

الشعبية الديمقراطية الجزائرية الجمهورية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure
Et de la Recherche Scientifique

Université du 20 Août 1955

Skikda



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

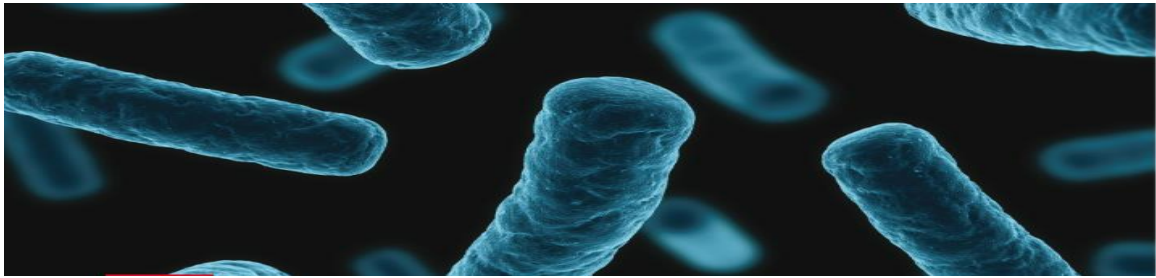
جامعة 20 أوت 1955

سككدة

Faculté des Sciences
Département des sciences de la nature et de la vie

كلية العلوم
قسم علوم الطبيعة والحياة

Cours de microbiologie générale (2^{ème} année Tronc Commun Science de la vie)



Réalisé par : Dr LABID ASMA

Chef de département :

Président du conseil scientifique de
département :

Année Universitaire : 2021/2022

Préambule

Les micro-organismes auraient été les premières formes de vie à se développer sur Terre, il y a environ 3 milliards d'années. Même si d'autres espèces plus « complexes » sont apparues après, ces derniers ont tout aussi évolués dans ce monde que n'importe quelle autre espèce actuelle. ils sont ubiquistes et ont une très grande diversité taxonomique.

La microbiologie s'intéresse à l'étude des microorganismes, qu'il s'agisse des bactéries, des champignons, des protozoaires ou des virus. Une connaissance approfondie de leur physiologie, de leur génétique et des interactions entre eux facilite notre compréhension du monde vivant à l'échelle microscopique.

Ce cours a pour objectif de définir la Microbiologie et le concept des micro-organismes. Il est destiné aux étudiants de la deuxième année L2 ; Domaine : Sciences biologiques, Sciences Agronomiques, ainsi qu'à tous ceux qui dans d'autres disciplines, s'intéressent à cette science.

dans ce contexte ce présent polycopié est le fruit des connaissances pratiques d'une adaptation des programmes ayant un enseignement de microbiologie. il rassemble une panoplie de cours /TP /TD.

les cours sont scindés en six principaux chapitres classés selon un ordre chronologique qui débutent par le monde microbien ,la structure détaillée de la cellule bactérienne qui constitue une étape primordiale pour comprendre la base de ce module , la classification, la nutrition, la croissance des bactéries, et enfin des notions de mycologie et virologie.

La pédagogie empruntée lors de l'élaboration de ce polycopié est basée sur l'utilisation d'un langage simple et basique, soutenu par des exemples. De plus, et afin de rendre le contenu plus accessible au public visé, beaucoup d'illustrations en forme de schémas simplifiés, de photos et de tableaux récapitulatifs ont été utilisés, considérés aussi comme partie attrayante pour les étudiants.

Comme tout travail, il peut être sujet d'erreurs et de manques. De ce fait, il est toujours encourageant et motivant de recevoir des corrections, conseils et recommandations de la part des collègues enseignants et chercheurs activant sur terrain.

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

Louis Pasteur

PREMABULE

TABLE DES MATIERES

LISTES DES FIGURES

LISTES DES TABLEAUX

CHAPITRE1:LE MONDE MICROBIEN	1
1.1. HISTORIQUE	2
1.2. PLACE DE MICROORGANISMES DANS LE MONDE VIVANT	6
1.3.CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA CELLULE PROCARYOTE	8
CHAPITRE2: LA CELLULE BACTERIENNE	10
2.1. TECHNIQUES D'OBSERVATION DE LA CELLULE BACTERIENNE..	10
2.2.LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE.....	16
2.3.LA PAROI	18
2.3.1. COMPOSITION CHIMIQUE	18
2.3.2. STRUCTURE MOLECULAIRE	19
2.3.3.FONCTIONS	24
2.3.4. COLORATION DE GRAM.....	25
2.4. LA MEMBRANE PLASMIQUE	27
2.4.1. COMPOSITION CHIMIQUE	27
2.4.2. STRUCTURE	27
2.4.3. FONCTIONS	28
2.5. LE CYTOPLASME.....	30

2.5.1. LES RIBOSOMES.....	31
2.5.2.LES SUBSTANCES DE RESERVE	32
2.6.LE CHROMOSOME	33
2.6.1. MORPHOLOGIE.....	33
2.6.2. COMPOSITION.....	33
2.6.3.REPLICATION CHIMIQUE	34
2.6.4. STRUCTURE	35
2.7. LES PLASMIDES	35
2.7.1 STRUCTURE	35
2.7.2 REPLICATION.....	36
2.7.3 PROPRIETES	36
2.8 .LES PILIS.....	36
2.8.1. STRUCTURE	37
2.8.2.FONCTIONS	37
2.9. LA CAPSULE.....	37
2.9.1 MORPHOLOGIE.....	38
2.9.2. COMPOSITION CHIMIQUE	38
2.9.3. FONCTIONS	38
2.10. LES CILS ET LES FLAGELLES	39
2.10.1. MISE EN EVIDENCE.....	39
2.10.2. STRUCTURE	39
2.10.3. FONCTIONS	40

2.11. LA SPORE	41
2.11.1. MORPHOLOGIE	41
2.11.2.STRUCTURE	42
2.11.3.PHENOMENE DE SPORULATION	43
2.11.4.PROPRIETES	44
2.11.5.GERMINATION	45
CHAPITRE3: LA CLASSIFICATION BACTERIENNE	46
3.1.CLASSIFICATION PHENETIQUE	47
3.2.CLASSIFICATION PHYLOGENIQUE(OU PHYLETIQUE) NATURELLE	47
3.3.CLASSIFICATION DE BERGEY	49
CHAPITRE 4: NUTRITION BACTERIENNE	53
4.1.BESOINS ELEMENTAIRES	53
4.2. FACTEURS DE CROISSANCE	56
4.3.TYPES TROPHIQUES	58
4.4. PARAMETRES PHYSICOCHEMIS	58
CHAPITRE5: CROISSANCE BACTERIENNE	62
5.1. MESURE DE LA CROISSANCE	63
5.2.PARAMETRES DE CROISSANCE	67
5.3.COURBE DE CROISSANCE DANS UN SYSTEME FERME - CULTURE DISCONTINUE OU CULTURE EN BATCH	68
5.4.CULTURE BACTERIENNE	70
5.5.AGENTS ANTIMICROBIENS	71
CHAPITRE 6: NOTIONS DE MYCOLOGIE ET DE VIROLOGIE	77

6.1.MYCOLOGIE (LEVURE ET MOISSURE)	77
6.1.1.TAXONOMIE	78
6.1.2.MORPHOLOGIE.....	79
6.1.3.REPRODUCTION	82
6.2. VIROLOGIE	87
6.2.1.MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DES VIRUS	89
6.2.2.DIFFERENTS TYPES DE VIRUS	93
TRAVAUX PRATIQUES	101
TP 1 : INTRODUCTION AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE.....	101
TP2: METHODE D'ETUDE DES MICRO-ORGANISMES ET LES DIFFERENTS PROCEDES DE STERILISATION.....	105
TP3 : METHODES D'ENSEMENCEMENT	110
TP 4 : ETUDE MICROSCOPIQUE DES BACTERIES, COLORATION SIMPLE.....	114
TP 5 : ETUDE MORPHOLOGIQUE DES DIFFERENTES COLONIES BACTERIENNES SUR MILIEU DE CULTURE	117
TP 6 : COLORATION DE GRAM	119
TP 7 : LES MILIEUX DE CULTURE	121
TP 8 : ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE	124
TP 9 : CRITERES D'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DES BACTERIES	127
TP 10 : LEVURES ET CYANOBACTERIES	133
TP 11 : LES INHIBITEURS DE LA CROISSANCE, L'ANTIBIOGRAMME	136
TP 12 : ISOLEMENT DE LA FLORE TOTALE ET SPECIFIQUE DE CERTAINS PRODUITS (EAU, LAIT...)	139

TRAVAUX DIRIGES	144
TD1	144
TD 2	146
TD 3	147
TD 4	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	154

Liste des figures

Figure 1:Réplique en laiton du microscope de van Leeuwenhoek et son portrait..... 3

Figure 2: Louis Pasteur (1822-1895). Expérience de Pasteur qui acheva la théorie de la génération spontanée 4

Figure 3 : L’arbre phylogénique universel 8

Figure 4: Microscope optique 11

Figure 5: Exemples microscopie à fond noir 12

Figure 6: Microscope électronique 14

Figure 7:Quelques types morphologiques fréquemment retrouvés chez les bactéries. 17

Figure 8: Schéma simplifié d'une cellule bactérienne. 18

Figure 9: Schéma simplifié de la structure du peptidoglycane 19

Figure 10: Représentation de la paroi des bactéries Gram-positives..... 20

Figure 11: biosynthèse des acides teichoïques du peptidoglycane..... 21

Figure 12: Représentation de la paroi des bactéries Gram-négatives 23

Figure 13: La structure de la membrane cytoplasmique bactérienne (modèle en mosaïque fluide). 28

Figure 14: Modalités de transport membranaire passif 29

Figure 15: Les trois systèmes de transport membranaire 30

Figure 16: Structure et constitution du ribosome bactérien 32

Figure 17: Représentation schématique de la double hélice d'ADN 34

Figure 18:Le mode semi-conservatif de la réplication d'ADN. 35

Figure 19:L'ultra structure d'un flagelle de bactéries à Gram négatif (à gauche) et à Gram positif (à droite) 40

Figure 20: Types flagellaires et modes d'insertions 40

Figure 21: Exemple de localisation et taille des endospores 42

Figure 22: La structure d'une endospore bactérienne 43

Figure 23: Etapes du cycle de sporulation et de germination chez *Bacillus subtilis* 44

Figure 24: Structure hiérarchique en taxonomie 47

Figure 25: Le cycle biogéochimique simplifié de l’azote..... 54

Figure 26: un exemple de syntrophie 57

Figure 27:les échelles de la température pour la croissance bactérienne..... 59

Figure 28:pourcentage de croissance des bactéries selon le PH 59

Figure 29:L'oxygène et la croissance bactérienne..... 60

Figure 30: la scissiparité 62

Figure 31: différents types de cellules utilisées pour dénombrement bactérien..... 63

Figure 32: Dénombrement des bactéries par la technique des dilutions 65

Figure 33: le procédé de filtration sur membrane	66
Figure 34: Courbe de croissance dans un système fermé (culture discontinue).	68
Figure 35: Un chémostat	69
Figure 36: Micromycètes et Macromycètes.....	77
Figure 37: Hyphe	80
Figure 38: Le mycélium Fusarium.....	80
Figure 39: Filaments non septés et filaments septés	81
Figure 40: Thalle filamenteux et thalle levuriforme	81
Figure 41: Reproduction par bourgeonnement et reproduction par fission binaire	82
Figure 42: Différents types de spores de dissémination (reproduction asexuée)	84
Figure 43: Différents types de spores dans la reproduction sexuée	85
Figure 44: Reproduction asexuée et sexuée "téléomorphe" chez les mycètes.....	86
Figure 45: Virus de la mosaïque du tabac	87
Figure 46: Photos de virus et d'une bactérie en microscopie électronique avec respect des tailles relatives	88
Figure 47: Structure d'un virus	89
Figure 48: Les différents éléments constituant un virus	89
Figure 49: Icosaèdre avec à 20 faces triangulaires identiques	90
Figure 50: Capside rigide (VMT) et capside souple (virus de la grippe)	91
Figure 51: Représentation du bactériophage T4	91
Figure 52: Virus de la grippe	93
Figure 53: Cycle de reproduction du virus.	96
Figure 54: Schéma externe et interne du virus SARS CoV-2.....	97
Figure 55: Le récepteur ACE2 exprimé	98
Figure 56: Phase d'attachement et de fusion du virus SARS-CoV-2 avec la membrane de la cellule.	99
Figure 57: Résumé des principales enzymes protéolytiques cellulaires impliquées dans le clivage de la protéine S chez les coronavirus	99
Figure 58: Entrée du virus SARS-CoV-2 et réplication de son ARN	100

Listes des tableaux

Tableau 1:Quelques évènements importants dans le développement de la microbiologie..... 5

Tableau 2:Les principales différences entre les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes..... 9

Tableau 3:Comparaison entre bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif 24

Tableau 4:Classification des levures 79

Chapitre 1: Le monde microbien

Introduction

Toutes les cellules d'espèces vivantes, tant multi- qu'unicellulaires, sont construites selon deux modèles : Les **cellules procaryotes** (du grec *pro*, avant, *etkaryon*, amande) ont une morphologie plus simple que les cellules eucaryotes et n'ont pas de noyau limité par une enveloppe. Par contre, les **cellules eucaryotes** (du grec *eu*, vrai, et *karyon*, amande) ont un noyau entouré d'une enveloppe, leur morphologie est plus complexe et elles sont habituellement plus grandes que les cellules procaryotes.

A ces deux types correspondent; les organismes visibles à l'œil nu, mais aussi l'énorme et riche monde invisible des microorganismes, un ensemble très hétérogène tant sur le plan morphologique que physiologique, qui sont majoritairement unicellulaire. Il peut être défini en deux ensembles : les **protistes**, appartenant au domaine des **Eucaryotes** et subdivisés en plusieurs sous-ensembles (les protozoaires, les micro-algues et les champignons), et les procaryotes, incluant deux domaines: les **Bactéries** et les **Archées**.

Les virus, quant à eux, font exception, et sont considérés comme des entités, acellulaires qui dépendent entièrement de leurs cellules hôtes pour se multiplier et qui ont leur propre système de classification.

La microbiologie est définie comme étant la science et la doctrine des microorganismes « microbes », dérivé du grec: Mikros, «petit» et Organismos, «organisme», forment un ensemble d'organismes invisibles à l'œil nu (trop petits). C'est une discipline large incluant de nombreuses spécialités et se divise en deux grands domaines à savoir, la microbiologie fondamentale et la microbiologie appliquée.

Les orientations; fondamentale et appliquée sont imbriquées l'une dans l'autre. Une recherche fondamentale est souvent menée dans des domaines appliqués et des applications découlent souvent de la recherche fondamentale.

La microbiologie fondamentale se consacre à l'étude, à la compréhension, à l'identification et à la caractérisation des microorganismes ; à l'étude de leur origine, leur évolution, à définir leurs caractéristiques, en plus à l'étude des mécanismes microbiens. Elle est aujourd'hui divisée en de multiples branches: bactériologie (l'étude des bactéries), la virologie (l'étude des virus), la mycologie (l'étude des mycètes : levures et moisissures), la parasitologie (étude des parasites).

La microbiologie appliquée a pour objet la mise en application des microorganismes afin d'exploiter au mieux leurs activités, dans différents domaines qui peuvent être en l'occurrence: médical, alimentaire, agroalimentaire, industriel, biotechnologique, clinique...etc.

Les propriétés biologiques des organismes « microbiens » (bactéries, archées et leurs virus), objets d'étude de la microbiologie, sont au centre d'un éventail d'activités humaines depuis les applications industrielles jusqu'aux bio- et nanotechnologies. La microbiologie est également partie prenante des différents secteurs de la sauvegarde de l'environnement. Enfin, les approches génomiques et métagénomiques ont révélé la place essentielle, voire primordiale des micro-organismes dans l'ensemble du monde vivant.

1.1. Historique

Nous savons aujourd'hui que les microorganismes sont présents partout, toutefois ils étaient inconnus des scientifiques avant l'invention des microscopes. Nous pouvons entrevoir comment les idées actuelles en microbiologie en pris forme en rappelons quelques-uns des évènements marquants qui ont changé notre vie dans ce domaine.

Robert Hooke décrit en 1665 en Angleterre des minuscules objets ressemblant à des petites cavités (œil de mouche et une cellule de liège), et décide de les appeler **cellules** « Observation XVIII » de *Micrographia*). Il a été le premier à utiliser le mot « cellule » et dire que la plus petite unité structurale de l'être vivant est une " cellule". En 1667 On lui attribue ainsi la première description d'une cellule biologique faite à partir de l'observation de végétaux grâce à un microscope primitif. Bien que le microscope de Hooke fût capable de montrer de grandes cellules, il lui manquait la résolution qui lui aurait permis de voir clairement les microorganismes . En 1673, le commerçant et scientifique marchand-drapier et observateur passionné de la nature néerlandais Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723), concepteur du microscope le plus simple, c'est-à-dire la loupe, révéla au monde scientifique des micro-organismes , il observe de l'eau d'un étang grâce à un simple microscope qu'il a confectionné lui-même. Il y découvre des **cellules** vivantes que l'on ne pouvait voir à l'oeil nu: les microorganismes vivants à travers les lentilles des microscopes qu'il a construites, lui même pour décrire enfin, les structures de ces microorganismes qu'il a appelé "animalicules", et décrire la diversité de ces derniers et l'incroyable richesse des milieux naturels comme l'eau en protozoaires, algues, levures, bactéries.

Il décrivit ainsi le grouillement d'une infinie variétés de ces d'animalcules mobiles ou immobiles, en forme de sphère, bâtonnet, spirilles, il découvrit notamment les spermatozoïdes et les globules rouges. (figure 1)

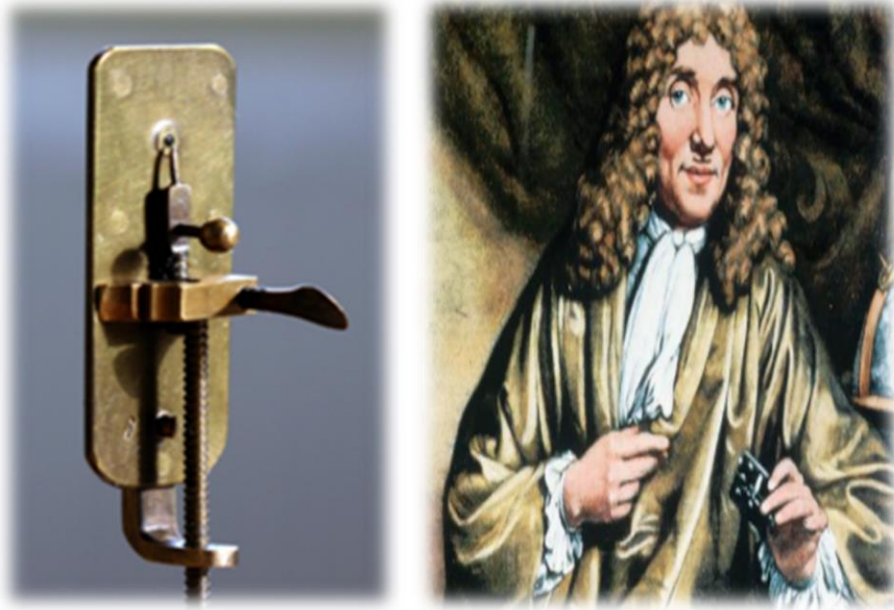


Figure 1: Réplique en laiton du microscope de van Leeuwenhoek et son portrait

Depuis la découverte de Van Leeuwenhoek, le monde des micro-organismes a été révélé. Francesco Redi en 1688 vient pour contester la génération spontanée; une théorie largement admise par ses précédents et qui prétend que la vie apparaît spontanément à partir de la terre ou des matières organiques. A la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, beaucoup de scientifiques et philosophes croient que certains êtres vivants peuvent être engendrés « spontanément » à partir de la matière non vivante, ce processus hypothétique, appelé théorie de la génération spontanée.

A cette époque Louis Pasteur réfute les thèses en cours sur la génération spontanée en montrant la présence de germes dans l'atmosphère, leur destruction par la chaleur et leur rétention dans ses fameux ballons à col-de-cygne. Les microorganismes ne peuvent donc apparaître spontanément, mais ils existent autour de nous dans l'air, l'eau, la terre, donc il fallait attendre l'arrivée de ce pionnier de la microbiologie, avec ses importantes découvertes pour réveiller ce domaine mais plus encore: fermentations, pasteurisations, vaccins, fondement de l'immunologie....etc.(figure2)

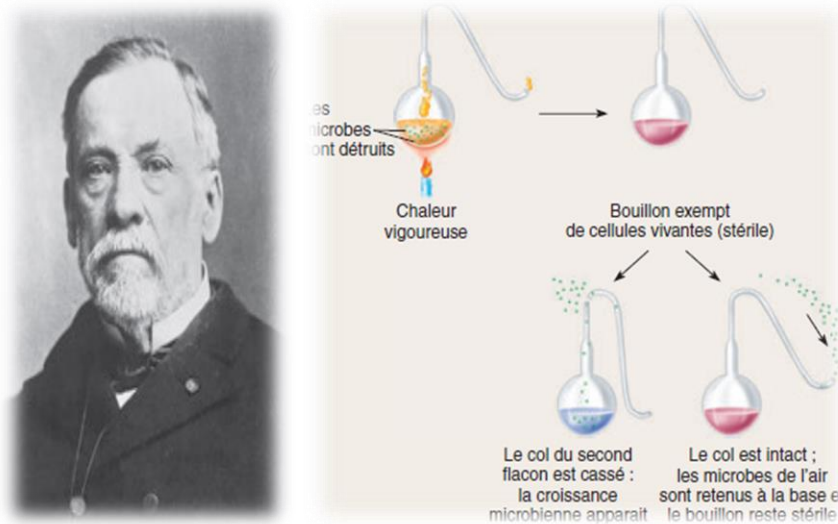


Figure 2: Louis Pasteur (1822-1895). Expérience de Pasteur qui acheva la théorie de la génération spontanée

La période allant de 1857 à 1914 a été nommée l'âge d'or de la microbiologie. Pendant cette période, des progrès rapides, menés principalement par Pasteur et Robert Koch, ont conduit à l'établissement de la microbiologie comme étant une science. qu'on considère de véritables fondateurs de la bactériologie médicale. en effet Robert Koch découvre des bactéries en forme de bâtonnets «*Bacillus anthracis*» dans le sang de bovins morts du charbon. Dans un célèbre mémoire, il énonce les fameuses règles connues sous le nom de Postulats de Koch, il établit une suite d'étapes expérimentales pour relier directement un microbe spécifique à une maladie spécifique.

Les découvertes au cours de ces années comprenaient à la fois les agents de nombreuses maladies et le rôle de l'immunité dans la prévention et la guérison des maladies.

Certains évènements majeurs survenus pendant l'âge d'or de la microbiologie sont répertoriés dans le tableau 1.

Tableau 1: Quelques évènements importants dans le développement de la microbiologie

Date (Année)	Auteur	Découverte
1590–1608	Zacharias Janssen	développe le premier microscope composé
1665	Robert Hooke	publie: <i>Micrographia</i> 1676 Leeuwenhoek découvre les « animalcules »
1668	Francesco Redi	réfute la génération spontanée des asticots
1676	A. van. Leeuwenhoek	découvre les « animalcules »
1765–1776	Lazzaro Spallanzani	attaque la théorie de la génération spontanée
1798	Edward Jenner	introduit le vaccin contre la variole
1847–1850	Ignace Philippe Semmelweis	propose d'utiliser des antiseptiques pour prévenir la maladie
1854	Snow	retrouve la trace du choléra dans les pompes qui distribuent l'eau
1861	Louis Pasteur	réfute la génération spontanée
1876–1877	Robert Koch	démontre que le charbon est dû à <i>Bacillus anthracis</i>
1885	Louis Pasteur	développe le vaccin contre la rage
1887–1890	Sergueï Vinogradski	étudie les bactéries sulfureuses et nitrifiantes
1889	Martinus Willem Beijerinck	isole des bactéries des nodules radiculaires
1894	Alexandre Yersin	isole <i>Yersinia pestis</i>
1896	Van Ermengem	découvre <i>Clostridium botulinum</i>
1899	Martinus Willem Beijerinck	démontre qu'un virus est la cause de la maladie de la mosaïque du tabac
1884	Hans Christian Gram	Coloration de Gram
1884	Robert Koch	Metchnikoff décrit la phagocytose; Développement de l'autoclave Les postulats de Koch sont publiés
1887–1890	Sergueï Vinogradski	étudie les bactéries sulfureuses et nitrifiantes
1889	Martinus Willem Beijerinck	isole des bactéries des nodules radiculaires
1894	Alexandre Yersin	isole <i>Yersinia pestis</i>
1896	Van Ermengem	découvre <i>Clostridium botulinum</i>

1899	Martinus Willem Beijerinck	démontre qu'un virus est la cause de la maladie de la mosaïque du tabac
1911	Francis Rous	découvre un virus responsable de cancer chez les poulets
1915–1917	D'Herelle et Twort	Découvrent les virus bactériens
1918-1919		Grippe espagnole
1928	Frederick Griffith	Découvre la transformation bactérienne
1929	Alexandre Fleming	découvre la pénicilline
1931	Van Niel	étudie les bactéries photosynthétiques
1933	Knoll et Ruska	développent le microscope électronique
1941	Beadle et Tatum	formulent l'hypothèse un gène, une enzyme
1953	Watson et Crick	proposent la structure en double hélice de l'ADN
1961	Jacob et Monod	proposent le modèle de l'opéron
1970	Beadle et Tatum	formulent l'hypothèse un gène, une enzyme
1977	Arber et Smith	découvrent les endonucléases de restriction
1983-1984	Carl Woese	divise les procaryotes en <i>Bacteria</i> et <i>Archaea</i>
1990	Montagnier et Gallo; Mullis	Isolement et identification du VIH par Montagnier et Gallo; Mullis développe la technique PCR
1992		Premiers tests chez l'homme d'une thérapie antisens
1995-1996		Séquence des génomes de <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Methanococcusjannaschii</i> et de la levure
2002		Synthèse chimique du poliovirus infectieux
2003		Epidémie de SRAS en Chine

1.2. Place de microorganismes dans le monde vivant

la place des bactéries dans le monde vivant a beaucoup évolué.

En 1735, le botaniste suédois Carl van Linné, élaborera une première classification des organismes vivants en deux règnes Plantae et Animalia.

En 1857, Karl van Nägeli, proposa de classer les bactéries et les champignons dans le règne des Plantes.

En 1866, E. Haeckel, divise le monde vivant en trois règnes, le règne animal, le règne végétal et le règne des protistes qui rassemble les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries.

En 1937 et grâce à l'invention du microscope électronique, **Edward Chatton** mis en opposition deux types de cellules, la cellule eucaryote la cellule procaryote.

En 1968, R.G.E.Murray, dans la continuité du travail d'E. Chatton, divise le monde vivant en deux règnes, celui des "Eucaryotae" et celui des "Procaryotae" (ou "Monera").

En 1969, Robert H. Whittaker, décrit une classification à cinq règnes. Quatre règnes eucaryotes (Animal, Végétal, Champignons et Protistes). Les procaryotes se regroupent dans le règne des monères.

En 1977, Carl Woese, propose une classification à six règnes, sur la base de l'analyse des séquences d'ARN ribosomique (16S ou 18 S). Cette classification a permis de tracer l'arbre phylogénétique universel qui comprend trois domaines à savoir; deux domaines procaryotes (**Bacteria** et Archaea) et un domaine eucaryote (Eucarya) (Figure 3).

NB: la classification des bactéries sera détaillée dans le chapitre qui suit

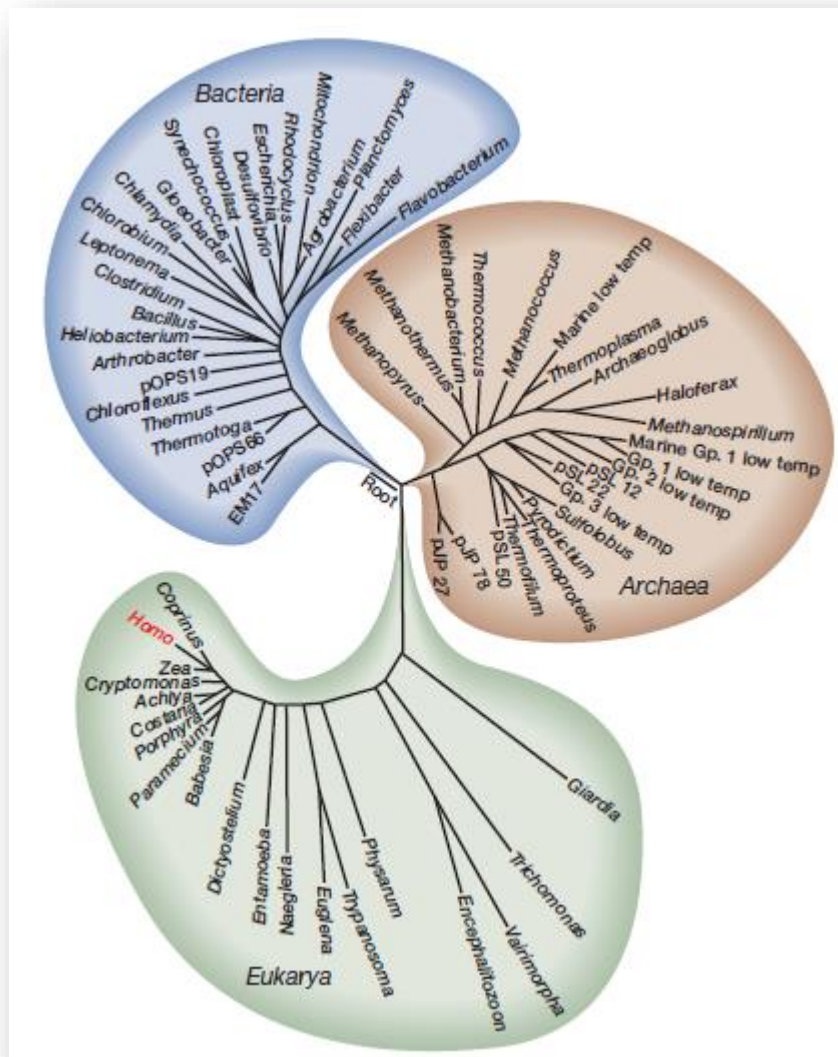


Figure 3 : L'arbre phylogénique universel

1.3. Caractéristiques générales de la cellule procaryote

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

Tableau 2: Les principales différences entre les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes.

Taille	2 - 20 μm	0,3 - 2,5 μm
Enveloppe nucléaire	Absente	Présente
Nombre de chromosomes	Généralement 1 et circulaire	> 1 non circulaire
Nucléole	Absent	Présent
Réticulum endoplasmique	Absent	Présent
Appareil de Golgi	Absent	Présent
Lysosomes	Absents	Présents
Mitochondries	Absentes	Présentes
Chloroplastes	Absents	Présents chez les plantes
Microtubules	Absents	Présents
Paroi cellulaire avec peptidoglycane	Présente (<i>sauf chez mycoplasmes et archaeobactéries</i>)	Absente
Ribosomes	70 S	80 S (<i>sauf mitochondries et chloroplastes</i>)
Division	Mitose ou méiose	Scissiparité

Chapitre2: La cellule bactérienne

Définition

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

- ❖ **Archaebactéries:** sont adaptées à la vie dans des conditions de vie extrêmes (forte salinité, haute température, faible pH, sans oxygène).
- ❖ **Eubactéries:** sont des "vraie" bactéries, Les eubactéries représentent le domaine réunissant tous les Procaryotes à l'exception des Archées. Ces deux groupes des bactéries englobe nombreuses types telle que :

-Bactéries ubiquitaires; Faisant preuve d'une extraordinaire diversité, les bactéries ont colonisé tous les milieux (air, eau, sol et être vivant...). Certaines peuvent même vivre dans des conditions extrêmes.

-Bactéries commensales : On appelle flore commensale un ensemble de bactéries qui vivent sur ou dans un organisme sans lui porter préjudice. Elle contribue soit à sa défense, à son fonctionnement, ou au bon état de ses muqueuses.

La flore commensale est principalement sur les muqueuses : peau, tube digestif, arbre respiratoire, appareils génitaux.

Bactéries pathogènes

Pathogènes strictes : sont des bactéries qui provoquent un ensemble de troubles spécifiques plus ou moins sévères chez un hôte infecté. Par exemple : *Salmonella typhi* , *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis (BK)*, *Neisseria meningitidis*, gonocoque ...etc

Pathogènes opportunistes: bactérie commensale normalement présente dans l'organisme sans l'affecter, mais qui peut provoquer une maladie à la suite d'une diminution des défenses de l'organisme (chez les immunodéprimés ou les malades du SIDA...) par exemple : *Pseudomonas aeruginosa*, entérocoques, *Acinetobacter...*etc

2.1. Techniques d'observation de la cellule bactérienne

La microbiologie s'intéresse à des organismes si petits qu'ils ne peuvent être vus distinctement à l'œil nu. Les dimensions de ces derniers sont microscopiques, allant de l'ordre du micromètre (μm) pour les plus grands (protistes) jusqu'à l'ordre du nanomètre (nm) pour les plus petits qui sont les virus. Le microscope a par conséquent une importance fondamentale, pour observer et comprendre les structures cellulaires, d'ailleurs beaucoup de nos connaissances sur les microorganismes ont été découverts grâce à ce dernier, de plus, certains types fournissent de précieux détails sur les fonctions des structures observées. Donc, la compréhension du fonctionnement d'un microscope ainsi que la maîtrise des

méthodes de préparation des échantillons à examiner est particulièrement nécessaire pour un microbiologiste.

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

2.1.1. Le microscope optique

Il a été le premier microscope inventé et il continue d'être le type le plus communément employé; son principe repose sur le fonctionnement des lentilles convexes qui condensent et focalisent les rayons lumineux provenant d'une source éloignée à point (le foyer) d'une distance au centre de la lentille appelée; la distance focale.(figure4.)

il permet; l'observation à l'état frais entre lame et lamelle et l'utilisation de certains colorants, mais l'inconvénient de ce type de microscope est sa limite de résolution qui est en général de $0.2\mu\text{m}$ (200 nm).



Figure 4: Microscope optique

les microbiologistes utilisent couramment divers microscopes optiques dans leur travail et les plus utilisés sont en l'occurrence ; le microscope à fond clair, à fond noir, à contraste de phase, à fluorescence et le microscope confocal et chacun d'eux a son utilité pour des applications précises

2.1.1.1. Le microscope à fond clair: l'objet foncé, le fond clair

Ce microscope est utilisé en routine dans les laboratoires de microbiologie ou il peut être employé pour l'analyse des échantillons colorés ou non, on dit que ce microscope forme une image foncée sur un fond plus clair d'où son nom, il est constitué, d'un corps métallique composé d'un socle, d'un condensateur (condense la lumière émise), d'une potence, d'une source lumineuse, d'un miroir ou une ampoule électrique, des objectifs et deux oculaires dont le rôle est de grossir l'image, deux boutons de focalisation, d'une platine (plateau). ce type de microscope est le plus fréquemment utilisé dans les laboratoires de recherche et clinique; son seul inconvénient est que les cellules vivantes non pigmentées ne sont pas clairement visibles à cause de la faible différence de contraste entre les cellules, les structures subcellulaires et l'eau.

2.1.1.2. Le microscope à fond noir

il fournit des images détaillées des cellules et des organismes non colorés en modifiant la façon dont ils sont éclairés. Un cône creux de lumière est dirigé vers l'échantillon de telle sorte que seule la lumière réfléchie ou réfractée par l'échantillon forme une image, le champ qui entoure ce dernier apparaît noir, tandis que l'objet lui-même apparaît brillant. Il est utilisé pour identifier des bactéries telles que *Treponema pallidum*, l'agent de la syphilis (figure 5.)

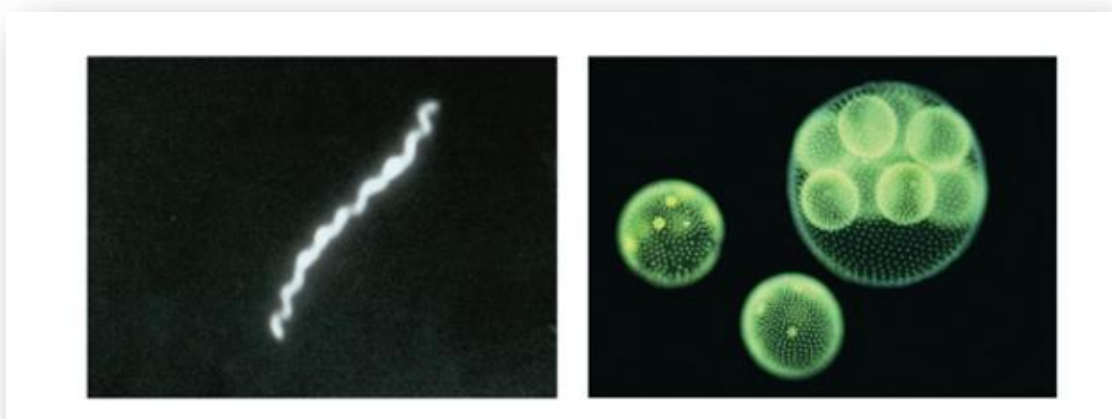


Figure 5: Exemples microscopie à fond noir

2.1.1.3. Le microscope à contraste de phase

Le principe de ce type de microscope est la transformation de différences légères d'indice de réfraction et de densité cellulaire en différences d'intensité lumineuse bien observables. Le résultat de l'observation se traduit par un fond légèrement clair (formé par la lumière non

déviée) et un échantillon non coloré qui paraît sombre mais bien défini. Il est spécialement utilisé pour voir la mobilité, la forme des cellules vivantes ainsi que certains constituants bactériens comme l'endospore et les corps d'inclusion.

2.1.1.4. Le microscope à contraste d'interférence différentielle

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

2.1.1.5. Le microscope à fluorescence

Les microscopes décrits jusqu'à présent forment une image à partir de la lumière qui passe au travers de l'échantillon, par contre le principe du microscope à fluorescence réside dans le contraste de l'échantillon ; c'est à dire ce dernier est habituellement contrasté par un colorant appelé fluorochrome. Il est alors éclairé avec une lumière ultra-violette, violette ou bleue, permettant ainsi d'obtenir une image de l'objet résultante de la lumière fluorescente émise par l'échantillon lui-même.

2.1.1.6. Le microscope confocal

Dans ce microscope, un rayon laser monochromatique illumine un échantillon habituellement rendu fluorescent. Grâce à une ouverture qui bloque tout autre rayon émis par les autres cotés de l'échantillon ou d'un échantillon en superposition, seule la lumière provenant du plan focal sert à créer une image nette. Ce type de microscope est appelé aussi "le microscope confocal à balayage laser (MCBL)". Il a de nombreuses applications y compris dans l'étude des biofilms qui peuvent se former sur de nombreux types de surfaces entre autres sur de des dispositifs médicaux a demeure comme les prothèses de la hanche.

2.1.2. Le microscope électronique

Le microscope optique a été pendant des siècles l'instrument le plus important dans l'étude des microorganismes, cependant la limite de résolution des meilleurs microscopes optiques est de 0.2 (µm) ce qui compromet grandement leur utilité pour des études détaillées pour de nombreux microorganismes ; par exemple les bactéries et les archées sont visibles mais comme elles n'ont qu'habituellement que 1 à 2 µm de diamètre seules leurs formes générales et leurs structures morphologiques sont visibles ; les virus sont trop petits pour être visible sur ce genre de microscopes.

Les microscopes électroniques ont une résolution beaucoup plus élevée, ils ont transformé la microbiologie et ont permis d'accroître considérablement nos connaissances. Actuellement il existe différents types à savoir ; Le microscope électronique à transmission, le microscope électronique à balayage, la cryomicrographie électronique, le microscope électronique à

balayage de sonde .Pour l'ensemble de ces microscopes, l'échantillon observé est fixé (non vivant).(figure 6)



Figure 6: Microscope électronique

2.1.2.1.Le microscope électronique à transmission (MET)

Ce microscope forme une image à partir d'une radiation qui traverse l'échantillon en effet les électroaimants fonctionnent comme les lentilles et le système fonctionne sous vide total. De plus, il est équipé d'un appareil photo. Contrairement à la lumière visible, une source d'électron ne pénètre pas bien la cellule,c'est pourquoi, des techniques spécifiques de coupes fines sont nécessaires pour préparer l'échantillon avant l'observation, ces dernières sont traitées par des colorants tels que l'acide osmique, les sels de plomb, de permanganate, d'uranium ou de lanthanum a fin d'obtenir suffisamment de contraste. L'image de l'échantillon apparait en noir et blanc.

2.1.2.2.Le microscope électronique à balayage (MEB)

il produit une image à partir des électrons réfractés par la surface de l'objet ,on doit d'abord fixer, déshydrater et sécher les microorganismes pour préserver la structure superficielle. Avant d'être observés ,ils sont montés et enduits d'une fine couche de métal pour éviter l'accumulation d'une charge électrique à la surface et pour obtenir une meilleure image.On peut observer la localisation réelle *in situ* des microorganismes dans des niches écologiques telles que la peau humaine et le revêtement intestinal.

❖ Méthodes immuno-cytochimiques d'observation de la cellule bactérienne

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

❖ La préparation et la coloration des échantillons pour la visualisation et l'identification des microorganismes**❖ La fixation des échantillons**

La fixation est un procédé par lequel toutes les structures internes et externes de la cellule sont figées et conservées en place, elle inactive les enzymes qui peuvent détruire la morphologie cellulaire et durcit les structures pour qu'elles ne se modifient pas durant l'observation et la coloration. le microorganisme est habituellement tué et fermement fixé à la lame porte objet durant la fixation; Pour ce faire, deux méthodes sont utilisées à savoir; la fixation à la chaleur et la fixation chimique.

-**La fixation à la chaleur** consiste à chauffer doucement un frottis séché à l'air en le passant brièvement sur une flamme. Ce procédé préserve correctement la morphologie générale de la cellule mais détruit les protéines et les structures intracellulaires ce qui peut déformer leur apparence.

-**La fixation chimique** est utilisé pour protéger les structures fines et la morphologie des microorganismes plus délicats. Les fixateurs chimiques pénètrent à l'intérieur des cellules pour inactiver les protéines et les lipides et les rendent insolubles et immobiles. Les fixateurs couramment utilisés contiennent de l'éthanol, de l'acide acétique, du chlorure mercurique, le formaldéhyde et le glutaraldéhyde.

❖ La coloration des échantillons

il existe plusieurs types de colorants pour visualiser les microorganismes, qui ont deux propriétés en commun ;ils sont constitués d'un groupement chromophore (couleur) et d'un groupement auxochrome (groupement ionisé).Ce dernier attribut souvent une charge qui peut être soit positive pour les colorants basiques, soit négative pour les colorants acides . La coloration se fait par une fixation permanente sur des constituants cellulaires de charges opposées.

-**Les colorants basiques** : révèlent des constituants cellulaires acides, tels que les acides nucléiques et de nombreuses protéines. Les colorants de ce type les plus utilisés dans les laboratoires de microbiologie sont ; la fuchsine basique (phéniquée),le bleu de méthylène, le vert de malachite,ils sont souvent utilisés pour déterminer la taille, la forme et l'arrangement des structures cellulaires bactériennes.

-Les colorants acides : mettent en évidence des constituants cellulaires basiques, les plus couramment utilisés sont ; éosinose bengale , fuschine acide.

- ***La coloration simple***

Ce type de coloration n'utilise qu'un seul agent colorant; le frottis est fixé et couvert pendant un laps de temps, lavé à l'eau pour enlever l'excès de colorant puis la lame est séchée, le frottis est alors observé à l'immersion avec une goutte d'huile spéciale entre l'objectif et la préparation, cela permet d'obtenir une image plus nette. (généralement pour le microscope optique) l'avantage de cette coloration est sa simplicité et sa facilité d'utilisation. Ce genre de coloration reflète la forme générale de la cellule .

- ***La coloration différentielle***

Est une technique primordiale utilisée pour différencier certains organites (structures particulières) sur la base de leur coloration, on peut citer: **la coloration négative** pour mettre en évidence la capsule grâce à l'encre de chine, **la coloration de la spore** au vert de malachite, **la coloration des flagelles**, **la coloration des endospores** ou encore la différenciation de groupes microbiens par exemple; **la coloration acido alocolorésistante** appelée aussi la coloration de **Ziehl Nielsen** pour identifier le groupe des mycobactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* et *M. leprae* responsables respectivement de la tuberculose et de la lèpre, **la coloration de Gram** pour déterminer le type de la paroi de la bactérie.

NB: toutes ces colorations seront détaillées au fur et à mesure dans ce présent chapitre.

2.2. La morphologie cellulaire

Lorsqu'on observe des bactéries au microscope optique à partir de prélèvements pathologiques ou d'un milieu de culture, on reconnaît rapidement la forme des cellules, leurs dimensions et les arrangements ou les groupements qu'elles constituent entre elles. Toutes ces informations définissent la taille et la morphologie bactérienne et constituent un des critères de reconnaissance et d'identification.

2.2.1. La taille: les bactéries les plus petites ont une taille d'environ 0,2 μm (*Chlamydia*) et les plus longues; certains Spirochètes peuvent atteindre 250 μm de long. En moyenne la taille se situe entre 1 et 10 μm .

2.2.2. La forme et groupement cellulaires

On pourrait s'attendre à ce que les cellules bactériennes étant petites et relativement simples aient une forme et une taille uniforme mais ce n'est pas le cas car le monde microbien présente une variété presque infinie de morphologie, toutes fois; les formes les plus

communes sont les coques (sphériques), bacilles (bâtonnets allongées), comme le montre si bien la figure7,mais on peut citer aussi des formes coccobacilles (formes intermédiaires entre coques et bacilles, ovoïdes), des formes incurvées (vibrions), des formes spiralées dont certaines sont rigides (spirilles) et d'autres sont flexibles (spirochètes), des formes filamenteuses (mycélium des actinomycètes), des formes pédonculées (allongement dans l'extrémité) et enfin des formes pléomorphes (changent de formes).

Ces formes peuvent exister seules mais aussi former des arrangements caractéristiques (mode de groupement qui est déterminé par le mode de division),souvent utiles pour une identification, associées par deux (diplococoques, diplobacilles), en chaînette (streptocoques, streptobacilles), en amas (groupées), en tétrades (par quatre), amas en grappe de raisin,...etc

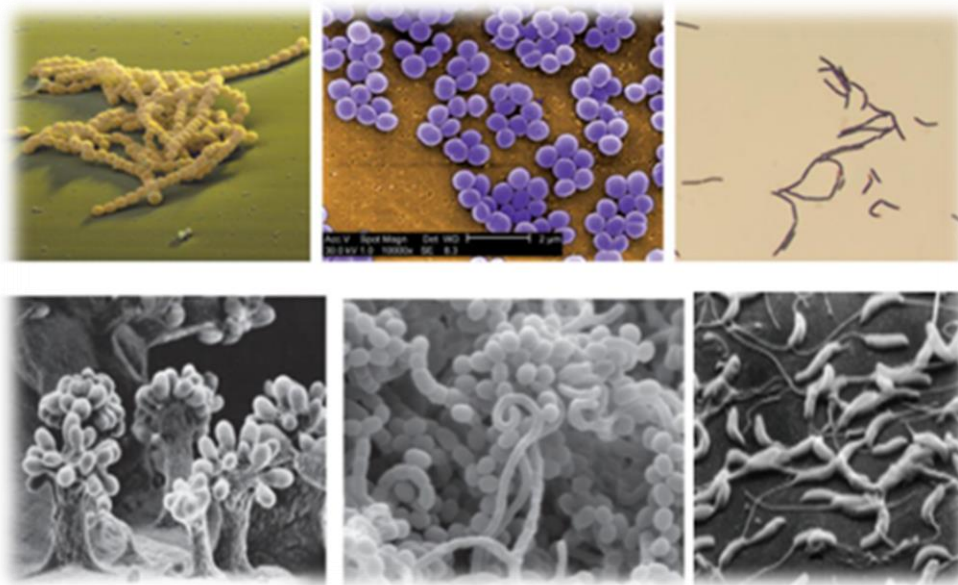


Figure 7:Quelques types morphologiques fréquemment retrouvés chez les bactéries.

-Structure cellulaire d'une bactérie:la cellule bactérienne est composée d'éléments constants et inconstants (facultatifs) les premiers sont retrouvées chez presque toutes les bactéries et qui sont en l'occurrence; **la paroi, la membrane cytoplasmique, le chromosome, les ribosomes et le cytoplasme** dont baignent les organites;tous ces éléments sont cités de l'extérieur vers l'intérieur et les deuxièmes sont facultatifs c'est à dire peuvent être retrouvés chez certaines bactéries mais pas chez d'autres.Parmi ces structures, on cite; **la capsule** qui entoure la paroi bactérienne, les **plasmides, les pilis sexuels, les fimbriae, les flagelles, les spores et les corps d'inclusions** (Figure 8).

Le rôle et la composition chimique de chaque structure seront développés dans ce présent chapitre.

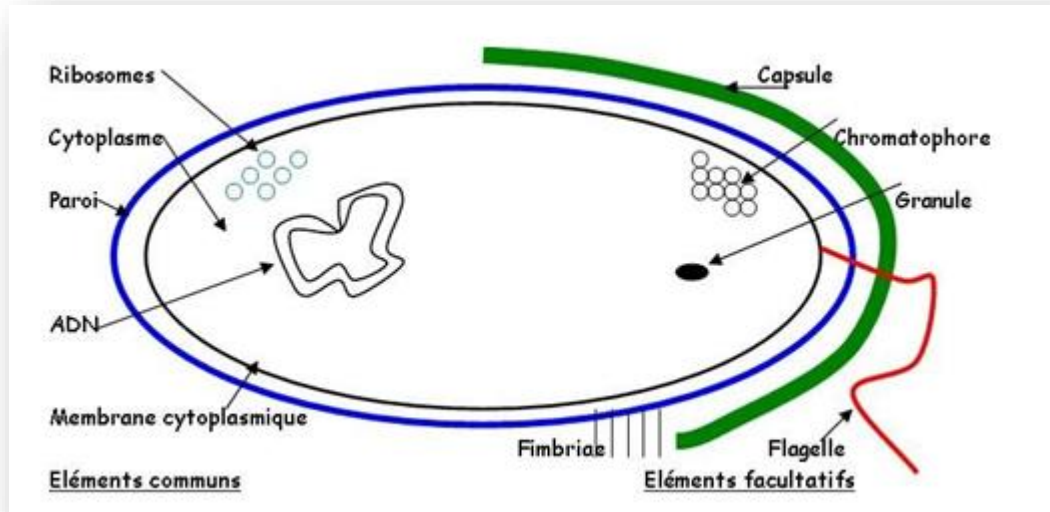


Figure 8: Schéma simplifié d'une cellule bactérienne.

❖ **Structure des éléments constants**

2.3.La paroi

Enveloppe rigide caractéristique de la cellule procaryote, située à l'extérieur de la membrane plasmique, la paroi est un véritable exosquelette qui confère à la cellule sa forme et sa rigidité, assurant l'intégrité de la bactérie. C'est un élément constant présent chez la plupart des bactéries à part les **Mollicutes**, (*Mycoplasma*). Cette structure est une cible privilégiée des thérapies antibactériennes (Betalactamines, fosfomycine, vancomycine, bacitracine).

2.3.1. Composition chimique

On trouve plusieurs éléments qui constituent la paroi bactérienne. Selon la nature chimique on peut trouver les composants suivants; peptidoglycane, acides (téichoïques et lipotéichoïques) lipopolysaccharides, protéines, lipides et lipoprotéines. elle permet la différenciation de deux grands types de bactéries. En effet, la distinction entre les bactéries dites "à Gram positif" (Gram+) et les bactéries dites "à Gram négatif"(Gram-) repose sur une différence de composition pariétale. Au microscope électronique à transmission, on observe une nette différence de structure entre les parois des bactéries à Gram+ qui est en général plus épaisse (15 à 80nm) et d'aspect plus homogène, alors que celles des Gram-est plus fine (6 à 15 nm) et plus hétérogène (+complexe). Dans cette partie, la structure de la paroi des bactéries Gram(+) et Gram(-) seront développées séparément. Concernant les constituants de la paroi, la structure du peptidoglycane sera élucidée en premier car il s'agit d'un élément commun présent dans les deux types de paroi, c'est l'élément structural de

base pour toutes les bactéries puis les autres structures seront traitées selon leur présence dans le type de la paroi étudiée.

2.3.2. Structure moléculaire

2.3.2.1. La structure du peptidoglycane

la caractéristique commune à presque toutes les parois bactériennes est le peptidoglycane qui est un énorme polymère réticulé appelé aussi mucopeptide ou muréine.

Brièvement, c'est une structure macromoléculaire continue dont les principaux composants sont des chaînes linéaires de glycanes, reliées entre elles par de petites chaînes peptidiques. Ces unités répétées de glycanes sont composées de l'alternance d'unités de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). (figure 9).

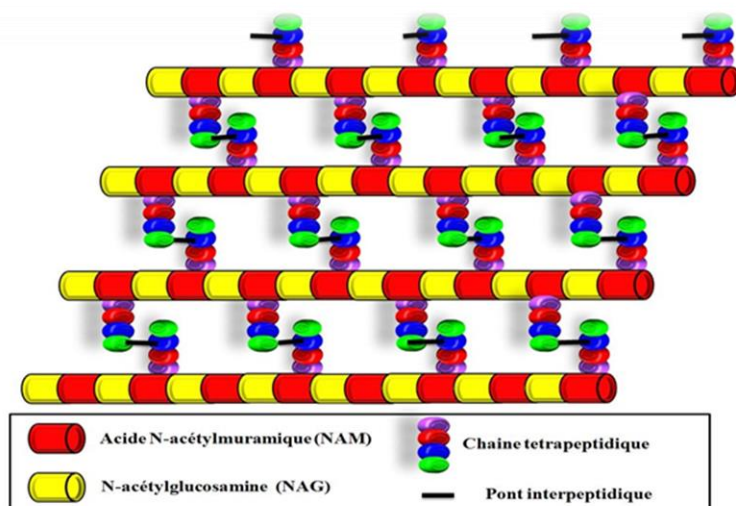


Figure 9: Schéma simplifié de la structure du peptidoglycane

Toutes les liaisons entre les sucres sont de type β 1-4. Le groupement carboxyle de chaque NAM est substitué par une sous-unité peptidique de cinq résidus d'acides aminés (ex : L-Ala- γ -D-Glu- mDAP-D-Ala-D-Ala) (figure 9). Il est à noter que le dernier acide aminé de la chaîne est enlevé au fur et à mesure de l'élongation de la chaîne du peptidoglycane. Les trois acides aminés; l'acide D-glutamique (D-Glu), la D-alaline (D-Ala) et l'acide méso-diaminopimélique (DAP), ne sont pas présents dans les protéines. Donc, ces acides aminés de la série D empêchent la dégradation par la plupart des peptidases qui reconnaissent que les isomères de la série L.

La synthèse du peptidoglycane nécessite plus de trente enzymes et a lieu dans différents compartiments de la cellule bactérienne (cytoplasme, membrane et paroi). Les chaînes de peptidoglycane voisines sont interconnectées (entre le 3ème acide aminé d'une chaîne et le

4ème acide aminé d'une autre chaîne voisine) soit par une liaison peptidique directe, soit par une courte chaîne d'acides aminés entre deux sous-unités peptidiques (ex : Gly-Gly-Gly-Gly-

Gly). Bien que la composition des peptides puisse varier d'une espèce à l'autre, la composition du squelette carbohydraté est généralement considérée comme étant constante.

2.3.2.2. Les parois des bactéries Gram-positives

La plupart des bactéries à Gram positif présente une paroi épaisse de 20 à 80nm. Elle est principalement composée de peptidoglycane qui est le constituant majeur, elle est pauvre en lipides mais riches en constituants secondaires : les acides téichoïques et les acides téichuroniques. Elle peut contenir également des protéines pariétales (ex: adhésines, couche S...etc.) (Figure 10). L'espace périplasmique, situé entre la membrane cytoplasmique et la paroi, est petit par rapport à celui des bactéries à Gram-négatives et peu de protéines sont retrouvées fixées au côté extérieur de la membrane cytoplasmique. Il est admis que la plupart des protéines sécrétées par les cellules traversent habituellement le peptidoglycane. Ces dernières sont considérées comme des exo-enzymes, car elles servent souvent à dégrader les substrats nutritifs trop grands pour être transportés à travers la membrane cytoplasmique.

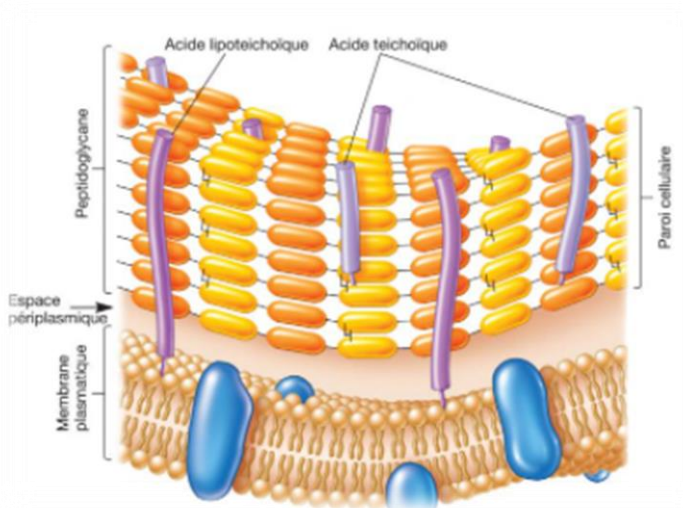


Figure 10: Représentation de la paroi des bactéries Gram-positives.

❖ La structure des acides téichoïques et les acides lipotéichoïques

Les acides téichoïques (AT) et les acides lipotéichoïques (ALT) sont formés d'un squelette d'alditol (glycérol ou ribitol) connecté par des liaisons phosphates et sont reliés aux résidus N-acétylmuramique du peptidoglycane (AT) ou à la membrane plasmique (ALT). D'autres molécules comme le glucose ou le D-alanine, peuvent se lier aux résidus de glycérol ou de

ribitol (Figure 11) .Les AT et ALT sont considérés comme des éléments importants qui stabilisent davantage la structure de la paroi bactérienne. Par ailleurs, plusieurs fonctions ont été attribuées aux AT et ALT notamment leur implication dans la pathogénicité. Ces acides téichoïques contribuent à la résistance aux peptides antimicrobiens, la formation de biofilms, l'adhésion aux cellules eucaryotes et stimulent l'inflammation par exposition des cellules au complément.

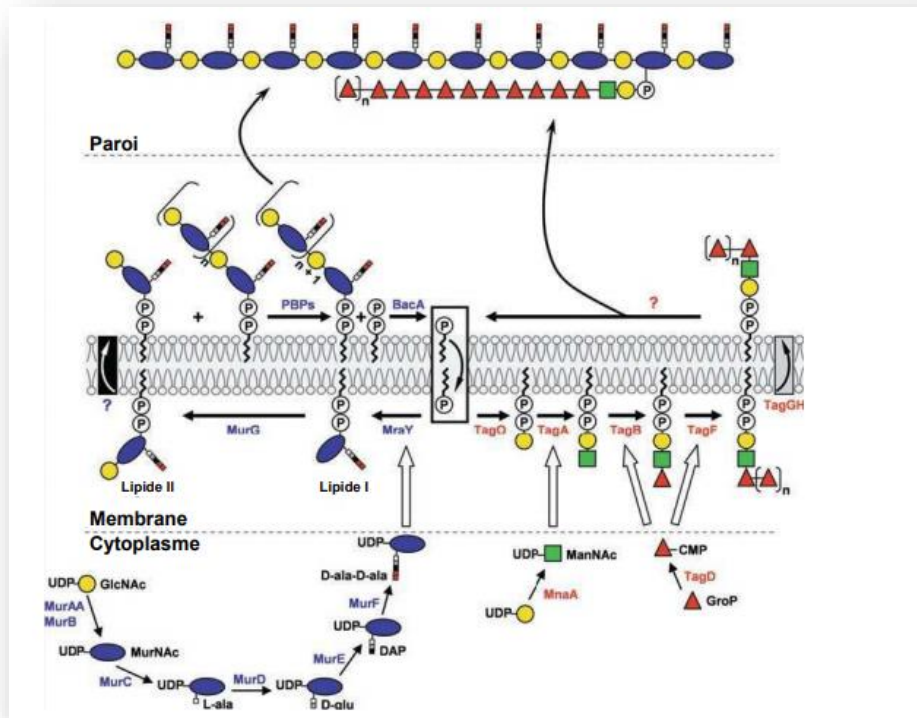


Figure 11: biosynthèse des acides téichoïques du peptidoglycane

- Exemples de bactéries à Gram positif

Il existe plusieurs milliers de bactéries à Gram positif dont on peut citer quelques-uns qui sont: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*.....etc

2.3.2.3. Les parois des bactéries Gram-négatives

Elle est composée de deux éléments : le **peptidoglycane** qui est présent en une seule couche de 1 à 5nm d'épaisseur (moins de 10% du poids sec de la paroi) et une **membrane externe** qui surmonte le peptidoglycane, comporte deux feuillets et présente des caractères particuliers et une composition complexe de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides. Ces dernières (LPS), sont de grandes molécules composées de trois parties; le *lipide A* enfoui dans la membrane externe, le *polysaccharide central* composé de

glucides (10 glucides chez *Salmonella*) et la chaîne latérale O à l'extrémité appelée également l'*antigène O* qui est une courte chaîne de polysaccharides.

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

qui résultent de l'association de 3 sous unités avec un canal centrale, elles rendent la membrane externe perméable contrairement à la membrane cytoplasmique.

On trouve dans la membrane externe un complexe appelé lipoprotéine majeure ou lipoprotéine de BRAUN, localisé dans la couche interne de la membrane externe et rattaché au peptidoglycane par covalence. Il confère à l'enveloppe externe une meilleure stabilité.

Le feuillet interne est composé de phospholipides similaires à ceux de la membrane cytoplasmique, le feuillet externe est composé de : lipopolysaccharides ou LPS, Les LPS jouent plusieurs rôles. En effet, ils contribuent à la charge négative de la surface externe de la bactérie, il peut faciliter l'adhésion de la bactérie à des surfaces, il participe à la sélectivité de la membrane externe en empêchant la perméabilité de certaines molécules et enfin, il suscite une réponse immunitaire chez l'hôte *via* l'antigène O et agit également comme une endotoxine à cause de la toxicité du lipide A. responsable de la spécificité antigénique de surface des bactéries à Gram négatif. Le LPS est composé de trois parties :

2.3.2.3.1. Le lipide A : inséré dans la membrane externe, et constitué de plusieurs unités de D-glucosamine-phosphate, substituées d'acides gras hydroxylés. C'est la partie la plus stable du LPS, qui donne la pathogénicité des bactéries Gram négatif

2.3.2.3. 2. La partie centrale ou core : composée de 10 à 15 unités glucidiques dont des hexoses et des heptoses et un octose (l'acide 2-céto-3-désoxyoctulosonique (CDO), commun à la plupart des bactéries à Gram négatif et spécifique des protistes procaryotes.

2.3.2.3.3. La partie périphérique, appelée antigène O : Elle est formée d'une chaîne flottante de plusieurs unités formée de 4 à 6 glucides. Elle est responsable du pouvoir immunogène des bactéries à Gram négatif.

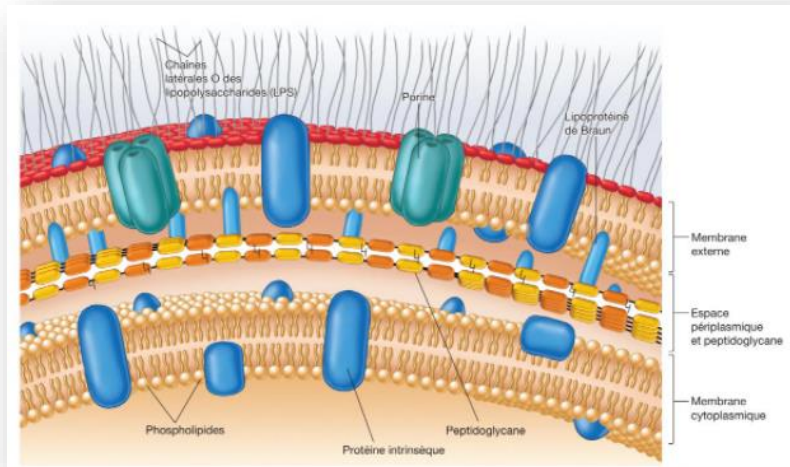


Figure 12: Représentation de la paroi des bactéries Gram-négatives

- **Exemples de bactéries à Gram négatif**

il existe une multitude de bactéries à Gram négatif dont on peut citer ;genres *Escherichia*, *Proteus*, *Klebseilla*, *Peudomonas*, *Aeromonas*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Neisseria*, *Rhizobium*, *Bordetella*....etc

❖ Comparaison entre les bactéries à Gram+ et les bactéries à Gram- (tableau3)

Tableau 3: Comparaison entre bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif

	Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif
Aspect en microscopie électronique	Une couche épaisse et amorphe	Deux couches séparées par un espace clair
Présence d'une membrane externe	Non	Oui
Présence d'un espace périplasmique	Non	Oui
Peptidoglycane	Epais(10à 80 nm) représente 40p. cent du poids sec, détermine la morphologie bactérienne	Mince (2à6nm) représente moins de 10p. cent du poids sec, détermine la morphologie bactérienne
Acides techoiques	Présents	Absents
Présence de protéine	Possibles: liaisons covalentes avec le peptidoglycane, rôle éventuel dans le pouvoir pathogène, rôle éventuel dans l'antigénicité spécifique	Fréquents
Présence de polysaccharides	Possible ; antigène spécifique du groupe pour certaines espèces	Possibles
Lipopolysacharides	Absents	Présents

2.3.3.Fonctions

Afin d'étudier les rôles de la paroi, on utilise un enzyme "le lysozyme" (Le lysozyme a été découvert en 1922 par Alexander Flemming quand il a traité les cultures bactériennes avec le mucus nasal d'un patient souffrant d'un rhume) qui attaque les peptidoglycanes constituant la paroi des bactéries. En effet, le lysozyme hydrolyse les liaisons (β 1 4 glucosidique) entre → l'acide N-acétyl-muramique et le N-acétyl-glucosamine qui détruit la paroi de peptidoglycane.

Expérience

1- On place une souche de *Bacillus subtilis* (bacille Gram+) en milieu hypotonique : la bactérie se comporte normalement.

2- Si on ajoute du lysozyme à cette suspension, les bactéries gonflent et éclatent.

3- On fait la même expérience en milieu isotonique, les bactéries n'éclatent pas en présence de lysozyme, mais elles prennent une forme sphérique appelée : PROTOPLASTE. Les protoplastes ne possèdent plus les propriétés antigéniques de la bactérie, ne se divisent plus, ne fixent plus les bactériophages et sont incapables de mobilité.

4- On fait la même expérience avec *Escherichia coli* (bacille Gram-) : en milieu isotonique + lysozyme, les bactéries prennent une forme sphérique appelée : SPHEROPLASTE. Les sphéroplastes conservent toutes les propriétés initiales de la bactérie.

Donc on a abouti à la formation de 2 types de formes bactériennes :

-Des sphéroplastes: deux membranes unitaires, caractéristiques des Gram- .

-Des protoplastes : limités par une membrane unitaire caractéristique des Gram +.

2.3.3.1. Assurer le maintien de la forme de la bactérie

2.3.3.2. Propriétés antigéniques

2.3.3.3. Permettre la fixation des bactériophages : ils reconnaissent des récepteurs localisés sur le peptidoglycane des Gram positif ou la membrane externe des Gram négatif (cette propriété est utilisée pour l'identification de certaines bactéries c'est la "Lysotypie".)

2.3.3.4. Une perméabilité sélective: La paroi laisse passer de petites molécules comme l'eau, les sels minéraux ou des métabolites simples. Par contre elle est plus ou moins perméable à certains solvants (exemple l'alcool)

2.3.3.5. Participer à la mobilité : En effet, les flagelles sont implantés dans la membrane cytoplasmique mais ne peuvent pas fonctionner en absence de peptidoglycane (d'où l'immobilité des protoplastes).

2.3.3.6. Assurer une protection contre la pression osmotique intracellulaire (car une forte concentration en métabolites à l'intérieur de la cellule >> l'eau rentre). Un protoplaste ne possède plus les propriétés antigéniques de la bactérie d'origine. En effet, les antigènes pariétaux (de la paroi) : Chez les Gram sont (+peptidoglycane + acides téchoïques et lipotéchoïques + polyside C (Streptocoques). Chez les Gram (-) : les antigènes O du LPS.

2.3.3.7. Permettre la fixation des bactériophages. Ils reconnaissent des récepteurs localisés sur le peptidoglycane des Gram(+) ou la membrane externe des Gram(-). Cette propriété est utilisée pour l'identification de certaines bactéries

2.3.3.8. Une toxicité

2.3.4. Coloration de Gram

Contexte : en 1884, Hans Christian Gram, un médecin d'origine danoise travaillant à Berlin, a trouvé accidentellement une méthode qui est encore aujourd'hui à la base de

l'identification bactérienne. Au cours de ses études sur les tissus de poumons de patients morts de pneumonie, il découvre que les colorants permettent de mieux observer les cellules bactériennes transparentes. Il s'aperçoit aussi que certaines bactéries sont colorées par les colorants qu'il emploie, tandis que d'autres ne le sont pas. Quelques années plus tard, Hans Gram développe une procédure de coloration qui sépare la population bactérienne en deux grands groupes distincts à savoir; les bactéries à Gram positif, caractérisées par une paroi très riche en peptidoglycane (couche épaisse) et en acide teichoïques et lipoteichoïques (ce qui empêche la pénétration des solvants organiques tel que l'alcool et l'acétone), et les bactéries à Gram négatif, caractérisées par une paroi très riche en lipides et lipopolysaccharides grâce à la présence d'une membrane externe. Cependant, la couche du peptidoglycane est beaucoup moins importante par rapport aux bactéries Gram positives. Ce qui permet la pénétration des solvants organiques. Cette coloration est toujours utilisée dans les laboratoires de microbiologie du monde entier. c'est l'étape indispensable et préliminaire à toute identification bactérienne.

NB: La méthodologie de la coloration de GRAM sera développé dans le TPN°6.

❖ Cas de parois particulières

Les parois bactériennes ne sont pas toutes identiques à celles des bactéries Gram+ et des Gram- conventionnelles. Car certaines bactéries présentent des parois particulières voire même absentes. Chez les *Mycoplasmes*, la paroi bactérienne est absente. De ce fait, ils sont insensibles aux antibiotiques ciblant la paroi bactérienne. Vu l'absence de paroi, les mycoplasmes ont tendance à être pléomorphes. ce sont des microorganismes, commensaux des animaux, elles peuvent vivre librement sous forme de protoplastes, soit parce que leur membrane cytoplasmique contient des stérols qui lui confèrent une certaine rigidité, soit parce que ces organismes vivent dans un habitat où la pression osmotique est contrôlée (par exemple le corps humain).

La paroi des Mycobactéries, par exemple, est essentiellement composée d'une épaisse couche formée de trois structures liées de manière covalente : le peptidoglycane, l'arabino-galactane et des acides mycoliques. Une liaison covalente entre les acides mycoliques conduit à la formation d'une couche, parfois appelée mycomembrane, ayant une fluidité extrêmement faible. La partie extérieure de la mycomembrane contient des lipides libres variés, comme les glycolipides phénoliques, les sulfolipides et phosphatidylinositol-mannosides, intercalés entre les acides mycoliques. Ces bactéries sont dites "acido-alcool-résistantes" car elles résultent d'une estérification entre un acide gras long avec un alcool long, elles sont mises en évidence par la coloration de Zielh Nielsen.

Le genre *Chlamydia* par exemple, sont des parasites intracellulaires obligatoires, non colorable en Gram car le peptidoglycane est inexistant. Chez l'homme, *Chlamydia trachomatis* est responsable de l'urétrite (maladie sexuelle transmissible) et de la cécité évitable (trachome).

2.4. La membrane plasmique

2.4.1. Composition chimique

Au microscope électronique, les membranes cytoplasmiques des bactéries apparaissent en triple feuillet; deux feuillets denses limitant une couche claire. De point de vu moléculaire, la membrane cytoplasmique bactérienne (Figure 13) est principalement constituée de lipides (de 30 à 40%) qui sont à la base de la structure de la membrane. Chaque molécule de lipide est amphipathique ; formée d'une partie hydrophobe soluble dans l'huile insoluble dans l'eau et une partie hydrophile ayant des propriétés opposées et portant un groupement phosphate chargé négativement.

Ces deux couches moléculaires induisent une organisation en double feuillet. Cette organisation n'est pas statique, elle répond au modèle dit en **mosaïque fluide** (Les molécules peuvent se déplacer latéralement en échangeant leurs places). et de protéines (de 60 à 70%). Ondistinguedeuxcatégoriesdeprotéines:**lesprotéinespériphériques**etles **protéine sintégrales** qui traversent complètement le double feuillet. Elle possède le même type de structure que celle d'une cellule eucaryote (bicouche phospholipidique) mais avec beaucoup moins de glucides et jamais de stérols (sauf chez les mycoplasmes). Les glucides sont quantitativement des constituants mineurs et souvent associés aux lipides (glycolipides) ou aux protéines (glycoprotéines). La membrane plasmique contient les enzymes de la chaîne respiratoire, les déshydrogénases et les coenzymes associés : NAD⁺, FAD, cytochromes, cytochrome oxydase,d'autres enzymes impliquées dans la synthèse des lipides et dans la réplication de l'ADN y sont localisées.

2.4.2. Structure

La membrane plasmique (ou cytoplasmique) est un élément de structure fluide qui entoure le cytoplasme et se situe sous la paroi bactérienne. Généralement, c'est une couche fine de 7.5 à 8 nm d'épaisseur,et comporte deux feuillets denses limitant un feuillet interne transparent (structure en double feuillet). Elle contient principalement des phospholipides (30 à 40%) et des protéines (60 à 70%). Les lipides sont de loin les plus abondantes (phospholipides) et sont à la base de la structure de la membrane. Son rôle essentiel est celui d'une barrière hydrophobe et osmotique. L'eau et les petites molécules hydrophiles diffusent librement, tandis que les plus grosses molécules hydrophiles la franchissent par l'intermédiaire de transporteurs protéiques perméases (Plusieurs antibiotiques ciblent la membrane

cytoplasmique de bactéries telles que les polymyxines et polypeptides antimicrobiens). organisée, asymétrique, flexible et dynamique.

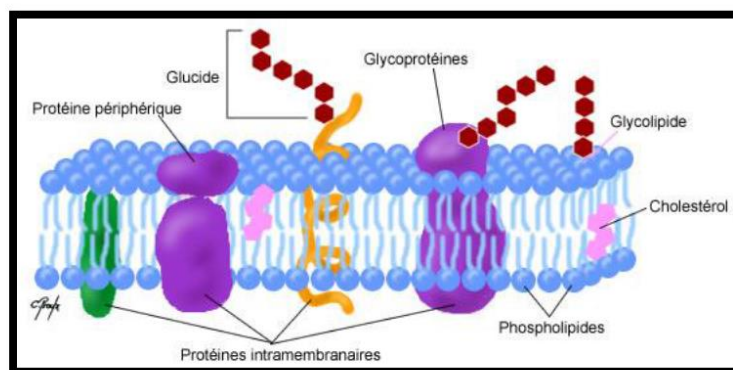


Figure 13: La structure de la membrane cytoplasmique bactérienne (modèle en mosaïque fluide).

2.4.3. Fonctions

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

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

2.4.3.1. Contrôle des échanges entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire

2.4.3.1.1. Échanges sans déformation de la membrane plasmique: Il s'agit de transports de petites molécules, sans intervention du cytosquelette. Ils sont de deux types, le transport passif et le transport actif.

❖ **Transport passif:** Les molécules sont transportées dans le sens de leur gradient de concentration, sans consommation d'ATP, ils sont de deux types (figure 14).

- **Diffusion simple:** (sans perméases), à travers la bicouche lipidique (ex: molécules hydrophobes et non chargées (H₂O, CO₂, O₂, N₂, benzène, éthanol...))

- **Diffusion facilitée** par l'intermédiaire de canaux protéiques tels que les canaux ioniques spécifiques (Na⁺, K⁺, Cl⁻) ou canaux hydriques (aquaporines), soit par des protéines porteuses spécifiques ou perméases pour le transport du glucose, des acides aminés).

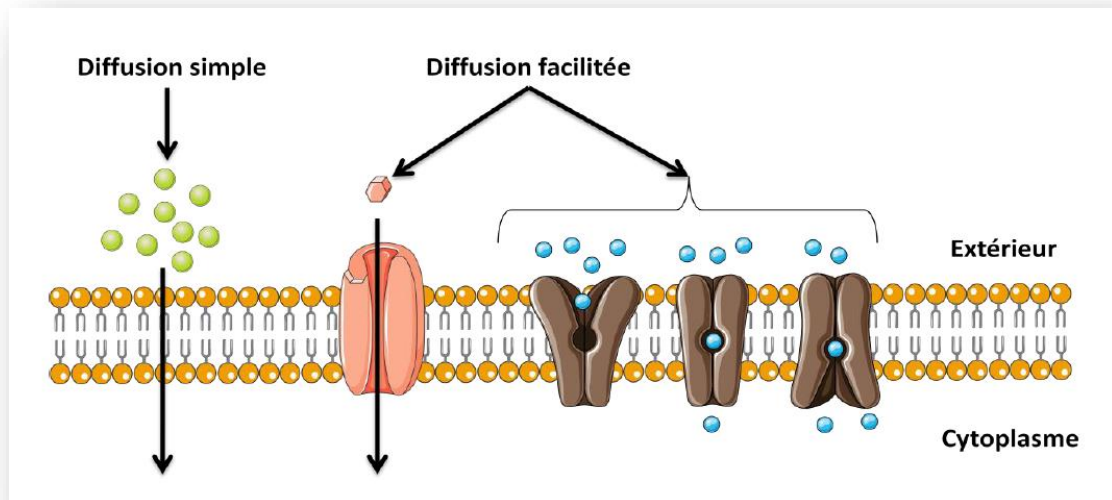


Figure 14: Modalités de transport membranaire passif

❖ **Transport actif**

-**Primaire** : appelé transport actif direct, il consomme de l'énergie obtenu par l'hydrolyse de l'ATP et se fait contre le gradient de concentration. Il fait intervenir des enzymes dites ATPases transmembranaires ou pompes (ex. pompe $\text{Na}^{2+} / \text{K}^{+}$, pompe à H^{+} et pompe à Ca^{2+}) (figure 15).

-**Secondaire** : contrairement au transport actif direct, celui-ci n'utilise pas l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP, c'est la différence de potentiel électrochimique qui est utilisée.

- **les uniports** transportent une seule molécule dans une seule direction.
- **Le symport** : les deux substances de nature différentes sont transportées dans la même direction (co-transport), l'une est dans le sens de son gradient de concentration (transport passif) et l'autre dans le sens opposé à son gradient de concentration (transport actif).
- **L'antiport** : transport de deux ou plusieurs substances de nature différentes dans des directions opposées (contre-transport). L'une est transportée dans le sens du gradient de concentration et l'autre contre gradient de concentration.

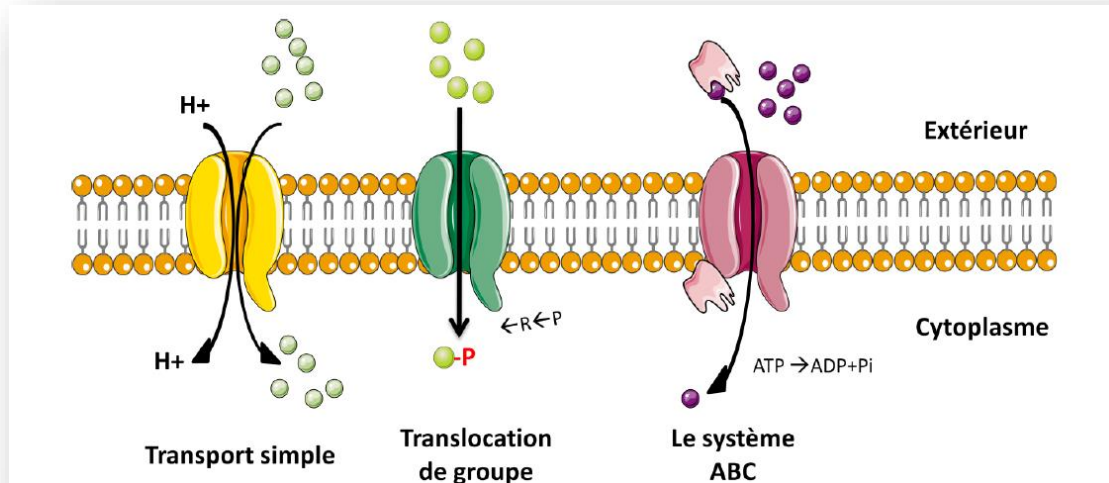


Figure 15: Les trois systèmes de transport membranaire

2.4.3.1.2. Echanges avec déformations de la membrane plasmique C'est le transport des grosses molécules ou particules avec intervention du cytosquelette, cas de l'endocytose et l'exocytose.

- ❖ **Endocytose:** Elle permet l'entrée des molécules vers la cellule. Trois types d'endocytose sont connus, la pinocytose, la phagocytose et l'endocytose par récepteurs.
- ❖ **Exocytose:** Au contraire, l'exocytose assure la sortie des molécules de sécrétion vers le milieu extracellulaire et permet le recyclage des récepteurs membranaires.

2.4.3.2. la membrane joue un rôle important dans la détection des signaux et de composés présents dans le milieu environnant grâce à **la présence de protéines transmembranaires du chimiotactisme.**

Ceci, permet aux bactéries dotées de flagelles, **de nager vers les endroits** les plus riches en nutriments, ou bien, de s'éloigner des endroits défavorables comme ceux qui contiennent des substances toxiques. Ces protéines interviennent dans les sens de rotation des flagelles.

2.4.3.3. Rôle de barrière semi-perméable (ou semi sélective): elle permet le passage de molécules lipophiles et empêche le passage des molécules hydrophiles

2.4.3.4. Outre son rôle de barrière, la membrane exerce de nombreuses fonctions grâce à de nombreuses enzymes qui lui sont associées : enzymes des chaînes respiratoires, perméases, ATPases, phosphotransférases, enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi et des pilis.

2.5. Le cytoplasme

En raison de l'absence de compartimentation des cellules procaryotes, l'ensemble des constituants solubles (macromolécules, molécules organiques ou minérales, éventuels organites, etc.) sont localisés dans le cytoplasme, ou cytosol. Celui-ci est donc le lieu de

nombreux processus vitaux. c'est un hydrogel colloïdal neutre (pH situé entre 7 et 7,2) Il représente 60-70 % du volume total de la cellule (entre $< 0,2$ et plusieurs μm^3 selon les espèces). Sa composition chimique et ses propriétés physiques varient en fonction de l'état physiologique et des fluctuations physicochimiques de l'environnement. Chez *E. coli*, il occupe environ $0,2 \mu\text{m}^3$ en cours de croissance exponentielle.

La membrane plasmique délimite ce cytoplasme dans lequel baignent les différents éléments cellulaires (ADN, ribosomes, inclusions, protéines, ions...etc.). Exceptionnellement, le cytoplasme de certaines espèces peut contenir d'autres structures particulières tels que des cristaux (chez *Bacillus thuringiensis*), des protéines "corps R" chez certaines bactéries parasites de protozoaires...etc.

2.5.1. Les ribosomes

Les ribosomes sont de petites granulations sphériques de 10 à 30 nm de diamètre. Ils sont très abondants dans le cytoplasme des bactéries en croissance (plus de 15000 ribosomes/bactérie). De point de vue composition, les ribosomes sont constitués d'ARN (63%) et de protéines (37%) et la cohésion est maintenue en présence d'ions Mg^{++} et d'autres liaisons telles que les liaisons hydrogène, ioniques et hydrophobes. Vu la charge négative des ARN et de certaines protéines, les ribosomes fixent les colorants basiques tels que le bleu de Méthylène. Deux sous unités composent le ribosome bactérien à savoir; une grande sous unité 50S et une petite sous unité 30S. Cependant, ils présentent une constante de sédimentation de 70S (Attention! $50\text{S} + 30\text{S} \neq 80\text{S}$). La figure 16 illustre la composition d'un ribosome bactérien.

2.5.1.1. Rôle des ribosomes

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

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

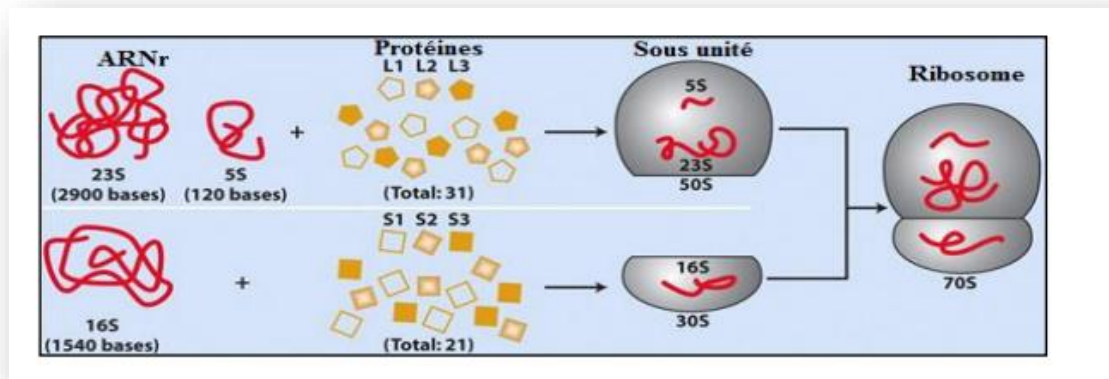


Figure 16: Structure et constitution du ribosome bactérien

2.5.2. Les substances de réserve

leurs rôle dans la cellule bactérienne est de stoker certains nutriments (les réserves) sous forme de granules de réserve qui constituent ainsi un stock disponible. Ces granules sont limitées par une mince enveloppe lipidique et qui peuvent être de réserves azotées non azotées (carbonées, phosphatées, soufre et fer).

2.5.2.1. Réserves azotées : beaucoup de bactéries aquatiques photosynthétiques (les cyanobactéries) accumulent dans leur cytoplasme la cyanophicine. C'est un polymère d'arginine et d'aspartate, et constitue une réserve directe pour la biosynthèse d'autres acides aminés et acides organiques du cycle de KREBS.

2.5.2.2. Réserves non azotées

- ❖ **Carbonées :** de nature glucidique telles que le glycogène et l'amidon, rencontrées chez les entérobactéries, mais le plus souvent stockées sous forme lipidique structurées en acide β -hydroxybutyrique chez les bactéries des genres *Vibrio*, *Azotobacter* et *Pseudomonas*. Ces réserves peuvent servir de source d'énergie et de carbone en cas d'absence de nutriments dans le milieu de croissance.
- ❖ **Phosphatées:** dans la région nucléaire, se trouve des inclusions de vultine qui est un polymère de phosphate et d'oxygène (ortho-phosphate). Les vultines peuvent servir pour la phosphorylation qui est une étape importante pour la vie de la cellule bactérienne. Le phosphore est intégré dans la composition des acides nucléiques, des phospholipides, des acides teichoïques, et des nucléotides (ATP, NAD⁺).
- ❖ **Soufrées:** certaines bactéries oxydent le sulfure d'hydrogène (H₂S) et stockent le soufre élémentaire dans leur cytoplasme sous forme de globules. Ce sont les bactéries photosynthétiques pourpres (*Chromatium*), les bactéries filamenteuses mobiles par

glissement (Beggiatoa) et des bactéries incolores du soufre (Thiobacterium). Le soufre sert pour la synthèse des acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et de coenzymes.

- ❖ **Ferriques** : Les bactéries oxydant le fer (bactéries ferro oxydantes) contiennent des inclusions cytoplasmiques d'hydroxyde ferrique ($\text{Fe}(\text{OH})_3$). Le fer est présent dans la structure des transporteurs d'électrons (cytochromes) et dans certaines protéines.

2.6. Le chromosome

2.6.1. Morphologie

comme tous les protistes procaryotes, les bactéries possèdent un appareil nucléaire constitué d'acide desoxyribonucléique (ADN) qui est le support de l'information génétique (héréditaire) de la cellule, appelé aussi, génome. L'ADN est constitué d'une double hélice d'ADN circulaire. Cette double hélice est pelotonnée, surenroulée dans le cytoplasme grâce à l'action des topo isoméras (au nombre de 4 chez les bactéries). Déplié, le chromosome bactérien a près de 1 mm de long (1000 fois la longueur de la bactérie) et 3 à 5 nanomètres de large. Les deux chaînes de nucléotides se répliquent selon le schéma de Watson et Crick, chaque chaîne assurant la répllication de la chaîne complémentaire selon un mode semi-conservatif.

2.6.2. Composition

l'ADN ou acide désoxyribonucléique est un polymère de poids moléculaire (PM) élevé, composé d'unités appelées nucléotides, ce dernier est constitué de : « Groupement phosphoré + sucre désoxyribose à 5 C + une base purique ou pyrimidique ». Bases puriques : Adénine A et Guanine G. Bases pyrimidiques : Cytosine C et Thymine T. Le sucre: Désoxyribose. Le groupement phosphoré : est un phosphate diester en 3' et 5' du désoxyribose. Le rapport (A+T)/G+C) mieux connu sous le nom de coefficient de Chargaff varie selon les espèces. On l'exprime en GC% : 50% par exemple chez *E.coli*, 60% et chez *Pseudomonas*, 25 à 45, Les deux brins d'ADN antiparallèles sont maintenus en une double hélice par des liaisons hydrogènes entre les bases azotées de manière spécifique (complémentarité de bases : A=T et C≡G). Cette structure complémentaire de l'ADN rend possible la duplication précise de l'ADN durant la division cellulaire. Les chromosomes sont composés de gènes qui sont des segments d'ADN qui déterminent la synthèse des protéines (figure 17).

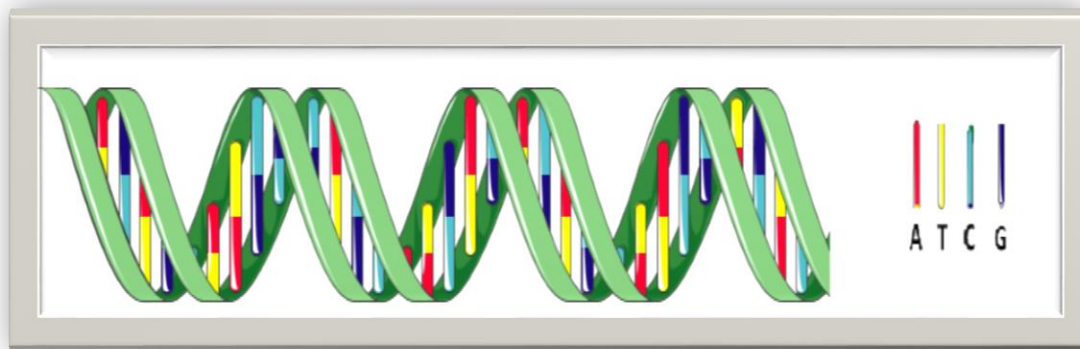


Figure 17: Représentation schématique de la double hélice d'ADN

2.6.3. Réplication chimique

la réplication est bidirectionnelle et semi-conservative : chaque chaîne parentale reste associée à la nouvelle chaîne pour qui elle sert de matrice. Plusieurs enzymes sont impliquées : ADN polymérase I, II, III : catalysent l'addition de désoxyribonucléotides à l'extrémité d'une chaîne d'ADN, elles ont aussi une activité exonucléasique. La III est la plus active.

ADN ligase : unit les extrémités de deux chaînes d'ADN en catalysant la synthèse d'un pont phosphodiester entre un 3'OH et 5'P. Elle répare les coupures d'ADN et circularise l'ADN bactérien. Hélicase: elle ouvre les chaînes d'ADN avant la réplication.

La Gyrase ou Topo isomérase II : La Gyrase fait une coupure au niveau de l'un des brins, ce qui induit la désenroulement de l'ADN superenroulé en molécule circulaire enroulée. La réplication débute en un point spécifique (le point origine ou point d'initiation).

Au niveau de la fourche de réplication, l'un des deux brins est synthétisé dans le sens de déplacement (3'OH libre), catalysé par la DNA polymérase III. Il est appelé brin précoce ou avancé. L'autre à extrémité 5' sera synthétisé par fragments d'Ogasaki et il est appelé brin tardif. Ces fragments de 1000 à 2000 résidus nécessitent des amorces d'ARN synthétisées par une ARN polymérase DNA dépendante appelée primase, ensuite ces amorces ARN sont excisées par l'ADN polymérase I (activité exonucléasique) et les délétions sont remplacées par de l'ADN par cette même enzyme. Enfin l'ADN ligase relie les différentes séquences au niveau de leurs extrémités 3'OH et 5'OH libre. Durant toutes ces étapes, les d'ADN matrice sont maintenus déroulés et stabilisés par des protéines appelées « DNA binding proteins » (figure 18).

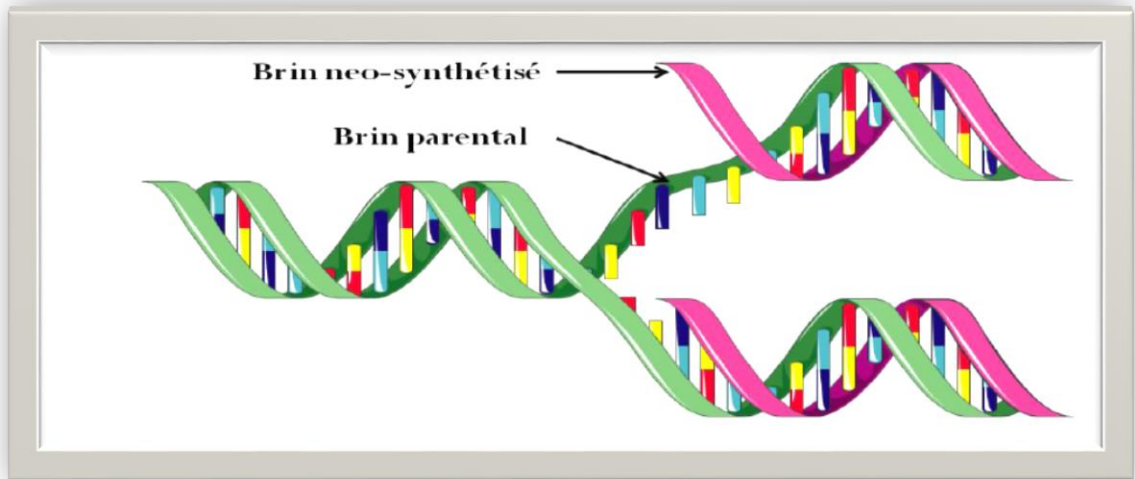


Figure 18:Le mode semi-conservatif de la réplication d'ADN.

2.6.4. Structure

L'analyse chimique de l'appareil nucléaire indique qu'il est composé à 60 % d'ADN (le chromosome), à 30 % d'acide ribonucléique ou ARN (rôle de structuration) et à 10 % de protéines. Ces dernières sont représentées en particulier par les ADN polymérases qui copient les doubles brins d'ADN, les topo isomérases, surtout les ADN gyrases, qui les déroulent pour permettre l'action des polymérases, et des ARN polymérases qui assurent la synthèse des divers ARN. La molécule d'ADN est très riche en charges électrique négatives (riche en résidus phosphate), mais elle est complexée à des cations Mg^{2+} et Ca^{2+} et avec des protéines basiques (polyamines ou protéines P, voisines des histones de l'ADN des eucaryotes), équilibrent ces charges et assurent la neutralité électrique et la stabilité de l'ADN.

2.7. Les plasmides

La cellule bactérienne peut contenir des éléments génétiques extrachromosomiques capables d'autoreproduction que Lederberg en 1952 proposa d'appeler les plasmides. Certaines bactéries possèdent plusieurs plasmides différents. ils permettent à la bactérie une meilleure adaptation à son environnement.

2.7.1 Structure

ce sont des molécules d'ADN bicaténares, généralement circulaires (des plasmides linéaires sont présents chez les *Borrelia spp.* et les *streptomyces sp.*), extrachromosomiques, d'une taille variant de 1 à 400 kb, doués de réplication autonome (réplicon) et transmissibles

de façon stable à la descendance.). Ils adoptent un enroulement serré (torsadé) afin de préserver l'espace cellulaire.

2.7.2 Réplication

Le plasmide peut se répliquer selon deux modèles :

- ❖ **La réplication de type Thêta θ** , uni ou bidirectionnelle, à partir d'une origine de réplication en utilisant l'équipement enzymatique de la bactérie hôte.
- ❖ **Une réplication de type « Rolling cercle » ou cercle déroulant.** Un brin est coupé par une nucléase. Ce brin va se dérouler autour de l'autre brin dans le sens 5'P et la bactérie va synthétiser un brin complémentaire simultanément aux deux brins parents.

2.7.3 Propriétés

- ❖ **Résistance aux antibiotiques:**(90% plasmidique) les 10% restant (chromosomique).
- ❖ **Résistance aux métaux lourds:**(mercure, sels de cadmium, bismuth, de plomb, d'antimoine et arsénites.
- ❖ **Production de substances à rôle pathogène:**L'exemple le plus étudié est rencontré chez les *Escherichia coli*, responsables de diarrhées.
- ❖ **Le pouvoir pathogène:**dans les 3 cas est contrôlé par une information génétique **portée par un plasmide**, codant pour des **entérotoxines** et des **facteurs de colonisation** permettant l'attachement des bactéries à la surface de l'intestin (épithélium intestinal).
- ❖ **Production de bactériocines**
- ❖ **Caractères métaboliques :** un grand nombre de caractères biochimiques des bactéries sont d'origines plasmidiques.

2.8 .Les Pilis

Les Pilis ou fimbriae sont de courts appendices protéiques fins et plus minces que les flagelles qui mesurent de 3 à 10 nm de diamètre et plusieurs μm de long. On les retrouve plus fréquemment chez les bactéries à Gram négatif que celles à Gram positif. Contrairement aux flagelles, les pilis ne sont pas impliqués dans le mouvement. Il existe deux types de pili à savoir; les pilis communs et les pilis sexuels On peut parler de :

- ❖ **Pili** pour désigner les appendices qui jouent un rôle dans la conjugaison (pili sexuels ou pili F).
- ❖ **Fimbriae** (pili communs de type I à IV) pour désigner les appendices impliqués dans les phénomènes d'adhésion.

2.8.1. Structure

Les deux types sont composés des protéines appelées pilines (adhésine). Les sous unités de la piline sont séparées par chauffage ou traitement acide et reformées à froid ou à pH neutre

2.8.2. Fonctions

- ❖ **Pilis (fimbriae) communs** jouent un rôle d'adhésion et de pathogénicité en protégeant la bactérie contre la phagocytose (ex : gonocoque, *Salmonella*); .
- Les fimbriae de type I, III**, jouent un rôle dans l'adhésion des bactéries aux différents supports vivant ou non. Ils favorisent la formation de biofilm.
- Les fimbriae de type IV**, retrouvés par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa*, en plus de l'attachement, ils sont impliqués dans un autre mode de mobilité, dite saccadée. On les retrouve au niveau des pôles des cellules bactériennes.
- Les fimbriae IV** se contractent et se rétractent comme un ressort, pour permettre la mobilité de la bactérie
- ❖ **Pilis sexuels** A l'inverse des pilis communs, les pilis sexuels sont plus longs, plus épais et moins nombreux (de 1 à 5 pilis par bactéries) et se terminent par un renflement. ils permettent le contact et l'accouplement entre deux bactéries en effet **Le pili sexuel ou de type II** joue un rôle dans la conjugaison bactérienne (un des 3 modes de transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre). Les pilis sexuels de la bactérie donatrice vont permettre de reconnaître une bactérie réceptrice (de l'amarrer) et entraîner la création d'un pont cytoplasmique entre les 2 bactéries, permettant ainsi le passage d'une molécule de plasmide.

2.9. La Capsule

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

NB : Une capsule peut entourer un ou plusieurs corps bactériens

- ❖ **Mise en évidence de la capsule: Etat frais à l'encre de chine:** les bactéries apparaissent sur fond sombre avec un halo clair au tour du corps bactérien qui correspond à la capsule.

2.9.1 Morphologie

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

- **La capsule**, est bien organisée, bien définie et elle est difficilement détachable de la bactérie.
- **La couche mucoïde**, retrouvée chez les bactéries aquatiques est moins bien organisée, diffuse, elle est facilement détachable de la bactérie.
- **La couche S**, plus rigide, très structurée. C'est une couche de surface mise en évidence que par microscopie électronique. Elle est constituée de sous unités protéiques organisées de façon.

2.9.2. Composition chimique

Les constituants capsulaires sont le plus souvent de nature polysaccharidiques (Ex : *Streptococcus pneumoniae*) ou parfois polypeptidiques (Ex : *Bacillus anthracis*) Les capsules « vraies » sont celles qui entourent la paroi comme les capsules de *Streptococcus pneumoniae*. Cependant, d'autres couches comme les couches « diffuses » les couches « slime » (biofilm) peuvent former une capsule (ex : *Staphylococcus epidermidis*) .La couche muqueuse ou slime est une couche diffuse, facilement séparable du corps bactérien. Certains polysides produits par des bactéries ont un intérêt industriel comme *Leuconostoc mesenteroides* qui produit des dextrans.Le glycocalyx peut comprendre à la fois les capsules et les couches mucoïdes. Il constitue un réseau de polysaccharides recouvrant la surface des bactéries et d'autres cellules voisines. La couche S est constituée de sous unités protéiques organisées de façon cristalline selon un système géométrique carré, hexagonal ou oblique. Cette couche est fréquente chez les archéobactéries mais aussi chez les bactéries (*Chlamydia, Treponema, Helicobacter, Bacillus, Clostridium ...etc.*)

2.9.3. Fonctions

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

2.10. Les cils et les flagelles

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

2.10.1. Mise en évidence

Directe : en microscopie optique après avoir épaissi les flagelles par des colorations spéciales (Rhodes, Leifson : fuch sine basique) ;ils sont mis en évidence par la méthode de Rhodes qui consiste à appliquer le mordant de Rhodes pour 3mn sur un frottis de bactéries flagellées auquel les nitrates d'argent ammoniacal sont rajoutées. Après chauffage jusqu'à ébullition le frottis est laissé 3 à 5 minutes en contact avec le mélange. Cette méthode très délicate permet de rendre la structure des flagelles plus épaisse et donc visible au microscope La meilleure méthode d'étude est l'observation au microscope électronique qui, seule, permet de détailler leur forme, leur mode d'insertion et leurs dimensions.

Indirecte : état frais (bactéries en mouvement) ou en milieu semi-gélosé. on ensemence un milieu faiblement gélosé (semi-liquide , semi solide) en piqûre centrale : les bactéries immobiles se développent le long de la piqûre et les cellules mobiles envahissent toute la masse. Plusieurs facteurs influence la mobilité tels que l'âge de la culture, la température (*Yersinia sp* est immobile à 37°C et mobile à 22°C).

2.10.2. Structure

La microscopie électronique à transmission a permis de montrer que le flagelle bactérien est composé de trois parties à savoir; le corps basal enfoui dans la membrane cytoplasmique, le filament qui s'étend à l'extérieur de la cellule et enfin, le crochet qui relie le corps basal au filament (Figure 19). De point de vu structural, le filament est composé de sous-unités de flagelline dont la masse molaire vari de 30000 à 60000 Da selon l'espèce bactérienne. Cette protéine s'organise pour créer un filament long creux et rigide. Le filament de certaines espèces est entouré également par une gaine de lipopolysaccharides telle que *Vibrio cholerae*. Le crochet et le corps basal sont plus larges est plus complexes que le filament. Le corps basal est ancré dans la membrane cytoplasmique et il est composé de disques (anneaux). Chez les bactéries à Gram négatifs, plusieurs disques sont retrouvés (C, MS, P et L) alors que les bactéries à Gram positif, deux anneaux uniquement sont présents.

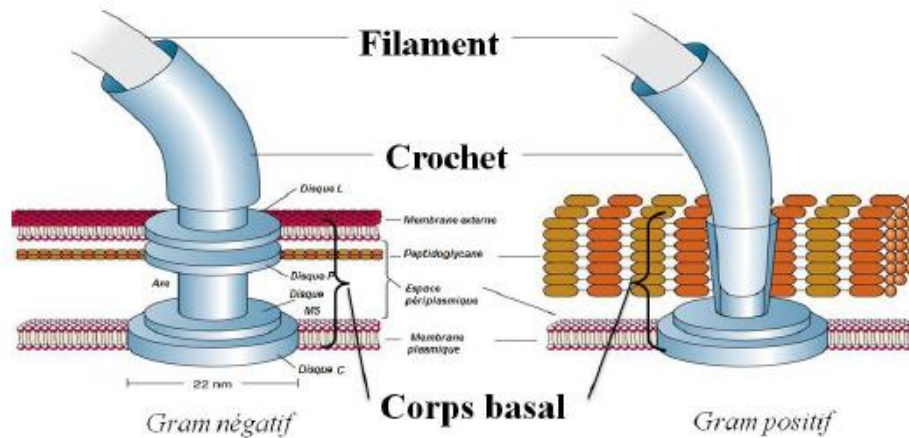


Figure 19: L'ultra structure d'un flagelle de bactéries à Gram négatif (à gauche) et à Gram positif (à droite)

Types de flagelles (figure 20)

Dans le système **polaire**, le ou les cils sont insérés à une ou aux deux extrémités de la cellule. La cellule est :

- Monotriche** si l'on ne rencontre qu'un seul flagelle à l'une de ses extrémités
- Amphitriche** lorsqu'un flagelle émerge à chacun des pôles
- Lophotriche** lorsqu'une touffe de cils apparaît à l'une ou aux deux extrémités

-Dans le système **péritriche**, la bactérie porte de très nombreux cils insérés sur tout le pourtour de la cellule. L'intérêt de ces notions est évident en taxonomie.

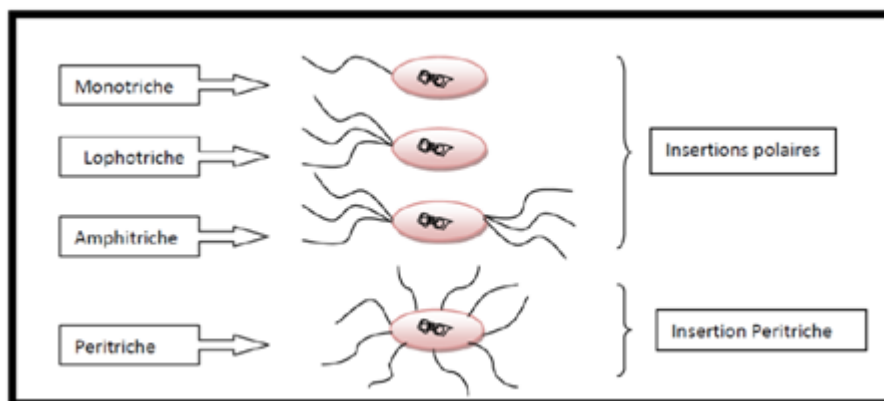


Figure 20: Types flagellaires et modes d'insertions

2.10.3. Fonctions

Le rôle principal des flagelles est la mobilité. Les flagelles fonctionnent comme les hélices de bateaux, par conséquent, une rotation dans le sens opposé à celui des aiguilles d'une montre engendre un déplacement avant appelé la course. À l'inverse, une rotation dans le

sens des aiguilles d'une montre engendre une culbute (elle se tourne sur elle-même afin de changer de sens). La mobilité permet aux bactéries d'envahir les tissus de l'hôte ce qui permet de considérer les flagelles comme des facteurs de virulence.

Les flagelles possèdent d'autres rôles autres que la mobilité tel que le chimiotactisme. Le système du chimiotactisme permet à la bactérie de sentir le milieu environnemental (attractif ou répulsif) et provoque une réponse par un changement de rotation des flagelles. Dans le cas des nutriments (substance attractive), les bactéries métabolisent les nutriments dans le voisinage immédiat, créant un gradient chimique. Elles vont ensuite se déplacer suivant le gradient pour former un anneau de croissance. Enfin, un rôle antigénique est attribué aux flagelles grâce aux flagellines qui sont antigéniques (antigène H) ce qui donne une agglutination en présence d'anticorps correspondants. En clinique, ce rôle est exploité notamment dans le sérodiagnostic de la fièvre typhoïde.

2.11. La spore

Ce sont des structures de résistance formées par certaines bactéries lorsque les conditions deviennent défavorables. Elle permet aux bactéries sporulantes de survivre dans des conditions difficiles et extrêmes de l'environnement. Les genres bactériens les plus connus qui forment des endospores sont *Bacillus*, *Clostridium*, *Porosarcina*. Ce sont toutes des bactéries Gram (+). D'autres genres sont capables également de sporuler.

➤ Mise en évidence

Les spores sont visibles à la coloration de Gram où elles apparaissent comme des espaces vides à l'intérieur des bactéries, seul le contour de la spore apparaît coloré à l'état frais, elles apparaissent comme de petites masses réfringentes au sein de la bactérie, ou libres dans le milieu. Il existe des colorations spéciales basées sur le caractère acido-alcool-résistant des spores. Exemple : coloration au vert de malachite = coloration de Benito-Trujillo. Après une contre-coloration par la fushine, les spores apparaissent vertes dans la bactérie rose.

2.11.1. Morphologie

Les spores sont de petites unités ovales ou sphériques. Elles peuvent déformer ou non le corps bactérien. Leur position dans la cellule est variable : centrale, terminale, subterminale (figure 21). Elles servent également dans l'identification bactérienne. La spore peut-être libre ou non. La recherche de tous ces caractères se fait dans un but taxonomique.

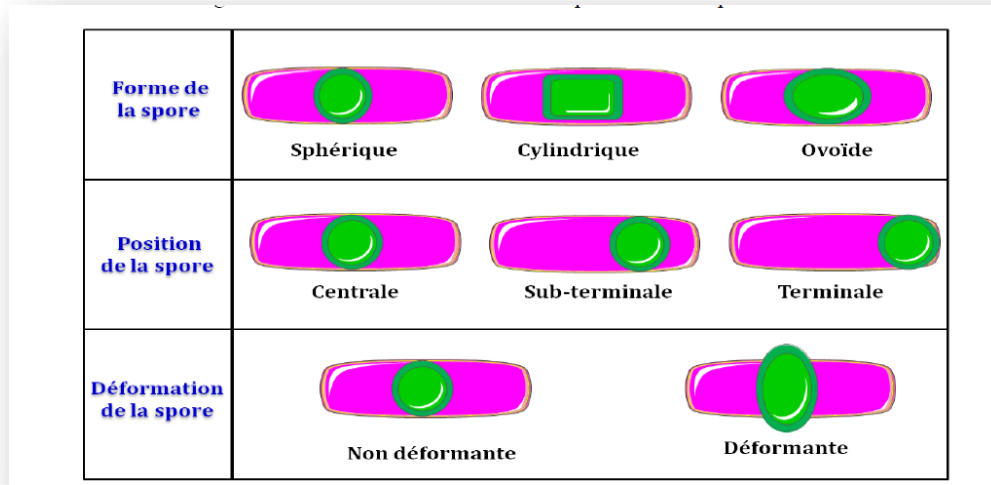


Figure 21: Exemple de localisation et taille des endospores

2.11.2.structure

L'exopodium de *Bacillus anthracis* par exemple est composée de protéines, d'osamines et de polysaccharides neutres. Elle contient une multitude d'enzymes nécessaires à la germination et/ou à l'interaction avec les cellules de l'hôte tels que les macrophages. La tunique est de nature protéique et selon l'espèce elle est constituée de protéines ressemblant à la kératine chez *Bacillus cereus* ou au collagène chez *Bacillus subtilis*. Elle contient également les enzymes nécessaires à la germination. Le cortex est constitué de peptidoglycane différent de celui de la paroi avec moins de ponts interpeptidiques car 50% de NAM (acide N-acétyl muramique) sont remplacés par des MAL (résidus lactam-muramique). La figure 22 illustre bien la structure d'une endospore bactérienne.

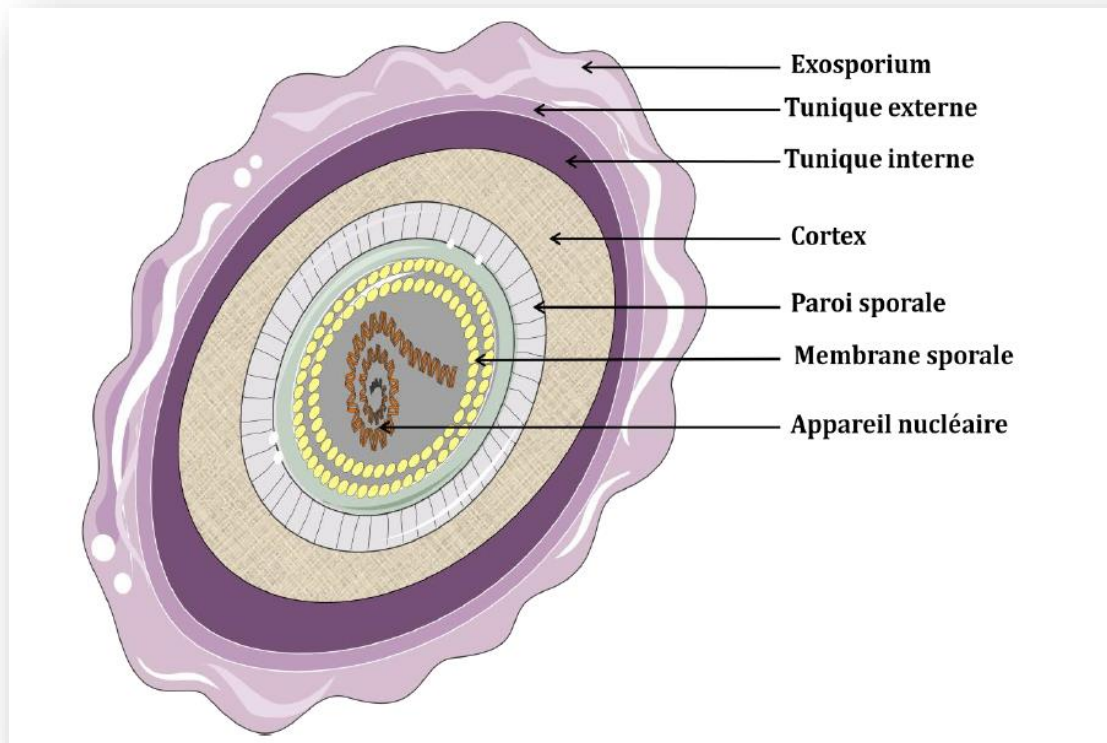


Figure 22: La structure d'une endospore bactérienne

2.11.3. Phénomène de sporulation

Des conditions défavorables de croissance entraînent la sporulation ou l'absence de germination de la spore. Il représente le passage de la forme végétative à la forme sporulée (figure 23). La sporulation dure environ 10.5 heures, chez *Bacillus megaterium*. Elle est provoquée par l'épuisement du milieu en substrat nutritif et elle peut nécessiter des conditions particulières : absence d'oxygène pour les *Clostridium*, présence d'oxygène au contraire pour *B. anthracis*.

Le processus de sporulation débute à la fin de la phase exponentielle et se déroule en 6 étapes :

Stade I : formation du filament axial : la division nucléaire n'étant pas suivie d'une division cellulaire, les deux génomes fusionnent donnant un filament chromatique axial.

Stade II : les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales. Ce septum va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une pré spore caractéristique.

Stade III : Englobement de la pré spore.

Stade IV : entre les deux membranes limitant la pré spore se forme la paroi sporale

puis apparaît rapidement le cortex.

Stades V and VI : apparition des tuniques et après maturation.

Stade VII : la cellule végétative se lyse et libère la spore.

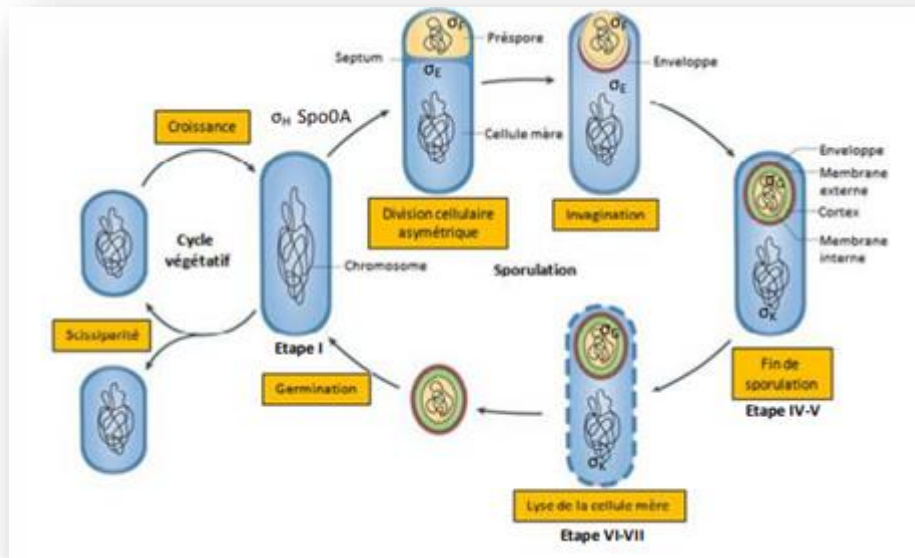


Figure 23: Etapes du cycle de sporulation et de germination chez *Bacillus subtilis*

2.11.4. Propriétés

La spore possède de nouvelles propriétés par rapport à la cellule végétative : Dans la nature (conditions naturelles), la spore permet de résister aux manques d'eau et de nutriments. Expérimentalement on a démontré les propriétés suivantes :

- **La thermo résistance:** La spore résiste en général à des températures de 70-80°C pendant 10 minutes, parfois plus. Cette propriété est due à la présence de l'acide dipicolinique,
- **la déshydratation de la spore et aux protéines « SASP »** (petites protéines acides et solubles pouvant se fixer à l'ADN).
- **Résistance aux agents physiques et chimiques:** La spore résiste aux rayons Ultraviolets, aux rayons gamma (Calcium, et SASP). Aux antiseptiques, désinfectants, antibiotiques (la tunique).
- **Synthèse d'antibiotiques:** Certaines bactéries synthétisent des antibiotiques au début de la phase de sporulation. Mais aussi des toxines (entérotoxine de *Clostridium perfringens*) ou des substances à activité biopesticide (toxines qui tue des insectes).

2.11.5. Germination

Afin que la spore germe, elle doit se trouver dans des conditions favorables : eau, nutriments, pH, force ionique, température convenable, aucun d'agent antimicrobien. Placée dans des conditions favorables (eau, glucose, acides aminés) la spore redonne naissance à une cellule végétative. On distingue 3 stades dans le processus de germination :

2.11.5.1. L'activation: correspondant à une lésion des enveloppes sporales par des agents physiques (choc thermique) ou chimiques (acides, lysozyme) ou mécaniques (abrasion, choc).

Remarque : l'activation thermique est mise à profit au cours de la tyndallisation qui consiste à chauffer 3 fois le produit à stériliser : 30 min à 60°C (destruction des formes végétatives et induction de la germination d'éventuelles spores), le deuxième chauffage à 60°C et pendant 30 minutes, tue les spores issues de la germination et induit la germination des spores résiduelles. Le troisième chauffage dans les mêmes conditions, détruit les dernières formes végétatives.

2.11.5.2. L'initiation débute en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites effecteurs (alanine, magnésium, adénosine) qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées. Des enzymes hydrolytiques dégradent les constituants de la spore ; il y a libération du dipicolinate de calcium. Le cortex ainsi détruit, la spore 'imbibe d'eau et gonfle.

2.11.5.3. L'émergence de la nouvelle cellule végétative, grâce à l'altération des enveloppes.

Chapitre3: La classification bactérienne

Introduction

Depuis la première description de bactéries vivantes par Anthonie Van Leevenhoek en 1665 jusqu'à la fin du XIX siècle, il n'y eut que peu d'intérêt pour l'identification des espèces bactériennes et leur classification. Leur étude n'a véritablement commencé qu'avec la découverte de leur rôle dans le processus de fermentation de leur mode de transmission en pathologie infectieuse grâce aux travaux de Louis Pasteur et de Robert Koch. C'est le naturaliste suédois Carl Von Linné (1707-1778) qui fonda la science du classement des organismes vivants appelée taxonomie (*du grec taxis, arrangement*), et le premier ouvrage "moderne" de classification bactérienne parut en 1923 avec *Bergey's Manual of determinative bacteriology*

La taxonomie permet de différencier les organismes vivants en définissant les limites aux groupes à l'intérieur desquels les organismes seront rassemblés sur la base de leur caractère communs ou distinctifs, caractères principalement liés à la morphologie, à la niche écologique ou encore la physiologie.

La taxonomie se subdivise en trois parties:

la classification c'est à dire l'arrangement des organismes dans des groupes taxonomiques ou "taxons" sur la base de leur similarité de leurs caractères, la nomenclature c'est à dire la dénomination de ces groupes selon des règles stricts, et l'identification c'est à dire la comparaison des caractères d'un organisme inconnu à ceux des différents groupes décrits permettant alors de l'assigner à l'un d'entre eux. Un taxon regroupe différents organismes dans le groupe qu'il constitue (figure 24), l'élément de base est l'espèce, on considère alors des taxons d'espèce (par exemple espèce *Escherichia coli*), de genre (genre *Escherichia*), de famille (famille Enterobacteriaceae), d'ordre (ordre des Enterobacterales), de classe (classe Gammaproteobacteria), de phylum (phylum proteobacteria) de domaine ou encore appelé super règne (bactéria) donc Elle permet de répartir les micro-organismes en groupes significatifs, utiles, avec des noms précis, de sorte que les microbiologistes peuvent les étudier et communiquer efficacement avec un langage universel.

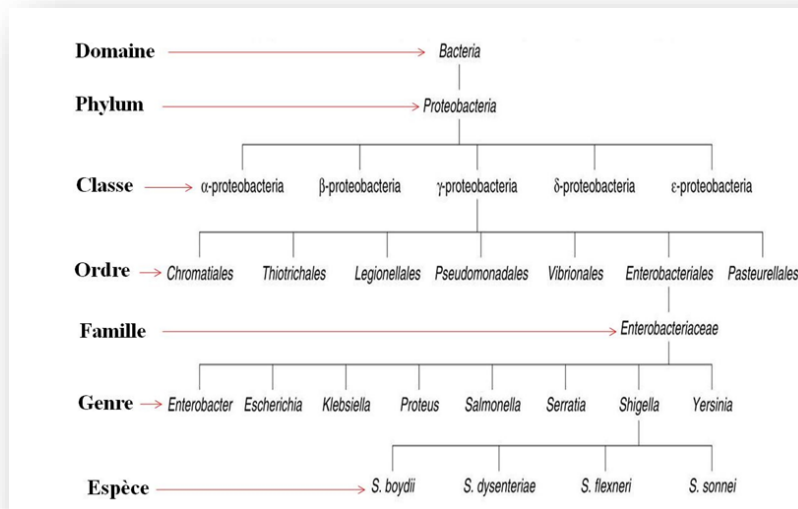


Figure 24: Structure hiérarchique en taxonomie

Types de classification

3.1. Classification phénétique

Aussi appelée classification artificielle, car elle utilise un faible nombre de caractères tels que la morphologie, la présence d'une spore, des caractères biochimique...etc. Elle consiste à regrouper les micro-organismes suivant la similitude de leurs caractères phénotypiques. C'est l'une des classifications anciennes utilisées pendant longtemps par les taxonomistes microbiens. Cette classification a réussi à mettre de l'ordre dans la diversité microbienne et a permis de relier certaines fonctions à des structures morphologiques (Ex : l'association des cils et flagelles avec la mobilité). Cette classification reste limitée et moins précise car elle ne reflète qu'une faible quantité d'informations. Néanmoins, plus le nombre d'attributs comparés est élevé, plus la classification phénétique est meilleure. Ainsi, les micro-organismes qui partagent le plus de caractères sont groupés dans un même taxon (ou groupe phénétique).

3.2. Classification phylogénique(ou phylétique) naturelle

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, la classification des organismes vivants a été révisée et modifiée. On utilise maintenant de plus en plus une classification dite phylogénétique qui regroupe les êtres vivants sur la base d'homologies de leur ADN (génotype) ; alors que la classification traditionnelle établit des groupes ou taxons en fonction d'un simple critère de ressemblance globale (phénotype basée sur l'évolution commune de la descendance. Elle est basée sur l'étude comparative de marqueurs moléculaires spécifiquement retenus en raison de leur grande stabilité évolutive (ADN, ARN

et protéines, et les lipides qui en dérivent), elle consiste à comparer les espèces sur la base des relations évolutives. Depuis l'apparition de la théorie de Darwin sur l'évolution des espèces en 1859, Carl Woese et George Fox furent les premiers à avoir proposé d'utiliser les séquences de l'ARN ribosomique de la petite sous-unité du ribosome (ARN 16S chez les procaryotes et l'ARN 18S chez les eucaryotes), pour étudier la relation évolutive entre les espèces en 1977. Depuis, ils proposèrent une réorganisation de la classification du monde vivant en trois domaines à savoir; *Eucarya*, *Bacteria* et *Archaea*.

❖ **L'ADN est analysé selon plusieurs méthodes**

-dénaturation de l'ADN:

l'augmentation progressive de la température provoque la rupture progressive des liaisons hydrogènes liant les 2 brins, cette rupture s'accompagne par l'augmentation de l'absorbance (OD) jusqu'à un maximum où elle se stabilise : c'est l'effet hyperchrome. La température de demi dénaturation (meltingpoint, T_m) ou température de fusion correspond à l'obtention de la moitié de l'hyperchrome. Plus il y a de G-C dans l'ADN plus T_m augmente. La T_m est spécifique à chaque ADN puisque le contenu en G-C est variable d'une espèce à l'autre. **le coefficient G-C** : donne le contenu relatif en base d'ADN. détermine sa température de fusion T_m (T_m : une température à laquelle les deux brins d'ADN se séparent). ($GC\% = \frac{[G+C]*100}{[G+C+T+A]}$) où A, G, T, et C sont exprimés en concentration molaire. Actuellement quand ce pourcentage ne dépasse pas 5%, on considère que les bactéries appartiennent à la même espèce (c'est le pourcentage d'hétérogénéité). la variation du CG % à l'intérieur d'un genre bactérien est inférieure à 10% ce qui représente un bon paramètre de classification.

-l'hybridation de l'ADN: (ou renaturation) est basée sur la propriété des brins d'ADN monocaténaire à s'associer en ADN bicaténaire, si leurs séquences en bases sont complémentaires, c'est-à-dire qu'ils sont homologues.

Exemple : un brin d'une bactérie A et un autre d'une bactérie B, on regarde si le monobrin 1 est complémentaire du B : si le pourcentage de complémentarité 100%, donc c'est la même espèce, si le pourcentage de complémentarité 50%, donc c'est le même genre.

-l'analyse de l'ARN: les ARN sont des molécules informationnelles transcrites de l'ADN. Sur le plan méthodologique, 2 procédés sont utilisés: l'hybridation ADN/ARN ou le séquençage comparatif des ARN surtout les ARN 16S et 23S. Sur la base de l'ARNr, il est maintenant clair qu'il existe 3 catégories d'organismes, c'est-à-dire 3 domaines. **Le domaine des eubactéries (procaryotes):** avec 23 embranchements procaryotes dont la paroi contient le peptidoglycane et l'acide muramique (majorité des bactéries et des cyanobactéries).

-Le domaine des archaebactéries: avec 4 embranchements "bactéries anciennes" dont la paroi ne possède pas de peptidoglycane et ses acides aminés spécifiques (pas d'acide muramique), leur réponse à la coloration de gram est diverse. La majorité vivent dans des milieux extrêmes (producteurs de méthane, thermophiles extrêmes, halophiles extrêmes acidophiles et un groupe n'ayant pas de paroi cellulaire); et le domaine des eucaryotes (protistes, plantes, animaux et champignons).

3.3. Classification de Bergey

le plus remarquable travail de classification des bactéries, édité dès 1923 au USA sous le nom: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Son objectif initial était le regroupement des informations phénotypiques disponibles pour l'identification des espèces bactériennes reconnues, afin de permettre l'identification de souches inconnues. C'est une classification de référence actuelle des bactéries, basée sur les données phylogénétiques.

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

3.4. Classification génotypique

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

3.5. Critères et les techniques d'études de classification bactérienne

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

3.5.1. Les critères classiques

Les critères classiques de la classification bactérienne s'intéressent aux caractères morphologiques (phénotypiques), physiologiques, biochimiques et écologiques (habitat). La similarité morphologique est un bon indicateur d'une parenté phylogénétique. En effet, les caractères structuraux dépendent de l'expression de nombreux gènes qui sont habituellement stables. Les comparaisons morphologiques des espèces bactériennes, notamment les plus petites d'entre elles sont limitées par la résolution du microscope optique. C'est plutôt les microscopes électroniques (à transmission et à balayage) qui ont beaucoup contribué à l'étude morphologique et anatomique des micro-organismes par un pouvoir de résolution plus poussé. Les caractéristiques physiologiques et métaboliques renseignent sur la nature des enzymes et des protéines de transport. Donc, elles permettent indirectement de faire une analyse des génomes du fait que ces protéines sont des produits d'expression génétique. La caractéristique biochimique la plus importante en taxonomie consiste à analyser le profil des acides gras par la technique de FAME (*fatty acids methyl-ester*) qui peut relever des différences significative d'une espèce à une autre. Enfin, les propriétés écologiques sont d'un grand intérêt pour la taxonomie bactérienne. En effet, les caractéristiques de l'habitat (comme le pH, la température, l'oxygène, la pression osmotique..) renseignent sur les préférences et les exigences des bactéries pouvant partager des liens de parenté.

3.5.2. Morphologie de la colonie la forme, la texture et la couleur des colonies bactériennes peuvent être caractéristiques ; Forme, structure cellulaire et réaction aux colorants : la coloration de Gram est l'un des tests les plus importants. Ces caractères apportent des informations concernant la taille, la forme et le regroupement des bactéries, ce qui est suffisant pour identifier certains genres tel que les Streptocoques (cocci gram positif en chaînette). Concernant les colorants comme le vert de malachite pour colorer les spores. Caractéristiques de la culture : la température, le pH, et les besoins en oxygène sont utiles à l'identification des bactéries.

Les tests biochimiques: tels que les sources de carbone, les produits finaux de leurs processus métaboliques (ex : fermentation du glucose et la production d'acétoïne (acétyl méthyl carbinol) par le test de Voges Proskauer), les enzymes que produisent les bactéries (décarboxylases, protéases et DNases), la présence d'autres molécules comme les toxines, les acides gras à chaînes longues ou les antibiotiques.

3.5.3. Les tests immunologiques des anticorps dirigés contre des composants cellulaires comme l'antigène O des polysaccharides.

3.5.4. Les critères moléculaires

Avec l'arrivée de la biologie moléculaire, des critères moléculaires se sont imposés afin

d'éclaircir certaines ambiguïtés retrouvées en utilisant uniquement les critères classiques.

Les critères moléculaires se basent notamment sur les acides nucléiques (leur composition en base, leur hybridation, leur séquençage, empreintes génomiques) ainsi que sur l'analyse des protéines. La composition en base des acides nucléiques et notamment le contenu en GC%.

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

-Le Séquençage des acides nucléiques et plus précisément le séquençage des gènes ADN codant pour l'ARN ribosomique de la petite sous-unité du ribosome (ARN 16S) constitue la base de l'arbre phylogénétique proposé par Carl Woese et George Fox. Donc, l'ARN 16S est considéré comme une carte d'identité moléculaire. Le gène codant pour l'ARN 16S est vital et n'admet pas de mutations importantes ce qui fait que ce gène change très peu au cours du temps (évolution). A titre d'exemple, les expériences d'hybridation ADN-ADN et l'analyse des séquences de l'ARNr 16S, menées en 1984, ont permis de montrer que les espèces *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques pour justifier la création du genre *Enterococcus*.

3.5.5. Les tests d'ADN

la comparaison des contenus et des séquences d'ADN entre les souches sont des méthodes qui permettent de séparer les organismes en différents groupes et de mesurer la relation évolutive entre eux. l'analyse du contenu en G-C ou coefficient de Chargaff ; et plus récemment la comparaison des séquences d'ARNr 16S ou des protéines comme le cytochrome c ou l'ATPase.

D'autres techniques appelées "prise d'empreintes génomique" (*fingerprinting*) contribuent également de façon efficace, précise et rapide à la taxonomie bactérienne. Parmi ces techniques, l'analyse de séquence multilocus (MLSA) et l'analyse de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP).

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

3.6. Les méthodes d'identification

3.6.1. L'observation microscopique: elle est réalisée avec ou sans coloration spécifique. Les différentes colorations permettent de déterminer les caractères morphologiques ou structuraux (forme, type de paroi.....etc)

3.6.2. Les tests métaboliques préliminaires : type respiratoire, recherche de la catalase, de l'oxydase..etc

3.6.3. L'analyse du profil biochimique : consiste à mettre en évidence des métabolismes spécifiques par l'identification de leurs produits ou leurs métabolites intermédiaires spécifiques. Les galeries biochimiques classiques sont délaissées au profit de galeries multi-tests miniaturisées (galeries API).

Les différentes espèces bactériennes clairement identifiées sont reconnues comme souches de référence et déposées sous forme de souches types dans des collections.

Ces méthodes d'identification seront plus détaillées dans le TP N°9.

3.7. Collection des souches

Les différentes espèces bactériennes clairement identifiées sont reconnues comme souches de référence et déposées sous forme de souches types dans des collections d'au moins 2 centres ou instituts officiellement reconnus (ex: l'American type collection center, ATCC). Par exemple, la souche de référence d'*E.coli* est *E.coli* ATCC 11.775. Les souches de références sont conservées sous formes lyophilisées et congelées.

Chapitre 4: Nutrition Bactérienne

Généralités

la physiologie bactérienne consiste à étudier la nutrition, le métabolisme et la croissance des bactéries en fonction des variations du milieu dans le quel elles vivent. Pour survivre et se reproduire les bactéries utilisent une quantité plus ou moins importante de substances minérales et organiques dites substances alimentaires. L'objectif de ce chapitre est d'étudier les modalités de multiplication des microorganismes et plus particulièrement de comprendre dans quelles conditions la cellule bactérienne se développe, croît et se reproduit puis dépérit et meurt.

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

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

4.1. Besoins élémentaires

4.1.1. Besoins en carbone

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

o Les bactéries **autotrophes** sont capables de réduire le carbone inorganique du CO₂. Les organismes autotrophes sont à l'origine de l'ensemble de la matière organique et ils se trouvent toujours à la base des chaînes alimentaires. Les plus connues des bactéries autotrophes sont les cyanobactéries.

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

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

Les principales molécules sources de carbone sont les glucides, les acides et alcools organiques. Pour les bactéries hétérotrophes, la présence de CO₂ dans le milieu de culture ne suffit pas à assurer la survie bactérienne, mais lorsque la source spécifique de carbone est

présente dans le milieu, une forte concentration de CO_2 peut favoriser la croissance de certaines espèces.

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

4.2.2. Besoins en azote

L'azote est surtout nécessaire à la synthèse des protéines et autres substances azotées. Il peut provenir de l'azote moléculaire, atmosphérique, de substances inorganiques azotées (nitrites, nitrates, ammoniac, sels d'ammonium) ou de molécule azotées organiques (acides aminés, protéines).(figure25).

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

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

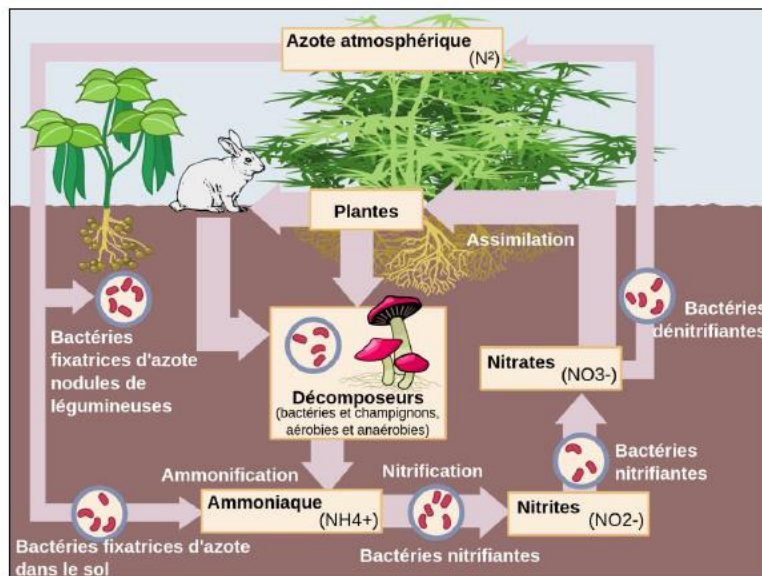


Figure 25: Le cycle biogéochimique simplifié de l'azote

❖ Besoins énergétiques

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

Selon le type d'énergie utilisée, on distingue deux catégories de microorganismes:

les microorganismes **phototrophes** qui puisent leur énergie dans le rayonnement lumineux (l'énergie lumineuse) au cours de la photosynthèse, les microorganismes **chimiotrophes** qui utilisent l'énergie provenant de l'oxydation des nutriments (l'énergie chimique). Au sein de chacune de ces catégories, on distingue deux groupes en fonction de la nature des substances sur lesquelles va s'exercer l'énergie dont on vient de parler. Ces substances servent de source d'hydrogène ou d'électrons. Elles peuvent être:

- **Minérales**, on parle alors de microorganismes lithotrophes.
- **Organiques**, on parle alors de microorganismes organotrophes.

On distingue ainsi des bactéries photolithotrophes (qui utilisent un substrat minéral comme le H₂S ou l'eau), photo-organotrophes (qui utilisent des substances organiques comme le succinate), chimiolithotrophes (bactéries nitrifiantes, utilisant du NH₃, bactéries utilisant le soufre sous forme de H₂S, S, S₂O₃²⁻, bactéries oxydant le fer ferreux Fe²⁺, bactéries oxydant l'hydrogène H₂) ou chimio-organotrophes.

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

Les bactéries utilisant **les nitrites (NO₂-) et nitrates (NO₃-)** le font essentiellement par le biais du nitrate réductase, qui permet d'utiliser ces molécules soit comme source d'azote, soit comme accepteur final d'électrons dans le cadre d'une respiration anaérobie.

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

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

1. Besoins en eau

Un paramètre appelé (« **Activity of water** », **Aw**, ou **activité de l'eau**) quantifie la disponibilité de l'eau libre, non associée aux nutriments, elle varie de 0 à 1. Le rôle de l'eau dans le fonctionnement de la cellule bactérienne est fondamental. Cette importance se reflète directement dans la composition cellulaire, dont l'eau représente plus de 80%.

L'eau représente 70% du poids cellulaire total chez *Escherichia coli*. Elle solubilise les nutriments, elle joue un rôle important dans leur transport et ceci dans les deux sens. C'est le solvant de la vie, ou se déroulent toutes les réactions métaboliques (catabolisme plus anabolisme).

La majorité des bactéries se développent à des A_w supérieures à 0.95, certains germes ne se développent que pour une valeur de l' A_w supérieure à 0,97. A l'opposé, les bactéries halophiles qui nécessitent la présence de sel (NaCl, 1 à 15%) l' A_w est de l'ordre de 0.75.

La diminution de ce paramètre peut entraîner des modifications majeures dans le métabolisme bactérien, comme une perte de toxicité (*Staphylococcus aureus*) ou même la mort cellulaire. Peu de germes résistent à des taux bas d'humidité ; c'est notamment le cas de *Listeria monocytogenes*, qui peut se développer à une A_w de 0.83. Seules les spores peuvent survivre à la dessiccation en effet.

Les endospores peuvent survivre dans un environnement dépourvu d'eau libre. Le degré d'humidité des aliments a une influence sur leur conservation et leur séchage. C'est un procédé de conservation basé en partie sur la diminution de l' A_w .

2.Le soufre est l'un des minéraux les plus importants pour le développement bactérien, aussi bien pour le métabolisme de synthèse qu'en tant qu'accepteur final d'électrons dans le métabolisme énergétique. Les sources utilisées sont :

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

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

4.Eléments minéraux

jouent un rôle dans l'équilibre physicochimique (Na,K,Mg,Cl) et rentrent dans la composition d'enzymes et de coenzymes (Fe) Cytochrome ou Mg (Chlorophylle).

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

❖ Besoins spécifiques

4.2. facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des substances ou des éléments strictement nécessaires au métabolisme bactérien mais que la bactérie ne peut pas synthétiser-elle-même. Les besoins en facteurs de croissance sont spécifiques pour chaque famille bactérienne, et parfois même

pour une souche particulière. Les quantités requises sont généralement très faible, les facteurs de croissance servant principalement de catalyseurs ou de cofacteurs enzymatiques. Les bactéries capables de se développer en l'absence de facteurs de croissance sont appelées **prototrophes**. Elles ont besoin de milieux de culture simples, contenant une source d'énergie, une source de carbone, d'azote et les principaux minéraux. Celles qui nécessitent au contraire un facteur de croissance dans leurs milieux de culture sont dites **auxotrophes**. La nature de ces facteurs de croissance est très diverse : bases azotées, acides gras, vitamines, acides aminés, hème ou protoporphyrine (facteurs X), etc. Parfois, ces facteurs de croissance sont produits par d'autres bactéries présentes sur le même substrat. Dans ce cas, la relation qui s'établit entre les deux espèces est appelée **syntrophie** et se traduit par le développement de colonies « satellites » de bactéries auxotrophes autour d'une colonie qui produit le facteur de croissance. (figure 26).

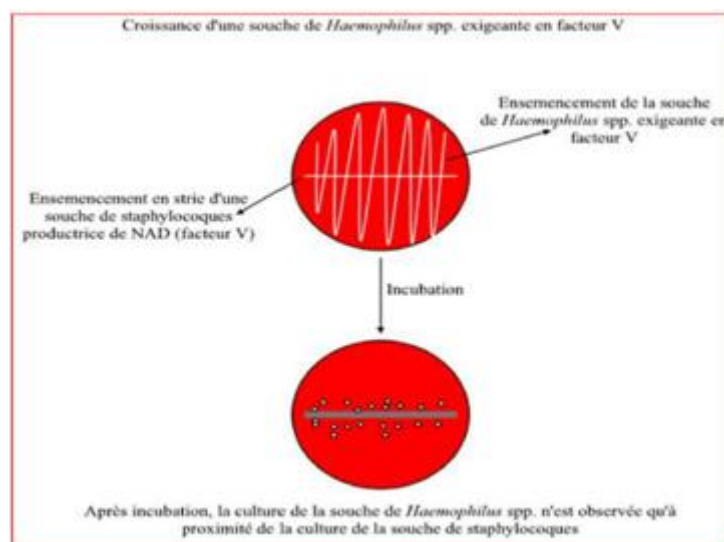


Figure 26: un exemple de syntrophie

Les facteurs de croissance les plus exigés par la plupart des bactéries auxotrophes sont les vitamines (vitamine B12, Biotine, Thiamine).

NB : A l'opposé des facteurs de croissance, certaines molécules ou certains éléments peuvent inhiber la croissance bactérienne : ce sont des antimétabolites, comme l'arsenic, le chrome, le mercure, le plomb, l'or, le radium....etc

Les molécules de cette classe sont souvent des analogues des facteurs de croissance, capables d'entrer en compétition avec ceux-ci, comme par exemple l'acide para-aminobenzoïque (PAB) ou la para-aminobenzène sulfanylamide (PAS).

4.3.Types trophiques

Classe du besoin	Nature du besoin	Type trophique
Source d'énergie	Rayonnement lumineux	Phototrophe
	Oxydation des composés organiques ou inorganiques	Chimiotrophe
Donneur d'électron	Minéral	Lithotrophe
	Organique	Organotrophe
Source de carbone	Composé Minéral	Autotrophe
	Composé organique	Hétérotrophe
Facteurs de croissance	Non nécessaire	Phototrophe
	Nécessaire	Auxotrophes

4.3.1.L'absorption des nutriments

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

4.4. Paramètres physicochimiques

la croissance bactérienne est largement influencée par des paramètres physicochimiques de l'environnement tels que la température, le pH, la concentration en nutriments... Ces paramètres peuvent inhiber ou favoriser la nutrition des bactéries. Chaque bactérie possède des valeurs optimales pour chaque facteur et par conséquent, selon les valeurs optimales, on définit différentes catégories de bactéries.

4.4.1.Température : joue un rôle essentiel dans la croissance bactérienne (stimule les réactions enzymatiques). (figure 27) Selon la température optimale de développement, les bactéries sont réparties en 5 groupes physiologiques :

- ❖ **Les psychrotrophes :** peuvent se cultiver à 0°C. Température optimale de multiplication entre 20 à 25 °C.
- ❖ **Les psychrophiles :** température maximale 20°C. Température optimale de croissance inférieure à 15 °C.
- ❖ **Les mésophiles :** croissance entre 25 et 40 °C. Optimum à 37°C. La majorité des bactéries pathogènes.
- ❖ **Les thermophiles :** température optimale entre 50 et 60 °C.
- ❖ **Les hyperthermophiles** ont une température optimale de croissance entre 70 °C et 110°C.

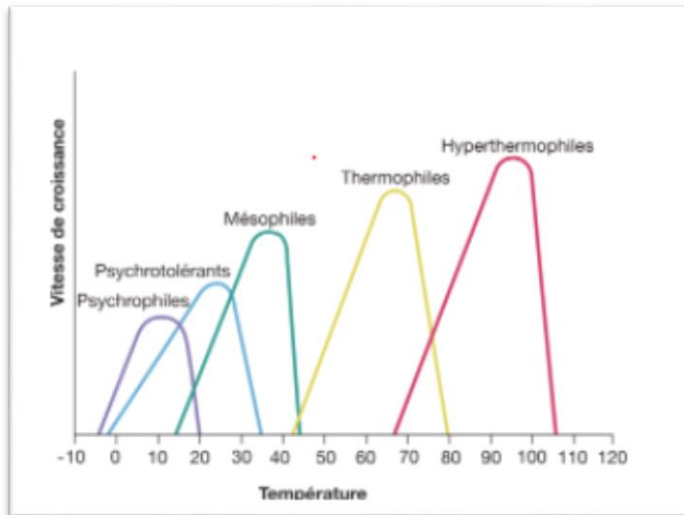


Figure 27: les échelles de la température pour la croissance bactérienne

4.4.2. Le pH

La nutrition bactérienne est directement influencée par le pH du milieu dans lequel elle se trouve (figure 28). Selon le pH optimal de croissance, on distingue :

- ❖ **les bactéries acidophiles** vivant dans des pH très acides (ex : certaines cyanobactéries, peuvent coloniser des milieux hyperacides caractérisés par des pH proches de 0 comme les lacs acides des volcans), (1–4).
- ❖ **les bactéries neutrophiles** retrouvées dans des pH plus ou moins neutres (ex: Les bactéries de la flore intestinale de l'homme sont généralement des neutrophiles), (5,5–8,5).
- ❖ **les bactéries alcalophiles (basophiles)** pouvant croître dans des pH très alcalins (ex : *Bacillus alcalophilus*) (8,5 à 11,5)

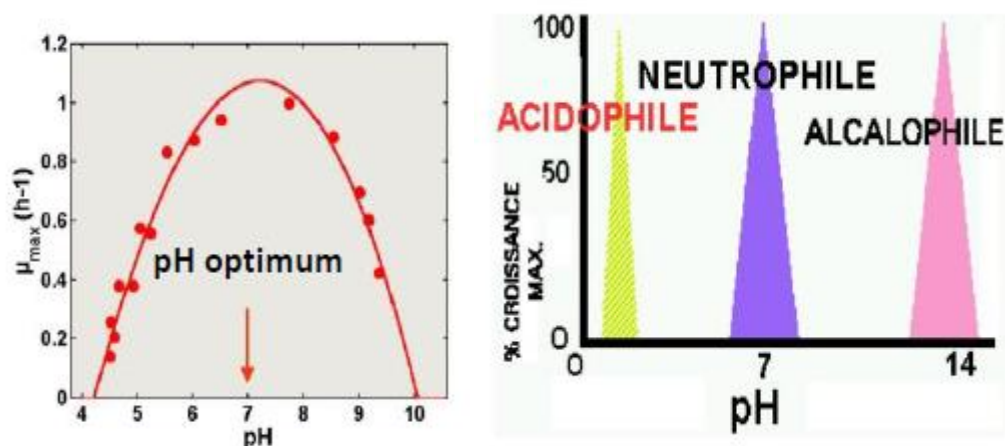


Figure 28: pourcentage de croissance des bactéries selon le PH

4.4.3. l'oxygène: l'exigence des bactéries vis-à-vis de l'oxygène moléculaire (O_2) permet de distinguer plusieurs groupes (figure 29).

- ❖ les **bactéries aérobies strictes** qui nécessitent de l'O₂ pour leur développement
- ❖ les **bactéries anaérobies strictes** qui ne peuvent se cultiver qu'en absence d'O₂
- ❖ les **bactéries aéro-anaérobies ou anaérobies facultatives** capables de croître avec ou sans l'oxygène
- ❖ les **bactéries microaérophiles** qui ne nécessitent qu'une faible quantité d'O₂ (environ 10%).
- ❖ les **bactéries anaérobies tolérantes** bien qu'elles supportent l'O₂, elles préfèrent l'anaérobiose

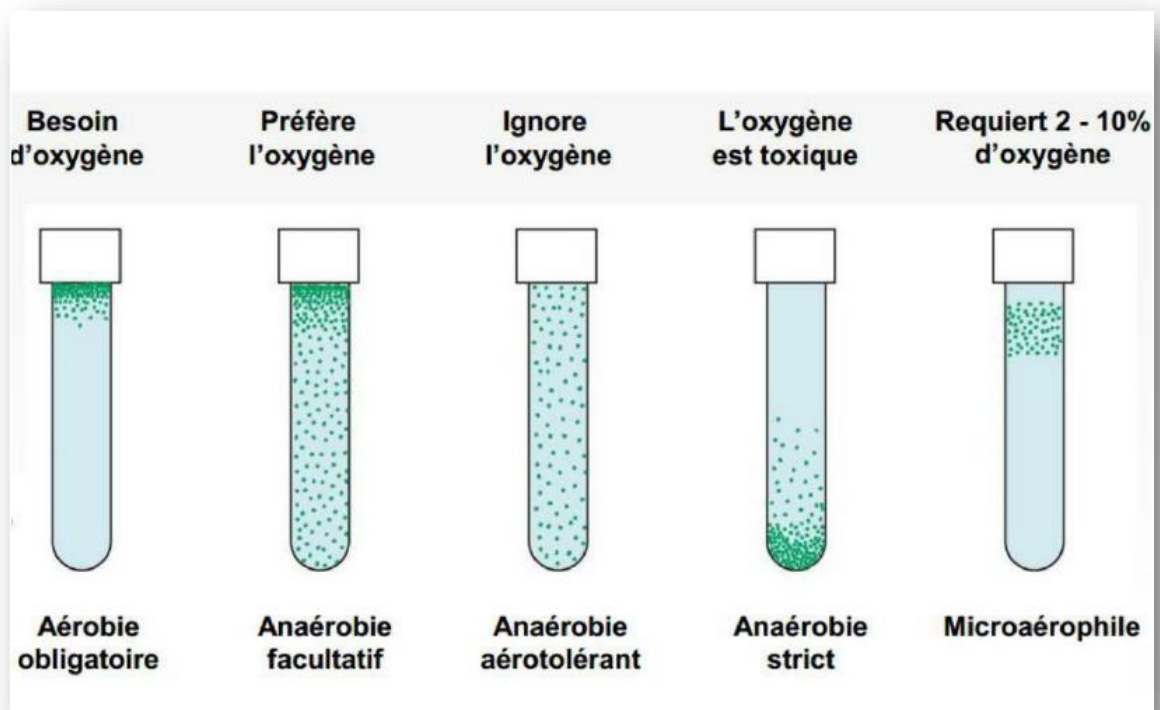


Figure 29: L'oxygène et la croissance bactérienne

4.4.4. Pression

Les bactéries **barophiles** (du grec *baros*, poids, pesanteur), ont une croissance optimale dans une atmosphère dont la pression est supérieure à la pression atmosphérique. Ce sont les bactéries des eaux profondes des mers et des océans.

4.4.4.1. La pression osmotique

la pression osmotique d'un milieu traduit la concentration totale des ions et molécules en solution dans ce milieu.

L'activité de l'eau (A_w : "Activity of water") est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un milieu. Ainsi, elle est affectée par la concentration plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau. Les bactéries peuvent se développer dans des milieux

ayant une A_w comprise entre 1 et 0,7. L' A_w de l'eau pure est de 1; celle du sang humain est de 0,99; l'eau de mer = 0,98; celle des sols est située entre 0,9 et 1,0.

La plupart des bactéries sont insensibles à la pression osmotique (protégées par la paroi rigide).

Seules les bactéries marines adaptées à une concentration de 35 g/l de NaCl sont sensibles aux variations de ce paramètre.

• Selon cette sensibilité on distingue :

- les non-halophiles : ($\text{NaCl} < 0,2\text{M}$) (entérobactéries)

- les halophiles : $0,2 < \text{NaCl} < 5,2\text{M}$ (*Ps. Marina*, *Halobacterium salinarium*)

- Les halotolérants : NaCl élevée (*Staphylococcus*)

❖ **Les bactéries halophiles** : nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. NaCl supérieure à 0,2 M pour les moins halophiles (Ex : *Cobetia marina*), et supérieure à 5,2 M pour les plus halophiles (Ex : *Halobacterium salinarum*).

❖ **Les bactéries halotolérantes** : acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Ex : *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Lactobacillus*). Ils tolèrent 7.5 à 15% de NaCl.

Par rapport à la concentration en sucres dans le milieu, on trouve :

❖ **Les bactéries osmophiles** nécessitent des sucres pour leur croissance. Les **osmotolérantes** acceptent des concentrations modérées mais non obligatoires pour leur croissance.

❖ **Les bactéries xérophiles** peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

Chapitre 5: Croissance bactérienne

Introduction

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

Chez les organismes pluricellulaires, la croissance se manifeste par l'augmentation de taille ou de masse. Chez les microorganismes unicellulaires, elle se manifeste par l'augmentation du nombre (multiplication suite à des divisions binaires). (figure 30), Lorsqu'une cellule bactérienne est placée dans un milieu de culture convenable, elle va assurer ses biosynthèses, augmente de taille puis se divise, par fission binaire, en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire.

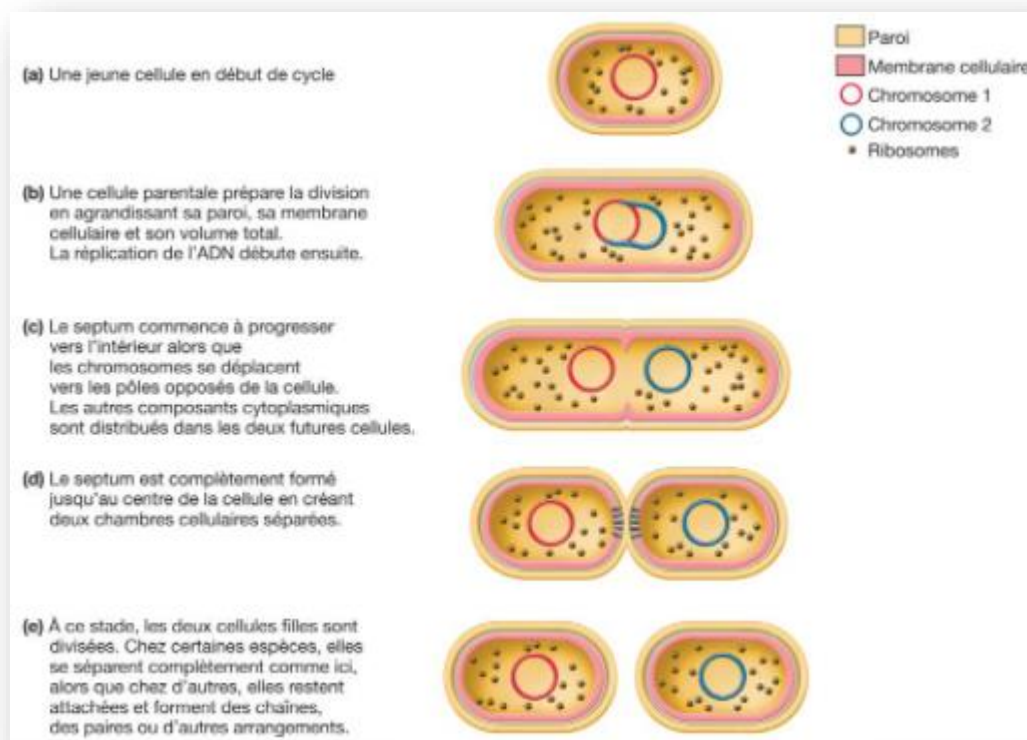


Figure 30: la scissiparité

5.1. Mesure de la croissance

Plusieurs techniques sont utilisées pour analyser, suivre et mesurer la croissance. Chacune a des avantages et des inconvénients. On distingue les méthodes directes et les méthodes indirectes. Certaines distinguent les cellules vivantes des cellules mortes et d'autres, en sont incapables.

5.1.1. Mesures directes du nombre de cellules

5.1.1.1. Méthodes de numération (dénombrement)

❖ Numération totale directe

Cette technique permet le dénombrement de la totalité des bactéries. Elle se fait au microscope en utilisant des compartiments volumétriques (ex.: cellule de Thoma). Le dénombrement au microscope est une technique de comptage direct des bactéries. Elle est plus adaptée pour les microorganismes de grandes tailles (plusieurs μm). Le comptage se fait sous observation microscopique en utilisant des lames spécifiques ayant des quadrillages et des puits microscopiques permettant de dénombrer le nombre de cellules se trouvant dans une surface et un volume donné, puis déduire la concentration cellulaire. Les cellules utilisées pour ce type de dénombrement sont les cellules de Malassez, de Thoma, de Petroff-Hausser de Breed ...etc (Figure 31). Enfin, cette technique est directe et rapide mais peu sensible. En effet, elle ne distingue pas entre les cellules mortes et celles vivantes.

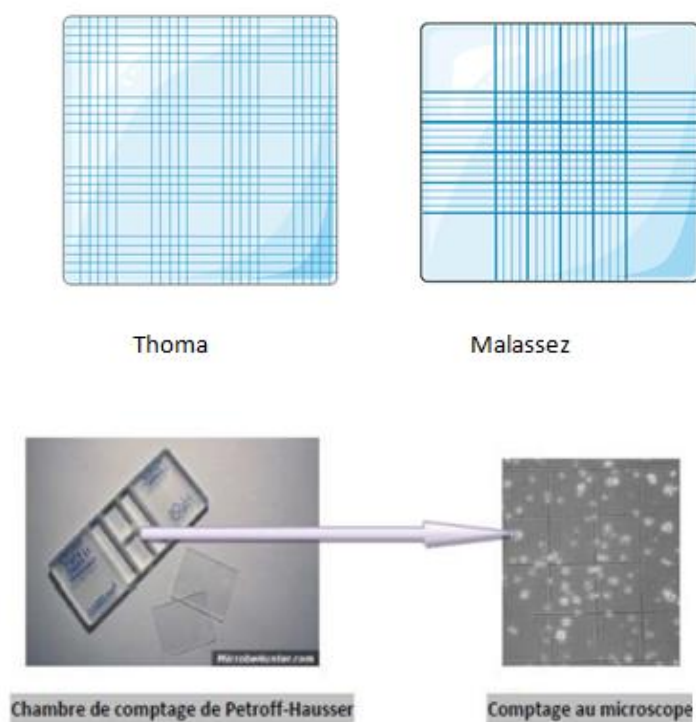


Figure 31: différents types de cellules utilisées pour dénombrement bactérien

Récemment, la numération a été automatisée; elle se fait par des compteurs automatiques de particules. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle ne distingue pas entre les bactéries viables et mortes. Elle n'est donc fiable que dans les conditions où la plupart des bactéries sont vivantes. Le compteur de particule est un appareil qui réalise automatiquement le dénombrement des cellules en suspension dans une solution électrolytique. Le principe repose sur un déplacement de volume de solution conductrice dans un microorifice (tube cylindrique) se trouvant entre deux électrodes reliées à un générateur électrique. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle compte toutes les particules (cellules) ayant relativement la même taille y compris celle mortes.

❖ *Dénombrement des bactéries après culture*

Le dénombrement après culture est une méthode classique appliquée en routine dans les laboratoires de microbiologie. Elle présente l'avantage de dénombrer uniquement les cellules vivantes qui peuvent former des colonies visibles à l'oeil nu. Cette méthode permet l'appréciation des bactéries viables et cultivables. Après avoir effectué une série de dilutions (figure 32), une aliquote (0,1 ml en général) des dilutions convenables est étalée à la surface d'un milieu gélosé approprié. Après incubation, chaque cellule se multiplie pour donner une colonie visible à l'oeil nu. En tenant compte du facteur de dilution, nous pouvons déduire la concentration bactérienne initiale. Parfois, il arrive que plus d'une bactérie donne une seule colonie; il est donc plus prudent de donner la concentration bactérienne en unités formant colonies (UFC) par millilitre. Le nombre total de bactéries est calculé par le nombre d'UFC multiplié par le volumeensemencé et l'ensemble est divisé par la dilution dans laquelle le nombre d'UFC est calculé. Cependant, la rigueur oblige d'ensemencer deux boîtes par dilution et le nombre est calculé selon la formule de la moyenne pondérée.

Notez qu'il existe une autre technique statistique semi-quantitative dite du "nombre le plus probable" (Most Probable Number : MPN).

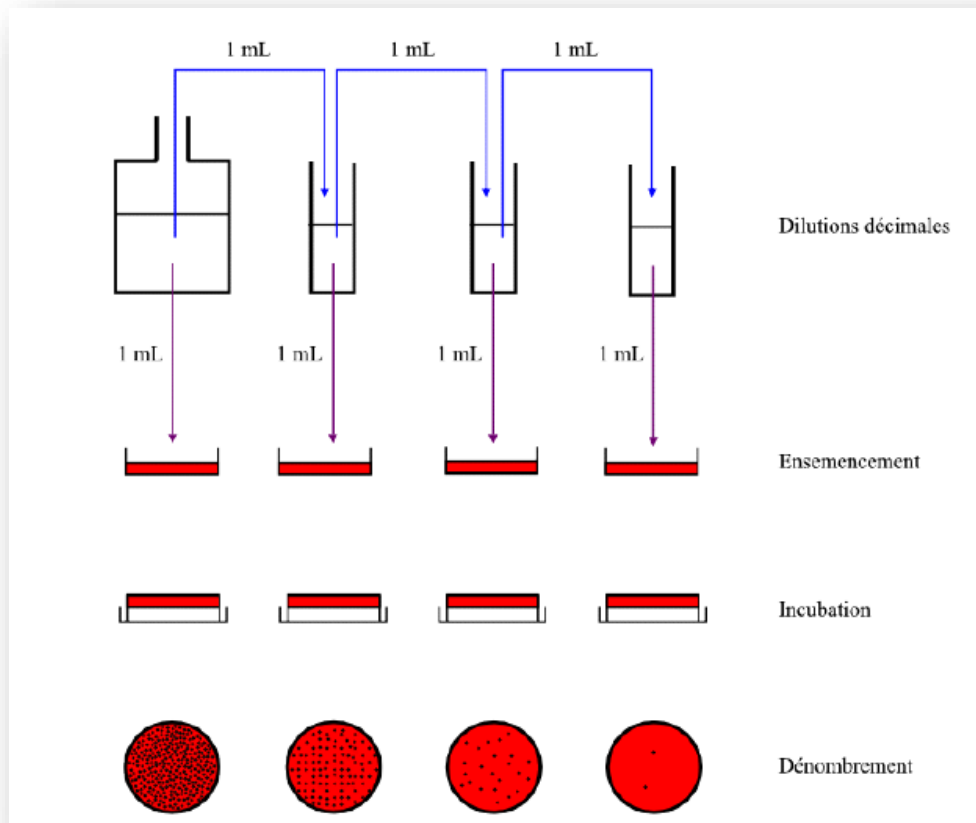


Figure 32: Dénombrement des bactéries par la technique des dilutions

l'échantillon est dilué de 10 en 10 et 1 mL de chacune des dilutions est étalé à la surface d'un milieu gélosé ou incorporé au milieu avant sa solidification. Après incubation, on procède au dénombrement en choisissant: la boîte qui contient entre 20 et 300 colonies.

❖ **Après dilution**

le calcul d'UFC après dénombrement sur milieu solide sans répétition : **UFC = N étoile/V**

Unité: (UFC/ ml) ou (germes/ml) ou (bactérie/ml).

N: Nombre de colonies

V: volume de dilution

F: facteur de dilution

❖ **pour le dénombrement du milieu solide avec répétitions N**

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0,1n_2)} \times \frac{1}{d}$$

N=nombre de colonies

ΣC :Somme totale de colonies comptées sur les boites retenues

V=Volume de dilution

1/d=F=Plus fort facteur de dilution comptable

N1:Nombre de boites à la plus faible dilution comptable

N2: Nombre de boites à la plus faible dilution comptable

❖ **Nombre le plus probable (N.P.P)**

dénombrement en milieu liquide La méthode du NPP (Nombre le Plus Probable) utilise une méthode statistique pour connaître le nombre (le plus probable) de bactéries présentes dans 1 mL de dilution. Cette technique utilise plusieurs tubes par dilution (2, 3, 4 ou 5) et on compare les résultats à une table statistique = la table de Mac Grady qui donne le NPP sur la dilution considérée.

5.1.1.2.Mesure par filtration sur membrane

Elle repose sur le passage de liquide à travers une membrane filtrante qui empêche le passage des cellules dont la dimension est supérieure à celle du filtre. Cette technique a pour but de concentrer les micro-organismes présents dans un grand volume de liquide. Cette technique est souvent utilisée pour les analyses bactériologiques des eaux. (figure33).



Figure 33:le procédé de filtration sur membrane

5.1.1.3.La technique d'épifluorescence permet en théorie de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Elle utilise l'acridine orange ou d'autres **fluorochromes** qui se fixent sur l'ADN. Examinée en lumière ultraviolette, la fixation de l'acridine orange sur un ADN bicaténaire donne une fluorescence verte alors que sa fixation sur un ADN monocaténaire donne une fluorescence rouge. Au microscope à lumière ultraviolette, les bactéries au repos apparaissent vertes alors que les bactéries mortes, La couleur verte reflète les cellules

vivantes alors que la couleur rouge reflète les cellules mortes (ADN dénaturé). Cependant, la cellule vivante en pleine réplication subit une dénaturation de son ADN ce qui reflète une couleur rouge et rentre en confusion avec les cellules mortes. Cette méthode est plus appropriée aux cellules bien séparées et donc inapplicable aux microorganismes formant des chaînettes ou des mycéliums.

5.1.2. Mesures indirectes par la biomasse sèche

5.1.2.1. Mesure de la biomasse Chez les bactéries, l'augmentation de la masse et l'apparition d'un trouble sur milieu liquide se traduisent par l'augmentation du nombre d'individu. Détermination du poids sec (PS) Les cellules sont récupérées par centrifugation ou par filtration (0,45 ou 0,22 µm de diamètre). Elles sont ensuite séchées de 80 à 100°C. On laisse refroidir à température ambiante et on pèse la biomasse cellulaire jusqu'à ce que le poids devienne constant. Le PS est exprimé en gramme par litre.

5.1.2.2. Mesures de la turbidimétrie

On utilise un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm. Cette méthode est simple, rapide et efficace. Elle est la plus utilisée. Principe: On soumet une suspension cellulaire à un faisceau de lumière. Les cellules absorbent de la lumière et la lumière réfléchi est mesurée. On mesure la turbidité qui est exprimée en densité optique (DO) ou absorbance. Plus il y a de cellule, plus le milieu est trouble et plus la DO est élevée. Inconvénients: pour des valeurs de DO \rightarrow 0,8, il faut faire des dilutions de la suspension cellulaire. On doit toujours travailler dans la gamme où la DO de la suspension est proportionnelle à la masse des particules en suspension. pour des cellules qui forment des agrégats, cette méthode n'est pas appliquée.

5.1.2.3. Mesure indirecte par l'activité métabolique

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

5.2. Paramètres de croissance

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

5.2.2. Taux de croissance

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

5.3.3. Paramètres physicochimiques

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

5.3. Courbe de croissance dans un système fermé- culture discontinue ou culture en batch

Dans une population bactérienne, toutes les cellules ne se divisent pas de manière synchrone et la croissance s'effectue de façon continue. Dans un milieu non renouvelé, la croissance des bactéries est limitée par l'épuisement du milieu en nutriments. **La cinétique de la croissance** peut être établie expérimentalement en mesurant les variations de la masse bactérienne (m) en fonction du temps (t) (voir figure 34). La vitesse de croissance dm/dt ou accroissement de masse par unité de temps est proportionnelle à la masse bactérienne présente au temps t . Le coefficient de proportionnalité, désigné par μ , est nommé taux de croissance.

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

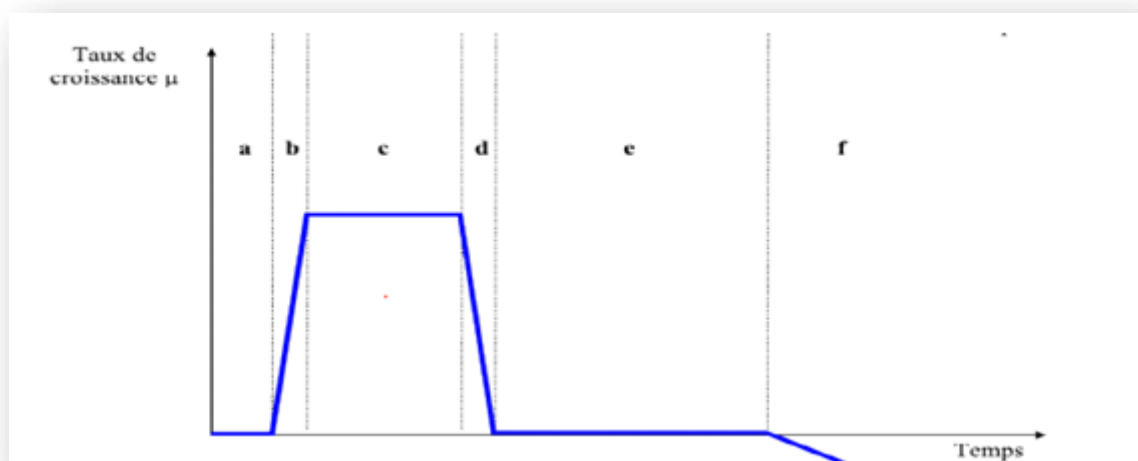


Figure 34: Courbe de croissance dans un système fermé (culture discontinue).

❖ **Culture continue**

La culture continue des micro-organismes est faisable dans un système ouvert. Dans ce système, il ya approvisionnement constant en nutriments. De plus, les déchets sont retirés à un rythme constant. La culture dans ce système permet le maintient de la croissance des cellules dans la phase exponentielle. elle est utilisée pour obtenir des corps bactériens de même âge avec les mêmes propriétés physico-chimiques et physiologiques. Elle est très importante notamment dans la préparation en grande quantité des vaccins bactériens, des métabolites bactériens (vitamines, antibiotiques...etc.) ou des toxines bactériennes (préparation d'anatoxines).

Ces conditions sont réalisées en laboratoire ou en industries dans des systèmes spécifiques . Parmi les principaux systèmes utilisés; les chémostats et lesturbidostats.

• **Un chémostat**

Est construit de façon telle qu'un milieu stérile est introduit dans la chambre de culture à la même vitesse que le milieu contenant les microorganismes en est éliminé .le milieu de culture d'un chémostat contient une quantité limitée d'un élément nutritif essentiel (ex: .une vitamine).ce nutriment étant limité.la vitesse de croissance est déterminé par la vitesse à la quelle le milieu frais est ajouté dans la chambre de la densité cellulaire finale.



Figure 35: Un chémostat

• **Le turbidostat**

le second type de système de culture continue , le turbidostat est équipé d'une cellule photoélectrique qui mesure la turbidité de la culture (définie par la quantité de

lumière diffractée) dans la chambre de culture. la vitesse d'écoulement du milieu dans la cuve est réglée automatiquement pour maintenir une turbidité prédéterminée.

❖ **Croissance diauxique**

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

5.4.culture bactérienne

5.4.1.La culture bactérienne et les milieux de culture

La microbiologie, et notamment la bactériologie, a connu son plein développement suite à la découverte des méthodes et outils permettant la culture bactérienne. Le microscope à lui seul, est insuffisant pour identifier la bactérie. La culture bactérienne et sa caractérisation est rendue possible par l'utilisation des milieux de culture. Les milieux de cultures sont des préparations utilisées pour faire croître, reproduire, transporter et conserver des micro-organismes. Ils contiennent des éléments nutritifs nécessaires à la nutrition et la croissance bactérienne. Ils peuvent être liquides, solides ou semi solides. Généralement, les milieux liquides sont solidifiés avec de l'agar-agar (1.5%). On distingue différents types de milieux de culture à savoir;

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

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

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

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

(Ex:1 Gélose au sang: Bactéries hémolytiques versus non-hémolytiques ,Gélose Mac Conkey: Bactéries qui fermentent ou pas le lactose).

5.4.2.Notions de Colonie bactérienne

Une colonie est constituée d'individus tous semblables nés d'une seule cellule, c'est une culture pure. **Isolément** : Isoler une bactérie d'un mélange c'est l'obtenir en culture pure. Ça consiste à provoquer la formation de colonies isolées. La technique d'isolement repose sur le principe d'épuisement de la suspension bactérienne. Il existe plusieurs méthodes d'isolement telles que la méthode des quadrants, méthodes des stries...etc.

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

5.4.2. Les caractères cultureux

L'aspect macroscopique des colonies est le caractère primaire utilisé pour orienter l'identification bactérienne. Les critères comme la taille des colonies, leur forme (punctiforme, ronde régulière, dentelée irrégulière) et leur aspect sont recherchés. L'aspect *rough* "R" est attribué aux colonies rugueuses à surface irrégulière, l'aspect *Smooth* "S" pour les colonies lisses, brillantes et régulières et l'aspect muqueux "M" pour les colonies grasses et coulantes. La forme et l'aspect des colonies dépend des facteurs intrinsèques à la bactérie comme la mobilité, morphologie (taille, forme, contour), production d'une capsule, pigmentation, présence de fibrine...etc., et des facteurs extrinsèques tels que les gradients de solutés créés autour de la colonie et la présence de colorants dans le milieu de culture.

5.5. Agents antimicrobiens

-Introduction

Au cours du 20e siècle, les scientifiques ont développé une série de méthodes physiques et chimiques pour lutter et contrôler la croissance des micro-organismes. Tous ces efforts étaient dans un cadre de pratique médicale pour diminuer le pourcentage de décès post chirurgicaux ou après des accouchements. L'altération des aliments et le développement d'approches efficaces pour leur conservation constituaient également une motivation d'ordre sanitaire et économique.

-Définition: toutes substances qui inhibent ou tuent les microorganismes. On emploie un suffixe particulier pour indiquer l'action de l'agent antimicrobien. Les substances destructrices d'organismes (traitement de destruction) ont souvent le suffixe -cide (du latin *coedere*, tuer) : cide : Agents qui tuent Germicides, bactéricides, fongicides, algicides et virucides, sporicides: qui tuent les spores bactériennes (endospores). D'autres substances ne tuent pas mais elles empêchent le développement des microorganismes (traitement de stabilisation). Leurs noms se terminent par le suffixe -statique (du grec *statikos*, **bactériostatique**, **fongistatique** provoquent une station debout, s'arrêtant.

-La stérilisation (du latin *sterilis*, stérile, infécond) est le procédé par lequel on détruit ou on élimine, d'une façon durable, toutes les formes vivantes, et d'inactiver les entités acellulaires

(les virus et les prions) contenus dans une préparation ou sur un matériel. Utilisée sur les objets inanimés, les agents utilisés pour assurer la stérilisation sont physiques ou chimiques.

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

Les désinfectants : sont des agents de nature chimique, utilisés uniquement sur des objets inanimés. On peut de ce fait, les utiliser en fortes doses et pendant des temps de contact prolongés. Ils peuvent être sous forme de: vapeurs (formol, gaz sulfureux, oxyded'éthylène) liquides (phénols, sulfate de cuivre, de fer, eau de Javel, permanganate de potassium) solide (chaux vive).

-L'antiseptie (du grec *anti*, contre et *sepsis*, putréfaction) : Opération au résultat momentané visant à détruire ou inhiber les micro organismes et/ou d'inhiber l'activité des virus présents sur des tissus vivants, selon leur seuil de tolérance est la prévention de l'infection sur le tissu dans le but de détruire ou d'inhiber le développement de l'agent pathogène.

-Les antiseptiques : sont des produits chimiques, leur action est limitée aux espèces sur lesquelles le produit est actif. Ils agissent au niveau des tissus vivants dans la limite de leur tolérance : teinture d'iode, mercryl laurylé, permanganate de potassium, eau oxygénée etc. Parce qu'ils ne doivent pas détruire le tissu hôte, les antiseptiques sont généralement moins toxiques que les désinfectants. Leur action est quasi instantanée mais non durable dans le temps.

-Aseptique : qualificatif d'un milieu ne contenant pas de microorganismes.

-Septique : qualificatif d'un milieu contenant de microorganismes. Un produit est qualifié de non stérile ou de septique s'il contient des microorganismes.

-Asepsie : ensembles de mesures permettant d'empêcher tout apport extérieur de microorganismes. Ce terme est plutôt utilisé pour les manipulations.

5.5.1.Agents physiques : Température , Radiations, Pression, Centrifugation, Filtration,Ultrasons

5.5.2.Agents chimiques: oxydants, alcools, ,savons détergents, métaux lourds et leurs sels, colorants et conservateurs,Gaz,huiles essentiels.

5.5.3.Les agentschimio thérapeutiques;les Antibiotiques.

5.5.1.Agents physiques

5.5.1.1. Température

❖ **Effet des hautes températures**

Deux types de température sont utilisés pour la stérilisation des matériaux, produits et milieux de culture. Le premier type est la chaleur sèche qui nécessite des températures plus élevées et des temps d'exposition plus longs (ex four Pasteur : 180° pendant 30 mn utilisé pour la stérilisation de la verrerie). Le deuxième type est la chaleur humide qui tue facilement les différents types de micro-organismes (virus, bactéries, champignons). En

effet, elle dégrade les acides nucléiques, dénature les protéines et brise les membranes (ex : l'autoclave : 120° pendant 15 à 20 mn)

❖ **Applications de la chaleur humide en industrie**

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

□ **La tyndallisation**: Opération décrite par Tyndall: Elle consiste à chauffer un milieu à 60-70°C pendant 30 à 60 minutes trois fois consécutives en laissant un intervalle de 24 heures entre chaque chauffage. Ce procédé permet d'éliminer les micro-organismes thermostables mais aussi les spores bactériennes. Le premier traitement sert à l'activation des spores, et une fois celles-ci germent et reprennent leur vie végétative, elles deviennent thermosensibles et donc facilement éliminées par le deuxième et troisième traitement à la chaleur. D'autres méthodes de traitement à la chaleur sont très efficaces dans l'élimination des bactéries dans les produits complexes telle que la stérilisation à température ultra-élevée de 140 à 150°C pour 1 à 3 secondes.

❖ **Effet des basses températures**

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

5.5.1.2. Radiations

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

5.5.1.3. Pression

Les ultrapressions sont capables de détruire les microorganismes. Le traitement d'aliments à 4 000 bars permet de réduire sensiblement leur teneur en microorganismes. L'augmentation de la pression osmotique (diminution de la disponibilité de l'eau) est un procédé ancestral

pour la conservation des aliments (ex : utilisation des concentrations élevée en NaCl ou en sucres).

5.5.1.4. Centrifugation

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

5.5.1.5. Filtration

Pour les substances notamment celles qui sont thermosensibles, la filtration est une excellente méthode pour réduire la population microbienne. La filtration est également utilisée pour stériliser l'air. Le principe de la filtration repose sur l'utilisation des membranes filtrantes ayant des diamètres trop petits pour être traversées par des bactéries. La filtration garde la solution intacte contrairement à l'effet de la chaleur qui pourrait induire des modifications des caractéristiques. Dans les laboratoires de microbiologie, l'utilisation des hottes de sécurité biologique à flux laminaire permet d'obtenir une surface de travail stérile pour les manipulations en condition d'asepsie.

5.5.1.6. Ultrasons

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

5.5.2. Agents chimiques Les objets sont généralement stérilisés au moyen d'agents physiques, mais on emploie plus souvent des produits chimiques pour la désinfection et l'antisepsie. Il faut noter que des produits chimiques sont employés aussi pour empêcher la croissance de microorganismes dans la nourriture et certains le sont pour traiter des maladies infectieuses (enchimiothérapie). Les agents chimiques décrits jusqu'à présent sont appropriés pour une utilisation soit sur des objets inanimés et on parle d'un désinfectant, soit sur des tissus vivants externe (peau ou plaie) et on parle d'un antiseptique. Ces derniers peuvent être utilisés à haute dose s'ils n'ont aucune toxicité (bétadine, éosine...), et pour ceux à risque de toxicité élevée (dakine, alcool 70°, chlorhexidine) on les utilise à faible dose. Selon la concentration d'usage, une même molécule active peut être utilisée soit comme désinfectant, soit comme antiseptique. Exemple l'hypochlorite de sodium qui est un composé chimique de formule brute NaClO . L'hypochlorite de sodium peut être utilisé comme désinfectant classique des surfaces (eau de Javel) s'il est utilisé à une concentration comprise entre 9,6° et

35° chlorométriques. La même molécule, l'hypochlorite de sodium, est utilisée comme antiseptique sous la forme de Dakin si elle est diluée à 1,5° chlorométriques.

5.5.3. Les agents chimio thérapeutiques La chimiothérapie est l'utilisation des substances chimiques pour le traitement des maladies. D'abord limitée au traitement des maladies infectieuses, la chimiothérapie s'est étendue à toutes les branches de la médecine, en particulier à la cancérologie et à la psychiatrie (neuroleptiques, antidépresseurs etc.) La plupart des agents chimiothérapeutiques sont des antibiotiques. Ces derniers inhibent le développement ou tuent les microorganismes pathogènes en nuisant le moins possible à l'hôte. Leur usage interne est possible parce qu'ils ont une toxicité sélective c'est-à-dire qu'ils ciblent le microorganisme en ne nuisant pas ou peu l'hôte.

En 1929, Fleming observe sur une boîte de Pétriensemencée avec des Staphylocoques, des colonies d'une moisissure *Penicillium notatum*, contaminant provoquant une inhibition de la croissance des bactéries en culture. Il mit alors en évidence la **pénicilline** utilisée en thérapeutique.

5.5.3.1. Définition Agents antibactériens naturels d'origine biologique et/ou synthétiques et/ou semi-synthétiques empêchant la multiplication des bactéries (bactériostatiques) ou entraînant leur destruction (bactéricide) par une action au niveau d'une étape métabolique indispensables à la vie de la bactérie Les antibiotiques se définissent comme des molécules toxiques (statique ou cide) pour un groupe cible de microorganismes (bactéries, champignons, virus, protozoaire etc.). Ils sont actifs à des concentrations faibles de l'ordre du $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, et ont un mode d'action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules eucaryotes (utilisables par voie générale).

Le rôle des antibiotiques est de diminuer les quantités de bactéries présentes sur le site infectieux afin de permettre aux défenses immunitaires d'assurer leur rôle. Un antibiotique bactéricide tue les bactéries. Un antibiotique bactériostatique arrête la croissance des bactéries et ne peut à lui seul éradiquer une infection ; en empêchant la prolifération bactérienne, il facilite simplement la destruction des germes par les défenses de l'hôte. En cas d'infection grave et/ou à inoculum important, et chez tous les patients dont les défenses immunitaires sont déficientes, on préférera un antibiotique bactéricide. **La distinction entre les deux types d'activité peut se faire en comparant *in vitro* la CMI (concentration minimale inhibitrice) et la CMB (concentration minimale bactéricide).** Un antibiotique peut être considéré comme bactéricide lorsque sa CMB est sensiblement égale à sa CMI.

5.5.3.2. Classification des antibiotiques d'après leur origine

-**Les antibiotiques naturels** : un grand nombre d'antibiotiques sont des molécules naturelles, fabriquées par les microorganismes : amphotéricine B, chloramphénicol, kanamycine, nystatine, streptomycine et autres sont synthétisées par les espèces du genre *Streptomyces*.

Gentamycine synthétisé par *Micromonospora sp.* Bacitracine et polymixines par *Bacillus sp.* Griséofulvine et pénicilline par *Penicilium sp.* et céphalosporines par *Cephalosporium*.

-Les antibiotiques synthétiques : fabriqués par des méthodes chimiques indépendantes d'une activité microbienne. Ce procédé convenable pour les antibiotiques dont la formule chimique est connue ou modélée). Exemples : les sulfamides, la triméthoprimine, le chloramphénicol, la ciprofloxacine etc. Les antibiotiques semi-synthétiques: ce sont des antibiotiques naturels ayant subi une modification par l'addition de groupes chimiques supplémentaires dans le but d'améliorer l'activité et/ou modifier des paramètres pharmacocinétiques essentiels.

5.5.3.3. Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles (10 familles : β lactamines, aminosides, tétracyclines, phénicolés, polymixines, sulfamides, quinolone, etc.) et quelques produits orphelins comme acide fusidique, fosfomycine, rifamycine etc. Très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi-synthèse. La même parenté chimique ou structurale confère des propriétés communes : voie de pénétration dans la bactérie, interférence avec la cible, mécanisme d'action, bactéricidie, spectre d'action, mécanismes de résistance.

Chapitre 6: Notions de mycologie et de virologie

6.1.Mycologie (Levure et moisissure)

❖ Définition

La mycologie est l'étude des mycètes ou champignons. On distingue trois groupes majeurs de champignons : **Les moisissures (champignons filamenteux)**, **Les levures (unicellulaires)** et **Les champignons macroscopiques.**, donc ce sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) (figure 36). qui sont bien visibles à l'oeil nu à cause de leurs carpophores (organes reproducteurs) abondants dans les sols à certaines saisons, ils intéressent peu les biologistes médicaux car ce ne sont pas des agents habituels de mycoses, et d'autres microscopiques (micromycètes d'aspect filamenteux ou levuriforme) qui font l'objet de notre étude, peuvent être à l'origine d'infections humaines parfois redoutables.



Figure 36: Micromycètes et Macromycètes

Cosmopolites, ils sont retrouvés partout dans la nature. Riches en enzymes, ils peuvent recycler les parties les plus dures des végétaux. D'autres sont utiles à certains insectes pour dégrader la cellulose et la lignine qui leur servira de nourriture, aussi ils servent de nourriture aux insectes mycétophages et à leur larves. L'homme s'en sert pour la fabrication des médicaments (antibiotiques, vitamines), d'aliment (pain, fromages), d'enzymes. Ils jouent un rôle essentiel de recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir des sources carbonées externes. Ces organismes sont très importants et vivent en relation avec d'autres organismes, selon plusieurs manières :

❖ Symbiotes

établissent aussi des interactions avec les espèces animales ou végétales donc c'est une traduction vraisemblable de leur co-évolution avec les végétaux d'une part, et les animaux d'autre part en effet , ces mycètes obtiennent leurs nutriments grâce à un autre organisme, leur procurant en retour certains bénéfices. Ce type d'association est essentiel pour les végétaux, 90% des plantes

seraient en symbiose avec ces champignons qui sont appelés **mycorhizes**. D'autres mycètes vivent en relation avec une algue. Ils ne peuvent survivre l'un sans l'autre. Ce sont les **lichens**.

❖ Saprophytes

Ils prélèvent leurs nutriments à partir de matières organiques en décomposition. Ils sont très importants en tant que décomposeurs et recycleurs de matières mortes.

❖ Parasites

Certains sont parasites et hautement pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes (causant des pertes économiques considérables aux agriculteurs). Leur pouvoir pathogène peut s'exprimer de diverses façons. En produisant des toxines, ils peuvent être à l'origine d'intoxication alimentaire, ou de mycotoxicoses par l'accumulation de ces toxines dans des végétaux et leur consommation par l'homme, ou l'animal. Différent est le développement du champignon dans l'organisme humain ou animal (colonisation, invasion, dissémination) ; ce parasitisme est à l'origine de maladies appelées mycoses (car produites par des mycètes).

NB: Ce sont les mycètes microscopiques (les micromycètes filamenteux ou levuriformes) qui seront abordés dans ce chapitre...

❖ Type trophique

Chimio hétérotrophes: ils utilisent la matière organique comme source d'énergie d'électrons et de carbone. Ils se nourrissent par **absorption**, de matières organiques en décomposition qu'ils transforment en matière minérale. Les molécules simples sont absorbées directement (acide aminé, monosaccharides). Les molécules plus complexes sont hydrolysées à l'extérieur par un équipement enzymatique **secrété ou associé à la paroi**, qui décompose les molécules complexes en composés simples.

Facteurs physicochimiques

Du point de vue des facteurs physicochimiques, les mycètes sont **mésophiles**, Température optimale de croissance entre 25 et 35°C. Le maximum observé est de 62°C. Ils tolèrent **des milieux acides** $5.5 < \text{pH} < 7.5$ et ils sont moins exigeant en humidité par rapport aux autres micro-organismes. Le type respiratoire est **aérobie**, à l'exception de ceux que l'on trouve dans le tube digestif des mammifères. Les levures sont **anaérobies facultatives**.

6.1.1. Taxonomie

Dans la classification du monde du vivant, les champignons constituent aussi un règne à part, distinct de celui des plantes ou des animaux, cette classification est basée principalement sur le type du thalle, le type de reproduction (sexuée et asexuée), l'écologie et la constitution cellulaires. Six divisions sont connues chez les mycètes: **Les Chytridiomycètes, les Oomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes, les Zygomycètes et les Deutéromycètes**. elle englobe les thalles unicellulaires (levures), les thalles filamenteux

(moisissures), les thalles développés (champignons champêtres) et les thalles primitifs (plasmodes). Beaucoup de champignons appartiennent aux Mycorhizes. Ces derniers sont très diversifiés mais ont en commun le même mode de vie.

❖ **Les levures**

Les levures sont des mycètes à thalle unicellulaire. La majorité d’entre elles effectuent une reproduction sexuée par formation d’asques contenant des ascospores. Elles appartiennent alors aux Ascomycètes. Ex : *Saccharomyces*, *Candida*. Par contre les levures incapables de réaliser la reproduction sexuée, se multiplient toujours par mitose des noyaux (bourgeonnement). Elles appartiennent alors à la classe des champignons imparfaits, dits Deutéromycètes. Les levures et les moisissures appartiennent au règne des **Mycètes** (*Fungi*). La classification est basée sur le cloisonnement des hyphes et des caractères morphologiques observés lors de la reproduction sexuée (tableau 4 ci-dessous).

Tableau 4: Classification des levures

Classe	Cloisonnement	Reproduction sexuée	Particularités / Exemples
Myxomycètes	Non	Oui	moisissures visqueuses plasmodiales
Oomycètes	Non	oui (oospores)	<i>Plamopara viticola</i> (mildiou de la vigne)
Zygomycètes	Non	oui (zygospores)	Mucorales : <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Absidia</i>
Ascomycètes	Oui	oui (ascospores)	<i>Saccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Hansenula</i> ; <i>Neurospora</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i>
Basidiomycètes	Oui	oui (basidiospores)	nombreux champignons macroscopiques : <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Coprinus</i> ...98
Deutéromycètes (<i>Fungi imperfecti</i>)	Oui	Absente (ou inconnue)	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodothorula</i> , <i>Brettanomyces</i> ; <i>Geotrichum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i>

6.1.2.Morphologie

La grande majorité des champignons se présentent sous une forme filamenteuse, des filaments enchevêtrés et ramifiés tels que les branches d’un arbre caractérisée par une structure tubulaire, et plurinucléée, autrement dit ces microorganismes ne contiennent pas de

racines, ni de tiges, ni de feuilles. Ils se caractérisent par la formation de filaments (hyphes) (figure 37).

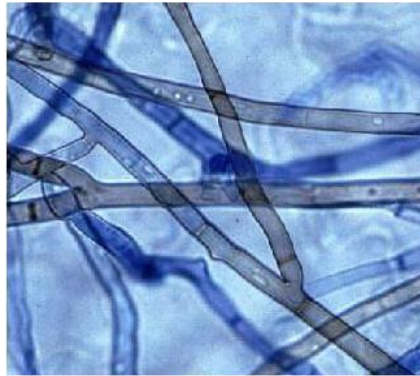


Figure 37:Hyphe

qui sont une cellule tubulaire emprisonnée dans une paroi rigide. Les hyphes se multiplient au niveau de leurs extrémités, formant ainsi une masse emmêlée appelée **mycélium**(Figure38).

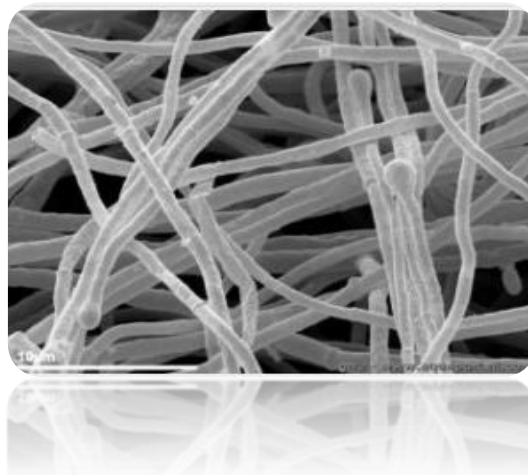


Figure 38:Le mycélium Fusarium

L'ensemble des hyphes d'un mycélium constitue **un thalle, d'où le nom de thallophytes**. Le thalle peut être **unicellulaire (levures)** ou **filamenteux (moisissures)**. La plupart des champignons ont des thalles pluricellulaires constitués d'un mycélium et d'organes de fructification (les moisissures). Certaines levures sont toutefois capables de former des structures filamenteuses (**pseudomycélium**). dans certaines conditions (**figure39**) On distingue **les thalles siphonnés**, donc pas de cloisons (Champignons inférieurs coénocytiques) et **les thalles cloisonnés** par une septation transversale de la paroi (champignons supérieurs).

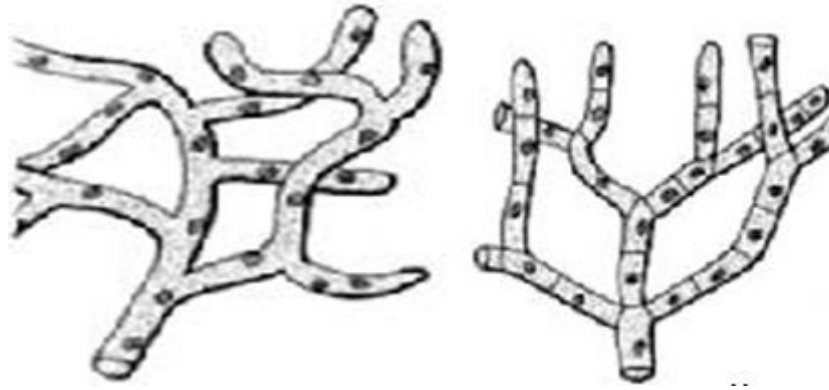


Figure 39: Filaments non septés et filaments septés

Le diamètre des hyphes varie considérablement en fonction des conditions de l'environnement, de leur position dans la colonie, et surtout d'une espèce à l'autre, de 3-4 μm à plus de 10 μm .

Les levures ont une forme qui peut être sphérique, ovoïde, allongée, cylindrique, .Les levures ne forment pas de mycélium et sont souvent associées en agrégats. leur thalle est dit **levuriforme**(figure 40). Leur taille est généralement comprise entre 10 et 50 μm .

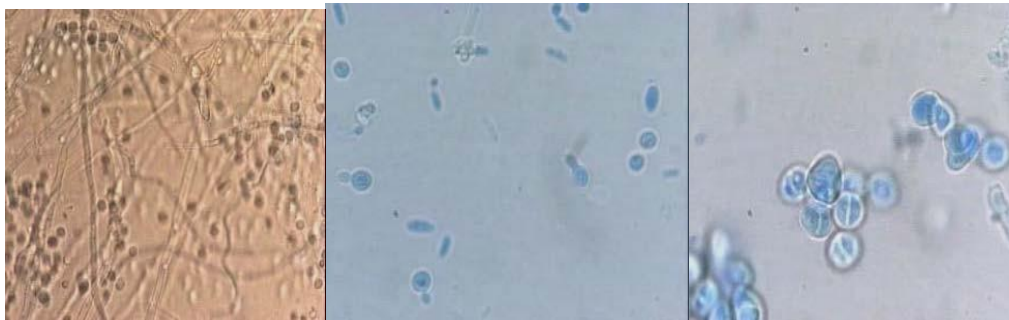


Figure 40: Thalle filamenteux et thalle levuriforme

NB: Certains champignons sont dimorphiques et qui selon les conditions du milieu peuvent être sous forme de levure ou de moisissure (mycélium). Ce sont souvent des champignons très pathogènes, comme *Histoplasma capsulatum*. *In vitro* il est sous forme mycélienne, alors qu'*in vivo* il est sous forme de levure.

❖ Composition chimique et structure cellulaire

La cellule fongique est formée par le noyau (certaines structures en ont un, d'autres deux ou plus), les mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, les ribosomes, les vacuoles de réserves (contenant du glycogène), le cytosquelette (filaments d'actine et de tubuline), la membrane cytoplasmique et la paroi. Chez les mycètes pluricellulaires, les cellules communiquent entre elles par des pores au niveau des septes transversales.

La membrane plasmique, riche en ergostérol, qui constitue le principal stérol de leur membrane.

Leur **paroi**, principalement constituée de 10 à 20% de protéines, 80% de polysaccharides antigéniques **la chitine**; (polymère linéaire de β -D-1-4- N Acétyl-glucosamine), de la cellulose (polymère linéaire de β -D-1-4- glucose, c'est un composé spécifique de la paroi des champignons où elle représente le composé majeur. Néanmoins, chez certaines espèces elle peut être partiellement ou totalement remplacée par la cellulose (ex : les Oomycètes en sont complètement dépourvus) La chitine est sous forme de microfibrilles, de mannanes ou de glucanes..Elle a de ce fait un rôle taxonomique important .

La paroi des représente 30 % du poids sec de la cellule. La principale différence avec les moisissures, est que la chitine n'est pas le composé majoritaire de la paroi des levures, elle représente seulement 1 à 6 % de la masse pariétale.

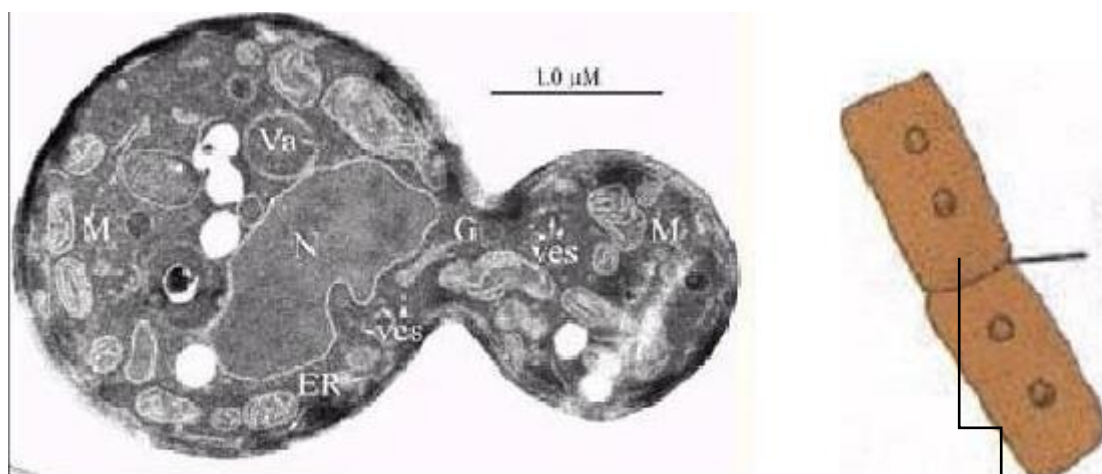
6.1.3.Reproduction

La reproduction des champignons est complexe, elle peut être sexuée ou asexuée, bien que certains champignons alternent entre les deux types de reproduction. Les levures sont **unicellulaires** et se reproduisent **par bourgeonnement** mais également **par fission binaire** ou **scissiparité**(figure 41).

6.1.3.1.Reproduction asexuée "anamorphe" C'est un mode de reproduction commun à presque tous les champignons, peut se faire par bourgeonnement, fission binaire, fragmentation, ou par formation de spores.

* Le bourgeonnement et la fission binaire

Le bourgeonnement et la fission binaire sont les formes de reproduction asexuée les plus simples. Le bourgeonnement est une division inégale du cytoplasme, résultant en une cellule parent et une cellule fille, celle-ci étant plus petite que la cellule parent. La fission binaire par contre aboutit à deux cellules identiques.



scission transversale formant une nouvelle paroi cellulaire schizosaccharomyces

Figure 41:Reproduction par bourgeonnement et reproduction par fission binaire

***La fragmentation et la sporulation**

La fragmentation est une forme de reproduction asexuée (figure 42). où un nouvel organisme se développe à partir d'un fragment parent. Chez de nombreuses moisissures, **la fragmentation des hyphes** peut donner naissance à de nouveaux individus. L'isolement de cellules par clivage de la paroi cellulaire permet la formation d'**Arthrospores**.

***La sporulation:** est la plus importante forme de reproduction asexuée chez les champignons. Elle se fait à travers les spores asexuées, formées au cours de la phase asexuée du cycle de vie des champignons. Suite à une mitose, ces spores se transforment en cellules reproductives appelées mitospores qui, après dispersion, se développent en de nouveaux organismes.

La colonisation des milieux par les champignons est assurée par la production de de **spores de dissémination** :

- **Blastospores**, produites par bourgeonnement de cellules mères végétatives d'un pseudomycélium.

-**Arthrospores** : formées par fragmentation du thalle. Ex : *Geotrichum*.

-**Chlamydospores**, structures de résistance possédant une paroi épaisse.

- **Sporangiospores**, formées chez les **Mucorales** (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*) à l'intérieur d'une cellule végétative différenciée, le **sporange**, et libérées par éclatement de ce « sac » lorsqu'il est mature.

Conidiospores (ou conidies), produites à l'extrémité d'un **conidiophore** par des organes de fructification: **stérigmates** chez *Aspergillus*, **phialides** chez *Penicillium*. Chez *Fusarium*, les spores sont pluricellulaires (**macroconidies**).

Dictyospores : formées par plusieurs divisions successives. Ex : *Alternaria*

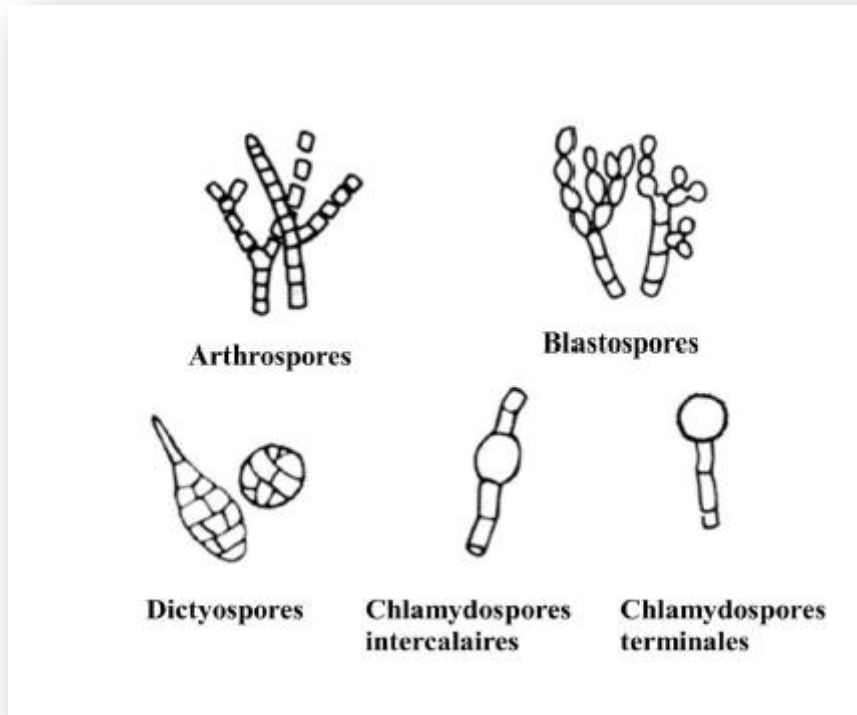


Figure 42: Différents types de spores de dissémination (reproduction asexuée)

6.1.3.2. Reproduction sexuée "téléomorphe"

La reproduction sexuée (ou le téléomorphe) fait intervenir la rencontre de filaments spécialisés (plasmogamie), (figure 43). la conjugaison des noyaux (caryogamie) et enfin une réduction chromatique (méiose) suivie d'une ou plusieurs mitoses. Ces événements sont suivis par la formation de Quatre types de spores :

- **Les ascospores** : Elles sont formées dans des structures spécialisées dites « asques ». Une fois mûres, les ascospores se placent à l'extrémité des asques et sont libérées à l'extérieur par contraction de ces derniers. Ce mode de reproduction est caractéristique des Ascomycètes.
- **Les basidiospores** : Ce sont des cellules formées à l'extérieur des « basides » et portées par des filaments fins dits « stérigmates ». Après maturité, les stérigmates se brisent (par la pluie, le gel, le vent, le poids des spores, etc.) et libèrent les basidiospores. Ces cellules sont caractéristiques des Basidiomycètes.
- **Les oospores** : Elles sont formées chez les thalles plasmodiaux par la fusion de deux sporocystes de sexes opposés (l'oogone et le spermatocyste). La fécondation se fait à l'intérieur de l'oospore. Cette forme de reproduction est rencontrée chez les Oomycètes.
- **Les zygosporés** : Elles sont formées aussi par la fusion de deux sporocystes de sexes opposés. Elles sont rencontrées chez les moisissures à thalle siphonné les Zygomycètes. Les zygosporés sont portées par des sporophores qui se différencient en « suspenseurs ». Comme pour l'oospore, la fusion se fait à l'intérieur.

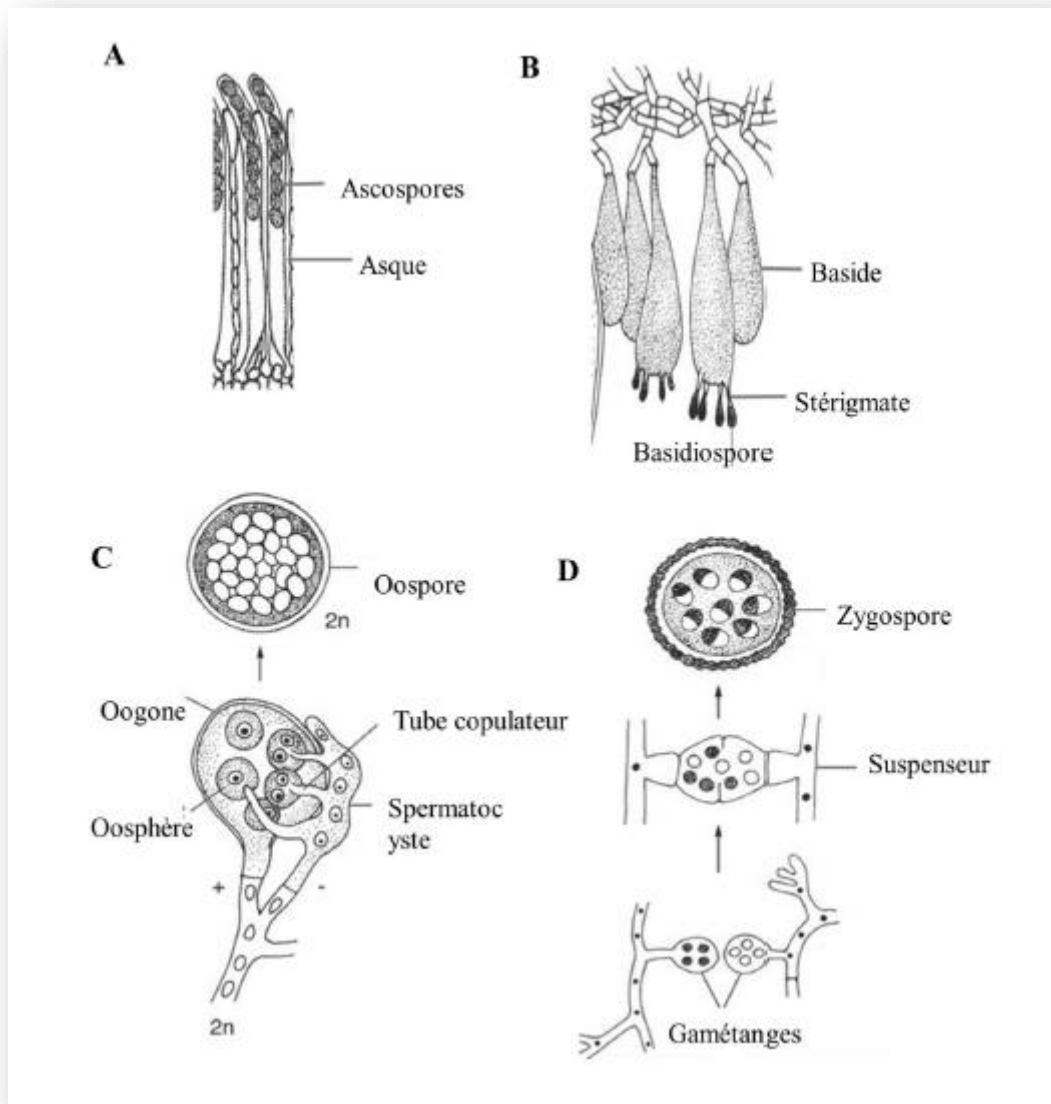


Figure 43: Différents types de spores dans la reproduction sexuée

NB: La figure 44 illustre bien la Reproduction asexuée et sexuée "téléomorphe" chez les mycètes.

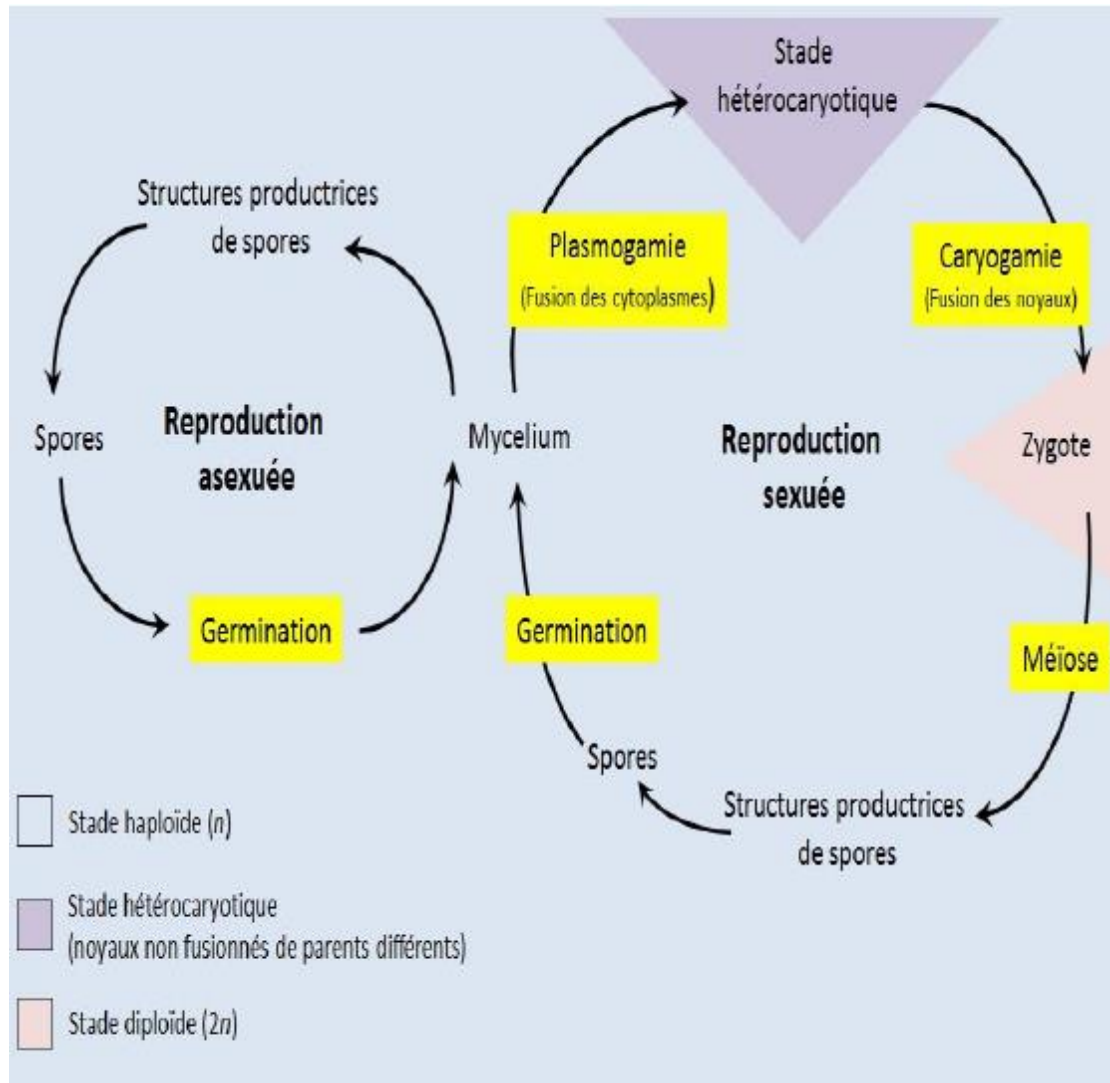


Figure 44:Reproduction asexuée et sexuée "téломorphe" chez les mycètes.

6.2. virologie

❖ Introduction

La découverte des virus trouve son origine au XIXe siècle, avec les travaux d'A. Mayer sur la mosaïque du tabac. Le scientifique allemand a découvert que cette maladie qui touchait les feuilles de tabac pouvait se propager d'une plante à l'autre. Mais il n'a pas pu trouver de bactérie responsable de cette maladie. Plus tard, le microbiologiste Beijerinck comprit que la particule infectieuse devait être bien plus petite qu'une bactérie. Le virus de la mosaïque du tabac (VMT) n'a été identifié qu'en 1935 par Wendell Stanley (figure 45). L'année suivante des études complémentaires montrèrent que ce cristal contenait également de l'ARN. Des études ultérieures montrèrent que selon les virus étudiés, ceux-ci étaient composés soit de protéines et d'ARN, soit de protéines et d'ADN. C'est en 1957 que André Lwoff proposa une définition claire et moderne des virus. A partir des années 1960, le développement des cultures cellulaires, de la microscopie électronique, puis de la biologie moléculaire a permis aux scientifiques de progresser dans la compréhension des mécanismes de répllication des virus, dans la réalisation de diagnostics fiables et dans l'élaboration de vaccin.

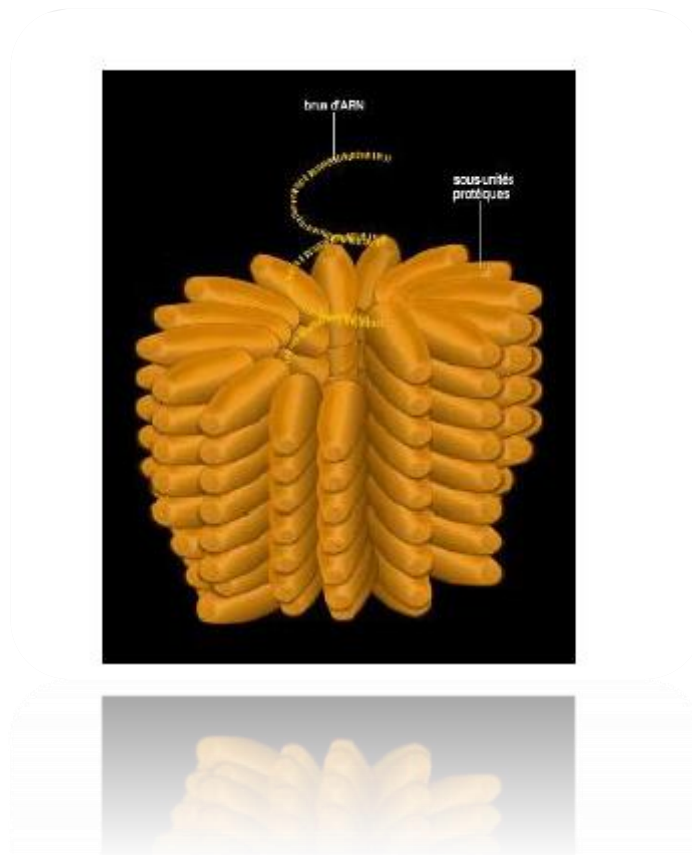


Figure 45: Virus de la mosaïque du tabac

Actuellement, de nouveaux virus continuent à être découverts, comme par exemple le virus de l'hépatite C en 1989, le virus Nipah en 1999 (infection respiratoire du porc et encéphalite chez l'homme), le Metapneumovirus en 2001, le virus du SRAS (syndrome respiratoire aigue sévère) en 2003 jusqu'au SARS-COV 2 en décembre 2019.

❖ **Définition:**

Le mot latin « virus » signifie poison. Ce mot latin n'a pas de pluriel ; la même forme est utilisée au singulier et au pluriel. un virus est. un micro-organisme de très petite taille (nm) par rapport aux cellules animales et aux bactéries ,les plus gros atteignent 250 nm et les plus petits jusqu'à 20nm, c'est un agent infectieux nécessitant un hôte, souvent une cellule qui peut être aussi bien pluricellulaire (animale ou végétale) qu' unicellulaire (bactérie et protiste), dont il utilise le métabolisme et ses constituants pour se répliquer c'est donc des entités nucléo-protéiques des cellules constitué au minimum d'un acide nucléique ADN (simple ou double brin) ou ARN (simple ou double brin) et de protéines. Les virus existent sous une forme extracellulaire sont appelés " virions " ou sous la forme intracellulaire (à l'intérieur de la cellule hôte), sont appelés " virus ". La taille des virus varie entre 18 nm (Parvovirus) et 250 × 350 nm (virus de la variole). Selon certains travaux, la taille des virus se situe entre 10 et 400 nm de diamètre (sachant que le pouvoir de résolution de la microscopie optique se situe autour de 300 nm). Des ADN-virus exceptionnellement grands ont été mis en évidence chez les amibes et classés dans une nouvelle famille (virus géants ou *Megaviridae*). Avec un diamètre de 400 nm, ils atteignent la taille des petites bactéries. Le plus grand virus mis en évidence à ce jour chez les amibes est le Pandoravirus (1 µm × 0,5 µm) qui contient plus de 2 500 séquences codant des protéines et qui semble constituer un stade d'évolution intermédiaire entre un virus et une cellule. (figure 46)

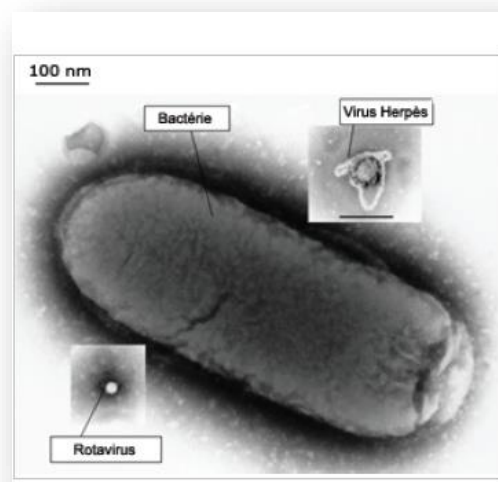


Figure 46:Photos de virus et d'une bactérie en microscopie électronique avec respect des tailles relatives

6.2.1. Morphologie et Structure des virus

Le virus est obligatoirement constitué de:

6.2.1.1. Génome

Acide nucléique, soit ADN soit ARN. Il ne peut pas contenir les deux à la fois. Il constitue le 1er critère de la classification. (figure 47,48) Il peut coder entre 3 et plus de 100 protéines différentes et ces protéines sont de structure de virus. Le nombre et la taille des protéines codées ne sont pas toujours corrélés à la taille du génome.

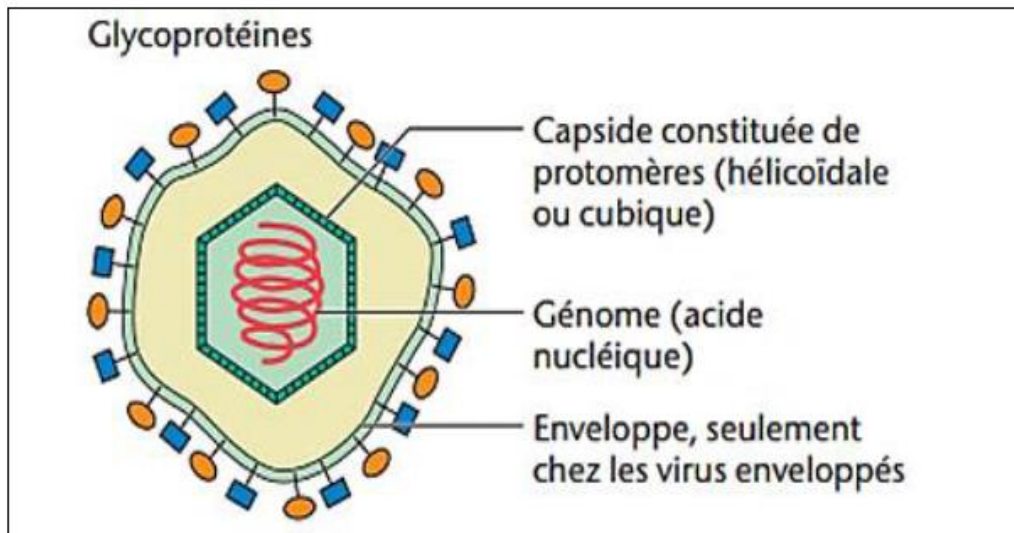


Figure 47: Structure d'un virus

6.2.1.2. La capsid : (du grec capsas : boîte)

La capsid est une coque qui entoure et protège l'acide nucléique viral des diverses agressions du milieu extérieur ou du milieu cytoplasmique de la cellule hôte. Représentant l'essentiel de la masse du virus et responsable de son apparence cristalline en microscopie électronique, et qui est très stable. Constituée par un assemblage de structures protéiques.

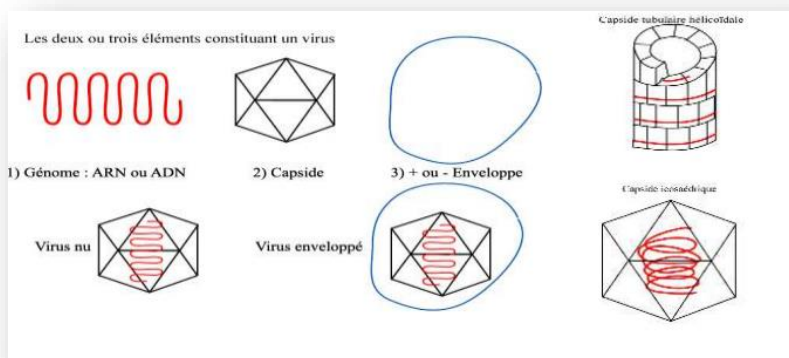


Figure 48: Les différents éléments constituant un virus

L'ensemble capsid et acide nucléique est appelé: **nucléocapside**. La nucléocapside a une conformation géométrique qui, selon les virus, est soit hélicoïdale tubulaire, soit polyédrique.

Une nucléocapside tubulaire se présente comme un tube enroulé en peloton.

La structure de la capsid entraine la forme du virus, ce qui permet de distinguer deux groupes principaux de virus :

❖ Les virus à symétrie cubique ou icosaédrique Les virus à symétrie hélicoïdale

-Les virus à symétrie cubique

❖ Ce sont des icosaédres, polyèdres réguliers constitués par 12 sommets et 20 facestriangulaires équilatérales.(figure 49)

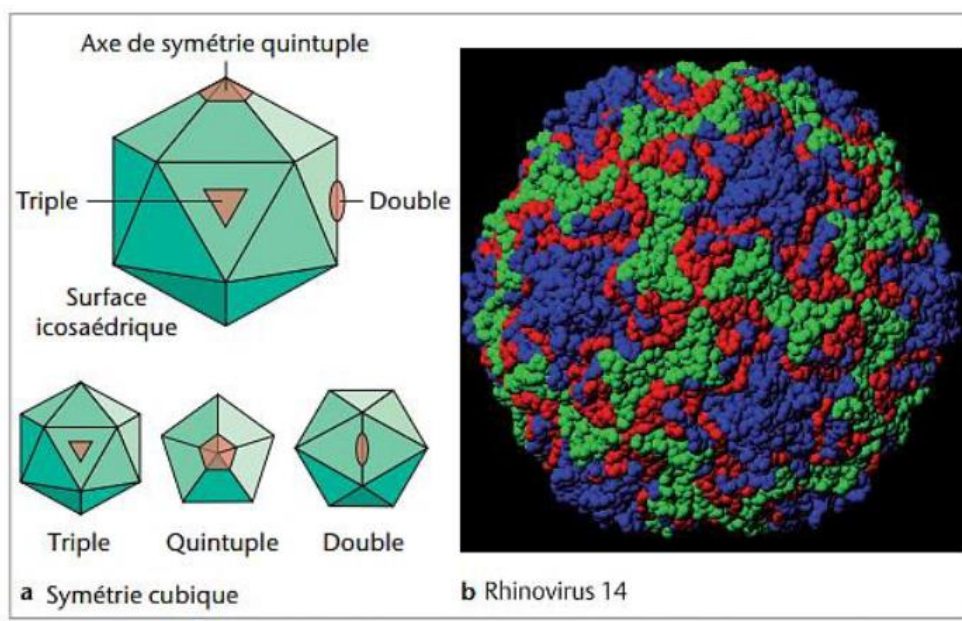


Figure 49:Icosaédre avec à 20 faces triangulaires identiques

- Les virus à symétrie hélicoïdale :

Ce sont de longs cylindres creux (200 à 300nm), faits de l'assemblage de 200 protéinesidentiques. Le matériel génétique est logé à l'intérieur du tube. **Exemple :** le VMT (virus de la mosaïque du tabac) (figure 50).

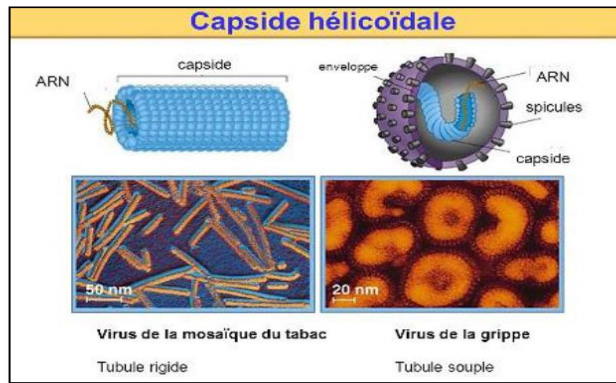


Figure 50: Capside rigide (VMT) et capside souple (virus de la grippe)

-Capside à symétrie complexe

Un certain nombre de virus élaborent leur capside d'une manière qui ne correspond pas aux standards hélicoïdaux ou icosaédriques. Par exemple, les phages de la série T montrent une structure de nature binaire, impliquant à la fois des éléments de nature hélicoïdale et icosaédrique (Figure 51).

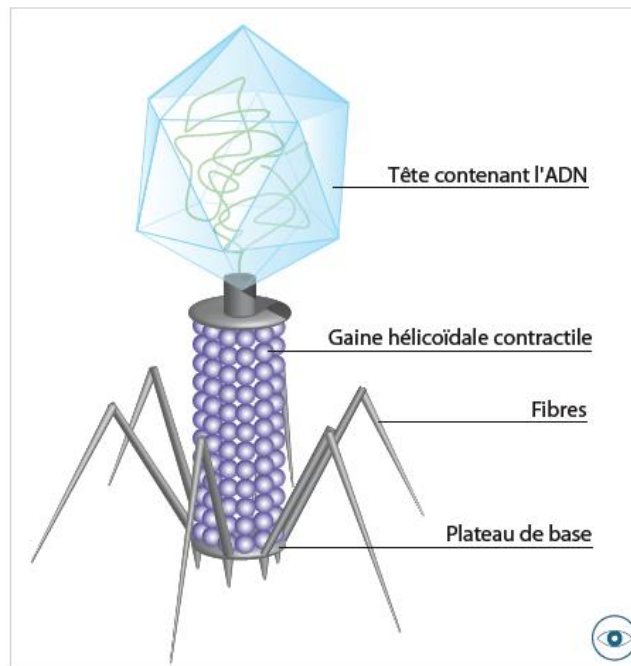


Figure 51: Représentation du bactériophage T4

6.2.1.3. Enveloppe (ou peplos)

C'est l'élément le plus externe des virus enveloppés. La présence (virus enveloppés) ou l'absence d'enveloppe (virus nus) a un rôle important dans le mode de transmission des maladies virales. L'enveloppe dérive des membranes cellulaires. En effet, les virus enveloppés, tel que le virus de la grippe, terminent leur multiplication dans la cellule par bourgeonnement à travers une telle membrane, après insertion de glycoprotéines virales dans

la bicouche lipidique : le virus est libéré de la cellule par formation d'une évagination de la membrane, évagination qui va se détacher pour former un virus entier. De constitution complexe faite d'un assemblage de phospholipides et de protéines.

-Elle porte les déterminants viraux (glycoprotéines) qui se lient aux récepteurs cellulaires d'une manière spécifique permettant l'introduction de la nucléocapside dans la cellule hôte. On distingue :

- ❖ Les virus nus, ne possédant pas d'enveloppe. Ex : le virus de la poliomyélite (picovirus).
- ❖ Les virus enveloppés possédant une enveloppe. Ex : le virus de la grippe (orthomyxoviridae) et le virus du SIDA (famille des retroviridae).

Le fait d'avoir une enveloppe rend le virus fragile. L'enveloppe virale présente, en effet, la fragilité des membranes cellulaires dont elle dérive. Or, un virus, quel qu'il soit, doit être entier pour être infectieux. En particulier, il existe deux endroits où les virus enveloppés vont avoir leur enveloppe rapidement dégradée et du même coup perdre leur pouvoir infectieux alors que les virus nus y résistent beaucoup plus longtemps : le milieu extérieur et le tube digestif.

Dans le milieu extérieur, les virus enveloppés sont inactivés par la température, même la température ordinaire, et la dessiccation ; dans le tube digestif, par le pH acide et les enzymes digestives. Les virus enveloppés, comme les virus de la grippe (figure 52), et les virus de la famille des Herpesviridae, sont absents des selles. A l'inverse, les poliovirus qui sont des virus nus sont trouvés dans les selles qui sont le moyen essentiel de dissémination de l'infection (contamination fécale-orale). En ce qui concerne la transmission des infections virales d'un individu à un autre, on peut donc opposer nettement la transmission de la grippe à celle de la poliomyélite et mettre en correspondance ces différences avec les propriétés des virus en cause.

La transmission de la grippe saisonnière se fait directement par voie aérienne lors du contact rapproché de deux sujets. On respire les microgouttelettes infectantes projetées par la toux du sujet grippé, ou éventuellement présentes sur les mains à la suite d'un mouchage de nez. Les virus de la grippe ne résistent pas longtemps à l'air libre. Ils ne sont pas excrétés dans les selles et on ne les retrouve ni dans la poussière, ni dans les eaux usées. La brève survie des virus de la grippe dans l'air, autour des sujets infectés, est favorisée quand l'air est humide et froid, l'enveloppe craignant la chaleur et la dessiccation. Rien d'étonnant à ce que, dans les hémisphères Nord et Sud, la grippe prédomine pendant l'hiver et non pendant l'été.

En ce qui concerne la transmission de la poliomyélite, les virus sont excrétés non seulement dans les microgouttelettes respiratoires et la salive mais plus encore dans les selles et cela pendant des semaines. Ils peuvent persister plusieurs jours dans le milieu extérieur, en particulier dans les eaux usées. Ainsi, la transmission se fait de deux façons : comme pour la

grippe, par contact direct rapproché avec un sujet infecté ; surtout par contamination indirecte après ingestion d'aliments ou d'eau contaminés par les virus des selles (contamination fécale-orale). Cette transmission est évidemment favorisée par les mauvaises conditions d'hygiène. Les épidémies de poliomyélite, avant l'ère de la vaccination généralisée, survenaient surtout pendant l'été, saison où l'on se baigne, où l'on consomme des végétaux crus, où les orages perturbent la circulation et le traitement des eaux usées

Des particularités viennent cependant nuancer ce schéma. Les coronavirus, agents de gastroentérites, de rhumes, et parfois d'infections respiratoires beaucoup plus graves (SARS/SRAS en 2003, MERS-CoV en 2012-2014), sont des virus enveloppés et pourtant éliminés dans les selles.

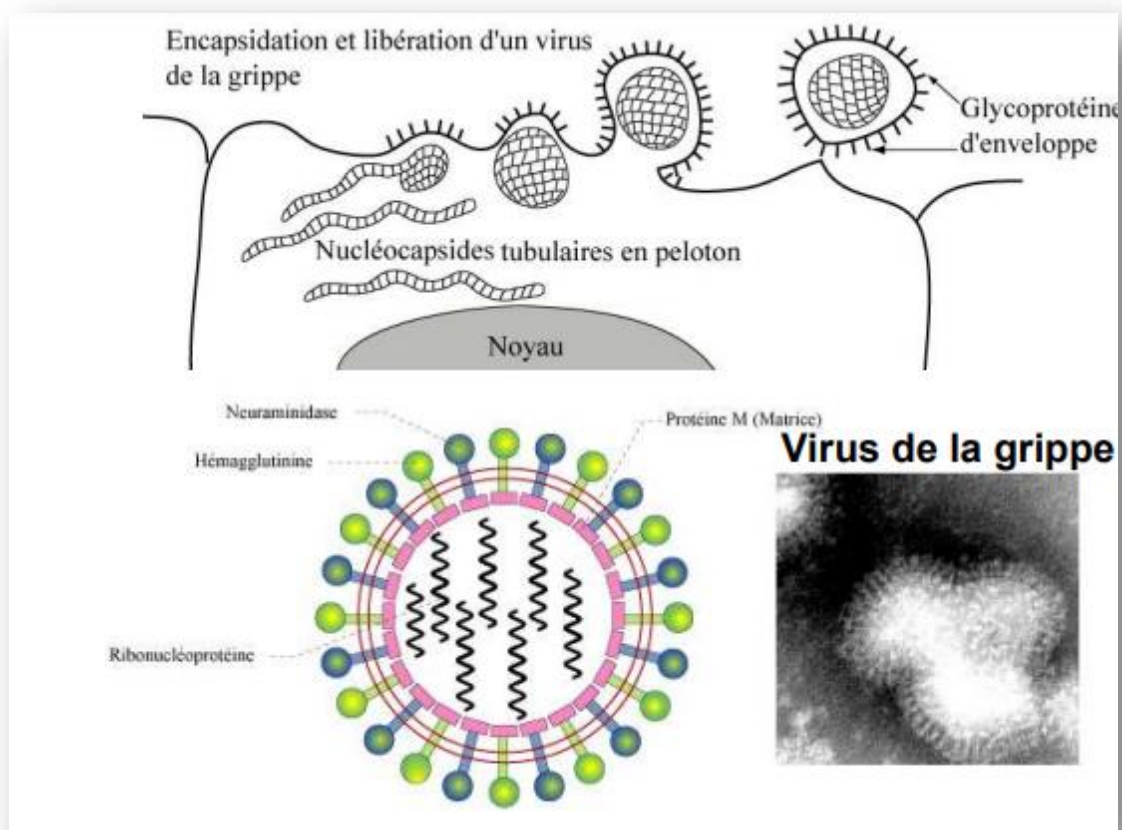


Figure 52: Virus de la grippe

6.2.2. Différents types de virus

Il existe deux classifications majeures des virus qui ne sont pas en opposition :

- ❖ La classification de l'ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses
- ❖ La classification de Baltimore

6.2.2.1. La classification de l'ICTV (Comité International de Taxonomie Virale), créé en 1975. C'est le système majoritairement utilisé dans le monde, proposé en 1962 par Lwoff, Horne et Tournier. Il est basé sur la nature et la structure du génome (type d'acide nucléique,

nombre de brins, structure physique et polarité), puis celle de la capsid (symétrie), et enfin l'existence ou non d'une enveloppe. Les virus sont répartis en :

-**Ordres** (-virales)

-**Familles** (-viridae)

-**Sous familles** (-virinae)

-**Genre** (-virus)

-**Espèces**

Les virus sont généralement nommés en fonction :

1-Des propriétés de la famille de laquelle ils sont issus

2-De la maladie qu'ils engendrent (tels les herpesvirus)

3-De leur morphologie

4-Du lieu de découverte / d'isolation (Ebola, Lassa)

Les bactériovirus sont souvent désignés par un nom de code (phage T4 par exemple)

Les virus infectant les insectes sont souvent nommés à partir du nom de l'hôte

Les virus des plantes sont appelés selon deux critères : le nom de la plante et la description de la maladie engendrée.

Le classement des virus n'est pas terminé ; beaucoup de familles ne sont pas encore classées.

La classification comprenait sept ordres :

- **Caudovirales**
- **Herpesvirales**
- **Ligamenvirales**
- **Mononegavirales**
- **Nidovirales**
- **Picornovirales**
- **Tymovirales**

Régulièrement, l'ICTV remet à jour cette classification. Dans son 8ème rapport, le CITV a décrit près de 2000 espèces de virus répartis en 3 ordres, 73 familles, 9 sous-familles, 287 genres.

6.2.2.2. La classification de Baltimore

Alors que les rapports du comité CITV représentent l'autorité officielle, en taxonomie virale, des nombreux virologues trouvent plus facile d'utiliser un mode de classification alternatif établi par le lauréat du prix Nobel, David Baltimore. Le système Baltimore est complémentaire au système CITV mais se base surtout sur le génome des virus et sur le procédé utilisé pour synthétiser l'ARNm viral.

Le système original de Baltimore reconnaît 6 groupes de virus. Depuis, le système a été étendu à **7 groupes**, en partie en considérant la réplication du génome ainsi que la synthèse de l'ARNm. Ce système permet de simplifier le vaste éventail de cycles viraux en un nombre relativement petit de types de base.

La classification de David Baltimore comprend donc 7 groupes, En fonction des particularités du génome (le type d'acide nucléiques et sa polarité, et ainsi sa stratégie d'expression/réplication). Elle permet de rendre directement compte du mécanisme du cycle viral

❖ **Virus à ADN**

-Groupe I - Virus à ADN à double brin

-Groupe II - Virus à ADN à simple brin

❖ **Virus à ARN**

-Groupe III - Virus à ARN à double brin

❖ -Groupes IV & V: virus à ARN simple brin

-Groupe IV - virus à ARN simple brin à polarité positive

-Groupe V - virus à ARN simple brin à polarité négative

❖ **Virus à ADN ou à ARN à transcription inverse**

-Groupe VI – rétrovirus à ARN simple brin

-Groupe VII - Pararétrovirus à ADN double brin

-Groupe I : ADN bicaténaire circulaire ou linéaire Le génome doit pénétrer dans le noyau (sauf pour les poxvirus), où il utilisera les polymérases cellulaires pour effectuer les étapes de réplication et d'expression. Les conséquences sont que le virus est totalement dépendant de la division cellulaire pour mener à bien son cycle viral. Si la cellule cible n'est pas en phase S (moment du cycle cellulaire où les ADN polymérases travaillent pour répliquer le génome de la cellule), le virus est incapable de se répliquer entièrement, il pourra au mieux produire ses protéines. De ce fait, certains virus du groupe I ont développé des stratégies pour remédier à ce « problème » : ils forcent la cellule (par l'expression de diverses protéines inductrices du cycle) à entrer en mitose, pour pouvoir répliquer leur propre génome (mais la division non contrôlée des cellules peut engendrer une cancérisation).

-Groupe II : ADN monocaténaire Ces virus nécessitent également d'entrer dans le noyau de la cellule hôte pour s'exprimer. Là encore, ils utilisent la machinerie cellulaire. L'ADN polymérase cellulaire permet au génome monocaténaire viral de devenir de l'ADN double brin, qui sera ensuite transcrit

-Groupe III : ARN bicaténaire Une transcriptase virale produit de l'ARNm

-Groupe IV : ARN monocaténaire à polarité positive Cet ARN est simplement copié, afin d'obtenir de l'ARNm prêt à l'emploi

-Groupe V : ARN monocaténaire à polarité négative Le génome est antisens : il ne permet pas la traduction des protéines tel quel. Un ARN complémentaire, cette fois-ci à polarité positive est synthétisé. Celui-ci servira de matrice pour produire un nouveau génome monocaténaire à polarité négative, en plus d'aboutir à la production de protéines

-Groupe VI : Rétrovirus à ARN simple brin Utilisation d'une transcriptase inverse pour transformer le génome (ARN) en ADN double brin. Cet ADN double brin ira s'intégrer dans le génome cellulaire, avant d'être transcrit par le matériel cellulaire.

-Groupe VII : Rétrovirus à ADN double brin Devient de l'ARN simple brin grâce à une Reverse Transcriptase virale. Cet ARN aboutira à un ARNm.

6.2.3. Multiplication des virus

La multiplication virale se déroule en plusieurs **étapes** successives bien coordonnées dans le temps, identiques pour tous les virus. (figure 53), Ces étapes sont :

- l'attachement du virus à la cellule hôte
- la pénétration du virus
- la décapsidation
- la réplication des composants viraux
- l'assemblage des composants viraux (encapsidation)
- la libération de la nouvelle génération de virus.

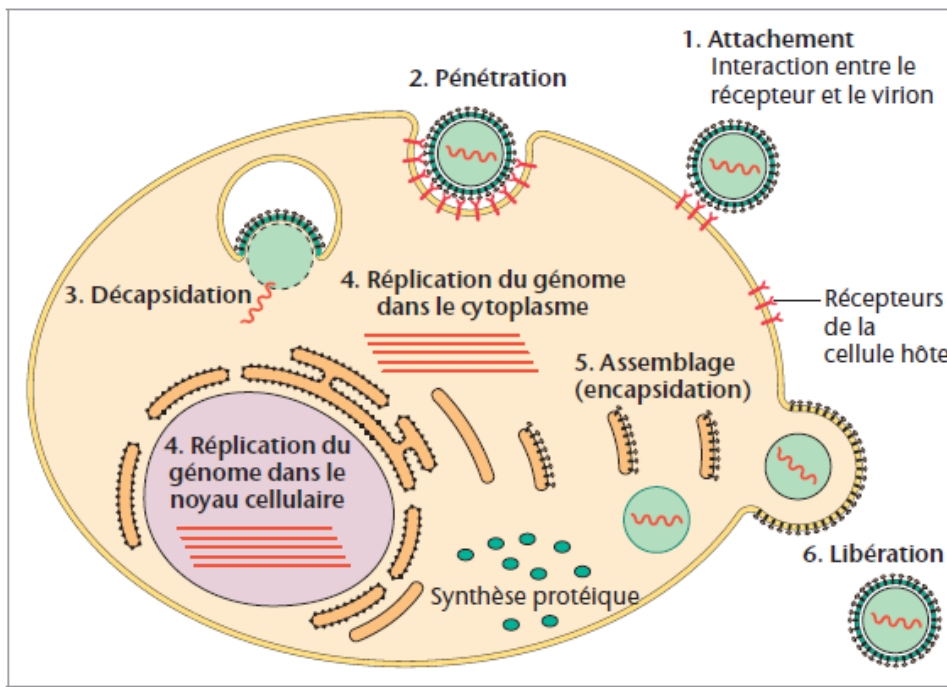


Figure 53: Cycle de reproduction du virus.

6.2.4. Morphologie et génome du SARS-CoV-2

Le virus SARS-CoV-2 fait partie des **Coronaviridés**, une famille de virus dont le patrimoine génétique, ou génome, est porté par un **brin d'ARN** et qui sont caractérisés par des **protubérances en forme de couronnes** observées à leur surface, à l'origine de leur nom. La taille du SARS-CoV-2 est en moyenne de 100 nm ce qui le rend invisible au microscope optique et seulement observable au microscope électronique. Fait remarquable, la taille de ce virus et de son génome (près de **30 000bases azotés** réparties sur **15 gènes**) en fait **un des plus gros virus à ARN**. Rappelons à titre de comparaison que notre génome, sous forme d'une double hélice d'ADN, a une taille d'environ 3 milliards de bases et qu'il contient près de 30 000 gènes. Comme tous les coronavirus, ce virus possède des protéines autour de son ARN (Nucléocapside N) et une enveloppe constituée de deux couches de lipides dans laquelle on retrouve des protéines de membrane (M), d'enveloppe (E) et celles constituant les **péplomères ou spicules (S)** (Figure 54)

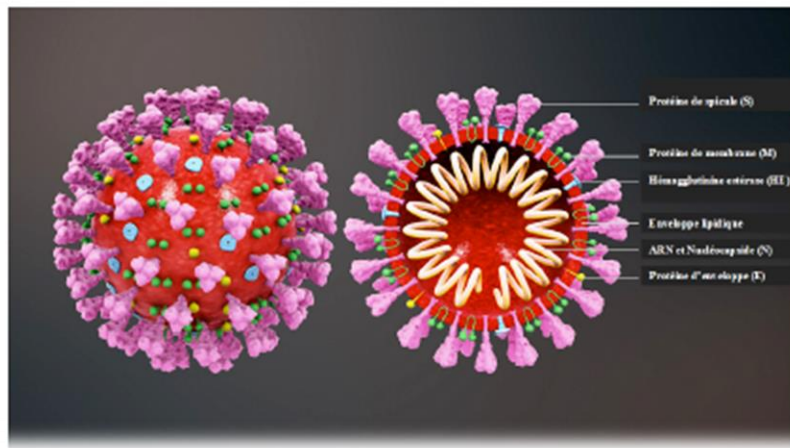


Figure 54:Schéma externe et interne du virus SARS CoV-2.

Cette protéine S (*Spike* en anglais) est capitale, car elle se lie au récepteur de la membrane des cellules de l'hôte auquel elle est adaptée, comme une clé dans une serrure. De très nombreuses cellules humaines possèdent ce récepteur : **l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2)**. Le récepteur ACE2 est exprimé de manière quasi-ubiquitaire : système vasculaire, cœur, rein, foie, rétine, intestins, système nerveux central, poumon (figure55).

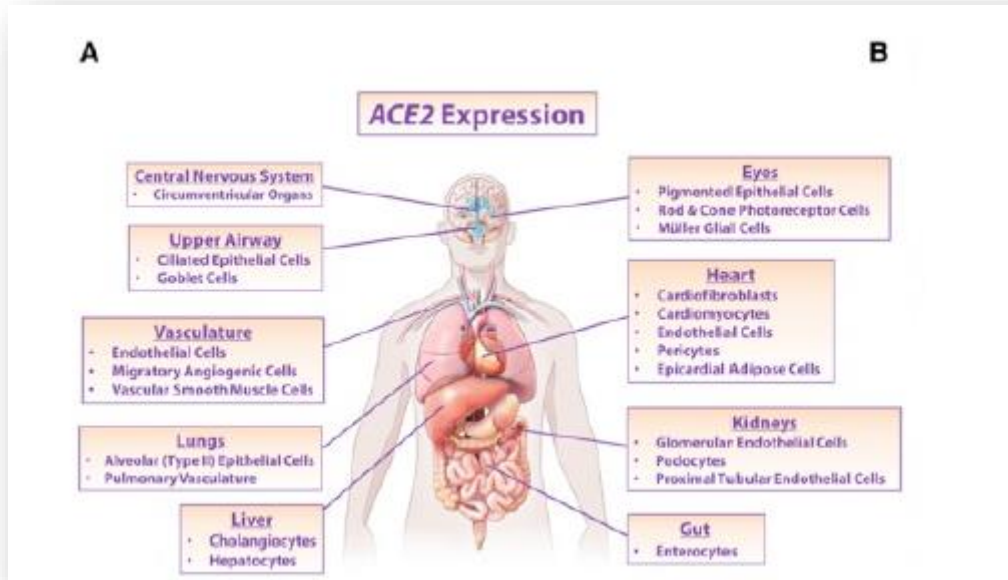
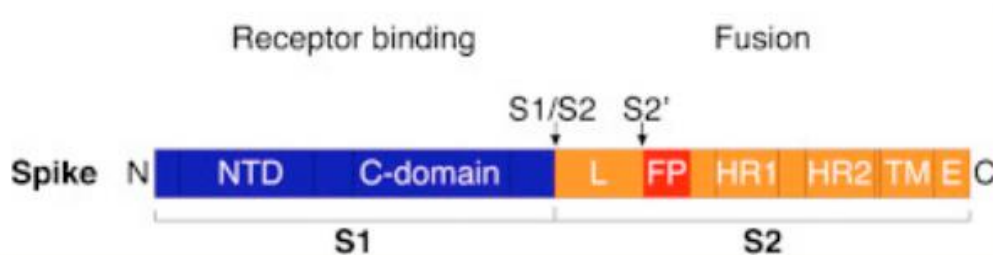


Figure 55: Le récepteur ACE2 exprimé

6.2.4.1. Cycle de vie du virus SARS-CoV-2

6.2.4.1.1. Phase d'attachement

Avant de pénétrer dans la cellule qu'il infecte, le virus s'attache par sa protéine S au récepteur ACE2 situé sur la membrane de la cellule hôte. Cette protéine est constituée de deux domaines, le domaine S1 responsable de la liaison du virus à son récepteur (RBD, *Receptor Binding Domain*) et le domaine S2 responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.



Une fois attachée au récepteur ACE2, l'enveloppe du virus fusionne avec la membrane de la cellule hôte ; cette étape nécessite une ou plusieurs coupures (clivages) de la protéine S, une très grosse protéine de surface de plus de 1200 acides aminés, qui est réalisée par plusieurs enzymes de la cellule hôte, telles que les cathepsines endosomales, la sérine-protéase de surface transmembranaire (TMPRSS), la trypsine et **lafurine**. Le mécanisme de clivage de protéines d'enveloppe virales par la furine se rencontre chez d'autres virus, par exemple le virus du Sida, d'Ebola, de la Dengue ou *Influenza A* de la grippe. (figure 56).

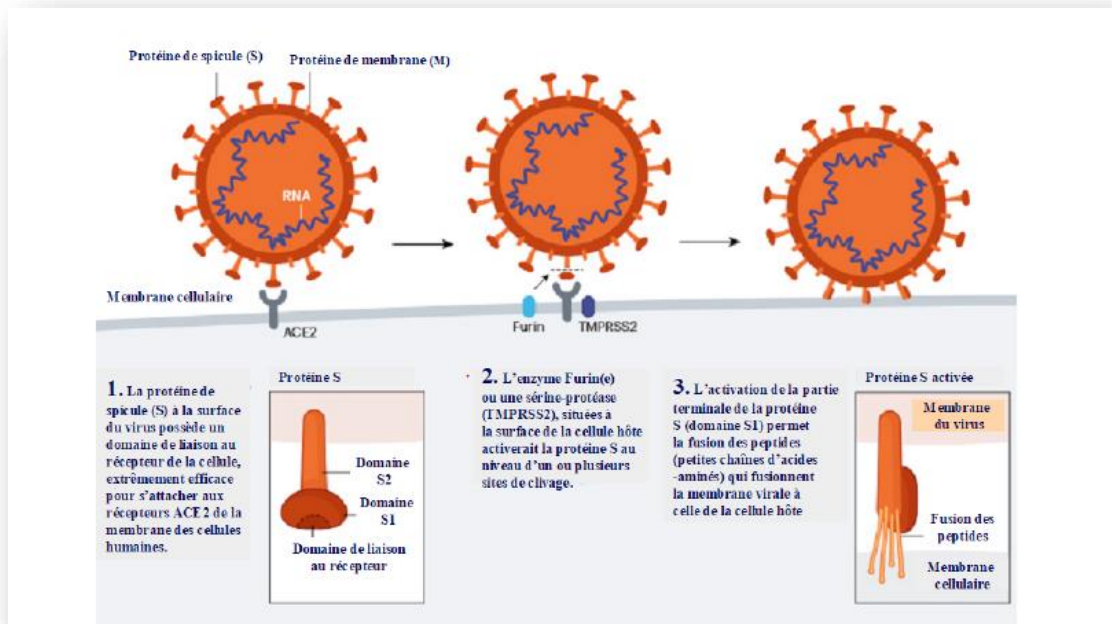


Figure 56:Phase d'attachement et de fusion du virus SARS-CoV-2 avec la membrane de la cellule.

Suivant le coronavirus concerné et le type de cellules infectées, le clivage peut avoir lieu à différents sites de la protéine S (Figure 57) et à différents moments du cycle de vie du virus ce qui aura **une forte influence sur sa pathogénicité. Les protéines S du SARS-CoV-2 et du MERS-CoV possèdent un site de clivage pour la furine**, une protéase exprimée de manière quasi-ubiquitaire par l'ensemble des cellules quoiqu'à un niveau variable d'un type cellulaire à l'autre.

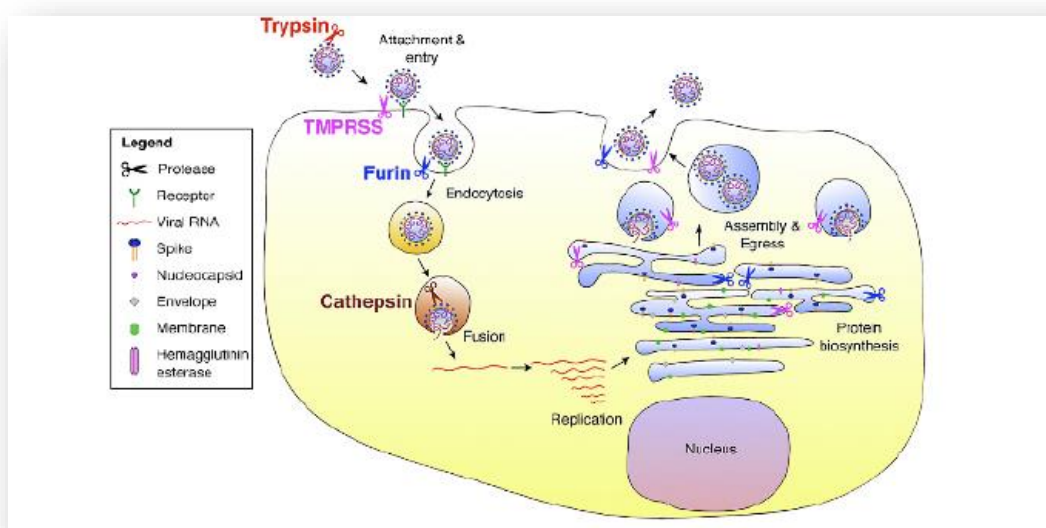


Figure 57:Résumé des principales enzymes protéolytiques cellulaires impliquées dans le clivage de la protéine S chez les coronavirus

6.2.4.1.2. Entrée dans la cellule et réplication

Une fois l'étape de fusion réalisée, **le virus injecte son patrimoine génétique(ARN) dans le cytoplasme à l'intérieur de la cellule.**(figure 58). Cet ARN est directement traduit en protéines, comme n'importe quel ARN messager, par la machinerie de traduction de la cellule (ribosomes), permettant la synthèse de **l'ARN polymérase, impliquée dans la réplication de l'ARN viral**, et d'autres protéines virales qui s'assemblent avec l'ARN en particules virales (voir Figure 5 et 6). Ces nouveaux virus ou virions quittent la cellule par exocytose et là encore la furine pourrait jouer un rôle en facilitant la libération des virions en dehors de la cellule infectée. Ces derniers infecteront de nouvelles cellules ou contamineront d'autres personnes en étant expectorés dans des gouttelettes qui seront inhalées par la bouche, le nez et les yeux.

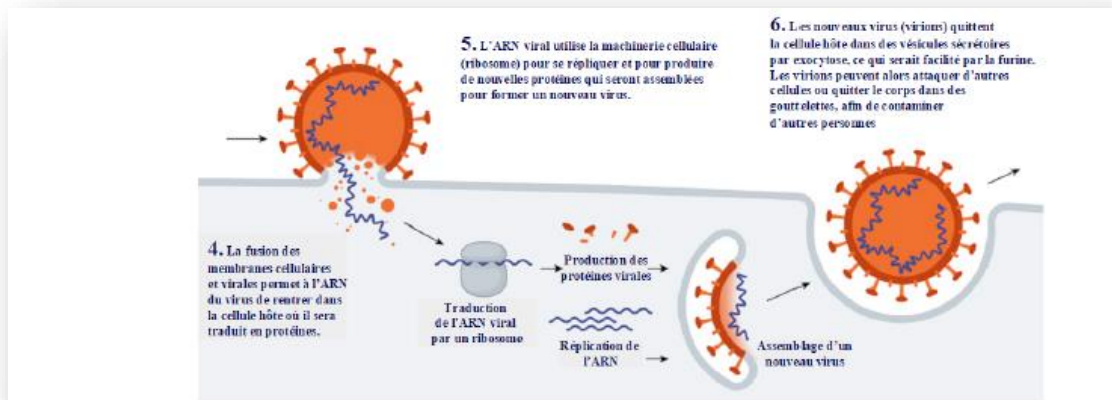


Figure 58:Entrée du virus SARS-CoV-2 et réplication de son ARN

dans la cellule hôte, avec réplication de son ARN et traduction de ses gènes en protéines virales, et assemblage en nouveaux virus quittant la cellule par exocytose.

Travaux pratiques

Pré-requis

Suivre en parallèle les cours théoriques de bactériologie et de mycologie est fortement conseillé.

TP 1 : Introduction au laboratoire de Microbiologie

OBJECTIFS :

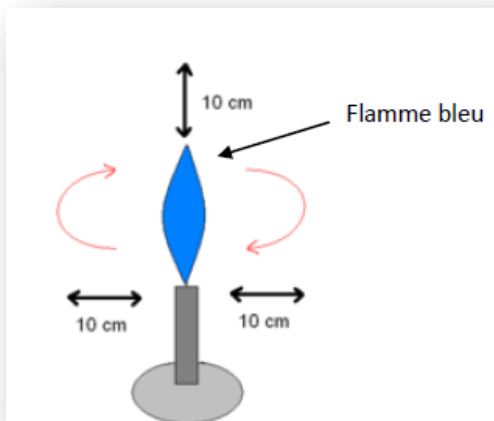
Se familiariser avec un laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement

1. Visite des locaux :

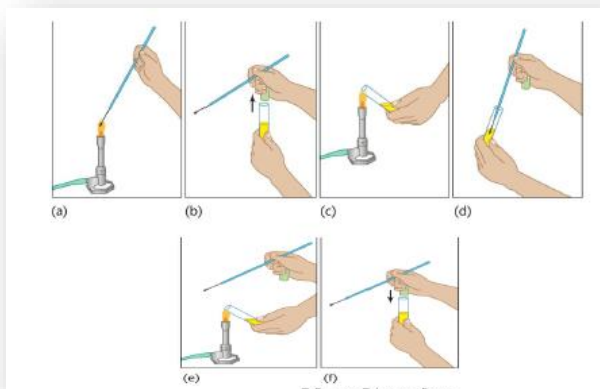
- Structure
- Présentation des gros matériels (étuves, autoclave, ...)

2. Présentation d'un poste de travail :

- Matériels (bec bunsen, pipettes, verres, béchers anse, pinces lame,...),
- Produits (eau, alcool, colorants divers,...)



Rôles du bec bunsen.



La manière de saisir l'anse de platine et le tube de suspension bactérienne

3. Matériel utilisé en microbiologie



1- Verrerie et petits instruments :

Une variété d'outils sont utilisés en manipulations microbiologiques, certains sont spécifiques (limités à la microbiologie), d'autres sont d'utilisation commune entre plusieurs sciences expérimentales. On distingue des instruments à utilisation unique et d'autres réutilisables (à plusieurs utilisations mais après stérilisation).

❖ *A utilisation unique (jetables) :*

-Pipettes Pasteur : est une pipette à bout effilé dont l'une de ses extrémités est cotonnée par du coton cardé pour empêcher les microorganismes de passer, et assez lâche pour permettre une aspiration du liquide. Après utilisation, la pipette Pasteur est désinfectée dans l'eau de Javel puis jetée.

-Lames: est une petite plaque en verre utilisée pour poser et maintenir un échantillon préparé pour une observation au microscope. Après utilisation, on les met dans un cristalliseur contenant l'eau de javel puis on les jets.

-Lamelles : est une petite et fine plaque de verre utilisée pour couvrir un échantillon placé sur une lame pour une observation au microscope. Ayant le même devenir que les lamelles.

Boîtes Pétri en plastique : récipient circulaire, très utilisée en microbiologie, il sert comme un support pour **cultiver les microorganismes**. Après utilisation, elles seront immédiatement incinérées.

❖ *Récupérables (à plusieurs utilisations) :*

-Anse de platine : c'est un fil droit et bouclé en extrémité, il est en platine (métal inoxydable) ou en alliage de nickel-chrome, et doit être protégé des torsions et maintenu en bon état de propreté. Il est utilisé pour **le prélèvement des germes**.

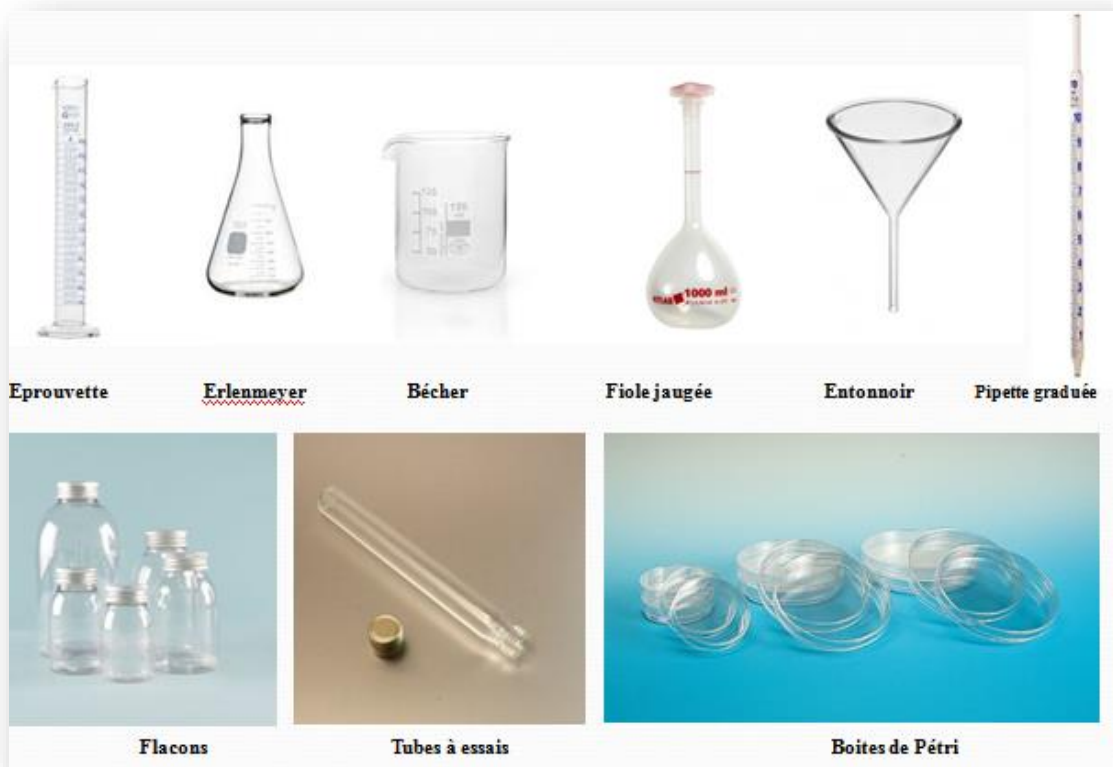
- **Boîte Pétri en verre** : un support pour **cultiver les microorganismes**.

- **La loupe** : utile dans les examens macroscopique des colonies microbiennes.

- **La pince** : instrument métallique ou en bois qui sert à tenir les lames lors des colorations et peut être utilisé également pour cotonner les pipettes graduées avant leur stérilisation.

- **Tubes à essai** : utilisés pour la préparation des dilutions, comme ils peuvent contenir des milieux de culture (solides inclinés, en culot, liquides) ou des réactifs.

- **Différentes verreries** : il existe plusieurs types d'instruments en verre utilisés en microbiologie entre autres : bécher, fiole jaugée, erlenmeyer, pipettes graduées, cellules de Thoma et Malassez (utilisé dans le comptage des cellules)...



4. Les consignes de sécurité :

-Règles à suivre lors des TP de microbiologie

Les TP de microbiologie exigent une tenue exemplaire. Les manipulations doivent y être effectuées avec grand soin, gardant à l'esprit le danger toujours présent qu'entraîne l'utilisation de cultures microbiennes. Voici quelques règles à suivre :

1. Le port d'une blouse est de rigueur. Elle devra toujours être propre.
2. Ne jamais oublier de se laver les mains avant et après chaque séance de TP
3. Désinfecter les paillasse avant et après chaque période de travaux pratiques.
4. L'étudiant(e) aux cheveux longs verra à les attacher surtout lors d'un travail exigeant l'emploi d'un bec à gaz.

5. Eviter de porter ses doigts ou tout objet à sa bouche.
6. Les instruments de travail contaminés ne seront déposés sur table qu'après avoir été stérilisés par un flambage adéquat.
7. Eviter de laisser les becs Bunsen allumés inutilement.
8. Pendant les travaux pratiques, éviter de parler, notamment lorsque des ensemencements sont faits, éviter également de se déplacer inutilement
9. Déposer tout matériel qui n'est pas utile, dans les récipients destinés à cette fin.
10. Etiqueter soigneusement les cultures avant de les porter à l'étuve.

Remarques

-On prendra en garde à conserver **tous les objets dans la zone stérile** du bec bunsen et de ne jamais les faire entrer en contact avec la paillasse. Les **bouchons** des tubes seront passés à la flamme du bec avant et après toute manipulation, tout comme les instruments.

Dans le cas d'utiliser une **Pipette Pasteur** :La pipette est passée rapidement dans la flamme.

A l'aide d'une pince stérile, sectionner la pipette à la pointe scellée Aspirer le bouillon de culture. Ensemencer dans les tubes sans souffler

La pipette Pasteur ne sert qu'une seule fois.

-Ne jamais travailler hors de la zone stérile

-N'oublier jamais de flamber les orifices des tubes contenant les suspensions microbiennes avant et après chaque utilisation ;

-N'oublier jamais de stériliser l'anse de platine ou de flamber la pipette Pasteur avant et après chaque utilisation (les pipettes pasteur sont à usage unique).

TP2: Méthode d'étude des micro-organismes et les différents procédés de stérilisation

1.La stérilisation

La stérilisation est indispensable lors de la préparation du matériel et des milieux destinés aux manipulations, ainsi qu'avant le lavage ou l'élimination du matériel et des milieux utilisés. Dans le premier cas, il est indispensable d'utiliser des méthodes qui ne sont pas susceptibles de gêner la prolifération ultérieure des germes étudiés : on utilise essentiellement des méthodes physiques. Dans le deuxième cas, il sera possible d'utiliser des méthodes plus variées et à effet plus durable (méthodes physiques ou chimiques). Il faut opposer la stérilisation qui est la destruction totale des germes, à la désinfection qui est une destruction plus grossière.

-Définition

La stérilisation est une opération qui vise à détruire tous les micro-organismes d'un objet de façon durable. Elle est notamment utilisée dans la cuisine, la médecine et l'industrie pharmaceutique (médicaments). L'objectif de la stérilisation est double : contrôler les micro-organismes et prévenir une éventuelle contamination

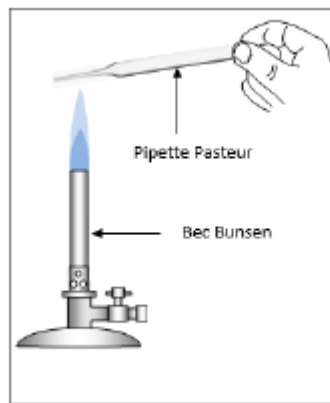
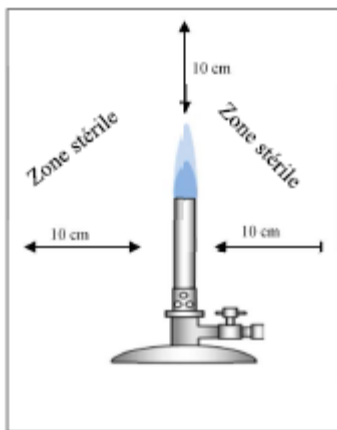
1.1. Stérilisation par les méthodes physiques

1.1.1. Stérilisation par la chaleur sèche

La chaleur sèche tue les micro-organismes en combinant l'oxydation des protéines, par l'oxygène de l'air, et l'enlèvement de l'eau, indispensable au maintien de la structure protéique.

1.1.1.1.Le flambage :

Une technique rapide et complète du petit matériel, utilisée dans les laboratoires de bactériologie, ainsi que dans les hôpitaux et cliniques. Elle s'applique au traitement des surfaces aisément accessibles à la flamme, et en aucun cas à la stérilisation des objets carbonisables. Au laboratoire de microbiologie, le flambage est le passage dans la flamme de bec BUNSEN de la surface de matériel non inflammable. Avec cette façon les fils de platine et les pipettes Pasteur et pipettes graduées, col des tubes à essai, tubes contenant des milieux de culture, erlenmeyers et flacons divers, sont stérilisés. L'échauffement de l'air autour de la flamme assure une zone de convection de 10-15 cm autour du bec dans laquelle l'air est stérile. C'est dans cette zone qu'il faut se situer pour travailler les protocoles de microbiologie



Stérilisation de l'air par flambage

Stérilisation d'une verrerie par flambage

1.1.1.2. Le four Pasteur (Poupinel)

Le stérilisateur de type Poupinel ressemble à un four ménager, non vitré et hermétique, muni de grilles permettant d'y déposer les paquets comme représenté par la Figure3. La chaleur sèche de cet appareil ne peut s'utiliser que sur les matériaux supportant des températures élevées, comme les instruments métalliques, la verrerie, et éventuellement le papier et des tissus. La verrerie à stériliser doit être propre et parfaitement sèche, éventuellement bouchée avec du coton et emballée dans du papier solide. Elle est alors disposée à l'intérieur du four et subit un chauffage à des températures variantes (**Tableau 1**)



Four Pasteur

Tableau 1 : Couples Temps-Température utilisables au four Pasteur

Température	125°	140°	140°	150°	160°	170°	180°
Temps	24h	4h	3h	2h30mn	2h	1h	30mn

1.2.1. Stérilisation par la chaleur humide

1.2.1.1 l'autoclavage

La stérilisation par la chaleur humide aboutit à une hydrolyse des protéines bactériennes par action conjuguée de la chaleur, de l'humidité, et d'une pression élevée, qui permet d'atteindre des températures de vapeur d'eau saturante plus hautes qu'à pression atmosphérique. L'autoclave, enceinte dans laquelle a lieu cette stérilisation, doit donc être capable de supporter de fortes pressions. Il est utilisé pour stériliser les milieux de culture neufs ou souillés, mais peut également stériliser tout autre matériel de microbiologie.

Trois paramètres sont à prendre en compte pour la stérilisation à l'autoclave :

- Pression.
- Température.
- Temps de stérilisation.

Dans une enceinte totalement close, l'augmentation de la température de la vapeur d'eau saturée entraîne également une augmentation de la pression. Autrement dit, à une pression donnée, il n'existe qu'une seule température possible pour la vapeur d'eau saturée

Tableau 2 : Couples Temps-Température utilisable en chaleur humide.

Instrument emballé Instrument non emballé

Température	121°C	126°C	134°C	121°C	131°C
Temps	20mn	15mn	5mn	15mn	3mn



Autoclave

1.2.1.2. La Pasteurisation

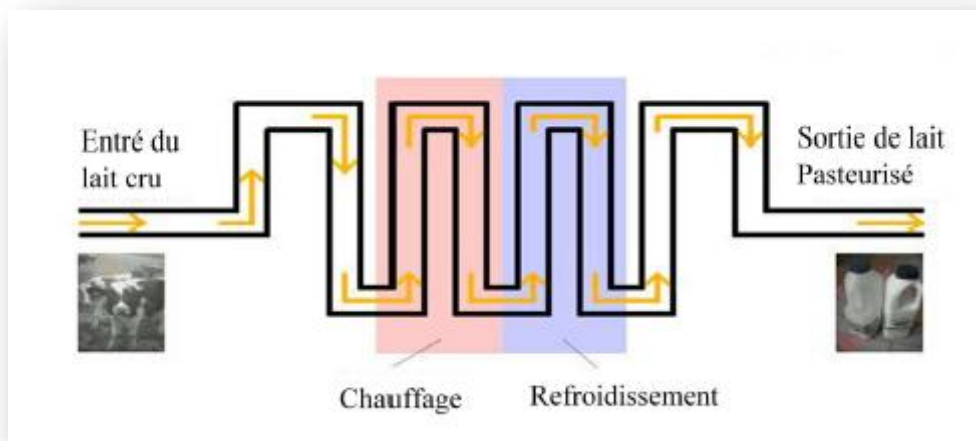
La pasteurisation est un traitement thermique à des températures comprises entre 60 et 100°C ayant pour but de détruire la totalité des micro-organismes pathogènes non sporulés et de

réduire significativement la flore végétative présente dans un produit. La pasteurisation est un procédé consistant à chauffer des produits alimentaires liquides tels que le lait, les jus, les boissons pendant quelques minutes ou secondes à une température la plus basse possible, entre 63 et 95° C, puis à le refroidir de 4 à 14°C de manière à détruire les germes nocifs qui pourraient être présents dans le lait, et réduire le nombre de microorganismes nullement dangereux pour la santé.

NB: *ce n'est pas une stérilisation, les spores ne sont pas tuées.*

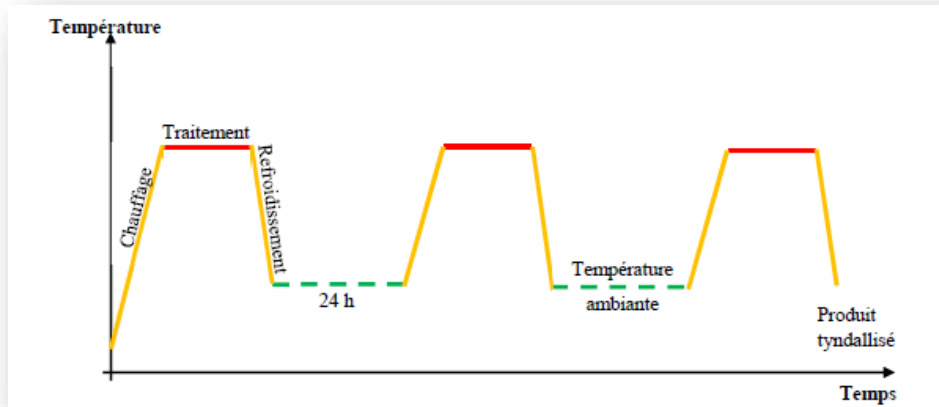
Tableau 3 : Les différents barèmes de pasteurisation du lait.

Température	63°C	72°C	89°C	90°C	94°C	96°C	100°C
Temps	30mn	15sec	1sec	0.5sec	0.1sec	0.05sec	0.01sec



1.2.1.3. La Tyndallisation

Actuellement, la tyndallisation consiste en une série de 3 pasteurisations de 1h. à 70 - 80°C, séparées par un intervalle de 24 heures à température ambiante, ce qui permet la germination et la destruction des spores, sans l'emploi d'une température excessive. Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles contenant sérum, oeuf ou toute substance thermosensible de forte viscosité qui ne peut être stérilisée par filtration.



Les étapes de la Tyndallisation

2. La filtration

La filtration est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 μm . Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre. Cette technique est intéressante lors d'utilisation de produits thermolabiles comme certains acides aminés aromatiques, vitamines, hormones de croissance, acides nucléiques et une bonne partie des antibiotiques.

3. Autres procédés de stérilisation

Certaines matières (Plastiques, Caoutchoucs ...) ne tolèrent pas l'autoclave ou se détériorent rapidement après des expositions répétées à la chaleur.

3.1. Radiations

La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection. Le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. D'autres radiations (rayons X), peuvent servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri en matière plastique et de produit pharmaceutiques

1/ Hottes à flux laminaire : La lumière U.V,est la plus souvent utilisée (lampes germicidesou stéri-lampes).

2/ Les rayons X ou γ : sont utilisés pour la conservation des produits alimentaires.

3.2. Agents chimiques

Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué dans le laboratoire pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en a

TP3 : Méthodes d'ensemencement

L'ensemencement est la mise en culture des microorganismes d'un échantillon donné sur un milieu nutritif. Il vise donc à favoriser la multiplication des germes sur un milieu de culture. Il doit être effectué dans des conditions d'asepsie rigoureuses, à partir d'un échantillon, avec une anse de platine ou une pipette Pasteur. Il peut être réalisé sur un milieu de culture solide ou liquide. Sur un milieu de culture solide, l'ensemencement d'un échantillon donnera naissance à des colonies microbiennes isolées. Dans ce cas, l'ensemencement ou en d'autre terme l'isolement consiste à séparer les divers microorganismes d'un mélange. Il permet :

- D'isoler une ou plusieurs souches contenues dans un mélange ;
- Vérifier la pureté d'une souche étudiée.

-Techniques d'ensemencement

Avant toute manipulation, il faut rassembler tout le matériel dont on a besoin. On l'organise de façon à les avoir dans la zone stérile (à proximité du bec).

Selon l'objectif visé, on utilisera différentes techniques :

1.Sur milieu liquide (en tube)

2.Sur milieu solide

2.1 (en tube)

ensemencement par stries sur milieu incliné

ensemencement par inondation en nappe ou par étalement

ensemencement par piqure centrale profonde ou par piqure périphérique

2.2 (en boîte)

ensemencement par épuisement sur trois ou quatre quadrants

ensemencement par inondation en nappe ou par étalement en surface

ensemencement dans la masse ou étalement en profondeur;

ensemencement en spots

1.Ensemencement dans le tube

❖ *Ensemencement dans le tube de bouillon*

-**Devant le bec**, prendre le tube contenant les microorganismes dans la main gauche, déboucher le et garder le bouchon dans la main droite, ensuite flamber l'ouverture du tube.

-Stériliser l'anse dans la flamme du bec et la laisser refroidir.

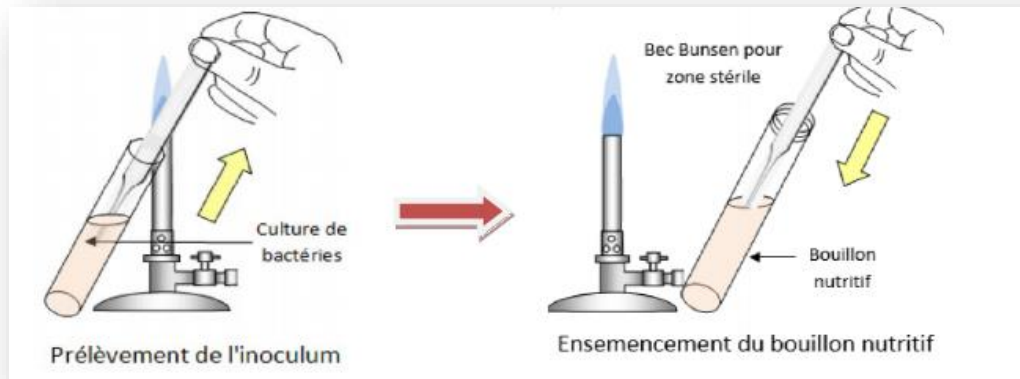
-Plonger l'anse dans la suspension bactérienne réalisée à partir d'une colonie que l'on veut identifier ou confirmer.

-Prendre une goutte de la suspension.

-On la retire sans toucher les parois du tube, l'anneau de l'anse contient une bulle de suspension avec des germes, c'est l'**inoculum**.

-Ensuite reflamber l'ouverture du tube et remettre le bouchon.

- On plonge ensuite l'anse dans le tube de bouillon neuf et stérile (après flambage de son col).
- On l'agite sur toute la hauteur afin de répartir la suspension dans tout le milieu.
- Reflamber l'ouverture du tube ensemencé et refermer le.
- Repasser le fil de platine à la flamme en le portant au rouge.
- Incuber le tube ensemencé dans l'étuve.



2. Sur milieu solide

2.1 (en tube)

ensemencement par stries sur milieu incliné

ensemencement par inondation en nappe ou par étalement

ensemencement par piqure centrale profonde ou par piqure périphérique

2.2 (en boîte)

ensemencement par épuisement sur trois ou quatre quadrants

ensemencement par inondation en nappe ou par étalement en surface

ensemencement dans la masse ou étalement en profondeur;

ensemencement en spots

2.1.1. Ensemencement dans le tube étroit de gélose en culot

Il est ensemencé grâce à une pipette Pasteur en réalisant un **mouvement hélicoïdal** du fond vers la surface, la suspension bactérienne est libérée progressivement. (test type respiratoire)

2.1.2. Ensemencement dans le tube de gélose en culot

L'ensemencement se fait par **piqure centrale** à l'aide d'une **pipette Pasteur boutonnée**, après avoir préalablement chargé celle-ci de suspension bactérienne. (test métabolique)

2.1.3. Ensemencement dans le tube de gélose inclinée (pente)

On utilise l'**anse chargée** de suspension selon le procédé décrit pour le milieu liquide. On réalise des **stries espacées** sur toute la longueur de la pente en commençant par le fond du tube et en remontant. (conservation du microorganisme)

2.1.4. Ensemencement dans le tube de gélose semi-inclinée (culot + pente)

Le culot est classiquement ensemencé par **piqure centrale** par **pipette Pasteur boutonnée** et la **pente par stries** selon le principe de la gélose inclinée. (test type respiratoire)

2.2. Ensemencement dans la boîte de Pétri (*contient le milieu de culture solide*)

2.2.1. Ensemencement en masse (*en profondeur*)

- Incorporer 1 ml de suspension microbienne dans la boîte de Pétri vide.
- Faire couler le milieu de culture en surfusion (45°C).
- Faire homogénéiser les **germes avec toute la masse du milieu**.
- Laisser solidifier puis incubé.

2.2.2. Ensemencement en double couche

- Faire couler une première couche **15ml** du milieu de culture et laisser solidifier.
- Déposer 1 ml de la suspension des germes et ensemencer par étalement.
- Couvrir d'une deuxième couche **5ml** du milieu de culture en surfusion (45°C).
- Laisser solidifier puis incubé.

On crée alors une zone micro aérobie (isolement des anaérobies facultatifs).

2.2.3. Ensemencement en surface

2.2.3.1. Par inondation (*utilisée en antibiogramme*)

- Deux millilitres de suspension microbienne sont déposés à la surface du milieu de culture coulé et solidifié.
- On recouvre la surface totalement, l'excès est éliminé et jeté dans l'eau de javel.
- Déposer un ou plusieurs disques d'antibiotiques à la surface puis incubé.

2.2.3.2. Par étalement (*utilisé pour le dénombrement microbien*)

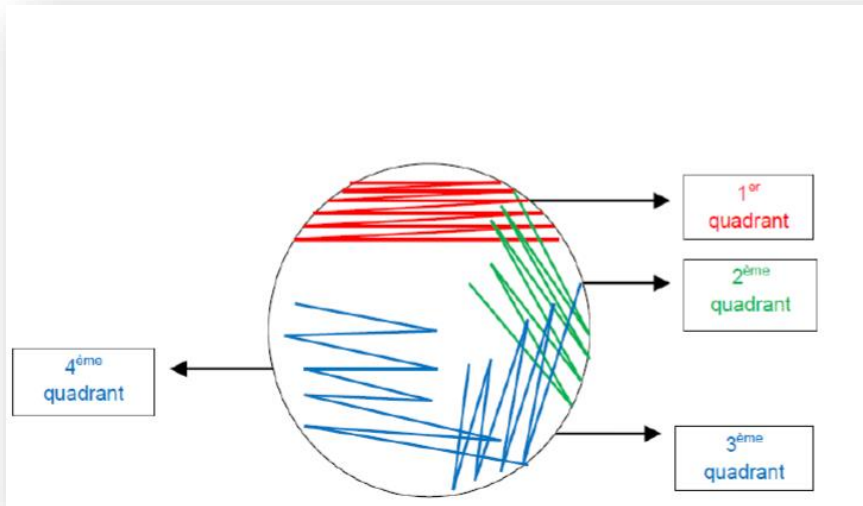
- Déposer 100 µl de suspension du germe à la surface du milieu de culture coulé et solidifié.
- Constituer un râteau (étaioir) à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Etaler la goutte de suspension par ce râteau, puis incubé.

2.2.3.3. Par stries d'épuisement « méthode des cadrans » (*utilisé pour la purification, ...*)

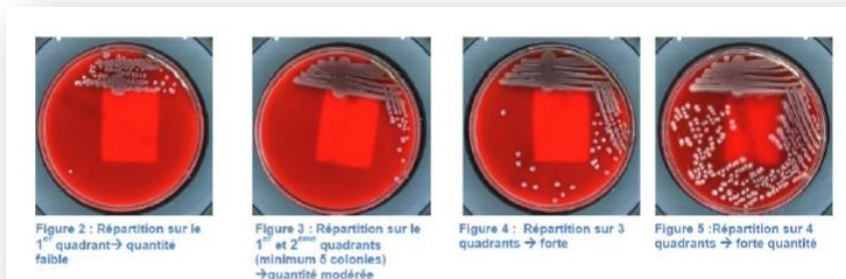
- Faites charger l'öse (anneau) de l'anse de Platine comme décrit précédemment en **titre 2-a**.
- Il faut tenir la boîte par la main gauche et l'an par la main droite.
- Déposer la suspension microbienne au bord de la boîte sur le 1er cadran.

Selon le schéma ci-dessous :

- Tracer à l'aide de l'anneau de l'anse des **stries serrées** sur le 1er cadran (de la manière la plus délicate pour ne pas abimer la gélose).
- Puis Flamber l'öse de l'anse et laisser refroidir.
- On retourne la boîte vers le 2ème cadran et on le trace de la même façon du premier.
- On retourne la boîte vers le 3ème cadran, on l'ensemence cette fois-ci par des **stries non serrées** mais éloignées ne recoupant pas le dépôt précédent.



Technique d'ensemencement par épuisement (4 quadrants)



Résultat de la technique d'ensemencement par épuisement après incubation

N.B. Dans certains cas, l'échantillon à étudier nécessite une dilution préalable avant l'ensemencement. Cette dilution va nous aider à avoir des colonies bien isolées ce qui va nous faciliter l'estimation quantitative du contenu microbien de notre échantillon (expliquer la dilution décimale et le dénombrement sur milieu solide).

TP 4 : Etude microscopique des bactéries, coloration simple.

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce bactérienne. Elle comprend :

L'état frais

1. But: observer les bactéries **vivantes**. Ceci permet de:

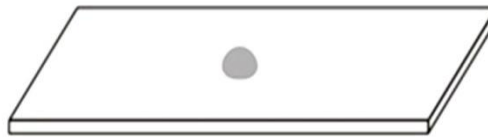
- Mettre en évidence leur **mobilité**.
- Mettre en évidence leur mode de groupement.
- Faire une approche de leur morphologie.

2. Technique

2.1. A partir d'une culture

L'examen à l'état frais se pratique sur les **cultures en milieu liquide** (en milieu solide, la mobilité s'exprime mal et de façon aléatoire).

• **Homogénéiser** la culture liquide à prélever.



• **Prélèvement:** prélever une goutte de culture liquide (à la pipette Pasteur ou à l'anse de platine) et la déposer sur une lame propre.



Attention! Une goutte trop grosse risque de déborder à l'étape suivante.

• **Pose de la lamelle**, en partant d'une position inclinée à 45°. **Attention!** Le liquide ne doit pas déborder.



2.2. A partir d'un produit pathologique

La préparation se fera, soit directement à partir du produit, soit à partir d'une dilution (si produit solide ou très visqueux), soit après concentration par centrifugation.

L'examen à l'état frais des produits pathologiques ne doit pas être systématique; dans certains cas, il est indispensable.

3. Observations à l'objectif x40

Observation de la mobilité: une bactérie est dite **mobile** si elle se déplace dans le champ du microscope avec un **mouvement qui lui est propre**, les autres bactéries restant immobiles ou se déplaçant dans une autre direction.

Cet examen permet d'apprécier la forme et parfois la mobilité des germes étudiés.

Technique :

1. À partir d'une culture en milieu liquide :

Déposer sur une lame propre soit le contenu d'une « anse de platine » soit « une petite goutte » à l'aide d'une pipette Pasteur. Recouvrir la goutte d'une lamelle, éviter les bulles d'air. Et recommencer au besoin.

2. À partir d'une culture sur milieu solide :

Déposer une gouttelette de liquide (milieu liquide ou eau) sur la lame. Prélever une trace de culture à l'anse de platine et l'émulsionner dans le liquide.

Attendre éventuellement quelques dizaines de secondes la disparition des mouvements liquidiens.

Ne pas prolonger le temps d'observation au-delà de quelques minutes.

4.Examen après coloration

L'examen après coloration permet d'observer des bactéries tuées fixées sur une lame et ayant subi l'action d'un ou plusieurs colorants. Les colorations, réalisées sur des frottis sèches et fixes, sont classées en :

- ❖ Coloration simple (un seul colorant)
- ❖ Coloration différentielle type Gram
- ❖ Colorations spéciales des structures bactériennes (capsules, spors...).

Remarque :

La réalisation de frottis de bonne qualité est une condition préalable à toute coloration

-préparation du frottis:

Les frottis doivent être étalés en couche mince et régulière, puis séchés et fixés.

-Etalement sur lame de verre :

1. Notez la référence de l'échantillon sur une lame parfaitement propres et dégraissées,
2. Prélevez stérilement à l'aide d'une anse de platine une goutte de culture bactérienne et étalez un film mince,

-Séchage :

Le séchage est effectué à l'aire libre jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

-Fixation du frottis sec :

Cette étape consiste à tuer les bactéries et les coller sur la lame, sans en altérer la structure.

La fixation s'effectue par la chaleur :

La lame, tenue par une pince (frottis situé sur le dessus) est passée 3ou 4 fois dans la flamme du bec Bunsen. Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration.

4.1. Coloration simple

4.1.1. Coloration au bleu de méthylène

Sur le frottis fixé et refroidi :

- Faire couler la solution de bleu de méthylène phéniqué jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte.
- Laisser agir 1 minute.
- Rincer abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès.
- Sécher à l'air ou sur une platine chauffante, ou encore sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans frotter.
- Examiner au microscope, objectif à immersion.

Résultats

Les bactéries sont colorées en bleu sombre.

Cette coloration est intéressante pour **l'observation rapide des frottis**, mais elle permet seulement l'étude de la **morphologie des bactéries**.

Il est donc souvent nécessaire de la compléter par une coloration de Gram.

4.1.2. Coloration différentielle

-Coloration de Gram (qui va être détaillée dans le tp6)

TP 5 : Etude morphologique des différentes colonies bactériennes sur milieu de culture

Etude morphologique des colonies bactériennes :

L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées. La colonie peut apparaître à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies.

-L'étude macroscopique :

Définition d'une colonie bactérienne : c'est l'amas, visible à l'œil nu, constitué par des milliards de descendances d'une seule cellule bactérienne vivante à la surface ou à l'intérieur d'un milieu de culture solide.

1. Etude macroscopique (l'aspect) des colonies

La première étape du diagnostic bactérien et du biotypage d'une souche est la description macroscopique des colonies isolées ; parfois cette seule étude permet de connaître le germe qu'on a en présence car les colonies sont typiques....

Cette description doit mentionner :

- **La taille :** diamètre des colonies. Vous pouvez mesurer cette taille à l'aide d'une règle graduée. On distingue :

- Colonies punctiformes : Colonies à peine visibles, dont la taille est inférieure au millimètre

- petites colonies : Colonies dont le diamètre est compris entre 1 et 2 mm

- Colonies moyennes : Colonies dont le diamètre est compris entre 3 et 5 mm

- Grosses colonies : Colonies dont le diamètre est supérieur à 5 mm

- **La vue de profil (élévation)** (bombée, plane, ombiliquée, à bords surélevés ou en oeuf au plat) et **avec vue de dessus (bords ou contours)** (bords : dentèles, en étoile, ovoïde, régulière, ondulée, lobée).

- **L'aspect de la surface** (lisse, rugueuse, brillante).

- **L'opacité.** Les colonies opaques ne laissent pas passer la lumière contrairement aux translucides. Certaines sont très transparentes, car ils laissent passer la lumière.

- **La consistance.** Elle se juge au moment du prélèvement. On distingue les colonies crémeuses des sèches et des muqueuses (gluantes).

- **La couleur ou pigmentation.** Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donne un aspect bien caractéristique à la colonie (rose, jaune, rouge), tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu.

• **L'odeur** Présence ou absence, essayer d'en déterminer la nature

2. Aspect des colonies en profondeur :

- Colonies régulières en formes de lentilles,
- Colonies irrégulières de formes diffuses et floues.

3. Aspect des colonies en surface sur gélose linéaire

- Filiformes
- Légèrement envahissantes avec bords ondulés
- Légèrement envahissantes avec bord érodé
- Envahissante

4. Aspect de la pousse

Les bouillons nutritifs sont aussi utilisés pour cultiver les bactéries. Dans un bouillon la croissance microbienne se traduit par l'apparition d'un trouble ou opalescence mais l'aspect varie selon les espèces

4.1. Milieu liquide :

- ❖ Repiquer à l'aide d'une anse de platine des colonies différentes dans des tubes de bouillon nutritifs
- ❖ Flamber l'anse après chaque repiquage
- ❖ Incuber à 37 °C pendant 24 à 48h
- ❖ Observer les différents aspects de pousse en milieu liquide

4.2. Milieu solide :

- Repiquer différents aspects et formes de colonies sur des tubes de géloselinéaire
- Incuber à 37°C pendant 24 h
- Observer les différents aspects.

TP 6 : Coloration de Gram

Objectif du TP :

Savoir comment faire la coloration de Gram, et comment faire la mise au point du microscope optique pour bien visualiser la forme, la structure des microorganismes

1.Introduction

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en Gram négatif. C'est une "coloration double", qui permet de différencier les bactéries: d'après leur forme et d'après leur affinité pour les colorants. Cette distinction est fondamentale pour leur identification. En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après cet temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

2.Réactifs

- Violet de gentiane phénique
- Lugol (iodo-iodure de potassium)
- Alcool à 95% (ou mélange alcool absolu + 1/5ème d'acétone)
- Safranine (ou Fuchsine phéniquée de Ziehl)

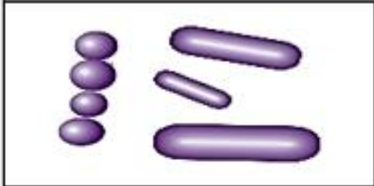
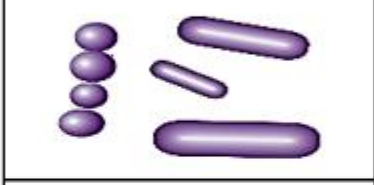
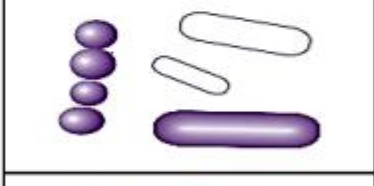
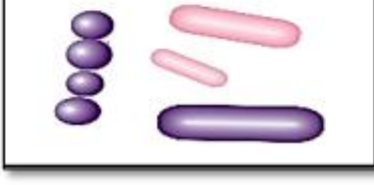
3.Mode opératoire

- Réaliser un frottis et le fixer à la flamme
- Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute
- Jeter le colorant et finir de le chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol environ 1 min
- Jeter le Lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau
- Recouvrir la préparation de Safranine, laisser agir environ 1 min. laver abondamment.
- Sécher au dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

4.Résultats

A l'issue de cette coloration, on peut distinguer :

- Des bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, 'le gram' elle sont dites 'Gram positif' ;
- Des bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, 'le Gram' elles sont dites 'gram négatif'.

	Étapes de la coloration	États des bactéries
	Étape 1 : Cristal violet (colorant primaire) pendant une minute. Rincer à l'eau.	Les cellules sont violettes.
	Étape 2 : Iode/iodure (mordant) pendant une minute. Rincer à l'eau.	Les cellules sont violettes.
	Étape 3 : Alcool (dénaturant) pendant 10-30 secondes. Rincer à l'eau.	Les cellules Gram-positives sont violettes ; les cellules Gram-négatives sont incolores.
	Étape 4 : Safranine (contre-colorant) pendant 30-60 secondes. Rincer à l'eau. Sécher.	Les cellules Gram-positives sont violettes ; les cellules Gram-négatives sont roses.

La technique de coloration de Gram

TP 7 : Les milieux de culture

-Introduction

Les micro-organismes exigent pour leur croissance des aliments. Ces aliments leur sont fournis au laboratoire par des milieux nutritifs ou milieux de culture. Un milieu de culture est une préparation. Un milieu de culture est une préparation stérile utilisée pour faire croître, repiquer ou conserver les bactéries, les levures et les moisissures afin de, au sein de laquelle ils peuvent se multiplier, il doit donc satisfaire aux exigences nutritives (une source d'énergie, de carbone, d'azote, les ions essentiels : calcium, sulfate...) et physique (pH, température, l'eau, l'isotonie) du microorganisme étudié. Comme les besoins nutritionnels des microorganismes et les conditions de leurs développements sont très variés, il n'existe évidemment aucun milieu universel sur lequel tous les microbes soient capables de se multiplier. Toutefois, certains milieux conviennent au développement d'une grande variété de germes microbiens ; le choix de tels milieux repose sur la connaissance de l'habitat naturel et de la physiologie alimentaire du groupe de germes que l'on désire cultiver. Ils sont répartis, à différents volumes, dans des récipients de laboratoire en verre ou en plastique (tubes à essais, boîtes de Pétri, flacons, Erlenmeyer : stérilisés au préalable...).

D'une manière très générale, on peut distinguer

1. Selon leur consistance

1.1. Milieu liquide : ne contenant pas l'agar agar par exemple : bouillon nutritif, la croissance se traduit par un trouble ou des dépôts et des voiles superficiels.

Exemple : bouillon nutritif BN, Bouillon trypticase soja (TSB), Brain-Heart Infusion Broth BHIB ect...

1.2. Milieu solide : On obtient les milieux solides en ajoutant un agent gélifiant à un milieu liquide. Le gélifiant le plus utilisé est l'**agar-agar** ou gélose : il s'agit d'un polygalactoside sulfaté présentant la propriété de former avec l'eau un gel solide à une température inférieure à environ 60 °C tout en étant liquéfiable par ébullition, auquel cas, il reste en surfusion (liquide) jusqu'aux environs de 45°C. D'autre part, très peu de micro-organismes sont capables d'hydrolyser l'agar.

Les milieux solides contenant généralement 1.5-2% (15-20 g.L⁻¹) d'agar agar ; ils peuvent s'utiliser de plusieurs façons : gélose inclinée en tubes à essai, culot en tube droit ou couche mince en boîtes de pétri. La croissance des microorganismes se traduit par la formation des colonies. Exemple : Gélose nutritive GN, Gélose trypticase soja (TSA), gélose MacConkey, Gélose Muller-Hinton... etc.

Milieu semi-solide : contenant 0.5-0.75 (5-7,5 g.L⁻¹) % d'agar agar, exemple : Hugh et Leifson, viande foie...

2. Selon leur composition

On distingue 2 types de milieux

2.1 Les milieux complexes ou empiriques : De composition complexe, mal définie, ils peuvent être :

-d'origine animale : lait, sérum, bouillon et gélose nutritive, gélatine, etc.

-d'origine végétale : peptone de soja, pomme de terre, etc. exemple de milieux ; Gassner, Tryptycase soja, gélose au Chocolat, gélose au sang, etc.

2.2 Les milieux synthétiques ou définis : dans lesquels tous les composants sont connus qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont surtout utilisés pour l'étude des bactéries autotrophes (non exigeantes) ou pour étudier les besoins nutritifs d'un germe. Ils sont rarement utilisés en routine à l'exception de quelques-uns : **Citrate de Simons, Citrate de Christensen, Urée-Tryptophane.**

3.Selon leur utilisation : On distingue en général 4 types principaux de milieux :

3.1 Milieux de-base ; appelés aussi milieux usuels non sélectifs, on regroupe sous ce vocable tous les milieux ne contenant aucune molécule inhibitrice. Ils sont en général de préparation assez simple et généralement peu coûteuse, ces milieux contiennent une base nutritive constituée de molécules azotées (acides aminés, molécules organiques diverses...) provenant de l'hydrolyse de produit d'origine vivante animale, végétale, mycélienne) comme les peptones, les extraits de viande ou de levure exemple **gélose et Bouillon nutritif, gélose et Bouillon Muller-Hinton** . cependant il n'existe pas de milieux universels. Pour les bactéries, c'est la gélose ou bouillon ordinaire ou nutritive et le Bouillon trypticase soja. Pour les champignons, le milieu Sabouraud est utilisé pour la culture des levures et moisissures.

3.2. Milieux d'isolement : milieux solides sur lesquels de nombreuses colonies peuvent se développer. La séparation de ces dernières permet la préparation de cultures pures qui constituent le point de départ d'une identification. Ces milieux incluent :

3.2.1. Milieux d'enrichissement : Ce sont des milieux liquides ou solides favorisant la croissance des micro-organismes recherchés (substrats spécifiques et/ ou conditions de cultures particulières).

Exemple : gélose au sang pour *Streptococcus* sp.

3.2.2. Milieux sélectifs : permettent uniquement la culture de certains genres de micro-organismes. Pour cela on ajoute des éléments qui inhibent la croissance des micro-organismes indésirables.

Exemple : gélose Chapman pour les Staphylocoques.

3.2.3. Milieux différentiels : permettent de distinguer ou de sélectionner un groupe particulier de microorganismes, se développant dans un même milieu et même d'identifier des micro-organismes sur la base de leurs caractéristiques.

Exemple : Gélose MacConkey pour les bactéries fermentant ou pas le lactose.

3.3. Milieux d'identification : milieux servant à mettre en évidence un ou plusieurs caractères chez une souche microbienne précédemment isolée. Exemple : extrait de Malt pour l'identification des champignons, géloses King A ou King B pour les *Pseudomonas*.

3.4. Milieux de conservation : ce sont des milieux pauvres qui maintiennent les micro-organismes dans un état de vie ralentie.

3.5. Milieu minimum : Un milieu minimum est un milieu ne contenant que les éléments nécessaires aux besoins essentiels (élémentaires et énergétiques). Seuls les prototrophes sont capables de se développer sur un tel milieu.

TP 8 : Etude de la croissance bactérienne

La croissance se définit comme l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme. Chez les organismes pluricellulaires elle conduit à une augmentation de taille ou de masse, chez les organismes unicellulaires (bactéries, levures par exemple) elle aboutit essentiellement à une augmentation du nombre d'individus

On effectue une étude des paramètres de la croissance **des microorganismes du sol**

1. Méthodes indirectes : (après culture)

Bactérie + éléments nutritifs (C, N, O₂, etc...) Biomasse cellulaire + Produits

Le dénombrement se base sur l'évaluation de cette biomasse soit par :

*Mesure de la masse après culture sur milieu de culture liquide :

La biomasse peut être évaluée par pesée du poids sec après filtration et séchage ou par mesure de la Densité du trouble (DO au spectrophotomètre)

* **Mesure de l'activité des bactéries**, en suivant la cinétique de disparition d'un substrat ou celle de l'apparition d'un produit final.

*Mesure du nombre de bactéries :

- Dilution et dénombrement en milieu de culture solide
- Estimation du nombre le plus probable (MPN)

2. Différence entre les méthodes directes et indirectes :

Méthodes directes: comptent directement les cellules, leur résultat est rapide, mais peuvent compter aussi bien les cellules mortes que les cellules vivantes.

Méthodes indirectes: ne comptent que les cellules viables et cultivables dans un milieu de culture ; mais demandent du temps (minimum 24h).

Selon le but recherché et la précision du dénombrement requise, on choisit l'une ou l'autre des méthodes. Comme le nombre de bactéries à compter n'est pas connu au départ, et pour avoir au moins une boîte où on peut aisément compter le nombre de colonies, on procède généralement à une dilution de l'échantillon avant d'ensemencer le milieu de culture.

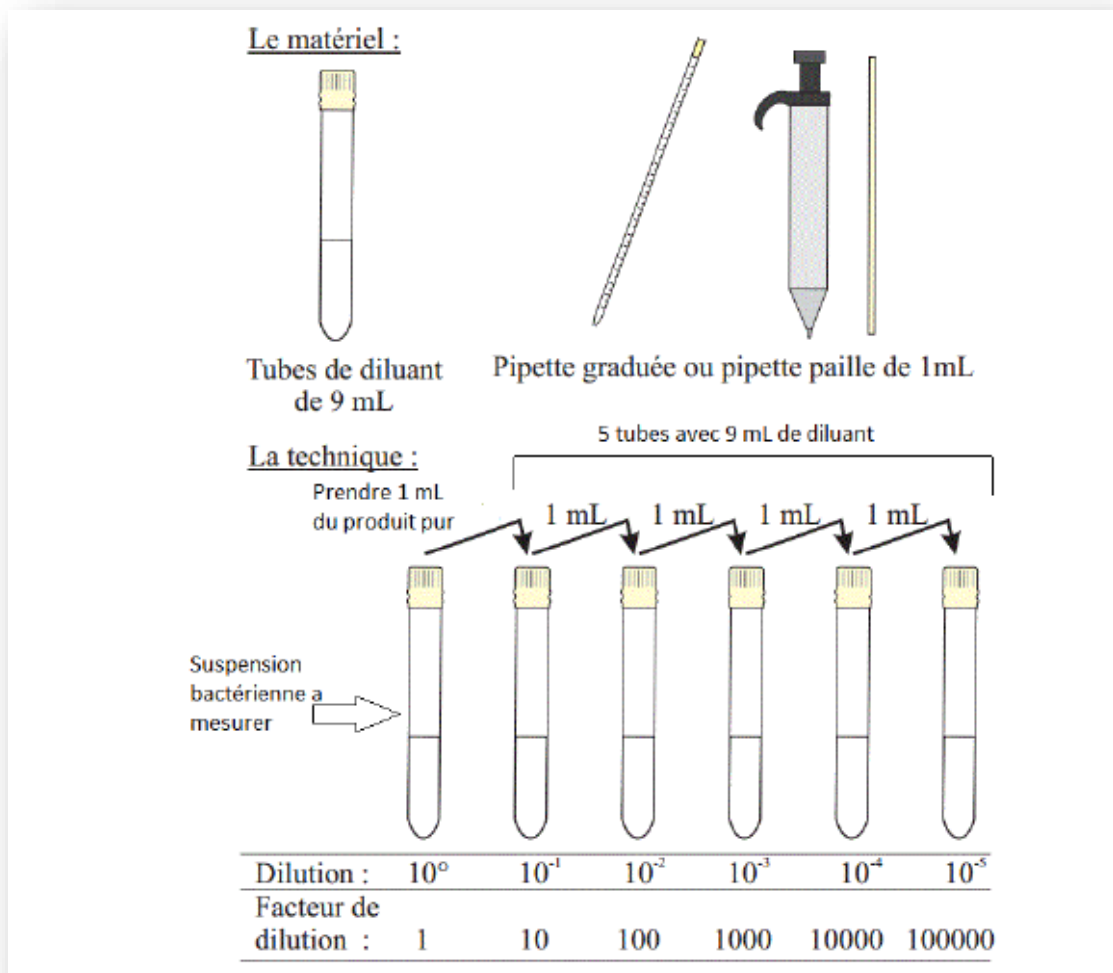
Après la préparation de la solution mère (1g de sol dans 9ml d'eau physiologique) on passe aux dilutions

3. Réalisation de la dilution de facteur 10: Homogénéiser la suspension microbienne à prélever (agitation par mouvements circulaires pendant 10 secondes environ ou à l'aide d'un vortex).

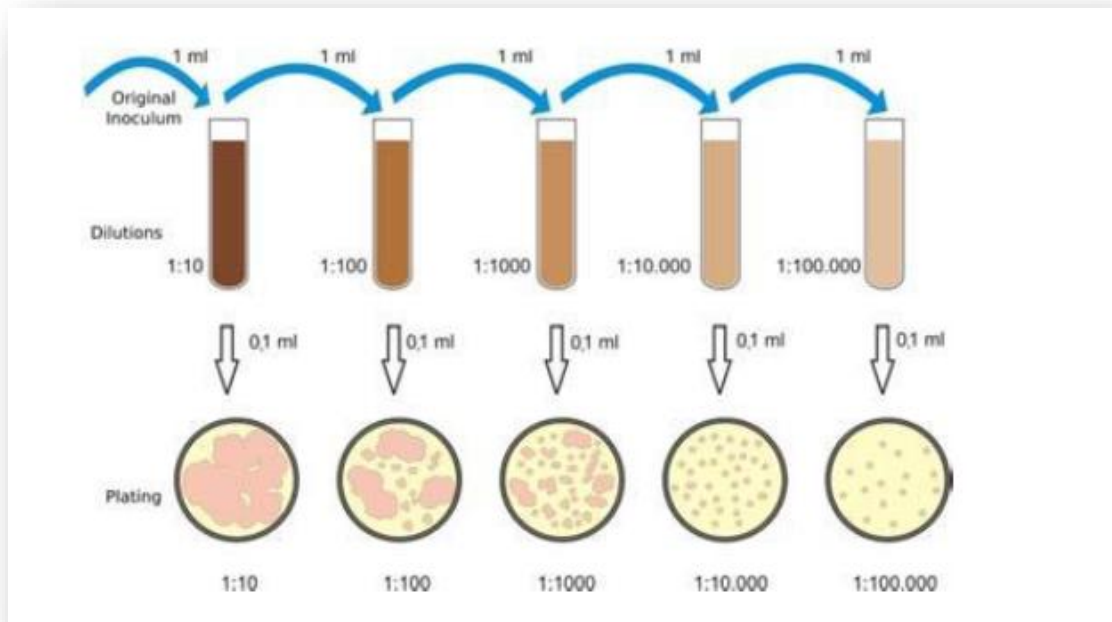
- Ouvrir et flamber l'ouverture du tube.
- Prélever 1mL de suspension à l'aide de la pipette graduée stérile (ne pas introduire la pipette dans la suspension de plus de 1cm).
- Flamber et refermer le tube.

- Ouvrir le tube de 9 mL de diluant, flamber l'ouverture y introduire le volume prélevé (éviter tout contact entre la pipette contenant l'inoculum et le diluant stérile).
- Flamber et refermer le tube.
- Jeter la pipette souillée dans le bac à eau de javel.

La dilution suivante s'effectue comme la dilution décrite ci-dessus mais en partant du tube de la dilution



De chaque dilution on prélève 0,1 ml et on ensemence une boîte de Petri avec un milieu de culture (gélose nutritive) puis on étale le prélèvement (0,1ml) avec un râteau. On laisse quelques minutes puis on incube dans un incubateur à 30° C pendant 24H.



Après incubation, on ne considère que les boîtes de GN où on peut compter facilement le nombre de colonies apparues. Pour une même dilution, on refait plusieurs essais, pour avoir un nombre moyen et augmenter la précision du dénombrement.

Parmi les boîtes comptables on ne considèrera que la boîte qui a donné un nombre de colonies compris entre 30 et 300 colonies.

Si le nombre est inférieur à 30, il n'est pas statistiquement significatif.

Si le nombre est supérieur à 300, on risque de sous-estimer le nombre de bactéries du fait qu'il peut y avoir une compétition entre ce grand nombre de bactéries vis à vis des éléments nutritifs disponibles et vis à vis de l'espace et par la suite une inhibition d'une bonne proportion de cellules au niveau de la boîte. Après avoir choisis la boîte on dénombre les colonies puis on applique la formule suivante : $N = n \times 1/D \times 10 \text{ UFC/ml}$

N le nombre dans la solution mère ; n le nombre des colonies compté sur la boîte ; D : facteur de dilution ; 10 volume ensemencé 0,1ml. L'unité utilisée est l'Unité Formant Colonie (U.F.C.) : c'est une unité plus précise que l'unité bactéries/ml dans ce cas. Car on compte le nombre d'unités qui forment des colonies, quelque fois, plusieurs bactéries côte à côte pouvant donner une même colonie. Il est donc plus exact de parler du nombre d'unités formant colonies que de nombre de bactéries.

TP 9 : Critères d'identification biochimique des bactéries

En plus de l'étude des caractères morphologiques et culturaux, on identifie aussi une bactérie en observant si elle utilise tel ou tel substrat. On la met donc en contact dans un milieu de culture avec un glucide, ou un peptide, ou d'autres substrats plus complexes. En général, l'utilisation d'un substrat est révélée par le virage d'un indicateur de pH (par exemple : un glucide utilisé donne un produit acide, un peptide donne un produit basique, etc..) mais toujours appréciée à l'oeil nu.

L'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ces caractères biochimiques, il existe actuellement deux types la méthode par la galerie biochimie classique et la méthode automatisée galerie api ,on cite à titre d'exemples quelques caractères qui sont en l'occurrence

1. l'étude des enzymes respiratoires terminales Recherche de l'oxydase et de la catalase

Des tests d'orientation rapides sont réalisés en fonction du Gram et des résultats des caractères morphologiques et culturaux

1.1 Test de catalase

C'est une enzyme décomposant l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux.

$H_2O_2 \rightarrow \frac{1}{2}O_2 + H_2O$. La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier (ex. les staphylocoques pour les Gram + et les entérobactéries pour les Gram -) sur l'extrémité d'une anse de platine que l'on plonge ensuite dans une goutte d'eau oxygénée (à l'aide d'une pipette Pasteur). Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme (cf. Fig. 9)..



Test de catalase

1.2 Test d'oxydase

Appelé aussi phénylène diamine oxydase est une enzyme intervenant dans divers couples d'oxydo-réduction. Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram (-).

Placer un disque d'oxydase sur une lame propre et stérile. Déposer à l'aide d'une pipette Pasteur (il est strictement interdit d'utiliser l'anse de platine pour ne pas fausser le résultat) une goutte de suspension bactérienne pure sur " un disque oxydase", celui-ci contient de

l'oxalate de diméthyl paraphénylène diamine. Les bactéries oxydase-positives donnent rapidement une coloration violette foncée ; dans le cas contraire, il n'y a pas de coloration .



Test d'oxydase

2. Etude des caractères biochimiques

Le métabolisme glucidique

Étude des différentes voies fermentatives intermédiaires

3. Galeries d'identification: Système API Méthodes automatisées

-Généralités

Elles utilisent le même principe que les techniques biochimiques conventionnelles dans l'identification des bactéries. Elles se présentent sous forme de cupules prêtes à l'emploi contenant le substrat lyophilisé nécessaire aux différents tests biochimiques. Version miniaturisée et standardisée, elles ont l'avantage de standardiser les caractères biochimiques recherchés pour améliorer la reproductibilité inter-laboratoire en éliminant le choix subjectif des tests « importants » pour la caractérisation, elles limitent la variabilité technique (utilisation de système de distribution possible).

Leur utilisation est simple. Selon le type de galerie, l'inoculum et le milieu de suspension varient . Le rendu des résultats repose sur le principe de l'identification numérique, il repose sur le calcul pour le profil observé.

3.1. La galerie Api 20 E:

La galerie API 20E compte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs

Une galerie API est un ensemble de petits tubes prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés



3.2.Choix de la galerie

Le choix de la galerie àensemencer dépend des résultats de l'étude des caractères morphologiques, cultureux et biochimiques qui ont été étudiés précédemment (oxydase, catalase...) et qui sont indispensables pour l'interprétation de la galerie Api.

Ainsi, les galeries disponibles dans notre laboratoire permettent d'identifier un ensemble de bactéries Gram positif et négatif (cf. catalogues analytiques des galeries) qui présentent un risque négligeable (P1) ou faible (P2) et dont la manipulation est autorisée aux étudiants dans un laboratoire pédagogique.

-La galerie Api 20 NE est destinée à l'identification des coques ou bacilles Gram négatif, peu exigeants (bacilles autres que les entérobactéries) et oxydase positif (*Pseudomonas* et apparentés, Vibrionaceae, Aeromonadaceae).

-La galerie Api Staph permet l'identification des staphylocoques et des microcoques.

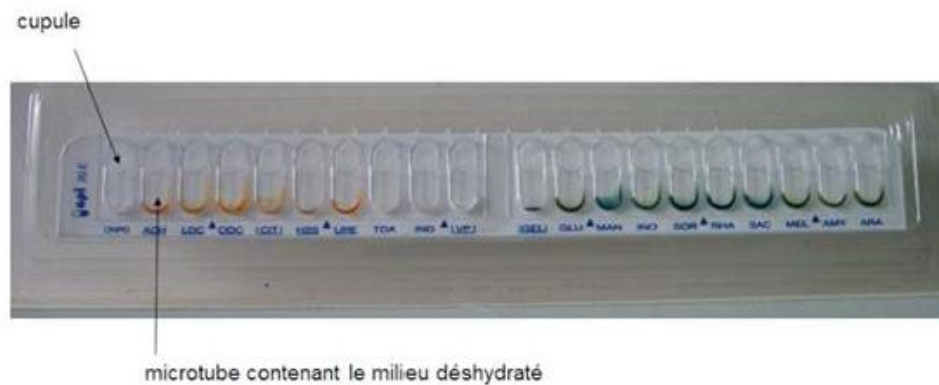
-La galerie Api 20 Strep assure l'identification des streptocoques, entérocoques et les bactéries apparentées (notamment quelques espèces du genre *Listeria*) en 4 ou 24 heures

3.3.Exemple de galerie API 20E

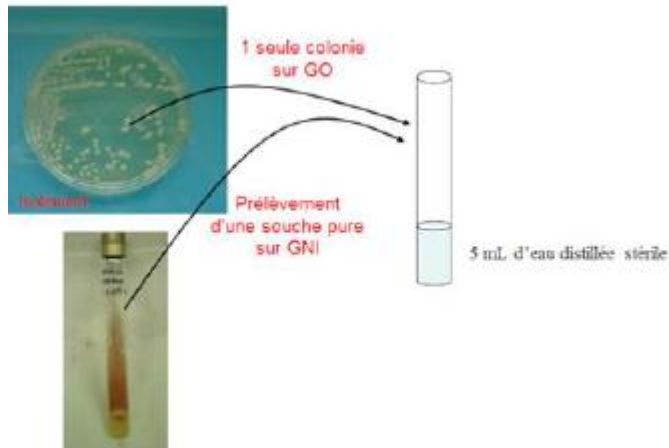
3.3.1..Présentation de la galerie

galerie de 20microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles à Gram - appartenant a la famille des Entérobactriaceae

3.2.2.Préparation



3.2.3.Préparation de l'inoculum

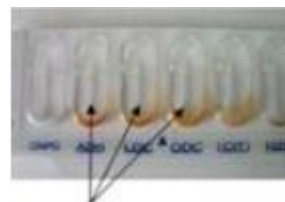


3.2.4. Ensemencement de la galerie Api20 E

Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le coté pour éviter la formation de bulles



Pour certains caractères



Remplir de suspension le tube et la cupule Remplir la suspension puis recouvrir de l'huile de paraffine

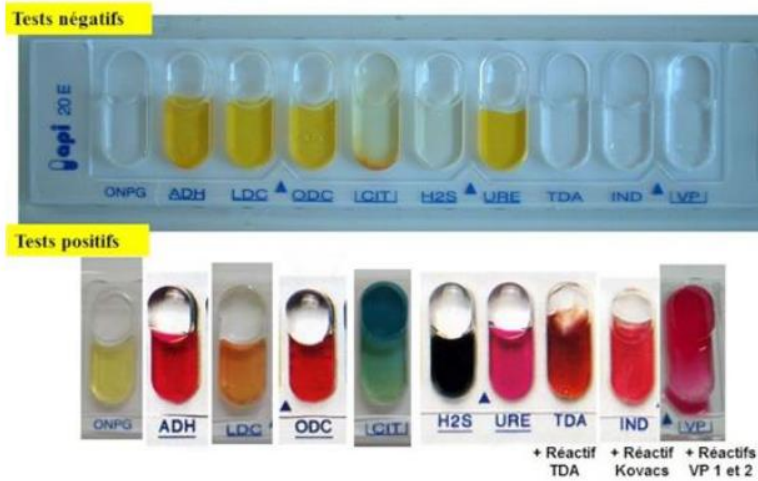
pour les tests: **ADH LDC ODC H2S UREE**

pour les tests: **CIT VP GE L**

3.2.5. Lecture de la galerie API 20E

le virage de la couleur indique la positivité ou négativité du test.

Pour les 10 premiers tests

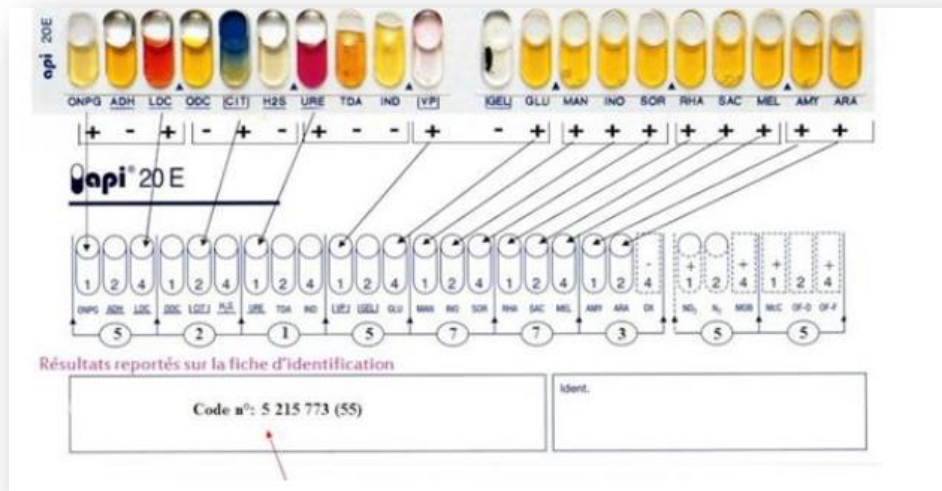


Pour les 10 derniers tests:



3.2.6. Identification de la souche

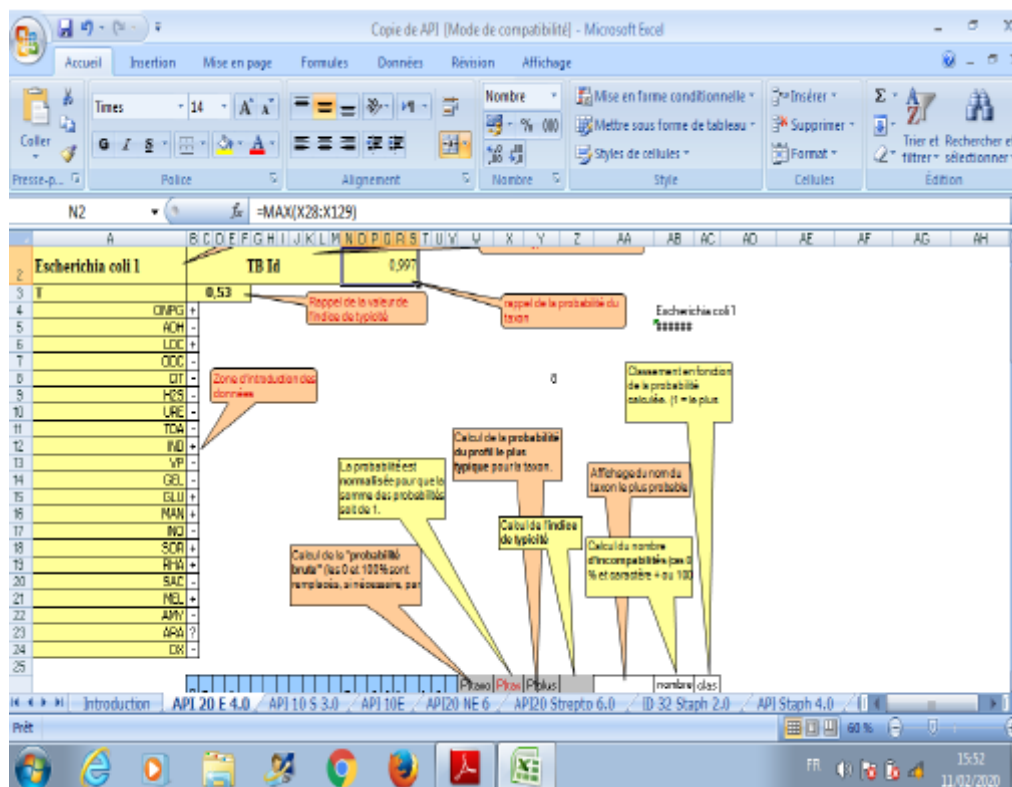
Résultats de la galerie



Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code

La lecture peut se faire plus facilement grâce à l'utilisation du logiciel d'identification.

Les bases de données des galeries Api sont désormais intégrées par APIweb TM afin de faciliter leur interprétation.



Feuille Excel de lecture de la galerie Api (Excel Microsoft).

TP 10 : Levures et cyanobactéries

1. Levure: *Saccharomyces cerevisiae* "La levure" est l'un des êtres vivants les mieux connus et à côté de son utilisation millénaire dans la fabrication de différents aliments, elle constitue l'un des outils les plus utilisés dans la biotechnologie, notamment en génie génétique.

Introduction *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme unicellulaire eucaryote appartenant aux champignons. Elle est utilisée depuis les siècles par l'homme dans la fabrication des boissons alcooliques et pour faire lever les pâtes, par l'utilisation de la propriété de fermentation alcoolique. *Saccharomyces cerevisiae* se présente sous forme de cellules isolées, ovoïdes ou arrondies, longues de 6 à 12 μm et larges de 6 à 8 μm , et elle possède une paroi qui protège la cellule de composition différente de celle des végétaux.

Classification Règne: Fungi Embranchement: Ascomycota Classe: Saccharomycetes Ordre: Saccharomycetales Famille: Saccharomycetaceae Genre: *Saccharomyces* Espèce: *cerevisiae*

Matériel: Microscope optique -Levure de boulanger -Boîte de pétri -Sucre -Eau -Lame et lamelle

1.1 Examen macroscopique: on observe attentivement

-**La texture** :crémeuse, laiteuse ou coulante

-**La couleur** : la majorité es levures est est de couleur blanche à beige.Un certain nombre produit des pigments caroténoïdes; les colonies sont alors colorées en orange ou en rouge.

1.2 Examen microscopique

-**Protocole opératoire:** -on étale soigneusement sur une lame portant une goutte de bleu de méthylène une pointe de pipette de culture de levure de *Sacchromyces cerevisiae* (la levure boulangère), que l'on couvre d'une lamelle

On observe au microscope, puis on dessine en tenant compte de

-**La forme:** ronde ou ovoïde

-**La taille:** petite, moyenne ou grande

-**La présence de bourgeons:** uni-bi-,multipolaires, ou multilateraux

2. cyanobactéries

Les cyanobactéries, ou cyanophycées, ou encore algues bleues (leurs anciens noms), sont des bactéries photosynthétiques, c'est-à-dire qu'elles tirent parti, comme les plantes, de l'énergie solaire pour synthétiser leurs molécules organiques. Pour capter cette lumière, elles utilisent différents pigments : des phycocyanines (de couleur bleu-vert) ou la chlorophylle. Leur photosynthèse, comme celle des plantes, produit du dioxygène (la molécule d'oxygène O_2), à la différence des autres bactéries photosynthétiques (chlorobactéries et rhodobactéries), qui utilisent le soufre à la place de l'eau. Elles sont unicellulaires ou filamenteuses, certaines sont mobiles mais elles sont dépourvues de flagelles. On parle de

mobilité par glissement liée à une sécrétion de l'enveloppe mucilagineuse. Ces mouvements peuvent être dirigés vers une source lumineuse ou un gradient chimique.

2.1. Conditions de culture

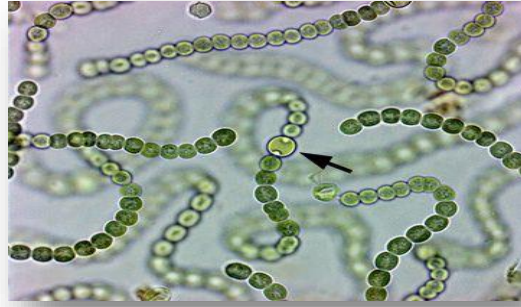
La multiplication des cyanobactéries est très longue même dans les conditions optimales.

Milieu de culture : Les cyanobactéries poussent sur un milieu minéral. Le milieu pour la croissance des cyanobactéries est prêt à l'emploi. En conditions stériles, ensemencer 10 ml d'une suspension de cyanobactéries bien agitée pour 100ml de milieu. Température : Entre 20 et 25°C. Eclairage : Constant ou 12h/12h. Eviter la lumière du soleil (l'effet loupe provoqué par une vitre provoque une élévation de température trop importante). Cultiver les cyanobactéries dans un flacon stérile en verre afin que la luminosité soit suffisante. Les néons spécifiques à la culture végétale conviennent parfaitement, cependant, il est possible d'utiliser une lumière classique. Oxygénation : Elle est indispensable à la culture des cyanobactéries, il est donc exclu de les cultiver dans un flacon hermétiquement fermé. Utiliser du coton cardé stérile pour boucher le flacon, cela permet d'oxygéner le milieu tout en évitant l'entrée d'un contaminant.

Exemple : Cyanobactérie (Exemple : Nostoc sp.) c'est un genre de Cyanobactéries de la famille des Nostocaceae, procaryote réalisant la photosynthèse (présence de pigments chlorophylliens) et fixant l'azote.

La fixation de l'azote atmosphérique se fait par l'intermédiaire des cellules particulières : les hétérocystes. Ce sont des cellules différenciées à paroi plus épaisse, apparaissant habituellement aux extrémités des chaînes de cellules sphériques, ovoïdes ou cylindriques. Ces chaînes sont plus ou moins longues. On trouve des espèces du genre Nostoc dans une grande variété de milieux (certains déserts, à la limite des zones polaires, les rizières, etc.) Le genre Nostoc présente d'importantes spécificités écologiques (forte capacité de survie sous forme déshydratée, résistance à des cycles répétés de gel et de dégel, etc.). Les phycocyanines peuvent se trouver dans les Cyanobactéries (appelées auparavant 'algues bleu-vert'). La phycocyanine (du grec phyco signifiant 'algue' et cyanine de la couleur 'cyan', qui est dérivé du grec 'kyanos' et signifie bleu-vert) est l'association de protéines de la famille des phycobiliprotéines, et de pigments hydrosolubles de la photosynthèse

Observation microscopique : Faire un petit prélèvement, le déposer avec une goutte d'eau sur une lame et observation au microscope.



Nostoc

TP 11 : Les inhibiteurs de la croissance, l'antibiogramme

Un certain nombre de facteurs physique externes peuvent intervenir dans le développement des microorganismes. La variation de certains entre eux (pH du milieu, la température, la pression osmotique.....etc) peut accélérer, retarder, ou arrêter la croissance microbienne. Nous étudions dans cette séance l'influence de la variation de température

Variation de la température

Pour chaque microorganisme, on définit une température optimale de croissance pour laquelle le développement est maximal, une température minimale en deçà de laquelle il n'y a plus de croissance et une température maximale au-delà de laquelle le développement est stoppé

1. But d'expérience

Il s'agit d'apprécier les valeurs limites de la température et la valeur optimale de croissance d'un germe donné (germe mésophile)

2. Matériel par groupe

- 5 tubes de bouillons nutritifs (contenant 5 ml de milieu)
- Anse de platine
- Boîtesensemencées par le germe à étudier

3. Mode opératoire

- Marquer chaque tube de la température correspondante : + 4°C, 20°C, 37°C, 44°Cet 55°C.
- Ensemencer les cinq tubes avec la souche microbienne à étudier
- Incuber immédiatement chaque tube a la température indiquée. La durée d'incubation est de 24 h, mais elle peut être prolongé jusqu'à 48 h (pour 20°C) ; voir une semaine (pour + 4°C)

4-Lecture des résultats

On note par le système des croix le développement des germes dans les tubes

- (-) : absence de pousse
- (+) : léger trouble douteux
- (+) : légère turbidité, visible
- (++) : Développement assez important
- (+++) : Trouble maximale

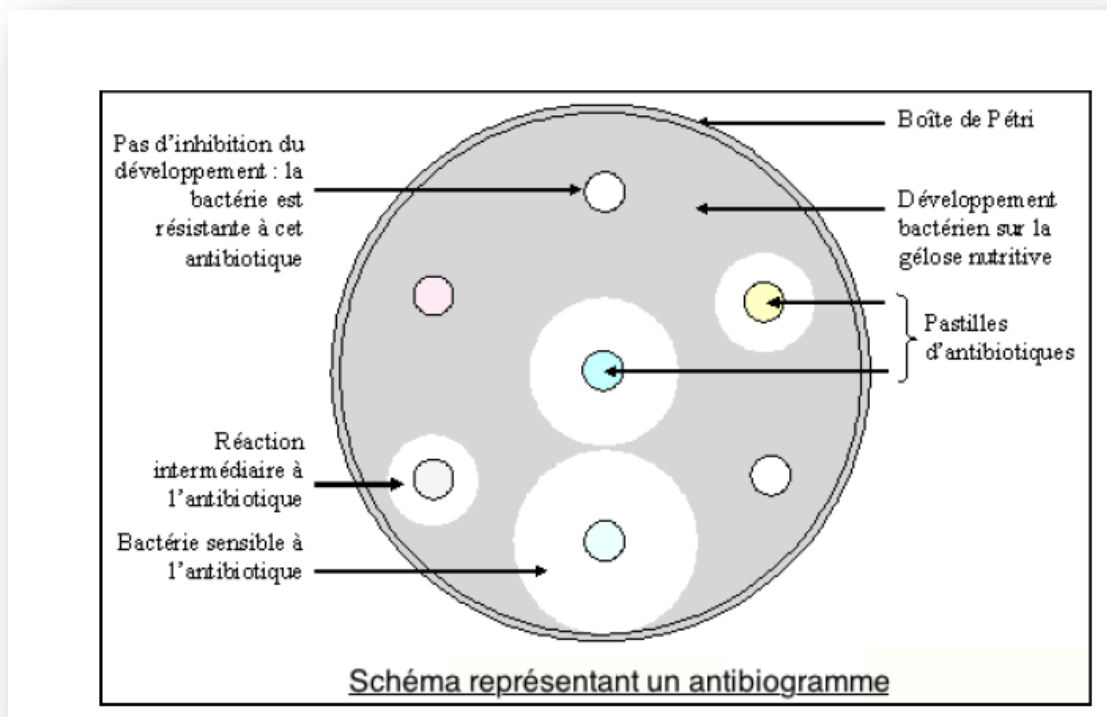
Remarque : Pour plus de précision, il est préférable de déterminer la densité optique des tubes avec un turbidimètre

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à Un ou plusieurs antibiotiques afin d'effectuer la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne ou bien de réaliser une identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

5.Méthodes de réalisation d'un antibiogramme

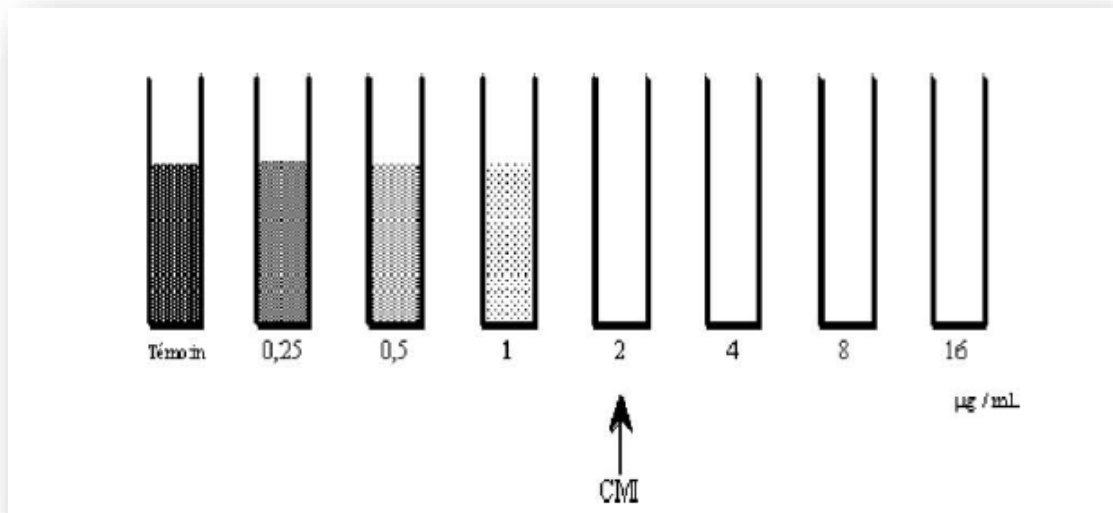
L'antibiogramme s'effectue soit en milieu solide (gélifié) par la méthode de diffusion en déterminant les zones d'inhibition des disques d'antibiotiques standards vis-à-vis d'une souche à tester. Ou bien en milieu liquide en déterminant la concentration minimale inhibitrice CMI.

5.1 En milieu solide : la méthode de diffusion se fait par ensemencement de la surface de la gélose (généralement MULLER-HINTON) avec un inoculum des souches à étudier, ensuite les disques d'antibiotiques standards (papier filtre imbibé avec une concentration standard d'un antibiotique donné) sont placés à la surface de la gélose. Le résultat c'est des zones d'inhibitions mesurables à l'aide d'un double décimètre ou pied à coulisse. L'interprétation des résultats se fait en suivant les recommandations internationales CASFM, EUCAST ou CLSI (schéma ci dessous)



Antibiogramme par méthode de diffusion sur gélose MULLER-HINTON

5.2.En milieu liquide : des dilutions de l'antibiotique à tester sont effectuées en milieu liquide, ensuite l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant les différentes dilutions. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible (figure cidessous).



La concentration minimale inhibitrice

TP 12 : Isolement de la flore totale et spécifique de certains produits (eau, lait...)

-Introduction

Les paramètres microbiologiques sont les premiers à prendre en compte en matière d'alimentation en eau potable parce qu'ils peuvent avoir des effets directs sur la santé du consommateur. En effet, L'examen bactériologique est le moyen le plus précis de détecter les pollutions fécales récentes, et d'apprécier par conséquent la qualité de l'eau du point de vue sanitaire. Le dénombrement de FMAT vise à estimer la densité de la population bactérienne générale présente dans l'eau potable, la plupart ne sont pas pathogènes. Cependant, certaines espèces peuvent être pathogènes opportunistes et causent des infections chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli. En effet, la forte concentration en germes totaux génère des problèmes d'ordre organoleptique de l'eau.

1.Prélèvement : Il doit être effectué d'une manière correcte. Il faut qu'il soit représentatif et doit être considéré comme une phase préliminaire à l'analyse. -Les échantillons sont recueillis dans des flacons ayant été soumis au préalable à un nettoyage rigoureux et surtout stérilisés. -On peut utiliser soit des flacons en verre (borosilicaté de préférence) de 250 mL à 1 litre, soit des flacons en plastique à usage unique.

2.Technique de prélèvement :

Eau du robinet :

- Se laver très soigneusement les mains et avant-bras, les rincer à l'alcool, laisser sécher.
- Retirer les mousseurs, joints, et accessoires du robinet. -
- Faire couler l'eau à fort débit pendant quelques secondes.
- Flamber le robinet pendant au moins une minute en utilisant un chalumeau ou un coton imbibé à l'alcool.
- Ouvrir le robinet et laisser couler 30 secondes avant de faire le prélèvement.
- Veiller à ne pas toucher le col et l'intérieur du bouchon avec les doigts.
- Remplir le flacon de manière stérile sans faire déborder et laisser un volume d'air d'environ 1/10 du volume du flacon. -Refermer rapidement le flacon

Une fois le flacon bouché, le col est protégé par du papier sparadrap et doit être correctement étiqueté (date, heure du prélèvement, endroit, adresse exacte, analyses à effectuer...)

Certains paramètres sont à faire in situ : pH, T° de l'eau et T° de l'air ambiant Transport :

- La teneur initiale en microorganismes des eaux risque de subir des modifications : le transport doit être rapide ;
- Les prélèvements sont placés dans une enceinte réfrigérée (+4 à +6°C) à l'abri de l'air et de la lumière -Le délai maximum entre le prélèvement et le début d'analyse ne doit pas excéder 24.

3.Méthodes générales d'examen bactériologique des eaux

3.1.Numération après ensemencement sur une Gélose Nutritive

3.1.1..Méthode par flottation : Faire couler à la surface de la boîte de pétri contenant la gélose, un volume connu de liquide (eau à analyser ou dilution) dans des conditions parfaites de stérilité puis faire incuber.

3.1.2.Méthode par immersion : Introduire un certain volume d'eau dans la boîte de pétri puis couler la gélose fondue et refroidie au-dessus, faire incuber. Résultat : on dénombre les colonies et on admet qu'une colonie correspond à une bactérie.

3.2.Numération après concentration sur membrane filtrante : La filtration est effectuée sur membrane d'ester de cellulose de porosité 0,22 μ ou 0,45 μ susceptible de retenir les bactéries.

La technique est la suivante : *Stériliser l'entonnoir gradué et la plaque poreuse à l'aide d'un bec-bunsun ;

*Refroidir avec l'eau à analyser ;

*Mettre de façon aseptique une membrane filtrante (pince stérile) ;

*Verser aseptiquement un volume V d'eau à analyser ;

*Actionner la pompe à vide pour absorber l'eau à travers la membrane ;

*Retirer la membrane et la placer immédiatement et aseptiquement sur la surface d'une plaque de gélose : incuber

3.3.Dénombrement en milieu liquide / Détermination du NPP : C'est une estimation par calcul statistique du NPP (nombre le plus probable) de microorganismes. On ensemence des dilutions successives de l'eau à analyser à raison de 3 à 5 tubes en milieu de culture liquide. Le NPP est donné en se référant à la table de Mc Grady

4.Analyse proprement dite : analyse de routine

4.1.Recherche et numération des germes totaux : « Micro-organismes aérobies revivifiables à 22 et 37°C dans les eaux » C'est un test d'orientation, utilisé comme indicateur de pollution soit dans les milieux naturels soit dans les réseaux, également utilisé comme indicateur d'efficacité de traitement. Technique : -Préparer des dilutions à partir de l'eau à analyser : 1/10, 1/100, 1/1000... en fonction du degré de pollution de l'eau et sa nature ; -Porter aseptiquement à partir de l'eau à analyser et/ou des dilutions décimales 1ml en double dans deux boîtes de Pétri vides numérotées ; -Couler ensuite le milieu gélosé : TGEA ; mélanger par des mouvements circulaires en 8. -Laisser solidifier et incuber : *la 1ère série à 22°C pendant 72h ; *la 2ème série à 37°C pendant 48h Lecture : Les colonies apparaissent en masse sous forme lenticulaire Lire les boîtes de pétri où le nombre de colonies est compris entre 15 et 300 colonies Nombre de colonies / 100 ml d'eau à analyser = nombre de colonies . 100 . inverse de la dilution. **4.2.Recherche et dénombrement des coliformes:**

4.1.1.Définition : -Les coliformes sont des bacilles à GN, aéro-anaérobies facultatifs non sporulés, oxydase négatif, se multiplient en présence de sels biliaires, fermentent le lactose avec production d'acide et de gaz en 24 à 48h à 37°C -Les Coliformes thermo tolérants ont les mêmes propriétés que les coliformes mais à 44 °C. -Les *Escherichia coli* sont des coliformes thermo tolérants ayant la particularité de produire de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à 44°C.

4.1.2.Dénombrement :

4.1.2.1.Colimétrie en milieu liquide : Se fait en deux étapes consécutives : *Test de présomption : A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement : -50 ml dans un flacon de 50ml de milieu BCPL (Bouillon Lactosé au pourpre de Bromocrésol) D/C (doublement concentré)muni d'une cloche de Durham ; -5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10ml de BCPL D/C -5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de BCPL S/C (simplement concentré) Incuber à 37°C pendant 24 à 48h Lecture Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois : Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10ème de la hauteur de la cloche), Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune. La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP.

*Test de confirmation -Le test de confirmation est basé sur la recherche de Coliformes thermo tolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'*Escherichia coli*. -Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans des tubes contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham. -L'incubation se fait au bain marie à 44°C pendant 24 heures.

-**Lecture** Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois : Un dégagement gazeux, Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacs. La lecture finale se fera par consultation de la table du NPP.

4.1.2.2.Méthode par filtration sur membrane: -La technique est décrite précédemment ; - Le volume d'eau à filtrer varie de 100 à 250 ml, on filtre dans deux membranes différentes ; -Milieu de culture : Gélose TTC au Tergitol -Incubation : 1ère boîte à 37°C, 2ème boîte à 44°C pendant 24 à 48h Lecture : *Faire une première lecture 16 h après incubation, une deuxième 24h après et une dernière 44 h après.± *Dénombrer toute colonie noire de 0,5 mm de diamètre, ayant poussé en masse et rapporter le nombre total des colonies dans les quatre tubes à 20 ml d'eau.

De façon générale, la présence de coliformes totaux dans l'eau potable est plutôt un indicateur de risque peu spécifique de sa qualité. C'est pour cela que leur présence dans l'eau traitée est tolérable. Habituellement, ces bactéries peuvent croître dans un réseau de distribution d'eau dont la station de production d'eau potable est parfaitement fonctionnelle ;

cela se produit à partir du biofilm microbien qui se forme sur la paroi des canalisations, particulièrement en cas de faible teneur en chlore résiduel.

lait

Nous allons rechercher la FMAT OU FTAM ainsi que les différents microorganismes susceptibles d'être pathogènes, sur cette denrée alimentaires ayant subi une pasteurisation et comparer les résultats obtenus aux normes afin de juger sa conformité.

Mode opératoire : Recherche de la Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM) : Après une dilution décimale, 1ml de la solution mère et de ces dilutions estensemencé en masse sur une gélose ordinaire (GNO ou PCA) et l'incubation se fait 24h à 30°C ou bien 72h à 22°C. Ce test est effectué pour les deux denrées.

Lecture : comptage de toutes colonies ayant poussé peu importe leur aspect. Le dénombrement sera suivi d'un calcul du nombre des microorganismes selon la formule : $N = \frac{\Sigma c}{d.V}$ Σc =nombre de colonies comptée sur les boîtes retenus, d = taux de dilution, V = volumeensemencé Norme : 3.104 UFC/mL

Recherche des Coliformes Totaux et Fécaux (CT-CF) : Elle se fait sur milieu BLBVB (Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant) qui est sélectif des bacteries intestinales et qui permet de détecter la fermentation du lactose chez les entérobactéries avec production de gaz emprisonné dans la cloche de durham. La recherche des coliformes se fait en deux étapes selon le test de Mackensie ; la 1ere est présomptive pour la recherche des CT (1ml de la solution mère ou des dilutions estensemencé dans un bouillon, incubé 24h à 30°C) suivie d'une étape confirmative pour la recherche des CF (1ml du 1er tube transféré dans ce dernier et incubé à 44°C puisqu'ils sont thermotolérants). Ce test est fait aux deux denrées. Lecture : le test est considéré positif s'il y'a formation d'un trouble + gaz dans la cloche (vol. +1/10) Norme : 10 UFC/ml pour les CT et 1UFC/mL pour les CF (à la date limite de consommation : 100 CT et 10 CF)

Norme : / **Recherche de Staphylococcus aureus** Un milieu sélectif est utilisé, c'est le Baird Parker enrichi au jaune d'œuf (émulsion stérile dans de l'eau physiologique à 30%) et additionné de téllurite de potassium. L'ensemencement se fait par étalement en surface d'un mL de la solution mère et l'incubation se fait à 37°C 24h. Ce test est fait aux deux denrées. Lecture : les colonies noires avec halo sont celles de Staphylococcus aureus et seront dénombrées. Norme : 1 UFC/ml (à la date limite de consommation : 10 UFC/ml)

Recherche de Salmonella Elle se fait en 3 étapes : un pré-enrichissement (10 mL de solution mere dans 90 ml eau physiologique stérile) incubé 4 à 16h à 37°C, suivi d'un enrichissement (10 mL du 1er vers un bouillon sélénite) incubé aussi à 37°C. La 3ème étape est un isolement sélectif sur gélose Salmonella-Shigella (S-S), qui seraensemencée par striation et incubée à 37°C durant 24h. Cette flore est recherchée dans le lait. Lecture : Les

colonies incolores à centre noir ou pas (Lac-, H₂S +/-) sont celles de Salmonella sp. Norme : 0 dans 250 mL

Recherche des Streptocoques fécaux Ce test se fait en 2étapes ; une présomptive (bouillon Rothe ensemencé et incubé à 37°C pour 24h) et une confirmative (bouillon Eva-litsky inoculé à partir de Rothe et incubé à 37°C 24h). Cette flore est recherchée dans le jus. Lecture : la présence d'un trouble indique que la bacterie est présente Norme : absence dans 1mL

Expression et interprétation des résultatsobtenus Les résultats obtenus sont rapportés sur le tableau du compte rendu, exprimés en unité formant colonie/mL en cas de dénombrement sur gélose, et absence ou présence en cas de détection des flores en question. Ils seront par la suite comparés aux normes élaborés. Une conclusion est tirée sur la conformité ainsi que la densité microbienne de l'aliment.

Travaux dirigés

TD1

Exercice 1

Répondre aux questions suivantes :

1-A quel règne appartiennent les bactéries? Que signifie t-il? 2-Quel est l'ordre de grandeur d'une bactérie?

Exercice 2

Recopier le tableau suivant et classer les différents types de microorganismes en fonction de leur type cellulaire et de leur niveau d'organisation. Indiquer s'ils possèdent une paroi et, éventuellement, quelle est la nature de cette paroi

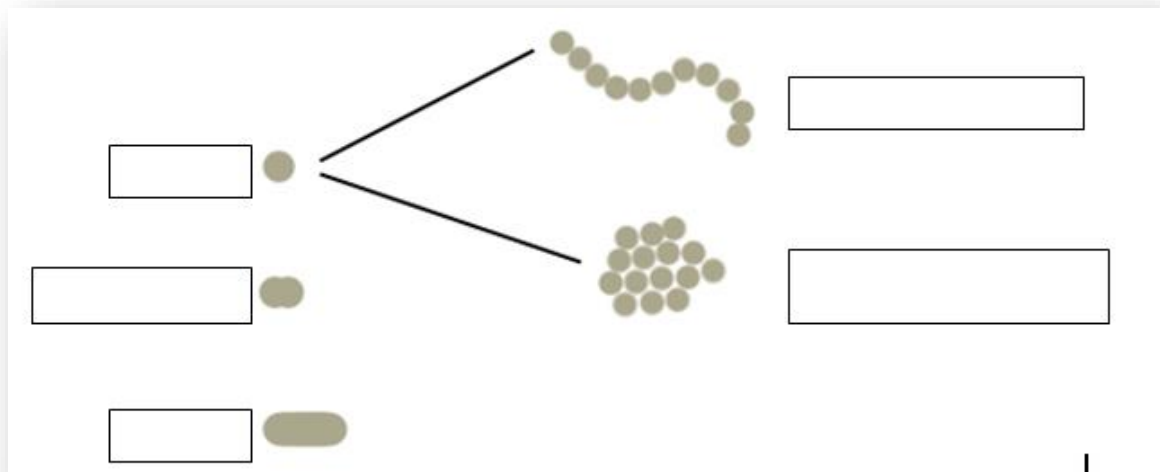
	Procaryotes	Eucaryotes	
Type cellulaire		Unicellulaires	Pluricellulaires
Paroi			

Exercice 3

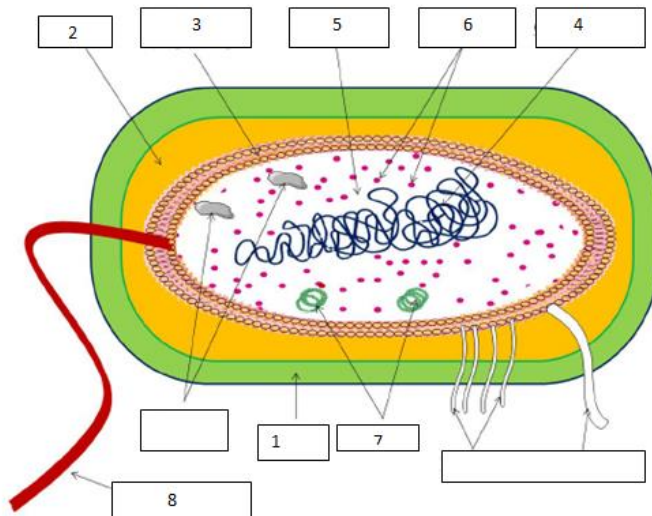
La figure ci-dessus (figure 1) montre les différentes formes des bactéries

1-Donnez le nom de chaque forme avec définition

2-Que veut dire un mode de regroupement des bactéries et quel est le mode de chaque forme?



Exercice 4



Ci- dessus un schéma d'une bactérie, sachant que 1 est une enveloppe qui permet à la bactérie de se défendre contre la phagocytose, alors que 2 est un élément important qui permet de classer la bactérie lors de la coloration de Gram, tandis que 6est un complexe ribonucléoproteique qui permet de synthétiser les protéines en décodant l'information contenue dans l'ARN messager. A partir du schéma ci-dessus;

- 1-Donnez le nom de chaque élément numéroté
- 2- Comment peut on détecter la présence de 1 au laboratoire
- 3- définissez, et donnez le rôle de 7
- 4-quelle est la fonction de 8 et quelle est sa structure.

TD 2

Exercice : 1

En étudiant deux bactéries différentes par microscopie électronique, un chercheur a remarqué que la première (A) a une forme sphérique et une paroi épaisse, alors que la deuxième (B) a une forme allongée en bâtonnet et une paroi mince avec une membrane externe.

1) Après coloration de Gram, quelle est la bactérie à Gram positif et quelle est la bactérie à Gram négatif ?

2) Comment appelle-t-on la forme sphérique et la forme allongée ?

Après ensemencement, la bactérie (A) a donné des colonies bombées et jaunes dorées sur un milieu de base tandis que la bactérie (B) a donné des colonies envahissantes pigmentées en vert sur un milieu différentiel, 3) Comment appelle-t-on cette étude ? 4) Est-ce que les pigmentations sont vraies pour les deux bactéries ? Et pourquoi

Exercice 2

Le schéma ci-dessus est une spore bactérienne à l'état libre;

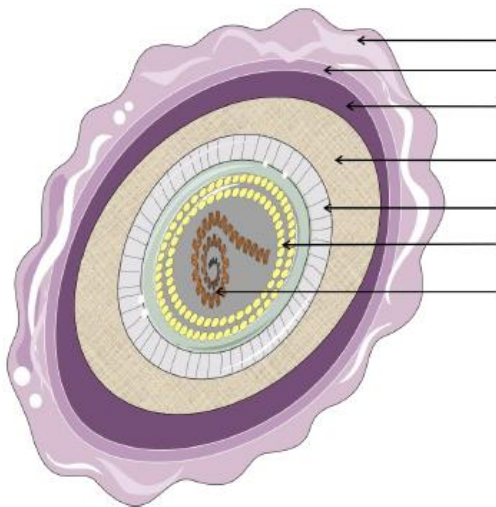


Figure: Schéma d'une endospore bactérienne

1-Compétez la légende du schéma

2-Quelles sont les différentes formes et positions de spores?(réponse avec dessin)

3-Dessinez le cycle de sporulation de *Bacillus subtilis*

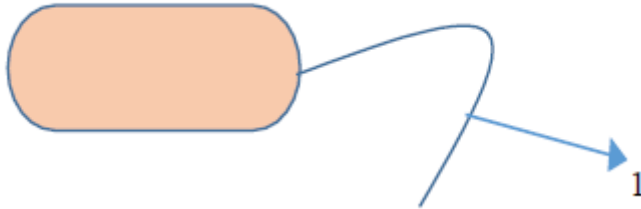
4-expliquez pourquoi une bactérie sporule? est ce que ce phénomène est commun chez toutes les espèces bactériennes?

5- Donnez deux exemples de bactéries sporulées avec une courte définition

6-décrivez une technique permettant de mettre en évidence la spore

TD 3

Exercice 1:



1-A quoi correspond le chiffre 1, préciser le type de ciliature et le type de Gram.

2 -L'élément 1 est de nature.....Il joue un rôle principal dans et également un rôle dans.....Ce dernier se traduit par un changement de rotation du en présence d'un milieu attractif ou répulsif.

Exercice02:

Les résultats des différents tests

de croissance de 3 espèces bactériennes sont donnés dans le tableau suivant:

Espèce/milieu de culture	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
Espèce A	-	+	+
Espèce B	-	-	-
Espèce D	-	-	+

Composition des différents milieux

Milieu1:

Glucose	10g/L
KH ₂ PO ₄	13,6g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,5mg/L
CaCl ₂	0,02g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2g/L
ajusté à pH 7,0 avec NaOH	

Milieu2:

KH ₂ PO ₄	13,6g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,5mg/L
CaCl ₂	0,02g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2g/L
ajusté à pH 7,0 avec NaOH	

Milieu3 :

Glucose	10g/L
KH ₂ PO ₄	13,6g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g/L
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,5mg/L
CaCl ₂	0,02g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2g/L
Tryptophane	0.01g/L
ajusté à pH 7,0 avec NaOH	

Questions:

1. Comment qualifier les milieux de cultures présentés ci-dessus ?
2. Quel est le rôle de : glucose, (NH₄)₂SO₄, Tryptophane dans le milieu de culture ?
3. Expliquer chaque cas.
4. Dans quel milieu peut-on espérer une croissance pour la souche B.

Exercice 3:

Un microbiologiste veut faire préparer une gélose dite de Müller-Hinton. Cependant, dans son laboratoire il n'a que le bouillon de Müller-Hinton. Un de ses collègues lui proposa d'ajouter un ingrédient qui lui permettra d'obtenir une gélose à partir de ce bouillon.

- 1) quel est cet ingrédient ?
- 2) Combien de grammes doit-il ajouter pour la préparation d'un litre de cette gélose ?
- 3) Parmi les constituants des milieux de culture, les extraits de levures et les peptones ;
 - a. Comment peut-on obtenir ces composés ?
 - b. de quoi sont-ils constitués ?

TD 4

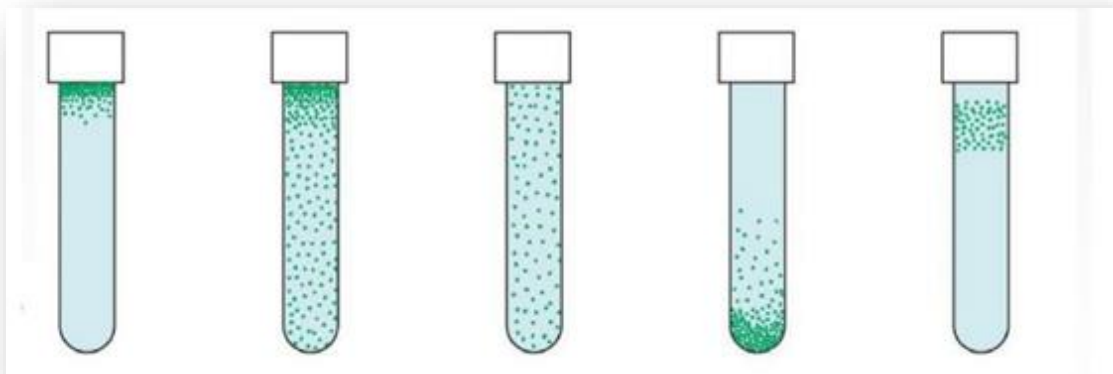
Exercice 1 :

Compléter le tableau suivant

Classe du besoin	Nature du besoin	Type trophique
Source d'énergie	Rayonnement lumineux	
	Oxydation des composés organiques ou inorganiques	
Donneur d'électron	Minéral	
	Organique	
Source de carbone	Composé Minéral	
	Composé organique	
Facteurs de croissance	Non nécessaire	
	Nécessaire	

Exercice 2 :

Cinq espèces bactériennes différentes ont été ensemencées par piqure centrale. Après incubation les espèces ont poussé dans des endroits différents. Le resultat est présenté par la figure suivante



l'oxygène et la croissance bactérienne

Que constatez- vous de la croissance des espèces ABCD et E

Exercice 3:

Un laboratoire de contrôle des aliments a reçu des prélèvements de quelques microorganismes différents: des champignons qui attaquent le raisin, du genre *Plasmopara* connu sous le non de mildiou provoquant la pourriture des raisins a des ph très bas, des

vibrio qui colonisent des poissons à pH=9 et qui supportent également des concentrations élevées en NaCl et des souches d'*Erwinia* qui affectent des plantes à des pH voisins de 7.

1-Comment peut-on appeler ces microorganismes selon le pH de l'environnement dans lequel ils ont été prélevés?

2-Par rapport à la croissance en présence de NaCl à fortes concentrations, comment peut-on appeler les espèces de *vibrio* prélevées de la mère ?.

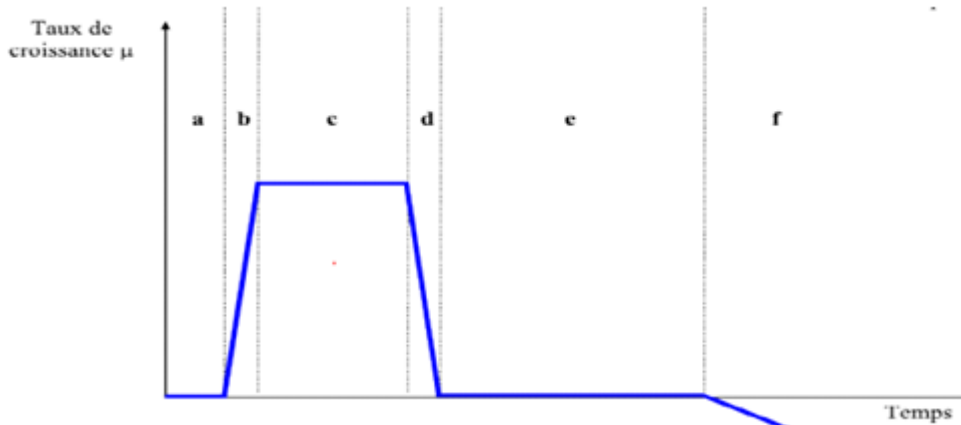
TD5

Exercice 1

Dans un milieu de culture liquide de 10ml, on ensemence 10^3 d'Escherichia coli, après 3h d'incubation sans phase de latence, on dénombre 10^8 germes par millilitre.

-Calculer le temps de génération de ce germ?.

Exercice 2



a: Phase de latence

b: phase d'accélération

c: phase exponentielle

d: Phase de ralentissement

e: Phase stationnaire

f: Phase de déclin

Questions

1-Décrivez ce que présente ce graphique et expliquer ce que présente chaque phase telles quelles sont représentées sur le graphique.

2-Que se passerait-il pour le graphique précédent si la culture était effectuée en milieu renouvelé? Schématiser

3-Que se passerait-il pour le graphique précédent si la cellule était synchrone? Schématiser.

Exercice 3 :

-Avec quel taux de croissance se déroule une culture si la durée d'une division est de 65minutes ?

Exercice 4 :

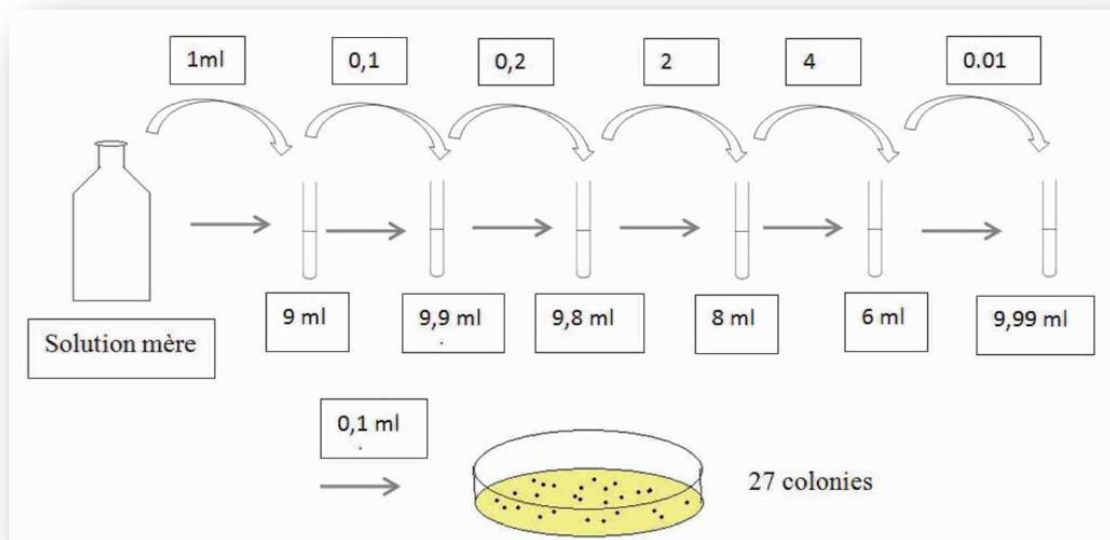
Après 24 heures d'incubation de culture avec un rythme (taux de croissance) égale à 0.02.

1-Combien de division ont eu lieu? Si on inocule une quantité initiale égale à $4 \cdot 10^6$ cellules

2-Après 5 générations quel sera le nombre de cellules ?

Exercice 5:

Le schéma ci-dessus montre la procédure de six dilution successives lors d'une analyse microbiologique



les différentes dilutions effectuées pour la solution mère

- 1-Déterminez chaque dilution par un rapport de division;
 - a-par rapport à la solution mère.
 - b-Par rapport à la dilution précédente
- 2-Déterminez la concentration bactérienne dans la solution mère (UFC/ml)
- 3-Sachant que le volume de la solution mère est de 100ml, quel est le nombre total d'UFC dans cette solution?

Exercice 6:

Un patient était atteint d'une septicémie, le médecin a recommandé des analyses sanguines avec un dénombrement des cellules bactériennes. Le tableau ci-dessus représente le résultat du dénombrement bactérien après hémoculture de plusieurs dilutions, sachant que l'on a ensemencé 0.1ml de dilution de chaque boîte de milieu de culture :

Tableau 1:Résultats du dénombrement bactérien après hémoculture de différentes dilutions

Dilution	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Essai1	Indénombrable	520	106	13
Essai2	Ndénombrable	507	114	2
Essai 3	Ndénombrable	477	92	3

- 1.Pourquoi des dilutions ont été réalisées?
- 2. Quelle dilution doit-on utiliser pour réaliser le dénombrement
- 3. Pourquoi doit -in utiliser cette dilution ? Expliquez

4. Déterminez le nombre de bactéries par ml de sang (UFC/ml)

5. Pourquoi utilise-t-on l'unité UFC/ml et non par bactérie/ml

6. Une deuxième méthode de dénombrement a été utilisée pour confirmer les résultats, c'est le dénombrement direct par microscope, le résultat était 17×10^5 bactéries/ml.

- Comparer et interpréter les deux résultats ?

Références bibliographiques

Arlat M, Dion M, & Rakotoarivonina H. (2019). *Introduction à la microbiologie: Microbiologie fondamentale et appliquée.* Dunod 258 pages.

Bergey, D. H. & Holt, J. G. (Eds.). (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Bonnin, A., Danneels, A., Dubuisson, J., Goffard, A., & Belouzard, S. (2018). HCoV-229E spike protein fusion activation by trypsin-like serine proteases is mediated by proteolytic processing in the S2' region. *Journal of General Virology*, 99(7), 908-912.

Black, J. G. (2012). *Microbiology: Principles and Explorations*, 8ème édition. Wiley

Cyranoski, D. (2020). Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. *Nature*, 581(7806), 22-27.

Cyranoski, D. (2020). What China's coronavirus response can teach the rest of the world. *Nature*, 579(7800), 479-481.

Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral research*, 176, 104742.

Chanaz, S. (1999). *Microbiologie et pathologie infectieuse.* Biofutur,(192), 53.

Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M. C., & Poyart, C. (2016). *Bactériologie médicale: techniques usuelles.* Elsevier Masson

Faucher ,N. (2019).*Immunologie et microbiologie. 3e Edition: CEC, 1 vol.*

Guezalme,T.B.,Kahlouche,B & Athmani,G.S.(2008).*Microbiologie: travaux pratiques.*Offices des publications universitaires.138pages.

Khadir,A., Benhadou,M., Benbelaid,F., Senouci.B,M., & Abdelouahed,J.D(2018). *Travaux dirigés de microbiologie.*Office des publications universitaires.140pages.

Le Faou, A. (2012). *Précis de virologie humaine.* Doin.,442 pages.

Luciano Paolozzi, J.-C. L. (2019, juin). introduction à la microbiologie: Microbiologie fondamentale et appliquée. Dunod.

Laskin, A.I., & Lechevalier, H.A., Ed. (1973) "Handbook of Microbiology", Press Division of Chemical Rubber Co., Cleveland.

Lamendi, H. (2013). *ANTONIVAN LEEUWENHOEK (1632-1723). Le microscope médical et les spermatozoïdes*: L'harmattan, 150 pages.

Luciano, Paolozzi, J. C., Liébart, P., Bauda, J., Bodilis, & Dussurget, O. (2021). *Microbiologie: Biologie des procaryotes et de leurs virus*. 2e édition: dunod, 512 pages.

Manual of Clinical Microbiology, 12th ed. (2019). American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2690 pp (*Chapitres 116-134*).

Madigan, M. & Martinko J. (2007). Brock. *Biologie des micro-organismes*, 11ème édition. Paris: Pearson Education France.

Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, 202, 120–134.

Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J. & Prescott, L. M. (2013). *Microbiologie*. De Boeck 4ème édition.

Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2018). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur 5ème édition. .1120 pages.

Paolozzi, L. (2015). *Microbiologie: biologie des procaryotes et de leurs virus*. Dunod.

Prieur, D., Geslin, C. & Payan, C. (2011). *Mini manuel de microbiologie: cours + QCM-QROC*. Paris: Dunod

Ripert, C. (2013). *Mycologie médicale*. Tec & Doc. Lavoisier, 690 Pages.

Roujeinikova, A. (2008). Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: Implications for peptidoglycan recognition. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 10348–10353.

Stewart, R. (2021). *Introduction à la virologie et à l'immunologie*: Independently Published, 464 pages.

Schleifer, K. H., Kilpper-Bälz, R., Kraus, J. & Gehring, F. (1984). Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and 'mutans-like' streptococci. *J Dent Res* **63**, 1047–1050.

Singleton, P. & Dusart, J. (1999). *Bacteriologie: cours : 2e cycle*. Paris: Dunod.

Stolz, J. F. (1993). Magnetosomes. *Microbiology* **139**, 1663–1670.

Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2012). *Microbiology: An Introduction*, 11ème édition. Benjamin Cummings.

Woese, CR et Fox, GE (1977). Structure phylogénétique du domaine procaryote : les règnes primaires. *Actes de l'Académie nationale des sciences* , 74 (11), 5088-5090.