

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BATNA1 -BATNA-  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES  
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

---



TITRE

LA BACTERIOLOGIE GENERALE  
(Polycopié destiné aux étudiants de la 2<sup>ème</sup> ANNEE  
MEDECINE VETERINAIRE

*Rédigé par :*  
Dr. RABEHI Sabrina

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2023/2024

## Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Le Monde microbien.....	2
1. Importance de la Microbiologie .....	2
2. Histoire de la microbiologie.....	4
3. Classification du monde vivant.....	8
4. Diversité des micro-organismes (Eucaryotes et Procaryotes).....	10
- Bactéries .....	10
- Archéobactéries .....	11
- Cyanobactéries .....	11
- Protozoaires .....	12
- Champignons microscopiques.....	12
- Algues microscopiques.....	12
- Virus.....	13
- Agents transmissibles non conventionnels (ATNC) (Prions, Viroïdes) .....	13
5. Taxonomie .....	14
6. Nomenclature.....	17
Chapitre 2 : L'Anatomie bactérienne .....	19
1. Morphologie bactérienne.....	19
2. Structures obligatoires .....	23
- Cytoplasme.....	23
- Ribosomes .....	23
- Appareil nucléaire .....	25
- Membrane plasmique .....	26
-Paroi bactérienne .....	28
3. Structures facultatives.....	35
-Plasmides.....	35
- Glycocalyx (Capsule, Slime) .....	38
- Flagelles .....	40
-Pilis communs.....	44
-Pilis sexuels.....	44
-Endospore .....	46
Chapitre 3 : La Physiologie bactérienne .....	52

1. Besoins nutritifs.....	52
- Besoins énergétiques et élémentaires.....	52
- Besoins spécifiques.....	56
- Facteurs physiques.....	58
2. Croissance bactérienne.....	67
3. Mesure de la croissance.....	83
4. Milieux de culture.....	92
Chapitre 4 : Le Métabolisme bactérien.....	100
1. Notions de biochimie (enzymes, oxydo-réductions.....)	100
2. Métabolisme énergétique.....	101
- Respiration aérobie.....	102
- Respiration anaérobie.....	107
- Fermentation.....	107
- Réactions cataboliques.....	111
- Assimilation des substances.....	118
- Transport des nutriments dans la cellule bactérienne.....	119
4. Métabolisme glucidique.....	122
5. Métabolisme protidique.....	123
6. Métabolisme lipidique.....	124
7. Réactions anaboliques (biosynthèses).....	125
Chapitre 5 : La Génétique bactérienne.....	129
1. Information génétique.....	129
- ADN chromosomique.....	129
- Plasmides.....	130
- Transposons.....	131
- Intégrons.....	133
- Opérons.....	133
2. Variations génétiques.....	133
- Mutation.....	134
- Transformation.....	139
- Transduction.....	142
- Conjugaison.....	148
Chapitre 6 : Le Pouvoir pathogène des bactéries.....	156
1. Relations hôte-bactéries.....	156

- Microbiote et microbiome .....	156
- Saprophytisme.....	157
- Commensalisme .....	157
- Mutualisme .....	158
-Pathogénicité .....	158
2. Postulats de Koch .....	160
3. Physiopathologie .....	161
- Pouvoir pathogène et virulence .....	162
- Ilots de pathogénicité.....	163
- Pouvoir invasif (Biofilms bactériens et évasion bactérienne...) .....	164
-Toxinogénèse .....	167
4. Échappement des bactéries aux défenses immunitaires .....	171
Chapitre 7 : L'antibiorésistance .....	174
1. Modes d'action des antibiotiques .....	175
2. Effet des antibiotiques.....	180
3. Antibiogramme.....	184
4. Types de résistance .....	192
- Résistance naturelle .....	193
- Résistance acquise.....	193
5. Modalités de résistance .....	195
6. Alternatives à l'antibiothérapie.....	196
Chapitre 8 : La Lutte antimicrobienne.....	198
1. Notions générales.....	198
- Stérilisation.....	198
- Désinfection.....	198
- Antisepsie .....	200
- Décontamination.....	201
2. Techniques de stérilisation.....	202
- Stérilisation à la chaleur sèche .....	202
- Stérilisation à la chaleur humide .....	203
- Stérilisation par filtration .....	204
- Stérilisation par irradiation .....	206
- Stérilisation chimique.....	208
Les références bibliographiques.....	210

## Liste des figures

Figure 1 : Les différentes branches de la microbiologie .....	2
Figure 2 : Principales caractéristiques des procaryotes et des eucaryotes .....	10
Figure 3 : Evolution des systèmes de classification.....	15
Figure 4 : Arrangement hiérarchique dans la taxonomie.....	18
Figure 5 : Les formes bactériennes les plus courantes.....	21
Figure 6 : Arrangements des bactéries.....	22
Figure 7 : Les principales structures de la cellule bactérienne.....	23
Figure 8 : Un modèle d'un ribosome procaryote, montrant les petites (30S) et grandes (50S) sous-unités, à la fois séparées et jointes .....	24
Figure 9 : Une centrifugeuse.....	25
Figure 10 : Structure chromosomique.....	26
Figure 11 : Le modèle de mosaïque fluide de la membrane cellulaire .....	27
Figure 12 : La structure du peptidoglycane .....	30
Figure 13 : L'enveloppe des cellules bactériennes .....	32
Figure 14 : Dispositions des flagelles bactériens .....	40
Figure 15 : Structure de deux flagelles bactériens différents.....	41
Figure 16 : Filaments axiaux ou endoflagellés .....	41
Figure 17 : Fonctionnement des flagelles et mode de locomotion chez les bactéries à flagelles polaires et péritriches.....	43
Figure 18 : Chimiotaxie chez les bactéries. ....	43
Figure 19 : Des pilis sur une cellule d' <i>Escherichia coli</i> .....	45
Figure 20 : Structure d'une Endospore bactérienne.....	48
Figure 21 : Spores bactériennes et leur positionnement dans les cellules bactériennes.....	48
Figure 22 : Sporogénèse.....	50
Figure 23 : Synthèse macromoléculaire.....	57
Figure 24 : Groupes écologiques par température exigée pour la croissance .....	60
Figure 25 : Besoins des bactéries en oxygène (O <sub>2</sub> ).....	62
Figure 26 : Système modèle pour démontrer l'osmose .....	66
Figure 27 : Réponses des micro-organismes au sel .....	67
Figure 28 : Croissance exponentielle par fission binaire .....	69
Figure 29 : Les étapes d'une numération sur plaque viable - méthode de culture en Batch (discontinue).....	70
Figure 30 : La courbe de croissance dans une culture bactérienne .....	71
Figure 31 : Le BIOSTAT® est un système de fermenteur bioréacteur compact et autoclavable également connu sous le nom de chemostat .....	74
Figure 32 : Les mathématiques de la croissance démographique .....	75
Figure 33 : Les mathématiques de la croissance démographique .....	76
Figure 34 : La détermination du temps de génération .....	78
Figure 35 : Différentes formes de colonies bactériennes .....	79
Figure 36 : Schéma du système de culture continue : le chémostat.....	81
Figure 37 : Croissance synchrone versus non synchrone .....	82
Figure 38 : Croissance diauxique de <i>Escherichia coli</i> sur glucose et lactose .....	83
Figure 39 : La chambre de numération de Petroff-Hausser (hémocytomètre).....	85

Figure 40 : Chambre de comptage de Petroff-Hausser .....	85
Figure 41 : Grille de la chambre de comptage de Petroff-Hausser .....	85
Figure 42 : Compteur Coulter .....	86
Figure 43 : Schéma de la procédure de dilution en série .....	87
Figure 44 : Comptage des colonies .....	88
Figure 45 : Le test du filtre à membrane pour la pureté de l'eau.....	89
Figure 46 : Mesures de turbidité comme indicateurs de croissance bactérienne .....	90
Figure 47 : Turbidité.....	91
Figure 48 : Un spectrophotomètre .....	91
Figure 49 : Test du nombre le plus probable (MPN) .....	92
Figure 50 : Le convertissement de l'acide pyruvique en acétyl-CoA .....	104
Figure 51 : Le système de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative dans les membranes bactériennes.....	105
Figure 52 : Transfert d'énergie par les molécules porteuses .....	106
Figure 53 : Voies de fermentation .....	108
Figure 54 : Fermentation de l'acide homolactique .....	108
Figure 55 : Fermentation alcoolique.....	109
Figure 56 : Un test de fermentation au mannitol positif (jaune).....	110
Figure 57 : Résumé des voies les plus courantes du métabolisme du glucose .....	110
Figure 58 : Les réactions de glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof).....	111
Figure 59 : Le shunt de l'hexose monophosphate (voie de pentose phosphate).....	112
Figure 60 : La voie d'Entner-Doudoroff.....	113
Figure 61 : Le cycle de Krebs [le cycle des acides tricarboxyliques (TCA)] .....	114
Figure 62 : Rendement en ATP de la respiration aérobie .....	115
Figure 63 : Réduction assimilatoire des sulfates et synthèse de cystéine .....	119
Figure 64 : Trois types de porteurs : A : uniporteurs, B : symporteurs et C : antiporteurs ....	121
Figure 65 : Le catabolisme des glucides .....	123
Figure 66 : Le catabolisme des protéines.....	124
Figure 67 : Le catabolisme des graisses.....	125
Figure 68 : La gluconéogenèse .....	128
Figure 69 : Le chromosome bactérien.....	129
Figure 70 : Transposons : segments changeants du génome.....	132
Figure 71 : Les effets de la substitution de bases (une mutation pointue) .....	137
Figure 72 : Les effets des mutations par décalage de cadre .....	138
Figure 73 : Réparation des dimères de thymine.....	139
Figure 74 : L'expérience classique de transformation de Griffith .....	141
Figure 75 : La transformation d'uu <i>Streptococcus pneumoniae</i> non encapsulé .....	142
Figure 76 : Cycles de vie des bactériophages .....	144
Figure 77 : Lysogénie .....	145
Figure 78 : Excision normale d'un phage lysogène.....	145
Figure 79 : Erreur d'excision d'un phage lysogène .....	145
Figure 80 : Transduction spécialisée.....	145
Figure 81 : Transduction généralisée.....	146
Figure 82 : La découverte de la conjugaison : l'expérience de Lederberg .....	148
Figure 83 : Facteur de fertilité (facteur F).....	150

Figure 84 : TEM (Microscope Electronique à Transmission) de pili F de <i>E. coli</i> . (1 F <sup>+</sup> et 2 F <sup>-</sup> ; 18 000X.).....	150
Figure 85 : Le transfert de plasmides F (facteur F ou plasmide conjugatif) .....	151
Figure 86 : Recombinaisons haute fréquence .....	152
Figure 87 : La formation et le transfert du plasmide F'.....	154
Figure 88 : Démonstration qu'une maladie bactérienne satisfait aux postulats de Koch .....	161
Figure 89 (A, B et C) : Le mode d'action des exotoxines dimères A-B .....	169
Figure 90 : Le mode d'action des super-antigènes .....	169
Figure 91 : Les nombreuses activités du lipopolysaccharide (LPS) .....	171
Figure 92 : Mécanismes bactériens permettant d'échapper à la clairance phagocytaire .....	173
Figure 93 : Modes d'action des antibiotiques.....	176
Figure 94 : Sites d'inhibition sur le ribosome procaryote et principaux antibiotiques agissant sur ces sites.....	178
Figure 95 : Inhibition compétitive .....	179
Figure 96 : Analogues de base .....	180
Figure 97 : La technique de diffusion sur disque de gélose Kirby-Bauer.....	186
Figure 98 : Technique de préparation et d'interprétation des tests de diffusion sur disque ...	187
Figure 99 : Table de lecture 5 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour <i>Staphylococcus spp.</i> .....	188
Figure 100 : Un test E (epsilomètre), qui détermine la sensibilité aux antibiotiques et estime la CMI (concentration minimale inhibitrice).....	189
Figure 101 : Test de dilution en tube pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	190
Figure 102 : La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (MBC) d'un médicament .....	191
Figure 103 : Un système automatisé de bioMérieux pour identifier les micro-organismes et déterminer leur sensibilité à divers agents antimicrobiens.....	192
Figure 104 : Une carte génétique typique d'un facteur de transfert de résistance : facteur R	195
Figure 105 : L'hydre.....	197
Figure 106 : L'autoclave .....	204
Figure 107 : Stérilisation par micro-ondes.....	207

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Quelques événements importants dans le développement de la microbiologie .....	4
Tableau 2: Comparaison entre les cellules procaryotes et eucaryotes.....	9
Tableau 3 : Principales caractéristiques différentielles entre les <i>Bacteria</i> , les <i>Archaea</i> et les <i>Eukarya</i> .....	16
Tableau 4 : Caractéristiques des parois cellulaires des bactéries Gram-positives, Gram-négatives et acido- alcoolo-résistantes .....	34
Tableau 5: Principaux types nutritionnels chez les bactéries .....	56
Tableau 6 : Résultats d'un exemple de test Kirby-Bauer.....	186
Tableau 7 : Méthodes de désinfection .....	200
Tableau 8 : Agents antiseptiques .....	201
Tableau 9 : Tailles des pores des filtres à membrane et des particules qui les traversent .....	205

## **Introduction générale**

La bactériologie générale est une branche de la microbiologie générale qu'est l'étude des organismes trop petits pour être vus à l'œil nu, c'est-à-dire des microorganismes ou microbes. Donc, la bactériologie est l'étude des bactéries c'est à dire l'étude : de la structure, l'organisation et la composition de la cellule bactérienne ; des notions de physiologie et du métabolisme bactérien ; de la génétique bactérienne ; le pouvoir pathogène des bactéries ; l'antibiorésistance et des agents qui sont impliqués dans la lutte antimicrobienne.

Ce polycopié s'adresse aux étudiants de 2<sup>ème</sup> année Médecine Vétérinaire du département de sciences vétérinaires et vise à améliorer les connaissances et les pratiques requises pour exercer un bon diagnostic et un traitement des infections bactériennes grâce à l'isolement et à l'identification des bactéries, l'analyse de l'antibiogramme et l'optimisation thérapeutique.

L'étudiant doit pouvoir accéder

- à des connaissances plus approfondies en matière de bactériologie générale.
- pouvoir comprendre la structure et le métabolisme bactériens, la multiplication, les facteurs de virulence et la relation hôte-bactérie ainsi que l'issue d'une infection bactérienne dépendant des capacités défensives de l'hôte infecté tout en insistant sur les différentes bactéries d'importance vétérinaire et zoonotique.
- Connaître les différents caractères de bactéries dans le but de les différencier.

A la fin de l'acquisition de cette matière, l'étudiant doit : pouvoir différencier les bactéries selon leurs différents caractères avec une approche diagnostique raisonnée basée sur l'usage des milieux de culture sélectifs appropriés.

## Chapitre 1 : Le Monde microbien

La microbiologie est l'étude d'organismes trop petits pour être vus à l'œil nu – c'est-à-dire l'étude des **micro-organismes**. Leur taille est généralement inférieure à un millimètre : ils doivent être observés au microscope (photonique ou électronique) et cultivés dans des milieux permettant leur croissance et leur isolement. La microbiologie est divisée en plusieurs branches, en fonction du type de « microbe » étudié (figure 1).

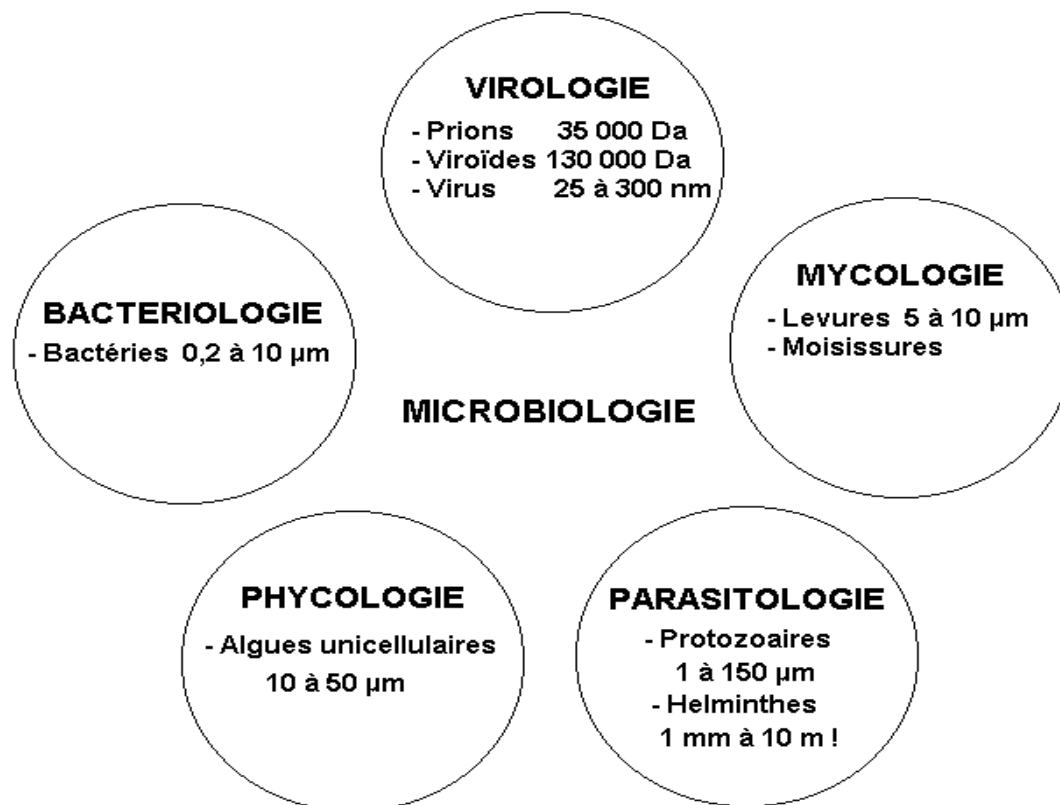


Figure 1 : Les différentes branches de la microbiologie

(Anonyme, 2022).

### 1. Importance de la Microbiologie

Les micro-organismes apportent de nombreux avantages à la société. Ils sont nécessaires à la production du pain, du fromage, des antibiotiques, des vaccins, des vitamines, des enzymes et de beaucoup d'autres produits importants. Par contre, les micro-organismes causent des effets indésirables tels que la détérioration de la nourriture et les maladies infectieuses. De cette importance découlent les grands thèmes de la microbiologie :

**A. Microbiologie médicale**

Cette branche traite des microbes qui causent des maladies chez l'homme et les animaux. Les chercheurs examinent les facteurs qui rendent les microbes virulents et des mécanismes pour les inhiber.

**B. Microbiologie et épidémiologie de la santé publique**

Ces branches surveillent et contrôlent la propagation des maladies dans les communautés. Parmi les institutions impliquées dans cette préoccupation l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

**C. Immunologie**

Cette branche étudie le réseau complexe de substances protectrices et cellules produites en réponse à une infection. Elle comprend une diversité de domaines tels que la vaccination, les tests sanguins et les allergies.

**D. Microbiologie industrielle**

Cette branche protège notre nourriture et notre eau, et comprend également la biotechnologie, l'utilisation du métabolisme microbien pour obtenir un produit dont le résultat souhaité, allant de la panification à la thérapie génique. Les microbes peuvent être utilisés pour créer de grandes quantités de substances telles que des acides aminés, bière, médicaments, enzymes et vitamines.

**E. Microbiologie agricole**

Cette branche s'intéresse aux relations entre les microbes et plantes et animaux domestiqués.

Les spécialistes des plantes se concentrent sur les maladies des plantes, la fertilité des sols et les interactions nutritionnelles.

Les spécialistes des animaux travaillent avec des maladies infectieuses et d'autres associations des animaux qu'ont une relation avec les micro-organismes

**F. Microbiologie environnementale**

Ces microbiologistes étudient l'effet des microbes sur les divers habitats. Que ce soient les microbes en eau douce ou en eau salée, la couche arable ou la croûte terrestre, ils ont des effets profonds sur notre planète.

Les sous-disciplines de la microbiologie environnementale sont :

***Microbiologie aquatique*** : l'étude des microbes dans les eaux de surface de la terre.

***Microbiologie du sol*** : l'étude des microbes dans les parties terrestres de la planète.

***Géo-microbiologie*** : l'étude des microbes dans la croûte terrestre.

**Astrobiologie** (également appelée exobiologie) : la recherche / l'étude de la vie microbienne et autre dans des endroits hors de notre planète.

## 2. Histoire de la microbiologie

L'existence et le rôle des microorganismes dans les maladies ont été soupçonnés avant même leur découverte. Le philosophe romain Lucrèce (à peu près 98-55 av. J-C) et le médecin Girolamo Fracastoro (1478-1553) avaient suggéré que des êtres vivants invisibles provoquaient les maladies.

Les premières observations des microorganismes ont été réalisées par le Hollandais Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), qui construisait des microscopes simples, composés de lentilles doubles convexes maintenues entre deux plaques d'argent. Ses microscopes agrandissaient de 50 à 300 fois et rendait visible des bactéries et des protozoaires. Depuis la découverte de Van Leeuwenhoek, le monde des microorganismes a été révélé. 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.

Dans un domaine de recherche actif comme la microbiologie, il est impossible de présenter une histoire complète. Le tableau 1 résume les principaux événements historiques de développement de la microbiologie.

**Tableau 1 : Quelques événements importants dans le développement de la microbiologie (Prescott et al., 2003 ; Black, 2012 ; Kumar, 2012 ; Prescott, 2018)**

Date	Histoire de la microbiologie
1546	Fracastoro suggère que des organismes invisibles soient la cause de maladie
1590-1608	Jansen développe le premier microscope
1676	Leeuwenhoek découvre les « animalcules » grâce à un microscope qu'il a lui-même construit
1688	Redi publie son travail sur la génération spontanée des asticots
1765-1776	Spallanzani attaque la théorie de la génération spontanée
1786	Müller établit la première classification des bactéries
1798	Jenner introduit le vaccin contre la variole
1838-1839	Schwann et Schleiden émettent la théorie cellulaire
1835-1844	Bassi découvre qu'une maladie du ver à soie est due à des mycètes et propose que beaucoup de maladies soient d'origine microbienne
1847-1850	Semmelweis démontre que la fièvre puerpérale se transmet par les médecins et propose d'utiliser des antiseptiques pour prévenir la maladie
1849	Snow étudie le développement d'une épidémie de choléra à Londres

La période : 1857 - 1914 est appelée l'âge d'or de la microbiologie

<b>1857</b>	Pasteur démontre que la fermentation du sucre en acide lactique est due à un micro-organisme
<b>1858</b>	Virchow propose que toutes les cellules viennent de cellules
<b>1861</b>	Pasteur démontre que les micro-organismes ne proviennent pas d'une génération spontanée
<b>1867</b>	Lister publie son travail sur la chirurgie aseptique
<b>1869</b>	Miescher découvre les acides nucléiques
<b>1874</b>	Billroth découvre des bactéries rondes en chaînes
<b>1876–1877</b>	Koch démontre que le charbon est dû à <i>Bacillus anthracis</i>
<b>1878</b>	Koch démontre la différenciation des staphylocoques
<b>1879</b>	Hansen découvre <i>Mycobacterium leprae</i> comme agent causal de la lèpre
<b>1880</b>	Laveran découvre <i>Plasmodium</i> , responsable de la malaria Neisser découvre <i>Neisseria gonorrhoeae</i> comme agent causal de la gonorrhée Eberth découvre <i>Salmonella typhi</i> comme agent causal de la fièvre typhoïde Pasteur et Sternberg arrivent à l'isolement et la culture de pneumocoques à partir de la salive
<b>1881</b>	Koch cultive les bactéries sur gélatine Pasteur développe un vaccin contre le charbon
<b>1882</b>	Koch découvre le bacille de la tuberculose, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Leistikow et Loeffler cultivent <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Loeffler et Schutz Identifient l' <i>Actinobacillus</i> comme responsable de la maladie animale la morve
<b>1883</b>	Klebs Identifie <i>Corynebacterium diphtheriae</i> et la toxine comme agent causal de la diphtérie
<b>1884</b>	Les postulats de Koch sont publiés pour la première fois Loeffler cultive <i>Corynebacterium diphtheriae</i> Metchnikoff décrit la phagocytose Développement de l'autoclave La coloration de Gram est établie Rosenbach obtient des cultures pures de streptocoques et de staphylocoques
<b>1885</b>	Pasteur développe le vaccin contre la rage Escherich découvre <i>Escherichia coli</i> , une cause de diarrhée Bumm obtient une culture pure de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<b>1886</b>	Fraenkel découvre <i>Streptococcus pneumoniae</i> , responsable de pneumonie
<b>1887</b>	La boîte de Petri est inventée par Richard Petri Weichselbaum montre que <i>Neisseria meningitidis</i> est liée à la méningite Bruce Identifie <i>Brucella melitensis</i> comme agent causal de la brucellose chez les bovins
<b>1888</b>	Roux et Yersin découvrent l'action de la toxine diphtérique
<b>1889</b>	Charrin et Roger découvrent l'agglutination des bactéries dans le sérum immun Kitasato découvre que <i>Clostridium tetani</i> produit la toxine tétanique Beijerinck isole des bactéries des nodules radiculaires
<b>1887–1890</b>	Winogradsky étudie les bactéries sulfureuses et nitrifiantes
<b>1890</b>	Pfeiffer Identifie le bacille de Pfeiffer, <i>Haemophilus influenzae</i> Von Behring prépare des antitoxines contre la diphtérie et le tétanos
<b>1892</b>	Ivanowsky démontre l'origine virale de la maladie de la mosaïque du tabac
<b>1894</b>	Kitasato et Yersin isolent <i>Yersinia pestis</i> , responsable de la lèpre Pfeiffer découvre la bactériolyse dans le sérum immun
<b>1895</b>	Bordet découvre le complément et l'hémolyse
<b>1896</b>	Van Ermengem découvre <i>Clostridium botulinum</i> , responsable du botulisme Widal et Grunbaum développent un test de diagnostique basé sur l'agglutination des bacilles typhoïdes par le sérum immun

	<b>1897</b>	Buchner prépare un extrait de levure qui fermente Ross démontre que le parasite de la malaria est transporté par un moustique Kraus découvre des précipitines Ehrlich formule la théorie des chaînes latérales de la formation d'anticorps
Suite de l'âge d'or de la microbiologie	<b>1898</b>	Shiga découvre <i>Shigella dysenteriae</i> comme agent causal de la dysenterie Loeffler et Frosch découvrent la filtrabilité du virus qui cause la fièvre aphteuse
	<b>1899</b>	Beijerinck découvre la reproduction intracellulaire du virus de la mosaïque du tabac
	<b>1900</b>	Reed démontre que la fièvre jaune est transmise par un moustique
	<b>1901</b>	Bordet et Gengou identifient <i>Bordetella pertussis</i> comme agent causal de la coqueluche ; développement du test de fixation du complément
	<b>1902</b>	Landsteiner découvre les groupes sanguins Portier et Richet Travaillent sur l'anaphylaxie
	<b>1903</b>	Wright et d'autres découvrent des anticorps dans le sang d'animaux immunisés Remlinger et Riffat-Bey identifient le virus qui cause la rage
	<b>1905</b>	Schaudinn et Hoffmann montrent que le <i>Treponema pallidum</i> est la cause de la syphilis
	<b>1906</b>	Wasserman, Neisser et Bruck développent la réaction de Wasserman pour les anticorps de la syphilis
	<b>1907</b>	Asburn et Craig identifient le virus qui cause la dengue
	<b>1908</b>	Ehrlich devient le pionnier de la chimiothérapie moderne pour traiter la syphilis
	<b>1909</b>	Ricketts démontre que la fièvre des montagnes Rocheuses est transmise par des tiques Flexner et Lewis identifient le virus qui cause la poliomyélite
	<b>1910</b>	Rous découvre des virus qui peuvent induire le cancer
	<b>1911</b>	Rous découvre un virus responsable de cancer chez les poulets
	<b>1915–1917</b>	D'Herelle et Twort découvrent les virus bactériens
	<b>1919</b>	Bordet découvre les rôles du complément et des anticorps dans la cytolysse
	<b>1921</b>	Fleming découvre le lysozyme
	<b>1923</b>	Première édition du manuel de Bergey
	<b>1928</b>	Griffith découvre la transformation bactérienne
	<b>1929</b>	Fleming découvre la pénicilline
	<b>1931</b>	Van Niel montre que des bactéries photosynthétiques utilisent des composés réduits comme donneurs d'électrons sans production d'oxygène
<b>1933</b>	Ruska développe le premier microscope électronique à transmission	
<b>1935</b>	Stanley cristallise le virus de la mosaïque du tabac Domagk découvre les sulfamides	
<b>1937</b>	Chatton divise les organismes vivants en procaryotes et eucaryotes	
<b>1941</b>	Beadle et Tatum formulent l'hypothèse un gène, une enzyme	
<b>1944</b>	Avery démontre que l'ADN transporte l'information génétique durant la transformation Waksman découvre la streptomycine	
<b>1946</b>	Lederberg et Tatum décrivent la conjugaison bactérienne	
<b>1949</b>	Enders, Weller, et Robbins multiplient le poliovirus dans des cellules humaines en culture	
<b>1950</b>	Lwoff induit des bactéries lysogènes	
<b>1952</b>	Hershey et Chase démontrent que les bactériophages injectent leur ADN dans les cellules hôtes Zinder et Lederberg découvrent la transduction généralisée	
<b>1953</b>	La microscopie à contraste de phase se développe Medawar découvre la tolérance immunitaire Watson et Crick proposent la structure en double hélice de l'ADN	
<b>1954</b>	Salk développe le premier vaccin contre la poliomyélite	
<b>1955</b>	Jacob et Wollman découvrent que le facteur F est un plasmide Jerne et Burnet proposent la théorie de la sélection clonale	

<b>1957</b>	Isaacs et Lindenmann découvrent la substance antivirale naturelle, l'interféron
<b>1958</b>	Lederberg découvre la recombinaison génétique et l'organisation du matériel génétique des bactéries
<b>1959</b>	Yalow développe la technique des dosages radio-immunologiques Ochoa et Kornberg découvrent des substances chimiques dans les chromosomes qui jouent un rôle dans l'hérédité
<b>1960</b>	Burnet et Medawar découvrent la tolérance immunologique acquise
<b>1961</b>	Jacob et Monod proposent le modèle de l'opéron pour la régulation des gènes
<b>1961–1966</b>	Nirenberg, Khorana et d'autres élucident le code génétique
<b>1962</b>	Porter propose la structure de base de l'immunoglobuline G L'acide nalidixique, premier antimicrobien de type quinolone est synthétisé
<b>1966</b>	Rous reçoit le prix de Nobel pour la découverte des virus oncogènes (mais la découverte en 1911)
<b>1969</b>	Delbruck, Hershey et Luria découvrent le mécanisme d'infection virale dans les cellules vivantes
<b>1970</b>	Arber et Smith découvrent les endonucléases de restriction Temin et Baltimore découvrent la transcriptase inverse chez les rétrovirus
<b>1971</b>	Diemer identifie les viroïdes
<b>1972</b>	Edelman et Porter découvrent la structure et la nature chimique des anticorps
<b>1973</b>	Ames développe un test bactérien de détection des agents mutagènes et cancérogènes Cohen, Boyer, Chang, et Helling se servent de plasmides vecteurs pour cloner des gènes dans des bactéries
<b>1975</b>	Kohler et Milstein développent une technique pour produire des anticorps monoclonaux Baltimore, Temin et Dulbecco découvrent les interactions entre les virus tumoraux et le matériel génétique de la cellule Découverte de la borréliose de Lyme
<b>1977</b>	Reconnaissance des archéobactéries comme un groupe distinct de micro-organismes Gilbert et Sanger développent des techniques de séquençage de l'ADN
<b>1978</b>	Smith, Nathans et Arber découvrent des enzymes de restriction pour couper l'ADN
<b>1979</b>	Synthèse de l'insuline grâce à la technologie de l'ADN recombinant Eradication de la variole Henle identifie le premier virus régulièrement associé au cancer humain
<b>1980</b>	Développement du microscope à effet tunnel et à balayage
<b>1982</b>	Vaccin contre l'hépatite B obtenu par des techniques de génie génétique
<b>1982–1983</b>	Cech et Altman découvrent l'ARN catalytique
<b>1983–1984</b>	Le virus humain de l'immunodéficience est identifié par Montagnier et Gallo Développement de la réaction de polymérisation en chaîne par Mullis
<b>1986</b>	Premier vaccin (hépatite B) produit par génie génétique et reconnu utilisable chez l'homme
<b>1990</b>	Premiers tests de thérapie génique humaine
<b>1992</b>	Premiers tests chez l'homme d'une thérapie antisens
<b>1995</b>	Approbation aux USA de l'utilisation du vaccin anti-varicelle Séquence du génome de <i>Haemophilus influenzae</i> Lewis, Nusslein et Wieschans étudient la physiologie de la génétique des microbes
<b>1996</b>	Séquence du génome de <i>Methanococcus jannaschii</i> Séquence du génome de levure
<b>1997</b>	Découverte de la plus grande bactérie connue : <i>Thiomargarita namibiensis</i> Séquence du génome d' <i>Escherichia coli</i> Prusiner découvre des prions
<b>2000</b>	Découverte de 2 chromosomes distincts chez <i>Vibrio cholerae</i>

2002	Synthèse chimique du poliovirus infectieux
2003	Apparition d'Epidémie de SRAS en Chine
2005	Marshall et Warren montrent que Helicobacter pylori est la cause des ulcères d'estomac
2007	Capecchi, Smithies et Evans réussissent à la création de souris knock-out en utilisant des recherches sur les cellules souches
2008	Montagnier et Barre-Sinoussi découvrent le virus de l'immunodéficience humaine Hausen découvre les papillomavirus humains responsables du cancer du col de l'utérus
2020	Apparition d'Epidémie de COVID-19 due au virus SARS-CoV-2

### 3. Classification du monde vivant

Tous les organismes vivants sur terre sont composés de l'un ou l'autre de deux types de cellules : les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes en fonction des différences d'organisation cellulaire et de biochimie.

**A. Procaryotes :** Les cellules procaryotes (noyau pro ou primitif) n'ont pas de noyau lié à la membrane. Toutes les bactéries et cyanobactéries (anciennement appelées algues bleues) sont des procaryotes.

Les bactéries sont des micro-organismes procaryotes et ne contiennent pas de chlorophylle, mais en revanche, les cyanobactéries (algues bleues) possèdent de la chlorophylle. Elles sont unicellulaires et ne présentent pas de véritable ramification, sauf chez les bactéries dites « supérieures » (Actinomycetales).

**B. Eucaryotes :** Les cellules eucaryotes (eu ou vrai noyau) ont un noyau lié à la membrane. Les autres algues (à l'exclusion des algues bleu-vert), les champignons, les moisissures visqueuses, les protozoaires, les plantes supérieures et les animaux sont des eucaryotes.

Trois caractéristiques fondamentales sont souvent considérées pour distinguer les procaryotes des eucaryotes : la petite taille, l'absence de cytoplasme complexe contenant des organites et l'absence de membrane nucléaire. Les différences entre les cellules procaryotes et eucaryotes ont été résumées dans le tableau 2

Tableau 2: Comparaison entre les cellules procaryotes et eucaryotes (Black, 2012)

Caractéristiques	Cellules procaryotes	Cellules eucaryotes
<b>Structures génétiques</b>		
Matériel génétique (ADN)	Se trouve généralement dans un seul chromosome circulaire	Se trouve généralement dans des chromosomes appariés
Localisation de l'information génétique	Région nucléaire (nucléoïde)	Noyau membranaire
Nucléole	Absent	Présent
Histones	Absentes	Présentes
ADN extra-chromosomique	Dans les plasmides	Dans les organites, comme les mitochondries et chloroplastes et dans les plasmides
<b>Structures intracellulaires</b>		
Fuseau mitotique	Absent	Présent lors de la division cellulaire
Membrane plasmique	Structure fluide-mosaïque dépourvue de stéroïls	Structure fluide-mosaïque contenant des stéroïls
Membranes internes	Uniquement dans les organismes photosynthétiques	Nombreux organites membranaires
Réticulum endoplasmique	Absent	Présent
Enzymes respiratoires	Membrane cellulaire	Mitochondries
Chromatophores	Présents dans les bactéries photosynthétiques	Absents
Chloroplastes	Absents	Présents dans certains
Appareil de Golgi	Absent	Présent
Lysosomes	Absents	Présents
Peroxisomes	Absents	Présents
Ribosomes	70S	80S dans le cytoplasme et sur réticulum endoplasmique, 70S dans les organites
Cytosquelette	Absent	Présent
<b>Structures extracellulaires</b>		
Paroi cellulaire	Peptidoglycane présent sur la plupart des cellules	Cellulose, chitine ou les deux présentes sur la plante et cellules fongiques
Couche externe	Capsule ou couche visqueuse	Pellicule, test ou coque chez certains protistes
Flagelle	Lorsqu'il est présent, consiste en fibrilles de flagelline	Lorsqu'il est présent, consiste en une structure complexe entourée d'une

Cils	Absent	membrane avec un arrangement de microtubules "9 + 2"
pili	Présent comme pili d'attachement ou de conjugaison dans certaines cellules procaryotes	Présent sous forme de structures plus courtes que les flagelles, mais similaires à celles-ci, dans certaines cellules eucaryotes
Processus de reproduction		
Division cellulaire	Fission binaire	Mitose et/ou méiose
Échange sexuel de matériel génétique	Ne fait pas partie de la reproduction	Méiose
Reproduction sexuée ou asexuée	Uniquement reproduction asexuée	Reproduction sexuée ou asexuée

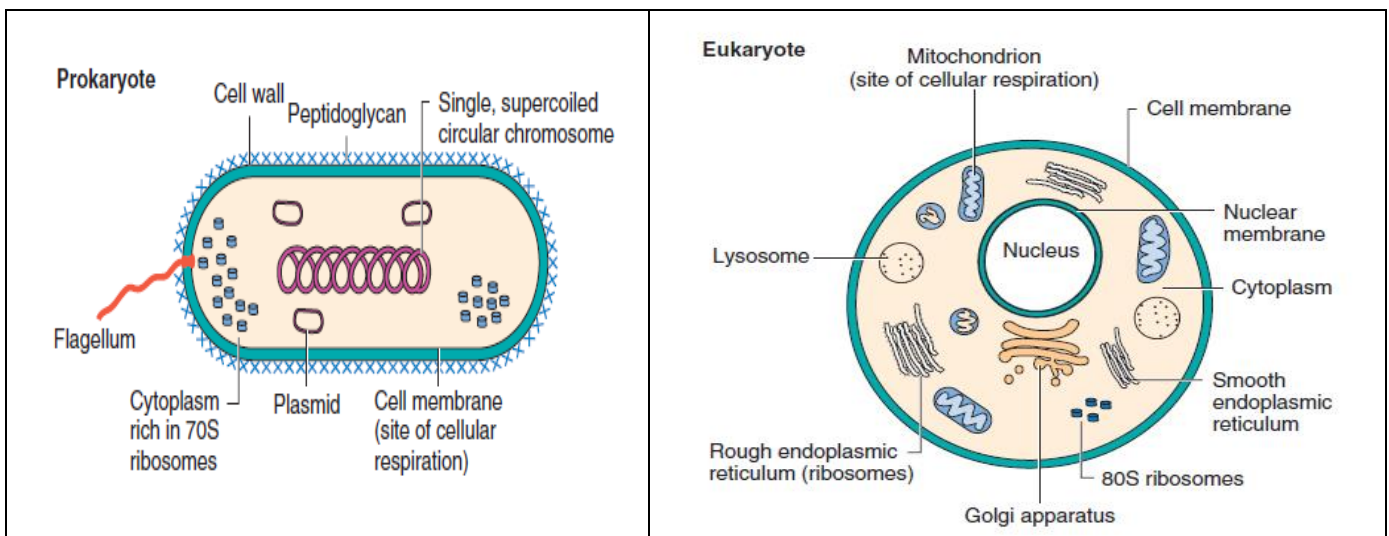


Figure 2 : Principales caractéristiques des procaryotes et des eucaryotes (Murray et al., 2016).

#### 4. Diversité des micro-organismes (Eucaryotes et Procaryotes)

Les micro-organismes sont de deux types fondamentalement différents – procaryotes et eucaryotes – et sont répartis en plusieurs règnes.

##### - Bactéries

Parmi la grande variété de micro-organismes identifiés, les bactéries ont probablement été les plus étudiées. La majorité des bactéries sont des organismes **unicellulaires** de forme sphérique, en bâtonnet ou en spirale, mais quelques types forment des filaments. La plupart sont si petits qu'ils ne peuvent être vus au microscope optique qu'au grossissement le plus élevé. Bien que les bactéries soient cellulaires, elles

n'ont pas de noyau cellulaire et ne possèdent pas les structures intracellulaires entourées d'une membrane que l'on trouve dans la plupart des autres cellules. De nombreuses bactéries absorbent les nutriments de leur environnement, mais certaines fabriquent leurs propres nutriments par photosynthèse ou d'autres processus de synthèse. Certains sont stationnaires, d'autres se déplacent. Les bactéries sont largement répandues dans la nature, par exemple dans les milieux aquatiques et dans les matières en décomposition. Et certains provoquent parfois des maladies.

### - Archéobactéries

Le groupe connu sous le nom d'*Archaea* (ar-kee-uh) est très similaire aux bactéries. Les archées et les bactéries appartiennent au même royaume, appelé Monera. Une nouvelle catégorie de classification, le Domaine, a été érigée comme étant supérieure au Royaume. Il existe 3 domaines : les *Bactéria*, les *Archéa* et les *Eucarya*. Comme les bactéries, les archées sont **unicellulaires** et n'ont pas de noyau. Cependant, ils sont génétiquement et métaboliquement très différents. De nombreuses archées sont extrémophiles, préférant vivre dans des environnements présentant des températures, un pH, des salinités et des pressions hydrostatiques et osmotiques extrêmes. Leurs lipides, parois cellulaires et flagelles diffèrent considérablement de ceux des bactéries. Il n'est pas prouvé que les archées provoquent des maladies chez les humains ; en fait, beaucoup sont très importants dans le tube digestif des ruminants. Les archéobactéries ne constituent pas un groupe homogène mais un ensemble de phénotypes divers :

- *Les méthanogènes* : réduisent les composés contenant du carbone en gaz méthane.

- *Les halophiles extrêmes* : vivent dans des environnements excessivement salés.

- *Les thermoacidophiles* : vivent dans des environnements acides chauds, tels que des cheminées volcaniques au fond des océans.

### - Cyanobactéries

Les cyanobactéries (si'an-o-bak-ter'e-ah), autrefois connues sous le nom d'algues bleu-vert, revêtent une importance particulière dans l'équilibre de la nature. Ce sont des organismes photosynthétiques, généralement **unicellulaires**, bien que les cellules puissent parfois être reliées pour former des filaments filiformes. Étant autotrophes, les cyanobactéries n'envahissent pas d'autres organismes et ne présentent donc aucune menace pour la santé humaine, à l'exception des toxines (poisons) que certaines rejettent dans l'eau.

Les cyanobactéries se développent dans une grande variété d'habitats, y compris les habitats anaérobies, où elles servent souvent de source de nourriture à des organismes hétérotrophes plus complexes. Certains « fixent » l'azote atmosphérique et le convertissent en composés azotés que les algues et d'autres organismes peuvent utiliser. Certaines cyanobactéries prospèrent également dans les eaux riches en

nutriments et sont responsables de la prolifération d'algues, une épaisse couche d'algues à la surface de l'eau qui empêche la lumière de pénétrer dans l'eau située en dessous. De telles proliférations libèrent des substances toxiques qui peuvent donner à l'eau une odeur désagréable et même nuire aux poissons et au bétail qui boivent l'eau.

Contrairement aux bactéries, plusieurs groupes de micro-organismes sont constitués de cellules plus grandes et plus complexes dotées d'un noyau cellulaire. Ils comprennent des algues, des champignons et des protozoaires, qui peuvent tous être facilement observés au microscope optique.

#### - Protozoaires

Les protozoaires (pro-to-zo'ah) sont également des organismes microscopiques **unicellulaires** avec au moins un noyau et de nombreuses structures intracellulaires. Quelques espèces d'amibes sont suffisamment grandes pour être vues à l'œil nu, mais nous ne pouvons étudier leur structure qu'au microscope. De nombreux protozoaires obtiennent leur nourriture en englobant ou en ingérant des micro-organismes plus petits. La plupart des protozoaires peuvent se déplacer, mais quelques-uns, notamment ceux qui causent des maladies humaines, ne le peuvent pas. Les protozoaires se trouvent dans divers environnements aquatiques et terrestres, ainsi que chez des animaux tels que les moustiques porteurs du paludisme.

#### - Champignons microscopiques

De nombreux champignons (fun'ji), comme les levures et certaines moisissures, sont des organismes microscopiques **unicellulaires**, mais certains champignons sont des organismes macroscopiques multicellulaires. Les champignons possèdent également un noyau cellulaire et des structures intracellulaires. Tous les champignons absorbent les nutriments prêts à l'emploi de leur environnement. Certains champignons forment de vastes réseaux de filaments ramifiés, mais les organismes eux-mêmes ne bougent généralement pas. Les champignons sont largement répandus dans l'eau et le sol en tant que décomposeurs d'organismes morts. Certains sont importants en médecine, soit comme agents de maladies telles que la teigne et les mycoses vaginales, soit comme sources d'antibiotiques.

#### - Algues microscopiques

De nombreuses algues (al'je) sont des organismes microscopiques **unicellulaires**, mais certaines algues marines sont de grands organismes multicellulaires relativement complexes. Contrairement aux bactéries, les algues ont un noyau cellulaire clairement défini et de nombreuses structures intracellulaires entourées d'une membrane. Toutes les algues photosynthétisent leur propre nourriture comme le font les plantes, et beaucoup peuvent se déplacer. Les algues sont largement répandues dans les eaux douces et les océans. Parce qu'elles sont si nombreuses et parce qu'elles captent l'énergie du soleil dans la nourriture qu'elles fabriquent, les algues constituent une source

importante de nourriture pour d'autres organismes. Les algues ont peu d'importance médicale ; une seule espèce, *Prototheca*, s'est avérée causer des maladies chez l'homme. Ayant perdu sa chlorophylle, et donc la capacité de produire sa propre nourriture, il fabrique désormais la nourriture des humains.

#### - Virus

Les virus sont des agents infectieux **acellulaires** qui doivent envahir une cellule hôte pour se répliquer (parasite obligatoire). Ce sont les plus petits de tous les microorganismes (20 – 25 nm à 200 – 300 nm). Ils contiennent de l'acide nucléique (ADN ou ARN) et sont recouverts de protéines. Ils n'ont pas été affectés à un règne. En fait, ils ne présentent que quelques caractéristiques associées aux organismes vivants.

#### - Agents transmissibles non conventionnels (ATNC) (Prions, Viroïdes)

Des agents pathogènes **acellulaires** encore plus petits sont les **Viroïdes** (acide nucléique sans revêtement protéique) et le **Prion** (protéine sans acide nucléique). Il a été démontré que les viroïdes provoquent diverses maladies des plantes, tandis que les prions provoquent la maladie : l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) – communément appelée maladie de la vache folle et des troubles associés.

- Les **prions** (selon les recherches de Prusiner) ont les caractéristiques suivantes :

1. Les prions résistent à l'inactivation par chauffage à 90°C, ce qui inactive les virus.
2. L'infection à prions n'est pas sensible à la radiothérapie qui endommage le génome du virus.
3. Les prions ne sont pas détruits par les enzymes qui digèrent l'ADN ou l'ARN.
4. Les prions sont sensibles aux agents dénaturants des protéines, tels que le phénol et l'urée.
5. Les prions ont un appariement direct d'acides aminés.

Les recherches de Prusiner [Stanley Prusiner qui a proposé de nommer la particule infectieuse prion (pré'on) en 1982, et il a reçu le prix Nobel pour ses travaux sur les prions] et celles d'autres suggèrent que les prions sont des protéines normales qui ne se replient pas correctement, peut-être à la suite d'une mutation. Les protéines normales et inoffensives se trouvent sur la membrane plasmique de nombreuses cellules de mammifères, en particulier les cellules cérébrales. Les chercheurs pensent que les protéines prions (PrP) se collent ensemble à l'intérieur des cellules, formant de petites fibres ou fibrilles. Parce que les fibrilles ne peuvent pas être organisées correctement dans la membrane plasmique, de telles agrégations finissent par tuer la cellule. Les

chercheurs pensent que les prions provoquent le repliement incorrect d'autres copies de la protéine normale.

Lors d'une épidémie de maladie de la vache folle en Grande-Bretagne au début des années 1990, le prion infectieux provenait à l'origine d'un supplément protéique présent dans les aliments. Ce supplément comprenait des sous-produits de moutons infectés par la tremblante ! Les prions ne semblent pas spécifiques à une espèce.

- Les **viroïdes** diffèrent des virus de six manières :

1. Chaque viroïde est constitué d'une seule molécule d'ARN circulaire de faible poids moléculaire, longue de 246 à 399 nucléotides.

2. Les viroïdes existent à l'intérieur des cellules, généralement à l'intérieur des nucléoles, sous forme de particules d'ARN sans capsid ni enveloppe.

3. Contrairement aux virus tels que les parvovirus, les viroïdes ne nécessitent pas de virus auxiliaire.

4. L'ARN viroïde ne produit pas de protéines.

5. Contrairement à l'ARN viral, qui peut être copié dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule hôte, l'ARN viroïde est toujours copié dans le noyau de la cellule hôte.

6. Les particules viroïdes ne sont pas visibles dans les tissus infectés sans l'utilisation de techniques spéciales pour identifier les séquences nucléotidiques dans l'ARN.

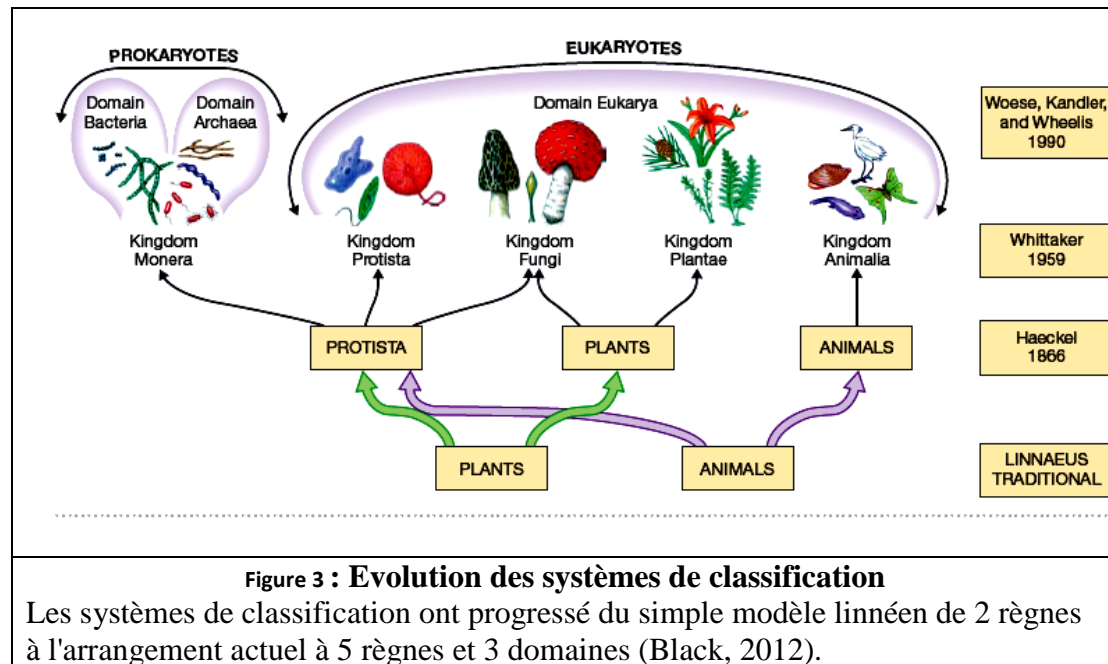
Bien que certains viroïdes n'entraînent aucun effet apparent ou seulement de légers effets pathogènes chez l'hôte, d'autres viroïdes sont connus pour provoquer plusieurs maladies mortelles des plantes, telles que la maladie du tubercule en fuseau de la pomme de terre, la maladie du rabougrissement du chrysanthème, la maladie du fruit pâle du concombre et la maladie du rabougrissement apical de la tomate.

## 5. Taxonomie

Un système de classification basé sur le schéma consistant à affecter des individus à un groupe et à les affecter à des groupes progressivement plus inclusifs et plus larges est appelé schéma hiérarchique de classification. Le système formel d'organisation, de classification et de dénomination des êtres vivants est appelé taxonomie (Gr. Taxis = arrangement + nomas = nom). Les principaux objectifs de la taxonomie sont la classification, la nomenclature et l'identification. Ces trois domaines sont interdépendants et jouent un rôle essentiel dans la tenue d'un inventaire dynamique de la vaste gamme d'êtres vivants. Une fois que les caractéristiques du micro-organisme sont déterminées et cataloguées de manière appropriée, le processus de classification

commence. L'arrangement ordonné des organismes en groupe selon la relation évolutive est appelé classification.

La taxonomie des organismes a progressé en fonction du développement des connaissances, elle repose sur un ensemble de caractères phénotypiques, biochimiques, génotypique et phylogénétique (figure 3).



Le système de classification à cinq règnes (*Monera*, *Protista*, *Fungi*, *Animalia* et *Plantae*) a été proposé par Whittaker (1959). Les organismes y sont divisés selon au moins trois critères majeurs : le type cellulaire (procaryote ou eucaryote), le niveau d'organisation (unicellulaire ou multicellulaire) et le type de nutritionnel. Ce système a été modifié par Woese *et al.* (1990), qui ont proposé une classification à trois domaines : les *Bacteria* (les bactéries vraies ou eubactéries), les *Archaea* (les archées) et les *Eucarya* (tous les organismes eucaryotes). Actuellement, ce système à trois domaines et cinq règnes est largement accepté par la communauté scientifique.

Le domaine des *Eucarya* comprend les microorganismes classés en tant que protistes, champignons, animaux et végétaux.

Les **protistes** sont des eucaryotes à organisation unicellulaire, soit sous la forme de cellules solitaires, soit en colonies de cellules dépourvues de vrais tissus. Parmi les protistes se trouvent les algues et les protozoaires.

Les champignons ou *Fungi* sont un groupe varié de microorganismes allant des levures unicellulaires jusqu'aux moisissures et champignons.

Le tableau 3 résume les principales caractéristiques différentielles entre les trois domaines.

**Tableau 3 : Principales caractéristiques différentielles entre les *Bacteria*, les *Archaea* et les *Eukarya* (Trivedi et al., 2010)**

Caractéristiques	<b>Bacteria</b>	<b>Archaea</b>	<b>Eukarya</b>
Morphologique et Génétique			
<b>Structure cellulaire procaryote</b>	Oui	Oui	Non
<b>ADN présent sous forme covalente fermée et circulaire</b>	Oui	Oui	Non
<b>Protéine histone présente</b>	Non	Oui	Oui
<b>Noyau membranaire</b>	Absent	Absent	Présent
<b>Paroi cellulaire</b>	Acide muramique présent	Acide muramique absent	Acide muramique absent
<b>Lipides membranaires</b>	Liés à Ester	Liés à Éther	Liés à Ester
<b>Ribosomes (masse)</b>	70 S	70 S	80 S
<b>Initiateur (ARNt)</b>	Formyméthionine	Méthionine	Méthionine
<b>Introns dans la plupart des gènes</b>	Non	Non	Oui
<b>Opérons</b>	Oui	Oui	Non
<b>Coiffage et queue poly A de l'ARNm</b>	Non	Non	Oui
<b>Plasmides</b>	Oui	Oui	Rare
<b>Sensibilité des ribosomes à la toxine diphtérique</b>	Non	Oui	Oui
<b>ARN polymérase</b>	Un (4 sous-unités)	Plusieurs (8-12 sous-unités chacune)	Trois (12-14 sous-unités chacune)
<b>Facteurs de transcription requis</b>	Non	Oui	Oui
<b>Structure du promoteur</b>	-10à-35 séquences	Boîte TATA	Boîte TATA
<b>Sensibilité au chloranphénicol, à la streptomycine et à la kanamycine</b>	Oui	Non	Non
Physiologique			
<b>Méthanogenèse</b>	Non	Oui	Non
<b>Réduction dissimilative de S° ou SO<sub>4</sub><sup>-3</sup> en H<sub>2</sub>S ou Fe<sup>+3</sup> → Fe<sup>+2</sup></b>	Oui	Oui	Non
<b>Nitrification</b>	Oui	Non	Non
<b>Dénitrification</b>	Oui	Oui	Non
<b>Fixation de l'azote</b>	Oui	Oui	Non
<b>Photosynthèse à base de chlorophylle</b>	Oui	Non	Oui (dans le chloroplaste)
<b>Métabolisme énergétique à base de rhodopsine</b>	Oui	Oui	Non
<b>Chimiolithotrophie</b>	Oui	Oui	Non
<b>Vésicules de gaz</b>	Oui	Oui	Non
<b>Synthèse de granulés de stockage de carbone composés de poly-β-hydroxy-alcanoates</b>	Oui	Oui	Non
<b>Croissance au dessus de 80°C</b>	Oui	Oui	Non
Exemples	E. coli	Metlzanosarcina	Amoeba

## 6. Nomenclature

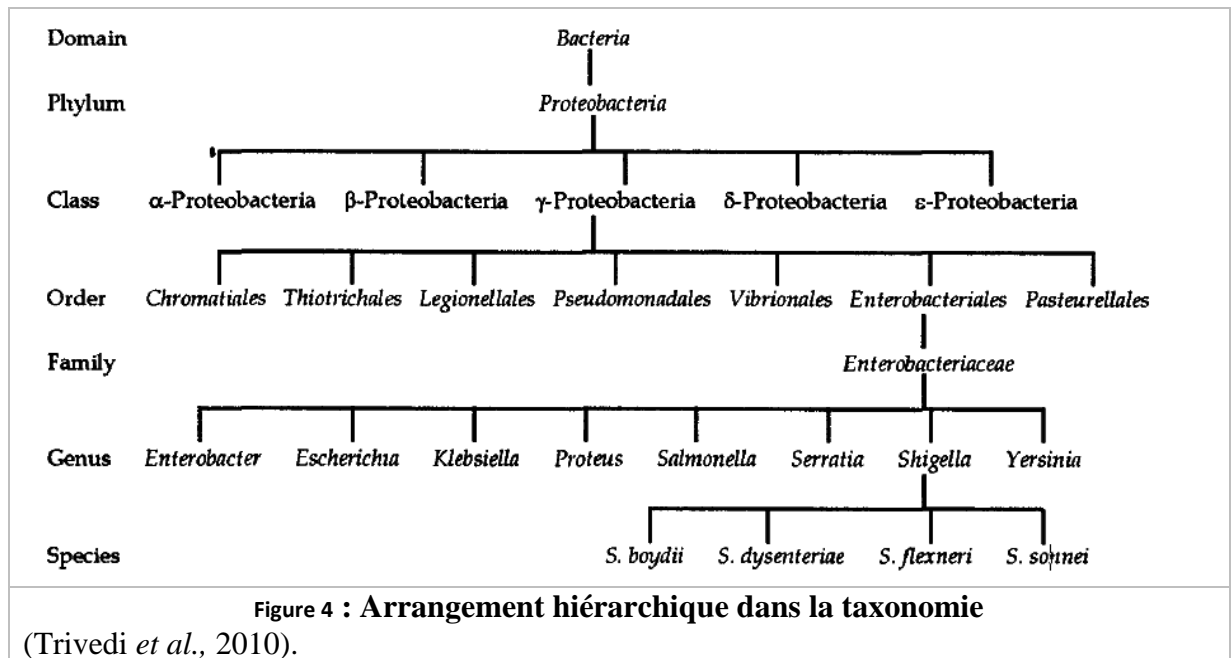
La nomenclature est la branche de la taxinomie qu'est le processus d'attribution de noms aux différents classements taxonomiques de chaque espèce microbienne. Le processus de découverte et d'enregistrement des caractéristiques distinctives de l'organisme est appelé identification.

Au dix-huitième siècle (1735), un biologiste suédois nommé Carolus Linnæus a établi les règles de base pour les catégories taxonomiques ou les taxons et a donné le système de nomenclature **binomial**, c'est-à-dire la dénomination d'un organisme par deux noms - **genre** et **espèce**.

Le nom de l'organisme commence par le nom générique (**genre**) qui s'écrit toujours avec une première lettre en majuscule, qui est suivi du nom de **l'espèce** qui commence par une lettre minuscule. Les deux noms doivent être écrits en italique ou soulignés lorsqu'ils sont écrits à la main. Lorsqu'il n'y a aucun risque de confusion, le nom du genre peut être abrégé en une seule lettre. Ainsi, *Escherichia coli* est souvent écrit *E. coli*. En l'absence d'identification précise d'une espèce, on utilise la nomenclature *sp* (espèce non précisée) : exemple *Klebsiella sp*. La source de la nomenclature est généralement latine ou grecque. Carl Linnæus (1707-1778) était un naturaliste suédois, appelé « Père de la taxonomie », classait les organismes selon son propre système de classification (système binomial). Un certain nombre d'espèces ont été nommées en l'honneur d'un scientifique qui a découvert le microbe à l'origine ou qui a apporté une contribution exceptionnelle au domaine. Par exemple *E. coli*, le nom générique *Escherichia* est nommé d'après Theodor Escherich, un bactériologiste allemand qui a décrit la bactérie pour la première fois, et le nom spécifique *coli* fait référence au côlon, ce qui est approprié car cet organisme est un résident entérique de l'homme.

En plus d'introduire le système binomial de nomenclature, Linnæus a également établi une hiérarchie de rangs taxonomiques : espèce, genre, famille, ordre, classe, embranchement (phylum) ou division et royaume.

Le schéma Linnéen reste aujourd'hui la base de la classification biologique qui donne à chaque organisme un nom unique.



L'espèce est l'unité **fondamentale** de la classification. Elle regroupe les organismes qui possèdent de nombreux caractères communs. A l'intérieur d'une même espèce, on distingue des **souches**. Une souche est un sous-groupe d'une espèce possédant une ou plusieurs caractéristiques qui la distinguent des autres sous-groupes de la même espèce. Chaque souche est identifiée par un nom, un numéro ou une lettre qui suit l'espèce spécifique. Par exemple, la souche K12 d'*E.coli* a été largement étudiée en raison de ses plasmides et d'autres caractéristiques génétiques, et la souche *E. coli* 0157:H7 provoque une inflammation hémorragique du côlon chez l'homme.

---

---

## Chapitre 2 : L'Anatomie bactérienne

La bactérie est une unité cellulaire, c'est-à-dire une cellule à un seul chromosome sans membrane nucléaire, sans mitochondrie, sans appareil de Golgi, de taille variable (quelque fraction de millimètre à quelque micromètre) assurant un cycle biochimique à multiplication importante.

Chez les bactéries, on distingue :

- des structures **obligatoires**, présentes chez toutes les bactéries
- des structures dont la présence est **facultative** et caractérisent certains groupes bactériens.

### 1. Morphologie bactérienne

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

#### a. Taille des bactéries

Les bactéries sont de très petite taille. L'unité de mesure en bactériologie est le micron ou micromètre ( $\mu\text{m}$ ).

1 micron ( $\mu$ ) ou micromètre ( $\mu\text{m}$ ) = un millionième de mètre [1/1000000 mètre (m)] ou un millième de millimètre [1/1000 millimètre (mm)].

1 millimicron ( $\text{m}\mu$ ) ou nanomètre (nm) = un millième de micron [1/1000 micron ( $\mu\text{m}$ )] ou un millionième de millimètre [1/1000000 millimètre (mm)].

1 unité Angström ( $\text{\AA}$ ) = un dixième de nanomètre (1/10 nm).

Le diamètre du plus petit corps qui peut être résolu et vu clairement à l'œil nu est de 200  $\mu\text{m}$ . Les bactéries d'importance médicale mesurent généralement 0,2 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre et environ 2 à 5  $\mu\text{m}$  de longueur. Pour voir les bactéries, un microscope optique doit être utilisé. Les meilleurs microscopes optiques, utilisant les optiques les plus avancées, sont capables de grossissements de 1000 à 2000 fois. Le microscope électronique offre un superbe pouvoir de résolution.

#### b. Forme des bactéries

Selon leur forme, les bactéries sont classées en plusieurs types (figure 5) :

**1. Coques (Cocci) :** Les coques (coccus [kok'us] ; pluriel : cocci [kok'se] : Cocci signifiant baie) sont des cellules ovales, sphériques, ou presque sphériques.

**2. *Bacilles*** : Les bacilles ([ba-sil'us] ; pluriel : bacilli [bas-il'e] : de bacillus signifiant bâtonnet) sont des cellules relativement droites en forme de bâtonnet (cylindrique). Certaines bactéries, appelées coccobacilles, sont de courts bâtonnets de forme intermédiaire entre les cocci et les bacilles. Ces formes doivent être soigneusement différenciées des cocci.

**3. *Vibrios*** : Les vibrions [vib're-o] sont comme comma (,) ou en forme de virgule ou petite tige incurvée. Ils portent des flagelles à leur extrémité et tirent leur nom de leur motilité vibratoire caractéristique.

**4. *Spirilla***: Les spirilles (un spirillum [spiril'um] ; pluriel : [spirilla]) sont des formes rigides en spirale ou en hélice.

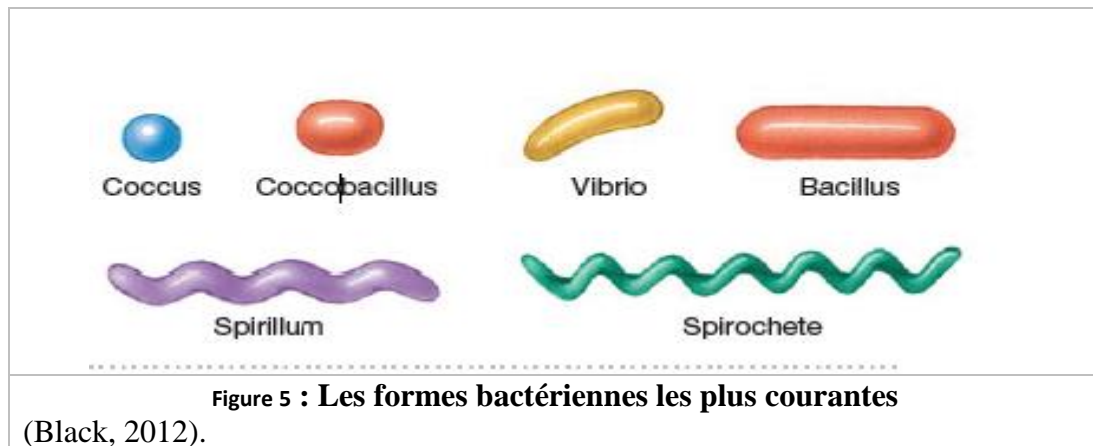
**5. *Spirochètes*** : Les spirochètes ([spi'ro-ket] de speira signifiant bobine et chaite signifiant cheveux) sont des formes spirale minces et flexueuses. Elles ont l'apparence d'un tire-bouchon.

**6. *Actinomycètes*** : Les actinomycètes (actine, rayon ; mykes, champignon) sont des bactéries filamenteuses ramifiées ressemblant à des champignons. Ils possèdent une paroi cellulaire rigide.

**7. *Mycoplasme*** : Les mycoplasmes sont des bactéries déficientes en paroi cellulaire et ne possèdent donc pas de morphologie stable. Ils se présentent sous forme de corps ronds ou ovales et de filaments entrelacés.

Certaines bactéries ne correspondent à aucune des catégories précédentes, mais ont plutôt des formes fusiformes ou des formes irrégulières et lobées. Des bactéries carrées ont été découvertes sur les rives de la mer Rouge en 1981. Elles mesurent 2 à 4 µm de côté et s'agrègent parfois en feuilles gaufrées. Les bactéries triangulaires n'ont été découvertes qu'en 1986.

Même les bactéries du même type varient parfois en taille et en forme. Lorsque les nutriments sont abondants dans l'environnement et que la division cellulaire est rapide, les bâtonnets sont souvent deux fois plus gros que ceux d'un environnement avec seulement un apport modéré de nutriments. Bien que les variations de forme au sein d'une même espèce de bactérie soient généralement faibles, il existe des exceptions. Certaines bactéries varient considérablement dans leur forme même au sein d'une même culture, un phénomène connu sous le nom de pléomorphisme. De plus, dans les cultures vieillissantes où les organismes ont épuisé la plupart des nutriments et déposé des déchets, non seulement les cellules sont généralement plus petites, mais elles présentent souvent une grande diversité de formes inhabituelles.



### C. Arrangement des cellules bactériennes

Les espèces bactériennes pathogènes apparaissent sous forme de sphères (cocci), de bâtonnets (bacilles) et de spirales. Les bactéries présentent parfois un arrangement ou un groupement cellulaire caractéristique (figure 6). Le type d'arrangement cellulaire est déterminé par le plan à travers lequel la fission binaire a lieu et par la tendance des cellules filles à rester attachées même après la division.

Les procaryotes se divisent par fission binaire, plutôt que par mitose ou méiose. Un nouveau matériau de paroi cellulaire se développe et la cellule se pince en deux dans cette zone. À l'intérieur, le chromosome s'est dupliqué et on en trouve un dans chaque cellule fille.

#### Arrangement de coques

1. **Diplocoques** : Les coques peuvent être disposées par paires (indiquées par le préfixe diplo- : diplocoques) lorsque les coques se divisent et restent ensemble.
2. **Chaînes longues** : chaînes longues (*Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*) lorsque les cellules adhèrent après des divisions répétées dans un même plan.
3. **Grappes ressemblant à du raisin** : Grappes ressemblant à du raisin (staphylocoques) lorsque les cocci se divisent en plans aléatoires.
4. **Tétrades** : Groupes carrés de quatre cellules (tétrades) lorsque les cocci se divisent en deux plans comme chez les membres du genre *Micrococcus*.
5. **Paquets cubiques** : Paquets cubiques de huit cellules (genre *Sarcina*) lorsque les cocci se divisent en trois plans.

#### Arrangement des bacilles

Les bacilles ne se divisent que sur leurs axes courts (en un seul plan), par conséquent, les motifs qu'ils forment sont limités. La forme de l'extrémité du bâtonnet varie souvent d'une espèce à l'autre et peut être plate, arrondie, en forme de cigare ou bifurquée. Certains bacilles peuvent aussi être disposés en chaînes ou côte à côte (streptobacilles : comme les wagons). D'autres sont disposés à différents angles les uns

par rapport aux autres, ressemblant à la lettre V présentant un arrangement de lettres cunéiformes ou chinoises et est caractéristique de *Corynebacterium diphtheriae*.

Les bactéries spirales ne sont généralement pas regroupées.

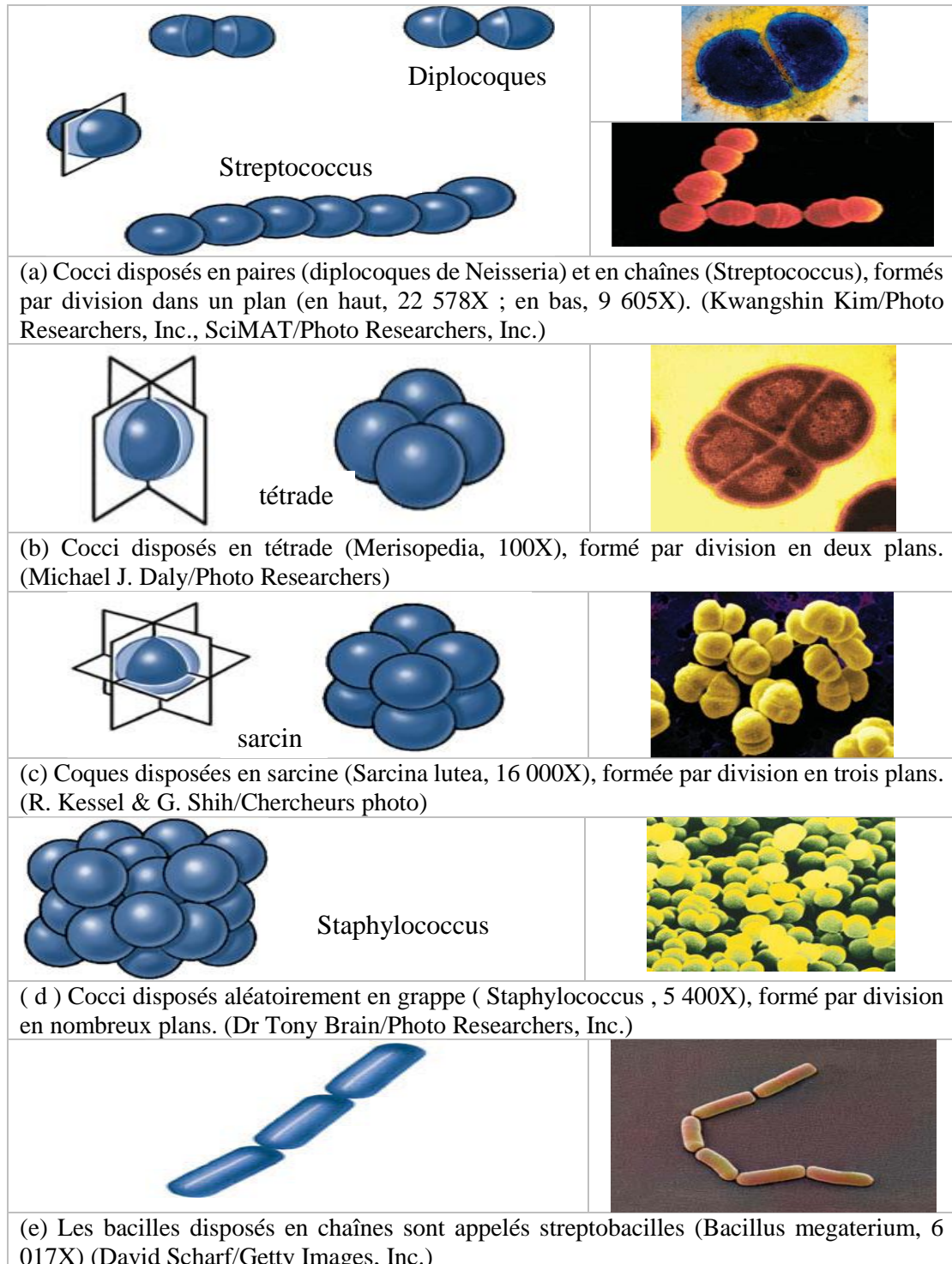


Figure 6 : Arrangements des bactéries

(Black, 2012).

## 2. Structures obligatoires

Les cellules bactériennes (figure 7) se composent des éléments obligatoires suivants :

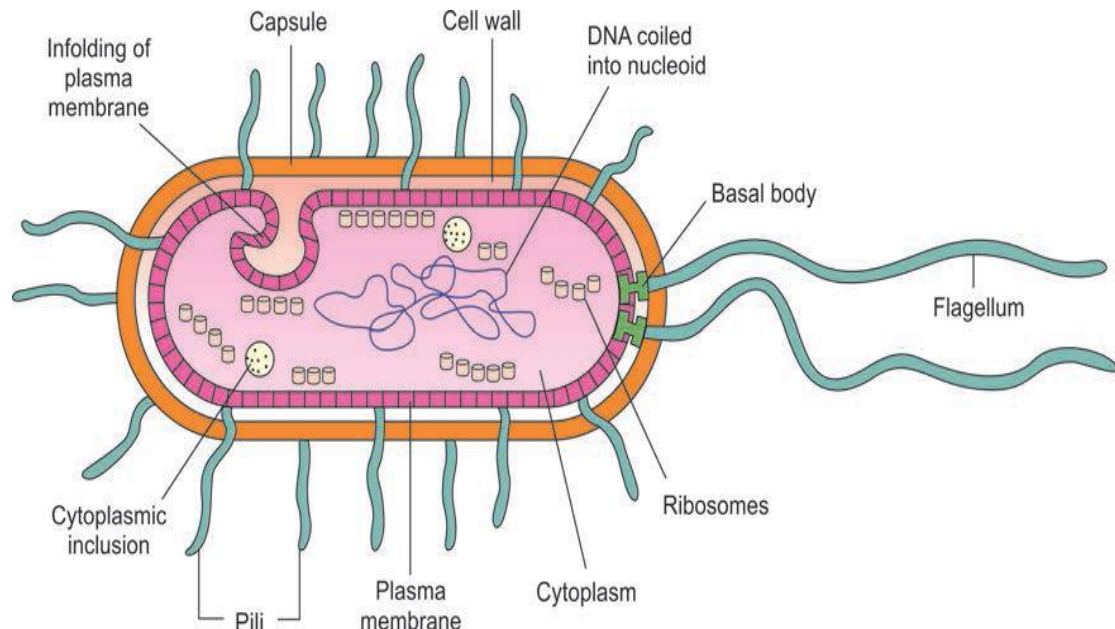


Figure 7 : Les principales structures de la cellule bactérienne

(Kumar, 2012).

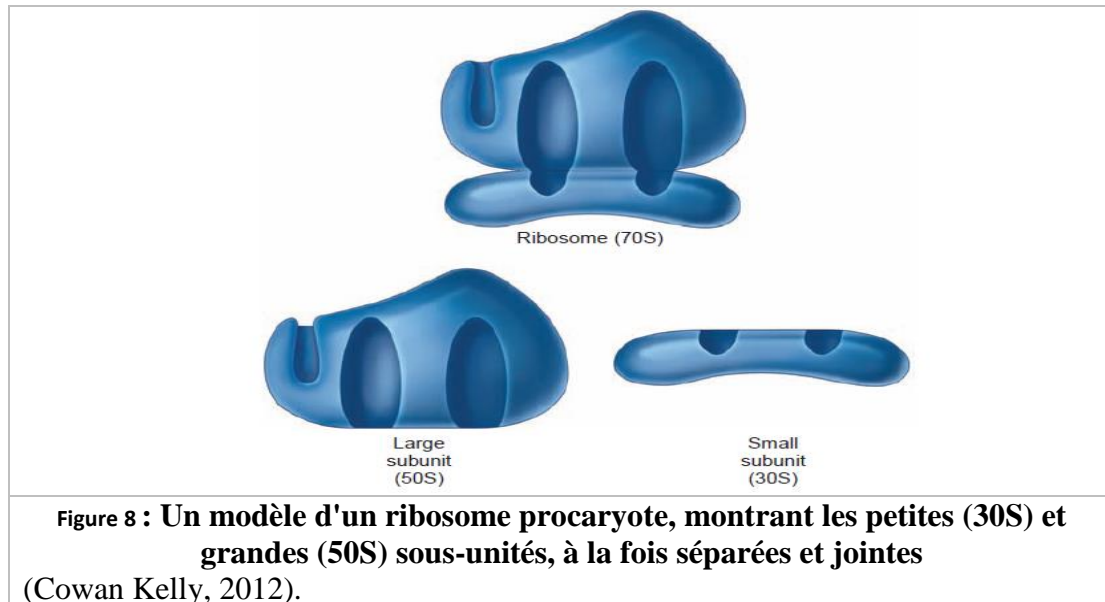
### - Cytoplasme

Le cytoplasme bactérien est une suspension colloïdale d'une variété de solutés organiques et inorganiques dans une solution aqueuse visqueuse (gel mou) à l'intérieur de la membrane cellulaire. Le cytoplasme est composé d'environ quatre cinquièmes d'eau et d'un cinquième de substances dissoutes ou en suspension dans l'eau. Ces substances comprennent des enzymes et d'autres protéines, des glucides, des lipides et une variété d'ions inorganiques requis par une bactérie pour la croissance et la division cellulaire. De nombreuses réactions chimiques, à la fois anaboliques et cataboliques, se produisent dans le cytoplasme. Le cytoplasme procaryote, contrairement à celui des eucaryotes, est dépourvu de réticulum endoplasmique et de mitochondries. Il ne montre pas non plus de flux protoplasmique (le mouvement dit de "streaming"). Les bactéries n'ont pas de véritable cytosquelette. Le cytoplasme est constitué de ribosomes, de mésosomes et de corps d'inclusions intra-cytoplasmiques, ainsi que du matériel génétique.

### - Ribosomes

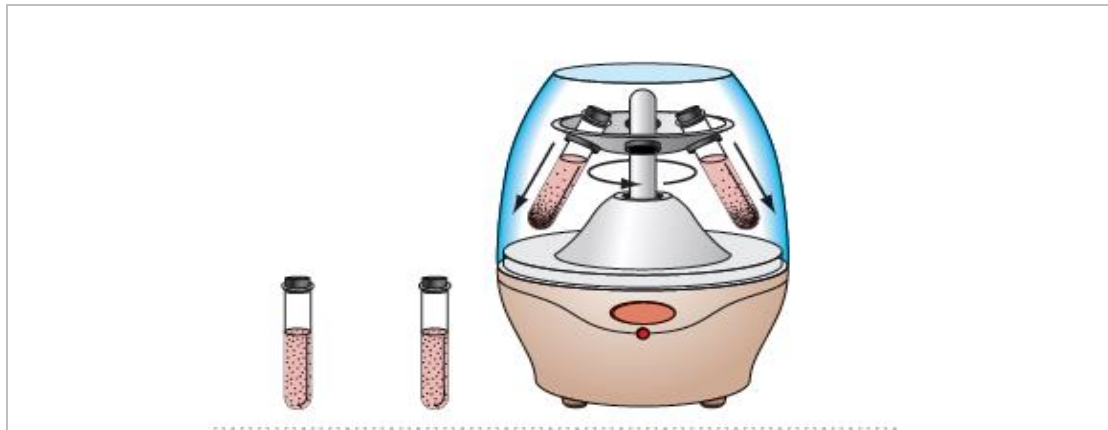
Les ribosomes [ribosome (reye'-boh-sohm) Gr. le *ribose*, un sucre pentose, et le *soma*, le corps] sont constitués d'une combinaison d'un type spécial d'ARN appelé ARN ribosomique ou ARNr (environ 60 %) et de protéines (40 %). Ils sont abondants dans le cytoplasme des bactéries (une cellule bactérienne contient des milliers de ribosomes),

souvent regroupés en longues chaînes appelées polyribosomes. Ils sont également attachés à la membrane cellulaire. Lorsqu'ils sont vus même à très fort grossissement, les ribosomes apparaissent comme de fines taches sphériques dispersées dans tout le cytoplasme, se colorent de manière dense et contiennent une grande sous-unité et une petite sous-unité (figure 8). Les ribosomes servent de sites pour la synthèse des protéines.



**Figure 8 : Un modèle d'un ribosome procaryote, montrant les petites (30S) et grandes (50S) sous-unités, à la fois séparées et jointes**  
(Cowan Kelly, 2012).

Les tailles relatives des ribosomes et de leurs sous-unités peuvent être déterminées en mesurant leurs vitesses de sédimentation - les vitesses auxquelles ils se déplacent vers le fond d'un tube lorsque le tube est rapidement centrifugé dans un instrument appelé centrifugeuse (figure 9). Les vitesses de sédimentation, qui varient généralement avec la taille moléculaire, sont exprimées en termes d'unités Svedberg (S) [Nommé en l'honneur de T. Svedberg, le chimiste suédois qui a développé l'ultracentrifugeuse en 1926]. Les ribosomes bactériens entiers, qui sont plus petits que les ribosomes eucaryotes, ont un taux de 70S ; leurs sous-unités ont des taux de 30S et 50S qui s'emboîtent pour former une plate-forme miniature sur laquelle la synthèse des protéines est effectuée. Certains antibiotiques, tels que la streptomycine et l'érythromycine, se lient spécifiquement aux ribosomes 70S et perturbent la synthèse des protéines bactériennes. Parce que ces antibiotiques n'affectent pas les plus gros ribosomes 80S présents dans les cellules eucaryotes, ils tuent les bactéries sans nuire aux cellules hôtes.



**Figure 9 : Une centrifugeuse**

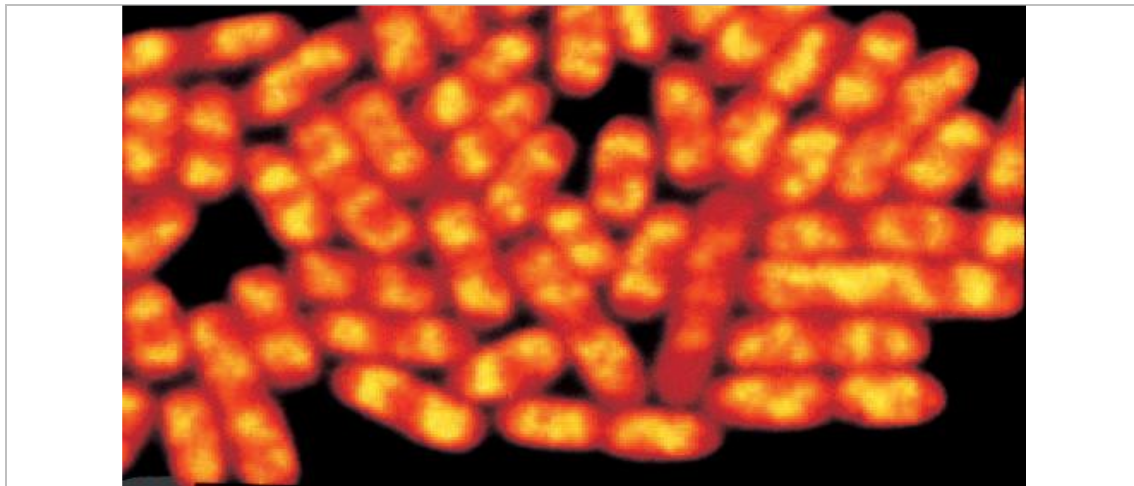
Les particules en suspension dans les tubes de liquide tourbillonnent à grande vitesse, ce qui les amène à se déposer au fond des tubes ou à former des bandes à différents niveaux. La vitesse de sédimentation ou les emplacements des bandes peuvent être utilisés pour déterminer la taille, le poids et la forme des particules. Les emplacements des bandes sont indiqués en unités Svedberg (S) (Black, 2012).

### - Appareil nucléaire

L'une des principales caractéristiques différenciant les cellules procaryotes des cellules eucaryotes est l'absence de noyau délimité par une membrane nucléaire. Au lieu d'un noyau, les bactéries ont une région nucléaire de forme irrégulière appelée **nucléoïde** [nucléoïde (noo'-klee-oid) L. *nucls*, noix et *oid*, forme ou similaire], mais souvent appelée **chromosome** bactérien en raison de l'analogie avec la structure eucaryote. Le nucléoïde est visible au microscope optique après coloration avec le colorant de Feulgen, qui réagit spécifiquement avec l'ADN. Ils apparaissent comme des corps ovales ou allongés, généralement un par cellule. Le chromosome bactérien est haploïde et se réplique par simple fission au lieu de mitose comme dans les cellules supérieures.

La région nucléaire située au centre se compose principalement d'ADN, mais a un peu d'ARN et de protéines qui lui sont associés. Le chromosome bactérien existe sous la forme d'une molécule circulaire singulière, fermée de manière covalente, d'acide désoxyribonucléique (ADN) double brin comprenant environ 4600 paires de kilobases. Il est complexé avec de petites quantités de protéines et d'ARN, mais contrairement à l'ADN eucaryote, il n'est pas associé aux histones. L'ADN, s'il était linéarisé, aurait une longueur d'environ 1 mm (1000  $\mu\text{m}$ ), environ 1000 fois la longueur de la cellule bactérienne. Afin d'emballer cette quantité de matériel, la cellule nécessite que l'ADN soit superenroulé en un certain nombre de domaines (environ 50) et que les domaines soient associés les uns aux autres et stabilisés par des protéines spécifiques en une masse agrégée ou nucléoïde. Les enzymes, les topoisomérases, qui contrôlent les changements topologiques dans l'architecture de l'ADN sont différentes de leurs homologues eucaryotes (qui agissent sur les chromosomes linéaires) et fournissent donc une cible biochimique unique pour l'action antibiotique.

On a longtemps cru que l'ADN était toujours organisé en un seul grand chromosome circulaire. Puis en 1989, deux chromosomes circulaires ont été trouvés dans la bactérie photosynthétique aquatique *Rhodobacter sphaeroides*. *Agrobacterium rhizogenes* a également deux chromosomes circulaires, mais son proche parent *Agrobacterium tumefaciens*, qui provoque des tumeurs chez les plantes, a un chromosome circulaire et un second chromosome linéaire. *Brucella suis*, pathogène du porc, présente la particularité que certaines de ses souches possèdent deux chromosomes, alors que d'autres souches de la même espèce n'en possèdent qu'un. La bactérie responsable du choléra, *Vibrio cholerae*, a deux chromosomes circulaires : l'un gros, l'autre d'environ un quart de la taille du premier. Les deux sont essentiels à la reproduction. Certaines bactéries contiennent également de plus petites molécules circulaires d'ADN appelées plasmides. L'information génétique contenue dans les plasmides complète l'information contenue dans le chromosome.



**Figure 10 : Structure chromosomique**

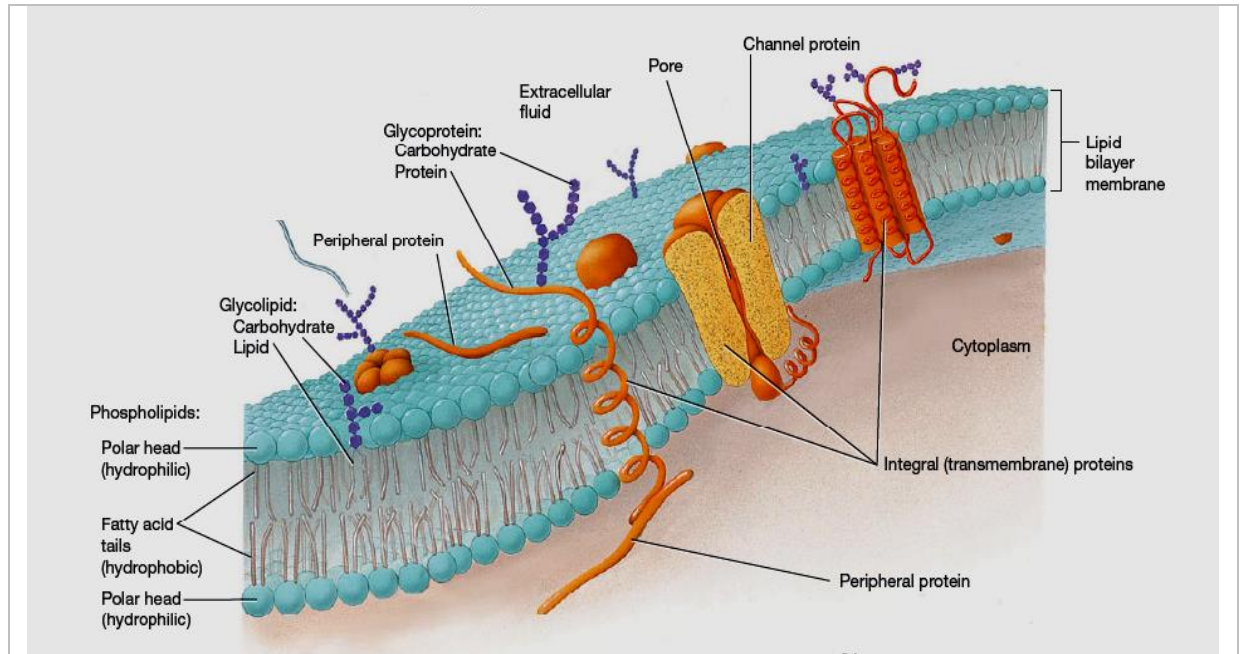
La coloration fluorescente met en évidence les chromosomes de l'agent pathogène bactérien *Salmonella enteritidis*. Le cytoplasme est orange et le chromosome émet une fluorescence jaune vif (Cowan Kelly, 2012)

#### - Membrane plasmique

La membrane plasmique, ou membrane cellulaire, est une membrane vivante qui forme la frontière entre une cellule et son environnement. Également connue sous le nom de membrane cytoplasmique, cette membrane dynamique et en constante évolution ne doit pas être confondue avec la paroi cellulaire. Ce dernier est une structure plus statique externe à la membrane cellulaire.

Les membranes cellulaires bactériennes ont la même structure générale que les membranes de toutes les autres cellules. Elles sont minces (5-10 nm d'épaisseur), élastiques et ne peuvent être vues qu'au microscope électronique. De telles membranes, anciennement appelées membranes unitaires, sont constituées principalement de phospholipides (constituant environ 30 à 40% de la masse membranaire) et de protéines (contribuant à 60 à 70%). Certaines de ces protéines jouent un rôle dans la synthèse du peptidoglycane et sont appelées protéines de liaison aux pénicillines (PLP) ou

penicillin-binding-proteins (PBP) car elles sont également la cible d'action des bêta-lactamines, famille d'antibiotiques à laquelle appartient la pénicilline. Le modèle de mosaïque fluide (figure 11) représente la compréhension actuelle de la structure d'une telle membrane. Le nom du modèle est dérivé du fait que les phospholipides de la membrane sont à l'état fluide et que les protéines sont dispersées parmi les molécules lipidiques de la membrane, formant un modèle en mosaïque.



**Figure 11 : Le modèle de mosaïque fluide de la membrane cellulaire**  
(Black, 2012).

Les phospholipides membranaires forment une bicouche ou deux couches adjacentes. Dans chaque couche, les extrémités phosphate des molécules lipidiques s'étendent vers la surface de la membrane et les extrémités acides gras s'étendent vers l'intérieur. Les extrémités phosphate chargées des molécules sont hydrophiles (qui aiment l'eau) et peuvent donc interagir avec l'environnement aqueux. Les extrémités des acides gras, constituées en grande partie de chaînes hydrocarbonées non polaires, sont hydrophobes (craignant l'eau) et forment une barrière entre la cellule et son environnement. Certaines membranes contiennent également d'autres lipides. Les membranes des mycoplasmes, bactéries dépourvues de paroi cellulaire, contiennent des lipides qui ajoutent de la rigidité et sont appelés stérols.

Des molécules protéiques se trouvent intercalées parmi les molécules lipidiques. Certaines s'étendent à travers toute la membrane et agissent comme porteurs ou forment des pores ou des canaux à travers lesquels les matériaux entrent et sortent de la cellule. Les protéines sur la surface externe comprennent celles qui rendent la cellule identifiable comme un organisme particulier. D'autres sont intégrés ou attachés de manière lâche à la surface interne ou externe de la membrane. Les protéines sur la surface interne sont généralement des enzymes. Quelques bactéries, telles que les mycoplasmes, ont des molécules de cholestérol dans leurs membranes cellulaires,

comme la plupart des eucaryotes. Les mycoplasmes manquent de parois cellulaires ; les molécules de cholestérol ajoutent de la rigidité à leurs membranes cellulaires.

Les membranes cellulaires sont des entités dynamiques en constante évolution. Les matériaux se déplacent constamment à travers les pores et à travers les lipides eux-mêmes, bien que de manière sélective. De plus, les lipides et les protéines des membranes changent continuellement de position. Certains antibiotiques et désinfectants tuent les bactéries en provoquant une fuite de leurs membranes cellulaires.

- **Fonctions de la membrane cellulaire**

Parce que les bactéries n'ont aucun des organites eucaryotes, la membrane cellulaire fournit un site pour des fonctions telles que les réactions énergétiques, le traitement des nutriments et la synthèse. La fonction principale de la membrane cellulaire est de réguler le mouvement des matériaux entrant et sortant d'une cellule par des mécanismes de transport (perméases). Chez les bactéries, cette membrane remplit également certaines fonctions exercées par d'autres structures dans les cellules eucaryotes. Elle synthétise les composants de la paroi cellulaire, aide à la réplication de l'ADN (médiation de la ségrégation chromosomique lors de la réplication) et sécrète des protéines (enzymes et toxines) dans le milieu extracellulaire. La plupart des enzymes de la respiration et de la synthèse de l'ATP résident dans la membrane cellulaire puisque les bactéries manquent de mitochondries. Elle contient également des bases d'appendices appelés flagelles ; les actions des bases font bouger les flagelles. Enfin, certaines protéines de la membrane cellulaire bactérienne réagissent aux substances chimiques présentes dans l'environnement.

### **-Paroi bactérienne**

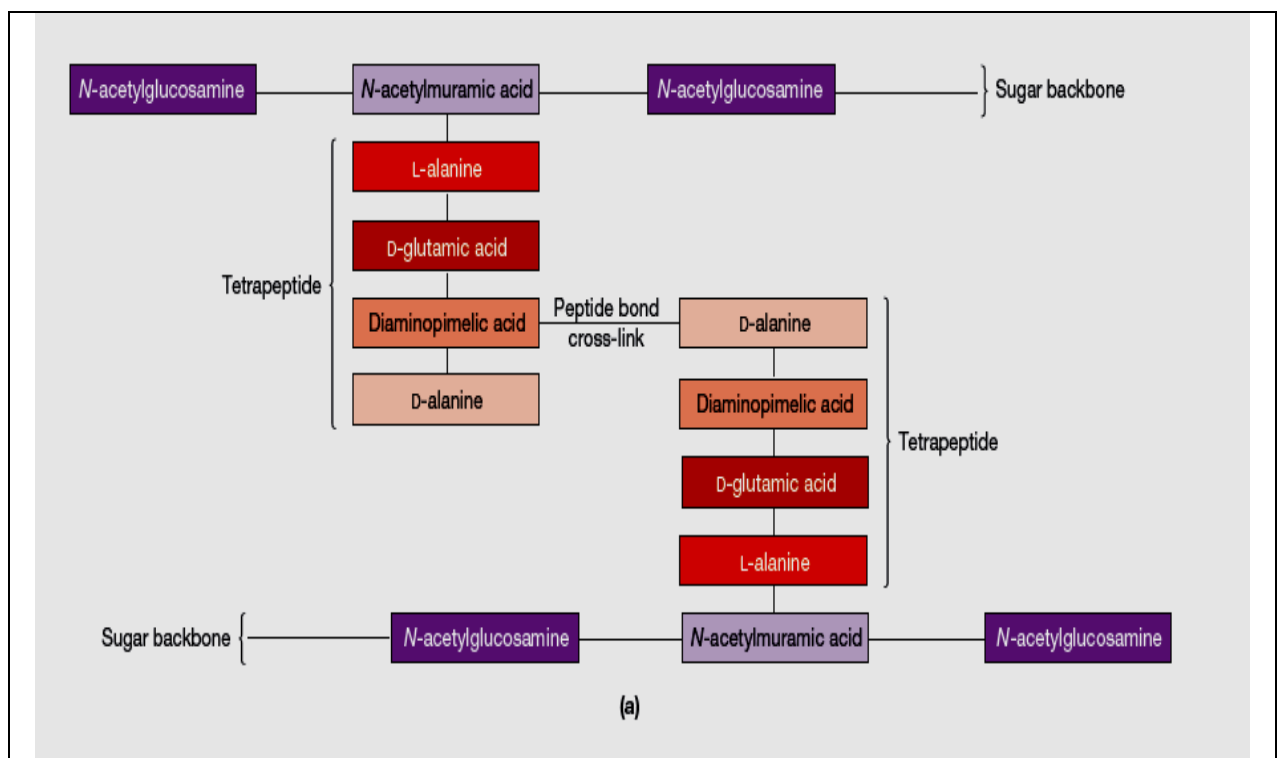
La paroi bactérienne semi-rigide se trouve à l'extérieur de la membrane cellulaire chez presque toutes les bactéries. Elle remplit deux fonctions importantes. Premièrement, elle maintient la forme caractéristique de la cellule. Si la paroi bactérienne est digérée par des enzymes, la cellule prend une forme sphérique. Deuxièmement, elle empêche la cellule d'éclater lorsque des fluides s'écoulent dans la cellule par osmose. Bien que la paroi cellulaire entoure la membrane cellulaire, dans de nombreux cas, elle est extrêmement poreuse et ne joue pas un rôle majeur dans la régulation de l'entrée des matériaux dans la cellule.

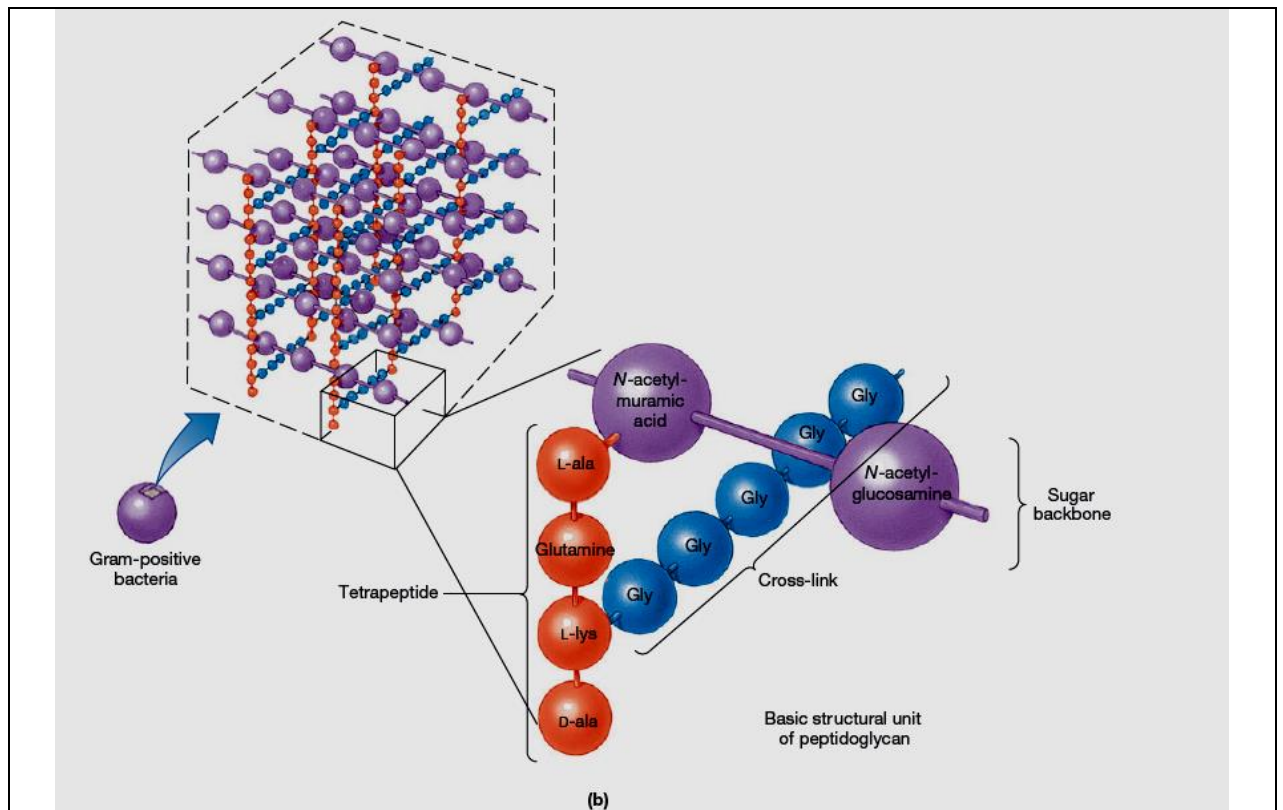
- **Les composants des parois bactériennes**

#### **a/ Peptidoglycane**

Le peptidoglycane (pep'ti-do-gly'-kan), également appelé muréine (de murus, paroi), est le composant le plus important de la paroi cellulaire bactérienne. C'est un polymère si grand qu'il peut être considéré comme une immense molécule liée par covalence. Il forme un filet de soutien autour d'une bactérie qui ressemble à plusieurs couches de clôture grillagée (figure 12). Les cellules Gram-positives peuvent avoir

jusqu'à 40 de ces couches. Dans le polymère de peptidoglycane, des molécules de N-acétylglucosamine (NAG) alternent avec des molécules d'acide N-acétylmuramique (NAM). Ces molécules sont réticulées par des tétra-peptides, chaînes de quatre acides aminés. Dans la plupart des organismes Gram-positifs, le troisième acide aminé est la lysine ; dans la plupart des organismes Gram-négatifs, il s'agit de l'acide diaminopimélique. Les acides aminés, comme de nombreux autres composés organiques, ont des stéréoisomères, des structures qui sont des images miroir les unes des autres, tout comme une main gauche est une image miroir d'une main droite. Certains des acides aminés des chaînes térapeptidiques sont des images miroir de ces acides aminés que l'on trouve le plus souvent chez les êtres vivants. Ces chaînes ne sont pas facilement décomposées car la plupart des organismes manquent d'enzymes capables de digérer les formes stéréoisomères.





**Figure 12 : La structure du peptidoglycane**

(a) Une vue bidimensionnelle du peptidoglycane de la bactérie Gram-négative : *Escherichia coli* ; un polymère de deux unités de sucre alternées (violet), le N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique, tous deux dérivés du glucose. Les sucres sont reliés par de courtes chaînes peptidiques (tétrapeptides) constituées de quatre acides aminés (rouge). Les sucres et les tétrapeptides sont réticulés par une simple liaison peptidique.

(b) Une vue tridimensionnelle du peptidoglycane pour la bactérie Gram-positive : *Staphylococcus aureus*. Les acides aminés sont représentés en rouge (Black, 2012).

Les parois cellulaires des organismes Gram-positifs ont une molécule supplémentaire, l'acide teichoïque. L'acide teichoïque (tie-ko'ik), qui se compose de glycérol, de phosphates et de l'alcool de sucre ribitol, est présent dans les polymères jusqu'à 30 unités de long. Ces polymères s'étendent au-delà du reste de la paroi cellulaire, voire au-delà de la capsule chez les bactéries encapsulées. Bien que sa fonction exacte ne soit pas claire, l'acide teichoïque fournit des sites de fixation pour les bactériophages (virus qui infectent les bactéries) et sert probablement de passage pour le mouvement des ions dans et hors de la cellule.

### **b/ Membrane externe**

La membrane externe, que l'on trouve principalement chez les bactéries Gram-négatives, est une membrane bicouche. Son feuillet interne est composé de phospholipides tandis que les phospholipides du feuillet externe sont remplacés par des molécules de lipopolysaccharide (LPS). Elle forme la couche la plus externe de la paroi cellulaire et est attaché au peptidoglycane par une couche presque continue de petites molécules de lipoprotéines (protéines associées à un lipide). Les lipoprotéines sont

intégrées dans la membrane externe et liées de manière covalente au peptidoglycane. La membrane externe agit comme un tamis grossier et exerce peu de contrôle sur le mouvement des substances entrant et sortant de la cellule. Cependant, elle contrôle le transport de certaines protéines de l'environnement.

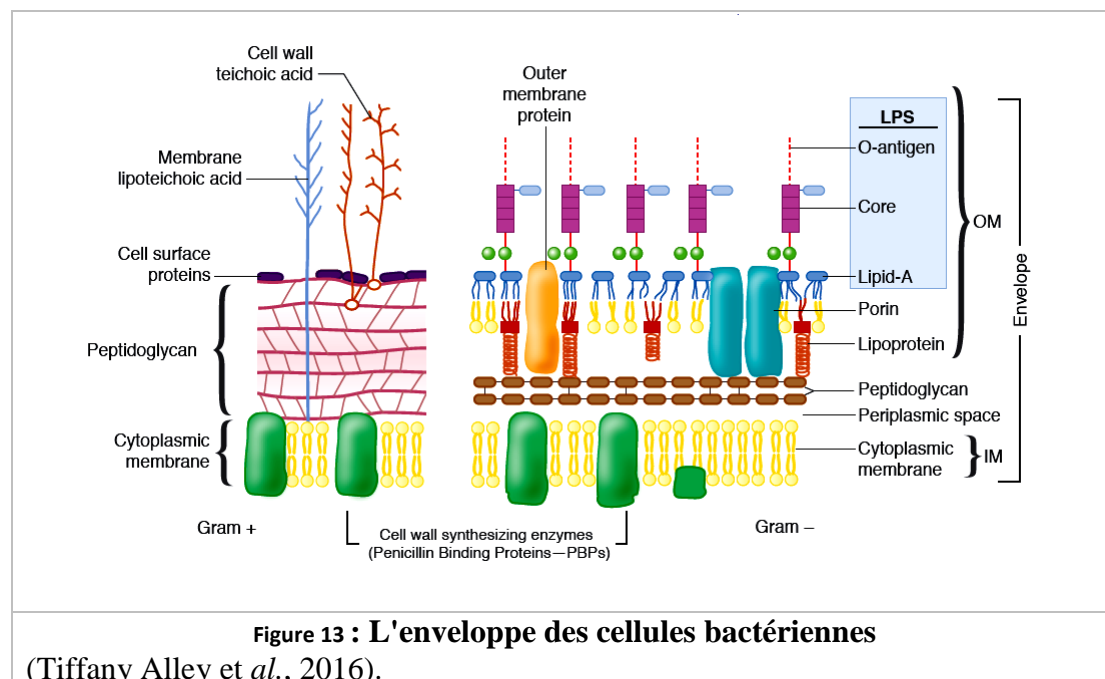
- **Les porines** ou protéines transmembranaires : la membrane externe contient plusieurs protéines importantes qui fonctionnent dans le transport sélectif des nutriments dans la cellule. Les porines ou protéines transmembranaires traversent la membrane externe et forment des canaux trimères qui permettent le passage de molécules telles que les nucléotides, les disaccharides, les peptides, les acides aminés, la vitamine B12 et le fer.
- **Le lipopolysaccharide (LPS)**, également appelé endotoxine, est une partie importante de la membrane externe et peut être utilisé pour identifier les bactéries Gram-négatives. Il fait partie intégrante de la paroi cellulaire et n'est libéré que lorsque les parois cellulaires des bactéries mortes sont détruites. Le LPS est constitué de polysaccharides et de lipide A. Les polysaccharides se trouvent dans des chaînes latérales répétitives qui s'étendent vers l'extérieur de l'organisme. Ce sont ces unités répétitives qui sont utilisées pour identifier différentes bactéries Gram-négatives. La partie lipidique A est responsable des propriétés toxiques qui font de toute infection à Gram négatif un problème médical potentiellement grave. Elle provoque de la fièvre et dilate les vaisseaux sanguins, de sorte que la pression artérielle chute brutalement. Étant donné que les bactéries libèrent des endotoxines principalement lorsqu'elles meurent, les tuer peut augmenter la concentration de cette substance très toxique. Ainsi, les antibiotiques administrés tardivement dans une infection peuvent entraîner une aggravation des symptômes, voire le décès du patient.

Les Gram-négatifs sont moins sensibles à la pénicilline que les Gram-positifs, en partie parce que la membrane externe inhibe l'entrée de la pénicilline dans la cellule. La surface externe de la membrane externe contient des antigènes et des récepteurs de surface. Certains virus peuvent se lier à certains récepteurs lors de la première étape de l'infection de la bactérie.

### c/ Espace périplasmique

Une autre caractéristique distinctive de nombreuses bactéries est la présence d'un espace entre la membrane cellulaire et la paroi cellulaire. L'écart est le plus facilement observé par microscopie électronique de bactéries Gram-négatives. Dans ces organismes, l'espace est appelé l'espace périplasmique (per'e-plaz'mik). Il représente une zone très active du métabolisme cellulaire. Cet espace contient non seulement le peptidoglycane de la paroi cellulaire, mais également de nombreuses enzymes digestives et protéines de transport qui détruisent les substances potentiellement nocives et transportent les métabolites dans le cytoplasme bactérien, respectivement. Le périplasma est constitué du peptidoglycane, des constituants protéiques et des métabolites trouvés dans l'espace périplasmique.

Les espaces périplasmiques sont rarement observés chez les bactéries à Gram-positif. Cependant, ces bactéries doivent accomplir bon nombre des mêmes fonctions métaboliques et de transport que les bactéries Gram-négatives. À l'heure actuelle, on pense que la plupart des bactéries Gram-positives n'ont que des périplasmiques - et non des espaces périplasmiques - où la digestion métabolique se produit et où un nouveau peptidoglycane à la paroi cellulaire est attaché. Le périplasmique des cellules Gram-positives fait donc partie de la paroi cellulaire.



- **Distinction entre les bactéries par les parois cellulaires**

Certaines propriétés des parois cellulaires produisent différentes réactions de coloration. Les bactéries Gram-positives, Gram-négatives et acido-alcolo-résistantes peuvent être distinguées sur la base de ces réactions (tableau 4).

- **Bactéries gram-positives**

La paroi cellulaire des bactéries Gram-positives a une couche relativement épaisse de peptidoglycane, de 20 à 80 nm de diamètre. La couche de peptidoglycane est étroitement attachée à la surface externe de la membrane cellulaire. L'analyse chimique montre que 60 à 90 % de la paroi cellulaire d'une bactérie à Gram-positif est constituée de peptidoglycane. À l'exception de celles des streptocoques, la plupart des parois cellulaires à Gram-positif contiennent très peu de protéines. Si le peptidoglycane est digéré à partir de leurs parois cellulaires, les bactéries Gram-positives deviennent des protoplastes, ou des cellules avec une membrane cellulaire mais pas de paroi cellulaire. Les protoplastes se ratatinent ou éclatent à moins qu'ils ne soient conservés dans une solution isotonique, une solution qui a la même pression que celle à l'intérieur de la cellule.

Les parois cellulaires épaisses des bactéries Gram-positives conservent des colorants telles que le colorant cristal violet-iode dans le cytoplasme, mais les cellules de levure, dont beaucoup ont des parois épaisses mais pas de peptidoglycane, conservent également ces colorants. Ainsi, la rétention de la coloration de Gram semble être directement liée à l'épaisseur de la paroi et non au peptidoglycane. Les dommages physiologiques ou le vieillissement peuvent provoquer une fuite de la paroi cellulaire Gram-positive, de sorte que le complexe de colorant s'échappe. Ces organismes peuvent devenir Gram-variables ou même Gram-négatifs en vieillissant. Par conséquent, la coloration de Gram doit être effectuée sur des cultures de moins de 24 heures.

Les bactéries Gram-positives manquent à la fois d'une membrane externe et d'un espace périplasmique. Ainsi, les enzymes digestives non retenues dans le périplasm sont libérées dans l'environnement, où elles deviennent parfois tellement diluées que les organismes n'en tirent aucun bénéfice.

#### **- Bactéries gram-négatives**

La paroi cellulaire d'une bactérie à Gram-négatif est plus fine mais plus complexe que celle d'une bactérie à Gram positif. Seulement 10 à 20 % de la paroi cellulaire est constituée de peptidoglycane ; le reste est constitué de divers polysaccharides, protéines et lipides. La paroi cellulaire contient une membrane externe, qui constitue la surface externe de la paroi, ne laissant qu'un espace périplasmique très étroit. La surface interne de la paroi est séparée de la membrane cellulaire par un espace périplasmique plus large. Les toxines et les enzymes restent dans l'espace périplasmique à des concentrations suffisantes pour aider à détruire les substances qui pourraient nuire à la bactérie, mais elles ne nuisent pas à l'organisme qui les a produites. Si la paroi cellulaire est digérée, les bactéries Gram-négatives deviennent des sphéropastes, qui ont à la fois une membrane cellulaire et la majeure partie de la membrane externe. Les bactéries Gram-négatives ne parviennent pas à retenir le colorant cristal violet-iode pendant la procédure de décoloration en partie à cause de leurs parois cellulaires minces et en partie à cause des quantités relativement importantes de lipoprotéines et de lipopolysaccharides dans les parois.

#### **- Bactéries acido-alcolo-résistantes.**

Bien que la paroi cellulaire des bactéries acido-alcolo-résistantes, les mycobactéries, soit épaisse, comme celle des bactéries Gram-positives, elle est composée d'environ 60 % de lipides et contient beaucoup moins de peptidoglycane. Dans le processus de coloration acido-alcolo-résistant, la fuchsine phéniquée se lie au cytoplasme et résiste à l'élimination par un mélange acide-alcool. Les lipides rendent les organismes résistants aux acides imperméables à la plupart des autres colorants et les protègent des acides et des alcalins. Les organismes se développent lentement car les lipides empêchent l'entrée des nutriments dans les cellules et les cellules doivent dépenser de grandes quantités d'énergie pour synthétiser les lipides. Les cellules acido-

alcolo-résistantes peuvent être colorées par la méthode de coloration de Gram ; Elles se colorent en Gram positif.

**Tableau 4 : Caractéristiques des parois cellulaires des bactéries Gram-positives, Gram-négatives et acido- alcolo-résistantes (Black, 2012)**

caractéristiques	Bactéries Gram-positives	Bactéries Gram-négatives	Bactéries acido- alcolo-résistantes
<b>Peptidoglycane</b>	Couche épaisse	Couche mince	Quantité relativement faible
<b>Acide teichoïque</b>	Souvent présent	Absent	Absent
<b>Lipides</b>	Très peu présents	Lipopolysaccharide	Acide mycolique et autres cires et glycolipides
<b>Membrane externe</b>	Absente	Présente	Absente
<b>Espace périplasmique</b>	Absent	Présent	Absent
<b>Forme de la cellule</b>	Toujours rigide	Rigide ou flexible	Rigide ou flexible
<b>Résultats de la digestion enzymatique</b>	Protoplaste	Sphéroplaste	Difficile à digérer
<b>Sensibilité aux colorants et aux antibiotiques</b>	Plus sensible	Modérément sensible	Moins sensible
<b>Exemples</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

#### - Bactéries déficientes en paroi cellulaire

Les bactéries appartenant au genre *Mycoplasma* n'ont pas de parois cellulaires. Elles sont protégées du gonflement osmotique et de l'éclatement par une membrane cellulaire renforcée qui contient des stérols. Ce sont des molécules typiques des eucaryotes et rarement retrouvées chez les procaryotes. Cependant, la protection n'est pas complète et souvent les mycoplasmes doivent être cultivés dans des milieux spéciaux. Sans paroi cellulaire rigide, leur forme varie considérablement, formant souvent des filaments minces et ramifiés et présentant un pléomorphisme extrême.

D'autres genres de bactéries peuvent normalement avoir une paroi cellulaire, mais peuvent soudainement perdre leur capacité à former des parois cellulaires. Ces souches à paroi déficiente sont appelées formes L, du nom de l'Institut Lister, où elles ont été découvertes il y a plus de 70 ans. La perte peut se produire naturellement ou être causée par un traitement chimique. Les formes L peuvent jouer un rôle dans les maladies chroniques ou récurrentes. Le traitement avec des antibiotiques qui affectent la synthèse de la paroi cellulaire tue la plupart des bactéries dans certaines infections, mais il en laisse quelques-unes vivantes sous forme de L. Lorsque le traitement est interrompu, les formes L peuvent redevenir des formes murées et faire repousser une population infectante. On en trouve un exemple dans l'association de la bactérie *Mycobacterium paratuberculosis* avec la maladie de Crohn, une maladie chronique de l'intestin.

### 3. Structures facultatives

Certaines cellules bactériennes sont composées d'éléments facultatifs, observés ou non en fonction des espèces.

#### -Plasmides

La plupart des bactéries possèdent des éléments génétiques extra-chromosomiques en plus des éléments d'ADN chromosomique connus sous le nom de plasmides. Ils consistent en des morceaux circulaires d'ADN double brin, peuvent se répliquer de manière autonome (réplicons indépendants) et peuvent se maintenir dans le cytoplasme d'une bactérie pendant de nombreuses générations. On les trouve principalement dans les bactéries mais aussi dans certains micro-organismes eucaryotes. L'ADN plasmidique peut parfois être intégré à l'ADN chromosomique. Le nom épisode a été employé pour de telles formes intégrées, bien que cette distinction ne soit généralement pas faite maintenant. Ceux-ci ne sont pas essentiels à la vie et aux fonctionnements normaux de la bactérie hôte. Ils peuvent lui conférer des propriétés conduisant à un avantage de survie dans des conditions appropriées telles que la résistance aux antibiotiques, la production de bactériocines. Les plasmides peuvent également se transférer facilement d'un organisme à un autre et entre espèces, augmentant ainsi la propagation de la résistance.

- **Types de plasmides**

Les plasmides en fonction de leur transmissibilité et de la nature du facteur peuvent être des types suivants :

- *Transmissibilité des plasmides*

Les plasmides, selon la transmissibilité, sont de deux types :

(a) plasmides transmissibles et (b) plasmides non transmissibles.

**a. Plasmides transmissibles :** ils peuvent être transférés d'une cellule à l'autre par un processus de transfert génétique appelé conjugaison. Ce sont de grands plasmides (poids moléculaire de 40 à 100 millions). Ils contiennent plus d'une dizaine de gènes responsables de la synthèse des pilis sexuels et de la synthèse des enzymes nécessaires à leur transfert. Habituellement, une à trois copies du plasmide sont présentes dans une cellule.

**b. Plasmides non transmissibles :** ils ne peuvent pas être transférés d'une cellule à l'autre, car ils ne contiennent pas les gènes de transfert. Ils sont petits (poids moléculaire 3 à 20 millions), généralement non conjugatifs et ont un nombre de copies élevé (généralement 10 à 60 par chromosome). Ils dépendent de leur hôte bactérien pour assurer certaines fonctions nécessaires à la réplication et sont réparties de manière aléatoire entre les cellules filles lors de la division.

- *Nature des facteurs*

Selon la nature des facteurs, les plasmides sont des types suivants : (a) le facteur F, (b) le facteur R, et (c) le facteur Col facteur.

**a. Le facteur F :** Le plasmide F, également appelé facteur F a été le premier plasmide à être découvert, est un facteur de transfert qui contient l'information génétique, essentielle pour contrôler le processus d'accouplement des bactéries lors de la conjugaison.

Le plasmide F d'*Escherichia coli* est le prototype des plasmides de fertilité chez les bactéries Gram-négatives. Les souches d'*E. coli* avec un plasmide F extra-chromosomique sont appelées F<sup>+</sup> et fonctionnent comme des donneurs, tandis que les souches dépourvues du plasmide F sont F<sup>-</sup> et se comportent comme des receveurs. Les fonctions de conjugaison du plasmide F sont déterminées par un cluster d'au moins 25 gènes de transfert (tra). Ces gènes déterminent :

- l'expression des pilis,
- la synthèse et le transfert de l'ADN pendant l'accouplement,
- l'interférence avec la capacité des bactéries F<sup>+</sup> à servir de receveurs et d'autres fonctions.

Le plasmide F dans *E. coli* peut se présenter sous la forme d'un élément génétique extra-chromosomique ou être intégré dans le chromosome bactérien. Le plasmide F et le chromosome bactérien sont des molécules d'ADN circulaires. Par conséquent, la recombinaison réciproque entre eux produit un cercle d'ADN plus grand constitué d'ADN de plasmide F inséré linéairement dans le chromosome.

**b. Le facteur R :** Les facteurs de résistance, également appelés facteurs R, sont des plasmides extra-chromosomiques. Ils sont circulaires avec de l'ADN double brin. Les facteurs R existent en deux tailles : grands plasmides (poids moléculaire 60 millions) et petits plasmides (poids moléculaire 10 millions). Les grands plasmides sont des facteurs « R » de conjugaison, qui contiennent de l'ADN supplémentaire pour coder le processus de conjugaison. Les petits plasmides ne contiennent que les gènes « r » et ne sont pas conjuguatifs. Le facteur R se compose de deux éléments : le facteur de transfert de résistance (RTF) et le déterminant résistant (r). Le RTF est responsable du transfert de conjugaison, tandis que chaque déterminant r porte une résistance à l'un des nombreux antibiotiques.

**c. Facteur colicinogène (Col) :** Le facteur Col est un plasmide qui ressemble au facteur F en favorisant la conjugaison, conduisant à l'auto-transfert et aussi parfois au transfert de segments de chromosomes.

■ Le facteur Col code pour la production de colicines, qui sont des substances semblables aux antibiotiques qui sont spécifiquement et sélectivement létales pour d'autres bactéries entériques.

■ Ils codent également pour la production de diphtéricine et de pyocyanine produites par *Corynebacterium diphtheriae* et *Pseudomonas pyocyanea*, respectivement, qui sont des substances similaires aux colicines.

- **Fonctions des plasmides**

De nombreux plasmides contrôlent les propriétés médicalement importantes des bactéries pathogènes. Celles-ci comprennent

(a) la résistance à un ou plusieurs antibiotiques,

(b) la production de toxines

(c) la synthèse des structures de surface cellulaire nécessaires à l'adhérence ou à la colonisation.

Certains plasmides sont cryptiques et n'ont aucun effet reconnaissable sur les cellules bactériennes qui les hébergent. La comparaison des profils de plasmide est une méthode utile pour évaluer la parenté possible des isolats cliniques individuels d'une espèce bactérienne particulière pour des études épidémiologiques.

- **Propriétés déterminées par le plasmide**

Les plasmides portent des gènes pour les éléments suivants :

1. Résistance aux antibiotiques tels que le chloramphénicol et la tétracycline médiée par une variété d'enzymes.

2. Résistance à la lumière ultraviolette médiée par les enzymes de réparation de l'ADN.

3. Résistance aux métaux lourds tels que le mercure et l'argent médiée par l'enzyme réductase.

4. Pilis qui interviennent dans l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales. Les exemples incluent K88, K99 trouvé dans *E. coli* uropathogène.

5. Exotoxines dont de nombreuses entérotoxines. Les toxines représentatives codées par les plasmides comprennent les entérotoxines thermolabiles et thermostables de *E. coli*, la toxine exfoliative de *Staphylococcus aureus*, les hémolysines de *Clostridium perfringens* et la toxine tétanique de *Clostridium tetani*.

6. Les bactériocines produites par certaines bactéries Gram-négatives sont mortelles pour d'autres bactéries. Les exemples incluent la pyocine produite par *P. pyocyanea* et la diphtéricine produite par *C. diphtheriae*.

7. Diverses enzymes telles que l'uréase de *Helicobacter pylori* et les protéases de *Pseudomonas* spp. ont des propriétés dégradantes. Les enzymes de dégradation produites par *Pseudomonas* spp. sont capables de nettoyer les déversements d'hydrocarbures et les déchets chimiques toxiques dans l'environnement.

Généralement, les plasmides portent des gènes qui codent pour des fonctions non essentielles à la croissance cellulaire tandis que le chromosome porte les gènes qui codent pour les fonctions essentielles.

#### - Glycocalyx (Capsule, Slime)

De nombreuses bactéries synthétisent de grandes quantités de polymère extracellulaire lors de leur croissance dans leur environnement naturel. Sauf une exception connue (les capsules d'acide poly-D-glutamique de *Bacillus anthracis* et *Bacillus licheniformis*), le matériel extracellulaire est un polysaccharide. Les termes **capsule** et couche visqueuse (**slime**) sont fréquemment utilisés pour décrire les couches de polysaccharides ; le terme plus inclusif **glycocalyx** est également utilisé. Le glycocalyx est défini comme le matériau contenant des polysaccharides se trouvant à l'extérieur de la cellule. Lorsque le polymère forme une couche condensée bien définie entourant étroitement la cellule, on l'appelle la capsule comme dans le pneumocoque. Si le polymère est facilement lavé et ne semble pas être associé à la cellule d'une manière définie, il est appelé couche visqueuse (slime) comme dans *Leuconostoc*. Toutes les bactéries ont au moins une fine couche visqueuse. Le polymère extracellulaire est synthétisé par des enzymes situées à la surface de la cellule bactérienne. *Streptococcus mutans*, par exemple, utilise deux enzymes, la glucosyl transférase et la fructosyl transférase, pour synthétiser des dextrans à longue chaîne (poly-D-glucose) et des lévanes (poly-D-fructose) à partir du saccharose. Ces polymères sont appelés homopolymères. Les polymères contenant plus d'un type de monosaccharide sont appelés hétéropolymères.

La capsule contribue au caractère invasif des bactéries pathogènes - les cellules encapsulées sont protégées de la phagocytose à moins qu'elles ne soient recouvertes d'anticorps anticapsulaires. Seules certaines bactéries sont capables de former des capsules, et tous les membres d'une espèce n'ont pas de capsules. Par exemple, la bactérie qui cause l'anthrax, une maladie naturellement présente principalement chez les bovins, ne produit pas de capsule lorsqu'elle se développe à l'extérieur d'un organisme, mais le fait lorsqu'elle infecte un animal. Le glycocalyx joue un rôle dans l'adhérence des bactéries aux surfaces de leur environnement, y compris les cellules des hôtes végétaux et animaux, afin qu'elles puissent rester à proximité des sources de nutriments ou d'oxygène. Ce « biofilm » protège les bactéries au fond des couches contre les produits chimiques environnementaux ou artificiels. Certaines bactéries buccales, *S mutans* par exemple, doit sa capacité à adhérer fermement à l'émail des dents à son glycocalyx. Les cellules bactériennes de la même espèce ou d'espèces différentes sont piégées dans le glycocalyx, qui forme la couche connue sous le nom de plaque à la surface de la dent ; les produits acides excrétés par ces bactéries provoquent

des caries dentaires. Le rôle essentiel du glycocalyx dans ce processus - et sa formation à partir du saccharose - explique la corrélation des caries dentaires avec la consommation de saccharose par la population humaine. Étant donné que les couches externes de polysaccharides lient une quantité importante d'eau (98 % d'eau), la couche de glycocalyx peut également jouer un rôle dans la résistance à la dessiccation.

- **Mise en évidence de Capsule**

*a. Coloration de Gram* : les capsules et la boue ne sont généralement pas visibles dans les films colorés par des méthodes ordinaires, sauf sous forme de halos clairs entourant le frottis coloré. Slime a peu d'affinité pour les colorants basiques et n'est pas visible dans les frottis colorés au Gram.

*b. Techniques spéciales de coloration des capsules* : Des techniques spéciales de coloration des capsules sont disponibles, utilisant généralement des sels de cuivre comme mordants.

*c. Coloration à l'encre de Chine (coloration négative)* : la méthode de démonstration la plus fiable est la coloration « négative » dans des films humides avec de l'encre de Chine et la capsule apparaît comme un halo clair autour de la bactérie, sur un fond sombre dans le film.

*d. Microscope électronique* : elles peuvent également être étudiées au microscope électronique.

*e. Méthodes sérologiques* : Le matériel capsulaire est antigénique et peut être mis en évidence par des méthodes sérologiques. Les capsules peuvent également être visualisées par réaction avec des anticorps spécifiques de la capsule qui provoque un gonflement caractéristique de la capsule. Lorsqu'une suspension d'une bactérie encapsulée est mélangée à son sérum anticapsulaire spécifique et examinée au microscope, la capsule devient très proéminente et apparaît « gonflée » en raison d'une augmentation de sa réfractivité. Elle est connue sous le nom de réaction de gonflement de la capsule ou réaction de Quellung (Quellung—(Ger) gonflement), décrite par Neufeld (1902) et permet une identification rapide des sérotypes capsulaires de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, plusieurs groupes de streptocoques, *Klebsiella*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia* et *Bacillus*.

- **Fonctions de la capsule**

*a. Facteur de virulence* : les capsules agissent souvent comme un facteur de virulence en protégeant la bactérie de l'ingestion par phagocytose, et les mutants non encapsulés de ces bactéries ne sont pas virulents. Des sous-cultures répétées in vitro conduisent à la perte de la capsule et aussi de la virulence.

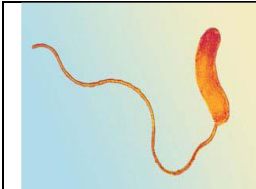

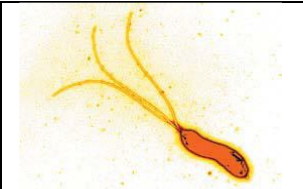
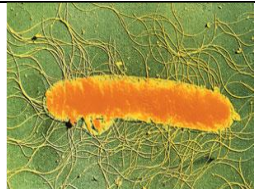
*b. Protection de la paroi cellulaire* : En protégeant la paroi cellulaire contre les attaques de divers types d'agents antibactériens, par ex. bactériophages, colicines, complément, lysozyme et autres enzymes lytiques.

**c. Identification et typage des bactéries** : L'antigène capsulaire est spécifique des bactéries et peut être utilisé pour l'identification et le typage des bactéries.

### - Flagelles

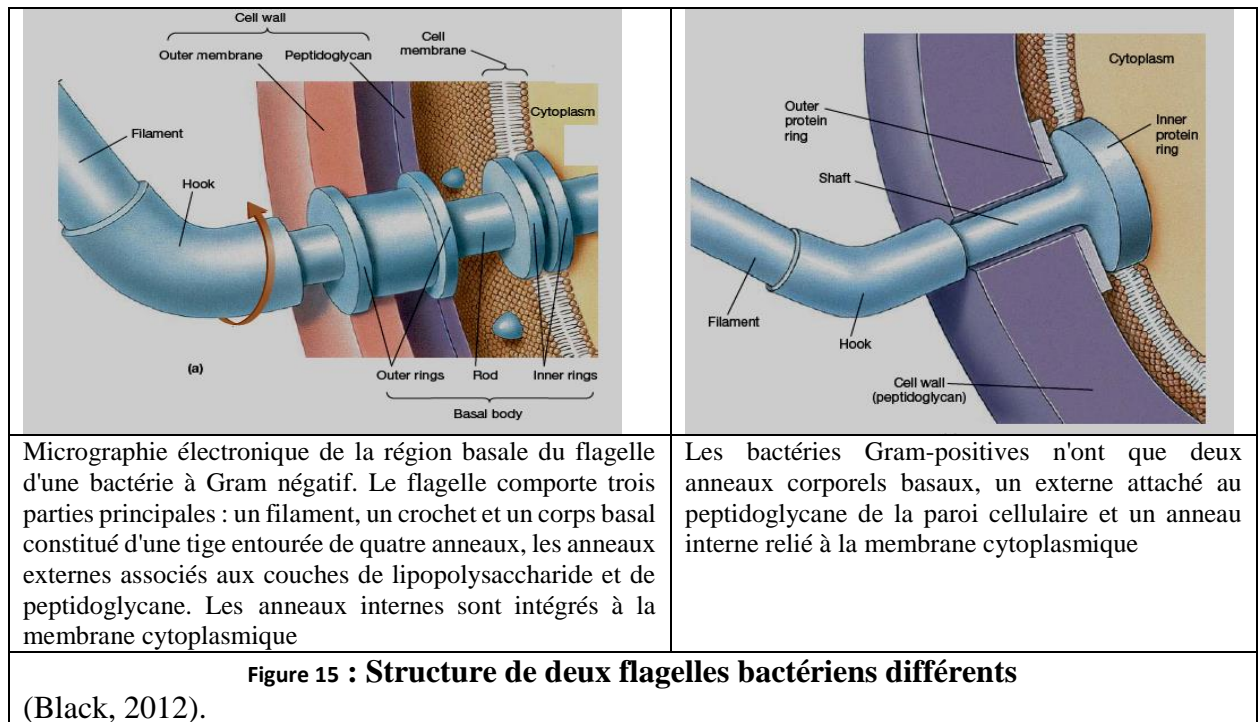
Environ la moitié de toutes les bactéries connues sont mobiles ou capables de se déplacer. Elles se déplacent souvent avec rapidité et dans un but apparent, et elles se déplacent généralement au moyen de longs appendices, minces et hélicoïdaux appelés flagelles.

Une bactérie peut avoir un flagelle ou deux ou plusieurs flagelles. Les bactéries avec un seul flagelle polaire situé à une extrémité, ou pôle, sont dites **monotriches** (mon-o-trik'-us) ; les bactéries à deux flagelles, un à chaque extrémité, sont **amphitriches** (am-fe-trik'-us) ; les deux types sont dits polaires. Les bactéries avec deux flagelles ou plus à une extrémité ou aux deux sont **lophotriches** (lo-fo-trik'us) ; et ceux qui ont des flagelles sur toute la surface sont **péritriches** (pe-ri-trik'us). Les bactéries sans flagelles sont atriches (a-trik'us). Les cocci ont rarement des flagelles (figure 14).

			
Monotriche polaire (flagelle unique à une extrémité) : <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	Amphitriche polaire (flagelle unique à chaque extrémité) : <i>Campylobacter fetus venerealis</i>	Lophotriche (avec une touffe de flagelles à une ou aux deux extrémités) : <i>Helicobacter pylori</i>	Peritriche (flagelles distribués partout) : <i>Proteus mirabilis</i>
<b>Figure 14 : Dispositions des flagelles bactériens</b> (Black, 2012).			

- **Structure de flagelles**

Les flagelles mesurent 3 à 20 µm de long et 0,01 à 0,03 µm de diamètre. La partie principale du filament est constituée de sous-unités protéiques appelées flagelline disposées en plusieurs hélices autour d'un noyau creux central. Le flagelle est attaché au corps cellulaire bactérien par une structure complexe constituée d'un crochet et d'un corps basal. Le corps basal porte un ensemble d'anneaux, une paire chez les bactéries Gram-positives et deux paires chez les bactéries Gram-négatives, à travers lesquelles les bactéries tournent dans le sens des aiguilles d'une montre ou dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Au-dessus de la base du filament se trouve le crochet, une courte structure incurvée entre le filament externe et le corps basal. Cette partie produit une répulsion en forme d'hélice à partir du flagelle tournant (figure 15).



- **Filaments axiaux**

Les spirochètes sont des bactéries mobiles mais sans aucun flagelle externe. Ils sont mobiles en raison de la présence d'un filament axial, il est parfois appelé l'endoflagellé. Chaque filament est attaché à l'une de ses extrémités à une extrémité du cylindre cytoplasmique qui forme le corps du spirochète. Parce que les filaments axiaux se situent entre la gaine externe et la paroi cellulaire, leur torsion fait tourner le corps rigide du spirochète comme un tire-bouchon (figure 16).



**Figure 16 : Filaments axiaux ou endoflagellés**

Les filaments axiaux rendus visibles par une fausse coloration sont clairement visibles sous la forme de rubans jaunes en spirale qui courent à l'intérieur de la paroi cellulaire le long du corps du spirochète *Leptospira interrogans* (50 000X) (Black, 2012).

- **Fonctions de flagelles**

Les flagelles ont les fonctions suivantes :

1/ Ils sont principalement responsables de la motilité des bactéries par chimiotaxie.

2/ Ils peuvent jouer un rôle dans la survie et la pathogénèse des bactéries. Ils sont hautement antigéniques, ils possèdent des antigènes H et certaines des réponses immunitaires à l'infection sont dirigées contre ces protéines. Les flagelles de différentes bactéries diffèrent sur le plan antigénique. Les anticorps flagellaires ne sont pas protecteurs mais aident au sérodiagnostic.

- **Mise en évidence des flagelles**

Les flagelles ont une épaisseur d'environ 0,02  $\mu\text{m}$  et dépassent donc la limite de résolution du microscope optique. Les méthodes suivantes sont utilisées pour sa démonstration :

*i. La microscopie à fond noir.*

*ii. Méthodes de colorations spéciales* : Diverses colorations spéciales de flagelles ont été développées qui utilisent un mordant pour aider à incruster les flagelles avec une coloration à une épaisseur visible.

*iii. Microscopie électronique.*

*iv. Méthodes indirectes* : méthodes indirectes par lesquelles la motilité des bactéries peut être observée ou démontrée en raison de la difficulté de démontrer directement les flagelles :

**a.** Au microscope dans des suspensions fluides (dans une goutte pendante ou sous une lamelle) : lors de l'examen microscopique de films humides, des bactéries mobiles sont observées nageant dans différentes directions à travers le champ, avec un mouvement de flèche, de tortillement ou de culbute.

**b.** Par propagation de la croissance bactérienne sous forme de film sur de la gélose, par ex. essaimage de *Proteus sp.*

**c.** Turbidité se propageant à travers la gélose semi-solide, par ex. La méthode du tube de Craigie.

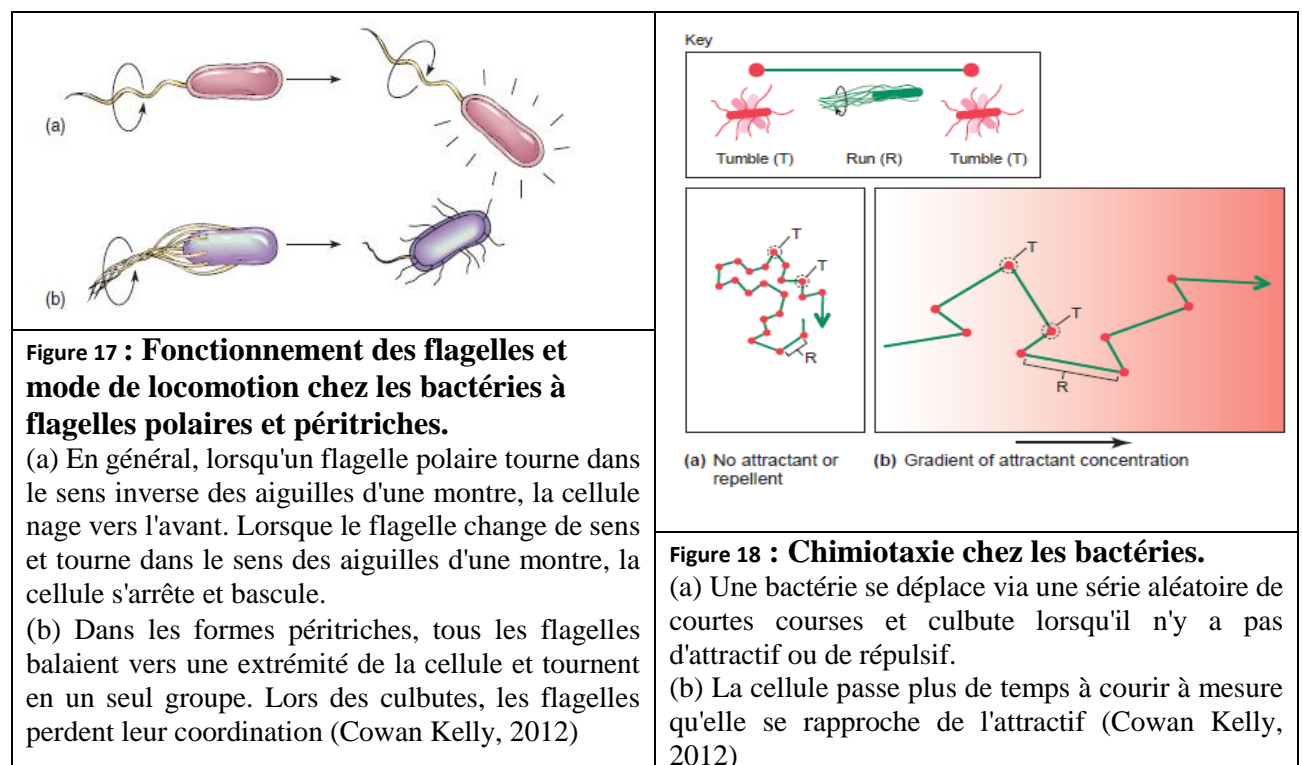
- **Chimotaxis et phototaxis**

**a/ Chimotaxis** : Les bactéries flagellées se rapprochent ou s'éloignent des substances de leur environnement par un processus non aléatoire appelé chimiotaxie (ke''-moh-tak'-sis). Les concentrations de la plupart des substances présentes dans l'environnement varient selon un gradient, c'est-à-dire d'une concentration élevée à faible. La chimiotaxie positive est le mouvement d'une bactérie dans la direction d'un

stimulus chimique favorable (généralement un nutriment) ; la chimiotaxie négative est l'éloignement d'un composé répulsif (potentiellement nocif par ex : des poisons).

Le flagelle est efficace pour guider les bactéries dans l'environnement principalement parce que le système de détection des produits chimiques est lié aux mécanismes qui animent le flagelle. Dans la membrane cellulaire se trouvent des grappes de récepteurs qui se lient à des molécules spécifiques provenant de l'environnement immédiat. La fixation d'un nombre suffisant de ces molécules transmet des signaux au flagelle et le met en mouvement rotatif. Si plusieurs flagelles sont présents, ils s'alignent et tournent en groupe (figure 17). Lorsqu'un flagelle tourne dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, la cellule elle-même nage dans une direction linéaire lisse vers le stimulus, appelée course. Les courses sont interrompues à divers intervalles par des culbutes, au cours desquelles le flagelle change de direction et provoque l'arrêt et la modification de la trajectoire de la cellule. On pense que les molécules attractives inhibent les culbutes et permettent la progression vers le stimulus. Les répulsifs provoquent de nombreuses culbutes, permettant à la bactérie de se rediriger loin du stimulus (figure 18).

**b : Phototaxis :** Certaines bactéries peuvent se déplacer vers ou loin de la lumière ; cette réponse est appelée phototaxie. Les bactéries qui se déplacent vers la lumière présentent une phototaxie positive, tandis que celles qui s'éloignent de la lumière présentent une phototaxie négative. Le mouvement peut être accompli au moyen de flagelles. Ou, dans le cas de certaines bactéries aquatiques photosynthétiques, les inclusions de gouttelettes d'huile dans leur cytoplasme peuvent leur donner la flottabilité nécessaire pour s'élever vers la surface de l'eau, où la lumière est plus disponible.



---

---

- **Pilis (Fimbriae)**

De nombreuses bactéries gram-négatives possèdent des appendices de surface rigides appelés pili [L., poils ; singulier : pilus : (py'-lus)] ou fimbriae [L., franges ; singulier : fimbria (fim'-bree-ah)] selon leur fonction. Ils sont plus courts et plus fins que les flagelles (0,1 à 1,5  $\mu\text{m}$  de longueur et largeur uniforme entre 4 et 8 nm) et émergent de la paroi cellulaire. On a vu que des cellules individuelles étaient recouvertes de 10 pili à 1000. Ils proviennent de la membrane cytoplasmique et sont composées de sous-unités protéiques structurales appelées pilines. Certains pilis contiennent un seul type de piline, d'autres plus d'un type. Des protéines mineures appelées adhésines sont situées à l'extrémité des pili et sont responsables des propriétés d'attachement.

- **Classes des pili** : deux classes peuvent être distinguées :

**-Pilis communs**

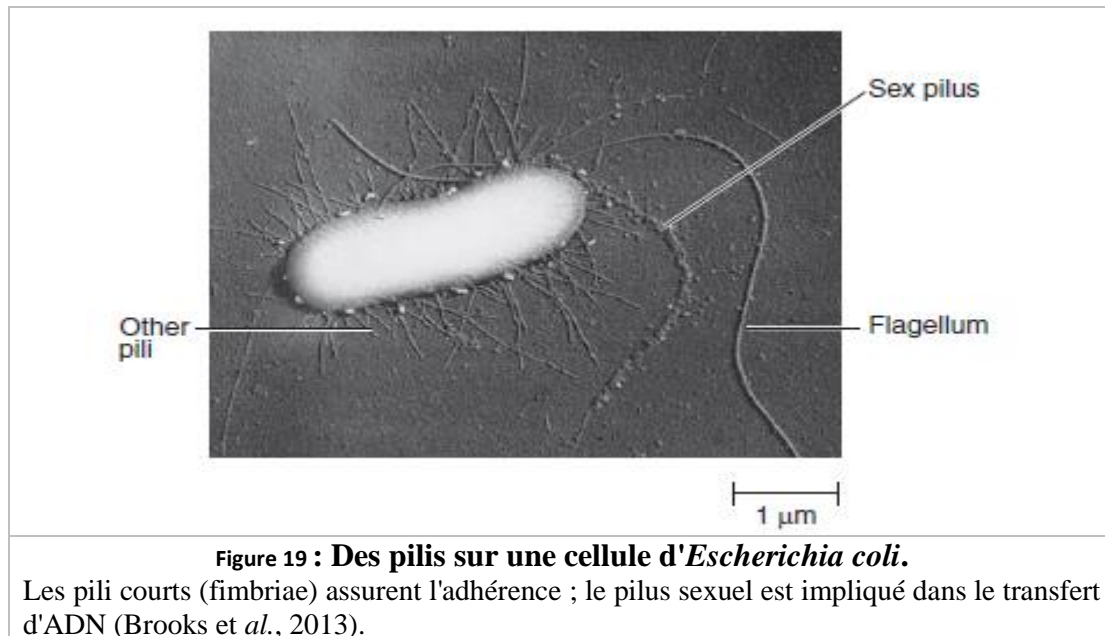
Les pili communs (ordinaires) sont des pili courts d'attachement, ou fimbriae qui jouent un rôle dans l'adhérence des bactéries symbiotiques et pathogènes aux surfaces, telles que les surfaces cellulaires et l'interface de l'eau et de l'air. Ils contribuent à la pathogénicité de certaines bactéries - leur capacité à produire des maladies - en favorisant la colonisation (le développement de colonies) à la surface des cellules d'autres organismes. Par exemple, certaines bactéries adhèrent aux globules rouges par des pili de fixation et provoquent l'agglutination des globules sanguins, un processus appelé hémagglutination. Chez certaines espèces de bactéries, certains individus ont des pili d'attachement et d'autres en sont dépourvus. Chez *Neisseria gonorrhoeae*, les souches sans pili sont rarement capables de provoquer la gonorrhée, mais celles avec pili sont hautement infectieuses car elles se fixent aux cellules épithéliales du système urogénital. Ces pili leur permettent également de se fixer aux spermatozoïdes et de se propager ainsi à l'individu suivant.

**-Pilis sexuels**

Les pili sexuels sont des pili longs de conjugaison, ou pili F (également appelés pili sexuels), sont trouvés uniquement dans certains groupes de bactéries (environ 1 à 10 par cellule). Ils sont génétiquement déterminés par des facteurs sexuels ou des plasmides de conjugaison. Ils attachent des cellules donneuses et receveuses et peuvent fournir une voie pour le transfert de l'ADN du matériel génétique. Ce processus de transfert est appelé conjugaison. Le transfert d'ADN fournit une variété génétique pour les bactéries, comme la reproduction sexuée fait pour de nombreuses autres formes de vie. De tels transferts entre bactéries causent des problèmes aux humains car la résistance aux antibiotiques peut être transmise avec le transfert d'ADN. Par conséquent, de plus en plus de bactéries acquièrent une résistance, et les humains doivent chercher de nouvelles façons de contrôler la croissance de ces bactéries.

Certains virus bactériens se fixent spécifiquement sur les récepteurs des pili sexuels au début de leur cycle de reproduction. Les pili sont classés en différents types (par exemple, F, I) en fonction de leur sensibilité à un bactériophage spécifique.

Les pili sont illustrés dans la figure 19, dans laquelle les pili sexuels ont été recouverts de particules de phage pour lesquelles ils servent de récepteurs spécifiques.



La motilité via pili est complètement différente du mouvement flagellaire. Les molécules de piline sont disposées en hélice pour former un cylindre droit qui ne tourne pas et n'a pas de corps basal complet. Leurs pointes adhèrent fortement aux surfaces éloignées des cellules. Les pili se dépolymérisent ensuite à partir de l'extrémité interne, se rétractant ainsi à l'intérieur de la cellule. Le résultat est que la bactérie se déplace en direction de la pointe adhérente. Ce type de motilité de surface est appelé contraction et est répandu parmi les bactéries piliées. Contrairement aux flagelles, les pili poussent de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur.

La virulence de certaines bactéries pathogènes dépend de la production non seulement de toxines mais aussi d'« antigènes de colonisation », qui sont de simples pili qui confèrent aux cellules des propriétés adhérentes. Dans les souches d'*E. coli* entéropathogènes, les entérotoxines et les antigènes de colonisation (pili) sont déterminés génétiquement par des plasmides transmissibles.

Dans un groupe de cocci à Gram positif, les streptocoques, les fimbriae sont le site de l'antigène de surface principal, la protéine M. L'acide lipotéichoïque, associé à ces fimbriae, est responsable de l'adhérence des streptocoques du groupe A aux cellules épithéliales de leurs hôtes.

Les pili de différentes bactéries sont antigéniquement distincts et provoquent la formation d'anticorps par l'hôte. Les anticorps dirigés contre les pili d'une espèce bactérienne n'empêcheront pas la fixation d'une autre espèce. Certaines bactéries, telles

que *Neisseria gonorrhoeae*, sont capables de fabriquer des pili de différents types antigéniques (variation antigénique) et peuvent donc encore adhérer aux cellules en présence d'anticorps dirigés contre leur type de pili d'origine. Il est nécessaire de s'assurer que les antigènes bactériens utilisés pour les tests sérologiques et la préparation des antisérums sont dépourvus de pili. Les pili inhibent la capacité phagocytaire des leucocytes.

Certaines bactéries aérobies forment une fine couche brillante ou floue à l'interface air-eau d'un bouillon de culture. Cette couche, appelée pellicule, est constituée de nombreuses bactéries qui adhèrent à la surface par leurs pili d'attache. Ainsi, les pili de fixation permettent aux organismes de rester dans le bouillon, à partir duquel ils prélèvent des nutriments, alors qu'ils se rassemblent près de l'air, où la concentration en oxygène est la plus élevée. En 2010, on a découvert que les bacilles *Pseudomonas* utilisent leurs pili d'attache pour se redresser et « se promener » sur la fin, explorant leur environnement. Ils peuvent également utiliser des pili pour se déplacer rapidement sur des surfaces lorsqu'elles sont horizontales.

- **Mise en évidence des pili**

**1. Microscopie électronique** : Ils ne peuvent pas être vus au microscope optique mais ne sont visibles qu'au microscope électronique en raison de leur petite taille.

**2. Hémagglutination** : La plupart des bactéries piliées portent des pili d'un type qui leur permet d'adhérer, entre autres types de cellules tissulaires, aux globules rouges de nombreux tissus animaux. Ils adhèrent très fortement, aux globules rouges de cobaye, de volaille, de cheval et de porc ; moyennement, aux cellules humaines ; faiblement, aux cellules de mouton et très peu aux cellules de bœuf. Les fonctions d'adhérence peuvent être détectées par la capacité des bactéries à adhérer aux cellules épithéliales ou à provoquer une hémagglutination. Par conséquent, un simple test d'hémagglutination peut être utilisé pour déterminer si une culture contient ou non des bacilles piliés. L'adhérence des bactéries aux globules rouges, aux cellules cultivées ou aux surfaces tissulaires peut être bloquée de manière compétitive par les pili.

### **-Endospore**

Un certain nombre de bactéries gram-positives, telles que celles des genres *Clostridium* et *Bacillus*, peuvent former des structures dormantes résistantes spéciales appelées spores. Ces structures sont internes à la cellule et sont donc appelées endospores. Les endospores se développent lorsque les nutriments essentiels sont épuisés. Lors de la sporulation, chaque cellule végétative (la cellule qui métabolise les nutriments) ne forme qu'une seule spore, et lors de la germination ultérieure, chaque spore donne naissance à une seule cellule végétative. La sporulation chez les bactéries n'est donc pas une méthode de reproduction comme les spores fongiques mais de conservation (un champignon produit de nombreuses spores, qui aident l'organisme à survivre et fournissent un moyen de reproduction).

Les endospores, qui se forment à l'intérieur des cellules, contiennent très peu d'eau et sont très résistantes à la chaleur, au séchage, aux acides, aux bases, à certains désinfectants et même aux radiations, y compris la lumière du soleil et les rayons X. L'épuisement d'un nutriment incite généralement un grand nombre de cellules à produire des spores. Cependant, de nombreux chercheurs pensent que les spores font partie du cycle de vie normal et que quelques-unes se forment même lorsque les nutriments sont adéquats et que les conditions environnementales sont favorables. Ainsi, la sporulation, ou formation d'endospores, semble être un moyen par lequel certaines bactéries se préparent à la possibilité de futures conditions défavorables, à peu près de la même manière que les pays gardent des «armées permanentes» prêtes en cas de guerre.

- **Structure des endospores**

La structure de la spore est beaucoup plus complexe que celle de la cellule végétative mère en ce sens qu'elle comporte de nombreuses couches entourant un noyau central (figure 20). La spore montre les structures suivantes.

**1. Noyau** : le noyau contient un noyau complet (chromosome), l'ensemble des composants de l'appareil de synthèse des protéines, et un système générateur d'énergie basé sur la glycolyse. La résistance à la chaleur des spores est due en partie à leur état déshydraté (ne contenant que 10 à 30% de la teneur en eau des cellules végétatives) et en partie à la présence de grandes quantités (5 à 15% du poids sec des spores) de dipicolinate de calcium dans le noyau.

**2. Paroi des spores** : c'est la couche la plus interne entourant la membrane interne des spores. Elle contient du peptidoglycane normal et devient la paroi cellulaire de la cellule végétative en germination.

**3. Cortex** : c'est la couche la plus épaisse de l'enveloppe des spores contenant un peptidoglycane inhabituel et faiblement réticulé. Il est extrêmement sensible au lysozyme et son autolyse joue un rôle dans la germination des spores.

**4. Enveloppe protéique de spores** : elle est composée d'une protéine semblable à la kératine contenant de nombreuses liaisons disulfure intramoléculaires ; cette couche confère une résistance relative aux agents chimiques antibactériens en raison de son imperméabilité.

**5. Exosporium** : les spores de certaines espèces ont une couverture supplémentaire, apparemment plutôt lâche, connue sous le nom d'exosporium est composé de protéines, qui peut avoir des crêtes et des rainures distinctives.

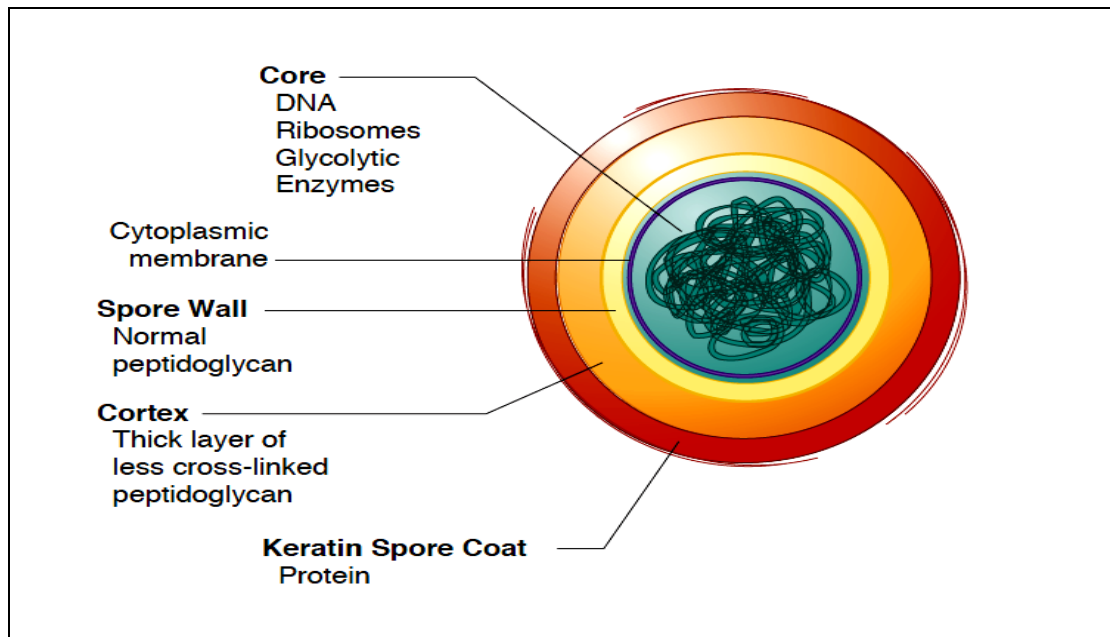


Figure 20 : Structure d'une Endospore bactérienne  
(Tiffany Alley et *al.*, 2016).

- **Forme et position des spores**

La forme et la position de la spore et sa taille par rapport à la cellule mère sont des caractéristiques de l'espèce. Les spores peuvent être centrales (équatoriales), subterminales (près d'une extrémité) ou terminales (figure 21). L'apparence peut être sphérique, ovoïde ou allongée, et être plus étroite que la cellule, ou plus large et bombée. Le diamètre de la spore peut être égal ou inférieur à la largeur de la bactérie (*Bacillus*), ou peut-être plus large que le corps bacillaire produisant une distension ou un renflement dans la cellule (*Clostridium*).

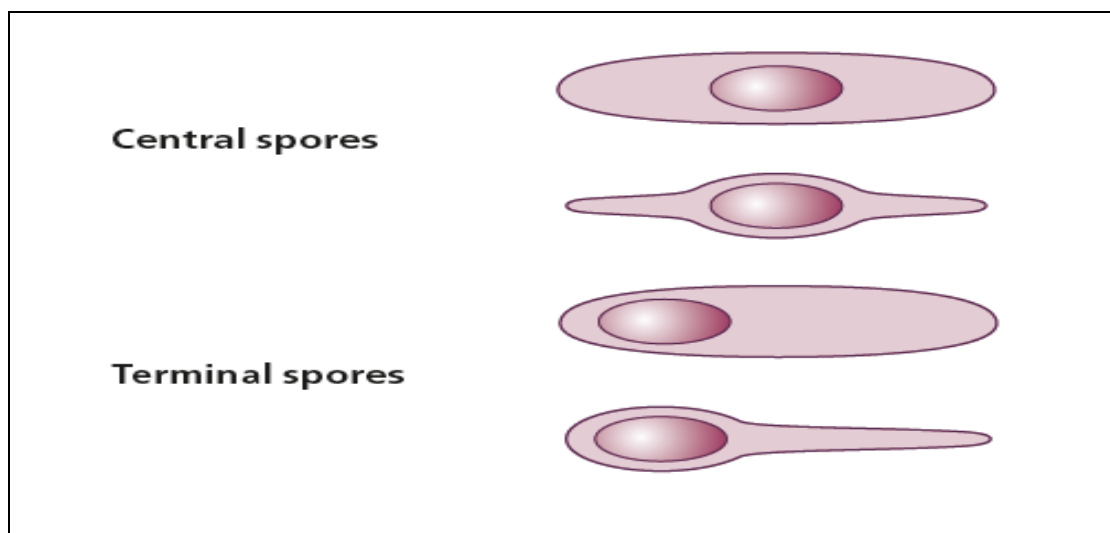


Figure 21 : Spores bactériennes et leur positionnement dans les cellules bactériennes  
Exemples de bactéries sporulées : *Clostridium botulinum* et *Bacillus cereus* (Roller, 2012).

- **Résistance**

Les spores bactériennes constituent certaines des formes de vie les plus résistantes. Elles peuvent rester viables pendant des siècles. Bien que certaines spores puissent résister à l'ébullition pendant des périodes prolongées, les spores de toutes les espèces médicalement importantes sont détruites par autoclavage à 120°C pendant 15 minutes. Les méthodes de stérilisation et de désinfection doivent garantir que les spores sont également détruites. La sporulation aide les bactéries à survivre pendant de longues périodes dans des environnements défavorables.

La résistance à la chaleur des endospores est probablement due à plusieurs facteurs : la stabilisation de l'ADN par le dipicolinate de calcium et les protéines acido-solubles, la déshydratation des protoplastes, l'enveloppe des spores, la réparation de l'ADN, la plus grande stabilité des protéines cellulaires chez les bactéries adaptées à la croissance à haute température et autres.

- **Mise en évidence des spores**

Les endospores peuvent être examinées au microscope optique et électronique. Dans les préparations non colorées, la spore est reconnue dans la cellule mère par sa plus grande réfringence.

**a. Coloration de Gram** : les spores apparaissent sous la forme d'un corps réfringent non coloré à l'intérieur de la cellule colorée par des méthodes conventionnelles, telles que la coloration de Gram.

**b. Coloration Schaeffer-Fulton** : une coloration primaire de vert malachite est forcée dans la spore en vaporisant l'émulsion bactérienne. Alternativement, le vert malachite peut être laissé sur la lame pendant 15 minutes ou plus pour colorer les spores. Le vert malachite est soluble dans l'eau et a une faible affinité pour le matériel cellulaire, de sorte que les cellules végétatives et les cellules mères des spores peuvent être décolorées avec de l'eau et contre-colorées avec de la safranine

**c. Coloration Ziehl-Neelsen modifiée (ZN)** : les spores sont légèrement acido-résistantes et peuvent être colorées différemment par une modification de la méthode Ziehl-Neelsen. La coloration de Ziehl-Neelsen avec 0,25 à 0,5 % d'acide sulfurique (au lieu de 20 % d'acide sulfurique tel qu'utilisé dans la méthode conventionnelle) comme agent décolorant est utilisée pour la coloration des spores, les spores apparaissent sous forme de corps rouges résistants à l'acide.

- **La Sporulation**

La formation de l'endospore, la sporogénèse ou la sporulation, commence au moment où la croissance cellulaire s'arrête par manque d'éléments nutritifs. C'est un processus très complexe et peut être divisé en sept phases (Figure 22) :

**Phase 1.** La sporulation débute par la formation d'un filament axial de matériel nucléaire : la division nucléaire n'étant pas suivie d'une division cellulaire, les deux génomes fusionnent donnant un filament chromatique axial.

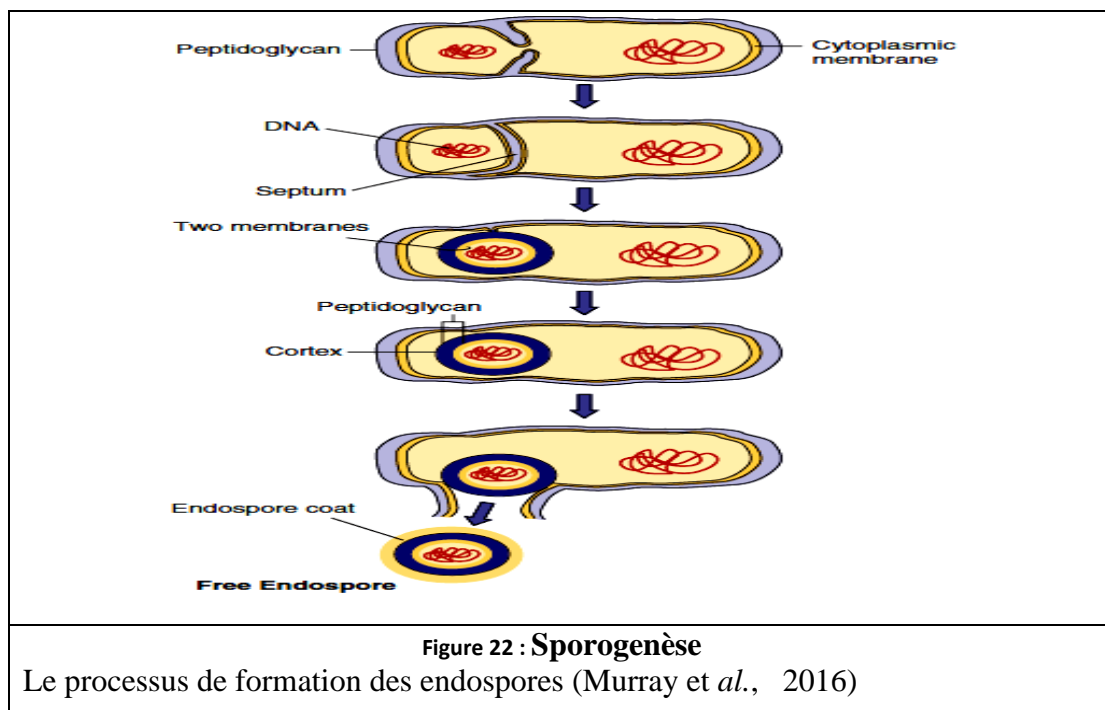
**Phase 2.** Les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales. Ce septum va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une préspore caractéristique.

**Phase 3.** La membrane cytoplasmique continue à se développer et entoure la préspore d'une seconde enveloppe de manière à englober cette dernière.

**Phase 4.** Les deux membranes des spores s'engagent désormais dans la synthèse active de couches spéciales qui formeront l'enveloppe cellulaire : la paroi des spores et le cortex, situés à l'extérieur des membranes.

**Phase 5 et 6.** Les protéines de la tunique sont alors formées autour du cortex et l'endospore arrive à la maturité.

**Phase 7.** Des enzymes lytiques détruisent le sporange libérant la spore.



La transformation complète d'une cellule végétative en sporange et en endospore nécessite 6 à 8 heures chez la plupart des espèces sporulées.

- **La germination**

Le processus de germination qui permet la transformation d'une spore en une cellule végétative (retour de la dormance à la vie active) se déroule en trois étapes : activation, initiation (ou germination) et l'émergence (éclosion ou excroissance).

**1. L'activation** : la transformation d'une spore en une cellule végétative est stimulée par la perturbation de la couche externe par des agents physiques (choc thermique), mécaniques (abrasion, choc) ou chimiques (acides, lysozyme).

**2. L'initiation (germination)** : débute en présence de l'eau et un nutriment déclencheur (par exemple l'alanine ou l'adénosine) qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées. La liaison de déclencheur active une autolysine qui dégrade rapidement le peptidoglycane du cortex. L'eau est absorbée et la spore gonfle, le dipicolinate de calcium est libéré et divers constituants des spores sont dégradés par les enzymes hydrolytiques.

**3. L'émergence (excroissance)** : la dégradation du cortex et des couches externes entraîne l'émergence d'une nouvelle cellule végétative constituée du protoplaste de la spore et de sa paroi environnante. S'ensuit une période de biosynthèse active ; cette période, qui se termine par la division cellulaire, est appelée excroissance. La croissance nécessite un apport de tous les nutriments essentiels à la croissance cellulaire.

- **Utilisations des spores**

**1. Importance en microbiologie alimentaire, industrielle et médicale** : Les endospores sont d'une grande importance pratique en microbiologie alimentaire, industrielle et médicale en raison de leur résistance et du fait que plusieurs espèces de bactéries formant des endospores sont des agents pathogènes dangereux. Les endospores survivent souvent à l'ébullition ordinaire (100°C) pendant une heure ou plus. Par conséquent, les autoclaves doivent être utilisés pour stériliser de nombreux matériaux.

**2. Contrôle de la stérilisation** : Pour une stérilisation correcte, les spores de certaines espèces de bactéries sont utilisées comme indicateur, par ex. *Bacillus stearothermophilus* qui est détruit à une température de 121°C pendant 10 à 20 minutes (même température et durée que celles utilisées en autoclavage). Avant son utilisation, ces spores peuvent être conservées en autoclave. Une bonne stérilisation est indiquée par l'absence de spores après passage à l'autoclave.

**3. Recherche** : La formation de spores est bien adaptée à la recherche sur la construction de structures biologiques complexes.

---

---

## Chapitre 3 : La Physiologie bactérienne

La physiologie bactérienne consiste à étudier la nutrition et la croissance des bactéries en fonction des variations (naturelles ou contrôlées) du milieu dans lequel elles vivent.

### 1. Besoins nutritifs

Les bactéries sont des organismes vivants devant trouver dans l'environnement l'ensemble des substances nécessaires à leur **énergie** et à leurs **synthèses cellulaires**.

#### - Besoins énergétiques et élémentaires

Les bactéries ont besoins :

##### a. Aliments énergétiques

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

La source d'énergie utilisée par les bactéries peut être : soit l'énergie lumineuse (bactéries **Phototrophes**), ou soit l'énergie fournie par les processus d'oxydoréduction (bactéries **Chimiotrophes**).

Les bactéries **Phototrophes** font appel à des composés minéraux ou organiques comme sources d'électrons. Si le substrat oxydable est minéral, la bactérie est dite **Photolithotrophe** : elle est capable de se développer dans un milieu purement minéral. Si le substrat oxydable est organique, la bactérie est dite **Photoorganotrophe**.

Les bactéries **Chimiotrophes** utilisent des composés minéraux ou organiques comme "donneurs d'hydrogène ou d'électrons" ou "accepteurs d'électrons". Si le donneur d'électron est un corps minéral, la bactérie est dite **Chimiolithotrophe**. Si le composé est organique, la bactérie est dite **Chimioorganotrophe**. Exemple : bactéries pathogènes d'intérêt médical, de contamination alimentaire, d'usage industriel pour la synthèse d'antibiotique, de vitamines...

##### b. Aliments constitutifs (élémentaires)

Ce sont les éléments nécessaires à la bactérie pour fabriquer ses constituants. Les besoins nutritionnels minimums pour la croissance et la multiplication des bactéries sont l'eau, une source de carbone, une source d'azote et certains sels inorganiques.

- **L'eau (H<sub>2</sub>O), besoin majeur** : Le rôle de l'eau dans le fonctionnement de la cellule bactérienne est fondamental. Cette importance se reflète directement dans la composition cellulaire, dont la teneur en eau des cellules bactériennes peut varier de 75 à 90 % du poids total et est le véhicule pour l'entrée de toutes les cellules et pour l'élimination de tous les déchets. Il participe aux réactions métaboliques et fait également partie intégrante du protoplasme.

#### - **Macroéléments ou macronutriments**

Les éléments qui composent les constituants cellulaires sont appelés macroéléments ou macronutriments et plus de 95 % du poids sec des cellules est composé de quelques macronutriments. Ceux-ci comprennent :

**\*6 éléments majeurs** : le carbone (C), l'oxygène (O), l'hydrogène (H), l'azote (N), le phosphore (P) et le soufre (S), tous indispensables à la cellule en quantités relativement importantes (en concentrations de g/L), ces éléments étant utilisés entre autres pour synthétiser des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

**\* 4 éléments mineurs** : le potassium, le magnésium, le calcium et le fer (en mg/L ou µg/L) existent dans la cellule à l'état de cations et jouent plusieurs rôles. Le potassium (K<sup>+</sup>) est nécessaire à l'activité de plusieurs enzymes y compris celles qui interviennent dans la synthèse protéique. Le calcium (Ca<sup>+2</sup>) a de nombreuses fonctions dont l'une est de contribuer à la thermo-résistance des endospores bactériennes. Le magnésium (Mg<sup>+2</sup>) est un cofacteur de nombreuses enzymes, il forme un complexe avec l'ATP, stabilise les ribosomes et les membranes cellulaires. Le fer (Fe<sup>+2</sup> et Fe<sup>+3</sup>) est utilisé dans la synthèse des cytochromes et est un cofacteur des enzymes et des protéines transporteuses d'électrons.

#### - **Oligo-éléments**

Certains éléments, appelés oligo-éléments ou micronutriments, sont requis en quantités beaucoup plus faibles par toutes les cellules. Ils comprennent le manganèse (Mn), le zinc (Zn), le cobalt (Co), le molybdène (Mo), le nickel (Ni) et le cuivre (Cu). Les oligo-éléments ne limitent probablement pas le développement et font normalement partie des enzymes ou peuvent être nécessaires à la fonction enzymatique. Ils aident à la catalyse des réactions et au maintien de la structure des protéines. De très petites quantités de ces oligo-éléments se retrouvent dans la plupart des milieux naturels, y compris l'eau.

#### - **Source de carbone**

Il semble intéressant de souligner un point concernant la source extracellulaire de carbone par opposition à la fonction intracellulaire des composés carbonés. Bien qu'une distinction soit faite entre le type de composés carbonés que les cellules absorbent en tant que nutriments (inorganiques ou organiques), la majorité des composés carbonés

impliqués dans la structure et le métabolisme normaux de toutes les cellules sont organiques.

\* Un **hétérotrophe** est un organisme qui doit obtenir son carbone sous une forme organique. Parce que le carbone organique provient des corps d'autres organismes, les hétérotrophes dépendent d'autres formes de vie (hetero- est un préfixe grec signifiant « autre »). Parmi les molécules organiques courantes qui peuvent satisfaire à cette exigence figurent les protéines, les glucides, les lipides et les acides nucléiques. Dans la plupart des cas, ces nutriments fournissent également plusieurs autres éléments. Certains nutriments organiques disponibles pour les hétérotrophes existent déjà sous une forme suffisamment simple pour être absorbés (par exemple, les monosaccharides et les acides aminés), mais de nombreuses molécules plus grosses doivent être digérées par la cellule avant l'absorption. De plus, les hétérotrophes varient dans leurs capacités à utiliser différentes sources de carbone organique. Certaines sont restreintes à quelques substrats, alors que d'autres (certaines bactéries *Pseudomonas*, par exemple) sont si polyvalentes qu'elles peuvent métaboliser plus de 100 substrats différents.

\* Un **autotrophe** ("auto-alimenteur") est un organisme qui utilise le CO<sub>2</sub> inorganique comme unique et principale source de carbone. Parce que les autotrophes ont la capacité spéciale de convertir le CO<sub>2</sub> en composés organiques, ils ne dépendent pas d'autres êtres vivants sur le plan nutritionnel. Nombre de micro-organismes sont autotrophes ; beaucoup sont photosynthétique, mais certains oxydent les molécules inorganiques pour produire de l'énergie.

#### - **Source d'azote**

Tous les organismes, y compris les micro-organismes, ont besoin d'azote pour synthétiser des enzymes, d'autres protéines et des acides nucléiques. L'azote 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).

\* Le diazote inorganique (N<sub>2</sub>) est très répandu, constituant 80 % de l'atmosphère terrestre. Les bactéries fixatrices d'azote moléculaire sécrètent de la nitrogénase, enzyme catalysant la fixation de l'azote. Elles appartiennent à deux classes :

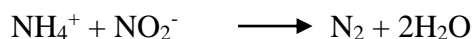
- Les *Azotobacter* vivent libres dans le sol et peuvent générer des kystes fixateurs de l'azote atmosphérique, phénomène capital pour la régénération des sols ;

- Les rhizobiacées entretiennent une relation symbiotique avec les légumineuses. L'établissement de cette relation induit l'apparition de nitrogénase.

La capacité de fixation de l'azote se trouve donc chez des bactéries qui ont développé des stratégies biochimiques assez différentes pour protéger leurs enzymes fixatrices d'azote de l'oxygène.

\* La plupart des micro-organismes peuvent utiliser  $\text{NH}_3$  comme seule source d'azote, et de nombreux organismes possèdent la capacité de produire du  $\text{NH}_3$  à partir d'amines ( $\text{R}-\text{NH}_2$ ) ou d'acides aminés ( $\text{RCHNH}_2\text{COOH}$ ), généralement de manière intracellulaire. La production de  $\text{NH}_3$  à partir de la désamination des acides aminés est appelée ammonification. L'ammoniac est introduit dans la matière organique par des voies biochimiques impliquant le glutamate et la glutamine grâce à la glutamate déshydrogénase ou à la glutamine synthétase.

\* De nombreux micro-organismes possèdent la capacité d'assimiler le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) de manière réductrice par conversion de ces ions en  $\text{NH}_3$ . Ces processus sont appelés respectivement réduction assimilatrice des nitrates et réduction assimilatrice des nitrites. Ces voies d'assimilation diffèrent des voies utilisées pour la dissimilation des nitrates et des nitrites. Les voies dissimilatrices sont utilisées par les organismes qui utilisent ces ions comme accepteurs d'électrons terminaux dans la respiration. Certaines bactéries autotrophes (par exemple, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* spp.) sont capables de convertir le  $\text{NH}_3$  en  $\text{N}_2$  gazeux dans des conditions anaérobies ; ce processus est connu sous le nom de dénitrification. La réaction dans laquelle l'ammoniac est oxydé par le nitrite est un processus microbien qui se produit dans les eaux anoxiques de l'océan et est une voie majeure par laquelle l'azote est renvoyé dans l'atmosphère.



Quelle que soit la forme initiale sous laquelle l'azote inorganique pénètre dans la cellule, il doit d'abord être converti en  $\text{NH}_3$ , la seule forme pouvant être directement combinée au carbone pour synthétiser les acides aminés et autres composés.

- **Types trophiques ou nutritionnels des bactéries**

Malgré la grande diversité métabolique observée chez les bactéries, elles peuvent être classées en quatre catégories nutritionnelles ou trophiques (du grec trophê "nourrir") sur la base de leurs sources primaires en carbone, énergie et électrons (tableau 5). Les termes carbone et source d'énergie sont souvent fusionnés en un seul mot pour plus de commodité.

Tableau 5: Principaux types nutritionnels chez les bactéries (Prescott et al., 2003)

Principaux types nutritionnels	Sources d'énergie, d'hydrogène/ électrons et carbone	Exemples
Autotrophes photolithotrophes (Photolithoautotrophie)	Energie lumineuse Donneur inorganique d'hydrogène/électrons (H/é) CO <sub>2</sub> comme source de carbone	Bactéries sulfureuses pourpres et vertes Cyanobactéries
Hétérotrophes photoorganotrophes (Photo-organohétérotrophie)	Energie lumineuse Donneur organique d'H/é Source organique de carbone (CO <sub>2</sub> peut aussi être utilisé)	Bactéries non sulfureuses pourpres Bactéries non sulfureuses vertes
Autotrophes chimiolithotrophes (Chimiolithoautotrophie)	Source chimique d'énergie (inorganique) Donneur inorganique d'H/é CO <sub>2</sub> comme source de carbone	Bactéries oxydant le soufre Bactéries oxydant l'H <sub>2</sub> Bactéries nitrifiantes Bactéries oxydant le fer
Hétérotrophes chimioorganotrophes (Chimio-organohétérotrophie)	Source chimique d'énergie (organique) Donneur organique d'H/é Source organique de carbone	La plupart des bactéries non photosynthétiques (la plupart des agents pathogènes)

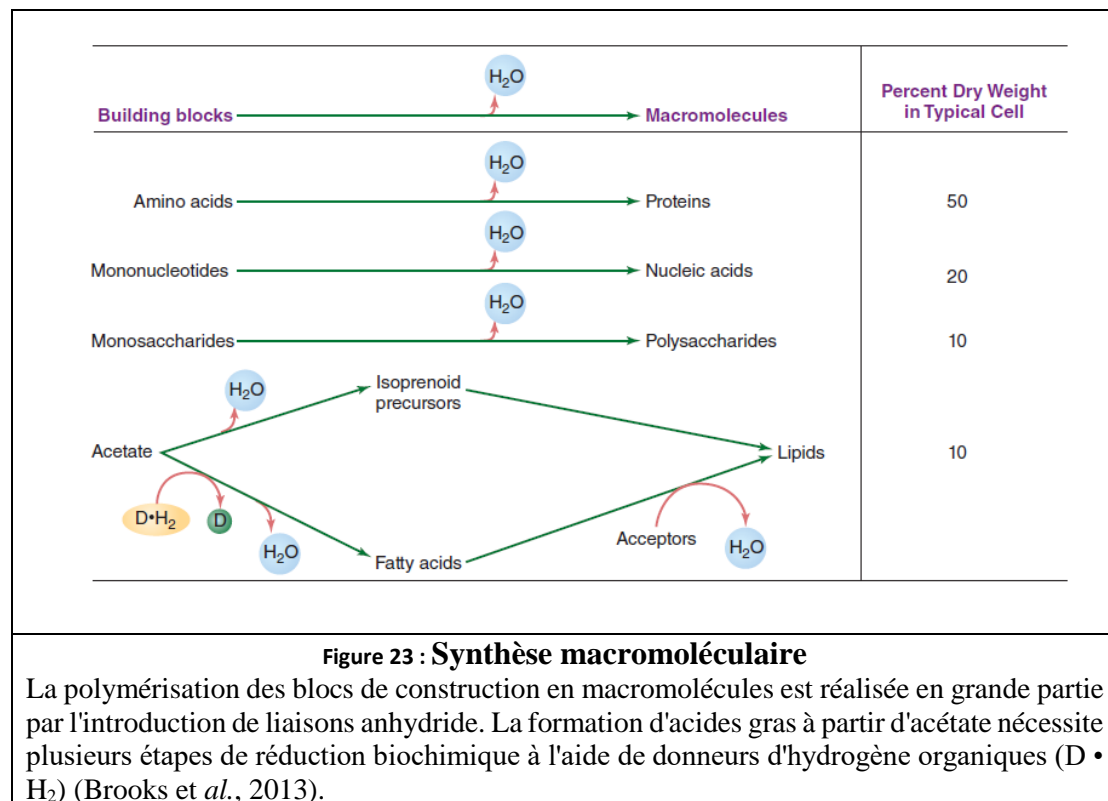
Il existe de plus des types trophiques correspondant à des besoins particuliers : hydrogénotrophe, méthanotrophe, diazotrophe, méthylotrophe, ...

#### - Besoins spécifiques

Certaines bactéries ont besoin de certains composés organiques en quantités infimes appelées facteurs de croissance ou vitamines bactériennes. Un **facteur de croissance** est un composé organique qu'une cellule doit contenir pour se développer mais qu'elle est incapable de synthétiser. 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**.

De nombreux micro-organismes, lorsqu'ils reçoivent les nutriments énumérés ci-dessous, sont capables de synthétiser tous les éléments constitutifs des macromolécules (figure 23), qui sont des acides aminés ; les purines, les pyrimidines et les pentoses (les précurseurs métaboliques des acides nucléiques) ; glucides supplémentaires (précurseurs de polysaccharides) ; et les acides gras et les composés isoprénoïdes. De plus, les organismes vivants libres doivent être capables de synthétiser les vitamines complexes qui servent de précurseurs aux coenzymes.



Différentes espèces microbiennes varient considérablement dans leurs besoins en facteurs de croissance. Les composés impliqués s'avèrent essentiels à tous les organismes ; les différences dans les exigences reflètent les différences dans les capacités synthétiques. Certaines espèces n'ont pas besoin de facteurs de croissance, mais d'autres, comme certains des lactobacilles, ont perdu, au cours de l'évolution, la capacité de synthétiser jusqu'à 30 à 40 composés essentiels et en ont donc besoin dans le milieu.

Pour certaines bactéries, la croissance est proportionnelle à la quantité de facteur de croissance présente dans le milieu. Un exemple est la souche d'*Escherichia coli* 113 qui est auxotrophe pour la vitamine B<sub>12</sub> et dont la croissance permet de déterminer la quantité de cette vitamine présente dans un milieu.

Cette situation (auxotrophe) peut être soit **naturelle** et c'est alors une des caractéristiques du microorganisme éventuellement utilisée en taxonomie, soit **provoquée** par exemple par une mutation. En fait, chacun de ces composés essentiels est synthétisé par une séquence discrète de réactions enzymatiques ; chaque enzyme est produite sous le contrôle d'un gène spécifique. Lorsqu'un organisme subit une mutation génétique entraînant une défaillance de l'une de ces enzymes, la chaîne est rompue et le produit final n'est plus produit. L'organisme doit alors puiser ce composé dans l'environnement : Le composé est devenu un facteur de croissance pour l'organisme. Ce type de mutation peut être facilement induit en laboratoire.

Il existe aussi des auxotrophes conditionnelles, c'est-à-dire dépendantes des conditions de culture. Par exemple chez la levure, l'oxygène est nécessaire en tant que co-substrat pour la synthèse des stérols et de l'acide nicotinique (vitamine PP, précurseur du coenzyme NAD<sup>+</sup>) du fait de la présence d'oxygénases dans les voies correspondantes, ce qui implique que ces composés doivent être ajoutés au milieu seulement pour une culture anaérobie.

### - Facteurs physiques

Les types de micro-organismes trouvés dans un environnement donné et les vitesses auxquelles ils se développent peuvent être influencés par une variété de facteurs physiques. Les facteurs physiques comprennent le pH, la température, la concentration en oxygène, l'humidité (l'activité de l'eau), la pression hydrostatique, la pression osmotique et le rayonnement.

### 1. Acidité / alcalinité (pH)

L'acidité ou l'alcalinité d'un milieu s'exprime en termes de pH. Les micro-organismes ont un pH optimal, c'est-à-dire le pH auquel ils se développent le mieux. Leur pH optimal est généralement proche de la neutralité (pH 7). La plupart des microbes ne se développent pas à un pH supérieur à 1 unité de pH au-dessus ou en dessous de leur pH optimal.

Selon leur tolérance à l'acidité ou à l'alcalinité, les bactéries sont classées comme :

- Des acidophiles,
- Des neutrophiles, ou
- Des alcalinophiles.

Cependant, aucune espèce ne peut tolérer la plage de pH complète de l'une de ces catégories, et beaucoup tolèrent une plage de pH qui chevauche deux catégories. Les **acidophiles** (a-sid'o-filz), ou organismes qui aiment les acides, se développent mieux à un pH de 0,1 à 5,4. Le lactobacille, qui produit de l'acide lactique, est un acidophile, mais il ne tolère qu'une légère acidité. Cependant, certaines bactéries qui oxydent le soufre en acide sulfurique peuvent créer et tolérer des conditions aussi basses que pH 1,0. Les **neutrophiles** (nu'tro-filz) existent de pH 5,4 à 8,0. La plupart des bactéries qui causent des maladies chez l'homme sont des neutrophiles. Les **alcaliphiles** (al'kah-li-filz), ou organismes aimant les alcalins (aimant les bases), existent à partir d'un pH de 7,0 à 11,5. *Vibrio cholerae*, l'agent causal de la maladie du choléra asiatique, se développe mieux à un pH d'environ 9,0. *Alcaligenes faecalis*, qui infecte parfois les humains déjà affaiblis par une autre maladie, peut créer et tolérer des conditions alcalines de pH 9,0 ou plus. La bactérie du sol *Agrobacterium* se développe dans un sol alcalin de pH 12,0.

Les effets du pH sur les organismes peuvent, en partie, être liés à la concentration d'acides organiques dans le milieu et à la protection que les parois cellulaires bactériennes fournissent parfois. Les lactobacilles et autres organismes qui produisent des acides organiques pendant la fermentation inhibent leur propre croissance en produisant des acides tels que l'acide lactique et l'acide pyruvique, qui s'accumulent dans le milieu. Il semble que les acides eux-mêmes, plutôt que les ions hydrogène en soi, inhibent la croissance. Les changements de pH peuvent conduire à la dénaturation des enzymes et d'autres protéines et peuvent interférer avec le pompage des ions au niveau de la membrane cellulaire. D'autres organismes ont des parois cellulaires relativement imperméables qui empêchent la membrane cellulaire d'être exposée à un pH extrême dans le milieu. Ces organismes semblent tolérer l'acidité ou l'alcalinité environnementale parce que la cellule elle-même est maintenue à un pH presque neutre.

De nombreuses bactéries produisent souvent des quantités suffisantes d'acides sous forme de sous-produits métaboliques qui finissent par interférer avec leur propre croissance. Pour éviter cette situation dans la culture de bactéries en laboratoire, des tampons sont incorporés dans les milieux de croissance pour maintenir les niveaux de pH appropriés. Les sels de phosphate sont couramment utilisés à cette fin.

## 2. Température

La plupart des espèces de bactéries peuvent se développer dans une plage de température de 30 °C, mais les températures minimales et maximales varient considérablement d'une espèce à l'autre. L'eau de mer reste liquide en dessous de 0°C et les organismes vivant dans les eaux froides de l'océan peuvent tolérer des températures inférieures au point de congélation. Selon leur plage de température de croissance, les bactéries peuvent être classées en groupes écologiques comme (figure 24) :

- les psychrophiles,
- mésophiles, ou
- thermophiles.

La plupart des bactéries, cependant, ne tolèrent pas toute la plage de température d'une catégorie, et certaines tolèrent une plage qui chevauche les catégories. La plage de températures pour la croissance d'une espèce microbienne donnée peut être exprimée en trois températures cardinales :

\* **La température minimale** est la température la plus basse qui permet la croissance et le métabolisme continu d'un microbe ; en dessous de cette température, ses activités sont inhibées.

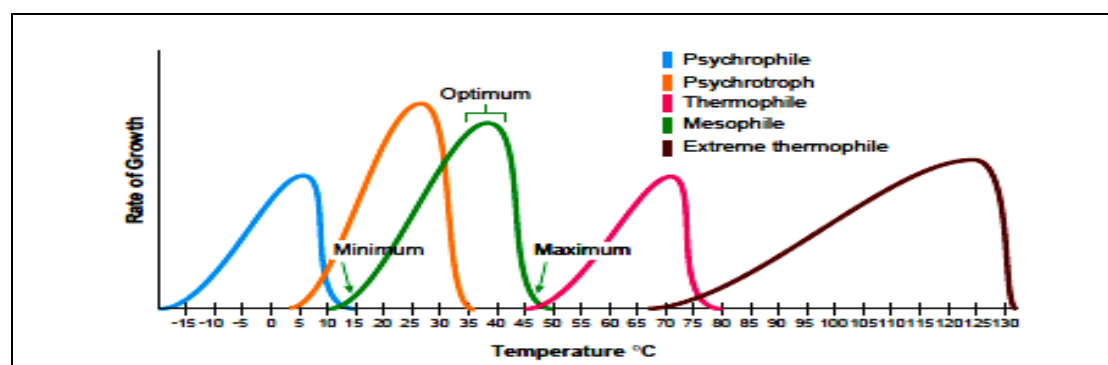
\* **La température maximale** est la température la plus élevée à laquelle la croissance et le métabolisme peuvent se poursuivre. Si la température monte légèrement au-dessus

du maximum, la croissance s'arrêtera, mais si elle continue d'augmenter au-delà de ce point, les enzymes et les acides nucléiques finiront par devenir inactivés de façon permanente (autrement connu sous le nom de dénaturation) et la cellule mourra. C'est pourquoi la chaleur fonctionne si bien comme agent de contrôle microbien.

\* **La température optimale** couvre une petite plage, intermédiaire entre le minimum et le maximum, qui favorise le taux de croissance et de métabolisme le plus rapide, c'est-à-dire les cellules ont le temps de génération le plus court (l'optimum est rarement un seul point).

Quel que soit le type de bactérie, la croissance augmente progressivement de la température minimale à la température optimale et décroît très fortement de la température optimale à la température maximale. De plus, la température optimale est souvent très proche de la température maximale. Ces propriétés de croissance sont dues à des modifications de l'activité enzymatique. L'activité enzymatique double généralement pour chaque élévation de température de 10 °C jusqu'à ce que la température élevée commence à dénaturer toutes les protéines, y compris les enzymes. La forte diminution de l'activité enzymatique à une température légèrement supérieure à la température optimale se produit lorsque les molécules d'enzymes sont tellement déformées par dénaturation qu'elles ne peuvent pas catalyser les réactions.

Au sein de ces groupes, les bactéries sont en outre classées comme obligatoires ou facultatives. Obligatoire signifie que l'organisme doit avoir les conditions environnementales spécifiées. Facultatif signifie que l'organisme est capable de s'adapter et de tolérer les conditions environnementales, mais il peut aussi vivre dans d'autres conditions. En fait, de petites différences chimiques dans les membranes bactériennes, qui affectent leur fluidité, leur permettent également de prospérer à des températures différentes.



**Figure 24 : Groupes écologiques par température exigée pour la croissance**

Les psychrophiles peuvent se développer à ou près de 0°C et avoir un optimum en dessous de 15°C. Les psychrotrophes ont un optimum de 15° à 30°C. En tant que groupe, les mésophiles peuvent croître entre 10°C et 50°C, mais leurs optima se situent généralement entre 20°C et 40°C. De manière générale, les thermophiles ont besoin de températures supérieures à 45°C et se développent de manière optimale entre cette température et 80°C. Les thermophiles extrêmes ont des optima supérieurs à 80°C. Notez que les plages peuvent se chevaucher dans une certaine mesure (Cowan Kelly, 2012).

\* **Les psychrophiles** (sy'-kroh-fyl), ou organismes qui aiment le froid, se développent mieux à des températures de 15 à 20 °C, bien que certains vivent assez bien à 0 °C. Ils peuvent ensuite être divisés en psychrophiles obligatoires, tels que *Bacillus globisporus*, qui ne peut pas se développer au-dessus de 20°C, et en psychrophiles facultatifs, tels que *Xanthomonas pharomicola*, qui pousse mieux en dessous de 20°C mais peut également se développer au-dessus de cette température. Le travail en laboratoire avec de vrais psychrophiles peut être un véritable défi. Les inoculations doivent être faites dans une chambre froide car la température ambiante peut être mortelle pour les organismes. Contrairement à la plupart des cultures de laboratoire, le stockage au réfrigérateur les incube plutôt qu'il ne les inhibe. Les psychrophiles vivent principalement dans l'eau froide, les lacs et les rivières, les champs de neige, la glace polaire, l'océan profond et le sol. Rarement, voire jamais, ils sont pathogènes. Les vrais psychrophiles doivent être distingués des psychrotrophes ou psychrophiles facultatifs qui se développent lentement au froid mais ont une température optimale entre 15°C et 30°C. Les bactéries telles que *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* sont préoccupantes car elles peuvent se développer dans les aliments réfrigérés et provoquer la détérioration de ces aliments et des maladies d'origine alimentaire, parfois mortelles.

\* **Les mésophiles** (mez'-oh-fylz), qui comprennent la plupart de bactéries médicalement significatives, des organismes qui se développent à des températures intermédiaires. Bien qu'une espèce individuelle puisse croître à des températures extrêmes de 10°C ou 50°C, les températures de croissance optimales (optima) de la plupart des mésophiles se situent entre 20°C et 40°C. Les organismes de ce groupe habitent les animaux et les plantes ainsi que le sol et l'eau dans les régions tempérées, subtropicales et tropicales. Les agents pathogènes humains ont des optima entre 30°C et 40°C, et la plupart d'entre eux se développent mieux près de la température du corps humain (37°C). Les microbes thermoduriques, qui peuvent survivre à une courte exposition à des températures élevées mais qui sont normalement mésophiles, sont des contaminants courants des aliments chauffés ou pasteurisés. Les exemples incluent les kystes résistants à la chaleur tels que *Giardia* ou les spores tels que *Bacillus* et *Clostridium*.

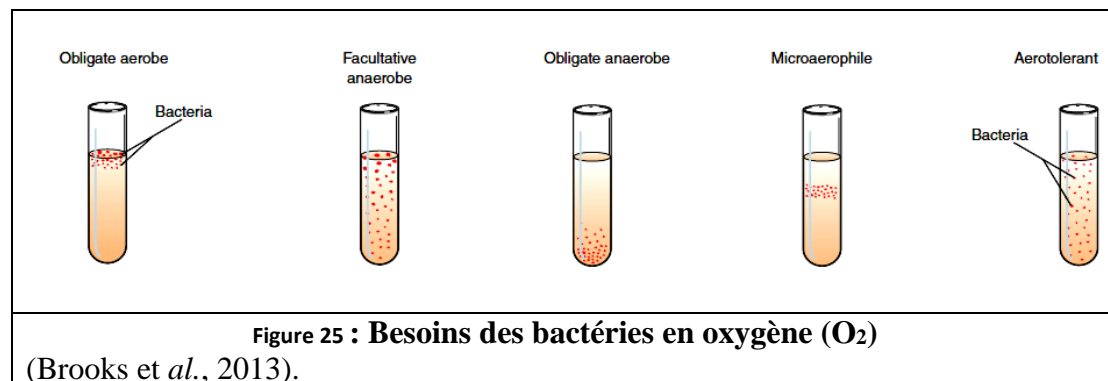
\* **Les thermophiles** (thur'-moh-fyl), ou organismes qui aiment la chaleur, se développent de manière optimale à des températures supérieures à 45°C. Ces organismes thermophiles vivent dans le sol et l'eau associés à l'activité volcanique, dans les tas de compost et dans les habitats directement exposés au soleil. Les thermophiles varient dans leurs besoins en chaleur, avec une plage générale de croissance de 45°C à 80°C. La plupart des formes eucaryotes ne peuvent pas survivre au-dessus de 60°C, mais quelques bactéries thermophiles, appelées thermophiles extrêmes, se développent entre 80°C et 121°C (actuellement considérée comme la limite de température établie par les enzymes et les structures cellulaires). Les thermophiles stricts sont si tolérants à la chaleur que les chercheurs peuvent utiliser un autoclave pour les isoler en culture. Actuellement, les entreprises de biotechnologie s'intéressent vivement aux micro-organismes thermiques.

La température est importante non seulement pour fournir des conditions propices à la croissance microbienne, mais aussi pour empêcher une telle croissance. La réfrigération des aliments, généralement à 4°C, réduit la croissance des psychrophiles et empêche la croissance de la plupart des autres bactéries. Cependant, la nourriture et d'autres matériaux, tels que le sang, peuvent favoriser la croissance de certaines bactéries même lorsqu'ils sont réfrigérés. Pour cette raison, les matières périssables qui peuvent résister au gel sont stockées à des températures de -30°C si elles doivent être conservées pendant de longues périodes. Des températures élevées peuvent également être utilisées pour empêcher la croissance bactérienne. L'équipement et les milieux de laboratoire sont généralement stérilisés à la chaleur, et les aliments sont fréquemment conservés en les chauffant et en les stockant dans des récipients fermés. Les bactéries sont plus aptes à survivre aux froids extrêmes qu'aux chaleurs extrêmes ; les enzymes ne sont pas dénaturées par le froid mais peuvent être dénaturées de manière permanente par la chaleur.

### 3. Besoins en gaz

Les gaz atmosphériques qui influencent le plus la croissance bactérienne sont l'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub>. Parmi ceux-ci, l'oxygène gazeux a le plus grand impact sur la croissance bactérienne. Non seulement c'est un gaz respiratoire important, mais c'est aussi un puissant agent oxydant qui existe sous de nombreuses formes toxiques.

- **Premièrement, l'Oxygène** : Sur la base de leurs besoins en O<sub>2</sub>, les bactéries peuvent être séparées en aérobies et anaérobies.



**1/ Bactéries aérobies (air'-ohb)** : Elles ont besoin d'oxygène pour se développer et peuvent être :

*i. Aérobie obligatoires* : Dans un tube de culture contenant un bouillon nutritif, les aérobies obligatoires se développent près de la surface, où l'oxygène atmosphérique se diffuse dans le milieu (figure 25) ; ils ont un besoin absolu ou obligatoire en oxygène (O<sub>2</sub>), comme le vibron cholérique. Les cultures de cellules à division rapide nécessitent plus d'oxygène que les cultures de cellules à division lente.

**ii. Anaérobies facultatifs** : Ils exercent habituellement un métabolisme aérobie en présence d'oxygène, mais ils passent au métabolisme anaérobie en l'absence d'oxygène. par ex. *Staphylococcus spp.*; *Escherichia coli* sont des anaérobies facultatifs ; on les trouve souvent dans les voies intestinales et urinaires, où seule une petite quantité d'oxygène est disponible. La plupart des bactéries d'importance médicale sont des anaérobies facultatifs.

**iii. Anaérobies aérotolérants** : Ils peuvent survivre en présence d'oxygène mais ne l'utilisent pas dans leur métabolisme. *Lactobacillus*, par exemple, capte toujours l'énergie par fermentation, que l'environnement contienne ou non de l'oxygène.

**iv. Microaérophiles** (myk''-roh-air'-oh-fyl) : Ils se développent mieux à faible quantité d'oxygène (~ 5 %). Ils se développent sous la surface du milieu dans un tube de culture au niveau où la disponibilité en oxygène correspond à leurs besoins, par ex. *Campylobacter spp.*, *Helicobacter spp.* Les microaérophiles tels que *Campylobacter*, qui peuvent provoquer des troubles intestinaux, sont également des capnophiles ou des organismes qui aiment le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Ils prospèrent dans des conditions de faible teneur en oxygène et de forte concentration de dioxyde de carbone.

**2/ Bactéries anaérobies** : Elles se développent en l'absence d'oxygène.

**Anaérobies obligatoires** : Ils se développent près du fond du tube de culture contenant un bouillon nutritif, où peu ou pas d'oxygène libre les atteint ; ils peuvent même mourir s'ils sont exposés à l'oxygène, par ex. *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Bacteroides fragilis*. Les anaérobies obligatoires vivent dans des habitats très réduits, tels que les boues profondes, les lacs, les océans et le sol.

**Anaérobies facultatifs** : Comparés à d'autres groupes d'organismes définis en fonction des besoins en oxygène, les anaérobies facultatifs possèdent les systèmes enzymatiques les plus complexes. Ils ont un ensemble d'enzymes qui leur permet d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons et un autre ensemble qui leur permet d'utiliser un autre accepteur d'électrons lorsque l'oxygène n'est pas disponible.

Les anaérobies obligatoires ne sont pas tués par l'oxygène gazeux mais par une forme d'oxygène hautement réactive et toxique appelée superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Le superoxyde est formé par certaines enzymes oxydantes et est converti en oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) et en peroxyde d'hydrogène toxique (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par une enzyme appelée **superoxyde dismutase**. Le peroxyde d'hydrogène est converti en eau et en oxygène moléculaire par l'enzyme **catalase**. Les aérobie obligatoires et la plupart des anaérobies facultatifs possèdent les deux enzymes. Certains anaérobies facultatifs et aérotolérants ont de la superoxyde dismutase mais manquent de catalase. La plupart des anaérobies obligatoires manquent à la fois d'enzymes et succombent aux effets toxiques du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène.

**Enzymes présentes dans les cellules pour la désintoxication de l'O<sub>2</sub>****Superoxyde dismutase :**  $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$  (peroxyde d'hydrogène)**Catalase:**  $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ **- Deuxièmement, le Dioxyde de carbone :**

Toutes les bactéries ont besoin d'une petite quantité de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) pour leur croissance. Ainsi, ce besoin est généralement satisfait par le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère, ou produit de manière endogène par le métabolisme cellulaire. Certains organismes tels que *Brucella abortus*, nécessitent des niveaux beaucoup plus élevés de dioxyde de carbone (5-10%) pour leur croissance, en particulier sur un isolement frais (capnophile). Les pneumocoques et les gonocoques sont d'autres capnophiles qui se développent mieux dans l'air additionné de 5 à 10 % de CO<sub>2</sub>.

**4. L'humidité (l'activité de l'eau)**

L'eau est essentielle à la croissance de toutes les formes de vie connues. Les bactéries Gram-négatives sont particulièrement adaptées à une existence dans les environnements les plus dilués et sont capables d'en extraire des traces de nutriments. Cette adaptation a ses limites car l'enveloppe cellulaire Gram-négative ne peut pas supporter les pressions osmotiques internes élevées associées à une réhydratation rapide après dessiccation et les organismes sont incapables de se développer en présence de fortes concentrations de soluté. La disponibilité de l'eau se reflète dans l'activité de l'eau d'un matériau ou d'un liquide.

La quantité d'eau disponible pour la croissance microbienne est décrite comme l'activité de l'eau (Aw). L'eau pure a une activité de l'eau de 1,0 et un matériau complètement sec ne contenant pas d'eau du tout a une activité de l'eau de 0. L'activité de l'eau n'est pas la même que la teneur en eau. Par exemple, la viande fraîche a une teneur en eau de 75 % mais une activité de l'eau de 0,98. En effet, la majeure partie des solides (protéines et graisses) présents dans la viande ne sont pas solubles. Les solides de viande ne lient pas l'eau et il y a donc beaucoup de place pour que la croissance microbienne se produise.

Les anciennes méthodes de conservation des aliments par séchage, salage ou ajout de sucre fonctionnent parce que l'eau est rendue indisponible pour la croissance des micro-organismes. Chaque espèce microbienne a une gamme d'activité de l'eau pour la croissance. Tout comme avec une température optimale, il existe une activité de l'eau optimale pour la croissance. Généralement, les bactéries Gram-négatives ne peuvent pas se développer si l'Aw est inférieure à 0,97, tandis que les bactéries Gram-positives peuvent se développer dans des matériaux avec une Aw de 0,8 à 0,98 et peuvent

survivre à la réhydratation après des périodes de dessiccation, d'où leur dominante dans le sol.

### 5. Pression hydrostatique

L'eau des océans et des lacs exerce une pression hydrostatique, pression exercée par l'eau stagnante, proportionnelle à sa profondeur. Cette pression double à chaque augmentation de profondeur de 10 m. Par exemple, dans un lac de 50 m de profondeur, la pression est de 32 fois la pression atmosphérique. Certaines vallées océaniques ont des profondeurs supérieures à 7 000 m, et certaines bactéries sont les seuls organismes connus pour survivre à la pression extrême à de telles profondeurs. Les bactéries qui vivent à des pressions élevées, mais meurent si elles ne sont laissées au laboratoire que quelques heures à la pression atmosphérique standard, sont appelées **barophiles**. Il semble que leurs membranes et enzymes ne tolèrent pas la pression simple mais nécessitent une pression pour fonctionner correctement. La haute pression est nécessaire pour maintenir leurs molécules enzymatiques dans la configuration tridimensionnelle appropriée. Sans elle, les enzymes perdent leur forme et se dénaturent, et les organismes meurent.

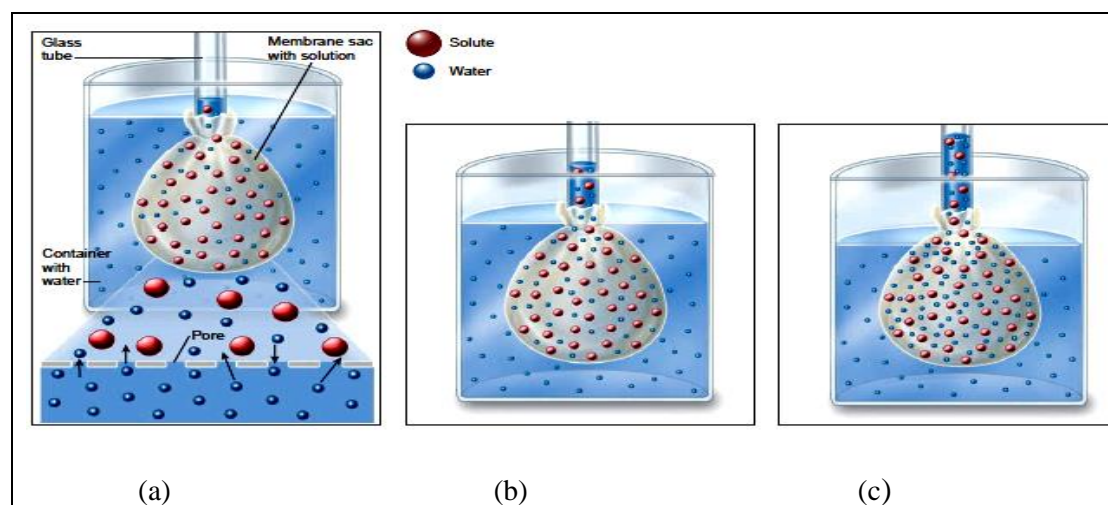
### 6. Pression osmotique

Les membranes des micro-organismes sont sélectivement perméables. La membrane cellulaire permet à l'eau de se déplacer par osmose entre le cytoplasme et l'environnement (figure 26). Les environnements qui contiennent des substances dissoutes exercent une pression osmotique, et la pression peut dépasser celle exercée par les substances dissoutes dans les cellules. Les cellules dans de tels environnements hyperosmotiques perdent de l'eau et subissent une plasmolyse (plas-mol'e-sis) ou un rétrécissement de la cellule. Dans les micro-organismes à paroi cellulaire, la membrane cellulaire ou plasmique se sépare de la paroi cellulaire. À l'inverse, les cellules dans l'eau distillée ont une pression osmotique plus élevée que leur environnement et, par conséquent, gagnent de l'eau. Chez les bactéries, la paroi cellulaire rigide empêche les cellules de gonfler et d'éclater, mais les cellules se remplissent d'eau et deviennent turgescentes (distendues).

La plupart des cellules bactériennes peuvent tolérer une gamme assez large de concentrations de substances dissoutes. Leurs membranes cellulaires contiennent des systèmes de transport qui régulent le mouvement des substances dissoutes à travers la membrane. Pourtant, si les concentrations à l'extérieur des cellules deviennent trop élevées, la perte d'eau peut inhiber la croissance ou même tuer les cellules.

L'utilisation du sel comme conservateur dans la salaison des viandes et dans la fabrication des cornichons est basée sur le fait que des concentrations élevées de substances dissoutes exercent une pression osmotique suffisante pour tuer ou inhiber la

croissance microbienne. L'utilisation du sucre comme conservateur dans la confection de gelées et de confitures repose sur le même principe.



**Figure 26 : Système modèle pour démontrer l'osmose**

Ici, nous avons une solution enfermée dans une membrane en forme de sac et attachée à un tube creux. La membrane est perméable à l'eau (solvant) mais pas au soluté. Le sac est immergé dans un récipient d'eau pure et observé au fil du temps.

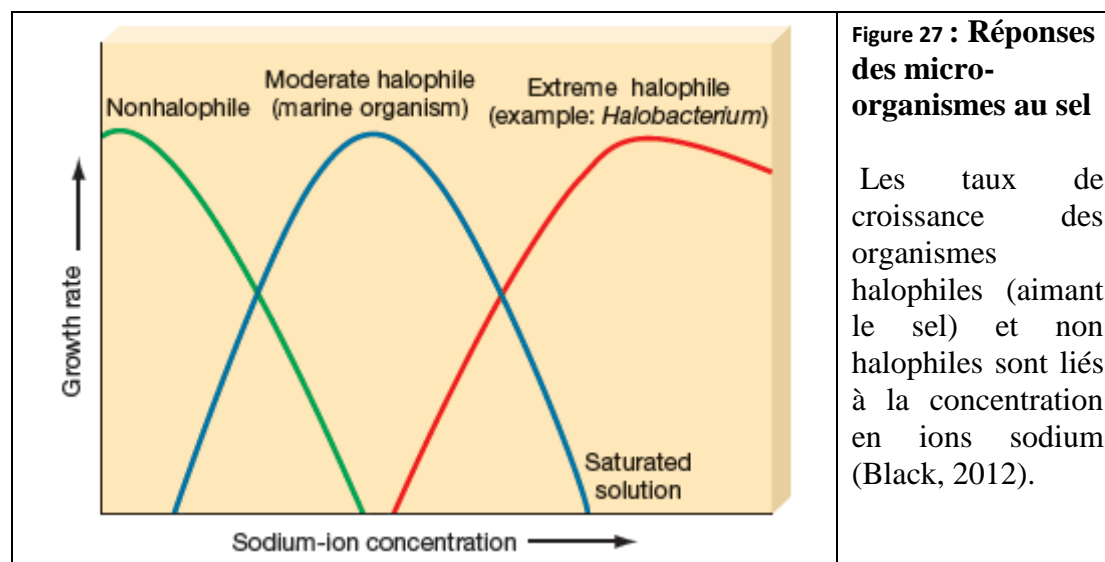
(a) L'encart montre un gros plan du processus osmotique. Le gradient va du récipient extérieur (concentration plus élevée de  $H_2O$ ) au sac (concentration plus faible de  $H_2O$ ). Une partie de l'eau diffusera dans la direction opposée mais le gradient net favorise l'osmose dans le sac.

(b) Au fur et à mesure que l' $H_2O$  se diffuse dans le sac, le volume augmente et force l'excès de solution dans le tube, qui montera continuellement.

(c) Même lorsque la solution se dilue, il y aura toujours une osmose dans le sac. L'équilibre ne se produira pas car les solutions ne peuvent jamais devenir égales (Cowan Kelly, 2012).

Bien que la plupart des microbes existent dans des conditions hypotoniques ou isotoniques, quelques-uns, appelés osmophiles, vivent dans des habitats à forte concentration de soluté. Les bactéries appelées **halophiles** (hal'o-filz), ou organismes qui aiment le sel, ont besoin de quantités modérées à importantes de sel (chlorure de sodium). Leurs systèmes de transport membranaire transportent activement les ions sodium hors des cellules et concentrent les ions potassium à l'intérieur de celles-ci. Deux explications possibles de la raison pour laquelle les halophiles ont besoin de sodium ont été proposées. La première est que les cellules ont besoin de sodium pour maintenir une concentration élevée de potassium intracellulaire afin que leurs enzymes fonctionnent. L'autre est qu'elles ont besoin de sodium pour maintenir l'intégrité de leurs parois cellulaires.

Les halophiles se trouvent généralement dans l'océan, où la concentration en sel (3,5 %) est optimale pour leur croissance. Les halophiles extrêmes nécessitent des concentrations de sel de 20 % à 30 % (figure 27). On les trouve dans des plans d'eau exceptionnellement salés, comme la mer Morte, et parfois même dans des cuves de saumure, où ils provoquent la détérioration des cornichons qui y sont fabriqués.



Les halophiles facultatifs sont remarquablement résistants au sel, même s'ils ne résident normalement pas dans des environnements à forte teneur en sel. Par exemple, *Staphylococcus aureus* peut se développer sur des milieux NaCl allant de 0,1 % à 20 %. Bien qu'il soit courant d'utiliser de fortes concentrations de sel et de sucre pour conserver les aliments (gelées, sirops et saumures), de nombreuses bactéries et champignons se développent dans ces conditions et sont des agents de détérioration courants.

**7. Radiations :** L'énergie de radiation, comme les rayons gamma et la lumière ultraviolette, peut provoquer des mutations (modifications de l'ADN) et même tuer des organismes. Cependant, certains micro-organismes ont des pigments qui filtrent les radiations et aident à prévenir les dommages à l'ADN. D'autres ont des systèmes enzymatiques capables de réparer certains types de dommages à l'ADN.

La bactérie *Deinococcus radiodurans* peut survivre à 10 000 Grays (Gy) de rayonnement. Le Gy est une unité de mesure de la dose de rayonnement absorbée. 5 Gy tueront un être humain et 1 000 Gy stériliseront une culture d'*E. coli*. Les bactéries qui peuvent résister à des niveaux élevés de rayonnement peuvent être utiles pour nettoyer les sites contaminés.

## 2. Croissance bactérienne

La croissance peut être définie comme l'augmentation ordonnée de tous les constituants chimiques de la cellule. La croissance bactérienne implique à la fois une augmentation de la taille des individus et une augmentation du nombre d'individus. En fait les cellules bactériennes se développent, mais dès qu'une cellule, appelée cellule mère, a approximativement doublé de taille et dupliqué son contenu, elle se divise en deux cellules filles. Ensuite, les cellules filles se développent, puis se divisent également. Étant donné que les cellules individuelles ne grossissent que pour se diviser en deux nouveaux individus, la croissance bactérienne n'est pas définie en termes de

taille cellulaire mais comme l'augmentation du nombre de cellules (une augmentation de la masse totale : biomasse), qui se produit par division cellulaire.

### A. Division bactérienne

La majorité des cellules bactériennes se multiplient en nombre par un processus de fission binaire. Autrement dit, chaque individu augmentera de taille jusqu'à ce qu'il soit suffisamment grand pour se diviser en deux cellules filles identiques (figure 28). Au point de séparation, chaque cellule fille doit être capable de croître et de se reproduire. Alors que chaque cellule fille contiendra automatiquement les matériaux qui sont dispersés dans la cellule mère (ARNm, ARNr, ribosomes, enzymes, etc.), chacune doit également porter au moins une copie du chromosome. La division nucléaire précède la division cellulaire et, par conséquent, dans une population croissante, de nombreuses cellules portant deux corps nucléaires peuvent être vues. En fait, le chromosome bactérien est circulaire et attaché à la membrane cytoplasmique où il est capable de se dérouler lors de la réplication de l'ADN. Le processus de réplication de l'ADN se déroule à une vitesse fixe en fonction de la température. Par conséquent, le temps nécessaire pour copier un chromosome entier dépend du nombre de paires de bases qu'il contient et de la température de croissance. Pour *Escherichia coli* poussant à 37°C, la réplication du chromosome prendra environ 45 minutes. Par contre, les cellules sont capables de se répliquer plus rapidement qu'une fois par heure en lançant plusieurs cycles de réplication de l'ADN à la fois. Ainsi, les chromosomes partiellement répliqués sont séparés dans les cellules filles nouvellement formées. De cette façon, il est possible pour certains organismes qui poussent dans leurs conditions optimales de se diviser toutes les 15 à 20 minutes.

La division cellulaire se produit de différentes manières pour les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Les cellules Gram-négatives n'ont pas de paroi cellulaire rigide et se divisent par un processus de constriction ou de pincement suivi d'une fusion membranaire. Les cellules Gram-positives, d'autre part, ayant une paroi cellulaire rigide, doivent développer un septum transversal qui divise la cellule en deux moitiés égales. Les organismes en forme de bâtonnet maintiennent leur diamètre pendant le cycle cellulaire et augmentent leur masse et leur volume par un processus d'allongement. Lorsque la longueur de la cellule a approximativement doublé, la division/constriction se produit au centre. Les formes cocciques augmentent de taille par expansion radiale avec le plan de division allant vers le centre géométrique. Dans certains genres, les plans de division successifs sont toujours parallèles. Dans de telles circonstances, les cellules semblent former des chaînes (c'est-à-dire des streptocoques). Chez les staphylocoques, les plans de division successifs sont randomisés, donnant aux grappes de cellules en division l'apparence d'une grappe de raisin. Certains genres, par exemple *Sarcina*, faites pivoter les plans de division successifs de 90° pour former des tétrades et des octets cubiques. L'apparition de cellules en division au microscope peut donc être un guide initial utile pour l'identification.

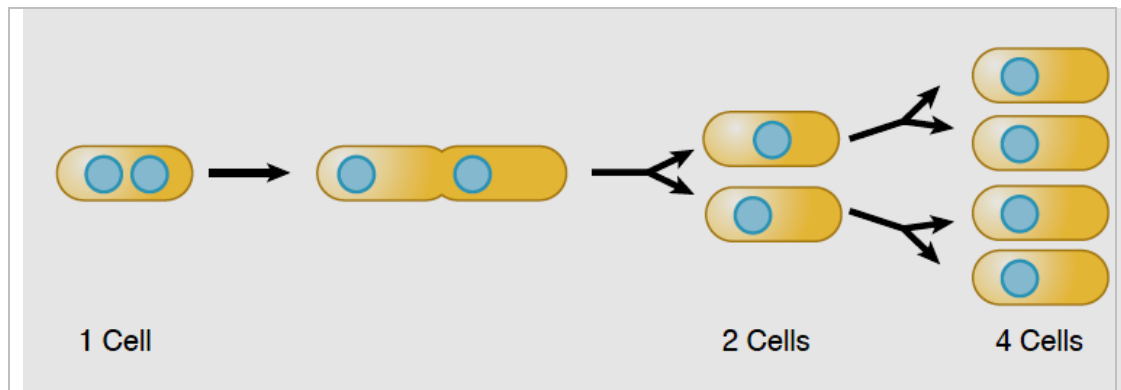


Figure 28 : Croissance exponentielle par fission binaire (Tiffany Alley et al., 2016).

### B. Temps de génération ou temps de dédoublement

La taille d'une population de bactéries dans un milieu de croissance favorable augmente de façon exponentielle. L'intervalle de temps entre deux divisions cellulaires, ou le temps nécessaire à une bactérie pour donner naissance à deux cellules filles dans des conditions optimales, est appelé temps de génération ou temps de doublement.

**Exemples :** dans les bacilles coliformes et de nombreuses autres bactéries importantes sur le plan médical, il s'agit d'environ 20 minutes ; dans le cas des bacilles tuberculeux, d'environ 20 heures et dans le cas des bacilles de la lèpre, d'environ 20 jours. Il est souvent difficile de saisir pleinement l'ampleur de la croissance microbienne exponentielle.

Comme les bactéries se reproduisent si rapidement et par progression géométrique, une seule cellule bactérienne peut théoriquement donner naissance à  $10^{21}$  descendants en 24 heures, avec une masse d'environ 4 000 tonnes. Dans la pratique actuelle, la croissance exponentielle ne peut pas être maintenue indéfiniment dans un système fermé (culture discontinue) avec des nutriments disponibles limités.

**Colonies :** les bactéries qui se développent sur des milieux solides forment des colonies. Chaque colonie représente un clone de cellules dérivé d'une cellule mère unique. Contrairement à la croissance en bouillon, on en sait beaucoup moins sur l'état des bactéries dans une colonie macroscopique mature sur une plaque de gélose. Il est probable que toutes les phases de croissance soient représentées dans les colonies, selon l'emplacement d'une cellule particulière et l'âge de la culture. En milieu liquide, la croissance est diffuse.

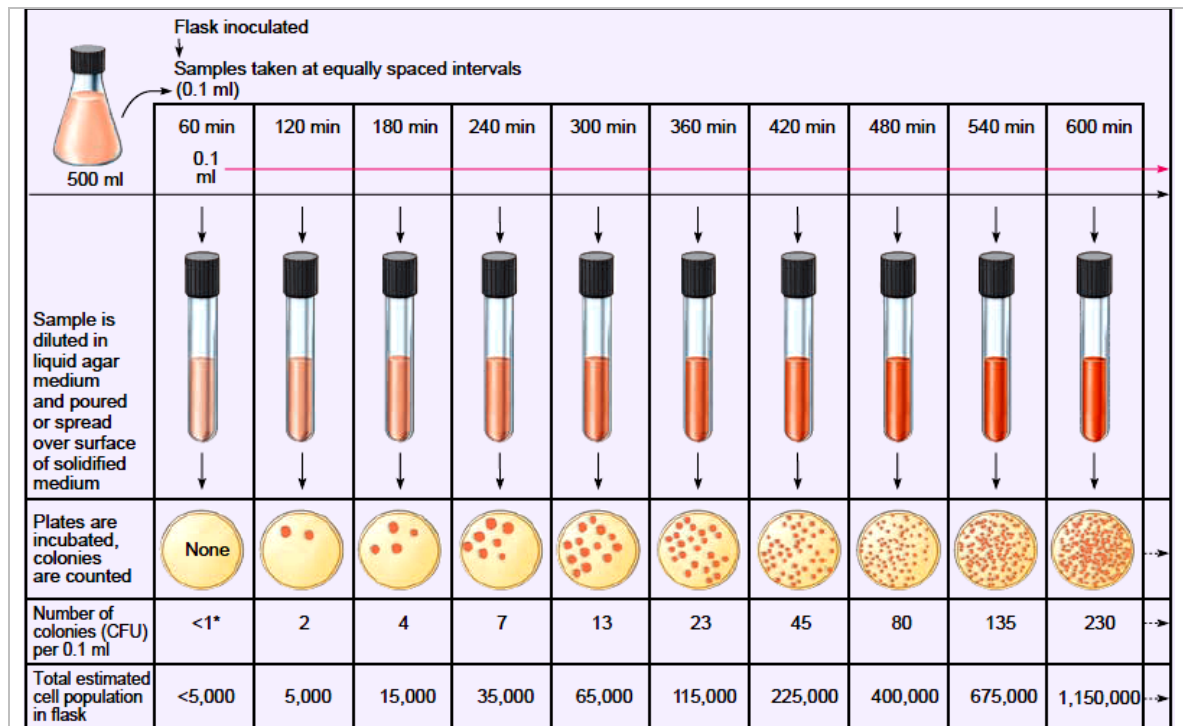
### C. La courbe de croissance

En réalité, une population de bactéries ne maintient pas son taux de croissance potentiel et ne double pas indéfiniment, car dans la plupart des systèmes, de nombreux facteurs empêchent les cellules de se diviser continuellement à leur vitesse maximale. Des études en laboratoire indiquent qu'une population affiche généralement un schéma

prévisible, ou une courbe de croissance, au fil du temps. La méthode traditionnellement utilisée pour observer le schéma de croissance de la population est une technique de comptage viable, dans laquelle le nombre total de cellules vivantes est compté sur une période de temps donnée. En bref, cette méthode consiste à :

1. placer un petit nombre de cellules dans un milieu liquide stérile ;
2. incuber cette culture pendant plusieurs heures ;
3. échantillonner le bouillon à intervalles réguliers (toutes les heures pendant 24 heures) pendant l'incubation ;
4. étaler chaque échantillon sur un milieu solide ; et
5. compter le nombre de colonies présentes après incubation.

La figure 29 résume les étapes d'une numération sur plaque viable - méthode de culture en Batch (discontinue)

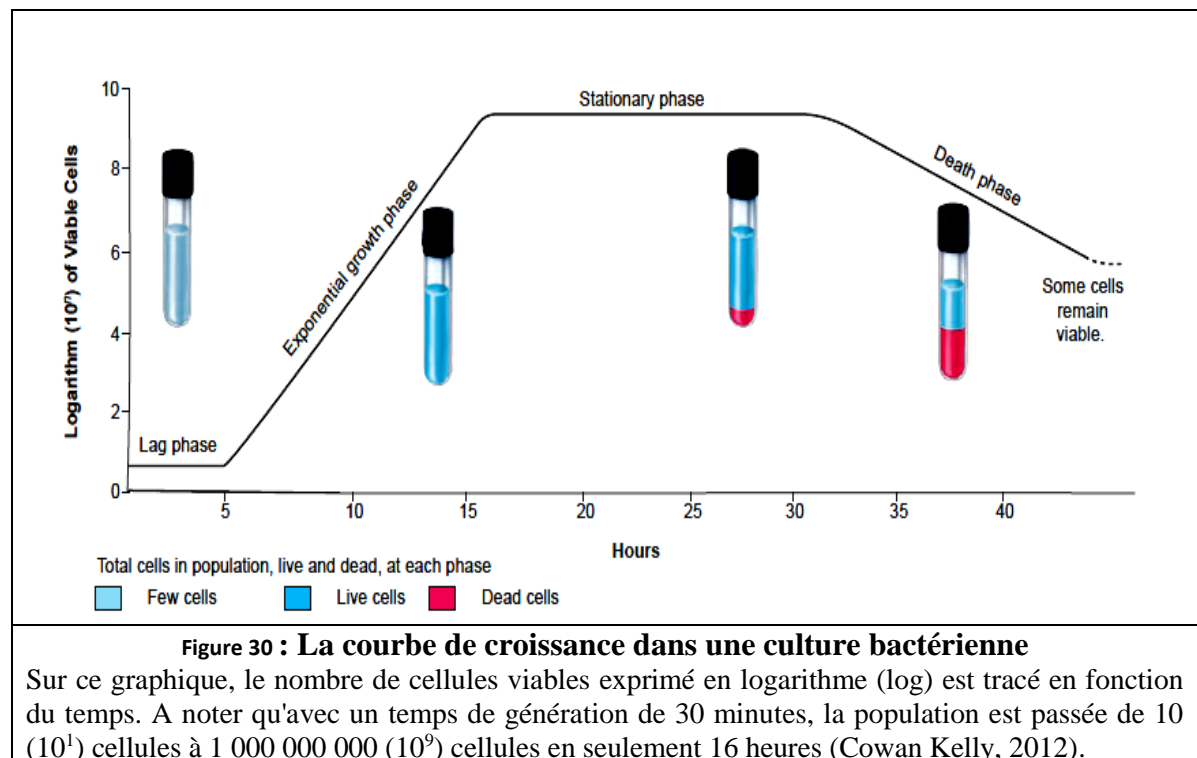


\* Signifie que seulement trop peu de cellules sont présentes pour être dosées.

**Figure 29 : Les étapes d'une numération sur plaque viable - méthode de culture en Batch (discontinue)**

(Cowan Kelly, 2012).

La courbe de croissance est déterminée en traçant le graphique du nombre de chaque échantillon en séquence pendant toute la période d'incubation (figure 30).



- **Étapes de la courbe de croissance normale**

Le système de culture en batch (ce type de culture est appelé culture discontinue) est fermé, ce qui signifie que les nutriments et l'espace sont finis et qu'il n'y a pas de mécanisme pour l'élimination des déchets. Les données d'une période de croissance complète de 3 à 4 jours produisent généralement une courbe de croissance bactérienne (figure 30). Le nombre de bactéries vivantes est mesuré en fonction du temps et est reporté sur une courbe  $\log_{10}$ , appelée courbe semi-logarithmique. Une échelle logarithmique est utilisée pour schématiser la croissance bactérienne en raison du nombre élevé de bactéries et pour montrer la nature exponentielle de la croissance. La courbe de croissance bactérienne révèle quatre phases de croissance :

**a. Phase de la latence**

Dans la phase de latence, les organismes n'augmentent pas de manière significative en nombre, mais ils sont métaboliquement actifs - grossissant, synthétisant des enzymes et incorporant diverses molécules du milieu. Au cours de cette phase, les organismes individuels augmentent de taille et produisent de grandes quantités d'énergie sous forme d'ATP.

La durée de la phase de latence est déterminée en partie par les caractéristiques de l'espèce bactérienne et en partie par les conditions dans le milieu - à la fois le milieu à partir duquel les organismes sont prélevés et celui dans lequel ils sont transférés. Certaines espèces s'adaptent au nouveau milieu en une heure ou deux ; d'autres prennent plusieurs jours. Les organismes issus de cultures anciennes, adaptés à des nutriments

limités et à de grandes accumulations de déchets, mettent plus de temps à s'adapter à un nouveau milieu que ceux transférés d'un milieu relativement frais et riche en nutriments.

### **b. Phase de la croissance exponentielle (logarithmique ou log)**

Après la phase de latence, les cellules commencent à se diviser et leur nombre augmente de façon exponentielle ou par progression géométrique avec le temps. Si le logarithme du compte viable est tracé en fonction du temps, une ligne droite sera obtenue. La population est la plus uniforme en termes de propriétés chimiques et physiologiques au cours de cette phase. Par conséquent, les cultures en phase exponentielle sont généralement utilisées dans les études biochimiques et physiologiques.

La phase exponentielle est de durée limitée en raison (i) de l'épuisement des nutriments ; (ii) accumulation de déchets métaboliques finaux toxiques ; (iii) augmentation de la densité cellulaire, (iv) modification du pH ; et (v) diminution de la tension en oxygène (dans le cas d'organismes aérobies).

La phase logarithmique est le moment où les cellules sont métaboliquement les plus actives et est préférée à des fins industrielles. Cependant, au cours de leur phase de croissance logarithmique, les micro-organismes sont particulièrement sensibles aux conditions défavorables. Radiation et de nombreux médicaments antimicrobiens, par ex. l'antibiotique pénicilline - exercent leur effet en interférant avec une étape importante du processus de croissance et sont, par conséquent, les plus nocifs pour les cellules au cours de cette phase.

### **c. Phase stationnaire**

Après une période variable de croissance exponentielle, la division cellulaire s'arrête en raison de l'épuisement des nutriments et de l'accumulation de produits toxiques. Finalement, la croissance ralentit et le nombre total de cellules bactériennes atteint un maximum et se stabilise. Le nombre de cellules descendantes formées est juste suffisant pour remplacer le nombre de vieilles cellules qui meurent. La courbe de croissance devient horizontale. Le compte viable reste stationnaire car un équilibre existe entre les cellules mourantes et les cellules nouvellement formées.

### **d. Phase de déclin**

Après une période de temps en phase stationnaire, qui varie selon l'organisme et les conditions de culture, le taux de mortalité augmente jusqu'à atteindre un niveau stable. En fait, la mort bactérienne est l'inverse de la croissance de cellules bactériennes et est exponentielle. C'est-à-dire qu'une proportion fixe de la population mourra dans un temps donné (le temps est spécifique à l'organisme), quelle que soit la taille de la population. Dans la plupart des cas, le taux de mort cellulaire est beaucoup plus lent

que celui de la croissance exponentielle. Souvent, après la mort de la majorité des cellules, le taux de mortalité diminue considérablement, de sorte qu'un petit nombre de survivants peuvent persister pendant des mois, voire des années. Cette persistance peut dans certains cas refléter le renouvellement cellulaire, quelques cellules se développant aux dépens des nutriments libérés par les cellules qui meurent et se lysent.

On pense qu'un phénomène, dans lequel les cellules sont appelées viables mais non cultivables (VBNC), est le résultat d'une réponse génétique déclenchée dans des cellules en phase stationnaire affamées. Ces cellules peuvent devenir dormantes sans changement de morphologie. Lorsque les conditions appropriées sont disponibles (par exemple, passage à travers un animal), les microbes VNBC reprennent leur croissance.

Au cours de la phase de déclin, certaines bactéries subissent une involution, c'est-à-dire qu'elles prennent une variété de formes inhabituelles, ce qui les rend difficiles à identifier. Dans les cultures d'organismes sporulés, plus de spores que de cellules végétatives (métaboliquement actives) survivent.

En laboratoire, les bactéries sont généralement cultivées dans un bouillon contenu dans un tube ou un flacon, ou sur une plaque de gélose. Ceux-ci sont considérés comme des systèmes discontinus (en Batch) ou fermés.

- **Importance pratique de la courbe de croissance**

La tendance des populations à présenter des phases de croissance rapide, de croissance lente et de mort a des implications importantes dans le contrôle microbien, l'infection, la microbiologie alimentaire et la technologie de culture. Les agents antimicrobiens tels que la chaleur et les désinfectants accélèrent rapidement la phase de mort dans toutes les populations, mais les microbes en phase de croissance exponentielle sont plus vulnérables à ces agents que ceux qui sont entrés dans la phase stationnaire. En général, les cellules en croissance active sont plus vulnérables aux conditions qui perturbent le métabolisme cellulaire et la fission binaire.

Les schémas de croissance des micro-organismes peuvent expliquer les stades de l'infection. Un hôte excréteur des bactéries aux stades précoce et intermédiaire d'une infection est plus susceptible de la transmettre à d'autres qu'un hôte aux stades avancés. L'évolution d'une infection est également influencée par le taux de multiplication relativement plus rapide du microbe, qui peut dépasser le taux de croissance plus lent des défenses cellulaires de l'hôte.

Comprendre les étapes de la croissance cellulaire est crucial pour travailler avec des cultures. Parfois, une culture qui a atteint la phase stationnaire est incubée sous l'impression erronée que suffisamment de nutriments sont présents pour que la culture se multiplie. Dans la plupart des cas, il est déconseillé de continuer à incubé une culture au-delà de la phase stationnaire, car cela réduirait le nombre de cellules viables et la

culture pourrait disparaître complètement. Il est également préférable d'utiliser de jeunes cultures pour faire des colorations (une exception est la coloration des spores) et des tests de motilité, car les cellules montreront leur taille naturelle et leur réaction correcte et les cellules mobiles auront des flagelles fonctionnels.

Pour certaines applications de recherche ou industrielles, la culture discontinue fermée avec ses quatre phases est inefficace. L'alternative est une chambre de croissance automatique appelée chémostat, ou système de culture continue (figure 31). Cet appareil peut admettre un flux constant de nouveaux nutriments et éliminer les milieux utilisés et les anciennes cellules bactériennes, stabilisant ainsi le taux de croissance et le nombre de cellules. Le chémostat est très similaire aux fermenteurs industriels utilisés pour produire des vitamines et des antibiotiques. Il a l'avantage de maintenir la culture dans un état biochimiquement actif et de l'empêcher d'entrer dans la phase de mort.



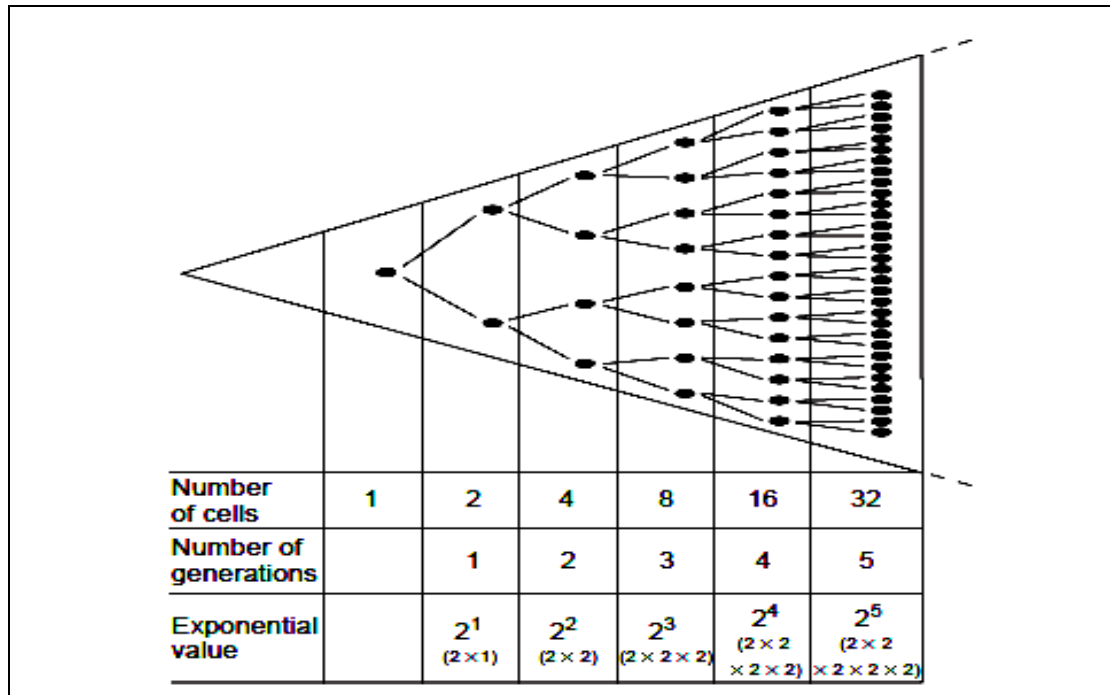
**Figure 31 : Le BIOSTAT® est un système de fermenteur bioréacteur compact et autoclavable également connu sous le nom de chemostat**

Les données sont transférées sur un ordinateur portable standard. Le renouvellement constant des nutriments dans une culture permet de faire croître des organismes en continu dans la phase logarithmique (Black, 2012).

- **Mathématiques de la croissance**

Le temps nécessaire pour un cycle de fission complet - de la cellule mère à deux nouvelles cellules filles - est appelé le temps de génération ou de doublement. Chaque nouveau cycle de fission ou génération augmente la population d'un facteur 2, voire le double. Ainsi, le stade parent initial est constitué de 1 cellule, la première génération est constituée de 2 cellules, la seconde 4, la troisième 8, puis 16, 32, 64, etc. Tant que l'environnement reste favorable, cet effet de doublement peut se poursuivre à un rythme constant.

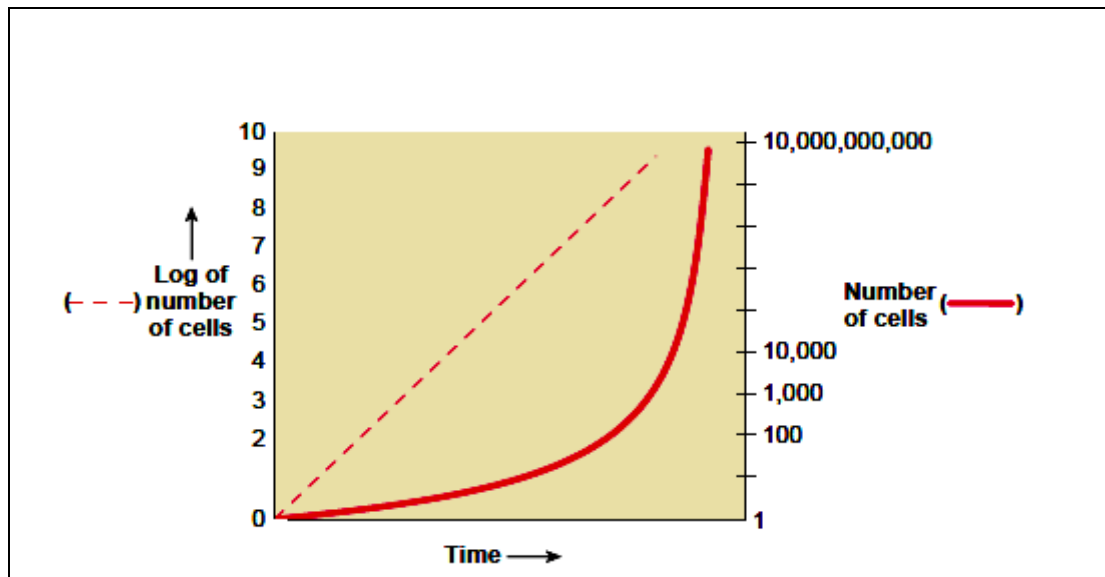
La figure 32 a montré plusieurs caractéristiques quantitatives de la croissance : La taille de la population cellulaire peut être représentée par le nombre 2 avec un exposant ( $2^1, 2^2, 2^3, 2^4$ ) ; l'exposant augmente de un à chaque génération ; et le nombre de l'exposant est aussi le nombre de la génération. Ce modèle de croissance est appelé exponentiel. Comme ces populations contiennent souvent un très grand nombre de cellules, il est utile de les exprimer au moyen d'exposants ou de logarithmes.



**Figure 32 : Les mathématiques de la croissance démographique**

En partant d'une seule cellule, si chaque produit de la reproduction se divise par fission binaire, la population double à chaque nouvelle division ou génération cellulaire. Ce processus peut être représenté par des logarithmes (2 élevé à un exposant) ou par de simples nombres (Cowan Kelly, 2012).

Les données d'une population bactérienne croissante sont représentées graphiquement en traçant le nombre de cellules en fonction du temps (figure 33).



**Figure 33 : Les mathématiques de la croissance démographique**

Le traçage du logarithme des cellules produit une ligne droite indiquant une croissance exponentielle, tandis que le traçage arithmétiquement des nombres de cellules donne une pente courbe. (Cowan Kelly, 2012).

Le numéro de cellule peut être représenté de manière logarithmique ou arithmétique. Le traçage du nombre de logarithmes dans le temps fournit une ligne droite indiquant une croissance exponentielle. Le traçage arithmétiquement des données donne une pente constamment incurvée. En général, les graphiques logarithmiques sont préférés car un nombre de cellules précis est plus facile à lire, en particulier pendant les premières phases de croissance.

La connaissance des vitesses de la croissance microbienne pendant la phase exponentielle est indispensable aux microbiologistes dans leur recherche fondamentale, physiologique et écologique, ou dans des problèmes appliqués en industrie.

Plusieurs mesures sont possibles dans une expérience de croissance en système fermé. Ces mesures comprennent le calcul de la vitesse de croissance moyenne et le calcul du temps de génération moyen :

Dans la phase **exponentielle**, la densité bactérienne en UFC/ml obéit à la loi suivante :

$$N_t = N_0 \times 2^n \quad (\text{pour des populations se reproduisant par scissiparité})$$

Considérons :

$N_0$  = la taille de l'inoculum (le nombre initial de cellules de la population)

$N_t$  = la taille de la population bactérienne au temps  $t$

$n$  = nombre de génération (division) dans le temps  $t$

- **Calcul de la vitesse de croissance moyenne**

On définit  $\mu$  comme étant la vitesse de croissance moyenne.

La valeur de  $n$ , le nombre de génération, peut être obtenue en prenant les logarithmes en base 10 des deux membres de l'équation

$$\text{Log } N_t = \text{log } N_0 + n \text{ log} 2, \text{ et}$$

$$n = \frac{\text{Log } N_t - \text{log } N_0}{\text{log} 2}$$

Donc

$$n = \frac{\text{Log } N_t - \text{log } N_0}{0,301}$$

La vitesse de croissance d'une culture en batch peut être exprimée en terme de constante de vitesse de croissance moyenne ( $\mu$ ), qui est le nombre de génération par unité de temps, souvent exprimé par heure.

$$\mu = \frac{n}{t}$$

$$\text{Donc } \mu = \frac{\text{Log } N_t - \text{log } N_0}{(0,301) t}$$

- *Calcul du temps de génération (de doublement moyen) moyen*

Le temps que prend une population pour doubler sa taille, c'est-à-dire le temps de génération moyen ou temps de doublement moyen ( $g$ ), peut maintenant être calculé. Si la population double ( $t=g$ ), alors

$$N_t = 2N_0$$

En substituant  $2N_0$ , dans l'équation de la vitesse de croissance moyenne, on peut déterminer  $\mu$ .

$$\mu = \frac{\text{log } (2N_0) - \text{log } N_0}{(0,301) g} \quad \text{Donc } \mu = \frac{\text{log } 2 + \text{log } N_0 - \text{log } N_0}{(0,301) g}$$

$$\mu = \frac{1}{g}$$

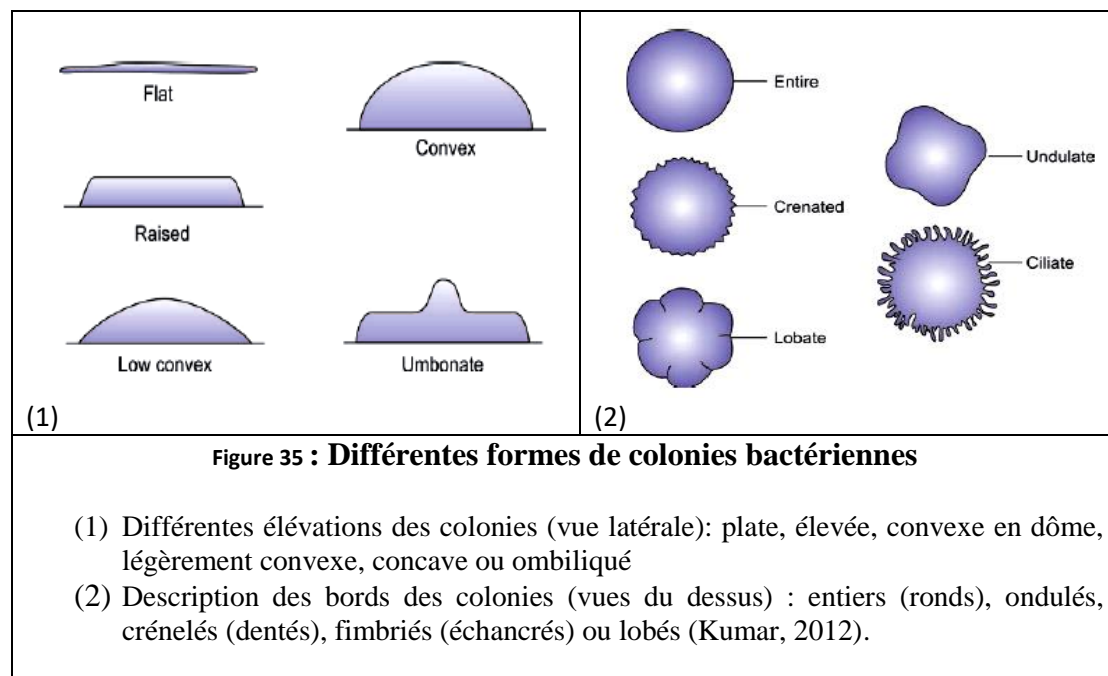
Le temps de génération moyen est l'inverse de la constante de vitesse de croissance moyenne.

$$g = \frac{1}{\mu}$$

Le temps moyen de génération peut être déterminé directement à partir du graphique semi-logarithmique des données de croissance (Figure 34) et de la constante de vitesse de croissance calculée à partir de la valeur  $g$ . Le temps de génération peut aussi être calculé directement à partir des équations précédentes. Par exemple, supposons qu'une population bactérienne augmente de  $10^3$  cellules à  $10^9$  cellules en 10 heures.



de Pétri) soit contenus dans une petite bouteille bouchée (oblique). Si des suspensions de différentes espèces de bactéries sont étalées sur la surface d'une plaque de gélose nutritive, chaque cellule individuelle produira une seule colonie visible. Ceux-ci peuvent être comptés pour obtenir une estimation du nombre initial de cellules. Différentes espèces produiront des colonies d'apparence légèrement différente, permettant de porter des jugements sur la diversité de la population. La couleur, la taille, la forme (figure 35) et la texture des colonies de différentes espèces de bactéries varient considérablement et constituent une aide diagnostique utile pour l'identification. La taille d'une colonie peut être limitée par l'épuisement local des substances nutritives (épuisement dû à la croissance de la colonie elle-même). C'est pour cette raison que des colonies très rapprochées sont généralement plus petites que des colonies bien espacées. Les bactéries qui produisent des pigments forment généralement des colonies brillamment colorées (rouge, jaune, violet, par exemple) tandis que les bactéries non-pigmentées ont habituellement un aspect gris, blanchâtre ou crème. La consistance d'une colonie peut être mucoïde (visqueuse, apparence de mucus), butyreuse (apparence de beurre), friable, etc. ; sa surface peut être lisse ou rugueuse, brillante ou mate, etc.



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

## 2/ Croissance dans les liquides

Lors de la croissance sur une surface solide, la taille de la colonie résultante est régie par la disponibilité locale des nutriments. Ceux-ci doivent diffuser à travers la colonie. Finalement, la croissance cesse lorsque le taux de consommation de nutriments

dépasse le taux d'apport. Lorsqu'elles sont cultivées dans des liquides, les bactéries peuvent se déplacer librement dans un milieu liquide, soit par diffusion, soit, pour les espèces mobiles, par locomotion active. Donc, les bactéries sont dispersées uniformément dans le liquide et les nutriments sont également disponibles pour toutes les cellules. Habituellement, lorsque la concentration en cellules augmente, le milieu devient de plus en plus trouble. Certaines bactéries font exception et tendent à former une couche (une pellicule) à la surface du milieu. Sous cette pellicule, le milieu peut être pratiquement dépourvu de cellules. Certaines pellicules renferment des produits bactériens, en plus des bactéries elles-mêmes ; les souches d'*Acetobacter xylinum*, par exemple, forment une pellicule cellulosique rigide.

Lors de l'examen de la croissance des populations bactériennes dans les liquides, il est nécessaire de déterminer si l'environnement est fermé ou ouvert par rapport à l'acquisition de nutriments frais. Les systèmes fermés sont caractérisés par la culture discontinue dans des flacons en verre fermés. Dans ces systèmes, les déchets (les produits du métabolisme) sont retenus et tous les nutriments disponibles sont présents au début de la croissance. Les systèmes ouverts, d'autre part, ont un approvisionnement continu en nutriments frais et l'élimination des déchets.

- **Culture continue**

Le problème posé par la « culture en batch » est que la croissance cellulaire s'arrête, provoquée par l'épuisement des nutriments ou par l'accumulation de produits toxiques. Pour maintenir les cellules dans un état de croissance continue, des nutriments doivent être continuellement ajoutés et les déchets éliminés. C'est ce qu'on appelle la culture continue ou le système ouvert. La culture continue ressemble davantage aux conditions rencontrées par les organismes dans le monde réel (par exemple, le corps des animaux), où les nutriments sont constamment remplacés. La culture continue utilise un chémostat (figure 36) dans lequel les cellules d'une culture en croissance sont continuellement récoltées et les nutriments sont continuellement réapprovisionnés. Le deuxième type de système de culture continue, le turbidostat possède une cellule photoélectrique qui mesure l'absorbance ou la turbidité de la culture (définie par la quantité de lumière diffractée) dans le récipient de croissance. Le débit du milieu à travers le récipient est automatiquement régulé pour maintenir une turbidité ou une densité cellulaire prédéterminée.

Le turbidostat diffère de chémostat sur plusieurs points. La vitesse de dilution dans un turbidostat varie au lieu de rester constante et tous les éléments nutritifs sont en excès dans le milieu de culture contrairement au milieu de culture du chémostat qui contient un élément nutritif limitant. Les turbidostats fonctionnent mieux à des vitesses de dilution élevées, alors que le chémostat est plus stable et plus efficace à des vitesses de dilution réduites.

- **Importance des méthodes de culture continue**

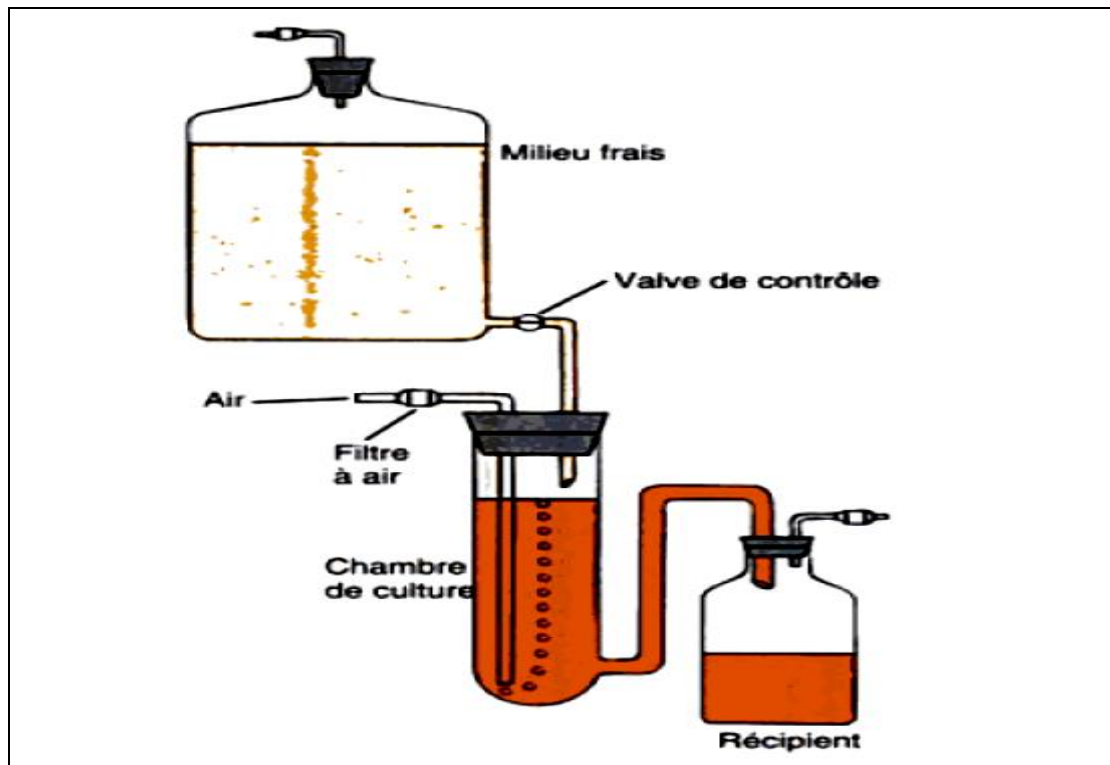
Les systèmes de cultures continues sont très utiles car :

- Ils produisent une quantité constante de cellules en phase exponentielle tout en se multipliant à une vitesse connue.

- Ils permettent l'étude de la croissance microbienne en présence de concentrations de nutriments faibles, ce qui est similaire aux conditions rencontrées en milieux naturels.

- Ils permettent l'étude d'interactions microbiennes sous des conditions similaires à celles rencontrées dans des milieux aquatiques.

- Très utilisés en microbiologie alimentaire et industrielle.



**Figure 36 : Schéma du système de culture continue : le chémostat**

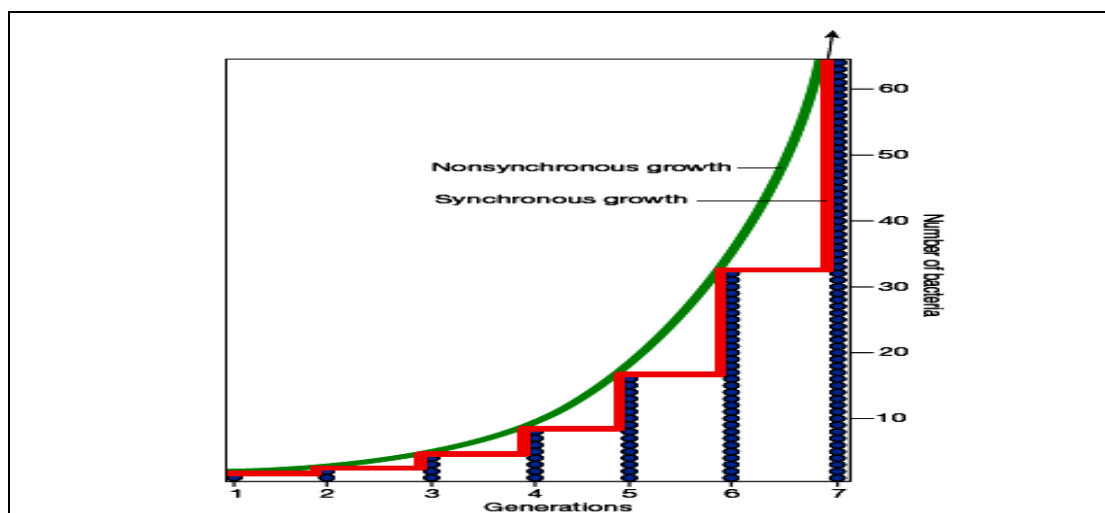
Le milieu frais contient une quantité limitante d'un nutriment essentiel. La vitesse de croissance est déterminée par la vitesse d'écoulement du milieu au travers de la chambre de culture (Prescott et *al.*, 2003).

- **Culture synchrone**

Au cours de la phase logarithmique, les organismes se divisent à leur rythme le plus rapide - un intervalle régulier, génétiquement déterminé, appelé temps de génération ou temps de doublement. La population d'organismes double à chaque génération. Par exemple, une culture contenant 1 000 organismes par millilitre avec un temps de génération de 20 minutes contiendrait 2 000 organismes par millilitre après 20 minutes, 4 000 organismes après 40 minutes, 8 000 après 1 heure, 64 000 après 2 heures et 512 000 après 3 heures. Puisque la population double à chaque génération, l'augmentation de la population est toujours  $2^n$  où  $n$  est le nombre de générations. Cette croissance est dite exponentielle ou logarithmique.

Le temps de génération pour la plupart des bactéries est compris entre 20 minutes et 20 heures, et est généralement inférieur à 1 heure. Certaines bactéries, comme celles qui causent la tuberculose et la lèpre, ont des temps de génération beaucoup plus longs (*Mycobacterium leprae*, la cause de la maladie de Hansen (la lèpre), a un temps de génération de 10 à 30 jours). Les bactéries environnementales ont généralement des temps de génération mesurés en mois. La plupart des agents pathogènes ont des temps de doublement relativement courts. *Salmonella enteritidis* et *Staphylococcus aureus*, les bactéries responsables des maladies d'origine alimentaire, doublent en 20 à 30 minutes, c'est pourquoi le fait de laisser les aliments à température ambiante même pendant une courte période a causé de nombreux cas de maladies d'origine alimentaire. En quelques heures, une population de ces bactéries peut facilement passer d'un petit nombre de cellules à plusieurs millions.

Certaines cellules individuelles prennent un peu plus de temps que d'autres pour passer de la phase de latence à la phase logarithmique, et elles ne se divisent pas toutes précisément ensemble. Si elles se divisaient ensemble et que le temps de génération était exactement de 20 minutes, le nombre de cellules dans une culture augmenterait en escalier, doublant exactement toutes les 20 minutes - une situation hypothétique appelée croissance synchrone. Dans une culture réelle, chaque cellule se divise au cours du temps de génération de 20 minutes, environ 1/20 des cellules se divisant chaque minute, une situation naturelle appelée croissance non synchrone. La croissance non synchrone apparaît sous la forme d'une ligne lisse, et non sous forme d'étapes, sur un graphique (figure 37).



**Figure 37 : Croissance synchrone versus non synchrone**

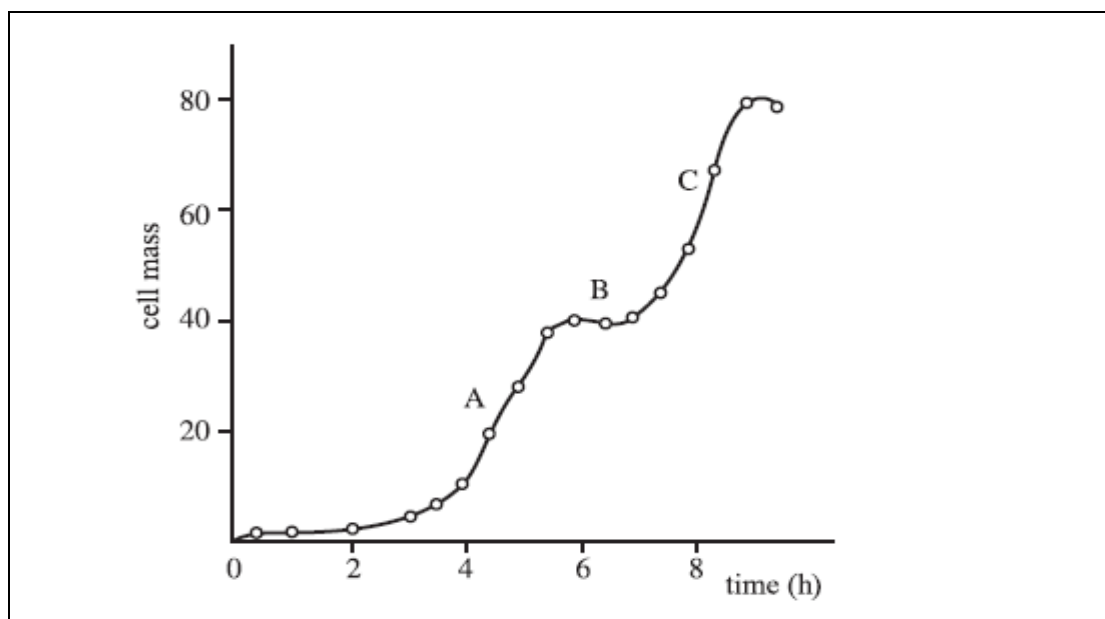
Une courbe de croissance pour une population en augmentation exponentielle tracée pour une population à division synchrone (ligne rouge) et pour une population à division non synchrone (ligne verte). Les sphères bleues représentent le nombre de bactéries présentes dans chaque génération, après avoir commencé avec une seule cellule (Black, 2012).

- **Cas particuliers de croissance : Diauxie :**

On parle de diauxie (du grec auxein "augmenter") lorsqu'il y a deux croissances à la suite l'une de l'autre, traduisant le plus souvent les utilisations successives de deux substrats différents. Cette croissance bi-phasique est caractérisée par une deuxième phase de latence pendant la période de croissance logarithmique pendant laquelle l'adaptation au deuxième substrat a lieu. Ce phénomène a été découvert par Jacques Monod en 1940.

Lorsque *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* sont cultivés dans un milieu liquide contenant du glucose et du lactose, elles se développent selon un schéma distinct à deux phases, comme le montre la figure 38. C'est ce qu'on appelle la croissance diauxique ou diauxie. Ceci est dû au fait que le glucose (substrat préféré) facilement utilisable et ses métabolites répriment l'utilisation du lactose. Le terme répression catabolique est utilisé pour décrire ce mécanisme de régulation, qui régule de nombreux gènes cataboliques et opérons chez les bactéries.

**Remarque :** il n'y a pas de diauxie avec les mêmes bactéries cultivées dans les mêmes conditions en présence de glucose + fructose, qui sont alors utilisés simultanément (et il n'y a pas d'opéron fructose).



**Figure 38 : Croissance diauxique d'*Escherichia coli* sur glucose et lactose**

Lorsque *Escherichia coli* est cultivé sur un mélange de glucose et de lactose, la bactérie se développe sur le glucose, réprimant l'utilisation du lactose (A) au début. Lorsque le glucose est épuisé, la bactérie se développe à nouveau sur le lactose (C) après une période de latence (B). C'est ce qu'on appelle la croissance diauxique ou diauxie. La croissance diauxique est le résultat d'un mécanisme de régulation connu sous le nom de répression catabolique. (Kim et Gadd, 2008).

### 3. Mesure de la croissance

La croissance des bactéries est diffuse dans les milieux liquides et elles forment des colonies sur les milieux solides. Chaque colonie est constituée d'un clone de cellules

dérivé d'une seule cellule mère. Les bactéries dans un milieu de culture ou un échantillon clinique peuvent être comptées par deux méthodes :

- **Méthodes de numération**

### *1. Numération total*

Il s'agit du nombre total de bactéries présentes dans un échantillon, qu'elles soient vivantes ou mortes. Le comptage total est effectué en comptant les bactéries au microscope à l'aide d'une chambre de comptage et en comparant la croissance avec des tubes d'opacité standard.

- **Comptes microscopiques directs**

La croissance bactérienne peut être mesurée par des comptages microscopiques directs. Dans cette méthode, un volume connu de milieu est introduit dans une lame de verre calibrée et gravée sous forme d'une grille appelée chambre de comptage de Petroff-Hausser (figure 39), également connue sous le nom d'hémocytomètre. Une suspension bactérienne est introduite dans la chambre avec une pipette calibrée. Après décantation des bactéries et ralentissement des courants liquides, les micro-organismes sont dénombrés dans des zones spécifiques appelées des carrés. La grille est localisée au centre du porte-objet. Les bactéries dans quelques-uns des carrés centraux sont comptées, généralement à un grossissement de 400 à 500 fois. Le nombre moyen de bactéries dans ces carrés est utilisé pour calculer la concentration en cellules dans l'échantillon original. Puisqu'il y a 25 grands carrés couvrant une surface de 1 mm<sup>2</sup>, dont chacun contient 16 petits carrés, soit un total de 400 petits carrés (figure 40 et figure 41). Le nombre total de bactéries dans 1 mm<sup>2</sup> de la chambre est (nombre/carré) (25 carrée). La chambre a une profondeur de 0,02 mm et par conséquent :

$$\text{bactéries/mm}^3 = (\text{bactéries/carré}) (25 \text{ carrés}) (50).$$

Le nombre de bactéries par cm<sup>3</sup> est 10<sup>3</sup> fois cette valeur. Supposons par exemple que le compte moyen par carré soit de 28 bactéries.

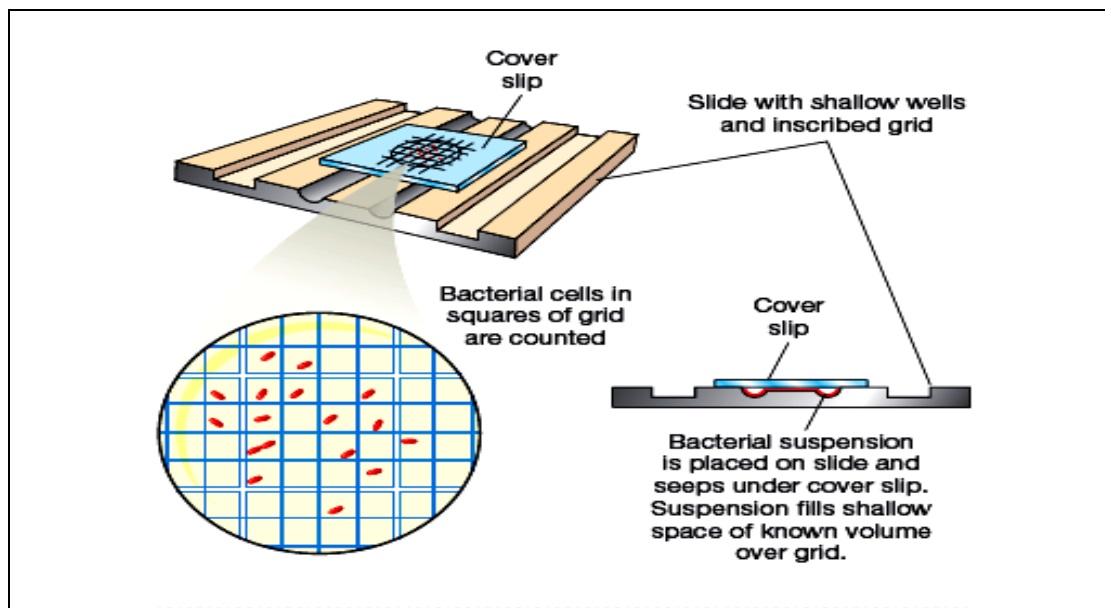
$$\text{bactéries/cm}^3 = (28 \text{ bactéries}) (25 \text{ carrés}) (50) (10^3) = 3,5 \times 10^7.$$

Le nombre de micro-organismes dans un échantillon est calculé en tenant compte du volume de la chambre et de la dilution de l'échantillon.

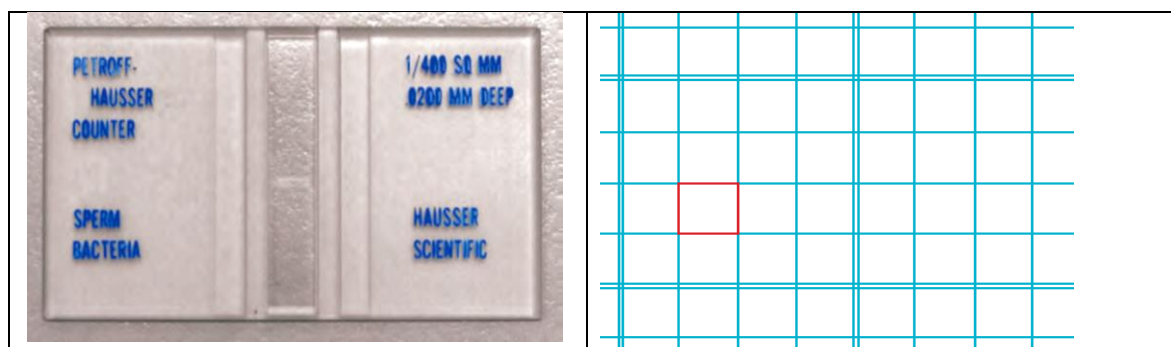
Les dilutions sont calculées à l'aide de la formule suivante :

$$D_2 = V_1 D_1 / V_2$$

D<sub>2</sub> est la nouvelle dilution à déterminer. V<sub>1</sub> est le volume d'échantillon à diluer. D<sub>1</sub> est la dilution de l'échantillon avant l'ajout du diluant (les échantillons non dilués ont un facteur de dilution de 1). V<sub>2</sub> est le nouveau volume combiné d'échantillon et de diluant une fois la dilution terminée.



**Figure 39 : La chambre de numération de Petroff-Hausser (hémocytomètre)**  
Le volume de suspension remplissant l'espace étroit entre la grille et la lamelle est connu, de sorte que le nombre de bactéries par unité de volume peut être calculé (Black, 2012).



**Figure 40 : Chambre de comptage de Petroff-Hausser**  
La chambre de comptage Hauser est un appareil utilisé pour le comptage direct des cellules bactériennes. La suspension bactérienne est aspirée par capillarité d'une pipette dans la chambre fermée par une lamelle. Les cellules sont ensuite comptées par rapport à la grille de petits carrés au centre de la chambre (Leboffe & Pierce, 2010).

**Figure 41 : Grille de la chambre de comptage de Petroff-Hausser**  
Une partie de la grille de la chambre de comptage de Petroff-Hausser est illustrée. Les plus petits carrés sont ceux mentionnés dans la formule. Le volume au-dessus d'un petit carré est de  $5 \times 10^{-8}$  mL. Lorsque les cellules atterrissent sur une ligne, comptez-les avec le carré en dessous ou à droite (Leboffe & Pierce, 2010).

La précision des comptages microscopiques directs dépend de la présence de plus de 10 millions de bactéries par millilitre de culture. En effet, les chambres de comptage sont conçues pour permettre des comptages précis uniquement lorsqu'un grand nombre de cellules sont présentes. Un comptage précis nécessite également que les bactéries soient réparties de manière homogène dans toute la culture. Cette technique présente l'inconvénient de ne généralement pas distinguer les cellules vivantes des cellules mortes, qui sont toutes deux incluses dans le comptage.

### - Compteurs électroniques

Le comptage peut être automatisé par des dispositifs sensibles tels que le compteur Coulter, qui scanne électroniquement une culture lorsqu'elle passe à travers une minuscule pipette. Au fur et à mesure que chaque cellule passe, elle est détectée et enregistrée sur un capteur électronique (figure 42).

Un cytomètre en flux fonctionne sur un principe similaire, mais en plus de compter, il peut mesurer la taille des cellules et même différencier les cellules vivantes des cellules mortes. Lorsqu'il est utilisé en conjonction avec des colorants fluorescents et des anticorps pour marquer les cellules, il a été utilisé pour différencier les bactéries gram-positives et gram-négatives. Il a été adapté pour être utilisé comme méthode rapide d'identification des agents pathogènes dans les échantillons de patients et pour différencier les cellules sanguines. Des formes plus sophistiquées du cytomètre en flux peuvent en fait trier des cellules de différents types dans des compartiments séparés d'un dispositif de collecte.

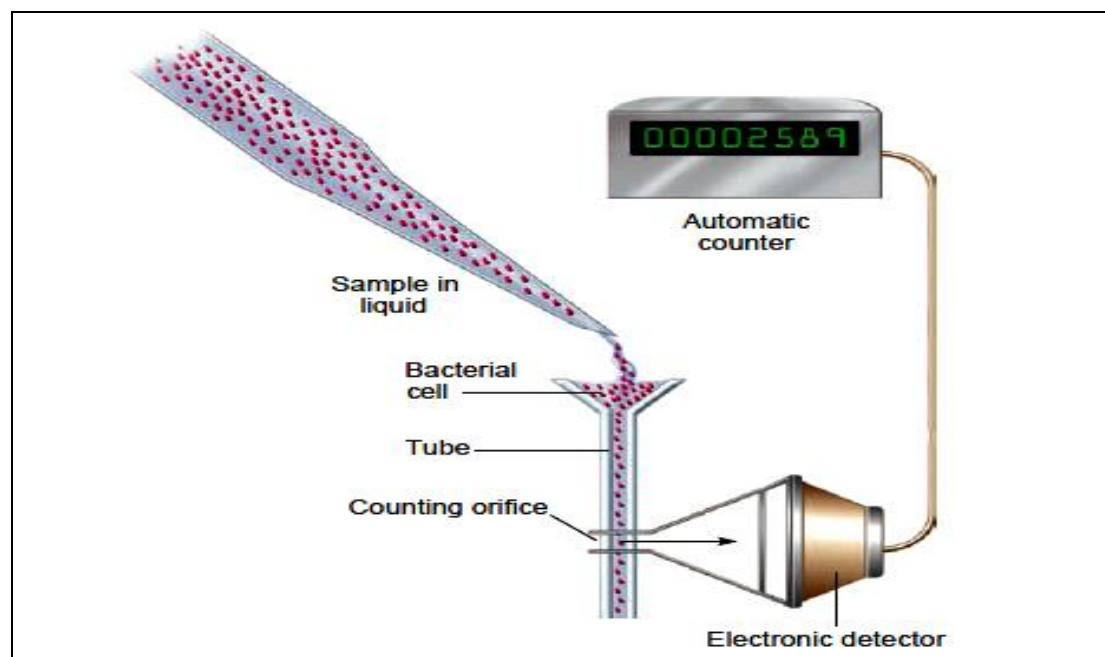


Figure 42 : Compteur Coulter

Lorsque les cellules traversent cet appareil, elles déclenchent un capteur électronique qui comptabilise leur nombre (Cowan Kelly, 2012).

Bien que la cytométrie en flux puisse être utilisée pour compter les bactéries dans des échantillons naturels sans avoir besoin de les cultiver, elle nécessite un marquage fluorescent des cellules que vous souhaitez détecter, ce qui n'est pas toujours possible.

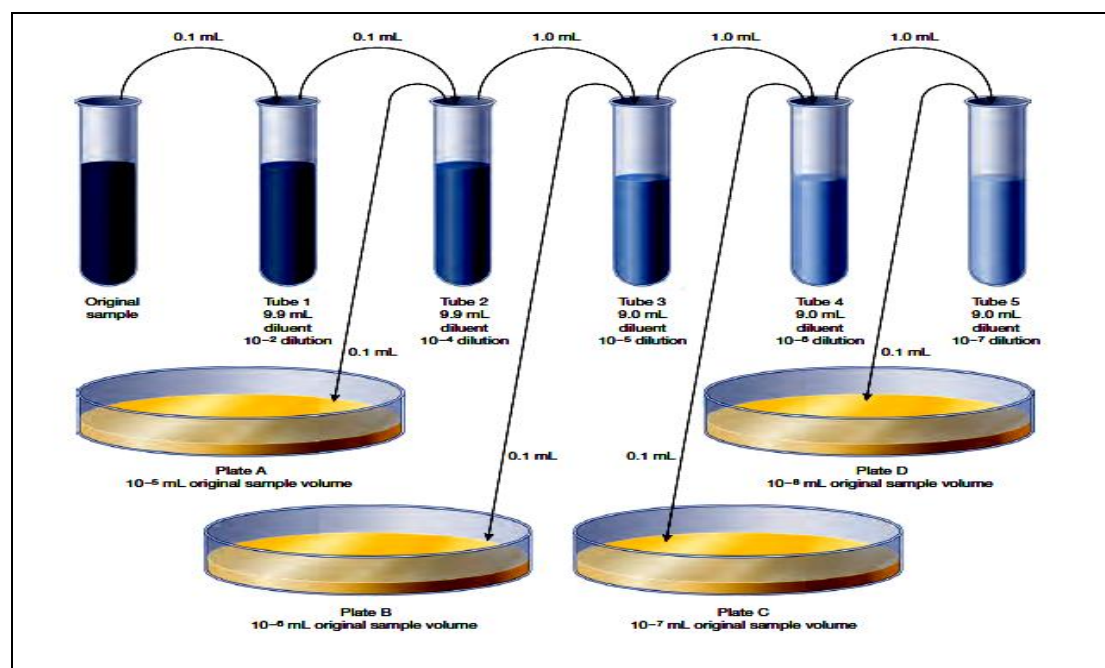
Une variante de la réaction en chaîne par polymérase (PCR), appelée PCR en temps réel, permet aux scientifiques de quantifier les bactéries et autres micro-organismes présents dans des échantillons environnementaux ou tissulaires sans les isoler et sans les cultiver.

Aucune des techniques rapides n'est capable d'isoler des organismes individuels. Elles ne contribuent donc pas à la caractérisation ou à l'identification des contaminants.

## 2. Numération des cellules viables

Cette méthode ne mesure que les cellules viables (vivantes) qui sont capables de croître et de produire une colonie sur un milieu approprié, c'est-à-dire de cellules capables de se multiplier.

**a- La numération sur plaque standard** : Une méthode de mesure de la croissance bactérienne est la numération sur plaque standard. Cette technique repose sur le fait que dans des conditions appropriées, seule une bactérie vivante se divisera et formera une colonie visible sur une plaque de gélose. Une plaque de gélose est une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif solidifié avec de l'agar agar, un polysaccharide complexe extrait de certaines algues marines. Parce qu'il est difficile de compter plus de 300 colonies sur une plaque de gélose, il est généralement nécessaire de diluer la culture bactérienne d'origine avant de plaquer (transférer) un volume connu de la culture sur la plaque solide. Les dilutions en série remplissent cette fonction.



**Figure 43 : Schéma de la procédure de dilution en série**

La dilution attribuée à chaque tube (écrite sous le tube) représente la proportion d'échantillon d'origine à l'intérieur de ce tube. Par exemple, si la dilution est de 10<sup>-4</sup>, la proportion d'échantillon d'origine à l'intérieur du tube serait de 1/10 000e du volume total à l'intérieur. Lorsque 0,1 ml de cette solution est transféré sur une plaque, le volume d'échantillon dans la plaque est de 0,1 ml x 10<sup>-4</sup> -10<sup>-5</sup> ml (Leboffe & Pierce, 2010).

Une dilution en série (figure 43) est simplement une série de transferts contrôlés sur une ligne de blancs de dilution (tubes contenant un volume connu de diluant stérile : eau, solution saline ou tampon). La série commence par un échantillon contenant une concentration inconnue de cellules (densité) et se termine par un mélange très dilué contenant seulement quelques cellules. Chaque blanc de dilution de la série reçoit un

volume connu du mélange dans le tube précédent et délivre un volume connu au suivant, réduisant généralement la densité cellulaire à 1/10 ou 1/100 à chaque étape. Par convention, les dilutions sont exprimées en notation scientifique. Par conséquent, une dilution au 1/10 s'écrit  $10^{-1}$  et une dilution au 1/100 s'écrit  $10^{-2}$ .

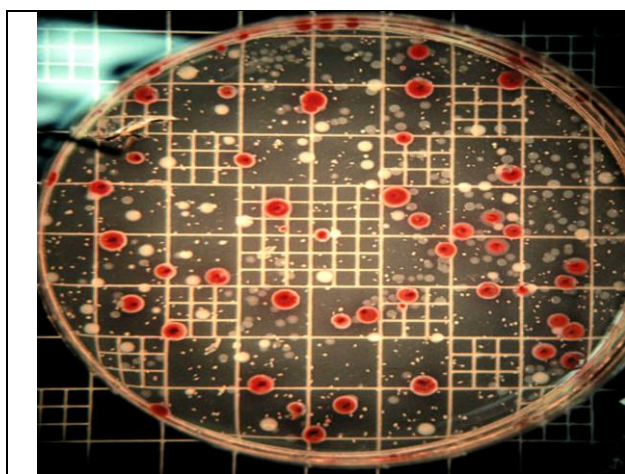
Une petite partie des dilutions appropriées (en fonction de la densité cellulaire estimée de l'échantillon d'origine) est ensuite étalée sur des plaques de gélose pour produire au moins une plaque dénombrable. Une boîte dénombrable est une boîte qui contient entre 30 et 300 colonies. Un nombre inférieur à 30 colonies est considéré comme statistiquement non fiable et supérieur à 300 est généralement trop nombreux pour être considéré comme des colonies individuelles.

Étaler un volume connu de cette dilution sur une plaque de gélose et compter les colonies qui se développent vous donneraient toutes les informations dont vous avez besoin pour calculer la densité cellulaire d'origine (OCD). Voici la formule de base pour ce calcul :

$$\text{OCD} = \text{UFC} / (\text{D} \times \text{V})$$

Les UFC (Unités Formant Colonies) sont en fait le nombre de colonies qui se développent sur la plaque. UFC est le terme préféré car les colonies peuvent se développer à partir de cellules individuelles ou de groupes de cellules, en fonction de l'arrangement cellulaire typique de l'organisme. D est la dilution indiquée sur le tube de dilution d'où provient l'inoculum. V est le volume transféré à la plaque. (Remarque : le volume est inclus dans la formule car les densités sont exprimées en UFC/ml, par conséquent, une inoculation de 0,1 ml (qui contiendrait 1/10e du nombre de cellules dans 1 ml) doit être prise en compte).

Pour compter le nombre réel de colonies présentes, placez la plaque sous la loupe d'un compteur de colonies (figure 44) et les colonies sur toute la plaque sont comptées.



**Figure 44 : Comptage des colonies**

Colonies bactériennes vues à travers la loupe contre une grille de comptage des colonies (Black, 2012).

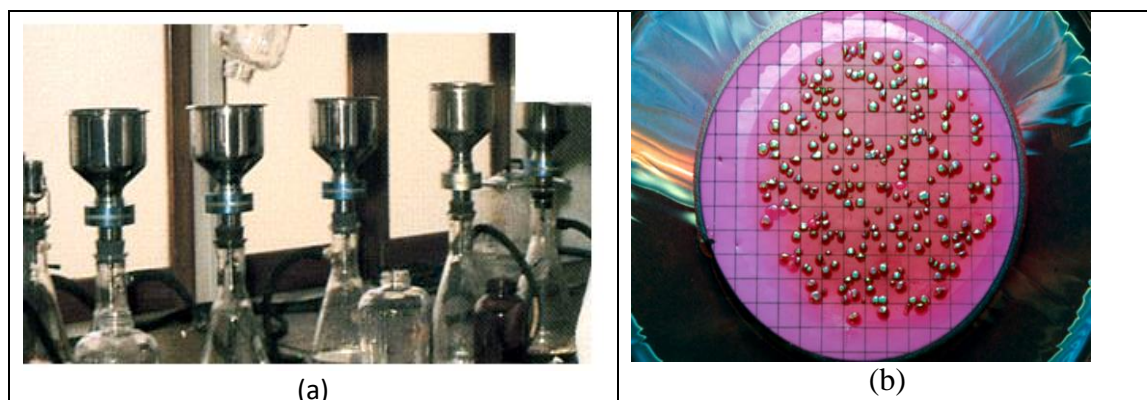
Supposons, par exemple, un calcul typique pour un nombre moyen de colonies de 37 produits en étalant une plaque avec 0,1 ml d'une dilution  $10^{-5}$ . Cette plaque contient maintenant  $10^{-6}$  ml d'échantillon d'origine. Le calcul serait le suivant.

$$\text{OCD} = \text{UFC} / \text{Volume d'échantillon} = 37 \text{ UFC} / 10^{-6} \text{ ml} = 3,7 \times 10^7 \text{ UFC/ml.}$$

La précision de la méthode de dilution en série et de comptage sur plaque dépend de la dispersion homogène des organismes dans chaque dilution. L'erreur peut être minimisée en secouant chaque culture avant l'échantillonnage et en faisant plusieurs plaques à partir de chaque dilution. La précision est également affectée par la mort des cellules. Étant donné que le nombre de colonies comptées représente le nombre d'organismes vivants, il n'inclut pas les organismes qui pourraient être morts au moment où l'ensemencement a été effectué ; il n'inclut pas non plus les organismes qui ne peuvent pas se développer sur le milieu choisi. L'utilisation de jeunes cultures dans la phase de croissance minimise ce type d'erreur.

**b- La numération par la filtration :** Une autre méthode d'estimation de la taille de petites populations bactériennes utilise la filtration. Un volume connu d'eau ou d'air est aspiré à travers un filtre dont les pores sont trop petits pour permettre le passage des bactéries. Lorsque le filtre est alors placé sur un milieu gélosé, chaque colonie qui se développe représente à l'origine un organisme collecté par le filtre. Ainsi, le nombre d'organismes par litre d'eau ou d'air peut être calculé. La figure 45 montre le processus de filtration et les colonies cultivées sur un tampon filtrant.

Dans la méthode du filtre à membrane, un échantillon d'eau de 100 ml est prélevé à travers un filtre à membrane stérile qui a des pores d'environ 0,45  $\mu\text{m}$  de diamètre. Cette membrane, qui piège les bactéries à sa surface, est ensuite incubée à la surface d'un tampon absorbant stérile préalablement saturé d'un milieu de croissance approprié. Après incubation, des colonies se forment sur le filtre où les bactéries ont été piégées lors de la filtration. La présence de plus d'une colonie par 100 ml d'eau indique que l'eau peut être impropre à la consommation humaine. Si des colonies sont observées, des tests supplémentaires peuvent être effectués pour les identifier spécifiquement. La méthode du filtre à membrane est une méthode très rapide et permet de tester de plus grands volumes d'eau.



**Figure 45 : Le test du filtre à membrane pour la pureté de l'eau**

(a) Filtrer les échantillons d'eau et piéger les organismes sur des tampons filtrants, qui sont ensuite incubés.

(b) Après incubation, les colonies de coliformes qui apparaissent sont comptées (Black, 2012).

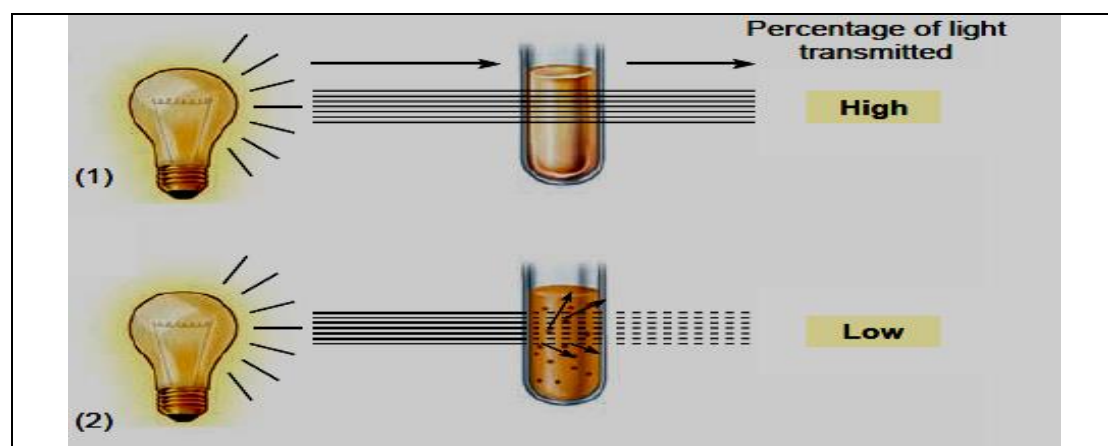
- **Méthodes quantitatives**

Plusieurs autres méthodes de surveillance de la croissance bactérienne sont disponibles. Elles comprennent la détermination des variations de la masse bactérienne par des mesures de poids sec, d'un ou de plusieurs composants cellulaires et de turbidité ou la mesure des produits métaboliques par la détection de la production de gaz ou d'acide.

**a- La mesure de la masse bactérienne (biomasse) :** Le nombre de cellules dans une culture peut être déterminé par des mesures de poids sec. Pour calculer le poids sec des cellules, elles doivent être séparées du milieu par des moyens physiques tels que la filtration ou la centrifugation. Les cellules sont ensuite lavées avec de l'eau distillée, séchées et la masse résultante est pesée. Cette mesure est proportionnelle à la totalité des cellules (permettent de quantifier les cellules mais pas de les numériser) et nécessite un étalonnage pour être corrélées à leur nombre (P. frais d'une bactérie =  $1,5 \times 10^{-12}$  g).

**\* Dosage de l'azote bactérien :** Si la quantité d'une substance dans chaque cellule est constante, la quantité totale de ce constituant cellulaire est en relation directe avec la masse cellulaire microbienne totale. Par exemple, un échantillon de cellules lavées et collectées à partir d'un volume connu de milieu, peut être analysé pour son contenu total en azote. Une augmentation de la population microbienne se traduira par une augmentation de l'azote total (14% du poids sec). De même pour le dosage des protéines.

**\* Mesure de la densité optique :** Densité Optique (DO) ou Absorbance : L'une des méthodes les plus simples pour estimer la taille d'une population est la turbidométrie (figure 46).



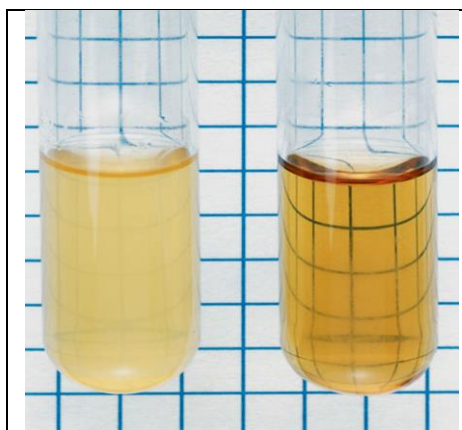
**Figure 46 : Mesures de turbidité comme indicateurs de croissance bactérienne**

La détermination de la masse bactérienne par mesure de l'absorption de la lumière. Le spectrophotomètre donne des mesures plus sensibles.

(1) Un tube sans croissance permettra à la lumière de passer facilement. Par conséquent, plus de lumière atteindra le photodétecteur et donnera une valeur de transmission plus élevée.

(2) Dans un tube en croissance, les cellules diffusent la lumière, ce qui réduit la quantité de lumière atteignant le photodétecteur et, par conséquent, donne une valeur de transmission inférieure (Cowan Kelly, 2012).

La turbidité (une apparence trouble) dans un tube de culture indique la présence d'organismes (figure 47). Des estimations assez précises de la croissance peuvent être obtenues en mesurant la turbidité avec un dispositif photoélectrique, tel qu'un colorimètre ou un spectrophotomètre (figure 48). Cette méthode est particulièrement utile pour surveiller le taux de croissance sans perturber la culture. Cependant, les échantillons avec des densités cellulaires très élevées doivent être dilués pour assurer des lectures précises. Les mesures de la croissance bactérienne basées sur la turbidité sont également particulièrement sujettes à erreur lorsque les cultures contiennent moins de 1 million de cellules par millilitre. De telles cultures peuvent présenter peu ou pas de turbidité même en cas de croissance. Inversement, la turbidité peut être produite par une forte concentration de cellules mortes dans une culture.



**Figure 47 : Turbidité**

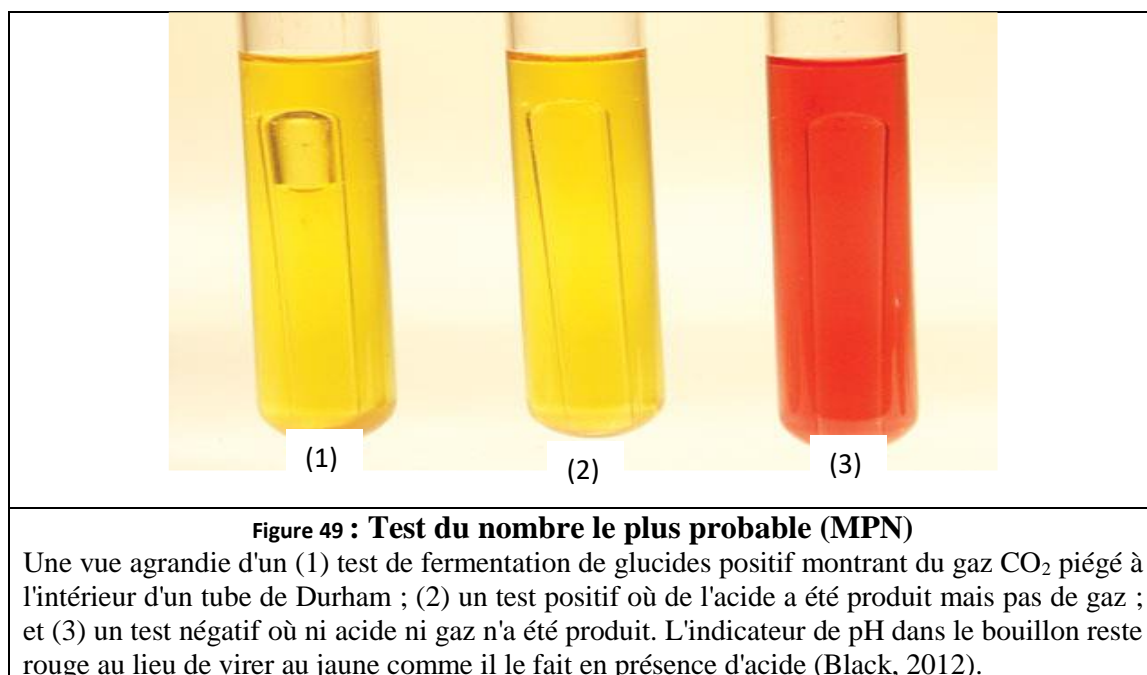
La turbidité, ou une apparence trouble, est un indicateur de croissance bactérienne dans l'urine dans le tube de gauche (Black, 2012).



**Figure 48 : Un spectrophotomètre**

Cet instrument peut être utilisé pour mesurer la croissance bactérienne en déterminant le degré de transmission de la lumière à travers la culture. Des échantillons de culture dans des tubes spéciaux optiquement transparents sont placés à l'intérieur du spectrophotomètre et sont mesurés par rapport aux normes (Black, 2012).

**b- La mesure des produits métaboliques :** La mesure des produits métaboliques d'une population peut être utilisée pour estimer indirectement la croissance bactérienne. La vitesse à laquelle les produits métaboliques tels que les gaz et/ou les acides sont formés par une culture reflètent la masse de bactéries présentes. La production de gaz peut être détectée (plutôt que mesurée) en capturant le gaz dans de petits tubes inversés placés à l'intérieur de tubes plus grands de milieu liquide contenant des bactéries. La production d'acide peut être détectée en incorporant des indicateurs de pH - des substances chimiques qui changent de couleur avec les changements de pH - dans un milieu liquide contenant des bactéries métaboliquement actives (figure 49).



La vitesse à laquelle un substrat tel que le glucose ou l'oxygène est utilisé reflète également la masse cellulaire. Par exemple, une méthode d'estimation de la masse bactérienne est le test de réduction de colorant, qui mesure l'absorption directe ou indirecte d'oxygène. Dans ce test, un colorant tel que le bleu de méthylène est incorporé dans un milieu contenant du lait. Les bactéries inoculées dans le milieu utilisent de l'oxygène lorsqu'elles métabolisent le lait. Le bleu de méthylène est bleu en présence d'oxygène et devient incolore en son absence. Ainsi, plus le milieu se décolore rapidement, plus l'oxygène est consommé rapidement et plus la présence de bactéries est présumée importante. La vitesse à laquelle le colorant est décoloré (réduction du colorant) est une approche hautement indirecte ; ce n'est pas une mesure précise de la masse bactérienne.

#### 4. Milieux de culture

La grande majorité des micro-organismes d'intérêt médical peuvent être cultivés en laboratoire et la plupart d'entre eux nécessitent des techniques et des installations relativement simples. La culture de bactéries en laboratoire nécessite la connaissance de leurs besoins nutritionnels et la capacité de fournir les substances nécessaires dans un milieu. Certains organismes, comme ceux qui causent la syphilis et la lèpre, ne peuvent toujours pas être cultivés en laboratoire. Ils doivent être cultivés dans des cultures contenant des cellules vivantes humaines ou animales. De nombreux autres organismes dont les besoins nutritionnels sont raisonnablement bien connus peuvent être cultivés dans un ou plusieurs types de milieux.

Un milieu de culture est une préparation **solide** ou **liquide**, utilisée pour faire **croître**, pour **transporter** et **conserver** des micro-organismes. Un bon milieu doit contenir tous les nutriments dont le micro-organisme a besoin pour se développer. Il

faut des milieux spéciaux pour l'**isolement**, l'**identification** et la mesure de la **sensibilité** des micro-organismes aux antibiotiques. Bien que tous les micro-organismes exigent une source d'énergie, de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre et de divers minéraux, la composition précise d'un bon milieu, dépend de l'espèce à cultiver, car les besoins en éléments nutritifs sont très spécifiques. La connaissance de l'habitat normal d'un micro-organisme est souvent utile dans la sélection d'un milieu de culture approprié, les besoins nutritifs reflétant les besoins naturels. Très souvent, un milieu est utilisé pour la croissance sélective de certains micro-organismes spécifiques ou pour l'identification d'une espèce particulière. Dans ce cas, la fonction du milieu déterminera aussi sa composition.

Il existe une grande diversité de milieux destinés à la culture des micro-organismes.

## **A. Les types de milieux de culture selon leurs compositions chimiques**

### **1) Milieux synthétiques ou définis**

Un nombre important de micro-organismes courants sont capables de synthétiser tous les matériaux dont ils ont besoin pour leur croissance (par exemple, les acides aminés, les nucléotides et les vitamines) à partir de sources simples de carbone et d'azote et de sels minéraux. De tels organismes peuvent se développer sur des milieux véritablement synthétiques (chimiquement définis)

Les milieux de laboratoire sont généralement des milieux synthétiques. Un milieu synthétique est un milieu préparé en laboratoire à partir de matériaux de composition précise ou raisonnablement bien définie.

Un milieu synthétique défini est un milieu qui contient des types et des quantités spécifiques connus de substances chimiques.

#### **Exemples :**

- ❖ Les autotrophes photolithotrophes tels que les cyanobactéries, se multiplient sur des milieux assez simples contenant :
  - du CO<sub>2</sub> comme source de carbone (souvent sous forme de carbonate de soude ou de bicarbonate)
  - du nitrate ou de l'ammoniaque comme source d'azote
  - du sulfate, du phosphate et une série de minéraux.
- ❖ De nombreux hétérotrophes chémoorganotrophes sont cultivés sur des milieux définis contenant :

- du glucose comme source de carbone
- un sel d'ammonium comme source d'azote.

Tous les milieux définis ne sont pas aussi simple que les exemples donnés, ils peuvent être constitués de dizaines de composants.

Les milieux définis sont beaucoup utilisés en recherche afin de déterminer ce que le micro-organisme étudié est capable de métaboliser.

## **2) Milieux complexes ou empiriques**

Ces milieux sont beaucoup plus couramment utilisés que les milieux synthétiques, car un seul milieu complexe peut être suffisamment riche et complet pour satisfaire les besoins nutritifs de nombreux micro-organismes différents. De plus les milieux complexes sont souvent nécessaires lorsque les besoins nutritifs d'un micro-organisme particulier sont inconnus et donc qu'un milieu défini ne peut pas être préparé. Plusieurs termes ont été utilisés pour décrire les milieux complexes, par ex. milieux de laboratoire de routine et milieux à usage général.

Un milieu complexe, ou milieu chimiquement non défini, est un milieu qui contient des matériaux raisonnablement familiers mais dont la composition chimique varie légèrement d'un lot à l'autre. Ces milieux contiennent du sang ou des extraits de bœuf, de levures, de soja et d'autres organismes. Un ingrédient courant est la peptone, un produit de la digestion enzymatique des protéines. Il fournit de petits peptides que les micro-organismes peuvent utiliser. Bien que les concentrations exactes ne soient pas connues, les oligo-éléments et les vitamines sont présents en quantité suffisante dans des milieux complexes pour soutenir la croissance de nombreux organismes. Les glucides sont utilisés sous forme d'amidon ou de sucres, mais le glucose (dextrose) est le seul sucre régulièrement utilisé comme nutriment. Les micro-organismes diffèrent par leur capacité à fermenter divers sucres et leurs schémas de fermentation peuvent être utilisés comme aide à l'identification. Ainsi, d'autres sucres inclus dans les milieux de culture sont normalement présents à ces fins de diagnostic plutôt que comme sources de carbone et d'énergie. Le chlorure de sodium peut être incorporé dans les milieux de culture pour ajuster la pression osmotique, et occasionnellement des tampons sont ajoutés pour neutraliser les acides résultant du métabolisme des sucres. Trois milieux complexes souvent utilisés sont : le bouillon nutritif, le bouillon au soja et la gélose MacConkey.

## **3) Milieux semi- synthétiques**

Ces milieux sont des milieux synthétiques additionnés d'un extrait d'organismes comme un extrait de levures contenant des facteurs de croissance pour les bactéries. Exemple : milieu de Chapman, qu'est également sélectif pour les Staphylocoques.

## B. Les types de milieux de culture selon leurs consistances

Les milieux de culture peuvent être **liquides** ou **solides** ; ce dernier terme décrit des milieux liquides gélifiés par ajout d'agar-agar, aussi appelé simplement agar, qui est un glucide extrait d'algues rouges. L'agar à une concentration d'environ 1 à 1,5 % fournira un gel ferme qui ne peut pas être liquéfié par les enzymes normalement produites lors de la croissance bactérienne (ce qui est l'une des raisons pour lesquelles elle est utilisée de préférence à la gélatine). L'agar est inhabituel dans la mesure où les températures de fusion et de prise de ses gels sont assez différentes. Les solutions de l'agar fluide se figent à environ 40°C, mais ne se reliquéfient pas lors du chauffage jusqu'à ce que la température dépasse 90°C. Ainsi, l'agar forme un gel ferme à 37 °C, qui est la température normale d'incubation de nombreux organismes pathogènes (contrairement à la gélatine), et lorsqu'elle est utilisée sous forme liquide à 45 °C, elle est à une température suffisamment basse pour éviter de tuer les micro-organismes. Cette propriété est importante dans les méthodes de comptage sur plaques coulées. En effet, les milieux solides destinés à être coulés en boîte de Pétri ou en tube ont une teneur en gélose assez élevée (1,5 %) tandis que les géloses molles ou **semi-solides** (exp: milieu Mannitol – mobilité), sont peu gélosées (0.75 %) et présentent une consistance intermédiaire.

En générale, les micro-organismes se développent parfaitement dans les milieux liquides (exp : bouillon de Clark Lubs) mais l'isolement bactérien nécessite des milieux solides afin de séparer les différents germes présents dans un prélèvement.

## C. Les types de milieux de culture selon leurs fonctions

### 1) Milieux de culture à utilisation générale

Les milieux comme le bouillon au soja et la gélose au soja sont aussi appelés les milieux usuels ou de base ou d'isolement car ils permettent la croissance de la plupart des micro-organismes.

### 2) Milieux enrichis

Les milieux de culture de base peuvent être **enrichis** par l'ajout de matériaux comme le lait, le sang ou le sérum, et les micro-organismes qui ont besoin de tels suppléments pour se développer sont décrits comme « exigeants » dans leurs besoins nutritionnels. Le terme enrichissement ici est utilisé dans le but de rendre un milieu plus riche sur le plan nutritionnel afin d'obtenir une croissance plus rapide ou plus abondante.

La plupart des cultures de base utilisent des milieux contenant de la peptone provenant de viande ou de poisson dans un bouillon nutritif ou un milieu gélosé (solide). Ces milieux sont parfois enrichis d'extrait de levure, qui contient un certain nombre de vitamines, de coenzymes et de nucléosides. L'hydrolysate de caséine, issu de protéines

de lait, contient de nombreux acides aminés et sert à enrichir certains milieux. Étant donné que le sang contient de nombreux nutriments nécessaires aux agents pathogènes fastidieux, le sérum (la partie liquide du sang après élimination des facteurs de coagulation), le sang total et le sang total chauffé peuvent être utiles pour enrichir les milieux. La gélose au sang est utile pour identifier les organismes susceptibles de provoquer une hémolyse ou une dégradation des globules rouges. Le sang de mouton est utilisé car son hémolyse est plus clairement définie que lorsque le sang humain est utilisé dans le milieu gélosé.

### 3) Milieux sélectifs

Un milieu sélectif est un milieu qui encourage (favorise) la croissance de certains micro-organismes mais supprime (inhibe) la croissance d'autres. De nombreux matériaux sont couramment ajoutés aux milieux sélectifs dont la fonction est de restreindre la croissance des bactéries indésirables et stimuler celle des bactéries recherchées. Par exemple, pour identifier *Clostridium botulinum* dans des échantillons alimentaires soupçonnés d'être des agents d'intoxication alimentaire, les antibiotiques sulfadiazine et sulfate de polymyxine (SPS) sont ajoutés aux cultures anaérobies d'espèces de *Clostridium*. Ce milieu de culture est appelé gélose SPS. Il permet la croissance de *Clostridium botulinum* tout en inhibant la croissance de la plupart des autres espèces de *Clostridium*. Un autre exemple inclut la bile ajoutée au milieu de MacConkey pour supprimer les organismes provenant de sites anatomiques autres que le tractus gastro-intestinal.

### 4) Milieux d'enrichissement

Étant donné qu'un petit nombre de bactéries peut facilement passer inaperçu, surtout si d'autres bactéries sont présentes en beaucoup plus grand nombre, il est parfois nécessaire d'utiliser un milieu d'enrichissement. C'est souvent le cas pour les échantillons de sol ou de fèces. Un milieu d'enrichissement est d'ordinaire liquide, et il contient des nutriments spéciaux qui permettent la croissance d'un micro-organisme particulier qui autrement ne serait pas présent en nombre suffisant pour permettre son isolement et son identification. Contrairement à un milieu sélectif, un milieu d'enrichissement ne supprime pas les autres micro-organismes. Par exemple, comme les organismes *Salmonella typhi* peuvent ne pas être suffisamment nombreux dans un échantillon fécal pour permettre une identification positive, ils sont cultivés sur un milieu contenant l'oligo-élément sélénium, qui favorise la croissance de l'organisme. Après incubation dans le milieu d'enrichissement, un plus grand nombre d'organismes augmente la probabilité d'une identification positive.

### 5) Milieux différentiels

Un milieu différentiel contient un constituant qui provoque un changement observable (un changement de couleur ou un changement de pH) dans le milieu

lorsqu'une réaction biochimique particulière se produit. Ce changement permet aux microbiologistes de distinguer un certain type de colonie des autres poussant sur la même boîte de Petri. La gélose SPS sert également de milieu différentiel. Les colonies de *Clostridium botulinum* formées sur ce milieu sont noires à cause du sulfure d'hydrogène fabriqué par les organismes à partir des additifs soufrés. De nombreux milieux, tels que la gélose SPS et la gélose MacConkey, sont à la fois sélectifs et différentiels. La gélose MacConkey contient du violet cristallisé et des sels biliaires, qui inhibent la croissance des bactéries Gram-positives tout en permettant la croissance des bactéries Gram-négatives. La gélose MacConkey contient également du sucre lactose et un indicateur de pH (du rouge neutre) qui rend les colonies qui fermentent le lactose rouges et se distinguent très facilement des colonies (restantes incolores et translucides) qui ne le fermentent pas. Bien qu'il existe quelques exceptions, la plupart des micro-organismes que l'on trouve normalement dans les intestins fermentent le lactose, alors que la plupart des agents pathogènes (micro-organismes pathogènes) ne le font pas.

La gélose au sang est un milieu différentiel enrichi. Il permet de distinguer les bactéries hémolytiques des bactéries non hémolytiques. Les bactéries hémolytiques (ex. de nombreux streptocoques et des staphylocoques isolés de la gorge) produisent des zones claires autour de leurs colonies, résultant de la destruction des globules rouges.

## 6) Milieux d'identification

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

## 7) Milieux des anaérobies

Les milieux solides conçus pour la croissance des micro-organismes anaérobies contiennent généralement des **agents réducteurs** non toxiques, par ex. le thioglycolate de sodium ou les acides aminés soufrés ; ces composés créent des potentiels redox de -200 mV ou moins et diminuent ou éliminent ainsi les effets inhibiteurs de l'oxygène ou des molécules oxydantes sur la croissance anaérobie. L'inclusion de tels composés est moins importante dans les milieux liquides où un potentiel redox suffisamment faible peut être obtenu simplement par ébullition ; cela expulse l'oxygène dissous qui, dans les liquides non agités, ne resature que lentement les quelques millimètres supérieurs du liquide. Des indicateurs redox comme le bleu de méthylène ou la résazurine peuvent être incorporés dans des milieux anaérobies pour confirmer qu'un potentiel redox suffisamment faible a été atteint.

**8) Milieux de transport**

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

**9) Milieux de conservation**

Une fois qu'un micro-organisme a été isolé, il peut être maintenu indéfiniment dans une culture pure appelée culture stock. Lorsque cela est nécessaire pour l'étude, un échantillon provenant d'une culture mère est inoculé dans un milieu frais. La culture mère elle-même n'est jamais utilisée pour des études en laboratoire. Cependant, les micro-organismes des cultures mères passent par des phases de croissance, épuisent les nutriments et accumulent des déchets comme le font ceux de n'importe quelle culture. À mesure que la culture vieillit, les micro-organismes peuvent acquérir des formes étranges ou d'autres caractéristiques altérées. Les cultures mères sont maintenues en effectuant des repiquages dans un milieu frais à intervalles fréquents pour maintenir la croissance des micro-organismes.

L'utilisation de techniques aseptiques minutieuses est importante dans toutes les manipulations de cultures. Les techniques aseptiques minimisent les risques que les cultures soient contaminées par des micro-organismes de l'environnement ou que des micro-organismes, notamment des agents pathogènes, s'échappent dans l'environnement. De telles techniques sont particulièrement importantes pour réaliser des sous-cultures à partir de cultures mères. Dans le cas contraire, un micro-organisme indésirable pourrait être introduit et le micro-organisme de base devrait être réisolé. Même avec des transferts réguliers des micro-organismes depuis des cultures mères vers des milieux frais, les micro-organismes peuvent subir des mutations (modifications de l'ADN) et développer des caractéristiques altérées.

Pour éviter le risque de contamination et réduire le taux de mutation, les micro-organismes de culture mère doivent également être conservés dans une culture préservée, une culture dans laquelle les micro-organismes sont maintenus à l'état dormant. On peut utiliser des milieux appauvris sur lesquels le taux de croissance est aussi faible que possible. Ceci a pour effet de maintenir la souche en phase d'abord exponentielle lente, puis en phase stationnaire prolongée, ce qui a pour avantage de limiter les mutations et l'accumulation de déchets toxiques en raison de la faible croissance.

La conservation à la température de réfrigération ( $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), généralement couplée à l'utilisation d'un milieu de conservation, reste une méthode de choix pour conserver de nombreuses espèces peu ou moyennement exigeantes pendant d'assez longues périodes (plusieurs mois jusqu'à 3 à 5 ans).

Des températures plus basses comme la congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  (température des congélateurs domestiques),  $-80^{\circ}\text{C}$  (température de la glace carbonique) ou  $-196^{\circ}\text{C}$  (température de l'azote liquide) sont aussi très utilisées pour des espèces plus sensibles à des coûts énergétiques plus élevés et à condition de maîtriser une technique validée pour la souche de congélation-décongélation. Ceci est le cas pour beaucoup d'espèces bactériennes.

La technique la plus couramment utilisée pour conserver les cultures est la lyophilisation (cryodessiccation), dans laquelle les cellules sont rapidement congelées, déshydratées pendant leur congélation et scellées dans des flacons sous vide. Ces cultures peuvent être conservées indéfiniment à température ambiante.

Étant donné que les micro-organismes subissent fréquemment des modifications génétiques, des cultures de référence sont conservées. Une culture de référence est une culture préservée qui maintient les micro-organismes avec les caractéristiques telles que définies initialement. Des cultures de référence de toutes les espèces et souches connues de bactéries et de nombreux autres micro-organismes sont conservées dans l'American Type Culture Collection (American Type Culture Collection), et beaucoup sont également conservées dans des universités et des centres de recherche. Ensuite, si les cultures mères d'un laboratoire particulier subissent des modifications ou si d'autres laboratoires souhaitent obtenir certains micro-organismes à étudier, des cultures de référence sont toujours disponibles.

## Chapitre 4 : Le Métabolisme bactérien

Le métabolisme, du terme grec metaballein, signifiant changement, concerne toutes les réactions chimiques et le fonctionnement physique de la cellule. Bien que le métabolisme entraîne des milliers de réactions différentes, la plupart d'entre elles appartiennent à l'une des deux catégories générales :

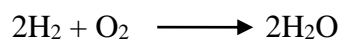
- **L'anabolisme** : parfois également appelé biosynthèse, est des réactions qui nécessitent de l'énergie pour synthétiser des molécules complexes à partir de molécules plus simples.

- **Le catabolisme** : est l'opposé de l'anabolisme. Des réactions qui libèrent de l'énergie en divisant des molécules complexes en molécules plus simples qui peuvent ensuite être réutilisées comme éléments de base.

L'anabolisme est nécessaire à la croissance, à la reproduction et à la réparation des structures cellulaires. Le catabolisme fournit à un organisme l'énergie nécessaire à ses processus vitaux, notamment le mouvement, le transport et la synthèse de molécules complexes, c'est-à-dire l'anabolisme.

### 1. Notions de biochimie (enzymes, oxydo-réductions...)

Toutes les réactions cataboliques impliquent un transfert d'électrons, qui permet à l'énergie d'être capturée dans des liaisons à haute énergie dans l'ATP et des molécules similaires. Le transfert d'électrons est directement lié à l'oxydation et à la réduction. **L'oxydation** peut être définie comme la perte ou la suppression d'électrons. Bien que de nombreuses substances se combinent avec l'oxygène et transfèrent des électrons à l'oxygène, il n'est pas nécessaire que l'oxygène soit présent si un autre accepteur d'électrons est disponible. **La réduction** peut être définie comme le gain d'électrons. Lorsqu'une substance perd des électrons ou est oxydée, de l'énergie est libérée, mais une autre substance doit gagner des électrons ou être réduite en même temps. Par exemple, lors de l'oxydation de molécules organiques, les atomes d'hydrogène sont éliminés et utilisés pour réduire l'oxygène pour former de l'eau :



Dans cette réaction, l'hydrogène est un donneur d'électrons, ou agent réducteur, et l'oxygène est un accepteur d'électrons, ou agent oxydant. Parce que l'oxydation et la réduction doivent se produire simultanément, les réactions dans lesquelles elles se produisent sont parfois appelées **réactions redox**. Le terme potentiel redox est également utilisé et indique si des conditions oxydantes ou réductrices prévalent dans une situation particulière, par ex. dans un fluide corporel ou un milieu de culture. Les organismes anaérobies préfèrent les faibles **potentiels redox** (généralement de zéro à -200 mV ou moins) tandis que les aérobies prospèrent dans des environnements à potentiel redox élevé (par exemple zéro à +200 mV ou plus).

- **Enzymes : catalyseur des réactions chimiques de la vie**

Une cellule bactérienne pourrait être considérée comme une usine microscopique, dotée de matériaux de construction de base, d'une source d'énergie et d'un « plan » pour faire fonctionner son vaste réseau de réactions métaboliques. Mais les réactions chimiques de la vie, même lorsqu'elles sont hautement organisées et complexes, ne peuvent se dérouler sans une classe spéciale de macromolécules appelées enzymes.

Les **enzymes** constituent une catégorie particulière de protéines présentes dans tous les organismes vivants. En fait, la plupart des cellules contiennent des centaines d'enzymes et synthétisent constamment des protéines, dont beaucoup sont des enzymes. Les enzymes agissent comme des **catalyseurs** : des substances qui restent inchangées (sans faire partie des produits ni être consommées dans la réaction) tout en accélérant les réactions jusqu'à un million de fois la vitesse non catalysée, ce qui n'est généralement pas suffisant pour maintenir la vie. La seule autre façon d'accélérer la vitesse de réaction serait d'augmenter la température : en général, une augmentation de température de 10 degrés entraîne un doublement de la vitesse de réaction. Cependant, la plupart des cellules mourraient si elles étaient exposées à une telle augmentation de température. Ainsi, les enzymes sont nécessaires à la vie à des températures que les cellules peuvent supporter.

Les enzymes sont généralement nommées en ajoutant le suffixe -ase au nom du substrat sur lequel elles agissent. Par exemple, les phosphatases agissent sur les phosphates, la sucrase décompose le sucre saccharose, les lipases décomposent les lipides et les peptidases brisent les liaisons peptidiques. Les enzymes peuvent être divisées en deux catégories selon l'endroit où elles agissent. Les **endoenzymes**, ou enzymes intracellulaires, agissent au sein de la cellule qui les a produites. Les **exoenzymes**, y compris les enzymes extracellulaires, sont synthétisées dans une cellule mais traversent la membrane cellulaire pour agir dans l'espace périplasmique ou dans l'environnement immédiat de la cellule.

## 2. Métabolisme énergétique

Les micro-organismes utilisent en général une des trois sources d'énergie suivantes. Les phototrophes capturent l'énergie radiante du soleil, les chimio-organotrophes oxydent des molécules organiques pour libérer de l'énergie ; tandis que les chimio-lithotrophes emploient comme source d'énergie, des aliments inorganiques.

Les micro-organismes chimio-organotrophes produisent l'énergie, soit par respiration (aérobie ou anaérobie), soit par fermentation ; les chimio-lithotrophes fabriquent de l'énergie par respiration (aérobie ou anaérobie). Les phototrophes convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique par un processus nommé la photosynthèse. On distingue deux catégories de photosynthèse : photosynthèse anoxygénique et photosynthèse oxygénique selon la nature des donneurs d'électrons.

**- Respiration aérobie**

En présence d'oxygène moléculaire et d'un donneur d'électron organique, les **chimio-organotrophes** réalisent la respiration aérobie de molécules organiques. La respiration implique l'activité d'une chaîne de transfert d'électrons. Le passage des électrons tout le long de la chaîne jusqu'à l'accepteur final d'électrons, qu'est **l'oxygène**, génère un type d'énergie potentielle, appelée force-proton motrice (FPM), qui est utilisée pour former de l'ATP à partir d'ADP et de Pi.

La respiration aérobie est une série de réactions (glycolyse, cycle de Krebs et chaîne respiratoire) qui convertissent le glucose en CO<sub>2</sub> et permettent à la cellule de récupérer des quantités importantes d'énergie. La respiration aérobie repose sur l'oxygène libre comme accepteur final d'électrons et d'hydrogène et produit une quantité relativement importante d'ATP.

La respiration aérobie est une série de réactions catalysées par des enzymes dans lesquelles des électrons sont transférés de molécules de carburant telles que le glucose à l'oxygène en tant qu'accepteur final d'électrons. Cette voie constitue le principal système de production d'énergie pour les hétérotrophes aérobies et fournit à la fois de l'ATP et des intermédiaires métaboliques à de nombreuses autres voies de la cellule, notamment celles de la synthèse des protéines, des lipides et des glucides.

- **Glucose : le composé de départ**

Les glucides tels que le glucose sont de bons carburants car ces composés sont facilement oxydés ; c'est-à-dire qu'ils sont de meilleurs donneurs d'hydrogène et d'électrons. Le retrait enzymatique de l'hydrogène enlève également des électrons qui peuvent être utilisés dans les transferts d'énergie. Les produits finaux de la conversion de ces composés carbonés sont de l'ATP riche en énergie et du dioxyde de carbone et de l'eau pauvres en énergie. Les polysaccharides (amidon, glycogène) et disaccharides (maltose, lactose) sont des sources stockées de glucose pour les voies respiratoires. Généralement, on utilise le glucose comme principal composé de départ, d'autres hexoses (fructose, galactose) et sous-unités d'acides gras peuvent également pénétrer dans les voies de la respiration aérobie.

- **Glycolyse : la programmation de départ**

La glycolyse convertit enzymatiquement le glucose en plusieurs étapes en acide pyruvique, un métabolite intermédiaire essentiel. Il s'agit uniquement de la première phase de la respiration aérobie

La glycolyse (gli-kol'i-sis) est également appelée voie Embden-Meyerhof. Le nom glycolyse signifie littéralement fractionnement (lyse) du sucre (glyco-). Au cours de la voie glycolytique quatre événements importants se produisent :

1. Phosphorylation au niveau du substrat (le transfert de groupes phosphate des ATP vers le glucose)
2. Cassation d'une molécule à six carbones (glucose) en deux molécules à trois carbones
3. Le transfert de deux électrons vers le coenzyme NAD
4. La capture de l'énergie dans l'ATP.

- **L'acide pyruvique : un métabolite central**

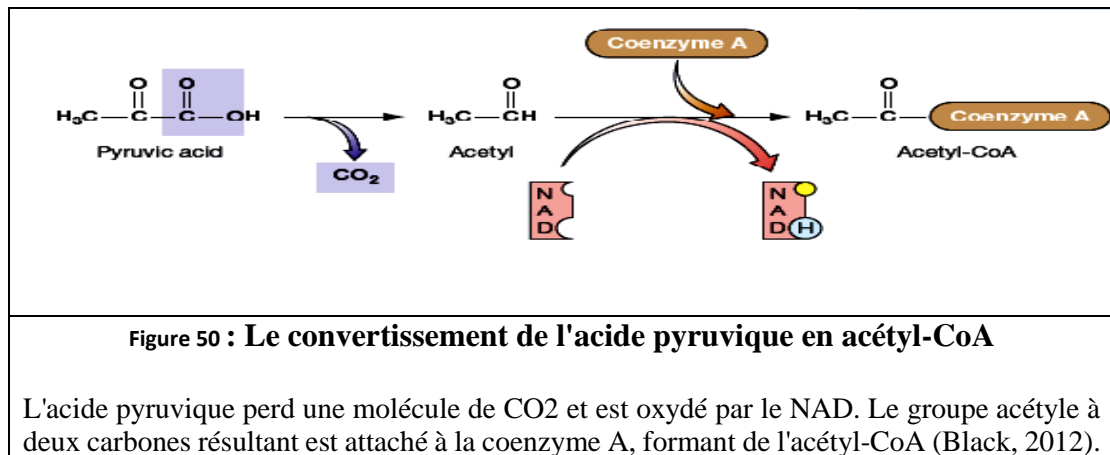
L'acide pyruvique occupe une place importante dans plusieurs voies, et différents organismes le manipulent de différentes manières (figure 57). Dans les organismes strictement aérobies et certains anaérobies, l'acide pyruvique entre dans le cycle de Krebs pour un traitement ultérieur et une libération d'énergie.

- **Le cycle de Krebs : une roue du carbone et de l'énergie**

On a vu que l'oxydation du glucose produit une quantité d'énergie relativement faible et dégage de l'acide pyruvique. L'acide pyruvique est encore riche en énergie, contenant un certain nombre d'hydrogènes et d'électrons extractibles pour alimenter la synthèse de l'ATP, mais cela ne peut être réalisé que grâce au travail des deuxième (cycle de Krebs) et troisième phases (phosphorylation oxydative) de la respiration, au cours desquelles les hydrogènes de l'acide pyruvique sont transférés à l'oxygène, produisant  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ .

Le cycle de Krebs, du nom du biochimiste allemand Hans Krebs, qui en a identifié les étapes à la fin des années 1930, métabolise des unités à deux carbones appelées groupes acétyle en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ . On l'appelle également cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), car certaines molécules du cycle ont trois groupes carboxyle ( $\text{COOH}$ ), ou cycle de l'acide citrique, car l'acide citrique est un intermédiaire important.

Avant que l'acide pyruvique (le produit de la glycolyse) puisse entrer dans le cycle de Krebs, il doit d'abord être converti en acétyl-CoA. Cette réaction complexe implique l'élimination d'une molécule de  $\text{CO}_2$ , le transfert d'électrons vers le NAD et l'ajout de coenzyme A (CoA) (figure 50). Chez les procaryotes, ces réactions se produisent dans le cytoplasme ; chez les eucaryotes, ils se produisent dans la matrice des mitochondries.



Le cycle de Krebs est une séquence de réactions dans lesquelles les groupes acétyl sont oxydés en dioxyde de carbone. Les atomes d'hydrogène sont également éliminés et leurs électrons sont transférés vers des coenzymes qui servent de porteurs d'électrons. (Les hydrogènes sont finalement combinés avec l'oxygène pour former de l'eau.) Chaque réaction du cycle de Krebs est contrôlée par une enzyme spécifique, et les molécules passent d'une enzyme à la suivante au cours du cycle. Les réactions forment un cycle car l'acide oxaloacétique (oxaloacétate), premier réactif, est régénéré en fin de cycle. Lorsqu'un groupe acétyl est métabolisé, l'oxaloacétate se combine avec un autre pour former de l'acide citrique et repasse par le cycle.

Certains événements du cycle de Krebs revêtent une importance particulière :

- L'oxydation du carbone
- Le transfert d'électrons vers les coenzymes
- Capture d'énergie au niveau du substrat

- **Le rendement énergétique**

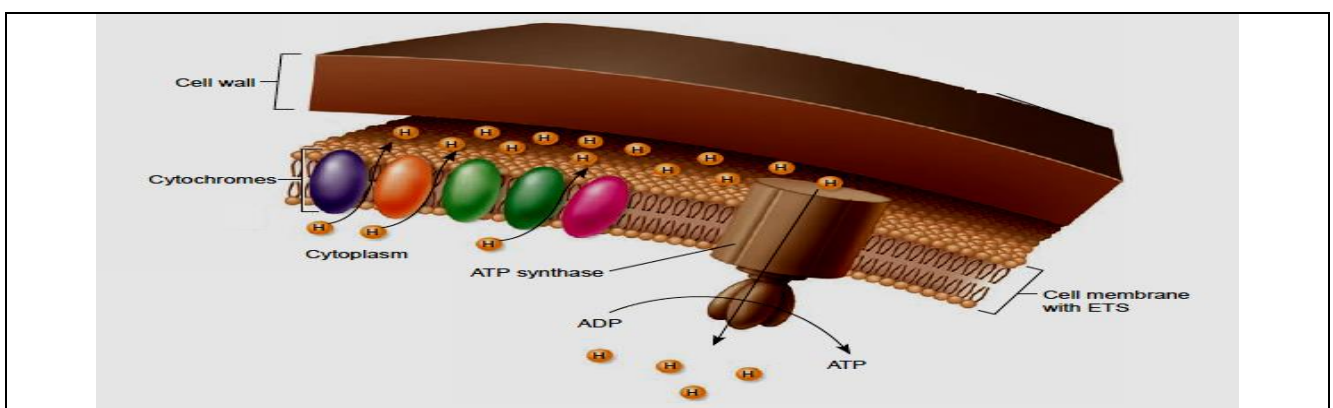
Le rendement théorique de chaque pyruvate est de 2 moles de CO<sub>2</sub>, 3 moles de NADH, 1 mole de flavine adénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>) et 1 mole de guanosine triphosphate (GTP).

Le cycle TCA permet à l'organisme de générer beaucoup plus d'énergie par mole de glucose que ce qui est possible à partir de la glycolyse seule. En plus du GTP (un équivalent de l'ATP) produit par phosphorylation au niveau du substrat, la conversion du NADH et du FADH<sub>2</sub> en NAD et FAD apporte des électrons à la chaîne de transport d'électrons pour produire de l'ATP. Dans cette chaîne, les électrons passent progressivement à travers une série de paires donneur-accepteur (par exemple, des cytochromes) et finalement vers l'oxygène (respiration aérobie) pour produire 3 molécules d'ATP pour chaque molécule de NADH et 2 ATP pour chaque FADH<sub>2</sub>. Alors que la fermentation ne produit que 2 molécules d'ATP par glucose, le

métabolisme aérobie avec transport d'électrons et un cycle complet de TCA peut générer jusqu'à 19 fois plus d'énergie (38 molécules d'ATP) à partir du même matériau de départ (et il est beaucoup moins odorant).

- **La chaîne respiratoire : transport d'électrons et phosphorylation oxydative**

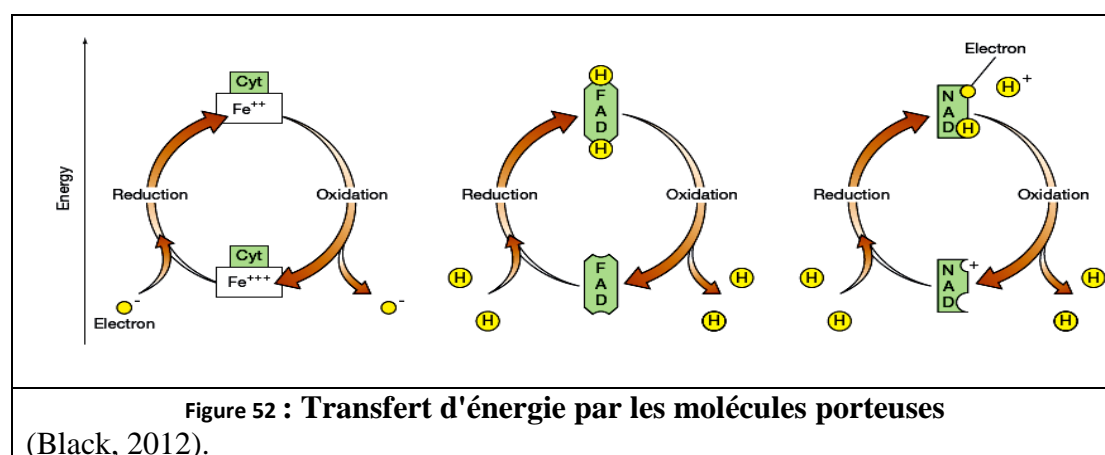
Le système de transport d'électrons (ETS) consiste en une chaîne de porteurs rédox spéciaux qui reçoit les électrons des porteurs réduits (NADH, FADH<sub>2</sub>) générés par la glycolyse et le cycle de Krebs et les transmet de manière séquentielle et ordonnée d'une molécule rédox à la molécule rédox suivante. Le flux d'électrons le long de cette chaîne est très énergétique et permet le transport actif des ions hydrogène vers l'extérieur de la membrane où se trouve la chaîne respiratoire. L'étape qui finalise le processus de transport est l'acceptation des électrons et de l'hydrogène par l'oxygène, produisant de l'eau. Évidemment, ce processus consomme de l'oxygène. Plusieurs types de complexes enzymatiques sont impliqués dans le transport des électrons. Ceux-ci incluent la NADH déshydrogénase, la cytochrome réductase et la cytochrome oxydase. Les porteurs d'électrons comprennent les flavoprotéines (telles que le FAD et le flavine mononucléotide, FMN), les protéines fer-soufre (FeS) et les cytochromes (sy'-toh-kroh-m), protéines contiennent en leur centre un atome métallique (du fer appelé hème) étroitement lié qui participe activement à l'acceptation des électrons et à leur transmission au porteur suivant de la série. Un groupe de porteurs d'électrons non protéiques et liposolubles, appelés quinones, ou coenzymes Q (ubiquinone), se trouvent également dans les systèmes de transport d'électrons. La structure hautement compartimentée de la chaîne respiratoire est un facteur important dans son fonctionnement. Les transporteurs d'électrons et les enzymes sont intégrés dans la membrane cellulaire des procaryotes (figure 51).



**Figure 51 : Le système de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative dans les membranes bactériennes**

À partir de la NADH déshydrogénase, les électrons apportés du cycle de Krebs par le NADH passent le long de la chaîne des transporteurs d'électrons. Chaque paire adjacente de molécules de transport subit une réaction redox. Au transport des électrons s'ajoute le transport actif simultané de H<sup>+</sup> dans le périplasma par des porteurs spécifiques. Ces processus préparent le terrain pour la synthèse de l'ATP et l'acceptation finale des H<sup>+</sup> et e<sup>-</sup> par l'oxygène (Cowan Kelly, 2012).

Les molécules porteuses telles que les cytochromes (cyt) et certaines coenzymes transportent de l'énergie sous forme d'électrons dans de nombreuses réactions biochimiques. Les coenzymes telles que le FAD transportent des atomes d'hydrogène entiers (des électrons avec des protons) ; Le NAD transporte un atome d'hydrogène et un électron « nu ». Lorsque les coenzymes sont réduites (gagnent des électrons), leur énergie augmente ; lorsqu'ils sont oxydés (perdent des électrons), ils diminuent en énergie (figure 52).



Toutes les chaînes de transport d'électrons ne se ressemblent pas ; ils diffèrent d'un organisme à l'autre, et parfois un organisme donné peut avoir plusieurs espèces. Cependant, ils contiennent tous des composés tels que les flavoprotéines et les quinones, qui n'acceptent que les atomes d'hydrogène, et des composés tels que les cytochromes, qui n'acceptent que les électrons. À moins que les électrons ne soient continuellement transférés du NAD et du FAD réduits à l'oxygène via la chaîne de transport d'électrons, ces enzymes ne pourront pas accepter davantage d'électrons du cycle de Krebs et l'ensemble du processus s'arrêtera.

À partir du métabolisme d'une seule molécule de glucose, 10 paires d'électrons sont transportées par le NAD (2 paires provenant de la glycolyse, 2 paires provenant de la conversion de l'acide pyruvique en acétyl-CoA et 6 paires provenant du cycle de Krebs). Deux couples supplémentaires sont transportés par FAD (du cycle de Krebs). Tous ces électrons sont transmis à d'autres porteurs d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons. Ainsi, lors du métabolisme aérobie d'une molécule de glucose, les 10 paires d'électrons du NAD produisent 30 ATP, et 2 paires du FAD produisent 4 ATP, pour un total de 34 ATP. En incluant les 2 molécules d'ATP issues de la glycolyse et les 2 molécules GTP ( $\times 2$  ATP) du cycle de Krebs, on obtient un rendement total de 38 ATP par molécule de glucose. La phosphorylation oxydative, comparée à la fermentation, génère la plus grande quantité d'énergie à partir du glucose. La fermentation, grâce à la production d'ATP au niveau du substrat pendant la glycolyse, ne donne qu'environ 5 % de plus. Le gain net de molécules d'ATP provenant de la fermentation est de 2.

**- Respiration anaérobie**

Au cours de la respiration anaérobie, l'oxygène n'est pas nécessaire, d'autres accepteurs d'électrons terminaux (molécules inorganiques contenant de l'oxygène) sont utilisés à la place de l'oxygène. Le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) peut être converti en  $\text{NH}_4$ , le sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) ou le soufre moléculaire en  $\text{H}_2\text{S}$ , le  $\text{CO}_2$  en méthane, l'ion ferrique en ion ferreux et le fumarate en succinate. Moins d'ATP est produit pour chaque NADH que lors de la respiration aérobie, car le potentiel de réduction-oxydation est moindre pour ces réactions. Ces réactions sont utilisées par les bactéries aéro-tolérantes et les anaérobies facultatives présentes dans le tractus gastro-intestinal et dans d'autres environnements anaérobies.

L'énergie est nécessaire à toutes les formes de vie. Dans des conditions données, les organismes utilisant les sources d'énergie de manière plus efficace deviendront dominants sur les autres. Parmi les procaryotes respiratoires anaérobies, les dénitrifiants conservent plus d'énergie que les autres groupes. Pour cette raison, la sulfidogenèse et la méthanogenèse sont inhibées en présence de nitrate, et le sulfate inhibe la méthanogenèse. Le fer ferrique est ubiquitaire sur Terre et possède un potentiel rédox supérieur à celui du sulfate. En raison de sa disponibilité, le fer ferrique est un accepteur d'électrons plus important que le nitrate. Il a été estimé que plus de la moitié de la dégradation des composés organiques en conditions anaérobies est couplée à la réduction du fer ferrique. Les hydrocarbures halogénés sont généralement toxiques et récalcitrants à la dégradation en conditions aérobie, mais peuvent servir d'accepteurs d'électrons en conditions anaérobies.

**- Fermentation**

Le métabolisme du glucose ou d'un autre sucre par glycolyse est un processus réalisé par presque toutes les cellules. La fermentation est un processus par lequel l'acide pyruvique est ensuite métabolisé en l'absence d'oxygène. La fermentation est le résultat de la nécessité de recycler la quantité limitée de NAD en transmettant les électrons du NAD réduit vers d'autres molécules. Cela se produit par de nombreuses voies différentes (figure 53). Deux des voies les plus importantes et les plus courantes sont la fermentation acide homolactique et la fermentation alcoolique. Ni l'une ni l'autre ne capture l'énergie de l'ATP provenant du métabolisme de l'acide pyruvique, mais les deux voies éliminent les électrons du NAD réduit afin qu'il puisse continuer à agir comme accepteur d'électrons. Ainsi, ils favorisent indirectement la captation d'énergie en entretenant la glycolyse.

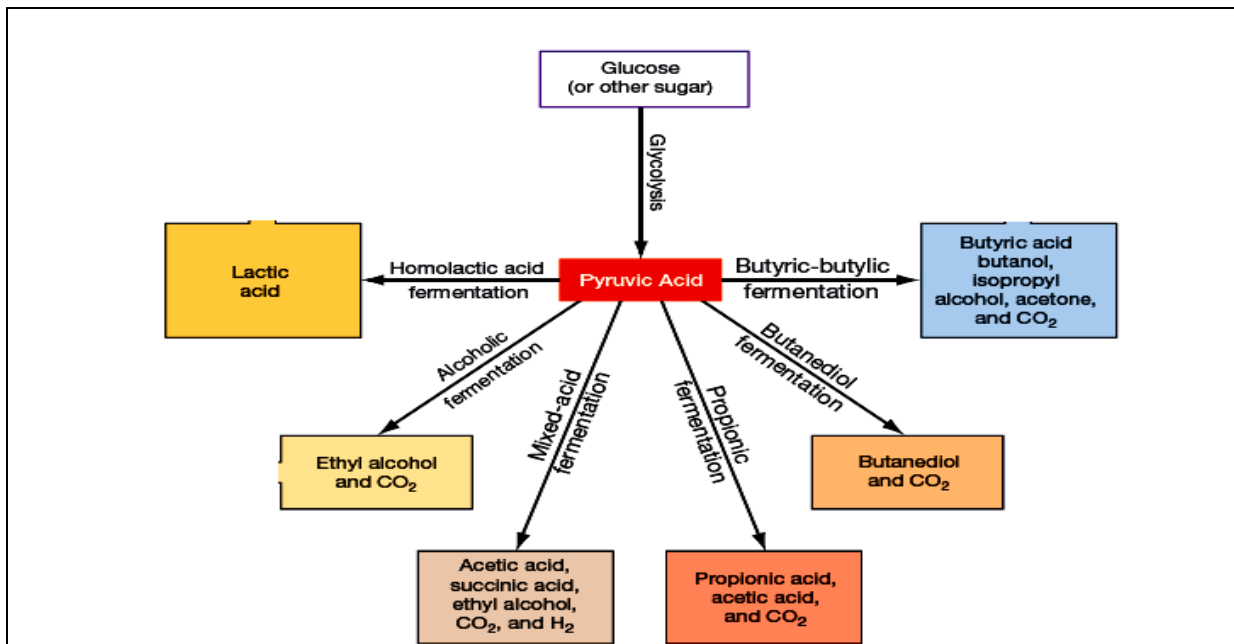


Figure 53 : Voies de fermentation

De nombreuses voies de fermentation différentes existent parmi les micro-organismes (Black, 2012).

#### - Fermentation de l'acide homolactique

La voie la plus simple du métabolisme de l'acide pyruvique est la fermentation homolactique, dans laquelle seul l'acide (homo-)lactique est produit (figure 54). L'acide pyruvique est converti directement en acide lactique, en utilisant les électrons du NAD réduit. Contrairement aux autres fermentations, ce type ne produit aucun gaz. Il se produit dans certains types de bactéries appelées lactobacilles, dans les streptocoques et dans les cellules musculaires des mammifères. Cette voie chez les lactobacilles est utilisée dans la fabrication de certains fromages.

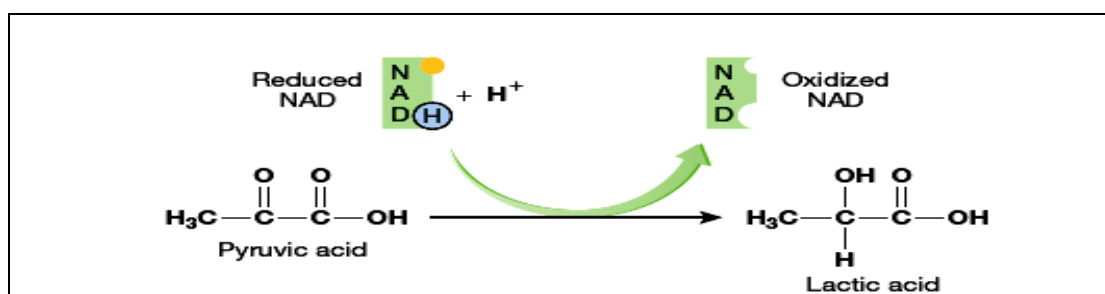


Figure 54 : Fermentation de l'acide homolactique

L'acide pyruvique est réduit en acide lactique par le NAD issu de la glycolyse (Black, 2012).

#### - Fermentation alcoolique

Lors de la fermentation alcoolique (figure 55), le dioxyde de carbone est libéré de l'acide pyruvique pour former l'acétaldéhyde intermédiaire, qui est rapidement réduit en alcool éthylique par les électrons du NAD réduit. La fermentation alcoolique, bien

que rare chez les bactéries, est courante chez les levures et est utilisée dans la fabrication du pain et du vin.

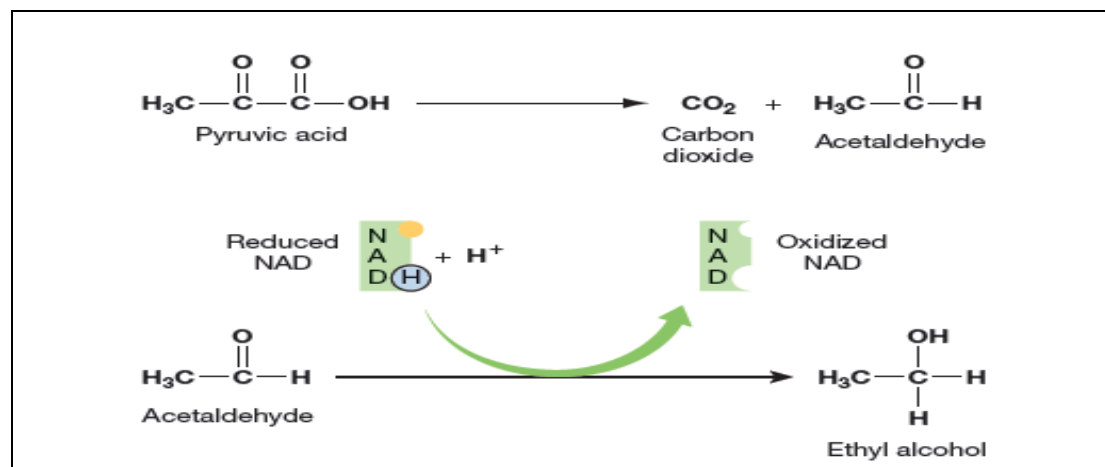


Figure 55 : Fermentation alcoolique.

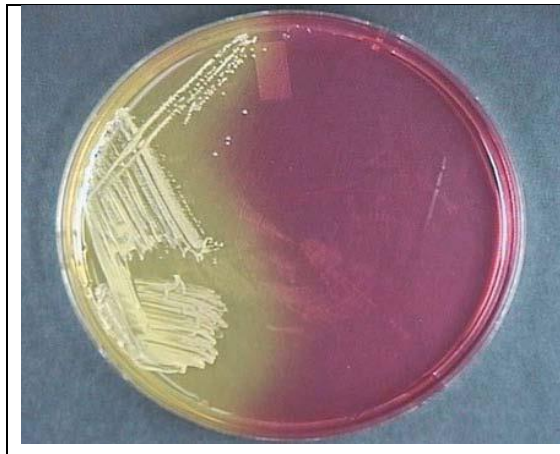
Dans ce processus en deux étapes, une molécule de dioxyde de carbone est d'abord éliminée de l'acide pyruvique pour former de l'acétaldéhyde. L'acétaldéhyde est ensuite réduit en alcool éthylique par NAD (Black, 2012).

#### - Autres types de fermentation

Les autres types de fermentation résumés dans la figure 53 sont réalisés par une grande variété de micro-organismes. L'un des aspects les plus importants de ces processus est qu'ils se produisent dans certains organismes infectieux et que leurs produits sont utilisés pour le diagnostic. Par exemple, le test Voges-Proskauer pour l'acétoïne, un intermédiaire dans la fermentation du butanediol, permet de détecter la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, qui peut provoquer une pneumonie. La fermentation butyricbutylique anaérobie se produit chez les espèces de *Clostridium* qui provoquent le tétanos et le botulisme. La production d'acide butyrique par *Clostridium perfringens* est une cause importante des graves lésions tissulaires de la gangrène. Cette fermentation produit également des odeurs désagréables de beurre rance et de fromage.

La capacité de fermenter des sucres autres que le glucose constitue la base d'autres tests de diagnostic. Un de ces tests (figure 56) utilise le sucre mannitol et l'indicateur de pH rouge de phénol. La bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* fermente le mannitol et produit de l'acide, ce qui fait jaunir le rouge de phénol présent dans le milieu. La bactérie non pathogène *Staphylococcus epidermidis* ne parvient pas à fermenter le mannitol et ne change pas la couleur du milieu.

De nombreux produits formés par ces fermentations et d'autres, tels que l'acide acétique, l'acétone et le glycérol, ont une valeur commerciale.

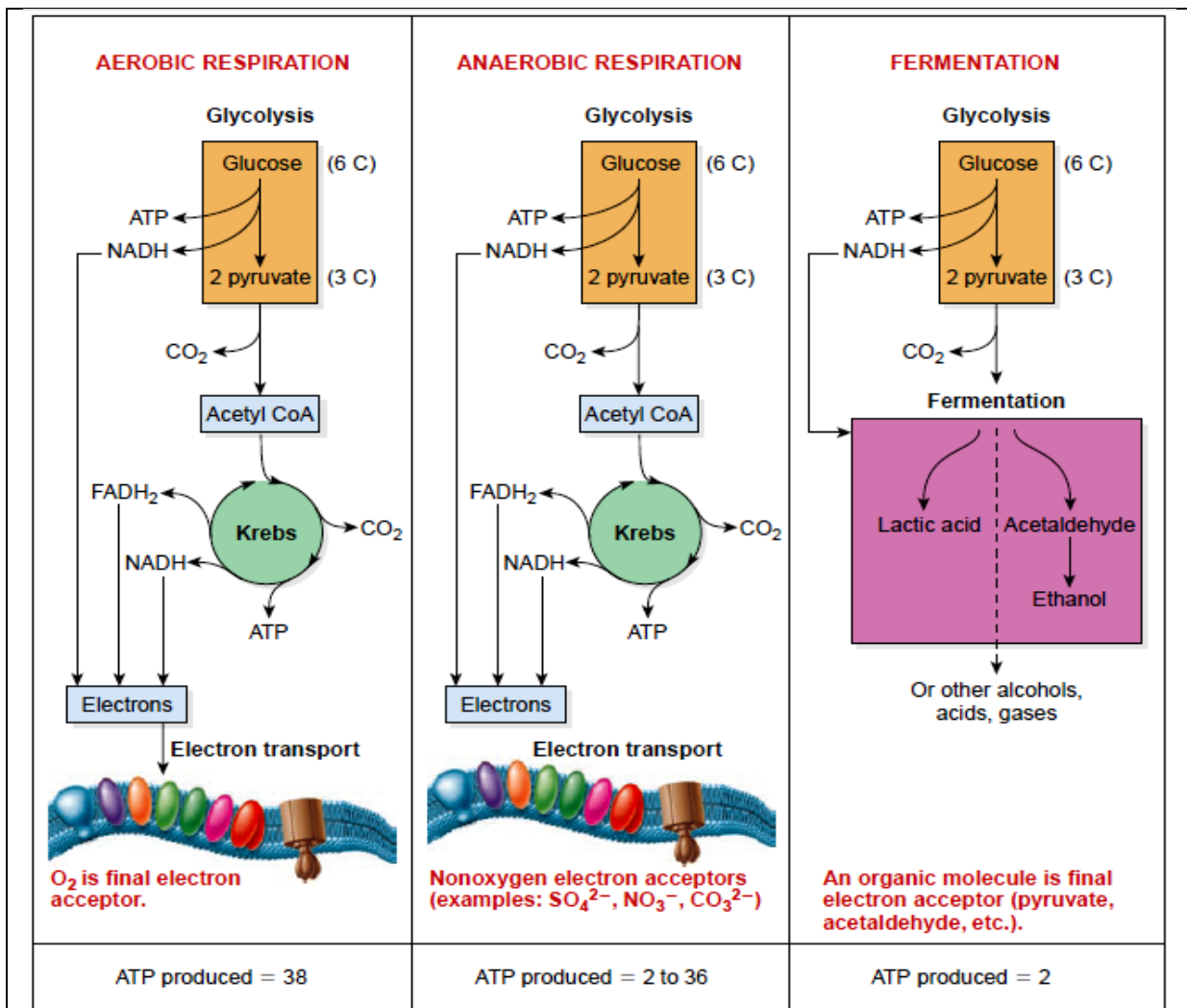


**Figure 56 : Un test de fermentation au mannitol positif (jaune)**

Ce test distingue le *Staphylococcus aureus* pathogène (à droite) de la plupart des espèces de *Staphylococcus* non pathogènes.

*S. aureus* fermente le mannitol, produisant de l'acide qui fait virer l'indicateur de pH (rouge de phénol) dans le milieu au jaune. Le milieu avant inoculation (à gauche) est rouge clair (Black, 2012).

La figure 57 résume des voies les plus courantes du métabolisme du glucose.



**Figure 57 : Résumé des voies les plus courantes du métabolisme du glucose**

La glycolyse est la première étape la plus courante du métabolisme. Il produit deux molécules de pyruvate ainsi que deux ATP et deux NADH. Ces produits alimentent soit le cycle de Krebs, soit la fermentation.

**Remarque** : la respiration aérobie peut parfois produire seulement 36 ATP (Cowan Kelly, 2012).

## - Réactions cataboliques

## • Glycolyse

La glycolyse est l'une des trois voies glycolytiques utilisées pour cataboliser le glucose en pyruvate et elle peut fonctionner pendant la respiration aérobie, la respiration anaérobie et la fermentation. Lorsqu'ils sont utilisés au cours d'un processus respiratoire, les électrons acceptés par le  $\text{NAD}^+$  (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) sont transférés vers une chaîne de transport d'électrons et sont finalement acceptés par un accepteur d'électrons exogène. Lorsqu'ils sont utilisés pendant la fermentation, les électrons acceptés par  $\text{NAD}^+$  sont donnés à un accepteur d'électrons endogène (par exemple, le pyruvate).

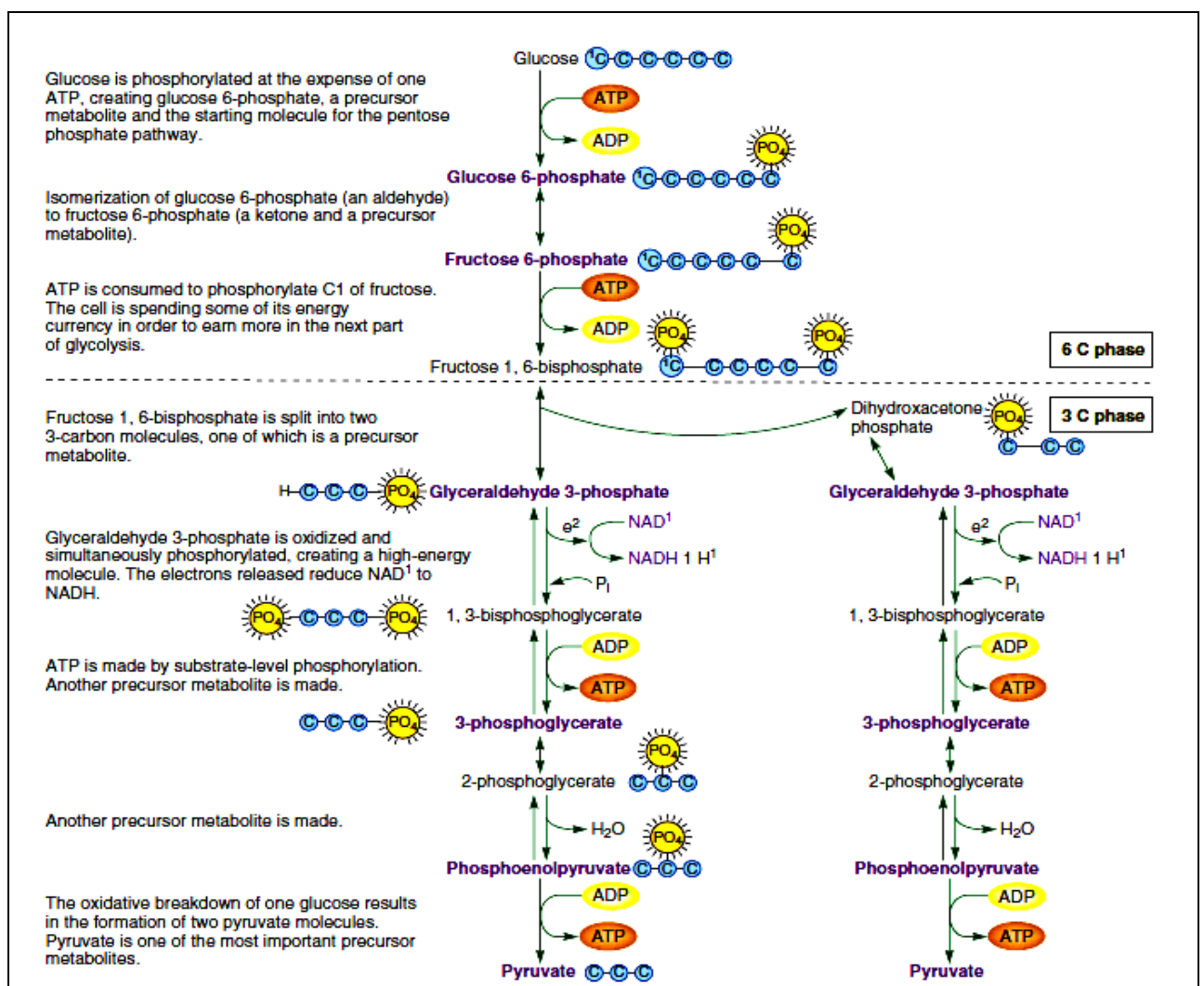
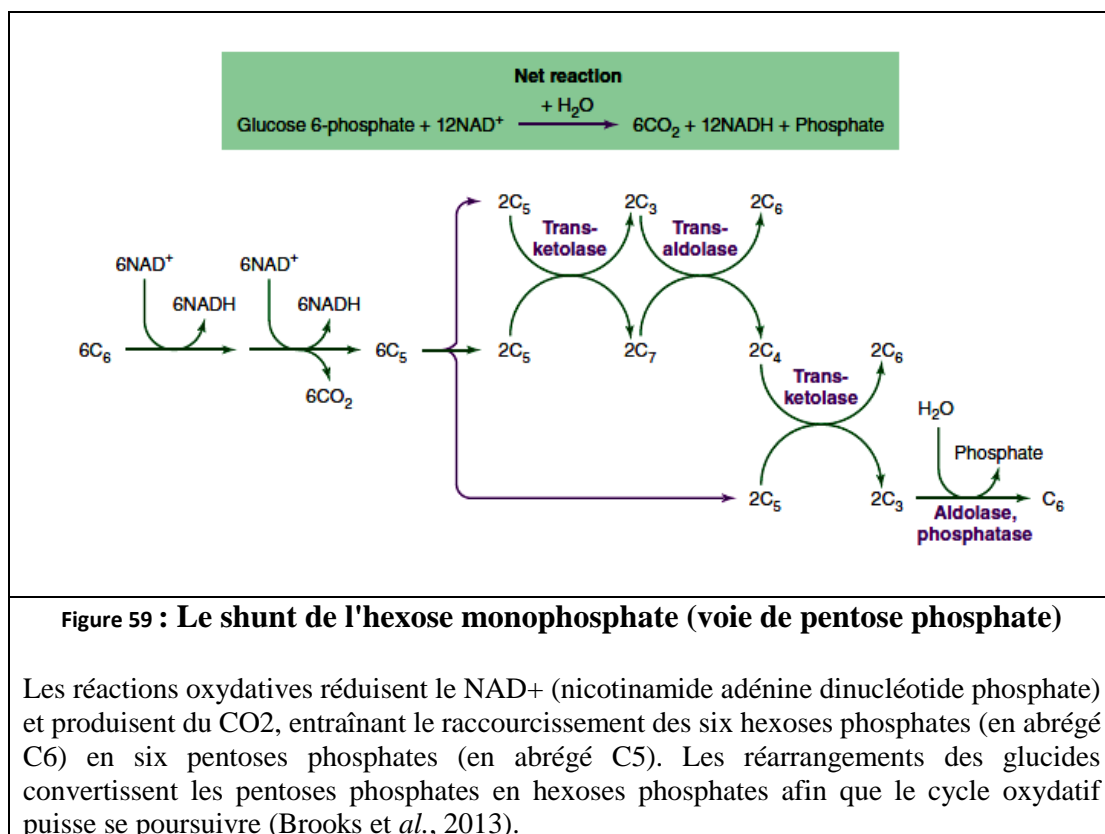


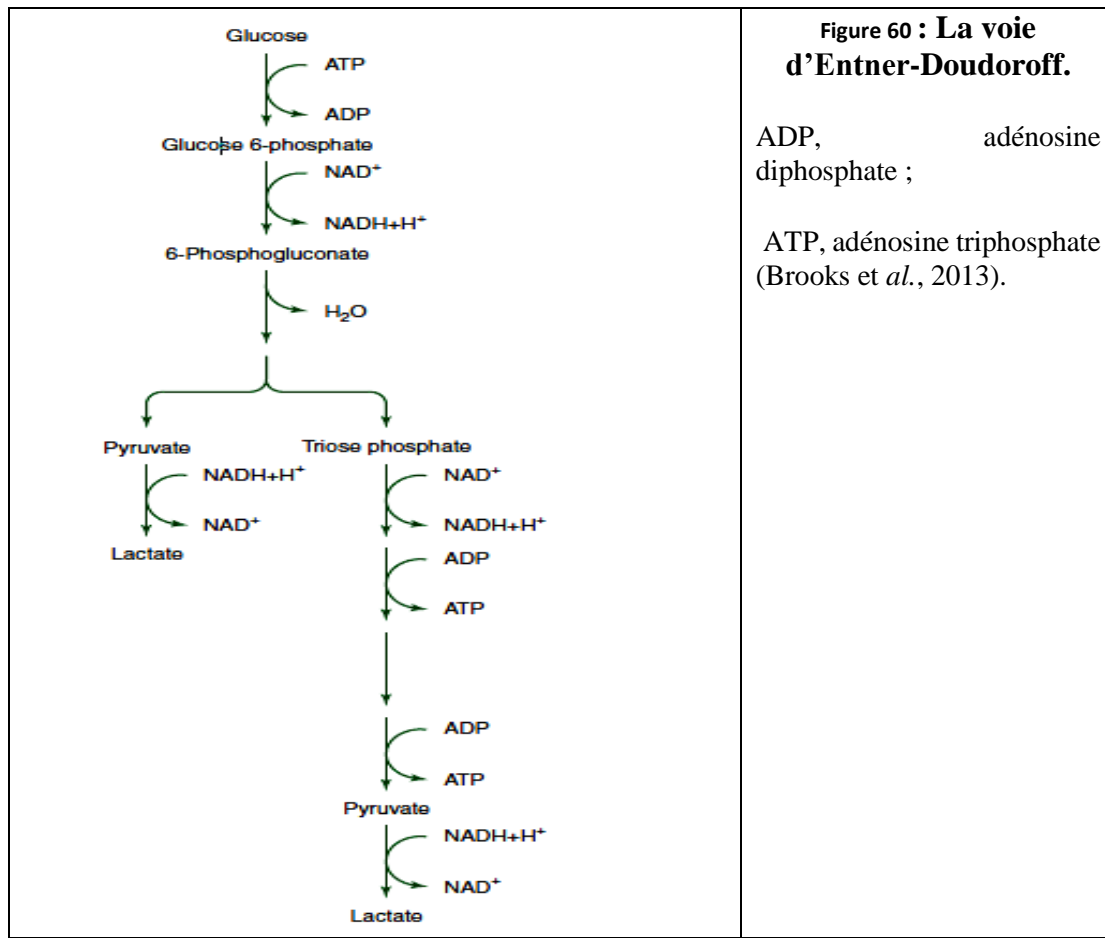
Figure 58 : Les réactions de glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof)

La voie Embden-Meyerhof est également une voie amphibole importante car elle génère plusieurs métabolites précurseurs (représentés en bleu). ADP, adénosine diphosphate ; ATP, adénosine triphosphate (Brooks et al., 2013).

- Alternatives à la glycolyse

Outre la glycolyse, de nombreux micro-organismes possèdent une ou deux autres voies métaboliques pour l'oxydation du glucose. Par exemple, de nombreuses bactéries, dont *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, ont une *voie de pentose phosphate* (shunt de l'hexose monophosphate). Cette voie, qui peut fonctionner en même temps que la glycolyse, décompose non seulement le glucose mais aussi les sucres à cinq carbones (pentoses) (figure 59). Chez quelques espèces de bactéries, dont *Pseudomonas*, les enzymes exécutent la *voie d'Entner-Doudoroff*, qui remplace les voies glycolytique et pentose phosphate. Dans cette voie (figure 60), le glucose passe par une courte série de réactions, dont un intermédiaire (glycéraldéhyde 3-phosphate) passe par les cinq dernières étapes d'une glycolyse typique et produit deux molécules d'ATP en cours de formation d'acide pyruvique.





- **Le cycle de Krebs**

En présence d'oxygène, l'acide pyruvique produit par la glycolyse et par le métabolisme d'autres substrats peut être complètement oxydé (combustion contrôlée) en H<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> en utilisant le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), ce qui entraîne une production d'énergie supplémentaire. Le processus commence par la production d'acétylcoenzyme A (acétyl CoA) et la libération de CO<sub>2</sub> et produit également deux molécules de NADH à partir du pyruvate. Les deux carbones restants dérivés du pyruvate dans l'acétyl CoA entrent ensuite dans le TCA par fixation à l'oxaloacétate pour former la molécule de citrate à six carbones. Dans une série de réactions oxydatives par étapes, le citrate est reconverti en oxaloacétate (figure 61).

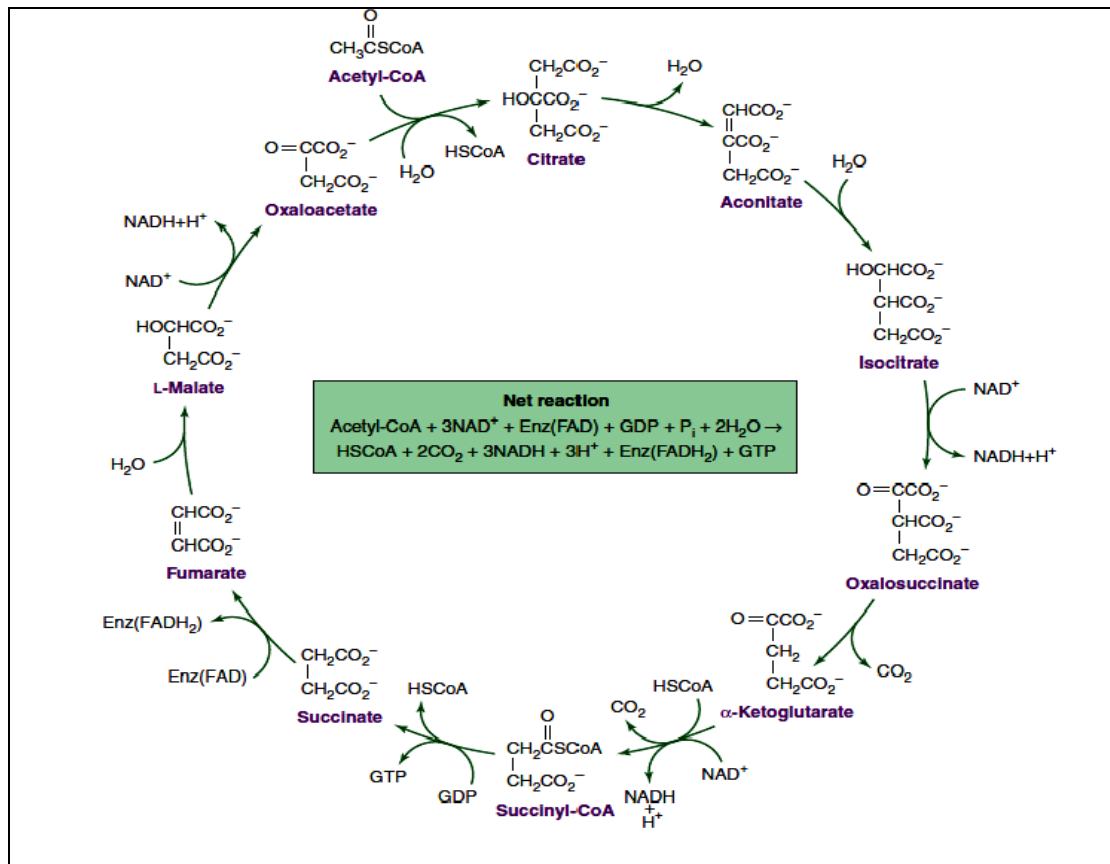


Figure 61 : Le cycle de Krebs [le cycle des acides tricarboxyliques (TCA)]

Il y a quatre étapes oxydatives, trois donnant naissance au NADH (hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide) et une donnant naissance à une flavoprotéine réduite, Enz (FADH<sub>2</sub>). Le cycle ne peut continuer que si des accepteurs d'électrons sont disponibles pour oxyder le NADH et la flavoprotéine réduite. GDP, guanosine diphosphate ; GTP, guanosine triphosphate (Brooks et *al.*, 2013).

- **Rendement potentiel des ATP issus de la phosphorylation oxydative**

Au total, cinq NADH (quatre du cycle de Krebs et un de la glycolyse) peuvent être utilisés pour synthétiser :

15 ATP pour ETS (5 × 3 par paire d'électrons)

et

15 × 2 = 30 ATP par glucose

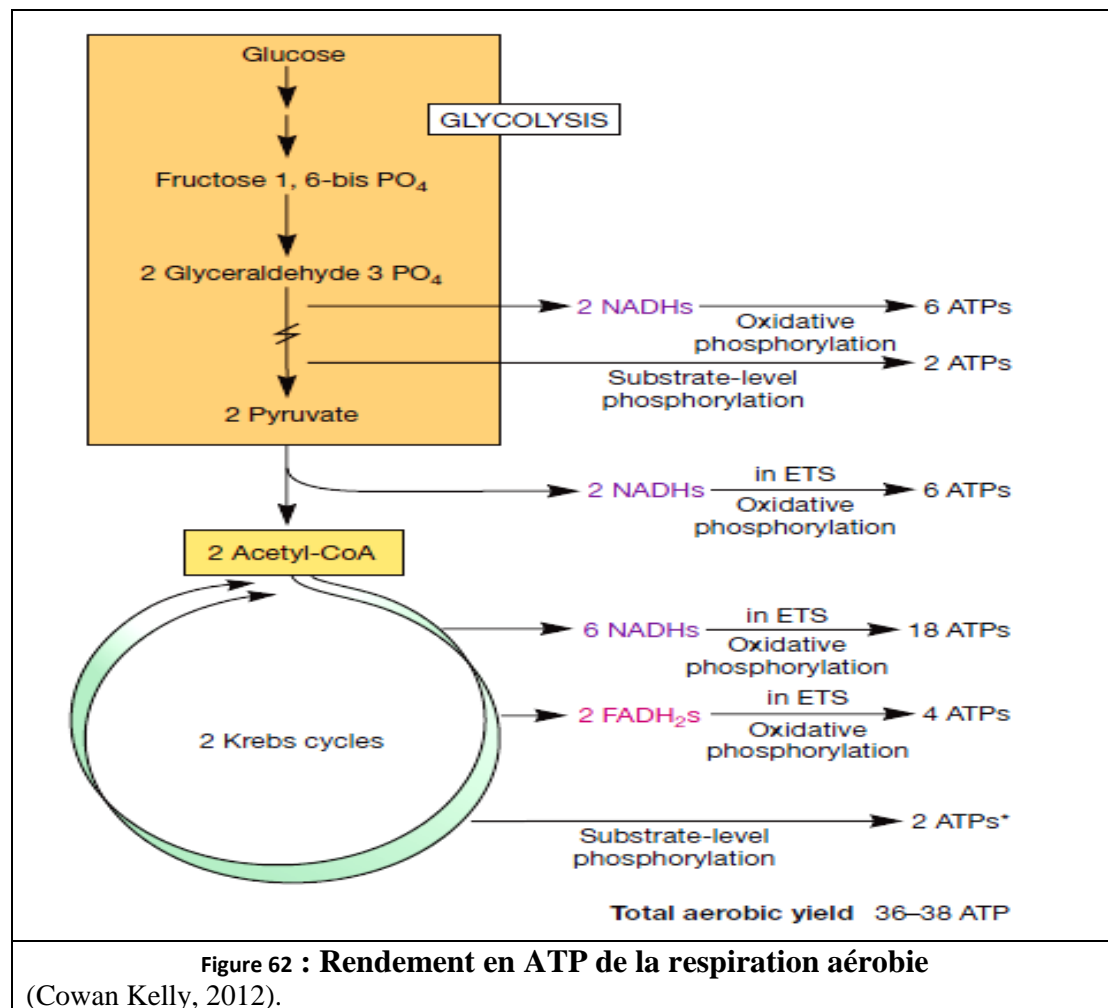
Le seul FADH produit au cours du cycle de Krebs donne lieu à :

2 ATP par paire d'électrons

et

2 × 2 = 4 ATP par glucose

La figure 62 résume le total d'ATP et d'autres produits pour l'ensemble de la voie aérobie. Ces totaux représentent les rendements potentiels possibles mais peuvent ne pas être atteints par de nombreux organismes.



- **Réduction des molécules inorganiques dans la respiration anaérobie**

La respiration est un processus de conservation d'énergie obtenu par phosphorylation par transport d'électrons (ETP) à l'aide d'accepteurs d'électrons fournis de manière externe. Les accepteurs d'électrons utilisés dans la respiration anaérobie comprennent les composés de soufre et d'azote oxydés, les ions métalliques, les halogènes organiques et le dioxyde de carbone.

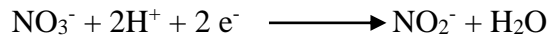
- **Dénitrification**

De nombreuses espèces anaérobies facultatives utilisent le nitrate et le nitrite comme accepteurs d'électrons dans des conditions limitées en oxygène. Les souches de *Paracoccus*, *Ralstonia (Alcaligenes)* et *Pseudomonas* sont les dénitrifiants les plus connus. Ceux-ci métabolisent les glucides par glycolyse et le cycle TCA, tout comme les aérobies. Les électrons de ces voies métaboliques sont consommés en réduisant les nitrates et les nitrites.

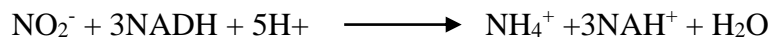
La dénitrification est définie comme un processus microbien réduisant les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) ou les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) pour générer une force motrice de protons dans des

conditions anaérobies. L'azote gazeux (N<sub>2</sub>) est le produit principal avec de petites quantités de NO (oxyde nitrique) et de N<sub>2</sub>O (oxyde nitreux).

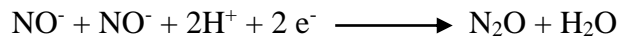
La **nitrate réductase** (NaR) réduit le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> couplé à l'oxydation du quinol.



Par la suite, la **nitrite réductase** (NiR) oxyde le cytochrome c réduit pour réduire le NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en oxyde nitrique (NO).



Deux molécules de NO sont ensuite réduites en oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O) par l'**oxyde nitrique réductase**.



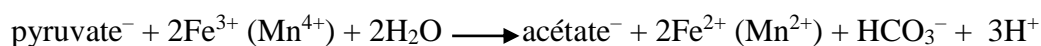
Enfin, l'**oxyde nitreux réductase** réduit le N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub>.



#### - Réduction des métaux

Les microbes réduisent les ions métalliques en tant qu'accepteurs d'électrons (réduction dissimilatrice des métaux) et à des fins biosynthétiques (réduction assimilatrice des métaux), ces deux méthodes pouvant réduire la toxicité des métaux.

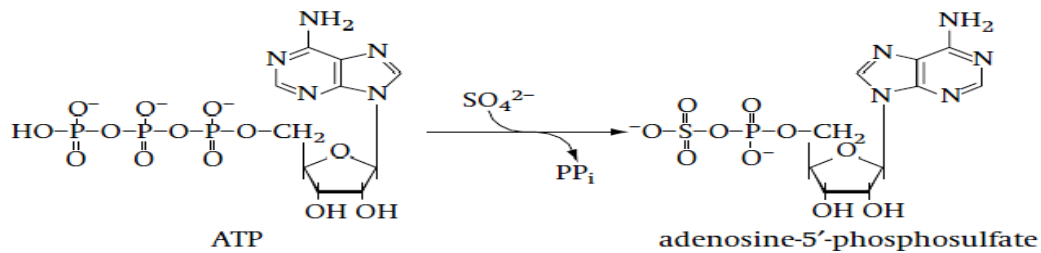
La plupart des réducteurs de Fe(III) et de Mn(IV) utilisent des produits de fermentation tels que l'acétate et le lactate comme donneurs d'électrons, bien que certains utilisent des glucides et du glycérol. L'*algue Shewanella* et *Shewanella oneidensis* oxydent le lactate et le pyruvate en acétate, et les électrons résultants sont consommés pour réduire les ions métalliques.



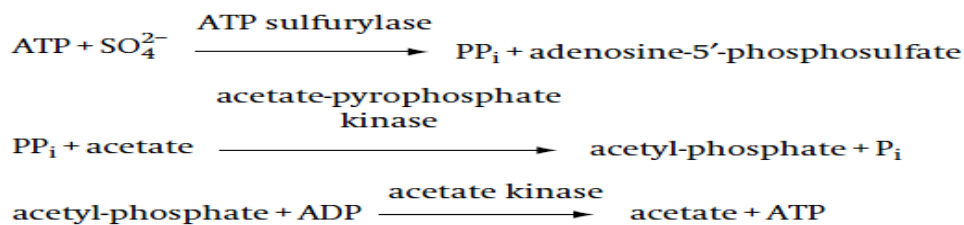
#### - Sulfidogenèse

De nombreuses bactéries et archées utilisent le sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) et le soufre élémentaire (S<sup>0</sup>) comme accepteurs d'électrons. Tous ces organismes sont des anaérobies obligatoires.

Le sulfate est activé en adénosine-5'-phosphosulfate (APS) consommant deux liaisons phosphate à haute énergie de l'ATP.



Le pyrophosphate (PPi) produit par l'ATP sulfurylase est hydrolysé en deux Pi par l'action de la phosphatase inorganique dans la plupart des cas, mais les souches de *Desulfotomaculum* utilisent le PPi pour activer l'acétate en acétyl-phosphate par la réaction catalysée par l'acétate-pyrophosphate kinase.



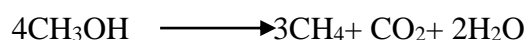
### - Méthanogenèse

Ce processus microbien a été appliqué pour traiter les eaux usées riches en matières organiques. Le CO<sub>2</sub> est l'accepteur d'électrons dans les méthanogènes. Les donneurs d'électrons couramment utilisés par les méthanogènes sont le formiate, le méthanol, l'acétate, les méthylamines, le monoxyde de carbone et le H<sub>2</sub> pour réduire le CO<sub>2</sub>. La majorité des méthanogènes connus se développent grâce à l'énergie libre disponible lors de la réduction du CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> en utilisant H<sub>2</sub> comme donneur d'électrons.  $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$

Ils utilisent du formiate et du CO en plus du CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>. Ceux-ci sont oxydés en CO<sub>2</sub> avant d'être réduits en CH<sub>4</sub>.



Les souches de *Méthanolobus* peuvent utiliser du sulfure de méthyle.



**- Assimilation des substances**

La biosynthèse des micro-organismes exige de grandes quantités de carbone, d'oxygène, de phosphore, de soufre et d'azote. Chacun de ceux-ci est assimilé ou incorporé dans des molécules organiques par des voies différentes

- **Assimilation de l'azote inorganique**

De nombreux constituants cellulaires sont des composés azotés et comprennent des acides aminés et des bases d'acides nucléiques. L'azote existe dans divers états rédox allant de - 5 à + 3. L'azote organique est utilisé préférentiellement par rapport à l'azote inorganique par presque tous les microbes. Lorsque l'azote organique, l'ammoniac ou le nitrate ne sont pas disponibles, certains procaryotes (au sein des bactéries et des archées) peuvent réduire l'azote gazeux en ammoniac pour répondre à leurs besoins en azote. Ce processus est connu sous le nom de fixation de l'azote et n'est pas présent chez les eucaryotes.

- **Assimilation des sulfates**

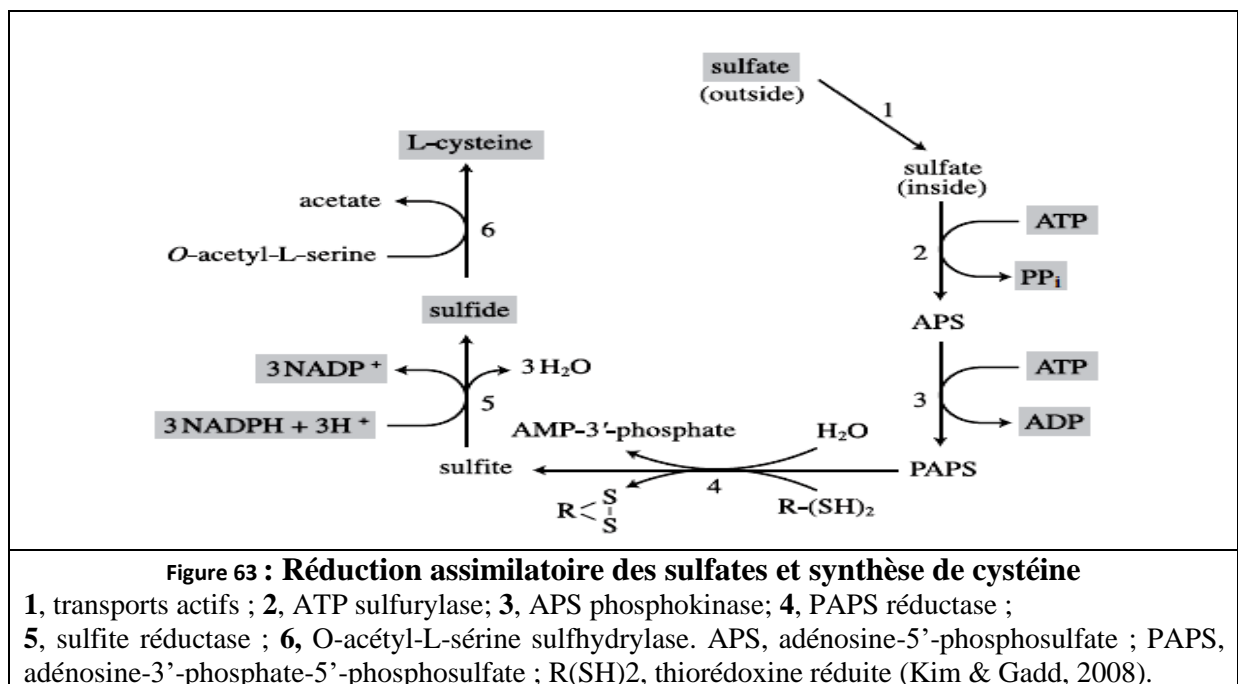
Le soufre est un constituant de certains acides aminés, par ex. la méthionine et la cystéine, ainsi que diverses coenzymes, et jouent également un rôle important dans la chaîne de transport d'électrons dans les protéines fer-soufre. Le sulfate est la principale source de soufre inorganique chez les microbes. Le sulfate doit être réduit en sulfure pour la biosynthèse des composés organiques soufrés. Le sulfate peut être utilisé comme accepteur d'électrons terminal dans un groupe de bactéries anaérobies appelées bactéries sulfato-réductrices. Ce processus est appelé réduction dissimilatoire du sulfate, tandis que la réduction assimilatoire du sulfate est utilisée pour décrire le processus qui utilise le sulfate comme source de soufre. Le sulfate est activé par l'adénosine-5'-phosphosulfate (APS) avec l'ATP comme dans la réduction dissimilatoire du sulfate. Le potentiel rédox ( $E^{0'}$ ) de  $\text{HSO}_4/\text{HSO}_3$  est - 454 mV, ce qui est inférieur à celui de tous les porteurs d'électrons naturels connus. Contrairement à la réduction dissimilatoire, l'APS est en outre activée en adénosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS).

Le sulfate transporté dans la cellule est converti en adénosine-5'-phosphosulfate (APS) dans une réaction catalysée par l'ATP sulfurylase (sulfate adényltransférase). Le  $\text{PPi}$  produit dans la réaction est hydrolysé en  $2\text{Pi}$  par la phosphatase pour amener la réaction à la synthèse d'APS. L'APS est phosphorylée en adénosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS) par l'APS kinase, consommant de l'ATP. La PAPS réductase réduit le PAPS en sulfite, libérant l'AMP-3'-phosphate, en utilisant les électrons de la thiorédoxine réduite. La sulfite réductase réduit davantage le sulfite en sulfure en utilisant le NADPH comme coenzyme. La O-acétyl-L-sérine sulfhydrylase incorpore du sulfure dans la cystéine (figure 63). Tout comme le glutamate et la glutamine

fonctionnent comme donneurs de  $-NH_2$ , la cystéine est utilisée comme donneur de  $-SH$  dans la biosynthèse.

De nombreuses bactéries oxydent le sulfonate organique, les thiols, le sulfure ou le thiophène en sulfate pour les utiliser comme source de soufre en l'absence de sulfate ou d'acides aminés contenant du soufre. Ces propriétés ont été étudiées comme moyen d'éliminer le soufre du pétrole et du charbon.

Chez *Escherichia coli*, un certain nombre de protéines produites dans des conditions limitées en sulfate ont été identifiées. C'est ce qu'on appelle le stimulon induit par la famine en sulfate (SSI).



### - Transport des nutriments dans la cellule bactérienne

Le processus métabolique commence généralement par l'hydrolyse de grosses macromolécules dans l'environnement cellulaire externe par des enzymes spécifiques. Les molécules plus petites produites (par exemple, monosaccharides, peptides courts, acides gras) sont transportées à travers les membranes cellulaires jusqu'au cytoplasme par des mécanismes de transport actifs ou passifs spécifiques du métabolite. Ces mécanismes peuvent utiliser des protéines de transport ou de transport membranaires spécifiques pour aider à concentrer les métabolites du milieu.

Il existe plusieurs mécanismes (systèmes de transport) qui permettent à la cellule de transporter les nutriments vers l'intérieur et les déchets hors de la cellule. Ces systèmes de transport fonctionnent contre un gradient de concentration pour augmenter la concentration de nutriments à l'intérieur de la cellule, une fonction qui nécessite de l'énergie sous une forme ou une autre. Il existe trois mécanismes de transport généraux

impliqués dans le transport membranaire : le transport passif, le transport actif et la translocation de groupe.

- **a. Transport passif** : ce mécanisme repose sur la diffusion, n'utilise aucune énergie et ne fonctionne que lorsque le soluté est à une concentration plus élevée à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule. Les processus passifs comprennent la diffusion simple et la diffusion facilitée.

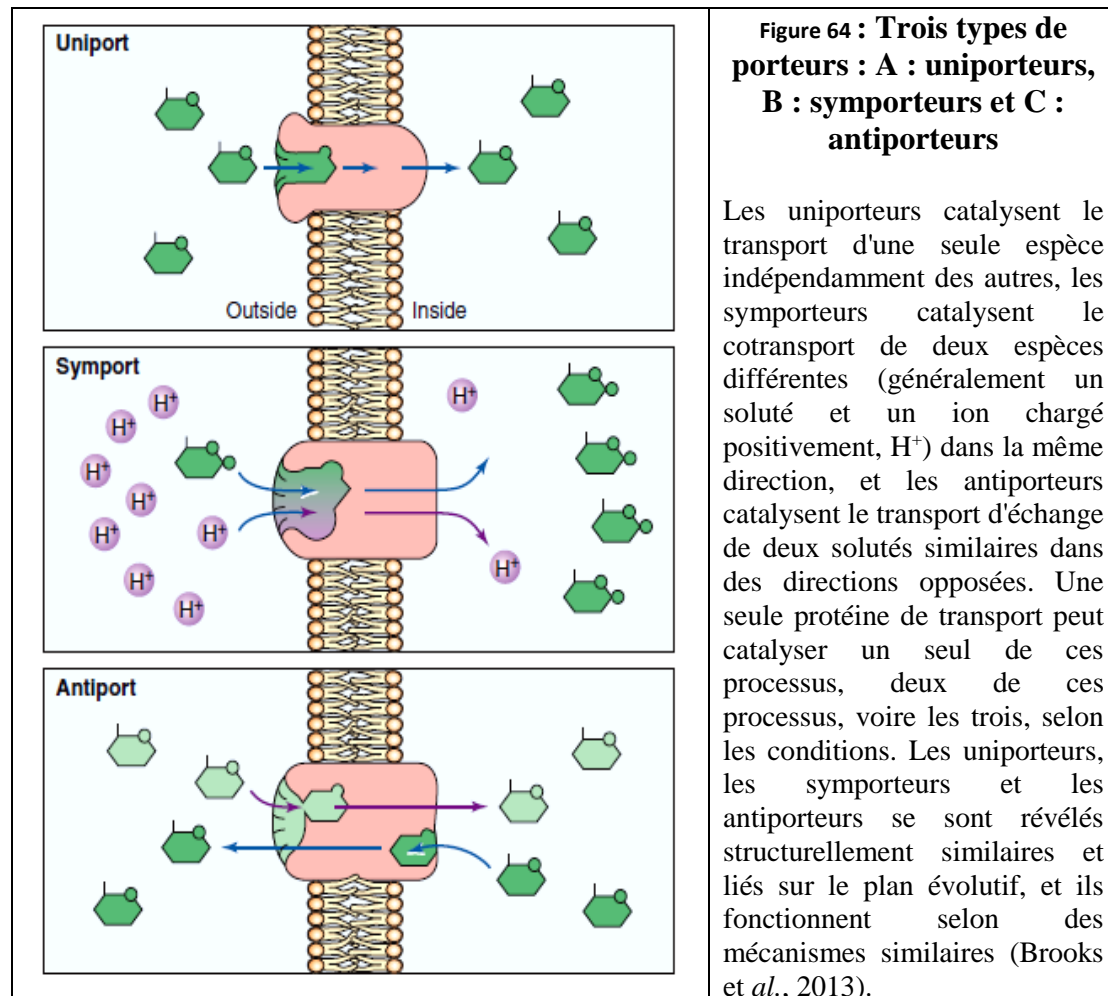
**La simple diffusion** explique l'entrée de très peu de nutriments, notamment l'oxygène dissous, le dioxyde de carbone et l'eau elle-même. La simple diffusion n'apporte ni rapidité ni sélectivité.

**La diffusion facilitée** n'utilise également aucune énergie. La diffusion facilitée est une diffusion selon un gradient de concentration et à travers une membrane avec l'aide de pores spéciaux ou de molécules porteuses. En fait, les membranes contiennent des pores tapissés de protéines qui facilitent le passage de molécules spécifiques. Ainsi, la diffusion facilitée est sélective. La diffusion facilitée est courante chez les micro-organismes eucaryotes (par exemple la levure), mais rare chez les procaryotes. Le glycérol est l'un des rares composés qui pénètre dans les cellules procaryotes par diffusion facilitée.

- **b. Transport actif** : la cellule dépense de l'énergie, ce qui lui permet de transporter des substances contre un gradient de concentration. Le transport actif est important chez les micro-organismes pour déplacer les nutriments présents en faibles concentrations dans l'environnement des cellules. Il nécessite des protéines membranaires qui agissent à la fois comme porteurs et comme enzymes. Ces protéines présentent une spécificité dans la mesure où chaque transporteur transporte une seule substance ou quelques substances étroitement apparentées. Il existe deux types de mécanismes de transport actif selon la source d'énergie utilisée : le transport couplé aux ions et le transport par cassette de liaison ATP (ABC).

**1) Transport couplé aux ions** : ces systèmes déplacent une molécule à travers la membrane cellulaire aux dépens d'un gradient ionique préalablement établi, tel que la force motrice des protons ou du sodium. Il existe trois types de base : uniport, symport et antiport (figure 64). Le transport couplé aux ions est particulièrement courant dans les organismes aérobies, qui ont plus de facilité à générer une force motrice ionique que les anaérobies. Les Uniporteurs catalysent le transport d'un substrat indépendamment de tout ion couplé. Les symporteurs catalysent le transport simultané de deux substrats dans la même direction par un seul transporteur ; par exemple, un gradient  $H^+$  peut permettre le symport d'un ion de charge opposée (par exemple la glycine) ou d'une molécule neutre (par exemple le galactose). Les antiporteurs catalysent le transport simultané de deux composés chargés de la même manière dans des directions opposées par un transporteur commun (par exemple,  $H^+ : Na^+$ ). Environ 40 % des substrats transportés par *E. coli* utilisent ce mécanisme.

2) **Transport ABC** : ce mécanisme utilise l'ATP directement pour transporter les solutés dans la cellule. Chez les bactéries Gram-négatives, le transport de nombreux nutriments est facilité par des protéines de liaison spécifiques situées dans l'espace périplasmique ; dans les cellules à Gram positif, les protéines de liaison sont attachées à la surface externe de la membrane cellulaire. Ces protéines fonctionnent en transférant le substrat lié à un complexe protéique lié à la membrane. L'hydrolyse de l'ATP est alors déclenchée et l'énergie est utilisée pour ouvrir les pores de la membrane et permettre le mouvement unidirectionnel du substrat dans la cellule.



- **c. Translocation de groupe** : en plus du véritable transport, dans lequel un soluté est déplacé à travers la membrane sans changement de structure, les bactéries utilisent un processus appelé translocation de groupe (métabolisme vectoriel) pour effectuer l'absorption nette de certains sucres (par exemple, le glucose et le mannose), le substrat devient phosphorylé pendant le processus de transport. Au sens strict, la translocation de groupe n'est pas un transport actif car aucun gradient de concentration n'est impliqué. Ce processus permet aux bactéries d'utiliser efficacement leurs ressources énergétiques en couplant le transport au métabolisme. Dans ce processus, une protéine porteuse membranaire est d'abord phosphorylée dans le cytoplasme aux dépens du phosphoénolpyruvate ; la protéine porteuse phosphorylée lie ensuite le sucre libre sur

la face extérieure de la membrane et le transporte dans le cytoplasme, le libérant sous forme de sucre phosphate. De tels systèmes de transport du sucre sont appelés systèmes phosphotransférases. Les systèmes de phosphotransférase sont également impliqués dans le mouvement vers ces sources de carbone (chimiotaxie) et dans la régulation de plusieurs autres voies métaboliques (répression des catabolites).

- **d. Procédés de transport spéciaux** : le fer (Fe) est un nutriment essentiel à la croissance de presque toutes les bactéries. Dans des conditions anaérobies, Fe est généralement à l'état d'oxydation +2 et soluble. Cependant, dans des conditions aérobies, Fe est généralement à l'état d'oxydation +3 et insoluble. Les compartiments internes des animaux ne contiennent pratiquement pas de Fe libre ; il est séquestré dans des complexes avec des protéines telles que la transferrine et la lactoferrine. Certaines bactéries résolvent ce problème en sécrétant des sidérophores, des composés qui chélatent le Fe et favorisent son transport sous forme de complexe soluble. Un groupe majeur de sidérophores est constitué de dérivés de l'acide hydroxamique ( $-\text{CONH}_2\text{OH}$ ), qui chélatent très fortement  $\text{Fe}^{3+}$ . Le complexe fer-hydroxamate est activement transporté dans la cellule par l'action coopérative d'un groupe de protéines qui couvrent la membrane externe, le périplasma et la membrane interne. Le fer est libéré et l'hydroxamate peut sortir de la cellule et être réutilisé pour le transport du fer.

Certaines bactéries pathogènes utilisent un mécanisme fondamentalement différent impliquant des récepteurs spécifiques qui se lient à la transferrine et à la lactoferrine de l'hôte (ainsi qu'à d'autres protéines hôtes contenant du fer). Le Fe est éliminé et transporté dans la cellule par un processus dépendant de l'énergie.

#### 4. Métabolisme glucidique

Les micro-organismes sont capables de cataboliser la plupart des glucides, en plus du glucose. Les sources des glucides sont soit intracellulaires soit extracellulaires. Souvent, les premières étapes de dégradation des polymères glucidiques intracellulaires diffèrent de celles des réserves internes.

Pour les monosaccharides (sucres simples), glucose, fructose, mannose et galactose : les trois premiers sont phosphorylés grâce à l'ATP et entrent facilement dans la voie de la glycolyse, le galactose doit être converti en uridine-diphosphate-galactose après la phosphorylation initiale et être ensuite transformé en glucose 6-phosphate dans un processus à trois étapes (figure 65).

Les disaccharides courants sont clivés en monosaccharides par deux mécanismes au moins. Le maltose, le saccharose et le lactose peuvent être directement hydrolysés en leurs monosaccharides constitutifs (figure 65). De nombreux disaccharides (par exemple : le maltose, le cellobiose et le saccharose) sont aussi hydrolysés par une attaque phosphate sur la liaison entre les deux sucres, un processus appelé phosphorolyse.

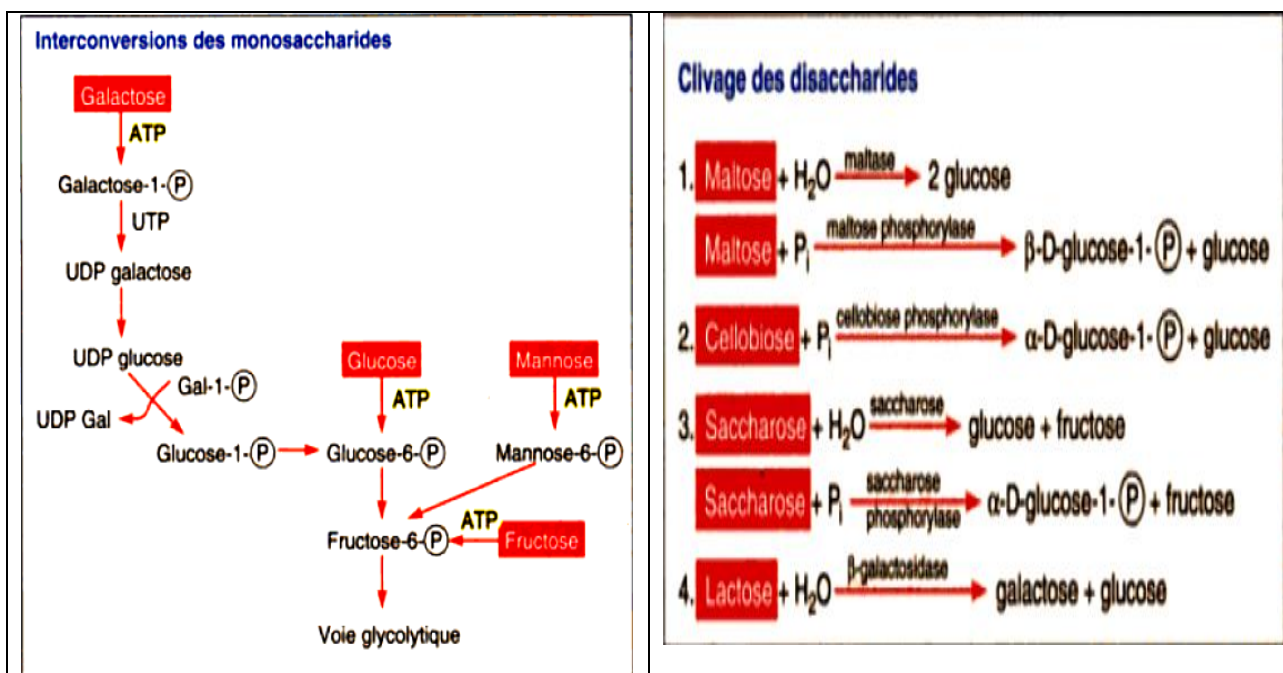


Figure 65 : Le catabolisme des glucides

Exemples d'enzymes et de voies utilisées dans le catabolisme des disaccharides et des monosaccharides. UDP est l'abréviation pour uridine diphosphate (Prescott et *al.*, 2003).

Les polysaccharides, comme les disaccharides, sont clivés par hydrolyse et phosphorolyse. Les bactéries et les mycètes dégradent les polysaccharides externes en sécrétant des enzymes hydrolytiques qui coupent les polysaccharides en petites molécules assimilables. L'amidon et le glycogène sont hydrolysés par des amylases en glucose, maltose et autres produits. La cellulose est plus difficile à digérer ; de nombreux mycètes et quelques bactéries (certaines bactéries mobiles par glissement, des clostridies et des actinomycètes) produisent des cellulase qui hydrolysent la cellulose en cellobiose et glucose.

## 5. Métabolisme protidique

Les protéines peuvent également être métabolisées en énergie (figure 66). Ils sont d'abord hydrolysés en acides aminés individuels par des enzymes protéolytiques (digérant les protéines). Ensuite, les acides aminés sont désaminés, c'est-à-dire que leurs groupes amino sont supprimés. Les molécules désaminées résultantes entrent dans la glycolyse, la fermentation ou le cycle de Krebs.

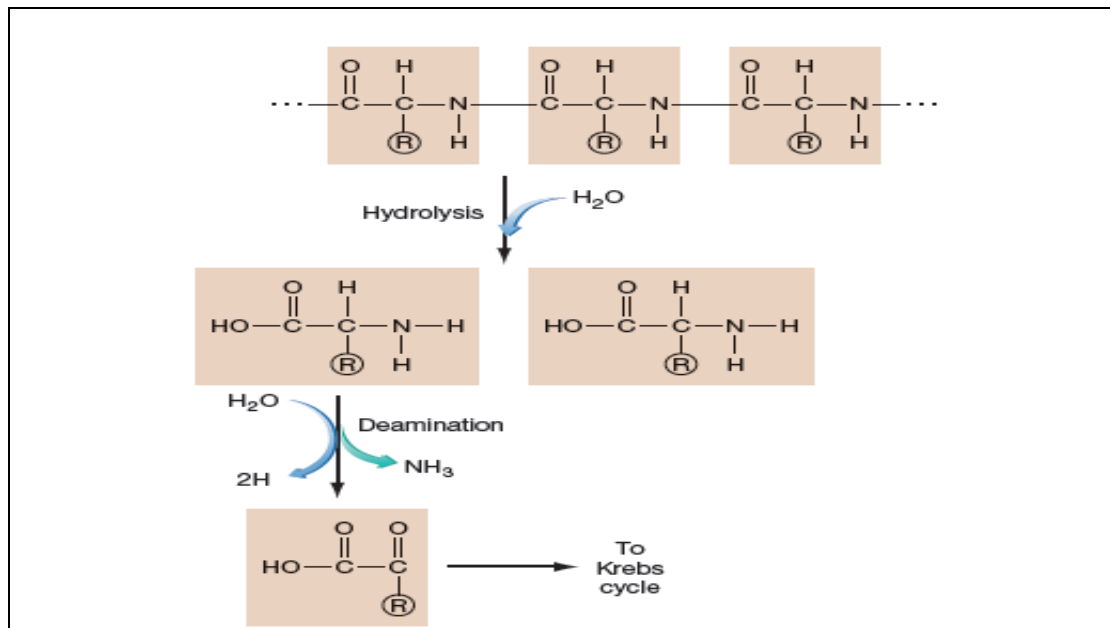


Figure 66 : Le catabolisme des protéines

Les polypeptides sont hydrolysés en acides aminés. Les acides aminés sont désaminés et les molécules résultantes entrent dans les voies menant au cycle de Krebs (Black, 2012).

## 6. Métabolisme lipidique

La plupart des micro-organismes, comme la plupart des animaux, peuvent tirer de l'énergie des lipides. Les exemples suivants donnent une idée générale de la manière dont ces processus se produisent. Les graisses sont hydrolysées en glycérol et en trois acides gras. Le glycérol est métabolisé par glycolyse. Les acides gras, qui contiennent généralement un nombre pair de carbones (16, 18 ou 20), sont décomposés en morceaux de 2 carbones par une voie métabolique appelée bêta-oxydation. Dans ce processus, un acide gras se combine d'abord avec la coenzyme A. L'oxydation du carbone bêta (deuxième carbone du groupe carboxyle) de l'acide gras entraîne la libération d'acétyl-CoA et la formation d'un acide gras plus court de 2 atomes de carbone. Le processus est ensuite répété et une autre molécule d'acétyl-CoA est libérée. L'acétyl Co-A nouvellement formé est ensuite oxydé via le cycle de Krebs pour obtenir de l'énergie supplémentaire (figure 67).

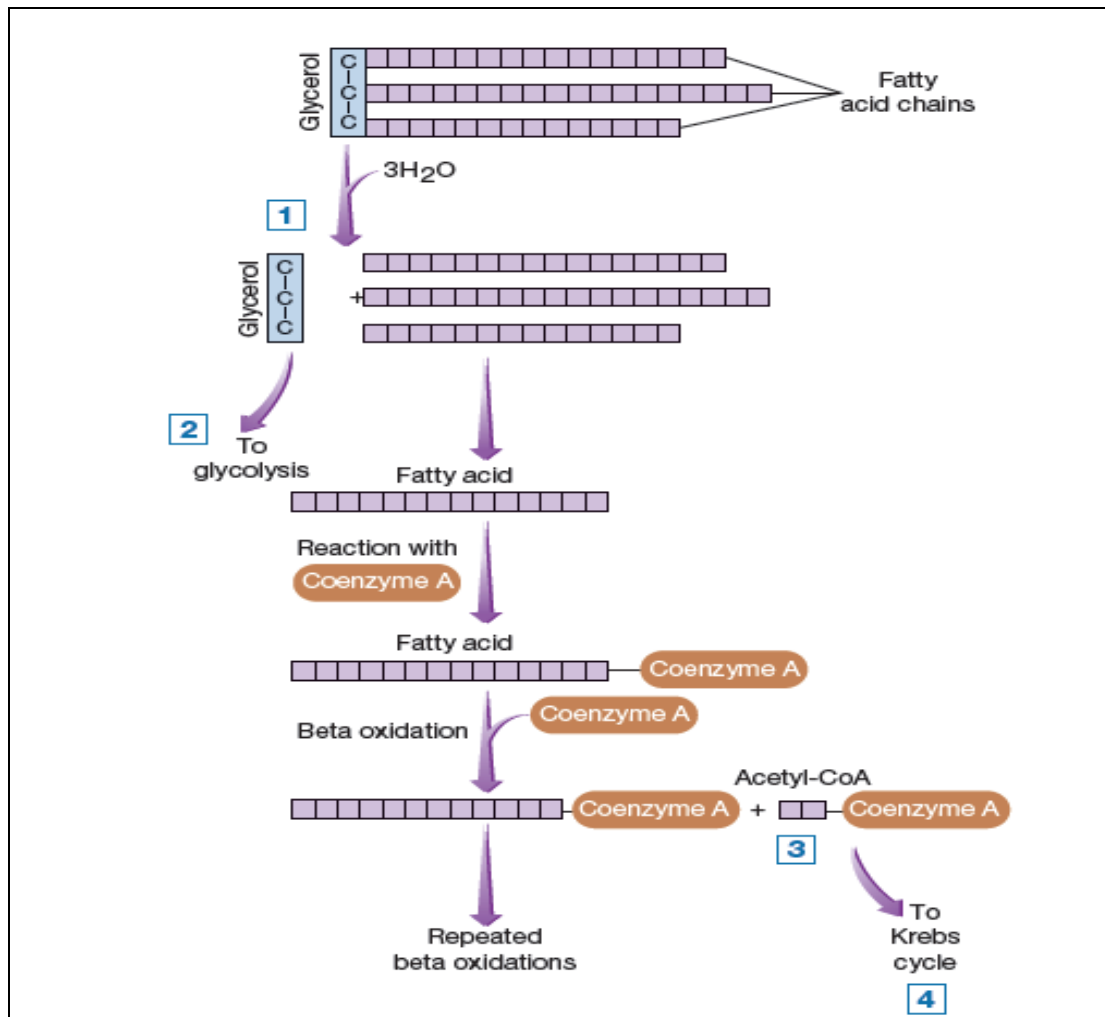


Figure 67 : Le catabolisme des graisses

Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et en acides gras. Le glycérol est dégradé par glycolyse. Les acides gras sont décomposés en unités à 2 carbones et introduits dans le cycle de Krebs, où ils sont métabolisés pour produire de l'énergie supplémentaire (Black, 2012).

## 7. Réactions anaboliques (biosynthèses)

Le processus de biosynthèse, connu sous le nom d'anabolisme, peut être discuté en trois étapes :

- biosynthèse des monomères
- polymérisation de monomères
- assemblage de polymères en structure cellulaire.

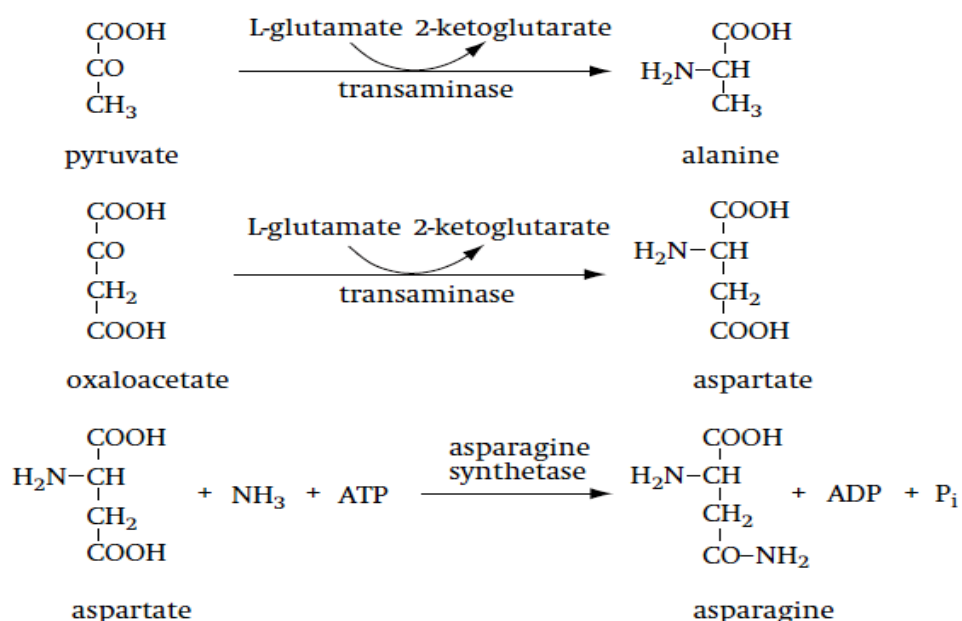
Certaines voies de biosynthèse sont assez complexes.

- **Biosynthèse des acides aminés**

Les acides aminés sont synthétisés à l'aide de squelettes carbonés disponibles dans le métabolisme central. Il s'agit du pyruvate, de l'oxaloacétate, du 2-cétoglutarate,

du 3-phosphoglycérate, du phosphoénolpyruvate, de l'érythrose-4-phosphate et du ribose-5-phosphate. Certains acides aminés sont synthétisés par des voies différentes selon les organismes. La synthèse des acides aminés dans les organismes qui peuvent les fabriquer nécessite souvent de nombreuses réactions, avec une enzyme pour chaque réaction. La synthèse de la tyrosine nécessite pas moins de 10 enzymes, et la synthèse du tryptophane en nécessite au moins 13.

Le pyruvate et l'oxaloacétate sont convertis en alanine et aspartate par des réactions catalysées par les transaminases. Dans ces réactions, le glutamate est utilisé comme donneur de  $-NH_2$ . L'asparagine synthétase synthétise l'asparagine à partir d'aspartate et d'ammoniac en consommant de l'énergie sous forme d'ATP dans une réaction similaire à celle catalysée par la glutamine synthétase.



- **Biosynthèse des nucléotides**

Les nucléotides sont synthétisés soit selon une voie de novo dès le début, soit selon une voie de récupération, recyclant ainsi les bases. Les voies de synthèse pour la fabrication des purines et des pyrimidines sont également complexes. L'absence d'une seule enzyme dans une voie de synthèse peut empêcher la synthèse d'une substance. Toute substance essentielle qu'un organisme ne peut pas synthétiser doit être accessible dans l'environnement, sinon l'organisme mourra. Les enzymes manquantes augmentent ainsi les besoins nutritionnels des organismes.

- **Biosynthèse des glucides et des lipides**

Des micro-organismes de différents types synthétisent également une variété de glucides et de lipides. La vitesse à laquelle ils sont synthétisés varie et dépend de la disponibilité et de l'activité des enzymes. Certains organismes, comme l'*Acétobacter*

aérobie, synthétisent la cellulose, que l'on trouve habituellement dans les plantes. Lorsque les brins de cellulose atteignent la surface cellulaire, ils forment un tapis qui emprisonne les bulles de dioxyde de carbone et maintient la cellule à flot. Parce que ces organismes doivent disposer d'oxygène, le tapis contribue à leur survie en les maintenant près de la surface, où l'oxygène est abondant.

Bien que la plupart des voies anaboliques soient distinctes des voies cataboliques, il existe des **voies amphiboliques** (du grec *amphi*, des deux côtés) qui fonctionnent à la fois dans le sens du catabolisme et de l'anabolisme. Deux des plus importantes de ces voies sont la **glycolyse** et le **cycle des acides tricarboxyliques**. La plupart des réactions dans ces deux voies sont complètement réversibles et peuvent être utilisées pour synthétiser et dégrader des molécules. Les quelques étapes cataboliques irréversibles sont contournées par des enzymes spéciales qui catalysent la réaction inverse. Par exemple, la fructose *bis*phosphatase inverse la réaction catalysée par la phosphofructokinase lors de la synthèse de glucose à partir de pyruvate (figure 68). La présence de deux enzymes, l'une catalysant la réaction inverse de l'autre permet une régulation indépendante des fonctions cataboliques et anaboliques de ces voies amphiboliques.

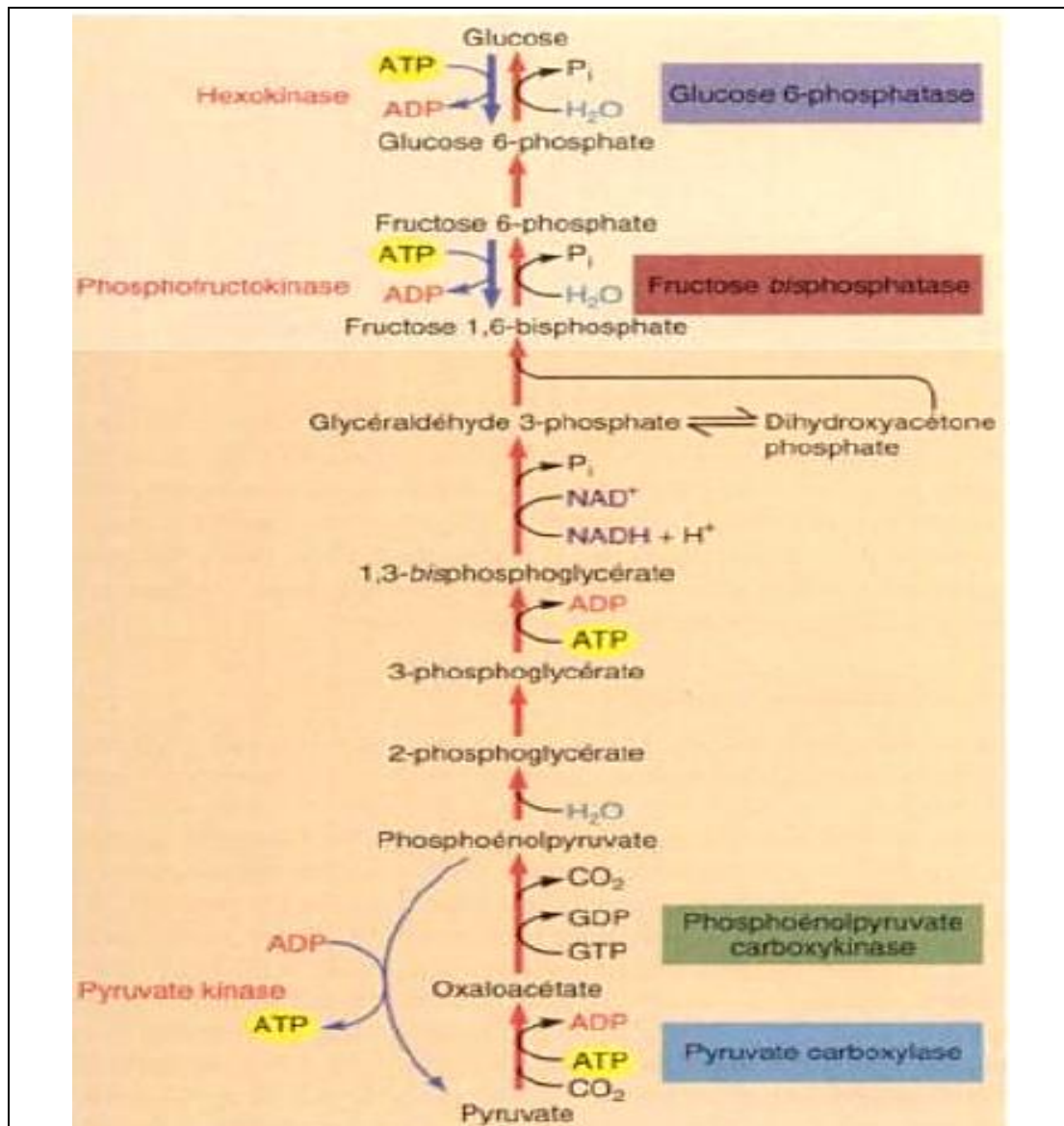


Figure 68 : La gluconéogenèse

La gluconéogenèse est utilisée par beaucoup de micro-organismes. Les noms des 4 enzymes qui catalysent des réactions différentes de celles que l'on trouve dans la glycolyse sont encadrés. Les étapes glycolytiques sont indiquées en bleu pour faciliter la comparaison (Prescott et *al.*, 2003).

- **Biosynthèse des polysaccharides et assemblage des structures de surface cellulaire**

De nombreuses bactéries synthétisent du peptidoglycane, du lipopolysaccharide et d'autres polymères associés aux parois cellulaires. Certaines bactéries forment des capsules, notamment dans les milieux contenant du sérum ou de grandes quantités de sucre. Les capsules sont généralement constituées de polymères d'un ou plusieurs monosaccharides. Cependant, chez *Bacillus anthracis*, la bactérie responsable du charbon, la capsule est un polypeptide d'acide glutamique.

## Chapitre 5 : La Génétique bactérienne

La génétique bactérienne est l'étude de l'hérédité des bactéries. L'unité de base de l'hérédité est le gène, un segment d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui code dans sa séquence nucléotidique des informations pour une propriété physiologique spécifique. C'est une science très vaste qui explore :

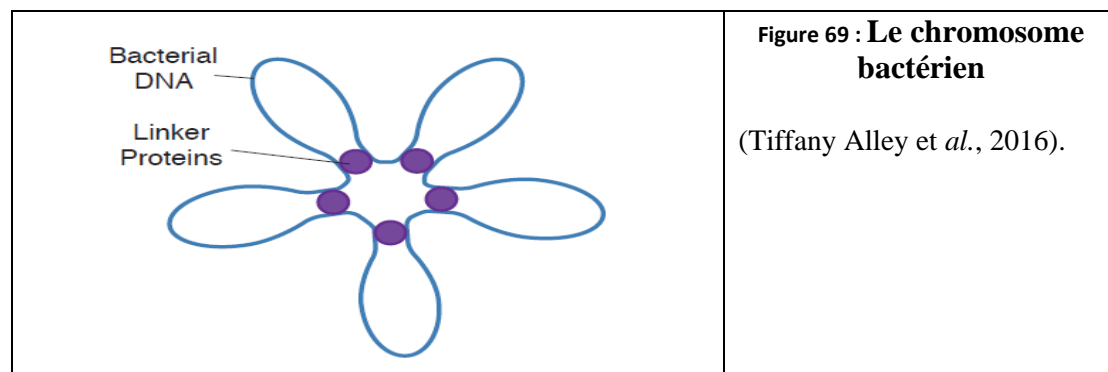
1. la transmission de propriétés biologiques (caractères) du parent à la progéniture ;
2. l'expression et la variation de ces traits ;
3. la structure et la fonction du matériel génétique ;
4. comment ce matériau change.

### 1. Information génétique

Toutes les informations nécessaires à la vie sont stockées dans le matériel génétique d'un organisme, l'ADN. Pour expliquer l'hérédité – la transmission de cette information d'un organisme à sa descendance (progéniture) – nous devons considérer la nature des chromosomes et des gènes.

#### - ADN chromosomique

La plupart des bactéries n'ont qu'un seul chromosome (elles sont donc haploïdes), mais il est possible qu'une cellule contienne plusieurs copies de ce chromosome à la fois. La plupart des chromosomes bactériens sont une grosse molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) double brin, qui se présente sous la forme d'un cercle fermée de manière covalente (environ 1 000 fois plus longue que la cellule elle-même). Pourtant, le chromosome bactérien n'occupe qu'environ un tiers à la moitié du volume de la cellule. Le chromosome est condensé et organisé en boucles autour d'un centre protéique ressemblant à des histones (figure 69). Une topoisomérase (1 coupure) détendra uniquement la boucle coupée, permettant la synthèse ou la transcription de l'ADN simple brin.



Les chromosomes de toutes les cellules sont subdivisés en paquets d'informations de base appelés **gènes**. Un gène peut être défini sous plusieurs angles. En génétique classique, le terme fait référence à l'unité fondamentale de l'hérédité responsable d'un trait donné dans un organisme. Au sens moléculaire et biochimique, il s'agit d'un site sur le chromosome qui fournit des informations sur une certaine fonction cellulaire. Plus précisément encore, il est traditionnellement caractérisé comme un certain segment d'ADN qui contient le code nécessaire pour fabriquer une protéine ou une molécule d'ARN. Avec de nouvelles découvertes dans le domaine de l'expression des gènes, nous préférons désormais parler d'un gène comme un segment d'ADN contenant le code permettant de fabriquer un groupe de protéines ou d'ARN apparentés.

Les gènes se répartissent en trois catégories de base : les gènes structurels qui codent pour les protéines, les gènes qui codent pour la machinerie à ARN utilisée dans la production de protéines et les gènes régulateurs qui contrôlent l'expression des gènes. La somme de tous ces types de gènes constitue la constitution génétique distinctive d'un organisme, ou génotype (jee'-noh-tɪp). L'expression du génotype crée des traits (certaines structures ou fonctions) appelés phénotype (fee'-noh-tɪp). Tout comme une bactérie hérite une combinaison de gènes (génotype) qui dirigent la formation d'un flagelle (phénotype) et un virus contient des gènes pour sa structure de capsid. Tous les organismes contiennent plus de gènes dans leurs génotypes que ce qui se manifeste sous forme de phénotype à un moment donné. En d'autres termes, le phénotype peut changer en fonction des gènes « activés » (exprimés).

Généralement, les chromosomes bactériens mesurent 1 mm ou plus et contiennent environ 1 000 à 3 000 gènes. (*E. coli* a environ 4 500 kbases). Tous les gènes essentiels se trouvent sur le chromosome bactérien.

### - Plasmides

Les plasmides sont des éléments génétiques extra-chromosomiques présents dans les bactéries. Les plasmides ressemblent généralement à des chromosomes mais sont beaucoup plus petits (1,5 à 400 Kbases) et mesurent environ 0,1 à 1,0 % de la taille d'un chromosome bactérien, et quelques-uns sont plutôt linéaires que circulaire. Ils se répliquent de manière autonome (indépendamment du chromosome) dans les cellules bactériennes, de sorte que les deux cellules filles contiennent une copie du plasmide après la fission binaire. Une sous-classe de plasmides, appelées épisomes, peut être intégrée à l'ADN bactérien. Les épisomes ont des séquences d'insertion correspondant à celles du chromosome bactérien. Les plasmides contiennent des gènes non essentiels à la vie bactérienne mais portent le matériel génétique d'une variété de gènes supplémentaires qui confèrent généralement à la cellule un avantage en matière de survie dans certaines conditions environnementales ; les bactéries possédant le plasmide en question seraient donc sélectionnées lorsque de telles conditions existent. Les propriétés qui peuvent être codées par les plasmides incluent la capacité à utiliser des sucres ou des sources alimentaires inhabituelles, la production de pili qui facilitent

la fixation d'une cellule à un substrat (par exemple l'épithélium intestinal), les gènes de fertilité dirigeant la conjugaison (opéron *tra*), de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques et la plupart des exotoxines bactériennes.

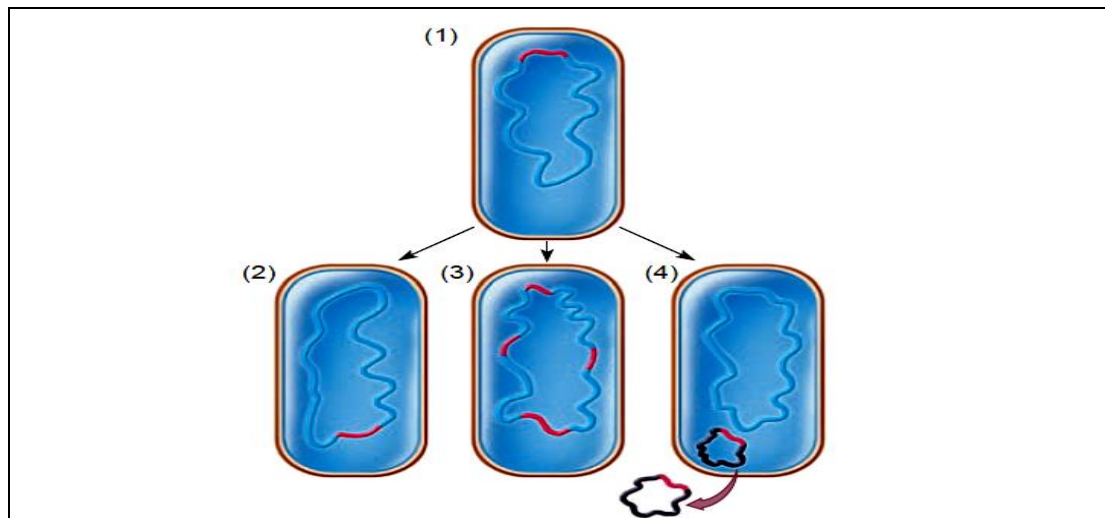
Une cellule peut contenir plusieurs copies d'un plasmide et peut contenir deux ou plusieurs plasmides différents. Cependant, certaines combinaisons de plasmides ne peuvent pas coexister à l'intérieur d'une même cellule et sont dites incompatibles ; ce phénomène permet de classer les plasmides en groupes d'incompatibilité. Les plasmides peuvent être transmis d'une cellule à une autre par divers moyens. Certains plasmides présentent un degré marqué de spécificité d'hôte et ne peuvent être transmis qu'entre différentes souches de la même espèce, bien que d'autres, en particulier ceux que l'on trouve couramment dans les bactéries intestinales à Gram négatif, puissent se croiser entre différentes espèces au sein d'un genre ou entre différents genres. Les plasmides conjugatifs (autotransmissibles) codent pour des gènes qui facilitent leur propre transmission d'une cellule à une autre par la production de pili. Ces pili sexuels établissent d'abord un contact entre les deux cellules, puis se rétractent, rapprochant les cellules donneuses et receveuses jusqu'à ce que la fusion membranaire se produise.

Les cercles d'ADN fermés de manière covalente (chromosomes bactériens et plasmides), qui contiennent les informations génétiques nécessaires à leur propre réplication, sont appelés **réplicons**.

#### - Transposons

Un type de transfert génétique d'un grand intérêt implique des éléments transposables, ou transposons. Les transposons sont des éléments génétiques qui contiennent plusieurs gènes, dont ceux nécessaires à leur migration (se déplacer) d'une partie du génome à une autre et sont donc appelés « gènes sauteurs ».

Tous les transposons partagent la caractéristique générale de voyager d'un endroit à un autre sur le génome : d'un site chromosomique à un autre, d'un chromosome à un plasmide, ou d'un plasmide à un chromosome (figure 70). Étant donné que les transposons peuvent se produire dans les plasmides, ils peuvent également être transmis d'une cellule à une autre chez les bactéries et quelques eucaryotes. Certains transposons se répliquent avant de passer à l'emplacement suivant, tandis que d'autres se déplacent simplement sans se répliquer au préalable.



**Figure 70 : Transposons : segments changeants du génome**

- (1) Un transposon existe sous la forme d'un petit morceau d'ADN intégré au chromosome de la cellule hôte.
- (2) Le transposon peut s'exciser et se déplacer d'un endroit à un autre dans le génome, en se maintenant à une seule copie par cellule.
- (3) Il peut également se répliquer avant de se déplacer, entraînant une augmentation du nombre de copies et un effet plus important sur le génome de l'hôte.
- (4) Enfin, le transposon peut sauter vers un plasmide, qui peut ensuite être transféré vers une autre cellule bactérienne (Cowan Kelly, 2012).

Les transposons contiennent de l'ADN qui code pour les enzymes nécessaires pour éliminer et réintégrer le transposon sur un autre site du génome. Encadrant la région codante de l'ADN se trouvent des séquences appelées répétitions en tandem, qui marquent le point auquel le transposon est retiré ou réinséré dans le génome. Les plus petits transposons (0,75 à 2,0 kpb de long) sont constitués uniquement de ces deux séquences génétiques et sont souvent appelés éléments d'insertion (également appelés éléments de **séquence d'insertion [IS]**). Un type de transposon appelé rétrotransposon peut transcrire l'ADN en ARN puis le retranscrire en ADN pour une insertion dans un nouvel emplacement. D'autres transposons contiennent des gènes supplémentaires qui confèrent des caractéristiques telles que la résistance aux antibiotiques ou la production de toxines.

L'effet global des transposons – brouiller le langage génétique – peut être bénéfique ou néfaste, en fonction de variables telles que l'endroit où l'insertion se produit dans un chromosome, les types de gènes déplacés et le type de cellule impliqué. Chez les bactéries, les transposons sont connus pour être impliqués dans :

1. changements dans les caractères tels que la morphologie des colonies, la pigmentation et les caractéristiques antigéniques ;
2. remplacement de l'ADN endommagé ;
3. le transfert inter-bactérien de la résistance aux médicaments.

### - Intégrons

De nombreux gènes de résistance des bactéries Gram-négatifs se trouvent dans des cassettes génétiques. Une ou plusieurs de ces cassettes peuvent être intégrées dans une position spécifique sur le chromosome appelée intégron. Plus de 60 cassettes ont été identifiées, chacune ne comprenant qu'un seul gène sans promoteur (généralement une résistance aux antibiotiques) et un élément de 59 bases formant un site de recombinaison spécifique. Ce site de recombinaison confère la mobilité car il est reconnu par des recombinases spécifiques codées par les intégrons qui catalysent l'intégration de la cassette dans un site spécifique au sein de l'intégron. Ainsi, les intégrons sont des éléments génétiques qui reconnaissent et capturent plusieurs cassettes de gènes mobiles. Comme le gène est généralement dépourvu de promoteur, l'expression dépend de l'orientation correcte dans l'intégron pour fournir le promoteur en amont. Quatre classes d'intégrons ont été identifiées, bien qu'un seul membre de la classe 3 ait été décrit et que les intégrons de classe 4 soient limités à *Vibrio cholerae*. L'analyse des souches résistantes de *Shigella* isolées au Japon a montré que certains des plasmides conjugatifs comprenaient un intégron avec une ou deux cassettes intégrées.

### - Opérons

Les opérons sont constitués d'un ensemble coordonné de gènes, tous régulés comme une seule unité. Les opérons sont décrits comme inductibles ou répressibles. La catégorie dans laquelle appartient chaque opéron est déterminée par la façon dont la transcription est affectée par l'environnement entourant la cellule. De nombreux opérons cataboliques, ou opérons codant pour des enzymes qui agissent dans le catabolisme, sont inductibles, ce qui signifie que l'opéron est activé (induit) par le substrat de la ou des enzymes pour lesquelles codent les gènes structurels. Ainsi, les enzymes nécessaires au métabolisme d'un nutriment (le lactose par exemple) ne sont produites que lorsque ce nutriment est présent dans l'environnement. Les opérons répressibles contiennent souvent des gènes codant pour des enzymes anabolisantes, telles que celles utilisées pour synthétiser les acides aminés. Dans le cas de ces opérons, plusieurs gènes en série sont désactivés (réprimés) par le produit synthétisé par l'enzyme.

## 2. Variations génétiques

Les micro-organismes peuvent s'adapter rapidement à de nouveaux environnements et concevoir des stratégies pour éviter ou annuler des circonstances stressantes ou potentiellement dangereuses. Leur capacité à survivre à des conditions défavorables peut résulter de l'utilisation par l'organisme de gènes qu'il possède déjà ou de l'acquisition de nouvelles informations génétiques. Le terme « **génotype** » décrit la composition génétique d'un organisme, c'est-à-dire qu'il fait référence aux gènes que possède l'organisme, qu'ils soient exprimés ou non. Il n'est pas rare qu'une cellule microbienne possède un gène particulier mais ne l'exprime pas, c'est-à-dire ne fabrique

pas la protéine ou l'enzyme qui est le produit de ce gène, à moins ou jusqu'à ce que le produit soit réellement requis ; il s'agit simplement d'un mécanisme pour éviter de gaspiller de l'énergie. Par exemple, de nombreuses bactéries possèdent les gènes codant pour les b-lactamases ; ces enzymes hydrolysent et inactivent les antibiotiques b-lactamines (par exemple les pénicillines). Dans de nombreux organismes, les b-lactamases ne sont produites qu'en réponse à la présence de l'antibiotique. Cette forme d'adaptation non génétique est appelée adaptation **phénotypique**, et il existe de nombreuses situations dans lesquelles les bactéries adoptent un changement phénotypique pour contrer le stress environnemental. Mais les micro-organismes peuvent également utiliser une stratégie alternative d'adaptation génétique, par laquelle ils acquièrent de nouveaux gènes soit par **mutation**, soit par l'un des mécanismes de transfert de gènes, tels que la **transformation**, la **transduction** et la **conjugaison** ; par la suite, un processus de sélection garantit que les organismes mutants les mieux adaptés au nouvel environnement deviennent numériquement dominants.

### - Mutation

Les mutations, ou modifications de l'ADN, peuvent être définies plus précisément comme des modifications héréditaires de la séquence de nucléotides de l'ADN. Ces mutations peuvent impliquer la perte de paires de bases, l'ajout de paires de bases ou un réarrangement dans l'ordre des paires de bases ; mais il ne faut pas confondre cette dernière avec la recombinaison génétique, dans laquelle les microbes transfèrent entre eux des segments entiers d'informations génétiques. Par conséquent, les mutations représentent des changements évolutifs dans les micro-organismes et des altérations qui produisent différentes souches au sein des espèces.

- **Cause des mutations**

Les mutations peuvent être spontanées ou induites, selon leur origine.

- **Une mutation spontanée** : est une modification aléatoire de l'ADN résultant d'erreurs de réplication qui se produisent de manière aléatoire. La fréquence des mutations spontanées a été mesurée pour un certain nombre d'organismes. Les taux de mutation varient énormément, d'une mutation sur  $10^5$  réplifications (taux élevé) à une mutation sur  $10^{10}$  réplifications (taux faible). Le taux rapide de reproduction bactérienne permet d'observer ces mutations plus facilement chez les bactéries que chez la plupart des eucaryotes.

- **Les mutations induites** : résultent de l'exposition à des mutagènes connus, qui sont principalement des agents physiques ou chimiques qui interagissent de manière perturbatrice avec l'ADN. L'utilisation soigneusement contrôlée de mutagènes s'est avérée un moyen utile d'induire des souches mutantes de micro-organismes à étudier.

Les agents mutagènes chimiques agissent de diverses manières pour modifier l'ADN. Des agents tels que les colorants à l'acridine s'insèrent complètement à travers les hélices d'ADN entre les bases adjacentes pour produire des mutations qui déforment l'hélice. Les analogues des bases azotées (5-bromodésoxyuridine et 2-aminopurine, par exemple) sont des imitations chimiques de bases naturelles qui sont incorporées dans l'ADN lors de la réplication. L'ajout de ces bases anormales conduit à des erreurs d'appariement des bases. De nombreux mutagènes chimiques agissent également comme cancérogènes, ou agents cancérogènes, lorsque les vertébrés y sont exposés.

Les agents physiques qui modifient l'ADN sont principalement des types de radiations. Les rayons gamma et les rayons X à haute énergie introduisent des changements physiques majeurs dans l'ADN et accumulent des cassures qui pourraient ne pas être réparables. La radiation ultraviolette (UV) induit des liaisons anormales entre les pyrimidines adjacentes qui empêchent la réplication normale. L'exposition à de fortes doses de radiations peut être mortelle, c'est pourquoi les radiations sont si efficaces dans le contrôle microbien ; elle peut également être cancérogène chez les animaux.

- **Types de mutations et leurs effets**

La distinction entre le génotype d'un organisme et son phénotype est que le **génotype** fait référence à l'information génétique contenue dans l'ADN de l'organisme, alors que le **phénotype** fait référence aux caractéristiques spécifiques affichées par l'organisme. Les mutations changent toujours le génotype. Un tel changement peut s'exprimer ou non dans le phénotype, selon la nature de la mutation.

**Deux types** importants de mutations sont les mutations **pointues**, qui affectent une seule base, et les mutations par **décalage de cadre (frameshift)**, qui peuvent affecter plusieurs bases de l'ADN. Les mutations rendent souvent un organisme incapable de synthétiser une ou plusieurs protéines. L'absence d'une protéine entraîne souvent des modifications dans la structure de l'organisme ou dans sa capacité à métaboliser une substance particulière.

Pour comprendre comment un changement dans l'ADN influence sur la cellule, rappelons que le code ADN apparaît dans un ordre particulier de triplets (trois bases) qui est transcrit en codons d'ARNm, dont chacun spécifie un acide aminé. Une altération permanente de l'ADN qui est fidèlement copié en ARNm et traduit peut modifier la structure de la protéine. Une modification d'une protéine peut également modifier la morphologie et la physiologie d'une cellule. Certaines mutations ont un effet néfaste sur la cellule, entraînant un dysfonctionnement ou la mort de la cellule ; c'est ce qu'on appelle des **mutations mortelles**. Les **mutations neutres** ne produisent aucun changement indésirable ou utile. Un petit nombre de mutations sont bénéfiques dans la mesure où elles apportent à la cellule un changement utile dans sa structure ou sa physiologie.

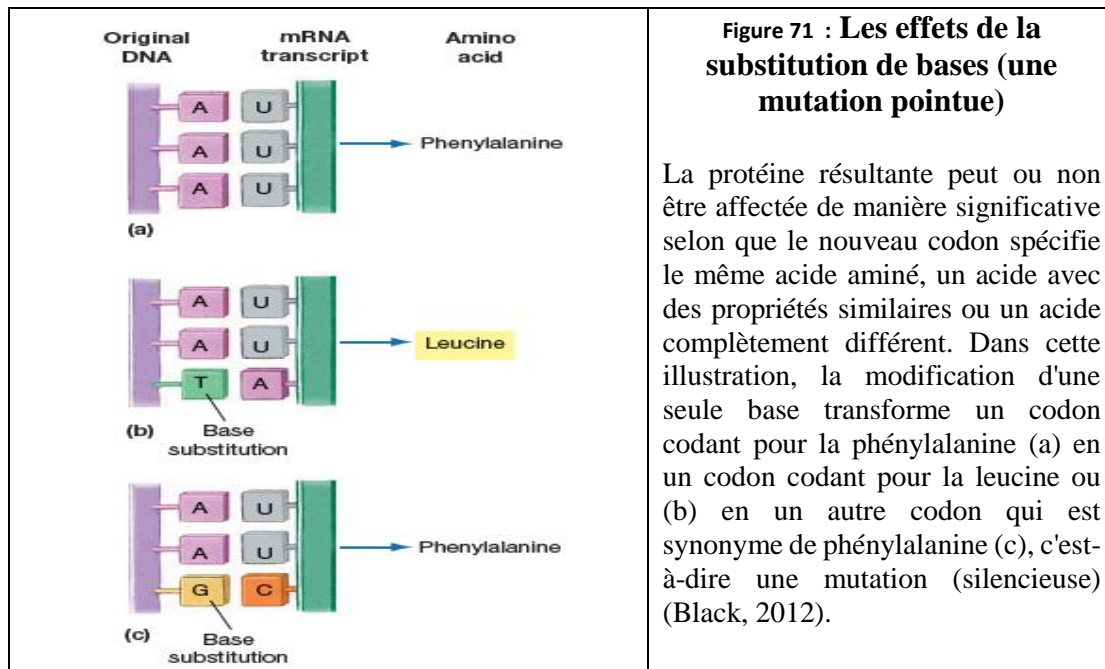
Un **troisième type** de mutation n'implique pas de changement quant aux bases présentes, comme c'est le cas dans les mutations pointue et par décalage de cadre. Au lieu de cela, une partie du chromosome change de position, peut-être même se brise et passe à une autre partie du même chromosome ou d'un chromosome différent (transposons). Ou bien il peut se réinsérer au même endroit, mais à l'envers (inversions).

#### - **Mutations pointues**

Une mutation pointue est une substitution de base, ou remplacement de nucléotide, dans laquelle une base est remplacée par une autre à un emplacement spécifique d'un gène. La mutation modifie un seul codon dans l'ARNm et peut ou non modifier la séquence d'acides aminés d'une protéine (figure 71). Supposons qu'une séquence d'ADN à trois bases passe de AAA à AAT. Pendant la transcription, le codon de l'ARNm passera de UUU à UUA. (Rappelez-vous que l'uracile dans l'ARN s'associe à l'adénine dans l'ADN) Lorsque les informations contenues dans l'ARNm sont utilisées pour synthétiser une protéine, l'acide aminé leucine sera remplacé par la phénylalanine dans la protéine. En raison de la substitution d'un seul acide aminé, la nouvelle protéine sera différente de la protéine normale. Les effets sur le phénotype de l'organisme seront négligeables si la nouvelle protéine fonctionne aussi bien que la protéine d'origine. Ils seront importants si la nouvelle protéine fonctionne mal ou pas du tout. Dans de rares cas, la nouvelle protéine peut mieux fonctionner et produire un phénotype mieux adapté à son environnement que le phénotype d'origine.

Si le code de l'ADN passe de AAA à AAG, le code de l'ARNm devient UUC au lieu de UUU. Étant donné que les codons UUC et UUU codent tous les deux pour la phénylalanine, la mutation n'a aucun effet sur la protéine synthétisée. Dans ce cas, on a longtemps pensé que même si le génotype avait changé, le phénotype n'était pas affecté. Cependant, nous savons maintenant que de telles mutations ne sont pas «silencieuses». Elles entraînent des changements légèrement différents dans les pourcentages de produits.

Parfois, la substitution d'une seule base dans l'ADN produit un codon terminateur dans l'ARNm. Si le codon terminateur est introduit au milieu d'une molécule d'ARNm destinée à produire une seule protéine, la synthèse sera terminée à mi-chemin dans la molécule. Un polypeptide qui sera très probablement incapable de fonctionner dans la cellule sera libéré et la protéine appropriée ne sera pas synthétisée. Si la protéine manquante est essentielle à la structure ou au fonctionnement cellulaire, l'effet peut être mortel.



#### - Mutations par décalage de cadre (frameshift)

Une mutation par décalage de cadre (frameshift) est une mutation dans laquelle il y a une délétion ou une insertion d'une ou plusieurs bases (figure 72). De telles mutations modifient toutes les séquences à trois bases au-delà de la suppression ou de l'insertion. Lorsque l'ARNm transcrit à partir d'un tel ADN modifié est utilisé pour synthétiser une protéine, de nombreux acides aminés de la séquence peuvent être modifiés. De telles mutations introduisent également couramment des codons terminateurs et provoquent l'arrêt de la synthèse protéique lorsque seul un court polypeptide a été créé. Les mutations par décalage de cadre empêchent généralement la synthèse d'une protéine particulière et modifient à la fois le génotype et le phénotype. Leur effet sur l'organisme dépend du rôle de la protéine manquante dans le fonctionnement de l'organisme.

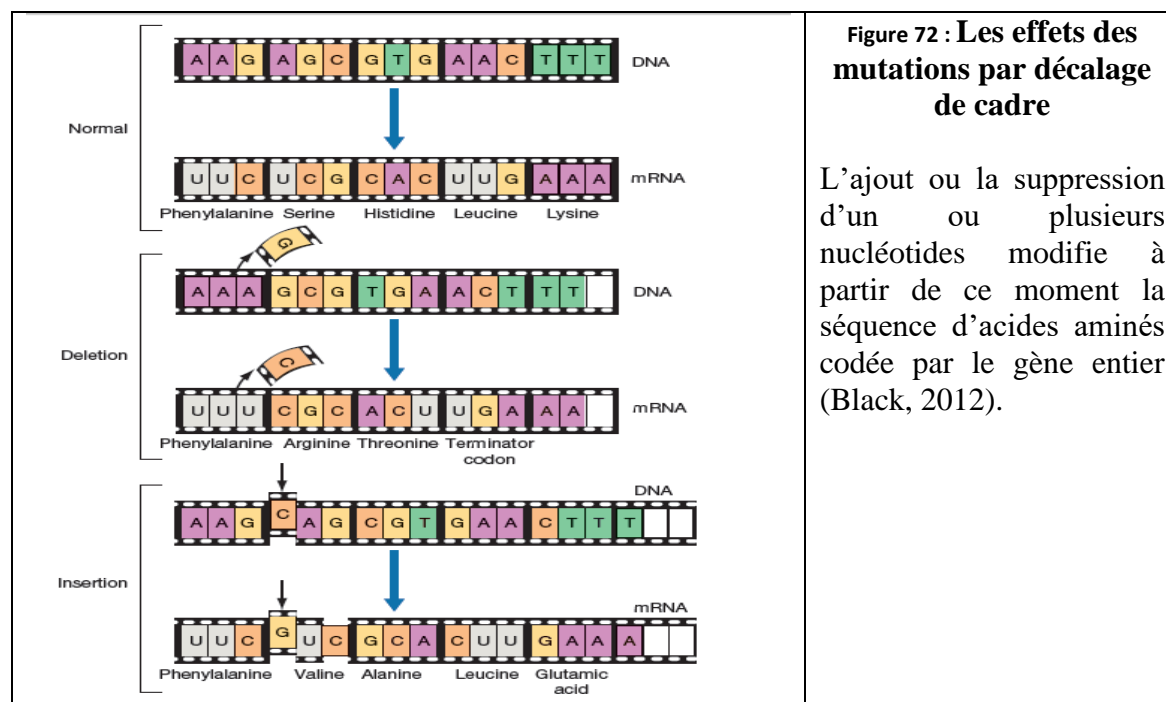


Figure 72 : Les effets des mutations par décalage de cadre

L'ajout ou la suppression d'un ou plusieurs nucléotides modifie à partir de ce moment la séquence d'acides aminés codée par le gène entier (Black, 2012).

- **La réparation des dommages causés à l'ADN**

De nombreuses bactéries possèdent des enzymes capables de réparer certains types de dommages causés à l'ADN. Deux mécanismes, la réparation par la lumière et la réparation sombre, sont connus pour réparer les dommages causés par les dimères.

- **La réparation par la lumière**, ou **photo-réactivation**, se produit en présence de lumière visible chez des bactéries préalablement exposées à la lumière ultraviolette. Lorsque des organismes contenant des dimères sont maintenus à la lumière visible, la lumière active une enzyme qui rompt les liaisons entre les pyrimidines d'un dimère (figure 73a). Ainsi, les mutations qui auraient pu être transmises aux cellules filles sont corrigées et l'ADN retrouve son état normal. Ce mécanisme contribue à la survie des bactéries mais pose problème aux microbiologistes. Les cultures irradiées par la lumière ultraviolette pour induire des mutations doivent être conservées dans l'obscurité pour que les mutations soient conservées.

- **La réparation sombre**, qui se produit chez certaines bactéries et peut avoir lieu en présence ou en absence de lumière, nécessite plusieurs réactions contrôlées par des enzymes (figure 73b). Premièrement, une endonucléase brise le brin d'ADN défectueux près du dimère. Deuxièmement, une ADN polymérase synthétise un nouvel ADN pour remplacer le segment défectueux, en utilisant le brin complémentaire normal comme matrice. Troisièmement, une exonucléase supprime le segment d'ADN défectueux. Enfin, une ligase relie le segment réparé au reste du brin d'ADN. Ces réactions ont été identifiées chez *E. coli* mais on sait maintenant qu'elles se produisent chez de nombreuses autres bactéries.

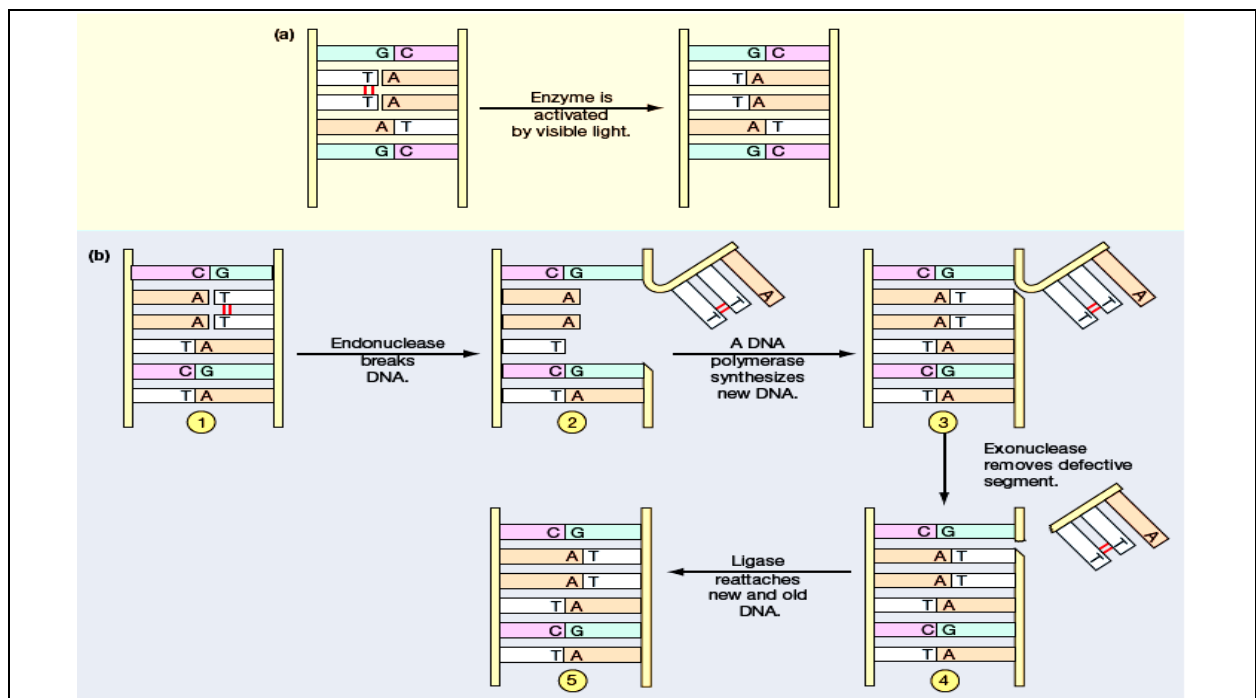


Figure 73 : Réparation des dimères de thymine

(a) La réparation lumineuse de l'ADN (photoréactivation) élimine les dimères.

(b) Lors de la réparation sombre, un segment défectueux d'ADN est découpé et remplacé (Black, 2012).

### • Mécanismes de transfert de gènes

La composition de l'ADN des micro-organismes est remarquablement fluide. L'ADN peut être transféré d'un organisme à un autre et cet ADN peut être incorporé de manière stable chez le receveur, modifiant ainsi de façon permanente sa composition génétique. Ce processus est appelé transfert horizontal de gènes pour le différencier de l'héritage des gènes parentaux, processus appelé héritage vertical. Trois grands mécanismes assurent le mouvement efficace de l'ADN entre les cellules : la conjugaison, la transduction et la transformation.

#### - Transformation

La transformation bactérienne, une modification des caractéristiques d'un organisme due au transfert d'informations génétiques, a été découverte en 1928 par Frederick Griffith, un médecin militaire anglais, alors qu'il étudiait les infections à pneumocoques chez la souris. Les pneumocoques à capsules produisent des colonies lisses (de type S) et luisantes et sont virulentes. Ceux qui manquent de capsules produisent des colonies rugueuses (de type R) avec un aspect grossier et non brillant et sont non virulentes. Seuls les pneumocoques producteurs de capsules (encapsulés) inoculés à des souris étaient des agents pathogènes, c'est-à-dire qu'ils avaient le pouvoir de provoquer une maladie (pneumonie). Un de ces organismes peut se multiplier rapidement et tuer une souris ! On dit que les souris sont « extrêmement » sensibles aux pneumocoques ; ils constituent donc d'excellents animaux d'essai. Les capsules aident

à empêcher les molécules produites par le système immunitaire de la souris d'atteindre la surface de la bactérie. Elles empêchent également les globules blancs d'engloutir les bactéries envahissantes. Autrement dit, la capsule protège les bactéries du système immunitaire de la souris.

Pour démontrer que le principe de transformation du pneumocoque était l'ADN, Griffith a montré que lorsqu'on injectait à des souris une souche vivante et virulente (S), elles mouraient rapidement (figure 74a). Les souris auxquelles on a injecté une souche vivante non virulente (R) sont restées vivantes et en bonne santé (figure 74b). Il essaya ensuite une variation sur ce thème. Tout d'abord, il a tué par la chaleur une souche S et l'a injectée à des souris qui sont restées en bonne santé (figure 74c). Vint ensuite le test ultime : Griffith injecta à la fois des cellules S mortes et des cellules R vivantes à des souris, avec pour résultat que les souris moururent d'une infection sanguine à pneumocoque (figure 74d). Si les cellules bactériennes tuées ne reviennent pas à la vie et que la souche vivante non virulente était inoffensive, pourquoi les souris sont-elles mortes ? Bien qu'il ne le sache pas à l'époque, Griffith avait démontré que les cellules S mortes, en traversant le corps de la souris, s'ouvraient et libéraient une partie de leur ADN (par hasard, cette partie contenant les gènes permettant de fabriquer une capsule). Quelques cellules R vivantes ont ensuite récupéré cet ADN libre et ont été **transformées** en souches virulentes formant des capsules. Une décennie plus tard, Avery, MacLeod et McCarty découvrirent qu'un polysaccharide capsulaire était responsable de la virulence des pneumocoques et que l'ADN était l'agent transformateur. Cela constitue le fondement de la biologie moléculaire telle que nous la comprenons aujourd'hui.

Des études ultérieures ont soutenu le concept selon lequel un chromosome libéré par une cellule lysée se divise en fragments suffisamment petits pour être acceptés par une cellule réceptrice et que l'ADN, même provenant d'une cellule morte, conserve son code génétique. Cette acceptation non spécifique par une cellule bactérienne de petits fragments d'ADN soluble provenant du milieu environnant est appelée **transformation**.

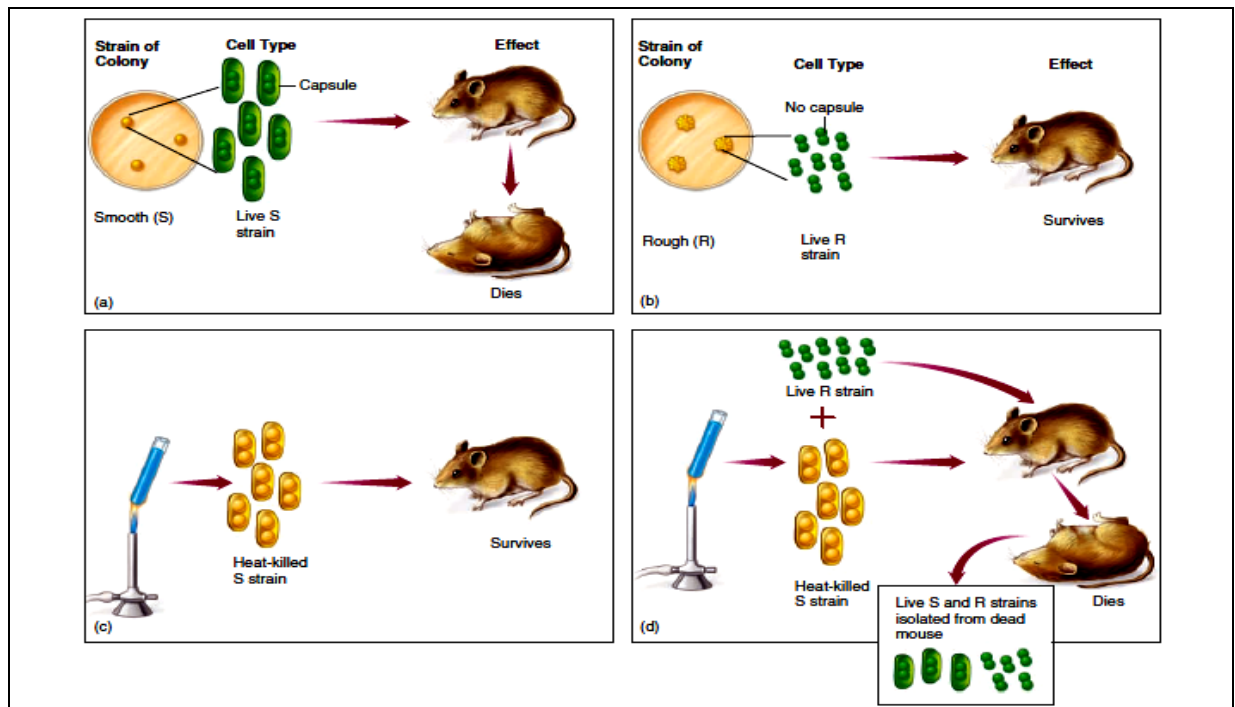
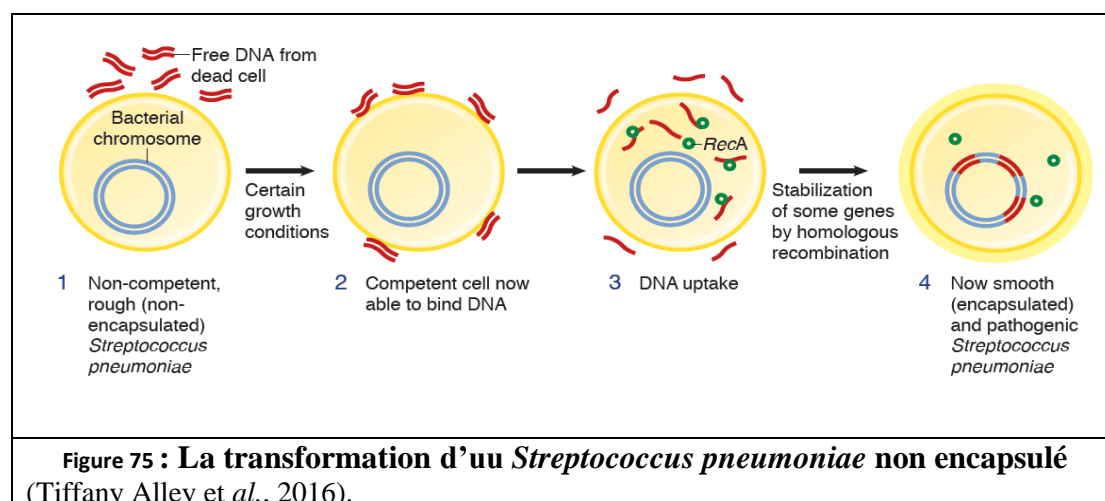


Figure 74 : L'expérience classique de transformation de Griffith

Essentiellement, cette expérience a prouvé que l'ADN libéré par une cellule tuée peut être acquis par une cellule vivante. La cellule recevant ce nouvel ADN est génétiquement transformée, dans ce cas, d'une souche non virulente à une souche virulente (Cowan Kelly, 2012).

La transformation est apparemment facilitée par des protéines spéciales liant l'ADN sur la paroi cellulaire qui capturent l'ADN du milieu environnant. Les cellules capables d'accepter du matériel génétique par ce biais sont dites **compétentes**. Le nouvel ADN est traité par la membrane cellulaire et transporté dans le cytoplasme, où une partie est insérée dans le chromosome bactérien. L'ADN qui n'est pas incorporé peut être dégradé et utilisé comme source de nutriments pour soutenir la croissance microbienne et l'ADN du receveur restant est ensuite décomposé, de sorte que le nombre de nucléotides dans l'ADN de la cellule reste constant.. La transformation est un événement **naturel** observé dans plusieurs groupes d'espèces bactériennes Gram-positives et Gram-négatives (elles sont naturellement compétentes). Étant donné que la transformation ne nécessite aucun appendice spécial et que les cellules du donneur et du receveur ne doivent pas nécessairement être en contact direct. La figure 75 présente les étapes de transformation d'un *Streptococcus pneumoniae* non encapsulé.



La plupart des bactéries sont incapables de se transformer naturellement. Dans ces cas, la transformation peut être forcée par un traitement au chlorure de calcium et choc thermique. La transformation avec des plasmides recombinants modifiés par cette procédure est une pierre angulaire de la biologie moléculaire moderne car des gènes étrangers provenant d'un organisme totalement indépendant sont insérés dans un plasmide, qui est ensuite introduit dans une cellule bactérienne compétente par transformation. Ces recombinaisons peuvent être réalisées dans un tube à essai, et les gènes humains peuvent être expérimentés et même exprimés en dehors du corps humain en les plaçant dans une cellule microbienne. Ce même phénomène dans les cellules eucaryotes, appelé **transfection**, est un aspect essentiel des levures, des plantes et des souris génétiquement modifiées, et il a été proposé comme future technique pour guérir les maladies génétiques chez l'homme.

### - Transduction

La transduction, comme la transformation, est une méthode de transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre (trans, « à travers », ductio, « tirer » ; les virus transportent ou tirent des gènes d'une cellule à une autre). Contrairement à la transformation, dans laquelle l'ADN nu est transféré, lors de la transduction, l'ADN est transporté par un bactériophage (bakter'-e-o-faj), un virus qui peut infecter les bactéries. Le phénomène de transduction a été découvert pour la première fois chez *Salmonella* en 1952 par Joshua Lederberg et Norton Zinder et a depuis été observé dans de nombreux genres de bactéries. Bien que la transduction se produise naturellement dans un large spectre de bactéries, les bactéries participant à un seul événement de transduction doivent être de la même espèce en raison de la spécificité des virus pour les cellules hôtes.

- **Les mécanismes de transduction**

Pour comprendre les mécanismes de transduction, il faut décrire brièvement les propriétés des bactériophages, également appelés phages (faj'ez). Les phages sont

composés d'un acide nucléique recouvert d'une enveloppe protéique. Ils infectent les cellules bactériennes (hôtes) et s'y reproduisent, comme le montre la figure 76. Un phage capable d'infecter une bactérie se fixe sur un site récepteur de la paroi cellulaire. L'acide nucléique du phage pénètre dans la cellule bactérienne après qu'une enzyme du phage ait affaibli la paroi cellulaire. L'enveloppe protéique reste à l'extérieur, attachée à la paroi cellulaire. Une fois que l'acide nucléique est dans la cellule, d'autres événements suivent l'une des deux voies suivantes, selon que le phage est virulent ou tempéré.

- **Un phage virulent** est capable de provoquer une infection et, éventuellement, la destruction et la mort d'une cellule bactérienne. Une fois que l'acide nucléique du phage pénètre dans la cellule, les gènes du phage ordonnent à la cellule de synthétiser des acides nucléiques et des protéines spécifiques du phage. Certaines protéines détruisent l'ADN de la cellule hôte, tandis que d'autres protéines et acides nucléiques s'assemblent en phages complets. Lorsque la cellule est remplie d'une centaine de phages ou plus, les enzymes phagiques brisent la cellule, libérant des phages nouvellement formés, qui peuvent ensuite infecter d'autres cellules. Parce que ce cycle entraîne la lyse (li'sis), ou la rupture, de la cellule infectée (hôte), on l'appelle un **cycle lytique** (lit'ik).

- **Un phage tempéré** ne provoque généralement pas d'infection perturbatrice. Au lieu de cela, l'ADN du phage est incorporé à l'ADN d'une bactérie et est répliqué avec lui. Ce phage produit également une substance répressive qui empêche la destruction de l'ADN bactérien, et l'ADN du phage ne dirige pas la synthèse des particules du phage. L'ADN du phage incorporé à l'ADN de la bactérie hôte est appelé **prophage** (pro'faj). La persistance d'un prophage sans réplication du phage et destruction de la cellule bactérienne est appelée **lysogénie** (li-soj'e-ne), et les cellules contenant un prophage sont dites **lysogènes** (lysogenic: li-so-jen'ik). Plusieurs façons d'inciter ces cellules à entrer dans le cycle lytique sont connues, et la plupart impliquent l'inactivation de la substance répresseur.

Les phages tempérés peuvent se répliquer soit sous forme de prophage dans un chromosome bactérien, soit indépendamment en s'assemblant en de nouveaux phages. La transduction se produit lorsque, au lieu que seul l'ADN du phage soit emballé dans des têtes de phage nouvellement formées, de l'ADN bactérien est également emballé dans les têtes. Les phages tempérés peuvent effectuer des formes de transduction à la fois **généralisées** et **spécialisées**. En transduction généralisée, n'importe quel gène bactérien peut être transféré par le phage ; dans la transduction spécialisée, seuls des gènes spécifiques sont transférés.

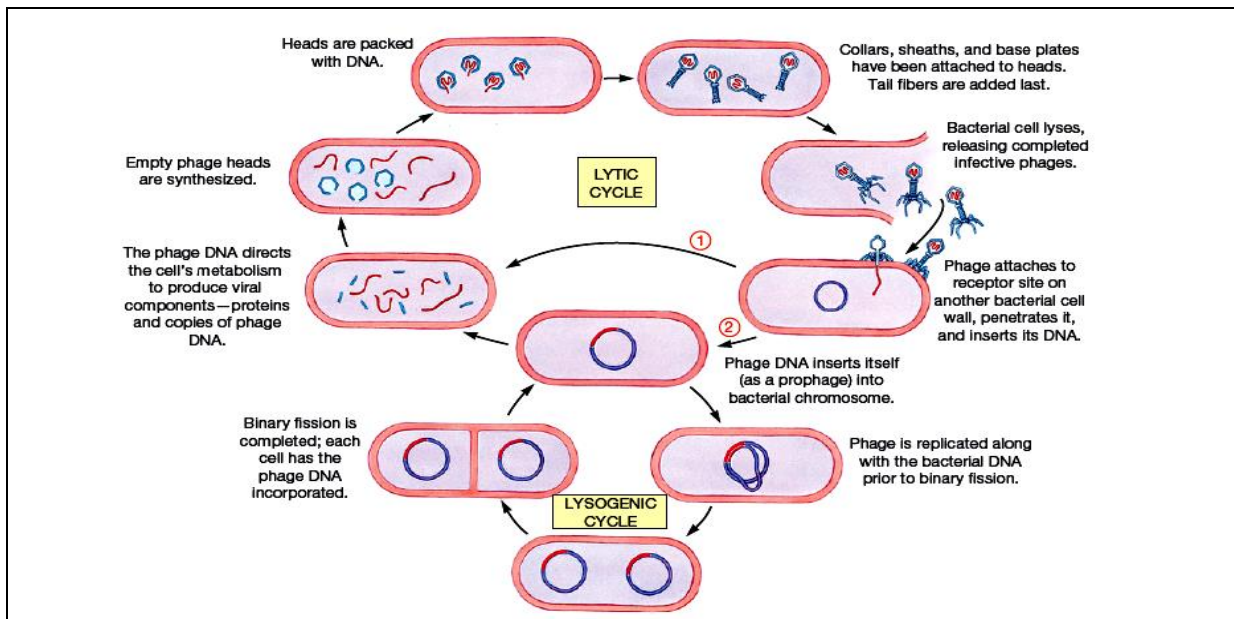


Figure 76 : Cycles de vie des bactériophages

Lorsqu'un bactériophage injecte son ADN viral dans une cellule bactérienne hôte, au moins deux résultats différents sont possibles. Dans le cycle lytique, caractéristique des phages virulents, l'ADN du phage prend le contrôle de la cellule et 1 l'amène à synthétiser de nouveaux composants viraux, qui sont assemblés en particules virales entières. La cellule se lyse, libérant les virus infectieux, qui peuvent ensuite pénétrer dans de nouvelles cellules hôtes. Dans le cycle lysogène, l'ADN d'un phage tempéré pénètre dans la cellule hôte, 2 s'incorpore au chromosome bactérien en tant que prophage et se réplique avec le chromosome à travers de nombreuses divisions cellulaires. Cependant, un phage lysogène peut soudainement revenir au cycle de vie lytique. Un prophage est donc une sorte de « bombe à retardement » installée à l'intérieur de la cellule infectée (Black, 2012).

### • TRANSDUCTION SPÉCIALISÉE

Plusieurs phages lysogènes sont connus pour effectuer une transduction spécialisée, mais le phage lambda ( $\lambda$ ) d'*Escherichia coli* a été largement étudié. Les phages s'insèrent généralement à un endroit spécifique lorsqu'ils s'intègrent à un chromosome. Le phage lambda s'insère dans le chromosome d'*E. coli* entre le gène *gal*, qui contrôle l'utilisation du galactose, et le gène *bio*, qui contrôle la synthèse de la biotine. Le gène *gal* et le gène *bio* font partie des opérons (figure 77). Lorsque les cellules contenant le phage lambda sont amenées à entrer dans le cycle lytique, les gènes du phage forment une boucle et sont excisés du chromosome bactérien (figure 78). L'ADN du phage lambda dirige ensuite la synthèse et l'assemblage de nouvelles particules de phage, puis la cellule est lysée.

Dans la plupart des cas, les nouvelles particules de phage libérées contiennent uniquement des gènes de phage. Rarement (environ une excision sur un million), le phage contient un ou plusieurs gènes bactériens qui étaient adjacents à l'ADN du phage lorsqu'il faisait partie du chromosome bactérien. Par exemple, le gène *gal* pourrait être incorporé dans une particule de phage (figure 79). Lorsqu'elle infecte une autre cellule bactérienne, la particule transfère non seulement les gènes du phage mais également le gène *gal*. Ce processus, dans lequel une particule de phage transduit (transfère) des

gènes spécifiques d'une cellule bactérienne à une autre, est appelé **transduction spécialisée** (figure 80). Dans la transduction spécialisée, l'ADN bactérien transduit est limité à un ou quelques gènes adjacents au prophage.

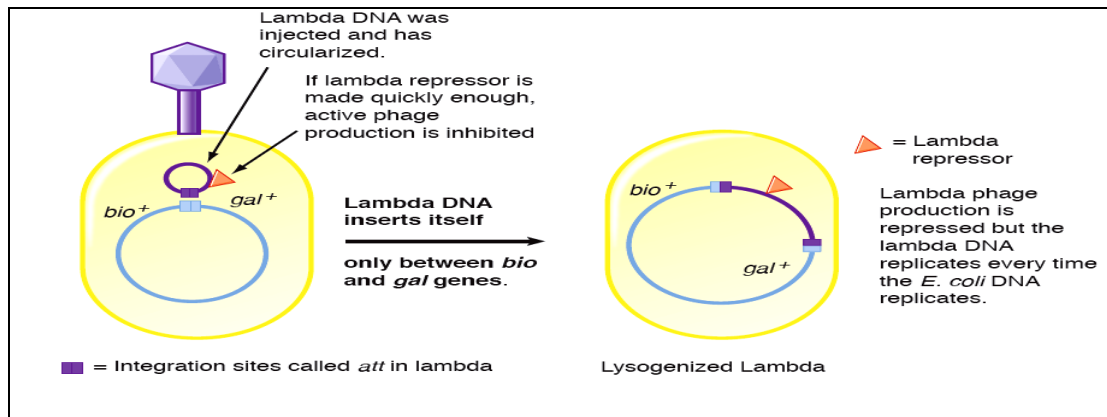


Figure 77 : Lysogénie

Le phage lambda ( $\lambda$ ) s'insère dans le chromosome d'*E. coli* entre le gène *gal* et le gène *bio* (Tiffany Alley et al., 2016).

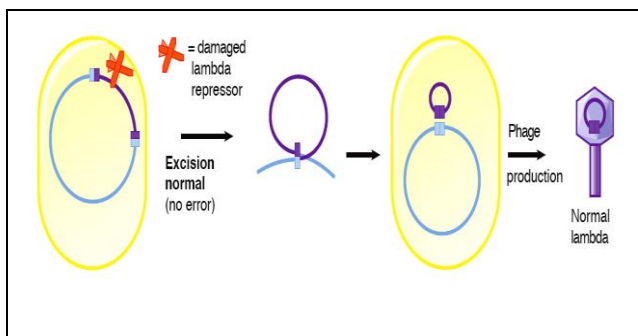


Figure 78 : Excision normale d'un phage lysogène

(Tiffany Alley et al., 2016).

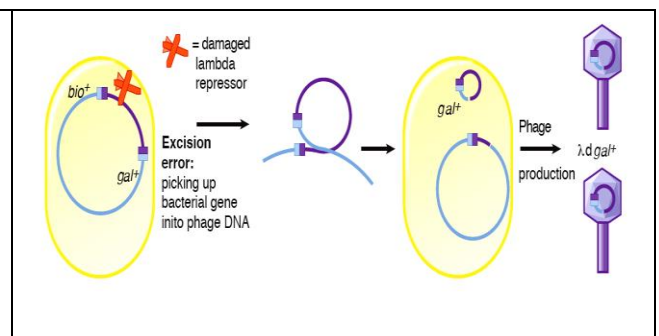


Figure 79 : Erreur d'excision d'un phage lysogène

(Tiffany Alley et al., 2016).

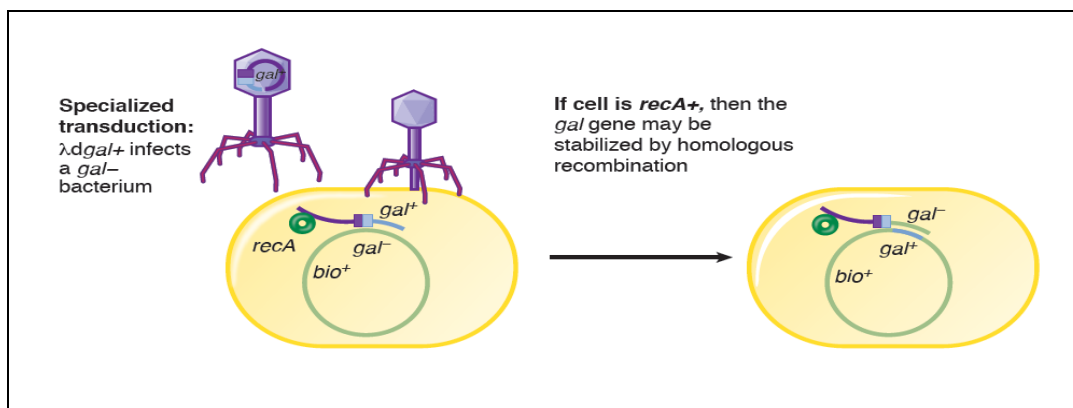
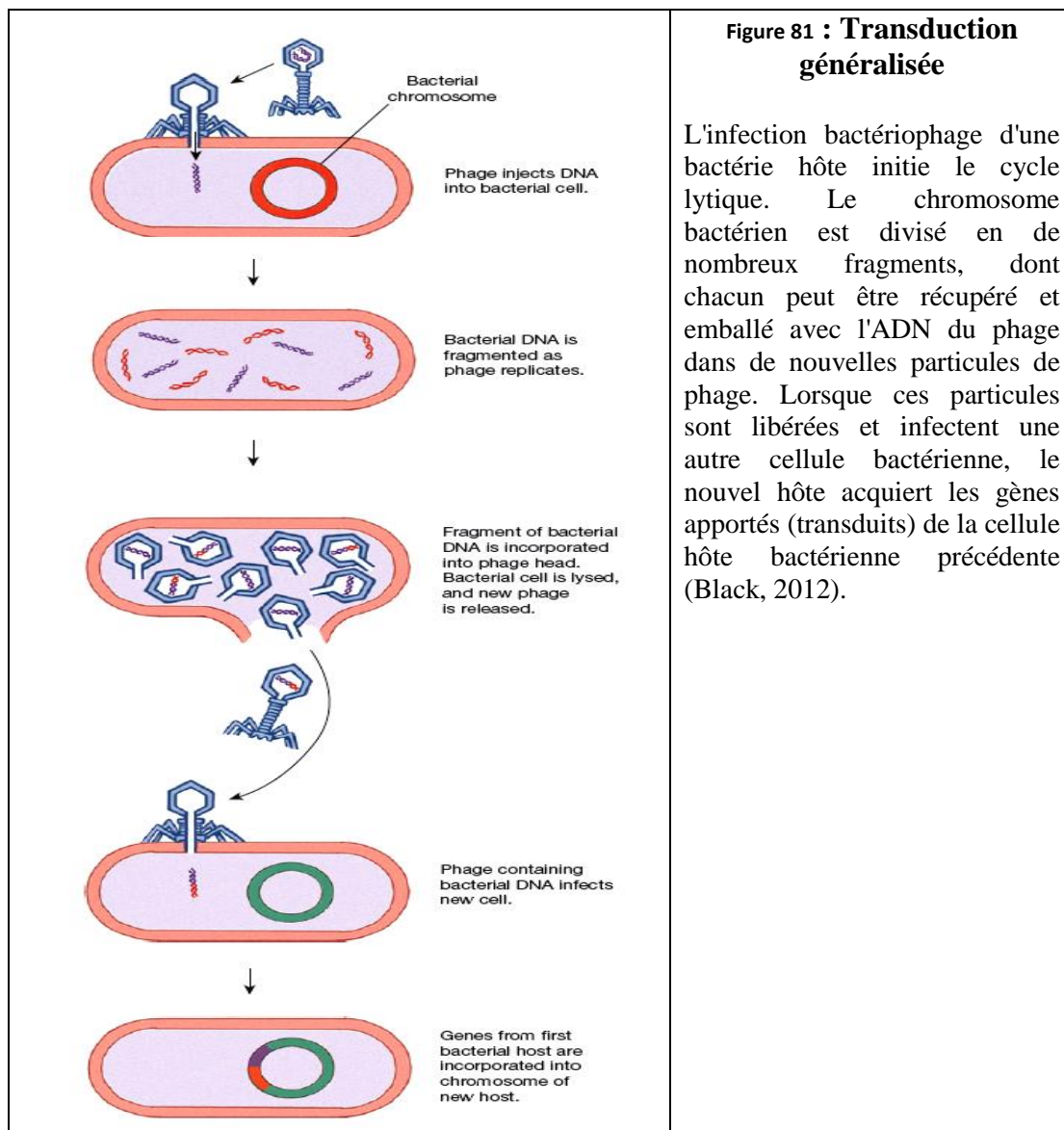


Figure 80 : Transduction spécialisée

Seuls les gènes situés à proximité du site d'insertion du phage peuvent être transduits par transduction spécialisée (Tiffany Alley et al., 2016).

- **TRANSDUCTION GÉNÉRALISÉE**

Lorsque les cellules bactériennes contenant l'ADN du phage entrent dans le cycle lytique, les enzymes du phage divisent l'ADN de la cellule hôte en plusieurs petits segments (figure 81). Alors que le phage dirige la synthèse et l'assemblage de nouvelles particules de phage, il conditionne l'ADN par « tête » (assez d'ADN pour remplir la tête d'un virus). Cela permet occasionnellement à un fragment d'ADN bactérien d'être incorporé dans une particule de phage. De même, l'ADN provenant de plasmides ou d'autres virus infectant la cellule peut être emballé dans la tête du phage. Une fois que cette particule de phage, avec son ADN bactérien nouvellement acquis, quitte l'hôte infecté, elle peut infecter une autre bactérie sensible, transférant ainsi les gènes bactériens par le processus de transduction généralisée. Chaque fragment bactérien du chromosome de la cellule hôte a une chance égale de devenir accidentellement une partie des particules du phage au cours du cycle de réplication du phage.



- **L'importance de la transduction**

La transduction est importante pour plusieurs raisons :

**Premièrement**, elle transfère le matériel génétique d'une cellule bactérienne à une autre et modifie les caractéristiques génétiques de la cellule réceptrice. Comme le démontre la transduction spécialisée des gènes *gal*, une cellule dépourvue de la capacité de métaboliser le galactose pourrait acquérir cette capacité. D'autres caractéristiques peuvent également être transférées par transduction spécialisée ou généralisée.

**Deuxièmement**, l'incorporation de l'ADN du phage dans un chromosome bactérien démontre une relation évolutive étroite entre le prophage et la cellule bactérienne hôte. L'ADN du prophage et celui du chromosome hôte doivent avoir des régions de séquences de bases assez similaires. Sinon, le prophage ne se lierait pas au chromosome bactérien.

**Troisièmement**, la découverte qu'un prophage peut exister dans une cellule pendant une longue période suggère un mécanisme possible similaire pour l'origine virale du cancer. Si un prophage peut exister dans une cellule bactérienne et modifier à un moment donné l'expression de l'ADN de la cellule, cela pourrait expliquer comment les virus animaux provoquent des modifications malignes. Par exemple, des gènes viraux insérés dans un chromosome humain pourraient perturber la régulation de certains gènes, permettant ainsi à des gènes structurels d'être actifs au mauvais moment, de manière continue, voire pas du tout. Les gènes fœtaux provoquent une prolifération rapide des cellules au début du développement, mais la croissance ralentit rapidement et finit par s'arrêter à l'âge adulte. Si ces gènes fœtaux étaient réactivés plus tard dans la vie dans un groupe de cellules, ils pourraient rapidement se transformer en tumeur.

**Quatrièmement**, une idée intéressante est que certains virus animaux ont probablement apporté des gènes de leur(s) hôte(s) précédent(s) lorsqu'ils ont infecté de nouveaux hôtes humains. Ces hôtes précédents n'étaient pas nécessairement des humains, ce qui peut donner peut-être des humains transgéniques.

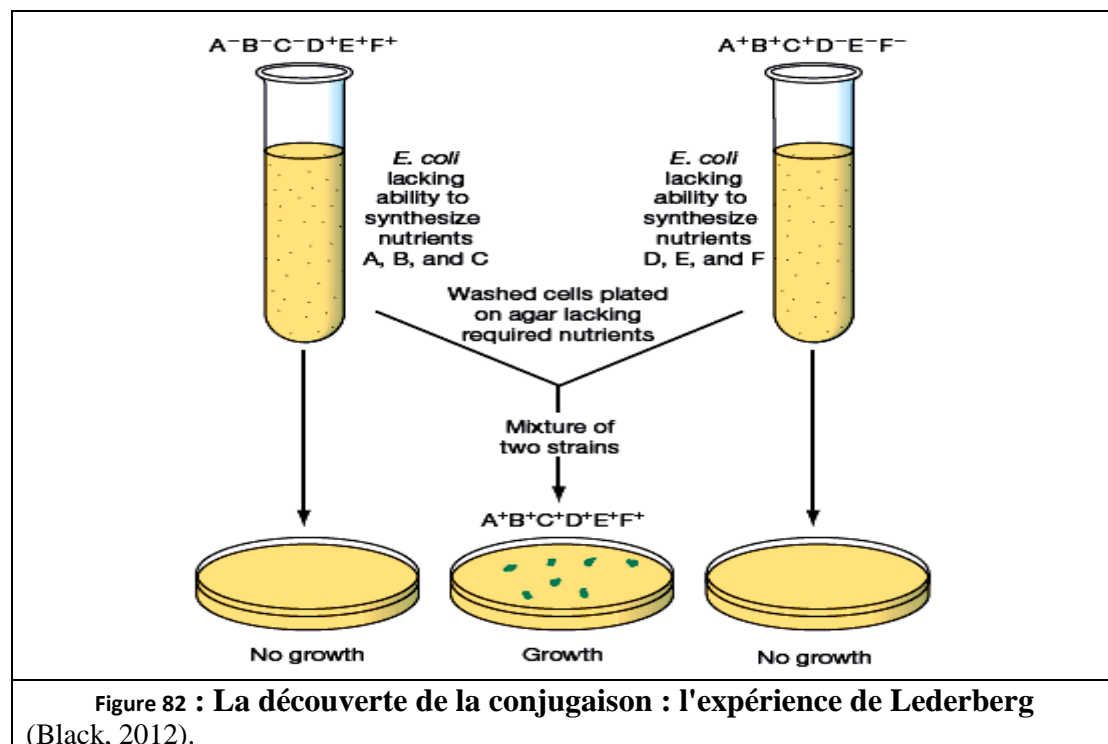
**Enfin**, et c'est le point le plus important pour les généticiens moléculaires, la transduction constitue un moyen d'étudier les liaisons génétiques. On dit que les gènes sont liés lorsqu'ils sont si rapprochés sur un segment d'ADN qu'ils sont susceptibles d'être transférés ensemble. Différents phages peuvent être incorporés dans un chromosome bactérien, chaque type pénétrant généralement dans un site spécifique. En étudiant de nombreuses transductions de phages différentes, les scientifiques peuvent déterminer où elles ont été insérées sur le chromosome et quels gènes adjacents elles sont capables de transférer. Les résultats combinés de nombreuses études de ce type permettent finalement d'identifier la séquence de gènes dans un chromosome. Cette procédure est appelée cartographie chromosomique.

### - Conjugaison

Lors de la conjugaison, comme la transformation et la transduction, l'information génétique est transférée d'une cellule bactérienne à une autre. Les bactéries Gram-négatives et Gram-positives peuvent se conjuguer. La conjugaison diffère de ces autres mécanismes de deux manières :

- (1) elle nécessite un contact entre les cellules donneuses et les cellules receveuses,
- (2) elle transfère des quantités beaucoup plus importantes d'ADN (parfois des chromosomes entiers).

La conjugaison a été découverte pour la première fois en 1946 par Joshua Lederberg. Dans ses expériences, Lederberg a utilisé des souches mutées d'*E. coli* incapables de synthétiser certaines substances. Il a sélectionné deux souches, chacune déficiente dans une voie de synthèse différente, et les a cultivées dans un milieu riche en nutriments (figure 82). Il a retiré les cellules de chaque culture et les a lavées pour éliminer les résidus du milieu nutritif. Il a ensuite tenté de cultiver des cellules de chaque souche sur des plaques de gélose dépourvues des nutriments spéciaux nécessaires à la souche. Il a également mélangé des cellules des deux souches et les a étalées sur le même milieu. Alors que les cellules des cultures originales n'ont pas réussi à se développer, certaines cellules des cultures mixtes se sont développées. Ces dernières doivent avoir acquis la capacité de synthétiser toutes les substances dont elles avaient besoin. Lederberg et d'autres ont continué à étudier ce phénomène et ont finalement découvert de nombreux détails du mécanisme de conjugaison.



- **Les mécanismes de conjugaison**

Les mécanismes impliqués dans la conjugaison ont été clarifiés grâce à plusieurs expériences importantes, chacune s'appuyant sur les résultats de la précédente. Parmi ces expériences, nous en considérerons trois : le transfert de plasmides F, les recombinaisons haute fréquence et le transfert de plasmides F' étant donné que les plasmides sont le plus souvent transférés par conjugaison. Les cellules bactériennes contiennent souvent plusieurs plasmides différents qui transportent des informations génétiques pour diverses fonctions cellulaires non essentielles.

#### - LE TRANSFERT DE PLASMIDES F

Après la première expérience de Lederberg, une découverte importante sur le mécanisme de conjugaison a été faite. Deux types de cellules, appelées F<sup>+</sup> et F<sup>-</sup>, existent dans toute population d'*Escherichia coli* capable de se conjuguer. Les cellules F<sup>+</sup> contiennent de l'ADN extra-chromosomique appelé **plasmides F** (fertilité) ; Les cellules F<sup>-</sup> manquent de plasmides F. (Lederberg a inventé le terme plasmide dans les années 1950 pour décrire ces fragments d'ADN).

Les plasmides F (**facteurs F**) possèdent :

**a.** Une série de gènes plasmidiques de (fertilité) importants appelés région de transfert ou *tra*, qui codent pour :

– **Pili sexuel**

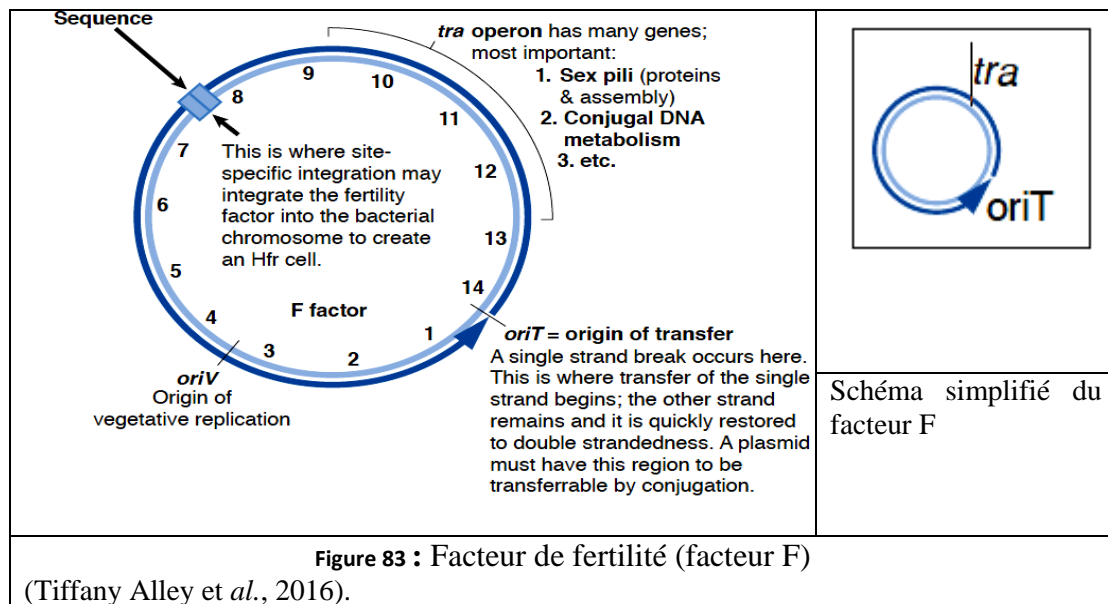
– Gènes dont les produits **stabilisent les couples reproducteurs**

– Les gènes qui dirigent le transfert d'ADN conjugal et d'autres gènes.

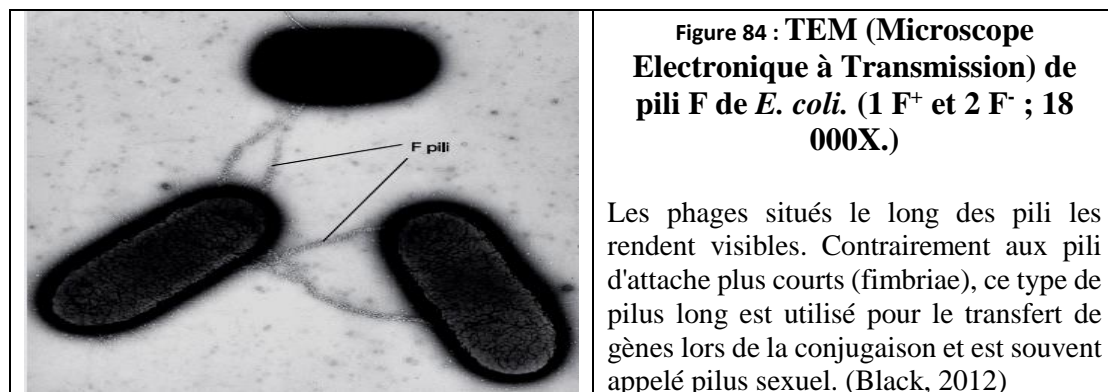
**b.** Une région appelée *oriT* (**origine du transfert**) où une cassure simple brin de l'ADN sera effectuée, puis *oriT* commencera le transfert d'un brin de la double hélice.

**c.** Des **séquences d'insertion** dans lesquelles le plasmide peut être inséré dans le chromosome bactérien, se combinant pour former une plus grande molécule d'ADN, un plasmide intégré est appelé un épisome.

Une carte génétique d'un facteur F est présentée dans la figure 83

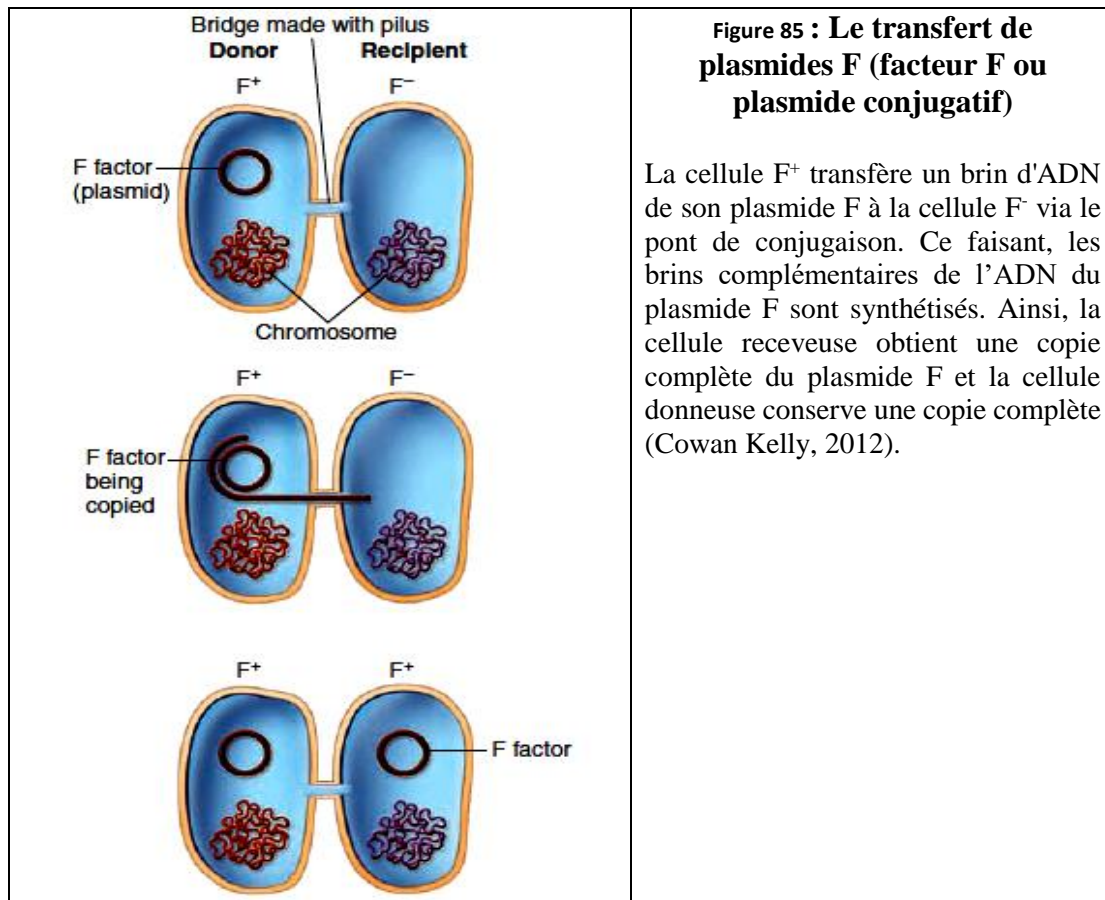


Parmi les informations génétiques contenues dans le plasmide F figurent des informations nécessaires à la synthèse des protéines qui forment le pili F. La cellule F<sup>+</sup> forme un **pilus F** (ou *pilus sexuel* ou *pilus de conjugaison*), un pont par lequel elle s'attache à la cellule F<sup>-</sup> lorsque les cellules F<sup>+</sup> et F<sup>-</sup> se conjuguent (figure 84). Une copie du plasmide F est ensuite transférée de la cellule F<sup>+</sup> vers la cellule F<sup>-</sup> (figure 85). Les cellules F<sup>+</sup> sont appelées cellules *donneuses* ou *cellules mâles*, et les cellules F<sup>-</sup> sont appelées cellules *receveuses* ou *cellules femelles*.



Bien que le processus de transfert exact reste inconnu, l'ADN est transféré sous forme d'un seul brin via un pont de conjugaison (canal d'accouplement). Étant donné que le pilus sexuel contient un trou qui permettrait le passage de l'ADN simple brin, il est possible, mais incertain, que l'ADN pénètre dans la cellule réceptrice par ce canal. Cependant, il existe également des preuves suggérant que les cellules en reproduction fusionnent temporairement, période pendant laquelle l'ADN est transféré. Le pilus entre en contact avec un site récepteur à la surface de la cellule F<sup>-</sup> (réceptrice). Un pore se forme à cet endroit. A l'intérieur de la cellule F<sup>-</sup>, le pilus est rentré et démonté. Cela rapproche les deux cellules. L'ADN de la cellule F<sup>+</sup> pénètre dans la cellule F<sup>-</sup> par ce site. Chaque cellule synthétise ensuite le brin complémentaire d'ADN, de sorte que les deux possèdent un plasmide F complet. Étant donné que toutes les cellules F<sup>-</sup> dans une

culture mixte de cellules  $F^+$  et  $F^-$  reçoivent le plasmide F, la population entière devient rapidement  $F^+$  ; mais dans une culture composée uniquement de cellules  $F^-$ , aucun transfert ne se produit et les cellules restent des cellules  $F^-$ .



**Figure 85 : Le transfert de plasmides F (facteur F ou plasmide conjugatif)**

La cellule  $F^+$  transfère un brin d'ADN de son plasmide F à la cellule  $F^-$  via le pont de conjugaison. Ce faisant, les brins complémentaires de l'ADN du plasmide F sont synthétisés. Ainsi, la cellule receveuse obtient une copie complète du plasmide F et la cellule donneuse conserve une copie complète (Cowan Kelly, 2012).

### - LES RECOMBINAISONS HAUTE FREQUENCE

Les mécanismes de conjugaison ont été davantage clarifiés lorsque le scientifique italien L. L. Cavalli-Sforza a isolé un **clone**, un groupe de cellules identiques descendant d'une cellule parent unique, à partir d'une souche  $F^+$  qui pourrait induire plus de mille fois le nombre de recombinaisons génétiques observées dans les conjugaisons  $F^+$  et  $F^-$ . Une telle souche donneuse est appelée **souche haute fréquence de recombinaison (Hfr)**.

Les souches Hfr proviennent de souches  $F^+$  lorsque le plasmide F est incorporé dans le chromosome bactérien en un site parmi plusieurs sites possibles (figure 86a). Lorsqu'une cellule Hfr sert de donneur en conjugaison, le plasmide F initie le transfert d'ADN chromosomique. Habituellement, seule une partie du plasmide F, appelée segment initiateur, est transférée, ainsi que certains gènes chromosomiques adjacents (figure 86b). La cellule receveuse ne devient pas une cellule donneuse  $F^+$ , car seule une partie du plasmide F est transférée.

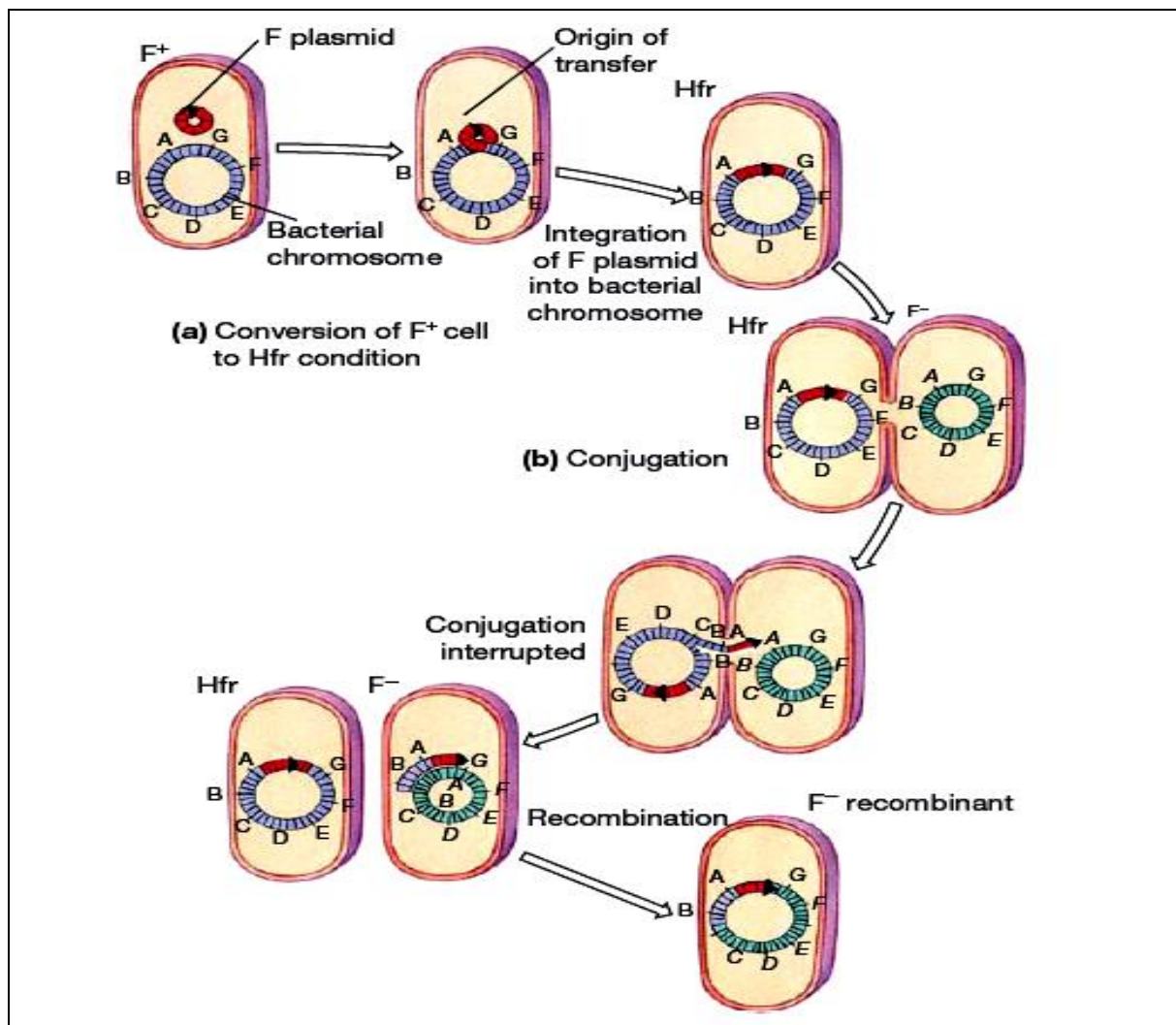


Figure 86 : **Recombinaisons haute fréquence**

(a) Conversion des cellules F<sup>+</sup> à la condition Hfr. Les cellules Hfr proviennent de cellules F<sup>+</sup> lorsque leur plasmide F est incorporé dans un chromosome bactérien sur l'un des nombreux sites possibles.  
 (b) Pendant la conjugaison, le site initiateur (rose) du plasmide F et les gènes adjacents sont transférés à une cellule réceptrice. Les gènes sont transférés en séquence linéaire et le nombre de gènes transférés dépend de la durée de la conjugaison et du fait que le brin d'ADN se brise ou reste intact (Black, 2012).

Dans les années 1950, le scientifique français Elie Wollman et François Jacob ont étudié ce processus Hfr dans une série d'expériences d'accouplement interrompues. Ils ont combiné des cellules d'une souche Hfr avec des cellules d'une souche F<sup>-</sup> et ont prélevé des échantillons de cellules à intervalles rapprochés. Chaque échantillon de cellules a été soumis à une agitation mécanique par vibration ou tourbillonnement dans un mélangeur pour perturber le processus de conjugaison. Les cellules de chaque échantillon ont été étalées sur divers supports, chacun manquant d'un nutriment particulier, afin de déterminer leurs besoins en nutriments. En observant attentivement les caractéristiques génétiques des cellules issues de nombreuses expériences, les chercheurs ont déterminé que le transfert d'ADN lors de la conjugaison se produisait de manière linéaire et selon un calendrier précis. Lorsque la conjugaison était interrompue au bout de 8 minutes, la plupart des cellules réceptrices avaient reçu un gène.

Lorsqu'elle était interrompue au bout de 120 minutes, les cellules réceptrices avaient reçu beaucoup plus d'ADN, parfois un chromosome entier. À intervalles intermédiaires, le nombre de gènes donneurs transférés était proportionnel à la durée pendant laquelle la conjugaison était autorisée. Cependant, en raison de la tendance des chromosomes à se briser lors du transfert, certaines cellules ont reçu moins de gènes que ce qui aurait été prévu dans le délai imparti. Quel que soit le nombre de gènes transférés, ils l'ont toujours été en séquence linéaire à partir du site d'initiation créé par l'incorporation du plasmide F.

#### - LE TRANSFERT DE PLASMIDES F'

Le processus d'incorporation d'un plasmide F dans un chromosome bactérien est réversible. En d'autres termes, l'ADN incorporé dans un chromosome peut s'en séparer et redevenir un plasmide F. Dans certains cas, cette séparation se produit de manière imprécise et un fragment du chromosome est transporté avec le plasmide F, créant ce qu'on appelle un **plasmide F' (F prime)** (figure 87). Les cellules contenant de tels plasmides sont appelées *souches F'*. Lorsque les cellules F' se conjuguent avec les cellules F<sup>-</sup>, le plasmide entier (y compris les gènes du chromosome) est transféré. Par conséquent, les cellules receveuses possèdent deux de certains gènes chromosomiques : un sur les chromosomes et un associé au plasmide. Les plasmides F' ne font généralement pas partie du chromosome de la cellule receveuse.

Lors du transfert des plasmides F<sup>+</sup> et F', comme dans tous les autres transferts lors de la conjugaison, la cellule donneuse conserve tous les gènes qu'elle possédait avant le transfert, y compris les copies du plasmide F. L'ADN simple brin est transféré et les cellules donneuses et receveuses synthétisent un brin complémentaire pour tout ADN simple brin qu'elles contiennent.

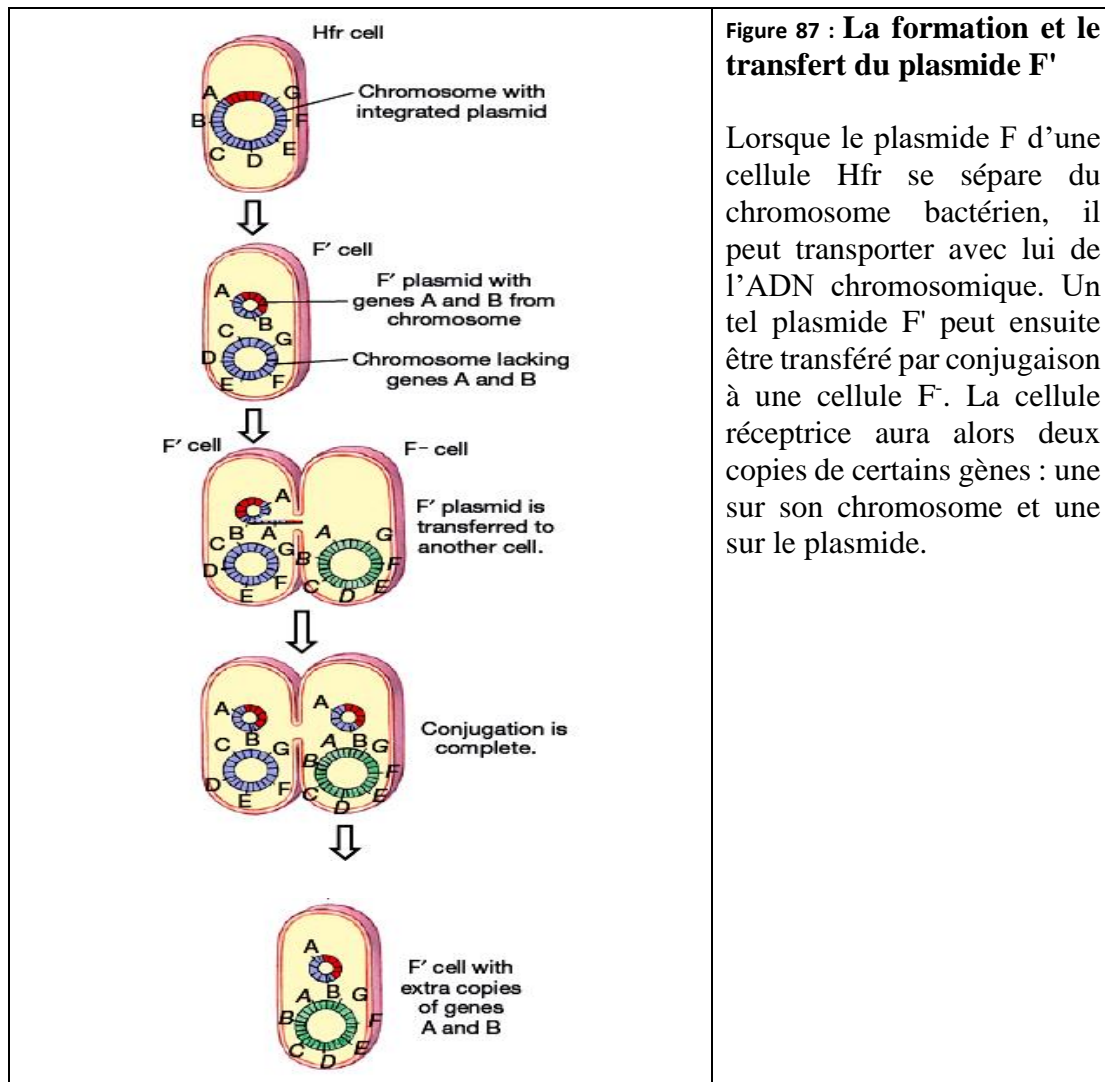


Figure 87 : La formation et le transfert du plasmide F'

Lorsque le plasmide F d'une cellule Hfr se sépare du chromosome bactérien, il peut transporter avec lui de l'ADN chromosomique. Un tel plasmide F' peut ensuite être transféré par conjugaison à une cellule F<sup>-</sup>. La cellule réceptrice aura alors deux copies de certains gènes : une sur son chromosome et une sur le plasmide.

- **L'importance de la conjugaison**

Comme d'autres mécanismes de transfert de gènes, la conjugaison est importante car elle contribue à la variation génétique. De plus grandes quantités d'ADN sont transférées lors de la conjugaison que lors d'autres transferts, la conjugaison est donc particulièrement importante pour accroître la diversité génétique. En fait, la conjugaison peut représenter une étape évolutive entre les processus asexués de transduction et de transformation et la fusion réelle de cellules entières (les gamètes) qui se produisent lors de la reproduction sexuée chez les eucaryotes. Pour le généticien microbien, la conjugaison revêt une importance particulière car un transfert linéaire précis de gènes est utile dans la cartographie des chromosomes.

Les plasmides autotransmissibles, c'est-à-dire possédant des gènes permettant la formation d'un pilus F, peuvent parfois être transférés à des autres espèces (Ceux dont on peut dire qu'ils sont **promiscuités**). Parfois, les espèces ne sont apparentées que de manière lointaine ; dans d'autres cas, le transfert s'effectue même dans des cellules

eucaryotes ! Cela a évidemment des implications importantes pour la santé et l'évolution.

Certaines bactéries à Gram positif possèdent des plasmides autotransmissibles qui ne forment pas de pili F. Au lieu de cela, les bactéries dépourvues de ces plasmides sécrètent des composés peptidiques, qui stimulent les bactéries voisines contenant les plasmides à s'accoupler avec eux. Une fois qu'une bactérie acquiert le plasmide, elle cesse de produire le peptide attractif qui lui est destiné. Il s'agit d'une conservation soignée de l'énergie. Cependant, ces cellules sécrèteront toujours d'autres peptides qui serviront d'appâts d'accouplement pour d'autres plasmides qu'elles n'ont pas encore acquis.

- **Comparaison des mécanismes de transfert de gènes**

Les différences les plus fondamentales entre les principaux types de transferts d'informations génétiques concernent la quantité d'ADN transférée et le mécanisme par lequel le transfert a lieu. Lors de la **transformation**, moins de 1 % de l'ADN d'une cellule bactérienne est transféré à une autre, et le transfert implique uniquement l'ADN chromosomique.

Lors de la **transduction**, la quantité d'ADN transférée varie de quelques gènes à de gros fragments du chromosome, et un bactériophage est toujours impliqué dans le transfert. Lors d'une transduction spécialisée, le phage s'insère dans un chromosome bactérien et transporte avec lui quelques gènes de l'hôte lors de sa séparation. En transduction généralisée, le phage provoque la fragmentation du chromosome bactérien ; certains fragments sont accidentellement intégrés dans des virus au fur et à mesure de leur assemblage.

En **conjugaison**, la quantité d'ADN transférée est très variable selon le mécanisme. Un plasmide est toujours impliqué dans le transfert. Un plasmide F lui-même peut être transféré, comme cela se produit dans la conjugaison  $F^+$  et  $F^-$ . Un segment initiateur d'un plasmide et toute quantité d'ADN chromosomique – de quelques gènes au chromosome entier – sont transférés par conjugaison Hfr. Un plasmide et tous les gènes chromosomiques qu'il transporte depuis le chromosome sont transférés par conjugaison  $F'$ .

---

---

## Chapitre 6 : Le Pouvoir pathogène des bactéries

Le corps de l'hôte (animal ou humain) existe dans un état d'équilibre dynamique avec les micro-organismes. Chez l'individu en bonne santé, cet équilibre est maintenu par une coexistence pacifique et une absence de maladie. Mais il arrive parfois que la balance penche en faveur du micro-organisme et qu'une infection ou une maladie en résulte.

### 1. Relations hôte-bactéries

La majorité des bactéries vivent une vie libre dans l'environnement tel que le sol et l'eau, où elles sont relativement inoffensives et souvent bénéfiques. Une bactérie vivant librement peut tirer tous les aliments nécessaires et d'autres facteurs directement de l'environnement non vivant.

Certaines bactéries nécessitent des interactions avec d'autres organismes qui leur servent d'hôtes. Un hôte est tout organisme qui héberge un autre organisme. L'issue de toute infection bactérienne dépend de l'interaction entre l'hôte et la bactérie.

#### - Microbiote et microbiome

Les micro-organismes qui vivent sur ou dans le corps mais ne provoquent pas de maladie sont collectivement appelés microflore normale ou **microbiote** normal. Les génomes de ces symbiotes microbiens sont collectivement définis comme le **microbiome**. Le microbiote normal constitue une première ligne de défense contre les agents pathogènes microbiens, facilite la digestion, joue un rôle dans la dégradation des toxines et contribue à la maturation du système immunitaire.

La peau et les muqueuses abritent toujours une variété de micro-organismes qui peuvent être divisés en : microbiote résident et microbiote transitoire.

*(1) le microbiote résident* comprend des micro-organismes toujours présents sur ou dans le corps. On les trouve sur la peau et la conjonctive, dans la bouche, le nez et la gorge, dans le gros intestin et dans les passages des systèmes urinaire et reproducteur, en particulier à proximité de leurs ouvertures. Dans chacune de ces régions du corps, le microbiote résident est adapté aux conditions dominantes. La bouche et la partie inférieure du gros intestin offrent des conditions chaudes et humides et suffisamment de nutriments. Les muqueuses du nez, de la gorge, de l'urètre et du vagin fournissent également des conditions chaudes et humides, bien que les nutriments soient plus rares. La peau fournit suffisamment de nutriments mais est plus fraîche et moins humide. D'autres régions du corps manquent du microbiote résident, soit parce qu'elles offrent des conditions inappropriées pour les micro-organismes, soit parce qu'elles sont protégées par les défenses de l'hôte, soit parce qu'elles sont inaccessibles aux micro-organismes. Par exemple, les conditions dans l'estomac sont trop acides pour permettre

la survie du microbiote. Dans des conditions normales, le système nerveux est inaccessible aux micro-organismes. Le sang ne possède pas du microbiote résident car il est relativement inaccessible, et les mécanismes de défense de l'hôte détruisent normalement les micro-organismes avant qu'ils ne s'établissent.

(2) *le microbiote transitoire* est constitué de micro-organismes non pathogènes ou potentiellement pathogènes qui peuvent être présents dans certaines conditions dans n'importe quel endroit où se trouve le microbiote résident. Ils persistent pendant des heures, voire des mois, mais seulement tant que les conditions nécessaires sont remplies. Un microbiote transitoire apparaît sur les muqueuses lorsque des quantités de nutriments supérieures à la normale sont disponibles ou sur la peau lorsqu'elle est plus chaude et plus humide que d'habitude. Même les agents pathogènes peuvent constituer un microbiote transitoire, par exemple : après un contact avec un malade et hébergement d'un micro-organisme de manière transitoire pendant une courte période par un individu immunisé (vacciné) contre ce micro-organisme auparavant.

Différents sites de la peau ou des muqueuses sont des milieux uniques dotés d'un microbiote caractéristique. Plus de 500 espèces de bactéries ont été identifiées dans le côlon. Les organismes anaérobies sont 1 000 fois plus nombreux que les organismes facultatifs dans le côlon.

Des modifications du microbiote normal ou une stimulation de l'inflammation par ces commensaux peuvent provoquer des maladies telles que les maladies inflammatoires de l'intestin.

### - Saprophytisme

Saprophytisme est le mode de vie des saprophytes (du grec *sapros* décomposé et *phyton* plante). Par conséquent, les bactéries saprophytes sont des bactéries libres qui vivent sur des composés organiques morts et en détérioration. Elles se trouvent dans le sol et l'eau et jouent un rôle important dans la dégradation des matières organiques dans la nature. Ces bactéries sont impliquées dans la détérioration des cadavres. Elles sont peu incriminées dans les maladies infectieuses parce qu'elles sont généralement incapables de se multiplier sur des tissus vivants. Cependant, les saprophytes comme *Bacillus subtilis* peuvent parfois provoquer une infection lorsque la résistance de l'hôte est abaissée.

### - Commensalisme

Dans le commensalisme, deux espèces vivent ensemble dans une relation telle que l'une en profite et l'autre ni profite ni n'est lésée. Par exemple, de nombreux micro-organismes vivent à la surface de notre peau et utilisent des produits métaboliques sécrétés par les pores de la peau. Parce que ces produits sont libérés, qu'ils soient ou non utilisés par des micro-organismes, les micro-organismes en bénéficient et, d'ordinaire, nous ne sommes ni bénéficiés ni lésés.

**- Mutualisme**

Dans le mutualisme, les deux membres de l'association vivant ensemble bénéficient de la relation. Par exemple, la capacité des termites à digérer le bois, ou la cellulose, dépend des protozoaires qu'ils hébergent dans leurs intestins.

Ces protozoaires et autres microbes, comme les bactéries et les champignons, sécrètent dans l'intestin des enzymes qui digèrent le bois mâché. Les protozoaires eux-mêmes gagnent un environnement sûr et stable dans lequel vivre. Pour les termites, la parenté est obligatoire ; ils mourraient de faim sans leurs partenaires protozoaires. De même, un grand nombre d'*Escherichia coli* vivent dans le gros intestin des humains.

Ces bactéries libèrent des produits utiles tels que la vitamine K, que nous utilisons pour fabriquer certains facteurs de coagulation du sang. Bien que la relation ne soit pas obligatoire, *E. coli* apporte une contribution modeste à la satisfaction de nos besoins en vitamine K. Les bactéries, à leur tour, obtiennent un environnement favorable dans lequel vivre et obtenir des nutriments.

- La frontière entre commensalisme et mutualisme n'est pas toujours claire. En occupant de l'espace et en utilisant des nutriments, les microbes qui présentent un comportement mutualiste ou commensaliste peuvent empêcher la colonisation de la peau par d'autres microbes potentiellement nocifs et pathogènes, un phénomène connu sous le nom de compétition microbienne. Ces relations symbiotiques confèrent donc un bénéfice indirect à l'hôte.

**-Pathogénicité**

La pathogénicité est la capacité d'un micro-organisme de produire une infection ou une maladie. La pathogénicité d'un micro-organisme dépend de sa capacité à envahir un hôte, à s'y multiplier et à éviter d'être endommagé par les défenses de l'hôte.

Un facteur important de pathogénicité est le nombre d'organismes infectieux qui pénètrent dans l'organisme. Si seulement un petit nombre entre, les défenses de l'hôte peuvent être en mesure d'éliminer les organismes avant qu'ils ne provoquent des maladies. Si un grand nombre d'entre eux pénètrent, ils peuvent submerger les défenses de l'hôte et provoquer des maladies. D'autres organismes sont si hautement contagieux que *Shigella*, par exemple, n'a besoin que de 10 organismes pour être ingérés pour provoquer un cas très grave de dysenterie.

Les bactéries pathogènes (du grec pathos, maladie et gen, produire) sont les bactéries capables de produire une maladie chez l'hôte.

- **Types d'agents pathogènes** : la pathogénicité est utilisée pour diviser les agents pathogènes en deux groupes : pathogènes primaires et opportunistes.

### **1. Agents pathogènes primaires (les véritables agents pathogènes)**

Les agents pathogènes primaires (les véritables agents pathogènes) sont les organismes capables de provoquer une maladie chez des individus auparavant en bonne santé avec des défenses immunologiques intactes. Cependant, ces bactéries peuvent plus facilement causer des maladies chez les individus avec des défenses affaiblies ; par ex. certains agents pathogènes, tels que *Mycobacterium tuberculosis*, provoquent fréquemment des maladies lorsqu'ils pénètrent dans un hôte sensible.

### **2. Pathogènes opportunistes**

Les agents pathogènes opportunistes provoquent rarement la maladie chez les individus dont les défenses immunologiques et anatomiques sont intactes. Ces bactéries ne peuvent provoquer une maladie que lorsque ces défenses sont altérées ou compromises, à la suite d'une maladie congénitale ou acquise ou par l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur ou de techniques chirurgicales.

De nombreux agents pathogènes opportunistes font partie de la flore normale, par ex. *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli*.

- **La différence entre la contamination, l'infection et la maladie**

La contamination, l'infection et la maladie peuvent être considérées comme une séquence de conditions dans lesquelles la gravité des effets des micro-organismes sur leurs hôtes augmente.

- La contamination signifie que les micro-organismes sont présents. Les objets inanimés et les surfaces de la peau et des muqueuses peuvent être contaminés par une grande variété de micro-organismes. Les commensaux ne font pas de mal, mais les parasites ont la capacité d'envahir les tissus.
- L'infection fait référence à la multiplication de tout organisme parasite dans ou sur le corps de l'hôte.

**NB** : le terme infestation est utilisé pour désigner la présence de parasites plus gros, tels que des vers ou des arthropodes, dans ou sur le corps.

- Si une infection perturbe le fonctionnement normal de l'hôte, la maladie survient. La maladie est une perturbation de l'état de santé dans laquelle le corps ne peut pas accomplir toutes ses fonctions normales.

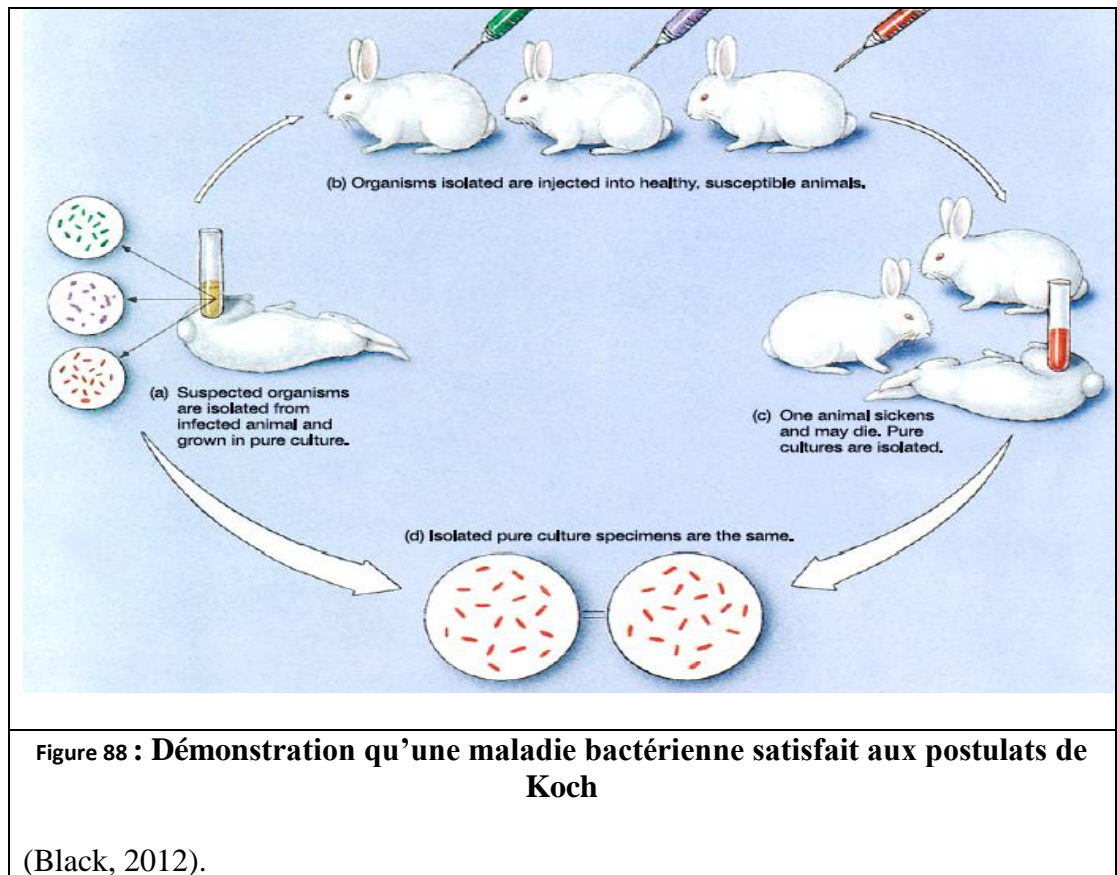
## 2. Postulats de Koch

La première démonstration directe du rôle des bactéries dans les maladies vint de l'étude du charbon par le médecin allemand Robert Koch. Koch a identifié la bactérie (*Bacillus anthracis*) responsable du charbon, une maladie hautement contagieuse et mortelle chez le bétail et parfois chez l'homme. Il a reconnu à la fois les cellules en division active (les cellules végétatives) et les cellules dormantes (spores) et a développé des techniques pour les étudier in vitro (en dehors d'un organisme vivant).

Les travaux de Koch pour établir les relations causales entre un micro-organisme et une maladie spécifique, sont connus sous le nom de **postulats de Koch**. Ils peuvent être résumés comme suit :

1. L'agent causal spécifique doit être observé dans chaque cas de maladie.
2. L'agent doit être isolé d'un hôte malade et doit être cultivé en culture pure.
3. Lorsque l'agent issu de la culture pure est inoculé à des hôtes expérimentaux sains mais sensibles, l'agent doit provoquer la même maladie.
4. L'agent doit être ré-isolé de l'hôte expérimental malade inoculé et identifié comme étant identique à l'agent causal spécifique d'origine.

Il est relativement facile aujourd'hui de démontrer que chaque postulat est satisfait pour diverses maladies causées par des bactéries (figure 88). Certaines bactéries, cependant, sont difficiles à cultiver parce qu'elles ont des besoins nutritionnels exigeants ou d'autres besoins particuliers pour leur croissance. Par exemple, bien que l'agent causal de la syphilis, *Treponema pallidum*, soit connu depuis de nombreuses années, il n'a pas été cultivé avec succès sur des milieux artificiels. De plus, les parasites tels que les virus et les rickettsies ne peuvent pas être cultivés dans des milieux artificiels et doivent plutôt être cultivés dans des cellules vivantes. Pour certains agents pathogènes chez l'homme, aucun autre hôte n'a été trouvé. Par conséquent, dans de tels cas, l'inoculation à un hôte sensible est impossible à moins de trouver des volontaires humains. Il existe des problèmes éthiques évidents associés à l'inoculation d'agents infectieux à des êtres humains, même si des volontaires sont disponibles.



### 3. Physiopathologie

Les bactéries pathogènes sont transmises à l'hôte de diverses façons, la porte d'entrée :

- 1) ingestion d'eau ou d'aliments contaminés (voie digestive) ;
- 2) inhalation d'aérosols ou de particules associés à des bactéries (voie respiratoire) ;
- 3) inoculation cutanée par contact direct ou indirect (voie cutanée) ;
- 4) inoculation muqueuse directe par la salive ou les sécrétions sexuelles ;
- 5) inoculation transcutanée par les insectes (*Yersinia pestis*, *Rickettsia*, *Borrelia...*), par traumatismes ou manipulations iatrogènes.

La source de l'agent infectieux (pathogène) peut être **exogène**, provenant d'une source extérieure au corps (l'environnement ou une autre personne ou animal), ou **endogène**, déjà existante sur ou dans le corps (microbiote normal ou infection auparavant silencieuse).

La 1<sup>ère</sup> phase du processus infectieux est l'implantation (ou colonisation) par les bactéries du revêtement cutané-muqueux. Suit éventuellement d'une dissémination

des bactéries par la circulation sanguine et de métastases infectieuses à de nombreux organes. Ces grandes étapes sont retrouvées pour tous les micro-organismes (virus bactéries, parasites) et comportent donc une porte d'entrée, une dissémination sanguine éventuelle, des métastases infectieuses. Le diagnostic bactériologique s'attachera donc à rechercher les micro-organismes à partir de ces trois phases du processus infectieux.

#### - Pouvoir pathogène et virulence

Le type et la gravité de l'infection dépendent à la fois du pouvoir pathogène de la bactérie de sa virulence.

- **Le pouvoir pathogène**

Les agents pathogènes varient dans leur capacité à perturber l'état de santé d'un individu, c'est-à-dire qu'ils présentent différents degrés de pathogénicité. Certains agents pathogènes, tels que *Mycobacterium tuberculosis*, provoquent fréquemment des maladies lorsqu'ils pénètrent dans un hôte sensible. D'autres agents, tels que *Staphylococcus epidermidis*, ne provoquent des maladies que dans de rares cas et généralement uniquement chez des hôtes dotés de défenses médiocres. La plupart des agents infectieux présentent un degré de pathogénicité compris entre ces extrêmes.

- **La virulence**

La virulence fait référence à l'intensité de la maladie produite par des agents pathogènes et varie selon les différentes espèces microbiennes. Par exemple, *Bacillus cereus* provoque une légère gastro-entérite, tandis que le virus de la rage provoque des lésions neurologiques presque toujours mortelles. La virulence varie également entre les membres d'une même espèce d'agent pathogène. Par exemple, les organismes fraîchement expulsés d'un individu infecté ont tendance à être plus virulents que ceux d'un porteur, qui ne présente généralement aucun signe de maladie. La virulence d'un agent pathogène peut augmenter par **passage chez l'animal**, c'est-à-dire le transfert rapide de l'agent pathogène à travers les animaux d'une espèce susceptible d'être infectée par cet agent pathogène. Lorsqu'un animal tombe malade, les organismes libérés par cet animal sont transmis à un animal en bonne santé, qui tombe alors également malade. Si cette séquence est répétée deux ou trois fois, chaque animal nouvellement infecté souffre d'un cas de maladie plus grave que le précédent. Vraisemblablement, le microbe devient plus capable d'endommager l'hôte à chaque passage de l'animal. Parfois, une maladie infectieuse se propage de cette manière à travers les populations humaines, ce qui entraîne une épidémie de la maladie. Les épidémies de grippe se déroulent souvent de cette manière ; les premières personnes infectées présentent une maladie bénigne, mais les personnes infectées plus tard présentent une forme beaucoup plus grave de la maladie. Ce processus ne se poursuit pas éternellement ; le microbe atteint le summum de sa virulence et la population exposée acquiert une immunité.

La virulence d'un agent pathogène peut être diminuée par **l'atténuation**, c'est-à-dire l'affaiblissement de la capacité de l'agent pathogène à produire une maladie. L'atténuation peut être obtenue par des repiquages répétés sur des milieux de laboratoire ou par transposition de virulence. **La transposition de la virulence** est une technique de laboratoire dans laquelle un agent pathogène est transmis de son hôte normal à une nouvelle espèce hôte, puis transmis séquentiellement à de nombreux individus de la nouvelle espèce hôte. Finalement, l'agent pathogène s'adapte si complètement au nouvel hôte qu'il n'est plus virulent pour l'hôte d'origine. Autrement dit, la virulence a été transposée à un autre organisme. Pasteur a utilisé la transposition de virulence dans la préparation des vaccins antirabiques. Grâce à des passages répétés sur des lapins, le virus est finalement devenu moins nocif pour les humains et pouvait être utilisé sans danger dans un vaccin humain. (L'atténuation est une étape importante dans la production de certains vaccins utilisés aujourd'hui).

### - Îlots de pathogénicité

Certaines espèces bactériennes sont efficaces pour provoquer des maladies chez les organismes supérieurs car elles possèdent des gènes spécifiques pour les déterminants pathogènes. Ces gènes transférés horizontalement dans les bactéries (situés sur le chromosome bactérien) ont la capacité de rendre leurs nouveaux hôtes pathogènes ou capables de provoquer des maladies et sont appelés **îlots de pathogénicité**. Ces segments de gènes peuvent être assez volumineux (jusqu'à 200 kilo paires de base) et coder pour un ensemble de gènes de virulence. Les propriétés majeures des îlots de pathogénicité sont les suivantes :

- (1) ils possèdent un ou plusieurs gènes de virulence ;
- (2) ils sont présents dans le génome des membres pathogènes d'une espèce mais absents chez les membres non pathogènes ;
- (3) ils sont grands ;
- (4) ils ont une teneur en guanine plus cytosine (G + C) différente de celle du reste du génome bactérien ;
- (5) ils sont étroitement liés sur le chromosome aux gènes de l'ARNt ;
- (6) ils sont flanqués de répétitions directes ;
- (7) on les retrouve souvent avec des parties du génome associées à des éléments génétiques mobiles ;
- (8) ils présentent souvent une instabilité génétique ;

(8) ils contiennent divers gènes importants pour la pathogenèse, notamment la résistance aux antibiotiques, les adhésines, les invasines et les exotoxines ; ainsi que les gènes qui peuvent être impliqués dans la mobilisation génétique.

(9) et ils représentent souvent des structures en mosaïque avec des composants acquis à des moments différents. Collectivement, les propriétés des îlots de pathogénicité suggèrent qu'ils proviennent d'un transfert de gènes provenant d'espèces étrangères.

#### **- Pouvoir invasif (Biofilms bactériens et évasion bactérienne...)**

La capacité d'un agent pathogène à provoquer une maladie chez l'hôte dépend de la victoire de l'agent pathogène ou de l'hôte. Les agents pathogènes ont certaines capacités invasives (pouvoirs invasifs) et l'hôte dispose de diverses défenses.

L'invasion est le terme couramment utilisé pour décrire l'entrée de bactéries dans les cellules hôtes, impliquant un rôle actif pour les organismes et un rôle passif pour les cellules hôtes. Dans de nombreuses infections, les bactéries produisent des facteurs de virulence qui influencent les cellules hôtes, les amenant à engloutir (ingérer) la bactérie. Les cellules hôtes jouent un rôle très actif dans le processus.

Les agents pathogènes bactériens ont souvent des structures spéciales ou des caractéristiques physiologiques qui améliorent les chances de succès de l'invasion et de l'infection de l'hôte. Les facteurs de virulence sont des caractéristiques structurelles ou physiologiques qui aident les organismes à provoquer des infections et des maladies. Ces facteurs comprennent des structures telles que les biofilms bactériens, les pili pour l'adhésion aux cellules et aux tissus, des enzymes qui aident à échapper aux défenses de l'hôte ou à protéger l'organisme des défenses de l'hôte, et des toxines qui peuvent directement provoquer des maladies.

- **Biofilms bactériens**

Il est de plus en plus reconnu que de nombreuses infections sont causées par des bactéries qui ne se développent pas individuellement (ou planctoniquement) ; elles existent plutôt dans des communautés intimes et complexes communiquant entre elles. Il est de routine de se débrider les dents tous les jours pour éliminer le film de bactéries qui se développent pendant notre sommeil. De même, les biofilms sont associés aux infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa* et à la colonisation par *Legionella pneumophila* des systèmes d'eau des hôpitaux, entre autres. Les biofilms de *Chlamydia pneumoniae* qui colonisent les artères coronaires ont été impliqués dans les maladies cardiaques. Ce schéma de croissance commence par une seule bactérie nucléant une surface, suivie de sa réplication ou du recrutement d'autres bactéries dans une colonie en formation. La reconnaissance de ce modèle de croissance est de plus en plus appréciée. La stratégie conceptuelle de formation de biofilm est logique :

(1) en formant couche après couche de croissance bactérienne, la bactérie initiale est moins sensible à la clairance immunitaire, et

(2) la pénétration des anti-thérapeutiques est protégée par la croissance externe.

La capacité d'étudier les biofilms en laboratoire et in vivo est une science en pleine évolution.

- *Le rôle des biofilms bactériens*

Un biofilm est un agrégat de bactéries interactives attachées à une surface solide ou entre elles et enfermées dans une matrice d'exopolysaccharides. Ceci est distinct des bactéries planctoniques ou libres, dans lesquelles les interactions des micro-organismes ne se produisent pas de la même manière. Les biofilms forment une couche visqueuse sur les surfaces solides et se produisent dans la nature. Une seule espèce de bactérie peut être impliquée ou plusieurs espèces peuvent se coagréger pour former un biofilm. Des champignons, y compris des levures, sont parfois impliqués. Après la formation d'un biofilm, les molécules de détection de quorum [Le mot latin « quorum » fait référence au fait d'avoir suffisamment de membres présents pour faire des affaires] produites par les bactéries dans le biofilm s'accumulent, entraînant une modification de l'activité métabolique des bactéries [les molécules de détection de quorum « quorum-sensing » sont un système de communication par lequel les bactéries communiquent avec d'autres membres de leur espèce via des molécules inductrices signalant qu'il y en a suffisamment pour qu'une action métabolique ait lieu].

Les bactéries dans la matrice exopolysaccharidique peuvent être protégées des mécanismes immunitaires de l'hôte. Cette matrice fonctionne également comme une barrière de diffusion pour certains antimicrobiens, mais d'autres antimicrobiens peuvent s'y lier. Certaines des bactéries présentes dans le biofilm présentent une résistance marquée aux antimicrobiens par rapport à la même souche de bactéries cultivées librement dans un bouillon, ce qui explique pourquoi il est si difficile de traiter les infections associées aux biofilms.

Les biofilms sont importants dans les infections humaines persistantes et difficiles à traiter. Quelques exemples incluent les infections à *Staphylococcus epidermidis* et *S. aureus* des cathéters veineux centraux, les infections oculaires telles que celles qui se produisent avec les lentilles de contact et les lentilles intraoculaires, dans la plaque dentaire et dans les infections des prothèses articulaires. L'exemple peut-être le plus profond d'un biofilm dans l'infection humaine est celui des infections des voies respiratoires à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose.

- **évasion bactérienne**

Les bactéries provoquent des maladies en **adhérant** à un hôte. Les **adhésines** sont des protéines ou des glycoprotéines trouvées sur les pili d'attachement (fimbriae) et les capsules. La plupart des adhésines identifiées permettent à l'agent pathogène d'adhérer

uniquement aux récepteurs situés sur les membranes de certaines cellules ou tissus. Par exemple, une adhésine sur les pili d'attachement de certaines souches d'*Escherichia coli* se fixe aux récepteurs de certaines cellules épithéliales de l'hôte. (Les leucocytes de l'hôte ont également des récepteurs pour cette adhésine, de sorte que la même adhésine qui aide la bactérie à s'attacher peut également aider l'hôte à la détruire). Cependant, très souvent, les capsules et les pili d'attachement sont également des structures antiphagocytaires. Il est difficile pour les cellules phagocytaires d'engloutir les bactéries qui possèdent des capsules ou des pili d'attachement, ces structures constituent donc d'excellents facteurs de virulence.

L'attachement à la surface d'une cellule hôte ne suffit pas à provoquer une infection. Les microbes doivent également être capables de coloniser la surface de la cellule ou d'y pénétrer. **La colonisation** fait référence à la croissance de micro-organismes sur les surfaces épithéliales, telles que la peau, les muqueuses ou d'autres tissus hôtes. Pour que la colonisation ait lieu après l'adhésion, les agents pathogènes doivent survivre et se reproduire malgré les mécanismes de défense de l'hôte. Par exemple, les bactéries pathogènes présentes à la surface de la peau doivent résister aux conditions environnementales et aux sécrétions cutanées bactériostatiques. Ceux qui se trouvent sur les membranes respiratoires doivent échapper à l'action du mucus et des cils. Ceux qui recouvrent certaines parties du tube digestif doivent résister aux mouvements péristaltiques, au mucus, aux enzymes digestives et aux acides.

Seuls quelques agents pathogènes provoquent des maladies en colonisant les surfaces ; la plupart possèdent des facteurs de virulence supplémentaires qui permettent à l'agent pathogène d'envahir les tissus. Le degré **d'invasion** d'un pathogène – sa capacité à envahir et à se développer dans les tissus de l'hôte – est lié aux facteurs de virulence que possède le pathogène et détermine la gravité de la maladie qu'il produit. Certaines bactéries, comme les pneumocoques et autres streptocoques, libèrent des enzymes digestives qui leur permettent d'envahir rapidement les tissus et de provoquer des maladies graves. Les streptocoques produisent l'enzyme **hyaluronidase**, ou facteur de propagation. Cette enzyme digère l'acide hyaluronique, une substance gluante qui aide à maintenir les cellules de certains tissus ensemble. La digestion de l'acide hyaluronique permet aux streptocoques de passer entre les cellules épithéliales et d'envahir les tissus plus profonds. Certaines souches de *Streptococcus pyogenes* peuvent provoquer une désintégration rapide des tissus (fasciite nécrosante). Dans certains cas, le même agent pathogène peut présenter différents degrés d'envahissement et de pathogénicité selon les tissus.

Les bactéries libèrent d'autres substances, dont la plupart endommagent les tissus de l'hôte. Ainsi, les enzymes qui contribuent aux lésions tissulaires constituent un autre facteur de virulence important. Les **hémolysines** lysent les globules rouges dans les cultures et peuvent ou non causer directement des lésions tissulaires chez l'hôte. Les **leucocidines** détruisent les neutrophiles. La **coagulase** est une enzyme bactérienne qui accélère la coagulation du sang. Lorsque le plasma sanguin (la partie liquide du sang) s'échappe des vaisseaux vers les tissus, la coagulase provoque la coagulation du plasma.

*Staphylococcus aureus* produit de la coagulase pour faciliter l'infection. La coagulase est une arme à double tranchant : elle empêche les organismes de se propager, mais elle aide également à les protéger des défenses immunitaires qui pourraient autrement les détruire. À l'inverse, l'enzyme bactérienne **streptokinase** dissout les caillots sanguins. Les agents pathogènes piégés dans des caillots sanguins se libèrent pour se propager à d'autres tissus en sécrétant ces facteurs de virulence.

Certains agents pathogènes bactériens pénètrent réellement dans les cellules. Les rickettsies, les chlamydias et quelques autres agents pathogènes doivent envahir les cellules pour croître, se reproduire et produire des maladies. Dans d'autres situations, les organismes qui peuvent survivre dans les cellules phagocytaires de l'hôte échappent non seulement à la destruction par les phagocytes, mais sont également transportés gratuitement vers les tissus corporels plus profonds. Ces organismes comprennent *Mycobacterium tuberculosis* et *Neisseria gonorrhoeae*.

### -Toxinogénèse

De nombreuses bactéries produisent également des toxines.

Les **toxines** sont des produits bactériens qui endommagent directement les tissus ou déclenchent des activités biologiques destructrices. Les toxines et les activités similaires sont des enzymes dégradantes qui provoquent la lyse des cellules ou des protéines spécifiques de liaison aux récepteurs qui déclenchent des réactions toxiques dans un tissu cible spécifique. De plus, les endotoxines (partie lipidique A du lipopolysaccharide) et les protéines super-antigènes favorisent une stimulation excessive ou inappropriée des réponses innées ou immunitaires.

**Dans de nombreux cas, la toxine est entièrement responsable des symptômes caractéristiques de la maladie.** Par exemple, la **toxine préformée** présente dans les aliments intervient dans l'intoxication alimentaire provoquée par *S. aureus* et *Bacillus cereus* et dans le botulisme provoqué par *Clostridium botulinum*. Les symptômes provoqués par une toxine préformée surviennent beaucoup plus tôt que pour d'autres formes de gastro-entérite, car l'effet est comparable à celui d'un poison et les bactéries n'ont pas besoin de se développer pour que les symptômes apparaissent. Étant donné qu'une toxine peut se propager de manière systémique par la circulation sanguine, des symptômes peuvent apparaître dans un site éloigné du site d'infection, comme cela se produit dans le tétanos, causé par *Clostridium tetani*.

Les toxines produites par les bactéries sont généralement classées en deux groupes : les exotoxines et les endotoxines.

- **Exotoxines**

Les **exotoxines** sont des protéines qui peuvent être produites par des bactéries Gram-positives ou Gram-négatives et comprennent des enzymes cytolitiques et des

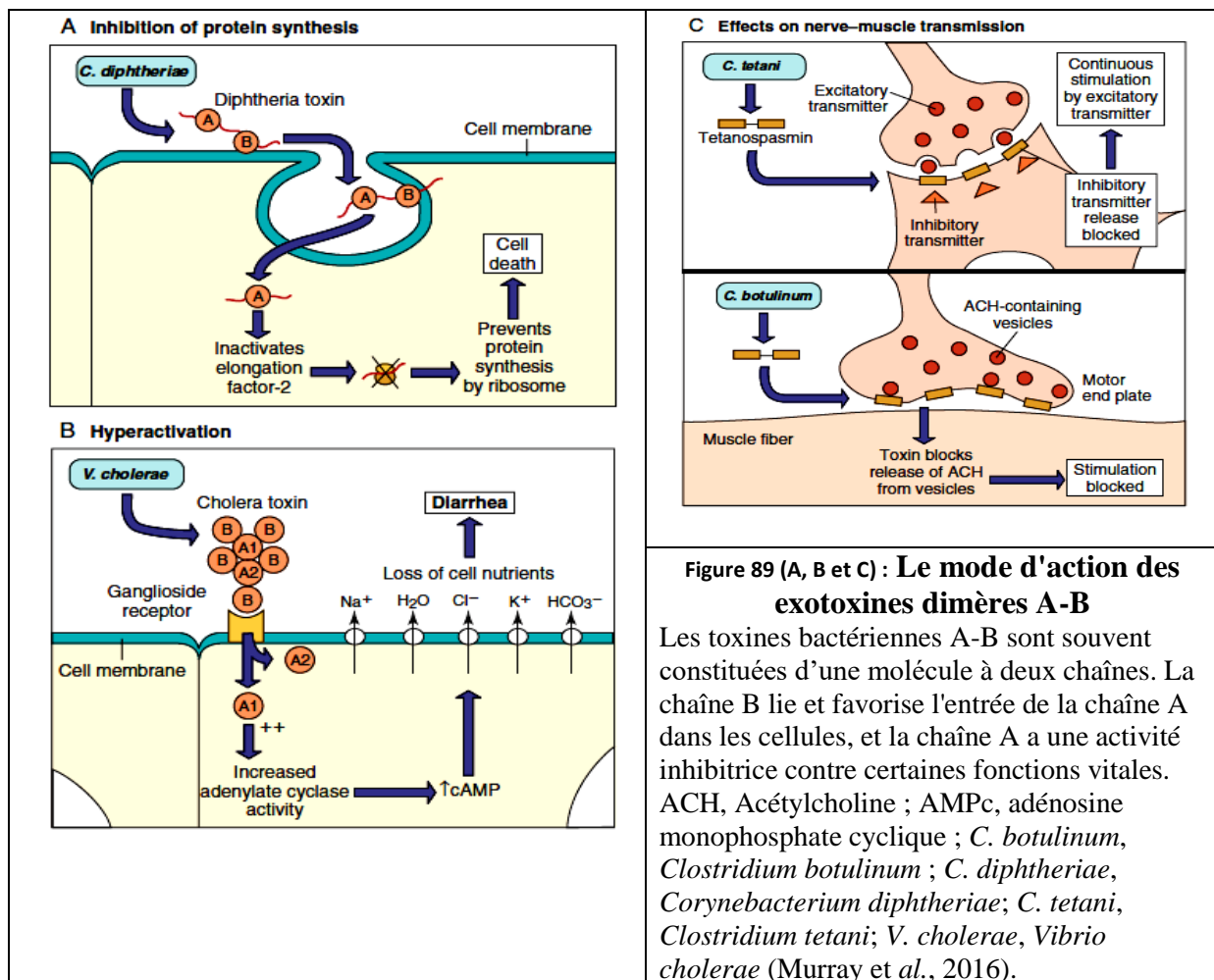
protéines de liaison aux récepteurs qui modifient une fonction ou tuent la cellule. Dans de nombreux cas, le gène de la toxine est codé sur un plasmide (toxine tétanique de *C. tetani*, toxines thermolabiles [LT] et thermostables [ST] d'*E. coli* entérotoxigène) ou un phage lysogène (*Corynebacterium diphtheriae* et *C. botulinum*).

Les toxines cytolytiques comprennent des enzymes perturbant la membrane telles que la toxine  $\alpha$  (phospholipase C) produite par *C. perfringens*, qui décompose la sphingomyéline et d'autres phospholipides membranaires. Les hémolysines s'insèrent et perturbent les érythrocytes et autres membranes cellulaires. Les toxines porogènes, notamment la streptolysine O, peuvent favoriser la fuite d'ions et d'eau de la cellule et perturber les fonctions cellulaires ou la lyse cellulaire.

De nombreuses toxines sont dimères, avec des sous-unités A et B (toxines A-B). La partie B des toxines A-B se lie à un récepteur spécifique de la surface cellulaire, puis la sous-unité A est transférée à l'intérieur de la cellule, où elle agit pour favoriser les lésions cellulaires (B pour liaison, A pour action). Les tissus ciblés par ces toxines sont très définis et limités (figure 89). Les cibles biochimiques des toxines A-B comprennent les ribosomes, les mécanismes de transport et la signalisation intracellulaire (production d'adénosine monophosphate cyclique [AMPc], fonction de la protéine G), avec des effets allant de la diarrhée à la perte de la fonction neuronale jusqu'à la mort.

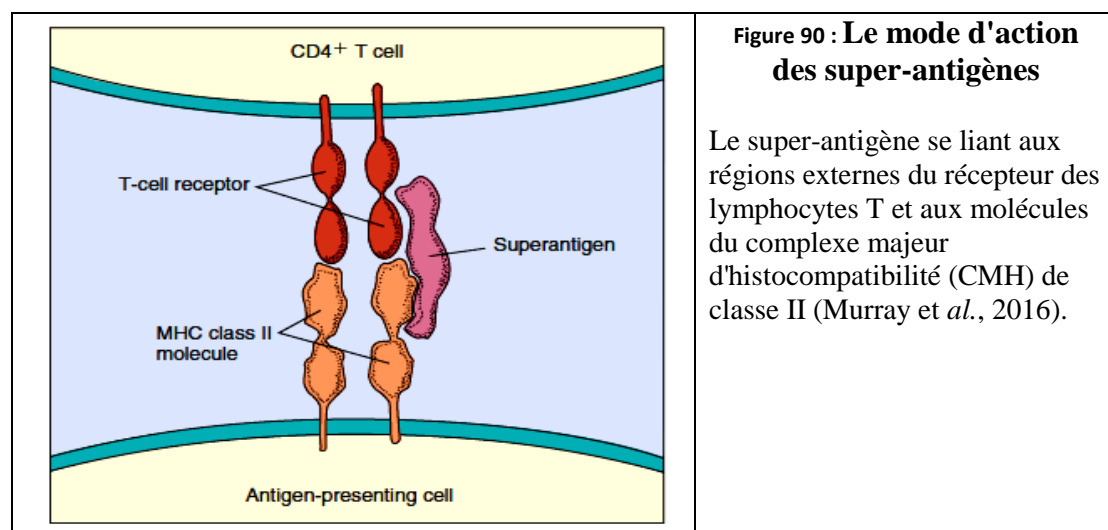
Les super-antigènes constituent un groupe particulier de toxines (Figure 90). Ces molécules activent les lymphocytes T en se liant simultanément à un récepteur de lymphocytes T et à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) sur une cellule présentatrice d'antigène sans nécessiter d'antigène. *Les superantigènes activent un grand nombre de lymphocytes T pour libérer de grandes quantités (tempête de cytokines) d'interleukines (y compris IL-1, IL-2, IL-6), de TNF- $\alpha$ , d'interféron (IFN)- $\gamma$  et de diverses chimiokines, provoquant une fièvre potentiellement mortelle, un choc, des éruptions cutanées et des réponses de type auto-immune.* Cette stimulation des cellules T par un super-antigène peut également entraîner la mort des cellules T activées, entraînant la perte de clones de cellules T spécifiques et la perte de leurs réponses immunitaires. Les super-antigènes comprennent la toxine du syndrome de choc toxique de *S. aureus*, les entérotoxines staphylococciques et la toxine érythroène A ou C de *S. pyogenes*.

Les exotoxines sont appelées **neurotoxines** si elles affectent le système nerveux et **entérotoxines** si elles affectent le système digestif. Les **anatoxines** sont des exotoxines inactivées qui conservent des propriétés antigéniques et sont utilisées pour l'immunisation.



**Figure 89 (A, B et C) : Le mode d'action des exotoxines dimères A-B**

Les toxines bactériennes A-B sont souvent constituées d'une molécule à deux chaînes. La chaîne B lie et favorise l'entrée de la chaîne A dans les cellules, et la chaîne A a une activité inhibitrice contre certaines fonctions vitales. ACH, Acétylcholine ; AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; *C. botulinum*, *Clostridium botulinum* ; *C. diphtheriae*, *Corynebacterium diphtheriae* ; *C. tetani*, *Clostridium tetani* ; *V. cholerae*, *Vibrio cholerae* (Murray et al., 2016).



- **Endotoxine et autres composants de la paroi cellulaire**

La présence de composants de la paroi cellulaire bactérienne agit comme un signal d'infection qui fournit un puissant avertissement multi-alarme au corps pour

activer les systèmes de protection de l'hôte. Les modèles moléculaires de ces structures (modèles moléculaires associés aux pathogènes [**pathogen associated molecular patterns : PAMPs**]) se lient aux récepteurs de type Toll (Toll-like receptors: TLRs) et à d'autres molécules et stimulent la production de cytokines. Dans certains cas, la réponse de l'hôte est excessive et peut même mettre la vie en danger. La **partie lipidique A du lipopolysaccharide (LPS)** produite par les bactéries à Gram négatif est un puissant activateur des réactions inflammatoires et en phase aiguë et est appelée **endotoxine**. Il est important de comprendre que l'endotoxine n'est pas la même chose que l'exotoxine et que seules les bactéries Gram-négatives produisent de l'endotoxine. Des réponses plus faibles, de type endotoxine, peuvent se produire contre les structures bactériennes à Gram positif, notamment les **acides lipotéichoïques**.

Les bactéries à Gram négatif libèrent de l'endotoxine lors de l'infection. L'endotoxine se lie à des récepteurs spécifiques (CD14 et TLR4) sur les macrophages, les cellules B et d'autres cellules et stimule la production et la libération de cytokines en phase aiguë, telles que l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et les prostaglandines (figure 91). L'endotoxine stimule également la croissance (mitogène) des cellules B.

À faibles concentrations, l'endotoxine stimule le développement de réponses protectrices telles que la fièvre, la vasodilatation et l'activation de réponses immunitaires et inflammatoires. Cependant, les niveaux d'endotoxines dans le sang des patients atteints de **sepsie bactérienne à Gram négatif** (bactéries dans le sang) peuvent être très élevés, et la réponse systémique à ceux-ci peut être écrasante, entraînant un choc, voire la mort. Des concentrations élevées d'endotoxine peuvent également activer la voie alternative du complément et la production d'anaphylatoxines (C3a, C5a), contribuant ainsi à la vasodilatation systémique et aux fuites capillaires. En association avec le TNF- $\alpha$  et l'IL-1, cela peut entraîner une **hypotension** et un **choc**. La **coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD)** peut également résulter de l'activation des voies de coagulation sanguine. La forte fièvre, les pétéchies (lésions cutanées résultant d'une fuite capillaire) et les symptômes potentiels de choc (résultant d'une perméabilité vasculaire accrue) associés à l'infection à *Neisseria meningitidis* peuvent être liés aux grandes quantités d'endotoxines libérées au cours de l'infection.

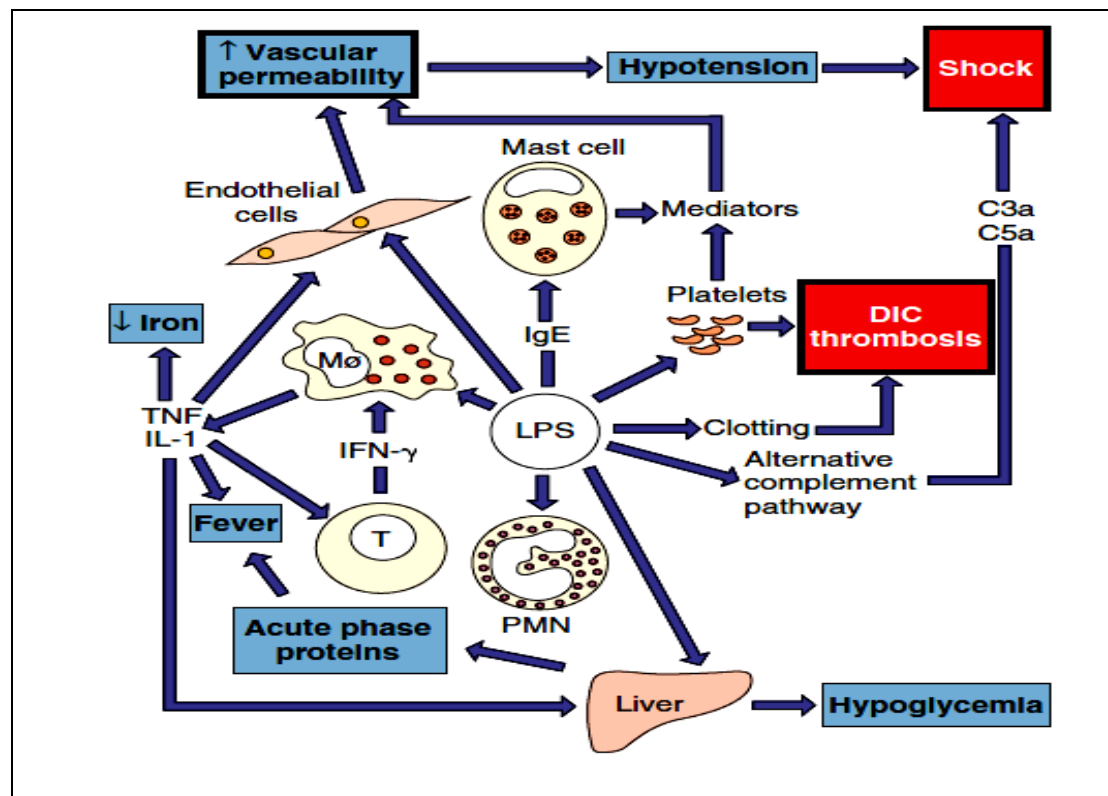


Figure 91 : Les nombreuses activités du lipopolysaccharide (LPS)

Cette endotoxine bactérienne active presque tous les mécanismes immunitaires, ainsi que la voie de la coagulation, ce qui fait du LPS l'un des stimuli immunitaires les plus puissants connus. CIVD (DIC), Coagulation intravasculaire disséminée ; IFN- $\gamma$ , interféron- $\gamma$ ; IgE, immunoglobuline E ; IL-1, interleukine-1 ; PMN, leucocytes polymorphonucléaires (neutrophiles) ; TNF, facteur de nécrose tumorale (Murray et *al.*, 2016).

#### 4. Échappement des bactéries aux défenses immunitaires

Les bactéries virulentes envahissent les tissus et se propagent dans l'organisme. Elles possèdent des mécanismes leur permettant de surmonter les défenses de l'hôte.

Logiquement, plus une infection bactérienne persiste longtemps chez un hôte, plus la bactérie a le temps de se développer et de causer des dommages. Par conséquent, les bactéries qui peuvent échapper ou neutraliser les défenses de l'hôte ont un plus grand potentiel de provoquer des maladies. Les bactéries échappent à la reconnaissance et à la destruction par les cellules phagocytaires, inactivent ou échappent au système du complément et aux anticorps, et se développent même à l'intérieur des cellules pour se cacher des réponses de l'hôte.

\* La **capsule** est l'un des facteurs de virulence les plus importants. Ces couches visqueuses fonctionnent en protégeant les bactéries des réponses immunitaires et phagocytaires. Les capsules sont généralement constituées de polysaccharides, qui sont de mauvais immunogènes. La capsule de *S. pyogenes*, par exemple, est composée d'acide hyaluronique, qui imite le tissu conjonctif humain, masquant ainsi les bactéries et les empêchant d'être reconnues par le système immunitaire. La capsule agit

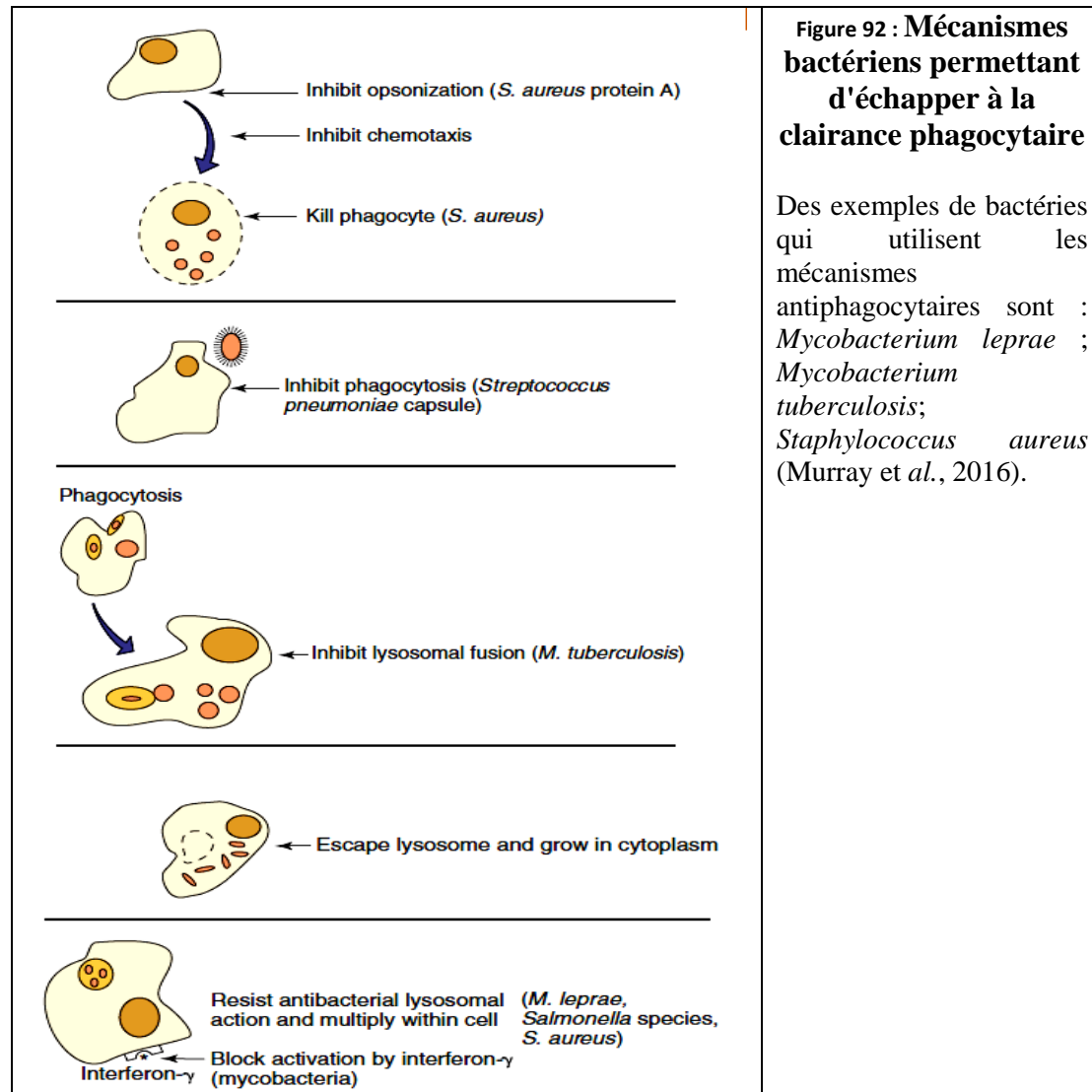
également comme un maillot de football gluant, dans la mesure où elle est difficile à saisir et se déchire lorsqu'elle est saisie par un phagocyte. La capsule protège également une bactérie de la destruction au sein du phagolysosome d'un macrophage ou d'un leucocyte. Toutes ces propriétés peuvent prolonger le temps que les bactéries passent dans le sang (bactériémie) avant d'être éliminées par les réponses de l'hôte. Les mutants de bactéries normalement encapsulées qui perdent la capacité de fabriquer une capsule perdent également leur virulence ; des exemples de telles bactéries sont *Streptococcus pneumoniae* et *N. meningitidis*. Un **biofilm**, constitué de matériau capsulaire, peut empêcher les anticorps et le complément d'atteindre la bactérie.

\* Les bactéries peuvent échapper aux réponses anticorps par **variation antigénique**, par **inactivation des anticorps** ou par **croissance intracellulaire**. *N. gonorrhoeae* peut modifier la structure des antigènes de surface pour échapper aux réponses anticorps et produit également une protéase qui dégrade les IgA. *S. aureus* fabrique une protéine de liaison aux IgG, la protéine A, qui empêche l'anticorps d'activer le complément ou d'être une opsonine et masque la détection de la bactérie. Les bactéries qui se développent de manière intracellulaire comprennent les mycobactéries, les franciselles, les brucelles, les chlamydiae et les rickettsies. Contrairement à la plupart des bactéries, le contrôle de ces infections nécessite des réponses immunitaires des cellules T auxiliaires pour activer les macrophages afin de tuer ou de créer une paroi (granulome) autour des cellules infectées (comme pour *M. tuberculosis*).

\* Les bactéries échappent à l'action du complément en empêchant l'accès des composants à la membrane, en se masquant et en inhibant l'activation de la cascade. Le peptidoglycane épais des bactéries à Gram positif et l'antigène O long du LPS de la plupart des bactéries à Gram négatif (pas *Neisseria spp.*) limitent l'accès au complément et protègent la membrane bactérienne contre les dommages. En dégradant le composant C5a du complément, *S. pyogenes* peut limiter la chimiotaxie des leucocytes au site d'infection. Pour compenser le manque d'antigène O, *N. gonorrhoeae* attache l'acide sialique à son lipooligosaccharide (LOS) pour inhiber l'activation du complément.

\* Les phagocytes (neutrophiles, macrophages) constituent la défense antibactérienne la plus importante, mais de nombreuses bactéries peuvent contourner la destruction phagocytaire de diverses manières ou tuer le phagocyte. Elles peuvent produire des enzymes capables de lyser les cellules phagocytaires (par exemple la streptolysine produite par *S. pyogenes* ou la toxine  $\alpha$  produite par *C. perfringens*). Elles peuvent inhiber la phagocytose (par exemple les effets de la **capsule** et de la **protéine M** produite par *S. pyogenes*) ou bloquer la destruction intracellulaire. Les mécanismes bactériens de protection contre la destruction intracellulaire comprennent le blocage de la fusion du lysosome avec le phagosome pour empêcher tout contact avec son contenu bactéricide (*Mycobacterium spp.*), la résistance médiée par la capsule ou enzymatique aux enzymes ou substances lysosomales bactéricides et la capacité de sortir du phagosome dans le cytoplasme de l'hôte avant d'être exposé aux enzymes lysosomales (figure 92). La production de catalase par les staphylocoques peut décomposer le

peroxyde d'hydrogène produit par le système myéloperoxydase. De nombreuses bactéries internalisées mais qui survivent à la phagocytose peuvent utiliser la cellule comme lieu de croissance et se cacher des réponses immunitaires et comme moyen de se propager dans tout le corps.



\* *S. aureus* peut également échapper aux défenses de l'hôte en isolant le site d'infection. *S. aureus* peut produire de la coagulase, une enzyme qui favorise la conversion de la fibrine en fibrinogène pour produire une barrière semblable à un caillot ; cette caractéristique distingue *S. aureus* de *S. epidermidis*. *S. aureus* et *S. pyogenes* et d'autres bactéries sont pyogènes (formations de pus) et la formation de pus lors de la mort des neutrophiles limite l'accès des anticorps ou des antibiotiques à la bactérie. *M. tuberculosis* est capable de survivre chez un hôte en favorisant le développement d'un granulome, à l'intérieur duquel des bactéries viables peuvent résider pendant toute la vie de l'individu infecté. La bactérie peut reprendre sa croissance en cas de déclin du statut immunitaire de la personne.

---

## Chapitre 7 : L'antibiorésistance

Le terme chimiothérapie a été inventé par le chercheur médical allemand Paul Ehrlich pour décrire l'utilisation de substances chimiques pour tuer des organismes pathogènes sans blesser l'hôte. Aujourd'hui, la chimiothérapie fait référence à l'utilisation de substances chimiques pour traiter divers aspects de la maladie : de l'aspirine pour les maux de tête et l'inflammation, des médicaments pour réguler la fonction cardiaque et des agents pour débarrasser le corps des cellules malignes. Avec cette définition moderne et large de la chimiothérapie, nous décrivons un agent chimiothérapeutique comme toute substance chimique utilisée dans la pratique médicale. Ces agents sont également appelés médicaments.

En microbiologie, nous nous intéressons aux agents antimicrobiens, un groupe spécial d'agents chimio-thérapeutiques utilisés pour traiter les maladies causées par des microbes. Ainsi, en termes modernes, un agent antimicrobien est synonyme d'un agent chimio-thérapeutique tel qu'Ehrlich l'a initialement défini.

**Antibiose** signifie littéralement « contre la vie ». Dans les années 1940, Selman Waksman, le découvreur de la streptomycine, définissait un **antibiotique** comme « une substance chimique produite par des micro-organismes qui a la capacité d'inhiber la croissance des bactéries et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes en solution diluée ». En revanche, les agents synthétisés en laboratoire sont appelés drogues **synthétiques**. Certains agents antimicrobiens sont synthétisés en modifiant chimiquement une substance provenant d'un micro-organisme. Le plus souvent, un précurseur synthétique différent du précurseur naturel est fourni à un micro-organisme, qui achève alors la synthèse de l'antibiotique. Les agents antimicrobiens fabriqués en partie par synthèse en laboratoire et en partie par des micro-organismes sont appelés médicaments **semi-synthétiques**.

L'année 1935 fut une année importante pour la chimiothérapie des infections bactériennes systémiques. Bien que des antiseptiques aient été appliqués localement pour empêcher la croissance de micro-organismes, les antiseptiques existants étaient inefficaces contre les infections bactériennes systémiques. En 1935, il a été démontré que le colorant protosil protégeait les souris contre une infection streptococcique systémique et était curatif chez les patients souffrant de telles infections. On a rapidement découvert que le protosil était clivé dans le corps pour libérer du *p*-aminobenzène sulfonamide (sulfanilamide), qui s'est révélé avoir une activité antibactérienne. Ce premier médicament « sulfamide » a marqué le début d'une nouvelle ère en médecine. On a finalement découvert que des composés produits par des micro-organismes (antibiotiques) inhibaient la croissance d'autres micro-organismes. Par exemple, Alexander Fleming fut le premier à comprendre que la moisissure *Penicillium* empêchait la multiplication des staphylocoques. Un concentré d'une culture de cette moisissure a été préparé et la remarquable activité antibactérienne et l'absence de toxicité du **premier antibiotique**, la pénicilline, ont été démontrées. La

streptomycine et les tétracyclines ont été développées dans les années 1940 et 1950, suivies rapidement par le développement d'aminosides supplémentaires, de pénicillines semi-synthétiques, de céphalosporines, de quinolones et d'autres antimicrobiens. Tous ces agents antibactériens ont considérablement augmenté l'éventail des maladies infectieuses pouvant être prévenues ou traitées. Bien que le développement de nouveaux antibiotiques antibactériens ait pris du retard ces dernières années, certaines nouvelles classes d'agents ont été introduites, notamment les cétolides (par exemple, la **télithromycine**), les glycylicyclines (**tigécycline**), les lipopeptides (**daptomycine**), les streptogramines (**quinupristine-dalfopristine**) et les oxazolidinones (**linézolide**).

Malheureusement, de nombreux agents pathogènes développent une résistance aux médicaments antimicrobiens disponibles ce qui diminue notre capacité à lutter contre les maladies infectieuses. Il est vrai que les échecs précoces des traitements antibiotiques ne représentaient pas un problème clinique significatif car d'autres classes d'agents, avec des cibles cellulaires différentes, étaient disponibles. C'est l'émergence de résistances multiples, c'est-à-dire de résistances à plusieurs types d'agents antibiotiques, qui posent aujourd'hui des problèmes majeurs en clinique. Plusieurs facteurs ont conduit à cette situation dans les années 1970 et 1980, notamment l'introduction de nouveaux agents chimio-thérapeutiques à spectre étendu et les progrès des techniques médicales, par exemple en matière de transplantation d'organes et de chimiothérapie anticancéreuse. Le résultat net a été une énorme pression sélective en faveur des espèces multi-résistantes. À cela s'ajoute une forte baisse de l'introduction d'agents agissant sur de nouvelles cibles cellulaires au cours des 30 dernières années, par rapport aux 20 années qui ont suivi la Seconde Guerre mondiale.

Il existe actuellement un certain nombre d'organismes résistants qui suscitent des inquiétudes. Les organismes à Gram positif notables comprennent le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et les staphylocoques à coagulase négative, le *S. aureus* à sensibilité intermédiaire aux glycopeptides (GISA), les espèces d'*Enterococcus* résistants à la vancomycine (ERV) et le *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline. Parmi les organismes à Gram négatif multi-résistants, on peut citer les *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Acinetobacter baumannii*, ainsi que les Enterobacteriaceae porteurs de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. La multi-résistance aux bacilles acido-résistants *Mycobacterium tuberculosis* et au complexe *M. avium* constitue une menace majeure pour la santé dans le monde entier.

## 1. Modes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent généralement sur une structure ou une fonction microbienne importante qui diffère généralement de son homologue chez les animaux. Cette différence est exploitée en exerçant un effet bactéricide (mortal) ou un effet bactériostatique (inhibiteur de croissance) sur les bactéries tout en ayant des effets minimes sur les cellules hôtes. Cependant, le système immunitaire de l'hôte ou les

défenses phagocytaires doivent encore achever l'élimination des microbes envahisseurs.

Les cinq différents modes d'action des antibiotiques sur la cellule bactérienne sont :

- (a) l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire,
- (b) la perturbation de la fonction de la membrane cellulaire,
- (c) l'inhibition de la synthèse des protéines,
- (d) l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques et
- (e) action comme anti-métabolites (figure 93).

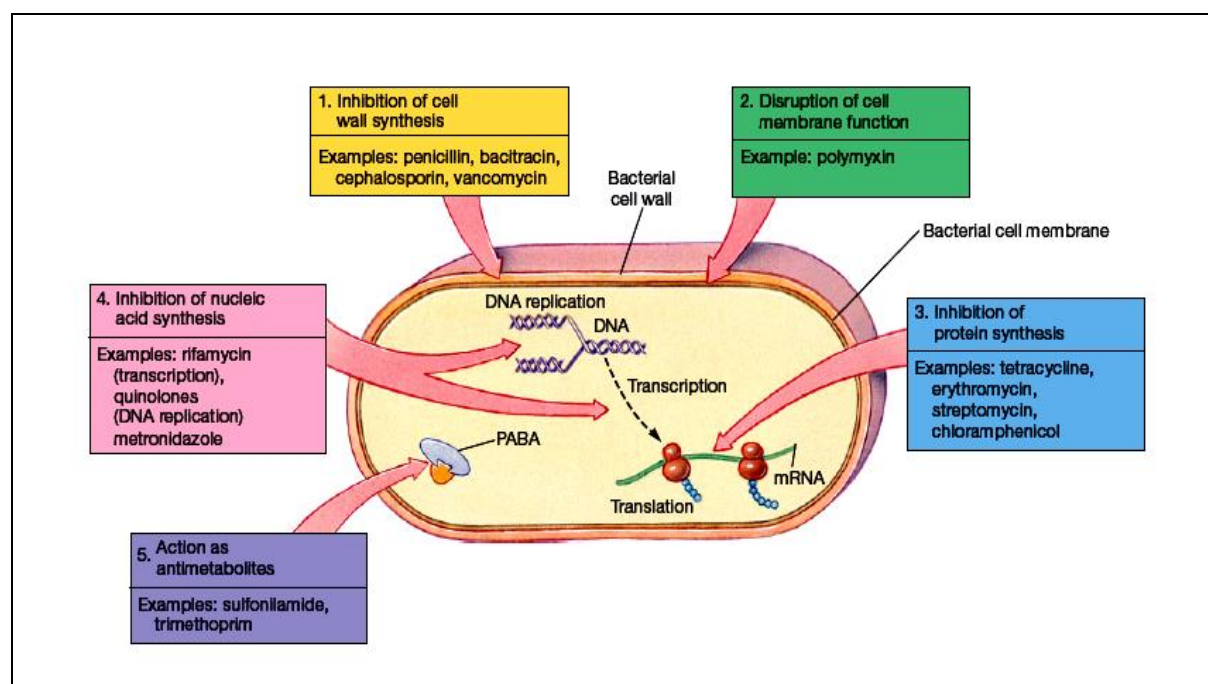


Figure 93 : Modes d'action des antibiotiques

Cinq modes d'action majeurs par lesquels les médicaments exercent leurs effets antimicrobiens sur les cellules bactériennes (Black, 2012).

### (a) Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire

De nombreuses cellules bactériennes ont des parois cellulaires externes rigides, alors que les cellules animales sont dépourvues de parois cellulaires. Par conséquent, l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire endommage sélectivement les cellules bactériennes. Les cellules bactériennes, notamment celles à Gram positive, ont une pression osmotique interne élevée. Sans paroi cellulaire normale et solide, ces cellules éclatent lorsqu'elles sont soumises à la faible pression osmotique des fluides corporels.

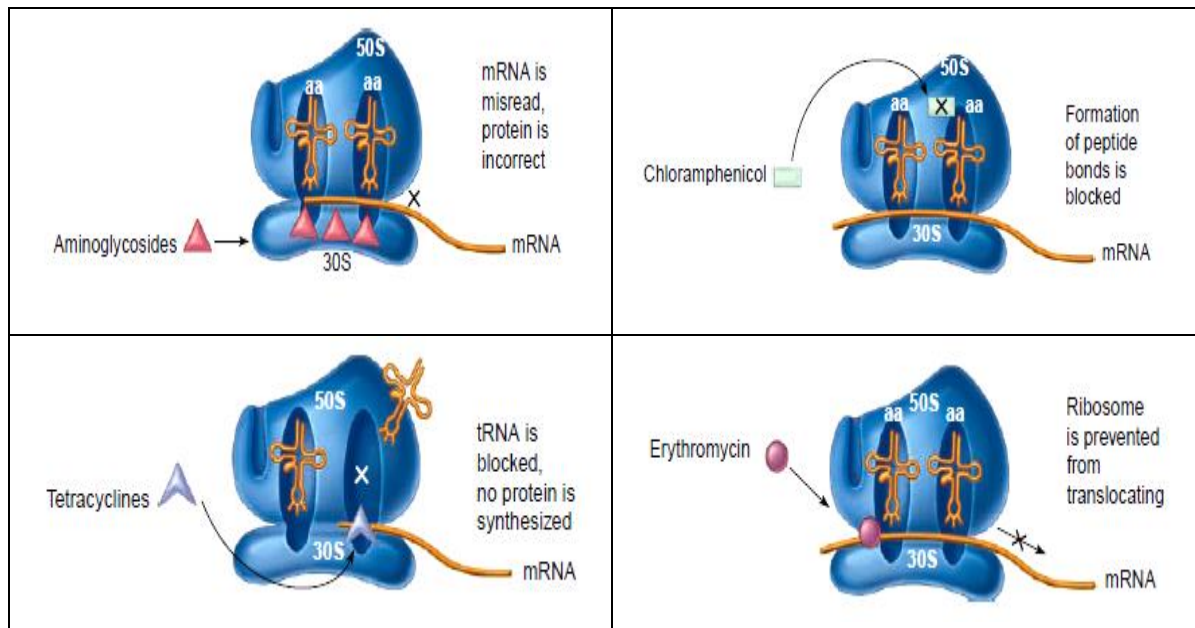
Les antibiotiques tels que la pénicilline et la céphalosporine contiennent une structure chimique appelée *anneau  $\beta$ -lactame*, qui se fixe aux enzymes qui réticulent les peptidoglycanes. En interférant avec la réticulation des tétrapeptides, ces antibiotiques empêchent la synthèse de la paroi cellulaire.

### **(b) Perturbation de la fonction de la membrane cellulaire**

Toutes les cellules sont délimitées par une membrane. Bien que les membranes de toutes les cellules soient assez similaires, celles des bactéries diffèrent suffisamment de celles des cellules animales pour permettre une action sélective des agents antimicrobiens. Certains antibiotiques polypeptidiques, tels que les polymyxines, agissent comme détergents et déforment les membranes cellulaires bactériennes, probablement en se liant aux phospholipides de la membrane. (Avec cette distorsion, la membrane n'est plus régulée par les protéines membranaires et le cytoplasme et les substances cellulaires sont perdues). Ces antibiotiques sont particulièrement efficaces contre les bactéries Gram-négatives, qui possèdent une membrane externe riche en phospholipides.

### **(c) Inhibition de la synthèse des protéines**

Dans toutes les cellules, la synthèse des protéines nécessite non seulement les informations stockées dans l'ADN, ainsi que plusieurs types d'ARN, mais également les ribosomes. Les différences entre les ribosomes bactériens (70S) et animaux (80S) permettent aux agents antimicrobiens d'attaquer les cellules bactériennes sans endommager de manière significative les cellules animales, c'est-à-dire avec une toxicité sélective. Les antibiotiques aminosides, tels que la streptomycine, tirent leur nom des acides aminés et des liaisons glycosidiques qu'ils contiennent. Ils agissent sur la partie 30S des ribosomes bactériens en interférant avec la lecture (traduction) précise du message ARNm, c'est-à-dire l'incorporation des acides aminés correctes. Les tétracyclines bloquent la fixation de l'ARNt sur le site accepteur A et arrêtent efficacement la synthèse des protéines. Le chloramphénicol et l'érythromycine agissent sur la partie 50S des ribosomes bactériens, inhibant la formation du polypeptide en croissance. Étant donné que les ribosomes des cellules animales sont constitués de sous-unités 60S et 40S, ces antibiotiques ont peu d'effet sur les cellules hôtes (figure 94). (Cependant, les mitochondries, qui possèdent des ribosomes 70S, peuvent être affectées par de tels médicaments).



**Figure 94 : Sites d'inhibition sur le ribosome procaryote et principaux antibiotiques agissant sur ces sites**

Tous ont pour effet général de bloquer la synthèse des protéines. Les actions de blocage sont indiquées par × (Cowan Kelly, 2012).

#### (d) Inhibition de la synthèse des acides nucléiques

Les différences entre les enzymes utilisées par les cellules bactériennes et animales pour synthétiser les acides nucléiques permettent une action sélective des agents antimicrobiens. Les médicaments antimicrobiens interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques en bloquant la synthèse des nucléotides, en inhibant la réplication ou en arrêtant la transcription. Étant donné que l'ADN et l'ARN fonctionnels sont également nécessaires à une traduction correcte, les effets sur le métabolisme des protéines peuvent être considérables. Les antibiotiques de la famille des rifamycines se lient à une ARN polymérase bactérienne et inhibent la synthèse de l'ARN. D'autres antimicrobiens inhibent la synthèse de l'ADN. Les quinolones à large spectre les plus récentes inhibent les enzymes ou hélicases de déroulement de l'ADN, arrêtant ainsi la transcription de l'ADN.

#### (e) Action comme anti-métabolites

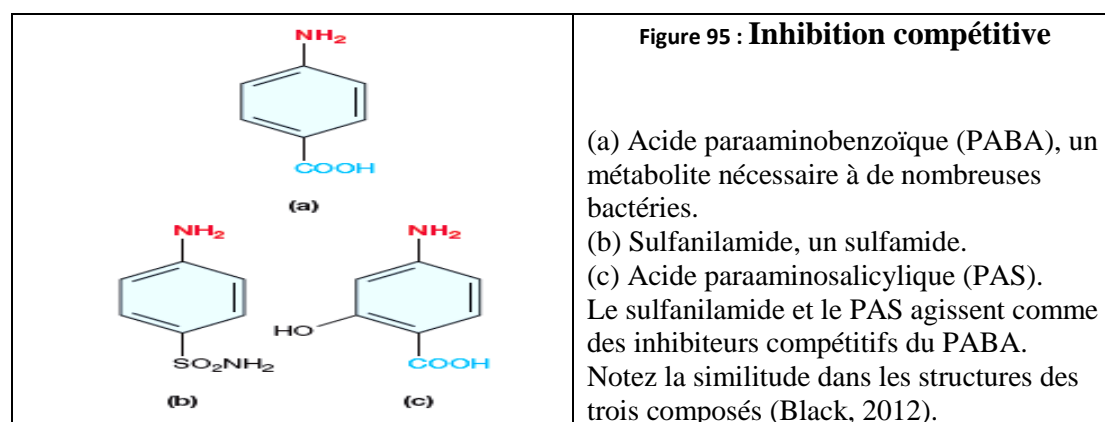
Les processus métaboliques normaux des cellules microbiennes impliquent une série de composés intermédiaires appelés métabolites qui sont essentiels à la croissance et à la survie cellulaire. Les **anti-métabolites** sont des substances qui affectent l'utilisation des métabolites et empêchent donc une cellule d'effectuer les réactions métaboliques nécessaires. Les anti-métabolites fonctionnent de deux manières :

(1) en inhibant de manière compétitive les enzymes ;

(2) en étant incorporés par erreur dans des molécules importantes telles que les acides nucléiques.

Les anti-métabolites sont structurellement similaires aux métabolites normaux. Les actions des anti-métabolites sont parfois appelées **mimétisme moléculaire** car ils imitent la molécule normale, empêchant ainsi une réaction de se produire ou la faisant mal tourner.

Dans l'inhibition compétitive, une réaction enzymatique est inhibée par un substrat qui se lie au site actif de l'enzyme mais ne peut pas réagir. Pendant que ce substrat concurrent occupe le site actif, l'enzyme est incapable de fonctionner et le métabolisme ralentira, voire cessera, si suffisamment de molécules d'enzyme sont inhibées. Par exemple, le sulfanilamide et l'acide para-aminosalicylique (PAS), qui sont chimiquement très similaires à l'acide para-aminobenzoïque (PABA) (figure 95). Ils inhibent de manière compétitive une enzyme qui agit sur le PABA. De nombreuses bactéries ont besoin de PABA pour fabriquer de l'acide folique, qu'elles utilisent pour synthétiser les acides nucléiques et d'autres produits métaboliques. Lorsque le sulfanilamide ou le PAS au lieu du PABA est lié à l'enzyme, la bactérie ne peut pas produire d'acide folique. Les cellules animales ne disposent pas des enzymes nécessaires pour fabriquer l'acide folique et doivent l'obtenir à partir de leur alimentation ; leur métabolisme n'est donc pas perturbé par ces inhibiteurs compétitifs.



Les anti-métabolites tels que l'analogue de la purine, la vidarabine, et l'analogue de la pyrimidine, l'idoxuridine, sont incorporés par erreur dans les acides nucléiques. Ces molécules sont très similaires aux purines et pyrimidines normales des acides nucléiques (figure 96). Lorsqu'ils sont incorporés dans un acide nucléique, ils déforment les informations qu'il code car ils ne peuvent pas former les paires de bases correctes lors de la réplication et de la transcription. Les analogues des purines et des pyrimidines sont généralement aussi toxiques pour les cellules animales que pour les microbes, car les allèles utilisent les mêmes purines et pyrimidines pour fabriquer des nucléotides. Ces agents sont particulièrement utiles dans le traitement des infections virales, car les virus incorporent des analogues plus rapidement que les cellules et sont plus gravement endommagés.

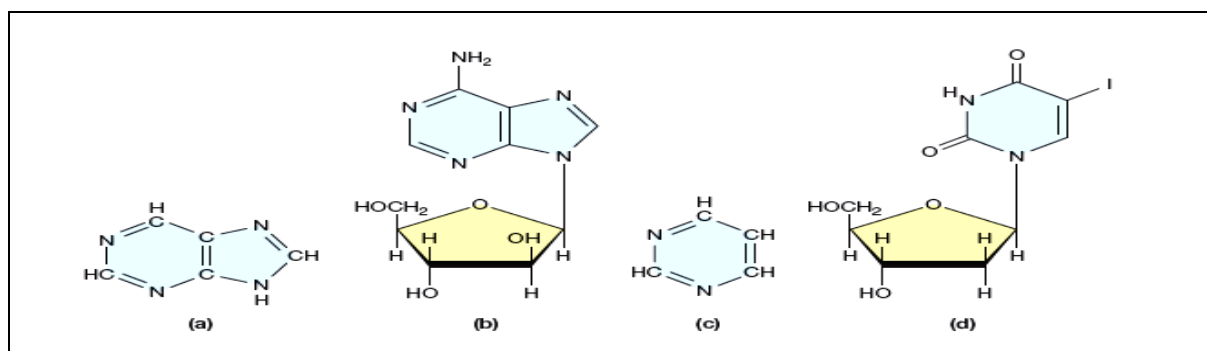


Figure 96 : Analogues de base

Bases d'acide nucléique et leurs analogues : les molécules ont une structure si similaire qu'elles peuvent être incorporées à la place de la molécule correcte, agissant ainsi comme des anti-métabolites. (a) Structure de base d'une purine. (b) L'analogue de la purine, la vidarabine. (c) Structure de base d'une pyrimidine. (d) L'analogue de la pyrimidine, l'idoxuridine (Black, 2012).

## 2. Effet des antibiotiques

La thérapie antibactérienne spécifique fait référence au traitement des infections avec des agents anti-infectieux dirigés contre l'agent pathogène infectant. Le groupe d'agents anti-infectieux le plus important est celui des antibiotiques, qui sont des produits de champignons et de bactéries (streptomycètes). Les agents antimicrobiens partagent certaines propriétés communes.

Avant tout, les médicaments doivent être sélectivement toxiques, ce qui signifie qu'ils doivent tuer ou inhiber les cellules microbiennes sans endommager simultanément les tissus de l'hôte.

Ce concept de **toxicité sélective** est au cœur du traitement antibiotique, et les meilleurs médicaments sont ceux qui bloquent les actions ou la synthèse de molécules dans les micro-organismes mais pas dans les cellules vertébrées. Des exemples de médicaments présentant une excellente toxicité sélective sont ceux qui bloquent la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries (pénicillines). Ils ont une faible toxicité et peu d'effets directs sur les cellules humaines, car celles-ci sont dépourvues du peptidoglycane chimique et ne sont donc pas affectées par cette action de l'antibiotique.

L'une des façons les plus utiles de classer les antimicrobiens consiste à les désigner selon leur **spectre d'activité** comme étant à large spectre ou à spectre étroit. Les médicaments à large spectre sont efficaces contre plusieurs groupes de bactéries, y compris les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, tandis que les médicaments à spectre étroit ciblent généralement un groupe spécifique.

Un médicament à large spectre est particulièrement utile lorsqu'un patient souffre d'une infection causée par un organisme non identifié. L'utilisation d'un tel médicament augmente le risque que l'organisme y soit sensible. Toutefois, si l'identité de l'organisme est connue, un médicament à spectre étroit doit être utilisé. L'utilisation d'un tel

médicament minimise la destruction de la microflore de l'hôte, ou flore normale (les microbes indigènes naturellement présents dans ou sur l'hôte) qui parfois entrent en compétition avec les organismes infectieux et aident à les détruire. L'utilisation de médicaments à spectre étroit réduit également la probabilité que les organismes développent une résistance aux médicaments.

### **A- L'effet des antibiotiques sur les bactéries**

L'efficacité ou l'efficace d'un antibiotique définit la manière dont il affecte une population bactérienne. Deux effets fondamentaux sont différenciés : **l'effet (activité) bactériostatique**, c'est-à-dire l'inhibition réversible de la croissance, et **l'effet (activité) bactéricide** irréversible. De nombreuses substances peuvent développer les deux formes d'efficacité en fonction de leur concentration, du type d'organisme et de la phase de croissance. Beaucoup de ces médicaments ont également un effet post-antibiotique (PAE) traduisant les dommages infligés à une population bactérienne. Une fois l'agent anti-infectieux disparu, les cellules bactériennes non tuées nécessitent une phase de récupération avant de pouvoir se reproduire. Le PAE peut durer plusieurs heures.

Un agent bactériostatique ne pourra jamais, à lui seul, éliminer complètement les bactéries pathogènes des tissus de l'organisme. La « guérison » résulte des effets combinés de l'agent anti-infectieux et des défenses immunitaires spécifiques et non spécifiques de l'organisme hôte. Dans les tissus où ce système de défense est inefficace, au milieu d'une lésion purulente où aucun phagocyte fonctionnel n'est présent ou chez les patients immunodéprimés, des substances bactéricides doivent être nécessaires. La valeur clinique de savoir si un médicament antibactérien est bactériostatique ou bactéricide est évidente. Toutes les bactéries d'un foyer d'infection ne peuvent être éliminées sans le soutien du système de défense immunitaire de l'organisme. Une population bactérienne comprend toujours plusieurs cellules présentant une résistance phénotypique qui n'est pas génotypiquement fondée. Ce sont ce que l'on appelle les persistants, qui apparaissent dans les cultures in vitro à des fréquences allant de  $1:10^6$  à  $1:10^8$ . La cause de cette persistance est généralement une propriété métabolique spécifique de ces bactéries qui empêche les substances bactéricides de les tuer. Après l'arrêt du traitement, ces persistances peuvent entraîner des rechutes.

Le développement d'une résistance aux antibiotiques peut également être considéré comme un effet secondaire sur les micro-organismes. La résistance produit des infections qui peuvent être difficiles à traiter.

### **B- L'effet des Antibiotiques sur les hôtes**

Les antibiotiques peuvent provoquer des effets secondaires sur les hôtes, résultant soit du non-respect de principes thérapeutiques importants, soit d'une réactivité spécifique du patient. Dans l'ensemble, ces effets secondaires sont d'une importance

mineure et se répartissent en trois catégories générales : (1) toxicité, (2) allergie et (3) perturbation de la microflore normale.

- **Toxicité**

Par leur toxicité sélective et leurs modes d'action, les agents antimicrobiens tuent les microbes sans nuire gravement aux cellules hôtes. Cependant, certains antimicrobiens exercent des effets toxiques sur les patients qui les reçoivent.

- **Allergie**

Une allergie est une condition dans laquelle le système immunitaire de l'organisme réagit à une substance étrangère, généralement une protéine. Par exemple, les produits de dégradation des pénicillines se combinent aux protéines présentes dans les fluides corporels pour former une molécule que le corps traite comme une substance étrangère. Les réactions allergiques peuvent se limiter à de légères éruptions cutanées et à des démangeaisons, ou elles peuvent mettre la vie en danger. Un type de réaction allergique potentiellement mortelle, appelé choc anaphylactique, survient lorsqu'un individu est exposé à une substance étrangère à laquelle son corps est déjà sensibilisé, c'est-à-dire une substance à laquelle l'individu a été exposé et contre laquelle il a développé des anticorps.

- **Perturbation de la microflore normale**

Les agents antimicrobiens, en particulier les antibiotiques à large spectre, peuvent exercer leurs effets néfastes non seulement sur les agents pathogènes mais également sur la microflore indigène, les micro-organismes qui habitent normalement la peau et les voies digestives, respiratoires et urogénitales. Lorsque cette microflore est perturbée, d'autres organismes non sensibles à l'agent antimicrobien, comme la levure *Candida*, envahissent les zones inoccupées et se multiplient rapidement. L'invasion par une microflore de remplacement est appelée **surinfection**. Les surinfections sont difficiles à traiter car elles sont sensibles à peu d'antibiotiques.

### **C- L'effet des Antibiotiques en thérapie combinée**

La thérapie combinée est le terme désignant l'administration simultanée (association) de deux ou plusieurs agents antibactériens. Certaines préparations galéniques associent deux composants dans un rapport fixe (exemple : cotrimoxazole). Toutefois, normalement, les substances individuelles d'une thérapie combinée sont administrées séparément.

Il existe quatre justifications possibles quant à l'utilisation combinée d'agents antibactériens.

**1. Élargissement du spectre d'action.** Dans les infections mixtes avec des agents pathogènes de résistance variable ; dans le traitement calculé des infections dont la flore pathogène et les caractéristiques de résistance sont inconnues ou pas encore connues.

**2. Obtention de synergie bactéricide.** Pour fournir une action bactéricide, qui peut être extrêmement difficile à démontrer de manière convaincante. Même avec le triméthoprim et le sulfaméthoxazole, où une véritable synergie se produit in vitro, le rapport optimal des deux composants peut ne pas toujours être présent in vivo, c'est-à-dire au site d'infection dans un tissu particulier.

**3. Retard du développement de la résistance.** En thérapie de la tuberculose ; lors de l'utilisation d'agents anti-infectieux contre lesquels les bactéries développent rapidement une résistance, ici le traitement antituberculeux combiné est préconisé.

**4. Réduction de la toxicité.** Parfois, l'utilisation simultanée de deux médicaments permet une réduction significative de la dose et évite ainsi la toxicité tout en offrant une action antimicrobienne satisfaisante.

Une combinaison (association) de deux agents antibactériens peut produire les réponses suivantes.

**1- Effet de synergie,** où l'effet combinée est significativement supérieur à la somme des effets de chaque médicament agissant seul c'est-à-dire potentialisation des effets.

**2- Effet additif,** dans lequel l'effet combiné est égal à la somme arithmétique des effets des deux agents individuels.

**3- Aucune différence (indifférence).** La combinaison n'est pas supérieure que le plus efficace des deux composants est utilisé seul.

**4- Effet d'antagonisme (interférence).** La combinaison est moins efficace que l'un des deux composants le plus efficace est utilisé seul.

Tous ces effets peuvent être observés in vitro (notamment en termes de taux bactéricide) et in vivo.

**En règle générale :** les combinaisons de substances bactériostatiques avec des substances qui sont bactéricides pendant la phase de division cellulaire n'entraînent souvent qu'un effet **antagonisme**, par exemple la pénicilline (qu'est un médicament bactéricide) et la tétracycline (qu'est un médicament bactériostatique, qui inhibait la synthèse des protéines chez les bactéries) dans le traitement de la pneumonie à pneumocoque. L'antagonisme se produisait principalement si le médicament bactériostatique atteignait le site de l'infection avant le médicament bactéricide, si la

destruction des bactéries était essentielle à la guérison et si seules des doses efficaces minimales de l'un ou l'autre médicament de la paire étaient présentes.

Un autre exemple consiste à combiner des médicaments  $\beta$ -lactamines dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* (par exemple, l'imipénème et la pipéracilline, car l'imipénème est un puissant inducteur de  $\beta$ -lactamase et la  $\beta$ -lactamase décompose la pipéracilline, la moins stable).

Une **synergie** antimicrobienne peut se produire dans plusieurs types de situations. Les combinaisons synergiques de médicaments doivent être sélectionnées selon des procédures de laboratoire complexes.

1. Deux médicaments peuvent bloquer séquentiellement une voie métabolique microbienne. Les sulfamides inhibent l'utilisation du PABA extracellulaire par certains microbes pour la synthèse de l'acide folique.

Le triméthoprime ou la pyriméthamine inhibe l'étape métabolique suivante, la réduction de l'acide dihydro-en tétrahydrofolique. L'utilisation simultanée d'un sulfamide et du triméthoprime est efficace dans certaines infections bactériennes (shigellose, salmonellose, espèce *Serratia*).

2. Un médicament tel qu'un inhibiteur de la paroi cellulaire (pénicilline ou céphalosporine) peut favoriser l'entrée d'un aminoside dans les bactéries et ainsi produire des effets synergiques. Les pénicillines améliorent l'absorption de la gentamicine ou de la streptomycine par les entérocoques. Ainsi, l'ampicilline et la gentamicine pourraient être essentielles à l'éradication d'*Enterococcus faecalis*, en particulier dans les endocardites. De même, la pipéracilline et la tobramycine peuvent avoir un effet synergique contre certaines souches des espèces de *Pseudomonas*.

3. Un médicament peut affecter la membrane cellulaire et faciliter l'entrée du deuxième médicament. L'effet combiné peut alors être supérieur à la somme de ses parties. Par exemple, l'amphotéricine a été synergique avec la flucytosine contre certains champignons (par exemple, les espèces *Cryptococcus* et *Candida*).

4. Un médicament peut empêcher l'inactivation d'un deuxième médicament par des enzymes microbiennes. Ainsi, les inhibiteurs de la  $\beta$ -lactamase (par exemple, l'acide clavulanique, le sulbactam, le tazobactam) peuvent protéger l'amoxicilline, la ticarcilline ou la pipéracilline de l'inactivation par les  $\beta$ -lactamases. Dans de telles circonstances, une forme de synergie s'opère.

### 3. Antibiogramme

L'antibiogramme désigne la détermination des sensibilités microbiennes aux agents antimicrobiens. Le profil de sensibilité aux antimicrobiens, ou *antibiogramme*, fournit des données pour la sélection des médicaments.

Les micro-organismes varient dans leur sensibilité aux différents agents chimio-thérapeutiques, et les sensibilités peuvent changer avec le temps. Idéalement, l'antibiotique approprié pour traiter une infection particulière devrait être déterminé avant l'administration de tout antibiotique. Parfois, un agent approprié peut être prescrit dès que l'organisme causal est identifié à partir d'une culture en laboratoire. Des tests sont souvent nécessaires pour déterminer quel antibiotique tue l'organisme.

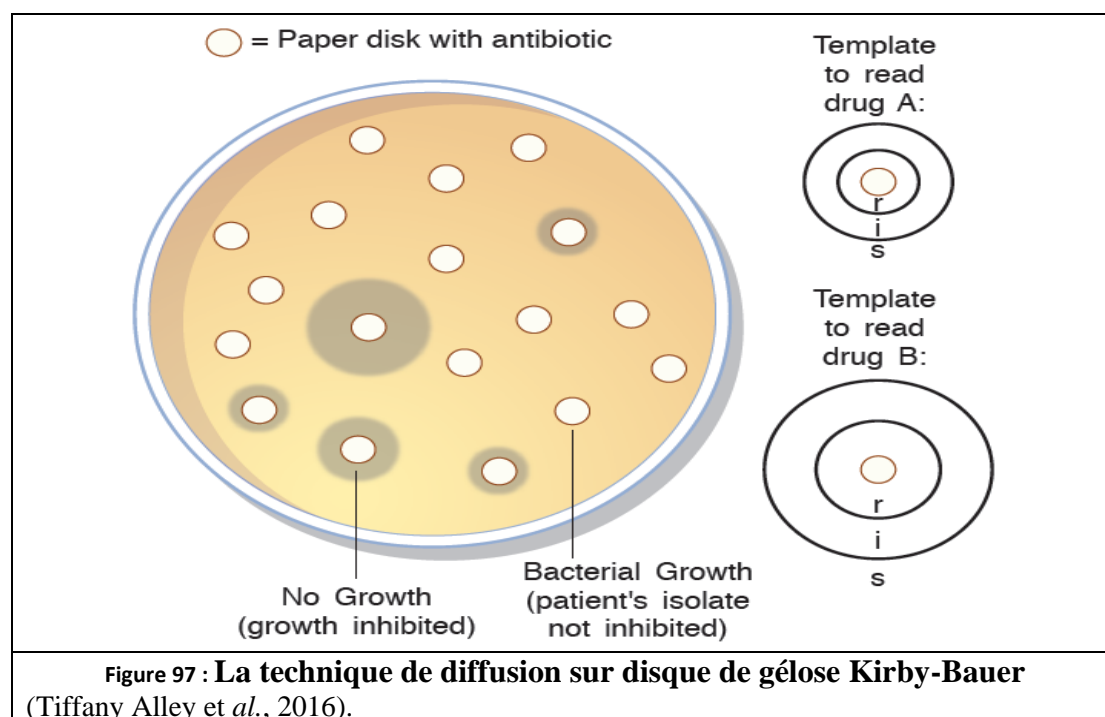
Plusieurs méthodes (diffusion sur disque, dilution et méthodes automatisées) sont disponibles pour déterminer de la sensibilité d'une bactérie pathogène aux médicaments antimicrobiens. Ces méthodes standardisées peuvent être utilisées pour estimer soit la puissance de l'antibiotique dans l'échantillon, soit la sensibilité du micro-organisme.

#### **a. La méthode de diffusion sur disque de gélose Kirby-Bauer**

Une méthode largement utilisée dans les petits laboratoires est **la méthode de diffusion sur disque, ou méthode Kirby-Bauer**. Une quantité standard de l'organisme causal est uniformément répartie sur une plaque de gélose. Ensuite, plusieurs disques de papier filtre imprégnés de concentrations spécifiques d'agents chimio-thérapeutiques sélectionnés sont placés sur la surface de la gélose. Enfin, la culture contenant les disques d'antibiotiques est incubée.

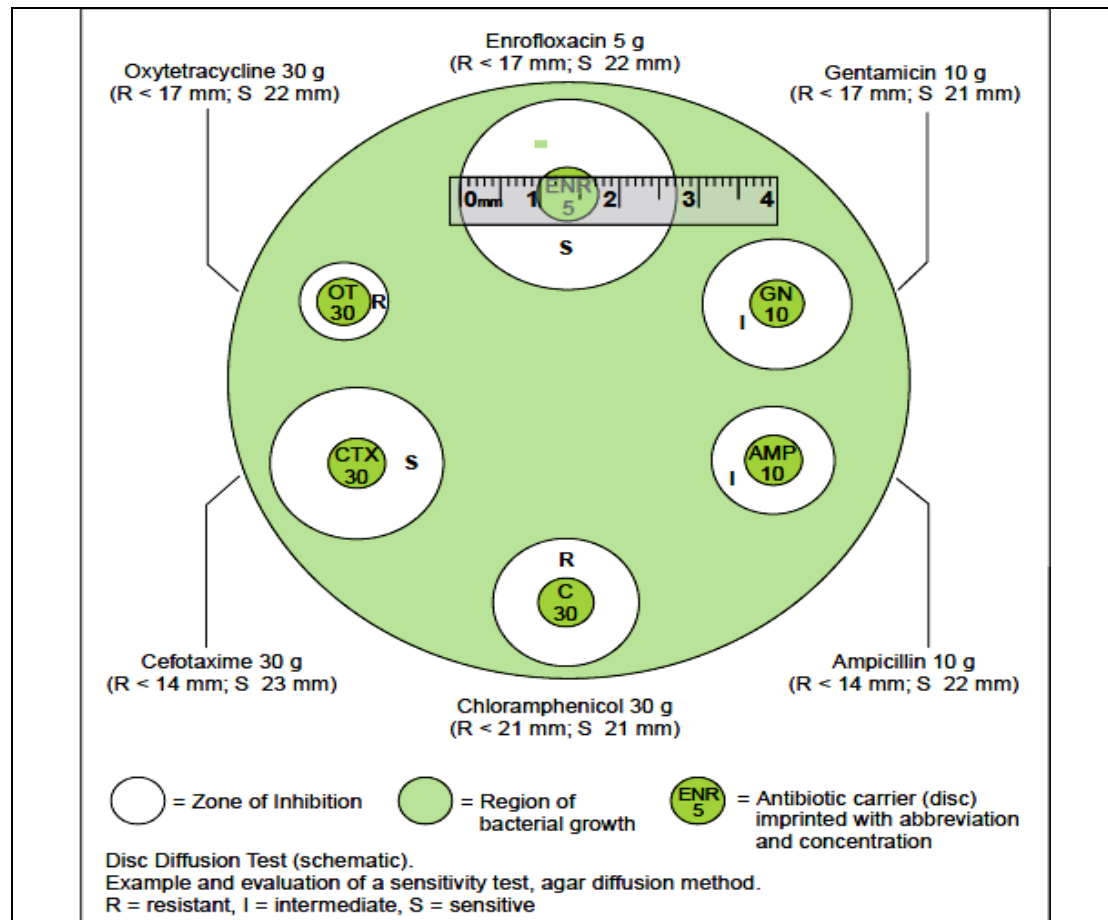
Pendant l'incubation, chaque agent chimio-thérapeutique se diffuse hors du disque dans toutes les directions. Les agents de poids moléculaire inférieur diffusent plus rapidement que ceux de poids moléculaire plus élevé. Des zones claires, appelées **zones d'inhibition**, apparaissent sur la gélose autour des disques où les agents inhibent l'organisme (figure 97). La taille d'une zone d'inhibition n'est pas nécessairement une mesure du degré d'inhibition en raison des différences dans les vitesses de diffusion des agents chimio-thérapeutiques. Un agent de grande taille moléculaire peut être un puissant inhibiteur même s'il ne diffuse qu'une petite distance et produit une petite zone d'inhibition.

Des mesures standard des diamètres de zone pour des milieux particuliers, des quantités d'organismes et des concentrations de médicament ont été établies et corrélées aux diamètres de zone afin de déterminer si les organismes sont *sensibles*, *modérément sensibles (intermédiaires)* ou *résistants* au médicament (tableau 6 et figure 98).



**Tableau 6 : Résultats d'un exemple de test Kirby-Bauer (Cowan Kelly, 2012)**

Médicament	Tailles de zone (mm) Requis pour :		Exemples de résultats (mm) pour <i>Staphylococcus aureus</i>	Évaluation
	Sensibilité	Résistance		
	(S)	(R)		
Bacitracine	>13	<8	15	S
Chloramphénicol	>18	<12	20	S
Érythromycine	>18	<13	15	I
Gentamicine	>13	<12	16	S
Kanamycine	>18	<13	20	S
Néomycine	>17	<12	12	R
Pénicilline G	>29	<20	10	R
Polymyxine B	>12	<8	10	R
Streptomycine	>15	<11	11	R
Vancomycine	>12	<9	15	S
Tétracycline	>19	<14	25	S



\*Les valeurs R et S diffèrent du tableau 6 en raison des concentrations différentes d'antimicrobiens.

#### Figure 98 : Technique de préparation et d'interprétation des tests de diffusion sur disque

Des méthodes standardisées sont utilisées pour ensemercer de bactéries sur le milieu. Un distributeur délivre plusieurs médicaments sur une plaque, suivi d'une incubation.

Interprétation des résultats : Au cours de l'incubation, les antimicrobiens se diluent de plus en plus à mesure qu'ils se diffusent hors du disque dans le milieu. Si la bactérie testée est sensible à un médicament, une zone d'inhibition se développe autour de son disque. En gros, plus la taille de cette zone est grande, plus la sensibilité de la bactérie au médicament est grande. Le diamètre de chaque zone est mesuré en millimètres et évalué pour la sensibilité ou la résistance au moyen d'un étalon comparatif (voir tableau 6) (Cowan Kelly, 2012).

La figure 99 présente la Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (IPA) pour l'Année 2020

Table de lecture 5\* : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus* spp.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Pénicilline	10 UI	≤ 28	—	≥ 29	≥ 0,25	—	≤ 0,12	Le test de la β-lactamase confirme les cas douteux. Interprétation valable pour toutes les pénicillines inactivées par les β-lactamases (ampicilline, ticarcilline, pipéracilline, ...)
Oxacilline ( <i>S.aureus</i> et <i>S.lugdunensis</i> )	—	—	—	—	≥ 4	—	≤ 2	Le disque d'oxacilline n'est pas fiable. Tester le disque de oxéfoxiline 30 µg pour détecter la résistance à la méticilline de <i>S.aureus</i> et des staphylocoques à coagulase négative.
Céfoxitine ( <i>S.aureus</i> et <i>S.lugdunensis</i> )	30 µg	≤ 21	—	≥ 22	≥ 8	—	≤ 4	Pour les staphylocoques (autre que <i>S.lugdunensis</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>S.pseudintermedius</i> et <i>S.schleiferi</i> ) les isolats dont la CMI à l'oxacilline est comprise entre 0.5 et 2 µg/ml peuvent être Mega négatif. Pour les infections sévères, ces souches peuvent être testées pour le MecA ou la PLP24, si le résultat est négatif elles peuvent être reportées sensibles à l'oxacilline.
Oxacilline (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i> )	—	—	—	—	≥ 0,5	—	≤ 0,25	
Céfoxitine (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i> , <i>S.pseudintermedius</i> et <i>S.schleiferi</i> )	30 µg	≤ 24	—	≥ 25	—	—	—	
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	Les souches résistantes à la gentamicine sont résistantes à tous les autres aminosides sauf à la streptomycine. **
Amikacine ( <i>S.aureus</i> )	30 µg	≤ 16	—	≥ 18	≥ 16	—	≤ 8	La détermination de la résistance à l'amikacine est mieux détectée avec la kanamycine : kanamycine (30 µg) : R : 18 mm pour <i>S.aureus</i> , R : 22 mm pour les SCN **
Amikacine (SCN)	30 µg	≤ 19	—	≥ 22	≥ 16	—	≤ 8	
Erythromycine	15 µg	≤ 13	14 – 22	≥ 23	≥ 8	1-4	≤ 0,5	Détecter la résistance inducible en plaçant le disque d'érythromycine à côté du disque de clindamycine. En présence d'une image d'antagonisme, répondre « Résistance à l'érythromycine et à la clindamycine ».
Clindamycine	2 µg	≤ 14	15 – 20	≥ 21	≥ 4	1-2	≤ 0,5	
Vancomycine ( <i>S.aureus</i> )	CMI	—	—	—	≥ 16	4 – 8	≤ 2	Le disque de vancomycine ne permet pas de différencier les souches vanco « S » et « I » de <i>Staphylococcus aureus</i> , ni de différencier les souches vanco « S », « I » et « R » de S.C.N., car les diamètres d'inhibition sont similaires. La détermination de la CMI de la vancomycine est obligatoire.
Vancomycine (SCN)	CMI	—	—	—	≥ 32	8 – 16	≤ 4	
Teicoplanine	CMI	—	—	—	≥ 32	16	≤ 8	
Ofloxacine	5 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 4	2	≤ 1	
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1	
Lévofloxacine	5 µg	≤ 15	16 – 18	≥ 19	≥ 4	2	≤ 1	
Triméthoprim+ sulfaméthoxazole	1.25/23.75 µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 4/78	—	≤ 2/38	
Rifampicine	5 µg	≤ 16	17 – 19	≥ 20	≥ 4	2	≤ 1	
Tétracycline	30 µg	≤ 14	15 – 18	≥ 19	≥ 16	8	≤ 4	Les souches sensibles à la tétracycline, sont sensibles à la doxycycline et à la minocycline.
Chloramphénicol	30 µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	
Quinupristine-dalfopristine	15 µg	≤ 15	16 – 18	≥ 19	≥ 4	2	≤ 1	A reporter pour les souches de <i>S.aureus</i> méticillino-sensibles. Interprétation valable pour la pristinaquine.
Acide fusidique**	10 µg	≤ 24	—	≥ 24	> 1	—	≤ 1	
Fosfomycine IV**	200 µg	< 23	—	≥ 23	> 32	—	≤ 32	La méthode de référence pour la détermination de la CMI est la dilution en milieu gélosé en présence de glucose-6-phosphate (25 mg/l)

\*Tableau extrait du Document M100 . 30th ed . 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.

\*\* Extraits des recommandations du CASFM/EUCAST 2020

Abbreviations : SCN : Staphylocoque à Coagulase Négative. CMI : Concentration Minimale Inhibitrice. IV : Intra veineuse.

Figure 99 : Table de lecture 5 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus* spp.

(<http://www.pasteur.dz/aarn/>).

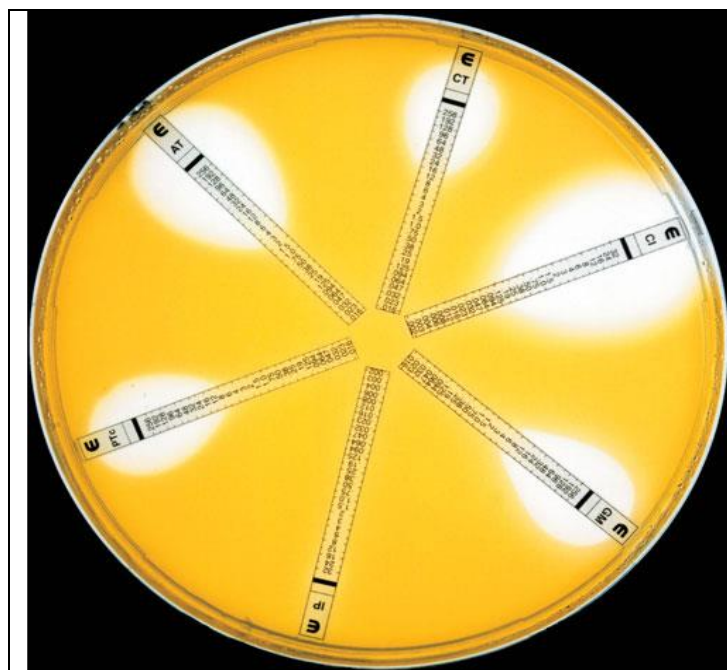
Même lorsque l'inhibition a été correctement interprétée lors d'un test de diffusion sur disque, l'agent chimio-thérapeutique le plus inhibiteur peut ne pas guérir une infection. L'agent inhibera probablement l'organisme responsable, mais il ne tuera peut-être pas un nombre suffisant d'organismes pour contrôler l'infection. Un agent bactéricide est souvent nécessaire pour éliminer un organisme infectieux, et la méthode de diffusion sur disque ne garantit pas qu'un agent bactéricide soit identifié.

De plus, les résultats obtenus in vivo (dans un organisme vivant) diffèrent souvent de ceux obtenus in vitro (dans un récipient de laboratoire). Les processus métaboliques dans le corps d'un organisme vivant peuvent inactiver ou inhiber un composé antimicrobien.

- **Test électronique (diffusion sur gélose)**

Une version plus récente du test de diffusion est le test électronique, appelée test E (epsilomètre) (figure 100), utilise une bandelette en plastique marquée d'un gradient unique pour chaque antibiotique et dont la face inférieure contient un antibiotique

séché. Celui-ci est placé sur une plaque de gélose déjà tamponnée avec l'organisme bactérien d'intérêt et lu après incubation. Il produit une valeur en  $\mu\text{g/ml}$  beaucoup plus quantitative que les résultats du Kirby-Bauer, ce qui permet au technicien de laboratoire de lire directement la concentration minimale nécessaire pour inhiber la croissance.



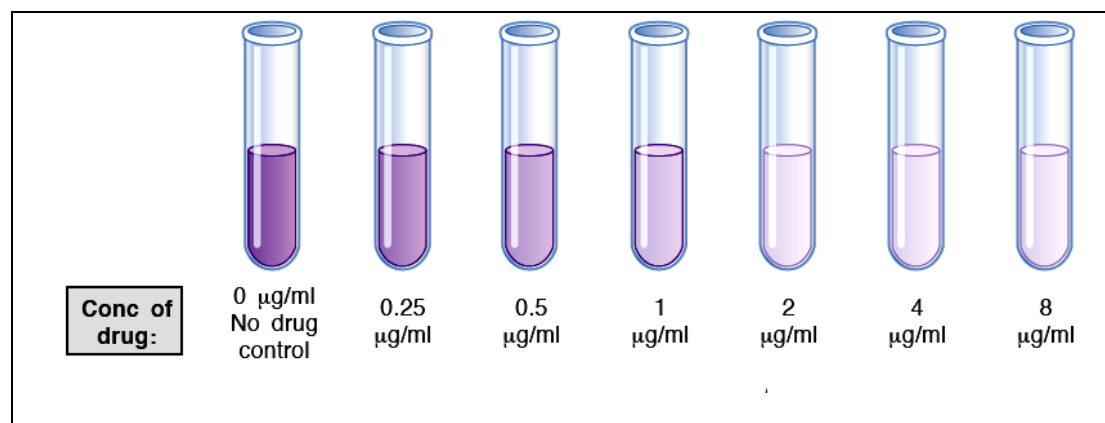
**Figure 100 : Un test E (epsilomètre), qui détermine la sensibilité aux antibiotiques et estime la CMI (concentration minimale inhibitrice)**

Une bandelette de plastique contenant un gradient croissant d'un antibiotique donné est placée sur la surface d'une boîte de Pétri qui a été tamponnée avec l'organisme bactérien d'intérêt. Une zone d'inhibition de croissance autour de la bandelette indique la sensibilité de l'organisme à cet antibiotique spécifique. Le point auquel l'inhibition commence (flèche) indique la CMI de cet antibiotique et peut être lu sur l'échelle imprimée (Black, 2012).

### **b. La méthode de dilution en tube**

La méthode de dilution pour tester la sensibilité aux antibiotiques a d'abord été réalisée dans des tubes de bouillon de culture (figure 101). Dans cette méthode, une quantité constante d'inoculum microbien (échantillon) est introduite dans une série de bouillons de culture contenant des concentrations décroissantes d'un agent chimiothérapeutique. Un tube de contrôle contient toujours uniquement l'inoculum et le milieu de culture, sans antibiotique pour garantir la viabilité de l'inoculum.

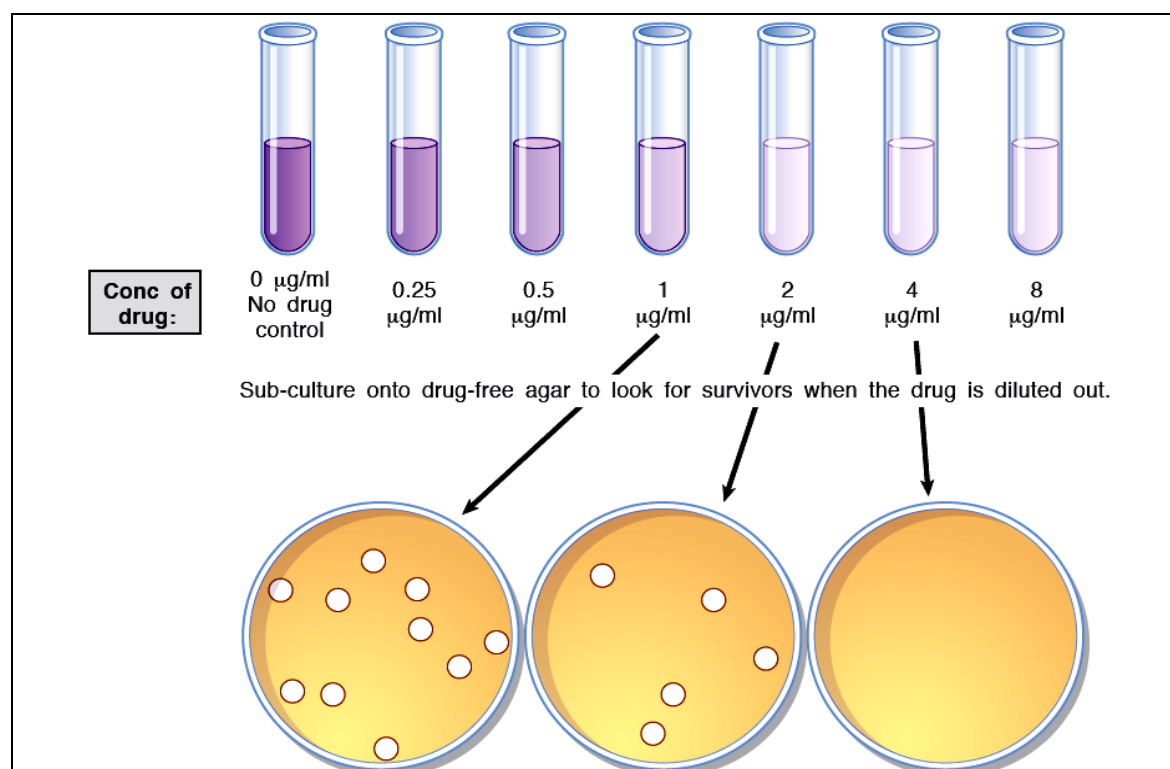
Après incubation (pendant 16 à 20 heures), les tubes sont examinés et la concentration la plus faible de l'agent empêchant la croissance visible (pas de turbidité) est notée. Cette concentration est la **concentration minimale inhibitrice (CMI)** pour un agent particulier agissant sur un micro-organisme spécifique. Ce test peut être effectué pour plusieurs agents simultanément en utilisant plusieurs jeux de tubes, mais il prend du temps et est donc coûteux.



**Figure 101 : Test de dilution en tube pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

L'antibiotique est dilué en série dans des tubes de nutriments liquides de droite à gauche. Tous les tubes sont inoculés avec une quantité identique d'une bactérie testée puis incubés. Le premier tube à gauche est un contrôle dépourvu du médicament et présentant une croissance maximale. La dilution du premier tube de la série qui ne montre aucune croissance (pas de turbidité) est la CMI. Dans cette figure, CMI = 2 µg/ml (Tiffany Alley et *al.*, 2016).

La découverte d'un agent inhibiteur par la méthode de dilution ne prouve pas plus qu'il tuera l'organisme infectieux chez le patient que la découverte d'un agent inhibiteur par la méthode de diffusion sur disque. Cependant, la méthode de dilution permet un deuxième test de distinguer les agents bactéricides, qui tuent les micro-organismes, et les agents bactériostatiques, qui inhibent simplement leur croissance. Des échantillons provenant de tubes ne montrant aucune croissance mais pouvant contenir des organismes inhibés peuvent être utilisés pour inoculer un bouillon ne contenant aucun agent chimio-thérapeutique (figure 102). Dans ce test, la concentration la plus faible de l'agent chimio-thérapeutique qui ne produit aucune croissance après cette seconde inoculation, ou repiquage, est la **concentration minimale bactéricide (CMB)**. Ainsi, il est possible de déterminer à la fois un agent chimio-thérapeutique efficace et une concentration appropriée pour contrôler une infection. Cette concentration doit être maintenue aux sites d'infection car c'est la concentration minimale qui permettra de guérir la maladie.



**Figure 102 : La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (MBC) d'un médicament**

Concentration minimale bactéricide (CMB) (Pas systématiquement effectué dans de nombreux laboratoires, mais ordonné lorsque cela est nécessaire)

La plus faible concentration de médicament ne montrant aucune croissance sur une sous-culture vers un milieu sans médicament = CMB

La CMB dans cette figure serait de 4 µg/ml (Tiffany Alley et *al.*, 2016).

### c. Les méthodes automatisées

Des méthodes automatisées (figure 103) sont disponibles pour identifier les organismes pathogènes et déterminer quels agents antimicrobiens les combattent efficacement. L'un de ces procédés utilise des cartes préparées comportant de petits puits dans lesquels une quantité mesurée d'inoculum est automatiquement distribuée. Jusqu'à 120 cartes de patients différents peuvent être exécutées simultanément. Des cartes contenant plusieurs types de milieux adaptés à l'identification des membres de différents groupes d'organismes, tels que les bactéries Gram-positives, les bactéries Gram-négatives, les bactéries anaérobies et les levures, sont disponibles. Des cartes sont également disponibles pour déterminer la sensibilité des organismes à divers agents antimicrobiens.

Les plateaux sont insérés dans une machine qui mesure la croissance microbienne. Certaines machines le font en utilisant un faisceau de lumière pour mesurer la turbidité. D'autres utilisent des milieux contenant du carbone radioactif. Les organismes qui se développent sur de tels milieux libèrent du dioxyde de carbone radioactif dans l'air et un dispositif d'échantillonnage le détecte automatiquement. Les machines varient selon leur degré d'automatisation et la rapidité avec laquelle les

résultats sont disponibles. Certains nécessitent que des techniciens effectuent certaines étapes ; d'autres fournissent un imprimé informatisé des résultats qui est transmis au dossier du patient. Certaines machines fournissent des résultats en 3 à 6 heures, et la plupart les fournissent pendant la nuit, bien que les organismes à croissance lente puissent nécessiter 48 heures.

Les méthodes automatisées rendent l'identification en laboratoire des organismes et de leur sensibilité aux antimicrobiens plus efficace et moins coûteuse. Une fois les résultats des tests de laboratoire disponibles, le médecin peut alors choisir un médicament approprié en fonction de la nature de l'agent pathogène, de la localisation de l'infection et d'autres facteurs tels que les allergies du patient. Les méthodes automatisées permettent aux médecins de prescrire un antibiotique approprié au début d'une infection plutôt que de prescrire un antibiotique à large spectre en attendant les résultats de laboratoire.



#### 4. Types de résistance

La sensibilité ou la résistance d'une bactérie aux antibiotiques est généralement évaluée au laboratoire par la méthode de l'antibiogramme. Cette technique permet d'apprécier l'activité bactériostatique et de déterminer la concentration minimale inhibitrice d'un ou de plusieurs antibiotiques vis-à-vis d'une bactérie. La résistance bactérienne aux antibiotiques a deux définitions :

- 1- une souche est dite "résistante" lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement

de la majorité des autres souches de la même espèce (Rapport Technique n° 210 de l'Organisation Mondiale pour la Santé, 1961);

- 2- une souche est dite "résistante" lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration que l'on peut atteindre in vivo.

L'antibiogramme réalisé avec plusieurs antibiotiques permet de déterminer très rapidement le phénotype de résistance de la souche. Seules des études biochimiques et génétiques, non réalisées en pratique courante dans les laboratoires de microbiologie médicale, permettent d'élucider les mécanismes de la résistance aux antibiotiques.

Les résistances bactériennes aux antibiotiques peuvent être naturelles ou acquises.

#### **- Résistance naturelle**

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées afin de déterminer l'activité d'un antibiotique et contribue à définir son spectre antibactérien. Elle peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique qui est une conséquence des différences existant entre les structures pariétales bactériennes, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique, ou encore à l'absence de la cible. On peut citer, à titre d'exemple, les résistances naturelles des entérobactéries et de *Pseudomonas* aux macrolides, des bactéries à Gram négatif à la vancomycine, des bactéries à Gram positif à la colimycine et à l'acide nalixique, des streptocoques aux aminosides, des mycoplasmes (dépourvues de peptidoglycane) aux  $\beta$ -lactamines (la pénicilline), et les bactéries dépourvues d'acides mycoliques sont résistantes à l'isoniazide.

#### **- Résistance acquise**

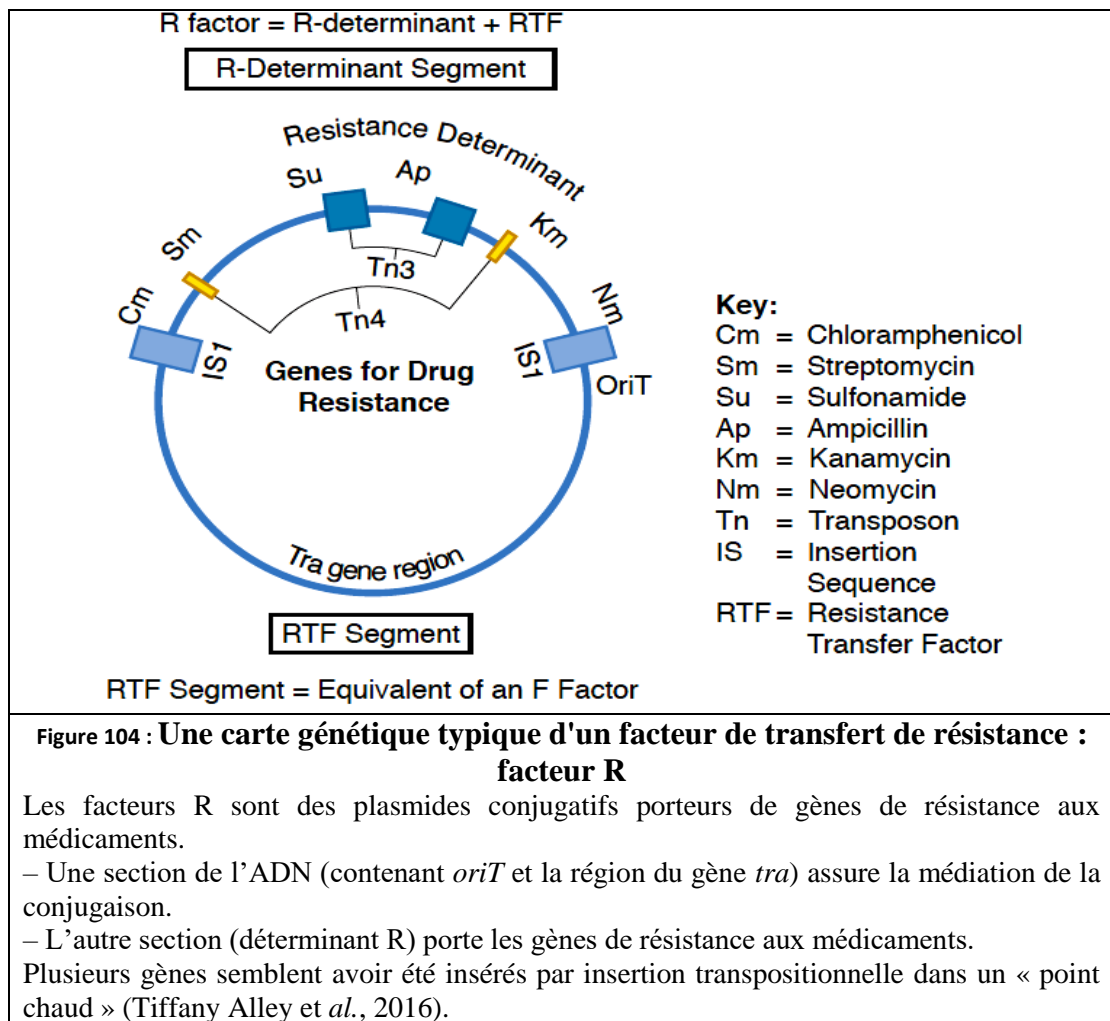
La résistance bactérienne acquise n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible. Elle est due à l'emploi en thérapeutique des antibiotiques et résulte soit d'une mutation affectant un gène régulateur ou un gène de structure, soit de l'acquisition d'un (ou de plusieurs) gène(s) qui rende(nt) la bactérie insensible à l'antibiotique. En fait, elle peut être due à des modifications du chromosome bactérien ou à l'acquisition d'ADN extra-chromosomique, généralement dans des plasmides.

La résistance consécutive à une mutation est la conséquence d'un changement des structures cellulaires existantes qui rend la cellule imperméable à un ou plusieurs antibiotiques ou encore rend les cibles pariétales (protéines liant la pénicilline, par exemple) ou intracellulaires (ARN polymérase, ADN gyrase, ribosomes,...) indifférentes à la présence du ou des antibiotiques. Ce type de résistance, qui ne concerne qu'un faible pourcentage (10 à 20 %) des souches pathogènes isolées en

clinique, est observé surtout après l'emploi de certains antibiotiques comme la streptomycine, la rifampicine, l'acide fusidique, la fosfomycine et les quinolones.

La **résistance chromosomique** est due à une mutation de l'ADN chromosomique et apparaît spontanément avec des fréquences de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  selon les bactéries et les caractères considérés. L'antibiotique n'est pas directement mutagène, mais il sélectionne les rares mutants résistants au sein de la population bactérienne sensible. Ces mutations sont stables (les fréquences de réversion sont équivalentes à celle des mutations) et héréditaires, mais non transmissibles en dehors de la descendance. On a longtemps pensé qu'une mutation chromosomique ne pouvait être responsable de la résistance qu'à un ou plusieurs antibiotiques appartenant à la même famille. La probabilité d'obtenir en une étape des bactéries résistantes à deux antibiotiques (double mutant) est égale au produit des probabilités d'apparition de chacune des mutations considérées indépendamment. L'utilisation des associations d'antibiotiques en bi-ou tri-antibiothérapies semblait pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. En fait, des germes multi résistants aux antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, chloramphénicol, triméthoprim, tétracyclines) par mutation chromosomique sont actuellement isolés assez fréquemment en milieu hospitalier, en particulier chez certaines entérobactéries comme *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia*.

La **résistance extra-chromosomique** est généralement due à la présence de types particuliers de **plasmides de résistance (R)**, ou **facteurs R**. L'origine des plasmides R est inconnue, mais ils ont été découverts pour la première fois à *Shigella* au Japon en 1959. Depuis lors, de nombreux plasmides R différents ont été identifiés. Certains plasmides R portent jusqu'à six ou sept gènes, chacun conférant une résistance à un antibiotique différent (figure 104). Les plasmides R peuvent également être transférés d'une souche ou d'une espèce de bactérie à une autre. La plupart des transferts se font par **transduction** (le transfert d'ADN plasmidique dans un bactériophage), et certains se font par **conjugaison**. Les gènes transférés par les bactériophages sont responsables des effets dévastateurs du SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline).



## 5. Modalités de résistance

Cinq modalités (mécanismes) de résistance ont été identifiées, chacun impliquant l'altération d'une structure microbienne différente. L'une d'entre elles implique l'altération de la cible à laquelle se lient les agents antimicrobiens, un processus généralement provoqué par une mutation du chromosome bactérien. Les autres mécanismes impliquent des altérations de la perméabilité membranaire, des enzymes ou des voies métaboliques, qui sont généralement provoquées par l'acquisition de plasmides R. Les cinq mécanismes sont expliqués ci-dessous :

**1. Modification des cibles :** Ce mécanisme affecte généralement les ribosomes bactériens. La mutation modifie l'ADN de telle sorte que la protéine produite ou la cible est modifiée. Les agents antimicrobiens ne peuvent plus se lier à la cible. Une résistance à l'érythromycine, à la rifamycine et aux antimétabolites s'est développée par ce mécanisme.

**2. Altération de la perméabilité des membranes :** Ce mécanisme se produit lorsque de nouvelles informations génétiques modifient la nature des protéines de la membrane. De telles altérations modifient le système de transport membranaire ou les

pores de la membrane, de sorte qu'un agent antimicrobien ne peut plus traverser la membrane. Chez les bactéries, la résistance aux tétracyclines, aux quinolones et à certains aminosides s'est produite par ce mécanisme. La présence de pénicilline ou de céphalosporine peut partiellement vaincre cette résistance car ces agents interfèrent avec la synthèse de la paroi cellulaire.

**3. Développement d'enzymes** : Cette cause fréquente de résistance peut détruire ou inactiver les agents antimicrobiens. Une enzyme de ce type est la b-lactamase. Plusieurs b-lactamases existent dans diverses bactéries ; ils sont capables de briser le cycle b-lactame des pénicillines et de certaines céphalosporines. Des enzymes similaires capables de détruire divers aminosides et le chloramphénicol ont été trouvées chez certaines bactéries à Gram négatif.

**4. Altération d'une enzyme** : Ce mécanisme permet à une réaction autrefois inhibée de se produire. Ceci est illustré par un mécanisme trouvé chez certaines bactéries résistantes aux sulfamides. Ces organismes ont développé une enzyme qui possède une très forte affinité pour le PABA (acide para-aminobenzoïque) et une très faible affinité pour le sulfamide. Par conséquent, même en présence de sulfamide, l'enzyme fonctionne suffisamment bien pour permettre à la bactérie de fonctionner.

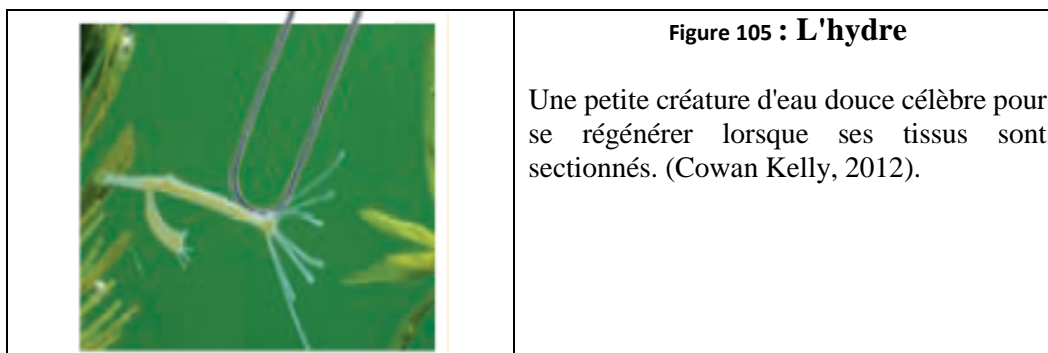
**5. Modification d'une voie métabolique** : Ce mécanisme contourne une réaction inhibée par un agent antimicrobien qui se produit chez d'autres bactéries résistantes aux sulfamides. Ces organismes ont acquis la capacité d'utiliser l'acide folique prêt à l'emploi issu de leur environnement et n'ont plus besoin de le fabriquer à partir du PABA.

## 6. Alternatives à l'antibiothérapie

Presque tous les antibiotiques utilisés pour stopper les infections bactériennes sont des composés naturels provenant des microbes eux-mêmes. Par exemple, la pénicilline provient d'un champignon, tandis que la vancomycine, l'antibiotique utilisé lorsque les bactéries résistent à de nombreux autres médicaments, provient d'une bactérie. De plus, bien que de nombreux antibiotiques soient synthétisés chimiquement pour ressembler à des antibiotiques naturels, leurs « modèles » sont des produits naturels des microbes eux-mêmes.

À mesure que de plus en plus de bactéries deviennent résistantes aux antibiotiques traditionnels, des médicaments alternatifs doivent être trouvés. Récemment, des scientifiques ont découvert un tout nouveau type d'antibiotique provenant de l'hydre, illustrée dans la figure 105, une petite créature d'eau douce célèbre pour se régénérer lorsque ses tissus sont sectionnés. En étudiant les mécanismes de défense de la peau des hydres en 2008, des scientifiques de l'Université de Keil en Allemagne ont découvert une protéine active contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Plus important encore, il agit contre certaines souches de bactéries résistantes aux

médicaments. Ils ont nommé cette protéine hydramacine. L'hydramacine est une protéine composée de 60 acides aminés et sa structure ne ressemble à celle de aucun antibiotique connu, bien que très similaire aux protéines présentes dans le venin de scorpion.



D'autres nouvelles approches pour contrôler les infections comprennent l'utilisation de probiotiques et de prébiotiques. L'utilisation de ces agents constitue un type de stratégie antimicrobienne différent et il pourrait avoir sa place dans un avenir où les antibiotiques traditionnels poseront plus de problèmes.

Les **probiotiques** sont des préparations de micro-organismes vivants qui sont donnés aux animaux et aux humains pour améliorer le biote intestinal. Cela peut servir à remplacer les microbes perdus lors du traitement antimicrobien ou simplement à augmenter le biote déjà présent. Il s'agit d'une application légèrement plus sophistiquée de méthodes qui ont longtemps été utilisées de manière empirique, par exemple par les personnes qui consomment du yaourt en raison des microbes bénéfiques qu'il contient. Ces dernières années, le nombre de produits probiotiques vendus dans les épiceries ordinaires a considérablement augmenté. Les experts trouvent généralement ces produits sûrs et, dans certains cas, ils peuvent être efficaces. On pense que les probiotiques sont utiles pour la gestion des allergies alimentaires ; leur rôle dans la stimulation de l'immunité muqueuse est également étudié.

Les **prébiotiques** sont des nutriments qui favorisent la croissance de microbes bénéfiques dans l'intestin. Par exemple, certains sucres tels que les fructanes favoriseraient la croissance de *Bifidobacterium* dans le gros intestin et décourageraient la croissance d'agents pathogènes potentiels.

---

---

## Chapitre 8 : La Lutte antimicrobienne

Les microbes sont ubiquitaires et de nombreux micro-organismes sont associés à des conséquences indésirables, telles que la détérioration des aliments et les maladies. Il est donc essentiel de tuer une grande variété de micro-organismes ou d'inhiber leur croissance afin de minimiser leurs effets destructeurs. L'objectif est double :

- détruire les agents pathogènes et empêcher leur transmission ;
- réduire ou éliminer les micro-organismes responsables de la contamination de l'eau, des aliments et d'autres substances.

### 1. Notions générales

Un aspect important du contrôle des infections est la compréhension des principes de stérilisation, de désinfection, d'antisepsie et de décontamination.

#### - Stérilisation

La stérilisation est la destruction totale de tous les microbes, y compris les formes les plus résistantes telles que les spores bactériennes, les mycobactéries, les virus non enveloppés et les champignons. Tout matériel ayant été soumis à ce processus est dit stérile. Ces termes ne doivent être utilisés que dans le sens absolu. Un objet ne peut pas être légèrement stérile ou presque stérile ; soit il est stérile, soit il n'est pas stérile. Bien que la plupart des stérilisations soient réalisées avec un agent physique, tel que la chaleur, quelques produits chimiques appelés stérilisants peuvent être classés comme agents stérilisants en raison de leur capacité à détruire les spores.

Un germicide, également appelé microbicide, est tout agent chimique qui tue les micro-organismes pathogènes. Un germicide peut être utilisé sur des matériaux inanimés (non vivants) ou sur des tissus vivants, mais il ne peut généralement pas tuer les cellules microbiennes résistantes. Tout agent physique ou chimique qui tue les « germes » est dit avoir des propriétés germicides.

#### - Désinfection

La désinfection signifie l'utilisation de procédures physiques ou d'agents chimiques qui détruisent ou éliminent tous les organismes pathogènes ou susceptibles de donner lieu à une infection. Ce processus détruit les agents pathogènes végétatifs mais pas les endospores bactériennes et les autres organismes relativement résistants (par exemple, les mycobactéries, les virus, les champignons) peuvent rester viables. Il est important de noter que les désinfectants ne sont normalement utilisés que sur des objets inanimés, car ils peuvent être toxiques pour les tissus humains et animaux lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations plus élevées. Les processus de désinfection éliminent également les produits nocifs des micro-organismes (toxines) des matériaux.

Malheureusement, les termes désinfection et stérilisation sont interchangeable et peuvent prêter à confusion. Cela est dû au fait que les processus de désinfection ont été classés en niveaux élevé, intermédiaire et faible. La désinfection de haut niveau peut généralement approcher l'efficacité de la stérilisation, tandis que les formes de spores peuvent survivre à une désinfection de niveau intermédiaire, et de nombreux microbes peuvent rester viables lorsqu'ils sont exposés à une désinfection de bas niveau.

Même la classification des désinfectants (tableau 7) selon leur niveau d'activité est trompeuse. L'efficacité de ces procédures est influencée par la nature de l'élément à désinfecter, le nombre et la résilience des organismes contaminants, la quantité de matière organique présente (qui peut inactiver le désinfectant), le type et la concentration du désinfectant, ainsi que la durée et la température d'exposition.

**Les désinfectants de haut niveau** sont utilisés pour les éléments impliqués dans des procédures invasives qui ne peuvent pas résister aux procédures de stérilisation (par exemple, certains types d'endoscopes et d'instruments chirurgicaux comportant du plastique ou d'autres composants qui ne peuvent pas être autoclavés). La désinfection de ces éléments et d'autres éléments est plus efficace si le nettoyage de la surface pour éliminer les matières organiques précède le traitement. Des exemples de désinfectants de haut niveau comprennent le traitement par chaleur humide et l'utilisation de liquides tels que le glutaraldéhyde, le peroxyde d'hydrogène, l'acide peracétique et les composés chlorés.

**Les désinfectants de niveau intermédiaire** (c.-à-d. alcools, composés iodophores, composés phénoliques) sont utilisés pour nettoyer les surfaces ou les instruments là où la contamination par des spores bactériennes et d'autres organismes très résistants est peu probable. Ceux-ci ont été appelés instruments et dispositifs semi-critiques et comprennent des endoscopes à fibre optique flexibles, des laryngoscopes, des spéculums vaginaux, des circuits respiratoires d'anesthésie et d'autres éléments.

**Les désinfectants de faible niveau** (c'est-à-dire les composés d'ammonium quaternaire) sont utilisés pour traiter les instruments et appareils non critiques, tels que les brassards de tensiomètre, les électrodes d'électrocardiogramme et les stéthoscopes. Bien que ces éléments entrent en contact avec les patients, ils ne pénètrent pas à travers les surfaces muqueuses ni dans les tissus stériles.

Tableau 7 : Méthodes de désinfection (Murray et al., 2016)

Méthode	Concentration (niveau d'activité)
<i>Chaleur</i>	
La chaleur humide	75° C à 100° C pendant 30 min (élevé)
<i>Liquide</i>	
Glutaraldéhyde	2%-3,2% (élevé)
Peroxyde d'hydrogène	3%-25% (élevé)
Composés chlorés	100-1000 ppm de chlore libre (élevé)
Alcool (éthyle, isopropylique)	70%-95% (intermédiaire)
Composés phénoliques	0,4 %-5,0 % (intermédiaire/faible)
Composés iodophores	30-50 ppm d'iode libre/L (intermédiaire)
Composés d'ammonium quaternaire	0,4 % à 1,6 % (faible)

Le niveau de désinfectants utilisé pour les surfaces environnementales est déterminé par le risque relatif que ces surfaces posent en tant que réservoir d'organismes pathogènes. Par exemple, un niveau de désinfectant plus élevé doit être utilisé pour nettoyer la surface des instruments contaminés par du sang que celui utilisé pour nettoyer les surfaces « sales », comme les sols, les éviers et les comptoirs.

#### - Antisepsie

L'antisepsie est définie comme la destruction ou l'inhibition de micro-organismes sur les tissus vivants ayant pour effet de limiter ou de prévenir les conséquences néfastes de l'infection. Les produits chimiques utilisés sont appliqués sur la peau et les muqueuses. Par conséquent, en plus d'avoir une activité antimicrobienne adéquate, ils ne doivent pas être toxiques ou irritants pour la peau. Les antiseptiques sont principalement utilisés pour réduire la population microbienne sur la peau avant une intervention chirurgicale ou sur les mains afin de prévenir la propagation de l'infection par cette voie. Les antiseptiques sont souvent des concentrations plus faibles des agents utilisés pour la désinfection.

Les agents antiseptiques (tableau 8) sont sélectionnés pour leur sécurité et leur efficacité. Les **alcools** ont une excellente activité contre tous les groupes d'organismes, à l'exception des spores, et ne sont pas toxiques, bien qu'ils aient tendance à assécher la surface de la peau car ils éliminent les lipides. Ils n'ont pas non plus d'activité résiduelle et sont inactivés par la matière organique. Ainsi, la surface de la peau doit être nettoyée avant d'appliquer de l'alcool. Les **iodophores** sont également d'excellents agents antiseptiques cutanés, ayant une gamme d'activité similaire à celle des alcools. Ils sont légèrement plus toxiques pour la peau que l'alcool, ont une activité résiduelle limitée et sont inactivés par les matières organiques. Les iodophores et les préparations à base d'iode sont fréquemment utilisés avec des alcools pour désinfecter la surface de la peau. La **chlorhexidine** a une large activité antimicrobienne, même si elle tue les organismes à un rythme beaucoup plus lent que l'alcool. Son activité persiste, même si les matières

organiques et les niveaux de pH élevés diminuent son efficacité. L'activité du **parachlorométaxylénol** (PCMX) se limite principalement aux bactéries à Gram positif. Parce qu'il est non toxique et qu'il a une activité résiduelle, il a été utilisé dans les produits de lavage des mains. Le **triclosan** est actif contre les bactéries mais pas contre de nombreux autres organismes. C'est un agent antiseptique courant dans les savons.

**Tableau 8 : Agents antiseptiques (Murray et al., 2016)**

Agent antiseptique	Concentration
Alcool (éthyle, isopropylique)	70%-90%
Iodophores	1-2 mg d'iode libre/L ; 1 % à 2 % d'iode disponible
Chlorhexidine	0,5%-4,0%
Parachlorométaxylénol	0,50%-3,75%
Triclosan	0,3%-2,0%

### - Décontamination

La décontamination est le niveau de contrôle le plus bas et est définie comme « la réduction des micro-organismes pathogènes à un niveau auquel les articles peuvent être manipulés en toute sécurité sans tenue de protection ». La décontamination comprend généralement un nettoyage physique (mécanique) avec des savons ou des détergents et l'élimination de la totalité (idéalement) ou de la plupart des matières organiques et inorganiques. Un nettoyage adéquat de tous les instruments et surfaces est considéré comme la première étape essentielle vers la désinfection ou la stérilisation car, pour être pleinement efficace, un désinfectant ou un stérilisant doit entrer en contact direct avec tous les agents pathogènes présents. Les matériaux laissés sécher sur une surface ou un appareil peuvent en fait protéger les agents pathogènes d'un agent désinfectant ou stérilisant ou les neutraliser d'une autre manière.

Plusieurs applications dans le commerce et en médecine ne nécessitent pas de véritable stérilisation, désinfection ou antiseptie, mais sont basées sur la réduction des niveaux de micro-organismes (la charge microbienne) afin de réduire considérablement le risque d'infection ou de détérioration. Les restaurants, laiteries, brasseries et autres industries alimentaires manipulent régulièrement un grand nombre d'ustensiles souillés qui pourraient facilement devenir des sources d'infection et de détérioration. Ces industries doivent maintenir les niveaux microbiens au minimum pendant la préparation et la transformation. La désinfection est toute technique de nettoyage qui élimine mécaniquement les micro-organismes ainsi que d'autres débris afin de réduire la contamination à des niveaux sûrs. Un désinfectant est un composé tel qu'un savon ou un détergent utilisé pour effectuer cette tâche.

Les ustensiles de cuisine, la vaisselle, les bouteilles, les canettes et les vêtements qui ont été lavés et séchés peuvent ne pas être totalement exempts de microbes, mais ils sont considérés comme sans danger pour une utilisation normale (sanitaire). La désinfection de l'air avec des lampes ultraviolettes réduit les microbes en suspension

dans l'air dans les chambres d'hôpital, les cliniques vétérinaires et les installations de laboratoire.

**Décontamination chimique** : La décontamination chimique est recommandée pour le traitement des déchets de laboratoire de microbiologie, du sang humain et des déchets de fluides corporels. Il n'est pas utilisé pour traiter les déchets anatomiques. Les déchets tranchants peuvent être décontaminés chimiquement ; cependant, les objets tranchants ne peuvent pas être complètement stérilisés à moins qu'un déchetage mécanique ne soit nécessaire. Le broyage n'est effectué que lorsque le broyeur fait partie intégrante d'un incinérateur, qui est scellé pour empêcher tout rejet.

L'incinération directe est la méthode d'élimination privilégiée pour les déchets tranchants. Si une décontamination chimique est utilisée, les facteurs suivants doivent être pris en compte : le type de micro-organisme, le degré de contamination, le type de désinfectant utilisé, ainsi que la concentration et la quantité de désinfectant. D'autres facteurs pertinents incluent la température, le pH, le degré de mélange et la durée pendant laquelle le désinfectant est en contact avec les déchets contaminés.

## 2. Techniques de stérilisation

La stérilisation consiste à éliminer complètement les organismes viables, y compris les spores, et constitue donc le niveau le plus élevé de contrôle des agents pathogènes. Plusieurs techniques sont disponibles pour garantir une stérilisation réussie. Ces techniques comprennent la stérilisation à la chaleur sèche, la stérilisation à la chaleur humide, la stérilisation par filtration, la stérilisation par irradiation et la stérilisation chimique.

### - Stérilisation à la chaleur sèche

La chaleur sèche (four) pénètre les substances plus lentement que la chaleur humide (vapeur). Il est généralement utilisé pour stériliser les objets métalliques et la verrerie et constitue le seul moyen approprié pour stériliser les huiles et les poudres. Les objets sont stérilisés par chaleur sèche lorsqu'ils sont soumis à 171°C pendant 1 heure, 160°C pendant 2 heures ou plus, ou 121°C pendant 16 heures ou plus, selon le volume. Une flamme nue est une forme de chaleur sèche utilisée pour stériliser les anses d'inoculation et les embouchures des tubes de culture par incinération et pour sécher l'intérieur des pipettes. Lorsque vous enflamez des objets en laboratoire, vous devez éviter la formation de cendres flottantes et d'aérosols (gouttelettes rejetées dans l'air). Ces substances peuvent être un moyen de propagation d'agents infectieux si les organismes qu'elles contiennent ne sont pas tués par incinération, comme prévu. Pour cette raison, des incinérateurs à anse spécialement conçus et dotés d'une gorge profonde sont souvent utilisés pour stériliser les anses d'inoculation. La stérilisation par chaleur sèche nécessite des temps d'exposition prolongés et endommage de nombreux instruments, elle n'est donc pas recommandée actuellement.

**- Stérilisation à la chaleur humide**

Les tentatives de stérilisation d'objets à l'eau bouillante sont inefficaces car seule une température relativement basse (100 °C) peut être maintenue. En effet, la formation de spores par une bactérie est généralement démontrée en faisant bouillir une solution d'organismes puis en repiquant la solution. L'ébullition des organismes végétatifs les tue, mais les spores restent viables. En revanche, la vapeur sous pression dans un autoclave (aw'to-klav) est une forme de stérilisation très efficace ; la température plus élevée provoque la dénaturation des protéines microbiennes. Le taux de destruction des organismes pendant le processus d'autoclavage est rapide mais est influencé par la température et la durée de l'autoclave, la taille de l'autoclave, le débit de vapeur, la densité et la taille de la charge, ainsi que l'emplacement de la charge dans la chambre. Il n'est pas recommandé d'emballer les objets dans du papier d'aluminium car cela pourrait gêner la pénétration de la vapeur dans la charge. La vapeur circule dans un autoclave depuis une sortie de vapeur jusqu'à un port d'évacuation d'air (figure 106). Lors de la préparation des articles pour l'autoclavage, les récipients doivent être descellés et les articles doivent être enveloppés dans des matériaux permettant la pénétration de la vapeur. Les grands paquets de pansements et les grands flacons de milieu nécessitent plus de temps pour que la chaleur les pénètre. De même, le fait de conditionner plusieurs articles à proximité les uns des autres dans un autoclave allonge le temps de traitement jusqu'à 60 minutes pour garantir la stérilité. Il est plus efficace et plus sûr de faire fonctionner deux chargements séparés et peu encombrés qu'un seul chargé.

En général, la plupart des autoclaves fonctionnent entre 121 °C et 132 °C pendant 15 minutes ou plus. Y compris les préparations commerciales de *Bacillus stearothermophilus*, les spores peuvent aider à surveiller l'efficacité de la stérilisation. Une ampoule de ces spores est placée au centre de la charge, retirée à la fin du processus d'autoclave et incubée à 37°C. Si le processus de stérilisation réussit, les spores sont tuées et les organismes ne se développent pas.

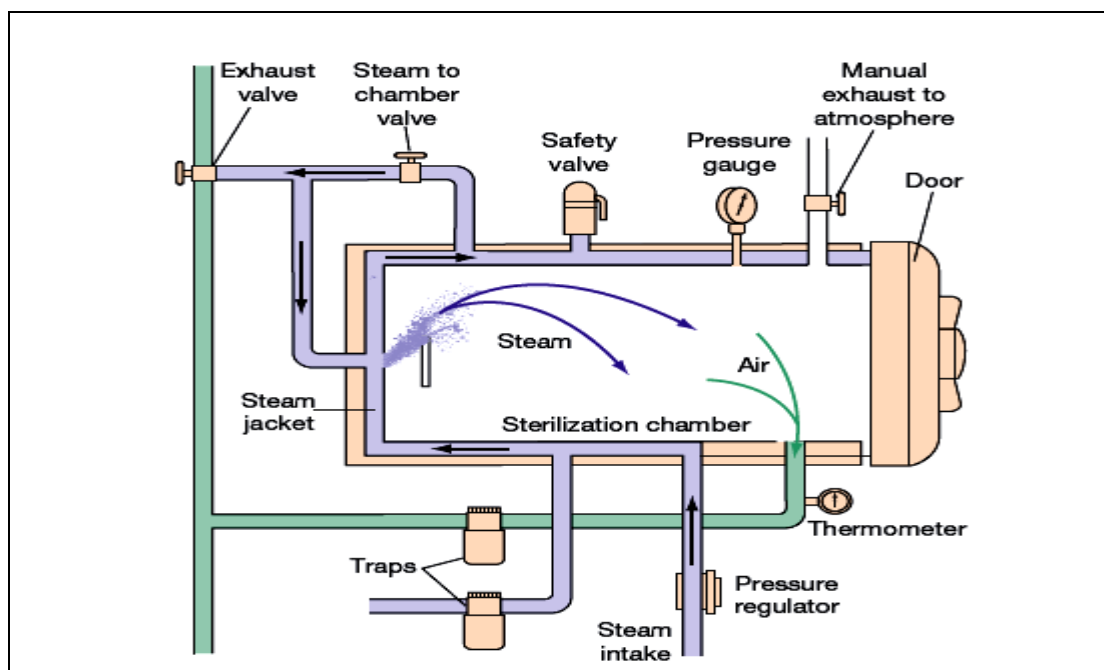


Figure 106 : L'autoclave

La vapeur est chauffée dans l'enveloppe d'un autoclave, pénètre dans la chambre de stérilisation par une ouverture en haut à l'arrière et est évacuée par un évent en bas à l'avant (Black, 2012).

### - Stérilisation par filtration

La stérilisation par filtration nécessite des filtres dotés de pores extrêmement petits. La filtration est utilisée depuis l'époque de Pasteur pour séparer les bactéries des milieux et pour stériliser les matériaux qui seraient détruits par la chaleur. Au fil des années, les filtres ont été fabriqués en porcelaine, en amiante, en terre de diatomées et en verre fritté (verre chauffé sans fondre). Les filtres à membrane, de minces disques dotés de pores qui empêchent le passage de tout ce qui est plus grand que la taille des pores, sont largement utilisés aujourd'hui. Ils sont généralement constitués de nitrocellulose et présentent le grand avantage de pouvoir être fabriqués avec des tailles de pores spécifiques allant de 25  $\mu\text{m}$  à moins de 0,025  $\mu\text{m}$ . Les particules filtrées selon différentes tailles de pores sont résumées dans le tableau 9. Les filtres à membrane présentent certains avantages et inconvénients. À l'exception de ceux dont les pores sont les plus petits, les filtres à membrane sont relativement peu coûteux, ne se bouchent pas facilement et peuvent filtrer de grands volumes de fluide assez rapidement. Ils peuvent être autoclavés ou achetés déjà stérilisés. Un inconvénient des filtres à membrane est que beaucoup d'entre eux laissent passer les virus et certains mycoplasmes. D'autres inconvénients sont qu'ils peuvent absorber des quantités relativement importantes de filtrat et introduire des ions métalliques dans le filtrat.

Les filtres à membrane sont utilisés pour stériliser les matériaux susceptibles d'être endommagés par la stérilisation thermique. Ces matériaux comprennent des milieux, des nutriments spéciaux qui peuvent être ajoutés aux milieux et des produits pharmaceutiques tels que des médicaments, des sérums et des vitamines.

**Tableau 9 : Tailles des pores des filtres à membrane et des particules qui les traversent (Black, 2012)**

Taille des pores (en $\mu\text{m}$ )	Particules qui les traversent
10	Érythrocytes, cellules de levure, bactéries, virus, molécules
5	Cellules de levure, bactéries, virus, molécules
3	Certaines cellules de levure, bactéries, virus, molécules
1.2	La plupart des bactéries, virus, molécules
0,45	Quelques bactéries, virus, molécules
0,22	Virus, molécules
0,10	Virus, molécules de taille moyenne à petite
0,05	Petits virus, molécules
0,025	Uniquement les plus petits virus, molécules
Ultrafiltre	Petites molécules

Certains filtres peuvent être fixés aux seringues afin que les matériaux puissent y être forcés relativement rapidement.

Lors de la fabrication de vaccins nécessitant la présence de virus vivants, il est important de sélectionner une taille de pores du filtre qui permettra aux virus de passer à travers le filtre mais empêchera les bactéries de le faire. En sélectionnant un filtre doté de pores de taille appropriée, les scientifiques peuvent séparer les poliovirus du liquide et des débris présents dans les cultures de tissus dans lesquelles ils ont été cultivés. Cette procédure simplifie la fabrication du vaccin contre la polio. Des filtres en acétate de cellulose dotés de pores extrêmement petits sont désormais disponibles et sont capables d'éliminer de nombreux virus (mais pas les plus petits) des liquides. Cependant, ces filtres sont coûteux et se bouchent facilement.

La filtration est également utilisée pour éliminer les micro-organismes et autres petites particules des réseaux publics d'eau et des installations de traitement des eaux usées. Cette technique ne peut cependant pas stériliser ; cela réduit simplement la contamination.

Les filtres à particules d'air à haute efficacité (High-efficiency particulate air : HEPA) sont utilisés dans les systèmes de ventilation des zones où le contrôle microbien est particulièrement important, comme dans les salles d'opération, les unités de brûlage et les hottes de transfert à flux laminaire dans les laboratoires. Les filtres HEPA capturent également les organismes libérés dans les pièces occupées par des patients tuberculeux ou dans les laboratoires où sont étudiés des microbes particulièrement dangereux, comme les unités de confinement maximal. Ces filtres éliminent presque tous les organismes d'un diamètre supérieur à  $0,3 \mu\text{m}$ . Les filtres usagés sont trempés dans du formol avant d'être jetés.

**- Stérilisation par irradiation**

Quatre types généraux d'irradiation – la lumière ultraviolette, les radiations ionisantes, les radiations micro-ondes et la forte lumière visible (dans certaines circonstances) – peuvent être utilisés pour contrôler les micro-organismes et conserver les aliments.

- **Les rayons ultraviolets (lumière ultraviolette)** : sont des radiations de type non ionisantes, dénature les protéines et les acides nucléiques.

L'efficacité de la lumière ultraviolette en tant qu'agent mortel et mutagène est étroitement liée à sa longueur d'onde. La longueur d'onde bactéricide la plus efficace se situe dans la plage de 240 à 280 nm, avec un optimum d'environ 260 nm, la longueur d'onde la plus efficacement absorbée par l'ADN, ce qui implique la réplication de l'ADN.

Les radiations ultraviolettes peuvent être produites artificiellement par des lampes à vapeur de mercure. Contrairement aux radiations ionisantes, l'énergie des radiations ultraviolettes est plus faible et son pouvoir de pénétration est faible. Les radiations ultraviolettes autour de 260 nm sont assez mortelles mais ne pénètrent pas très efficacement dans le verre, l'eau et d'autres substances. En raison de cet inconvénient, les radiations ultraviolettes ne sont utilisées comme agent stérilisant que dans quelques situations spécifiques. Elles sont utilisées pour réduire le nombre de micro-organismes dans l'air dans les salles d'opération, les animaleries et là où les cultures sont transférées. Étant donné que les radiations ultraviolettes brûlent la peau et endommagent les yeux, les personnes travaillant dans ces zones doivent s'assurer que les lampes ultraviolettes sont éteintes lorsque ces zones sont utilisées.

- **Les radiations ionisantes** incluent les rayons X, les rayons  $\gamma$  (gamma) et les rayons cosmiques. Elles ont un pouvoir de pénétration très élevé et sont hautement mortels pour toutes les cellules, y compris les bactéries. Les radiations ionisantes dénaturent les protéines et les acides nucléiques. Elles sont utilisées pour stériliser les plastiques (seringues en plastique, les cathéters et les gants qui ne résistent pas à la chaleur) et les produits pharmaceutiques (les antibiotiques, les hormones, les sutures et les vaccins) et pour prévenir la détérioration des aliments.

- Stérilisation à froid

Puisqu'il n'y a pas d'augmentation appréciable de la température dans cette méthode, on parle de stérilisation à froid. Les grandes usines commerciales utilisent les radiations gamma émises par un élément radioactif, généralement le cobalt 60, pour ce type de stérilisation.

- **Les radiations micro-ondes** Contrairement aux rayons gamma, aux rayons X et aux radiations UV, les radiations micro-ondes se situent à l'extrémité des grandes longueurs d'onde du spectre électromagnétique. Elles ont des longueurs d'onde d'environ 1 mm à 1 m. Les fréquences des fours à micro-ondes sont réglées pour correspondre aux niveaux d'énergie des molécules d'eau. À l'état liquide, les molécules d'eau absorbent rapidement l'énergie des micro-ondes et la restituent ensuite aux matériaux environnants sous forme de chaleur. Ainsi, les matériaux qui ne contiennent pas d'eau, comme les assiettes en papier, en porcelaine ou en plastique, restent froids tandis que les aliments humides qui s'y trouvent se réchauffent. Pour cette raison, les micro-ondes domestiques ne peuvent pas être utilisés pour stériliser des articles tels que des bandages et de la verrerie. La conduction de l'énergie dans les métaux entraîne des problèmes tels que des étincelles, qui rendent la plupart des objets métalliques impropres à la stérilisation par micro-ondes. De plus, les endospores bactériennes, qui ne contiennent quasiment pas d'eau, ne sont pas détruites par les micro-ondes. Cependant, un four à micro-ondes spécialisé est récemment devenu disponible et peut être utilisé pour stériliser des milieux en seulement 10 minutes (figure 107). Il dispose de 12 récipients sous pression, chacun contenant 100 ml de milieu. L'énergie des micro-ondes augmente la pression du milieu à l'intérieur des récipients jusqu'à ce que les températures stérilisantes soient atteintes.



**Figure 107 : Stérilisation par micro-ondes**

Le système MikroClave™ est spécialement conçu pour la stérilisation rapide des milieux et solutions microbiologiques. Utilisant l'énergie des micro-ondes, il peut stériliser 1,2 litre de milieux en 6,5 minutes ou 100 ml en 45 secondes. Il n'est pas nécessaire de faire bouillir l'agar avant la stérilisation (Black, 2012).

- **Forte lumière visible** la lumière du soleil a un effet bactéricide, mais cet effet est principalement dû aux rayons UV du soleil. La lumière visible forte, qui contient de la lumière de longueurs d'onde de 400 à 700 nm (lumière violette à rouge), peut avoir des effets bactéricides directs en oxydant les molécules sensibles à la lumière telles que la riboflavine et les porphyrines (composants des enzymes oxydatives) dans les bactéries. Pour cette raison, les cultures bactériennes ne doivent pas être exposées à une lumière intense lors des manipulations en laboratoire. Les colorants fluorescents : éosine et bleu de méthylène peuvent dénaturer les protéines en présence de lumière forte car ils absorbent de l'énergie et provoquent l'oxydation des protéines et des acides nucléiques. La combinaison d'un colorant et d'une lumière forte peut être utilisée pour débarrasser les matériaux des bactéries et des virus.

---

**- Stérilisation chimique**

L'oxyde d'éthylène gazeux est utilisé pour stériliser les articles sensibles à la température ou à la pression. Le traitement dure généralement 4 heures et les articles stérilisés doivent être aérés pendant 12 heures supplémentaires pour éliminer le gaz toxique avant que les articles ne soient utilisés. Bien que l'oxyde d'éthylène soit très efficace, des réglementations strictes limitent son utilisation car il est inflammable, explosif et cancérigène pour les animaux de laboratoire. Pour ces raisons, la stérilisation à l'oxyde d'éthylène est évitée si des alternatives acceptables sont disponibles.

Les vapeurs de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont des stérilisants efficaces en raison de la nature oxydante du gaz. Ce stérilisant est utilisé pour la stérilisation des instruments. Une variante est la stérilisation au gaz-plasma, dans laquelle le peroxyde d'hydrogène est vaporisé, puis des radicaux libres réactifs sont produits avec une énergie micro-onde ou radiofréquence. Puisqu'il s'agit d'une méthode de stérilisation efficace qui ne produit pas de sous-produits toxiques, la stérilisation au gaz plasma a remplacé de nombreuses applications de l'oxyde d'éthylène. Cependant, il ne peut pas être utilisé avec des matériaux qui absorbent le peroxyde d'hydrogène ou réagissent avec lui.

Deux stérilisants chimiques ont également été utilisés : l'acide peracétique et le glutaraldéhyde. L'acide peracétique, un agent oxydant, a une excellente activité et les produits finaux (c'est-à-dire l'acide acétique et l'oxygène) sont non toxiques. En revanche, la sécurité est un problème avec le glutaraldéhyde et il faut faire preuve de prudence lors de la manipulation de ce produit chimique. En effet, le glutaraldéhyde est moins toxique pour les tissus viables, mais il peut néanmoins provoquer des brûlures de la peau ou des muqueuses.

## Les références bibliographiques

- Anonyme (2022) : Le monde microbien : BTS Bioanalyses et Contrôles AFBB. BTS Analyses Biologiques. Microbiologie 1.

[https://www.academia.edu/28982404/BTS\\_Bioanalyses\\_et\\_Contrôles\\_AFBB\\_Techniques\\_de\\_Microbiologie\\_2\\_e\\_ann%C3%A9e\\_TP\\_n\\_1\\_brevet\\_de\\_technicien\\_supérieur\\_bioanalyses\\_et\\_contrôles\\_Epreuve\\_E5\\_Unit%C3%A9\\_U52\\_Techniques\\_de\\_microbiologie](https://www.academia.edu/28982404/BTS_Bioanalyses_et_Contrôles_AFBB_Techniques_de_Microbiologie_2_e_ann%C3%A9e_TP_n_1_brevet_de_technicien_supérieur_bioanalyses_et_contrôles_Epreuve_E5_Unit%C3%A9_U52_Techniques_de_microbiologie). Consulté le 24/12/2022.

- Berche P., Kayal S., Poyart C., Nassif X. (2003) Bactériologie générale P.C.E.M.2. Faculté de Médecine Necker-Enfants malades. Pp : 89.

- Black J. G. (2012) : Microbiology: Principles and Explorations 8<sup>TH</sup> EDITION. John Wiley & Sons, Inc., 111 River Street, Hoboken. Pp: 975. website <http://www.wiley.com/go>.

- Brooks G. F., Carroll K. C., Butel J. S., Morse S. A., Mietzner T. A.: (2013) : Jawetz, Melnick, & Adelberg's, Medical Microbiology, Twenty-Sixth Edition, The McGraw-Hill Companies, [bulksales@mcgraw-hill.com](mailto:bulksales@mcgraw-hill.com). Pp: 877.

- Cowan Kelly M. (2012) : Microbiology: a systems approach. 3<sup>rd</sup> Edition. The McGraw-Hill, a business unit of The McGraw-Hill Companies, Inc., 1221 Avenue of the Americas, New York, NY 10020. Pp: 881.

- Denyer S.P., Hodges N. A., Gorman S. P. (2004) : Pharmaceutical Microbiology, *Hugo and Russell's*, Seventh Edition. Blackwell Science Ltd. Pp: 494.

- Hart T., Shears P. (1997) : Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences, Flammarion 4, rue Casimir Delavigne, 75006 PARIS. Pp : 317.

- Kayser F. H. (2005) : Color atlas of medical microbiology. Thieme MedOne Education. Pp 720. <https://www.studypool.com/documents/10196118/color-atlas-of-medical-microbiology-kayser-thieme-2005->

- Kim B. H., Gadd G. M. (2008) : Bacterial Physiology and Metabolism: Cambridge University Press. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo. 553.

- Kumar S. (2012) : Textbook of Microbiology. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. New Delhi • Panama City • London • Dhaka • Kathmandu. Pp: 804.

- Leboffe M. J., Pierce B. E. (2010) : MICROBIOLOGY, Laboratory Theory & Application, Third edition, Morton Publishing Company, 925 W. Kenyon Ave., Unit 12, Englewood, Colorado 80110, [www.morton-pub.com](http://www.morton-pub.com). Pp: 786.

- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. (2016) : Medical Microbiology, 8th Edition Elsevier. 1600 John F. Kennedy Blvd. Ste 1800 Philadelphia, PA 19103-2899. <http://evolve.elsevier.com/Murray/microbiology/> Pp : 932.
  
- Parija S. Ch. (2012) : Textbook of Microbiology and Immunology, Second Edition. Elsevier A division of Reed Elsevier India Private Limited. Pp 682.
  
- Prescott L. M., Harley J. et Klein D. A. (2003) : Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition française, Traduction de la 5<sup>ème</sup> édition américaine par Bacq-Calberg C-M. et Dusart J. De Boeck. 5, allée de la 2<sup>ème</sup> DB 75015 Paris. France. Pp : 1137.
  
- Prescott L. M. (2018) : Microbiologie de Prescott. Traduction de Coyette, J. ; Joseleau J.-P., Perraud R. 5<sup>ème</sup> édition. De Boeck Supérieur. Rue du Bosquet, 7, B-1348 Louvain-la-Neuve. Belgique. Pp : 1120.
  
- Roller S. (2012) : Essential Microbiology and Hygiene for Food Professionals. Hodder Arnold, an imprint of Hodder Education, a division of Hachette UK 338 Euston Road, London NW1 3BH. Pp: 232.
  
- Service de Bactériologie. (2003) : Bactériologie, Niveau DCEM1, Université Pierre et Marie Curie, Faculté de Medecine. Pp : 122.
  
- Shamim M. (2017) : Clinico-basic Microbiology. 4th Revised Edition. Khurram & Brothers, Karachi. 254.
  
- Talaro K. P. et Talaro A. (2002) : Foundations in Microbiology 4th Edition. Front Matter. The McGraw–Hill Companies. [www.mhhe.com/primis/online](http://www.mhhe.com/primis/online). Pp 890.
  
- Tiffany Alley L., Moscatello K., Harrogate, T.N. (2016) : Immunology and Microbiology. USMLE® STEP 1 Lecture Notes. Kaplan Medical 750 Third Avenue New York, NY 10017. Pp: 519.
  
- Trivedi P. C., Sonali P. et Seema B. (2010) : Text Book of Microbiology. Aavishkar Publishers, Distributors. Printed at Sheetal Printers Jaipur –Raj.) India. Pp : 457.

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement  
Supérieur  
et de la Recherche Scientifique  
Université Batna 1 – Batna  
Institut des Sciences Vétérinaires  
et des Sciences Agronomiques



وزارة التعليم العالي  
والبحوث العلمي  
جامعة باتنة 1 - باتنة  
البيطرة علوم معهد  
والعلوم الفلاحية

N°: 81../SDPGRSRE/ ISVSA/ UB1/2024

Batna, le 06/10/2024

## Extrait de Procès verbal du Conseil scientifique N°1 du 26/05/2024

### • PEDAGOGIE : POLYCOPIE

Auteurs : RABEHI Sabrina

Intitulé du polycopié : La Bactériologie Générale .

– Vue le rapport des experts chargés de l'évaluation de ce polycopié en l'occurrence :

- Pr. Helleili Nouzha - Université Batna 1
- Dr. AYACHI Ammar - Université Batna 1

Le conseil scientifique donne un avis favorable à l'utilisation de ce polycopié comme support pédagogique destiné aux étudiants 2<sup>ème</sup> année médecine vétérinaire .

Le directeur adjoint chargé de la post graduation, de  
la recherche scientifique et des relations extérieurs