

Chapitre 1 : Le Monde microbien

Introduction

Les micro-organismes (appelés aussi microbes et protistes), forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques (c.-à-d. invisibles à l'œil nu). Ils diffèrent et varient par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie.

Ils sont représentés par les bactéries, les protozoaires, les champignons (Mycètes) microscopiques, et les algues. Les virus sont considérés, quant à eux, comme des micro-organismes non vivants, acellulaires entièrement dépendant de leurs cellules hôtes.

1. Place des bactéries dans le monde vivant

Au cours des années 1670 et 1680, un marchand hollandais "Antoni van Leeuwenhoek" fut le premier à décrire l'existence d'organismes vivants invisibles à l'œil nu (micro-organismes). Dès lors, de très nombreux micro-organismes furent décrits et officiellement regroupés au 19^e siècle sous le nom de protistes, qui signifie les tout premiers (protistos en grec).

Au 18^e siècle, deux grands groupes pouvaient être décrits : les micro-organismes pourvus d'un noyau (ou protistes eucaryotes) qui sont les protozoaires (protôs : premier ou primitif ; zôon : animal en grec), et les micro-organismes sans noyau (ou protistes procaryotes : pro = avant ; karyon = noyau, en grec) dénommés bacterium en 1872. Ce terme est un dérivé latinisé du mot français bactériidie qui signifie bâton ou bâtonnet (baktêrion en grec).

Le mot microbe (mikros : petit ; bios : vie ; en grec) a été proposé en 1878 pour désigner tous les micro-organismes invisibles à l'œil nu. Actuellement, les protistes comprennent des êtres unicellulaires simples et syncytiaux (noyau polylobé) et des êtres pluricellulaires à cellules indifférenciées.

En 1937 et grâce au microscope électronique, deux types de cellules sont identifiés, la cellule eucaryote (renferme des organites cellulaires et un noyau entouré d'une membrane) et la cellule procaryote (dont l'organisation est très simple et le noyau sans membrane). En 1938, le règne des bactéries (ou Monera) est séparé de celui des protistes.

Au sein du règne des Procaryotae (Monera), 04 divisions se font distinguées:

- La division des "Gracilicutes" : Bactéries à Gram négatif ;
- La division des "Firmicutes" : Bactérie à Gram positif ;
- La division des "Tenericutes" : Bactéries dépourvues de paroi ;
- La division des "Mendosicutes" : Archaeobactéries.

Au cours des années 1970, un troisième type de cellules a été décrit en plus des cellules eucaryotes et des procaryotes classiques (connue sous le nom d'eubactéries) : se sont les archaeobactéries (archées) (archae : ancien.) dépourvues de véritable noyau et formant donc des cellules procaryotes, ne sont ni des cellules eucaryotes, ni des eubactéries.

Comparées aux cellules eucaryotes, les cellules procaryotes n'ont pas de membrane nucléaire, pas de noyau différencié, pas d'appareil de Golgi, pas de protéines histones, pas de mitochondries, ni de chloroplastes ; Cependant, elles possèdent un chromosome (ADN circulaire) et des ribosomes ayant une

valeur de sédimentation 70S (Svedberg. Un Svedberg vaut exactement 10^{-13} s) (ceux des cellules eucaryotes ont une valeur 80S). De plus, les eubactéries possèdent une structure externe à la membrane plasmique, qui est la paroi (sauf les mycoplasmes et les chlamydie) formée de peptidoglycane absent dans la paroi des archaeobactéries.

Les archaeobactéries forment un groupe de bactéries primitives qui n'ont aucun intérêt médical. Se sont bactéries extrémophiles colonisant les sources thermales, abysses des océans, mer Morte, lacs acides, ...

Les protistes s'organisent en trois types de structures biologiques

- Protistes unicellulaires (bactéries, protozoaires, levures et de nombreuses algues) : composés d'une cellule unique capable de toutes les fonctions de la vie : nutrition, croissance et reproduction.
- Protistes pluricellulaires (champignons et algues) : formés de plusieurs cellules identiques dans leur structure et leur physiologie (c.-à-d. Non différenciées).
- Protistes coenocytiques : composés d'un cytoplasme important incluant de nombreux noyaux sans septum (cloison) entre eux. Ils sont la plus du temps aquatiques, parasites ou saprophytes. Ce sont les seuls membres des champignons mobiles.

Tableau 1: Caractères distinctifs des cellules eucaryotes, des eubactéries et des archaeobactéries

Caractéristiques	Eucaryotes	Archae (bactéries)	Eubactéries
<u>Paroi bactérienne</u>	Absente	Absente ou présente sans peptidoglycane	Présente avec peptidoglycane
<u>Lipides membranaires</u>	Chaînes droites unies au glycérol par des liaisons ester	Chaînes ramifiées unies au glycérol par des liaisons éther	Chaînes droites unies au glycérol par des liaisons ester
<u>Génome</u>	2n chromosomes linéaires dans le noyau	Un chromosome circulaire libre	Un chromosome circulaire libre
<u>Introns dans les gènes</u>	Oui	?	Non
<u>Protéines histones</u>	Oui	Non	Non
<u>Gènes ARNr</u>	18S, 5.8S, 28S	16S, 23S, 5S	16S, 23S, 5S
<u>Taille ribosomes</u>	80S	70S	70S
<u>Sensibilité ribosomale</u>	Toxine diphtérique, cycloheximide	Toxine diphtérique	Chloramphénicol
<u>Boucle d'ARNr se liant aux protéines ribosomales</u>	Non	Non	Oui
<u>Séquence commune aux ARNt</u>	Oui (<u>Guanine-Thymine-Pseudouridine-Cytosine-Guanine</u>)	Non	Oui (<u>Guanine-Thymine-Pseudouridine-Cytosine-Guanine</u>)
<u>Codon d'initiation</u>	Méthionine	Méthionine	Formyl-méthionine
<u>Reproduction</u>	Mitose	Scissiparité	Scissiparité

Chapitre 2 : Structure et anatomie fonctionnelle

1. Formes bactériennes et aspects au microscope

Au microscope optique, les bactéries se présentent sous différentes formes. Pour certaines espèces bactériennes, non seulement, chaque cellule a une forme particulière (coque, bâtonnet, vibrion, filament,...); mais aussi les cellules filles (dérivées d'une cellule mère) peuvent se regrouper de manières particulières (amas, chaînettes,...). D'autres espèces changent de forme durant leur cycle vital et sont dites pléomorphes (du grec pléon : plus abondant, et morphê : forme) (actinomycètes, mycoplasmes, ...). Les formes et les types d'assemblage sont influencés par le genre, la famille, l'espèce, la sous espèce, la souche, le milieu de culture (liquide, solide, composition) et l'âge de la culture.

1.2 Les coques (Coccus = grain ou baie. Bactéries sphériques)

Toutes les bactéries cocciformes n'ont pas une forme sphérique parfaite : certaines sont allongées et d'autres ont une face aplatie. Les coques se multiplient selon un, deux ou trois plans de division donnant respectivement des assemblages en chaînettes, en tétrades ou en amas. La taille moyenne des coques est de 0,5 à 2 μm .

1.2.1 Diplocoques (Diplo = deux)

Sont formés de deux coques assemblées : *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria spp.*

1.2.2 Streptocoques (Streptus = pliable, flexible)

Sont formés de chaînettes de coques plus ou moins longues : *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*

1.2.3 Tétrades (Tetra : quatre)

Sont des amas de quatre bactéries formés par une division cellulaire à deux plans.

1.2.4 Sarcines (Sarcina = un paquet)

Sont des amas réguliers en trois dimensions de 08 cellules bactériennes suite à l'existence de trois plans de division cellulaire se succédant de manière régulière : *Sarcina spp.*

1.2.5 Staphylocoques (Staphylo = grappe de raisin)

Sont des amas irréguliers de bactéries formés suite à l'existence de trois plans de division cellulaire se succédant de manière anarchique : *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*

1.3 Les bacilles ou bâtonnets

Sont des bactéries allongées qui ne présentent qu'un seul plan de division cellulaire. Selon leurs formes, les bacilles sont classés en :

1.3.1 Coccobacilles

Sont presque aussi longs que larges et leurs extrémités sont arrondies. Ils sont représentés par les pasteurelles et les entérobactéries.

1.3.2 Bacilles corynéformes (coryne = une massue)

Ce sont des bâtonnets courts présentant une extrémité épaissie sous forme de massue. C'est la forme typique de *Corynebacterium diphtheriae*.

1.3.3 Vrais bacilles

De forme régulière avec la longueur bien plus grande que la largeur et les extrémités moins arrondies que chez les coccobacilles. On trouve dans ce groupe beaucoup de bactéries: *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Listeria spp.*, *Bacteroides spp.*, *Pseudomonas spp.* Leur taille varie de 0,5 µm/0,2 µm pour *Erysipelothrix spp.* à 15 µm/1 µm pour *Clostridium septicum*.

1.3.4 Bacilles filamenteux

Sont de très longs bâtonnets observés dans certaines conditions de culture. C'est le cas de *Clostridium septicum*.

1.3.5 Bacilles fusiformes (fusiformis = un fuseau)

Ce sont des bâtonnets plus ou moins longs à extrémités effilées. Ce caractère est instable et il disparaît en subcultures. C'est le cas de *Fusiformis spp.*

1.3.6 Bacilles ramifiés

Ces bactéries ressemblent à des mycéliums (se rapprochant des moisissures) et sont appelées "Actinomycètes" (aktinos = rayon ; mykes = champignon). On y trouve *Mycobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Nocardia spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Dermatophilus spp.* Les Bacilles ramifiés sont plus ou moins abondants que les bâtonnets simples.

NB : Les bacilles peuvent se présenter en : bacilles isolés, en paires (diplobacilles), en chaînettes plus ou moins longues (streptobacilles) ou en amas plus ou moins irréguliers (en lettres chinoises, en lettre grecques ou en palissades).

1.4 Les courbées

Ce sont des bâtonnets courbés en tours de spire. Selon leur longueur, on distingue :

1.4.1 Les Vibrions (vibrio = qui bouge rapidement)

Sont recourbés en virgule ou en vis. Ils sont courts (< 5 µm) et ne présentent qu'un à deux tours de spire (*Vibrio spp.*, *Campylobacter spp.*, *Helicobacter spp.*

1.4.2 Spirilles (spirillum = petite spirale)

Ce sont des bâtonnets recourbés en longues spirales (jusqu'à 20 µm et plus) et présentent de nombreux tours de spire. Ils sont :

- Fins comme les spirochètes (spira = un tour ; chaeta = un cheveu) qui peuvent être :
 - * À spires étroites et régulières : *Treponema spp.*, *Brachyspira spp.* et *Serpulina spp.* ;
 - * À spires larges et régulières : *Borrelia spp.* ;
 - * À spires étroites et irrégulières : *Leptospira spp.* ;
- Très épais : *Anaerobiospirillum spp.*

NB : D'autres formes peuvent aussi être observées, mais elles sont peu fréquentes :

- En forme d'étoile : *Stella vacuolata*, *Prosthecomicrobium spp.* ;
- En forme carrée : *Haloquadratum walsbyi*, *Haloarcula spp.*

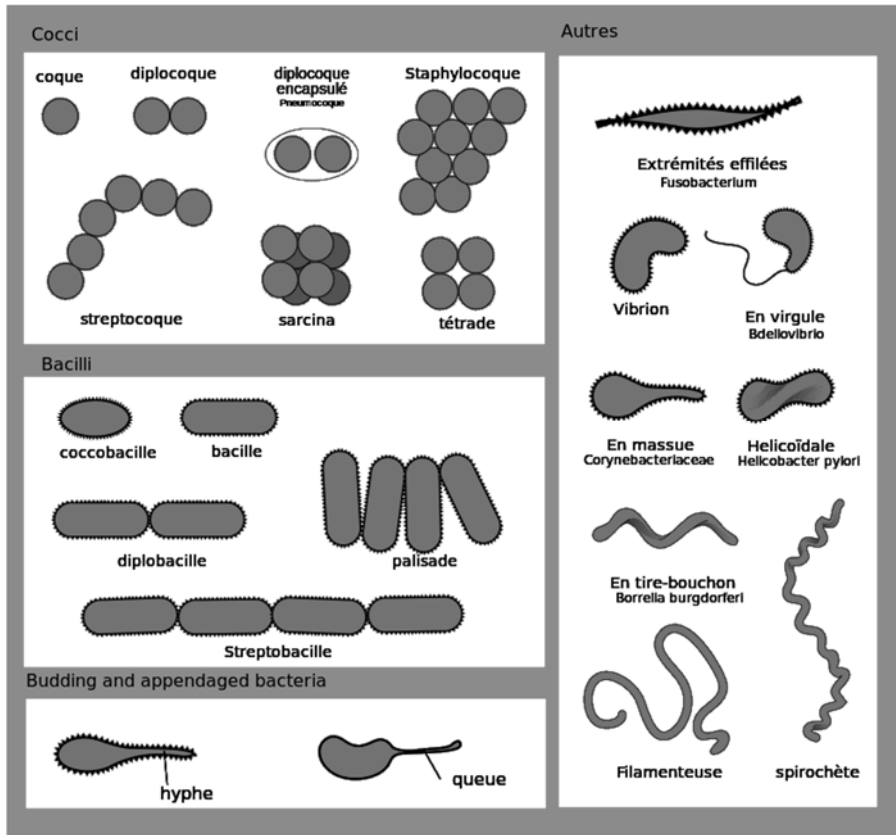


Figure1: Les formes des bactéries au microscope.

2. Structure des bactéries

Les cellules bactériennes sont constituées d'un cytoplasme, d'organelles, d'une membrane cytoplasmique et d'une paroi bactérienne. Cette dernière est un constituant unique des bactéries. Des structures extérieures aux membranes existent aussi telles que la capsule, les cils, les flagelles et les fimbriae (pilis). Des formes particulières peuvent aussi être observées. Il s'agit principalement de la spore bactérienne qui est une forme de résistance particulière à certains genres bactériens (*Clostridium* et *Bacillus*).

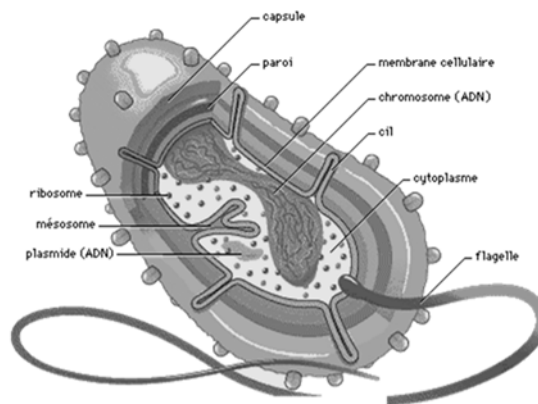


Figure 2 : Structure générale d'une cellule bactérie.

2.1 Le matériel génétique

Est représenté par le chromosome bactérien ou nucléoïde, les éléments extra-chromosomiques indépendants (plasmides) et les éléments génétiques mobiles possédant une certaine autonomie (phages, transposons, séquences d'insertion, intégrons, îlots de pathogénicité et de résistance) et qui sont portés soit par le chromosome ou le plasmide.

2.1.1 Le chromosome bactérien (nucléoïde)

Le matériel génétique de la bactérie est constitué d'une molécule d'ADN de composition classique, circulaire, bicaténaire et repliée sur elle-même de multiples fois. Cette molécule porte toute l'information génétique nécessaire au métabolisme bactérien et à la reproduction.

Chez les bactéries pathogènes, le chromosome peut aussi porter l'information génétique responsable de la synthèse de facteurs de virulence, et des mécanismes de la résistance aux désinfectants et/ou aux antibiotiques (résistances d'origine chromosomique). Ces informations font généralement partie de fragments d'ADN nouvellement acquis.

NB: Certaines bactéries (*Borrelia burgdorferi*) possèdent en effet un chromosome linéaire dont le mécanisme de réplication est inconnu.

2.1.1.1 Structure du gène bactérien

Un gène bactérien est une séquence d'ADN codante (gène de structure) débutant par un codon "start" (principalement ATG ou GTG) et se terminant par un codon "stop" (TAA, TAG ou TGA). Le nombre de séquences codantes varie en fonction des espèces bactériennes ce qui fait que leurs compositions en bases puriques et pyrimidiques (% de G+C) (puisque la liaison C-G est la plus forte. AT est faible) sont différentes aussi.

La séquence d'ADN codante (gène de structure) est devancée d'une région de liaison de l'ARN polymérase, appelée "promoteur" qui n'est qu'une partie de "l'opérateur" (ensemble de gènes de régulation de l'expression du gène de structure).

Après le gène de structure, se situe un "site de terminaison" de la transcription (région de détachement de l'ARN polymérase).

NB: Plusieurs gènes de structure peuvent être contrôlés par un seul promoteur et un seul site de terminaison. Ils constituent un opéron et sont transcrits ensemble (C.-à-d. en un seul ARN messenger).

Les chromosomes bactériens sont de différentes tailles en fonction des genres, des espèces et des souches. Le chromosome d'*E coli* est d'environ 4700 kpb (kilo paires de bases), celui de *Clostridium perfringens* 3500 kpb et celui de *Mycoplasma pneumoniae* 600 kpb (Un des plus petits chromosomes).

2.1.1.2. Expression du gène bactérien (voir cours de génétique de 1^e année DV).

2.1.2 Les plasmides

Les plasmides constituent des molécules circulaires d'ADN bicaténaire, se répliquant indépendamment du chromosome. Leur nombre varie selon leur taille et le nombre de copies de chromosome. On en trouve :

- Les plasmides à bas nombre de copies (1 ou 2 exemplaires par copie de chromosome) : grands plasmides (> 20 Mdaltons) en;
- Les plasmides à haut nombre de copies (plus de 10 exemplaires par copie de chromosome) : il s'agit de petits plasmides (< 10 Mdaltons) ;
- Les plasmides à nombre intermédiaire de copies et à taille intermédiaire.

Les plasmides sont capables de se multiplier lors de la réplication bactérienne. Ils ont aussi la possibilité de se propager horizontalement d'une cellule à l'autre dans une culture, c'est ce qu'on appelé "la conjugaison". En plus, Ils sont capables de s'intégrer dans le chromosome bactérien et de s'en exciser (détacher).

Les plasmides codent généralement pour des fonctions qui ne sont pas vitales pour la bactérie telles que :

- * La résistance aux antibiotiques et aux désinfectants ;
- * La synthèse de facteurs de virulence ;
- * La dégradation de molécules organiques ;
- * Les fermentations ;
- * La synthèse des bactériocines.

Les plasmides qui ne codent pour aucune fonction sont appelés "cryptiques"

NB : Des plasmides non circulaires ont été aussi décrits.

2.1.3. Les prophages

Les phages sont les virus des bactéries, ainsi ces dernières peuvent en garder ADN dit "phagique" et qui s'intègre dans un site particulier du chromosome bactérien (le prophage) par recombinaison. Les phages peuvent porter des gènes codant pour des gènes de virulence (toxines).

NB : Certains prophages peuvent être présents sous forme plasmidique.

2.1.4 Les transposons et les séquences d'insertion ou "gènes sauteurs"

Les transposons (Tn) et séquences d'insertion (IS) sont des fragments linéaires d'ADN bicaténaire qui sont portés sur des chromosomes, des plasmides ou des prophages.

Les transposons peuvent se transmettre horizontalement dans la bactérie du chromosome à un plasmide (ou inversement), d'un plasmide à l'autre ou même d'un endroit du chromosome à un autre (gènes sauteurs).

Les transposons sont porteurs de gènes de résistances aux antibiotiques, des facteurs de virulence, pour des fermentations ... Par contre, les séquences d'insertion ne portent pas de gènes donnant un phénotype à la bactérie.

NB : Des transposons doués de propriétés de conjugaison ont aussi été décrits dans les bactéries Gram+ (Capables de se transmettre horizontalement comme des plasmides).

2.1.5 Les îlots génomiques

Se sont des zones bien définies du chromosome bactérien possédant des propriétés différentes de celles de l'espèce bactérienne porteuse et contenant des informations génétiques d'origine étrangère à celle-ci.

Ils sont classés en :

2.1.5.1 Les îlots de pathogénicité (Pathogenicity Islands ou Pai) : ayant les caractéristiques suivantes :

- Ils comprennent divers gènes codant pour des facteurs de virulence ;
- Sont présents dans certaines souches pathogènes, mais pas dans les souches non pathogènes de la même espèce bactérienne (Souches commensales);
- Leur taille varie entre 10 et 200 kpb ;
- Leur contenu en G+C % est différent de celui de la bactérie hôte (origine étrangère) ;
- Ils sont souvent instables et s'excisent en entraînant la perte des fonctions pour lesquelles ils codent.

2.1.6.2. Les îlots de résistance ou intégrons : Les îlots de résistance, ou intégrons, représentent des fragments d'ADN codant pour des résistances aux antibiotiques et aux antiseptiques. Quatre classes différentes d'intégrons ont été décrites à ce jour, dont les deux premières sont plus fréquentes. Leur site d'intégration peut se trouver sur le chromosome bactérien, un plasmide ou un transposon.

2.2 Les ribosomes

Les ribosomes bactériens sont soit libres dans le cytoplasme, soit attachés à la membrane plasmique. Ils sont impliqués dans la synthèse protéique et sont présents sous forme de polysomes ou polyribosomes. Ils sont plus petits que ceux des cellules eucaryotes (avec une valeur de sédimentation de 70S), mais ils leurs ressemblent dans leur morphologie et leur constitution moléculaire.

2.3 Les inclusions cytoplasmiques

Sont des granules cytoplasmiques transitoires de 0,1 à 0,1 µm de dimension, constituées de substances énergétiques ou métaboliques de réserve (glycogéniques chez *Escherichia coli* et phospholipidiques chez *Mycobacterium spp...*).

Chez certaines espèces bactériennes, ces granules sont un caractère de spécialisation en ayant des propriétés métachromatiques (basophiles à la coloration de Giemsa) ou en étant responsables de la coloration bipolaire de *Pasteurella multocida*. En raison de leur accumulation aux pôles.

2.4 Les membranes bactériennes

La cellule bactérienne est entourée d'une membrane cytoplasmique et d'une paroi de peptidoglycane épaisse chez les bactéries Gram positives et plus mince chez les Gram négatives. La paroi bactérienne assure une structure rigide à la bactérie, lui donne sa forme typique, lui permet de résister à la pression osmotique interne élevée et elle présente aussi un filtre vis à vis du milieu extérieur.

2.4.1 La membrane cytoplasmique

Elle ressemble à celle des cellules eucaryotes et elle est identique pour toutes les eubactéries. C'est une structure dynamique qui se compose d'une double couche (8 nm) de lipides (30 à 40 %) avec

insertion de protéines (60 à 70 %) tournées vers la face interne ou vers la face externe, ou présentes dans toute son épaisseur.

C'est une barrière hydrophobe et osmotique qui englobe différents complexes de la chaîne respiratoire (assurant le transport d'électrons et les phosphorylations oxydatives), ainsi que les enzymes de synthèse du peptidoglycane.

La biogénèse de la membrane plasmique se fait de manière indépendante pour les lipides et les protéines dont l'assemblage est assuré par des mécanismes encore mal compris.

La membrane plasmique des bactéries Gram+ présente, dans certains endroits, des invaginations multi-digitées "les mésosomes" qui se forment suite à la fixation des bactéries et qui interviennent dans les processus enzymatiques et de sécrétion (augmentation de la surface de la membrane : mésosomes latéraux) et dans la synthèse des parois et la séparation des deux copies du chromosome lors de la division cellulaire (mésosomes septaux).

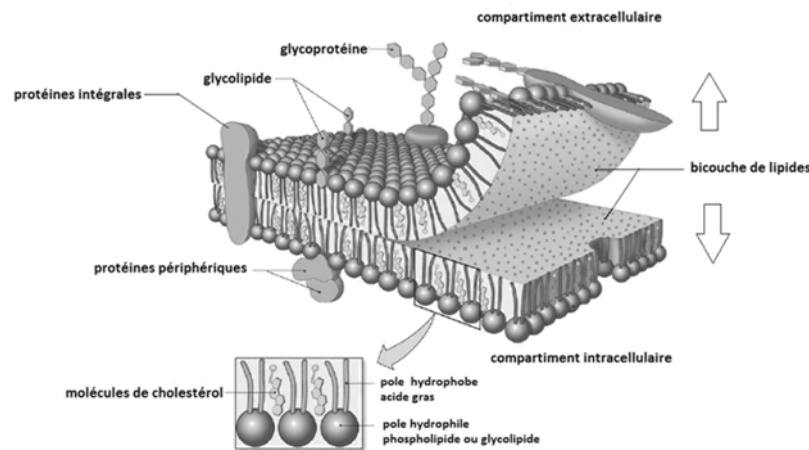


Figure 3: Structure de la membrane plasmique.

2.4.2 La paroi bactérienne

C'est l'enveloppe bactérienne externe à la membrane plasmique et qui donne une forme à la bactérie, la protège des agents extérieurs et qui permet de maintenir d'une pression osmotique intracellulaire trop élevée. Elle a pour constituant principal une substance complexe nommée le peptidoglycane (PDG).

En fonction de la paroi bactérienne, deux groupes se font distinguer :

- Les Gram+ ayant une paroi épaisse (20 à 80 nm) à aspect homogène, composée essentiellement du peptidoglycane associé à certains glucides et à l'acide teichoïque. Le périplasme est délimité par la membrane et la paroi bactériennes. Chez certaines espèces de ce groupe, une couche de protéines ou de polysaccharides recouvre la paroi (Couche S ; glycocalyx ; capsule ; zooglé).
- Les Gram- ont une paroi plus fine et plus complexe. La couche de peptidoglycane est épaisse de 5 nm et est entourée d'une membrane externe ressemblant à la membrane plasmique dans laquelle sont fixés plusieurs antigènes (ex : l'antigène somatique "O"). Le périplasme est délimité par la membrane et la membrane externe. Extérieure à la membrane externe des bactéries Gram- se retrouve une couche protéique ou polysaccharidique (la couche S ; le glycocalyx ; la capsule ; la zooglé).

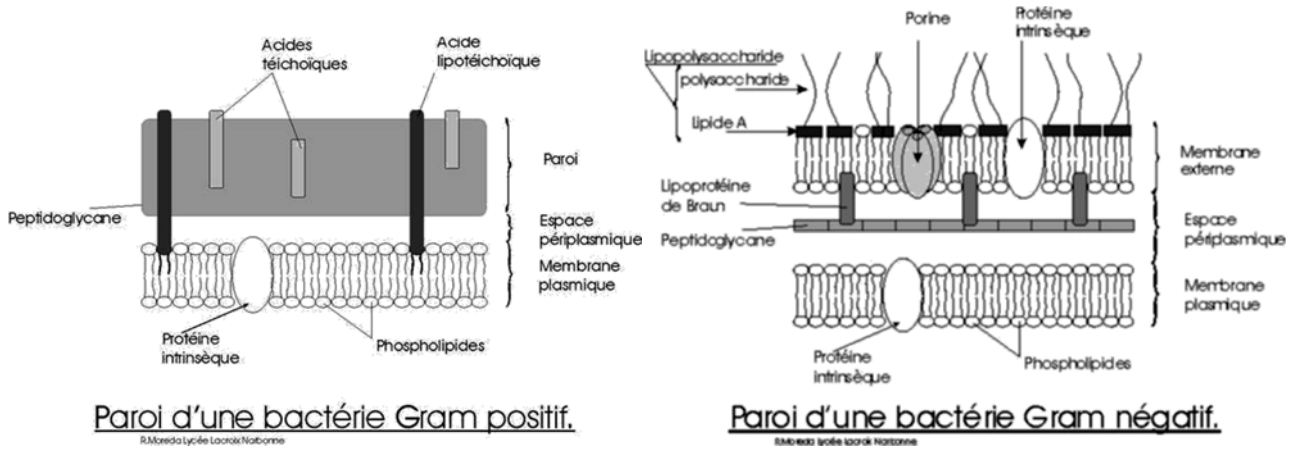


Figure 4 et 5: Parois bactériennes.

Le peptidoglycane (PDG) est un complexe polymère tridimensionnel qui comprend deux sucres aminés et au moins quatre acides aminés différents qui forment ensemble le muropeptide (unité du polymère) dont la composition et la structure diffèrent selon les bactéries. Le PDG des bactéries Gram- est formé de deux à trois plans (niveaux) et celui des bactéries Gram+ d'une dizaine de plans superposés. Les variations en composition chimique et en nature des liens covalents sont plus grandes parmi les bactéries Gram+ que parmi les bactéries Gram-.

Tableau 2 : Caractères distinctifs entre bactéries G+ et G-.

	Bactéries à Gram+	Bactéries à Gram-
Aspect en microscopie électronique	Une couche épaisse et amorphe	Deux couches séparées par un espace clair
Epaisseur de la paroi	20 à 80 nm	10 nm
Présence d'une membrane externe	Non	Oui
Présence d'un espace périplasmique	Non	Oui
Structure de la paroi	Simple	Complexe
Peptidoglycane	40% du poids sec	10% du poids sec
Acides téchoïques	Présents (+++)	Absents (-)
Présence de protéines	Possible : liaisons covalentes avec le peptidoglycane, rôle éventuel dans le pouvoir pathogène, rôle éventuel dans l'antigénicité spécifique.	Fréquente (9%)
Présence de polysaccharides	Possible : antigènes spécifiques de groupe pour certaines espèces	Possible
Lipopolysaccharides	Absents (-)	Présents (13%) (Antigène O)
Osamine : mucopeptide	Présents (++)	(-)
Acides aminés	Présents 24 à 35%	Présents 50%
Acide diaminopimélique	Présents (+++) exclu la lysine	Présents (+) n'exclut pas la lysine
Oses	20 à 60%	20 à 60%
Lipides	1 à 2.5%	10 à 22%
Rétention des colorants	Crystal violet, iode	Safranine
Aspect après coloration de Gram	Bleu, violet	Rose, rouge

2.4.3 L'espace périplasmique

Le périplasme est l'espace compris entre les membranes interne et externe des bactéries Gram négatives. Il contient les protéines (attachées à l'une des membranes ou libres) qui assurent le transport de molécules (ex : nutriments), la biogenèse de l'enveloppe cellulaire ou la détoxification de certaines molécules. S'y trouvent aussi des petites molécules (polysaccharides par exemple) qui aident à équilibrer les changements de pression ionique et osmotique de milieu environnant.

NB : Le périplasme est isotonique avec le cytoplasme.

2.5 Eléments extérieurs à la paroi

2.5.1 La couche S

De quelques nm d'épaisseur, elle est formée d'un ou de deux types de polypeptides, parfois associés à des sucres, arrangés en réseau d'aspect cristallin carré, hexagonal ou oblique. Elle est

résistante aux détergents et aux protéases et elle a des fonctions antiphagocytaires et antibactériophage. Chez Gram+, elle se retrouve à l'extérieur du peptidoglycane, alors que chez les Gram-, elle se retrouve à l'extérieur de la membrane externe.

2.5.2 Le glycocalyx

Le glycocalyx est une couche gélatineuse composée de polysaccharides fibrillaires et entourant la paroi cellulaire. Il permet l'adhésion entre les cellules bactériennes et la formation de microcolonies sur les surfaces (Biofilms).

2.5.3 La capsule

N'existe que chez les bactéries pathogènes (*Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Klebsiella pneumoniae*) et ne se développe que dans l'organisme vivant où elle assure la protection contre la phagocytose. C'est l'un des facteurs de virulence appelé : Antigène capsulaire K ou de Kauffman.

C'est une couche épaisse de glycocalyx ayant un contact direct avec la paroi et donnant aux colonies de certaines bactéries une apparence mucoïdes ou "pleureuses" avec des propriétés antigéniques et de résistances à certains antibiotiques, aux bactériocines et aux phages particulières.

NB : Chez les Gram-, l'antigène K est le deuxième antigène de la sérotypie (ou serotypage : identification sérologique) avec les antigènes de paroi ou de la membrane externe (antigènes somatique O : Ohne Kapsel : sans capsule) (ex : *E. coli* O₁:K₁, O₂:K₁, O₇₈:K₈₀).

2.5.4 La zooglée

C'est une couche plus ou moins volumineuse, glaireuse, constituée d'amas de bactéries englobées dans une énorme couche gélatineuse (formée de leurs glycocalyx). Elle joue un rôle dans certaine pathologie (Infections à *Staphylococcus aureus* chez le cheval) et dans la résistance à certains antibiotiques (par inhibition ou réduction de leur diffusion dans l'amas bactérien).

2.6 Appendices de surface

2.6.1 Les cils ou flagelles

Ce sont des filaments très fins (0,01 µm à 0,05 µm de diamètre), onduleux et de longueur variable (jusque 80 µm), prenant naissance d'un corps basal dans le cytoplasme et composés de protéine "la flagelline" proche de la myosine.

Ils sont mobiles par rotation, comme une hélice, grâce à un mécanisme similaire à un « rotor » fonctionnant grâce à l'énergie fournie par un gradient de protons.

Le mécanisme de rotation s'effectue grâce à un complexe mécanisme impliquant des récepteurs et des kinases situé dans la membrane plasmique et impliquant aussi la paroi. Le flagelle bactérien est constitué de 3 parties : le filament hélicoïdal, le crochet et le corpuscule basal.

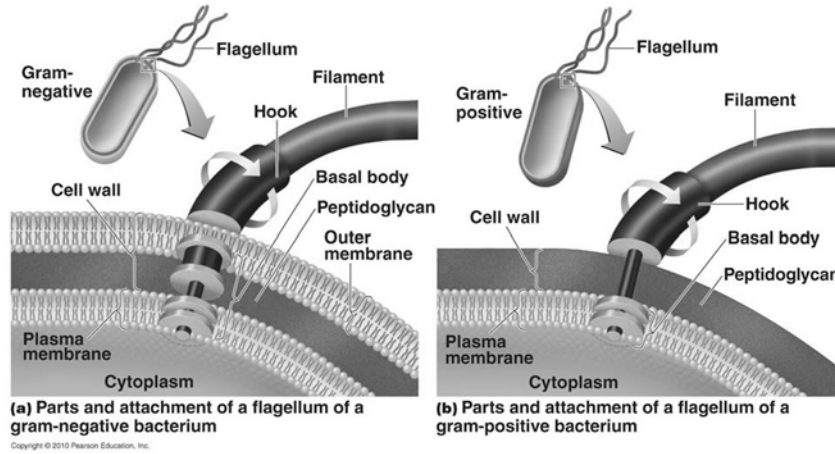


Figure 6 et 7 : Structure et attachement du flagelle chez les bactéries Gram+ et les Gram-.

Les bactéries ciliées, ne possèdent pas le même nombre de cils qui présentent aussi divers arrangements autour de la bactérie :

- Les bactéries monotriches possèdent un cil à une extrémité du bâtonnet (*Pseudomonas aeruginosa*) ;
- Les bactéries amphitriches ou céphalotriches possèdent un cil à chaque extrémité (certains spirochètes) ;
- Les bactéries lophotriches possèdent une touffe de cils à une extrémité ou aux deux (certains spirochètes) ;
- Les bactéries péritriches possèdent beaucoup de cils sur toute leur surface (*Proteus spp.*, *Clostridium tetani*, *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum*) ;
- Les bactéries péritriches dégénérées possèdent peu de cils répartis sur toute leur surface (*B. bronchiseptica*).

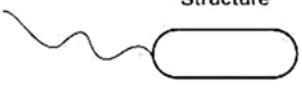



Structure	Flagella Type	Example
	Monotrichous	<i>Vibrio cholerae</i>
	Lophotrichous	<i>Bartonella bacilliformis</i>
	Amphitrichous	<i>Spirillum serpens</i>
	Peritrichous	<i>Escherichia coli</i>

Figure 8 : Classification des bactéries selon le nombre et le mode d'arrangement de leurs flagelles.

Les cils et flagelles sont animés de mouvements hélicoïdaux très rapides et permettent aux bactéries qui en sont pourvues la capacité de se déplacer. Ainsi les bactéries peuvent bouger :

- Très rapidement (*Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*) ;
- Plus lentement (*Campylobacter spp.*, *Bordetella bronchiseptica* surtout) ;
- En ligne droite (*Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*) ;

- En mouvements spiralés (*Campylobacter spp.*, *spirochètes*) ;
- En mouvements enroulés (cumulets de *Bordetella bronchiseptica*).

Selon le sens de rotation du flagelle, la bactérie ne se comporte pas de la même manière :

- Dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (CCW : CounterClockWise), la bactérie avance en tournant légèrement sur elle-même ;
- Dans le sens des aiguilles d'une montre (CW : ClockWise), la bactérie culbute (se renverse) et change alors de direction pour repartir en avant avec les flagelles tournant CCW ;
- Pour les ciliatures péritriches : En mouvement, tous les flagelles sont regroupés à l'arrière du corps bactérien. Pour changer de direction, les flagelles se dispersent autour du corps bactérien et la bactérie culbute.

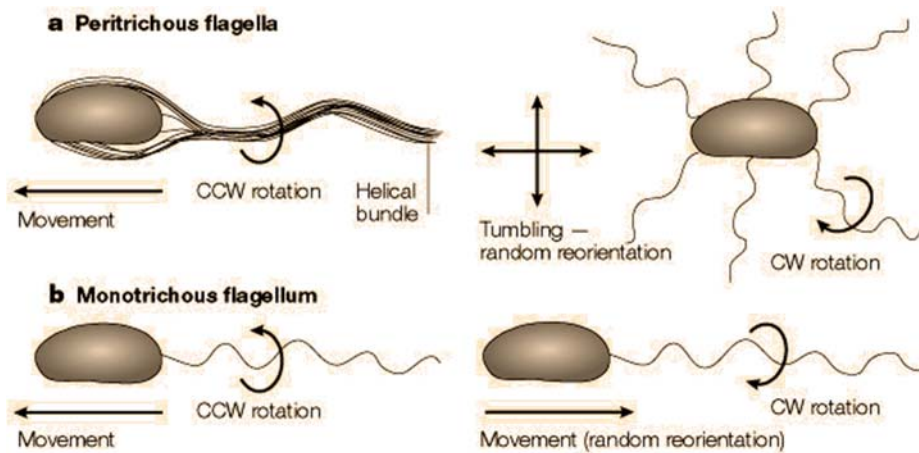


Figure 9 : Sens de rotation des flagelles et mouvements des bactéries.

Les cils s'expriment mieux lors de cultures en milieux liquides que sur milieux solides.

Les cils et les flagelles sont porteurs d'antigènes (antigènes H) qui sont importants dans l'identification sérologique de certaines bactéries ex : *Salmonella enterica* , *Escherichia coli*.

2.6.2 Les pili, fimbriae et fibrillae

Les pili (ou poils) sont des appendices périphériques que seules certaines bactéries en sont pourvues. Ils se répartissent en divers groupes. Le terme pili est réservé aux pili sexuels. Les autres types de pili sont appelés fimbriae s'ils sont rigides, courts et épais (6-7 nm de diamètre) ou fibrillae s'ils sont longs, flexibles et fins (2-3 nm de diamètre).

Les bactéries qui possèdent les pili sexuels sont dites bactéries mâles. Grâce à ces pili, le plasmide peut passer de la bactérie donneuse à la bactérie réceptrice.

Les fimbriae épais et creux (5-7 nm de diamètre) et les fibrillae fins et pleins (2-3 nm de diamètre) permettent aux bactéries de s'accrocher aux cellules. Ils se comportent comme des facteurs de virulence et sont antigéniques. Ils sont de nature protéique et sont importants dans l'identification des souches pathogènes.

2.6.3 Les spores (spore : semence en grec)

Certaines bactéries Gram+ des genres *Bacillus* et *Clostridium* sont capables de développer une forme de résistance particulière en conditions défavorables : la spore, appelée aussi endospore.

Les spores sont des formes dormantes, sans métabolisme actif, qui se transforment à nouveau en forme végétative (germination) lorsque les conditions redeviendront favorables. Ces spores sont extrêmement résistantes à la chaleur, à la dessiccation et aux antiseptiques, et totalement résistantes aux antibiotiques. Elles peuvent survivre pendant plusieurs décennies dans le milieu extérieur. Une endospore est formée par cellule bactérienne et elle inclut une copie du matériel génétique et son degré de résistance est variable selon l'espèce et la souche bactérienne.

Les spores sont classées selon leur position (spore centrale, sub-terminale, terminale) et leur diamètre par rapport à la forme végétative (spore déformante ou non).

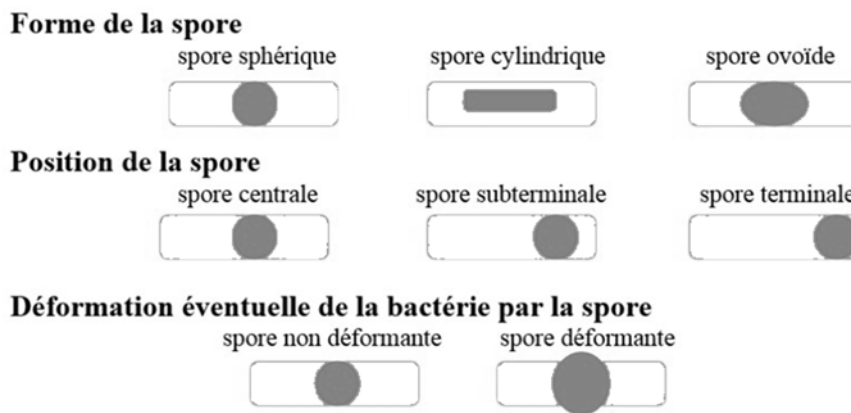


Figure 10 : Forme, position et taille de la spore.

La spore est composée d'un cytoplasme et d'une paroi. À l'intérieur se trouve la membrane cytoplasmique d'origine, recouverte par le cortex, le manteau et l'exospore respectivement. Elle renferme les éléments nécessaires à la germination : une copie du chromosome, la machinerie de synthèse des protéines et des ribo-nucléosides triphosphates pour la synthèse des ARN, mais elle est dépourvue d'ARN messenger et d'acides aminés.

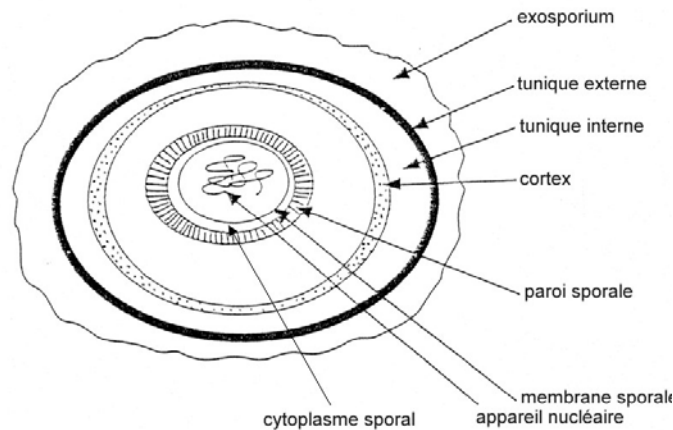


Figure 11 : Structure d'une endospore bactérienne.

La résistance des spores aux antibiotiques est la même puisqu'elles sont dépourvues de métabolisme actif. Cependant Leur résistance aux moyens physiques et chimiques de désinfection et de stérilisations n'est pas la même pour toutes les bactéries sporogènes :

- Toutes les spores résistent à un chauffage à 80 °C pendant 10 minutes ;
- 5 minutes à 100 °C sont nécessaires pour la destruction des spores de *C. Perfringens* ;
- 10 minutes à 100 °C pour celles de *Bacillus anthracis* ;
- 4 heures à 100 °C pour celles de *C. Botulinum* ;
- Aucune spore ne résiste à un chauffage à 121 °C pendant une heure.
- Seuls certains antiseptiques (iodophores) sont actifs sur les spores ; mais avec un temps de contact prolongé et des concentrations élevées.

Certaines bactéries synthétisent au début de la phase de sporulation:

- Des antibiotiques : *Bacillus licheniformis* synthétise la bacitracine ; *Bacillus polymyxa* la polymyxine ;
- Des toxines (entérotoxine de *Clostridium perfringens*) ;
- Des substances à activité biopesticide (toxines qui tue des insectes)ex : *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus*.

La sporulation est provoquée par l'épuisement du milieu en substrat nutritif et elle peut nécessiter des conditions particulières : absence d'oxygène pour les *Clostridium*, ou à l'inverse présence d'oxygène pour *B. anthracis*. Le processus de sporulation débute à la fin de la phase exponentielle et se déroule en 6 étapes :

- Stade I formation du filament axial : la division nucléaire n'étant pas suivie d'une division cellulaire, les deux génomes fusionnent donnant un filament chromatique axial ;
- Stade II : les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales. Ce septum va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une préspore caractéristique ;
- Stade III : Englobement de la préspore ;
- Stade IV : entre les deux membranes limitant la préspore se forme la paroi sporale puis apparaît rapidement le cortex ;
- Stades V et VI : apparition des tuniques et après maturation ;
- Stade VII : la cellule végétative se lyse et libère la spore.

Pour que la spore germe, les conditions doivent redevenir favorables (eau, nutriments, pH, force ionique, température et absence d'agent antimicrobien. On distingue 3 stades dans le processus de germination :

- L'activation : correspond à une lésion des enveloppes sporales par des agents physiques (choc thermique) ou chimiques (acides, lysozyme) ou mécaniques (abrasion, choc).
- L'initiation : débute en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites effecteurs (alanine, magnésium, adénosine) qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées. Des enzymes

hydrolytiques dégradent les constituants de la spore. Le cortex ainsi détruit et la spore s'imbibe d'eau et gonfle.

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

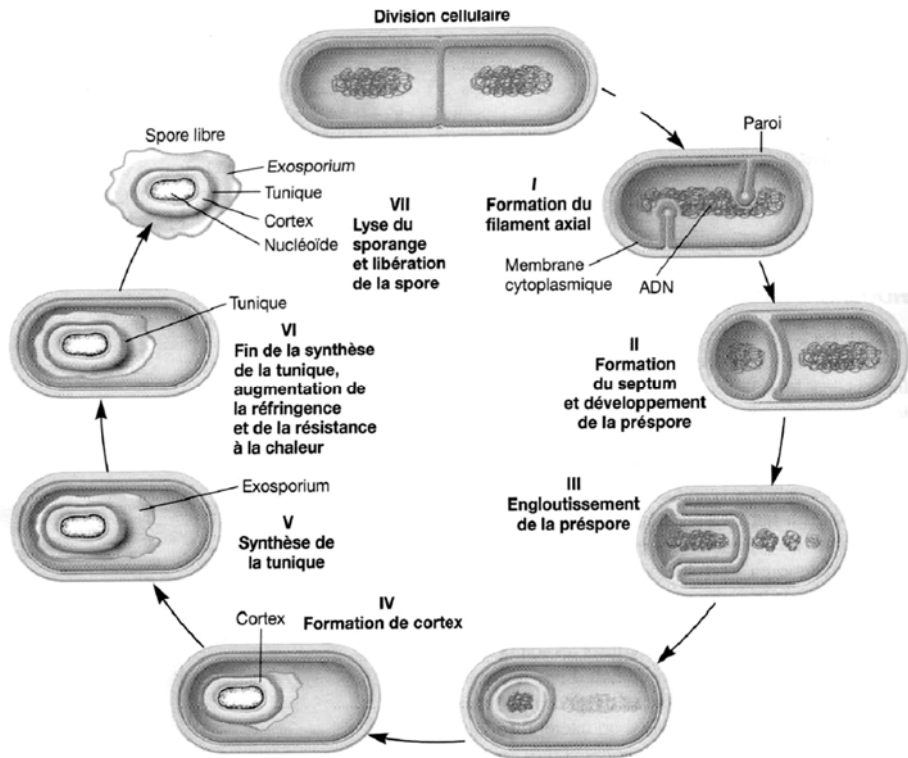


Figure 12 : Processus de sporulation et de germination.

Chapitre 3 : Le métabolisme bactérien

Le métabolisme bactérien est l'ensemble des réactions cataboliques (dégradation des éléments nutritifs du milieu avec transfert et stockage de l'énergie "ATP" résultante) fournissant aux bactéries les éléments nécessaires à la réalisation de leurs réactions anaboliques (pour la synthèse de leurs propres constituants) pour se diviser ou juste rester en vie.

Le métabolisme peut être intense et se traduit par une augmentation de la taille, mais surtout du nombre des cellules (division bactérienne très active). Cet état est dit végétatif. Dans certaines conditions, le métabolisme se ralentit et c'est l'état de repos (pas de division). Dans les deux états, la bactérie a des besoins nutritifs (pour se diviser ou juste se maintenir en vie). Selon la nature de ces besoins, on peut identifier :

- Des bactéries **prototrophes** : Ayant des besoins élémentaires : Eau, source d'énergie, source de carbone et d'azote, macro et micronutriments. Elles sont capables de synthétiser tous les constituants sans apport extérieur en "facteurs de croissance" ;

- Et des bactéries **auxotrophes** : En plus des besoins élémentaires, elles nécessitent des "facteurs de croissance" qui varient selon les espèces bactériennes (ex : acides aminés, bases puriques ou pyrimidiques, vitamines). Ces facteurs de croissance sont actifs à concentration infime (très basses) et sont étroitement spécifiques. Ex : *E. coli* est une bactérie prototrophe : n'exigeant aucun facteur de croissance, elle se multiplie sur milieu minimum. *Haemophilus influenzae* est une bactérie auxotrophe. Elle ne peut pousser en un milieu minimum car elle n'a pas les enzymes nécessaires à la synthèse du facteur V (Coenzyme I et II) et du facteur X (Hémine) qu'il faudra donc lui fournir dans le milieu de culture.

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

3.1 Nutrition bactérienne

C'est l'assimilation par la bactérie des divers éléments chimiques se trouvant dans son environnement. Ainsi, la capacité de la bactérie à utiliser un nutriment dépend de l'existence d'un processus d'entrée de ce nutriment (perméases) et d'un système enzymatique adéquat pour sa dégradation.

3.1.1 Sources d'énergie

A. Nature de la source d'énergie

On distingue :

- Les bactéries chimiotrophes qui tirent leurs énergies des réactions chimiques d'oxydoréduction :

* Si les composés donateurs d'électrons sont inorganiques (ex : H₂S, H₂, Fe ou NH₃ : *Nitromonas spp.*), les bactéries sont dites chimiolithotrophes;

* Si les donateurs d'électrons sont organiques, elles sont dites chimioorganotrophes.

La réaction type peut être résumée comme suit : $DH_2 + A \rightleftharpoons D + AH_2 + \text{énergie}$ (D = donneur électrons ; A= accepteur d'électrons).

- Les bactéries **phototrophes**: peuvent capter et utiliser l'énergie lumineuse au niveau de complexes multimoléculaires "photosystèmes".

Un photosystème est composé d'une "antenne collectrice", qui transmet l'énergie lumineuse à une **bactériochlorophylle** (capable d'expulser un électron après absorption d'un photon) et un "centre réactionnel" (ATP synthétase) permettant la formation d'ATP.

* Si la source d'électrons est minérale, les bactéries sont dites **photolithotrophes** ;

* Si la source d'électrons est organique, les bactéries sont dites **photoorganotrophes**.

La grande majorité des bactéries d'intérêt médical sont chimioorganotrophes. *Rickettsia spp* et *Chlamydia spp* sont incapables de produire, elles-mêmes, leur énergie et doivent profiter de celle produite par la cellule-hôte (Ce sont des bactérie intracellulaires obligatoires). Elles sont dites **paratrophes**.

B. Accepteur final d'électrons et types respiratoires

Traditionnellement :

- Lorsque les électrons passent par une chaîne de transporteurs (Chaîne respiratoire) et leur accepteur final est **l'oxygène moléculaire (O₂)**, on parle de **respiration aérobie** ;

- Lorsqu'ils passent par la chaîne respiratoire et leur accepteur final est une **autre substance inorganique oxygénée** (mais autre que l'oxygène : NO₃, SO₄-...) ou organique (Fumarate), on parle de **respiration anaérobie** ;

- Et quand leur accepteur est **un composé organique, mais ils ne passent pas par la chaîne respiratoire**, on parle de **fermentation**.

Tableau 3: Quelques exemples d'accepteurs d'électrons chez quelques microorganismes

Electron acceptor: Accepteur d'électron; *Reduced product:* Composé réduit.

	Electron Acceptor	Reduced Products	Examples of Microorganisms
Aerobic	O ₂	H ₂ O	All aerobic bacteria, fungi, protozoa, and algae
Anaerobic	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Enteric bacteria
	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻ , N ₂ O, N ₂	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , and <i>Paracoccus</i>
	SO ₄ ²⁻	H ₂ S	<i>Desulfovibrio</i> and <i>Desulfotomaculum</i>
	CO ₂	CH ₄	All methanogens
	S ⁰	H ₂ S	<i>Desulfuromonas</i> and <i>Thermoproteus</i>
	Fe ³⁺	Fe ²⁺	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , and <i>Geobacter</i>
	HAsO ₄ ²⁻	HAsO ₂	<i>Bacillus</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Sulfurospirillum</i>
SeO ₄ ²⁻	Se, HSeO ₃ ⁻	<i>Aeromonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Thauera</i>	
Fumarate	Succinate	<i>Wolinella</i>	

Les phototrophes ont (presque toujours) le NADP⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) comme accepteur final d'électrons. Chez les chimiotrophes, l'oxydation du donneur d'électrons produit du NADH + H⁺ (forme réduite du coenzyme NAD⁺), qui doit être ré-oxydé :

- Directement par réduction **d'un oxydant organique** (= accepteur d'électrons) : c'est une **fermentation** qui permet la ré-oxydation du NADH + H⁺ ainsi que la production d'ATP par "**phosphorylation au niveau du substrat**". Au cours de la fermentation, le substrat (élément nutritif) est métabolisé **sans l'intervention d'un agent oxydant externe**.

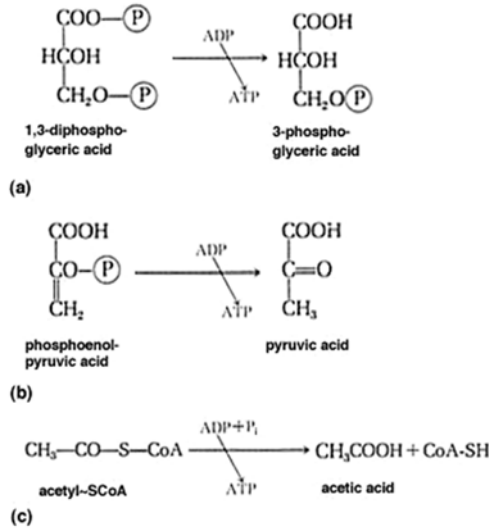


Figure 13: Exemples de réactions de phosphorylation au niveau du substrat rencontrées chez les bactéries.

- Ou indirectement par l'intermédiaire d'une **chaîne respiratoire**: c'est une **respiration** qui permet la ré-oxydation du NADH + H⁺ ainsi que la production d'ATP par "**phosphorylation oxydative**". Le substrat (élément nutritif) est donc métabolisé **avec l'intervention d'un agent oxydant externe** (l'oxygène ou d'autres agents organiques ou inorganiques qui remplacent l'oxygène).

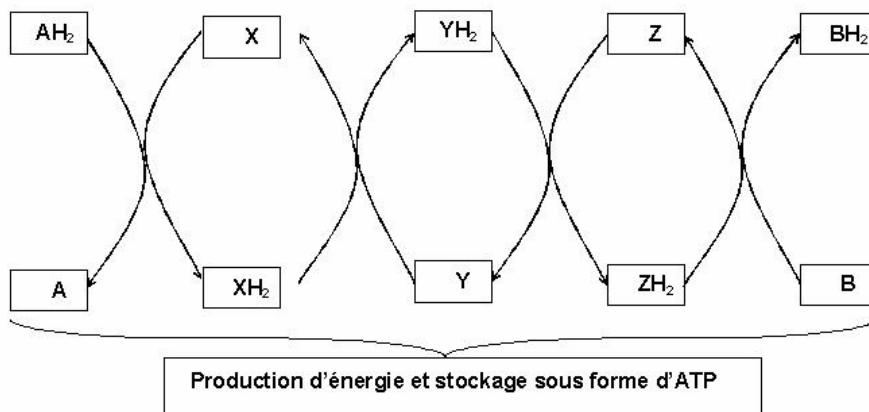


Figure 14: Représentation schématique de la chaîne respiratoire chez les bactéries.

AH₂ : Donneur d'électrons (substrat énergétique). A : Donneur oxydé. B : Accepteur final d'électrons. Les transporteurs intermédiaires (X, Y et Z) peuvent être des coenzymes tels que NAD, FAD, FMN ou des cytochromes.

B1. Respirations aérobie et anaérobie

La **phosphorylation oxydative** est le processus permettant la synthèse d'ATP à partir de l'énergie libérée lors du transfert des électrons des transporteurs membranaires aux potentiel d'oxydoréduction le plus négatif vers ceux dont le potentiel est plus positif.

Les bactéries **aérobies strictes** ne peuvent ré-oxyder le $\text{NADH} + \text{H}^+$ que par une chaîne respiratoire (ou chaîne de transporteurs) **ayant pour accepteur final d'électrons le dioxygène O_2** (Ex : *Micrococcus*, *Pseudomonas*). Ces bactéries poussent en surface de la gélose viande-foie VF.

Les bactéries **aéro-anaérobies facultatives** peuvent en l'absence de dioxygène utiliser une voie énergétique fermentative pour produire de l'ATP (ex : *Escherichia coli* qui cultive sur toute la hauteur de la gélose VF).

Les **micro-aérophiles** ne peuvent vivre que sous une faible pression en O_2 (ex. : *Campylobacter*).

Quand l'accepteur final d'électron n'est pas le dioxygène on parle de **respiration anaérobie**. Les électrons sont comme dans la respiration aérobie transférés au sein d'une chaîne de transporteurs mais l'accepteur final est une **molécule minérale** autre que l' O_2 (ex : NO_3^- (nitrate) pour les bactéries dénitrifiantes comme *Alcaligenes* ou *Acinetobacter*, SO_4^{2-} (sulfate) pour les bactéries sulfito-réductrices comme *Desulfovibrio desulfuricans* qui produit de l' H_2S) ou bien encore l'accepteur final est une **molécule organique** (ex : le fumarate pour *Vibrio succinogenes*).

Chez certaines bactéries à respiration anaérobie (et les bactéries anaérobies strictes), le dioxygène est inutile et même souvent toxique. En effet le dioxygène peut par réaction chimique produire des ions superoxydes (O_2^-), des radicaux hydroxyles (HO^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peuvent oxyder des lipides et des protéines de la cellule bactérienne. Ces bactéries n'ont pas d'enzymes de protection telles que la catalase, superoxyde dismutase ou la peroxydase.

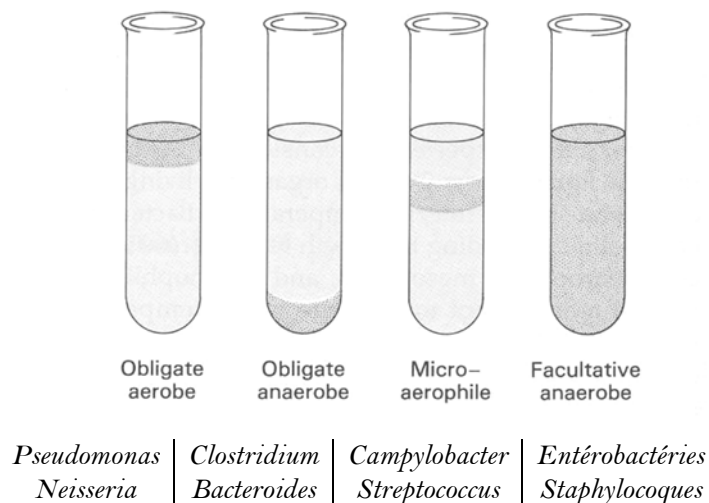


Figure 15: Exigences gazeuses chez les bactéries.

B2. La fermentation

Cette partie du métabolisme énergétique est très complexe car les voies métaboliques et les réactions biochimiques sont très nombreuses et variées. Dans le cas d'une fermentation **l'accepteur**

final d'électron est une molécule organique et le transfert des électrons à partir du substrat énergétique (donneur d'électrons) se fait dans le cytoplasme (sans passer par une chaîne de transporteurs membranaires), par simple couplage entre la réaction initiale d'oxydation et une réaction de phosphorylation : "phosphorylation au niveau du substrat". La fermentation conduit à l'accumulation de molécules organiques réduites (acides, alcools ...). Cette voie est utilisée par :

- Les bactéries aéro-anaérobies facultatives, qui utilisent préférentiellement la respiration quand elle est possible ;
- Les bactéries anaérobies strictes (ex : *Clostridium spp*).

Tableau 4: Types respiratoires chez les bactéries.

Groupes physiologiques de croissance	Besoin en O ₂	Croissance en aérobie	Croissance en anaérobie	Métabolisme respiratoire
Aérobie strict	Impératif	+	-	Respiration aérobie
Micro-aérophile	Impératif	+	-	Respiration aérobie
Aéro-anaérobie facultatif	Facultatif	+	+	Respiration aérobie Respiration anaérobie* Fermentation
Anaérobie strict	Nul	-	+	Respiration anaérobie* Fermentation
Anaérobie facultatif aérotolérant	Nul	+	+	Respiration anaérobie* Fermentation

* : Absente ou présente

Le rendement énergétique des fermentations est inférieur à ceux des respirations :

Respiration aérobie > respirations anaérobies > fermentations

Différents types de fermentations existent chez les bactéries :

- Fermentation homolactique : C'est le cas le plus simple : le pyruvate sert d'accepteur d'électrons et d'hydrogène pour la réoxydation du NADH. Il s'agit de la principale fermentation permettant la transformation du lait en yaourt ou en fromage frais. Elle est présente chez de nombreuses espèces de streptocoques et de *Lactobacillus* ;
- Fermentation hétérolactique : Caractéristique de certains *Lactobacillus* et *Leuconostoc* avec production de l'acide lactique, de l'éthanol et du CO₂ ;
- Fermentation « acides mixtes » : Elle se caractérise par la diversité des produits de fermentation (éthanol, acide acétique, acide lactique, acide succinique, CO₂, H₂). Elle est pratiquée par les entérobactéries dites «VP -».
- Fermentation butanediolique : Chez les bactéries dites «VP +» (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* chez les entérobactéries), une grande partie du pyruvate est transformée en **acétoïne**, qui sert d'accepteur d'électrons et d'hydrogène. Le produit final de cette voie est le butanediol.
- Fermentations des bactéries anaérobies : Chez les *Clostridium*, les voies de fermentation sont multiples et conduisent à la formation d'acides organiques, d'alcools, de cétones... Les composés les plus fréquemment produits sont l'acide butyrique (butanoïque), le butanol et l'acétone. Chez *Propionibacterium*, la fermentation conduit à la formation d'acide propanoïque.

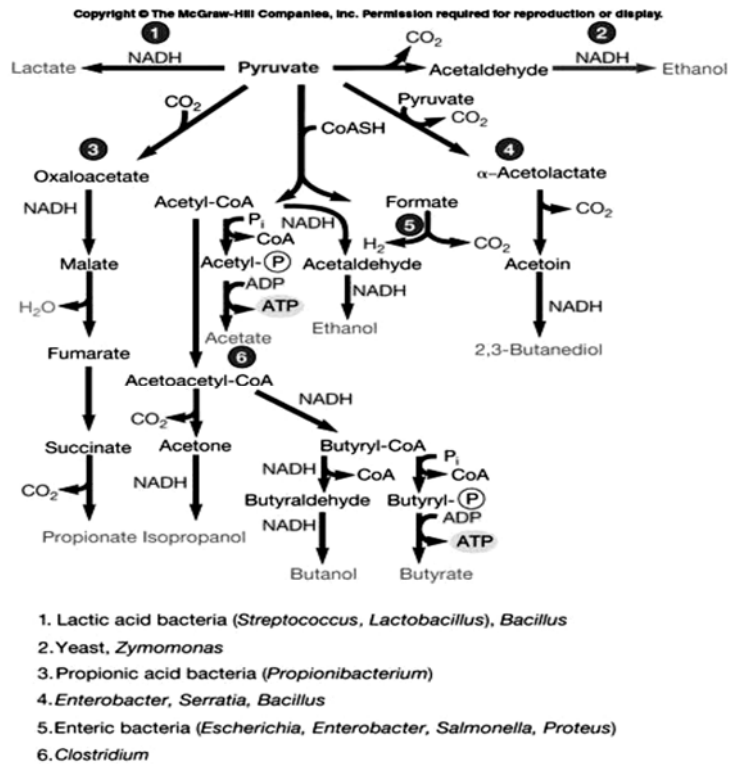


Figure 16: Quelques fermentations microbiennes courantes.

3.1.2 Sources de carbone

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

- Si la source est le dioxyde de carbone (CO₂) les bactéries sont dites **autotrophes**, c'est le cas des bactéries phototrophes et la plupart des bactéries chimolithotrophes.

- Si la source de carbone assimilable est un substrat (substance) organique, les bactéries sont appelées **hétérotrophes** et qui peuvent dégrader de nombreuses substances hydrocarbonées : Dans l'ordre, sucres simples, disaccharides, alcools polyvalents, acides organiques aliphatiques (n'est pas aromatique). L'utilisation de polysaccharides exige des exo-enzymes spécifiques. Les triglycérides, acides organiques aromatiques, alcools monovalents et hydrocarbures sont rarement utilisés comme source de carbone (sauf par certaines bactéries spécialisées).

Les bactéries photo-autotrophes sont photosynthétiques (Ex : cyanobactéries, bactéries vertes, bactéries pourpres non sulfureuses). Leur photosynthèse est différente de celle des végétaux supérieurs (Les pigments et les donneurs d'électrons sont l'hydrogène, le soufre, et jamais l'eau comme chez les plantes et également sans production d'oxygène libre).

Les photohétérotrophes sont photosynthétiques et puisent le carbone de composés organiques.

Les chimioautotrophes, n'ont pas besoin de matière organique et de lumière du soleil. Elles puisent leur énergie de substance inorganique et transforme le CO₂ en matière organique (Ex : les bactéries des sources hydrothermales profondes et les bactéries "Archeae" méthanogènes qui synthétisent le méthane CH₄ à partir du CO₂).

Les chimiohétérotrophes tirent leur énergie et leur carbone des substances organiques. C'est le cas de la majorité des bactéries pathogènes.

3.1.3 Sources d'azote

L'azote représente 12% du poids sec des bactéries qui en ont besoin pour la synthèse de leurs protéines et acides nucléiques. L'azote est assimilé, par les bactéries, sous forme ammoniacale.

Les bactéries autotrophes et beaucoup de bactéries hétérotrophes (pour l'énergie et le carbone) utilisent une source inorganique d'azote (N₂, nitrates, nitrites, sels inorganiques d'azote : phosphates, carbonates, sulfates) : C'est le cas de *Rhizobium spp.*, *Azotobacter spp.*, *Clostridium spp.* telluriques.

D'autres bactéries utilisent une source organique d'azote (sous forme NH₃), provenant de la désamination des protéines (par des protéases externes : putréfaction) ou des acides aminés libres. Ces bactéries ont besoin de milieux enrichis pour pousser (Ex avec du sang). Ceci est plus fréquent chez les Gram+ que les Gram-.

Il n'y a que certaines bactéries spécialisées qui sont capables d'utiliser l'urée, comme source d'azote.

3.1.4 Macronutriments

Les bactéries ont besoin de P, S, Mg, Ca et Na.

- Le phosphore P est impliqué dans la synthèse des acides nucléiques et phospholipides des membranes plasmiques et externes, ainsi que l'ATP (Energie). Il est apporté sous forme de phosphate organique et inorganique ;
- Le soufre S retrouvé au niveau de deux acides aminés (la méthionine et la cystéine), intervient dans les structures complexes des protéines (ponts disulfure) et la synthèse des vitamines (Biotine, coenzyme A). Le soufre cellulaire est d'origine inorganique (sulfate SO₄, sulfure métallique FeS, CuS, ZnS) ;
- Le potassium K joue le rôle de cofacteur enzymatique et de stabilisateur de structures cellulaires ;
- Le calcium Ca joue un rôle important dans la résistance à la chaleur des endospores chez *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.* Il stabilise aussi la paroi des bactéries ;
- Le sodium Na est important pour la croissance des bactéries halophiles (halos : sel ; philein : aimer) ;
- Le Fer Fe intervient dans la chaîne respiratoire des bactéries aérobies (cytochromes de la membrane plasmique). Les bactéries possèdent des sidérophores capables de capturer le fer insoluble et le transporter à l'intérieur des cellules bactériennes.

3.1.5 Les oligoéléments

Sont indispensables à la bactérie en très faibles quantités : cobalt, zinc, bore, cuivre, manganèse, le sélénium, etc....Ils sont importants pour le fonctionnement enzymatique, mais ne sont pas tous nécessaires pour une même espèce bactérienne.

Tableau 5 : Les différents types trophiques (nutritionnels) bactériens

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

	Nécessaires	Auxotrophe
--	-------------	------------

3.1.6 L'eau

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

La disponibilité de l'eau libre (non associée aux nutriments) est appelée activity of water A_w , ou activité de l'eau) et elle est quantifiée de 0 à 1.

L'activité de l'eau est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau :

- Présence de sels : Les bactéries halophiles nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles jusque 15-30% pour les bactéries halophiles extrêmes (Halobacterium). Les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : *Staphylococcus aureus*).
- Présence de sucres : Les bactéries osmophiles nécessitent des sucres pour leur croissance. Celles osmotolérantes acceptent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance.

Enfin les bactéries xérophiles résistent à la dessiccation et poussent dans les conditions arides (c'est-à-dire peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement).

En réponse à une A_w faible (solution fortement osmotique avec une proportion importante de soluté par rapport au solvant), les bactéries réagissent en ralentissant leur croissance (baisse de l'activité enzymatique). En revanche, certaines espèces peuvent s'adapter, tels *Micrococcus spp*, *Sarcina spp* ou *Staphylococcus spp*.

3.1.6 Facteurs de croissance

Les bactéries auxotrophes nécessitent un ou plusieurs facteurs de croissance qu'elles sont incapables de synthétiser. Ces derniers sont fournis par l'environnement ou rajouter dans le milieu de culture.

Les facteurs de croissance peuvent être des vitamines B1, B6, B12, acide folique, des précurseurs de coenzymes (de NAD, de coenzyme A, de FMN, de FAD). La syntrophie est un phénomène d'interaction métabolique, qui se traduit sur un milieu solide par la présence de colonies satellites d'une bactérie auxotrophe autour de celles d'une bactérie prototrophe productrice du facteur de croissance (phénomène de satellitisme).

D'autres relations peuvent exister entre les micro-organismes.

Tableau 6: Types d'interactions entre deux micro-organismes A et B.

Relation	Germe A	Germe B	Nature
Prédation	+	-	B détruit A pour se développer
Parasitisme	+	-	B se développe au détriment de A sans le détruire
Compétition	-	-	A et B s'inhibent par limitation de substrats
Amensalisme	0	-	B nuit à A sans être influencé d'aucune manière
Neutralisme	0	0	A et B évoluent indépendamment
Syntrophie ou commensalisme	0	+	B est bénéfique à A, sans être influencé
Synergie ou proto-coopération	+	+	A et B profitent l'un de l'autre, sans obligation
Symbiose ou mutualisme	+	+	A et B ont besoin obligatoirement l'un de l'autre

0 : neutre ; + : bénéfique ; - : néfaste

Nota bene : Il faut bien distinguer entre facteur de croissance et métabolite essentiel qui est une substance organique indispensable à la vie et la multiplication d'une bactérie et qui fait partie des composés fonctionnels assurant le déroulement et le maintien des activités cellulaires vitales. Il n'est pas utilisé (catabolisé) comme source d'énergie par la bactérie.

3.2 Recherche de nourriture et absorption des nutriments

Les bactéries doivent être capables de détecter et localiser les nutriments souvent en faible quantité dans leur environnement. Elles doivent se diriger vers eux (par tactisme), et doivent transporter ces nutriments dans le cytoplasme bactérien.

3.2.1 Mobilité et tactisme

Les bactéries se déplacent vers les endroits les plus favorables, et s'éloignent des milieux hostiles. Pendant leur mouvement, elles vont mesurer des paramètres environnementaux comme la concentration, ainsi, elle se dirige vers les endroits concentrés en sucres par exemple, par **chimiotactisme**. D'autres mesurent la concentration en O₂, **aérotactisme**, ou encore mesure la quantité de lumière, c'est le **phototactisme**, la température (**thermotactisme**) et la pression osmotique (**l'osmotactisme**).

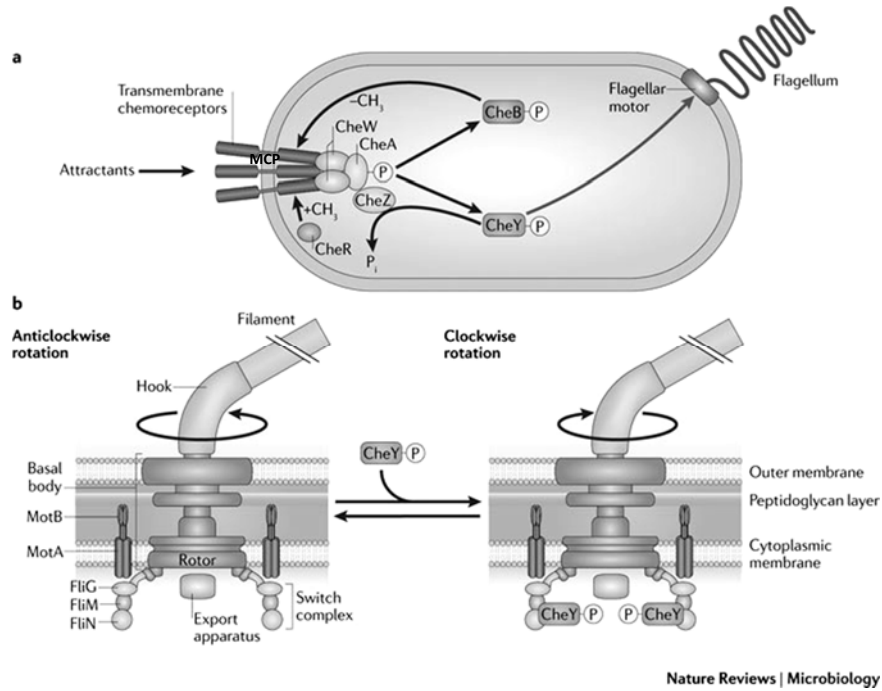


Figure 17: Mécanisme de chimiotactisme chez *E. coli*.

Les bactéries mobiles sont dotées de tactisme et se déplacent en mesurant en permanence différents paramètres, jusqu'à trouver un milieu favorable à leur développement.

Les substances attractives ou répulsives sont détectées grâce à des **chimiorécepteurs**, protéines spéciales qui se lient aux substances chimiques et transmettent les signaux. Ces récepteurs sont localisés dans l'espace périplasmique ou dans la membrane cytoplasmique. Au niveau cellulaire, à la surface des bactéries, il existe des protéines réceptrices, ce sont les protéines du chimiotactisme. Le mécanisme du chimiotactisme est complexe. Il implique au niveau des protéines, des changements de conformation, la méthylation et la phosphorylation.

La protéine la plus fréquente est la MCP (Méthyl accepting Chemotaxis Protein). Ces protéines seront plus ou moins méthylées en réponse à des changements de concentration du milieu. Plus la protéine est méthylée, plus la durée de déplacement sera longue.

3.2.2 Transport des nutriments dans la cellule

L'absorption des nutriments doit être sélective (c'est-à-dire que seules les substances nécessaires doivent être absorbées) et elle se fait contre le gradient de concentration.

A cause d'énorme variété de nutriments et de la complexité de l'absorption, les bactéries utilisent plusieurs mécanismes de transport différents. Les plus importants sont la diffusion facilitée, le transport actif et la translocation de groupe.

Les nutriments doivent traverser la paroi, et la membrane cytoplasmique. La paroi bactérienne, composé de peptidoglycane, se laisse traverser facilement par les nutriments via des ponts (chez les Gram +, pas de problème, chez les Gram -, la couche de LPS permet le transfert facile par des porines), alors que la membrane plasmique est une barrière sélective.

- La diffusion simple : Elle permet aux éléments simples de traverser la membrane plasmique suivant le gradient de concentration. Cette diffusion ne nécessite pas d'énergie, ni de protéine de transport. Ce moyen de transport est très peu utilisé chez les bactéries, seul les gaz passent passivement.

- La diffusion facilitée : L'absorption se fait dans le sens du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie, mais nécessite des protéines de transports transmembranaires (perméases). La vitesse de diffusion est ainsi fortement augmentée grâce à ces protéines. Quelques substances comme le glycérol peuvent être transportées de cette façon par les bactéries.

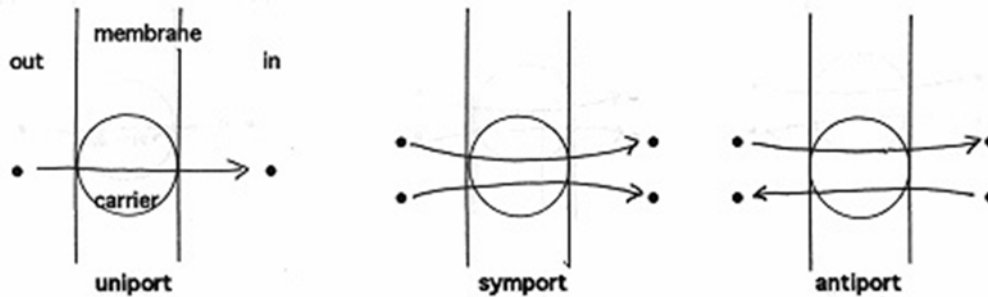


Figure 18: Perméases uniport, symport et antiport chez les bactéries.

- Le transport actif : Se fait contre le gradient de concentration (quand la concentration en soluté à l'intérieur est plus élevée), nécessite de l'énergie métabolique, et à recours à des protéines de transport. Ce transport est très utilisé pour l'absorption des sucres et acides aminés (ex : lactose absorbé ainsi par *E. coli*). Les protéines impliquées sont des protéines transmembranaires et des protéines spéciales de liaison localisées entre la membrane plasmique et la paroi bactérienne (lipoprotéines de Braun).

Dans la nature les bactéries possèdent plusieurs systèmes de transport pour un seul nutriment. (Ex : *E. coli* possède 5 systèmes différents de transport du galactose). Ces systèmes de transport diffèrent par les différentes protéines impliquées, et par la source d'énergie. Cette diversité de transport confère aux bactéries un avantage si l'environnement change.

- Le translocation de groupe : Les nutriments sont directement assimilés par les bactéries quand ils sont sous forme simple, par contre, ils sont souvent transformés avant absorption quand ils sont sous forme complexe. Des enzymes extracellulaires interviennent pour faciliter l'absorption, on parle de transport par translocation de groupe. Il s'agit d'un type de transport dépendant de l'énergie car il utilise l'énergie du métabolisme.

Exemple : De nombreux sucres complexes sont transformés avant absorption, le système de translocation impliqués est le système phosphotransférase (PTS), cet enzyme phosphoryle le sucre pour faciliter son transport.

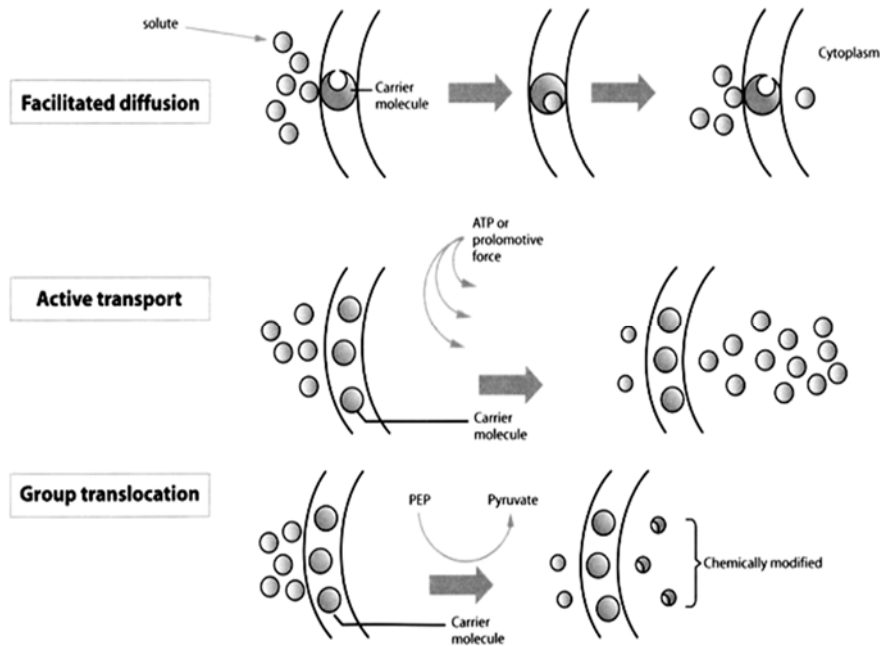


Figure 19: Différents types de transport des substrats chez les bactéries.

3.3 Les conditions physico-chimiques de la croissance

Les facteurs environnementaux (température, pH, salinité, osmolarité, pression mécanique ou hydrostatique, son et oxygène) influencent et contrôlent la croissance bactérienne. Chaque bactérie possède des valeurs optimales pour chaque facteur ; ainsi selon les valeurs optimales, les bactéries peuvent être classées en différentes catégories.

3.3.1 La température

La température est importante car les bactéries sont poïkilothermes. Cette thermo-sensibilité va influencer de façon importante le métabolisme des bactéries car la température intervient dans la catalyse de nombreuses enzymes. Pour chaque bactérie il existe 3 températures importantes “les températures cardinales” :

- * Température minimale : Température en dessous de laquelle la croissance bactérienne est stoppée ;
- * Température maximale : Température au dessus de laquelle la croissance bactérienne est stoppée ;
- * Température optimale : Température pour laquelle la bactérie croît à une vitesse maximale.

La température optimale est toujours plus près de la température maximale que de la minimale. Ces températures cardinales seront plus ou moins proches (ou éloignées) selon l'espèce :

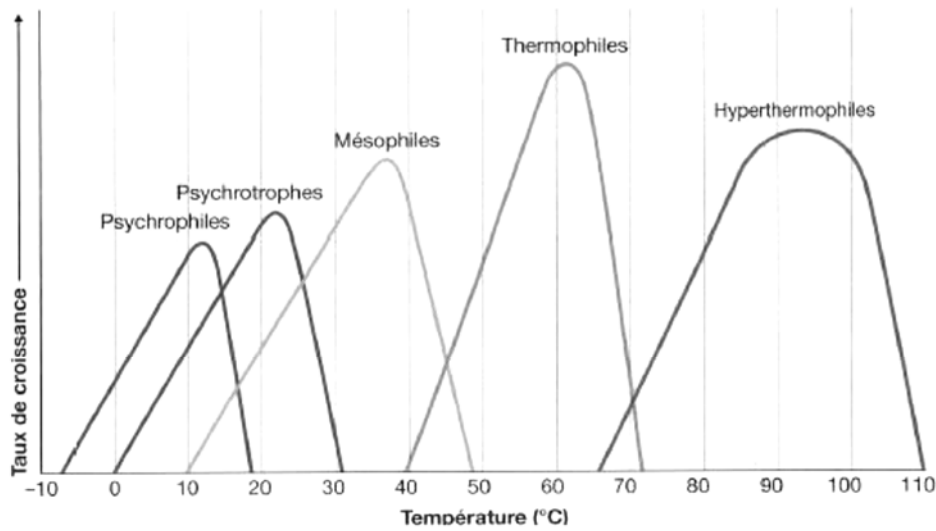
- * Si la bactérie peut se développer sur un intervalle étendu de température, la bactérie est dite eurytherme. (Ex : *Enterococcus*, T°min : 0°C T°max : 44°C) ;
- * Si la bactérie ne se développe que sur un petit intervalle de température, la bactérie est dite sténotherme. (Ex : *Neisseria*, T°min : 30°C T°max : 38°C).

La plupart des bactéries peuvent vivre et se multiplier dans un intervalle de température de 30°C.

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

- Les bactéries psychrophiles: Température maximale 20°C. Température optimale de croissance inférieure à 15°C (Ex : *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*);
- Les cryophiles: Peuvent se développer à des températures négatives. Elles sont souvent isolées des matières fécales d'animaux polaires. Température optimale de croissance (-5°C) (Ex : *Aéromonas*);
- Les mésophiles: Croissance entre 25 et 40°C. Optimum à 37°C. La plupart des bactéries d'intérêt médical ;
- Les thermophiles: Température optimale entre 50 et 60°C (Ex : *Thermus aquaticus*, *Legionella*);
- Les hyperthermophiles: Ont une température optimale de croissance entre 70°C et 110°C (*Pyrolobus fumarii* isolée de cheminée hydrothermale sous-marine se multiplie à 113 °C et des souches des genres *Pyrodictium* et *Pyrobaculum* isolées d'échantillons hydrothermaux seraient capables de survivre à 121 °C). Au dessus de 65-70°C, certaines bactéries ne survivent alors sous des formes thermorésistantes, comme les spores.

Cette classification n'a pas de limites strictes. Il peut exister des chevauchements entre groupes.



Gamme de températures de croissance de quelques espèces bactériennes

Espèces bactériennes	-10	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
<i>Bacillus globisporus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Micrococcus cryophilus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Xanthomonas pharmiticola</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Escherichia coli</i>			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Haemophilus influenzae</i>			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Lactobacillus lactis</i>			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Bacillus subtilis</i>			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Bacillus stearotherophilus</i>				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Thermus aquaticus</i>					■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Pyrodictium occultum</i>									■	■	■	■	■

Figure 20 et 21: Les gammes de température pour la croissance microbienne.

3.3.2 Le pH

Les enzymes cellulaires ne peuvent fonctionner que dans des valeurs étroites de pH. La majorité des bactéries se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (6.5 à 7.5), mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH. On distingue :

- Les acidophiles préfèrent un pH acide. C'est le cas des lactobacilles dont le pH optimal est de 6. *Thermoplasma acidophilum* a un pH optimal entre 0.8 et 3. *Ferroplasma acidarmanus* peut croître à pH proche de 0 ;
- Les alcalophiles préfèrent des pH alcalins. Ainsi, le pH optimal est de 9 pour la multiplication de *Vibrio cholerae*. *Alkaliphilus transvaalensis* est capable de croître à un pH de 12.5 ;
- Les neutrophiles préfèrent des pH se situant entre 5.5 et 8 (ex : *E. coli*, *Pseudomonas*).

En culture, le métabolisme bactérien engendre des acides qui inhiberaient la multiplication bactérienne. Pour éviter cela, on rajoute des solutions tampons qui maintiennent un pH optimal.

3.3.3 La pression

Les bactéries sont subdivisées en trois groupes :

- Les bactéries «classiques» : Dont la croissance est optimale à une atmosphère (soit 1,01325 bars), mais diminue lorsque la pression augmente ;
- Les bactéries piézophiles (du grec piézô : pression) ou barophiles (du grec baros : poids, pesanteur): Dont la croissance est optimale à des pressions plus élevées qu'une atmosphère, mais qui peuvent quand même pousser à une atmosphère;
- Les bactéries barophiles obligées : Dont la croissance (impossible à une atmosphère) n'est possible qu'à des pressions élevées correspondant à des profondeurs de 7000 à 10700 mètres dans les océans avec une pression de 1100 atmosphères (Ex : au fond de la fosse des Mariannes au nord-ouest de l'océan Pacifique). *Bacillus infernus* a été isolée à 2700 mètres sous la surface du sol.

3.3.4 Le son

La plus part des bactéries survivent sans problème à des sons dont la fréquence est de moins de 1000 cycles/seconde. Mais lorsque cette fréquence atteint 100000 cycles/seconde, des variations de pression (cavitation) en résultent, provoquant l'apparition de bulles qui fusionnent puis éclatent et faire rompre la cellule bactérienne. Les ultrasons sont utilisés au laboratoire pour rompre et lyser les bactéries d'une manière non chimique.

3.3.5 Les radiations

Les rayonnements peuvent interférer dans la croissance bactérienne ; ainsi, les UV peuvent générer des mutations qui ralentissent, ou stopperont la croissance bactérienne.

Les bactéries dites radio-résistantes peuvent survivre à des radiations ionisantes élevées. Par Ex : *Deinococcus radiodurans* est l'un des trois organismes les plus résistants à la radioactivité découverts jusqu'à présent avec *Deinococcus radiophilus* et *Rubrobacter radiotolerans*. Cette bactérie résiste à des niveaux de radiation allant jusqu'à cinq millions de rads, soit 5000 fois la dose susceptible de tuer un homme. Elle est capable de réparer son ADN (supporte jusqu'à 150 cassures) sans effet mutagène en

seulement quelques heures et sans perte de viabilité ; alors qu'*Escherichia coli* n'en supporte que deux ou trois maximum et subit des mutations délétères (mortelles). Cette bactérie est aussi 33 fois plus résistante aux UV qu'*Echerischia coli*.

NB: Certaines espèces bactériennes sont capables de résister à plusieurs conditions environnementales extrêmes. Elles sont dites poly-extrémophiles, comme :

* *Sulfolobus acidocaldarius* isolé de sources chaudes acides, est à la fois acidophile (croissance à un pH de 2-3) et hyperthermophile (optimum de croissance vers 80°C) ;

* *Desulfurudis audaxviator* a été trouvé à -2800 m de profondeur, dans le sol d'une mine d'or (en Afrique du Sud) où elle supporte une température de 60°C et un pH de 9.3.

* *Deinococcus radiodurans* (dite aussi Super Conan la bactérie) est l'un des organismes les plus radiorésistants connus au monde. Cette bactérie présente une résistance impressionnante, notamment aux UV, aux radiations ionisantes, au peroxyde d'hydrogène, au vide, à l'acide, aux températures extrêmes, au dessèchement, au froid et à la famine ;

* En 2004 un nombre important de micro-organismes ont été découverts sous des roches de l'Arctique et du continent Antarctique (caractérisés par des températures basses extrêmes, des vents extrêmement violents et surtout des rayonnements ultraviolets).

3.4 La Multiplication et la croissance bactériennes

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

Au cours de la croissance qui peut être étudiée en milieu liquide ou solide, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques.

3.4.1 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est la conséquence complète des évènements depuis la formation d'une nouvelle cellule jusqu'à la division suivante. La plupart des procaryotes se reproduisent par scissiparité (la cellule augmente de taille et, après avoir atteint une taille critique, se divise en deux cellules filles). La scissiparité est un type relativement simple de division cellulaire : la cellule s'allonge, réplique son chromosome et sépare les molécules d'ADN nouvellement formées de manière à ce qu'il y ait un chromosome dans chaque moitié de la cellule. Finalement, un septum se forme au milieu de la cellule en divisant la cellule parentale en deux cellules filles contenant chacune son chromosome et une partie des autres constituants cellulaires. La répétition constante et régulière de ce processus (division binaire) lorsque les conditions du milieu sont favorables aboutit à l'augmentation exponentielle ($2^0, 2^1, 2^2, 2^3, \dots, 2^n$) (Figure A) du nombre de bactéries et donc à la croissance de la population bactérienne.

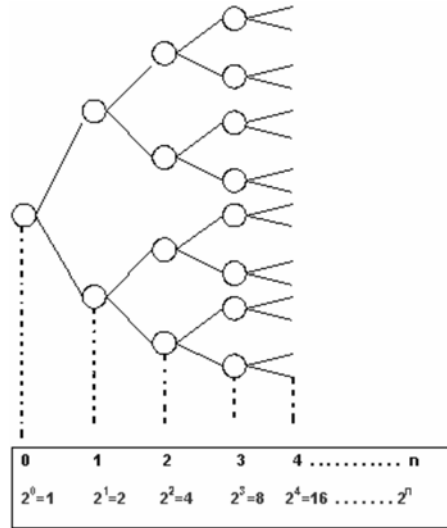


Figure 22 : Aspects théoriques de la croissance.

3.4.2 La courbe de croissance

L'étude de la croissance bactérienne se fait généralement en ensemençant un milieu neuf adapté avec un inoculum donné, puis on mesure le nombre de bactéries à intervalles de temps donnés. Ensuite, on transcrit le résultat de ces mesures sur un graphique exprimant le nombre en fonction du temps. La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide en 5 phases qui dans l'ensemble constituent la courbe de croissance, comme le montre la figure suivante:

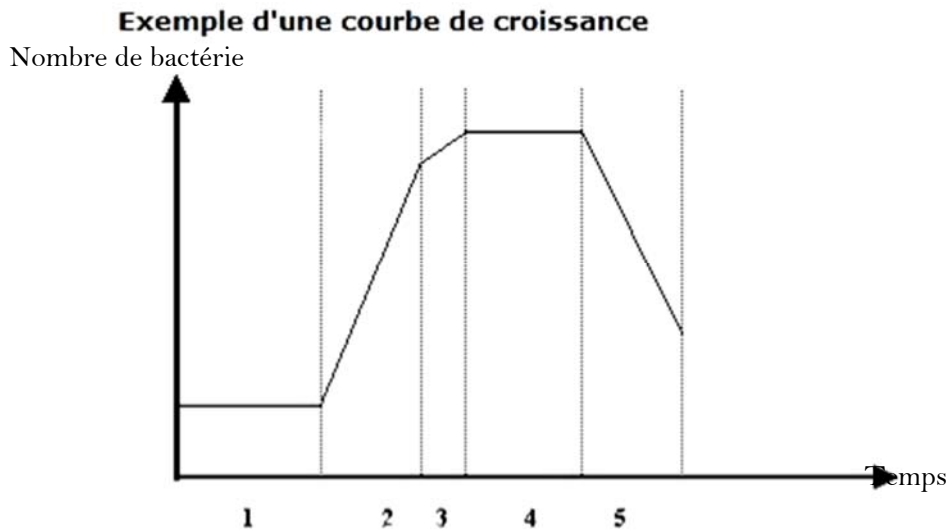


Figure 23: Courbe expérimentale de croissance montrant les différentes phases de croissance distinctes par μ (μ est le taux de croissance qui exprime la vitesse de multiplication des bactéries. C'est le nombre de divisions effectuées par unité de temps).

- Phase de latence (1): C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat où le taux de croissance est nul ($\mu=0$). Si les conditions restent identiques, la croissance démarre directement. La présence d'une phase de croissance dépend de 4 facteurs principaux :

- * L'état physiologique des bactéries de l'inoculum (les bactéries peuvent être stressées par les variations de température, pH, antiseptiques, antibiotiques ou encore anticorps) ;

- * L'âge de l'inoculum (les bactéries âgées sont susceptibles d'avoir une phase de latence plus longue) ;
- * La quantité de l'inoculum (lorsque les bactéries sont plus nombreuses, elles disposeront plus facilement des éléments nutritifs) ;
- * L'adaptation enzymatique (il est indispensable d'utiliser des milieux enrichis pour minimiser ce phénomène d'adaptation).

- Phase de croissance exponentielle (2): Le démarrage de la croissance se fait d'abord lentement mais accélèrent rapidement ; c'est la phase d'accélération qui est le plus souvent courte et conduit à la phase exponentielle. Lorsque le taux de croissance atteint son maximum ($\mu = \text{max}$), il s'agit de la phase exponentielle. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle), cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante.

- Phase de ralentissement (3): Si le milieu est non renouvelé, la concentration en substrats diminue et la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

- Phase stationnaire (4): Le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent (le nombre de cellules viables reste constant pendant un certain temps plus au moins long en fonction des conditions du milieu).

- Phase de déclin (5): La population bactérienne décroît et le taux de croissance devient négatif ($\mu < 0$). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution de cellules viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes.

3.4.3 Etude de la croissance bactérienne

3.4.3.1 Le temps de génération

Appelé aussi le temps de doublement, c'est le temps nécessaire pour qu'une bactérie donne deux cellules filles.

Le temps de génération varie selon les espèces de micro-organismes aussi bien que selon les conditions de l'environnement. Le temps de génération est souvent beaucoup plus long dans la nature qu'en milieu de culture. Le tableau 7 donne les temps de générations de quelques bactéries courantes d'intérêt médical. On peut y constater des variations interspécifiques importantes (Ex *Mycobacterium tuberculosis* présente une croissance 10 fois plus lente qu'*Escherichia coli*).

Dans les conditions de croissance en pathologie infectieuse, c'est-à-dire dans un organisme qui possède des tissus et des systèmes de protection (anticorps...) d'une certaine efficacité, le temps de génération est considérablement augmenté ; ce qui permet de comprendre que l'incubation d'une maladie infectieuses est nettement plus longue que le temps nécessaire pour isoler une bactérie in vitro.

Tableau 7: Temps de génération de quelques espèces bactériennes.

Microorganism	Temperature (°C)	Generation Time (Hours)
Bacteria		
<i>Beneckeia natrigens</i>	37	0.16
<i>Escherichia coli</i>	40	0.35
<i>Bacillus subtilis</i>	40	0.43
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	0.47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	0.58
<i>Clostridium botulinum</i>	37	0.58
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	25	4.6–5.3
<i>Anabaena cylindrica</i>	25	10.6
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37	≈12
<i>Treponema pallidum</i>	37	33

3.4.3.2 Techniques de mesure de la croissance bactérienne

Chez les micro-organismes, la croissance se traduit par une augmentation du nombre d'individus. Cette augmentation du nombre provient de la division d'une cellule en deux nouvelles cellules.

- Comptage du nombre de cellules

On compte le nombre total de bactéries (vivantes ou mortes) dans un volume connu. C'est une méthode un peu fastidieuse en raison d'un certains nombre de paramètres (exemple : la petite taille des bactéries, la mobilité...). Cette opération se fait manuellement à l'aide d'un microscope (chambre de comptage de Petroff-Hausser, lame de Thoma, lame de Helber) ou à l'aide des compteurs électroniques (si les cellules sont suffisamment grandes) tels que les compteurs de Coulter.

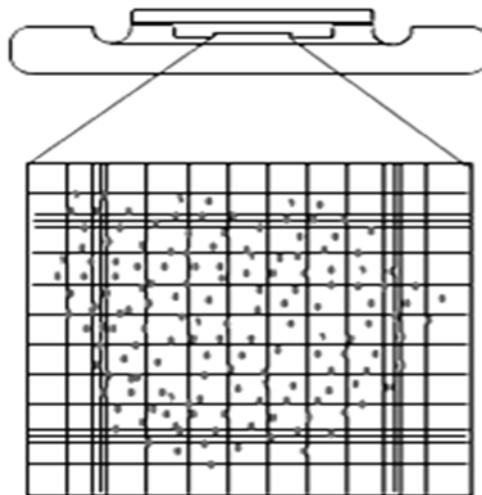


Figure 24: Cellule de Petroff-Hausser.

- Le dénombrement des colonies après culture en boîte de Pétri et dilution en série

Le principe de cette méthode consiste à diluer successivement l'inoculum initial dans des éprouvettes. Chaque éprouvette contient seulement un dixième du nombre de bactéries présentes dans l'éprouvette précédente.

On ensemence un volume connu (1 ml) à la surface de gélose ou incorporé au milieu avant sa solidification et on incube à une température convenable.

Le nombre de colonies devient dénombrable à des fortes dilutions. Il correspond au nombre de bactéries présentes dans le volume analysé de la suspension. Le résultat est exprimé en **UFC** (unités formant colonies) et non pas en nombre de cellules bactériennes.

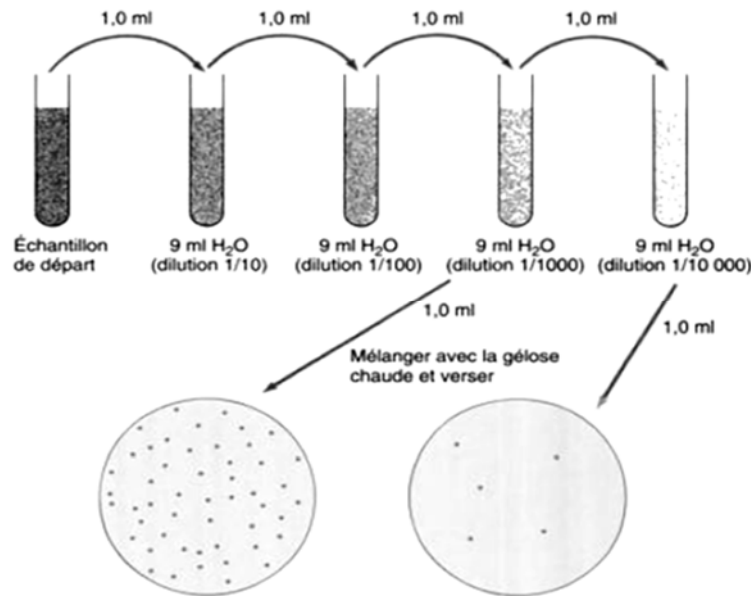


Figure 25: Dénombrement après culture et dilution en série.

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

- Mesure de la biomasse :

Se fait par :

* Détermination du poids sec : on prélève un certain volume de suspension bactérienne et on laisse sécher à 110°C pendant 12h puis on pèse l'échantillon sec. Le poids est exprimé généralement en grammes de matière sèche par litre.

Cette technique est cependant très longue et peu sensible et il faut centrifuger plusieurs centaines de millilitres de culture pour recueillir une quantité suffisante de bactéries.

* Mesure physique directe du poids frais ou du volume cellulaire après centrifugation.

* Mesure chimique directe de quelques constituants cellulaires, tels que l'azote total, les protéines totales ou encore l'ADN total.

* Opacimétrie (mesure de trouble) : on mesure la turbidité de la suspension bactérienne à l'aide d'un turbidimètre ou colorimètre (à longueur d'onde > 650 nm).

Principe : les bactéries mises en suspension dans un liquide dispersent la lumière qu'elles reçoivent (aspect trouble des cultures bactériennes en milieu liquide). Cette dispersion lumineuse (exprimée en DO) est proportionnelle à la biomasse selon la loi de Beer-Lambert. Plus la population augmente, plus la lumière est diffractée (déviée) et la lecture d'absorbance donnée par le spectrophotomètre est élevée.

Cette méthode a une sensibilité limitée à des biomasses assez importantes et la nécessité de pouvoir disposer de suspensions très homogènes et suffisamment dense pour donner une turbidité détectable, mais elle est très utilisée en industrie, car elle est rapide et peu coûteuse.

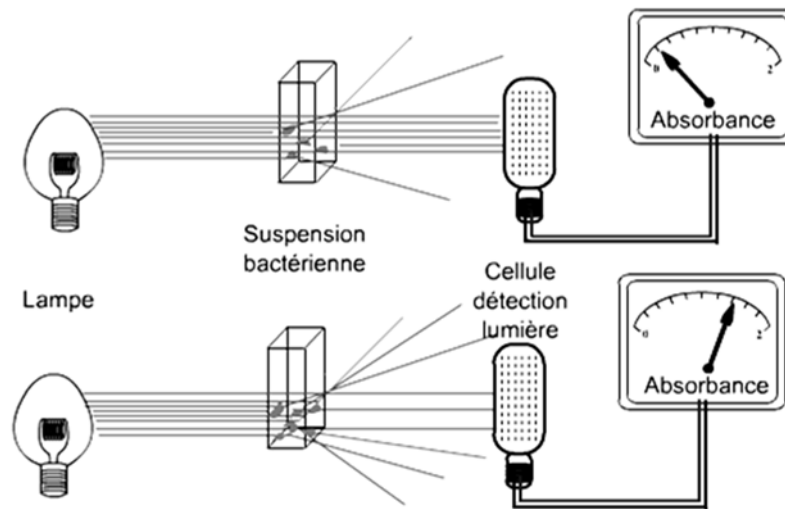


Figure 26: Principe de la mesure par turbidimétrie.

Il existe d'autres techniques de mesure de la croissance bactérienne : mesure de l'activité métabolique (catalytique) des bactéries par mesure de pH (méthode de sensibilité assez faible mais très utilisée en bactériologie médicale ou en recherche), dosage de l'O₂ ou du CO₂ et mesure du dégagement de chaleur (méthode très précise, mais elle est délicate et nécessite un laboratoire très spécialisé et elle est réservée à la recherche).

3.4.4 Cas particuliers de la croissance

3.4.4.1 Phénomène de diauxie

Dans certaines conditions, on peut observer des courbes de croissance plus complexes, avec souvent deux phases de croissance exponentielle séparées par une phase de latence. Cette croissance biphasique ou "*diauxie*", ou croissance double (comme si deux croissance se succédaient), est observée avec certaines bactéries poussant dans un milieu limitant en deux sucres ou en un sucre et un acide organique (deux substrats carbonés). La première phase de croissance correspond à l'utilisation exclusive d'un des composés, elle est suivie d'une période d'adaptation et d'une deuxième phase de croissance où le deuxième composé est métabolisé. La figure 27 est une courbe de diauxie typique où les deux substrats sont le glucose et l'acide citrique.

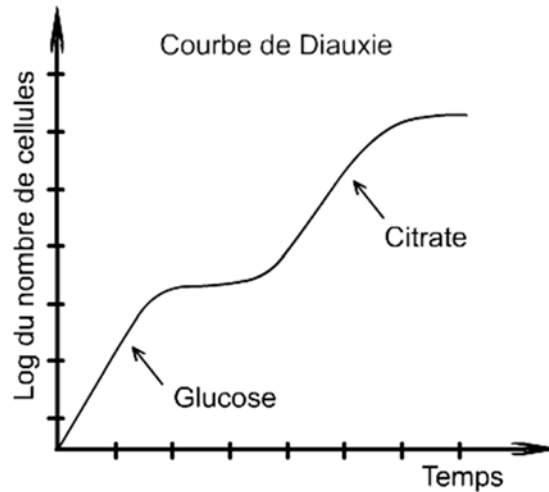


Figure 27: Croissance en diauxie.

3.4.4.2 Croissance en culture synchrone

Dans une population bactérienne, les cellules ne se divisent pas toutes au même moment (potentialités différentes de chacune des cellules). La courbe de croissance montre des paliers successifs exprimant les doublements de la population. Ce type de culture permet d'étudier la division cellulaire indépendamment de la croissance. La synchronisation de la croissance peut être obtenue expérimentalement à l'aide de procédés physico-chimiques (choc thermique par exemple).

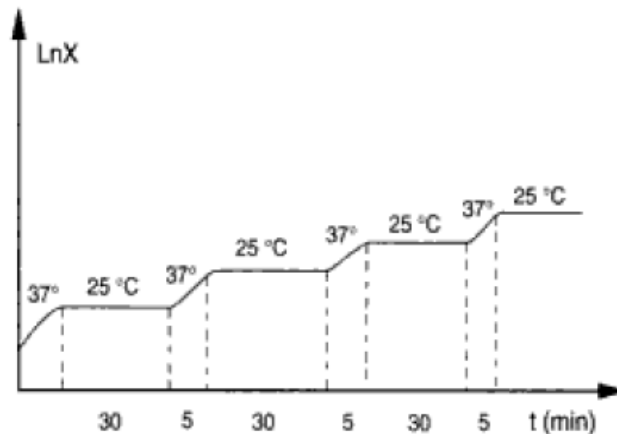


Figure 28: Croissance synchrone obtenue par choc thermique.

3.4.4.3 Croissance en culture continue

Il y a maintien d'une croissance exponentielle continue lorsque le milieu de culture est renouvelé régulièrement et que les métabolites sont éliminés en même temps. La valeur μ est maximale et constante. Deux types principaux de culture continue sont généralement utilisés :

- * Le chémostat : Un chémostat est construit de telle façon que le milieu stérile soit introduit dans la chambre de culture à la même vitesse que le milieu contenant les micro-organismes en est éliminé.
- * Le turbidostat : Ce second type de système de culture continue est équipé d'une cellule photoélectrique afin de mesurer l'absorbance ou la turbidité dans la chambre de culture. La vitesse d'écoulement du milieu au travers de la cuve est automatiquement réglée pour maintenir une turbidité ou densité cellulaire prédéterminée.

3.4.4.4 Croissance en biofilm

La notion de biofilm est liée à une forme de vie communautaire et sédentaire dans laquelle des espèces unicellulaires (bactéries, champignons ou levures) s'associent pour former une structure complexe ayant une hétérogénéité fonctionnelle et spatiale.

Les biofilms bactériens jouent un rôle important dans certains contextes infectieux, notamment en relation avec la pose de dispositif implantable (tubes endotrachéaux, prothèses, cathéters, sondes urinaires...).

Toutefois, leur importance est probablement sous-estimée dans de nombreuses situations cliniques en raison des difficultés techniques rencontrées pour les mettre en évidence. Ils sont également suspectés de former des réservoirs microbiens dans les réseaux d'eau à l'hôpital et d'engendrer des infections nosocomiales. Résistants à de nombreux agents anti-infectieux (antibiotiques et antiseptiques) et aux défenses immunitaires, les biofilms peuvent survivre dans des environnements hostiles.

Les communautés microbiennes qui les composent forment des microsociétés gouvernées par des règles qui favorisent le succès du groupe à travers la coopération et le partage de tâches, certaines sous populations se spécialisant pour le bien général. S'agissant d'un comportement multicellulaire, il est gouverné par une communication de nature chimique ou génétique. Au sein de cet arrangement multicellulaire, il s'établit un gradient chimique et métabolique entre l'intérieur de la structure et le milieu extérieur. La faible tension en oxygène qui règne au sein des biofilms les plus denses peut créer ainsi un environnement stressant pour les espèces aérobies favorisant l'émergence de mutants ayant des propriétés spécifiques.

3.4.5 Réponses des bactéries aux stress

Les micro-organismes présentent des capacités d'adaptation remarquables à certains stress physico-chimiques rencontrés dans leur environnement. Le déclenchement de mécanismes cellulaires complexes génère une réponse adaptative de la bactérie qui aboutit à un état de tolérance et par conséquent à une survie dans des conditions qui sont normalement létales.

La culture de cellules en conditions de stress sub-létales permet à ces cellules de se pré-adapter aux conditions de stress et ainsi d'améliorer leur résistance. L'acquisition de caractères de résistance induit par un mode de production adapté et performant va permettre de produire des préparations bactériennes présentant une vitalité et une viabilité accrue.

D'une manière générale, face aux stress, les bactéries peuvent répondre selon différentes stratégies :

- Fuir le stress (bactéries possédant un ou des flagelles) ;
- Produire des facteurs de virulence tels que des toxines (cas des bactéries pathogènes lors de l'attaque invasive) ;
- Former des spores de résistances (*Clostridium sp.*, *Bacillus sp.*) ;
- Se développer sous la forme de biofilms ;
- Eliminer le stress (dégradation des molécules toxiques tels que les antibiotiques) ;

- Tolérer le ou les stress : réparation des dommages intracellulaire et adaptation physiologique et moléculaire.

NB : Il est actuellement possible de favoriser la croissance d'un micro-organisme bénéfique ou d'éradiquer un micro-organisme indésirable (cas des biofilms) grâce à l'émergence d'outils technologiques permettant d'estimer les états de stress des cellules et à l'acquisition de connaissances aux niveaux moléculaires et physiologiques des mécanismes mis en jeu chez des bactéries modèles transférables à des souches industrielles.

3.4.6 Culture bactérienne

3.4.6.1 Elaboration des milieux de culture

En bactériologie médicale, l'analyse bactériologique classique passe toujours par un stade d'isolement des souches présentes dans un prélèvement représentatif du foyer infectieux. Cet isolement est en même temps un stade d'amplification du nombre de germes par culture sur un milieu et dans des conditions qui doivent être favorables à la croissance des germes présents. Ces milieux et conditions sont donc choisis en fonction des exigences des germes présents et dont on veut effectuer l'identification : milieux minimums, ordinaires (pour des bactéries réputées peu exigeantes), enrichis par diverses substances (pour les germes plus exigeants, ce qui est fréquemment le cas en bactériologie médicale), sous atmosphère aérobie ou anaérobie, enrichie ou non en CO₂, etc....

Dans d'autres cas, au contraire, si l'objectif est la recherche d'un germe particulier parfois présent au sein d'une population bactérienne diversifiée ou complexe (cas de coproculture par exemple) ou exigeant des conditions de croissance très particulières, il peut être nécessaire de pratiquer l'isolement sur des milieux et dans des conditions particulières :

- Soit dans des conditions défavorisant la croissance des autres bactéries sans entraver celle du germe recherché (milieux sélectifs par addition d'antibiotiques ou antiseptiques, condition de température, de pH, etc. ...).
- Soit en utilisant des milieux particulièrement adaptés au germe recherché (cas des leptospires, des mycoplasmes, des mycobactéries etc. ...).

Lorsque l'on ne connaît pas la nature des germes susceptibles d'être présents dans un prélèvement, on utilisera des conditions assurant la croissance de nombreuses espèces, en incubant suffisamment longtemps pour permettre la croissance des germes à croissance lente. Dans ce cas, le bactériologiste doit pouvoir déterminer, pour interpréter valablement les résultats, quels sont les germes qui avaient des chances d'être isolés et quels sont ceux qui, au contraire ne pouvaient pas être isolés.

3.4.6.2 Les milieux de milieux

Un milieu de culture est un mélange nutritif préparé au laboratoire, utilisé 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.

Les bactéries introduites dans le milieu de culture constituent l'inoculum. Les micro-organismes qui s'y développent forment une culture.

A. Classification des milieux selon la consistance

Selon les analyses et les expériences à effectuer, on peut cultiver des bactéries sur :

- Des milieux liquides qu'on appelle bouillons de culture : Les micro-organismes se développent sous forme d'un trouble ou voile en suspension.
- Si on rajoute de l'agar-agar (polysaccharides isolés des algues rouges, c'est un excellent agent solidifiant que les micro-organismes sont incapables de le dégrader), on obtient des milieux solides qui peuvent être préparés sur boîte de Pétri ou en tube (gélose inclinée, gélose profonde). Selon la quantité d'agar rajoutée, on a des géloses solides (1,5%) et des géloses molles (0,75%). Il est déconseillé de dépasser 1,5% car cela pourrait inhiber la croissance de certaines bactéries à cause d'une forte pression osmotique.

Sur milieu solide, les bactéries se développent en colonies, dont la forme, la couleur, l'odeur, dépendent à la fois de l'espèce et du milieu utilisé. La colonie s'agrandit radialement avant de pousser verticalement à une taille et une hauteur limites.

L'agar fond lorsqu'on la réchauffe à 100°C et se solidifie lorsqu'elle se refroidit (dès 40°C). Généralement, on prépare les boîtes de Pétri avec une gélose stabilisée à 50°C.

NB : Il est à signaler que certaines bactéries sont dites non cultivables puisqu'à ce jour on ne sait pas encore les cultiver. Beaucoup d'entre elles sont identifiées uniquement avec des techniques moléculaires (basées sur leur ARNr 16S).

D'autres germes comme, l'agent de la lèpre, *Mycobacterium leprae* est cultivé dans un petit animal appelé Tatou.

Les bactéries intracellulaires obligatoires (Rickettsies, Chlamydias), sont cultivées dans des cellules mammifères en monocouches.

Les anaérobies stricts ont besoin de milieux réducteurs et d'équipements spéciaux comme la jarre anaérobie ou une hôte anaérobie étanche, dont l'air est contrôlé.

B. Classification des milieux de culture selon leur composition chimique

Selon le type trophique de la bactérie et de ses exigences, il faudrait adapter la composition et le pH. Différentes catégories de milieux de cultures ont été développées:

B1. Les milieux synthétiques, minimums ou définis

La composition chimique de ce type de milieu, est connue avec exactitude, qualitativement et quantitativement. Ils sont constitués chimiquement, de corps purs et sont utilisés pour les bactéries autotrophes ou pour des tests bien précis.

Exemple : Milieu urée – indole (L-tryptophane (0,3 g), KH₂PO₄ (0,1 g), K₂HPO₄ (0,1 g), NaCl (0,5 g), urée (2 g), alcool à 95 (1 ml), rouge de phénol 1%, eau distillée (100 ml).

En général, un milieu minimum doit être composé de :

*Une source de carbone et d'énergie, généralement le glucose ;

- *Une source de potassium et de phosphore ;
- *Une source d'azote et de soufre ;
- *Une source de magnésium ;
- *Une source de calcium ;
- *Une source de fer: on emploie le citrate de fer (le citrate a pour rôle de maintenir le fer en solution ;
- *Une source d'oligo-éléments: sels de Cu, Zn, Co, Ni, B, Ti ;
- *Une source d'eau, indispensable à toute forme de vie: on utilise l'eau distillée (stérile) ;
- *Un tampon pH: il permet de maintenir un pH correct voire optimum ;

En l'absence de l'un de ces composants, les bactéries ne se développent pas, car elles ne peuvent synthétiser ces produits. C'est l'adjonction de facteur(s) de croissance approprié(s) qui permet à des bactéries exigeantes de se développer.

B2. Les milieux complexes ou empiriques

Contiennent des ingrédients de composition chimique indéterminée. Ces milieux sont très utilisés, car un seul milieu complexe peut satisfaire les besoins nutritifs de nombreux micro-organismes différents ou lorsque les besoins nutritifs d'un micro-organisme particulier sont inconnus et donc un milieu défini ne peut pas être préparé (utilisés surtout pour les chimiohétérotrophes).

Ils sont constitués d'extrait de soja, de viande, de levure, digérés par des enzymes. Ils fournissent une source de carbone, d'azote, vitamines B. Leur composition varie d'un lot à l'autre. Ils sont préparés par macération (laisser séjourner un solide dans un liquide froid) ou par décoction (dans l'eau bouillante, parties dures des plantes).

Exemple : bouillon nutritif: Peptone (5g), extrait de viande de bœuf (3g), NaCl (8g), Eau distillée (1 litre).

En bactériologie, trois milieux complexes sont souvent utilisés : le bouillon nutritif, le bouillon au soja et la gélose MacConkey.

B3. Les milieux semi-synthétiques

Se sont des mélanges de composés chimiques purs et de substances naturelles empiriques. Exemple milieu de Chapman, qui est également sélectif pour les Staphylocoques. Peptone (10g), Extrait de viande de bœuf (1g) Chlorure de sodium (75g), Mannitol (10g), Rouge de phénol (0,025g), Agar (15g), Eau distillée (qsp 1 Litre). pH=7,4.

B4. Les milieux enrichis

Ils contiennent, en plus des composants de base, des composants indispensables aux bactéries, que celles-ci ne peuvent pas synthétiser. Ce sont des milieux utilisés pour l'obtention des bactéries dites exigeantes et auxotrophes. Par exemple : les milieux au sang frais (le sang est riche en nutriments divers): Gélose au sang frais ou cuit. Les milieux avec du sérum, du jaune d'œuf : Gélose Baird Parker.

B5. Les milieux sélectifs

Favorisent la croissance de micro-organismes particuliers en inhibant d'autres. On fait intervenir un pH acide, une concentration de sel élevée, les sels biliaires, les colorants comme la fuchsine basique et

le crystal violet qui par exemple favorisent la croissance des bactéries Gram-négatives car ils inhibent la croissance des bactéries Gram-positives sans affecter les premières. La gélose MacConkey contient des sels biliaires. Les bactéries peuvent être sélectionnées en cultures sur la base des aliments nutritifs qu'elles utilisent spécifiquement (ex. cellulose).

B6. Les milieux différentiels

Contiennent un indicateur (colorant) qui permet de différencier deux types bactériens qui poussent sur le même milieu, mais ne dégradent pas tous les deux un substrat particulier. La gélose Hektoën, qui différencie la fermentation de 3 glucides (lactose, saccharose et salicine) ainsi que la production de sulfure d'hydrogène.

B7. Les milieux d'identification

Utilisés dans la mise en évidence des caractères biochimiques des bactéries dans l'identification différentielle.

B8. Les milieux de conservation

Se sont des milieux pauvres au sein desquels les bactéries survivent dans un état de vie ralentie.

3.4.6.3 Obtention et conservation des cultures pures

A. Isolement des bactéries

Pour étudier et utiliser des micro-organismes on doit obtenir des souches pures (culture pure). On peut utiliser pour cela deux techniques :

A1. Dilution en milieu liquide : Le produit d'où l'on veut isoler la souche est dilué de 10 en 10 dans un milieu stérile (Figure 25);

A2. Epuisement en milieu solide (La méthode des stries)

L'identification bactérienne nécessite l'obtention de clones (ou cultures pures) pour étudier les caractères d'identification sur une population homogène et suffisamment nombreuse. Celle-ci en général obtenue sur ou en milieu adapté sur le plan nutritionnel et solidifié, habituellement par adjonction de gélose (Agar agar).

Une méthode toute simple consiste à déposer l'inoculum à la périphérie de la boîte et à l'étaler vers le bas en stries serrées.

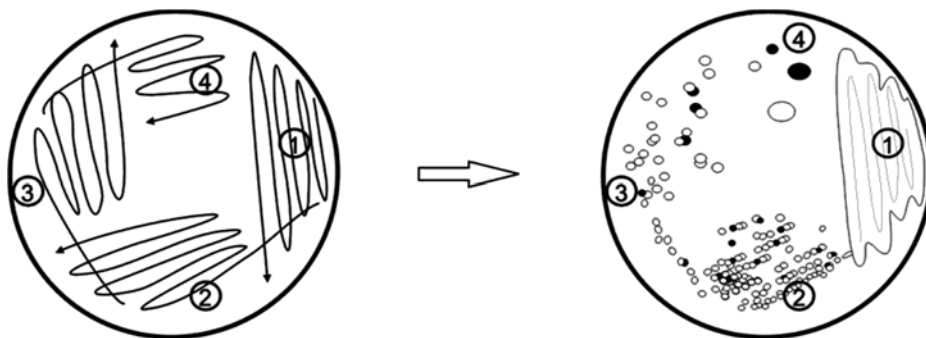


Figure 29: L'étalement sur boîte par la technique des stries.

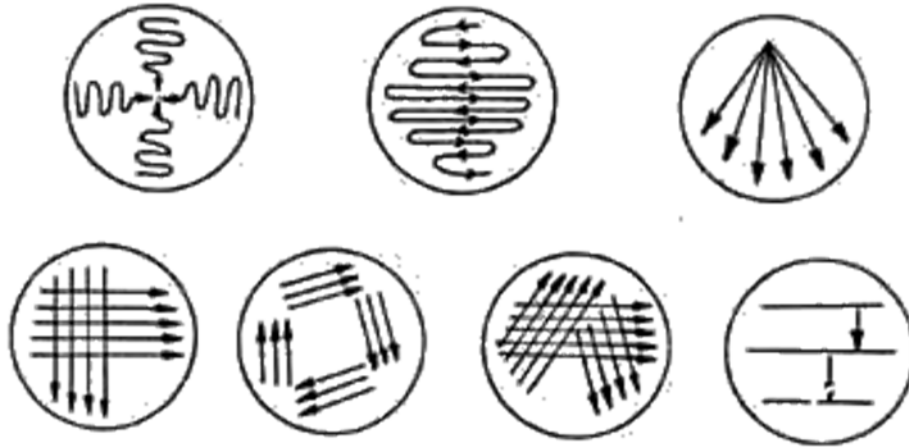


Figure 30: Différentes méthodes d'étalement sur boîte par la technique des stries

L'isolement permet d'obtenir des colonies différentes, espacées les unes des autres. On cherche à isoler les différentes cellules de l'échantillon, chaque cellule isolée étant alors potentiellement susceptible de conduire à une colonie. L'isolement permet d'observer les colonies. Chaque espèce bactérienne forme des colonies qui ont souvent une taille et une morphologie caractéristiques.

B. Identification des bactéries

L'identification des bactéries se fait suivant une clé dichotomique (étape par étape) qui va des caractères les plus vastes aux plus pointus pour aboutir à une espèce bactérienne donnée.

B1. Critères morphologiques

L'étude de la morphologie bactérienne est le premier acte effectué par un laboratoire de diagnostic pour identifier une bactérie. L'observation de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire du diagnostic.

B1a. Macroscopique : À l'œil nu, on peut distinguer les caractéristiques d'une colonie :

- *La forme du relief (bombée, semi-bombée, plate) ;
- *La taille ;
- *La couleur ;
- *L'aspect (collant, filamenteux, etc.) ;
- *L'odeur ;
- *La transparence (opaque, translucide) ;
- *L'allure des contours (régulier, dentelés) ;
- *La consistance ;
- *La pigmentation ;
- *Aspect de la surface (lisse ou rugueuse).

Il existe trois grands types de colonies :

*Colonies de Type S (Smooth=lisse) : contours lisse et réguliers, semi-bombée, surface brillantes, crémeuses ;

*Colonies de Type M (Muqueux) : contours lisse et réguliers, très bombées, surface très brillantes, filantes ;

*Colonies de Type R (Rough=rugueux) : contours irréguliers, plates rugueuses et mates, sèches.

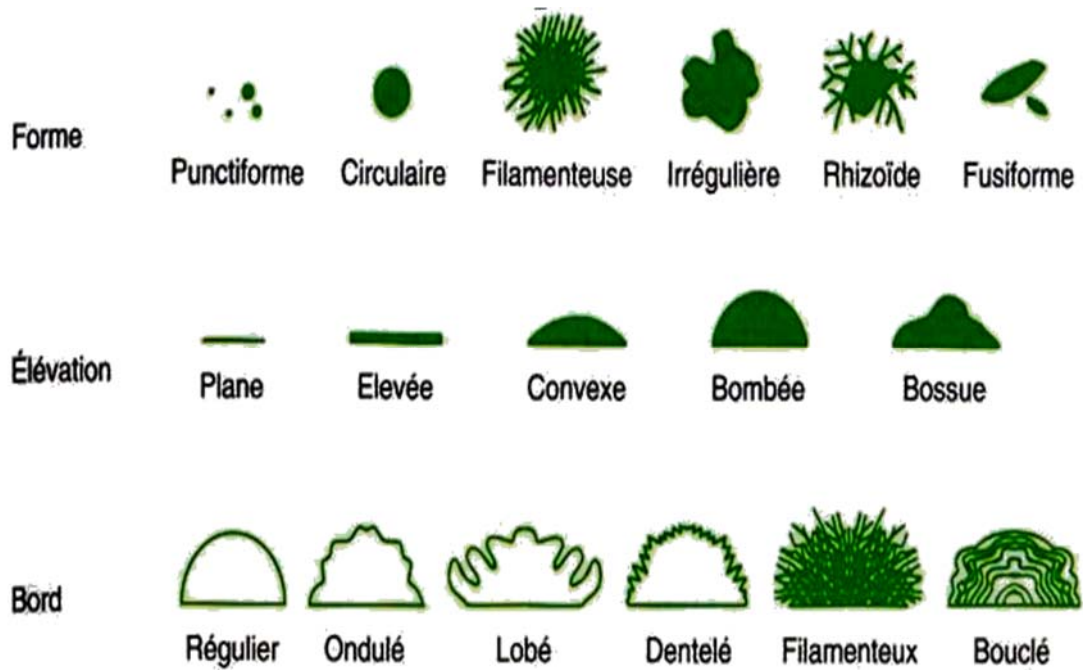


Figure 31: La morphologie des colonies bactériennes.

B1b. Microscopique

- *La coloration de Gram : elle permet de déterminer le type de paroi cellulaire ;
- *La forme (sphérique, bacille ou spirille) ;
- *Le mode de groupement ;
- *Taille ;
- *Présence de spore ;
- *Mobilité...

B2. Critères biochimiques

On identifie aussi une bactérie en observant si elle utilise tel ou tel substrat. On la met donc en contact dans un milieu de culture avec un glucide, ou un peptide, ou d'autres substrats plus complexes. Le test de l'oxydase par exemple utilise le tétraméthyl-para-phénylène-diamine. On peut révéler l'utilisation de ce substrat par virage d'un indicateur de pH car un glucide utilisé donne un produit acide, un peptide donne un produit basique, etc.

Chaque espèce de bactéries a des caractères propres, on peut donc les rassembler facilement avec des caractéristiques de base comme l'utilisation du glucose avec ou sans oxygène, la réduction des nitrates, etc. La combinaison de différents résultats obtenus permet de définir le profil métabolique de la bactérie analysée ce qui permet de l'identifier.

C. Conservation des souches pures

Les souches identifiées et pures peuvent être conservées à température ambiante en tube sur géloses inclinées, par lyophilisation dans des ampoules scellées, ou par congélation en présence de glycérol (40%). La congélation est la meilleure façon de procéder pour les durées de conservation longues.

Chapitre 4 : Génétique bactérienne

La génétique (du grec *genno* = donner naissance) est la science qui étudie l'hérédité et les gènes. La génétique formelle ou mendélienne, s'intéresse à la transmission, apparition ou disparition des caractères héréditaires, de manière permanente entre des géniteurs et leur descendance.

1. Variations génotypiques et phénotypiques

Il y a 2 types de variations qui sont mesurables : les variations génotypiques qui vont affecter le génome et qui potentiellement peuvent entraîner des variations phénotypiques observables ou non.

1.1 Variations génotypiques

Les **variations génotypiques (mutation)** qui ont lieu au niveau de la séquence génétique vont influencer sur les caractères phénotypiques qui sont les aspects que vont pouvoir prendre les bactéries.

Naturellement, les bactéries peuvent subir (comme n'importe quel génome procaryote, eucaryote ou viral) des modifications spontanées qui vont conduire à des mutations.

Une variation génotypique correspond à une modification :

- Spontanée ou induite par des facteurs physiques ou chimiques tels les UV ou autre ;
- Discontinue : apparition aléatoire ;
- Stable qui peut être transmise à la descendance ;
- Rare si elle est spontanée, avec une fréquence = 10^{-6} (probabilité d'1 / 1 000000 paires de bases) ;
- Spécifique : la probabilité d'obtenir un double mutant = produit des probabilités de chaque événement pris indépendamment = 10^{-12} .

Si une bactérie devait se baser essentiellement sur des modifications spontanées pour faire évoluer son génome, ça prendrait énormément de temps. Donc les bactéries utilisent d'autres mécanismes que simplement se baser sur des mutations spontanées pour faire évoluer leur génome (Ex : l'intégration de virus, les transposons).

1.1.1 Types de mutations génétiques

Différents types de mutations peuvent être caractérisés :

A. Mutations ponctuelles :

A1. Microdélétion : Il s'agit de la perte d'une paire de bases ;

A2. Microinsertion (Microaddition) : Il s'agit du gain d'une paire de bases.

A3. Substitution : Il s'agit de la substitution d'une paire de bases par une autre à la suite d'une erreur durant la réplication. On distingue deux types de substitutions:

A3a. Transition : substitution d'une purine par une purine ou d'une pyrimidine par une pyrimidine (Bases puriques : Adénine et Guanine; pyrimidiques : Cytosine et Thymine) ;

A3b. Transversion : Substitution d'une purine par une pyrimidine ou inversement.

B. Macrolésions :

Il s'agit de mutations qui affectent une séquence de bases. On distingue plusieurs catégories:

B1. Réarrangement : la totalité de l'ADN est présente après ce type de mutation:

B1a. Inversion : inversion d'une séquence ;

B1b. Translocation : excision d'un fragment puis sa réintégration dans un autre endroit ;

B2. Duplication : un segment d'ADN est présent en double ;

B3. Délétion : perte d'un fragment d'ADN ;

B4. Insertion : gain d'un fragment d'ADN.

1.1.2 Effets des mutations ponctuelles

Ces mutations peuvent affecter aussi bien les gènes de structure que ceux de régulation.

A. Mutations "même sens" (same sense)

Dues au fait que la séquence initiale en acides aminés ne change pas (mutation silencieuse).

Exemple: substitution de U par C (au niveau de l'ADN, transition AT → GC) dans le codon GAU ce qui donne GAC. Les deux codons codent pour l'acide aspartique.

B. Mutations "non sens" (stop)

Il s'agit de mutations qui aboutissent à des codons de terminaison (stop) UAA, UAG ou UGA. Le résultat de ces mutations est l'arrêt de la traduction avant la synthèse complète du polypeptide, ce qui donne naissance à un produit inactif.

C. Mutations "faux sens" (missense)

Obtenues par substitution d'une paire de bases par une autre, donc un acide aminé par un autre acide aminé au niveau du polypeptide. S'il s'agit d'une enzyme :

C1. La protéine peut avoir un site catalytique altéré donc perte totale ou partielle de l'activité enzymatique ;

C2. La protéine peut devenir anormalement sensible à un facteur physique ou chimique; ex: mutants thermosensibles ;

C3. Les unités polypeptidiques peuvent subir une association anormale, ce qui a pour conséquence la perte de l'activité catalytique ;

C4. Parfois aucun changement n'a lieu; c'est le cas d'une substitution d'un acide aminé par un autre qui a les mêmes propriétés, ex: Glu par Asp ;

C5. Parfois l'acide aminé n'intervient pas dans les sites actifs et n'est pas déterminant dans la conformation.

D. Microdélétions ou microinsertions

La conséquence de telles mutations est le décalage de lecture au niveau de l'ARNm. Dans ce cas, le polypeptide produit contient la séquence correcte d'acides aminés jusqu'au point où il y a eu mutation à partir duquel la séquence en acides aminés change. Parfois, ce décalage génère un codon non-sens, d'où l'arrêt de la traduction.

E. Mutations "suppresseurs" (Réversion)

Un organisme muté peut subir une deuxième mutation qui ramène au caractère sauvage (initial). Cette seconde mutation est dite "suppresseur" car elle supprime l'effet de la première.

1.2 Variations phénotypiques

Particularité, notamment chez les bactéries : les variations phénotypiques ne dépendent pas que des variations génétiques. Donc il y a des variations phénotypiques qui ne sont pas d'origine génotypique. Par exemple la diauxie : Lorsqu'il y a du glucose dans le milieu, l'opéron lactose qui permet d'utiliser le lactose est réprimé. Cette croissance biphasique est liée à une adaptation des bactéries en fonction des sources nutritives qu'elles ont dans le milieu. Lorsque le glucose arrive à épuisement, il y a une levée de l'inhibition de l'utilisation de l'opéron lactose, ce qui permet à la bactérie à ce moment-là d'utiliser le lactose.

2. Transferts horizontaux de matériel génétique

Chez les Procaryotes, les transferts génétiques sont unidirectionnels. Un fragment de matériel génétique exogène pénètre dans une cellule receveuse. Cet ADN peut persister dans le cytoplasme (cas de nombreux plasmides) ou être intégré au chromosome bactérien par recombinaison.

2.1 La conjugaison

La conjugaison est un mécanisme de transfert unidirectionnel de matériel génétique par contact entre deux cellules bactériennes. Le transfert de gènes s'effectue dans un sens déterminé, d'une cellule donneuse à une cellule receveuse.

Le facteur F, ou facteur de fertilité, est un plasmide portant les gènes nécessaires à l'attachement cellulaire et au transfert de matériel génétique. Certains de ces gènes sont impliqués dans la formation des pili sexuels, responsables de la première étape de la conjugaison.

La souche donneuse est dite F⁺ car elle possède ce facteur F. La souche receveuse est dite F⁻ car elle ne le possède pas (et ne produit donc pas de pili sexuels). Au cours de la conjugaison (c'est à dire le croisement F⁺ x F⁻), le facteur F est répliqué et c'est une copie du plasmide qui est transférée (sous forme simple-brin) dans la cellule receveuse.

Au terme de ce transfert (après réplication et recircularisation du plasmide), la cellule receveuse est devenue à son tour F⁺. Dans ces conditions, la fréquence de recombinaison des gènes chromosomiques est faible, car le chromosome bactérien n'est que très rarement transféré dans la cellule receveuse.

Le facteur F contient des séquences d'insertion permettant l'intégration du plasmide dans le chromosome de la cellule hôte.

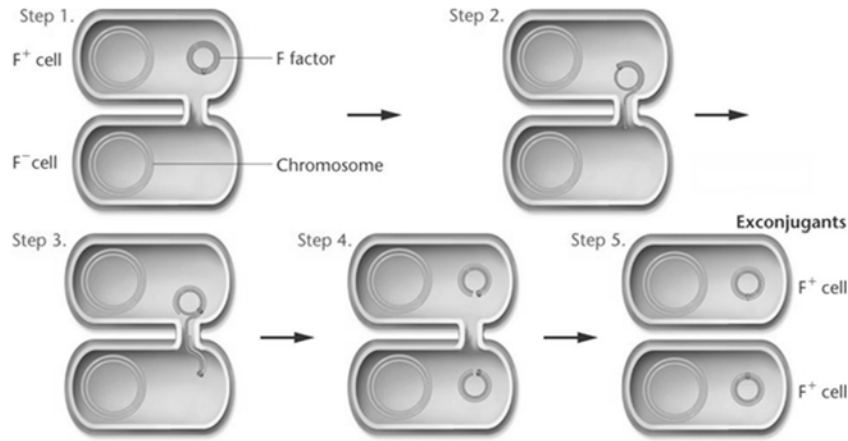


Figure 32 : Les étapes de la conjugaison.

2.2 La transformation

La transformation est l'entrée dans la cellule d'un fragment d'ADN « nu » présent dans l'environnement (et son intégration dans le chromosome receveur).

Une bactérie capable d'effectuer une telle opération est dite compétente. L'état de compétence est un phénomène transitoire, qui intervient chez certaines bactéries pendant 15 à 30 minutes à la fin de la phase exponentielle de croissance.

La transformation artificielle en laboratoire fait appel à des agents rendant perméable la membrane à l'ADN (chlorure de calcium), à des traitements thermiques ou électriques (électroporation).

Les cellules transformées ne deviennent recombinantes que si le(s) gène(s) porté(s) par l'ADN exogène s'exprime(nt). La transformation des bactéries est plus efficace avec de l'ADN plasmidique, moins facilement dégradé que des fragments linéaires et se répliquant de façon autonome.

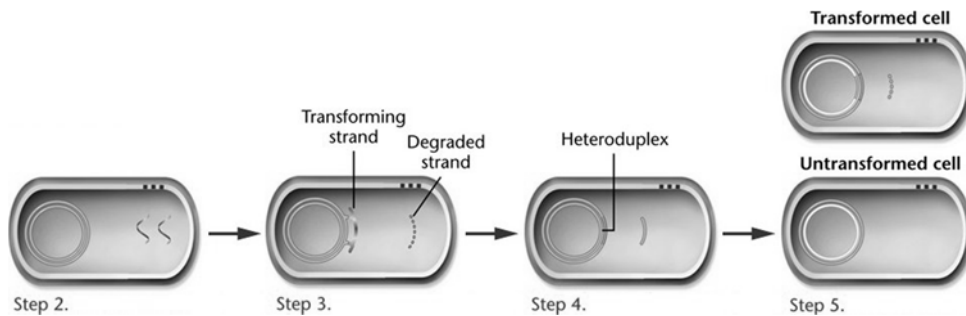


Figure 33 : Les étapes de la transformation bactérienne.

2.3 La transduction

2.3.1 Cycle lytique : Les bactériophages (virus bactériens) participent à ce mode de transfert de gènes bactériens. Ils possèdent une capsidie protéique qui protège leur génome. Lorsqu'un phage infecte une bactérie, il introduit uniquement son matériel génétique dans le cytoplasme de celle-ci. Le génome viral a la capacité de forcer la bactérie à synthétiser de nouveaux constituants viraux (acides nucléiques et protéines) qui s'assemblent en nouveaux phages. La lyse de la bactérie libère les nombreux phages produits au cours de ce cycle lytique. Ces phages sont dits virulents.

2.3.2 Cycle lysogénique : le génome viral reste dans le chromosome de la cellule hôte sans s'exprimer et il est reproduit en même temps que le chromosome bactérien. Ces phages sont dits tempérés car ils

résident dans leur hôte sans le détruire, à l'état de prophage. Cependant, les conditions de l'environnement (ex : UV) peuvent modifier cet état et déclencher la multiplication du phage (induction).

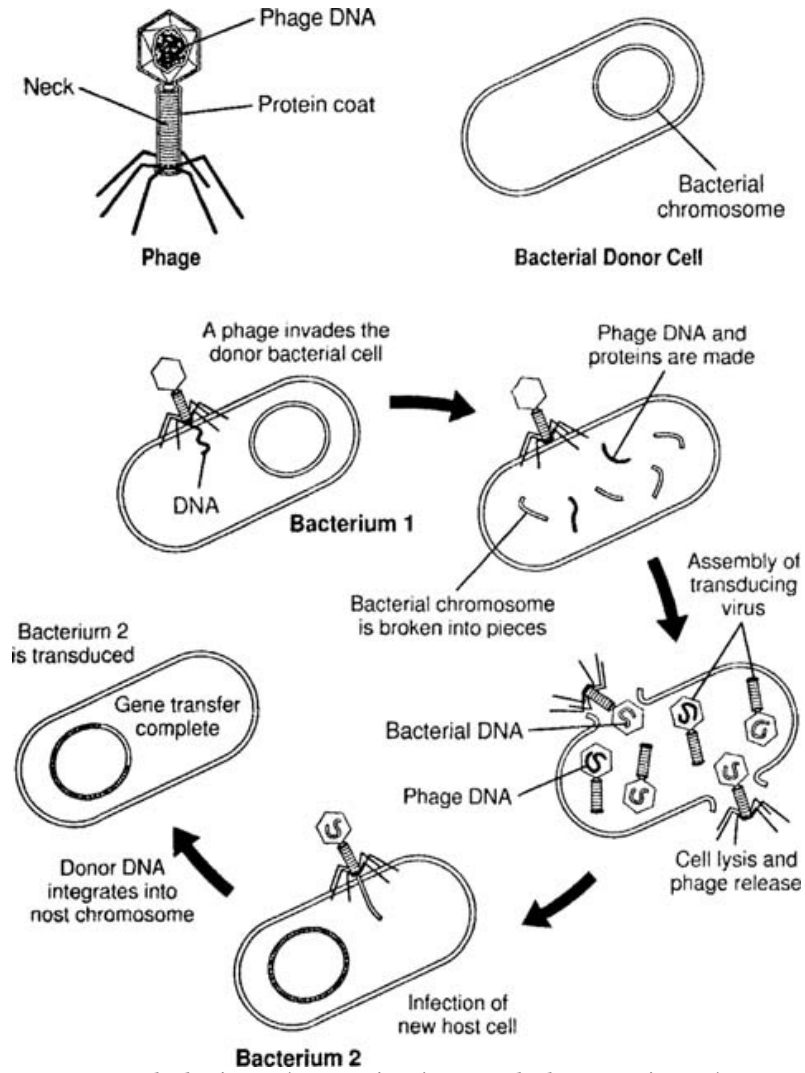


Figure 34 : Cycle lytique (Bactérie 1) et cycle lysogénique (Bactérie 2).

Chapitre 5 : Les agents antibactériens

I. DEFINITIONS

1.1. STERILISATION

C'est un procédé par lequel on détruit ou on élimine d'un objet ou d'un habitat toutes les cellules vivantes, des spores viables et des virus. Le matériel traité est dit stérile lorsque le résultat est acquis, c'est-à-dire lorsque aucun micro-organisme ne peut être revivifié ou n'est capable de se développer. Le résultat devrait être permanent, ce qui requière un emballage imperméable à toute nouvelle contamination. Les difficultés d'éviter la nouvelle contamination conduisent à définir une date de péremption. La mort ou l'inactivation pour une bactérie est bien une perte irréversible de son pouvoir de reproduction (croissance et division). Les agents utilisés pour assurer la stérilisation sont physiques (température, radiations) ou chimique.

1.2. DESINFECTION

C'est un procédé par lequel on détruit ou on élimine d'un objet ou d'un habitat tous les micro-organismes potentiellement pathogènes utilisant un produit pouvant justifier *in vitro* des propriétés autorisant à le qualifier de **désinfectant** ou d'**antiseptique**. Un objet désinfecté n'est pas nécessairement stérile. Il devrait toujours être accompagné d'un qualificatif (désinfectant des locaux, des mains, des plaies...). **Les désinfectants** sont des produits ou procédés utilisés pour la désinfection ou la décontamination, dans des conditions définies, de **supports inertes exclusivement** (sols, matériels...). Le résultat de la désinfection d'une surface inerte étant momentanée, il est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération. Les produits ayant les propriétés antimicrobiennes et toxicologiques adéquates pour un usage sur des **tissus vivants** sont appelés **antiseptiques**.

1.3. DECONTAMINATION

C'est un procédé par lequel on réduit la population microbienne à des niveaux considérés sans danger par les normes de la santé publique. L'usage du terme désinfection en synonyme de décontamination est prohibé (interdit). La décontamination diffère de la désinfection par deux points importants : d'une part, la décontamination n'implique pas obligatoirement leur élimination et d'autre part, la désinfection ne s'applique qu'aux milieux inertes alors que la décontamination peut s'appliquer aussi à des tissus vivants.

1.4. ANTISEPSIE

Un milieu est dit septique lorsqu'il contient des micro-organismes ; il est aseptique dans le cas contraire. L'antiseptie est un procédé au résultat momentanée par lequel on détruit ou on élimine des tissus vivants dans **la limite de leur tolérance** tous les micro-organismes potentiellement pathogènes. Les agents antiseptiques sont donc des substances chimiques capables de détruire les micro-organismes ou d'arrêter leur action. Le résultat de cette opération est limité à ceux présents au moment de l'application. Les antiseptiques, en raison de leur toxicité, ne peuvent être administrés à l'homme ou aux animaux par voie générale.

1.5. ASEPSIE

C'est l'ensemble des mesures propres à empêcher tout apport exogène de micro-organismes. Les traitements de désinfection, de décontamination et de stérilisation microbiennes sont des moyens de la réaliser.

1.6. SUFIXE "CIDE"

Il désigne les méthodes ou les substances capables de détruire les micro-organismes suivant leur efficacité contre un groupe spécifique (germicide, bactéricide, fongicide, virucide...).

1.7. SUFIXE "STATIQUE"

Les méthodes ou les substances qui ne tuent pas les microbes mais empêchent leur développement sont appelées bactériostatiques ou fongistatiques.

1.8. DETERGENTS

Leur action chimique décolle les salissures, dégraisse et émulsionne. Cette action est rendue possible grâce aux agents tensioactifs contenus dans les détergents. Il s'agit de produits nettoyants ne contenant pas d'agents anti-bactériens. Ces produits sont destinés aux surfaces et matériaux inertes, instruments et matériel médicochirurgical.

Les détergents sont dotés de :

- Pouvoir mouillant (humidifiant) ;
- Pouvoir dispersant (solubilisant) ;
- Pouvoir émulsionnant (préparation pharmaceutique formée de deux phases liquides dont l'une (huile, résine), insoluble dans l'autre, y est dispersée sous forme de globules) ;
- Pouvoir moussant ;
- Pouvoir dégraissant ;

Ces produits présentent la double propriété de détergence et de désinfection. Leur utilisation permet un gain de temps et une simplification du travail. Ils se caractérisent généralement par un bon pouvoir désinfectant mais une faible détergence. Les normes utilisées pour ces produits sont les mêmes que pour les produits désinfectants.

Lors de l'entretien des locaux, les produits détergents désinfectants ne sont pas rincés car ils ont besoin d'un minimum de 5 minutes de temps d'action (cf normes AFNOR : Association française de normalisation). Par contre, pour les surfaces en contact avec les denrées alimentaires, il est demandé de rincer les surfaces après avoir respecté le temps d'action du produit. L'agrément alimentaire est nécessaire si la surface à traiter est amenée à entrer en contact direct avec de l'alimentation.

1.9. CONCLUSION

On classe les agents microbiens en 2 catégories :

- **Agents physiques** au nombre de 4 avec chaleur, filtration, radiations UV et radiations ionisantes ;
- **Agents chimiques** avec les désinfectants et les antiseptiques.

II. FACTEURS CONDITIONNANT L'EFFICACITE DES AGENTS ANTI-MICROBIENS

2.1. DUREE DE L'EXPOSITION

Tous les germes présents ne vont pas être tués en même temps. On constate que plus le temps d'exposition à l'agent germicide est long plus le nombre de germes détruits est élevé.

2.2. TAILLE DE LA POPULATION

Il faudra plus de temps pour détruire une population importante que pour une population plus petite.

2.3. COMPOSITION DE POPULATION MICROBIENNE

L'efficacité d'un agent antimicrobien varie en fonction du type d'organisme traité :

- Les spores bactériennes sont les formes les plus résistantes ;
- Les cellules jeunes sont plus fragiles et sont plus faciles à détruire.

2.4. INTENSITE OU CONCENTRATION DE L'AGENT MICROBIEN

Le plus souvent, plus un agent chimique est concentré ou plus un agent physique est intense et plus les germes sont détruits rapidement dans une certaine limite. Il existe des exceptions : l'éthanol à 70° est plus efficace que celui à 90°.

2.5. TEMPERATURE

L'efficacité de l'agent chimique augmente si on élève la température.

2.6. ENVIRONNEMENT LOCAL

Certains facteurs de l'environnement vont protéger les micro-organismes ou au contraire favoriser leur destruction (température et pH).

III. AGENTS PHYSIQUES ANTI-MICROBIENS

3.1. CHALEUR

L'action de la température dépend de l'environnement, de l'état physico-chimique des cellules et de leur nombre. En solution aqueuse, la plupart des germes sous leur forme végétative sont rapidement tués à la température de 100°C. En revanche, dans un milieu déshydraté, ils sont beaucoup plus résistants. Les formes végétatives sont plus sensibles à la chaleur que les formes sporulées. Il faut une température supérieure à 100°C avec en plus 10 minutes de contact. En fin, plus le nombre de bactéries est important, plus grandes sont les difficultés de les faire disparaître.

Le pouvoir stérilisant de la chaleur évolue en fonction de différents facteurs :

- * Le temps de stérilisation est la cinétique de mortalité bactérienne : quand une culture est soumise à une température suffisamment élevée pour exercer des effets destructeurs, la décroissance de la population est exponentielle en fonction du temps. On définit D, le temps de réduction décimale, comme le temps nécessaire à une température donnée pour tuer 90% de la population bactérienne.
- * La température : l'augmentation de la température accélère le processus d'inactivation. Enfin, les procédés pratiques de stérilisation utilisent la chaleur humide ou sèche.

Les procédés de stérilisation utilisés seront :

- Autoclave (chaleur humide) ;

- Tyndallisation (cette opération, décrite par Tyndall, consiste à chauffer le milieu à 60 ou 70°C durant 30 minutes à une heure, 3 fois de suite à 24 heures d'intervalle) permet de détruire même les spores dont la dormance est levée par le choc thermique.
- Pasteurisation ;
- Chaleur sèche avec les fours Poupinel ou Pasteur.

3.2. RADIATIONS IONISANTES ET NON-IONISANTES

Ce sont les radiations solaires UV, agents naturels de stérilisation dont les principaux types sont:

- Electromagnétiques (UV, Rayons X et Rayons γ) ;
- Electroniques (émission continue d'électrons) ;
- Soniques (ultrasons).

3.3. FILTRATION

Elle permet la stérilisation des solutions qui renferment des substances thermolabiles.

Actuellement, nous avons recours aux membranes en acétate de cellulose.

Par cette méthode, les micro-organismes ne sont pas détruits mais retenus par un filtre.

IV. AGENTS ANTI-MICROBIENS CHIMIQUES

Un certain nombre de substances chimiques peuvent détruire ou empêcher le développement des micro-organismes. Ils peuvent agir par oxydation et dénaturation des protéines, par altération de la membrane cytoplasmique ou sur le métabolisme des germes.

On distingue :

- Les désinfectants = agents antimicrobiens utilisés sur les surfaces inertes.
- Les antiseptiques = agents antimicrobiens utilisés sur les tissus vivants. Ils agissent sur les différentes structures cellulaires par un effet physico-chimique **brutal et non spécifique** (à la différence des antibiotiques) qui peut aussi provoquer des lésions des cellules de l'hôte. On les utilise localement sans pénétration dans les tissus de l'hôte et certains désinfectants sont utilisés comme antiseptiques à plus faible concentration.
- Les antibiotiques = ils agissent à un moment précis de la vie bactérienne. Ils interfèrent dans diverses réactions métaboliques vitales pour les micro-organismes essentiellement par inhibition enzymatique.

4.1. DESINFECTANTS ET ANTISEPTIQUES

4.1.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques comme les crésols et les xylénols sont utilisés de nos jours comme désinfectants dans les laboratoires et les hôpitaux.

Ils agissent par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires entraînant une fuite des constituants cellulaires.

Bactéricides et fongicides, ils sont capables de tuer les bacilles tuberculeux, mais ils sont peu actifs sur les formes sporulées.

Efficacité atténuée en présence de matière organique et ils ont une durée d'action longue.

Leur odeur est désagréable et ils irritent la peau, les muqueuses respiratoires et oculaires. Ils ont aussi un effet allergisant et photo-sensibilisant.

4.1.2. Alcools

Les alcools et notamment l'éthanol (très soluble mais peu actif) sont des désinfectants et des antiseptiques très largement utilisés.

Ils agissent par dénaturation des protéines et dissolution des lipides membranaires.

Ils sont bactéricides et fongicides mais ne sont pas sporicides.

Ils peuvent aussi détruire certains virus contenant des lipides.

4.1.3. Halogènes

4.1.3.1. Chlore

C'est un désinfectant de choix de l'eau de distribution et des piscines.

Il peut être appliqué sous forme de gaz ou d'hypochlorite de sodium (mieux connu sous le nom de l'eau de Javel) ou de calcium (chlorure de chaux) qui agissent par **oxydation** des constituants cellulaires. En thérapeutique, on fait appel à des solutions d'hypochlorite plus diluées comme Dakin. En plus des hypochlorites, les chloramines sont également très répandus.

Il est bactéricide, fongicide mais pas sporicide.

Un contact de 30 minutes suffit à tuer presque tous les micro-organismes.

Les matières organiques interfèrent en réagissant avec le chlore.

4.1.3.2. Iode

C'est un antiseptique efficace de la peau mais il peut l'endommager, la tâcher et induire des allergies. Il est bactéricide et fongicide. Aussi, on utilise des iodophores comme les polyvinyles pyrrolidones iodés (Bétadine*) minimisant les risques de brûlure et d'irritation de la peau. Ceux-ci sont utilisés en hôpital pour une antiseptie préopératoire de la peau et comme désinfectant.

4.1.4. Aldéhydes

Le plus utilisé est le formaldéhyde encore appelé méthanal. L'activité des aldéhydes (formique, glutaraldéhyde, ect...) est liée à la dénaturation des protéines et des acides nucléiques par réduction chimique).

Ils détruisent très bien les bactéries. Ils sont sporicides et peuvent être employés comme stérilisants chimiques. Ils ont une excellente action sur les champignons et les virus. Cependant, leurs vapeurs sont très toxiques.

4.1.5. Ammoniums quaternaires

Ce sont des détergents cationiques.

Le plus utilisé est le chlorure de benzalkonium.

Ils agissent par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires. Ils tuent la plupart des bactéries mais ni le bacille tuberculeux ni les endospores.

Ils ont l'avantage d'être stables, non toxiques et doux.

Ils sont inactivés par les savons et sont utilisés comme antiseptiques cutanés et pour la désinfection d'ustensiles de cuisine et de petits instruments.

4.1.6. Gaz stérilisants

On utilise l'oxyde d'éthylène qui est un gaz à la fois germicide et sporicide. Il tue en se fixant aux protéines. C'est un agent stérilisant très efficace car il pénètre vite les matériaux d'emballage y compris le plastique. Il est utilisé pour stériliser les seringues à usage unique, les fils de suture et les cathéters. On utilise aussi la bétapropiolactone comme gaz stérilisant sous forme liquide. Elle sert à la stérilisation des vaccins et des sérums. Il est nettement plus actif que les antiseptiques précédents (4000 fois plus que l'oxyde d'éthylène).

4.2. ANTIBIOTIQUES

4.2.1. Historique et définition

Etymologiquement, antibiotique vient de la réunion de 2 racines grecques : anti : contre et bio : vie.

Ce sont donc des substances qui s'opposent à la vie. La chimiothérapie, c'est-à-dire l'utilisation d'agents chimiques en thérapeutique, prit son véritable essor en 1909 lorsque Ehrlich formula le principe de base suivant : pour être utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses, une substance doit être nuisible pour le micro-organisme parasite mais inoffensive pour les cellules hôtes. Elle doit être douée de toxicité sélective, les antibiotiques et les sulfamides ont cette qualité. Les antiseptiques, en dépit de leur haute activité, ne peuvent être administrés par voie générale car ils sont toxiques. Une deuxième étape fut franchie en 1935 lorsque Domagk, en Allemagne, démontra qu'un colorant diazoïque était capable de guérir les infections streptococciques expérimentales de la souris. Les travaux de l'Institut Pasteur démontrèrent que la partie active est le sulfamide. La troisième étape fut celle des antibiotiques. L'activité antagoniste de certains micro-organismes vis-à-vis d'autres micro-organismes avait été déjà signalée par Pasteur et Joubert à propos du bacille charbonneux et de sa disparition dans les urines. Cependant, l'ère véritable des antibiotiques commença en 1929 lorsque Fleming fit cette observation apparemment anodine : sur une boîte de Pétriensemencée avec des *Staphylococcus*, la présence de quelques colonies de moisissures du genre *Penicillium*, un contaminant, provoque une inhibition de la croissance des bactéries mises en culture. Il proposa d'appeler ces extraits "Pénicilline". A partir de 1939, ce fut l'âge d'or des antibiotiques qui dura jusqu'en 1959. C'est pendant cette période que les principaux antibiotiques furent découverts : la céphalosprine (à partir d'une culture de *Cephalosporium acremonium*), la streptomycine (Waksman) à partir d'une culture de *Streptomyces griseus*.

Les antibiotiques sont des substances chimiques produites par des micro-organismes ou obtenues par synthèse chimique qui détruisent ou empêchent le développement des bactéries.

Il existe également des antibiotiques antifongiques qui s'opposent aux champignons.

Tous les antibiotiques possèdent les mêmes propriétés de base :

- Activité antibactérienne ;
- Toxicité sélective envers leurs cibles sans nuire aux cellules de l'organisme ;
- Activité et stabilité dans les milieux organiques puisqu'ils doivent se maintenir dans le sang et au sein des tissus ;
- Capacité à diffuser dans les tissus de l'organisme.

Remarque : antibiose : relation biologique entre 2 ou plusieurs organismes qui s'effectue au détriment de l'un d'eux (s'oppose à la symbiose)

4.2.2. Classification

Certaines classifications se sont fondées sur le spectre d'activité : antibiotiques à large spectre ou à spectre étroit. On peut aussi grouper les antibiotiques en fonction de leur site d'action (paroi, membrane, acides nucléiques, protéines, etc.). En général, c'est la classification chimique qui est le plus utilisée. La classification actuelle des antibiotiques repose sur la notion de famille.

Une famille d'antibiotique regroupe des molécules qui ont en commun :

- Une analogie de structure chimique ;
- Un même mode d'action antibactérien ;
- Des effets secondaires semblables ;
- Souvent, une résistance bactérienne croisée entre eux.

Il existe de nombreuses familles d'antibiotiques :

- Les bêta-lactamines (Pénicillines, Céphalosporines) ;
- Les aminosides (Ex. Streptomycine) ;
- Les tétracyclines (Ex. Doxycycline) ;
- Les macrolides (Ex. Erythromycine, Spiramycine).
- Les phénicolés (Ex. Chloramphénicol) ;
- Les quinolones (antibiotiques de synthèse) ;
- Les sulfamides ;

4.2.3. Modes d'action

Schématiquement, l'action antibactérienne des antibiotiques s'effectue selon 4 mécanismes principaux :

- Inhibition de la synthèse des constituants de la paroi (Bétalactamines) ;
- Blocage de la synthèse des protéines (aminosides, Tétracyclines et Macrolides) ;
- Blocage de la synthèse des acides nucléiques (Quinolones, Sulfamides) ;
- Altération de la membrane cytoplasmique des bactéries (Polypeptides) ;

Conclusion : chaque famille d'antibiotique a un mode d'action différent.

4.2.4. Notion de spectre

À chaque antibiotique est associée une liste d'espèces bactériennes qui constitue le "spectre d'activité" de la molécule. Le spectre naturel, établi dans les premières études avant tout emploi en thérapeutique, reste stable par définition puisqu'il ne prend pas en compte la proportion de bactéries

ayant acquis une résistance à l'antibiotique après son utilisation. Cette proportion augmente au cours du temps parce que l'emploi de l'antibiotique exerce la pression de sélection nécessaire à l'émergence de mutants ou de souches porteuses de facteurs extra-chromosomiques de résistance. Cette notion doit être connue du clinicien car elle explique des situations d'apparence paradoxale : par exemple, le spectre naturel de la pénicilline G comprend *Staphylococcus aureus* alors que 90% des souches sont actuellement résistantes par production de pénicillinase.

Pour faciliter le choix d'un traitement antibiotique, les espèces bactériennes ont été réparties en 3 classes :

4.2.4.1. Les espèces habituellement sensibles : il s'agit d'espèces répondant à la répartition suivante : 90% ou plus des souches sont caractérisées par des **CMI** < **c** (concentration critique basse). Moins de 10 % des souches sont résistantes ou de sensibilité diminuée. Ex : pénicilline G et streptocoque du groupe A.

4.2.4.2. Les espèces modérément sensibles : il s'agit d'espèces dont la sensibilité naturelle n'a pas été modifiée par la résistance mais qui sont habituellement classées I par l'antibiogramme : 90% et plus des souches se situent dans la catégorie **I**. Le classement ne dépend pas d'un mécanisme de résistance acquis (dont la fréquence peut évoluer), mais d'un caractère propre à l'espèce. Ex : macrolides et *Haemophilus influenzae*.

4.2.4.3. Les espèces résistantes : il s'agit d'espèces pour lesquelles plus de 50% des souches sont résistantes. Cette résistance peut être naturelle ou acquise. L'antibiogramme ne fait que confirmer la résistance s'il s'agit d'une résistance naturelle ; il permet de suivre son évolution s'il s'agit d'un mécanisme acquis. CMI de l'antibiotique testé est supérieure à la concentration critique haute **C**. Ex : pénicilline G et *S. aureus* / aminosides et streptocoques.

4.2.5. Interaction entre antibiotiques

En plus du fait que certaines molécules inhibent ou au contraire exacerbent l'effet des antibiotiques (acide, sucre, thymine, etc...), les différents antibiotiques peuvent interagir entre eux. Trois grands types d'interactions peuvent être définis :

- La synergie : chaque antibiotique voit son action augmentée par l'autre ;
- L'antagonisme : les effets des deux antibiotiques se contrarient ;
- L'indifférence : que l'on utilise chaque antibiotique séparément ou en association, le résultat est le même.

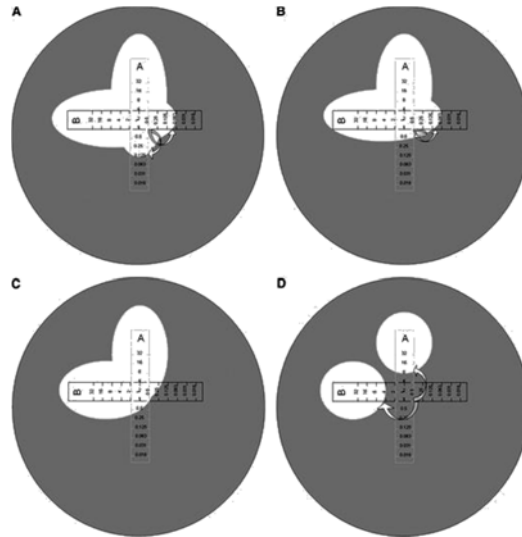


Figure 35 : Interaction entre antibiotiques (A : Synergie ; B : Additivité ; C : Indifférence ; D : antagonisme).

4.2.6. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance sont :

- L'absence de pénétration, elle dépend souvent de la modification des porines. On peut aussi assister à une excrétion active de l'antibiotique au fur et à mesure de son entrée dans la cellule.
- Modification de la cible ;
- Production d'enzymes susceptibles de dégrader l'antibiotique ;
- Changement de voie métabolique.

Il existe 2 types de résistance :

4.2.6.1. Résistance naturelle

Elle préexiste chez le germe.

En fait, le germe est insensible à l'action de l'antibiotique car celui-ci ne trouve pas de sites d'action sur le germe.

L'étude des résistances naturelles des bactéries permet de définir le spectre d'activité d'un antibiotique c'est-à-dire de déterminer sur quel germe il peut agir ou non.

4.2.6.2. Résistance acquise

Une bactérie est résistante à un antibiotique lorsqu'elle peut croître et se développer en sa présence. Une souche est dite résistante à un antibiotique lorsque une modification de son capital génétique lui permet de tolérer des concentrations d'antibiotique nettement plus élevées que celles qui inhibent la croissance de la majorité des autres souches de la même espèce dite sensibles. Elle apparaît soudainement chez des bactéries jusque-là sensibles aux antibiotiques. Deux mécanismes sont possibles :

- Une mutation chromosomique de la bactérie : phénomène rare.
- Une transmission d'un plasmide de résistance : phénomène beaucoup plus fréquent qui représente 90% des résistances acquises. Certaines bactéries possèdent du matériel génétique supplémentaire appelé plasmide. Le plasmide est constitué d'un ensemble de gènes correspondant à un ou plusieurs facteurs de

résistance, le plus souvent des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques. La transmission peut se faire:

- Par transformation : expérience de Griffith ;
- Par conjugaison : plasmide transmis d'une bactérie à l'autre par un pili ;
- Par transduction : plasmide transmis d'une bactérie à l'autre par l'intermédiaire d'un virus infectant la bactérie, le bactériophage jouant le rôle de vecteur ;

Un même plasmide peut se transmettre à une cellule bactérienne fille, à des bactéries de même espèce ou à des bactéries d'espèces différentes : un germe peut donc devenir multi-résistant aux antibiotiques ;

4.2.6.3. Concentration minimale inhibitrice et valeur critique

Il est fondamental de mesurer l'activité des antibiotiques :

- Pour sélectionner, in vitro, le ou les antibiotiques actifs sur une bactérie identifiée ou non ;
- Pour agir vite et éviter la prolifération microbienne et la septicémie.

Après isolement d'une souche bactérienne, le paramètre le plus utilisé pour évaluer in vitro sa sensibilité à un antibiotique est la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) : c'est la plus faible concentration d'une gamme de dilution qui entraîne une inhibition de toute croissance visible en 18 à 24 h dans des conditions de passe bien définies exprimées en $\mu\text{g}/\text{mL}$. Il est à noter que le même nombre de bactéries soit inoculé et seule la concentration en antibiotiques varie.

La concentration minimale bactéricide, ou CMB, est la plus petite concentration aboutissant à une destruction notable de l'inoculum bactérien (par définition, 0,01 % de survivants).

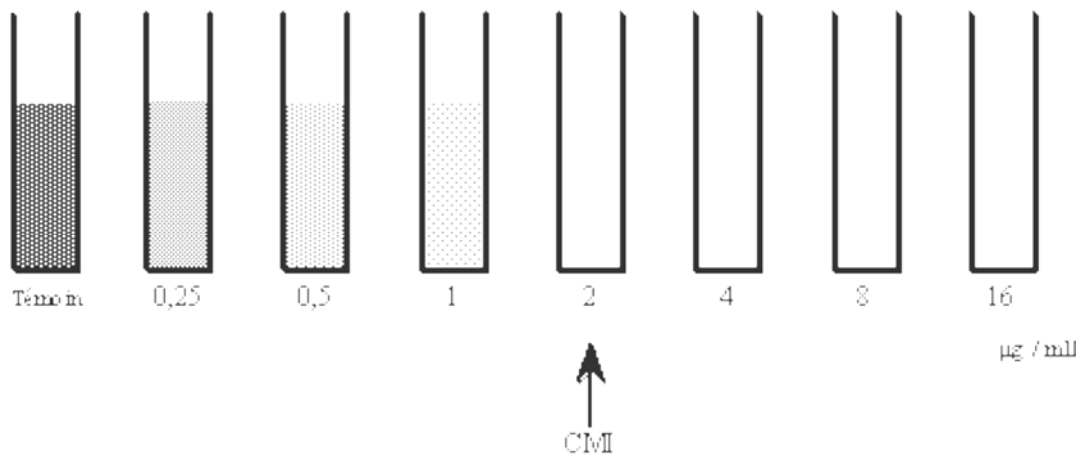


Figure 36 : Antibiogramme par dilution.

En plus de la méthode d'antibiogramme par dilution, il existe une autre méthode plus facile c'est la technique de diffusion sur gélose (Mueller Hinton. Cette technique consiste à placer des disques de buvard imprégnés d'antibiotiques est les déposer sur la gélose où pousse une culture bactérienne à étudier.

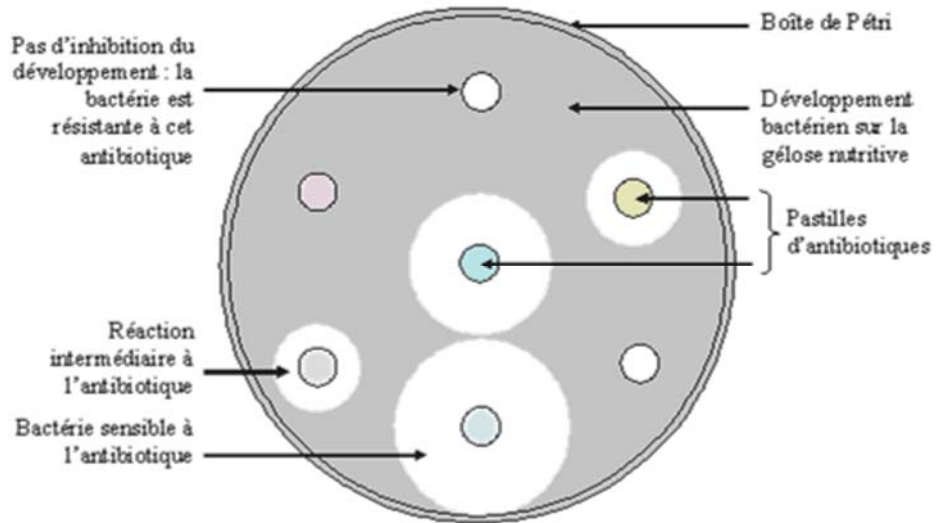


Figure 37 : Schéma représentant un antibiogramme avec différents degrés de sensibilité de la souche bactérienne aux antibiotiques testés.

Chapitre 6 : Virulence bactérienne

1. Les Différents types de relations hôte-bactérie

La plupart des bactéries mènent une vie indépendante d'un autre organisme vivant. Elles sont appelées des saprophytes. Elles vivent dans l'environnement ou elles assurent la destruction des déchets organiques.

D'autres bactéries sont des parasites car elles vont trouver les conditions nécessaires à leur croissance à la surface ou à l'intérieur d'un autre organisme vivant. Diverses relations biologiques peuvent s'établir entre la bactérie et son hôte :

- La symbiose est le mode de relation au cours duquel bactérie et hôte profitent tous deux de leur association.
- Le commensalisme est un second type de relation où l'hôte et la bactérie vivent en association étroite et constante sans bénéfice, ni désavantage. Les flores adaptées à l'homme sont appelées commensales.
- Le parasitisme : la bactérie parasite tire un bénéfice substantiel de l'hôte qui, lui n'en tire aucun. Les bactéries facultatives sont celles qui peuvent vivre en dehors de l'hôte.
- Les bactéries parasites obligatoires sont incapables de se multiplier dans des conditions naturelles en dehors de leur hôte. Les bactéries parasites pathogènes sont celles qui possèdent vis-à-vis de leur hôte un pouvoir agressif et qui provoquent chez ce dernier une série de troubles. L'hôte va alors opposer à cette agression divers mécanismes de défense ou immunité. On distingue un pathogène spécifique qui provoque une maladie bien caractéristique (*M. tuberculosis* et tuberculose) et un pathogène opportuniste qui n'est virulent que si l'hôte est affaibli.

2. Les sources de l'infection

Pour les maladies bactériennes, les sources de contamination et les voies de transmission, les plus fréquentes sont :

- La surface infectée de l'individu malade ou porteur sain asymptomatique.
- Les objets inanimés. La transmission vers des surfaces saines non infectées se fait par contact avec ces objets (contagion indirecte) :
- Le sol. Il ne s'agit pas de contagion au sens strict du terme.
- La nourriture et eau. Il ne s'agit pas non plus de contagion au sens strict du terme.
- L'air. La contagion, par cette voie, peut se faire à distance plus ou moins grande selon la survie des bactéries dans le milieu extérieur. La surface intacte est souvent la muqueuse respiratoire, parfois la muqueuse conjonctivale.
- Les arthropodes piqueurs. Il s'agit ici d'hôtes intermédiaires obligés pour ces quelques bactéries, chez lesquels elles suivent un cycle biologique intra- ou extracellulaire et sans lesquels elles ne peuvent exercer leur pouvoir pathogène chez les hôtes ;
- Infections à partir des flores commensales résidentes. Les flores commensales comprennent naturellement, ou chez des porteurs sains, des bactéries potentiellement pathogènes, qui n'attendent que des circonstances adjuvantes favorables pour déclencher une maladie.

3. Les facteurs de virulence

La virulence est l'aptitude qu'a un micro-organisme de se développer dans les tissus de l'hôte et de produire des troubles morbides (maladie). Elle est fonction de la bactérie et de l'hôte.

3.1 Facteurs liés à la bactérie

Pour une bactérie donnée, la virulence n'est pas définitivement fixée et présente des variations :

- L'atténuation de la virulence : Peut être spontanée comme dans la conservation au laboratoire. Cette atténuation peut-être également obtenue par différents procédés : le vieillissement, la chaleur, la dessiccation lente, les repiquages fréquents (cas du BCG Calmette et Guérin).
- L'exaltation de la virulence : Pour augmenter la virulence il faut effectuer des passages répétés de la bactérie sur un animal réactif : ex. streptocoque de lapin à lapin.

Chez l'homme au cours de certaines épidémies, les premiers cas sont bénins, mais l'infection devient grave en fin d'épidémie après avoir été transmise entre patients un grand nombre de fois.

3.2 Facteurs liés à l'hôte

La virulence d'une espèce bactérienne est différente d'une espèce d'hôte à l'autre. Il existe des espèces réfractaires comme la poule vis-à-vis du charbon d'autres au contraire, sont très sensibles comme la souris au pneumocoque ou le cobaye au bacille tuberculeux.

Dans une espèce donnée, tous les individus ne présentent pas la même sensibilité : le jeune âge, certaines malformations anatomiques, la malnutrition, l'effort musculaire, la fatigue, l'état général déficient, les maladies sévères concomitantes (cancers), les interventions chirurgicales majeures (greffes), l'immunodépression... sont des facteurs qui prédisposent aux infections.

3.3 Facteurs liés à l'environnement

Certaines conditions climatiques sont des facteurs capitaux qui jouent un rôle déclenchant dans certaines infections.

4. Les étapes de la virulence bactérienne

4.1. La colonisation des surfaces muqueuses et cutanées

Les organismes pathogènes ont des systèmes d'attachement. Les plus fréquents fonctionnent grâce à des protéines de surfaces, les adhésines qui reconnaissent au niveau des muqueuses colonisées des récepteurs spécifiques. On distingue :

- Des adhésines fimbriales ou pili communs. Des protéines (adhésines) sont intercalées dans la structure ou l'extrémité du pili et assurent la fixation spécifique de la bactérie sur certains récepteurs cellulaires. Ceci explique la spécificité de tissus de certains organismes pathogènes.
- Des adhésines non fimbriales : adhésines d'enveloppe non incluses dans une structure piliée.
- Le glycocalyx structure de surface polysaccharidique et protéique en réseau qui reconnaît des structures analogues complémentaires à la surface des cellules.
- Les biofilms : ensemble de cellules bactériennes appartenant à des espèces différentes et colonisant une surface vivante ou inerte.

4.2. Invasion et installation intracellulaire

Après fixation à une muqueuse, certaines bactéries peuvent entrer dans la cellule par internalisation. En général, la bactérie provoque son internalisation en adressant un message à la cellule hôte, qui engage une phagocytose active. Des protéines de membrane (invasines) provoquent au point de contact un remaniement du cytosquelette qui aboutit à la formation de pseudopodes qui englobent la bactérie.

Par exemple, après leur internalisation, les *Listeria* et les *Shigella* s'échappent du phagolysosome grâce à une lysine qui détruit les membranes phagosomiales. Dans le cytoplasme, la bactérie se multiplie à l'abri des défenses naturelles et de nombreux antibiotiques. Elle utilise l'actine pour se déplacer et passer d'une cellule à l'autre.

D'autres facteurs peuvent aussi intervenir dans l'invasion et l'installation intracellulaire des bactéries tels que :

- La mobilité : qui augmente la probabilité de contact cellule/bactérie. Les bactéries adaptées au mucus qui colonisent les surfaces muqueuses sont souvent spiralées et mobiles dans les milieux visqueux.
- L'acquisition du fer : Facteur de croissance essentiel pour la synthèse de co-enzyme d'oxydo-réduction, le fer est en quantité faible dans l'environnement. Pour le capter, la bactérie élabore des molécules de sidérophores qui le captent et entrent en compétition avec les transporteurs de fer de l'organisme de l'hôte.

4.3. L'effet toxique (Facteurs d'agression)

Ils provoquent directement des effets délétères sur les tissus de l'hôte. On distingue:

4.3.1 Les exotoxines : Ce sont des protéines thermolabiles, qui sont libérées dans le milieu extérieur pendant la croissance bactérienne. On distingue 2 types principaux :

- Les A-B toxines : Exemple : toxine cholérique, l'entérotoxine d'*E. coli*, les toxines diphtériques, tétaniques. Elles sont formées de 2 types de sous unités protéiques A et B.

La sous-unité B est la partie qui assure la fixation de la molécule de toxine sur un récepteur de la membrane cellulaire. La sous-unité A est la partie biologiquement active. Elle pénètre dans la cellule et clive le radical ADP ribosyl d'un NAD qu'elle fixe sur une protéine cellulaire.

- Les toxines cytolytiques : Elles lysent les membranes cellulaires ou phagosomiales. Les hémolysines s'insèrent dans les membranes des hématies et provoquent une lyse osmotique de la cellule et une hémolyse (ex. streptolysine).

Les phospholipases clivent l'extrémité hydrophile des phospholipides de membrane et désorganisent la structure membranaire.

4.3.2 Les endotoxines : C'est essentiellement le LPS libéré par la lyse bactérienne au cours de l'infection et qui diffuse dans l'organisme. Elles sont inflammatoires, pyrogènes et vasculotropes. La libération de LPS est responsable de la fièvre et de syndromes de choc septique qui surviennent au cours des septicémies à bactérie à Gram négatif. Ils se caractérisent par des anomalies circulatoires, des troubles dans la coagulation, responsables d'hémorragie et de l'activation du complément.

4.3.3 Composés bactériens qui induisent une réponse auto-immune : Certains composés bactériens ont des épitopes communs avec les cellules de l'hôte. Les anticorps qu'ils induisent reconnaissent également les antigènes de l'hôte. Ces anticorps provoquent des lésions des tissus concernés par l'intermédiaire d'effecteurs comme le complément.

4.3.4 Enzymes hydrolytiques : Ce sont des enzymes comme les DNases, les hyaluronidases, les protéases qui vont désorganiser les tissus et aider à la diffusion locale des bactéries.

Des bactéries ont des composés de surface qui ressemblent à certains antigènes de l'hôte, entraînant une tolérance vis-à-vis du système immunitaire.

Certaines s'enroulent de protéines de l'hôte trompant ainsi les éléments de reconnaissance des antigènes n'appartenant pas à l'hôte.

4.4 Echappement aux défenses naturelles

On distingue :

4.4.1 L'échappement à la phagocytose et au complément : Les capsules et protéines de surface s'opposent aux premiers stades de la phagocytose (adhésion des bactéries sur les phagocytes). Des protéines de surfaces inhibent la fixation et l'activation du complément. D'autres facteurs inhibent le chimiotactisme des phagocytes, d'autres sont des toxines qui lysent les phagocytes (leucocidines des staphylocoques).

4.4.2 Survivance à la phagocytose : Certaines bactéries s'échappent du phagosome après avoir été internalisées (ex : *Listeria*). D'autres inhibent la fusion phago-lysosomiale (ex : *Mycobactéries*). D'autres inhibent les réactions métaboliques du « burst oxydatif » ce qui empêche la libération des dérivés réactifs de l'oxygène, comme l'ion superoxyde O_2^- et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui dans le phago-lysosome assurent la destruction des bactéries phagocytées.

4.4.3 Echappement à la réponse anticorps : Certaines bactéries peuvent faire varier la spécificité de leurs antigènes de surface (variations antigéniques) ce qui rend la réponse anticorps inadaptée. Une nouvelle réponse se met en place, elle est adaptée aux nouveaux antigènes, mais l'élimination des bactéries s'en trouve retardée. Ce phénomène est décrit chez *Neisseria* et *Salmonella*.

Des bactéries ont des composés de surface qui ressemblent à certains antigènes de l'hôte, entraînant une tolérance vis - à - vis du système immunitaire.

Certaines s'enrobent de protéines de l'hôte trompant ainsi les éléments de reconnaissance des antigènes n'appartenant pas à l'hôte.

Certaines sont capables de détruire, par l'action de protéases, les IgA protectrices des muqueuses.

5. Issue de l'infection

Le contact entre un hôte et une bactérie pathogène peut donner lieu à divers développements, selon un ensemble de paramètres, en fonction de l'hôte, de la bactérie, de l'environnement (densité de population, poussières, litière, ...) et des conditions environnementales (température, vent, ...).

3.1. Absence de maladie

Il est très possible que la bactérie soit éliminée par l'organisme hôte avant que des lésions ne se développent (avant l'apparition des signes cliniques), donc avant qu'une maladie n'apparaisse. Cet état

peut ou non être différent de celui de porteur asymptomatique, car la bactérie peut être éliminée totalement et ne pas persister chez l'hôte, qui n'est donc pas, dans ce cas précis, contagieux pour son environnement ou ses congénères.

3.2. Maladie

Dans de nombreux cas, l'organisme infectieux n'est pas éliminé et une maladie survient. Le développement de cette maladie est variable en fonction de la rapidité et de l'intensité des lésions.

3.2.1. *Suraigu*

La résistance de l'hôte est vaincue très rapidement (en quelques heures) et l'organisme pathogène se multiplie partout. La mort de l'hôte survient très vite (mort subite). Les signes cliniques n'ont pas eu le temps d'apparaître. La bactérie infectieuse n'a pas toujours eu le temps d'être excrétée en grand nombre, mais le cadavre est très infectieux.

3.2.2. *Aigu*

L'organisme pathogène vainc la résistance de l'hôte moins rapidement. La mort survient plus ou moins rapidement (en deux à trois jours). Auparavant, l'organisme infectieux aura été excrété dans les sécrétions et excréments de l'hôte, selon un schéma variable en fonction de l'organisme et l'hôte, et la maladie se répand rapidement dans le groupe. Les cadavres sont aussi très infectieux.

3.2.3. *Subaigu*

L'organisme pathogène n'arrive pas à vaincre rapidement la résistance de l'hôte. L'évolution se fait sur plusieurs jours, voire deux semaines. Les signes cliniques sont moins intenses que dans la forme aiguë. L'excrétion de la bactérie pathogène est plus longue, mais à niveau plus bas.

3.2.4. *Chronique*

La chronicité se définit comme une maladie qui dure plus de 40 jours. Soit l'hôte a bien résisté à la phase aiguë de l'infection bactérienne, mais la guérison tarde à venir ; soit l'infection progresse naturellement très lentement. Dans le premier cas, des lésions dites chroniques (**fibrose**, c'est-à-dire remplacement des tissus « nobles » fonctionnels par du tissu conjonctif non fonctionnel) sont présentes, éventuellement génératrices de signes cliniques à vie (perte de la fonction rénale, par exemple). Mais le processus infectieux lui-même est arrêté et l'hôte n'est plus contagieux pour son environnement, sauf s'il reste porteur de la bactérie (porteur convalescent). Dans le second cas, le processus infectieux se poursuit, le plus fréquemment, **par paliers** (périodes d'équilibre et d'expansion, comme dans la tuberculose). L'issue finale sera la mort, en absence de traitement et l'hôte reste contagieux pour son entourage.

3.3. Mort de l'hôte

La mort de l'hôte peut être une conséquence directe ou indirecte de la toxicité de la bactérie et du développement des lésions :

- Choc septique lors de septicémies ;
- Abcès cérébral mal localisé ;
- Blocage de la filtration rénale ;

Endocardite (à *Streptococcus suis* par exemple) avec décompensation cardiaque ;

Déshydratation (diarrhée néonatale à *E. coli*) ;

Paralysie des muscles respiratoires (tétanos et botulisme) ;

Déchéance progressive lors de tuberculose ; etc

3.4. Guérison

Que ce soit naturellement, ou avec l'aide de médicaments, l'individu infecté par une bactérie pathogène peut guérir. Il faut différencier la guérison clinique (disparition des signes cliniques et des lésions) de la guérison bactérienne. En effet, après guérison d'une infection clinique, certains individus vont continuer d'excréter des bactéries pendant un certain temps (cas des porteurs convalescents et guéris). Ils restent contagieux pour leurs congénères.

Le médecin peut aider l'hôte à guérir par l'administration de médicaments « classiques », qui vont pendant un certain temps pallier à la défaillance de certaines fonctions physiologiques perturbées (réhydratation dans les problèmes de diarrhées par exemple) ; mais aussi dans le cas des maladies virales, bactériennes et parasitaires, par l'administration de molécules à activité dirigée contre ces organismes infectieux : les antiviraux, les antibactériens (antibiotiques et antiseptiques) et les antiparasitaires.