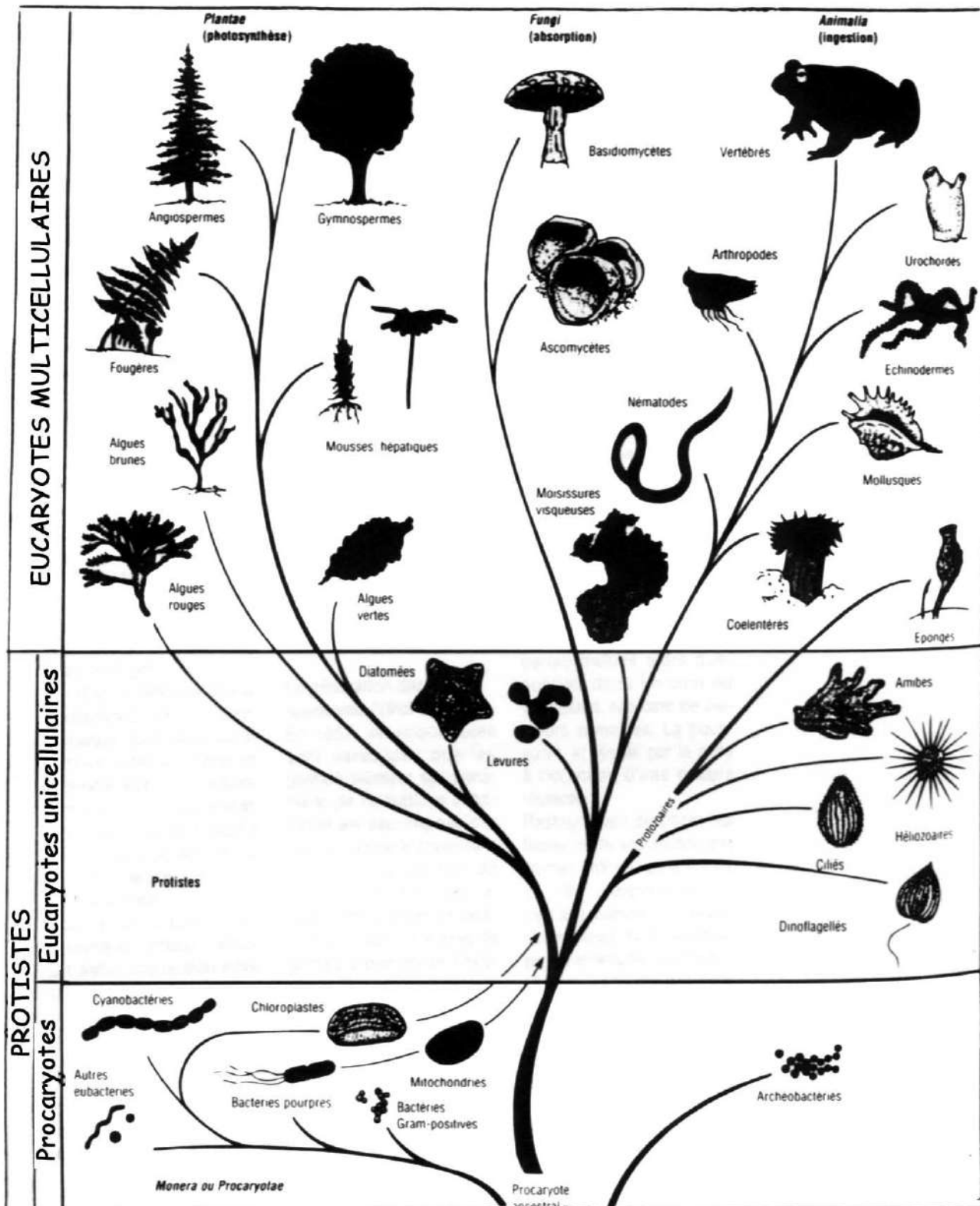
Annexe 1 : Three Hundred Years of Microbiology : Some Key Papers in Microbiology, 1684-1983

YEAR	INVESTIGATOR(S)	DISCOVERY
1684	Anton van Leeuwenhoek	Discovery of bacteria
1798	Edward Jenner	Smallpox vaccination
1857	Louis Pasteur	Microbiology of the lactic acid fermentation
1860	Louis Pasteur	Role of yeast in alcoholic fermentation
1864	Louis Pasteur	Settled spontaneous generation controversy
1867	Robert Lister	Antiseptic principles in surgery
1881	Robert Koch	Methods for study of bacteria in pure culture
1882	Robert Koch	Discovery of cause of tuberculosis
1884	Robert Koch	Koch's postulates
1884	Robert Koch	Discovery of cause of cholera
1884	Christian Gram	Gram-staining method.
1889	Sergei Winogradsky	Concept of chemolithotrophy
1889	Martinus Beijerinck	Concept of a virus
1890	Sergei Winogradsky	Autotrophic growth of chemolithotrophs

1901	Martinus Beijerinck	Enrichment culture method
1901	Karl Landsteiner	Human blood groups
1908	Paul Ehrlich	Chemotherapeutic agents
1928	Frederick Griffith	Discovery of pneumococcus transformation
1929	Alexander Fleming	Discovery of penicillin
1944	Avery, Macleod, McCarty	Explanation of Griffith's work-DNA is genetic
1944	Selman Waksman	Discovery of streptomycin
1953	James Watson, Francis Crick	Structure of DNA
1959	Pardee, Jacob, Monod	Gene regulation by a repressor protein
1959	Rodney Porter	Immunoglobulin structure
1959	F. Macfarlane Burnet	Clonal selection theory
1960	Jacob, Perrin, Sanchez, Monod	Concept of an operon
1975	Georges Kohler, Cesar Milstein	Monoclonal antibodies
1976	Susumu Tonegawa	Rearrangement of immunoglobulin genes
1977	Sanger, Niklen, Coulson	Methods for sequencing DNA
1983	Luc Montagnier	Discovery of HIV, the cause of AIDS

II. CLASSIFICATION DES MICRO-ORGANISMES :

2. Place des Protistes dans la classification des êtres vivants :



ETUDE MORPHOLOGIQUE DE LA CELLULE BACTERIENNE

Les bactéries les plus communes ont deux formes :

3. Les **coques** sont à peu près sphériques. Ils peuvent exister en tant que cellules individuelles, mais sont aussi associés en arrangements caractéristiques qui sont souvent utiles pour leur identification. Les diplocoques se forment quand les coques se divisent et restent ensemble pour former des paires (*Neisseria*). De longues chaînes de coques se forment quand les cellules restent attachées après plusieurs divisions dans un plan ; ce type d'arrangement se rencontre dans les genres *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*. *Staphylococcus* se divise pour former des groupes irréguliers de cellules comme une grappe de raisins. Des divisions dans deux ou trois plans peuvent produire des amas symétriques de coques. Les membres du genre *Micrococcus* se divisent souvent selon deux plans pour donner des groupes carrés de quatre cellules appelés tétrades. Dans le genre *Sarcina*, les coques se divisent suivant trois plans produisant des agglomérats cubiques de huit cellules.
4. L'autre forme habituelle de bactéries est celle d'un bâtonnet souvent appelé **bacille**. *Bacillus megaterium* est un exemple typique de bactérie en bâtonnet. Les bacilles sont très différents dans leur rapport longueur/largeur, les coccobacilles étant si courts et larges qu'ils ressemblent à des coques. La forme des extrémités du bâtonnet varie souvent suivant les espèces, elle peut être plate, arrondie, en forme de cigare ou bifurquée. Quoique beaucoup de bacilles soient solitaires, ils peuvent rester ensemble après la division pour former des paires ou des chaînes (ex. *Bacillus megaterium* se présente en longues chaînes).
5. Quelques bactéries en forme de bâtonnet, les vibrions, sont incurvés comme des virgules ou des spirales incomplètes.

Les bactéries peuvent avoir d'autres types de formes. Les actinomycètes forment de longs filaments multinucléés ou hyphes qui peuvent être ramifiés et produire un enchevêtrement appelé mycélium. Beaucoup de bactéries ont une forme de long bâtonnet tordu en spirale ou en hélice, elles sont appelées **spirilles** si elles sont rigides et **spirochètes** si elles sont flexibles. On connaît aussi quelques bactéries plates. Enfin, certaines n'ont pas de formes caractéristiques et sont dites **pléomorphes**.

Leur taille varie de 100-200 nm à 500 µm de long.

I. GÉNÉRALITÉS

- **Méthodes d'étude**

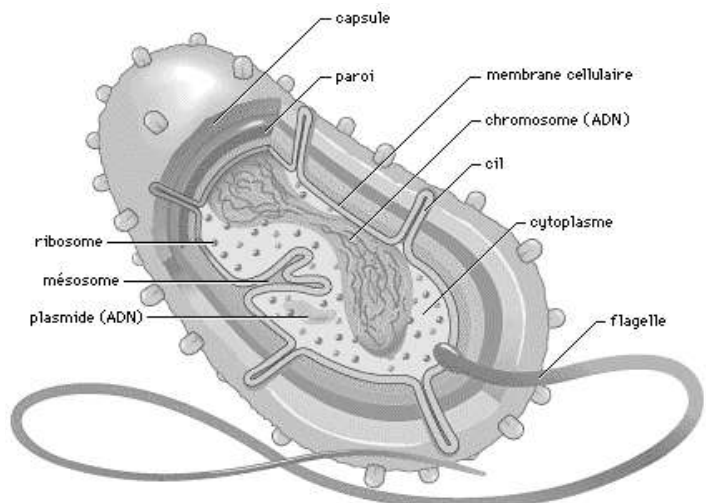
La microscopie : les observations se font à l'état frais ou sur des frottis colorés. La microscopie photonique permet des observations spéciales : microscopie sur fond noir pour observer les tréponèmes, microscopie en contraste de phase pour révéler des détails morphologiques à l'état frais. La microscopie électronique permet de voir des détails d'environ 5 nm. Les coupes ultrafines sont traitées par des sels de métaux lourds (coloration positive ou négative, ombrage). La technique de cryodécapage qui n'exige pas la fixation et l'inclusion, respecte la structure cellulaire. La microscopie électronique à balayage permet les images en relief.

Composition chimique : La teneur en eau est de 75 à 85% de la masse humide. Les protéines représentent 50% de la masse sèche, les acides nucléiques 13%, les lipides 10%, les polysaccharides 8% et le pool de métabolites 4%.

- **Structure générale**

La cellule bactérienne est une cellule procaryote. Ses dimensions varient de 0,5 µm à 10 µm. Dans cette cellule nous distinguerons :

4. des **organes constants** : présents chez toutes les bactéries de toutes les espèces. Ces organes font partie du génotype (matériel génétique) :
 - a. **paroi** : elle limite la cellule et donne sa forme à la bactérie



- b. **membrane cytoplasmique** : elle limite le cytoplasme
 - c. **cytoplasme** : lieu de synthèse, de dégradation et de réserve
 - d. **nucléotide** : lieu de stockage de l'information génétique
5. des **organes inconstants** : présents ou non selon l'espèce bactérienne et selon les conditions de milieux (par exemple une bactérie flagellée peut perdre ses flagelles dans un milieu pauvre ; on dira que son **génotype** est flagellé (elle possède l'information codant pour le flagelle) et que son **phénotype** est aflagellé (dans ces conditions, elle ne l'exprime pas)). Ces organes sont :
- flagelle(s)** : ils permettent les mouvements de la cellule
- pili** : ils permettent l'adhésion et les échanges de matériel génétique
- capsule** : elle protège la cellule de la phagocytose
- spore** : organe de résistance qui permet la survie de la cellule lorsque les conditions sont défavorables.

II. LA PAROI

1. Généralités

C'est une enveloppe rigide qui assure la forme de la bactérie (coque, bacille, vibrion, etc...). C'est un constituant essentiel de la cellule bactérienne (représente 20 à 30 % du poids sec de la bactérie)

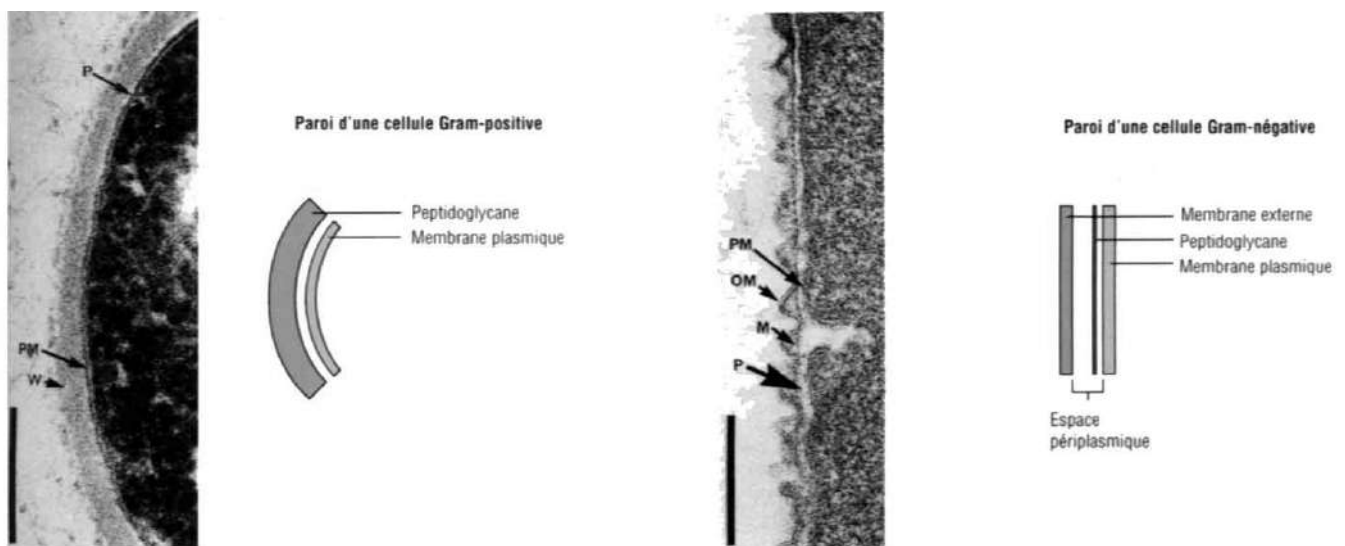
Remarque : la paroi est absente chez les **Mycoplasmes** qui appartiennent à la classe des mollicutes (molli : mou, cutis : peau) ou « Bactéries à peau molle »

2. Méthodes d'isolement de la paroi

Elles permettent d'étudier les propriétés de cet organe important :

- a) **Méthodes physiques** : la désintégration de la cellule peut se faire par broyage sur billes de verre, ultra-sons, congélations et décongélations successives, hautes pressions.
- b) **Méthodes chimiques** : elles vont détruire les constituants cytoplasmiques mais risquent d'enlever des constituants de la paroi. On utilise l'acide trichloracétique à 5%, à 100°.
- c) **Méthodes enzymatiques** : elles risquent également d'altérer la paroi. Digestion par la trypsine ou par la pepsine.

Les parois sont ensuite récupérées par centrifugations successives.



La paroi cellulaire des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. L'enveloppe d'une bactérie Gram-positive, *Bacillus licheniformis* (à gauche) et d'une bactérie Gram-négative, *Aquaspirillum serpens* (à droite) au microscope électronique. M. peptidoglycane ou muréine; OM. membrane externe; PM. membrane plasmique; P. espace périplasmique; W. peptidoglycane de la paroi bactérienne Gram-positive. La barre mesure 100 nm.

3. Constitution chimique de la paroi bactérienne

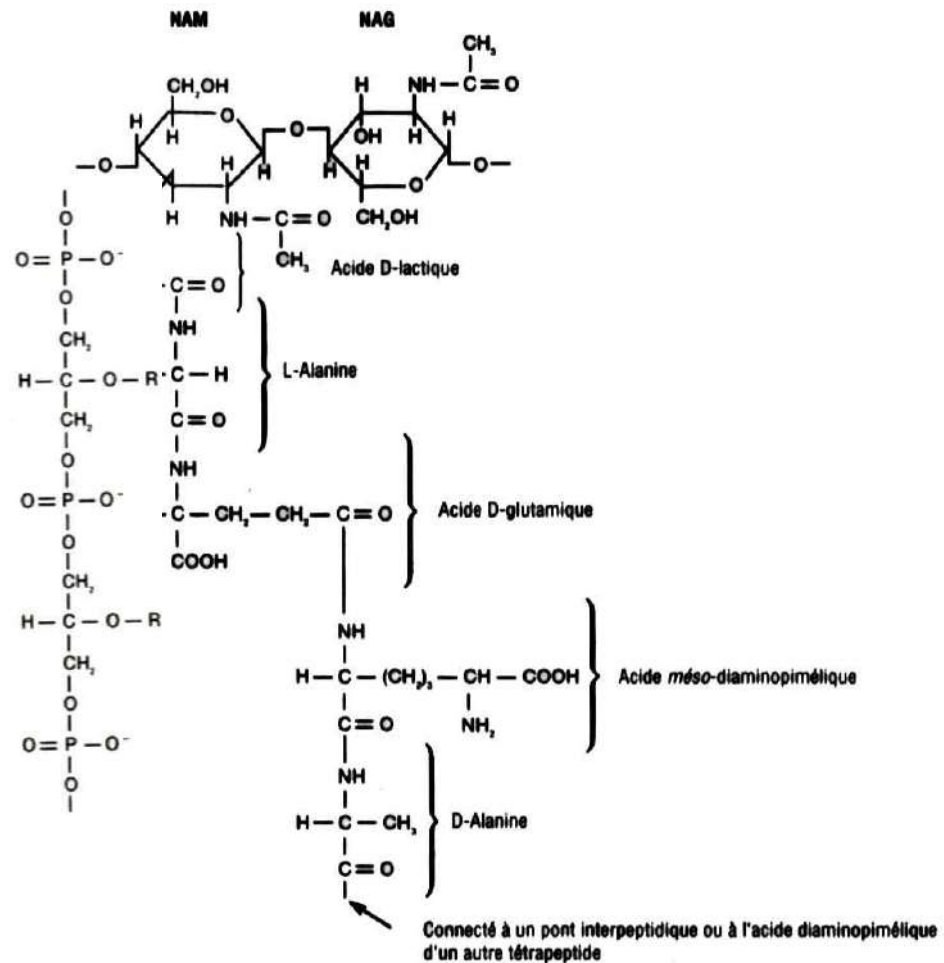
On peut distinguer deux groupes de bactéries correspondant à des réactions différentes vis-à-vis de la coloration de GRAM. On parle de bactéries Gram + et de bactéries Gram (GRAM = bactériologiste danois, 1884)

Bactéries Gram + : la partie la plus importante est le **mucocomplexe** ou **muréine** ou **mucopeptide** ou **peptidoglycane**.

Le peptidoglycane confère à la paroi sa résistance et maintient la forme caractéristique de la bactérie ; il représente 80 à 90% de la paroi chez les Gram +. Il est formé des éléments suivants :

- acides aminés** : D. Alanine, L. Alanine, acide D-glutamique, L. lysine ou acide diaminopimélique (selon les espèces). L'hydrolyse ménagée de la paroi donne des tétrapeptides. Les peptides peuvent être reliés entre eux dans une même chaîne ou entre deux chaînes par un peptide pont de longueur variable (exemple 5 gly chez *S.aureus*) ou directement (*E.coli*), créant une maille plus ou moins lâche.
- glucides aminés = osamines** : N-acetyl-glucosamine (NAG), acide-N-acetyl-muramique (NAM), hexoses aminés liés en β 1-4

C'est l'ensemble glycane + peptides qui est appelé peptidoglycane.



Peptidoglycane : structure de base

acide téichoïque

- acides téichoïques** unis par liaison covalente à la membrane cytoplasmique ou à la membrane (acides lipotéichoïques) ; ils donnent à l'hydrolyse, du ribitol ou du glycérol, du glucose ou de la glucosamine, de l'alanine, un phosphate inorganique) (50% de la masse sèche de la paroi, 10% de la masse bactérienne)
- polysaccharides** ou **polyosides** (avec des glucides pouvant servir parfois à la détermination de la bactérie : glucose, galactose, rhamnose, arabinose, mannose)
- lipides** en très faible quantité ou pas du tout, par contre quantité importante chez les Corynébactéries

Bactéries Gram – : leur constitution et structure sont plus complexes. Notons les différences d'avec les bactéries Gram + :

- Le peptidoglycane est beaucoup plus mince (il ne représente que 5 à 10 % de la paroi)
- Il y a lysine **et** acide diaminopimélique
- Moins de glucides aminés
- Pas d'acides téichoïques isolés jusqu'à présent
- Beaucoup de lipides liés aux protéines et aux polysides.
- A peu près autant de polysaccharides

	Bactéries Gram +	Bactéries Gram -
Osamines	++	+
Acides aminés	24-35 %	50 %
Nombre	4 à 10	16-17
A. diaminopimélique	+++	+
Acides téichoïques	+++	-
Oses	20-60 %	20-60 %
Lipides	1-2.5 %	10-22 %

Remarque : ces différences dans la constitution chimique permettent d'expliquer les résultats de la coloration de Gram . Voici une des explications possibles pour cette coloration de GRAM

1^{ère} étape : les cellules Gram+ et les cellules Gram- absorbent le 1^{er} colorant, le violet qui colore le cytoplasme.

2^{ème} étape : l'iode du lugol renforce les interactions entre le colorant basique et la cellule, formant un précipité avec le violet (= mordantage)

3^{ème} étape : deux cas se présentent :

dans les bactéries Gram +, l'alcool acétone pénètre difficilement (il y aurait rétraction importante des pores) et le complexe colorant + iode n'est pas éliminé au lavage : les bactéries restent violettes

dans les bactéries Gram -, l'alcool acétone passe facilement en dissolvant en partie les lipides ; il dissout le complexe colorant + iode qui est alors éliminé au rinçage : la bactérie est alors incolore.

4^{ème} étape : la fuchsine diluée pourra ainsi recolorer en rose ou rouge la bactérie qui était incolore : elle sera appelée Gram –

Remarques sur la coloration de Gram :

L'âge de la culture est susceptible de modifier les résultats de la coloration de Gram.

Les bactéries Gram + tendent à perdre leur « positivité » en vieillissant .

Certaines bactéries ont une réaction variable vis-à-vis de la coloration de Gram, par exemple certaines souvent Gram + , peuvent apparaître Gram - : exemple les Corynebactéries :

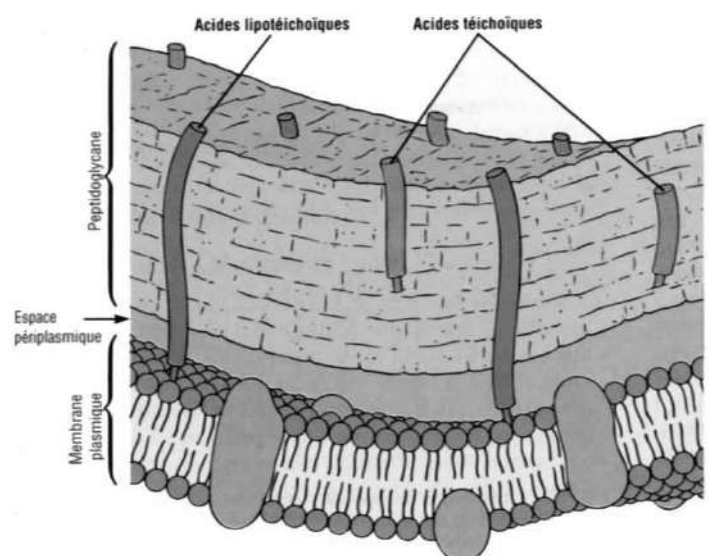
D'autres techniques pouvant remplacer la coloration de Gram classique .

4. Structure

Bactéries gram +

La paroi a une épaisseur de 10 à 80 nm. La structure est homogène, d'aspect uniforme. Les acides téichoïques sont des antigènes accessibles aux anticorps. Ce sont également des sites de fixation des bactériophages (virus bactériens).

Chez les streptocoques on rencontre aussi des antigènes polysaccharidiques et protéiques. Les antigènes polysaccharidiques, appelés antigène C, sont à la base de la classification de Lancefield en groupes sérologiques (groupes A, B, C...). Les protéines M, T et R forment des antigènes protéiques.



Bactéries gram –

La paroi a une épaisseur de 10 nm.

On distingue trois couches : la **membrane plasmique**, le **peptidoglycane** (mince car constitué d'une seule couche moléculaire, avec peu de liaisons par les peptides ponts entre

les chaînes polysaccharidiques : le maillage est plus lâche que chez les bactéries Gram+.), la « **membrane externe** » où les LPS remplacent les phospholipides.

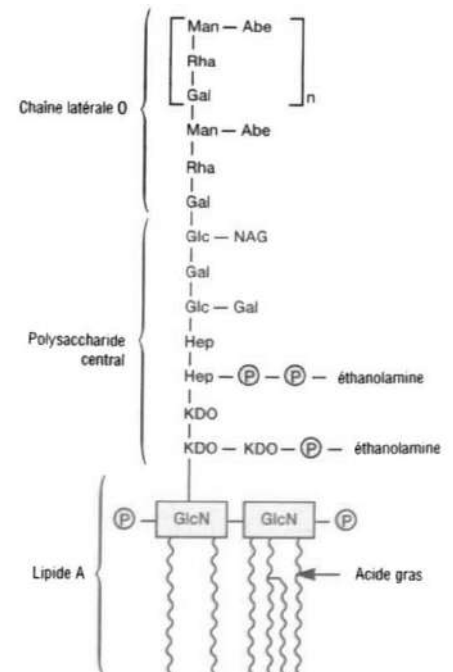
Le LPS est constitué de trois parties :

Lipide A --- core --- chaîne O :

Le **lipide A** est un glycophospholipide : c'est un polymère composé d'unités disaccharidiques de glycosamines, reliées entre elles par des ponts pyrophosphates, auxquelles sont rattachés des chaînes d'acides gras.

Le **core** est un oligosaccharide composé d'un sucre en C8, le cétodésoxyoctonate ou KDO, antigénique, d'heptose et de sucres en C6

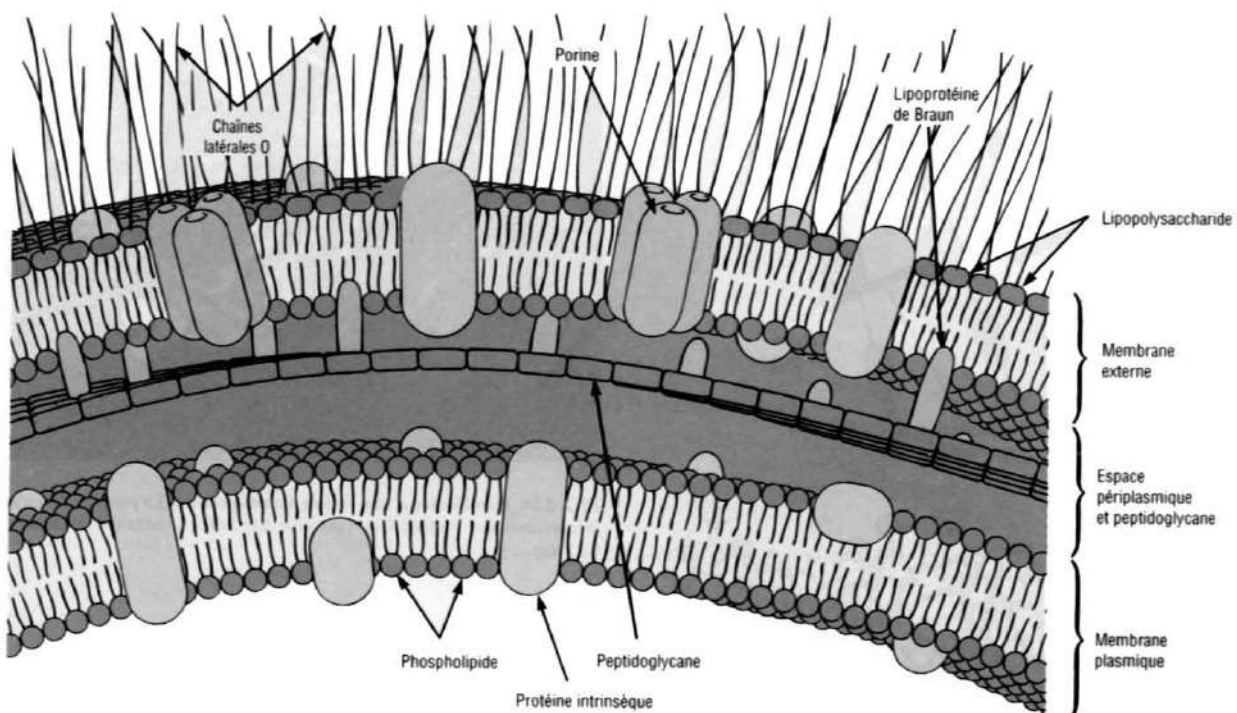
La **chaîne O** est constituée de tri, tétra ou pentasaccharides organisés en sous unités répétitives et forme une région antigénique variable.



Le LPS a un effet de barrière s'opposant au passage de nombreuses molécules dont les pénicillines. Les chaînes O augmentent la résistance à la phagocytose.

La lipoprotéine de Braun est une protéine intrinsèque de la membrane externe associée de manière covalente au peptidoglycane : ces deux structures sont fortement liées ensemble.

Dans les deux cas, la paroi possède des pores permettant le passage de petites molécules.



La membrane externe sert de barrière de protection : elle ralentit l'entrée des substances toxiques, colorants, sels biliaires (agissant donc sur les bactéries Gram +) et d'antibiotiques.

5. Fonctions de la paroi

Fonction de soutien

La paroi est une structure rigide (sauf chez les spirochètes) qui donne sa forme à la cellule. Elle maintient rigidité et pression interne, protégeant la bactérie contre la lyse osmotique et les chocs.

On peut supprimer le peptidoglycane en traitant les bactéries au **lysozyme** (enzyme présente dans les sécrétions de muqueuses nasale, conjonctive, dans les larmes, la salive, le mucus, dans les extraits d'organes tels que la peau...). La bactérie tend alors à se lyser sauf si on la maintient dans un milieu hypertonique ou isotonique (par exemple forte concentration de saccharose, ex : 10 %). Dans ce cas :

Une **bactérie Gram +** prend une forme sphérique appelée **protoplaste** qui se nourrit, respire mais ne peut se multiplier ni redonner la bactérie dans sa forme intégrale.

Une **bactérie Gram -**, après un traitement particulier, pourra subir l'action lytique du lysozyme et deviendra un **sphéroplaste** (une partie de la paroi est maintenue) lequel pourra se multiplier et resynthétiser sa paroi, c.à.d reverser vers la forme initiale

Dans certains cas, la réversion ne se fait pas : on parle de « formes L » (-sphéroplastés fixés).

Remarque : On peut aboutir au même résultat avec la pénicilline. C'est un antibiotique actif sur les bactéries (Gram + en particulier) en voie de croissance. Il inhibe la synthèse de la paroi notamment en empêchant l'utilisation d'un acide dans la synthèse du peptidoglycane.

Rôle de la paroi dans la coloration de Gram : cette coloration différentielle est basée sur la perméabilité plus ou moins grande de la paroi vis-à-vis de l'alcool.

Une bactérie Gram + colorée par le violet, soumise au lysozyme en milieu hypertonique perd sa paroi et apparaît comme un protoplaste violet. Traité ensuite par l'alcool acétone, ce protoplaste se décolore alors que normalement une bactérie Gram+ garde sa coloration violette.

C'est donc bien la paroi qui empêche (pour les Gram+) la pénétration de l'alcool acétone.

Rôle particulier dans l'acido-alcool-résistance des B.K (Bacille de Koch) : ces bactéries ne sont visibles ni à l'examen direct ni au Gram à cause des lipides de la paroi. On emploie une coloration différentielle. La bactérie reste colorée par la fuchsine à chaud n'est pas décolorée par l'acide-alcool.

Rôle de la paroi dans l'antigénicité (fonction antigénique) : c'est au niveau de la paroi que se situe l'**antigène somatique** (ou **antigène 0**). Chez les bacilles Gram - formant le groupe des Entérobactéries, cet antigène somatique 0 est le LPS ou lipopolysaccharide : il correspond aux deux couches lipopolysidique et lipoprotéinique) et constitue l'**endotoxine** de ces bactéries.

Rôle de la paroi dans la sensibilité aux Bactériophages : au niveau de la paroi se situent des récepteurs spécifiques que reconnaissent les bactériophages.

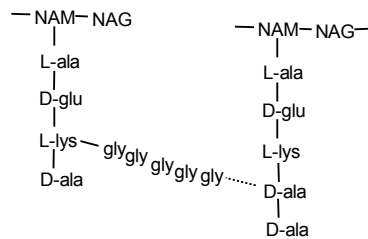
Rôle dans les variations d'aspect des colonies bactériennes : au sein de la population d'une même espèce il peut se produire des modifications par exemple chez les bacilles Gram- du groupe des Entérobactéries, il peut y avoir une mutation changeant les colonies **smooth (lisses)** ou **S** ou **L**, régulières, à bord net, résistantes à la pénicilline en colonies **rough (rugueuses)** ou **R**, irrégulières, sèches, à bord crénelé (par perte d'un glucide du LPS), sensibles à la pénicilline.

Chez ces dernières on ne retrouve généralement plus l'antigène 0. Ce passage de la forme S à la forme R peut se produire spontanément (quelquefois par vieillissement des souches) ou artificiellement (on la provoque par culture en conditions défavorables).

6. Synthèse de la paroi

NAG + lactate → NAM → NAM-L-ala → NAM-L-ala-D-glu

NAM-L-ala-D-glu $\longrightarrow$ NAM-L-ala-D-glu-L-lys $\longrightarrow$ NAM-L-ala-D-glu-L-lys-D-ala-D-ala
 NAM-L-ala-D-glu-L-lys-D-ala-D-ala = NAM-pentapeptide
 NAG + NAM-pentapeptide $\longrightarrow$ NAG-NAM-pentapeptide
 NAG-NAM-pentapeptide + pont $\longrightarrow$ NAG-NAM-pentapeptide-pont
 NAG-NAM-pentapeptide-pont + NAG-NAM-pentapeptide $\longrightarrow$ chaîne de peptidoglycane

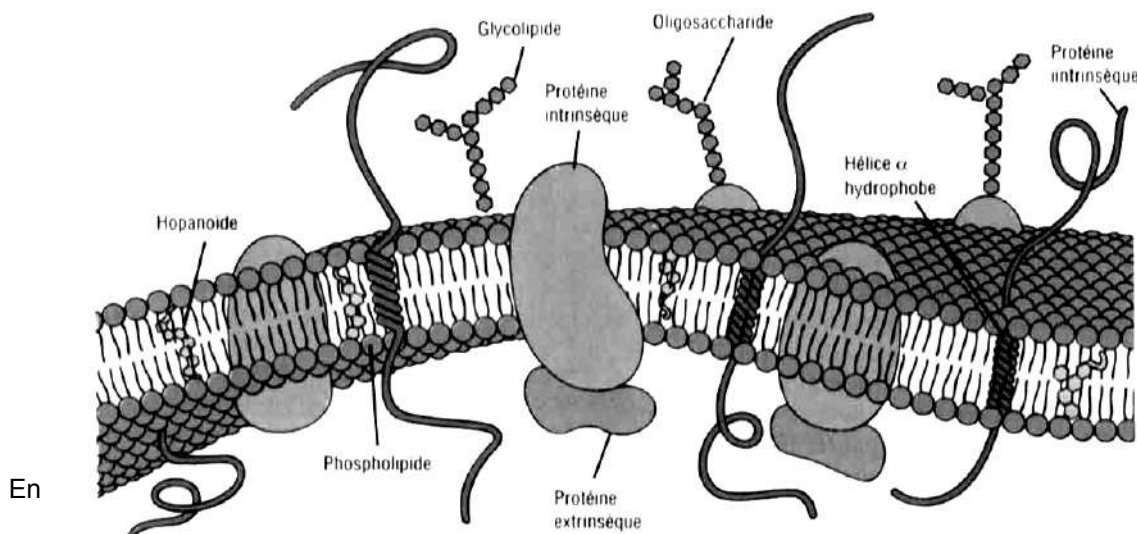


Les antibiotiques de la famille des β -lactamines (pénicillines, céphalosporines) ont une configuration stéréochimique voisine de D-ala—D-ala. Ils inhibent ainsi la réaction de transpeptidation par analogie structurale. D'autres substances agissent sur la synthèse de la paroi, notamment les colorants (violet de cristal).

III. LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

1. Généralités

La membrane est située sous la paroi, à son contact. Elle mesure de 40 à 75 angströms et représente 20 % du poids de la bactérie. Elle est constituée de protéines, de glucides et de lipides mais pas de cholestérol contrairement aux membranes biologiques eucaryotes (sauf chez les mycoplasmes). On trouve par contre des **hopanoïdes**, molécules proches du stérol, qui stabilisent la membrane.



microscopie électronique, elle montre une structure classique à deux feuillets opaques aux électrons et un feuillet interne transparent. L'organisation en double feuillet est liée au caractère **amphipathique** des molécules lipidiques (modèle de la « **mosaïque fluide** » de Singer). Les protéines **extrinsèques** ou **périphériques** apparaissent sur une des faces de la membrane alors que les protéines **intrinsèques** ou **intégrales** la traversent complètement.

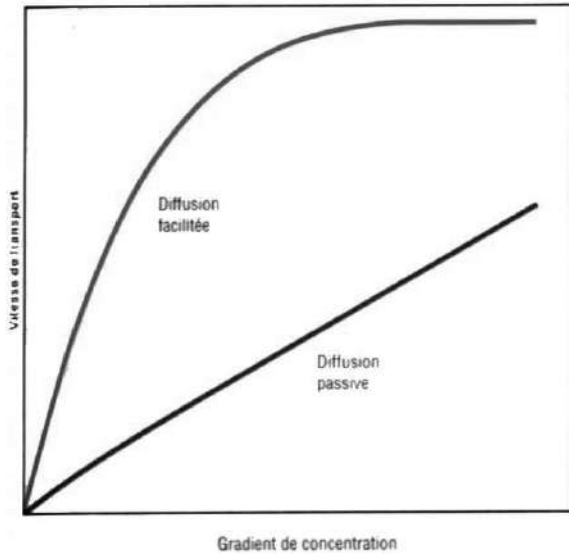
2. Rôles

Maintien de l'équilibre osmotique entre la cellule et le milieu et transfert de substance. La membrane joue un rôle de barrière empêchant la fuite de composés intracytoplasmiques et la pénétration anarchique de constituants extracellulaires. Elle assure cependant les échanges avec l'extérieur nécessaires au métabolisme.

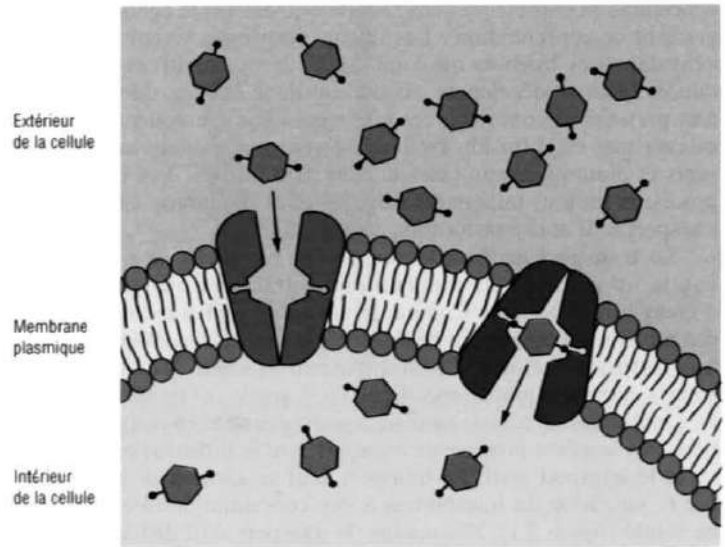
a) diffusion : elle se fait selon le gradient de concentration. La diffusion peut être passive ou facilitée par une protéine porteuse

b) transport actif : des **perméases**, enzymes spécifiques, permettent le transport actif et sélectif de certains nutriments à l'intérieur de la cellule (= systèmes de « pompes ») tels que glucides, acides aminés etc.

Exemple : la galactoside perméase d'*Escherichia coli* assurant la pénétration du lactose et son accumulation



La diffusion passive et facilitée. La vitesse de diffusion dépend du gradient de concentration du soluté. Notez l'effet de saturation ou plateau, aux valeurs élevées du gradient de concentration lors de la diffusion facilitée.



Un modèle de la diffusion facilitée. Le transporteur membranaire peut changer de conformation après avoir lié une molécule externe et l'avoir libérée dans le milieu cellulaire. Le transporteur retourne alors à sa position orientée vers l'extérieur et est prêt à lier une autre molécule en solution. Comme il n'y a pas d'énergie absorbée, les molécules ne continueront à entrer que si leur concentration est plus élevée à l'extérieur.

c) Respiration cellulaire : la membrane des bactéries contient des **enzymes respiratoires** (ex. : système cytochrome) et jouerait donc le même rôle que les mitochondries des cellules eucaryotes. La chaîne respiratoire est à l'origine d'un gradient électrochimique de protons servant de source d'énergie pour la synthèse d'ATP.

d) Des enzymes : amylase, lipase, peptidase etc...

IV. LE CYTOPLASME

C'est un **hydrogel colloïdal** (système dans lequel des particules très petites sont en suspension dans un fluide : sels minéraux, composés lipoprotéiques, nucléoprotéines), dont le pH est neutre (7-7,2) et d'aspect finement granulaire. Dépourvus d'organites délimités par une membrane, il contient des ribosomes et diverses inclusions.

1. Ribosomes

Les ribosomes sont le siège de la **synthèse protéique**. Plus petits que les ribosomes eucaryotes, ils sont constitués de deux sous-unités, 50S et 30S (Svedberg, unité du coefficient de sédimentation) et dissociables en l'absence d'ions Mg^{++} . Une seule cellule en contiendrait 50 000. Ces particules sont constituées de protéines et d'ARNr : ARNr16S pour la sous unité 30S et ARNr 23S et 5S pour la sous unité 50S.

2. Inclusions granulaires

a) **Substances de réserve organiques** : **glycogène** (polymère de glucose liés en alpha 1-4 et alpha 1-6 pour les ramifications) **amidon** mais aussi **polyhydroxybutyrate (PHB)** sont une forme de réserve du carbone synthétisée en cas de carence en azote (entérobactéries, *Clostridium* etc),

b) **Substances minérales** : fer (bactéries appelées *Sidérobactéries*), soufre (bactéries appelées *Thiobactéries*)

Granulations métachromatiques : ou **grains de volutine** sont constitués de **polyphosphates inorganiques**. Ils sont mis en évidence par la coloration d'Ernst Neisser ou par le bleu de toluidine ou de méthylène, prenant alors une teinte rouge (différente de celle du colorant d'où le terme de **métachromasie**). Leur rôle est mal connu (réserve, déchets, appareil paranucléaire, métabolisme du phosphore .. ?)

Chromatophores et pigments.

Dans le cas des bactéries photosynthétiques, les pigments chlorophylliens (bactériochlorophylle) et caroténoïdes sont localisés dans les chromatophores (équivalent des chloroplastes des plantes).

Chez les autres bactéries chromogènes (bactéries pigmentées) les pigments sont en solution dans les lipides bactériens.

Par exemple, *Halobacterium halobium* contient un pigment membranaire voisin des pigments rétinien, la bactériorhodopsine.

Il existe d'autres pigments : pyocyanine, violaceine, etc...

Vacuoles à gaz

Présentes chez les bactéries et les algues aquatiques et leur permettent de flotter, de descendre en dégonflant leurs vésicules et de monter en formant de nouvelles vésicules. Les vésicules sont délimitées par une membrane à un seul feuillet.

4. L'espace périplasmique

Situé entre la membrane cytoplasmique et la paroi, il contient des enzymes dont des enzymes de dégradation des substances permettant aux produits de cette dégradation de franchir la membrane cytoplasmique et des enzymes de résistance à certains antibiotiques.

V. LE NUCLÉOÏDE

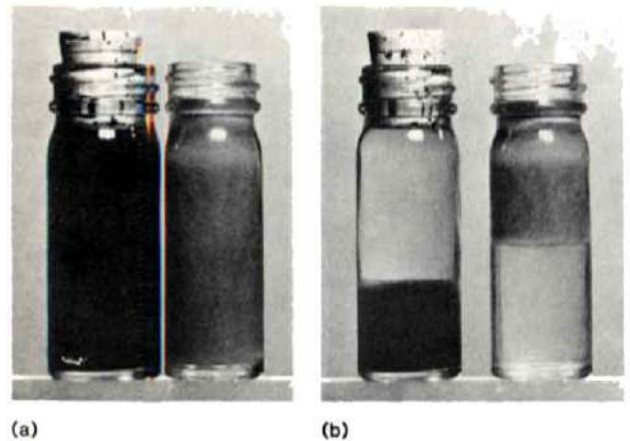
1. Mise en évidence

a) **au microscope optique** : par des techniques spécifiques, telles que la **réaction de Feulgen** (détection de l'ADN) :

hydrolyse ménagée de l'ADN par HCl dilué, libérant le désoxyribose et ses fonctions aldéhydes libres ajout de réactif de Schiff (fuschine décolorée par l'acide sulfureux ou le bisulfite de sodium) le désoxyribose recolore en rouge la fuschine. Cette coloration est localisée dans la cellule aux emplacements où se trouve de l'aldéhyde libre, donc où se trouve l'ADN du noyau. (l'ARN ne se colore pas par ce procédé)

ou bien par **destruction de l'ARN** cytoplasmique (par hydrolyse chimique ou enzymatique puis coloration par un colorant basique ordinaire, le Giemsa par exemple. Résultat : le cytoplasme est rose pâle, le nucléoïde violet)

b) **Avec d'autres microscopes** : à contraste de phase, à fluorescence, électronique



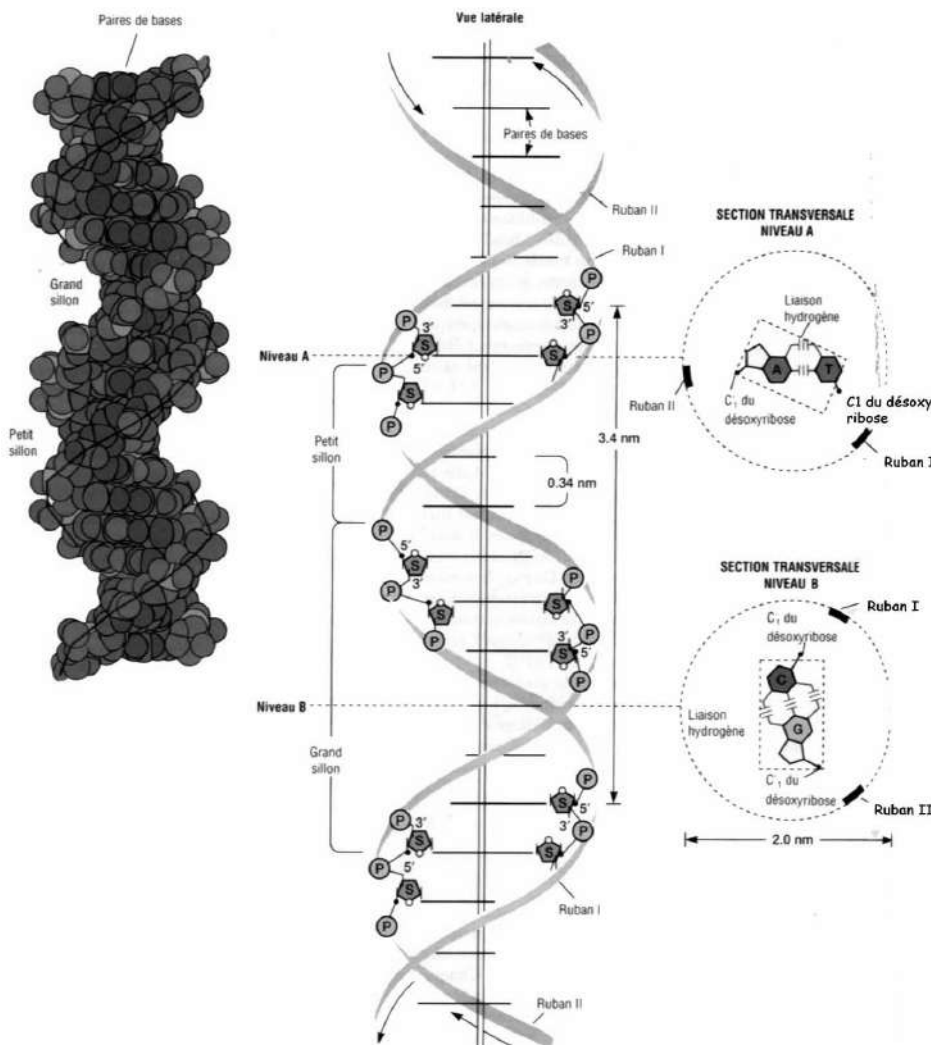
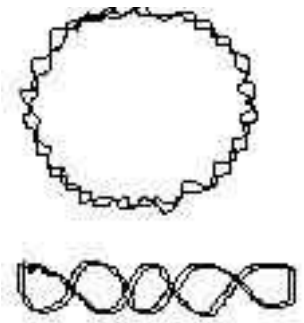
Les vacuoles gazeuses et la flottaison des bactéries. Une expérience à marteau et bouchon avec la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa*. (a) La bouteille remplie est fermée par un bouchon tandis que la bouteille contrôle est laissée ouverte. (b) Si on frappe le bouchon avec un marteau, les cyanobactéries s'enfoncent dans le fond. Dans la bouteille contrôle, les micro-organismes flottent à la surface.

2. Structure du nucléoïde

Il n'y a pas de membrane nucléaire comme chez les eucaryotes ni de nucléoles, et pas de phénomènes de mitose. Le plus souvent sa forme est irrégulière et diffuse.

Ce « noyau » est dénommé **appareil nucléaire** ou **corps nucléaire** ou **corps chromatinien** ou **nucléoïde**. Le nucléoïde bactérien est assimilé à un chromosome, 2 ou 4 éléments nucléaires pouvant être présents à un moment donné dans une même bactérie car la division nucléaire précède la division cellulaire c.à.d que le nucléoïde se divise plus vite que la cellule, surtout chez les bactéries jeunes. En culture âgée les cellules sont fréquemment « mononuclées ».

L'ADN bactérien a une **structure circulaire**, en **superhélice**, et est associé à des **protéines basiques** de type non histone, qui l'organisent en une structure enroulée de type chromatine. Il apparaît sous forme de filaments enchevêtrés, non ramifiés.

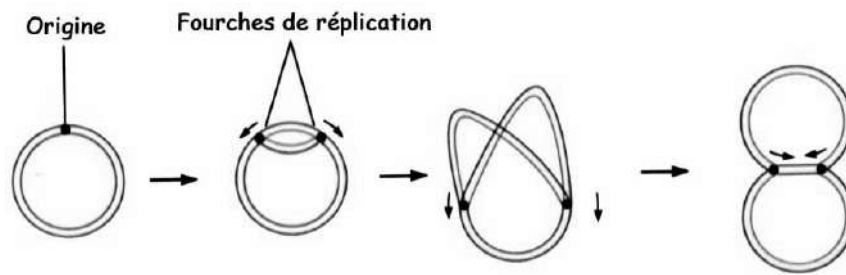


L'ADN bactérien est composé d'un enchaînement de **nucléotides** constitués de **désoxyribose**, d'un groupement **phosphate** et d'une **base purique ou pyrimidique**. Les bases puriques sont l'**adénine** et la **guanine**, les bases pyrimidiques sont la **cytosine** et la **thymine**. Les nucléotides sont reliés entre eux par des **liaisons phosphodiester** en 3' et 5' du désoxyribose. La molécule d'ADN est **bicaténaire**, les chaînes étant maintenues par des **liaisons hydrogène** entre bases complémentaires (3 liaisons H entre C et G et 2 liaisons H entre A et T).
 5'A-T-A-G-A-C-C-T-G-G-T-A-C-3'
 3'T-A-T-C-T-G-G-A-C-C-A-T-G-5'

- modèle compact
- schéma de la double hélice

Réplication

La réplication est le mécanisme au cours duquel une copie exacte d'ADN parental est synthétisée à partir d'une molécule parentale servant de matrice. Chez *E. coli*, elle a lieu selon un **mécanisme bidirectionnel** (mis en évidence par culture de *E. coli* sur un milieu contenant de la **thymidine tritiée** (marqueur de l'ADN))

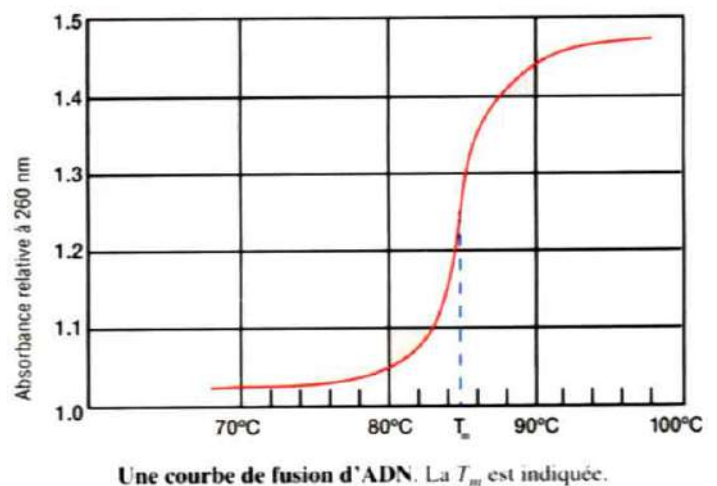


La réplication commence en un seul endroit, l'**origine**, puis deux **fourches de réplication** se déplacent à partir de l'origine jusqu'à ce qu'elles aient copié tout le **réplicon** (unité du génome qui contient une origine pour l'initiation de la réplication et dans laquelle l'ADN est répliqué). Lorsque les fourches se déplacent, on observe une structure en forme de **thêta θ**, puis les deux fourches se rencontrent et deux chromosomes séparés sont libérés.

Le mécanisme de la réplication est complexe et fait intervenir de nombreuses enzymes : il y a dans un premier temps une modification de la conformation de la molécule d'ADN (séparation des brins, déroulement de l'hélice par des **hélicases**) puis synthèse d'ADN (**polymérases**) et enfin reconstitution des molécules bicaténares (**ligases**).

Propriétés physiques de la molécule d'ADN.

Dénaturation : la dénaturation est la séparation de la molécule bicaténaire en deux brins, elle se produit sous l'action de la chaleur. L'ADN natif absorbe faiblement la lumière ultraviolette à 260 nm. Au cours de la dénaturation les liaisons hydrogène entre bases sont détruites, les brins se séparent et l'absorption U.V. augmente (effet **hyperchrome**) pour atteindre un plateau quand tout l'ADN est devenu simple brin. L'absorbance relative peut être suivie au spectrophotomètre pendant la dénaturation.



Le rapport $(G+C) / (A+T)$ (**coefficient de Chargaff**) ou le contenu en G+C (GC%) est un reflet de la séquence en base du génome.

Il varie avec les modifications de séquence comme suit : $GC\% = [(G+C) / (G+C+A+T)] \times 100$

Le GC% peut facilement être déterminé à partir de la température de fusion ou T_m de l'ADN. La rupture des paires GC, liées par trois liaisons hydrogène exige plus d'énergie que celle des paires AT, liées par deux liaisons hydrogène. Par conséquent, l'ADN ayant un contenu en G+C plus important aura plus de liaisons hydrogène et ses chaînes ne se sépareront qu'à des températures plus élevées. La température de fusion correspond à 50% de l'absorption maximale, c.a.d. quand l'ADN est à moitié dénaturé. Le GC% peut être facilement déterminé par mesure de la température de transition : **$GC\% = 2.44 \times (T_m - 69,4)$**

Le GC% a une grande importance en **taxonomie** :

- a) deux espèces bactériennes ayant des GC% différents n'ont pas de communauté génétique.
- b) deux bactéries ayant même GC% n'ont pas forcément les mêmes séquences nucléotidiques.

c) deux bactéries ayant des génomes identiques ont nécessairement le même GC%.

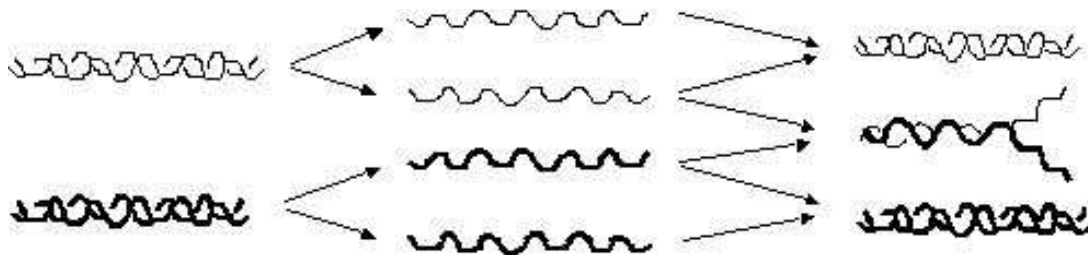
d) les bactéries appartenant à la même espèce ont le même GC%.

Hybridation ADN / ADN :

la similitude entre génomes peut aussi se comparer de façon directe par hybridation des acides nucléiques. Si on refroidit un mélange d'ADN simple brin formé par chauffage d'ADN double brin et si on le maintient à une température d'environ 25°C inférieure à sa T_m, les chaînes dont les séquences en bases sont complémentaires se réassocieront pour former de l'ADN bicaténaire stable tandis que des chaînes non complémentaires resteront simples. La renaturation est la ré association des brins d'ADN par refroidissement.

Des chaînes dont les séquences sont similaires mais non identiques s'associeront pour former des ADN double brin hybrides moins stables et l'incubation des mélanges à une température de 30 à 50 ° sous la T_m permettra la formation d'hybrides entre des ADN simple brin plus divergents. Une incubation à 10 - 15 °C sous la T_m permet seulement l'hybridation de chaînes presque identiques.

ADN fixé à la membrane	pourcentage d'homologie
<i>N. meningitidis</i>	100
<i>N. gonorrhoeae</i>	78
<i>N. sicca</i>	45
<i>N. flava</i>	35



→ La renaturation de deux brins homologues donne un duplex identique à la molécule bicaténaire d'origine.

→ La renaturation de deux brins d'ADN hétérologues donne un hétéroduplex présentant des séquences homologues.

→ Le pourcentage de ces séquences complémentaires par rapport aux séquences totales exprime le degré d'homologie entre les deux brins d'ADN.

L'hybridation est un outil taxonomique important à côté du GC% et de la taille du génome : on considère que deux souches d'une même famille bactérienne appartiennent à la même espèce lorsque leurs ADN s'hybrident à plus de 70%.

3. Plasmides

Ce sont des molécules d'ADN cytoplasmiques extrachromosomiques de petite taille, dotés de réplication autonome, circulaires, en superhélice, à deux brins, dont la structure est voisine de celle du « chromosome » bactérienne, pouvant parfois s'intégrer dans celui-ci. Ils ne sont pas nécessaires au développement ni à la reproduction de la bactérie, mais peuvent lui apporter des avantages sélectifs. Il existe de 1 à 20 copies de chaque plasmide selon sa taille.

Par exemple, le **plasmide F** ou facteur de fertilité est transmis au moyen d'un pilus sexuel, d'une bactérie F⁺ à une bactérie F⁻. Le **plasmide R** ou plasmide de résistance code pour la synthèse d'enzymes inactivant des antibiotiques, et peut aussi être transféré d'une bactérie à l'autre. On connaît actuellement plus de 1 000 plasmides différents pouvant donner de nouvelles possibilités métaboliques (lactose, raffinose, histidine, composés sulfurés), rendre pathogène les bactéries qui en sont porteuses (résistance aux antibiotiques, aux bactériophages, aux métaux lourds, production de toxine)

4. Transposons

Il s'agit de séquences nucléotidiques dites d'insertion pouvant se déplacer au sein du chromosome bactérien. La transposition est l'intégration au sein d'un génome d'un élément provenant de la même molécule d'ADN ou d'une autre molécule.

VI. LES COMPOSANTS EXTERNES DE LA PAROI BACTÉRIENNE

1. La capsule

a) composition : La capsule est un réseau de **polysaccharides** situé au delà de la paroi, pouvant aussi contenir d'autres substances (*Bacillus anthracis* a une capsule peptidique constituée d'acide poly D-glutamique) présentant une surface externe nettement définie, et formant une couche gélatineuse, pouvant entourer une cellule bactérienne isolée ou une file de cellules associées bout à bout. C'est une structure inconstante et non vitale pour la bactérie (un pneumocoque sans capsule reste vivant, et forme une nouvelle capsule dans un milieu neuf). Les composants de la capsule varient selon les souches, ce qui entraîne des spécificités antigéniques différentes à la base de la classification en types capsulaires distincts et utilisés comme marqueurs épidémiologiques (antigène K de *E. coli*).

Elle peut être vue à l'état frais après **coloration à l'encre de chine** ou par la **réaction de gonflement** (réaction de Neufeld) à l'aide d'anticorps spécifiques et observation en contraste de phase.

b) rôles : la capsule permet l'adhérence de la bactérie sur les tissus animaux et la résistance à la phagocytose (elle constitue donc un facteur de virulence), empêchent la fixation des bactériophages et la pénétration de certains antibiotiques et confèrent une certaine résistance aux agressions physico-chimiques comme la dessiccation (car elle est riche en eau) ou aux détergents

2. Les couches mucoïdes ou "slimes"

Ce sont des couches de substance glycoprotéiques diffuses, non organisées et que l'on peut facilement enlever par simple mise en suspension dans l'eau. Dans certaines espèces les souches donnant des colonies muqueuses possèdent un antigène M. Les souches M de *Pseudomonas aeruginosa* produisent un polysaccharide constitué d'acide alginique (polymère de mannuronate et de glucuronate), celles de *Escherichia coli* d'acide cholanique.

3. Le glycocalyx

Le glycocalyx est un réseau de polysaccharides recouvrant la surface des bactéries. Chez *Pseudomonas aeruginosa* les chaînes latérales O, de grande longueur, du LPS constituent le glycocalyx. Il permet l'attachement des bactéries sur des surfaces solides dans des environnements aquatiques et sur les tissus.

Remarque: le glycocalyx peut avoir un sens plus large et signifier toute production polysaccharidique exocellulaire (capsule et couches muqueuses).

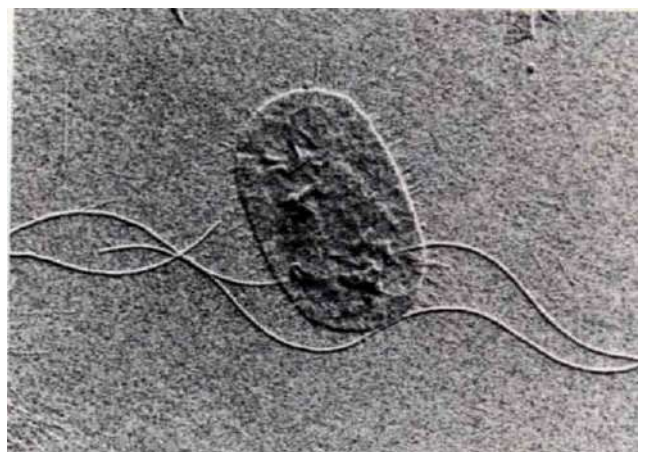
4. Couche S : C'est une couche régulièrement structurée à la surface de nombreuses bactéries Gram + et Gram -. Elle est composée de protéines et de glycoprotéines, et forme un pavement régulier, qui protégerait la cellule contre les fluctuations ioniques, les variations de pH, le stress osmotique les enzymes ou la bactérie prédatrice *Bdellovibrio*.

6. Les pili et fimbriae

Ce sont de courts appendices, extrêmement fins, visibles uniquement en microscopie électronique, leur diamètre étant de l'ordre de 3-10 nm. Ils ne sont présents que chez les bactéries Gram-.

Les pili communs ou **fimbriae** : responsables de l'adhérence sur différents supports inertes ou vivants. Ils font partie des antigènes K (ex : antigènes K₈₈ et K₉₉ de *E. coli*).

Les **pili sexuels** de nature protéique (constitués de piline) sont moins nombreux et plus gros que les fimbriae. Ils sont nécessaires à la conjugaison et peuvent servir de récepteurs aux bactériophages.



7. Les flagelles

Ce sont les **appendices locomoteurs** des bactéries mobiles, qui s'étendent à l'extérieur de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire (**absents chez les coques**).

Ce sont des structures **minces**, d'environ 20 nm de diamètre et 15 à 20 µm de long. Les flagelles sont observés après **coloration** par des techniques spéciales qui augmentent leur épaisseur.

a) Répartition des flagelles : très utile à l'identification des bactéries :

Les bactéries **monotriches** (du grec trikhos, cheveu) ont un seul flagelle ; s'il est situé à une extrémité, on le dit **polaire** (*Vibrio cholera*)

Les bactéries **amphitriches** ont à chaque extrémité, un seul flagelle (*Bacillus megatherium*)

au contraire, les bactéries **lophotriches** (en grec lophos veut dire touffe) ont une touffe de flagelles à l'une ou aux deux extrémités (*Spirillum volutans*)

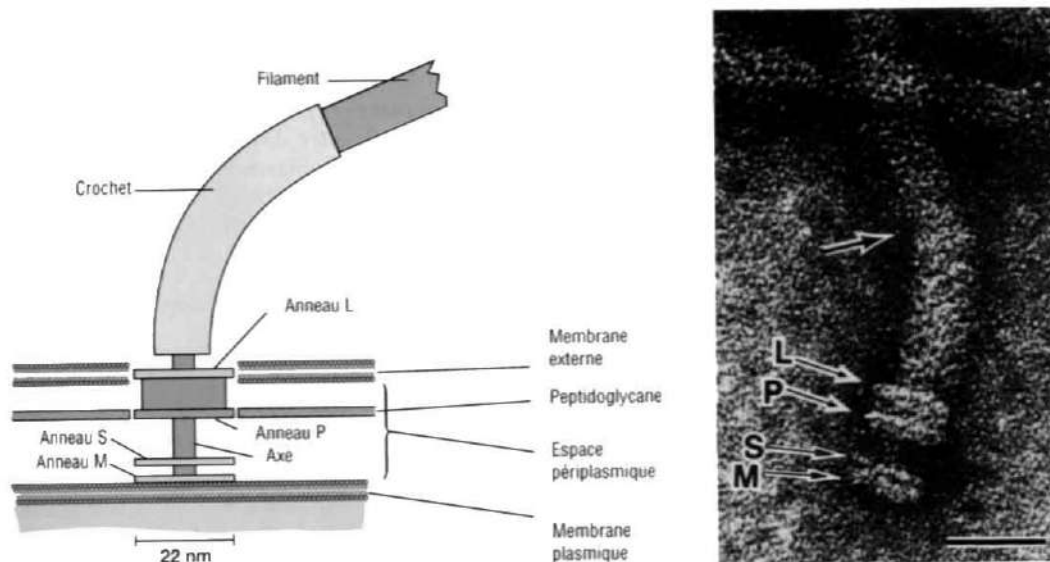
Les flagelles sont distribués sur toute la surface des bactéries **péritriches** (*Proteus vulgaris*, *S. typhi*)

b) Structure détaillée d'un flagelle : elle ne s'observe qu'au microscope électronique. Le flagelle bactérien se compose de trois parties :

la partie la plus longue, le **filament** s'étend depuis la surface cellulaire ; c'est un cylindre creux constitué d'une seule protéine appelée flagelline dont la masse moléculaire varie de 30 000 à 60 000.

un **corps basal** est enfoui dans la cellule

un segment court et courbe, le **crochet**, qui lie le filament au corps basal.

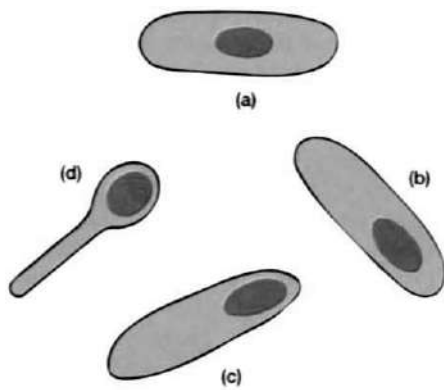


c) Fonctionnement du flagelle : le flagelle est « un moteur rotatif » propulsant la bactérie à la vitesse d'environ 20 µm.s⁻¹. Il tourne à gauche à environ 60 cycles par seconde, le corps bactérien tournant à droite à environ 6 cycles.s⁻¹. L'énergie nécessaire à la rotation provient du gradient de protons. Il faut un flux entrant de 256 protons pour faire tourner le flagelle de 1 tour.

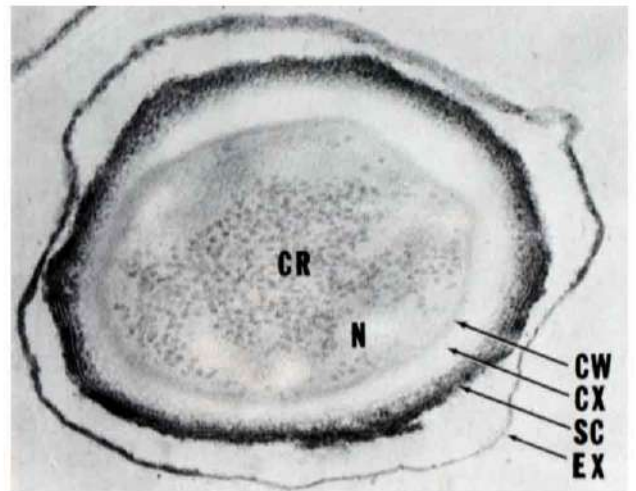
d) Le chimiotactisme : les bactéries mobiles sont attirées par certaines substances (sucres, acides aminés → chimiotactisme positif) et repoussées par d'autres (acides, bases, phénols → chimiotactisme négatif). Il existe des chémorécepteurs comparant les concentrations en substrat dans le milieu extérieur au cours du temps et capables de créer un signal intracellulaire à destination du flagelle.

7. L'endospore

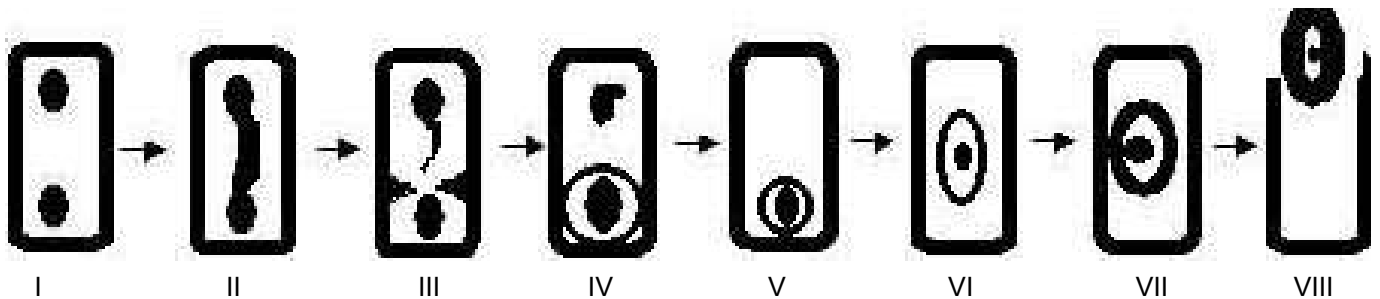
a) Définition : Un certain nombre de bactéries Gram + (genre *Bacillus*, *Clostridium* et *Plectridium*) acquièrent une structure spéciale, résistante, dormante, à l'intérieur de la cellule végétative, appelée endospore. C'est une forme de vie au ralenti, sans multiplication, ni métabolisme (état de cryptobiose), qui se forme lorsque le milieu est appauvri en nutriments ou dans des conditions physiques défavorables.



Exemples de localisation et de taille des endospores. (a) Spore centrale. (b) Spore subterminale. (c) Spore terminale. (d) Spore terminale avec sporange gonflé.



La structure d'une endospore. Endospore de *Bacillus anthracis* (x 151.000). Notez les structures suivantes : exosporium, EX; tunique SC; cortex, CX; paroi de la spore CW; le protoplasme avec son nucléoïde, N, et les ribosomes CR.



b) Étapes de la sporulation :

Sporulation : 7 étapes d'environ une heure :

étape 1 : formation d'un filament axial par assemblage des deux nucléoïdes de la cellule végétative. La cellule produit des antibiotiques (bacitracine, bacilysine) et des enzymes (ribonucléase, amylase, protéase).

étape 2 : formation du septum transversal par invagination de la membrane. Apparition d'alanine deshydrogénase qui pourrait jouer un rôle dans la germination.

étape 3 : individualisation de la spore : formation de la préspore. Certaines enzymes acquièrent de nouvelles propriétés (exemple : la catalase devient résistante à la chaleur).

étape 4 : formation du cortex par accumulation d'acide picolinique et de calcium ; la spore devient très réfringente.

étape 5 : synthèse de protéines à l'origine des tuniques

étape 6 : étape de maturation avec acquisition de toutes les propriétés de thermorésistance.

étape 7 : destruction du sporange par des enzymes lytiques et libération de la spore

c) Propriétés de la spore :

Thermorésistance : les spores résistent plusieurs dizaines de minutes à 80 °C, parfois 8 heures à 100 °C et même 5 minutes à 120°C (problème de stérilisation : nécessité de chauffer à 120°C pendant 20 min, en chaleur humide). Le dipicolinate (associé au Ca^{++}) joue un rôle essentiel : il rend la spore imperméable et conserve l'état déshydraté favorable à la résistance des protéines et des acides nucléiques à la dénaturation. (*B. subtilis* : 30 min à 120°C). Elles résistent très bien au froid (-70°C), à la lyophilisation)

Résistance aux agents physico-chimiques : résistance aux U.V., R.X, hautes pressions, antiseptiques, antibiotiques, à la dessiccation etc.

d) La germination :

dans des conditions favorables (humidité, chaleur...), la spore peut être activée et donner naissance à une cellule végétative. La spore doit être activée par un agent capable de léser la tunique sporale : choc, chaleur, acidité. Le moyen le plus utilisé est le chauffage entre 65 et 95°C (ex : tyndallisation). La germination ne commence qu'en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites effecteurs (alanine, adénosine) qui déclenche un phénomène autolytique.

On observe une destruction du cortex, une perte de la réfringence, une sensibilité à la chaleur, une excrétion de calcium, de dipicolinate et de peptidoglycane du cortex puis une reprise métabolique. La spore se libère des tuniques après rupture de celles-ci et donne une nouvelle cellule végétative.

CELLULE PRIMITIVE

Tous les organismes sont issus d'une cellule primitive, apparue il y a quelques milliards d'années, qui, par le processus de l'évolution, a permis l'émergence des premières bactéries, puis des végétaux et des animaux. La première cellule était un organisme très simple : une membrane, de l'ADN, support de l'information génétique, de l'ARN, intermédiaire de liaison entre l'ADN et les protéines, responsables de la majeure partie des fonctions cellulaires.

Puis, il y a environ 1.5 milliard d'années, une évolution majeure s'est produite : le passage des cellules procaryotes (type de cellule ne possédant pas de noyau véritable ni d'organites entourés d'une membrane ; *pro* signifie « primitif, avant » et *caryon* signifie « noyau ») aux cellules eucaryotes (type de cellule renfermant un noyau contenu dans une enveloppe nucléaire et des organites entourés d'une membrane ; *eu* signifie « vrai »), complexifiant ainsi la structure interne des cellules, entraînant aussi une augmentation de la taille des cellules : 10 à 30 µm en moyenne pour les cellules animales, 10 à 100 µm pour les cellules végétales et 0.1 à 10 µm pour les cellules procaryotes.

LA NUTRITION BACTERIENNE

Pour obtenir de l'énergie et construire de nouveaux constituants cellulaires, les organismes doivent avoir une source de matériaux de base ou nutriments.

95% du poids sec de la cellule sont composés de quelques éléments majeurs : **carbone, oxygène, hydrogène, azote, soufre, phosphore, potassium, calcium, magnésium et fer**. Ceux-ci sont nécessaires aux micro-organismes en quantités importantes et sont appelés **macro éléments** ou **macro nutriments**.

- Les six premiers éléments (**C, O, H, N, S et P**) sont des constituants des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

Les quatre derniers éléments existent dans la cellule à l'état de cations et jouent plusieurs rôles :

- Le **potassium** (K^+) est nécessaire à l'activité de plusieurs enzymes y compris celles qui interviennent dans la synthèse protéique
- Le **calcium** (Ca^{2+}) a de nombreuses fonctions dont l'une est de contribuer à la thermorésistance des endospores bactériennes
- Le **magnésium** (Mg^{2+}) est un cofacteur de nombreuses enzymes, il forme un complexe avec l'ATP, stabilise les ribosomes et les membranes cellulaires
- Le **fer** (Fe^{2+} et Fe^{3+}) est utilisé dans la synthèse des cytochromes et est un cofacteur des enzymes et des protéines transporteuses d'électrons.

Tous les micro-organismes ont aussi besoin de quelques **oligo-éléments** (**micro-éléments** ou **micro nutriments**) - **manganèse, zinc, cobalt, molybdate, nickel, cuivre** -, indispensables en quantité très faible (les impuretés de l'eau, la verrerie et les composants habituels des milieux de culture sont généralement suffisants). Il est donc très difficile de démontrer les besoins en oligo-éléments de la croissance.

Les oligo-éléments font normalement partie des enzymes et des cofacteurs, ils aident à la catalyse des réactions et au maintien de la structure des protéines. Par exemple, le zinc (Zn^{2+}) se trouve dans le site actif de quelques enzymes, le manganèse (Mn^{2+}) peut aider beaucoup d'enzymes qui catalysent le transfert de groupes phosphate. Le molybdène (Mo^{2+}) est requis pour la fixation de l'azote et le cobalt (Co^{2+}) est un composant de la vitamine B₁₂.

Les éléments sont parfois classés différemment selon les besoins nutritifs. Les éléments majeurs (C, O, H, N, S, P) sont requis à des concentrations exprimées en grammes par litre de milieu de culture, celles des éléments mineurs (K, Ca, Mg, Fe) en milligrammes et celles des oligo-éléments (Mn, Zn, Co, Mo, Ni, Cu) en microgrammes.

LES DIFFÉRENTS TYPES TROPHIQUES

Tout organisme a besoin de :

Carbone, nécessaire à la formation du squelette de toutes les molécules organiques,

Energie, pour le métabolisme, les bactéries utilisent de l'énergie sous forme de molécules **d'ATP** : ces molécules « riches en énergie » c.à.d. à liaison à énergie d'hydrolyse élevée ou à potentiel élevé de transfert de groupement phosphate sont synthétisées au cours de réactions d'oxydoréduction,

Hydrogène et d'électrons pour sa croissance.

Les types trophiques sont définis en fonction de ces besoins.

1. Classification selon la source d'énergie

Il y a seulement deux sources d'énergie disponibles pour les organismes :

L'énergie lumineuse (captée durant la **photosynthèse**) est utilisée par les **phototrophes**.

L'énergie provenant de l'**oxydation** de **molécules organiques** et/ou **minérales** est utilisée par les **chimiotrophes**.

2. Classification selon la source d'électrons / hydrogène

Les micro-organismes ont seulement deux sources d'atomes d'hydrogène ou d'électrons :

Les **substances minérales réduites** (H_2 , H_2S , S_2) sont utilisées comme source d'électrons par les **lithotrophes** (« mangeurs de pierres ») (ex: *Thiorhodaceae* (bactéries sulfureuses pourpres))

Les **substances organiques réduites** sont utilisées comme source d'électrons par les **organotrophes** (ex: *Athiorhodaceae* (bactéries non sulfureuses pourpres))

3. Classification selon la source de carbone

Les besoins en carbone, hydrogène et oxygène sont souvent satisfaits ensemble, les mêmes molécules servant à la fois de source de carbone et d'hydrogène)

Les **autotrophes** utilisent le CO₂ comme unique ou principale source de carbone Mais comme il est oxydé et ne contient pas d'hydrogène. il faut à ces organismes une autre source d'hydrogène et d'électrons. Beaucoup de micro-organismes sont autotrophes, ils sont généralement photo et chimiolithotrophes.

La réduction du CO₂ est un processus très coûteux en énergie. Ainsi de nombreux micro-organismes ne peuvent pas utiliser le CO₂ comme seule source de carbone, mais dépendent aussi de molécules complexes plus réduites.

Les **hétérotrophes** utilisent des **molécules organiques préformées** réduites, comme sources de carbone sont (ces molécules provenant d'autres organismes). De nombreux hétérotrophes utilisent des aliments organiques à la fois comme sources de carbone et d'énergie. Les bactéries chimioorganotrophes sont toutes hétérotrophes

Remarque : Une des caractéristiques les plus remarquables des besoins nutritifs des micro-organismes est leur extraordinaire flexibilité en ce qui concerne les sources de carbone. Il n'y a pas de molécule organique naturelle qui ne puisse être utilisée par certains micro-organismes. Les actinomycètes sont capables de dégrader l'alcool amylique, la paraffine et même le caoutchouc. Certaines bactéries utilisent à peu près n'importe quoi comme source de carbone; par exemple, *Pseudomonas cepacia* consomme plus de 100 substances carbonées différentes. Malheureusement, de nombreux produits fabriqués par l'homme, comme les plastiques et le DTT, ne sont pas ou très lentement dégradés. Au contraire des bactéries omnivores, certaines bactéries sont difficiles à cultiver et utilisent un nombre très limité de sources de carbone. Les bactéries méthylotrophes utilisent seulement le méthane, le méthanol, le monoxyde de carbone, l'acide formique et quelques molécules voisines. Les membres parasites du genre *Leptospira* n'utilisent que des acides gras à longue chaîne comme sources principales de carbone et d'énergie.

Selon le nombre de composés organiques nécessaires à la croissance, on distingue les bactéries **prototrophes** et les bactéries **auxotrophes** :

Les bactéries **prototrophes** sont capables de se développer avec une seule source de carbone (ex: *E. coli*, *Pseudomonas*, etc....)

Les bactéries **auxotrophes** sont incapables de synthétiser certains **métabolites essentiels**. Ceux-ci être fournis par le milieu de culture, ce sont des **facteurs de croissance** (ex: *P. vulgaris*, *Lactobacillus*, etc...). Le besoin en un acide aminé spécifique est une forme commune d'auxotrophie. L'obtention d'auxotrophes est très utile en génétique microbienne.

PRINCIPAUX TYPES NUTRITIONNELS	SOURCES D'ÉNERGIE, HYDROGÈNE/ÉLECTRONS ET CARBONE	MICRO-ORGANISMES REPRÉSENTATIFS
Autotrophes photolithotrophes	Énergie lumineuse Donneur inorganique d'hydrogène/électrons CO ₂ comme source de carbone	Algues Bactéries sulfureuses pourpres et vertes Cyanobactéries
Hétérotrophes Photo-organotrophes	Énergie lumineuse Donneur organique d'hydrogène/électrons Source organique de carbone (CO ₂ peut aussi être utilisé)	Bactéries non sulfureuses pourpres Bactéries non sulfureuses vertes
Autotrophes chimiolithotrophes	Source chimique d'énergie (inorganique) Donneur inorganique d'hydrogène/électrons CO ₂ comme source de carbone	Bactéries oxydant le soufre Bactéries oxydant l'H ₂ Bactéries nitrifiantes Bactéries du fer
Hétérotrophes Chimio-organotrophes	Source chimique d'énergie (organique) Donneur organique d'hydrogène/électrons Source organique de carbone	Protozoaires Mycètes La plupart des bactéries non photosynthétiques

Remarque : Bien qu'une espèce bactérienne particulière appartienne généralement à une des quatre catégories nutritionnelles, certaines montrent une grande flexibilité métabolique et peuvent modifier leurs voies métaboliques

en réponse à des changements de l'environnement. Par exemple, de nombreuses bactéries pourpres non sulfureuses peuvent agir comme des hétérotrophes photo-organotrophes en absence d'oxygène, mais peuvent oxyder des molécules organiques et se comporter comme des chimiotrophes en présence d'une concentration normale en oxygène. Quand la quantité d'oxygène est faible, la photosynthèse et le métabolisme oxydatif peuvent fonctionner simultanément. Cette flexibilité semble à première vue complexe, elle donne pourtant à l'organisme un avantage certain si les conditions de l'environnement se modifient souvent.

Source d'azote

L'azote est nécessaire à la synthèse des acides aminés, des purines, des pyrimidines, de certains glucides et lipides, de cofacteurs enzymatiques et d'autres substances

Certaines bactéries sont capables de fixer l'azote moléculaire (ex: *Rhizobium*, bactéries vivant en symbiose avec certaines légumineuses et leur permettent de fixer N_2). Dans la plupart des cas, les bactéries incorporent l'azote sous forme de sels ammoniacaux après réduction de composés inorganiques (NO_3^- , NO_2^-)

Autres besoins trophiques

Phosphore : il y a du phosphore dans les acides nucléiques, les phospholipides, les nucléotides comme l'ATP, quelques cofacteurs, certaines protéines et d'autres composants cellulaires. Presque tous les micro-organismes utilisent le phosphate inorganique comme source de phosphore et l'incorporent directement. Certains micro-organismes (ex. *E. coli*) acquièrent de façon active le phosphate de l'environnement. De faibles niveaux de phosphate limitent la croissance microbienne dans beaucoup de milieux aquatiques.

Soufre : le soufre est nécessaire à la synthèse de substances comme la cystéine et la méthionine qui sont des acides aminés, quelques glucides, la biotine et la thiamine. Les micro-organismes pour la plupart, utilisent le sulfate comme source de soufre et le réduisent, ils l'assimilent donc par réduction anabolique du sulfate ; certains exigent une forme réduite du soufre comme par exemple, la cystéine.

Les facteurs de croissance

4. Mise en évidence expérimentale :

Soit trois milieux nutritifs :

milieu A : milieu minimum (glucose, NH_4^{+} , sels minéraux).

milieu B : milieu minimum + nicotinamide

milieu C : minimum + extrait d'*E. coli*

croissance de *E. coli* et *Proteus vulgaris* :

	milieu A	milieu B	milieu C
<i>E. coli</i>	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	-	+	+

→ Les bactéries **prototrophes**, comme *E. coli*, sont capables de croître sur milieu minimum.

→ Les bactéries **auxotrophes**, incapables de croître sur milieu minimum, exigent une concentration suffisante des molécules organiques qu'elles sont incapables de synthétiser. Ces molécules sont des facteurs de croissance. Ces bactéries sont auxotrophes pour le ou les facteurs de croissance considérés.

5. Définition et classification

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

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

les **acides aminés**, nécessaires à la synthèse protéique (besoins de l'ordre de 10 mg.L^{-1})

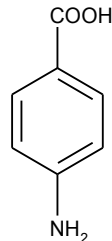
les **purines** et les **pyrimidines**, nécessaires à la synthèse des acides nucléiques (acides aminés, bases puriques et pyrimidiques, certains acides gras sont des **métabolites de structure**)

les **vitamines**, petites molécules organiques qui généralement forment les cofacteurs ou une partie de ceux-ci, nécessaires en très faible quantité pour la croissance (besoins $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$). (Ex. : **NAD** ou **NADP** très utilisé dans de nombreuses réactions de déshydrogénation. **hématine** (facteur X) entre dans la composition des hémoprotéines impliquées dans les processus respiratoires).

Remarque : Les **antimétabolites** sont des substances qui en raison de leur analogie structurale avec un facteur de croissance, se substituent à lui, entravant le métabolisme et entraînant l'arrêt de la croissance des bactéries exigeantes (**inhibiteur compétitif**).

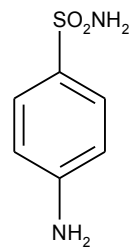
Exemple : l'acide para-aminobenzoïque intervenant dans certaines synthèses est un facteur de croissance pour certaines bactéries. Le PAB sulfanilamide (PAS) est un analogue structural qui agit comme un antimétabolite.

Acide para-aminobenzoïque



PAB

para-aminobenzène sulfanylamide PAS



Il peut exister des inhibiteurs pour certaines bactéries dont l'action peut être levée par d'autres molécules qui, sans être réellement des facteurs de croissance, les neutralisent et favorisent la croissance.

Certains composés, comme par exemple la cystéine, agissent en captant certains ions toxiques. Ces substances sont plutôt des **adjuvants** de la croissance.

6. Applications

dosage microbiologique : la connaissance des besoins spécifiques en facteurs de croissance de nombreux micro-organismes, permet le dosage d'une variété de substances.

a) dosage en milieu liquide : des espèces des genres bactériens *Lactobacillus* et *Streptococcus* peuvent être utilisées pour doser la plupart des vitamines et des acides aminés : la bactérie appropriée, auxotrophe pour la substance à doser, est cultivée dans une série de flacons, chacun contenant du milieu et un excès de tous les composés requis excepté le facteur de croissance étudié. Une quantité variable du facteur de croissance est ajoutée à chaque flacon, et on obtient une courbe standard en portant la concentration du facteur de croissance en fonction de la croissance bactérienne.

Idéalement, le rendement atteint par la culture est directement proportionnel à la quantité du facteur de croissance présente : si la concentration du facteur de croissance double, le rendement double. **La quantité de facteur de croissance dans un échantillon est donc déterminée en comparant le rendement dans l'échantillon inconnu à ceux dit standard.** Les dosages microbiologiques sont spécifiques, sensibles et simples. Ils sont toujours utilisés pour des substances telles que la vitamine B₁₂ et la biotine, en dépit des progrès des techniques chimiques.

Remarque : Pour les faibles concentrations en facteur de croissance, la croissance s'arrête lorsque le facteur de croissance est épuisé. Au-delà d'une certaine concentration le facteur de croissance n'est plus le facteur limitant de la croissance

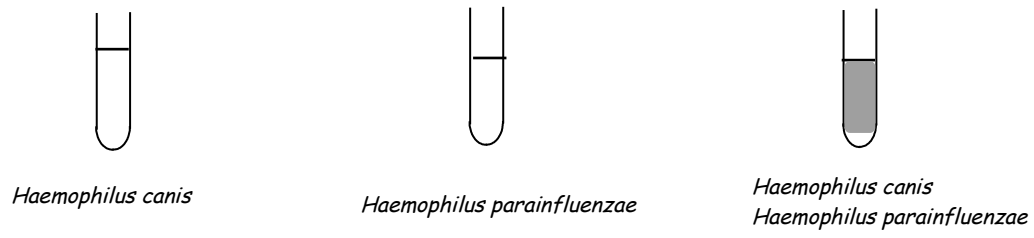
b) Dosage en milieu solide : la souche auxotrophe est ensemencée sur un milieu ne contenant pas de facteur de croissance. Des disques de papier contenant différentes quantités de facteur de croissance sont déposés sur la surface de la gélose. Un volume connu de l'échantillon à doser est déposé sur un disque. Après un temps d'incubation suffisant, on mesure le diamètre des zones de croissance autour des disques.

Taxinomie : les exigences nutritives de certaines bactéries conduisent à choisir des milieux suffisamment riches pour les isoler (ex: gélose au sang pour les streptocoques). Lorsque les exigences sont constantes pour un groupe bactérien donné, on peut les utiliser comme critères de classification (ex: *Haemophilus* petits bacilles gram-négatifs soit l'hémine (facteur X) soit le NAD (facteur V) soit les deux)

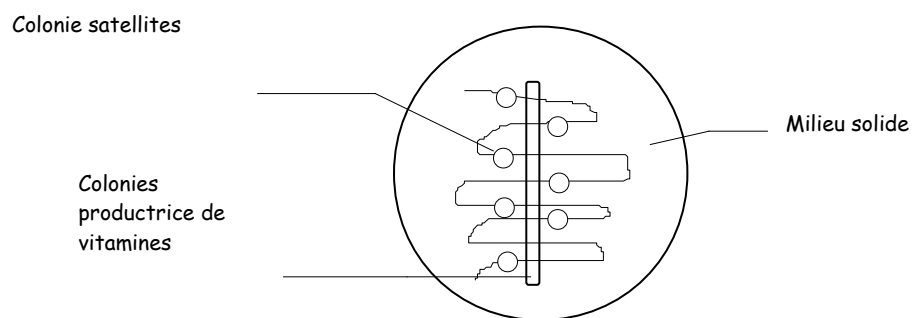
Phénomène de syntrophie : c'est une interaction métabolique, lorsque les besoins en facteurs de croissance d'une espèce microbienne sont satisfaits par la présence d'une autre espèce qui synthétise ces facteurs.

culture en bouillon peptoné

Syntrophie en milieu liquide



Sur milieu solide on parle de satellitisme :



METABOLISME ENERGETIQUE

Une cellule a besoin d'énergie pour maintenir ses structures cellulaires, effectuer ses biosynthèses, se mouvoir et se multiplier ; elle transforme donc une forme d'énergie en une autre. L'énergie se définit comme la capacité d'accomplir un travail ou celle de provoquer des changements particuliers. Les organismes vivants sont capables de 3 types principaux de travail : **travail chimique** (biosynthèses), **travail de transport** (transport actif, sécrétion), **travail mécanique** (mouvement).

GÉNÉRALITÉS

f. Définitions

Le **métabolisme** cellulaire est l'**ensemble des réactions chimiques qui ont lieu dans la cellule**, i.e. des réactions chimiques exergoniques (libérant de l'énergie ou spontanées, $\Delta G < 0$) et endergoniques (consommant de l'énergie ou non spontanées, $\Delta G > 0$, avec $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). L'oxydation des molécules libère de l'énergie (mise en réserve sous une forme facilement utilisable, l'ATP) tandis que la synthèse des molécules ou leur transport en réclame.

L'**anabolisme** est l'**ensemble des réactions chimiques consommatrices d'énergie** (endergoniques), **aboutissant à la biosynthèse de molécules à partir de précurseurs simples**. Par exemple, l'anabolisme des protéines correspond à leur synthèse à partir des acides aminés.

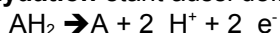
Le **catabolisme** est l'**ensemble des réactions chimiques pourvoyeuses d'énergie** (exergoniques), **aboutissant à la dégradation des molécules** (le catabolisme des protéines correspond à leur dégradation en acides aminés).

2. Les principaux processus de la production d'énergie chez les microorganismes

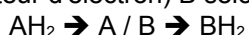
La **récupération d'énergie** est toujours liée à des **transferts d'électrons correspondant à des processus d'oxydoréduction** (*oxydant + $ne^- \rightleftharpoons$ réducteur ; réducteur = donneur d'électrons ; oxydant = accepteur d'électrons*), **nécessitant des transporteurs d'électrons**, des molécules possédant le potentiel de réduction le plus négatif vers celles possédant le potentiel de réduction le plus positif. **L'énergie libérée durant le transfert des électrons est piégée sous forme d'ATP.**

Les substrats organiques susceptibles d'être oxydés sont, en général, des **molécules hydrogénées** (soit AH_2), leur oxydation correspond à une **déshydrogénation** selon l'équation : $AH_2 \rightarrow A + 2(H)$

Une **oxydation** étant aussi définie par une **perte d'électron** par un substrat, on préférera écrire :



Les électrons libres, n'ayant qu'une existence très éphémère, doivent être pris en charge par un oxydant (accepteur d'électron) B selon l'équation :



L'énergie libérée par ces réactions est récupérée de **manière progressive** afin de limiter la quantité de chaleur dégagée et d'assurer le **rendement le plus élevé possible**.

Les réactions d'oxydation s'arrêtent obligatoirement lorsque toutes les molécules de coenzymes transporteurs se trouvent à l'état **réduit**. Il est possible d'identifier plusieurs voies métaboliques selon le trajet suivi par les électrons et la nature de l'oxydant (accepteur d'électrons) final :

a) La respiration aérobie, avec transfert des électrons par des cytochromes jusqu'à l'oxygène moléculaire comme accepteur final.

b) La respiration anaérobie, avec transfert des électrons par voie cytochromique jusqu'à un accepteur final qui peut être un ion minéral comme le nitrate ou un substrat organique comme le fumarate.

c) La fermentation, qui se produit uniquement en anaérobiose sans intervention des cytochromes et où l'accepteur final des électrons est un composé organique oxygéné.

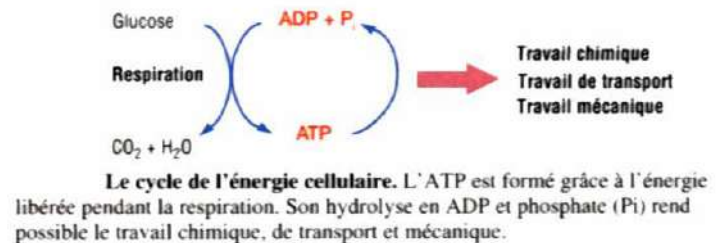
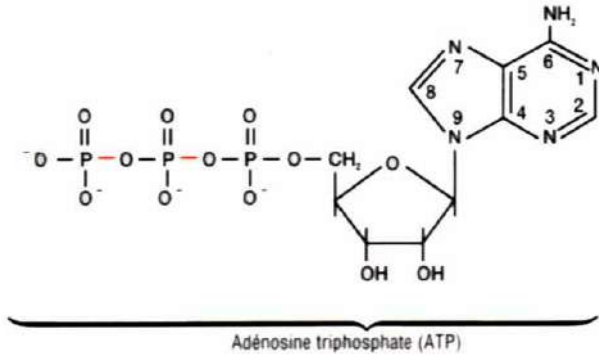
Remarques :

la respiration correspond à l'oxydation complète des substrats organiques en composés minéraux, tels CO_2 et H_2O ; elle fournit une grande quantité d'ATP (36 pour une molécule de glucose)

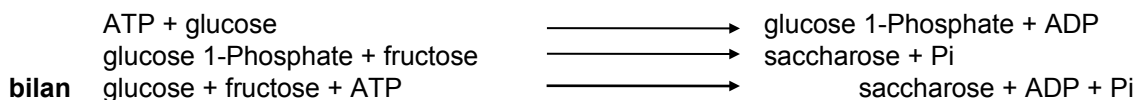
la fermentation est la dégradation incomplète des substrats, aboutissant à la formation de composés organiques résiduels (acide lactique par exemple), et à la formation d'une moins grande quantité d'ATP (2 seulement pour une molécule de glucose)

3. Le rôle de l'ATP dans le métabolisme

Un intermédiaire est nécessaire pour coupler les réactions exergoniques aux réactions endergoniques. L'énergie provenant du système de capture et de production d'énergie doit être efficacement transférée aux systèmes réalisant un travail. Les composés « riches en énergie » (dérivés phosphorylés ayant une liaison anhydride (ATP, ADP, GTP, GDP...) ou une liaison émol (phosphoénolpyruvate), les composés comportant une liaison thio-ester (acétylCoA)) sont de tels intermédiaires, l'hydrolyse du groupement phosphate terminal s'accompagne d'une grande variation d'énergie libre négative (29 KJ par mole dans les conditions standard pour l'ATP). Ils interviennent comme agents de couplage.



L'énergie est donc mise en réserve au sein de liaisons covalentes qui peuvent s'hydrolyser facilement, les liaisons à énergie d'hydrolyse élevée. Par exemple, la synthèse du saccharose se déroule de la façon suivante :



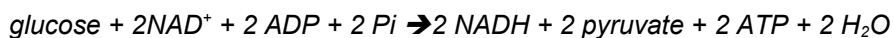
Les réactions de phosphorylation se font soit dans le cytoplasme (phosphorylation au niveau du substrat), soit au niveau de la membrane cytoplasmique (phosphorylation oxydative ou oxydation phosphorylante).

SCHÉMA DE L'OXYDATION DU GLUCOSE (SUBSTRAT ÉNERGÉTIQUE TYPE)

1. Dégradation du glucose en pyruvate (cf. cours de biochimie)

Les microorganismes utilisent plusieurs voies pour dégrader le glucose et d'autres oses :

voie glycolytique d'Embden-Meyerhof ou voie des hexoses diphosphates conduit à la production de deux NADH et de deux ATP par l'intermédiaire du fructose 1,6-bisphosphate. Cette fonctionne en présence ou en absence de O₂. Les ATP sont synthétisés par phosphorylation au niveau du substrat :



voie de Dickens-Horecker ou voie des hexoses monophosphates ou voie des pentoses phosphates : le glucose 6-phosphate est oxydé deux fois et converti en pentose et autres glucides. C'est une source de NADPH, d'ATP, de pentoses et de tétroses.

voie d'Entner-Doudoroff ou voie du 2-céto-3-déoxygluconate (voie particulière aux micro-organismes), le glucose est oxydé en 6-phosphogluconate qui est ensuite déshydraté et clivé en pyruvate et glycéraldéhyde 3-phosphate. Ce dernier peut être oxydé par les enzymes glycolytiques pour fournir de l'ATP et du NADH

Par phosphorylation au niveau du substrat il y a 2 molécules d'ATP formées par la voie A, une par la voie B et aucune par la voie C.

2. Cycle de Krebs (cycle des acides tricarboxyliques)

Chez les bactéries aérobies, l'oxydation complète du pyruvate en CO₂ se fait par le cycle de Krebs dont les enzymes sont situées dans la membrane cytoplasmique. 12 moles de transporteurs d'électrons sont réduites. Pour chaque mole ré-oxydée, 4 H⁺ sont expulsés qui permettent la synthèse de 2 moles d'ATP (dans le modèle de E. coli)

LA RESPIRATION AÉROBIE

La phosphorylation oxydative

Chez les procaryotes, la respiration aérobie est réalisée dans la **membrane plasmique**. A ce niveau, se situe la **chaîne respiratoire** dont le rôle est de transporter les électrons par des **déshydrogénases** (protéines redox agissant aussi comme oxydoréductase) et des coenzymes. L'accepteur final des électrons est le dioxygène moléculaire. La structure générale de la chaîne des bactéries est comparable à celle des mitochondries.

Chez *E.coli* :

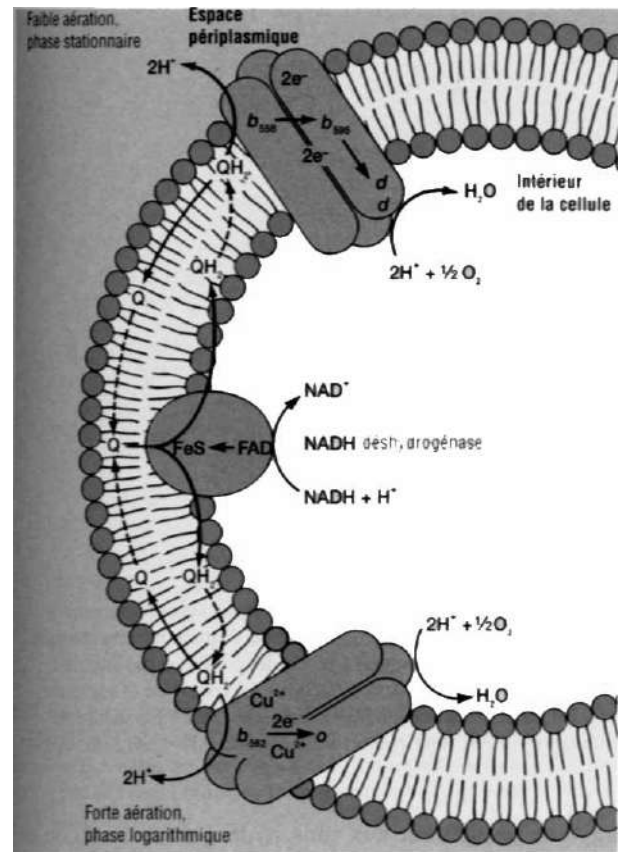
les e^- et les protons sont amenés par $NADH + H^+$, ils sont cédés à la flavine adénine dinucléotide (FAD), et à ce niveau les 2 protons sont expulsés hors de la cellule

Les e^- sont transmis à une protéine Fer/Soufre (Fe/S) qui retourne vers l'intérieur de la membrane.

L'ubiquinone Q est réduite par les 2 e^- cédés par Fe/S et par 2 protons.

Q relargue ces 2 protons à l'extérieur et cède ses 2 e^- au cytochrome B.

Les e^- portés par B sont ramenés vers l'intérieur de la membrane et cédés au cytochrome O, lequel les transfère à l'oxygène moléculaire en présence de 2 protons, d'où formation d'eau ($\frac{1}{2} O_2 + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow H_2O$)



Au niveau membranaire l'ATPase permet la synthèse d'ATP ($ADP + P_i + \text{énergie} \rightarrow ATP + H_2O$), de manière proportionnelle au potentiel redox.

Pendant le transport des électrons dans la membrane cytoplasmique, les protons H^+ sont donc expulsés dans le milieu extérieur (théorie de **Mitchell**), créant une force **proton-motrice**. Inversement, d'autres protons H^+ sont injectés dans le cytoplasme par l'intermédiaire d'une ATP synthétase d'où production d'ATP pendant la phosphorylation oxydative. (cette force proton motrice peut aussi en retour participer au transport de molécules au travers de la membrane et à la rotation des flagelles).

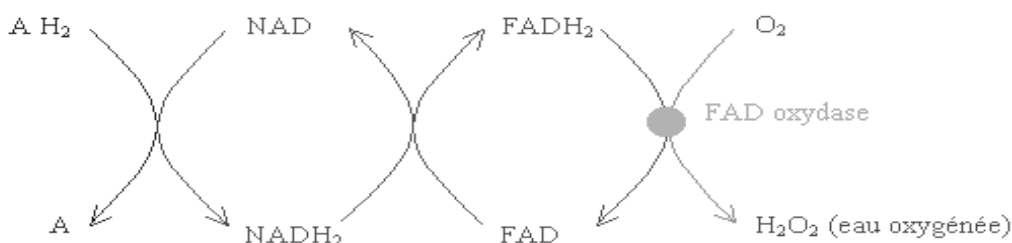
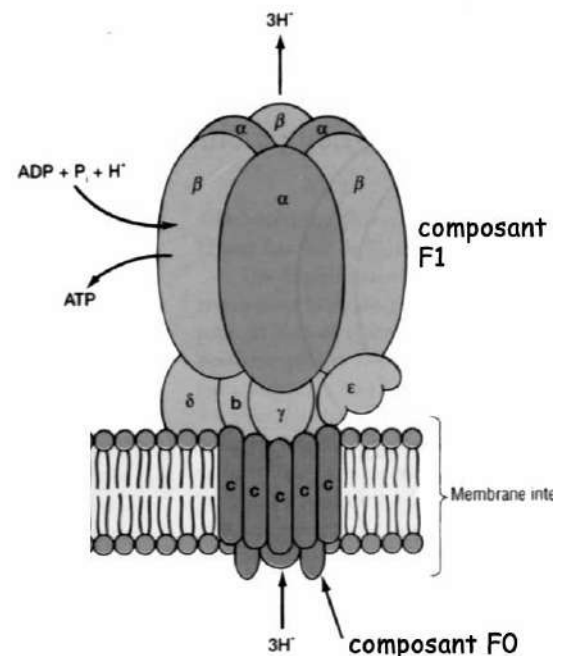
3. La voie oxydative directe

Le dioxygène est toujours l'accepteur d'électrons final, mais le $FADH_2$ étant auto-oxydable, les électrons et les atomes d'hydrogène libérés se fixent directement sur le dioxygène moléculaire, aboutissant à la formation de divers produits :

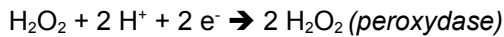
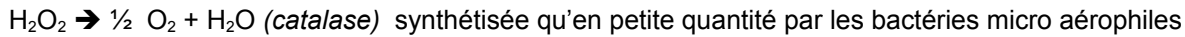
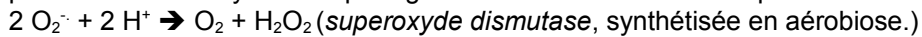
$O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ (**radical superoxyde**)

$O_2^- + e^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$ (**peroxyde d'hydrogène** ou eau oxygénée)

$H_2O_2 + e^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O + OH^\cdot$ (**radical hydroxyle**)



Ces voies sont peu énergétiques. Mais ces produits de réduction de l'O₂ sont toxiques pour la bactérie car ce sont de puissants agents oxydants qui détruisent les constituants cellulaires. Ces réactions ne sont donc pas physiologiques sauf si la bactérie possède des **enzymes de détoxication**. De nombreux microorganismes possèdent des enzymes les protégeant de ces substances toxiques :



Intérêt taxonomique de la chaîne respiratoire

Le cytochrome terminal transférant les électrons sur l'oxygène est appelé de façon générale cytochrome oxydase quelque soit sa nature : cytochrome O de *E. coli*, cytochrome (a + a₃) de *Paracoccus denitrificans*.

Il ne faut pas confondre le terme cytochrome oxydase et la réaction dite de l'oxydase utilisant la tétraméthyl paraphénylènediamine (TMDP). La TMDP a un potentiel redox voisin de celui du cytochrome c, elle peut donner des électrons à la partie terminale de la chaîne.

Seules les bactéries possédant dans leur chaîne respiratoire un cytochrome c donnent une réaction oxydase positive.

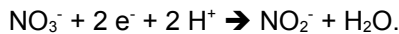
Les bactéries aérobies strictes ou micro aérophiles sont en général oxydase+ et les bactéries aérobies-anaérobies facultatives oxydase-. Les anaérobies strictes ou aérotolérantes sont évidemment oxydase-.

LA RESPIRATION ANAÉROBIE

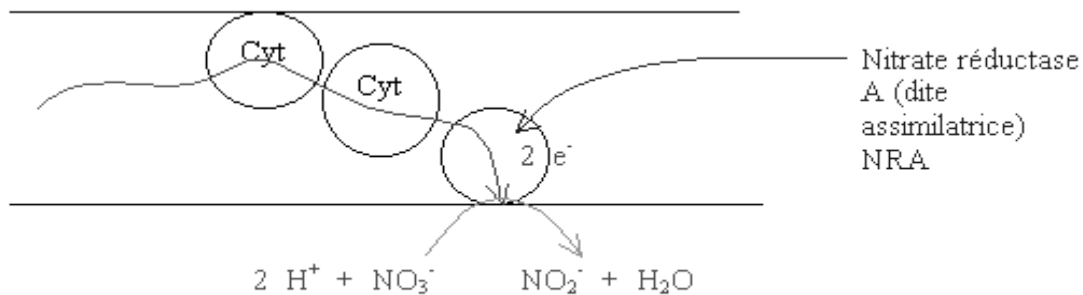
Les chaînes respiratoires peuvent fonctionner en anaérobiose. L'accepteur d'électron est une substance minérale autre que le dioxygène (qui réprime habituellement les respirations anaérobies) à potentiel redox moins élevé.

1. Respiration des nitrates

La dernière enzyme de la chaîne respiratoire est la **nitrate réductase A** (dite **assimilatrice**) qui catalyse la réduction des nitrates en nitrites :



Cette enzyme est également capable de réduire les chlorates en chlorites



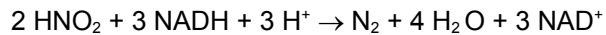
L'oxydation complète d'une molécule de glucose par cette voie fournit 12 moles d'ATP, nettement moins que par la respiration aérobie car une grande quantité de nitrate est nécessaire à la croissance (une molécule de nitrate accepte seulement deux électrons). mais beaucoup plus que par la fermentation. Par ailleurs, le nitrite formé est également assez toxique. C'est pourquoi le nitrate est souvent réduit plus encore en azote gazeux, un processus appelé **dénitrification**. Chaque nitrate acceptera alors cinq électrons et le produit ne sera pas toxique.

Il existe des nitrates réductases constitutives cytoplasmiques non couplées avec la chaîne respiratoire membranaire, ce sont les nitrates réductases B.

La mise en évidence d'une nitrate réductase par les techniques classiques ne permet pas de distinguer entre NR A et NR B. Cette différence peut se faire dans un milieu contenant des ions chlorates. Les bactéries possédant une NR A ne pourront pas se développer car la réduction des chlorates produit des chlorites extrêmement bactéricide.

2. Dénitrification

Certaines bactéries (*Pseudomonas* et *Bacillus*) possèdent des enzymes réduisant les nitrites en azote moléculaire (dénitrification). Ils utilisent cette voie comme alternative à la respiration aérobie normale. On peut les considérer comme des anaérobies facultatifs. Ces réactions ne semblent pas productrices d'énergie.



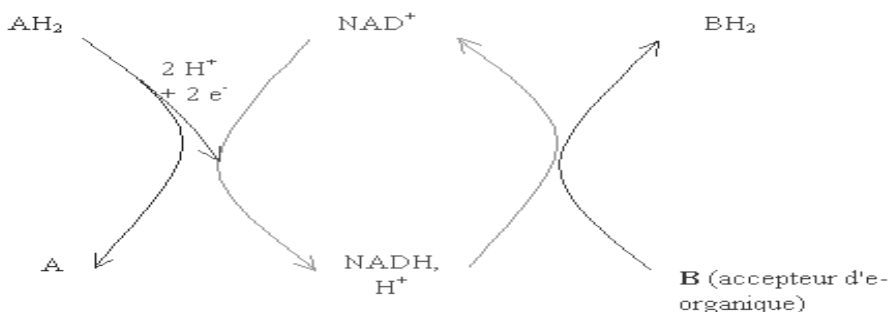
La dénitrification dans un sol anaérobie conduit à un appauvrissement en azote et fertilité.

LES FERMENTATIONS

1. Mécanisme général

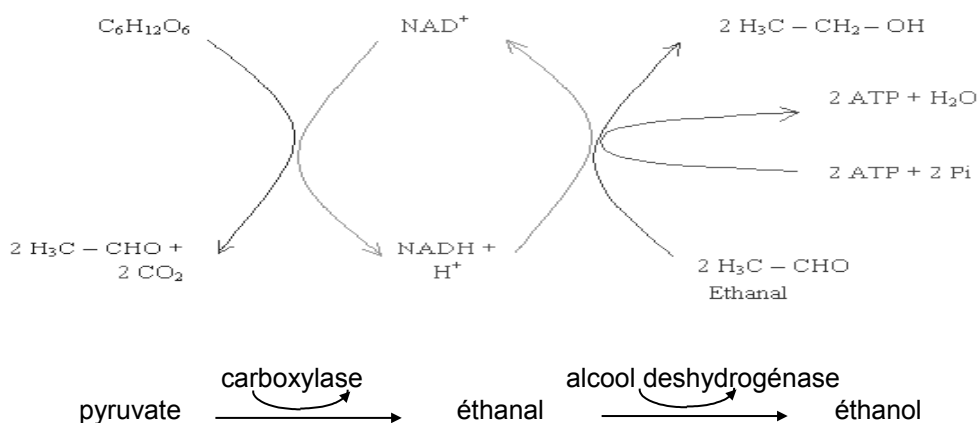
L'accepteur d'électrons est une substance organique, l'oxydation incomplète du substrat s'accompagnant de la phosphorylation. Les fermentations fournissent moins d'énergie que les respirations (~100 KJ pour la fermentation du glucose tandis qu'une mole de glucose fournit 2 800 KJ par respiration aérobie). Les réactions de réduction de composés intermédiaires permettent de différencier les bactéries fermentantes par l'étude des produits finaux.

Soit une molécule organique réductrice AH_2 (glucose), du NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite) et $\text{NADH} + \text{H}^+$ (forme oxydée) les transporteurs d'électrons dans le cytoplasme et B l'accepteur d'électrons organique.



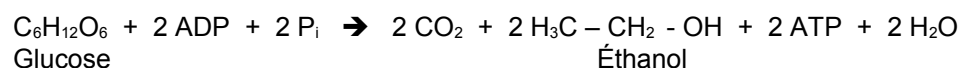
2. La fermentation alcoolique

Elle est à la base de la fabrication du vin, de la bière, du pain. Elle est réalisée par les levures comme *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentation alcoolique ne semble pas exister chez les bactéries.



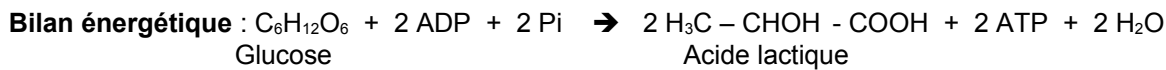
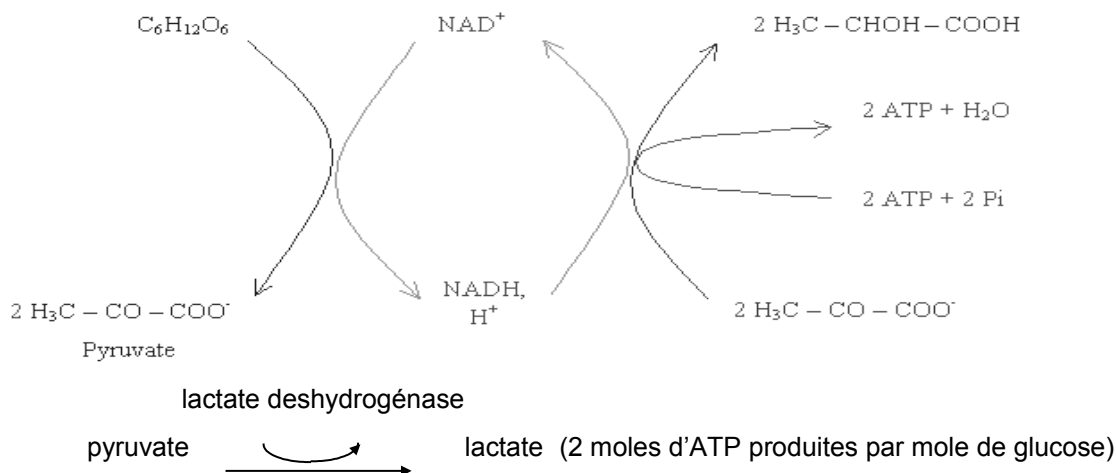
Le pyruvate est décarboxylé en acétaldéhyde, qui est alors réduit en éthanol par l'alcool déshydrogénase, le NADH étant le donneur d'électrons. L'oxydation d'une molécule de glucose produit 2 moles d'ATP. En milieu alcalin cette fermentation peut donner d'autres produits finaux (glycérol, acétate).

Bilan énergétique :



3. La fermentation lactique

la **fermentation homolactique** est réalisée par les *Streptococcus*, les *Lactobacillus* et certains *Bacillus*. C'est la fermentation principale du lait qui conduit au yaourt et au fromage frais. Au cours de cette fermentation le pH baisse rapidement.



a) La **fermentation hétérolactique** est caractéristique de certains *Lactobacillus* et *Leuconostoc*. Outre le lactate, de nombreuses autres substances sont produites : éthanol, CO_2 . Le pH est abaissé en fin de fermentation avec dégagement gazeux de CO_2 .

b) La **fermentation acétolactique** est assez spécifique de *Bifidobacterium*, et produit 5 moles d'ATP pour 2 moles de glucose oxydées.

4. Les fermentations plus complexes

Certaines bactéries comme les *Enterobacteriaceae* peuvent dégrader le glucose par les voies plus complexes comme la voie du butan-2,3-diol ou celle des acides mixtes.

a) La **fermentation acide mixte** : caractéristique des bactéries dites VP - (*E. coli*, *Salmonella*, *Proteus*...). Les produits finaux sont le lactate, l'acétate, le formate, le succinate, l'éthanol, le pH final est donc très faible (mise en évidence par le rouge de méthyl qui vire du jaune au rouge lorsque le pH passe en dessous de 4.4) ; en présence de la formiate hydrogène lyase, l'acide formique est dégradé en CO_2 et H_2 . La proportion de ces produits dépend des conditions de culture :

- à pH 6,2 : 9 glucose $\rightarrow$ 5 éthanol + 4 acétate + 8 lactate + 1 succinate + 8 CO_2 + 8 H_2
- à pH 7,8 : 9 glucose $\rightarrow$ 5 éthanol + 4 acétate + 7 lactate + 9 formate + 3/2 succinate, sans dégagement gazeux.

b) La **fermentation butanediolique** : les Entérobactéries dites VP+ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia* et quelques espèces de *Bacillus*) possèdent une voie particulière donnant un composé intermédiaire, l'acétylméthylcarbinol ou acétoïne qui est ensuite réduit en un produit final neutre, le 2,3 butanediol. Le pH final est assez élevé, les produits finaux étant majoritairement neutres (test négatif au rouge de méthyl, pas de virage de l'indicateur coloré).

L'acétoïne peut être mise en évidence par la réaction de Voges Proskauer (1898) : oxydation du butanediol par ajout de soude dans le milieu $\rightarrow$ acétoïne + diacétyle qui réagit avec l'arginine des peptones et donne un complexe coloré en rose.

Il existe des bactéries VP+ dans d'autres genres : *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bacillus*.

Ces deux fermentations sont appelées **fermentations formiques**

d). La **fermentation butyrique** : elle est caractéristique des espèces saccharolytiques du genre *Clostridium*. La proportion des produits finaux varie selon les conditions de culture et les espèces. La fermentation acétone-butanolique par *Clostridium acetobutylicum*.

5. Intérêt taxonomique des fermentations :

- Subdivision des entérobactéries entre VP+ et VP-
- Mise en évidence, identification et étude des proportions des produits finaux des fermentations par les bactéries anaérobies strictes par chromatographie en phase gazeuse.

CROISSANCE DES POPULATIONS BACTERIENNES EN MILIEU NON-RENOUVELE

La **croissance** des micro-organismes se traduit par une augmentation du nombre de cellules quand le micro-organisme se multiplie par scissiparité ou par bourgeonnement (bactéries, levures bourgeonnantes). Croissance est donc synonyme de multiplication pour les organismes unicellulaires, mais aussi par une augmentation de la taille des micro-organismes (cas des champignons filamenteux tels que *Mucor* et *Rhizopus*)

L'étude de la croissance (ou **accroissement**) en microbiologie est donc l'étude de l'évolution, en fonction du temps, d'une population homogène constituée d'individus strictement identiques (souche pure). C'est **l'augmentation du nombre de cellules de l'espèce bactérienne par unité de volume (ml ou l) en fonction du temps de culture** (heure ou jour).

L'étude de cette croissance permet :

De rechercher et approfondir les caractéristiques physiologiques et biochimiques du micro-organisme afin de compléter son identification.

De permettre la production massive de substances intéressantes dérivées de la croissance (antibiotiques...)

A/ MESURE DE LA CROISSANCE

I. Dénombrement des cellules

a) Méthode hématimétrique (dénombrement au microscope)

- **Principe** :
on utilise des cellules de comptage (Thoma, Petroff-Hausser) dans un volume connu de suspension bactérienne.
- **Fonctionnement** cf. tp hématologie.
- **Avantages** : méthode précise et fiable, rapide et facile à mettre en œuvre, elle est cependant de moins en moins utilisée en routine dans les laboratoires
- **Inconvénients** : ne distingue pas les cellules mortes des cellules vivantes (sauf si on réalise une coloration au bleu de méthylène pour les cellules eucaryotes) . Les méthodes de dénombrement au microscope sont peu utilisées.

b) Numération sur lame

- **Principe et fonctionnement** : on dépose un volume connu (10 µl) sur une surface donnée. On étale l'échantillon le plus régulièrement possible sur cette surface, on sèche puis on colore. Ensuite on peut observer l'échantillon sur une surface donnée à l'aide d'un micromètre (oculaire, objectif ou directement gravé sur la surface d'étalement) et enfin dénombrer les cellules par rapport au volume étalé.
- **Avantages** : technique très simple, fiable, utilisable en toutes circonstances. On peut utiliser des réactifs fluorescents pour distinguer les micro-organismes vivants et morts (surtout dans l'étude des eaux et des produits laitiers).
- **Inconvénients** : peu précis, interprétation délicate.

c) Compteur de particules

- **Principe** : Le compteur détermine le nombre de particules en suspension dans un liquide électriquement conducteur.
- **Fonctionnement** : la suspension microbienne passe au travers d'un orifice ; un courant électrique circule au travers de cet orifice, et des électrodes placées de part et d'autre de l'ouverture mesurent la résistance électrique. Chaque fois qu'une cellule passe au travers du système, la résistance électrique augmente et la cellule est comptée.
- **Avantages** : comptage rapide et plus fiable que le comptage à la cellule hématimétrique.
- **Inconvénients** : ne différencie pas les cellules vivantes des cellules mortes et ne permet pas de compter les cellules si le milieu contient des débris cellulaires, des filaments ou des précipités. Nécessité d'étalonner la machine pour chaque micro-organisme, prix élevé.

d) Dénombrement après culture en milieu solide

- **Principe** : sur un milieu nutritif gélosé, chaque bactérie **revivifiable** donne naissance à une colonie repérable à l'œil nu. Le nombre total de colonies correspond donc au nombre de micro-organismes mis en culture. Mais comme les micro-organismes peuvent rester associés et qu'une colonie peut provenir de plusieurs micro-organismes, on parle **d'unités formant colonies** (U.F.C.)
- **Mise en oeuvre** : cf. TP microbiologie.
- **Avantages** : méthode simple et plus précise que celle en milieu liquide, la précision augmentant avec le nombre de boîtes. Permet aussi d'effectuer un isolement.

- **Inconvénient** : méthode lourde du fait des dilutions, des milieux à préparer...

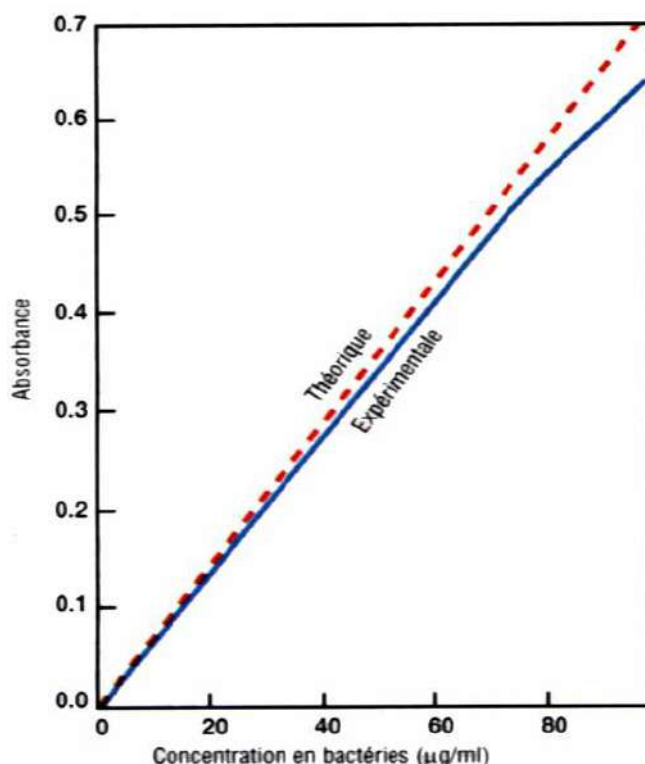
2. Mesures indirectes

a) Détermination du poids sec d'une culture microbienne

- **Principe** : mesure après concentration de la suspension cellulaire pour obtenir des masses mesurables avec une marge d'erreur relativement faible.
- **Mise en œuvre** : on récupère dans un premier temps la masse humide par centrifugation ou filtration
 - centrifugation** : la culture est centrifugée, lavée et séchée à 110°C jusqu'à poids constant. Permet d'obtenir des mesures fiables car on peut évaluer la masse cellulaire quelque soit la concentration des cellules au départ mais peu employée car il y a perte de masse sèche (5-10 %) à chaque centrifugation et mesure la masse des bactéries vivantes et mortes.
 - filtration** : principe similaire, on déshydrate la masse humide filtrée par étuvage à 105°C jusqu'à qu'elle soit constante. Méthode rapide, sans pertes au cours de la manipulation, mais les membranes filtrantes se colmatent assez rapidement et les quantités pesées restent très faibles.

b) Opacimétrie (mesure du trouble après culture)

- **Principe** : mesure de la quantité de la lumière diffractée (lumière non transmise) par la suspension dans un spectrophotomètre. Suit la loi de Beer-Lambert pour de faibles absorbances : l'absorbance mesurée est proportionnelle au nombre de germes en suspension par unité de volume de la solution.
- **Mise en œuvre** : La lecture se fait à $\lambda = 650 \text{ nm}$. La limite est de l'ordre de $10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$. $\text{Abs} = \log(I_0/I) = K.C$ avec C = concentration cellulaire et K = coefficient d'absorption.
- **Avantages** : technique la plus rapide et la plus simple à mettre en œuvre.
- **Inconvénients** : à fortes concentrations, il n'y a plus linéarité $\text{Abs} > 0.8$: il faut faire des dilutions et multiplier la valeur mesurée par le coefficient de dilution. La culture doit être au départ assez riche pour être mesurable ($C > 10^6 \text{ cellules/ml}$). Non utilisable pour les milieux trop colorés ou contenant des précipités. Ne distingue pas les bactéries vivantes des bactéries mortes. Pour chaque micro-organisme et milieu utilisé, il faut établir une courbe d'étalonnage entre abs et nombre de cellules par ml qui permet de calculer un coefficient de proportionnalité, afin de connaître la masse de cellules synthétisée.



L'absorbance et la concentration cellulaire.

c) Mesure de constituants cellulaires

- **Dosage de l'azote** : la culture est centrifugée et lavée puis, l'azote est dosé par la méthode de Kjeldahl. Ce procédé présente les mêmes inconvénients que la détermination du poids sec, elle est cependant moins fastidieuse.
- **Dosage de la flavine mononucléotide (FMN)** : coenzyme d'oxydoréduction que l'on peut doser par bioluminescence. Cette méthode, très sensible, repose sur le principe suivant : La flavine mononucléotide réduite (FMNH_2) peut être oxydée par le dioxygène en présence d'un aldéhyde saturé à longue chaîne ($\text{R}-\text{CHO}$). La réaction est catalysée par une enzyme d'origine bactérienne : la luciférase. Elle conduit à l'émission de lumière selon la réaction : $\text{FMNH}_2 + \text{R}-\text{CHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Produits d'oxydations} + \text{lumière}$
- L'intensité de la lumière produite est mesurée, elle est proportionnelle à la concentration de FMNH_2 donc au nombre de bactéries présentes dans l'essai. (seuil : 10^5 bact/mL)
- **Dosage de l'ATP intracellulaire par bioluminescence** : l'ATP est un excellent marqueur : il n'est jamais stocké, sa concentration reste constante et il disparaît rapidement à la mort de la cellule. La réaction de bioluminescence utilise une enzyme naturelle (substrat : luciférine, enzyme : luciférase) dépend chez les lucioles de la présence d'ATP, d'oxygène mais aussi de l'ion Mg^{++} :
 - $\text{ATP} + \text{luciférine} + \text{O}_2 \rightarrow \text{AMP} + \text{P} + \text{oxyluciférine} + \text{CO}_2 + \text{photon visible}$

Le nombre de photons lumineux émis est proportionnel à la concentration en ATP. L'éclair lumineux, de faible intensité, est mesuré par un luminomètre.

Méthode rapide, seuil de détection très bas → permet de détecter 10^4 bactéries vivantes par ml.

d) Mesure de la production de chaleur : microcalorimétrie

- **Principe** : La croissance des bactéries s'accompagne d'un dégagement de chaleur dû à la dégradation des substrats énergétiques (5 kcal / g de masse sèche).
- **Mise en œuvre** : on mesure par le dégagement de chaleur avec un calorimètre ; la chaleur dégagée par les bactéries d'un volume déterminé de culture entre l'enceinte interne et l'enceinte externe (la chaleur dégagée dépend du nombre de bactéries dans la prise d'essai). La puissance thermique dégagée est exprimée en μ watts.
- **Avantages** : mesures rapides et sans prélèvements et s'adaptant bien aux cultures très riches.

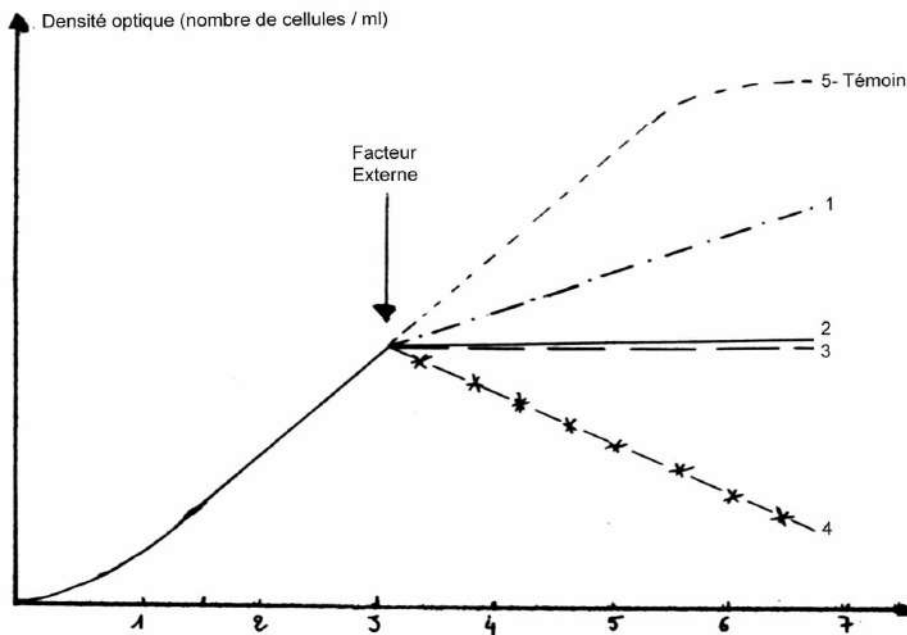
e) Modification du milieu

- Mesure d'un produit excrété : CO_2 , acide lactique, éthanol, acides gras à courtes chaînes...
- Consommation d'oxygène.
- Mesure du pH : la mesure de biomasse par titrage de l'acidité totale est utilisée en industrie laitière. L'acidité est exprimée en degré Dornic.

2. Facteurs influençant la croissance

a) Différents types d'actions (de facteurs effecteurs)

La courbe 5 est une courbe de croissance témoin (conditions idéales de culture) dans un milieu liquide limité. Les autres courbes : 1, 2, 3 et 4 représentent les différentes possibilités d'action d'un facteur (facteur externe: F.E) en fonction de sa concentration ou de son intensité.



Courbe 5 : témoin

courbe 1 : action bactériofrénatrice (μ diminue) : diminution légère de la température ou ajout d'antiseptique à taux très faible (traces)

courbe 2 : action bactériostatique ($\mu = 0$) : conservation à basses températures et conservateurs alimentaires (Acide salicylique)

courbe 3 : action bactéricide : antiseptiques, antibiotiques, conservateurs à forte concentration

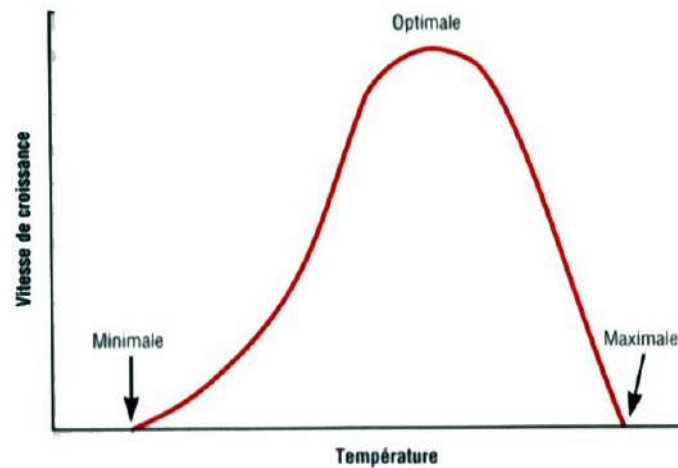
courbe 4 : action bactériolytique : forte augmentation de température, concentration normale des antiseptiques

Remarque : pour différencier 2 et 3, il faut faire des repiquages sur un milieu où le 'Facteur Effecteur' n'agit plus.

b) La température

Elle a une influence considérable sur le métabolisme et donc sur la multiplication microbienne.

La température optimale de croissance est déterminée en incubant des bouillons de culture à différentes températures. Après un temps suffisant de croissance on pratique sur chaque tube un dénombrement.



Tant que les diminutions de températures restent faibles et modérées on observe un simple ralentissement de la croissance. Pour une action plus forte de la température on peut obtenir un arrêt de la multiplication.

Quand on mesure ainsi la vitesse spécifique de croissance μ max, on observe que μ augmente avec la température jusqu'à une température optimale, puis μ max diminue pour s'annuler au-delà d'une température létale

Chaque micro-organisme possède une température optimale de croissance. De part et d'autre de cette température la croissance se fera mais avec des vitesses plus faibles. La température minimale est la température au dessous de laquelle il y a arrêt de la croissance. La température maximale est celle au dessus de laquelle il n'y a plus de multiplication.

De part et d'autre de ces deux températures il existe une zone plus ou moins étroite où les micro-organismes se maintiennent en vie sans pouvoir se multiplier (zone dysgénésique). Au delà de cette zone les températures deviennent létales : mort des micro-organismes.

Groupe	Température minimale de croissance	Température optimale de croissance	Température maximale de croissance	Valeur de μ
Cryophiles ou psychrophiles	0 °C	15 °C	20 °C	Très faible
Psychrotrophes	0 - 5 °C	20 - 30 °C	35 °C	Faible
Mésophiles	15 - 20 °C	20 - 45 °C (37 °C)	45 °C	Normal
Thermophiles	25 - 45 °C	50 - 55 °C	65 - 90 °C voire 100°C	élevé

Les bactéries pathogènes pour l'homme (*S. aureus*, *C. albicans*) et l'animal, les bactéries des flores de la peau et des muqueuses sont en majorité mésophiles.

Les bactéries thermophiles (surtout parmi les genres *Bacillus* et *Clostridium*) se trouvent dans les sources thermales.

Les bactéries psychrophiles sont des hôtes des milieux naturels et représentent un risque de contamination pour les produits conservés à basse température, produits alimentaires, sang et dérivés (*Pseudomonas*, *Aeromonas*).

c) Le pH

Le pH influence aussi la vitesse de croissance. On peut déterminer pour chaque micro-organisme une zone de pH optimal et un pH d'inactivation.

En général le pH doit être neutre ou légèrement alcalin pour la plupart des bactéries, mais de nombreuses bactéries acceptent des limites plus larges (ex *E.coli* 4,4 à 8). En dessous de pH 5, les bactéries pathogènes ne se multiplient plus.

Les **bactéries acidophiles** exigent un pH acide (entre 3 et 5.5).. Les levures et moisissures sont acidophiles.

D'autres organismes tolèrent ou se développent à des pH élevés (entre 9 et 9.5), tels *Vibrio* qui pousse à pH = 9 ; ce sont des bactéries **basophiles**.

Les milieux de culture sont ajustés à des pH adaptés à la croissance et en général tamponnés pour éviter les brusques variations de pH.

d) Les gaz

Les exigences sont essentiellement définies par rapport à l'oxygène. Les bactéries consommatrices d'oxygène sont dites **oxybiontiques** et celles qui n'en consomment pas **anoxybiontiques**.

Les bactéries microaérophiles exigent une pression partielle en oxygène réduite (ex : *Campylobacter*).

L'incubation en atmosphère enrichie en CO₂ (5 à 10%) favorise la croissance de certaines bactéries comme *Streptococcus*, *Brucella*, *Neisseria gonorrhoeae*.

e) La pression osmotique

La pression osmotique d'un milieu peut être modifiée de trois manières différentes :

En faisant varier la concentration en sels, surtout NaCl.

En ajoutant au milieu des composés de hauts poids moléculaires, parfois non utilisés par le micro-organisme (exemple : la saccharose).

En enlevant partiellement l'eau du milieu ; ceci revient à concentrer les composants (L'*a_w* = water activity devient plus faible).

Vis-à-vis de la **concentration en NaCl**, on distingue :

Les organismes **halotolérants** ne se développent pas sur milieu salé mais peuvent rester vivants (exemples: *E.coli*, Streptocoque D = Entérocoque).

Les organismes **halophiles** nécessitent de fortes concentrations salines. Ce sont les bactéries marines, les bactéries des saumures (*Microcoques*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas salinaria*...)

Les micro-organismes **osmophiles**, supportent de fortes concentrations en saccharose, jusqu'à 40% (*Saccharomyces rouxii*, *Aspergillus restrictus*)

f) Activité de l'eau

La survie ou le développement d'un microorganisme nécessite une certaine quantité **d'eau libre**, c.à.d. d'eau non liée dans un produit ou un milieu. Les aliments sont caractérisés par leur **A_w** (activité d'eau) :

A_w = pression partielle d'eau dans le milieu / pression partielle de l'eau pure

A_w = nombre de molécules d'eau / nombre de molécules d'eau + nombre de molécules de solutés

Par définition, A_w est toujours inférieur à 1. Plus le milieu est aqueux (riche en eau libre), plus A_w est voisin de 1. L'activité de l'eau est inversement proportionnelle à la pression osmotique.

Les bactéries supportent mal des A_w faibles. Les aliments frais, ayant des A_w variant entre 0,980 et 0,990, sont donc sujets à l'altération bactérienne. Les denrées dont l'humidité relative est moindre seront plutôt attaquées par les moisissures. Les bactéries **xérophiles** ne se développent que sur les produits secs.

g) Les produits chimiques

- **Antiseptiques** : les plus utilisés sont l'eau de Javel, les phénols, l'éthanol etc... Une faible concentration d'un entraîne un simple ralentissement de la croissance.

Mais le rôle des antiseptiques est de tuer et d'éliminer les micro-organismes rapidement. La nature, la concentration, et le temps de contact sont très importants dans le choix du produit, mais aussi, il convient de considérer sa toxicité (environnement), son spectre d'action et l'usage auquel on le destine

- **Additifs de stabilisation antimicrobienne** : leur rôle est d'éviter la multiplication des micro-organismes (action bactériostatique essentiellement) et permettre la conservation d'un produit (confitures, jus de fruits ou cosmétiques) dans le temps, et répondre de façon satisfaisante aux 5 exigences suivantes :

être absolument nécessaire dans l'intérêt du consommateur.

être inoffensifs.

avoir un spectre antimicrobien assez large.

avoir une stabilité suffisante dans le produit.

pouvoir être dosé facilement et selon une technique fidèle dans les aliments traités.

Antibiotiques : un antibiotique est un composé chimique produit naturellement par des moisissures et par certaines bactéries ou issus de la synthèse chimique. Un antibiotique a le pouvoir en solution diluée d'inhiber la croissance bactérienne ou même de détruire certaines espèces bactériennes.

3. Expression mathématique de la croissance bactérienne en milieu non renouvelé

a) Équation différentielle de la loi de croissance

Dans un milieu liquide, le nombre d'individu par mL augmente d'une quantité dX pendant un intervalle de temps dT.

La vitesse d'accroissement ($v = dX / dT$) du nombre de bactéries à un instant donné est proportionnelle au nombre X de bactéries à cet instant (on dit que c'est un phénomène autocatalytique) :

$$dX / dT = \mu \cdot X (1) \rightarrow dX / X = \mu \cdot dT$$

Après intégration, l'équation précédente peut s'écrire :

$$\ln(X) = \mu \cdot T + cte$$

Au temps $T = 0$, l'équation devient : $\ln(X_0) = 0 + cte$, avec X_0 = population bactérienne au temps 0.

D'où : $\ln(X) = \mu \cdot T + \ln(X_0)$ (2) ou encore $X = X_0 \cdot e^{\mu T}$ (3)

Le coefficient directeur de la droite, ou coefficient de proportionnalité μ est appelé taux de croissance népérien :

$$\mu = (\ln(X) - \ln(X_0)) / T \text{ ou } \mu = (\ln X / X_0) / T$$
 (4)

L'expression précédente peut être convertie en logarithmes décimaux sous une forme plus pratique à utiliser :

Rappel : $\log a = \ln a / \ln 10$

$$\Rightarrow \log(X) = \ln(X) / \ln 10 = \ln(X_0 \cdot e^{\mu T}) / \ln 10 = (\ln X_0 + \mu T) / \ln 10 = \log(X_0) + (\mu T / 2.302)$$

$$\Rightarrow \log(X) = \log(X_0) + (\mu T / 2.302) = \Rightarrow \log(X) = \mu' \cdot T + \log(X_0) \text{ avec pente de la courbe } \mu' = \mu / 2.302$$

Le taux de croissance peut être calculé en utilisant la relation $\mu = 2.302 \cdot \mu'$

Remarque : les bactéries de l'inoculum sont à des stades différents de leur évolution ; l'évolution de la population est continue ; la culture est dite **asynchrone**. Mais par divers artifices techniques (chocs thermiques successifs, chocs lumineux, filtration sélective sur membrane récoltant les cellules de même taille), on peut obtenir que toutes les bactéries inoculées soient au même stade de leur évolution et se divisent en même temps : la culture est dite **synchrone**. La croissance synchrone est intéressante pour l'étude morphologique et physiologique de la cellule au cours de la division.

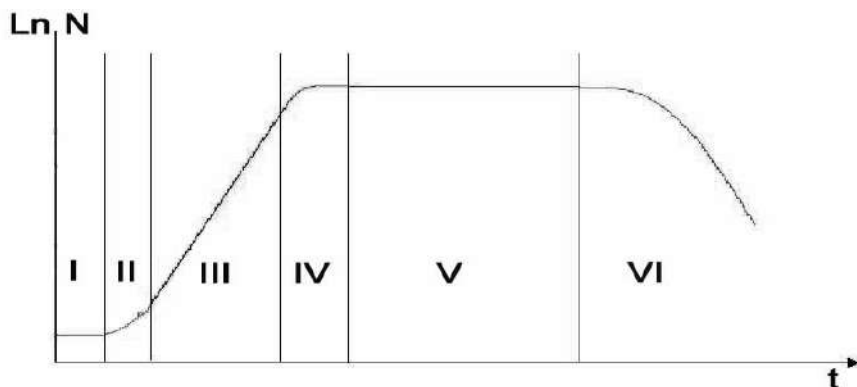
b) Temps de génération T_g ou G

Bien que la valeur de μ soit suffisante pour définir la croissance, un autre paramètre souvent utilisé est le temps de génération G : temps nécessaire au doublement du nombre de bactéries (ou l'intervalle de temps entre deux divisions successives).

Si on pose $X = 2 \cdot X_0$, $X / X_0 = 2$, alors (4) devient $\mu = \ln 2 / T_g$ ou encore $T_g = G = 0.693 / \mu$ (5)

Connaissant T_g on peut éventuellement calculer le nombre de divisions par unité de temps : $r = 1 / T_g$ (6)

T et T_g sont exprimés en heure, μ en h^{-1} et r en nombre de divisions par heure.



c) Courbe de croissance théorique (Voir ci-après tableau descriptif)

La courbe expérimentale est représentée avec la notation logarithmique car la notation exponentielle est difficilement utilisable.

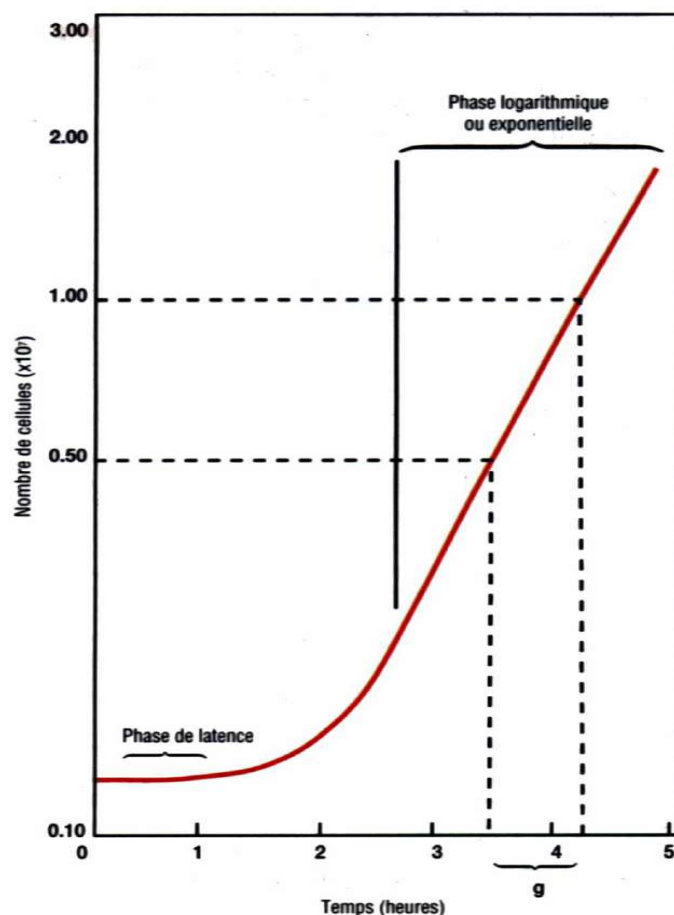
Phase	Description	Valeur de μ en h^{-1}
Phase de latence	Facultative. Correspond à une phase d'adaptation des bactéries au milieu (temps nécessaire aux bactéries pour synthétiser les enzymes nécessaires pour dégrader le milieu et pour ajuster certains paramètres comme le pH). Les bactéries ne se divisent pas ou très peu. Elle est absente quand l'inoculum est jeune et que le milieu est le même que le précédent.	$X = X_0$ ($\ln N = \ln N_0$) $\mu_x = 0$

Phase d'accélération	Les bactéries se multiplient de plus en plus activement, le temps de génération atteint sa valeur minimale	μ passe de 0 à $\mu_{\max}$
Phase exponentielle de croissance	Les bactéries se multiplient à leur rythme le plus élevé. Le $\ln$ de N est directement proportionnel au temps. C'est la phase physiologique (production d'antibiotiques et de toxines). La représentation est une droite d'équation : $\log(X) = \log(X_0) + \mu'T$	$\mu = \mu_{\max}$
Phase de ralentissement	Les éléments nutritifs diminuent et sont en quantité limitante, le milieu s'est enrichi en produits excrétés par les cellules	$\mu_{\max}$ diminue et tend vers 0
Phase stationnaire	La biomasse est stable. Soit : - Les bactéries ne se divisent plus - Il y a autant de bactéries qui se divisent que de bactéries qui meurent.	$\mu_x = 0$
Phase de déclin	Certaines bactéries meurent et sont lysées. Leur nombre diminue. Dans certains cas des bactéries survivantes peuvent se multiplier au dépend des substances libérées par la lyse bactérienne.	$\mu_x < 0$

Le temps de latence est déterminé graphiquement, il correspond à la durée des deux premières phases. La détermination graphique du temps de génération correspond au doublement de la population. Le temps de génération dépend de la température d'incubation, de la nature et de la concentration du substrat.

Le temps de génération varie de 10 minutes pour quelques bactéries à plusieurs jours pour certains micro-organismes eucaryotes. Il est généralement plus long dans la nature qu'en milieu de culture.

Le densité optique étant proportionnelle, dans une certaine mesure toutefois, à la concentration cellulaire, on applique alors pour calcul de $r_{\max}$ la formule suivante : $r_{\max} = X(\log_2 DO_n - \log_2 DO_0) / (T_n - T_0)$

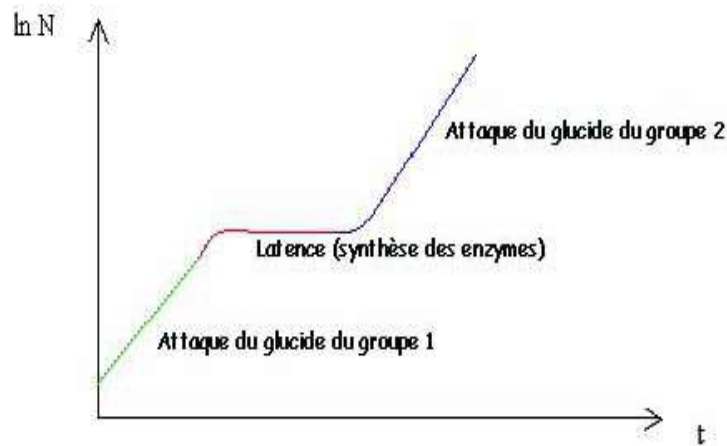


Phénomène de de **La détermination du temps de génération.** Les données sont portées sur un graphique semi-logarithmique où le nombre de cellules est sur l'axe logarithmique. Le temps de doublement est lu directement sur le graphique. Le log du nombre de cellules peut aussi être porté sur un graphique normal en fonction de temps. **diauxie diauxie**

On cultive *E.coli* en milieu synthétique contenant deux substrats carbonés, glucose et lactose.

La courbe de croissance présente un palier. Le glucose est consommé en premier, le lactose est consommé quand tout le glucose a disparu du milieu.

Les enzymes nécessaires pour l'utilisation du premier des deux glucides sont **constitutives**, et **inductibles** pour ceux du second.



Courbe de diauxie

CROISSANCE EN MILIEU RENOUVELE, Cultures Continues :

Dans les systèmes fermés (culture discontinue, en batch), les éléments nutritifs ne sont pas renouvelés ni les déchets éliminés. La phase exponentielle a lieu pendant quelques générations et la phase stationnaire est rapidement atteinte.

Dans les processus industriels de fermentation ou de production de substances d'origine microbienne, on cultive les micro-organismes dans un système ouvert, à volume constant, où les conditions de culture sont maintenues constantes par l'apport continu de nutriments et l'élimination des déchets, la phase exponentielle de croissance pouvant être maintenue avec une concentration constante de la biomasse

Le chémostat

Le milieu stérile est introduit dans la chambre de culture à la même vitesse que le milieu contenant les micro-organismes en est éliminé.

Le milieu de culture d'un chémostat contient un élément nutritif essentiel en quantité limitante (ex. un acide aminé). Ce nutriment étant limité, la vitesse de croissance est déterminée par la vitesse à laquelle le milieu frais est ajouté dans la chambre de culture, et la densité cellulaire finale dépend de la concentration en nutriment limitant.

La population augmente puis se stabilise.

Le turbidostat

Le turbidostat est équipé d'une cellule photoélectrique qui mesure l'absorbance dans la chambre de culture. La vitesse d'écoulement du milieu au travers de la cuve est automatiquement réglée par une électrovanne commandée par la cellule photoélectrique pour maintenir une croissance maximale à population constante.

Le turbidostat diffère du chémostat de plusieurs façons :

La vitesse de dilution (vitesse d'échange des nutriments) dans un turbidostat varie au lieu de rester constante,

Le milieu de culture ne contient pas de nutriment limitant.

Si la densité cellulaire augmente trop, la vitesse d'échange des nutriments diminue et la population diminue aussi.

Inversement, si la densité cellulaire est inférieure à une valeur prédéterminée, la vitesse d'échange des nutriments augmente et la population augmente.

Applications industrielles

Fermenteurs en continu :

turbidostat et chimostat sont utilisés pour produire de la biomasse ou une substance fabriquée pendant la phase exponentielle.

Si la substance recherchée est synthétisée après la phase exponentielle on utilise plusieurs fermenteurs en continu montés en série : **fermenteurs mult-étages**.

Le principal inconvénient de la culture en continu est le maintien de l'intégrité de la souche d'origine. (en effet il peut y avoir remplacement progressif par des mutants) et de sa pureté pendant la durée parfois très longue du processus.

Fermenteur en discontinu :

récolte des microorganismes ou des produits formés après un temps de croissance déterminé. Il existe de nombreux problèmes de stérilisation après vidange des cuves de gros volume.

Exemples de substances organiques fabriqués ainsi biologiquement :

des *acides organiques* : acide acétique, obtenu à partir d'éthanol par *Acetobacter suboxydans*, bactérie aérobique stricte, au cours de la fabrication du vinaigre ; acide citrique, acide gluconique par certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*.

des *vitamines* : vitamine B1, par *Eremothecium Ashbyii*, *Ashbya gossypii* (champignons ascomycètes), *Candida Guilliermondia* (levure) ; vitamine B12, par *Streptomyces olivaceus*

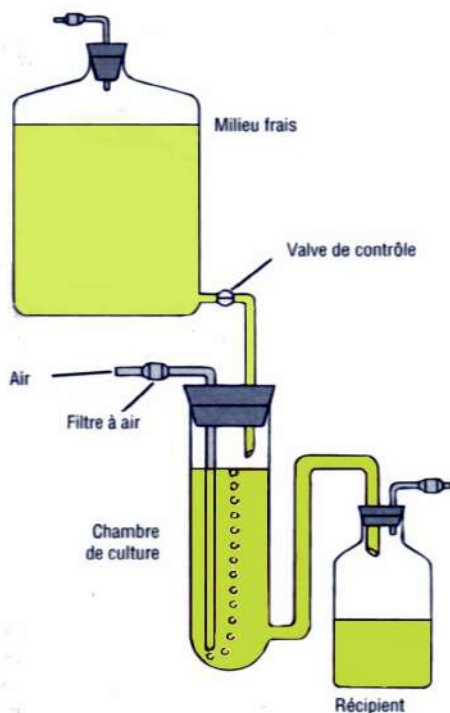
des *acides aminés* : L-glutamate, par *Micrococcus glutamicus* ; L-lysine, par un mutant de cette espèce

des *alcaloïdes* de l'ergot de seigle, par *Claviceps purpurea*, champignon responsable de la maladie du seigle

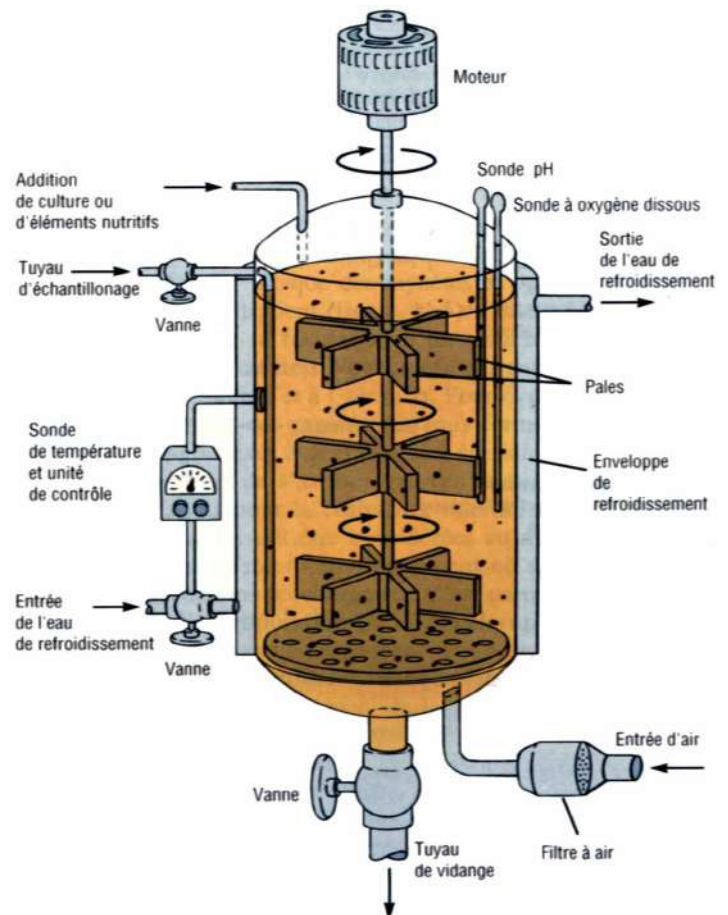
tous les *antibiotiques*

des *dextrans* (hauts polymères du glucose utilisés pour donner aux sérums physiologiques une pression osmotique et une viscosité convenables), par *Leuconostoc mesenteroides* (bactérie)

le *butanediol*, qui a servi de matière première pour la fabrication des caoutchoucs artificiels butyl; mais actuellement la fabrication chimique remplace la production par fermentation.



Fermenteur experimental



Une unité de fermentation de grande taille.

Fermenteur Industriel

GENETIQUE BACTÉRIENNE

La génétique microbienne a pour objet l'étude du génome du micro-organisme, c'est-à-dire des gènes, de leurs variations et de leur expression phénotypique. Du point de vue historique, la génétique a franchi trois grandes étapes :

En 1880 le moine autrichien Gregor Mendel publie ses « Essais sur les hybrides naturels ». Ce recueil énonce les lois fondamentales de la génétique. Il montre que chaque propriété d'une cellule, d'un organisme est sous la dépendance de facteurs qui, depuis, ont été appelés des gènes. En 1910, Morgan et Bridges établissent le rôle probable des chromosomes dans la transmission des caractères : c'est la théorie chromosomique de l'hérédité.

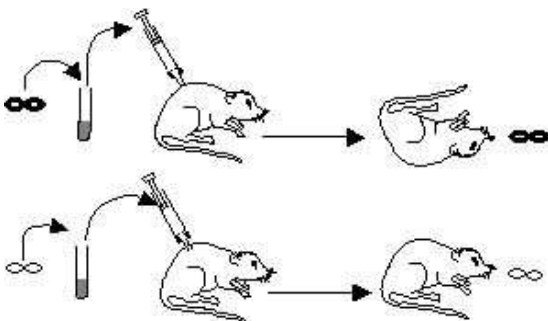
Les travaux de Beadle et Tatum, en 1941, effectués sur une moisissure, *Neurospora crassa*, montrent que les gènes gouvernent la formation des enzymes et contrôlent toute l'activité biosynthétique de la cellule donc toutes les propriétés susceptibles d'apparaître chez celle-ci.

En 1944, Avery, McLeod et McCarty reproduisent *in vitro*, le phénomène de transformation découvert par Griffith.

I. Rappels sur l'ADN bactérien

1. Expérience de Griffith (1928)

L'expérience consiste à inoculer à des souris :



- des souches de *Streptococcus pneumoniae* capsulées (type S)

→ Mort de la souris

→ Présence de pneumocoques type S dans le sang.

Interprétation : l'injection de formes S capsulées vivantes entraîne une septicémie mortelle

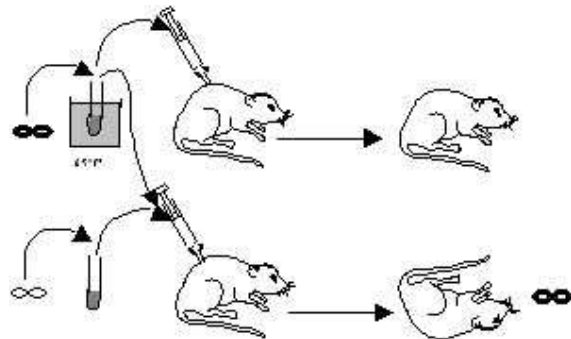
- des souches de *Streptococcus pneumoniae* acapsulées (type R:)

→ Survie de la souris

→ Absence de bactérie dans le sang

Interprétation : l'injection de formes R acapsulées vivantes n'entraîne pas de septicémie mortelle

Le pouvoir pathogène est donc du à la présence de la capsule

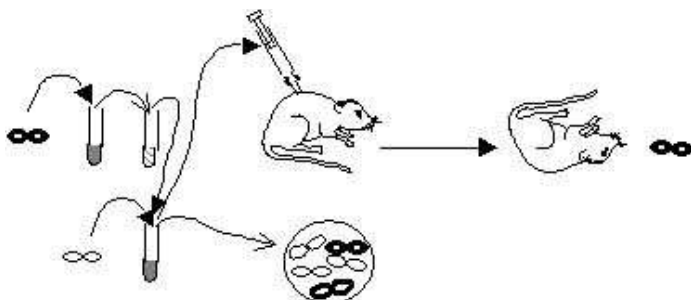


1. Inoculation à des souris de pneumocoques tués par la chaleur (65°C) survie des souris

2. Inoculation simultanée à des souris de pneumocoques S tués par la chaleur et de pneumocoques R : mort des souris

Le développement d'une septicémie mortelle après injection de pneumocoques R vivants (non pathogènes) et de pneumocoques S tués (non pathogènes également) ne peut s'expliquer que par la **transformation** des souches R avirulentes en souches virulentes par l'acquisition du facteur de virulence (capsule). Un « matériel transformant » a donc été transmis des bactéries S mortes aux bactéries R vivantes.

Mise en évidence par McLeod et McCarty en 1944 de la nature de l'agent transformant :



De l'ADN extrait de pneumocoques de type S est mélangé à une culture de pneumocoque de type R.

On inocule les bactéries de ce mélange à des souris qui en meurent, le sang contient des bactéries de type S qui se sont multipliées.

Après un temps de contact suffisant, on peut mettre en évidence quelques bactéries de type S dans la culture.

Le « matériel transformant » est de l'ADN

2. Organisation du matériel génétique

L'essentiel de l'ADN bactérien est organisé en une seule molécule, le nucléoïde. C'est une molécule d'ADN circulaire, d'environ 1 mm de longueur, un poids moléculaire d'environ $3 \cdot 10^9$ daltons ; il est composé de deux chaînes polynucléotidiques de polarités inversées dont les éléments sont liés par covalence de même que les extrémités.

Le « chromosome » bactérien n'est pas toujours la seule molécule d'ADN présente. La plupart des bactéries portent en effet soit des éléments d'ADN extrachromosomiques qu'on appelle des plasmides, soit des virus bactériens ou bactériophages impossibles à distinguer des premiers.

Ces éléments d'ADN chromosomiques ou extrachromosomiques sont capables de répllication autonome et de ségrégation au cours de la croissance bactérienne. On les appelle des réplicons. Le réplicon chromosomique se distingue des réplicons plasmidiques ou bactériophagiques essentiellement par sa taille.

Tous les réplicons sont porteurs d'information génétique. La totalité de cette information correspond au **génotype** de la cellule bactérienne par opposition au **phénotype** qui représente l'ensemble des caractères (structuraux et fonctionnels) observables à un moment donné. Chez la bactérie, la majorité (90 %) de l'ADN cellulaire est exprimée en permanence, à l'exception de quelques gènes qui sont réprimés (10 % de l'ensemble).

B/ Les variations génotypiques

Ce sont des modifications de l'information génétique. On distingue : Les mutations et les recombinaisons.

Les mutations qui se traduisent dans une population microbienne par l'apparition de cellules différentes de celles du type normal (ou sauvage) par un ou plusieurs caractères ; on appelle ces microbes des **mutants**.

Les recombinaisons, qui mettent en jeu un échange du matériel génétique après transfert de celui-ci d'une cellule à une autre (par exemple de A vers B) ;

- par **transformation** après extraction du matériel génétique de A puis pénétration dans B ;
- par **transduction** : le transfert du matériel génétique est assuré par un bactériophage ;
- par **conjugaison** : le transfert de l'ADN de A vers B est effectué après contact entre les deux cellules.

Au cours des dernières années, des techniques ont été mises au point, qui permettent d'élargir le champ des recombinaisons génétiques en réalisant de véritables greffes d'ADN entre des espèces très éloignées phylogénétiquement (ex. : espèce bactérienne et espèce animale). Le terme de **génie génétique** souligne le caractère prospectif de ces expériences.

1. Les mutations

a- Définition

Une mutation est la modification brutale d'un caractère transmis héréditairement sous l'effet d'agents physico-chimiques. La mutation est un phénomène rare qui crée la variabilité et contribue à l'évolution. Les mutants obtenus peuvent transmettre à leur descendance le caractère nouvellement acquis.

b- Mise en évidence du phénomène

Sensibilité ou résistance à un antibiotique : soit une bactérie sensible à la streptomycine. Cultivée sur un milieu favorable, elle forme un clone (population de cellules descendant d'une cellule unique). En étalant sur un milieu solide contenant de la streptomycine plusieurs centaines de millions de bactéries du même clone, on voit apparaître une ou plusieurs colonies ; ces colonies ont acquis une nouvelle propriété ; elles sont résistantes à la streptomycine ; elles conservent indéfiniment ce nouveau caractère au cours de subcultures sur milieux contenant ou non de la streptomycine. Ce sont des mutants.

Besoin en facteur de croissance : soit *S. typhi* qui est incapable de synthétiser le tryptophane pour sa croissance. *S. typhi* est auxotrophe pour le tryptophane (Trp) ; elle ne peut se développer sur un milieu synthétique sans tryptophane. Sur deux milieux synthétiques solides, l'un contenant du tryptophane, l'autre non, coulés en boîtes de Pétri on étale 10^6 *S. typhi*. Après 24 heures d'incubation à une température convenable, une nappe confluyente s'est développée sur le premier milieu ; rien n'apparaît sur le second. On recommence l'expérience, mais cette fois avec 10^9 germes au lieu de 10^6 . Comme dans le premier cas, on observe une culture continue sur le premier milieu. Sur le second, quelques colonies se forment. Les germes de ces colonies sont capables, indéfiniment, de se multiplier dans un milieu sans tryptophane. Dans une population de germes exigeant du tryptophane pour leur croissance, donc ne pouvant le synthétiser, sont apparues spontanément quelques bactéries non exigeantes, capables de synthétiser ce facteur de croissance (Trp+) et de transmettre cette faculté à leurs descendants : ce sont des mutants.

c- Principaux caractères des mutations

- Spontanéité : les bactéries résistantes à la streptomycine sont-elles apparues spontanément (indépendamment de la streptomycine) ou est-ce l'antibiotique qui est à l'origine de leur venue ? L'expérience dite des répliques ou empreintes de Lederberg permet d'y répondre.

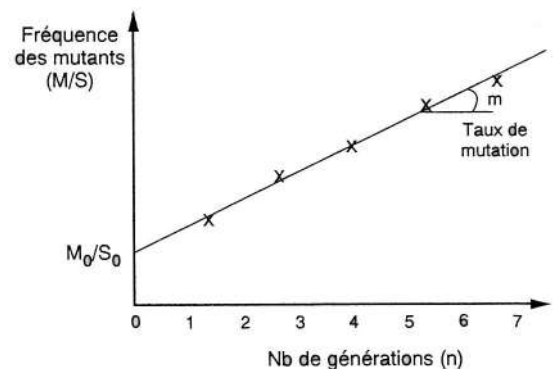
Soit une plaque de gélose portant des colonies isolées d'une bactérie sensible à la streptomycine. On dépose à sa surface un tampon de velours stérile, tendu sur un cylindre métallique, de façon à la recouvrir entièrement. On appuie légèrement et l'on reporte cette empreinte sur une autre plaque de gélose stérile contenant de la streptomycine. Le tissu, au contact de la culture, prélève une fraction de chaque et la reporte sur le second milieu. Quelques colonies streptomycine résistantes apparaissent sur le milieu. Elles proviennent obligatoirement de cellules résistantes préexistantes sur la plaque initiale.

En repérant l'endroit correspondant à une de ces colonies sur le milieu d'origine et en le prélevant, on peut ensemencer un nouveau bouillon. Après culture on étale à nouveau sur un milieu solide sans antibiotique une partie aliquote beaucoup plus faible que précédemment (l'inoculum contient en principe une plus grande proportion de résistants). En répétant la même opération plusieurs fois, le nombre de mutants augmente pour donner finalement une culture pure de germes résistants. Les milieux contenant de la streptomycine ont servi uniquement au repérage des mutants qu'ils ont sélectionnés. Mais la population obtenue n'a jamais été au contact de l'antibiotique, ce qui démontre que la mutation se produit spontanément, en l'absence de l'agent sélectif (ici la streptomycine).

L'apparition des mutants est un phénomène rare. On le définit par le taux de mutation, c'est-à-dire la probabilité que la mutation a d'apparaître dans une bactérie dans l'intervalle compris entre deux divisions. Ce taux varie de 10^{-3} à 10^{-20} .

Soit un taux de mutation de 10^{-6} . Cela signifie que, dans une population de 10^6 germes, la probabilité pour qu'une mutation survienne est de 1. Chaque fois qu'une nouvelle population de 10^6 germes apparaîtra, la probabilité de mutation sera encore de 1.

Remarque : Le taux de mutation ne doit pas être confondu avec la proportion de mutants rencontrés à un moment donné de la croissance. Le taux de mutation reste toujours identique à lui-même tandis que le nombre de mutants peut varier en plus ou en moins selon que la croissance de ceux-ci est avantagée ou non par rapport aux autres cellules. La détermination du taux de mutation est relativement simple chez les micro-organismes. On évalue en fonction du temps la fréquence des mutants d'un type donné pendant la phase exponentielle de croissance. On trace ensuite la courbe dont la pente donne le taux de mutation.



Détermination graphique du taux de mutation.

- Stabilité : la nouvelle propriété acquise est transmise de génération en génération : 1e mutant résistant à la streptomycine peut être cultivé de multiples fois sur un milieu sans streptomycine en conservant son nouveau caractère. La mutation est un phénomène héréditaire et stable.

Le caractère sauvage peu réapparaître chez certains mutants, mutations inverses (ou réverses) :

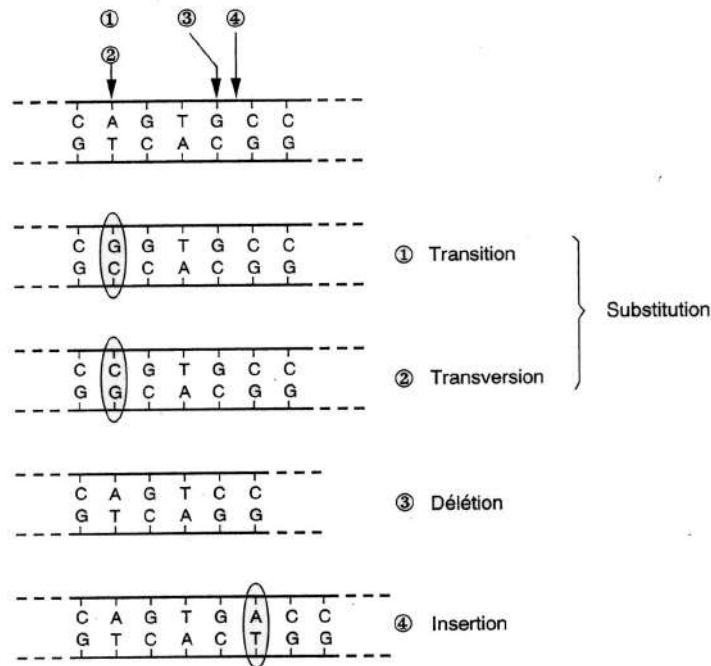
bactérie streptomycine sensible $\longleftrightarrow$ bactérie streptomycine résistante

- Indépendance : les mutations sont en général spécifiques d'un caractère donné. Elles sont aussi indépendantes, c'est-à-dire qu'une bactérie mutée pour un de ses caractères peut subir une autre mutation pour n'importe quel autre caractère.

d- Application importante en thérapeutique antibactérienne : soit un germe sensible à deux antibiotiques A et B, dont les taux de mutation $S \rightarrow R$ sont respectivement de 10^{-7} et 10^{-8} . Puisque les deux caractères sont indépendants, la probabilité pour une bactérie de subir une mutation double, c'est-à-dire de devenir résistante aux deux antibiotiques A et B, est le produit des probabilités individuelles. Ici, ce taux sera de $10^{-7} \times 10^{-8}$ soit 10^{-15} , c'est-à-dire pratiquement négligeable, d'où l'intérêt d'associer les antibiotiques pour traiter les maladies infectieuses.

e- Les différents types de mutations

Les mutations peuvent survenir naturellement, on les appelle alors mutations spontanées. Leur fréquence augmente en présence d'agents physiques ou chimiques appelés agents mutagènes.



- Mutation ponctuelle

C'est la substitution d'une base par une autre base de la séquence génétique,. On distingue :

Les transitions : remplacement d'une base purique par une autre base purique, ou une base pyrimidique par une autre base pyrimidique.

Les transversions : remplacement d'une base purique par une base pyrimidique et vice versa.

On obtient alors deux types de modifications :

Mutation faux sens : la substitution de la base dans un codon entraîne le changement d'un acide aminé dans la séquence peptidique. Si ce changement n'altère pas l'activité de la protéine, la mutation est dite permissive. Si l'activité est altérée ou perdue, la mutation est dite déficiente. Les propriétés antigéniques sont généralement conservées.

Mutation non sens : c'est la transformation d'un codon sensé par un codon Stop indiquant la fin de la traduction. Si le codon muté se trouve en fin de chaîne, la protéine sera peu raccourcie, donc peu modifiée. Si le codon se trouve au milieu, il y a synthèse d'une protéine incomplète inactive.

- Insertion ou délétion

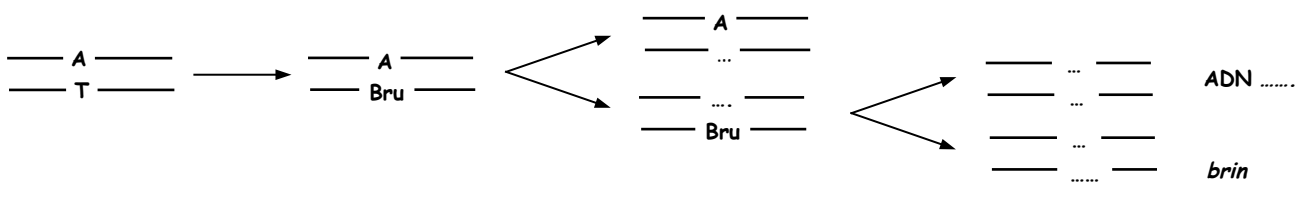
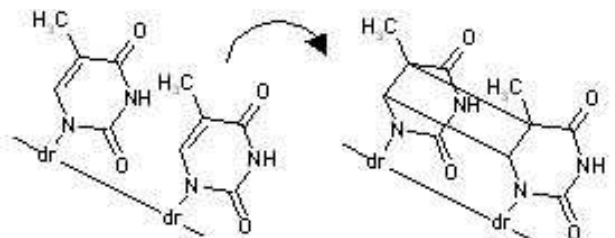
Il s'agit de l'ajout (insertion) ou de la perte (délétion) d'une ou plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN. Il en résulte une modification complète de la séquence des triplets dans l'ARNm (modification du cadre de lecture), menant à la synthèse de protéines complètement différentes (non fonctionnelles le plus souvent).

2. Agents mutagènes et mode d'action

Les agents mutagènes peuvent être des agents chimiques ou physiques.

a- Rayons UV : les rayons UV (longueur d'onde 260 nm) provoquent des modifications structurales diverses dont le plus important est la formation de dimères de thymine : au moment de la réplication, la distorsion spatiale induite par le dimère entraîne le saut de l'ADN polymérase

b- bromo-uracile : c'est un analogue de la thymine. Une bactérie cultivée sur un milieu contenant de la 5-bromo-uracile l'intègre dans son ADN.



3. Les différents types de mutants bactériens

a) Mutants morphologiques : de nombreuses mutations concernant les flagelles, les pili, la paroi, les dimensions de la cellule... sont connues. Des souches sporogènes peuvent muter en souches asporogènes... (! une bactérie mobile peut par mutation devenir immobile, mais l'inverse n'est pas vrai). L'aspect des colonies peut changer de façon spectaculaire :

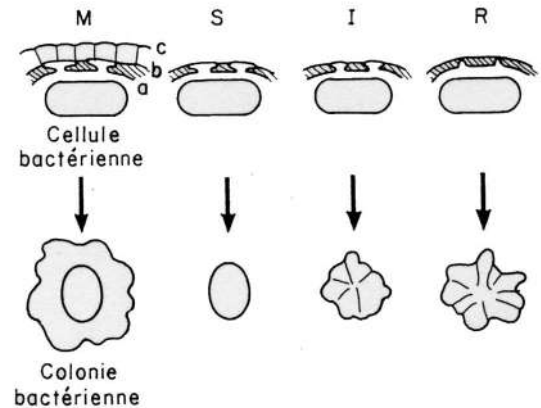
Colonies S (smooth ou lisses) : rondes et régulières, donnant des suspensions homogènes en eau physiologique. Formes généralement pathogènes.

Colonies R (rough ou rugueuses) : aspect granuleux ou plissé avec contour irrégulier, donnant une agglutination spontanée en eau physiologique.

Colonies M (muqueuses) arrondies et de consistance visqueuses (présence d'une capsule polysaccharidique).

Colonies I (intermédiaires) : type morphologique intermédiaire entre S et R.

Lorsqu'une mutation entraîne plusieurs changements morphologiques simultanément, on parle de mutation pléiotropique.



Les variations bactériennes.

Les colonies peuvent être muqueuses (M), lisses (S), intermédiaires (I) et rugueuses (R). Dans les cellules bactériennes qui les composent, on notera la présence ou l'absence de la couche capsulaire (c) et la proportion plus ou moins importante des couches lipopolysaccharidiques (b) et lipoprotéiques (a).

b) Mutants nutritionnels : il s'agit de mutants chez lesquels apparaît ou disparaît un besoin nutritionnel ou qui acquièrent ou perdent un caractère biochimique (fermentation d'un ose, dégradation d'un acide aminé...). Les mutants auxotrophes sont facilement obtenus à partir de souches prototrophes grâce à une irradiation UV. Il est par contre plus difficile d'obtenir des mutants prototrophes à partir d'auxotrophes..

c) Mutants résistants aux antimicrobiens : un antibiotique est actif s'il peut pénétrer dans la cellule et atteindre son site d'action. La modification de la perméabilité membranaire, la modification de la cible de l'antibiotique (consécutives à une mutation) ou l'acquisition d'une nouvelle fonction enzymatique (cas des pénicillinases, des céphalosporinases...) sont responsables de l'acquisition de résistance.

d) Mutants conditionnels : une mutation est létale lorsque le produit du gène muté est indispensable à la cellule. La mutation est létale conditionnelle lorsqu'elle ne s'exprime que dans certaines conditions.

Exemple : modification de la température d'inactivation d'une protéine d'*E. coli* : la protéine est dénaturée à 45°C mais pas à 30°C. La mutation létale s'exprime à 45°C mais pas à 30°C.

4. Test de mutagenèse

Un agent physique ou chimique est cancérigène pour l'homme en provoquant des lésions de l'ADN qui entraînent des transformations cancéreuses. L'ADN étant commun à tous les êtres vivants, le test utilise des bactéries.

La souche utilisée est une *Salmonella typhimurium* auxotrophe His⁻ (incapable de se développer en absence d'histidine). Un composé est mutagène lorsqu'il permet de faire pousser cette souche sur un milieu sans histidine. Dans le test, on ajoute aux bactéries un extrait de foie de rat qui permet une métabolisation du produit testé analogue à celle qui se produirait chez l'animal. Ce sont souvent les métabolites qui sont cancérigènes et non le produit lui-même.

Le test est simple, sensible et précis. 90 % des produits cancérigènes connus ont donné un résultat positif à ce test.

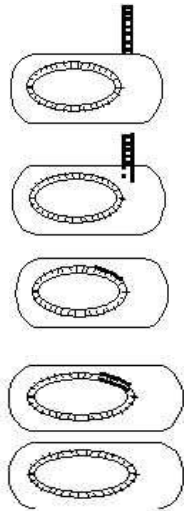
C/ LES TRANSFÈRES GÉNÉTIQUES

Bien qu'il n'existe pas chez les bactéries et les virus de reproduction sexuée permettant le brassage des caractères génétiques, il peut se produire des échanges de matériel héréditaire au cours de phénomènes dits de parasexualité.

1. La transformation bactérienne

L'expérience de Griffith a mis en évidence que l'ADN est responsable de la transformation bactérienne. L'aptitude à la transformation ou état de compétence, ne dure que pendant 15-30 minutes à la fin de la phase

exponentielle de croissance. La probabilité de transformation dépend de la concentration en ADN, qui doit être bicaténaire. Le mécanisme est le suivant :



Fixation : rencontre aléatoire entre un fragment d'ADN transformant et une bactérie compétente.

Pénétration : un fragment d'ADN pénètre à travers la membrane, l'autre brin est dégradé pendant ce passage par des endonucléases.

Intégration : le brin restant s'apparie avec une séquence homologue, structurellement proche de l'ADN receveur. Au cours de la réplication l'hétéroduplex donne naissance à un ADN transformé.

Le génome de la bactérie réceptrice est appelé endogénote, celui de la bactérie donatrice exogénote.

2 La conjugaison bactérienne

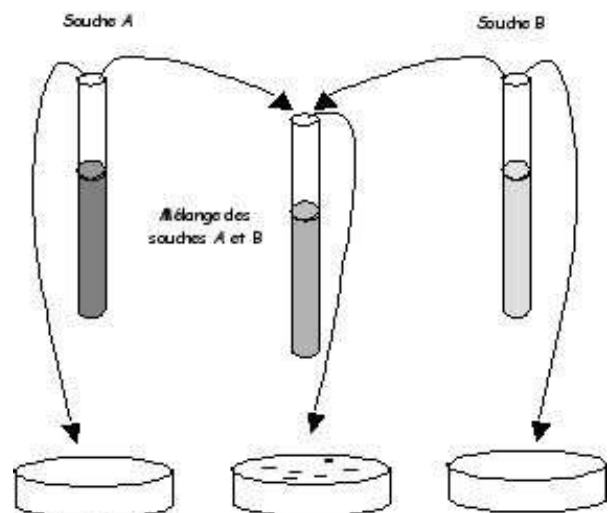
a- Mise en évidence : expériences de Lederberg et Tatum (1946-1951)

Lederberg et Tatum ont sélectionné après irradiation aux rayons X deux souches auxotrophes pour certaines substances (poly-auxotrophes) :

- **souche A** : prototrophe pour la biotine, la phénylalanine et la cystéine, auxotrophe pour la leucine et la thiamine. Le génotype de cette souche est noté : Bio+, Phé+, Cys+, Leu-, B1-
- **souche B** : auxotrophe pour la biotine la phénylalanine et la cystéine et prototrophe pour la leucine et la thiamine. Le génotype de cette souche est noté : Bio-, Phé-, Cys-, Leu+, B1+

Des bactéries A ou B étalées sur un milieu ne contenant aucune de ces substances ne donnent aucune culture. En revanche si on étale simultanément et suffisamment (au moins 10^8) des bactéries des deux souches sur un tel milieu, on récupère des colonies de bactéries nécessairement prototrophes pour tous ces caractères. Le génotype de ces bactéries est donc : Bio+, Phé+, Cys+, Leu+, B1+.

Ce sont des bactéries recombinantes : elles résultent d'un échange de matériel génétique entre bactéries des deux souches. On peut en effet exclure l'apparition de mutants car si on admet que chaque mutation survient avec une fréquence de 10^{-7} , la mutation double ou triple apparaîtrait avec une fréquence de 10^{-14} à 10^{-21} . La conjugaison est donc un transfert de matériel génétique à la suite d'un contact direct entre deux cellules.



b- Mécanisme de la conjugaison (ou sexduction)

Les expériences de Hayes (1952) montrent une sorte de différenciation sexuelle des bactéries. Certaines souches dites F⁻ sont incapables de donner entre elles des recombinants. D'autres souches dites F⁺ donnent toujours des recombinants avec les souches F⁻ et parfois entre elles. Les bactéries F⁺ sont des donneurs de matériel génétique, les bactéries F⁻ sont des receveuses.

Le caractère F⁺ ou F⁻ dépend de la possession par la bactérie d'un facteur F. Le facteur F est un réplicon, c.à.d. une petite molécule d'ADN circulaire, indépendante du chromosome, capable de réplication et présents en

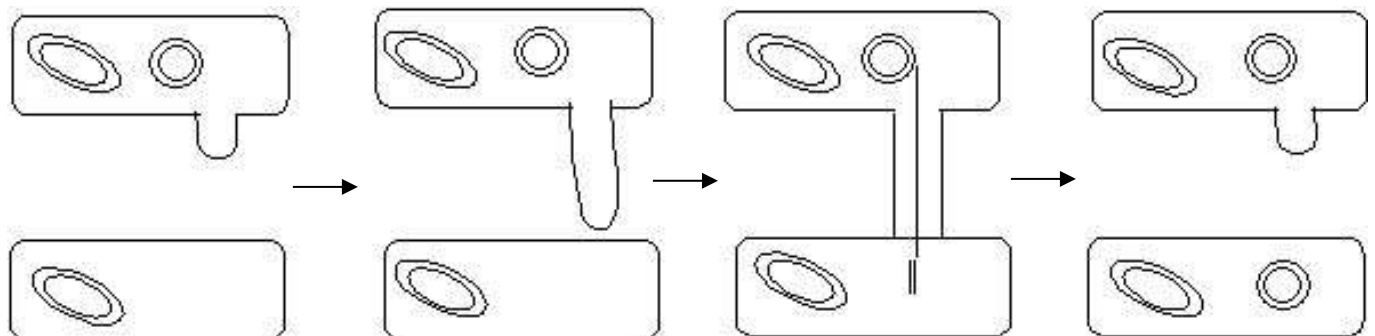
plusieurs exemplaires. Il porte les gènes codant pour les pili et pour les événements de la conjugaison (les bactéries F⁺ portent des pili à leur surface).

Le transfert d'ADN chromosomique suivi de recombinaison est spécifique (intra espèces), mais limité, en particulier aux espèces à Gram négatif telles E. coli, Salmonella, Pseudomonas aeruginosa et aussi chez les Streptococcus. Par contre, ce mode de transfert d'information génétique est très largement rencontré dans le monde bactérien lorsqu'il s'agit de transfert de plasmides conjugatifs (Tra⁺) porteurs ou non de transposons. La spécificité est, dans ce cas, variable selon le type de plasmides, certains ayant un large spectre.

Différenciation sexuelle : Le transfert d'ADN qui est à sens unique ou orienté (croisements fertiles (F) que dans un sens), met en évidence la différenciation sexuelle entre le donneur et le receveur. Elle porte sur la présence du facteur sexuel, appelé encore facteur de fertilité (F), donnant la polarité à la bactérie donatrice ou mâle (F⁺). Il s'agit du premier plasmide connu. Son potentiel d'information génétique (de l'ordre de 2 % de celui du chromosome bactérien) code pour la biosynthèse d'appendices ou pili sexuels, pour son insertion possible au chromosome bactérien, pour la mobilisation ou le transfert partiel ou non de ce dernier dans la bactérie réceptrice (F⁻). La conjugaison est ainsi dénommée sexualité des bactéries.

Contact ou appariement : Cette phase individualise ce mode de transfert. En effet, le transfert de gènes du donneur au receveur n'est possible qu'après la formation de paires ou couples de bactéries donatrice-réceptrice. Le rôle des pilis sexuels, flexibles ou non (2 à 3 par donneur) est essentiel, bien qu'incomplètement élucidé. Leurs extrémités spécifiques, repérées par des bactériophages, reconnaissent des zones de contact à la surface cellulaire des bactéries réceptrices, s'y fixent et se rétractent. Cette rétraction des pilis sexuels a pour effet de rapprocher les deux bactéries de sexe différent permettant un contact cellulaire étroit (pont cytoplasmique de 100 à 300 mμ)

Transfert de l'ADN chromosomique : La mobilisation du chromosome de la bactérie donatrice peut alors débuter à travers le pont cytoplasmique sous la forme monocaténaire (un des deux brins transmis). Ce transfert est à sens unique, orienté et progressif, quelquefois total, durant alors une centaine de minutes à 37° C. Son interruption artificielle par agitation mécanique a permis l'analyse cinétique. Un processus de réplication asymétrique restaure le brin monocaténaire non transféré du donneur au niveau d'un site réplicateur spécifique proche du pont cytoplasmique ou du pilus. Le processus ultérieur de recombinaison entre certaines régions du brin monocaténaire exogène et celles de l'ADN receveur est mal connu.



La bactérie receveuse F possède alors un épisome et devient une bactérie F⁺. Ce phénomène de parasexualité est la sexduction.

Au cours d'un croisement F⁺ x F⁻, la fréquence des recombinaisons est d'environ 10⁻⁴. Mais certains clones mutants de F⁺ présentent un taux de transfert chromosomique 1 000 fois plus grand : on les appelle mutants haute fréquence de recombinaison ou Hfr. Le facteur F n'est plus sous forme épisomique mais intégré au chromosome bactérien

c- Carte génétique par Wollman et Jacob (1956)

On mélange des bactéries F⁻ (Thr⁻ Leu⁻ Az^S T₁^S Lac⁻ Gal⁻ Str^R) et la souche Hfr sauvage (Thr⁺ Leu⁺ Az^S T₁^R Lac⁺ Gal⁺ Str^S). Après des temps croissant de contact entre les bactéries, des échantillons de cette culture mixte sont prélevés, agités au mixeur pour interrompre la conjugaison et étalés sur un milieu contenant du glucose et de la streptomycine (élimination des génotypes parentaux et sélection des recombinants Thr⁺ Leu⁺ Str^R). Les bactéries recombinantes recueillies sur ce milieu sont repiquées sur différents milieux sélectifs pour les autres caractères Az, T₁, Lac et Gal.

Si l'accouplement dure 5 minutes, aucun marqueur n'est transmis.

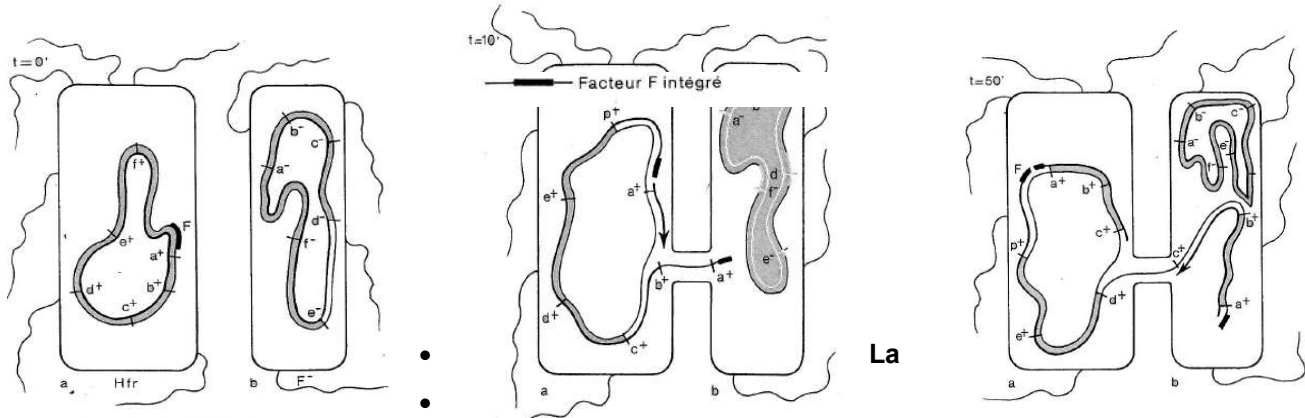
Si l'accouplement dure 10 minutes, seul le caractère Thr⁺ est transmis.

Si l'accouplement dure 20 minutes, on constate que les recombinants sont $\text{Thr}^+ \text{Leu}^+ \text{Str}^R$

Si l'accouplement n'est pas interrompu, le chromosome entier sera transmis en 90 minutes à 37°C

Les caractères $\text{Thr}^+ \text{Leu}^+ \text{Str}^R$ sont donc les premiers à être transférés. Plus un caractère est éloigné du point d'origine du transfert, moins il a de chances d'être transmis.

Pour une souche Hfr donnée, l'épisome se rompt toujours au même niveau. Il y a donc pénétration dans un ordre toujours le même, des différents gènes entraînés par l'épisome. La méthode permet de connaître l'ordre des gènes sur le chromosome et d'apprécier la distance les séparant (Carte génétique circulaire d'*Escherichia coli* K 12).



3) Transduction (cf. cours « Notions de virologie : les bactériophages »)

Les bactériophages sont des virus à ADN spécifiques aux bactéries

a- Cycle lytique

Le bactériophage (ex. : bactériophage T_4) se fixe sur des récepteurs de la bactérie et injecte son ADN dans le cytoplasme.

L'ADN phagique est répliqué, transcrit puis traduit par les enzymes bactériennes.

Les protéines et l'ADN phagiques s'accumulent dans la bactérie et s'assemblent spontanément pour former des particules virales.

La bactérie se lyse et libère dans le milieu des phages qui peuvent infecter d'autres cellules.

Les bactériophages de type T sont dits virulents.

b- Lysogénie

Dans certains cas (ex. : bactériophage λ) l'ADN phagique s'intègre sous forme de prophage dans l'ADN bactérien. La bactérie se divise et transmet le prophage à sa descendance.

La multiplication du phage qui peut être déclenchée par certains facteurs comme les rayons UV et conduit à la lyse de la bactérie. La bactérie est dite lysogène et les bactériophages de type λ sont dits tempérés.

c- Transduction

Chez une bactérie lysogène, la multiplication du phage peut être déclenchée par certains facteurs (rayons UV). Certains des phages libérés par la lyse bactérienne contiennent une petite portion de l'ADN de la bactérie hôte. Ces phages peuvent infecter des bactéries d'une souche différente et leur transmettre des caractères de la bactérie donneuse. On les appelle phages transducteurs.

- **Transduction généralisée et non spécifique** : n'importe quelle région du chromosome du donneur peut être transmise, la nucléase virale fragmentant le chromosome bactérien en de nombreux morceaux, pouvant être incorporés à la place du génome viral dans la capside. Les propriétés transmises peuvent donc être nombreuses : fermentation de glucides, résistance à un antibiotique....

- **Transduction restreinte et spécifique** : le prophage est toujours intégré dans la même région du chromosome, C'est donc toujours le même gène, situé au voisinage du prophage, qui peut être transmis.

- **Transduction abortive** : le fragment d'ADN emporté dans la capsid virale et injecté dans la cellule réceptrice n'est pas intégré dans le chromosome bactérien. Il est fonctionnel, s'exprime normalement, mais est rapidement dilué car une seule bactérie en est porteuse.

5) Transfert génétique : Conclusion

Chez les cellules eucaryotes, les transferts génétiques sont des événements communs au cours de la reproduction sexuée. A partir de deux cellules sexuelles haploïdes (gamètes), on obtient par fusion une cellule diploïde appelée zygote.

Chez les bactéries, qui se multiplient par division binaire, les transferts génétiques, rares, peuvent s'observer dans des circonstances différentes ; ils ne sont pas nécessairement suivis de recombinaison. Au cours de ce processus, une partie ou la totalité d'un réplicon d'une bactérie A est transmise à une bactérie B.

Dans la transformation, un fragment de matériel chromosomique (simple chaîne), extrait d'une bactérie donatrice, est introduit dans une bactérie réceptrice, puis intégré à son propre chromosome.

Dans la transduction, le fragment chromosomique (double chaîne) de la bactérie donatrice est transféré dans la bactérie réceptrice, par l'intermédiaire d'un bactériophage.

Dans la conjugaison, l'exogénote du donneur, qui peut être plasmidique ou chromosomique est transféré à la cellule réceptrice à la suite d'un contact direct entre les deux cellules.

Quelles que soient les modalités du processus de transfert, dans tous les cas, il aboutit à la pénétration de l'exogénote dans la cellule réceptrice. Dès lors, les événements qui vont suivre peuvent être multiples. L'exogénote peut aussi être dégradé par voie enzymatique dans la bactérie réceptrice. C'est le phénomène de restriction de l'hôte.

POUVOIR PATHOGENE DES MICRO-ORGANISMES

De nombreux micro-organismes participent à l'équilibre biologique à la surface de la terre. D'autres sont au contraire hautement nuisibles pour l'homme ou les animaux, provoquant chez eux des troubles plus ou moins graves. Selon leur nature et les conditions de milieu, les microorganismes peuvent entretenir avec leurs hôtes plusieurs types de rapports.

I - RELATIONS HÔTE / MICRO-ORGANISME

1.1. Définitions

Saprophytisme : mode de vie d'un micro-organisme qui se nourrit de substances inertes, libérées par la mort des organismes vivants, ou de ses déchets. Ils jouent un rôle considérable dans le cycle de la matière.

Commensalisme : mode de relation où l'hôte ne tire ni avantage ni inconvénient, seul le commensal y trouve son profit. Les bactéries vivant sur l'homme sont des commensales en majorité.

Parasitisme : mode de vie d'un micro-organisme vivant de matière organique vivante aux dépens d'un organisme hôte. Ils peuvent provoquer des maladies plus ou moins graves (les infections) ou entraîner la mort de leur hôte, et sont donc appelées pathogènes.

Symbiose : association réciproquement bénéfique de deux organismes. Les rapports hôte / microorganismes sont équilibrés, chaque partenaire (ou symbiote) tirant de leur association un bénéfice égal. C'est le cas des micro-organismes cellulolytiques de la panse des ruminants, des bactéries fixatrices d'azote sur les racines de certaines légumineuses, des bactéries productrices de facteurs vitaminiques de la flore intestinale.

Remarque : la limite entre commensaux et pathogènes n'est pas toujours très nette et est largement tributaire du bon fonctionnement des défenses de l'organisme.

1.2. Les flores commensales de l'homme

Dès la naissance, la peau et sur les muqueuses de l'homme sont colonisés par de très nombreux germes qui formeront des flores stables :

Les **flores commensales** permanentes (ou résidentes) se rétablissent si elles sont perturbées.

les **flores transitoires** peuvent proliférer et devenir pathogènes si la flore résidente est perturbée.

Flore de la peau : constituée de bactéries lipophiles qui se développent aux dépens des sécrétions sébacées et de la kératine. Ce sont presque exclusivement, des bactéries à Gram + : microcoques, staphylocoques, *Bacillus*, Corynébactéries, levures et champignons dans les régions humides.

L'épiderme n'est pas un environnement favorable pour les micro-organismes : dessiccation périodique, pH légèrement acide, concentration élevée de NaCl, substances bactéricides comme le lysozyme... La flore résidente ne peut être éliminée en totalité par un nettoyage.

Flore des voies urinaires et vaginales : le facteur de sélection est ici l'acidité. De la puberté à la ménopause, elle est dominée par un seul germe : *Lactobacillus acidophilus*. Ce germe dégrade le glycogène en acide lactique créant un environnement acide (pH 3 à 5) défavorable à la plupart des organismes.

Flore oropharyngée : elle est très abondante et diversifiée. Sa composition dépend de la zone anatomique considérée. On trouve essentiellement des streptocoques, *Neisseria*, staphylocoques, corynébactéries, pneumocoques etc...

Flore des voies digestives : le tube digestif humain héberge 10^{14} bactéries, essentiellement dans le côlon (l'estomac est stérile en raison de l'acidité qui y règne). Plus de 450 espèces y vivent, formant un écosystème stable pour un même individu. On rencontre essentiellement des bactéries anaérobies (*Clostridium*...), des entérobactéries (*E. coli*, *Proteus* etc.), des entérocoques, des levures, des *Pseudomonas*... Cette flore joue des rôles très importants :

1. **Activité métabolique** : la flore intestinale dégrade de nombreux substrats (cellulose, acides gras, acides aminés, urée, bilirubine, acides biliaires) ce qui profite à l'hôte (synthèse de vitamines)
2. **Effet de barrière microbienne** : par leur présence, les bactéries commensales s'opposent à l'implantation de bactéries exogènes.

3. Stimulation du système immunitaire local (plaques de Peyer)

II - POUVOIR PATHOGÈNE DES BACTÉRIES

1) Définition

Pouvoir pathogène : capacité à provoquer une maladie (modification de l'état de santé).

Maladie infectieuse : pathologie résultant ou s'accompagnant d'une infection (pénétration et développement dans un être vivant de micro-organismes pathogènes qui peuvent rester localisés (pneumonie, abcès, etc.) ou diffuser par voie sanguine (septicémie) ou répandre leurs toxines dans l'organisme (toxi-infections)).

2) Principales composantes du pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène des bactéries est déterminé par trois éléments principaux :

Le pouvoir invasif ou virulence : pouvoir de multiplication, c.à.d. capacité à proliférer dans l'organisme.

Le pouvoir toxique : capacité à sécréter des toxines.

Les résistances opposées par l'organisme : la sensibilité dépend de nombreux facteurs :

- génétiques : sensibilité au rhumatisme articulaire aigu post streptococcique (RAA), à la tuberculose..
- constitutionnels : âge (plus grande sensibilité du très jeune enfant ou de l'individu âgé.), sexe (la femme présente une plus grande sensibilité à la tuberculose pendant la période hormonale et surtout pendant la grossesse), nutrition (la malnutrition protéique entraîne une baisse de la production des anticorps et de l'immunité cellulaire.).
- état physiologique : entraîne une grande variation de la susceptibilité aux infections. Certaines maladies (maladies tumorales, sanguines, SIDA etc.) augmentent cette susceptibilité en particulier aux infections
- opportunistes.

On peut schématiser ces données sous forme d'une équation :

$$\text{Pouvoir pathogène} = (\text{pouvoir invasif} + \text{pouvoir toxique}) / \text{résistances de l'organisme}$$

Pouvoir invasif important Pouvoir toxique faible	Pouvoir invasif faible Pouvoir toxique important	Pouvoir invasif important Pouvoir toxique important	Pouvoir invasif faible Pouvoir toxique faible/nul
<i>Brucella</i> (brucellose), <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (tuberculose), <i>Salmonella</i> les souches les plus virulentes de <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (diphthérie), <i>Clostridium tetani</i> (tétanos) <i>Clostridium botulinum</i> (botulisme)...	<i>Clostridium</i> toxinogènes, <i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas</i> Entérobactéries <i>Acinetobacter</i>
Bactéries à pouvoir pathogène spécifique , car introduites dans organisme, elles provoquent sur un terrain normal une pathologie bien précise. Leur élimination entraîne la guérison définitive			Bactéries opportunistes car n'engendrent d'infections que lors d'une immunodépression (commensales sur terrain normal, pathogènes sur terrain affaibli)

3) Bactéries à pouvoir invasif

Rares sont les micro-organismes capables de traverser la peau saine. Une lésion cutanée (ulcère, éraflure, brûlure, plaie...), généralement d'origine traumatique, constitue donc une porte ouverte à l'infection.

aAdhésion : la plupart des infections commencent par l'attachement de l'agent infectieux au niveau d'une muqueuse, lui permettant de résister aux phénomènes mécaniques (toux, péristaltisme intestinal, flux urinaire) tendant à l'expulser. Cette adhérence est due à différents types de structures de surface :

Facteur d'adhérence	Description
Fimbriae	Structures filamenteuses protéiques, codés par le chromosome, permettant l'attachement aux surfaces solides et possédant également des propriétés hémagglutinantes (érythrocytes de cheval, poule cobaye etc.)
Acides téichoïques	Constituants de la paroi des bactéries Gram +
Capsule	Structure polysaccharidique à contour net
Couche muqueuse glycocalyx	Film polysaccharidique moins compact qu'une capsule, adhérant aux cellules humaines comme chez les streptocoques de la cavité buccale responsables de la plaque dentaire (<i>S.mutans</i> , <i>S.salivarius</i>)
Antigènes d'adhérence (adhésines)	Protéines de surface codées par un plasmide, hémagglutinants, capables d'adhérer à certaines villosités intestinales ; ex: Ag K88 et K99 de souches animales d' <i>E. coli</i> , CFAI et CFAII des souches humaines d' <i>E.coli</i> entéro-pathogènes

Dans certains cas, cette colonisation permet l'implantation d'une flore commensale représentant une barrière de défense. Cependant, lorsque la bactérie est invasive, la colonisation peut aboutir à l'installation d'un foyer infectieux.

b- Le franchissement des muqueuses : de nombreuses bactéries invasives possèdent un équipement enzymatique catalysant la destruction localisée d'une muqueuse :

Substances	Organismes	Rôle
Collagénase	<i>Clostridium</i>	Dégrade le collagène formant la charpente des tissus conjonctifs, permet à la bactérie de se répandre (extension locale ou générale)
DNase	Streptocoques A, Staphylocoques	Diminue la viscosité des exsudats, donnant plus de mobilité à l'agent pathogène (→ extension locale)
Hémolysines	Streptocoques A, Staphylocoques, <i>E. coli</i>	Lyse des hématies libérant du fer pour la croissance microbienne
Hyaluronidase	Streptocoques A, B, C et G, Staphylocoques	Hydrolyse l'acide hyaluronique, constituant de la substance fondamentale intercellulaire et rend le passage possible des bactéries entre les cellules (→ extension locale)
Streptokinase	Streptocoques A, B, C et G, Staphylocoques	Digère la fibrine des caillots, permettant aux bactéries de quitter la zone du caillot (extension générale)

Le tissu conjonctif liquéfié est aisément franchi, les bactéries peuvent alors se multiplier dans l'organe concerné ou (et) gagner le sang et être disséminées vers d'autres organes.

c- Résistance à la phagocytose : la plupart des germes virulents exercent une action antiphagocytaire soit par l'action de produits de sécrétion, soit du fait des propriétés de certains constituants de leur paroi

Substances	Rôle
Coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i>	Coagule le fibrinogène dans le plasma : le caillot protège la bactérie contre la phagocytose
protéine A de <i>Staphylococcus aureus</i>	Fixe les immunoglobulines G par leur extrémité Fc, empêchant ainsi l'interaction avec le complément
capsule	inhibe la phagocytose
IgA protéase de <i>Neisseria meningitidis</i>	Enzyme sécrétée par la bactérie et dégradant les immunoglobulines A

Certains germes peuvent par ailleurs se multiplier dans les phagosomes en inhibant la fusion du phagosome avec le lysosome ou bien en neutralisant les enzymes lysosomiales.

d- Nombre de bactéries : la virulence peut se définir aussi comme la quantité de bactéries nécessaires pour déclencher la maladie (dose infectante).

Remarques : la virulence d'une espèce bactérienne peut être variable:

- Le vieillissement de la souche atténue la virulence.
- Le passage répété sur des hôtes réceptifs, l'association avec une autre bactérie pathogène... exaltent au contraire la virulence
- Les mutations génétiques ou des transferts de gènes peuvent provoquer le passage à l'état pathogène de souches non pathogènes.

4) Bactéries à pouvoir toxique

a- Mise en évidence expérimentale : en 1888, Roux et Yersin injectent d'un filtrat abactérien de culture de *Corynebacterium diphterieae* à un cobaye qui meurt en 48h. A l'autopsie, ils observent les mêmes lésions que pour la maladie naturelle. Ils en concluent que les effets de la maladie sont dus à une substance chimique présente dans le milieu, non associée au corps bactérien, agissant comme un poison. C'est substance est une exotoxine.

b- Définitions

- **Toxine** : substance (protéique ou lipopolysidique) d'origine bactérienne, agissant à très faible dose, ayant un effet létal sur un organisme ou capable d'induire des troubles pathologiques sur cet organisme.
- **Intoxication** : maladie résultant de l'entrée d'une toxine spécifique dans l'organisme

c- Classification : la classification est basée sur deux critères :

- La **localisation de la toxine en phase exponentielle de croissance** : certaines ne sont libérées qu'après la lyse de la bactérie (**endotoxines**), d'autres sont libérées au cours de la vie du germe (**exotoxines**).
- La **nature chimique** : protéique ou glucidolipidoprotéique.

Localisation au cours de la croissance exponentielle		Groupe	Nature chimique	Principales bactéries toxinogènes
Restent localisées dans la cellule bactérienne ou à sa surface et ne sont libérées qu'après la lyse des bactéries	Toxines intracytoplasmiques	I	Protéine	<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Clostridium perfringens</i>
	Toxines constitutives des parois bactériennes	II	LPS	La plupart des bacilles Gram - « endotoxines » classiques
	Toxines faiblement liées à la surface bactérienne	III	Protéine	Entérotoxine de <i>S. aureus</i>
Entièrement libérées dans le milieu	« Exotoxines » vraies	IV	Protéine	Entérotoxine de <i>Vibrio cholerae</i> , toxines de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Partiellement libérées dans le milieu	Localisation mixte : endo et exocellulaire	V	Protéine	Toxines de <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium tetani</i> ...

d- Propriétés des toxines protéiques

- **Thermolabilité** : elles sont inactivées par la chaleur (60-80°C)
- **Pouvoir toxique très élevé** : les toxines botulinique et tétanique sont les poisons les plus actifs que l'on connaisse : un milligramme de toxine suffirait à tuer 1 000 tonnes de matière vivante.. Elles sont 15 000 fois plus actives que la substance chimique la plus toxique (l'aconitine)
- **Spécificité d'action très étroite** : chaque toxine provoque des symptômes particuliers et ceux-ci peuvent être reproduits par son introduction dans l'organisme.

On distingue :

1. **Les neurotoxines** : la toxine botulique se fixe au niveau de la plaque motrice (jonction neuro-musculaire) et inhibe la libération d'acétylcholine entraînant une paralysie flasque des muscles. La toxine tétanique agit au niveau présynaptique en inhibant la synchronisation entre muscles agonistes et antagonistes, provoquant une paralysie de contracture.
Ces toxines agissent à distance du foyer infectieux.
 2. **Les entérotoxines** : la toxine cholérique se fixe sur les entérocytes et stimule la sécrétion intestinale d'ions Na⁺ et Cl⁻, entraînant de l'eau ce qui provoque de très fortes diarrhées
 3. **Les cytotoxines** : la toxine diphtérique inhibe la synthèse des protéines. La toxine staphylococcique solubilise les lipides membranaires provoquant la fuite du cytoplasme.
- **Pouvoir antigénique très fort** : les toxines protéiques sont de bons immunogènes qui induisent la synthèse d'anticorps (antitoxines) neutralisants.

Les toxines protéiques se détachent parfois spontanément ou peuvent être transformées artificiellement (sous l'action du formol, de la chaleur et du vieillissement) en **anatoxines** (toxine ayant perdu son pouvoir toxique mais conservant son pouvoir antigénique). Les anatoxines sont utilisées pour la préparation de certains vaccins,

- **Toxinogénèse** : elle dépend de la composition du milieu (milieu riche, présence ou absence de certains ions métalliques etc...) et d'un facteur génétique porté :
 1. soit par un bactériophage (toxine diphtérique, toxine érythrogène, toxines botuliques C et D, entérotoxine A de *S. aureus* etc),
 2. soit par un plasmide (toxine tétanique, hémolysine et entérotoxines de *E. coli*)
 3. soit situé sur le chromosome (toxines cholérique, coquelucheuse...).

e- Propriétés des endotoxines : il s'agit du LPS, constituant de la membrane externe des bactéries Gram -.

- **Thermostabilité** : elles ne sont pas inactivées par la chaleur
- **Pouvoir toxique faible** : seules des doses élevées provoquent la mort il faut environ 1 mg/ kg)
- **Pas de spécificité d'action** : les effets toxiques sont dus au lipide A :

Effet pyrogène : l'injection de LPS provoque une fièvre intense après 30 minutes associée à une leucopénie intense.

Effet vasculaire : le LPS entraîne une hypotension et une diminution de la circulation veineuse, avec possibilité d'arrêt cardiaque.

Effet abortif.

Chez les patients atteints de septicémie à bactérie Gram -, une antibiothérapie massive peut libérer brutalement une quantité importante d' endotoxine ce qui entraîne un collapsus cardiovasculaire (effondrement de la pression, sanguine) et des hémorragies digestives (choc endotoxinique)

f- Pouvoir antigénique faible : les endotoxines entraînent la formation d'anticorps précipitants (IgM) mais non neutralisants. On ne peut obtenir ni anatoxine ni antitoxine.

Action non spécifique sur l'immunité :

Effet adjuvant : le LPS augmente la réponse à un antigène injecté simultanément.

Effet mitogène : augmentation des mitoses de lymphocytes B

5) Bactéries invasives et toxiques

De nombreuses bactéries présentent ces deux caractéristiques. C'est notamment le cas des *Clostridium*, responsable de myonécroses. Ces bactéries sont introduites, à la suite d'une blessure, dans une plaie profonde. Elles se multiplient activement dans la plaie et libèrent leurs enzymes (lécithinase, collagénase, diverses protéases...) qui opèrent une digestion du tissu musculaire. Les *Clostridium* sont fortement producteurs de gaz (à l'exception de *C. histolyticum*). Le gaz produit s'accumule dans les espaces rendus disponibles par la fonte des tissus et forme des poches qui, en éclatant, dispersent les germes. Ceux-ci reprennent plus loin leur activité. La plaie progresse rapidement, l'amputation est souvent nécessaire.

Parallèlement, les agents des myonécroses produisent leurs toxines. La toxine de *Clostridium perfringens* a une activité hémolytique : les hématies sont massivement détruites avec pour conséquence une forte anémie, des troubles rénaux et hépatiques, se traduisant cliniquement par un ictère.

6) Bactéries opportunistes : les infections nosocomiales

Les infections hospitalières résultent de la réunion de trois facteurs principaux :

a- L'immunosuppression : l'hôpital accueille de nombreux malades dont les défenses immunitaires sont plus ou moins affaiblies. Tous ces malades sont très sensibles aux agents infectieux, y compris ceux dont la virulence est peu importante.

b- Le traitement : pour prévenir les infections, il est instauré un traitement à base d'antibiotiques à large spectre dont l'effet indésirable est de sélectionner les germes résistants.

c- Les germes : la sélection s'opère sur des bactéries d'origine exogène présentes dans l'environnement du malade, dans tous les endroits humides (robinets, humidificateurs, linge, plantes ornementales, cathéters...)

LES ANTIBIOTIQUES

1. Historique de la découverte

- En **1877**, Pasteur et Joubert observent que dans une culture de deux bactéries différentes, l'une finit par éliminer l'autre : c'est l'**antagonisme bactérien**. Ils suggèrent qu'il existe une substance, produite par l'espèce dominante, responsable de l'élimination de l'autre bactérie.

A partir de cette observation fondamentale, les travaux de nombreux chercheurs vont aboutir à la découverte des antibiotiques.

- En **1897**, Duchesne répète les expériences de Pasteur et Joubert en utilisant une bactérie et une moisissure qui en général l'emporte en culture. Il imagine les conséquences thérapeutiques possibles et traite certaines maladies avec des produits d'origine fongique, dont ceux provenant d'une culture de *Penicillium*, et se pose en véritable précurseur des antibiotiques.

- En **1909**, Herlich formule le principe de base d'une substance chimique utilisable en thérapeutique. Pour être utilisable par voie générale cette substance doit être de toxicité sélective (toxique pour les micro-organismes et non pour les cellules animales).

- En **1928**, Fleming observe sur une boîte de culture de staphylocoques une inhibition autour d'une colonie de moisissure contaminante identifiée comme *Penicillium notatum*. Fleming suppose que la moisissure produit une substance qui diffuse dans le milieu et a une activité inhibitrice sur la souche de staphylocoque. Plus on s'éloigne de la moisissure, plus sa concentration dans le milieu diminue, et à partir d'un certain seuil, les staphylocoques peuvent se développer.

Il ensemence par stries plusieurs souches bactériennes d'espèces différentes perpendiculairement à une rigole creusée dans la gélose, contenant un filtrat d'une culture de *Penicillium notatum*.

Après incubation on constate que la pousse de certaines souches est inhibée. Le filtrat contient une substance inhibitrice donc l'action est sélective (*Salmonella* n'est pas inhibée). Un filtrat identique est injecté à des souris, les souris survivent. Le filtrat ne contient pas de substance toxique pour l'animal. Fleming nomme pénicilline la substance douée d'activité antibactérienne produite par *Penicillium notatum*.

Un produit empêchant le développement d'un microbe se termine par le suffixe **-statique** (ex : bactériostatique, fongistatique) par opposition au suffixe **-cide** qui désigne la capacité de détruire.

2) L'activité antimicrobienne

L'activité d'un agent antimicrobien dépend :

a. du micro-organisme :

- les germes en phase exponentielle de croissance sont plus résistants que ceux âgés de 24h ou plus - le nombre de microbes nécessite d'augmenter la durée d'action de l'agent
- les spores peuvent être très résistantes (voir cours sur la structure bactérienne)

2. des conditions physico-chimiques : - la température peut augmenter ou inhiber l'effet de l'agent (les antibiotiques sont sensibles à la chaleur)

- le pH a les mêmes effets (un antibiotique n'agit que dans une zone limitée de pH)

- la composition du milieu modifie l'action de l'antimicrobien

3. de l'agent lui même :

- le spectre d'action est la liste des espèces sur lesquelles une substance exerce son pouvoir antimicrobien

- l'intensité pour les agents physiques (l'action augmente avec la température ou la pression)

- la concentration pour les agents chimiques (effet bactéricide ou bactériostatique)

- la stabilité chimique est très variable (l'eau oxygénée se décompose rapidement)

- la solubilité qui favorise le contact et la pénétration du produit dans sa cible est très variable

3) L'Action antimicrobienne : schéma d'inactivation

La destruction d'une population bactérienne par un agent antimicrobien n'est pas instantanée. La proportion, de survivants diminue avec le temps selon une fonction logarithmique :

$$N = N_0 \cdot e^{-kt}$$

N_0 : nombre initial de microbes

N : nombre de microbes survivants au temps t

k : constante de destruction (dépend du microbe, de l'agent et des conditions d'application)

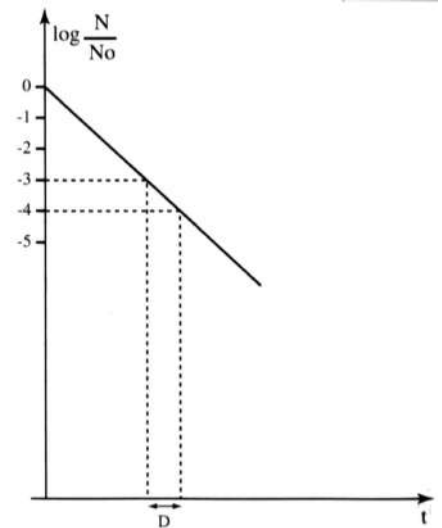
Après intégration $\rightarrow \log(N/N_0) = (-k \cdot t / 2.303) = -t/D$

$D = 2.303/k$ = temps de réduction décimal (nécessaire pour réduire d'une puissance de 10 le nombre de microbes)

Pour détruire un nombre initial $N_0 = 10^n$, on a besoin d'un temps de destruction $t = n \cdot D$

Exemple: soit une population bactérienne de 10^5 bactéries et un produit qui détruit 90% d'une population bactérienne par minute ($D = 1$ minute).

T: temps (minutes)	N (nombre de bactéries)
0	10^5
1	10^4
2	10^3
3	10^2
4	10^1
5	$10^0 = 1$
6	$10^{-1} = 0.1$
7	$10^{-2} = 0.01$



Donc au bout de 6 minutes il reste encore 1 chance sur 10 pour qu'il y ait encore des bactéries, et ainsi de suite. En augmentant le temps d'action, on augmente la probabilité d'avoir détruit le dernier micro-organisme vivant.

4) Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques en familles peut se faire

- Selon la nature chimique : classification la plus utilisée
- Selon leur spectre d'action (ensemble des bactéries sensibles à un antibiotique) : on distingue les antibiotiques à large spectre, à spectre étroit, les antimycosiques...
- Selon leur origine.
- En fonction du site d'action au niveau de la cellule bactérienne (le plus simple à étudier)

5) Modalité d'action des antibiotiques

Pour qu'un antibiotique soit actif, il doit respecter trois conditions

1ère condition : l'antibiotique doit pénétrer dans la cellule

a. au niveau du foyer infectieux

Un antibiotique ne diffuse pas de la même façon dans tous les tissus de l'organisme. Les taux tissulaires sont le plus souvent inconnus parce que difficilement mesurables.

Dans les poumons, les antibiotiques diffusent assez bien.

Dans le LCR, la diffusion est limitée puisque l'on retrouve en moyenne le 1/10 des taux sanguins.

b. dans la bactérie

La paroi des bactéries à Gram positif est relativement perméable à la plupart des antibiotiques.

La paroi des bactéries à Gram négatif est en règle générale beaucoup moins perméable à cause de la membrane externe.

La traversée de la membrane externe dépend des caractéristiques de la molécule telles que la taille, la solubilité et sa charge électrique.

La traversée de la membrane cytoplasmique peut se faire par simple diffusion passive ou "emprunter" un système de transport bactérien consommant de l'énergie.

2ème condition : l'antibiotique ne doit pas être modifié ni détruit

a. dans l'organisme

La plupart des antibiotiques ne sont pas modifiés dans l'organisme.

b. dans la bactérie

De nombreuses enzymes codées par le chromosome bactérien ou par des plasmides sont capables de détruire ou de modifier la molécule de façon telle que la fixation à la cible est rendue impossible. Une fois de plus, les bactéries à Gram négatif sont avantagées car la membrane extérieure délimite un espace périplasmique où pourront s'accumuler certaines de ces enzymes.

3^{ème} condition : l'antibiotique doit se fixer à une cible

Cibles principales que peuvent atteindre les antibiotiques :

- la voie de synthèse du peptidoglycane de la paroi
- les membranes : extérieure et cytoplasmique
- la voie de synthèse des protéines
- la voie de synthèse des acides nucléiques

6) Cibles moléculaires des antibiotiques

• Action sur la synthèse de la paroi :

Ce sont essentiellement les **β -lactamines** : tous ces antibiotiques ont en commun le noyau **bêta lactame** (

Les cibles des β -lactamines sont des protéines insérées sur la face externe de la membrane cytoplasmique, les PLP (Protéines Liant la Pénicilline ou PBP Penicillin Binding Proteins).

Ces PLP ont une activité de transpeptidase : elles sont impliquées dans la **synthèse du peptidoglycane**.

Les β -lactamines ne sont donc actives que sur la paroi et plus sur les bactéries Gram + que sur les bactéries Gram -, dont la membrane externe s'oppose à leur passage.

Ils sont **bactéricides** et agissent seulement sur les germes en **phase exponentielle de croissance** et de synthèse du peptidoglycane (les bactéries n'étant plus protégées par leur paroi finissent par éclater par choc osmotique). Ce sont donc **les moins toxiques** de tous les antibiotiques.

Outre les bêta lactamines, citons également la **vancomycine** (utilisée dans les infections sévères à staphylocoques, entérocoques et streptocoques), un inhibiteur de la fixation du NAM-pentapeptide sur le peptidoglycane, la **fosfomycine**, la **bacitracine**.

• Action sur la membrane plasmique :

→ Les **polymyxines** (polymixine B, colistine) sont des polypeptides cycliques produits par *Bacillus*, agissant comme des détergents en désorganisant la membrane cytoplasmique des bactéries Gram -.

→ La **Gramicidine** forme des pores traversant la membrane plasmique, provoquant la fuite de constituants intracellulaires et la mort de la cellule.

• Action sur la synthèse des protéines

→ Les **aminosides** : très bactéricides et souvent associés aux bêta-lactamines, ils provoquent des erreurs de lecture de l'ARNm (fixation sur la sous-unité 30S ou 50S des ribosomes), les protéines formées étant anormales.

→ Les **macrolides** et apparentés (érythromycine, josamycine, lincomycine....) perturbent l'élongation des protéines.

→ Les **cyclines** (tétracycline, minocycline) inhibent la synthèse protéique par blocage de la fixation de l'aminoacyl-ARNt au niveau des ribosomes.

→ Les **phénicol**s (chloramphénicol, thiamphénicol, très toxiques, sont réservés au traitement de la typhoïde. Ils empêchent la formation de la liaison peptidique entre deux acides aminés.

→ **Acide fusidique** : bloque la translocation des acides aminés sur le ribosome. Utilisé dans les infections bénignes à staphylocoques.

Comme toutes ces molécules distinguent les ribosomes eucaryotes des ribosomes procaryotes, leur indice thérapeutique est élevé, mais moins que celui des inhibiteurs de synthèse de paroi.

• Action sur les acides nucléiques

→ La **mitomycine C** crée des ponts entre les deux chaînes de la molécule d'ADN, ce qui empêche leur séparation lors de la réplication.

→ Les **quinolones** inhibent la réplication de l'ADN en bloquant l'ADN-gyrase

→ Les **rifamycines** se fixent sur la transcriptase bactérienne et perturbe la transcription de l'ADN en ARN

• Action par inhibition compétitive (antagonisme métabolique)

→ Les **sulfamides** sont des inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique (précurseur des acides nucléiques).

III. PHENOMENE DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

L'apparition des phénomène de résistance aux antibiotiques fut constatée très rapidement après le début de leur utilisation : en 1941, moins de 1 % des souches de *S. aureus* étaient résistantes, dès 1946, 14 % des souches sont résistantes, et 90 % le sont actuellement)...

La résistance des micro-organismes pose de graves problèmes surtout en milieu hospitalier ou souvent 99 % des souches isolées présentent des résistances.

Ainsi, un micro-organisme est dit **résistant** lorsqu'il est capable de se développer en présence d'un taux

d'antibiotique plus élevé que le taux habituel.

1. Mécanismes responsables de phénomènes de résistance

• Diminution de la perméabilité cellulaire à l'antibiotique (perte ou altération des porines) :

→ La paroi des bactéries à Gram - s'oppose à la pénétration de nombreux antibiotiques.

Ceux qui pénètrent le font par des porines. Toute mutation touchant une de ces protéines canal entraînera une diminution de la pénétration de l'antibiotique.

Il existe aussi des mécanismes d'excrétion active de l'antibiotique (nécessite de l'énergie)

→ La paroi des bactéries **Gram +** laisse librement pénétrer les antibiotiques.

• **Modification de la cible et diminution de son affinité pour l'antibiotique** : la mutation au niveau d'un ou de plusieurs acides aminés dans une protéine ribosomale rend l'antibiotique inefficace, mais ces cas sont rares.

• **Inactivation de l'antibiotique par une enzyme** : les β -lactamases (ex. : pénicillinase) sont des enzymes hydrolysant le cycle β -lactame entraînant la perte d'activité antibactérienne.

Les β -lactamases sont **exocellulaires** chez les **bactéries Gram +** et **périplasmiques** chez les **Gram -**.

• **Mise en place d'une dérivation métabolique** : certaines bactéries mettent en place une autre voie métabolique qui permet de « doubler » la voie bloquée. Ainsi, la résistance aux sulfamides est due à l'utilisation d'acide folique (précurseur des nucléotides) préformé présent dans le milieu, la bactérie ne le synthétise plus elle-même. Une production accrue de la cible de l'antibiotique est également possible.

2. Génétique de la résistance

• **Résistance naturelle** : c'est une propriété préexistante chez la bactérie, par exemple lorsque la cible de l'antibiotique n'existe pas chez le germe (les β -lactamines sont inactifs sur les mycoplasmes, bactéries sans paroi). Cette résistance peut résulter d'une sélection qui a fait émerger les souches résistantes.

• **Résistance acquise** : ce type de résistance n'affecte initialement qu'une souche. L'expression de la résistance est contrôlée génétiquement. Les gènes peuvent être localisés soit dans le nucléoïde, soit dans des éléments extrachromosomiques (plasmides, transposons) que peut acquérir la bactérie par un mécanisme de transfert (conjugaison ou transduction).

→ **Résistance chromosomique** : elle concerne **10 % des cas** de résistance acquises. Une mutation spontanée, survenant aléatoirement, rend une bactérie résistante. Mais comme le taux de mutation spontanée varie de 10^{-6} à 10^{-9} selon les bactéries, ces événements sont rares. Par contre, le nombre de mutants est d'autant plus élevé que la population bactérienne est grande. L'antibiotique intervient alors comme agent de sélection en éliminant les populations sensibles.

Exemple : soit deux antibiotiques A et B. La mutation conférant la résistance à l'antibiotique A se produit de façon indépendante de l'antibiotique B. Si la fréquence de mutation est respectivement de 10^{-6} et 10^{-7} pour A et B, la fréquence d'apparition d'un double mutant sera de 10^{-13} . En thérapeutique, on utilise ainsi fréquemment l'association de deux antibiotiques.

→ **Échange de matériel génétique par des plasmides ou des transposons** : concerne **90 % des cas** de résistance acquises.

Presque toutes les bactéries peuvent posséder un plasmide de résistance aux antibiotiques. Les gènes portés par ces éléments peuvent :

- Apporter à la bactérie le gène d'une enzyme d'inactivation de l'antibiotique (pénicillinase par exemple).
- Produire une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (excrétion)
- Entraîner une modification de la cible ou la substitution de la cible sensible par une autre insensible.

On comprend donc facilement que ce sont ces résistances acquises qui sont responsables de l'apparition de souches multirésistantes particulièrement difficiles à traiter, d'autant que les transferts s'effectuent de façon **verticale** (cellule mère vers cellule fille) et de façon **horizontale** (entre espèces bactériennes plus ou moins apparentées).

Le suivi strict d'une prescription médicale comportant un traitement antibiotique est donc indispensable. Si la posologie n'est pas respectée, la concentration tissulaire de l'antibiotique sera inférieure à sa valeur bactéricide, et aura pour effet de sélectionner des germes résistants plutôt que de les tuer.

Par ailleurs, les antibiotiques prescrits en ville ne sont pas les mêmes que ceux prescrits en hôpitaux : y sont réservés les antibiotiques les plus puissants et / ou les plus récents pour éviter (ou ralentir) le développement de résistances (plusieurs antibiotiques sont parfois prescrits simultanément dans ce but, certains ne le sont qu'en association).

NOTIONS DE VIROLOGIE

La découverte des virus date de **1884** quand **Chamberland** invente le **filtre en porcelaine** capable de retenir les bactéries. L'étude d'une maladie des plants de tabac, la mosaïque, en 1892, montre que même après filtration, des extraits de feuilles de plantes infectées restent inducteurs de la maladie : on définit ainsi de nouveaux agents microbiens, dits **ultrafiltrables**.

Ce caractère d'agent ultrafiltrable est ensuite démontré pour d'autres maladies (fièvre jaune, rage), poliomyélite, fièvre aphteuse). Ces agents infectieux d'un nouveau type sont nommés **VIRUS**, du latin poison. En 1911, on montre qu'un virus est responsable d'une **tumeur** du muscle chez le poulet. En 1915, on découvre qu'il existe des virus particuliers aux bactéries, les **bactériophages**.

Leur étude directe débute en 1950, le terme de **virion** est alors introduit pour désigner la particule virale organisée visible au microscope électronique, forme extracellulaire et inerte du virus (virus désignant l'agent à tous ses stades).

I/ GÉNÉRALITÉS

1) Importance des virus dans le monde vivant

Les virus sont de petite taille (inférieure à $0,30\ \mu\text{m}$ environ), passent au travers des filtres $0,22\ \mu\text{m}$ et sont des agents d'un grand nombre de maladies infectieuses appelées **viroses**, des plus bénignes aux plus graves, affectant tous les êtres vivants multicellulaires et unicellulaires. Plusieurs milliers de virus sont recensés, chacun étant spécifique d'une espèce vivante, dite **hôte**.

2) Définition

Les virus se comportent à la fois comme des gènes et comme des agents infectieux. Le monde des virus est un monde à part. Dès 1953, André Lwoff pose une définition des virus en quatre points :

- Un virus ne contient qu'un seul acide nucléique, **soit ARN soit ADN**.
- Un virus présente une structure acellulaire (ni cytoplasme, ni noyau), **quasi cristalline**.
- Un virus est un parasite intracellulaire obligatoire : il possède l'information nécessaire à la synthèse de ses propres constituants, mais n'a pas les moyens d'exprimer cette information : il utilise donc les systèmes de transcription de l'ADN en ARN messager et de traduction des messagers en protéines de la cellule infectée. De nouveaux virions peuvent alors être libérés. En dehors de l'hôte, un virus est une particule inerte, le **virion**, qui ne possède ni métabolisme, ni capacité de réplication.
- Un virus est incapable de croître ou de se diviser *in vitro*. Son mode particulier de multiplication diffère de la mitose ou de la multiplication bactérienne.

3) Obtention des virus

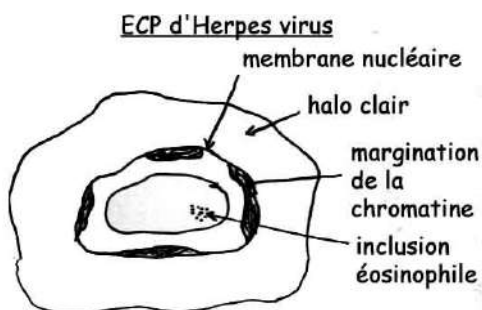
Les techniques de cultures des virus se sont longtemps basées sur l'**inoculation à l'œuf** (généralement de poule).

Actuellement pour de nombreux virus, il est possible d'utiliser des **cultures cellulaires eucaryotes**. Les virus provoquent sur ces cultures, soit :

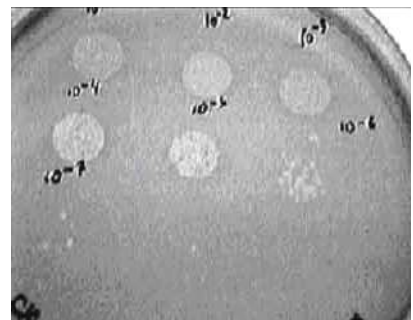
la **lyse des cellules** (plage de lyse),

des anomalies dans les cellules infectées (**effets cytopathiques ou ECP**).

Les virus bactériens (bactériophages) sont capables de détruire très rapidement une culture bactérienne.



→ Plages de lyse sur un tapis bactérien confluent après infection par des dilutions croissantes de bactériophages



II LA STRUCTURE VIRALE

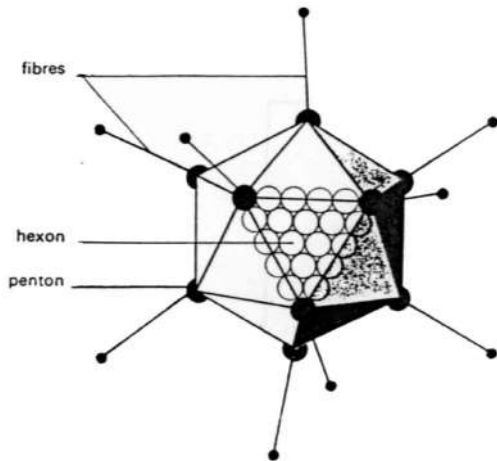
Schématiquement, un virus est formé d'une coque protéique, la **capside**, renfermant le **génome**, de l'ADN ou de l'ARN. La taille se situe entre 10 et 400 nm. La nucléocapside est parfois entourée d'autres couches.

1) Les différents types de capsid

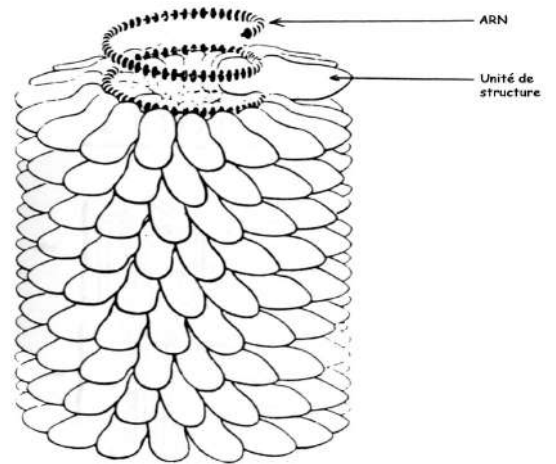
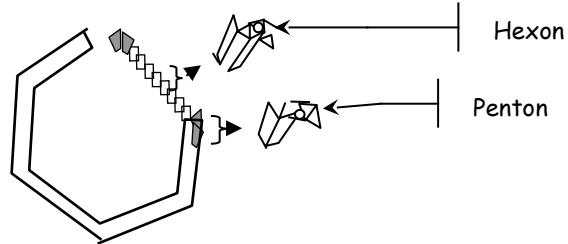
Les capsides sont constituées par l'assemblage d'**unités protéiques répétitives** appelées **capsomères**. La fonction de la capside est de **protéger** l'acide nucléique viral de l'action dénaturante des nucléases cellulaires ou tissulaires.

a- Capside icosaédrique (symétrie cubique)

Un icosaèdre est un polyèdre à **20 faces** triangulaires équilatérales et 12 sommets. Au niveau des sommets les capsomères sont groupés par 5 (**pentons**), au niveau des faces et des arêtes les capsomères sont groupés par 6 (**hexons**).



Virions à nucléocapside icosaédrique d'un adénovirus.

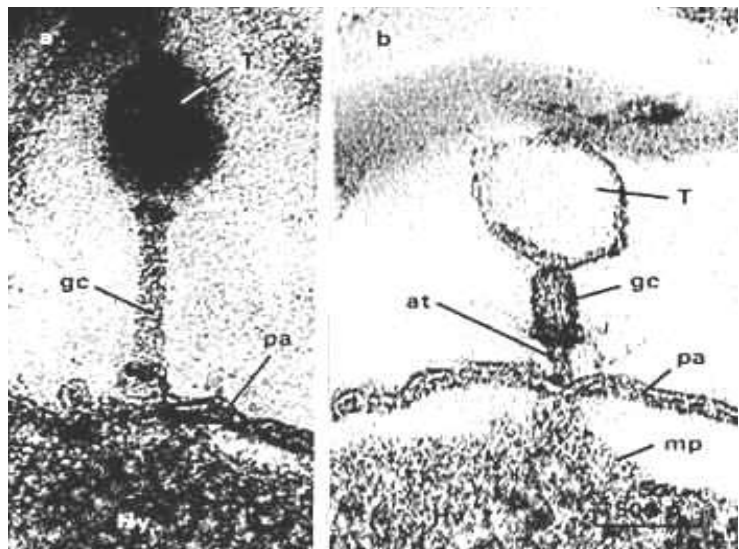
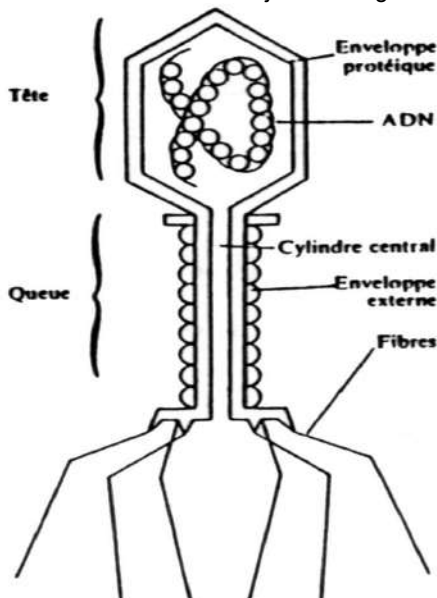


b-Capside hélicoïdale (→)

La capside ressemble à un **cylindre creux** donnant un aspect en tronc de palmier. Cette hélice peut être rigide ou souple.

c- Capside mixte

Elle associe les deux types de symétries précédentes. C'est le cas du de certains **bactériophage** (ex. : bactériophage T4). La « **tête** » du phage a une symétrie **cubique**, elle renferme le génome viral (ADN bicaténaire), la « **queue** » a une symétrie **hélicoïdale**, elle permet la fixation du phage sur la bactérie hôte et l'injection du génome viral dans la bactérie.



Remarque : les virus complexes ont une capside dont la symétrie n'est ni icosaédrique ni hélicoïdale.

2) Les acides nucléiques viraux

La taille de la molécule de l'acide nucléique est très variable, mais le génome est très **réduit** (seulement 8 gènes chez les *parvovirus* et pas plus de 400 chez les *poxvirus*, contre 3 500 chez *E. coli* et 35 000 chez l'Homme). Un seul type d'acide nucléique est présent, ce peut être de l'**ADN simple brin ou double brin** ou de l'**ARN simple brin ou double brin**, parfois **circulaire** ou **morcelé**.

- La plupart des virus à ADN ont un ADN double brin qui peut être linéaire ou circulaire selon les différents virus.

- La majorité des virus à ARN contiennent un ARN simple brin. Si cet ARN est identique à l'ARN_m viral cet ARN est dit de **polarité positive**. Certains ARN viraux ont une séquence complémentaire à celle de l'ARN_m viral, ce sont des ARN de **polarité négative**.

3) Enveloppes et enzymes virales

De nombreux virus animaux sont entourés d'une couche membranaire appelée **enveloppe** ou **peplos** qui provient des membranes (plasmiques ou nucléaires) de la cellule hôte infectées. Ces virus sont dit **enveloppés**.

Ils sont **fragiles** vis à vis de la **chaleur** ou des **agents tensioactifs** (éther, sels biliaires, détergents) et nécessitent des **contacts rapprochés** pour se transmettre (rage par la morsure ; herpès, VIH, VHB... par un contact cutanéomuqueux...).

- Les **lipides** et **glucides** de l'enveloppe sont **d'origine cellulaire**.

- Les **protéines** de l'enveloppe sont en revanche **d'origine virale** (codées par des gènes viraux) et sont reconnus comme des antigènes par les anticorps de l'organisme infecté.

Les virus sans enveloppe lipidique sont appelés **virus nus**. Ils sont plus **résistants**, et se transmettent donc plus facilement.

Certains virus possèdent également des **enzymes** associées à la capsid (enzymes impliquées dans la réplication de l'acide nucléique).

Remarque :

*Les virus enveloppés ne sont donc jamais retrouvés dans les selles puisque les sels biliaires les détruisent. **La grippe intestinale n'existe pas** puisque le virus de la grippe est enveloppé. Cette dénomination absurde doit être traduite en **gastro-entérite virale**.*

*les **poliovirus** (virus nus à ARN) s'éliminent dans les selles, contaminent les eaux usées et la contamination se fait souvent par voie orale, l'épidémiologie est alors proche de celle des entérobactéries.*

IV CLASSIFICATION SELON LWOFF, HORN ET TOURNIER (LHT)

La classification L.H.T des virus ,est basée sur **quatre principaux critères** depuis 1962 :

- **nature de l'acide nucléique** (virus à ADN = **désoxyvirus**, ou virus à ARN = **ribovirus**), nombre de brins (simple ou double), orientation positive ou négative pour les génomes simple brin ;
- **symétrie de la nucléocapside** (Hélicoïdale, Cubique ou Binaire)
- **présence d'une enveloppe** (Enveloppé ou Non Enveloppé)
- **nombre de capsomères** (virus C) ou **diamètre de la nucléocapside** (virus H)

V LES VIRUS DES EUCARYOTES

Exemples de virus animaux : Virus de l'herpès, Rétrovirus, Myxovirus (rhumes, infections respiratoires, oreillons), Paramyxovirus, VIH etc..

1) Schéma général de la réplication virale (cycle dit productif)

a- Adsorption

C'est la fixation du virus sur la cellule suite à des **collisions au hasard** entre le **virion** et un **récepteur membranaire** (souvent une **glycoprotéine**).

La présence ou l'absence du récepteur sur une cellule détermine la **spécificité tissulaire** des infections virales. Le virus peut s'attacher soit directement par sa **capside** (cas des **virus nus**), soit par les **spicules** de l'enveloppe virale (cas des **virus enveloppés**).

b- Pénétration et décapsidation

Les virus pénètrent dans la cellule par **endocytose** ou par **fusion** de leur enveloppe avec la membrane plasmique et perdent leur capsid au cours de cet événement sous l'action d'enzymes cellulaires ou de **décapsidases** virales. Le génome viral est libéré dans le cytosol.

c- Expression du génome viral

Une fois dans le cytosol, le génome viral a deux destinées :

- **Être répliqué** sous l'action de **polymérases** pour former un grand nombre de **copies conformes du génome viral**, les « **néogénomes** » viraux. Pendant cette période, le virus n'existe que sous forme de génome : c'est la phase d'éclipse.
- **Être transcrit** en ARNm viraux qui seront ensuite traduits pour former les protéines virales. Cette traduction utilise les ribosomes, les ARNt et l'ATP cellulaire.

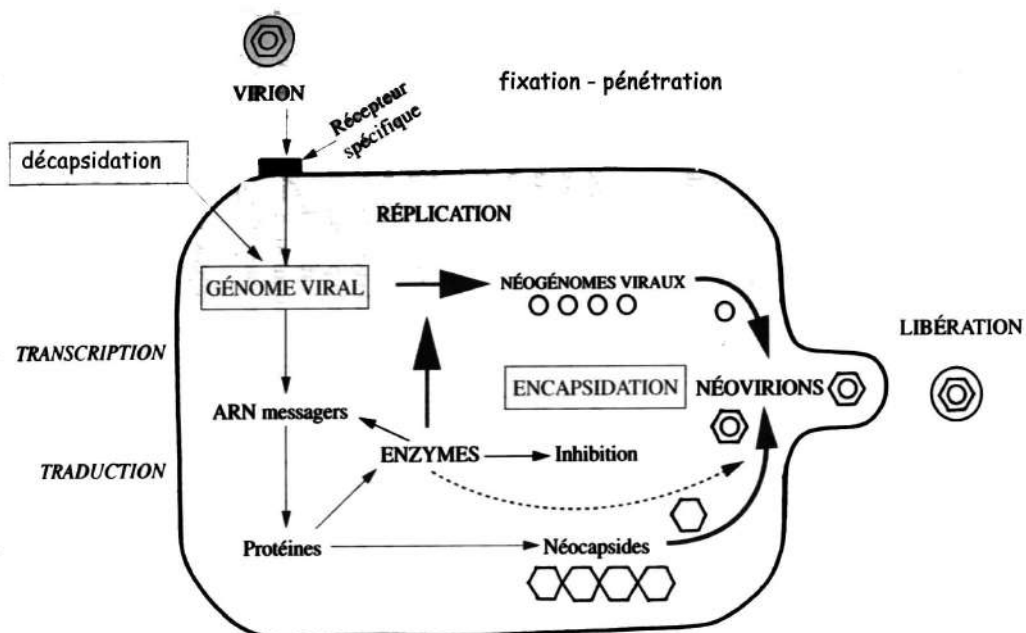
d- Assemblage

Les **néogénomes** et **néocapsides** formés s'auto-assemblent spontanément pour former de nouveaux virions (étape d'encapsidation). Pour les virus enveloppés, une étape supplémentaire leur fournira le pepsos.

e- Libération

Le cycle viral se termine avec la libération dans le milieu extérieur de centaines ou de milliers de virions ; on observe, selon les virus, deux modes d'échappement :

- La **lyse**, c'est-à-dire l'éclatement de la cellule, libérant les **virus nus**, aptes à infecter d'autres cellules, et provoquant la **mort de la cellule hôte infectée**.
- Le **bourgeonnement**, c'est-à-dire la sortie des virus à travers de petites convexités qui se forment à la surface de la membrane, qui ne détruit pas systématiquement la cellule, libérant les **virus enveloppés**.



Réplication des virus à ADN

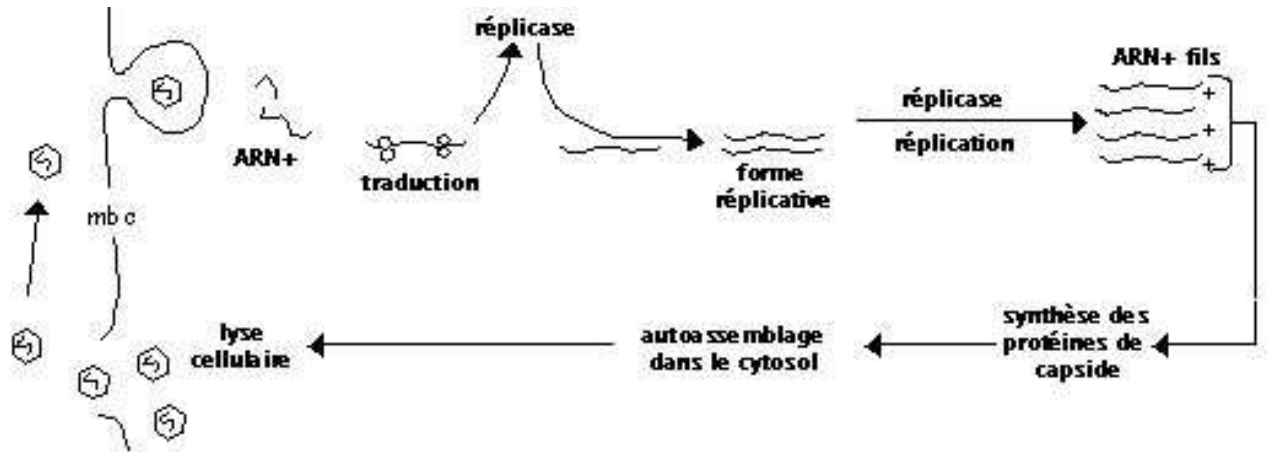
Elle se produit **dans le noyau cellulaire**. Chez les herpèsvirus, l'ADN est transcrit par l'ARN polymérase de la cellule hôte en ARN messager dirigeant la synthèse de protéines de régulation et d'enzymes nécessaires à la réplication de l'ADN viral.

Réplication des virus à ARN

Virus à ARN monocaténaux de polarité positive (modèle : Poliovirus)

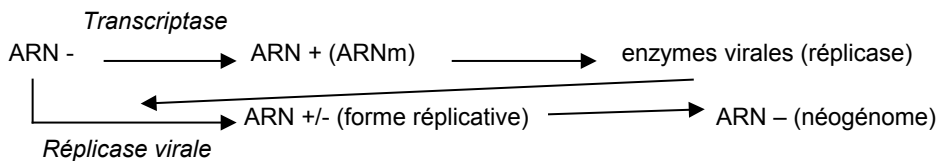
Le génome viral a une **structure d'ARN messager (polarité positive)** :

- Il est **directement traduit** par les ribosomes de la cellule, permettant la synthèse d'une enzyme indispensable à sa réplication, la **réplicase**.
- La **réplication** passe par la synthèse d'un ARN négatif complémentaire grâce à la **réplicase** (ARN-polymérase ARN-dépendante), fournissant une matrice double brin (**forme répliquative RF**) pour la formation des néogénomes viraux de polarité positive.



Virus à ARN monocaténaux de polarité négative (modèle : Myxovirus)

L'ARN simple brin négatif est d'abord recopié en brin complémentaire positif grâce à une enzyme apportée par le virus, dans sa capsid (**transcriptase**). Ce brin codant est d'une part, traduit comme un ARNm pour la synthèse des protéines virales, et d'autre part il sert de matrice pour recopier le brin négatif original, c'est-à-dire pour répliquer le génome viral. L'ARN purifié n'est donc pas infectieux.



Cas particulier des Rétrovirus

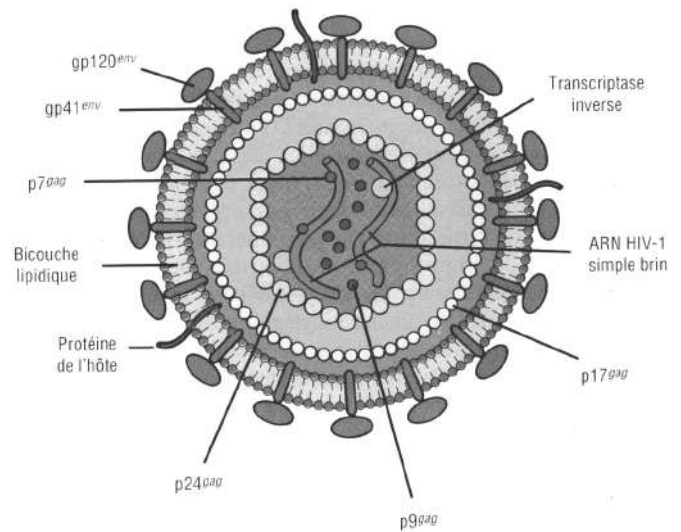
Un exemple de rétrovirus : le VIH (*Virus de l'Immunodéficience Humaine, responsable du SIDA*)

- **Structure du VIH** : virus à ARN simple brin fragmenté (2 molécules d'ARN de 9.2 kb), à symétrie cubique, enveloppé, formant des particules sphériques d'un diamètre de 80 à 100 nm. La capside renferme la transcriptase inverse.

- **Reconnaissance, internalisation et décapsidation** : fixation de la gp120 sur la protéine CD4 des lymphocytes T4.

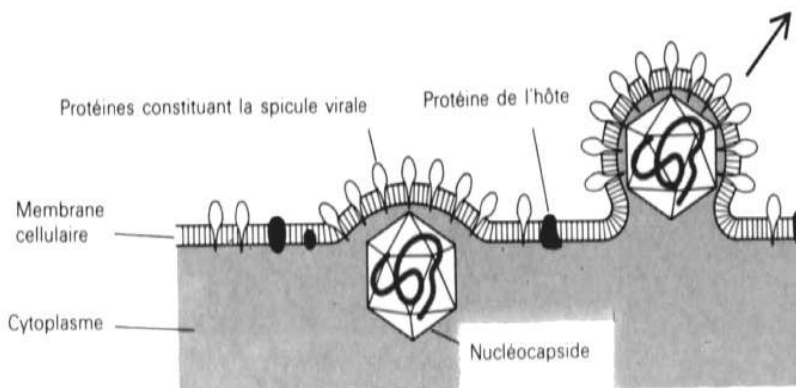
La liaison gp120-CD4 ainsi établie active la gp41 qui va se ficher dans la membrane du lymphocyte T, provoquant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique du lymphocyte. La nucléocapside passe dans le cytoplasme de la cellule.

- **Transcription inverse** : une fois entré dans le cytoplasme cellulaire, l'ARN viral va être transcrit en un **ADN proviral** grâce à la **transcriptase inverse**. Un **hybride ADN-ARN** est progressivement formé. La transcriptase inverse dégrade ensuite l'ARN⁺ associé à l'ADN, puis elle synthétise le brin d'ADN complémentaire pour former un ADN double brin proviral.



- **Intégration** : l'ADN proviral pénètre alors dans le noyau cellulaire et peut s'intégrer à l'ADN génomique de la cellule infectée. L'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire s'effectue au hasard dans le génome hôte. Le génome du VIH va se comporter comme les gènes cellulaires. Il peut rester longtemps sous cette forme sans s'exprimer, comme dans un état de **latence** et être transmis aux cellules filles lors de la mitose cellulaire ou **être activé** et diriger la synthèse des constituants viraux.

- **Transcription et Traduction** : identique à une transcription de gène cellulaire : transcription d'ARNm traduits en protéines virales qui s'accumulent et transcription d'ARN⁺ génomiques.



Assemblage et libération des virus par bourgeonnement

Résumé du cycle du VIH :

Ces virus **inversent** le processus normal au cours duquel l'ADN est transcrit en ARN. Le génome viral se présente initialement sous la forme d'un **ARN simple brin positif**, qui est d'abord **rétro-transcrit** en **ADN double brin** dès le premier stade de l'infection par une enzyme **transcriptase inverse virale** contenue dans la **capside**. L'**ADN proviral** ou **provirus** est ensuite **intégré** dans l'ADN de la cellule hôte, ou il peut : - **rester intégré** et être transmis aux cellules filles ; - **s'exprimer et diriger la synthèse des ARNm et de nouvelles copies d'ARN positif du génome viral**.

VI LES BACTÉRIOPHAGES

Les bactériophages sont les virus des bactéries. Il existe de nombreux bactériophages de formes et de physiologie différentes.

1) Cycle lytique (exemple des bactériophages T2 et T4)

-a- Phase d'adsorption et de pénétration :

l'adsorption est due à l'**interaction** entre des **protéines caudales** du bactériophage et des **récepteurs de la paroi bactérienne**. Elle dépend des concentrations des bactéries et des bactériophages, puisque les virus ne se déplacent pas.

Plusieurs centaines de phages peuvent infecter une bactérie.

Noter que l'action d'une **enzyme phagique** masquée dans la queue qui attaque les liaisons glycosidiques de la paroi bactérienne, facilite l'injection du génome viral.

-b- Phase d'éclipse : le virion **n'existe plus en tant que virion**, seul son génome est présent ; cette phase correspond à **l'entrée en fonction du génome viral**. Elle dure 12 minutes environ et comprend deux phases :

-c-Phase précoce : caractérisée par une **désor-ganisation du fonctionnement cellulaire** et le détournement de la machinerie bactérienne au profit du phage pour la synthèse de ses éléments.

- **arrêt des synthèses protéiques de la bactérie** : tout se passe comme si les ARNm du phage étaient les seuls reconnus ;

- **destruction du chromosome bactérien** sous l'action d'endonucléases virales ;

- **synthèses d'ARNm viraux** ;

- **synthèses de protéines précoces** qui sont essentiellement des **enzymes nécessaires à la réplication** de l'ADN phagique et qui sont codées par lui.

-d- phase tardive : elle débute avec la réplication de l'ADN du phage et toutes les protéines constitutives du phage y sont synthétisées

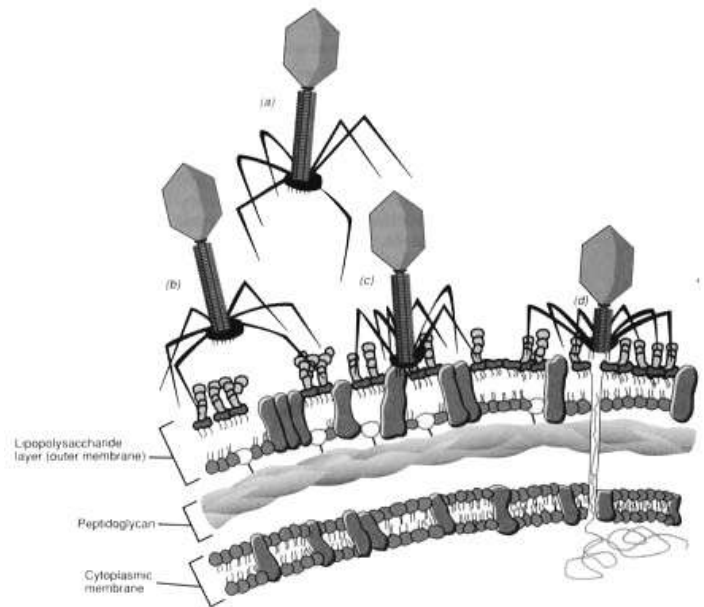
- **synthèse d'ADN phagique** : les ADN synthétisés se regroupent en un gel, attendant que les capsides soient prêtes ;

- **synthèse des protéines virales** : ce sont les **protéines de capside** et des **enzymes** nécessaires à l'élaboration des virions et à leur libération. Toutes sont synthétisées sur les ribosomes de la bactérie qui lisent les ARN messagers du phage.

A la fin de cette phase les protéines et les ADN phagiques sont encore séparés, dans la bactérie il n'y a pas de virus.

-e- Phase de maturation : c'est l'assemblage des virions. Leur nombre augmente à partir de 12 minutes. L'assemblage se fait spontanément, la tête et la queue s'assemblent d'abord et les fibres se fixent ensuite sur la plaque basale.

-f- Phase de libération : les virions n'apparaissent dans le milieu qu'à partir de 22 minutes. La libération se fait après action d'une **endolysine bactériophagique** ; cette phase dure une à deux minutes. Les virions libérés peuvent infecter d'autres cellules.



2) Cycle lysogène (La lysogénie)

Soit une souche d'*E. coli* dite K12.

L'irradiation aux rayons UV de cette souche suivie d'un étalement sur milieu de culture gélosé montre des **plages de lyse** (destruction du tapis bactérien) dans lesquelles on peut mettre en évidence un **phage** appelé phage λ (**lambda**).

Cependant, la lyse des bactéries de cette souche *E. coli* K12 avant l'exposition aux rayons UV ne montre aucun virion : le virus ne persiste donc pas dans certaines bactéries sous la forme de virus.

Le cycle de lyse se déclenche à l'irradiation ; le phage semble donc « naître » à cause de l'irradiation : on parle d'**induction**.

En fait, le bactériophage persiste dans la bactérie uniquement sous forme d'**ADN, intégré à l'ADN bactérien** en un endroit précis (on parle alors de **prophage**).

Le virus se multiplie donc en même temps que la bactérie et il est transmis aux bactéries filles à chaque division.

Le bactériophage est dit **phage tempéré**, la bactérie est dite **lysogène** pour le phage en question.

Le **prophage** (ADN viral intégré au génome bactérien) code pour une molécule appelée **répresseur** qui empêche toute transcription des gènes phagiques. Ce répresseur peut être **détruit** sous l'action d'agent inducteur comme les UV, ce qui permet la transcription des gènes phagiques et l'**activation** du phage : le cycle devient alors **lytique**

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

