

Chapitre 1 : Le monde microbien

Les microbes aussi appelés microorganismes, sont des êtres vivants qui sont trop petits pour être visibles à l'œil nu. Le groupe comprend les bactéries, les mycètes (levures et moisissures), les protozoaires, les algues microscopiques et les virus.

La majorité des microorganismes jouent un rôle indispensable dans le bien être des êtres vivants en participant au maintien de l'équilibre écologique entre les organismes vivants et les composants chimiques dans l'environnement.

Nous savons aujourd'hui que les microorganismes sont présents partout. Toutefois il n'y a pas longtemps avant l'invention du microscope, les microbes étaient inconnus des scientifiques.

Nous pouvons entrevoir comment les idées actuelles en microbiologie ont pris forme en rappelant quelques-uns des événements marquants qui ont changé notre vie dans ce domaine.

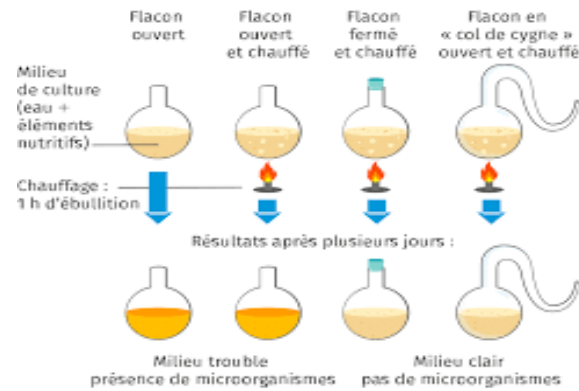
1-1. Historique de la microbiologie

Robert Hooke et la théorie cellulaire, en 1665 à l'aide d'un microscope plutôt primitif Hooke annonce au monde que la plus petite unité structurale de l'être vivant est une « cellule »

Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723), concepteur du microscope le plus simple, c'est-à-dire la loupe, révéla au monde scientifique la diversité des microorganismes et l'incroyable richesse des milieux naturels comme l'eau en protozoaires, algues, levures, bactéries... il décrivit ainsi le grouillement d'une infinie variété d'animalcules mobiles ou immobiles, en forme de sphère, bâtonnet, spirilles...

A la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, beaucoup de scientifiques et philosophes croient que certains êtres vivants peuvent être engendrés « spontanément » à partir de la matière non vivante, ce processus hypothétique, appelé théorie de la génération spontanée.

Et à cette époque que Louis Pasteur réfute les thèses en cours sur la génération spontanée en montrant la présence de germes dans l'atmosphère, leur destruction par la chaleur et leur rétention dans ses fameux ballons à col-de-cygne. Les organismes et les microorganismes ne peuvent donc apparaître spontanément, mais ils existent autour de nous dans l'air, l'eau, la terre....



Expérience de Pasteur qui acheva la théorie de la génération spontanée

Lois Pasteur et Robert Koch (1843-1910) sont les véritables fondateurs de la bactériologie médicale.

Koch découvre des bactéries en forme de bâtonnets « *Bacillus anthracis* » dans le sang de bovins morts du charbon.

Dans un célèbre mémoire, Koch énonce les fameuses règles connues sous le nom de Postulats de Koch, il établit une suite d'étapes expérimentales pour relier directement un microbe spécifique à une maladie spécifique.

C'est à Koch et ses collaborateurs (comme Erlich, Gaffky, Nocard...) que l'on doit aussi d'avoir mis au point toutes les techniques d'isolement et d'identification des bactéries.

1-2. Classification : place des microorganismes dans le monde vivant

Avant la découverte des microorganismes, tous les êtres vivants étaient classés soit dans le règne animal, soit dans le règne végétal.

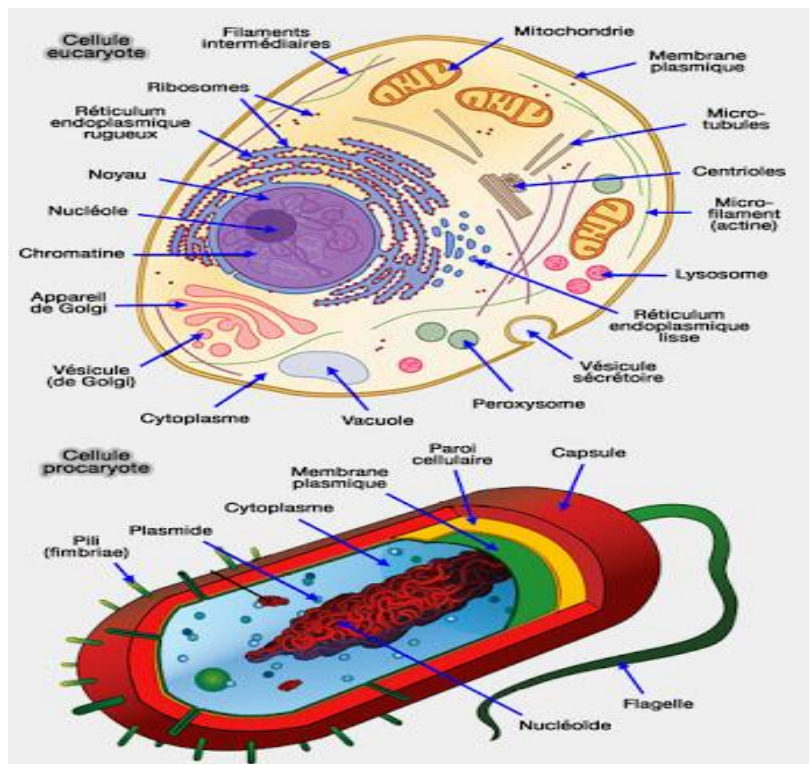
Avec la découverte des êtres microscopiques, il devient nécessaire de mettre au point un nouveau système de classification.

Cependant, il fallut attendre la fin des années 1960 (Whittaker, 1969) pour que les biologistes s'entendent sur les critères à employer pour classer les nouveaux organismes qu'ils découvraient.

En 1886, Haecke proposa une solution logique en créant pour ces formes microscopiques un troisième règne, celui des protistes, qui rassemble les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries.

La distinction entre la cellule eucaryote et la cellule procaryote :

En 1937 et grâce à l'invention du microscope électronique, Edward Chatton mis en opposition deux types de cellules, la cellule eucaryote (présence d'une membrane nucléaire délimitant le matériel génétique en plus d'organites cellulaires) et la cellule procaryote (absence d'un vrai noyau, le matériel génétique n'est pas entouré d'une membrane nucléaire).



Organisation de la cellule animale (eucaryote) et de la cellule bactérienne (procaryote)

Le tableau suivant résume les caractéristiques des eucaryotes et des procaryotes tout en faisant apparaître les caractères de différenciation.

Tableau I : Caractères de différenciations entre Eucaryotes et Procaryotes

Caractéristiques	Cellule Procaryote	Cellule Eucaryote
Taille typique	1-10 µm	10-100 µm
Type de noyau	nucléotide (pas de véritable noyau)	vrai noyau avec double membrane
Division de la cellule	division simple	mitose (réplication de la cellule) méiose (menant à la formation de gamètes)
Organisation génétique		
Membrane nucléaire	Non	oui
Nombre de chromosomes	1 chromosome (Haploïde)	Plusieurs chromosomes Diploïde)
Chromosome circulaire	Oui	non
Histones	Non	oui
Nucléole	Non	oui
Echange génétique	transfert unidirectionnel	fusion de gamètes
ARN et synthèse des protéines	couplé au cytoplasme	synthèse d'ARN dans le noyau synthèse de protéines dans le cytoplasme
Premier acide aminé initiant la synthèse d'une chaîne polypeptidique	méthionine ou N-formylméthionine	méthionine
Structures cellulaires et organites		
Réticulum endoplasmique	Non	oui
Appareil de Golgi	Non	oui
Lysosomes	Non	oui
Mitochondries	Non	oui
Chloroplastes	Non	oui chez les plantes
Microtubules	Non	oui
Paroi cellulaire avec peptidoglycane	Oui	non
Présence de stérols dans les membranes	Non	oui
Endospores	oui, parfois	non
Taille des ribosomes	70 S	80 S, sauf mitochondries et chloroplastes
Localisation des ribosomes	dispersés dans le cytoplasme	dispersés dans le cytoplasme ou liés au réticulum endoplasmique
Constantes de sédimentation des ARN ribosomaux	16S, 23S, 5S	18S, 28S, 5,8S, 5S
Attributs fonctionnels		
Phagocytose	Non	oui, parfois
Pinocytose	Non	oui, parfois
Flux cytoplasmique	Non	oui
Mouvement de la cellule	flagelles faites de flagelline	flagelle et cils faits de tubuline
Site du transport des électrons	membrane cellulaire	membrane des organites

Classification selon Murray :

En 1968, Murray divise le monde vivant en deux règnes : celui des *Eucaryotae* et celui des *Procaryotae* (ou *Monera*). Au sein du règne des procaryotes, Murray distinguait quatre divisions :

La division des **Gracilicutes**, regroupant les bactéries à Gram négatif.

La division des **Firmicutes**, regroupant les bactéries à Gram positif.

La division des **Tenericutes**, regroupant les bactéries dépourvues de paroi.

La division des **Mendosicutes**, regroupant les Archéobactéries.

En 1978, Carl Woese proposa un système de classification fondé sur l'organisation cellulaire des êtres vivants, il regroupa tous les organismes en trois domaines de la façon suivante :

Bactéries (*Eubacteria*), présence d'une paroi pourvue de peptidoglycane

Archéobactéries (*Archaeae*), paroi de structure spéciale différente de la paroi des eubactéries,

Eucaryotes, qui englobent les groupes suivants :

Protistes (protistes fongiformes, protozoaires et algues)

Mycètes (levures, moisissures...)

Plantes (Plantes à fleurs, fougères...)

Animaux (éponges, insectes, vertébrés...)

Chapitre 2 : La cellule bactérienne

Les bactéries sont les plus petits organismes connus doués de métabolisme et capables de croître et de se diviser aux dépens de substances nutritives. Leur diamètre est habituellement d'environ 1µm.

2-1. Observation de la cellule bactérienne

Observation entre lame et lamelle, dite à l'état frais, de microorganismes en milieu liquide permet l'observation de la forme, taille des cellules ainsi que le mode de groupement et la mobilité. Sa variante, la coloration à l'encre de Chine, assure la mise en évidence de la capsule.

Observation de frottis séchés, fixés et colorés. Les colorations de Gram, de Ziehl Nielsen et autres font apparaître spécifiquement les cils, les spores... Les frottis sont examinés à l'immersion en plaçant une goutte d'huile spéciale entre la lentille de l'objectif et la préparation afin d'obtenir une image plus nette.

Pour observer des structures de l'ordre de 5nm à 10nm, on utilise la microscopie électronique.

Les immunocytochimiques, permettent de localiser dans la cellule des molécules bactériennes. On utilise des anticorps marqués par la peroxydase, la biotine ou des molécules fluorescentes comme la fluoresceine.

2-2. La séparation des constituants cellulaires

On utilise différentes techniques de séparations, après avoir lysé (casser) les différentes enveloppes cellulaires (membranes, paroi...) avec des techniques chimiques, enzymatiques ou physiques (détergents, lysozymes, pression osmotique, broyage, ultrasons...). On utilise la centrifugation, ultracentrifugation (différentielles) sur gradient de densité (ex. gradient de saccharose) pour séparer les différents organites cellulaires.

2-3. La composition chimique d'une bactérie :

Tableau II : Constitution chimique des bactéries (C. Senez, Microbiologie générale. Doin, Paris)

Teneur en eau (% du poids) : *Escherichia coli* 73-78

Composition élémentaire d'*Escherichia coli*

Elément	% du poids sec
Carbone	50 + ou - 5
Azote :	10.3
Par Kjeldahl	15
par analyse isotopique (Roberts et coll.)	
Phosphore	3.2
Soufre	1.1
Cendres (total)	12.75
Sels fixes (non extractibles par l'eau)	7.25
Sels libres (extractibles)	5.5
Macromolécules	
Protéines	50
Acides nucléiques (ADN)	3-4
ARN	10
Polysaccharides	4-9
Lipides	10-15
Pool de métabolites	
Acides aminés, nucléotides libres, sucres, acides organiques, esters, oligopeptides, ATP, vitamines, coenzymes	

2-4. Taille, forme et groupement des cellules bactériennes :

Il y a une très grande diversité de tailles et de formes de bactéries. La plupart d'entre elles ont de 0.2 à 2 ;0 µm de diamètre et de 2 à 8 µm de long.

Les cellules bactériennes individuelles présentent trois formes principales, la forme sphérique des cocci (coccus au singulier : grain), la forme en bâtonnet des bacilles (=baguette) et la forme en spirale.

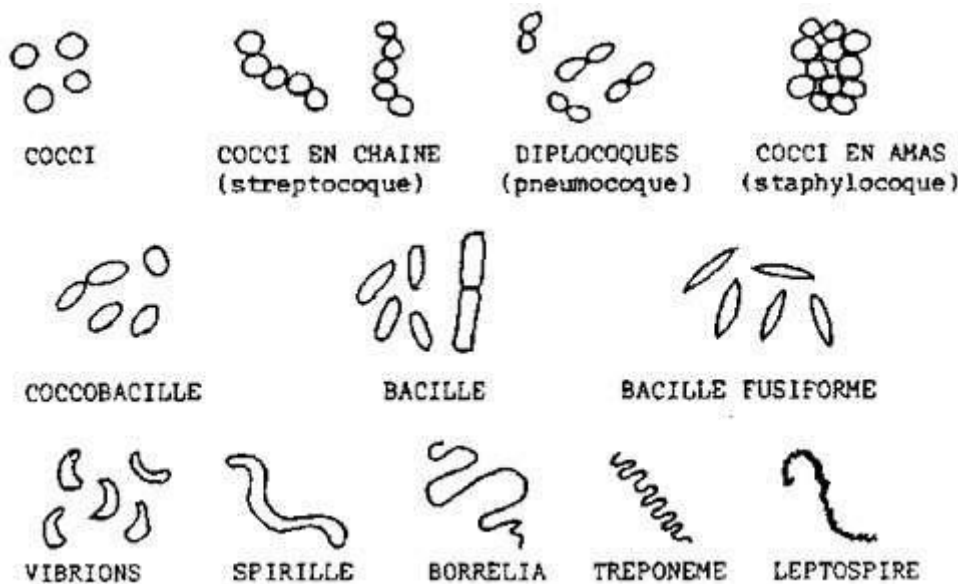
Les cocci sont habituellement ronds mais peuvent être ovales, allongés ou plats d'un côté (réniformes).

Les plans suivant lesquels les bactéries se divisent déterminent le groupement des cellules. Les modes de groupements des cocci sont variés. Ainsi, les cocci qui restent groupés par paires après s'être divisés sont appelés diplocoques ; ceux qui forment des chainettes sont appelés streptocoques ; ceux qui se divisent dans de nombreuses directions et forment des grappes sont

appelés staphylocoques.... Ces groupements sont une caractéristique qui facilite souvent l'identification de certains cocci.

La plupart des bacilles sont des bâtonnets simples. Les diplobacilles restent par aires après leur division et les streptobacilles forment des chainettes ; certains bacilles ressemblent à des pailles. D'autres ont des extrémités effilées, comme des cigares. D'autres encore sont ovale et ont une apparence tellement semblable à celle des cocci qu'on les appelle coccobacilles.

Les bactéries spiralées présentent une ou plusieurs courbes, elles ne sont jamais droites. Celles qui ont la forme d'un bâtonnet incurvé et qui ressemble à des virgules s'appellent vibrions. D'autres appelées spirilles, ont une forme hélicoïdale, et un corps passablement rigide. Un troisième groupe est caractérisé par une forme flexible en hélice, ce sont les spirochètes.



Les différentes formes et associations bactériennes

Outre les trois principales formes, on trouve également d'autres formes particulières, la forme filamenteuse des bactéries ferrugineuses, les formes mycéliennes, à peine ramifiées chez les mycobactéries et nettement ramifiées chez les actinobactéries.

Le pouvoir de résolution du microscope optique était insuffisant pour révéler les détails de sa structure. C'est la microscopie électronique avec ses différents modes d'exploitation qui a mis en lumière l'architecture de la bactérie.

La cellule apparait entourée d'une enveloppe rigide, la paroi, qui lui donne sa forme et sa résistance et qui entoure une seconde enveloppe beaucoup plus mince et plus délicate, la membrane cytoplasmique. Le cytoplasme, en général très homogène, contient essentiellement des granulations d'acides ribonucléique, des ribosomes, parfois aussi des substances de réserve. Dans le cytoplasme, l'appareil nucléaire qui n'est pas entouré d'une membrane.

La paroi, la membrane, le cytoplasme et l'appareil nucléaire représentent les structures essentielles de la cellule, qui sont toujours présentes. D'autres structures peuvent éventuellement être présentes, la capsule, enveloppe externe ; les flagelles, de nature protéique qui confère à la bactérie sa mobilité ; les pili et fimbriae, plus fins que les flagelles, rigides et cassants ; les spores, qui sont des formes de résistance n'existent que chez certaines espèces bactériennes.

2- 5. La paroi cellulaire

Enveloppe cellulaire, la paroi est un véritable « exosquelette » qui confère à la cellule sa forme et sa rigidité.

La paroi est notamment formée d'un polymère, le peptidoglycane (Fig.) (encore appelé *mucopéptide*, *muréine* ou *mucocomplexe*). La distinction entre bactérie à Gram positif et à Gram négatif repose sur une différence de composition chimique pariétale.

2-5-1. Composition chimique de la paroi

Tableau III : Composition chimique globale de la paroi chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (C. Senez, Microbiologie générale. Doin, Paris)

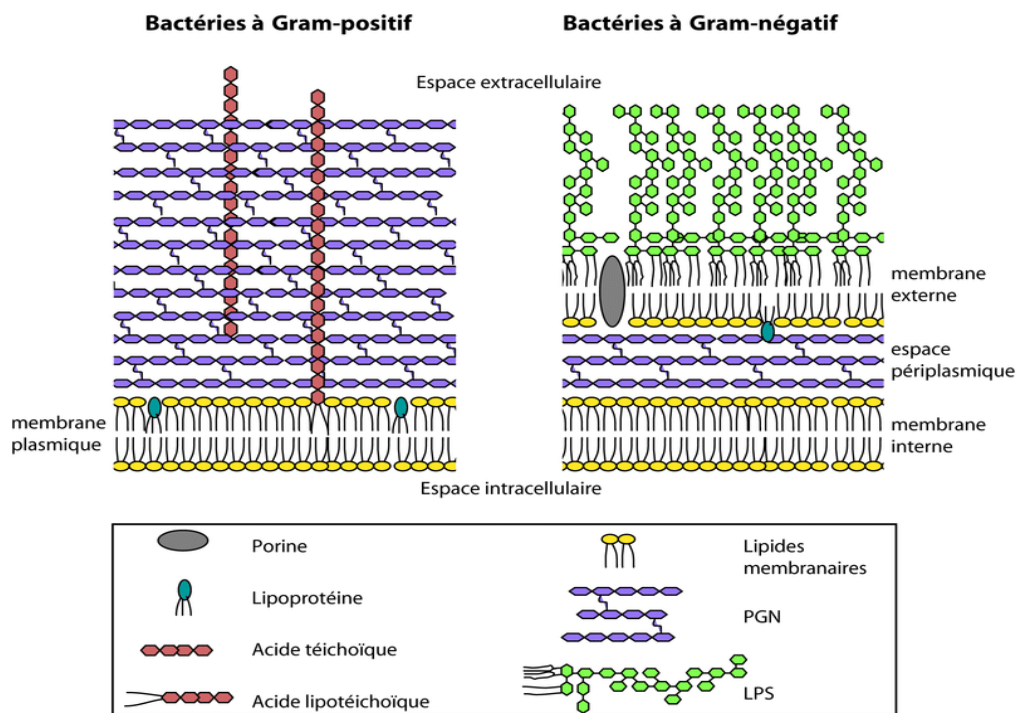
	Bactéries à Gram +	Bactéries à Gram -
Osamines (NAG) et (NAM)	+++	+
Acides aminés	24-35%	50% env.
Nombre	4 à 10	16 à 17
Acide diaminopimélique	+++ (exclut la lysine)	+ (n'exclut pas la lysine)
Acides teichoïques	+++	-
Oses	20-60%	20-60%
Lipides	1-2.5%	10-22%

La paroi cellulaire bactérienne est composée d'un réseau macromoléculaire, le peptidoglycane constitué d'un disaccharide qui se répète pour former des chaînes reliées entre elles par des polypeptides.

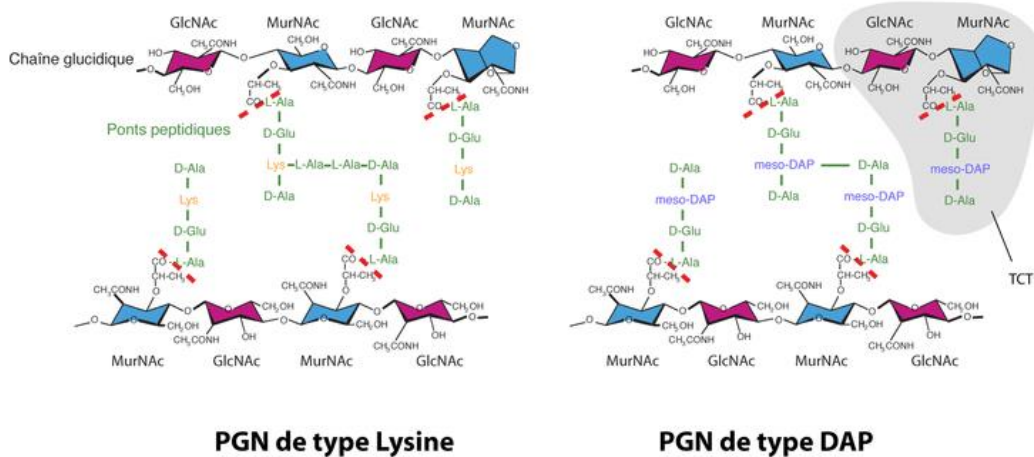
Le disaccharide est composé de monosaccharides appelés N-acétylglucosamine (NAG) et acide N-acétylmuramique (NAM) (de *murus*, mur), qui sont apparentés au glucose.

Les molécules de NAM et NAG se suivent en alternance reliés par une liaison glycosidique β 1-4, pour former des rangées de 10 à 65 sucres qui constituent un « squelette » glucidique (la partie glycane du peptidoglycane). Les rangées adjacentes sont reliées par des polypeptides (la partie peptide du peptidoglycane). La structure du lien polypeptidique varie mais elle comprend toujours un térapeptide latéral, composé de quatre acides aminés reliés aux NAM du squelette (deux alanines, un acide glutamique et une lysine ou l'acide diaminopimélique (D ou L)).

Les térapeptides parallèles peuvent être liés directement les uns aux autres ou au moyen d'un pont peptidique, constitué d'une petite chaîne d'acides aminés.



Composition de la paroi des bactéries à Gram Positif et des bactéries à Gram négatif



Structure chimique du peptidoglycane d'une paroi de bactérie à Gram + et à Gram -

2-5-2. Paroi des bactéries à Gram positif

La paroi des bactéries à Gram positif est composée de multiples couches de peptidoglycane, qui forme une structure homogène, épaisse et rigide (Fig.)

Elle contient des acides teichoïques, qui sont formés principalement d'un alcool (tel que le glycérol ou le ribitol) et de phosphate. Il y a deux classes d'acides teichoïques : l'acide lipoteichoïque, qui traverse la couche de peptidoglycane et se lie aux lipides de la membrane plasmique, et 'acide teichoïque de la paroi, qui se fixe à la couche de peptidoglycane.

Leurs fonctions ne sont pas totalement connues (ils assurent la régulation de l'entrée et la sortie des cations dans la cellule ; ils confèrent à la paroi la majeure partie de sa spécificité antigénique...)

La paroi à Gram positif de certaines bactéries est recouverte de divers polysaccharides qui permettent d'en faire une classification (Ex. Streptocoques). Celles des bactéries acido-alcoolrésistantes, telle que *Mycobacterium*, contient jusqu'à 60% d'acides mycolique, un lipide cireux.

2-5-3. Paroi des bactéries à Gram négatif

La paroi des bactéries à Gram négatif présente une structure stratifiée plus complexe. Outre le peptidoglycane de base (fine couche), elle comprend trois autres structures polymériques externes ou reliées à ce peptidoglycane.

-Une couche phospholipidique dite membrane externe pour la différencier de la membrane cytoplasmique qui contient des protéines importantes ;

- Un lipopolysaccharide (LPS) ;
- Enfin, une lipoprotéine assurant la liaison entre la membrane externe et le peptidoglycane et conférant une certaine solidité à l'ensemble.

Le membre externe contient des lipoprotéines (lipides liés à des protéines par des liaisons covalentes) qui sont liées au peptidoglycane sous-jacent.

En plus des lipoprotéines, la membrane externe de la bactérie à Gram négatif est composée de lipopolysaccharides et de phospholipides.

Les **LPS** sont à l'origine de deux caractéristiques importantes de la bactérie à Gram négatif :

La partie glucidique est composée de sucres, appelée **polysaccharide O (antigène O)**, qui jouent le rôle d'antigènes et permettent de différencier les espèces de Bactéries à G- (ex. l'agent pathogène *E. coli* O157 :H7). Le polysaccharide du LPS est formé d'une partie centrale, **le core** qui est commun à toutes les bactéries à G- ; et de **chaines latérales** faites de séquences répétitives distinctes en fonction des espèces ou des sérotypes.

La partie lipidique du LPS, appelée **lipide A**, porte aussi le nom d'endotoxine. La toxicité du lipide A s'exerce quand des bactéries pathogènes à G- sont détruites. La mort cellulaire entraîne la dispersion des fragments de la paroi cellulaire, l'endotoxine est libérée et devient toxique quand elle se trouve dans la circulation sanguine ou le tube digestif de l'hôte.

Espace périplasmique

Les bactéries à Gram positif synthétisent diverses exoenzymes capables de fragmenter les éléments nutritifs et de les rendre accessibles au métabolisme (ex. protéases) ou de dénaturer les antibiotiques (ex. pénicillinase) ou encore de produire un effet nocif (ex. exotoxine).

Au contraire, la plupart des protéines élaborées par les bactéries à Gram négatif sont retenues dans l'espace périplasmique compris entre les deux membranes interne et externe. Elles peuvent être libérées par transformation des cellules en sphéroplastes ou par choc osmotique...

2-5-4. Fonctions de la paroi

Pour étudier les rôles de la paroi, on utilise une enzyme (lysozyme), pour la casser ou la fragmenter. Le lysozyme coupe les liaisons β 1-4 glycosidiques entre le NAG et le NAM, on obtient une destruction totale du peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif et une

fragmentation chez les bactéries à Gram négatif (à cause de la présence de la membrane externe). On obtient alors des protoplastes ou sphéroplastes selon l'expérience.

Expérience :

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

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

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

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

- La paroi assure le maintien de la forme de la bactérie ;

- la paroi assure une protection contre la pression osmotique intracellulaire ;

- La paroi joue également un rôle dans les propriétés antigéniques de la bactérie ;

- La paroi permet la fixation des bactériophages. Ils reconnaissent des récepteurs localisés sur le peptidoglycane des bactéries à Gram (+) ou la membrane externe des bactéries à Gram (-). Cette propriété est utilisée pour l'identification de certaines espèces : c'est la lysotypie.

- La paroi participe à la mobilité des bactéries. Bien que les flagelles soient implantés dans la membrane cytoplasmique, ils ne peuvent fonctionner en absence de peptidoglycane (d'où l'immobilité des protoplastes).

- La paroi confère à la bactérie sa toxicité. Chez les bactéries à Gram (-), le LPS est une endotoxine (effet toxique porté par le lipide A).

- La paroi joue un rôle de perméabilité, elle laisse passer de petites molécules comme l'eau, les sels minéraux ou des métabolites simples. Par contre elle est plus ou moins perméable à certains solvants (ex. l'alcool. Coloration de Gram).

2-6. La membrane plasmique (cytoplasmique)

Ou membrane interne, est une structure mince, à la fois souple et résistante, qui s'étend sous la paroi cellulaire et qui enveloppe et retient le cytoplasme de la cellule.

Composition chimique de la membrane plasmique :

L'analyse chimique de la membrane révèle trois types de substances : des lipides, des protéines et des glucides. Avec une abondance de molécules lipidiques.

Les protéines sont de grosses molécules, et en poids, elles dépassent les lipides : les proportions sont environ de 60 à 70% de protéines et de 30 à 40% de lipides.

Les glucides (glucose, glucosamine, etc.), faiblement représentés, sont quantitativement des constituants mineurs.

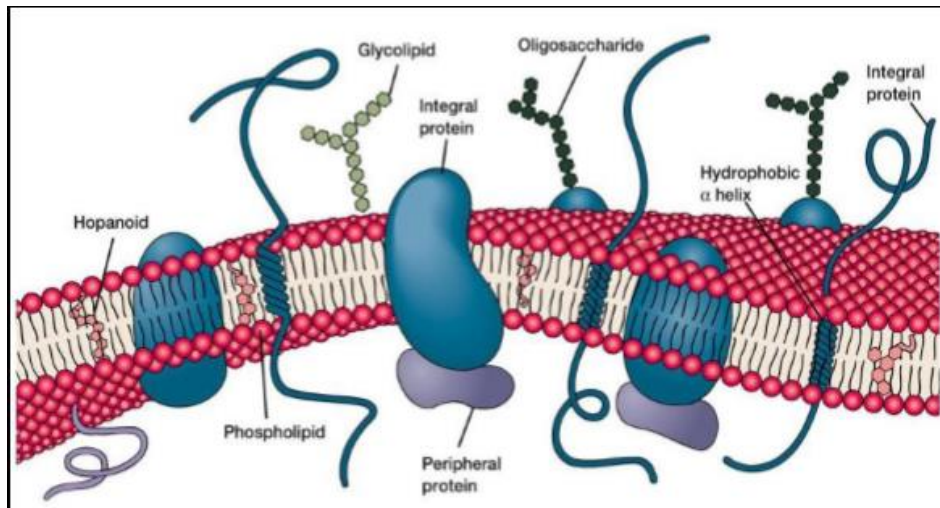
Les lipides sont représentés essentiellement par des phospholipides, en particulier, le phosphatidyl-glycérol et/ou le phosphatidyl-éthanolamine (PE). Les membranes des bactéries à Gram positif l'un des composants ou les deux avec plusieurs autres substances de nature voisine telles que l'acide phosphatidique et le diphosphatidyl-glycérol ; tandis que, les membranes des bactéries à Gram négatif ne renferment qu'un seul ou deux types de molécules lipidiques. Le cholestérol (stérols) ne sont jamais rencontrés dans la membrane des cellules bactériennes.

Le membre plasmique contient également des enzymes de la chaîne respiratoire, c'est-à-dire des déshydrogénases et les coenzymes qui leur sont fonctionnellement associées : NAD⁺, FAD, cytochromes, cytochromes oxydases...

2-6-1. Structure de la membrane plasmique

Les lipides sont à la base de la structure de la membrane. Chaque molécule de lipide est amphipathique ; formée d'une partie hydrophobe soluble dans l'huile insoluble dans l'eau et une partie hydrophile ayant des propriétés opposées et portant un groupement phosphate chargé négativement. Ces deux couches moléculaires induisent une organisation en double feuillet. Cette organisation n'est pas statique, elle répond au modèle dit en mosaïque fluide (Les molécules peuvent se déplacer latéralement en échangeant leurs places).

On distingue deux catégories de protéines : les protéines périphériques (extrinsèques) et les protéines intégrales (intrinsèques) qui traversent complètement le double feuillet.



Structure de la membrane cytoplasmique bactérienne

2-6-2. Fonctions de la membrane plasmique

- La membrane plasmique joue le rôle de barrière semi-perméable (perméabilité sélective), elle permet le passage de molécules lipophiles et empêche le passage des molécules hydrophiles.

- Elle joue un rôle primordial dans les transferts de substances ; on distingue 2 grands types de transport :

Le transport passif : il se fait dans le sens du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie.

Le transport actif : il se fait en sens inverse du gradient de concentration des molécules, ce qui nécessite l'utilisation d'énergie (généralement fournie sous forme d'ATP).

- Elle représente le site de fixation des flagelles.

- Elle possède des protéines membranaires ayant pour rôles : la biosynthèse et l'excrétion dans l'espace périplasmique de molécules nécessaires à la synthèse de la paroi. Des Enzymes de la chaîne respiratoire permettant la synthèse d'ATP et celles de la photosynthèse. Enfin, des transporteurs de diverses molécules (ions, sucres, ...) dans les deux sens.

De plus la membrane joue un rôle important dans la détection des signaux et de composés présents dans le milieu environnant grâce à la présence de protéines transmembranaires du chimiotactisme. Ceci, permet aux bactéries dotées de flagelles, de nager vers les endroits les plus riches en nutriments, ou bien, de s'éloigner des endroits défavorables comme ceux qui

contiennent des substances toxiques. Ces protéines interviennent dans le sens de rotation des flagelles.

2-7. Le cytoplasme

Le cytoplasme est la substance délimitée par la membrane cytoplasmique, épais, aqueux, semi transparent et élastique. Constitué d'eau à environ 80% et contient surtout des protéines (enzymes), des glucides, des lipides, des ions inorganiques et un grand nombre de molécules de faible masse moléculaire. Son pH est neutre (situé entre 7 et 7.2).

Dans la cellule procaryote, les principales structures du cytoplasme sont la région nucléaire (contenant l'ADN), des particules appelées ribosomes et des réserves sous forme de dépôts appelées inclusions, complètement dépourvue d'organites cellulaires, cytosquelette...

2-8. Nucléotide, chromosome bactérien

La région nucléaire ou nucléotide, de la cellule bactérienne, contient un long filament simple, continu de forme circulaire, composé d'ADN bicaténaire et appelé chromosome bactérien. C'est le patrimoine génétique de la bactérie, qui porte toute l'information nécessaire à la production de ses structures et l'accomplissement de ses fonctions.

Contrairement au chromosome de la cellule eucaryote, celui des bactéries n'est pas entouré d'une enveloppe (membrane) nucléaire et ne contient pas d'histones.

2-8-1. Composition

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est un polymère de PM élevé, composé d'unités appelées nucléotides.

Nucléotide : « Groupement phosphoré + sucre à 5 atomes + une base purique ou pyrimidique».

Bases puriques : Adénine A et Guanine G

Bases pyrimidiques : Cytosine C et Thymine T

Le sucre : Désoxyribose

Le groupement phosphoré : est un phosphate diester en 3' et 5' du désoxyribose

Il y a autant de « A que de T » et autant de « C que G » par contre le rapport (A+T)/(G+C) mieux connu sous le nom de coefficient de Chargaff varie selon les espèces. On l'exprime en GC%. 50% chez *E. coli* 60% chez *Pseudomonas*, 25 à 45% chez *Clostridium*.

2-8-2. Réplication du chromosome bactérien

L'ADN se réplique, ça veut dire qu'il se reproduit lui-même. Un brin de la double hélice sert de matrice à la synthèse d'un nouveau brin identique au brin parental. La séquence de bases le long d'une chaîne détermine automatiquement (par complémentarité de base) la séquences des bases sur l'autre chaîne.

La réplication est **semi-conservative** : Chaque chaîne nouvellement synthétisée (néo-synthétisée) reste associée à la chaîne parentale qui lui a servi de matrice.

La réplication est **bidirectionnelle** : La croissance du brin nouvellement synthétisé engendre une fourche de réplication. La réplication s'effectue selon un schéma bidirectionnel. Les deux chaînes d'ADN parental se répliquent simultanément jusqu'à ce que les deux points de croissance se rencontrent.

2-8-3. Mécanisme moléculaire de la réplication

La réplication débute en un point spécifique (le point origine ou point d'initiation).

Plusieurs enzymes sont impliquées dans le processus de la réplication :

ADN polymérase I, II, III : catalysent l'addition de désoxyribonucléotides à l'extrémité d'une chaîne d'ADN, elles ont aussi une activité exonucléasique. L'ADNpoly III est la plus active.

Au niveau de la fourche de réplication, l'un des deux brins est synthétisé dans le sens de déplacement (3'OH libre), catalysé par l'ADN poly III. Il est appelé brin précoce ou avancé. L'autre brin à extrémité 5' sera synthétisé par fragments d'Okasaki, appelé brin tardif.

Ces fragments de 1000 à 2000 résidus nécessitent des amorces d'ARN synthétisées par une ARN polymérase DNA dépendante appelée primase.

Ensuite ces amorces ARN sont excisées par l'ADN polymérase I (activité exonucléasique) et les brèches sont remplacées par de l'ADN par cette même enzyme.

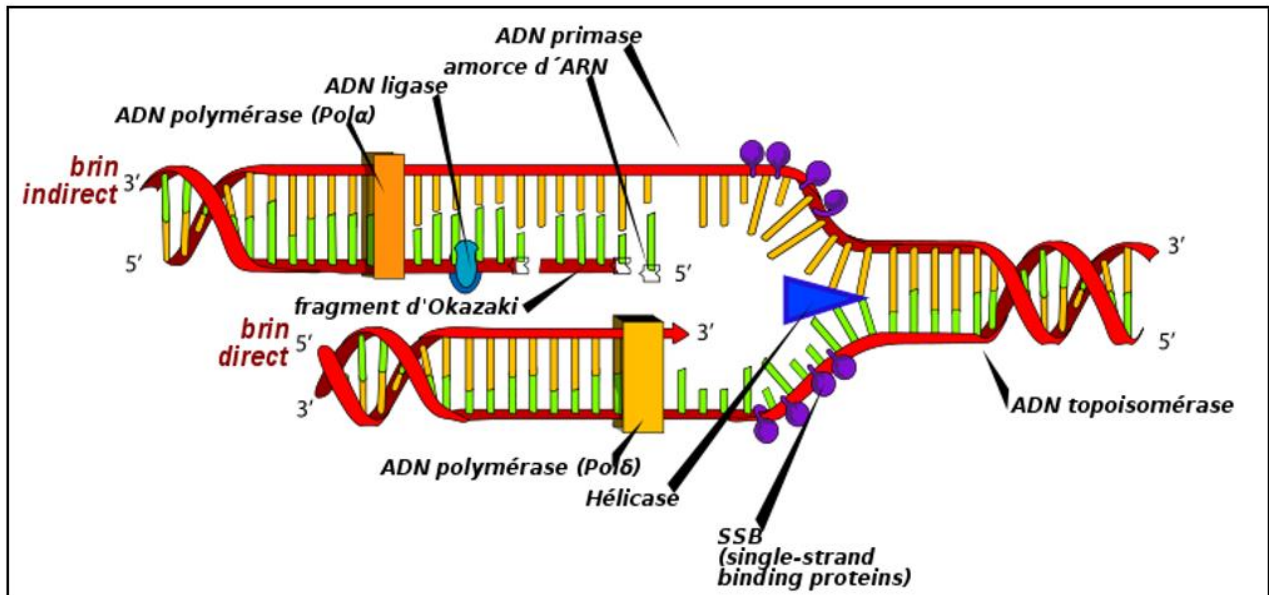
Enfin l'ADN ligase relie les différentes séquences au niveau de leurs extrémités 3'OH et 5'OH libre en catalysant la synthèse d'un pont phosphodiester entre un 3'OH et 5'P. Elle répare les coupures d'ADN et circularise l'ADN bactérien.

Hélicase : Elle ouvre les chaînes d'ADN avant la réplication.

Gyrase ou Topoisomérase II : Le chromosome d'*E. coli* fait 1360 μm (4.106 paires de Nt, donc 4.105 tours de spires) si la réplication se fait en 30 min, alors la désenroulement se fait à 10000

Tours/minute. C'est grâce à la découverte de la Gyrase qu'on a pu expliquer ce phénomène. La Gyrase fait une coupure au niveau de l'un des brins, ce qui induit la désenroulement de l'ADN superenroulé en molécule circulaire enroulée.

Durant toutes ces étapes, les d'ADN matrice sont maintenus déroulés et stabilisés par des protéines appelées « DNA binding proteins ».



Fourche de réplication de l'ADN chez *E. coli*. (Mariana Ruiz Villarreal, Humburg Germany)

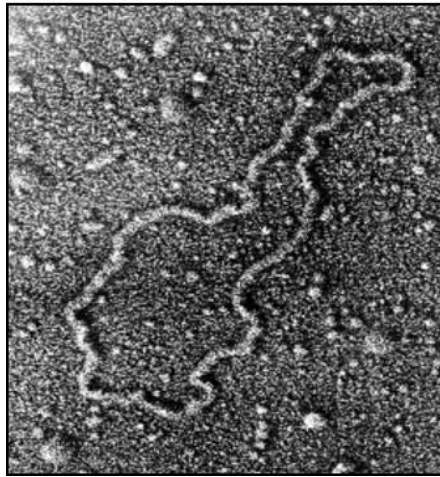
2-9. Les plasmides

En plus de leurs chromosomes, les bactéries contiennent souvent de petites molécules circulaires d'ADN bicaténaire appelées **plasmides**. Ces molécules sont des éléments génétiques extra-chromosomiques, et leur réplication est indépendante de celle de l'ADN chromosomique.

Ils contiennent habituellement de 5 à 100 gènes, qui en règle générale, ne sont pas indispensables à la vie de la bactérie quand les conditions de l'environnement sont normales. Néanmoins, dans certaines conditions, les plasmides confèrent plus d'un avantage à la bactérie. Ils peuvent porter des gènes pour des activités telles que la résistance aux antibiotiques, la tolérance aux métaux lourds, productions de toxines, la synthèse d'enzymes, augmentation de la virulence des bactéries...

2-9-1. Structure des plasmides

Comme toute structure porteuse d'informations génétiques, le plasmide est une molécule d'ADN. Ces molécules d'ADN plasmidique sont généralement de petite taille, 1/100 environ de celle du chromosome.

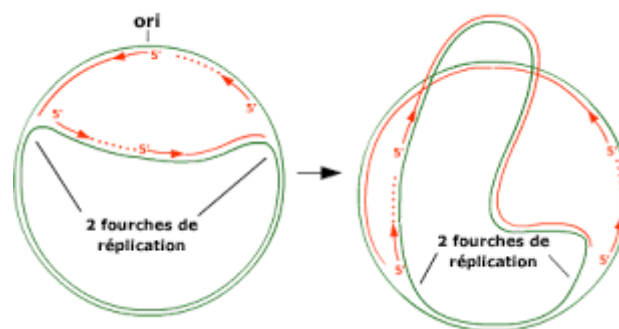


Plasmide au microscope électronique
PNAS in November 1973 by Stanley N. Cohen et al.

2-9-2. Réplication des plasmides

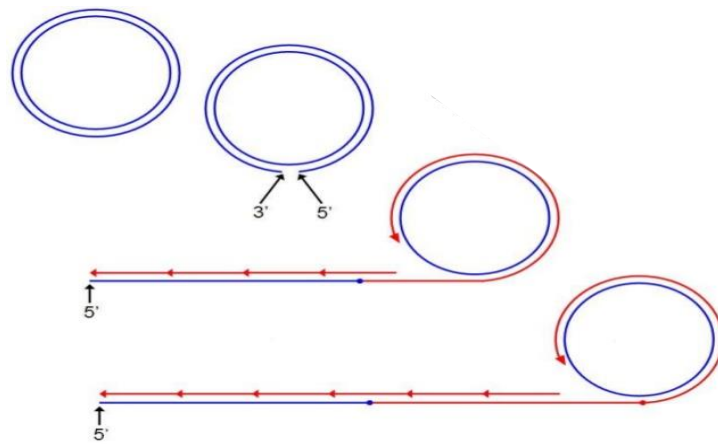
Le plasmide peut se répliquer selon deux modèles :

- **La réplication de type Theta θ** , uni ou bidirectionnelle, à partir d'une origine de réplication en utilisant l'équipement enzymatique de la bactérie hôte.



Mécanisme de réplication en forme Theta

- **Une réplication de type « rolling circle » ou cercle déroulant.** Un brin est coupé par une nucléase. Ce brin va se dérouler autour de l'autre brin dans le sens 5'P et la bactérie va synthétiser un brin complémentaire simultanément aux deux brins parents.



Réplication de type « Rolling cercle »

2.10. Le glycocalyx

Le Glycocalyx bactérien est un polymère gélatineux et visqueux, situé à l'extérieure de la paroi cellulaire et composé de polysaccharides, de polypeptides ou des deux. Il est produit à l'intérieur de la cellule et excrété à sa surface.

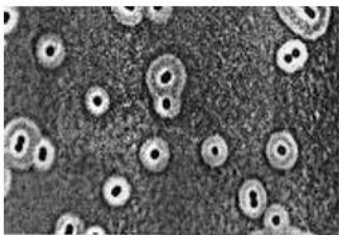
Si la substance est organisée et solidement fixé à la paroi, le glycocalyx porte le nom de **capsule**.

Si la substance est moins bien organisée et associée de façon lâche à la paroi, le glycocalyx est nommé **couche visqueuse**.

2-10-1. Mise en évidence

Etat frais à l'encre de chine : les bactéries apparaissent sur fond sombre avec un halo clair autour du corps bactérien qui correspond à la capsule.

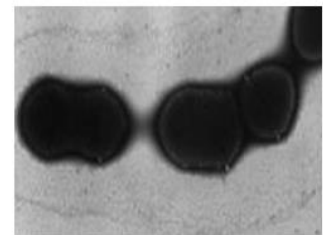
Réaction de gonflement de la capsule (réaction de Neufeld) : basée sur une combinaison antigène-anticorps ; lorsque des bactéries capsulées sont mises au contact d'un immunosérum spécifique, on observe au microscope à contraste de phase un « gonflement » de la capsule (précipitation des anticorps qui réagissent avec les antigènes capsulaires correspondants).



Coloration à l'encre de chine



Techniques immunochimiques



Microscopie électronique

2-10-2. Composition chimique

La nature des constituants capsulaires est fréquemment polyosidique, quelquefois polypeptidique. Acide aldobionique, composé d'un ose et un acide uronique par une liaison osidique.

Les acides peuvent être de différentes natures : acide glucuronique, acide galacturonique, acide cellobiuronique, acide hyaluronique... les oses également : glucose, rhamnose, galactose, osamine, dextran...

La diversité dans la nature des constituants et dans leur enchaînement entraîne des spécificités antigéniques différentes. Elle est à la base de la classification sérologique de certaines espèces en de nombreux types (exp. pneumocoques).

2-10-3. Fonctions de la capsule

Chez certaines espèces, la capsule joue un rôle important dans la virulence de la bactérie (sa capacité à causer la maladie).

La capsule protège souvent les bactéries pathogènes contre la phagocytose par les cellules de l'hôte (exp. *Streptococcus pneumoniae* dépourvue de sa capsule est incapable de provoquer la maladie et est facilement phagocyté) et exerce un chimiotactisme négatif vis-à-vis des leucocytes.

Un glycocalyx constitué de sucres est appelé polysaccharide extracellulaire (PSE). Le PSE donne à la bactérie la capacité de se fixer à diverses surfaces dans son environnement naturel afin d'assurer sa survie (exp. *Streptococcus mutans*, qui cause souvent des caries dentaires, se fixe à la surface des dents par un glycocalyx).

Le glycocalyx protège la bactérie contre la déshydratation.

Le glycocalyx confère la propriété aux bactéries d'adhérer les unes aux autres pour former des biofilms sur des surfaces humides.

Les substances capsulaires sont aussi le support de l'antigénicité. Les Ag capsulaires sont responsables de la spécificité sérologique (Ag K). Elle a permis de reconnaître plus de 7 types sérologiques chez le pneumococque.

2-11. Les flagelles

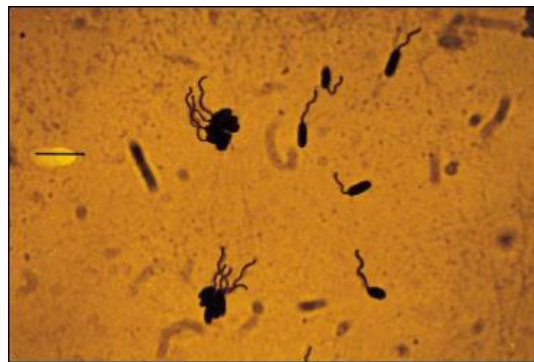
Certaines cellules procaryotes ont des flagelles (=fouet). Il s'agit de minces et longs appendices filamenteux qui permettent aux bactéries de se déplacer.

2-11-1. Mise en évidence

Indirecte : état frais (bactéries en mouvement) ou en milieu semi-gélosé. Plusieurs facteurs influencent la mobilité tels que l'âge de la culture, la température (*Yersinia* sp. est immobile à 37°C et mobile à 22°C).

Directe : en microscopie optique après avoir épaissi les flagelles par des colorations spéciales (Rhodes, Leifson : fuchsine basique).

La meilleure méthode d'étudier les flagelles est l'observation au microscope électronique qui, seule, permet de détailler leur forme, leur mode d'insertion et leurs dimensions.

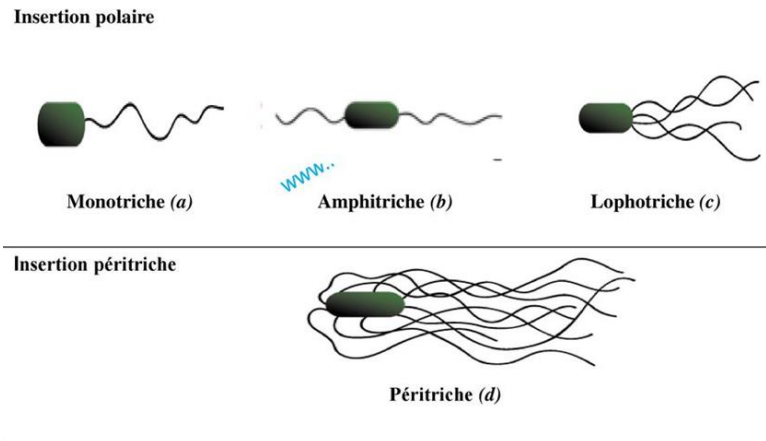


Pseudomonas fluorescens (flagelle monotriche)
Coloration selon la méthode de Rhodes

2-11-2. Structure des flagelles

Ils mesurent en moyenne 16 à 20 μm (beaucoup plus que la bactérie) et sont très fins (300 Å d'épaisseur).

Il y a quatre types d'arrangements des flagelles bactériens : **monotriche** (un seul flagelle polaire), **amphitriche** (un ou plusieurs flagelles aux deux extrémités de la cellule), **lophotriche** (deux ou plusieurs flagelles à une extrémité de la cellule) et **péritriche** (des flagelles repartis sur toute la surface de la cellule).



Types d'arrangement des flagelles bactériens

Ils sont fixés à la bactérie par insertion dans la membrane cytoplasmique.

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.

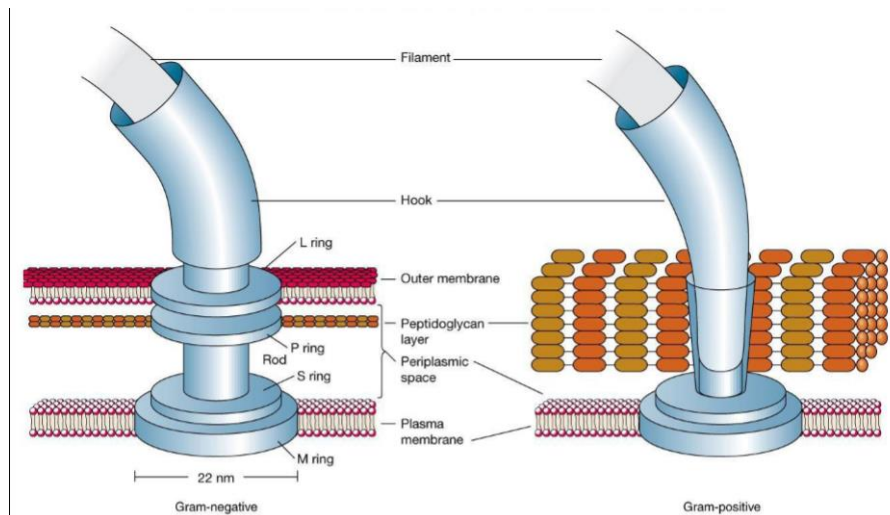
Le flagelle comprend trois parties principales :

Le filament est la partie visible du flagelle, un long segment de diamètre constant, en forme de cylindre creux et composé de **flagelline**, une protéine globulaire, assemblée en plusieurs chaînes entrelacées formant une hélice autour d'un centre vide (cylindre creux).

Le filament est fixé à un **crochet** un peu plus large, constitué d'une protéine différente.

La troisième partie du flagelle est le **corpuscule basal**, qui ancre la structure dans la paroi cellulaire et la membrane plasmique.

Chaque flagelle des cellules procaryotes est une structure hélicoïdale, semi rigide qui fait avancer la cellule en tournant sur lui-même à partir du corpuscule basal.



Structure du flagelle de bactéries à Gram négatif et à Gram positif

Quand une bactérie avance dans le même sens pendant un certain temps, le mouvement s'appelle « course » ou « nage ». Les nages sont interrompues périodiquement par des changements de direction aléatoires appelées « culbutes ».

2-11-3. Fonctions du flagelle

- La mobilité (locomotion) : un des avantages de la mobilité est de permettre à la bactérie de se diriger vers un environnement favorable ou de fuir de mauvaises conditions.

La réaction d'une bactérie qui la pousse à se rapprocher ou à s'éloigner d'un stimulus particulier s'appelle **tactisme** ; les stimuli peuvent être de nature chimique (**chimiotactisme**) ou de nature lumineuse (**phototactisme**).

Dans le cas d'un signal chimiotactique positif, dit **attractif**, les bactéries se dirigent vers le stimulus en faisant de nombreuses nages et peu de culbutes. Dans le cas d'un signal chimiotactique négatif, dit **répulsif**, la fuite des bactéries s'accompagne de culbutes fréquentes.

- Rôle antigénique, on peut identifier certaines bactéries pathogènes grâce à leurs protéines flagellaires appelées « **antigène H** » et permet de distinguer les **sérotypes** (les variations au sein d'une même espèce) (exp. Il y a au moins 50 antigènes H différents chez *E. coli*).

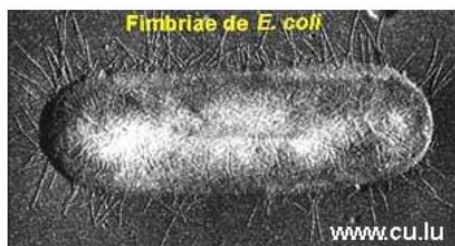
2-12. Pili et *fimbriae*

Beaucoup de bactéries à Gram négatif possèdent des appendices filiformes plus courts, plus droits et plus minces que les flagelles, qui servent plutôt à fixer les bactéries qu'à les faire avancer. Ces structures constituées d'une protéine appelée **piline** assemblée en hélice autour

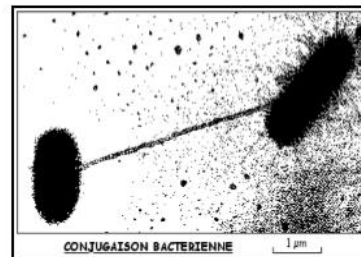
d'un noyau central, sont de deux types, les *fimbriae* et les *pili*, qui ont des fonctions très différentes.

Les *fimbriae* émergent des pôles de la cellule bactérienne ou sont uniformément distribuées sur toute sa surface. Leur nombre peut varier de quelques-unes à plusieurs centaines par cellule. Les *fimbriae* jouent un rôle important dans la virulence de la bactérie. Elles permettent aux bactéries d'adhérer aux surfaces, y compris à celles d'autres cellules (exp. Les *fimbriae* de *Neisseria gonorrhoeae*, bactérie qui cause la blennorragie, facilitent la colonisation des muqueuses par ce microbe et rendent ainsi possible l'apparition de la maladie).

Les *pili* sont généralement plus longs et leur nombre ne dépasse pas un ou deux par cellule. Ils relient les bactéries en vue de transfert d'ADN d'une cellule à l'autre lors de la conjugaison bactérienne, c'est pourquoi on les appelle parfois **pili sexuels**.



Fimbriae de *E. coli*



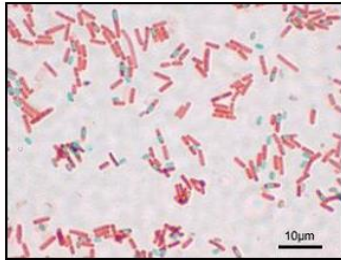
Pili sexuel (conjugaison)

2.13. La spore (endospore)

Certaines bactéries (notamment les bactéries à Gram positif tels que les genres *Bacillus* et *Clostridium*) ont le pouvoir de se transformer en petites unités ovales ou sphériques douées d'une résistance élevée lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables (milieu de culture épuisé en éléments nutritifs ; conditions physicochimiques extrêmes). On les appelle **spore** ou **endospores** (elles se forment à l'intérieure de la cellule).

2-13-1. Mise en évidence

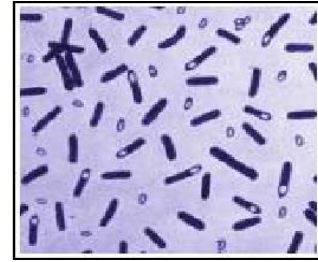
Les spores sont visibles à la coloration de Gram où elles apparaissent comme des espaces vides à l'intérieur des bactéries, seul le contour de la spore apparaît coloré. Il existe des colorations spéciales basées sur le caractère acido-alcool-résistant des spores. Exemple : coloration au vert de malachite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



Coloration au vert de malachite



Coloration de Gram
Bacillus



Coloration de Gram
Clostridium

2-13-2. Morphologie et structure de la spore

Les spores peuvent déformer ou non le corps bactérien. Selon l'espèce la position de l'endospore dans la cellule végétative peut être : centrale, terminale (formée à une extrémité), subterminale (formée près d'une extrémité). La spore peut être libre ou non.

Forme de la spore

spore sphérique



spore cylindrique



spore ovoïde



Position de la spore

spore centrale



spore subterminale



spore terminale



Déformation éventuelle de la bactérie par la spore

spore non déformante



spore déformante



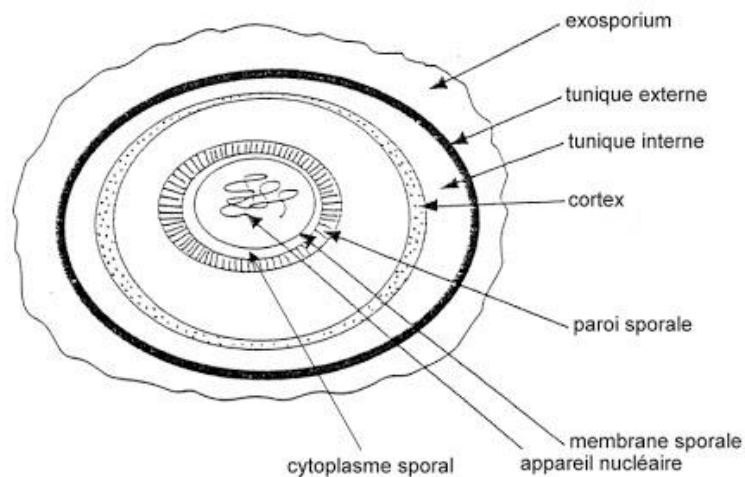
Les différentes formes et positions de la spore

Les enveloppes constituées autour de la membrane sporale ont des structures et des compositions variées. On distingue :

- **La paroi sporale**, contenant le peptidoglycane normal qui deviendra, après germination de la spore, la paroi de la cellule végétative.
- **Le cortex**, qui représente 10 à 20% de l'ensemble et qui est une couche épaisse, formé d'un peptidoglycane inhabituel (contient une forte proportion de dipicolinate de calcium, son autolyse constitue une étape déterminante de la germination).

- **Les tuniques (internes et externes)**, représentent 20 à 35% de l'ensemble ; elles sont composées d'une protéine de type kératine riche en liaisons disulfures ; imperméables, elles sont responsables de la résistance aux agents chimiques.

- **L'exosporium**, la couche la plus externe, qui est une membrane lipoprotéique contenant 20% de sucres ; pas essentiel à la survie de la spore.



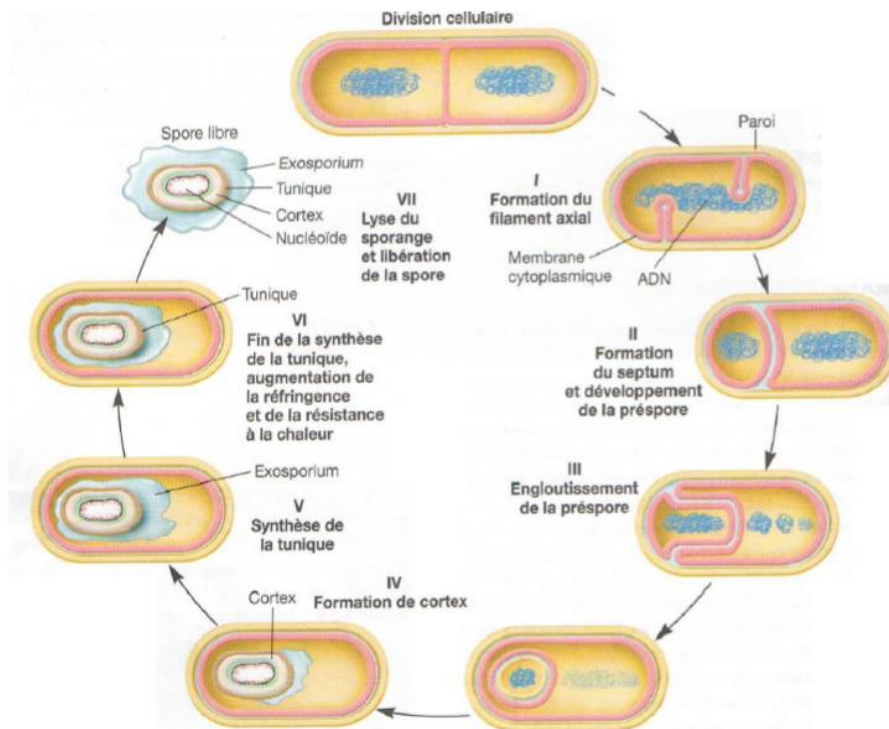
Structure de la spore bactérienne

2-13-3. Le Phénomène de sporulation

La formation d'une endospore dans une cellule végétative (cellule mère dont les fonctions métaboliques sont actives) s'effectue sur plusieurs heures et s'appelle **sporulation** ou **sporogénèse**.

Durant le premier stade observable de la sporulation, un chromosome bactérien récemment répliqué et une petite quantité de cytoplasme sont isolés par des invaginations de la membrane plasmique qui donnent naissance à ce qu'on appelle **septum transversal**. Ce dernier devient une membrane double qui enveloppe le chromosome et le cytoplasme. La structure ainsi formée, entièrement contenue dans la cellule d'origine, s'appelle **présore**.

D'épaisses couches de peptidoglycane se constituent entre les deux membranes. Puis une épaisse **tunique sporale** composée de protéines se forme autour de la membrane externe. La tunique confère à l'endospore sa résistance à un grand nombre d'agents chimiques ou physiques nocifs.



Formation d'endospore, ou sporulation bactérienne

La majeure partie de l'eau qui se trouve dans le cytoplasme de la présore est éliminée au cours de la sporulation et il n'y a pas de réactions métaboliques dans l'endospore.

L'intérieur hautement déshydraté, contient seulement de l'ADN, de petites quantités d'ARN, des ribosomes, des enzymes et quelques petites molécules importantes (bonne partie d'un composé organiques : l'acide dipicolinique, accompagné d'un grand nombre d'ions calcium).

La spore montre une résistance à des températures de 70-80°C pendant 10 minutes, parfois plus. Une résistance aux agents physiques et chimiques (rayons Ultraviolets, gamma, aux antiseptiques, désinfectants, antibiotiques ...).

2-13-4. La Germination

Les endospores peuvent rester en dormance pendant des millénaires. Elles retournent à l'état végétatif grâce à un processus appelé **germination**, qui est déclenché par le retour des conditions environnementales favorables.

Ce processus comprend trois stades principaux :

- **L'activation** : même lorsque la spore est placée dans un environnement idéal propice à la germination, pour germer, elle doit être activée par un agent capable de léser la tunique sporale. Cet agent peut être mécanique (choc, abrasion), physique (chaleur), chimique (acidité).

- **L'initiation** : La germination ne débutera ensuite qu'en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites effecteurs (ions inorganiques...) qui pénètrent à travers la tunique endommagée et déclenchent un processus autolytique : le peptidoglycane sporal détruit, libérant le dipicolinate de calcium.

Après l'élimination de la barrière corticale, la spore s'imbibe d'eau, gonfle, devient plus perméable.

- **L'émergence** : l'altération du cortex et des téguments externes fait émerger une nouvelle cellule végétative comprenant le protoplaste sporal entouré de sa paroi.