



**Université Mohammed Premier  
Faculté Pluridisciplinaire  
Nador**



## **COURS DE MICROBIOLOGIE GENERALE**

**Filière SVI**

**Semestre 3**

**Responsable : Pr. Salah Eddine SAMRI**

# TABLE DES MATIERES

Chapitre 1 : Monde Microbien .....	1
INTRODUCTION .....	1
1. Historique .....	1
1.1. Découverte des microorganismes .....	1
1.2. Débat sur la génération spontanée .....	2
1.3. Rôle des microorganismes dans les maladies .....	4
1.4. Naissance de la microbiologie industrielle .....	5
1.5. Ecologie microbienne .....	5
2. Les membres du monde microbien .....	6
3. Domaines et rôles de la microbiologie .....	8
4. Avenir de la microbiologie .....	8
Chapitre 2 : Structure de la cellule procaryote .....	10
INTRODUCTION .....	10
1. Caractéristiques générale de la cellule procaryote .....	10
3. Membrane Plasmique .....	10
4. Paroi de la cellule procaryote .....	12
4.1. Paroi des bactéries Gram positives .....	14
4.2. Paroi des bactéries Gram négatives .....	15
4.3. Paroi des archées .....	17
5. Flagelle et mobilité .....	17
5.1. Ultrastructure flagellaire .....	18
5.2. Mécanisme du mouvement flagellaire .....	19
6. Pili et fimbriae .....	19
6.1. Pili commun ou pili fimbriae .....	20
6.2. Pili sexuels : .....	20
7. Couches externes .....	20
7.1. Capsules .....	20
7.2. Couche S .....	21
8. Endospore .....	21
9. Matériels génétiques .....	22
9.1. Nucléotide .....	22
9.2. Plasmides .....	22
Chapitre 3 : Nutrition bactériens .....	24
INTRODUCTION .....	24
1. Besoins nutritifs .....	24
2. Source de carbone, hydrogène, oxygène et électron .....	25
3. Les types nutritionnels chez les micro-organismes .....	25

3.1. Autotrophes photolithotrophes .....	26
3.2. Hétérotrophes chimioorganotrophes.....	26
3.3. Hétérotrophes photoorganotrophes.....	26
3.4. Autotrophes chimiolithotrophes .....	26
3.5. Chimiolithohétérotrophes .....	26
3. Source d'azote .....	28
4. Besoins en ions minéraux .....	29
4.1. Soufre .....	29
4.2. Phosphore .....	29
4.3. Activateurs enzymatiques.....	29
5. Facteurs de croissance .....	29
5. Facteurs physico-chimiques.....	30
5.1. Température .....	30
5.2. pH.....	31
5.3. Pression osmotique.....	31
5.4. Besoins en oxygène .....	32
Chapitre 4 : Croissance bactérienne .....	33
INTRODUCTION .....	33
1. Le cycle cellulaire procaryote.....	33
2. Mesure de la croissance bactérienne.....	34
2.1. Mesure du nombre de cellules .....	34
2.2 Mesure de la masse cellulaire .....	36
3. Paramètres cinétiques de la croissance .....	37
3.1. Croissance en milieu de culture non renouvelé .....	37
3.2. Culture continue des microorganismes.....	41
Chapitre 5 : Métabolisme bactérien .....	43
INTRODUCTION .....	43
1. Le métabolisme.....	43
1.1. Vu d'ensemble du métabolisme .....	43
1.2. Le rôle de l'ATP dans le métabolisme .....	44
1.3. Les réactions d'oxydo-réductions.....	45
2. Types de métabolisme énergétique .....	45
2.1. Chimio-organotrophe .....	45
2.2. Les Chimio-lithotrophes.....	54
2.3. Les phototrophes .....	55
Chapitre 6 : Eléments de génétique bactérienne.....	60
INTRODUCTION .....	60
1. Structure et fonctions du génome bactérien .....	60
1.1. Structure de l'ADN .....	60
1.2. Organisation .....	60

1.2. Structure des gènes.....	62
1.3. Régulation de l'expression des gènes.....	63
2. La variabilité génétique des bactéries .....	65
2.1. Mutations.....	65
2.2. Conséquences phénotypiques des mutations .....	66
3. Les transferts génétiques.....	67
3.1. Conjugaison.....	67
3.2 Transformation .....	71
3.3. Transduction.....	73
Chapitre 7 : ELEMENTS DE VIROLOGIE .....	77
INTRODUCTION .....	77
1. Structure des virus .....	77
1.1 Génome .....	77
1.2. Capside.....	78
1.3. Enveloppe.....	78
1.4 Autres composants .....	79
1.5 Taille.....	79
2. Classification des virus .....	79
3. Le cycle viral .....	82
3.1. Attachement .....	82
3.2. Pénétration.....	83
3.3. Décapsidation .....	84
3.4. Réplication .....	84
4.5. Assemblage .....	85
4.6. Libération des virions .....	85

# Chapitre 1 : Monde Microbien

## INTRODUCTION

La microbiologie a été classiquement définie comme étant l'étude d'organismes trop petits pour être vus à l'œil nu. La microbiologie est principalement concernée par des organismes d'un diamètre inférieur à un millimètre, qui sont invisibles et doivent être examinés au microscope. Une variété extraordinaire d'organismes notamment les virus, les bactéries, beaucoup d'algues, de mycètes et les protozoaires sont dans cette catégorie. Cependant, d'autres organismes quoique visibles à l'œil nu, sont étudiés par des microbiologistes en particulier des algues et des mycètes.

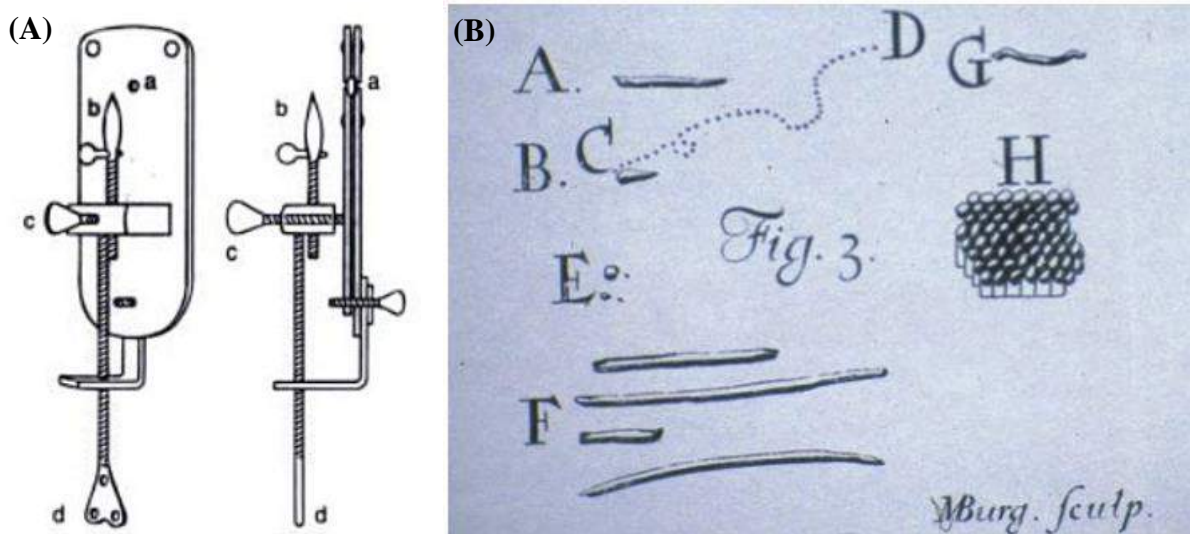
Les difficultés d'établir des limites à la microbiologie conduisirent Roger Stanier (1916-1982) à définir la microbiologie non seulement en termes de taille, mais encore en termes de techniques utilisées. Un microbiologiste isole d'abord un micro-organisme spécifique d'une population et le cultive. Donc, la microbiologie utilise des techniques telles que la stérilisation et l'emploi de milieux de culture nécessaires à l'isolement et à la croissance des micro-organismes.

## 1. Historique

### 1.1. Découverte des microorganismes

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

Les premières observations des microorganismes ont été réalisées par le Hollandais Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), qui construisait des microscopes simples, composés de lentilles doubles convexes maintenues entre deux plaques d'argent (Figure I.1). Ses microscopes agrandissaient de 50 à 300 fois et rendait visible des bactéries et des protozoaires.

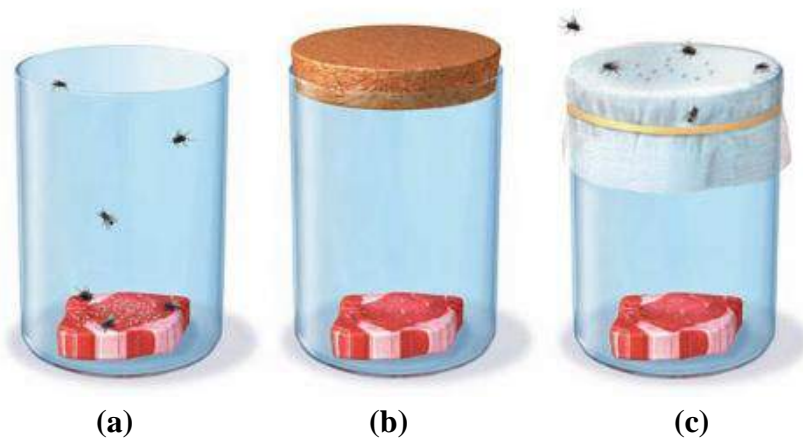


**Figure I.1 :** Le microscope d'Antonie van Leeuwenhoek. (A) : Dessin d'un des microscopes montrant les lentilles, a ; le support pointu b ; et les vis de mise au point, c et d ; (B) : Bactéries dessinées par van Leeuwenhoek.

## 1.2. Débat sur la génération spontanée

L'idée que la vie puisse émerger du monde inerte est vieille comme le monde. Les civilisations antiques croyaient que les pucerons sortaient des bambous, et que la boue pouvait engendrer des vers ou des grenouilles. Cette théorie de la génération spontanée, due à Aristote (384-322 av. J-C), traversera le moyen âge et sera encore évoquée à la Renaissance.

La théorie de la génération spontanée sera mise en doute pour la première fois par Francesco Redi (1626-1697), qui prouve en 1668 que la production d'asticots par de la viande en décomposition était due à la présence d'œufs de mouches et la viande ne générait pas spontanément des asticots comme on le pensait précédemment (Figure I.2).



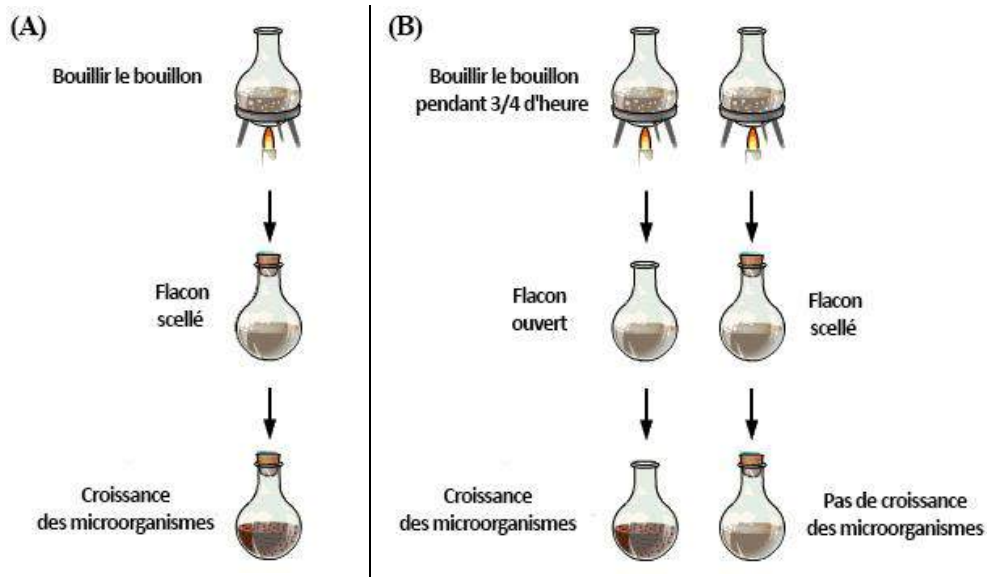
**Figure I.2 :** Les expériences de Redi réfutant la génération spontanée. Le premier récipient n'était pas couvert (a), le second était couvert (b) et le troisième d'une fine gaze qui pouvait écarter les mouches (c). Celles-ci déposèrent leurs œufs sur la viande non couverte et les asticots se développèrent. Les deux autres morceaux de viande ne produisirent pas spontanément d'asticots.

La découverte des micro-organismes par van Leeuwenhoek renouvela la controverse scientifique entre les partisans de la biogenèse et ceux de l'abiogenèse.

En 1748, John Needham (1713-1781) faisait bouillir du bouillon de mouton et bouchait hermétiquement les flacons. Par la suite, de nombreux flacons se troublaient, ils contenaient des micro-organismes. Il pensa que la matière organique possédait une force vitale qui pouvait conférer les propriétés de vie à la matière non vivante (Figure I.3A).

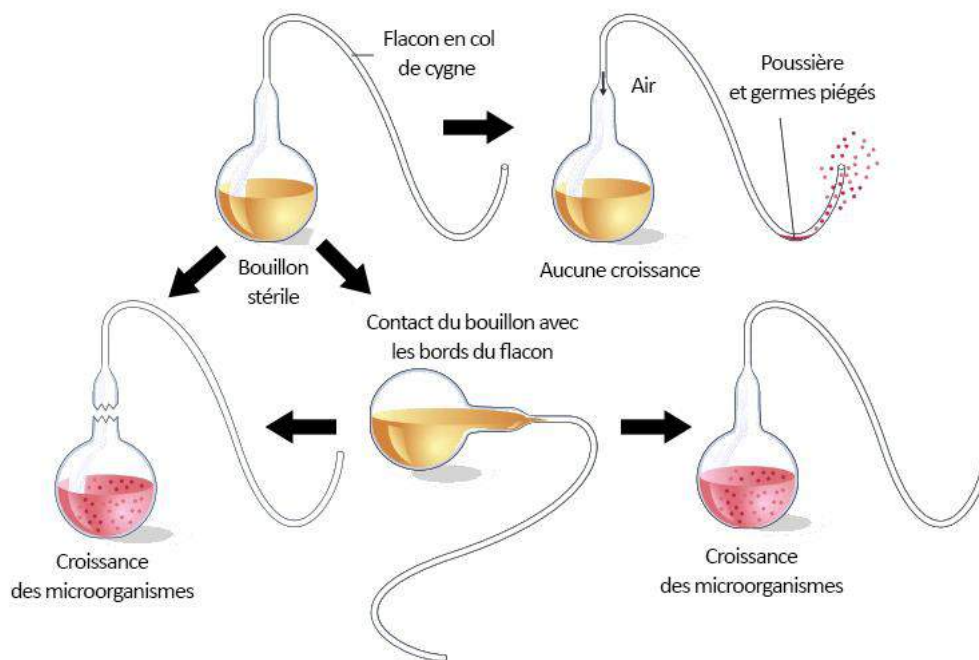
Quelques années plus tard, Lazzaro Spallanzani (1729-1799) améliora les expériences de Needham en scellant d'abord les flacons de verre contenant le bouillon et les germes. Si les flacons scellés étaient placés dans de l'eau bouillante pendant 3/4 d'heure, il n'y avait pas de croissance tant que les flacons restaient fermés. Il suggéra que l'air transportait les germes dans l'infusion, mais aussi que l'air externe était nécessaire à la croissance des "animaux" déjà présents dans l'infusion (Figure I.3B).

Bien que Spallanzani ait invalidé la théorie de l'abiogenèse, nombreux furent ceux qui ne le crurent pas, sous prétexte que Spallanzani avait fait bouillir la viande si longtemps qu'il tua "le pouvoir vital" qu'elle contenait.



**Figure I.3 :** Les expériences de John Needham (A) et de Lazzaro Spallanzani (B) sur la génération spontanée.

En 1850, Luis Pasteur (1822-1895) apporta la preuve définitive pour le refus de la génération spontanée. Il filtra d'abord l'air au travers de coton et trouva que des objets ressemblant à des spores végétales y étaient piégés. Si le morceau de coton était placé dans un milieu stérile après que de l'air y ait été filtré, la croissance microbienne apparaissait. Pasteur fit ensuite bouillir des solutions nutritives dans les flacons en col de cygne pendant quelques minutes puis les refroidit. Aucune croissance n'apparut même si les contenus des flacons avaient été exposés à l'air, Pasteur fit observer qu'il n'y avait pas de croissance parce que la poussière et les germes avaient été piégés sur les bords des goulots courbes. Si les goulots étaient cassés ou le bouillon stérile était ramené à la partie recoupée du col, la croissance commençait immédiatement (Figure I.4).



**Figure I.4 :** Les expériences de Pasteur avec les flacons à col de cygne.

John Tyndall (1820-1893) donna un coup final à la génération spontanée en 1877 en démontrant que la poussière portait réellement les germes et que si la poussière était absente, le bouillon restait stérile même s'il était exposé directement à l'air. Durant ces études, Tyndall montra l'existence de formes bactériennes exceptionnellement résistantes à la chaleur.

### 1.3. Rôle des microorganismes dans les maladies

La relation microorganismes - maladie fut loin d'être évidente bien qu'elle a été proposée par Girolamo Fracastoro (1483-1553) et Agostino Bassi (1773-1856). Une fois établie, les chercheurs ont développé la théorie des germes, selon laquelle de nombreuses maladies sont causées par des microbes.

#### 1.3.1. Théorie des germes et les postulats de Koch

Le médecin allemand Robert Koch (1843-1910) est le premier à établir une base scientifique pour déterminer si un microbe spécifique cause une maladie spécifique. Koch développa les principales méthodes et techniques encore utilisées aujourd'hui pour l'investigation microbienne, y compris la technique de culture pure et les postulats de Koch célèbres pour identifier l'agent causal d'une maladie (figure I.5). Il a appliqué ses méthodes pour de nombreuses maladies mortelles, y compris la fièvre charbonneuse causée par *Bacillus anthracis* et la tuberculose causée par *Mycobacterium tuberculosis*.

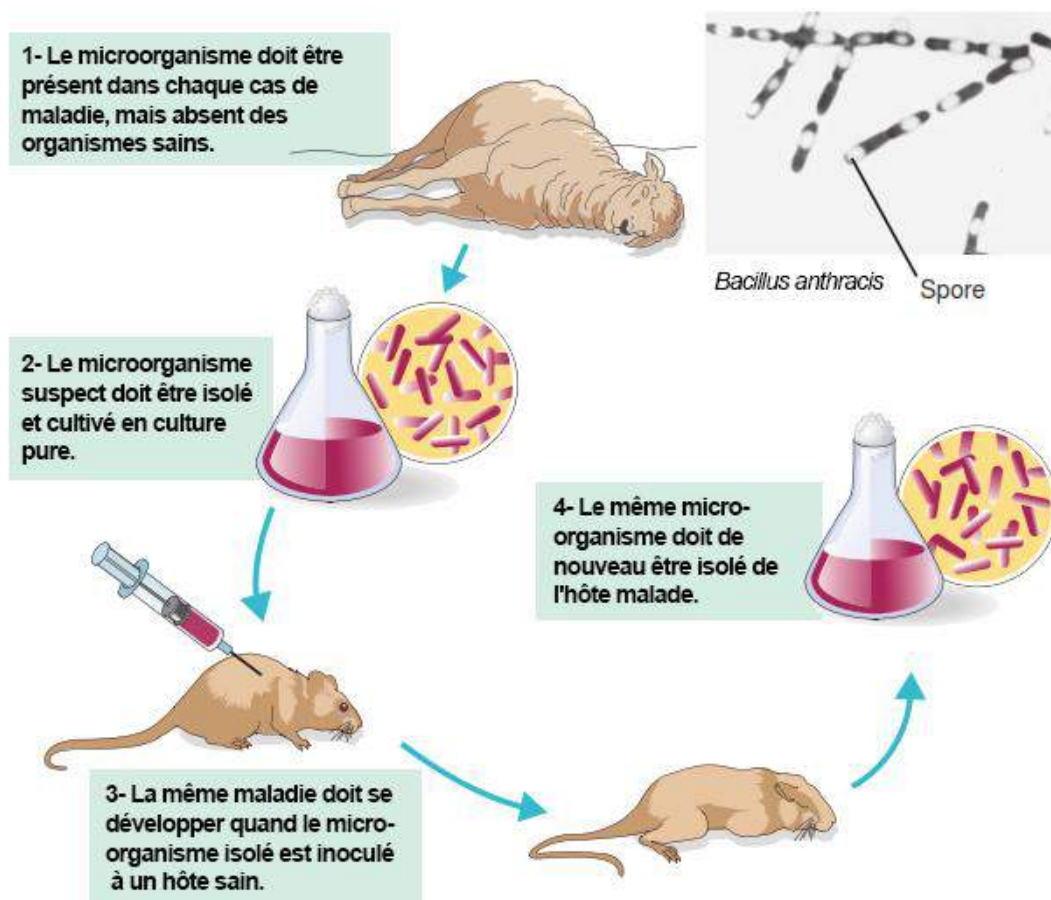


Figure I.5 : Postulats de Koch.



### 1.3.2. Vaccination

Après l'établissement de la théorie des germes, les scientifiques investiguaient les mécanismes qui protégeaient les hommes et le bétail des agents pathogènes.

Durant son travail sur le choléra des poules, Pasteur découvrit que si ces cultures atténuées de l'agent pathogène étaient injectées à des poulets. Ceux-ci restaient sains et devenaient résistants à la maladie (Figure I.6). Il appela cette culture atténuée un vaccin (du latin *vacca*, vache). Pasteur prépara ensuite le vaccin contre la rage par une approche différente. L'agent pathogène était atténué en le faisant se développer dans un hôte inhabituel.

Emile von Behring (1854-1917) et Shibasaburo Kitasato (1852-1931) ont réussi à produire l'antitoxine du tétanos, après injection de cette toxine inactivée à des lapins.

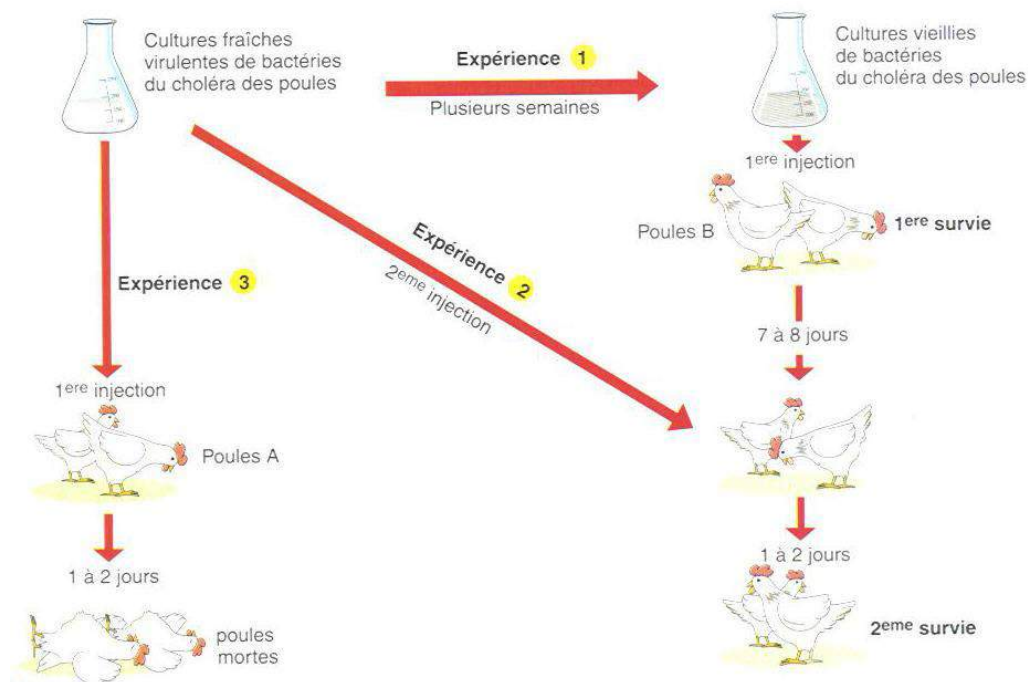


Figure I.6 : Expérience de Pasteur sur le choléra des poules.

### 1.4. Naissance de la microbiologie industrielle

Bien que Théodore Schwann et d'autres aient proposé en 1837 que les cellules de levure soient responsables de la transformation des sucres en alcool, processus qu'ils appelèrent fermentation alcoolique, les chimistes de l'époque étaient convaincus que la fermentation était due à une sorte d'instabilité chimique qui dégradait le sucre en alcool. Pasteur n'était pas d'accord, Il démontra par la suite que toutes les fermentations étaient dues à l'activité de levures et de bactéries spécifiques.

Les travaux de Pasteur ainsi que le développement des connaissances du métabolisme bactérien permettent la naissance la microbiologie industrielle.

### 1.5. Ecologie microbienne

L'investigation du rôle écologique des microorganismes a été initiée par deux des pionniers, Sergei Winogradsky (1856-1953) et Martinus Beijerinck (1851-1931).

Winogradsky apporta beaucoup à la microbiologie du sol, il découvrit que les bactéries du sol oxydaient le fer, le soufre et l'ammoniaque pour obtenir de l'énergie et que de nombreuses

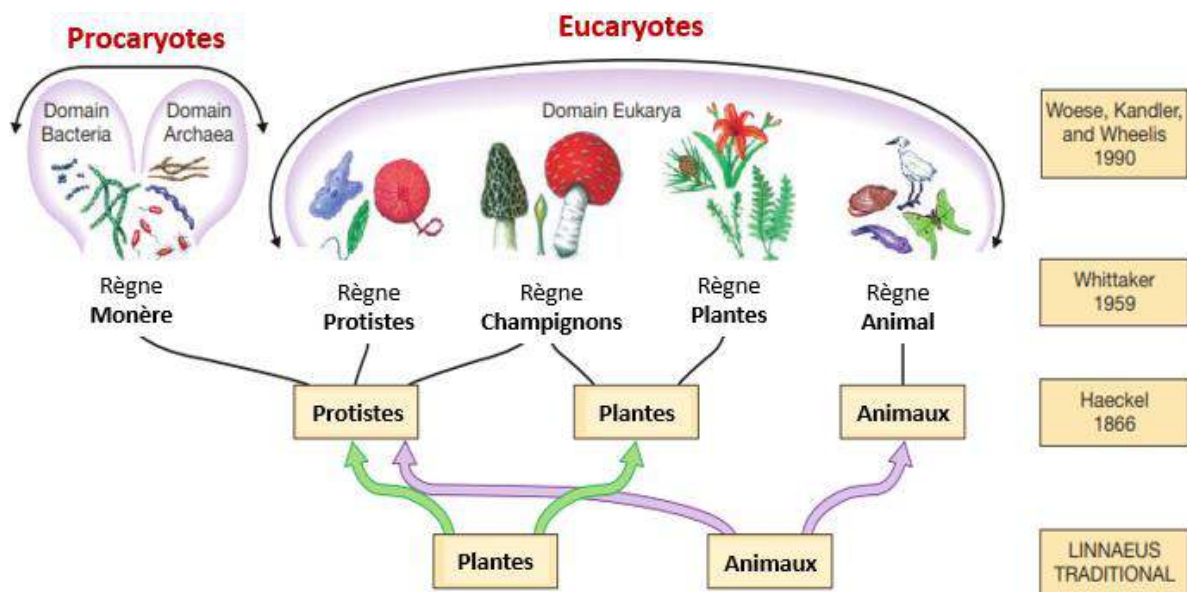
bactéries pouvaient incorporer du CO<sub>2</sub> dans la matière organique comme les organismes photosynthétiques. Il isola aussi du sol des bactéries anaérobies, fixatrices d'azote et étudia la décomposition de la cellulose.

Beijerinck fut un des plus grands microbiologistes pour sa contribution fondamentale à l'écologie microbienne et à de nombreux autres domaines. Il isola la bactérie aérobie fixatrice d'azote (*Azotobacter*), puis une bactérie d'un nodule racinaire également capable de fixer l'azote (*Rhizobium*), ainsi que des bactéries sulfate-réductrices.

Beijerinck et Winogradsky développèrent la technique d'enrichissement des cultures et l'utilisation de milieux sélectifs.

## 2. Les membres du monde microbien

La taxonomie des organismes a progressé en fonction du développement des connaissances, elle repose sur un ensemble de caractères phénotypiques, biochimiques, génotypique et phylogénétique (Figure I.7).



**Figure I.2 :** Evolution du système de classification ; les systèmes de classification ont progressé du modèle linnéen simple de deux royaumes à l'arrangement actuel à cinq règnes et trois domaines.

Le système de classification à cinq règnes (*Monera*, *Protista*, *Fungi*, *Animalia* et *Plantae*) a été proposé par Whittaker (1969). Les organismes y sont divisés selon au moins trois critères majeurs : le type cellulaire (procaryote ou eucaryote), le niveau d'organisation (unicellulaire ou multicellulaire) et le type de nutritionnel (Tableau I.1). Ce système a été modifié par Woese et al (1990), qui ont proposé une classification à trois domaines : les *Bacteria* (les bactéries vraies ou eubactéries), les *Archaea* (les archées) et les *Eucarya* (tous les organismes eucaryotes). Actuellement, ce système à trois domaines et cinq règnes est largement accepté par la communauté scientifique. Ci-dessous, une brève description des différents groupes :

Les *Bacteria* sont des procaryotes, des organismes habituellement unicellulaires, de structure simple. Elles occupent la plupart des milieux et constituent certainement en nombre

de cellules, peut être en masse, la plus grande partie du vivant. Elles remplissent des fonctions fondamentales dans l'écosystème terrestre, comme par exemple dans le cycle de l'azote ou du soufre. Elles jouent aussi un rôle prépondérant dans le recyclage des déchets organiques.

Les *Archaea* sont des procaryotes se distinguant des eubactéries par certains caractères chimiques dont la constitution de la membrane cellulaire et par l'absence d'espèces pathogènes pour les humains ou même pour les animaux.

Les archéobactéries constituent un groupe très hétérogène, regroupant peu d'espèces connues, ayant la capacité de se développer dans des niches extrêmes où les conditions de vie sont très difficiles voire impossibles pour la plupart des autres organismes, on distingue des halophiles extrême, des thermophiles extrêmes et des méthanogènes.

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

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

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

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

**Tableau I.1** : Comparaison des trois domaines du vivant.

Caractéristiques	Domaines		
	Bactéries	Archées	Eucaryotes
Enveloppe nucléaire	Absente	Absente	Présente
Organites membraneux	Absents	Absents	Présents
Peptidoglycane dans la paroi cellulaire	Présents	Absents	Absents
Lipides membranaires	Chaînes carbonées linéaires	Quelques chaînes carbonées ramifiées	Chaînes carbonées linéaires
ARN polymérase	Un type	Plusieurs types	Plusieurs types
Premier acide aminé dans la synthèse des protéines	Formyl-méthionine	Méthionine	Méthionine
Introns dans les gènes	Très rares	Présents dans certains gènes	Présents dans de nombreux gènes
Réaction à la streptomycine et au chloramphénicol (antibiotiques)	Inhibition de la croissance	Aucune inhibition de la croissance	Aucune inhibition de la croissance
Histones associées à l'ADN	Absentes	Présentes dans certaines espèces	Présentes
Chromosome en forme d'anneau	Présent	Présent	Absent
Capacité de croître à des températures supérieures à 100 °C	Non	Oui, chez certaines espèces	Non

### 3. Domaines et rôles de la microbiologie

La microbiologie moderne est une large discipline avec de nombreuses spécialités. Elle a une orientation fondamentale et appliquée. L'orientation fondamentale concerne la biologie des microorganismes et comprend la virologie, la bactériologie, la phycologie ou algologie, la mycologie ou la protozoologie, la cytologie et la physiologie microbienne et la taxinomie des microorganismes. L'orientation appliquée concerne des problèmes pratiques tels que la maladie, le traitement de l'eau et des eaux usées, la détérioration et la production des aliments et l'utilisation industrielle des microorganismes. Il est important de noter que les orientations fondamentale et appliquée sont intriquées.

La microbiologie a autant de champs d'applications que de sciences ou technologies ayant un quelconque rapport avec les microorganismes, on cite :

- La **microbiologie médicale** s'occupe des maladies humaines et animales. Les microbiologistes identifient l'agent responsable d'une maladie infectieuse et prennent les mesures pour l'éliminer.
- La **microbiologie de santé publique** est en relation étroite avec microbiologie médicale. Dans ce domaine, les microbiologistes cherchent à contrôler la propagation des maladies contagieuses.
- L'**immunologie** s'intéresse à la façon dont le système immunitaire protège le corps contre les germes pathogènes et à la réponse des agents infectieux.
- La **microbiologie agronomique** concerne l'impact des microorganismes sur l'agriculture. Les scientifiques luttent contre les maladies végétales qui affectent les cultures d'importance alimentaire, essayent d'augmenter la fertilité du sol ainsi que le rendement des récoltes.
- L'**écologie microbienne** s'intéresse aux relations entre les microorganismes et aux constituants de leurs habitats qu'ils soient vivants ou morts. Les microbiologistes du domaine étudient les contributions globales et locales des micro-organismes aux cycles du carbone, de l'azote et du soufre.
- La **microbiologie alimentaire** a pour objectif d'empêcher la contamination de la nourriture et la transmission des maladies alimentaires telles que le botulisme et la salmonellose. Ils utilisent aussi des microorganismes pour fabriquer des fromages, des yaourts etc.
- La **microbiologie industrielle** utilise des micro-organismes pour produire des substances telles que des antibiotiques, des vaccins, des alcools et d'autres solvants, des vitamines, des acides aminés et des enzymes.
- La **génétique et la biologie moléculaire** se concentrent sur la nature de l'information génétique et sur la façon dont elle régule le développement et le fonctionnement des cellules et des organismes.

### 4. Avenir de la microbiologie

Avec les nouveaux instruments de la biologie moléculaire, la microbiologie de demain est déjà là. Il sera possible d'identifier de nouvelles protéines, d'en prédire la fonction grâce à l'analyse bio-informatique, de découvrir les mécanismes intimes de leurs interactions et de leur distribution à l'intérieur de la cellule, et de leurs assemblages en structures complexes et en machineries fonctionnelles.

Cependant l'approche « génétique classique » a des beaux jours devant elle, car elle seule, via l'étude de mutants, permettra, pendant encore longtemps, d'associer un rôle

physiologique à la myriade de protéines dites « sans fonction connue » découvertes grâce aux nouvelles approches « omiques ».

L'étude et l'exploitation de l'énorme biodiversité du monde procaryote complétera nos connaissances sur ces organismes et leur évolution, et permettra de pénétrer encore plus en profondeur dans le « mystère » de l'origine de la vie.

## Chapitre 2 : Structure de la cellule procaryote

### INTRODUCTION

La bactérie est une unité cellulaire, c'est-à-dire une cellule à un seul chromosome sans membrane nucléaire, sans mitochondrie, sans appareil de Golgi, de taille variable (quelque fraction de millimètre à quelque micromètre) assurant un cycle biochimique à multiplication importante. Chez les bactéries, on distingue des structures obligatoires, présentes chez toutes les bactéries et des structures dont la présence est facultative et caractérisent certains groupes bactériens.

### 1. Caractéristiques générale de la cellule procaryote

La nature procaryote d'un organisme peut être schématisée en quatre points (figure II. 1) : (i) la présence d'une paroi ; (ii) l'absence de membrane nucléaire ; (iii) l'absence de membranes internes dans le cytoplasme, à l'exception des Planctomycètes ; (iv) certaines caractéristiques des constituants du cytoplasme.

L'enveloppe est constituée d'une membrane (membrane interne, ou cytoplasmique), et à l'extérieur de celle-ci de la paroi, une structure essentielle des procaryotes, qui définit leur forme et assure l'intégrité cellulaire. Cette structure est formée d'un polymère complexe, le peptidoglycane (ou muréine) chez les Bactéries, ou pseudomuréine chez certaines Archées. Chez de nombreuses classes de Bactéries (les Gram-), la paroi est entourée d'une membrane externe. Chez de nombreuses Bactéries, à l'enveloppe s'ajoute un autre revêtement, la capsule, constituée de polysaccharides très hydratés, qui joue un rôle protecteur important. Sur la surface de la paroi sont présentes un certain nombre de structures ayant différents rôles.

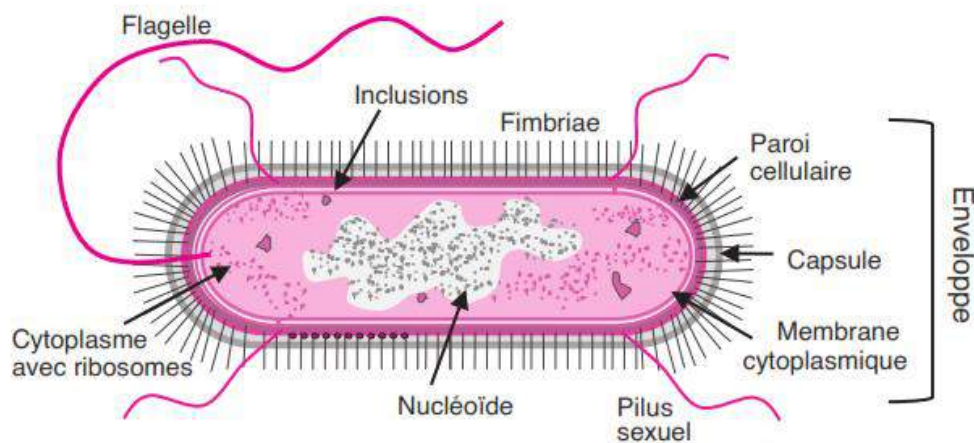


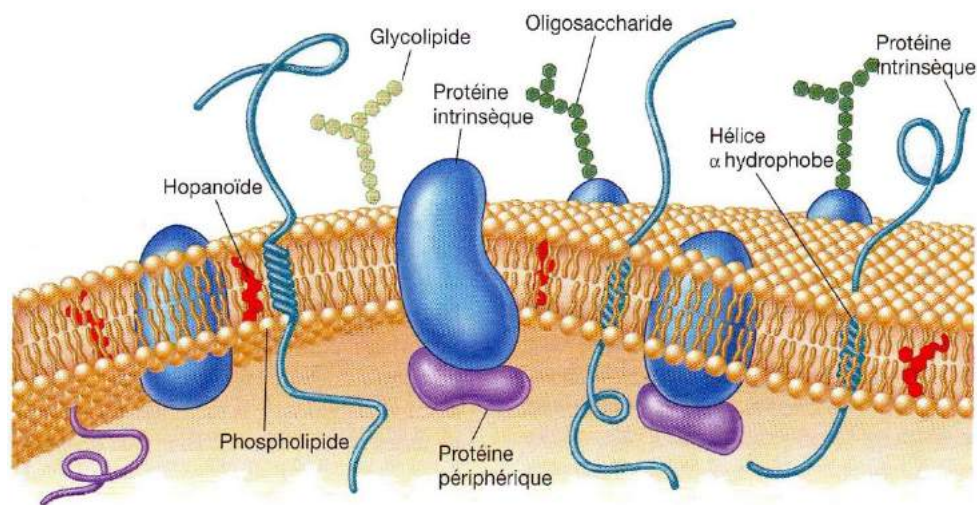
Figure II.1 : Structure et organisation d'une cellule procaryote.

### 3. Membrane Plasmique

Les membranes sont absolument nécessaires à tous les organismes vivants, elles assurent les interactions des cellules avec leur environnement. Les membranes cytoplasmiques des procaryotes sont particulièrement importantes étant donné qu'elles doivent remplir un très

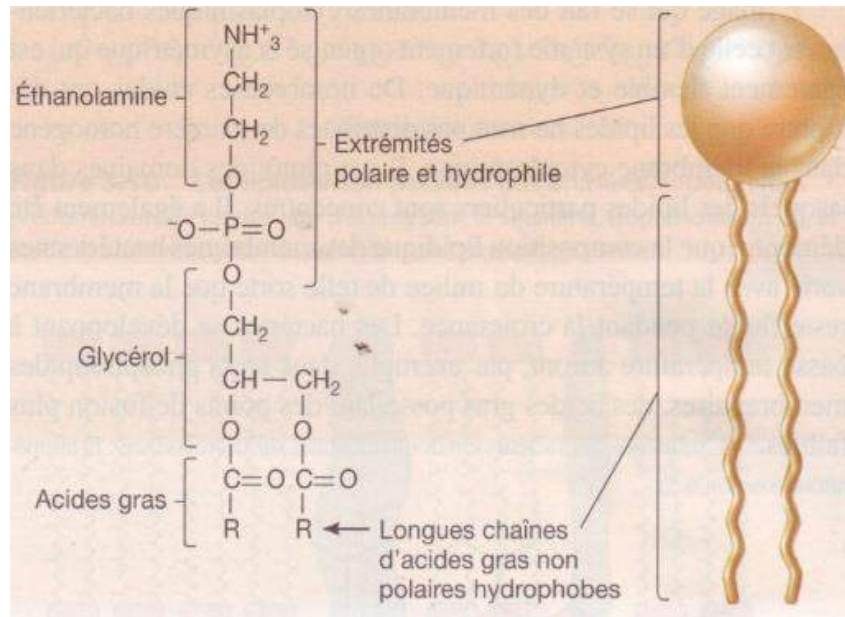
nombre de rôles différents. En plus de contenir le cytoplasme, elle sert aussi de barrière perméable sélective : elle permet aux ions et aux molécules de passer vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule tout en empêchant le mouvement d'autres. La membrane cytoplasmique procaryote est aussi le site d'une série de processus métaboliques essentiels : la respiration, la photosynthèse, la synthèse des lipides et des constituants de la paroi cellulaire. Enfin, les membranes contiennent des molécules réceptrices spéciales qui permettent à la bactérie de détecter et de répondre aux substances chimiques présentes dans leur environnement.

Le modèle de la structure membranaire le mieux accepté est le modèle de la « mosaïque fluide » de Singer et Nicholson (figure II.2), qui propose que les membranes sont des bicouches lipidiques dans lesquelles flottent les protéines.



**Figure II.x :** La structure de la membrane cytoplasmique bactérienne.

La nature chimique des lipides membranaires est essentielle pour leur capacité à former des bicouches. La plupart des lipides de la membrane ont une structure asymétrique avec une extrémité polaire et une extrémité non polaire (figure II.3), on les dit **amphipathiques**. Leurs extrémités polaires interagissent avec l'eau et sont donc **hydrophiles**, leurs extrémités non polaires, **hydrophobes**, sont insolubles dans l'eau et ont tendance à s'associer les unes aux autres. Dans un environnement aqueux, les lipides amphipathiques interagissent pour former une double couche. Les surfaces externes de la bicouche lipidique sont hydrophiles tandis que les extrémités hydrophobes sont enfouies à l'intérieur, à l'abri de l'eau.



**Figure II.3 :** La structure d'un lipide membranaire polaire.

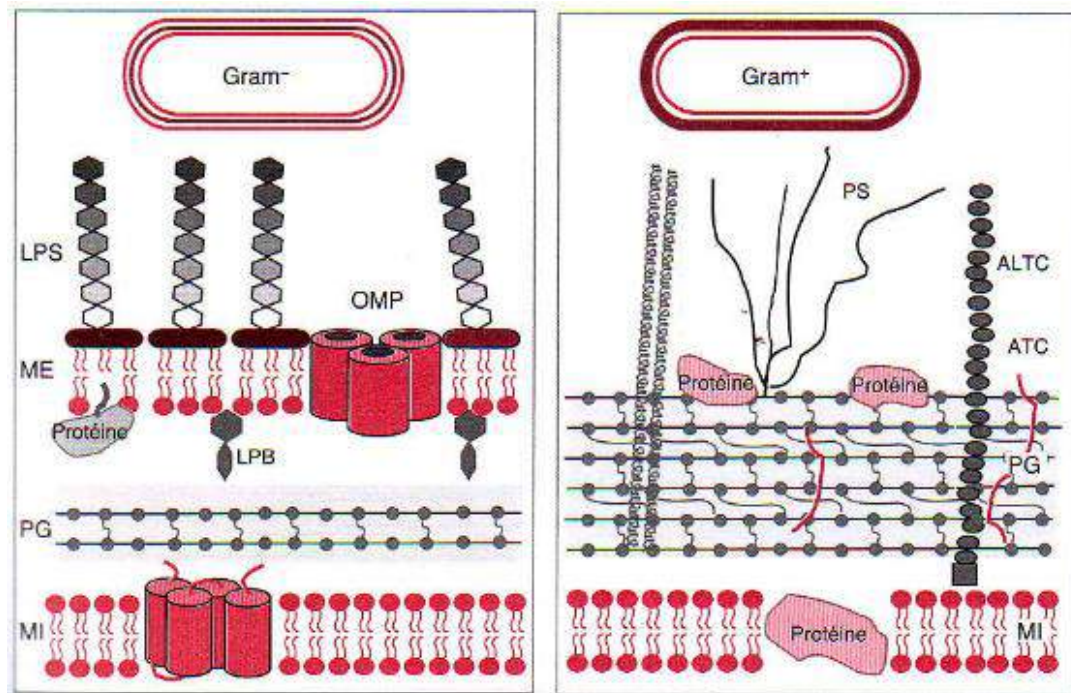
On distingue deux types de protéines membranaires selon la manière dont elles se séparent de la membrane. Les **protéines périphériques** représentent 20 à 30 % des protéines membranaires totales, ils sont faiblement associées à la membrane et peuvent être facilement libérées. Les protéines intrinsèques représentent environ 70 à 80 %, ils sont amphipathiques, insolubles dans les solutions aqueuses et ne sont pas facilement extraites des membranes.

#### 4. Paroi de la cellule procaryote

La paroi cellulaire est pour plusieurs raisons une des parties les plus importantes d'une cellule procaryote. A part les mycoplasmes et quelques archéobactéries, la plupart des bactéries ont une paroi qui leur donne une forme et les protège de la lyse osmotique. Les parois cellulaires de nombreux agents pathogènes ont des constituants qui contribuent au pouvoir pathogène. La paroi peut protéger une cellule contre des substances toxiques, elle est aussi le site d'action de plusieurs antibiotiques.

Sur la base d'une coloration développée par Christian Gram en 1884, il apparait évident que les bactéries se divisent en deux groupes majeurs. Les bactéries Gram-positives se colorent en pourpre tandis que les bactéries Gram-négatives se colorent en rose ou rouge. La paroi des cellules Gram positives est formée d'une seule couche homogène de peptidoglycane ou muréine de 20 à 80 nm d'épaisseur qui se trouve à l'extérieur de la membrane plasmique (figure II.4). Au contraire la paroi des bactéries Gram négatives est fort complexe. Elle contient une couche de peptidoglycane de 2 à 7 nm d'épaisseur entourée d'une membrane externe épaisse de 7 à 8 nm (figure II.4). A cause de ce peptidoglycane plus épais, les parois des bactéries Gram positives sont plus résistantes que celles des bactéries Gram négatives.





**Figure II.4 :** Différences structurales des enveloppes des Bactéries Gram- et Gram+. LPS : lipopolysaccharide ; ME : membrane externe, PC : peptidoglycane ; MI : membrane interne ; OMP : protéines intégrales de la membrane externe ; LPB (ou Lpp) : lipoprotéine de Braun ; ALTC : acide lipotéichoïque ; ATC : acide téichoïque ; PS : polysaccharide.

Le peptidoglycane ou murène est un énorme polymère composé de plusieurs sous-unités liées entre-elles. Le polymère contient deux dérivés glucidiques, la N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM) et plusieurs acides aminés différents. Trois d'entre eux l'acide D-glutamique, la D-alanine et l'acide *méso*-diaminopimélique ne sont pas trouvés dans les protéines.

La sous-unité de peptidoglycane est constituée de l'alternance de NAG et de NAM. Un térapeptide constitué d'acides aminés L alternant avec des acides aminés D est lié au groupe carboxyle de NAM. Beaucoup de bactéries possèdent la L-lysine en troisième position à la place de l'acide *méso*-diaminopimélique (figure II.5).

Les chaînes de peptidoglycane sont reliées entre-elles par des liaisons interpeptidiques. Souvent le groupe carboxyle de la D-alanine terminale est directement lié au groupe aminé de l'acide diaminopimélique ; dans certains cas, la liaison se fait par un pont interpeptidique. Le peptidoglycane de la plupart des cellules Gram-négatives possède moins de ponts interpeptidiques (figure II.6).

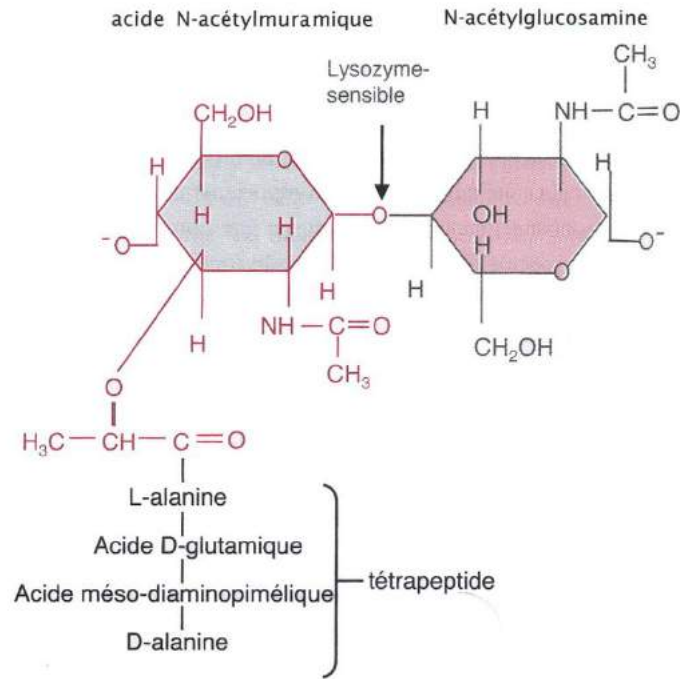


Figure II.5 : La composition des sous-unités de peptidoglycane.

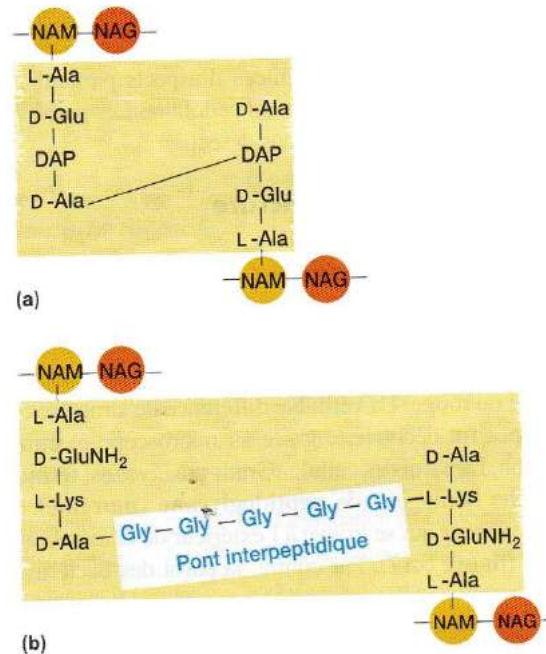


Figure II.6 : Les pontages du peptidoglycane. (a) Le peptidoglycane d'*E. coli* avec un pontage direct, typique de la plupart des bactéries Gram-négatives. (b) Le peptidoglycane de *Staphylococcus aureus*, une bactérie Gram-positive.

#### 4.1. Paroi des bactéries Gram positives

Les parois épaisses des bactéries Gram-positives sont constituées principalement de peptidoglycane qui contient souvent un pont interpeptidique (figure II.7). Ces parois

contiennent généralement en plus une grande quantité d'acides teichoïques. Les acides teichoïques sont fixés covalentiellement soit au peptidoglycane lui-même, soit aux lipides de la membrane cytoplasmique (lipoteichoïques). Les bactéries Gram-positives n'ont pas d'espace périplasmique évident, mais elles peuvent avoir un périplasm, qui contient relativement peu de protéines.

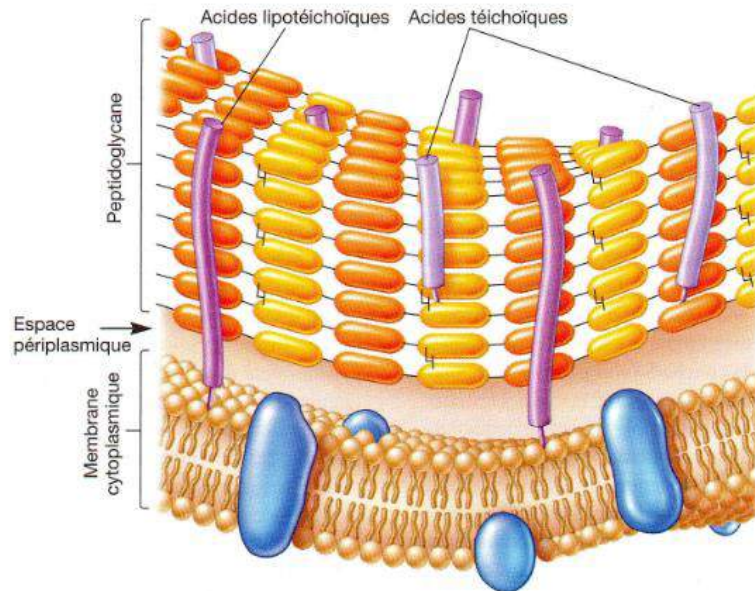


Figure II.7 : L'enveloppe des bactéries Gram-positives.

#### 4.2. Paroi des bactéries Gram négatives

Les parois des bactéries Gram- sont beaucoup plus compliquées que celles des Gram+. La couche fine de peptidoglycane, adjacente à la membrane cytoplasmique et limitée de part et d'autre par l'espace périplasmique (figure II.8). Cet espace contient des enzymes et des protéines périplasmiques (enzymes hydrolytiques, protéines de transport...).

La membrane externe est liée à la cellule de deux manières. La première est la lipoprotéine de Braun. Le second mécanisme de liaison fait intervenir de nombreux sites d'adhésion unissant la membrane externe et la membrane cytoplasmique.

Les éléments les plus particuliers de la membrane externe sont les **lipopolysaccharides (LPS)**, qui sont formées de trois parties : le lipide A, le polysaccharide central et la chaîne latérale O (figure II.9).

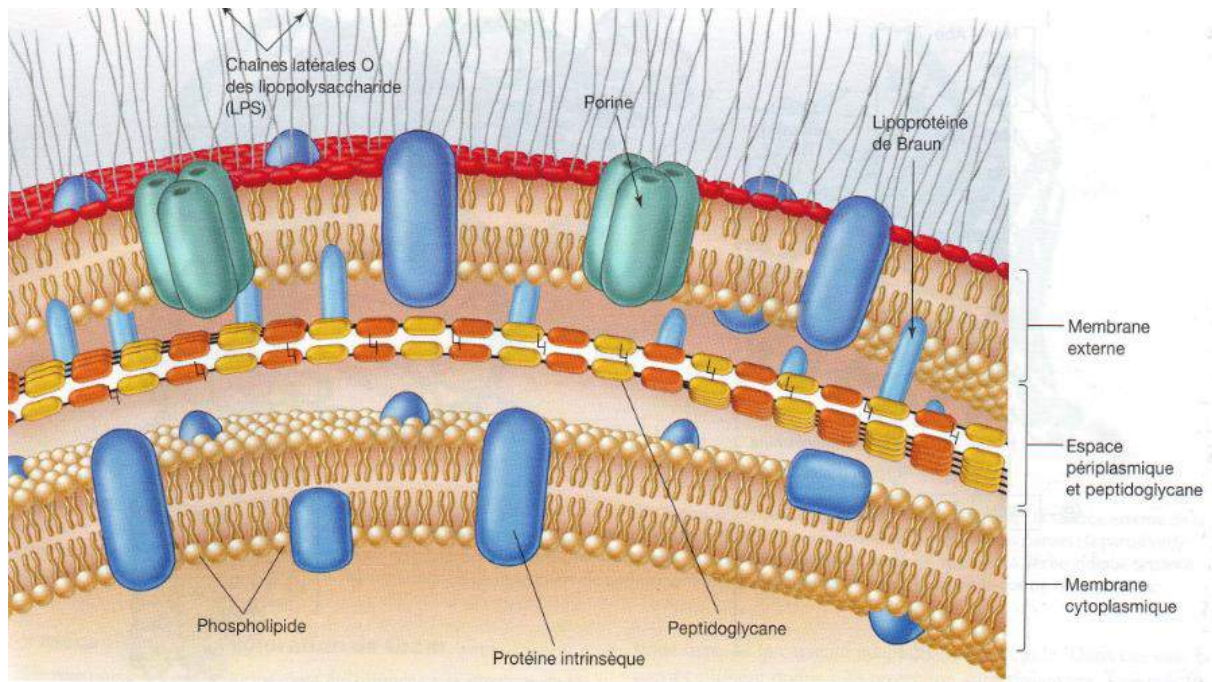


Figure II.8 : L'enveloppe des bactéries Gram-négatives.

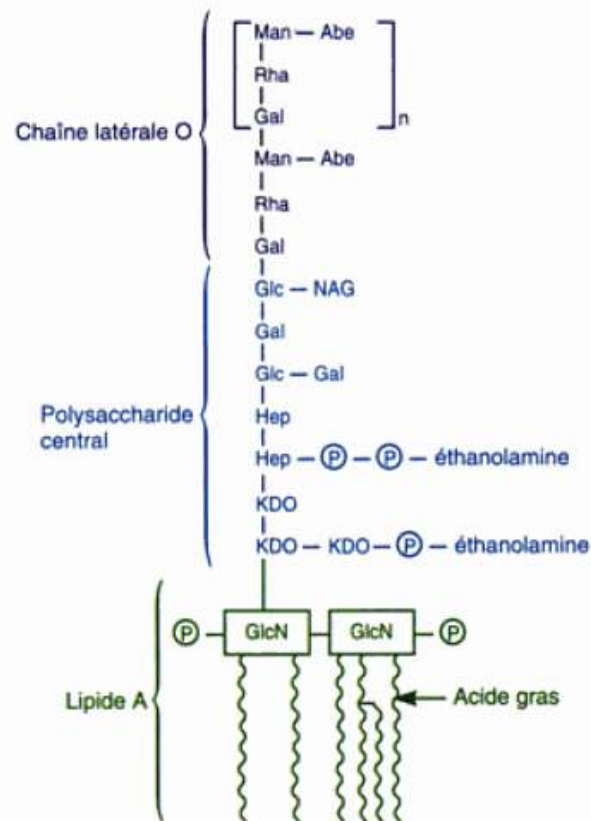


Figure II.9 : La structure des lipopolysaccharides.

La chaîne latérale O ou antigène O est constituée de quelques sucres particuliers et sa composition varie selon les souches bactériennes. Les chaînes latérales O sont facilement reconnues par les anticorps de l'hôte.

Le lipide A aide à la stabilisation de la structure membranaire. Il est également toxique, et peut donc agir comme une endotoxine et provoquer certains des symptômes qui apparaissent lors d'infections à bactéries Gram-négatives.

#### 4.3. Paroi des archées

Les Archées se distinguent par l'absence de muréine dans leur paroi. Seules certaines Archées méthanogènes, dont la paroi ressemble à celle des Bactéries, contiennent une pseudomuréine, constituée de répétitions de NAG et d'acide N-acétyl-talosaminuramique (NAT), que l'on ne trouve que chez ces Archées (figure II.10). Ces différences de composition rendent ces Archées résistantes au lysozyme et aux antibiotiques de type  $\beta$ -lactames.

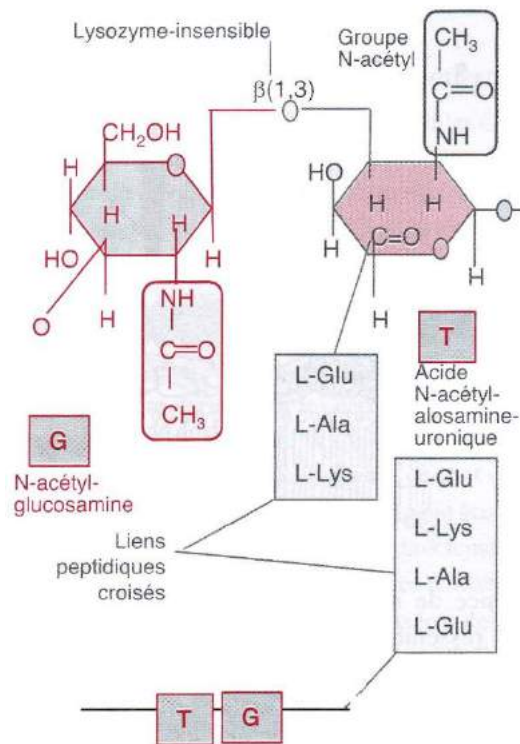


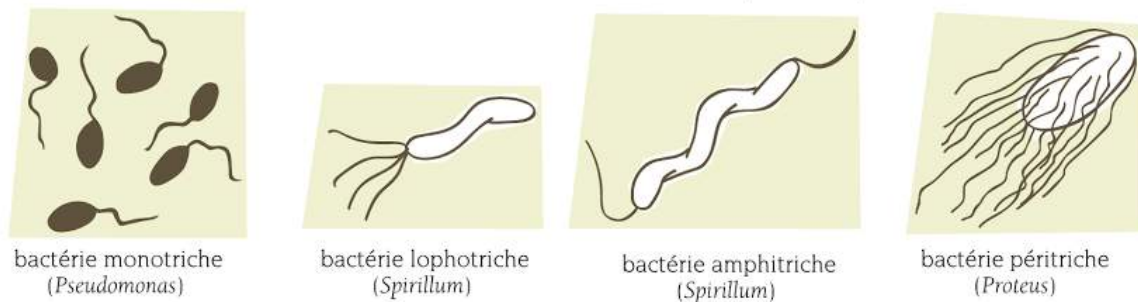
Figure II.10 : La pseudomuréine des Archées méthanogènes.

#### 5. Flagelle et mobilité

La plupart des procaryotes mobiles se déplacent grâce à des **flagelles**, qui sont des appendices locomoteurs s'étendant à l'extérieur de la membrane cytoplasmique et de la paroi cellulaire.

Les espèces bactériennes se distinguent souvent par le mode de distribution des flagelles. Les bactéries **monotriches** (du grec trikhos, cheveu) ont un seul flagelle : s'il est situé à une extrémité, on le dit **polaire**. Les bactéries **amphitriches** (du grec amphî, des deux côtés) ont un seul flagelle à chaque extrémité. Par contre, les bactéries **lophotriches** (du grec lophos,

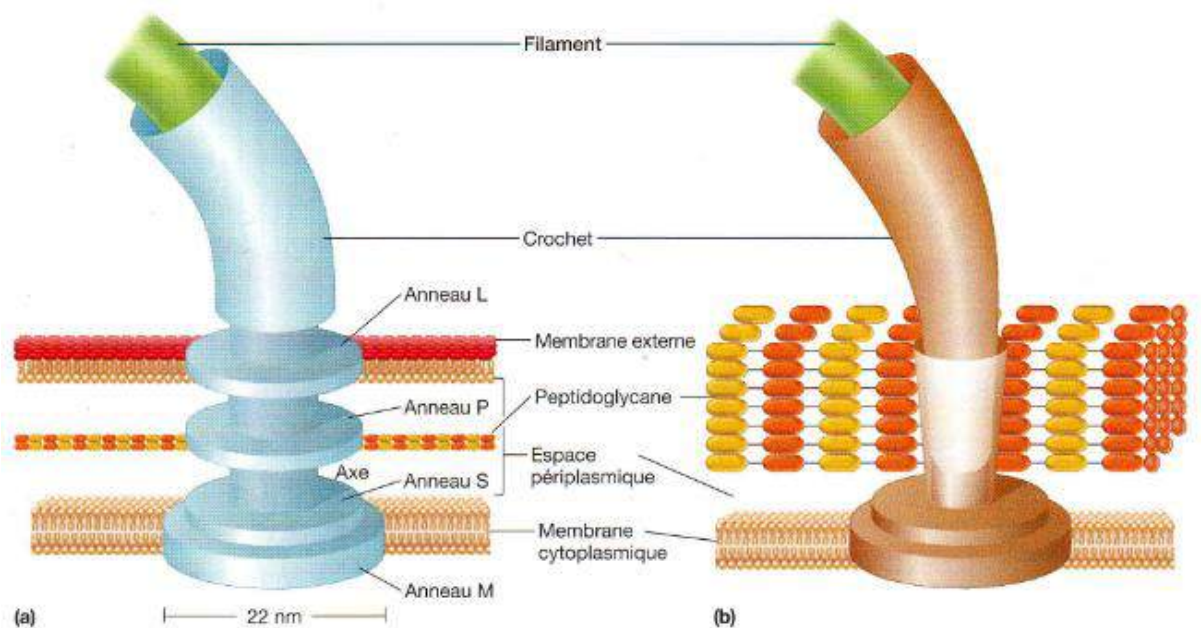
touffe) ont une touffe de flagelles à une ou aux deux extrémités. Les flagelles sont distribués sur toute la surface des bactéries **péritriches** (du grec péri, autour) (figure II.11).



**Figure II.11** : La distribution des flagelles.

### 5.1. Ultrastructure flagellaire

Le flagelle bactérien se compose de trois parties : un **filament**, un **corps basal** et un **crochet**. Le filament est un cylindre creux, rigide, constitué de sous-unités d'une protéine appelée la **flagelline** dont la masse moléculaire varie de 30 000 à 60 000 Da selon l'espèce bactérienne. Le crochet est un peu plus large que le filament et fait de différentes sous-unités protéiques. Le corps basal est la structure la plus complexe. Chez *E. coli* et la plupart des bactéries Gram-négatives, le corps basal a quatre anneaux attachés à un axe central. Les anneaux extérieurs L et P s'associent respectivement avec les lipopolysaccharides et le peptidoglycane. L'anneau M interne est en contact avec la membrane cytoplasmique. Les bactéries Gram-positives n'ont que deux anneaux sur le corps basal, un anneau interne connecté à la membrane cytoplasmique et l'autre probablement attaché au peptidoglycane (figure II.12).

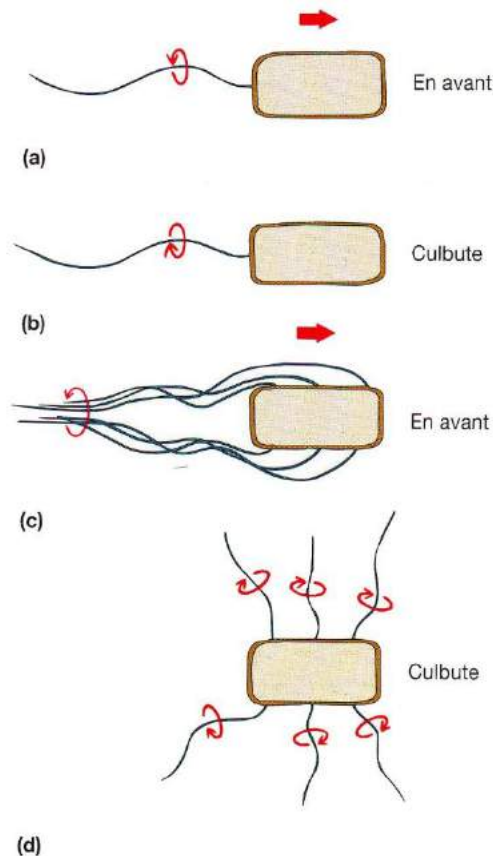


**Figure II.12** : L'ultrastructure du flagelle d'une bactérie. Le corps basal et le crochet chez (a) les bactéries Gram-négatives et (b) les bactéries Gram-positives.

## 5.2. Mécanisme du mouvement flagellaire

Le filament des flagelles est en forme d'hélice rigide et la bactérie se déplace quand l'hélice tourne. La direction de la rotation du flagelle détermine le type de mouvement de la bactérie. Les flagelles monotriches polaires tournent dans le sens antihorlogique, ce qui propulse la cellule vers l'avant. Les bactéries monotriches s'arrêtent et culbutent au hasard lors de l'inversion du sens de rotation du flagelle. Les bactéries péritriches se déplacent d'une manière similaire. Pour avancer, les flagelles tournent dans le sens antihorlogique. Se faisant, ils plient à leur crochet pour former un faisceau rotatoire qui propulse la cellule vers l'avant. La rotation des flagelles dans le sens horlogique détruit ce faisceau et la cellule culbute sur elle-même (figure II.13).

**Remarque :** En plus de leur rôle dans la mobilité, les flagelles présentent un caractère chimiotactique ; certaines bactéries capables de se mouvoir, sont attirées par les nutriments (sucres, acides aminés) et repoussées par des substances toxiques ou nuisibles. Les flagelles sont aussi le support de l'antigénicité, ils confèrent à la bactérie de nouvelles propriétés antigéniques.



**Figure II.13 :** Relation entre la rotation des flagelles et le mouvement de la bactérie. Les parties (a) et (b) décrivent le mouvement de bactéries monotriches polaires. Les parties (c) et (d) illustrent les mouvements d'organismes péritriches.

## 6. Pili et fimbriae

De nombreux procaryotes possèdent de courts appendices, fins comme des cheveux, plus minces que les flagelles.

### 6.1. Pili commun ou pili fimbriae

Les fimbriae (s. fimbria) apparaissent comme de minces tubes composés de sous-unités protéiques disposées en hélices et ils ont environ 3 à 10 nm de diamètre et plusieurs micromètres de long. Quelques types de fimbriae permettent aux bactéries d'adhérer à des surfaces telles que les pierres dans les rivières et les tissus d'un hôte. Les fimbriae font autre chose qu'attacher les cellules. Les fimbriae de type IV sont présents à un ou aux deux pôles des cellules bactériennes. Ils facilitent la fixation aux objets et sont également utilisés pour la mobilité saccadée (*twitching motility*) observée chez certaines bactéries comme *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* et certaines souches d'*E. coli*. Les fimbriae de type IV sont également impliqués dans les mouvements de glissement des Myxobactéries.

### 6.2. Pili sexuels :

De nombreuses bactéries ont des pili sexuels, de 1 à 10 par cellule. Ce sont des structures semblables à des cheveux, mais qui diffèrent des fimbriae (figure II.15). Les pili sont souvent plus épais que les fimbriae (environ 9 à 10 nm de diamètre). Ils sont déterminés génétiquement par des plasmides conjugatifs et sont nécessaires à la conjugaison. Certains virus bactériens se fixent spécifiquement à des récepteurs présents sur les pili sexuels au début de leur cycle de multiplication.

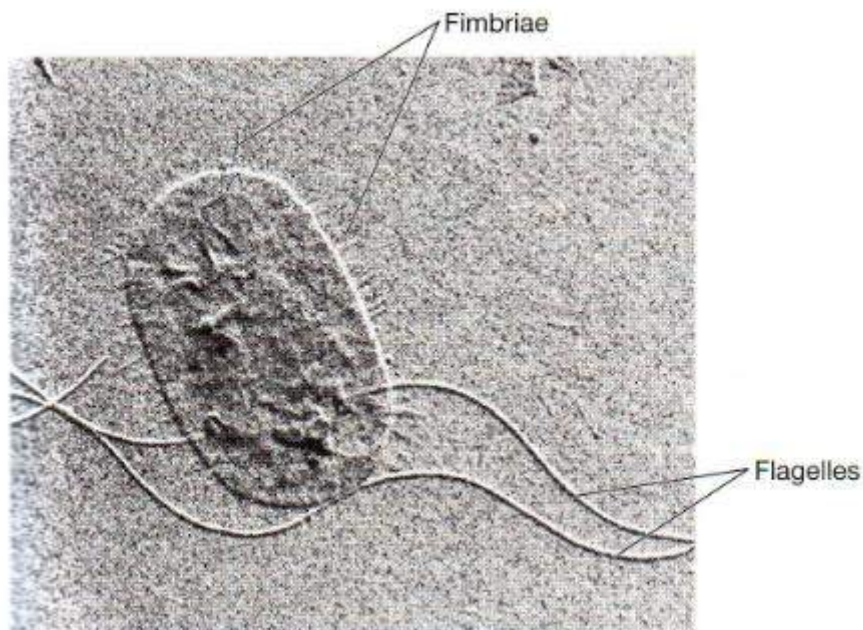


Figure II.14 : Les flagelles et les fimbriae.

## 7. Couches externes

Deux autres couches externes peuvent envelopper certaines cellules.

### 7.1. Capsules

Certains procaryotes ont une couche supplémentaire à l'extérieur de la paroi cellulaire. Cette couche porte différents noms selon ses caractéristiques. Quand la couche est bien organisée et qu'elle ne peut être facilement enlevée, on l'appelle une **capsule**, tandis que la

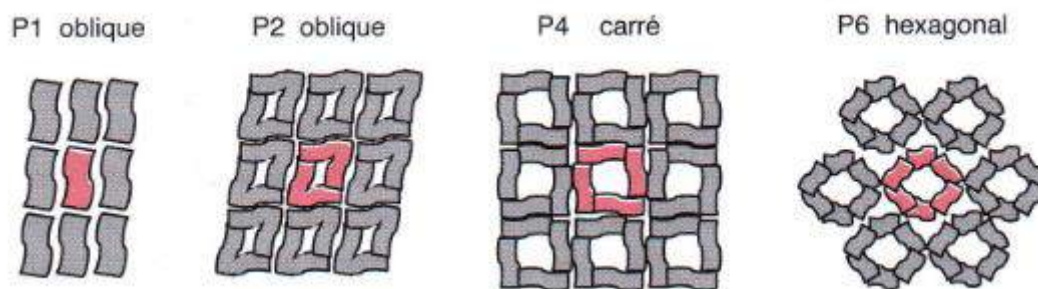


**couche mucoïde** est une couche de substance diffuse et non organisée que l'on peut facilement enlever. Un **glycocalyx** est un réseau de polysaccharides recouvrant la surface des cellules. Ce terme pourrait comprendre à la fois les capsules et les couches mucoïdes puisqu'elles sont en général composées de polysaccharides.

Bien que les capsules ne soient pas nécessaires à la croissance des cultures en laboratoire, elles apportent aux procaryotes plusieurs avantages quand ils se développent dans leurs habitats normaux. Elles permettent aux bactéries pathogènes de résister à la phagocytose par les cellules phagocytaires de l'hôte. Les capsules contiennent beaucoup d'eau et peuvent protéger la bactérie contre la dessiccation. Elles repoussent les virus et la plupart des substances hydrophobes toxiques telles que les détergents. Le glycocalyx permet aussi l'attachement des bactéries sur des surfaces solides y compris sur des tissus végétaux ou animaux. Les bactéries glissantes produisent souvent du mucus, qui dans certains cas semble faciliter la motilité.

## 7.2. Couche S

Nombre de procaryotes ont à leur surface une couche régulièrement structurée, appelée couche S. Chez les bactéries, la couche S est externe à la paroi cellulaire. Chez les archées, la couche S peut n'être que la seule structure pariétale externe à la membrane cytoplasmique. Cette couche ressemble à un pavement régulier et est composée de protéines et de glycoprotéines (figure II.15). Chez les bactéries Gram-négatives, la couche S adhère directement à la membrane externe ; elle est associée à la surface du peptidoglycane chez les bactéries Gram positives. Elle protégerait la cellule contre les fluctuations ioniques, les variations de pH, le stress osmotique, les enzymes ou la bactérie prédatrice *Bdellovibrio*. La couche S aide aussi à maintenir la forme et la rigidité de certaines bactéries. Elle peut favoriser l'adhérence des cellules à des surfaces et enfin, elle semble protéger certaines bactéries pathogènes contre les défenses de l'hôte et contribuerait donc à leur virulence.

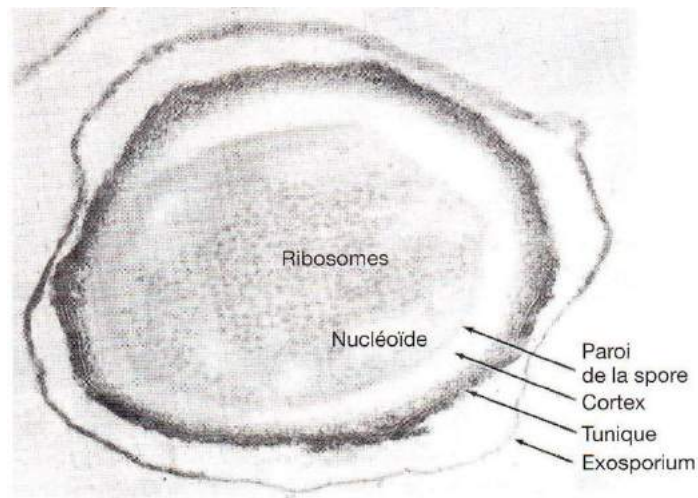


**Figure II.15 :** Différents types d'assemblage des sous-unités de la couche S.

## 8. Endospore

Un certain nombre de bactéries Gram-positives acquièrent une structure spéciale, résistante, dormante, appelée endospore. Les endospores se développent dans les cellules végétatives de quelques genres bactériens : *Bacillus* et *Clostridium* (bâtonnets), *Sporosarcina* (coques) et d'autres. Ces structures sont extraordinairement résistante aux conditions sévères de l'environnement comme la chaleur, les radiations ultraviolettes, les radiations gamma, les désinfectants chimiques et la dessiccation.

Les images au microscope électronique montrent la complexité de la structure de l'endospore (figure II.16).



**Figure II.16 :** La structure d'une endospore. Endospore de *Bacillus anthracis* (x 151 000).

La formation de l'endospore, la sporogénèse ou sporulation, commence au moment où la croissance cellulaire s'arrête par manque d'éléments nutritifs. C'est un processus peut être divisé en sept phases (figure II.17). Il y a d'abord formation d'un filament axial de matériel nucléaire (phase I), suivie de l'invagination de la membrane cellulaire isolant une partie de l'ADN et constituant le septum de la préspore (phase II). La membrane continue à se développer et entoure la préspore d'une seconde enveloppe (phase III). Le cortex se forme, ensuite, dans l'espace compris entre les deux membranes ; du calcium et de l'acide dipicolinique s'y accumulent (phase IV). Les protéines de la tunique sont alors formées autour du cortex (phase V) et l'endospore arrive à maturité (phase VI). Finalement, des enzymes lytiques détruisent le sporange libérant la spore (phase VII).

Les endospores sont d'une grande importance pratique en microbiologie alimentaire, industrielle et médicale à cause de leur résistance et du fait que certaines espèces bactériennes formant des endospores sont dangereusement pathogènes. Il est donc essentiel de pouvoir stériliser les solutions et les objets.

## 9. Matériels génétiques

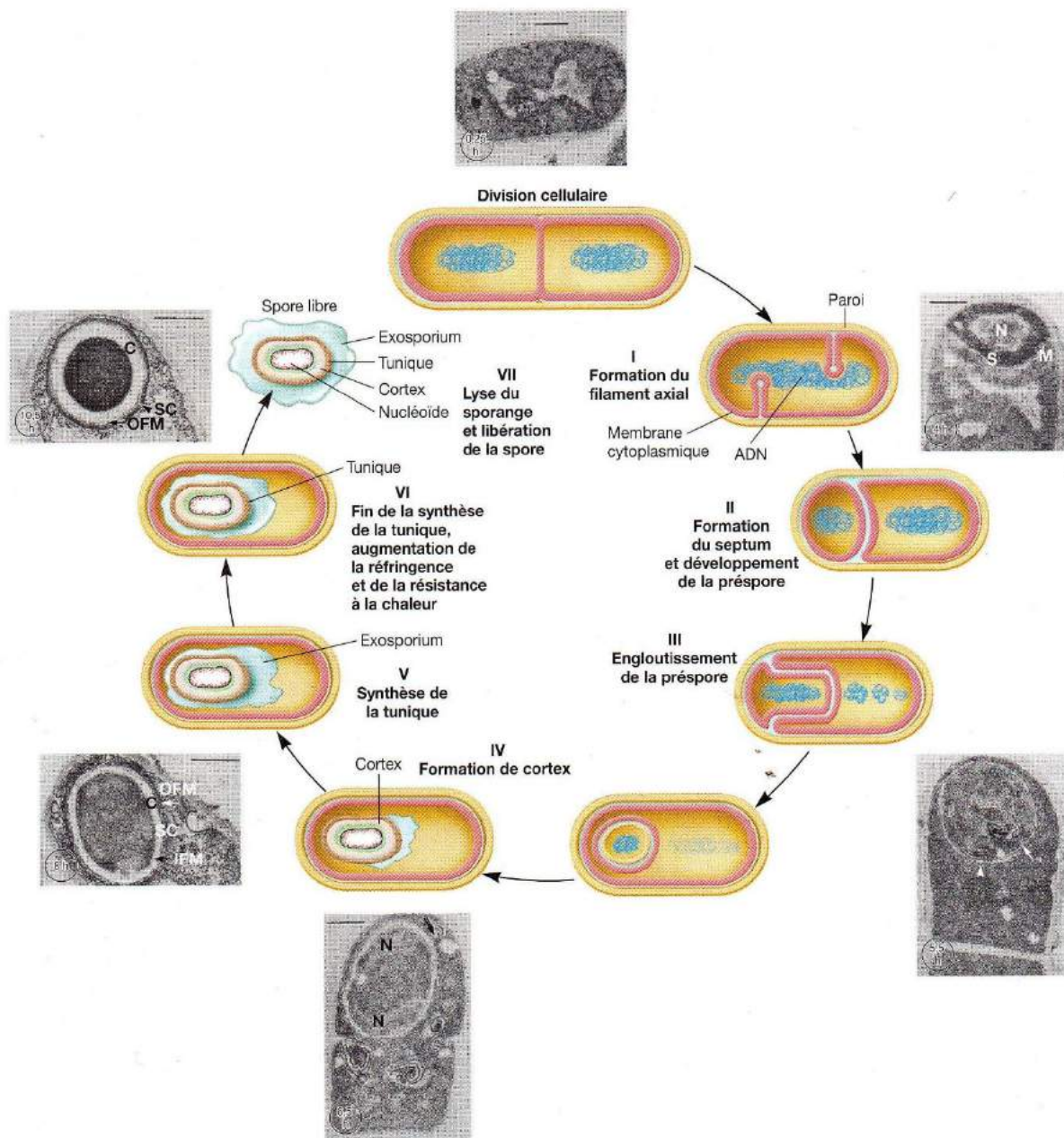
### 9.1. Nucléoïde

Les procaryotes n'ont pas de noyau délimité par une enveloppe. Le chromosome procaryote, se trouve dans une région de forme irrégulière appelée le nucléoïde. Les procaryotes contiennent généralement un cercle unique d'acide désoxyribonucléique (ADN) double brin, mais certains possèdent un chromosome d'ADN linéaire et d'autres comme *Vibrio cholerae* ont plus d'un chromosome.

### 9.2. Plasmides

Les plasmides ne sont pas présents chez toutes les bactéries. Ils sont très petits soit 1/100ème de la taille du chromosome. Ces plasmides sont des molécules d'ADN circulaire qui peuvent être soit libres soit intégrés au chromosome bactérien et peuvent être aussi

échangés entre microbes. Ils jouent un rôle très important dans la résistance aux antibiotiques, la production des substances uropathogènes et la production des bactériocines.



**Figure II.17** : La formation de l'endospore : Le cycle de *Bacillus megaterium*. C, cortex ; IFM et OFM, membrane interne et externe de la préspore ; N, nucléoïde ; S, septum ; SC, tunique de la spore.

# Chapitre 3 : Nutrition bactériens

## INTRODUCTION

Pour assurer sa croissance ou sa survie, une bactérie doit trouver dans son environnement de quoi satisfaire ses besoins nutritifs : sources d'énergie, de carbone, d'azote, etc... Ces éléments doivent être apportés dans un milieu où règnent des conditions physicochimiques favorables (température, pH, pression osmotique, etc...).

Le métabolisme est l'ensemble des réactions biochimiques mises en jeu par un organisme pour permettre sa croissance (figure 1).

Les réactions métaboliques peuvent être classées en deux catégories :

- celles qui produisent de l'énergie : catabolisme.
- celles qui consomment de l'énergie : anabolisme ou biosynthèse.

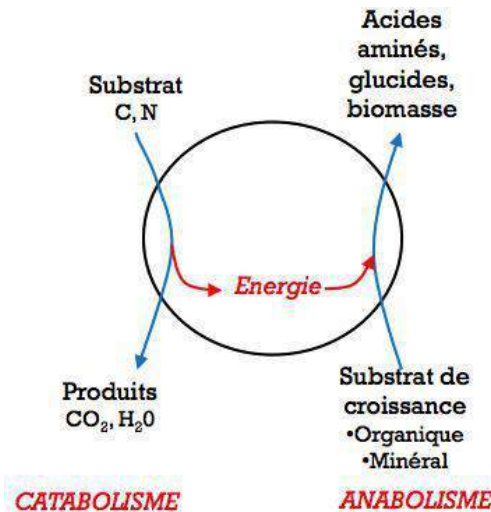


Figure III.1 : La relation entre le catabolisme et l'anabolisme.

### 1. Besoins nutritifs

L'analyse de la cellule microbienne montre que plus de 95 % du poids sec de la cellule sont composés de quelques éléments majeurs : carbone, oxygène, hydrogène, azote, soufre, phosphore, potassium, calcium, magnésium et fer. Ils sont nécessaires aux micro-organismes en quantités importantes et sont appelés **macroéléments ou macronutriments**. Les six premiers éléments (C, O, H, N, S et P) sont des constituants des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Les quatre derniers existent dans la cellule à l'état de cations et jouent plusieurs rôles.

Tous les micro-organismes ont besoin de plusieurs nutriments en petites quantités, en plus des macroéléments. On les appelle **oligoéléments ou micronutriments**. Les oligoéléments (manganèse, zinc, cobalt, molybdène, nickel et cuivre) sont indispensables à la plupart des cellules en quantité tellement faible que les impuretés de l'eau, la verrerie et les composants habituels des milieux de culture sont généralement suffisantes. Dans la nature, les oligoéléments sont ubiquitaires et ne limitent probablement pas le développement. Les oligoéléments font

normalement partie des enzymes et des cofacteurs, ils aident à la catalyse des réactions et au maintien de la structure des protéines.

## 2. Source de carbone, hydrogène, oxygène et électron

Tous les organismes ont besoin de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'une source d'électrons. Le carbone est nécessaire à la formation du squelette de toutes les molécules organiques dont sont constitués les organismes. L'oxygène et l'hydrogène en sont également des éléments importants. Des électrons sont également requis pour deux raisons :

- Fournir l'énergie utile au travail cellulaire suite au mouvement des électrons dans les chaînes de transport des électrons et pendant les autres réactions d'oxydoréduction,
- Réduction des molécules pendant la biosynthèse (la réduction du CO<sub>2</sub> pour former des molécules organiques).

Les besoins en carbone, hydrogène et oxygène sont souvent satisfaits ensemble parce que les molécules utilisées comme sources de carbone apportent également de l'hydrogène et de l'oxygène. Ainsi de nombreux **hétérotrophes** - les organismes qui utilisent des molécules organiques préformées et réduites comme sources de carbone - peuvent également obtenir de l'hydrogène, de l'oxygène et des électrons des mêmes molécules. En effet, plus la source de carbone organique est réduite (plus elle contient d'électrons), plus son contenu en énergie est élevé. Les lipides ont donc un contenu énergétique plus élevé que les glucides. L'anhydride carbonique (CO<sub>2</sub>) étant la forme de carbone la plus oxydée, il est incapable de donner des électrons dans des réactions d'oxydo-réduction. Les organismes, qui utilisent le CO<sub>2</sub> comme unique ou principale source de carbone, sont appelés **autotrophes**. Mais comme le CO<sub>2</sub> ne peut assurer leurs besoins en énergie, ils doivent trouver cette énergie dans d'autres sources comme la lumière ou des molécules inorganiques réduites.

## 3. Les types nutritionnels chez les micro-organismes

Comme le besoin en carbone, en énergie et en électrons est tellement important, les biologistes utilisent des termes spécifiques pour définir la façon dont ces besoins sont satisfaits (tableau III.1).

**Tableau III.1** : Les sources de carbone, d'énergie et d'électrons

<b>Sources de carbone</b>	Autotrophes	CO, seule ou principale source de carbone biosynthétique
	Hétérotrophes	Molécules organiques préformées, réduites provenant d'autres organismes
<b>Sources d'énergie</b>	Phototrophes	Lumière
	Chimiotrophes	Oxydation de composés organiques et inorganiques
<b>Sources d'électrons</b>	Lithotrophes	Molécules inorganiques réduites
	Organotrophes	Molécules organiques

Les microorganismes se classent en hétérotrophes ou autotrophes selon leur source préférée de carbone. Il y a seulement deux sources d'énergie disponibles pour les organismes :

l'énergie lumineuse et l'énergie provenant de l'oxydation de molécules organiques et inorganiques. Les **phototrophes** utilisent la lumière comme source d'énergie ; les **chimiotrophes** utilisent l'oxydation de composés chimiques (soit organiques, soit inorganiques) comme source d'énergie. Les microorganismes n'ont aussi que deux sources d'électrons. Les **lithotrophes** (les « mangeurs de pierres ») utilisent des substances inorganiques réduites comme source d'électrons, tandis que les **organotrophes** extraient les électrons des composants organiques.

Malgré leur grande diversité métabolique, la plupart des microorganismes peuvent être classés en cinq catégories nutritionnelles sur la base de leurs sources primaires en carbone, énergie et électrons (tableau III.2).

### 3.1. Autotrophes photolithotrophes

Les autotrophes photolithotrophes (souvent appelés **photoautotrophes** ou **photolithoautotrophes**) utilisent l'énergie lumineuse et le CO<sub>2</sub> comme source de carbone. Les protistes photosynthétiques et les cyanobactéries se servent de l'eau comme donneur d'électrons et libèrent de l'oxygène. Les bactéries sulfureuses pourpres et vertes ne peuvent pas oxyder l'eau, mais elles extraient les électrons de donneurs inorganiques comme l'hydrogène, le sulfure d'hydrogène et le soufre élémentaire.

### 3.2. Hétérotrophes chimioorganotrophes

Les hétérotrophes chimioorganotrophes (souvent appelés les **chimiohétérotrophes** ou **chimioorganohétérotrophes** ou simplement **hétérotrophes**) utilisent des composés organiques comme sources d'énergie, d'hydrogène, d'électrons et de carbone. Souvent, la même source nutritive organique satisfait tous ces besoins. Il faut aussi noter qu'essentiellement tous les microorganismes pathogènes sont chimiohétérotrophes.

### 3.3. Hétérotrophes photoorganotrophes

Certaines bactéries photosynthétiques pourpres et vertes utilisent de la matière organique comme source d'électrons et de carbone. Ces hétérotrophes photoorganotrophes sont souvent présents dans les lacs et les rivières pollués. Quelques-unes de ces bactéries peuvent aussi se développer en photoautotrophes utilisant de l'hydrogène moléculaire comme donneur d'électrons.

### 3.4. Autotrophes chimiolithotrophes

Les autotrophes chimiolithotrophes oxydent les composés réduits inorganiques tels que le fer, l'azote ou le soufre pour produire à la fois de l'énergie et des électrons pour la biosynthèse. L'anhydride carbonique est leur source de carbone.

### 3.5. Chimiolithohétérotrophes

Les chimiolithohétérotrophes, également connus comme les mixotrophes, utilisent des molécules inorganiques réduites comme sources d'énergie et d'électrons mais obtiennent leur carbone de sources organiques. Les chimiolithotrophes sont importants dans la transformation chimique des éléments qui se produit continuellement dans les écosystèmes (la conversion de l'ammoniaque en nitrate et du soufre en sulfate).

**Tableau III.2 :** Les principaux types nutritionnels chez les micro-organismes

Type nutritionnel	Source de carbone	Source d'énergie	Source d'électrons	Micro-organismes représentatifs
Photolithoautotrophie (Autotrophie photolithotrophe)	CO <sub>2</sub>	Énergie lumineuse	Donneur inorganique	Bactéries sulfureuses pourpres et vertes, cyanobactéries
Photoorganohétérotrophie (Hétérotrophie photoorganotrophe)	Carbone organique mais le CO <sub>2</sub> peut aussi être utilisé	Énergie lumineuse	Donneur organique	Bactéries non sulfureuses pourpres, bactéries non sulfureuses vertes
Chimiolithoautotrophie (Autotrophie chimiolithotrophe)	CO <sub>2</sub>	Produits chimiques inorganiques	Donneur inorganique	Bactéries oxydant le soufre, bactéries oxydant l'H <sub>2</sub> , bactéries nitrifiantes, bactéries oxydant le fer, méthanogènes
Chimiolithohétérotrophie ou mixotrophie (Hétérotrophie chimiolithotrophe)	Carbone organique mais le CO <sub>2</sub> peut aussi être utilisé	Produits chimiques inorganiques	Donneur inorganique	Certaines bactéries oxydatrices du soufre ( <i>Beggiatoa</i> )
Chimioorganohétérotrophes (Hétérotrophie chimio-organotrophe)	Carbone organique	Produits chimiques organiques souvent les mêmes que la source de carbone	Donneur organique souvent le même que la source de carbone	La plupart des micro-organismes non photosynthétiques y compris la plupart des agents pathogènes, les champignons, de nombreux protistes et de nombreuses archées

**Remarque :**

Bien qu'une espèce bactérienne particulière appartienne généralement à une des catégories nutritionnelles, certaines montrent une grande flexibilité métabolique et peuvent modifier leurs profils métaboliques en réponse à des changements de l'environnement.

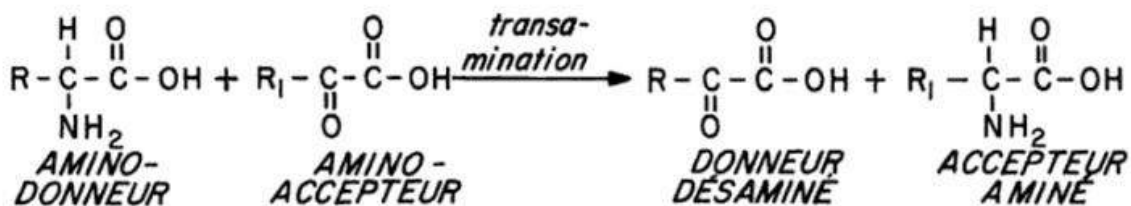
### 3. Source d'azote

Beaucoup de constituants cellulaires, les protéines en particulier, contiennent de l'azote. Dans les bactéries, l'azote représente approximativement 10 % du poids cellulaire sec. La forme sous laquelle l'azote est nécessaire dépend des possibilités réductrices enzymatiques de l'organisme ; quoique, dans le protoplasme, l'azote soit combiné organiquement (R-NH<sub>2</sub>) : une espèce microbienne donnée peut se le procurer du milieu environnant sous une ou plusieurs formes (tableau III.3).

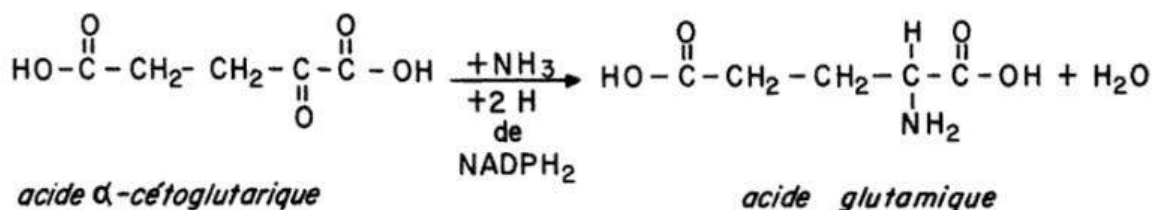
**Tableau III.3 :** Sources d'azote dans la nutrition microbienne.

Composé	Valence de N
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+5
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+3
N <sub>2</sub>	0
NH <sub>3</sub>	-3
R - NH <sub>2</sub>	-3

Quand la source azotée est R-NH<sub>2</sub> (R -radical organique), l'organisme s'en sert pour le désaminer en NH<sub>3</sub>, lequel est alors incorporé dans les composés azotés, ou pour le transfert direct de l'amino-groupe vers des accepteurs adéquats (transamination) ou les deux.



La plupart des micro-organismes peuvent utiliser NH<sub>3</sub> comme seule source d'azote. La principale réaction par laquelle NH<sub>3</sub> est introduit dans les molécules organiques est la réaction catalysée par la déshydrogénase glutamique :



La distribution de l'azote dans d'autres composés peut donc être affectée par la transamination entre l'acide glutamique et différents céto-acides, et par la modification des nouveaux amino-acides ainsi formés.



Peu de micro-organismes peuvent fixer l'azote atmosphérique  $N_2$  en le transformant en  $NH_3$  dans la cellule. Quelques bactéries peuvent utiliser le nitrate comme source azotée, le réduisant au niveau de  $NH_3$  dans la cellule.

#### 4. Besoins en ions minéraux

En plus du carbone et de l'azote, les cellules vivantes nécessitent de nombreux autres minéraux pour leur croissance.

##### 4.1. Soufre

Comme l'azote, le soufre est un composant de nombreuses substances des cellules organiques ; la plus grande partie du soufre se présente comme groupes sulfhydiyle (-SH) dans les protéines. Quelques organismes nécessitent du soufre organique (R-SH) ou  $H_2S$ , mais la plupart des espèces peuvent réduire le sulfate  $SO_4^{2-}$  à la forme organique.

##### 4.2. Phosphore

Le phosphate ( $PO_4^{2-}$ ) est nécessaire comme composé de l'ATP, des acides nucléiques et des coenzymes tels que NAD, NADP et les flavines. Le phosphate est toujours absorbé dans la cellule comme phosphate libre inorganique.

##### 4.3. Activateurs enzymatiques

De nombreux minéraux sont nécessaires comme activateurs enzymatiques. L'ion de magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et l'ion ferreux se trouvent également dans les porphyrines : le magnésium dans la molécule de chlorophylle et le fer comme partie des coenzymes des cytochromes et des peroxydases.

En composant un milieu de culture pour la plupart des micro-organismes, il est nécessaire de prévoir des sources de potassium, de magnésium, de calcium et de fer, ordinairement sous leur forme ionique ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ ). Beaucoup d'autres minéraux sont nécessaires, mais ils sont fournis de manière adéquate comme contaminants par l'eau du robinet et par d'autres ingrédients du milieu.

#### 5. Facteurs de croissance

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

D'un autre côté, de nombreux micro-organismes sont dépourvus d'une ou de plusieurs enzymes essentielles et par conséquent ne peuvent pas fabriquer tous les constituants indispensables, ils doivent les obtenir de leur environnement. Ces constituants cellulaires essentiels ou leurs précurseurs qui ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme, sont appelés des **facteurs de croissance**. Il y a trois classes principales de facteurs de croissance : 1) les acides aminés, 2) les purines et les pyrimidines et 3) les vitamines (tableau III.3). Les acides aminés sont nécessaires à la synthèse protéique, les purines et les pyrimidines à celle des acides nucléiques. Les vitamines sont de petites molécules organiques qui généralement forment les cofacteurs ou une partie de ceux-ci. Les vitamines sont nécessaires en très faible quantité pour la croissance.

**Tableau III.3 :** Exemples de vitamines utilisées par les bactéries

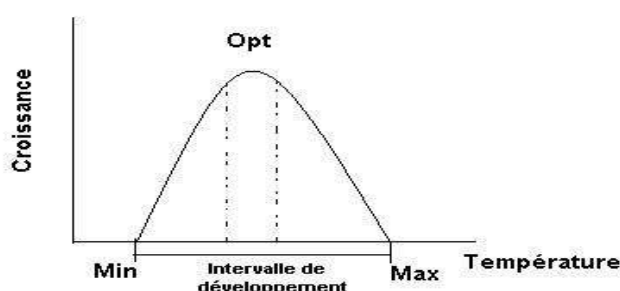
Vitamine	Forme du coenzyme	Fonction
Biotine	Biotine	Réactions de biosynthèse qui demandent la fixation du CO <sub>2</sub>
Acide nicotinique	NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et NADP	Transporteurs d'e- dans les réactions de déshydrogénation
Pyridoxine (B6)	Pyridoxal phosphate	Transamination, désamination, décarboxylation des aminoacides
Riboflavine (B2)	FMN (flavine mononucléotide) et FAD (flavine adénine dinucléotide)	Réactions d'oxydoréduction
Vitamine K	Quinones et naphthoquinones	Processus de transport d'électrons

## 5. Facteurs physico-chimiques

Les éléments énergétiques et constitutifs nécessaires à la croissance bactérienne doivent être fournis dans certaines conditions physico-chimiques, de température, de pH, de pression osmotique, etc... Ces facteurs peuvent favoriser ou inhiber la croissance bactérienne.

### 5.1. Température

Une bactérie est en général capable de croître dans un intervalle plus ou moins important (selon les espèces) de température. Il est limité par une valeur minimale en dessous de laquelle il n'y a plus de développement et une valeur maximale au-dessus de laquelle la croissance s'arrête. La croissance est meilleure dans un intervalle de température optimum (figure III.2).



**Figure III.2 :** Effet de la température d'incubation sur la croissance bactérienne.

En fonction de la température optimale moyenne (TOM), on distingue plusieurs groupes de bactéries (figure III.3):

- **Mésophiles** : TOM comprise entre 20 et 40°C ; parmi eux, on trouve : **Saprophytes** : TOM = 30°C et **Pathogènes** : TOM = 37°C.
- **Psychrophiles** : TOM aux environs de 0°C.
- **Thermophiles** : TOM comprise entre 45 et 65°C. Certains microorganismes (archéobactéries) peuvent se développer dans des températures supérieures à 100°C.

- A côté de ces groupes, on trouve aussi des bactéries :
- **Psychrotrophes** : se développent aux températures basses mais prolifèrent **mieux** à des températures plus élevées.
- **Thermotrophes** (thermotolérantes) : se développent à des températures élevées mais croissent **mieux** à des températures moyennes (30°C).

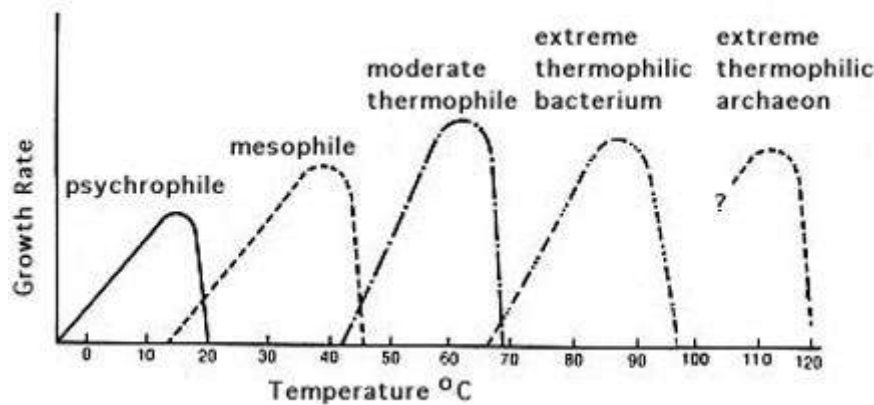


Figure III.3 : Différents groupes bactériens.

## 5.2. pH

Le potentiel Hydrogène (pH) traduit la concentration en H<sup>+</sup> dans un milieu. C'est un facteur très important qui influence beaucoup la croissance des bactéries.

Comme pour la température, une bactérie est capable de croître dans un intervalle plus ou moins important (selon les espèces) de pH. Il est limité par une valeur **minimale** en dessous de laquelle il n'y a plus de développement et une valeur **maximale** au-dessus de laquelle la croissance s'arrête. La croissance est meilleure quand le pH est **optimum**.

En fonction du pH optimum, on distingue trois groupes bactériens :

- **Acidophiles** : pH optimum acide
- **Neutrophiles** : pH optimum proche de la neutralité
- **Basophiles** (alcalophiles): pH optimum basique.

## 5.3. Pression osmotique

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

L'**activité de l'eau** ( $A_w$  : *Activity of water*) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un milieu. Ainsi, elle est affectée par la concentration plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau. Les bactéries peuvent se développer dans des milieux ayant une  $A_w$  comprise entre 1 et 0,7. L' $A_w$  de l'eau pure est de 1 ; celle du sang humain est de 0,99 ; l'eau de mer = 0,98 ; celle des sols est située entre 0,9 et 1,0.

Les bactéries **halophiles** nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. La concentration peut varier de 1-6 % pour les faiblement halophiles jusqu'à 15-30 % pour les bactéries halophiles extrêmes (*Halobacterium*).

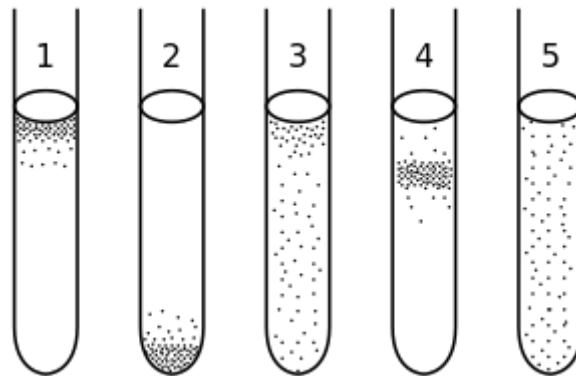
Les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : *Staphylococcus aureus*).

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

#### 5.4. Besoins en oxygène

Plusieurs groupes bactériens peuvent être distingués en fonction de leurs besoins en Oxygène (Figure III.4) :

- Les bactéries **aérobies strictes** ne se développent qu'en présence d'oxygène. Leur source principale d'énergie est la respiration aérobie où l'oxygène moléculaire est accepteur final d'électrons.
- Les **microaérophiles** peuvent croître lorsque la pression partielle d'oxygène est faible.
- Les **aéro-anaérobies facultatives** peuvent se développer en présence d'oxygène, en utilisant la respiration aérobie et en anaérobiose, la fermentation ou la respiration anaérobie.
- Les **anaérobies aérotoleérantes** se développent en présence et en absence d'oxygène mais sans l'utiliser. Elles empruntent exclusivement des voies fermentaires pour leur métabolisme.
- Les **anaérobies strictes** sont incapables de croître en présence d'oxygène ; il leur est toxique. Pour leur métabolisme, elles utilisent la fermentation, la respiration anaérobie ou la photosynthèse.
- 



**Figure III.4 :** Types respiratoires des bactéries. 1 : aérobies strictes, 2 : anaérobies strictes, 3 : anaérobies facultatives, 4 : microaérophiles, 5 : aérotoleérantes.

# Chapitre 4 : Croissance bactérienne

## INTRODUCTION

La croissance peut être définie comme une augmentation des constituants cellulaires, elle aboutit à un accroissement du nombre de cellules quand les micro-organismes se multiplient par scissiparité ou par bourgeonnement. Dans ce cas, les cellules s'élargissent et se divisent pour donner deux cellules filles de taille plus ou moins égale. Il y a aussi croissance si les cellules deviennent simplement plus longues ou plus grandes.

Si le microorganisme est coenocytique, c'est-à-dire multinucléé, il y a division nucléaire sans division cellulaire concomitante et la croissance conduit à une augmentation de la taille de la cellule et non du nombre de cellules.

Il n'est pas facile d'analyser la croissance et la division de micro-organismes pris individuellement à cause de leur petite taille. Les microbiologistes suivent donc normalement des variations numériques sur la totalité de la population.

### 1. Le cycle cellulaire procaryote

Le cycle cellulaire est la séquence complète des événements depuis la formation d'une nouvelle cellule jusqu'à la division suivante. La plupart des procaryotes se reproduisent par scissiparité, bien que certains procaryotes puissent se reproduire par bourgeonnement, par fragmentation et par d'autres moyens (figure IV.1). 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.

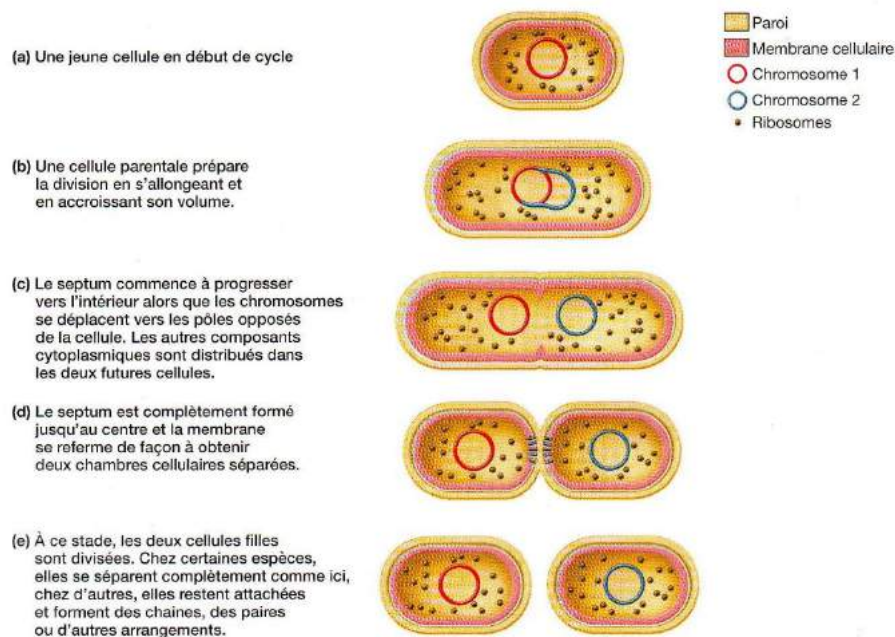


Figure IV.1 : La scissiparité

## 2. Mesure de la croissance bactérienne

Il existe plusieurs moyens de mesurer la croissance microbienne pour déterminer le temps de génération et la vitesse de croissance. Le nombre ou la masse cellulaire de la population peut être suivi puisqu'ils augmentent tous deux au cours de la croissance.

### 2.1. Mesure du nombre de cellules

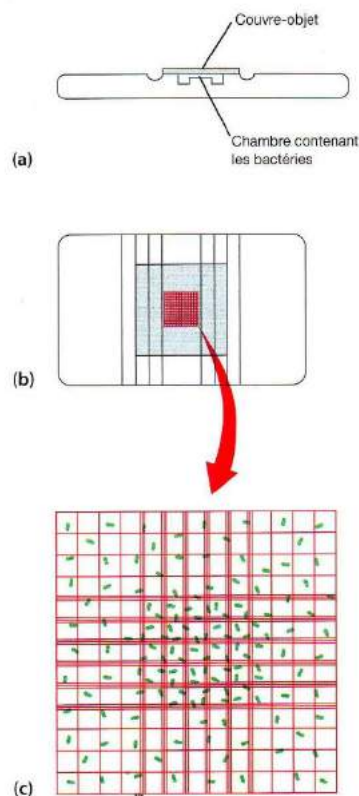
#### 2.1.1. Numération totale directe

La façon la plus évidente de déterminer le nombre de cellules est de les compter directement.

- **Lecture au microscope**

C'est une méthode facile à utiliser, peu coûteuse et relativement rapide. Elle donne aussi des informations quant à la taille et à la morphologie des organismes. Les chambres de comptage de Petroff-Hausser permettent de compter des bactéries. Les hémocytomètres sont employés pour des microorganismes procaryotes et eucaryotes. Ces lames spécialement conçues ont des chambres de profondeur connue dont le fond est muni d'une grille (figure IV.2). Le nombre de microorganismes dans un échantillon est calculé en tenant compte du volume de la chambre et de la dilution de l'échantillon.

Cette technique présente quelques désavantages. Il faut que la population microbienne soit suffisamment dense parce que les échantillons sont dans de petits volumes.



**Figure IV.2 :** Utilisation de la chambre de comptage de Petroff-Hausser ; (a) Vue latérale de la chambre. (b) Vue du haut de la chambre (c) Une vue agrandie de la grille.

### ▪ Compteur de particules

On compte directement les micro-organismes plus grands, comme les protistes et les levures, à l'aide de compteurs électroniques tels que le compteur de Coulter, mais actuellement le cytomètre de flux est de plus en plus utilisé.

La suspension microbienne doit passer dans le compteur au travers d'un orifice. Un courant électrique circule au travers de cet orifice et des électrodes placées de part et d'autre de l'ouverture mesurent la résistance électrique. Chaque fois qu'une cellule microbienne passe, la résistance électrique augmente (ou la conductivité diminue) et la cellule est comptée.

**Remarque :** Les méthodes traditionnelles de comptage direct des micro-organismes dans un échantillon donnent des densités cellulaires bien supérieures aux méthodes de culture sur boîte décrites ci-dessous parce que les premières ne distinguent pas les cellules mortes des cellules vivantes. Cependant, des marqueurs fluorescents à l'acridine (qui se fixe à l'ADN) permettent de différencier les cellules vivantes (vertes) des cellules mortes (rouges).

### 2.1.2. Numération indirecte des cellules viables

Ces méthodes de culture ne comptent que les cellules vivantes et capables de se reproduire. Les deux techniques habituellement utilisées sont celle de l'**étalement en surface** et celle de l'**étalement en profondeur**.

Dans les deux méthodes, un échantillon dilué de bactéries ou d'autres microorganismes est étalé sur une surface solide. Chaque micro-organisme ou groupe de micro-organismes se développe en une colonie distincte, et comme on n'est pas absolument certain que chaque colonie provienne d'une cellule isolée, les résultats sont souvent exprimés en termes d'**unités formatrices de colonies (UFC)** plutôt qu'en nombre de micro-organismes. Pour obtenir les meilleurs résultats, les échantillons doivent contenir entre 30 et 300 colonies (figure IV.3).

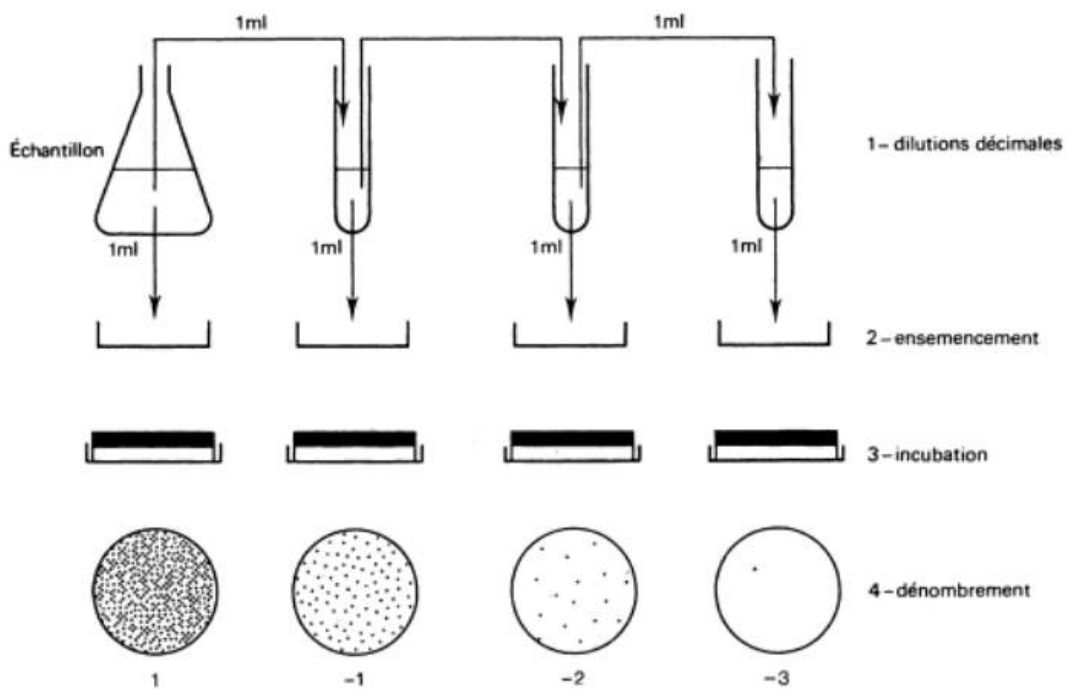


Figure IV.3 : Dénombrement des bactéries par ta méthode des dilutions

Une autre méthode de culture sur boîte habituellement employée retient les bactéries d'échantillons aqueux sur une membrane filtrante. Le filtre est ensuite déposé sur un milieu gélosé ou sur un buvard imprégné de milieu liquide (figure IV.4) et incubé jusqu'à ce que chaque cellule forme une colonie séparée. Le nombre de colonies comptées donne le nombre de micro-organismes dans l'échantillon filtré. Un milieu spécial permet de sélectionner des micro-organismes particuliers. Cette technique est particulièrement utile à l'analyse de la pureté de l'eau.



Figure IV.4 : Le procédé de filtration sur membrane.

## 2.2 Mesure de la masse cellulaire

La croissance d'une population est accompagnée d'une augmentation de la masse cellulaire totale aussi bien que du nombre de cellules ; par conséquent, les techniques mesurant des variations de la masse cellulaire permettent de suivre la croissance.

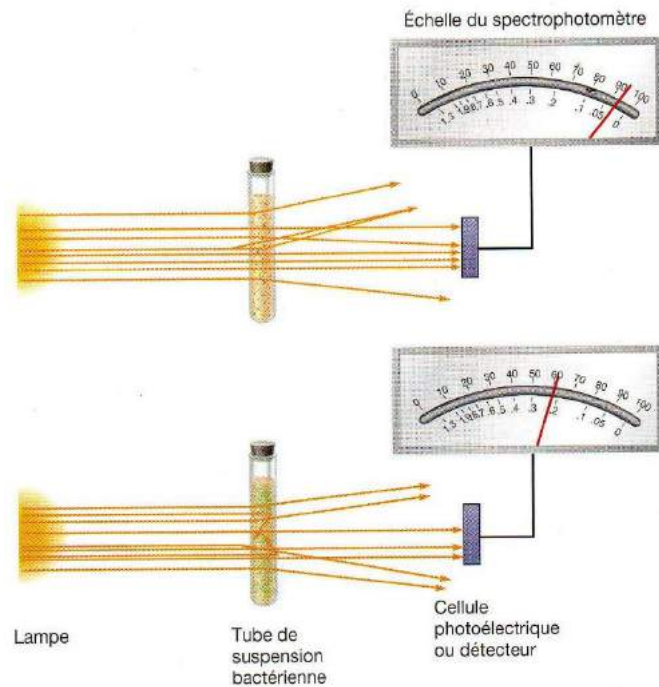
### 2.2.1. Détermination du poids sec des micro-organismes

Les cellules se développant dans un milieu liquide sont récoltées par centrifugation, lavées, séchées dans un four et pesées. Cette technique est surtout utilisée pour mesurer la croissance des champignons filamenteux. Elle est cependant très longue et peu sensible. À cause de leur faible poids, il faut centrifuger plusieurs centaines de millilitres de culture pour recueillir une quantité suffisante de bactéries.

### 2.2.2. Spectrophotométrie

Ces techniques sont plus sensibles et plus rapides. Elles sont basées sur le fait que les cellules bactériennes dispersent la lumière incidente. Comme dans une population bactérienne, les cellules ont approximativement la même taille, la quantité de lumière diffractée est directement proportionnelle à la masse cellulaire et indirectement à la concentration en cellules. Lorsque la concentration en bactéries atteint 10 millions de cellules ( $10^7$ ) par millilitre, le milieu apparaît légèrement trouble. Une augmentation supplémentaire de la concentration donne une plus grande turbidité et il y a moins de lumière transmise à travers le milieu. L'importance de la diffraction de la lumière est mesurée dans un spectrophotomètre et est en relation presque linéaire avec la concentration bactérienne à des valeurs faibles d'absorbance (figure IV.5). On mesure facilement la croissance d'une population à condition que la population soit suffisamment dense pour donner une turbidité détectable.





**Figure IV.5 :** La turbidité et la mesure de la masse microbienne

### 2.2.3. Autres techniques

Si la quantité d'une substance dans chaque cellule est constante, la quantité totale de ce constituant cellulaire est en relation directe avec la masse cellulaire microbienne totale.

On peut analyser le contenu total en protéines ou en azote d'un échantillon de cellules lavées et collectées à partir d'un volume connu de milieu.

Une augmentation de la population microbienne se traduira par une augmentation des protéines totales. De même, la quantité de chlorophylle permet de mesurer les populations d'algues et de cyanobactéries et la quantité d'ATP est une indication de la masse microbienne vivante.

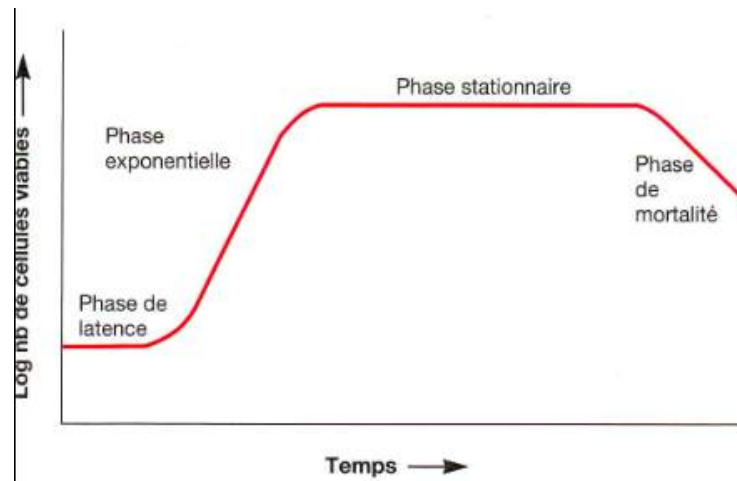
## 3. Paramètres cinétiques de la croissance

### 3.1. Croissance en milieu de culture non renouvelé

On étudie la croissance d'une population en analysant la courbe de croissance d'une culture microbienne. Lorsque des micro-organismes sont cultivés en milieu liquide, ils se développent habituellement dans un système fermé, culture en « batch » ou discontinue. Ils sont incubés dans un flacon fermé contenant un seul lot de milieu. Comme il n'y a pas d'apport de milieu frais au cours de l'incubation, la quantité d'éléments nutritifs diminue et la concentration de déchets augmente.

#### 3.1.1. La courbe de croissance

La croissance des micro-organismes se divisant par scissiparité est représentée graphiquement comme le logarithme du nombre de cellules en fonction du temps d'incubation, la courbe résultante comprend quatre phases distinctes (figure IV.6).



**Figure IV.6 :** La courbe de croissance microbienne dans un système fermé

- **La phase de latence**

Cette phase est caractérisée par une absence de croissance, mais elle est nécessaire pour différentes raisons :

- Les cellules peuvent être âgées et dépourvues d'ATP, de cofacteurs essentiels et de ribosomes. Ces différents constituants doivent être synthétisés avant que la croissance ne puisse débuter.
- Le milieu peut être différent de celui dans lequel les micro-organismes se développaient précédemment. Dans ce cas, les cellules pourraient avoir besoin de nouvelles enzymes pour utiliser d'autres nutriments.
- Les micro-organismes peuvent avoir été endommagés et requérir un certain temps de réparation.

Quelles que soient les causes, les cellules se réorganisent, répliquent leur ADN, commencent à augmenter leur masse et finalement se divisent.

- **La phase exponentielle**

Pendant la phase exponentielle ou logarithmique, les micro-organismes se développent et se divisent à la vitesse maximale possible étant donné leur potentiel génétique, la nature du milieu et les conditions de culture. La vitesse de croissance est constante pendant la phase exponentielle, les organismes se divisent et doublent leur nombre à intervalles de temps réguliers. Comme chaque organisme se divise à un moment légèrement différent, la courbe de croissance augmente doucement plutôt que par légers à-coups.

- **La phase stationnaire**

La croissance de la population finit par s'arrêter et la courbe de croissance devient horizontale suite à de multiples facteurs qui agissent seuls ou ensemble comme la limitation en éléments nutritifs et l'accumulation de déchets toxiques qui peuvent arrêter la croissance.

Pendant la phase stationnaire, le nombre total de micro-organismes viables reste constant. Ceci peut résulter d'un équilibre entre la division et mort cellulaire, ou bien la population peut simplement cesser de se diviser et rester métaboliquement active.

### ▪ La sénescence et la mort

Pendant la phase de sénescence le nombre des cellules diminue (masse bactérienne décroît et le taux de croissance prend des valeurs négatifs). Ce déclin peut être expliqué par deux hypothèses alternatives (figure 6.8).

Certains microbiologistes croient que les cellules privées de nutriment, qui montrent une chute exponentielle de densité, n'ont pas perdu irréversiblement la capacité de se reproduire. Ils proposent plutôt que les micro-organismes sont temporairement incapables de croître, du moins dans les conditions utilisées en laboratoire et que ce phénomène, dans lequel les cellules sont dites **viables non cultivables (VNC)**, résulte d'une réponse génétique déclenchée dans les cellules carencées lors de la phase stationnaire. De la même manière que certaines bactéries forment des spores par un mécanisme de survie, d'autres sont capables d'entrer en dormance sans changements morphologiques. Dès que les conditions appropriées sont réunies, les micro-organismes VNC reprennent leur développement.

La seconde alternative à une simple phase de mortalité est la mort cellulaire programmée. Par contraste avec l'hypothèse VNC selon laquelle les cellules sont génétiquement programmées pour survivre, la mort cellulaire programmée prédit qu'une fraction de la population microbienne est programmée génétiquement pour se suicider. Dans ce cas, les cellules non cultivables sont mortes (par opposition aux VNC) et les nutriments qu'elles libèrent permettent aux cellules de la population qui n'avaient pas entamé un suicide de finalement se développer.

### 3.1.2. Les mathématiques de la croissance

Pendant la phase exponentielle, chaque micro-organisme se divise à intervalles de temps constants. La population doublera donc en nombre après un intervalle de temps spécifique appelé **temps de génération** ou **temps de doublement**. On peut illustrer cette situation par un exemple simple (figure IV.7). Supposons qu'une culture en tube soit inoculée avec une cellule qui se divise toutes les 20 minutes. La population sera constituée de 2 cellules après 20 minutes, 4 cellules après 40 minutes et ainsi de suite. Puisque la population double à chaque génération, l'augmentation de la population est toujours  $2^n$  où  $n$  est le nombre de générations. Le développement de la population est exponentiel ou logarithmique (figure IV.8).

Ces observations peuvent être exprimées sous forme d'équations pour le temps de génération.

Considérons  $N_0$  = le nombre initial de cellules de la population

$N_t$  = la population au temps  $t$

$n$  = le nombre de générations dans le temps  $t$ .

Ensuite, l'analyse des résultats précédents montre que :

$$N_0 = N_t \times 2^n$$

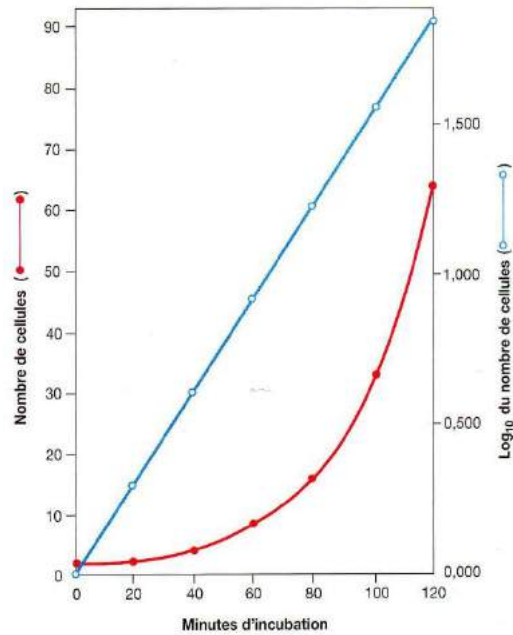
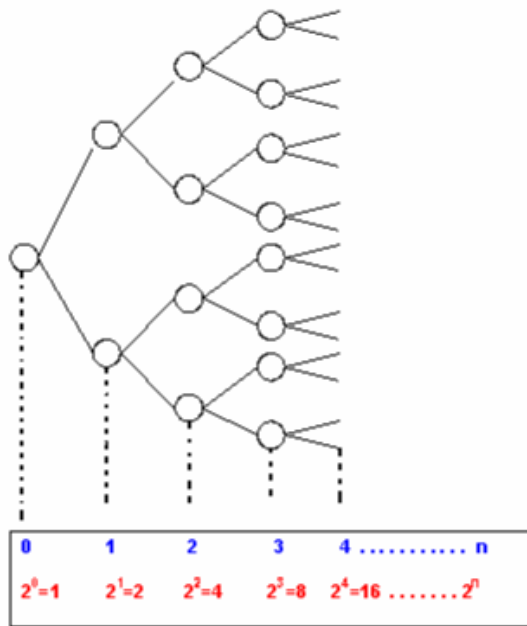


Figure IV.7 : Aspects théoriques de la croissance

Figure IV.8 : La croissance microbienne exponentielle

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

$$\log N_0 = \log N_t + n \log 2$$

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301}$$

La vitesse de croissance d'une culture en batch pendant la phase exponentielle peut être exprimée en terme de **constante de vitesse de croissance moyenne (k)**, qui est le nombre de générations par unité de temps, souvent exprimé par heure :

$$K = \frac{n}{t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301 \times t}$$

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

$$N_t = 2 \times N_0$$

En substituant  $2N_0$  dans l'équation de la vitesse de croissance moyenne, on peut déterminer k :

$$K = \frac{\log 2 N_0 - \log N_0}{0,301 \times g} = \frac{\log 2 + \log N_0 - \log N_0}{0,301 \times g}$$

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

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

Le temps de génération moyen peut être déterminé directement à partir du graphique semi-logarithmique des données de croissance (figure IV.9) et de la constante de vitesse de croissance calculée à partir de la valeur de  $g$ .

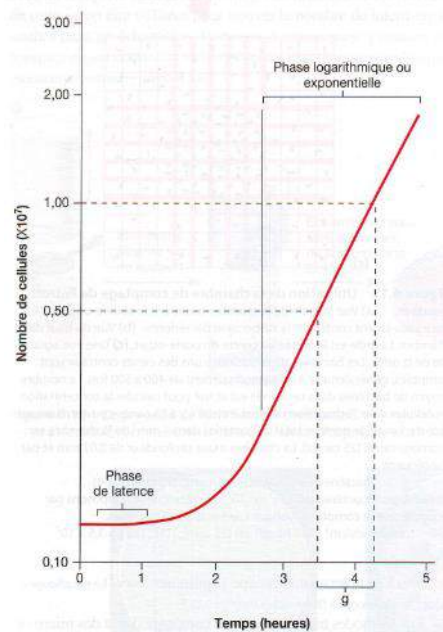


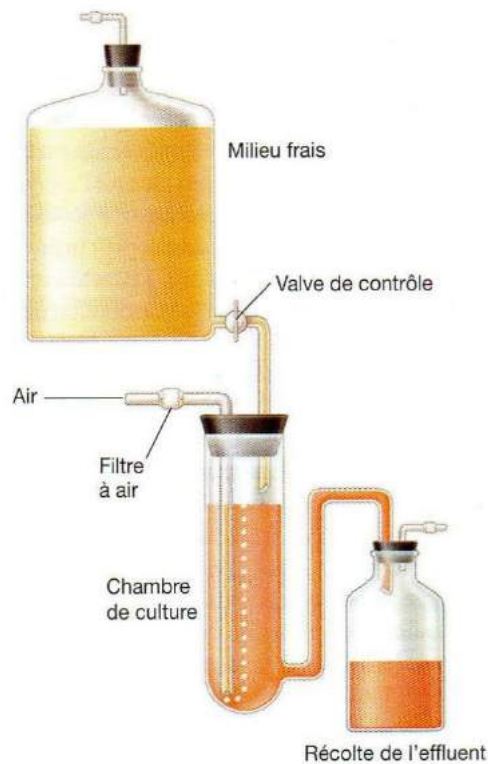
Figure IV.9 : La détermination du temps de génération

### 3.2. Culture continue des microorganismes

Il est possible de cultiver des micro-organismes dans un système ouvert dans lequel les conditions de culture sont gardées constantes par l'apport continu de nutriments et l'élimination régulière des déchets. Ces conditions sont réalisées en laboratoire dans des systèmes de culture continue où une population microbienne peut être maintenue longtemps en phase exponentielle de croissance et à une concentration constante de la biomasse. On utilise généralement deux types de système de culture continue : les chémostats et les turbidoslals.

#### 3.2.1. Le chémostat

Un chémostat est construit de façon telle que le milieu stérile est introduit dans la chambre de culture à la même vitesse que le milieu contenant les micro-organismes en est éliminé (figure IV.10). Le milieu de culture d'un chémostat contient un élément nutritif essentiel en quantité limitante (p. ex. un acide aminé). Ce nutriment étant limité, la vitesse de croissance est déterminée par la vitesse à laquelle le milieu frais est ajouté dans la chambre de culture et la densité cellulaire finale dépend de la concentration en nutriment limitant.



**Figure IV.10 :** Un système de culture continue : le chémostat

### 3.2.2. Le turbidostat

Le second type de système de culture continue, le turbidostat, est équipé d'une cellule photoélectrique qui mesure l'absorbance ou la turbidité dans la chambre de culture. La vitesse d'écoulement du milieu dans la cuve est réglée automatiquement pour maintenir une turbidité ou densité cellulaire prédéterminée. Le turbidostat diffère du chémostat de plusieurs façons. La vitesse de dilution dans un turbidostat varie au lieu de rester constante et le milieu de culture ne contient pas de nutriment limitant. Le turbidostat fonctionne mieux à des vitesses de dilution élevées, alors que le chémostat est plus stable et plus efficace à des vitesses de dilution réduites.

# Chapitre 5 : Métabolisme bactérien

## INTRODUCTION

Le métabolisme est l'ensemble des réactions biochimiques mises en jeu par un organisme vivant. Lorsque ces réactions sont convenablement équilibrées, elles permettent à l'organisme de croître et de se reproduire ; Lorsqu'elles sont dérégulées, elles provoquent sa mort. L'organisme doit alors fabriquer sa propre matière organique et doit prélever dans son milieu du carbone (MO = matière carbonée), du pouvoir réducteur (sources de H<sup>+</sup> et d'électrons), de l'énergie nécessaire à la réduction du Carbone.

Les types trophiques représentent les différentes modalités de prélèvement dans l'environnement du carbone, du pouvoir réducteur et de l'énergie.

## 1. Le métabolisme

### 1.1. Vu d'ensemble du métabolisme

Le métabolisme peut être divisé en deux parties : le **catabolisme** d'énergie et l'**anabolisme**.

Le catabolisme est la désagrégation de molécules organiques complexes, relativement grandes, en molécules plus simples, plus petites dans le but de générer de l'énergie sous forme d'ATP.

L'anabolisme est la synthèse de molécules organiques complexes, à partir de molécules plus simples. Il comprend une série d'étapes : (1) la conversion de la source de carbone en un ensemble de petites molécules, les métabolites précurseurs ; (2) la synthèse de monomères et autres éléments de base (c'est-à-dire acides aminés, nucléotides, hydrates de carbone simples, lipides simples), à partir des métabolites précurseurs ; (3) la synthèse de macromolécules (c'est-à-dire protéines, acides nucléiques, hydrates de carbone complexes, lipides complexes) ; et (4) l'assemblage de macromolécules en structures cellulaires.

L'anabolisme requiert de l'énergie (ATP) et d'une source d'électrons (pouvoir réducteur) (figure V.1).

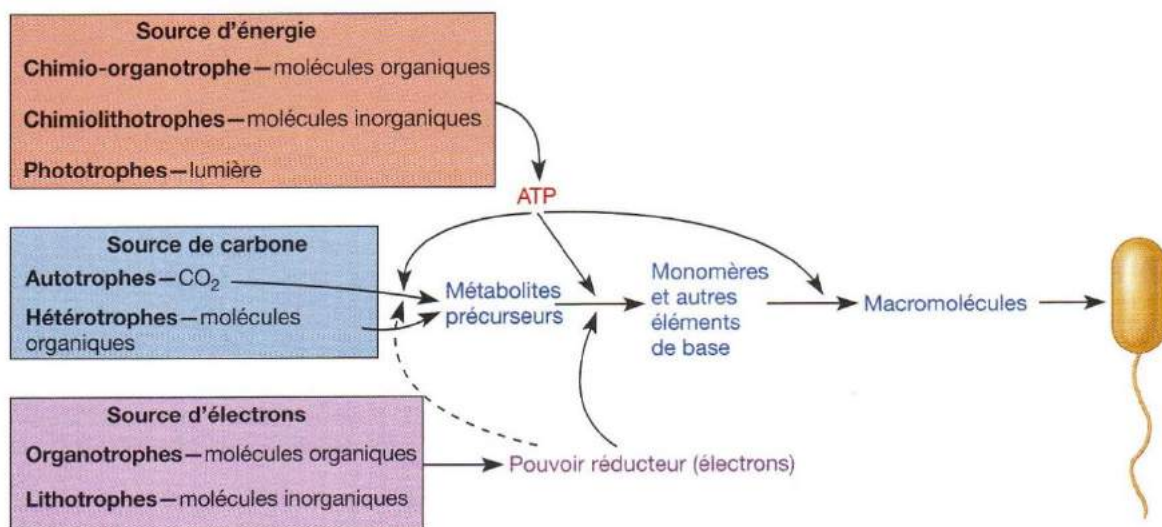


Figure V.1 : Vu d'ensemble du métabolisme.

## 1.2. Le rôle de l'ATP dans le métabolisme

L'énergie est extraite d'une source énergétique par des réactions exergoniques ( $\Delta G$  négatif) est capturée sous une forme pratique qui permet son transfert dans les systèmes cellulaires pour effectuer des réactions endergoniques (c'est l'anabolisme). Chez les organismes vivants, cette forme pratique d'énergie est l'adénosine 5'-triphosphate (ATP ; figure V.2).

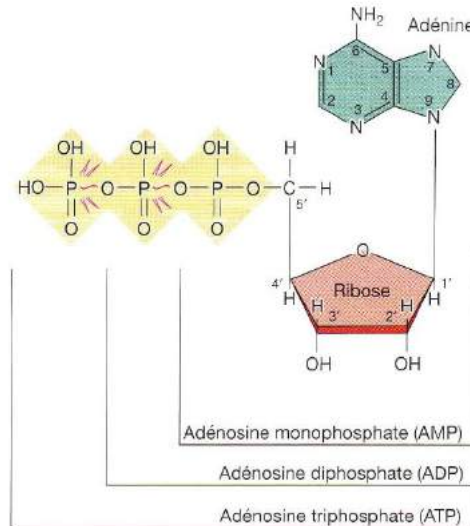
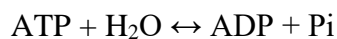


Figure V.2 : L'adénosine 5'-triphosphate (ATP).

L'ATP est une molécule riche en énergie, elle s'hydrolyse en adénosine diphosphate (ADP) et orthophosphate ( $P_i$ ), avec libération d'énergie ( $\Delta G^{\circ}$  de - 7,3 kcal/mole). Cette énergie permet la réalisation des processus endergoniques comme l'anabolisme, le transport et le travail mécanique. D'autre réaction sont capable de fournir de l'énergie qui est utilisée pour resynthétiser l'ATP à partir d'ADP et de  $P_i$ .



La synthèse d'ATP peut être effectuée par deux mécanismes distincts :

- Lors de la **phosphorylation au niveau du substrat**, l'ATP est formé par transfert direct à l'ADP d'un groupe phosphate d'un intermédiaire phosphorylé (le substrat) (figure 7.4).
- Dans la **phosphorylation oxydative**, l'ATP est synthétisé par l'ATP synthase, grâce à l'énergie d'un gradient de protons ( $H^+$ ).

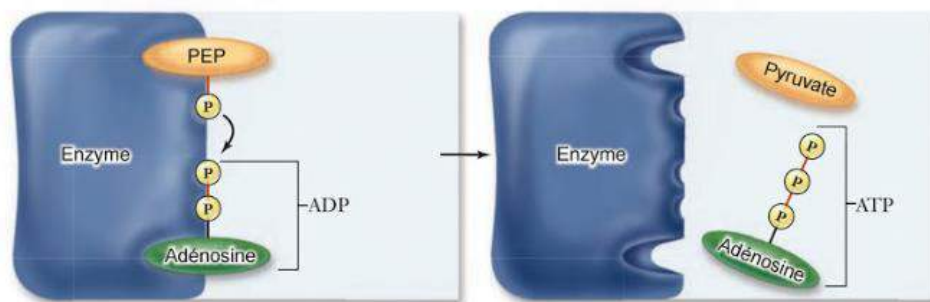


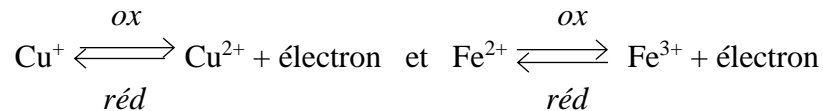
Figure V.3 : Phosphorylation liée au substrat ; PEP : phosphoénolpyruvate.



### 1.3. Les réactions d'oxydo-réductions

La libération d'énergie à partir d'une source énergétique fait normalement intervenir des réactions d'oxydo-réductions. Ces réactions sont celles où des électrons se déplacent d'un **donneur d'électrons** vers un **accepteur d'électrons**.

Un couple réducteur-oxydant forme un système redox. Soient 2 systèmes redox :



Mis en présence l'un de l'autre, le couple  $\text{Cu}^+ / \text{Cu}^{2+}$  est plus réducteur que le couple  $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ , c'est-à-dire que la réaction :

$\text{Cu}^+ + \text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$  évolue spontanément vers la droite : le couple  $\text{Cu}^+ / \text{Cu}^{2+}$  cède ses électrons au couple  $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ .

L'intensité des forces retenant les électrons des formes oxydée et réduite d'un même couple varie d'un couple à l'autre : les électrons vont du système qui a la plus grande tendance à s'oxyder (le système réducteur qui perd des électrons) vers le système ayant la plus grande tendance à se réduire (le système oxydant qui fixe des électrons). Un couple redox est caractérisé par son **potentiel oxydoréducteur ( $E^\circ$ )**.

**Tableau V.1** : Potentiels redox standard de demi-réactions choisies.

<i>Équation à l'électrode</i>	<i><math>E'_0(V)</math></i>
Succinate + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ $\alpha$ -cétoglutarate + $\text{H}_2\text{O}$	-0,670
Acétate + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ acétaldéhyde	-0,580
$2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{H}_2$	-0,421
$\alpha$ -Cétoglutarate + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ isocitrate	-0,380
Cystine + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 2 cystéines	-0,340
$\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{NADH} + \text{H}^+$	-0,320
$\text{NADP}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{NADPH} + \text{H}^+$	-0,324
Acétaldéhyde + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ éthanol	-0,197
Pyruvate + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ lactate	-0,185
Oxaloacétate + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ malate	-0,166
$\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{FADH}_2$ (dans les flavoprotéines)	+0,031
$\text{Fumarate} + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ succinate	+0,031
Ubiquinone + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ ubiquinol	+0,045
2 cytochrome $b_{(ox)} + 2e^- \rightleftharpoons$ 2 cytochrome $b_{(red)}$	+0,070
2 cytochrome $c_{(ox)} + 2e^- \rightleftharpoons$ 2 cytochrome $c_{(red)}$	+0,254
2 cytochrome $a_{3(ox)} + 2e^- \rightleftharpoons$ 2 cytochrome $a_{3(red)}$	+0,385
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$	+0,816

## 2. Types de métabolisme énergétique

### 2.1. Chimio-organotrophe

Les chimio-organotrophes oxydent des molécules organiques et conservent l'énergie libérée sous forme d'ATP. Le processus de conservation d'énergie que l'organisme utilise est défini selon que l'accepteur est exogène (respiration) ou endogène (fermentation) (figure V.4).

Dans la respiration aérobie, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène, tandis que dans la respiration anaérobie, il s'agit d'un autre accepteur exogène, comme  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$  ou fumarate. La respiration implique l'activité d'une chaîne de transfert d'électrons. Le

passage des électrons tout le long de la chaîne jusqu'à l'accepteur final génère un type d'énergie potentielle, appelée force-proton motrice (FPM), qui est utilisée pour former de l'ATP à partir d'ADP et de Pi.

Au contraire, dans la fermentation, c'est un accepteur d'électrons endogène qui est utilisé, aucune chaîne de transfert d'électrons n'intervient et il ne se forme pas de FPM. L'accepteur endogène est le plus souvent un intermédiaire (pyruvate) de la voie métabolique qui dégrade et oxyde la source d'énergie organique. Au cours de la fermentation, l'ATP n'est synthétisée que par phosphorylation au niveau du substrat.

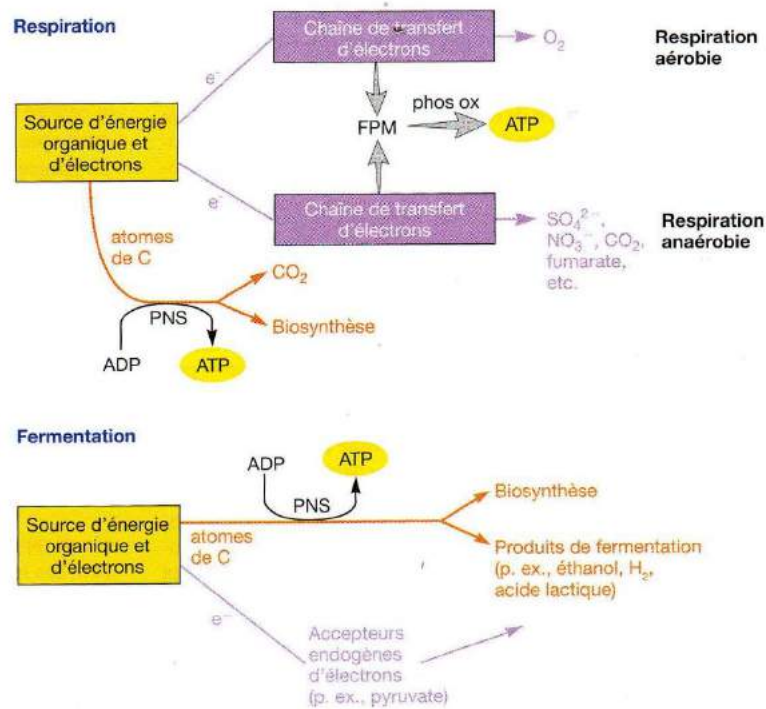


Figure V.4 : Les processus de fourniture d'énergie chez les chimio-organotrophes.

### 2.1.1. La respiration aérobie

La respiration aérobie peut être divisée en trois étapes (figure V.5). Dans la première étape, de grosses molécules nutritives (protéines, polysaccharides et lipides) sont hydrolysées, ou fragmentées en leurs unités constituantes. Les acides aminés, monosaccharides, acides gras, glycérol et autres produits obtenus lors de cette première étape, sont dégradés en quelques molécules plus simples dans la seconde étape. Généralement, il se forme des métabolites comme l'acétyl coenzyme A et le pyruvate. De plus, cette deuxième étape produit de l'ATP, ainsi que du NADH et/ou du FADH<sub>2</sub>. Enfin, au cours de la troisième étape du catabolisme, le carbone partiellement oxydé est introduit dans le cycle des acides tricarboxyliques et oxydé complètement en CO<sub>2</sub>, avec production d'ATP, de NADH et de FADH<sub>2</sub>.

La plus grande partie de l'ATP qui dérive de la respiration aérobie, vient de l'oxydation du NADH et du FADH<sub>2</sub> par la chaîne de transfert d'électrons où l'accepteur final d'électrons est l'oxygène.

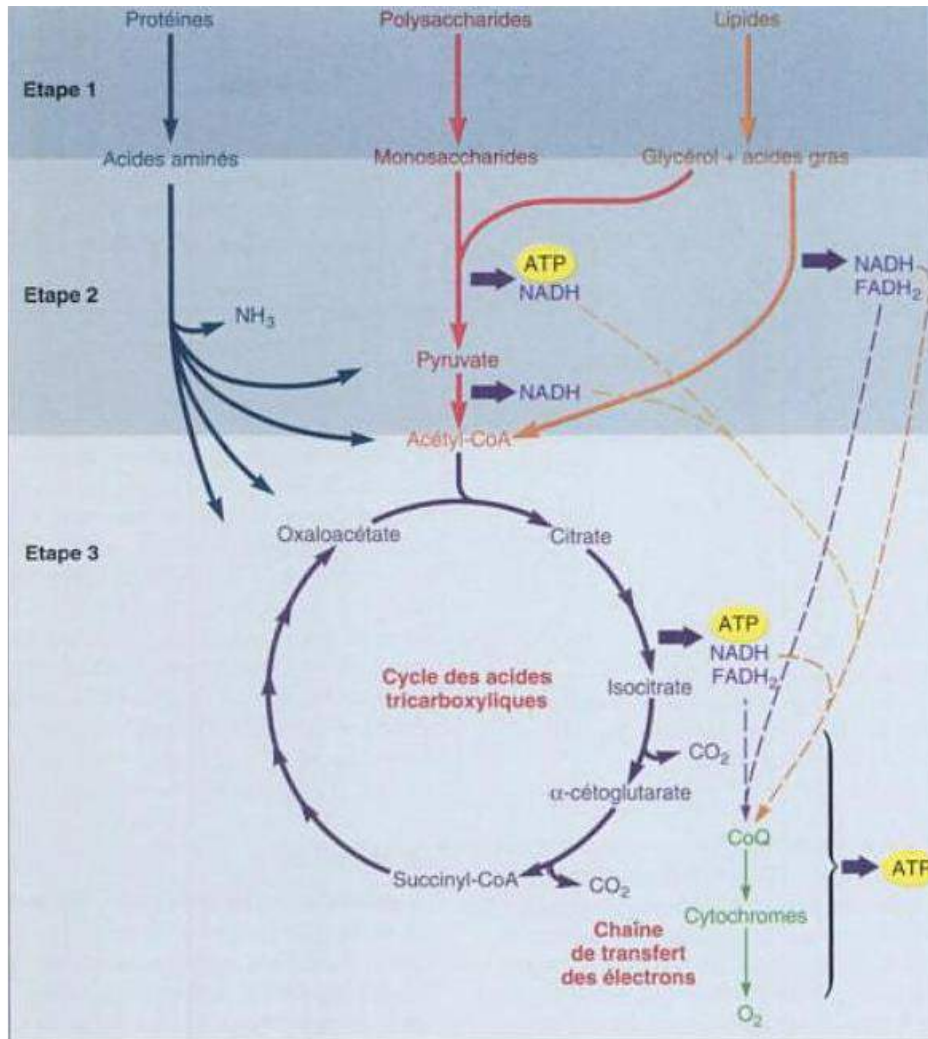


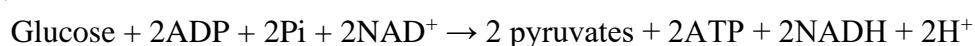
Figure V.5 : les trois étapes de la respiration aérobie.

### 2.1.1.1. La dégradation du Glucose en pyruvate

Les microorganismes utilisent plusieurs voies métaboliques pour cataboliser le glucose et d'autres sucres. Il existe trois voies de dégradation des sucres en pyruvate : (1) la voie d'Embden-Meyerhof, (2) la voie des pentoses phosphate et (3) la voie d'Entner-Doudoroff.

#### ▪ La voie d'Embden-Meyerhof

La voie d'Embden-Meyerhof est la voie la plus commune de dégradation du glucose en pyruvate. Elle se déroule dans le cytoplasme des procaryotes et des eucaryotes. L'ensemble de la voie peut se diviser en deux parties (figure V.6). Dans la phase initiale à six carbones, de l'énergie est consommée pour phosphoryler deux fois le glucose, qui est finalement converti en fructose 1,6-bisphosphate. La phase à trois carbones commence lorsque le fructose 1,6-bisphosphate aldolase catalyse le clivage du fructose 1,6-bisphosphate en deux molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate, qui sont alors converties en pyruvate dans un processus à cinq étapes. Le catabolisme d'une molécule de glucose produit ainsi deux coenzymes ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) et deux molécules d'ATP par phosphorylation au niveau substrat. L'équation simplifiée est la suivante :



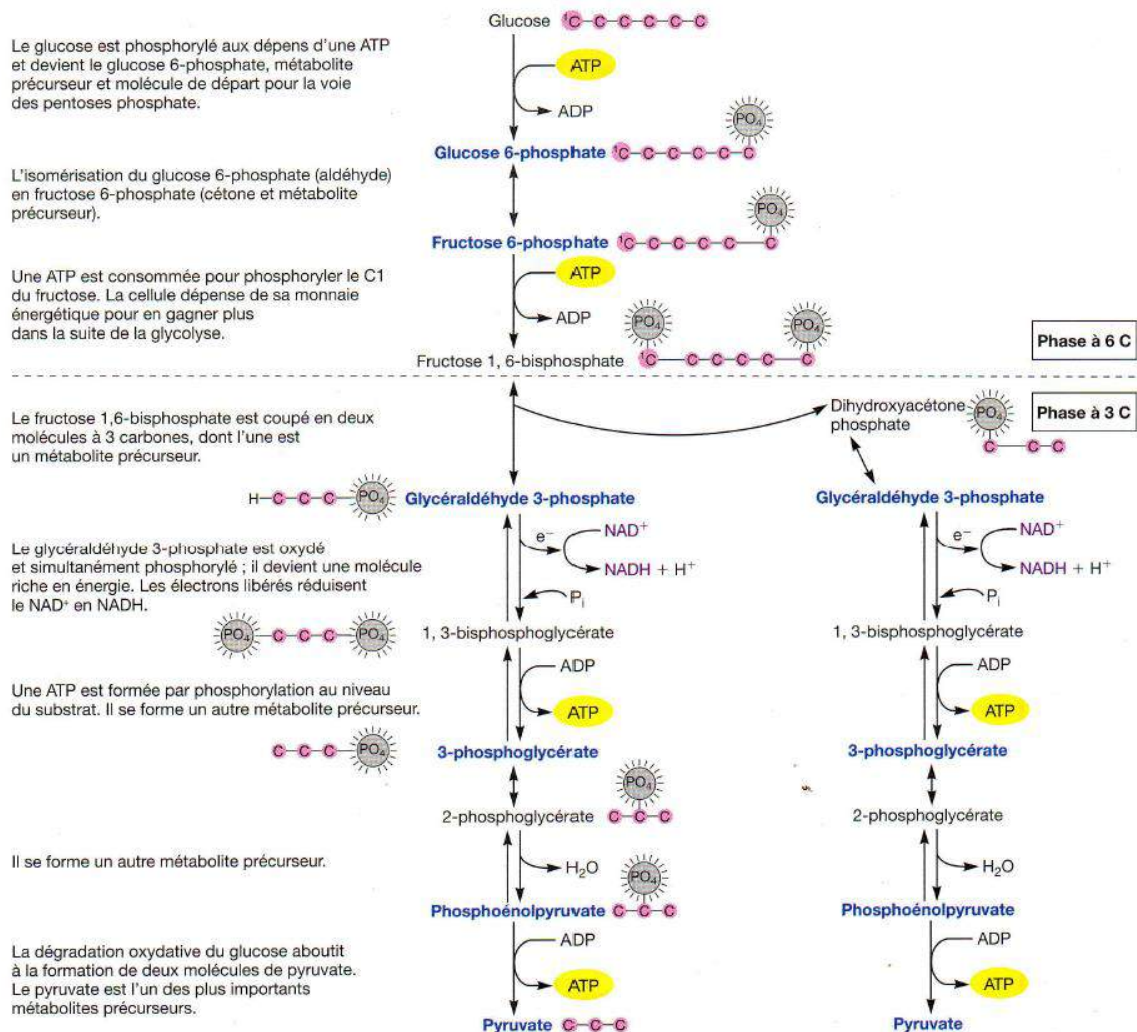
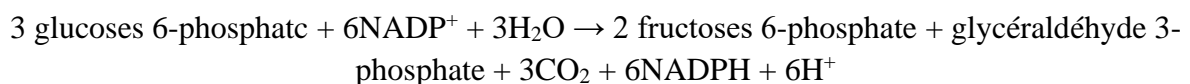


Figure V.6 : La voie d'Embden-Meyerhof.

### La voie des pentoses phosphate

La voie des pentoses phosphate ou voie des hexoses monophosphate, peut être utilisée en même temps que les voies d'Embden-Meyerhof ou d'Entner-Doudoroff. Elle débute par l'oxydation du glucose 6-phosphate en 6-phosphogluconate. Elle se poursuit par l'oxydation du 6-phosphogluconate en un pentose, le ribulose 5-phosphate, et en CO<sub>2</sub> (figure V.7). Ces oxydations produisent du NADPH. Le ribulose 5-phosphate est alors converti en un mélange de sucres phosphate de 3 à 7 carbones. Le résultat global est la conversion de trois glucoses 6-phosphate en deux fructoses 6-phosphate, un glycéraldéhyde 3-phosphate et trois molécules de CO<sub>2</sub>, comme le montre l'équation suivante :



Ces intermédiaires sont utilisés de deux façons :

- Le fructose 6-phosphate est reconverti en glucose 6-phosphate, tandis que le glycéraldéhyde 3-phosphate est converti en pyruvate par les enzymes de la voie d'Embden-Meyerhof.

- Les deux glycéraldéhydes 3-phosphate se combinent en fructose 1,6-bisphosphate, qui est reconverti en glucose 6-phosphate.

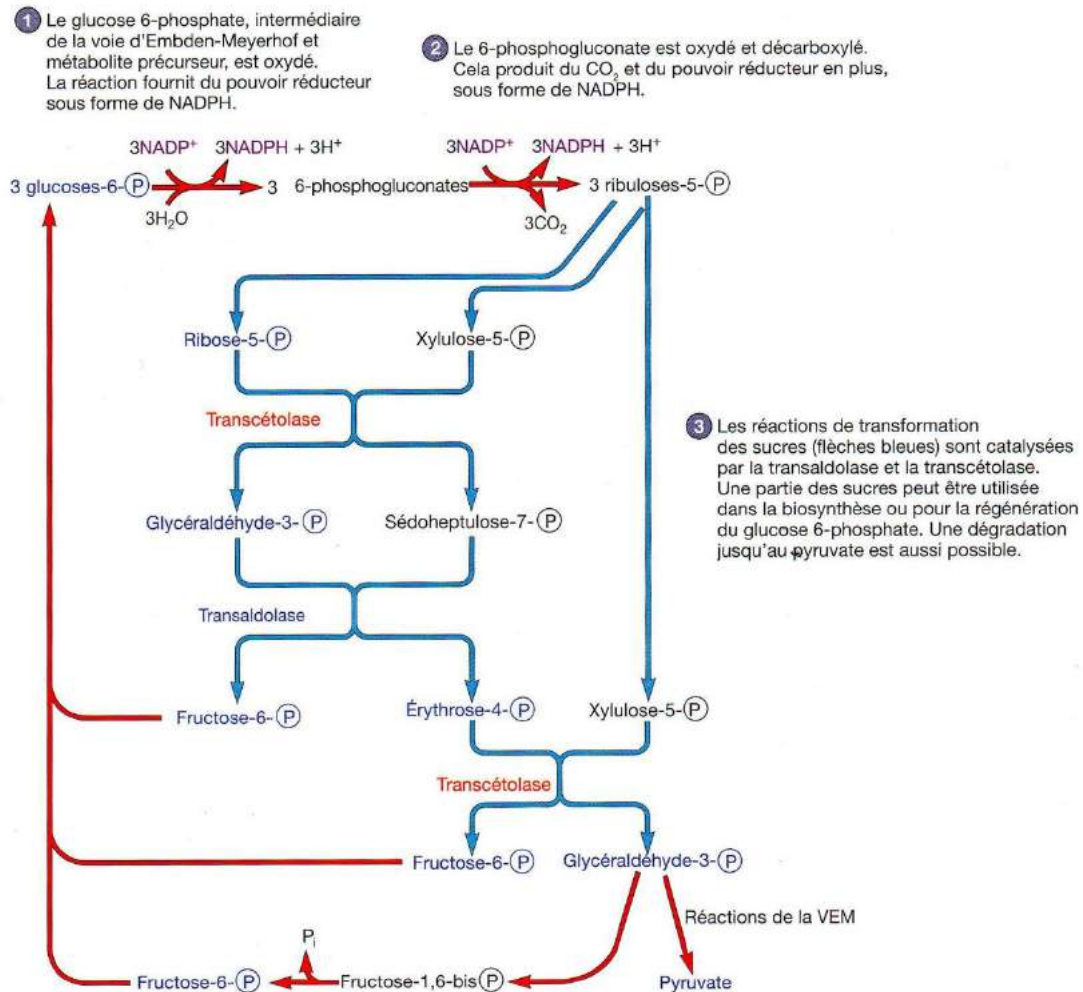
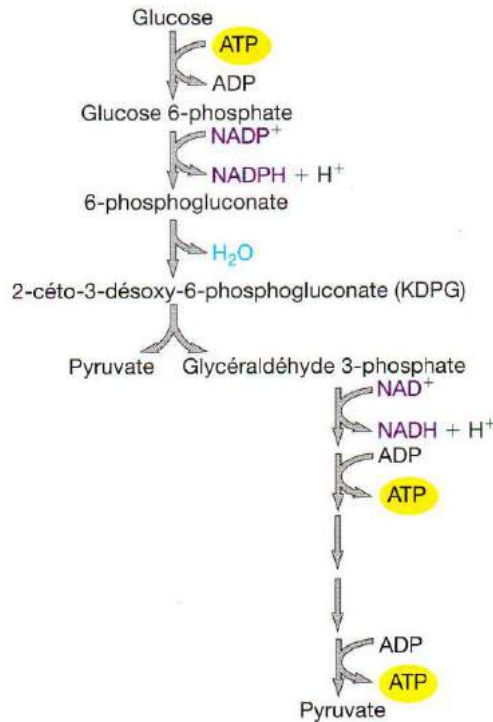


Figure V.7 : La voie des pentoses phosphate.

### La voie d'Entner-Doudoroff

La voie d'Entner-Doudoroff commence par les mêmes réactions que la voie des pentoses phosphate : la formation de glucose 6-phosphate, qui est converti en 6 phosphogluconate. Au lieu de poursuivre son oxydation, le 6-phospho-gluconate est déshydraté pour former le 2 céto-3-désoxy-6-phosphogluconate ou CDPG, l'intermédiaire clé de cette voie. Le CDPG est ensuite clivé par la CDPG aldolase, en pyruvate et glycéraldéhyde 3-phosphate. Ce dernier est converti en pyruvate dans la voie d'Embden-Meyerhof. Quand la voie d'Entner-Doudoroff dégrade le glucose en pyruvate de cette façon, elle fournit un ATP, un NADPH et un NADH par glucose métabolisé (figure V.8).



**Figure V.8 :** La voie d'Entner-Doudoroff.

### 2.1.1.2. Le cycle des acides tricarboxyliques

Dans les voies glycolytiques, le glucose est oxydé en pyruvate. Au cours de la respiration aérobie, le pyruvate est ensuite oxydé en trois CO<sub>2</sub>. La première étape de ce processus emploie un système multienzymatique, la pyruvate déshydrogénase, qui oxyde et clive le pyruvate pour former un CO<sub>2</sub> et de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA).

L'acétyl-CoA entre alors dans le cycle des acides tricarboxyliques (cycle des ATC) aussi appelé cycle du citrate ou cycle de Krebs (figure V.9). Ce dernier génère deux CO<sub>2</sub>, trois NADH, un FADH et une GTP pour chaque molécule acétyl-CoA oxydée.

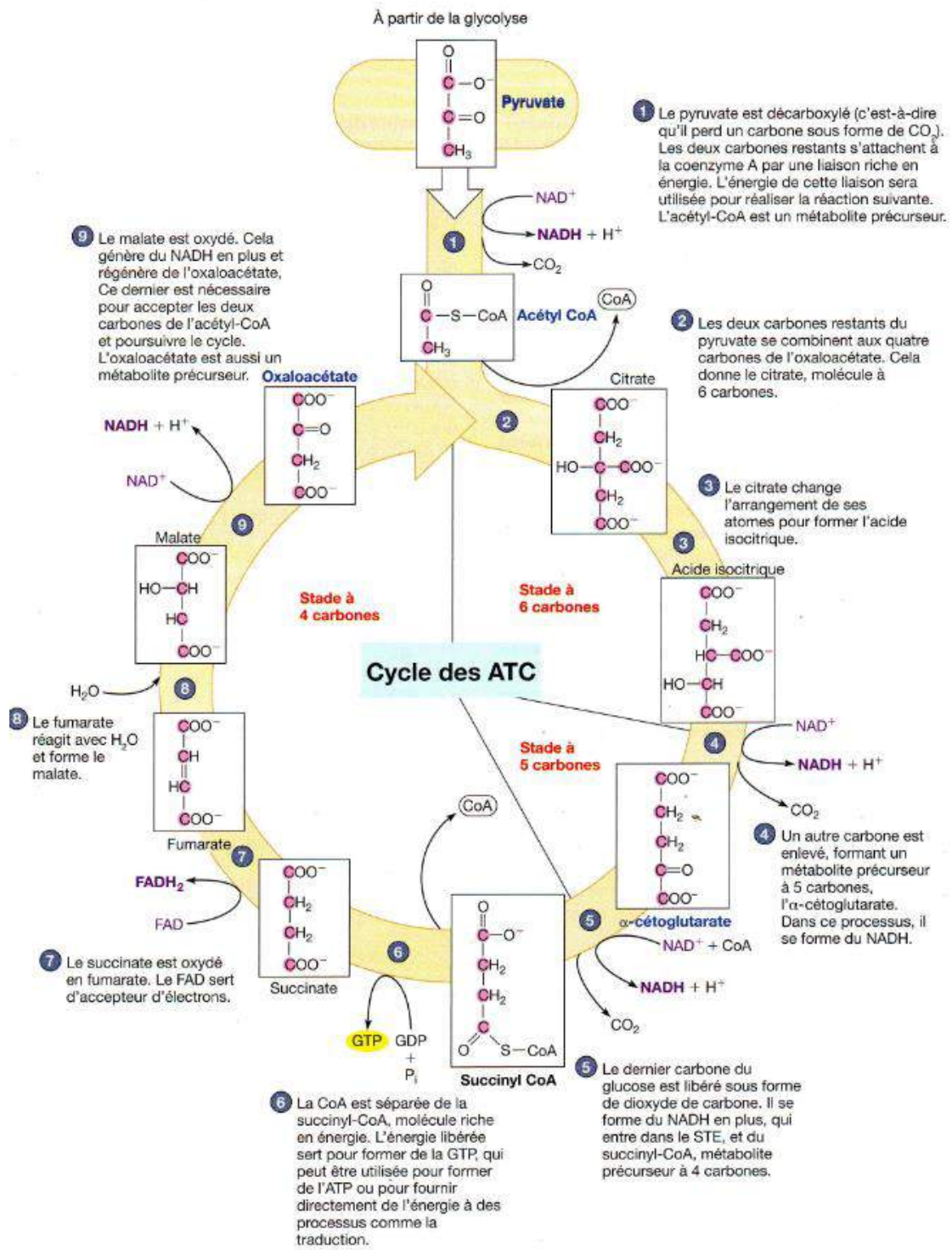
### 2.1.1.3. Le transfert des électrons et la phosphorylation oxydative

La glycolyse et le cycle des ATC produisent quatre molécules d'ATP ainsi que de nombreuses molécules de NADH et de FADH<sub>2</sub>. L'oxydation de ces deux molécules dans la chaîne de transfert d'électrons produit la plus grande partie de l'ATP lors de la respiration aérobie par phosphorylation oxydative.

#### ▪ La chaîne de transfert des électrons

La chaîne de transfert des électrons est composée d'une série de transporteurs d'électrons qui agissent ensemble pour transférer les électrons de donneurs (NADH et FADH<sub>2</sub>) à des accepteurs tels que l'O<sub>2</sub> (figure V.10a). Les électrons passent de transporteurs aux potentiels de réduction plus négatifs à ceux dont le potentiel est plus positif, pour finalement se combiner à l'O<sub>2</sub> et à l'H<sup>+</sup> pour former de l'eau.

L'expulsion des protons au cours du transport des électrons conduit à la formation d'un gradient de protons appelé force proton-motrice (FPM).



**Figure V.9 :** Le cycle des acides tricarboxyliques.

Les chaînes de transfert d'électrons chez les eucaryotes présentent certaines particularités. *Escherichia coli*, par exemple, a une chaîne de transfert d'électrons à deux branches qui travaillent dans des conditions différentes d'aération. Quand l'oxygène est facilement disponible, c'est la branche du cytochrome *bo* qui fonctionne. Quand les teneurs en oxygène sont réduites, c'est la branche *bd* qui est utilisée parce qu'elle a une plus grande affinité pour l'oxygène. Pourtant, elle est moins efficace que la branche *bo* parce qu'elle pompe moins de protons vers l'espace périplasmique (figure V.10b).

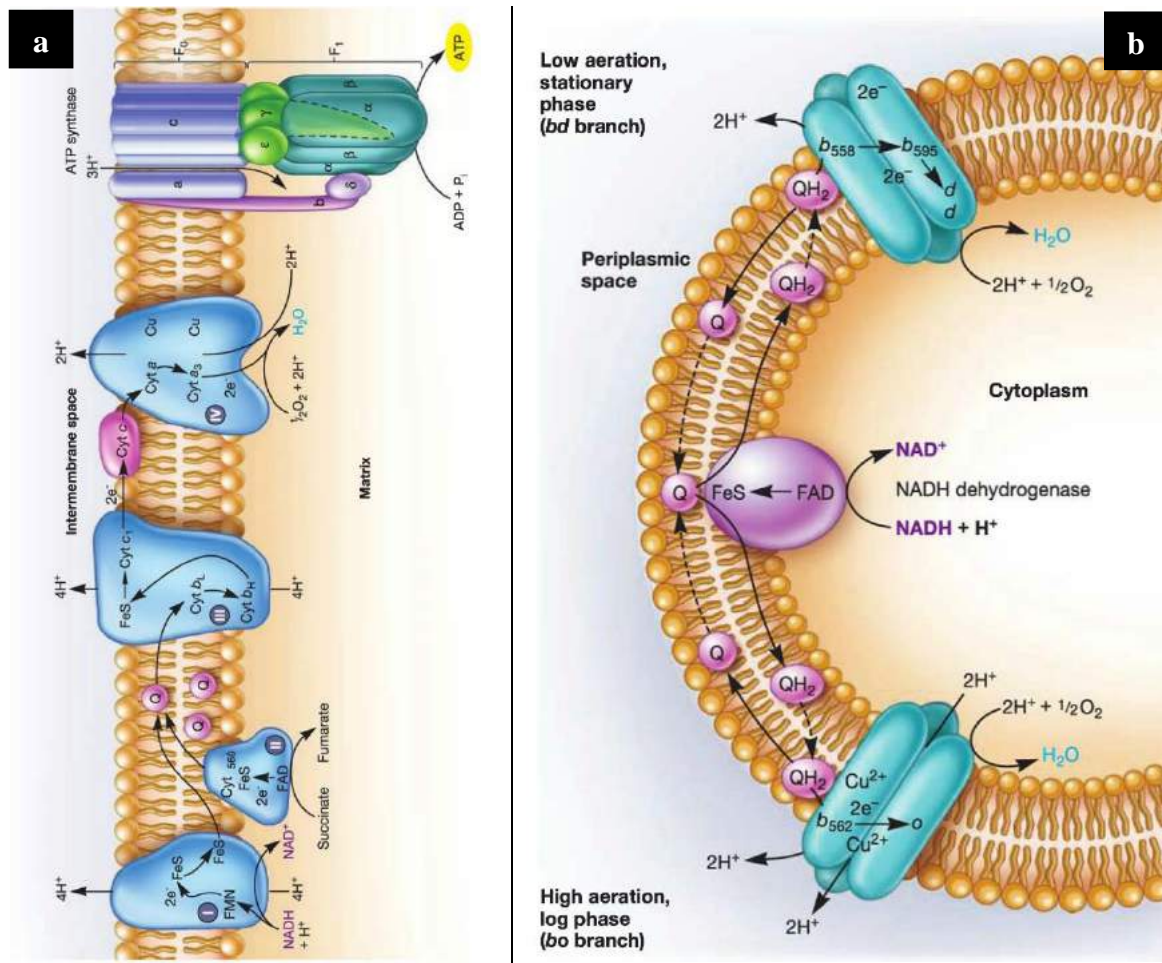


Figure V.10 : La chaîne de transfert des électrons ; (a) dans les mitochondries, (b) : chez *E. coli*.

### ▪ La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est le processus par lequel l'ATP est synthétisée, grâce au transport des électrons provenant de l'oxydation d'une source d'énergie chimique. En effet, la chaîne de transfert d'électrons est organisée de sorte que les protons soient transférés à l'extérieur de la matrice mitochondriale, pendant que les électrons traversent la chaîne (figure V.10a). Le résultat de l'expulsion des protons au cours du transport des électrons est la formation d'un gradient de protons et d'un gradient de charges créant une force proton-motrice. Cette dernière est utilisée pour phosphoryler de l'ADP en ATP grâce à l'ATP synthase.

**Remarque :** La FPM sert aussi à transporter des molécules dans la cellule directement et à faire tourner le moteur flagellaire.

### ▪ Le rendement en ATP de la respiration aérobie

Le rendement énergétique peut être évalué par le nombre d'ATP (phosphore) généré par oxygène réduit (O), c'est le rapport phosphore/oxygène (P/O). Parce que le  $\text{FADH}_2$  a un potentiel de réduction plus positif que le NADH, le rapport P/O est de 3 pour le NADH alors qu'il n'est que de 2 pour le  $\text{FADH}_2$ .

Le rendement théorique de la respiration aérobie est ainsi de 38 ATP (figure V.11). A noter que les rapports P/O se situent vraisemblablement aux alentours de 2,5 pour le NADH et



de 1,5 pour le FADH<sub>2</sub>. Le rendement aérobie total en ATP, à partir du glucose, pourrait donc être plus proche de 30 ATP que de 38.

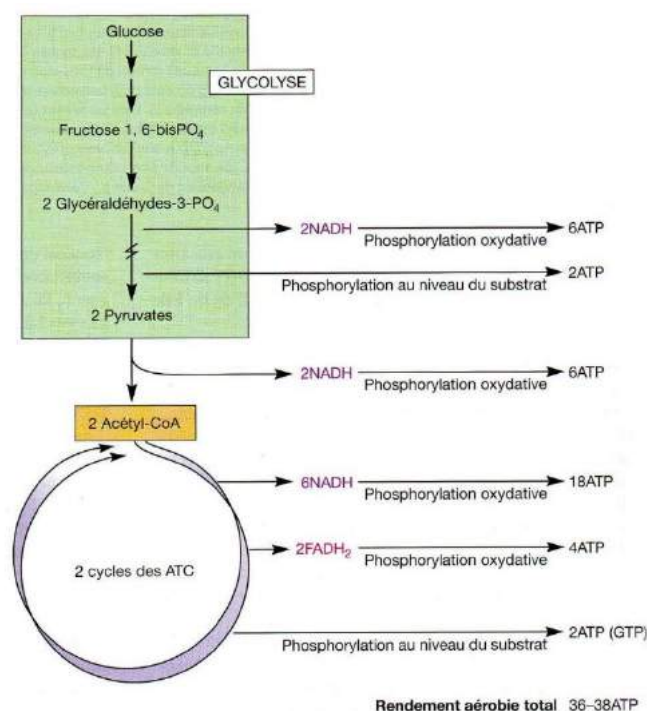


Figure V.11 : Rendement maximum théorique en ATP de la respiration aérobie.

### 2.1.2. La respiration anaérobie

La respiration anaérobie, pratiquée par de nombreuses bactéries et archées, est un processus d'oxydation de molécules organiques dans lequel le transfert des électrons conduit à un accepteur terminal exogène, autre que l'O<sub>2</sub>. Les accepteurs d'électrons terminaux les plus communs dans la respiration anaérobie sont le nitrate, le sulfate et le CO<sub>2</sub>, mais des métaux et quelques molécules organiques peuvent aussi être réduites (Tableau V.2).

Tableau V.2 : Quelques accepteurs d'électrons utilisés lors de la respiration.

Accepteur d'électrons	Produits réduits	Exemples de micro-organismes
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Bactéries entériques
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , N <sub>2</sub> O, N <sub>2</sub>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> et <i>Paracoccus</i>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> S	<i>Desulfovibrio</i> et <i>Desulfotomaculum</i>
CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	Tous les méthanogènes et acétogènes
S <sup>0</sup>	H <sub>2</sub> S	<i>Desulfuromonas</i> et <i>Thermoproteus</i>
Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> et <i>Geobacter</i>
HASO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HASO <sub>2</sub>	<i>Bacillus</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Sulfurospirillum</i>
SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Se, HSeO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<i>Aeromonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Thauera</i>
Fumarate	Succinate	<i>Wolinella</i>

### 2.1.3. Les fermentations

La fermentation utilise le pyruvate ou un de ses dérivés comme accepteur d'électrons et d'hydrogène, pour la réoxydation du NADH produit dans les réactions de la voie d'Embden-Meyerhof. La production d'ATP se fait uniquement par phosphorylation au niveau du substrat puisque la phosphorylation oxydative ne peut pas fonctionner, ce qui réduit significativement le rendement en ATP par glucose.

Il y a de nombreux types de fermentations, souvent caractéristiques de groupes microbiens particuliers (figure V.12).

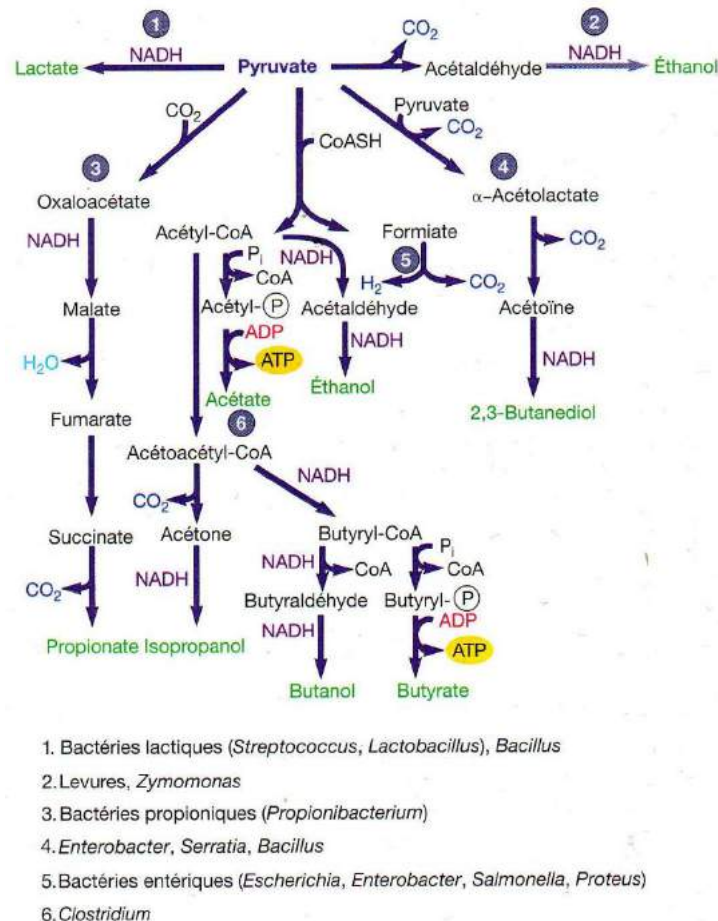


Figure V.12 : Quelques fermentations microbiennes.

### 2.2. Les Chimio-lithotrophes

Les chimio-lithotrophes oxydent des molécules inorganiques pour alimenter leur chaîne de transfert d'électrons. Chaque espèce montre une spécificité pour des donneurs et des accepteurs d'électrons (tableau V.3). L'accepteur est habituellement l'O<sub>2</sub>, mais le sulfate et le nitrate sont aussi utilisés. Les donneurs d'électrons les plus courants sont l'hydrogène, les composés azotés réduits, les composés soufrés réduits et l'ion ferreux (Fe<sup>2+</sup>).

L'oxydation des molécules inorganiques fournit beaucoup moins d'énergie que l'oxydation complète du glucose en CO<sub>2</sub>. De ce fait, les Chimio-lithotrophes doivent oxyder une grande quantité de matériel inorganique pour croître et se reproduire.

**Tableau V.3 : Chimiolithotrophes représentatifs et leurs sources d'énergie**

<b>Bactéries</b>	<b>Donneur d'électrons</b>	<b>Accepteur d'électrons</b>	<b>Produits</b>
Alcaligenes, Hydrogenophaga, et <i>Pseudomonas</i> spp	H <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	HO <sub>2</sub>
<i>Nitrobacter</i>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HO <sub>2</sub>
<i>Nitrosomonas</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	O <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , HO <sub>2</sub>
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	S <sup>0</sup> , H <sub>2</sub> S	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , N <sub>2</sub>
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Fe <sup>2+</sup> , S <sup>0</sup> , H <sub>2</sub> S	O <sub>2</sub>	Fe <sup>3+</sup> , HO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 2.3. Les phototrophes

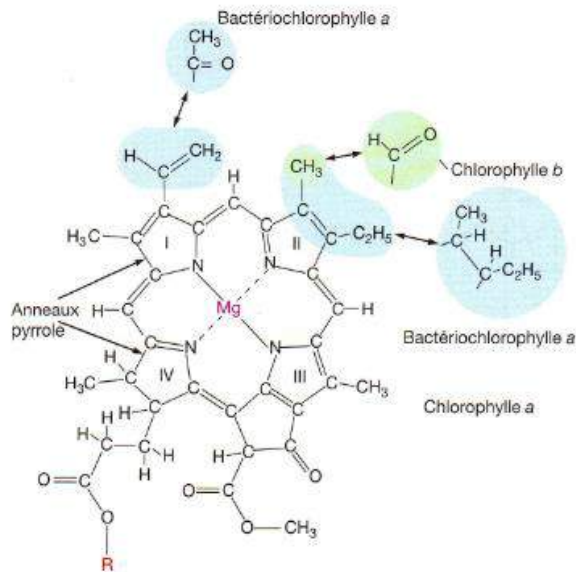
Les micro-organismes **phototrophes** captent l'énergie lumineuse et utilisent pour synthétiser de l'ATP et du pouvoir réducteur (NADPH). Le processus par lequel l'énergie lumineuse est piégée et convertie en énergie chimique s'appelle la **photosynthèse**. On peut diviser la photosynthèse en deux parties. Dans la **phase claire**, l'énergie lumineuse est piégée et convertie en énergie chimique. Cette énergie est alors utilisée pour réduire ou fixer le CO<sub>2</sub>, et synthétiser les constituants cellulaires au cours de la **phase obscure**. On distingue trois types de phototrophie : la photosynthèse oxygénique, la photosynthèse anoxygénique et la phototrophie basée sur la rhodopsine.

#### 2.3.1. Photosynthèse oxygénique

Les eucaryotes phototrophes et les cyanobactéries pratiquent la photosynthèse oxygénique, ainsi appelée parce qu'elle génère de l'oxygène lorsqu'elle convertit l'énergie lumineuse en énergie chimique.

Chez les phototrophes oxygéniques, les pigments les plus importants sont les chlorophylles. La chlorophylle a et la chlorophylle b sont les plus importants (figure V.13), ces molécules diffèrent légèrement par leur structure et leurs propriétés spectrales (les chlorophylles a et b présentent des pics d'absorption de la lumière à 665 et 645 nm respectivement). D'autres pigments photosynthétiques, appelés **pigments accessoires**, captent aussi l'énergie lumineuse. Le β-carotène est présent chez les cyanobactéries du genre *Prochloron* et chez la plupart des protistes photosynthétiques. On trouve également la fucoxanthine, la phycobiliprotéine.

Les chlorophylles et les pigments accessoires sont assemblés en structures hautement organisées appelées **antennes**. L'énergie lumineuse est captée par l'antenne et transférée jusqu'à une paire de chlorophylles spéciale d'un **centre réactionnel**, directement impliquée dans le transport des électrons photosynthétiques. Chez les phototrophes oxygéniques, il y a deux sortes d'antennes associées à deux photosystèmes différents : (1) le **photosystème I** absorbe la lumière de grande longueur d'onde (> 680 nm) et canalise l'énergie vers une paire de chlorophylles particulière appelée **P700**. (2) Le **photosystème II** capte la lumière à des longueurs d'onde plus courtes (< 680 nm) et transfère son énergie à la paire de chlorophylles particulières **P680**.



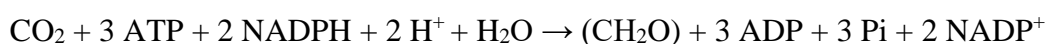
**Figure V.13 :** La structure des chlorophylles.

Lorsque l'antenne du photosystème I transfère l'énergie lumineuse à la paire de chlorophylles P700 du centre réactionnel, P700 absorbe l'énergie et est excitée. Son potentiel de réduction devient très négatif. Ceci lui permet de céder son électron excité, riche en énergie, à un accepteur spécifique. L'électron est finalement transféré à la ferrédoxine et peut suivre l'une ou l'autre de deux directions :

- Dans **la voie cyclique**, l'électron se déplace dans un cycle, via une série de transporteurs d'électrons et revient à P700 oxydée. La voie est dite cyclique parce que l'électron de P700 revient à P700 après avoir traversé la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons. Une FPM se forme au cours du transport cyclique d'électrons dans la région du cytochrome  $b_6$  et est utilisée pour synthétiser de l'ATP. On appelle ce processus la photophosphorylation cyclique, parce que les électrons suivent une voie cyclique et que de l'ATP est synthétisée (figure V.14).
- La **voie non cyclique** fait intervenir les deux photosystèmes. P700 est excitée et cède des électrons à la ferrédoxine qui réduit  $\text{NADP}^+$  en NADPH. Le photosystème II cède par la suite des électrons à P700 oxydée et génère de l'ATP au cours de ce processus. L'antenne du photosystème II absorbe l'énergie lumineuse et excite P680 qui réduit ensuite la phéophytine a. Ensuite, les électrons se déplacent vers la plastoquinone et descendent la chaîne de transfert d'électrons jusqu'à P700. Le P680 doit aussi être réduit pour pouvoir accepter de l'énergie lumineuse en plus. Le  $\text{H}_2\text{O}$  peut être utilisée pour donner des électrons à P680, d'où il résulte une libération d'oxygène. Une ATP et un NADH sont formés lorsque deux électrons parcourent la voie non cyclique (figure V.14).

Chez les cyanobactéries, la phase claire photosynthétique est localisée dans les membranes des thylacoïdes, à l'intérieur de la cellule.

La phase obscure requiert trois ATP et deux NADPH pour réduire un  $\text{CO}_2$  et utiliser celui-ci à la synthèse d'un hydrate de carbone ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) :



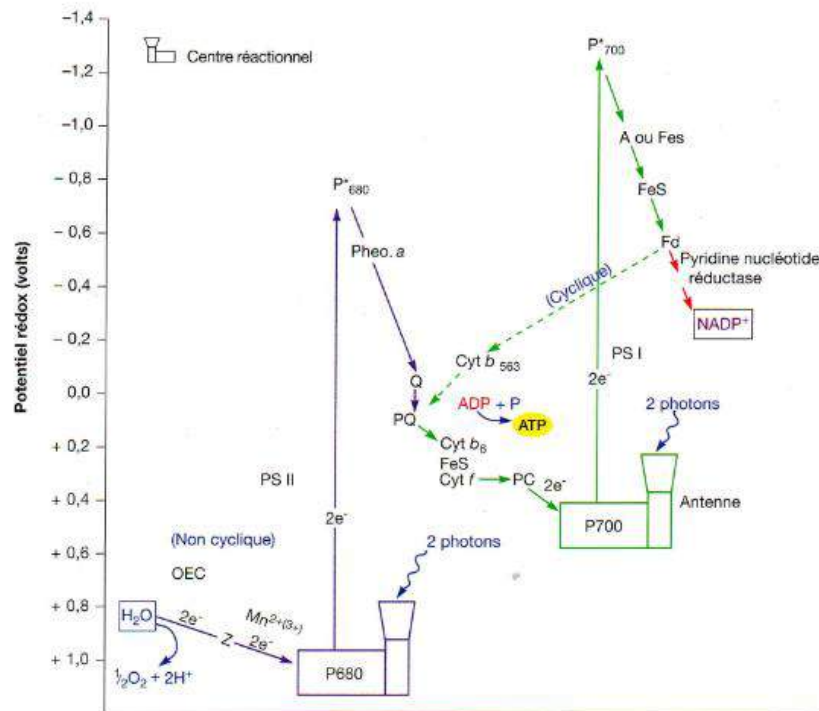


Figure V.14 : La photosynthèse chez les plantes vertes.

### 2.3.2. Photosynthèse anoxygénique

La photosynthèse anoxygénique tire son nom du fait que la source d'électrons n'est pas l'eau et que par conséquent, il n'y a pas d'O<sub>2</sub> produit. Trois groupes de bactéries effectuent la photosynthèse anoxygénique : les bactéries phototrophes vertes, les bactéries phototrophes pourpres et les héliobactéries.

Les phototrophes anoxygéniques contiennent des pigments photosynthétiques appelés bactériochlorophylles (figure V.13). Les maximums d'absorption des bactériochlorophylles (Bchl) se situent à des longueurs d'onde plus élevées que celles des chlorophylles (les bactériochlorophylles a et b ont des maximums à respectivement 775 et 790 nm).

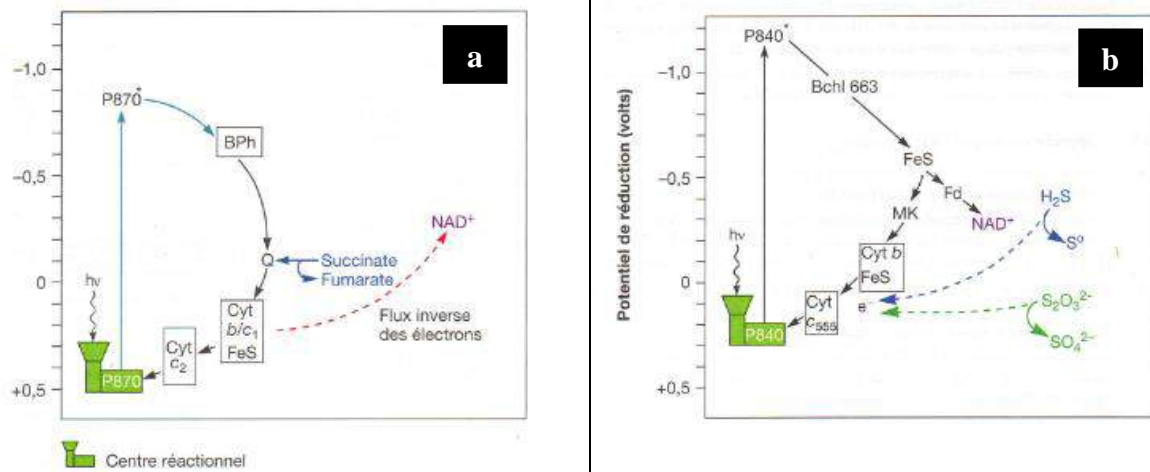
De nombreuses bactéries anoxygéniques n'ont qu'un seul photosystème. De ce fait, elles sont limitées au flux cyclique d'électrons et sont incapables de produire de l'O<sub>2</sub> à partir d'H<sub>2</sub>O. En effet, presque tous les phototrophes anoxygéniques sont des anaérobies stricts.

La chaîne photosynthétique de transfert des électrons des bactéries pourpres non sulfureuses est présentée dans la figure V.15a. Lorsque la bactériochlorophylle particulière P870 du centre réactionnel est excitée, elle cède un électron à la bactériophéophytine. Les électrons passent ensuite aux quinones et, à travers la chaîne de transfert des électrons, reviennent à P870, en générant une FPM suffisante pour permettre la synthèse d'ATP.

Notez que si les bactéries vertes aussi bien que les pourpres n'ont qu'un photosystème, les bactéries pourpres possèdent un appareil photosynthétique similaire au photosystème II, tandis que celui des bactéries vertes est similaire au photosystème I.

Les phototrophes anoxygéniques ont besoin de pouvoir réducteur (NAD(P)H ou de la ferrédoxine réduite) pour la fixation de CO<sub>2</sub> et pour d'autres processus biosynthétiques. Ils sont aptes à générer du pouvoir réducteur de trois façons :

- Certains possèdent des hydrogénases qui sont utilisées pour produire du NAD(P)H directement, par oxydation de l'hydrogène gazeux.
- Les bactéries photosynthétiques pourpres, doivent recourir au flux inverse des électrons pour générer du NAD(P)H (figure V.15a).
- Les bactéries phototrophes vertes et les héliobactéries tirent des électrons de donneurs comme le sulfure d'hydrogène, le soufre élémentaire ou des composés organiques remplacent les électrons soutirés de cette façon à la chaîne de transfert (figure V.15b).

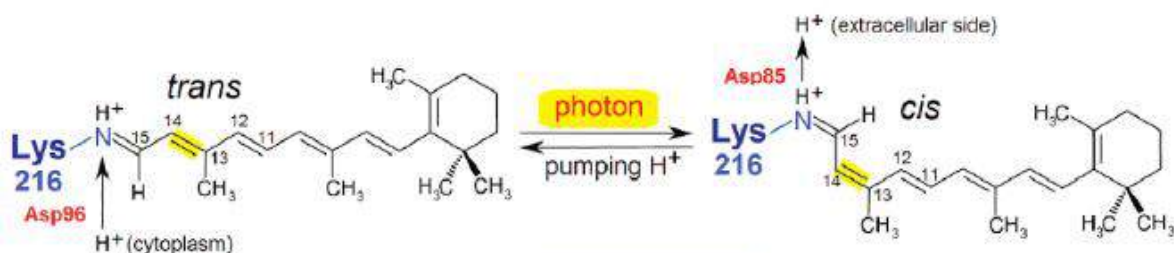


**Figure V.15 :** La photosynthèse chez (a) : les bactéries pourpres non sulfureuses, (b) : les bactéries vertes sulfureuses.

### 2.3.3 Phototrophie basée sur la rhodopsine

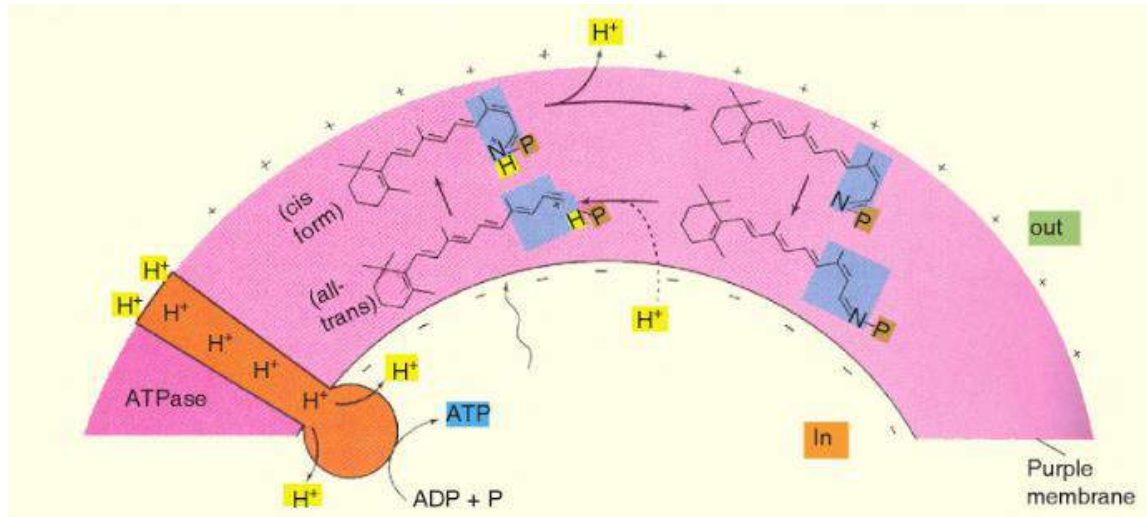
Certaines archées sont capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie. Au lieu de chlorophylle, ces micro-organismes utilisent une protéine membranaire appelée la bacteriorhodopsine (ou plus correctement archéorhodopsine). Une de ces archées est l'halophile *Halobacterium salinarum*.

*H. salinarum* recourt normalement à la respiration aérobie pour obtenir son énergie d'une source organique. Cependant, dans des conditions où l'oxygène est rare et l'intensité lumineuse forte, elle synthétise de la bacteriorhodopsine, un pigment d'un pourpre profond, qui ressemble fort à la rhodopsine des bâtonnets et des cônes des yeux des vertébrés. Le chromophore de la bacteriorhodopsine est le rétinol, un type de caroténoïde. Le chromophore est attaché covalentiellement au pigment protéique, qui est enchâssé dans la membrane cytoplasmique de telle façon que le rétinol soit au centre de la membrane (figure V.16).



**Figure V.16 :** Activation du rétinol de la bacteriorhodopsine.

La bactériorhodopsine est une pompe à protons : l'absorption d'1 photon provoque un changement conformationnel qui permet la translocation d'1 ou 2  $H^+$  du cytosol vers l'espace périplasmique compris entre la membrane plasmique et la paroi bactérienne (création d'une force proton-motrice et synthèse d'ATP par une autre protéine membranaire) ; il n'y a pas photosynthèse (pas intervention de PS) mais photophosphorylation (figure V.17).



**Figure V.17** : Fonctionnement de la bactériorhodopsine.

# Chapitre 6 : Eléments de génétique bactérienne

## INTRODUCTION

La génétique microbienne a pour objet l'étude du génome des micro-organismes à savoir les gènes, leurs variations génotypiques et de leurs expressions phénotypiques. La nature d'une cellule et toutes ses activités, proviennent d'instructions présentes dans la cellule sous la forme d'une information génétique. Chez les bactéries comme chez la plupart des êtres vivants, cette information est inscrite dans la structure d'une molécule qui est l'acide désoxyribonucléique (ADN) qui forme le chromosome de la cellule.

## 1. Structure et fonctions du génome bactérien

### 1.1. Structure de l'ADN

Les molécules d'ADN se composent de deux chaînes de nucléotides, ou « brins », enroulées en spirale autour d'un axe imaginaire de façon à former une **double hélice**. Les deux chaînes hélicoïdales s'enroulent dans des directions opposées 5'→3'; on qualifie cet **arrangement d'antiparallèle**. Les deux squelettes désoxyribosephosphate se trouvent sur les bordures extérieures de l'hélice, alors que les bases azotées s'apparient à l'intérieur de l'hélice. Les deux brins demeurent attachés ensemble grâce aux liaisons hydrogène qui unissent les bases azotées appariées (deux ou trois liaisons, selon les bases azotées) (figure VI.1). L'ADN est associé à des protéines basiques différentes des histones présentes chez les Eucaryotes.

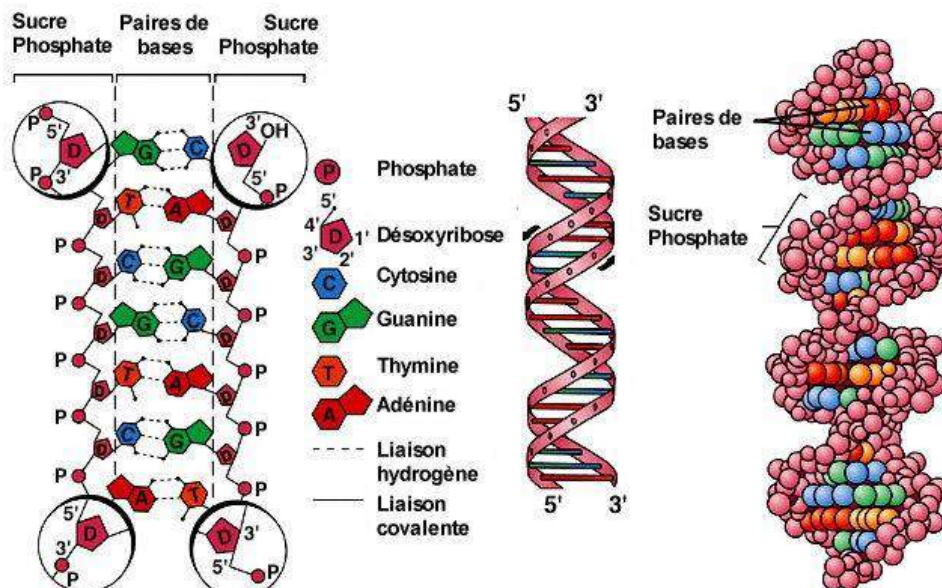


Figure VI.1 : Structure de l'ADN.

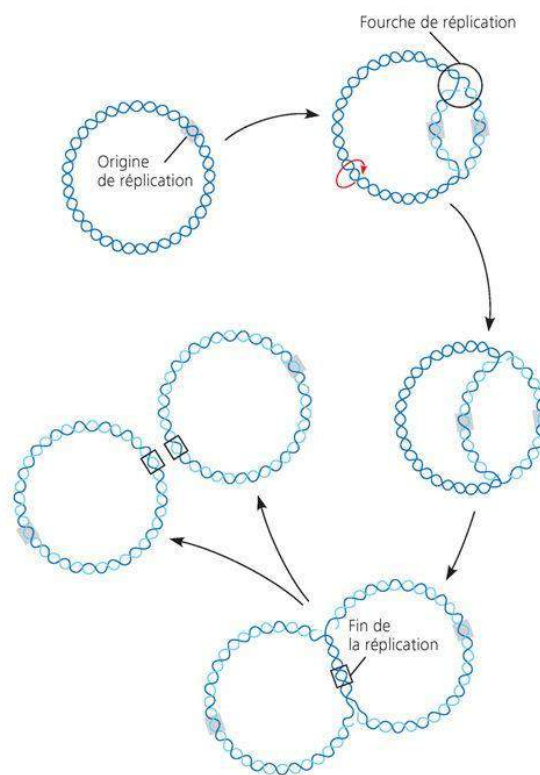
### 1.2. Organisation

Le matériel génétique des Procaryotes est généralement constitué que d'une seule molécule d'ADN double-brin, circulaire ou linéaire qu'on appelle **chromosome**. A l'intérieur de la cellule, le chromosome bactérien occupe une région délimitée irrégulièrement au contact



du cytoplasme appelée **nucléoïde** (le matériel génétique n'est donc pas dans un noyau). Le nucléoïde présente un point d'ancrage dans la membrane plasmique. Les bactéries possèdent un génome dont la taille est comprise entre  $7.10^5$  paires de bases chez *Mycoplasma* et  $7.10^6$  pb chez *Streptomyces* ( $4.6.10^6$  chez *E. coli*), soit entre 3000 et 4000 gènes.

Avant de se diviser, une bactérie doit répliquer son chromosome bactérien afin d'en transmettre une copie à chacune de ses cellules filles. La répllication de l'ADN est **semi-conservative** : chaque molécule fille contient un brin parental et un brin néosynthétisé. Chez les Procaryotes, lorsque le chromosome circulaire est copié, la répllication commence en un seul point appelé « **origine de répllication** », où se forme une petite zone de dénaturation de l'ADN, afin que chacun des deux brins puisse servir de matrice. Deux **fourches de répllication** partent de part et d'autre de cette origine jusqu'à ce que toute la molécule d'ADN soit copiée (figure VI.2).



**Figure VI.2 :** Répllication bidirectionnelle chez les procaryotes.

Les bactéries possèdent également des éléments d'ADN extrachromosomique, les **plasmides**. Ce sont de petites molécules d'ADN double-brin circulaire de quelques  $\mu\text{m}$  ( $10^3$  à  $10^5$  pb). Leur **répllication est autonome** : ils possèdent leur propre **origine de répllication** (ORI-R). Ils portent un nombre réduit de gènes (<30) qui confèrent aux bactéries hôtes des propriétés non essentielles à leur survie :

- gènes codant pour les pili sexuels et autres facteurs de conjugaison ;
- gènes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds ;
- gènes de virulence (toxines, sidérophores...) ;
- gènes codant pour des bactériocines.

## 1.2. Structure des gènes

Les gènes codant pour les protéines présentent en amont de la région codante un site de régulation permettant la reconnaissance et la liaison de l'ARN polymérase : le **promoteur** (figure VI.3).

- Le **site de reconnaissance** de l'ARN polymérase comporte sur le brin non copié une séquence 5'-TTGACA-3' (**boîte GACA**) située à 35 paires de bases du point d'initiation de la transcription (+1).
- Le **site de liaison** de l'ARN polymérase comporte sur le brin non copié une séquence 5'-TATAAT-3' (**boîte TATA** ou **boîte de Pribnow**) située à 10 paires de bases du point d'initiation de la transcription. C'est l'endroit où l'ARN polymérase provoque l'ouverture de la double hélice d'ADN.

Les séquences de ces deux sites sont relativement constantes d'une espèce bactérienne à une autre : elles sont appelées **séquences consensus**.



**Figure VI.3** : Organisation des opérons chez les procaryotes.

L'**ARN polymérase** copie l'ADN en ARN à partir du point d'initiation de la transcription. Au début de l'ARN messager (ARNm), il existe une séquence non traduite (comprise entre le point +1 et le codon initiateur AUG). Il s'agit d'une **séquence de tête**, qui contient également une séquence consensus 5'-AGGAGG-3' dite de **Shine-Dalgarno**. Celle-ci intervient comme un signal dans la fixation de la petite sous-unité du ribosome, par l'intermédiaire de l'ARNr 16S (figure VI.4).

La région codante commence par le triplet **AUG** (codant pour une méthionine) et se termine par l'un des trois codons stop (**UAA, UAG, UGA**).

A la fin de l'ARN messager (du côté 3'), on trouve une **séquence de queue** non traduite, au niveau de laquelle s'arrête la transcription. Elle est constituée de régions auto-complémentaires riches en GC susceptibles de s'apparier et de former une boucle permettant l'expulsion de l'ARN polymérase.

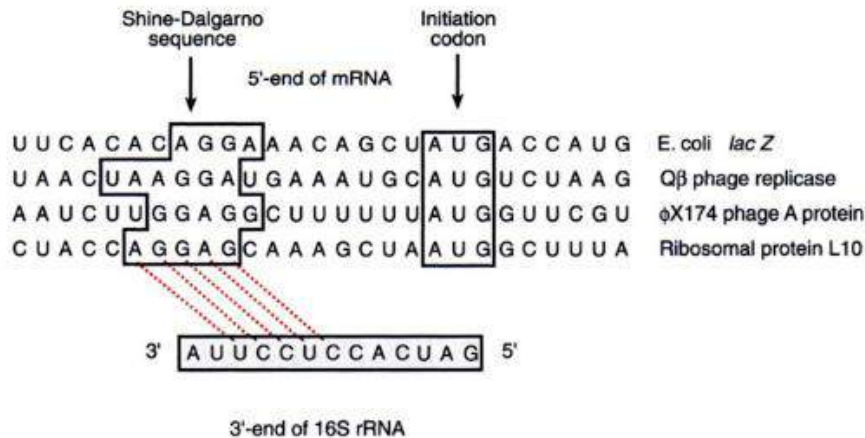


Figure VI.4 : La séquence de Shine-Dalgarno.

Chez les Procaryotes, la plupart des gènes sont organisés en unités structurales et fonctionnelles appelées **opérons**, succession de gènes codant chacun une chaîne polypeptidique. Un opéron rassemble des gènes intervenant dans un même domaine métabolique :

- l'opéron lactose rassemble les gènes permettant l'utilisation du lactose (figure VI.6) ;
- l'opéron tryptophane rassemble les gènes permettant la synthèse du tryptophane (figure VI.7).

Un opéron est transcrit en un seul **ARNm polycistronique** (ou polygénique) (figure VI.5). Certains gènes ne codent pas pour des protéines, mais pour les ARN de transfert (ARNt) et les ARN ribosomiaux (ARNr). Chez les Procaryotes, le matériel génétique est directement au contact du cytoplasme, donc des ribosomes. De ce fait, la synthèse protéique peut démarrer sur un ARNm dont la synthèse n'est pas terminée : **transcription et traduction sont simultanées**. De plus, un ARNm peut être lu simultanément par plusieurs ribosomes, formant ainsi une structure en « collier de perles » appelé **polysome**.

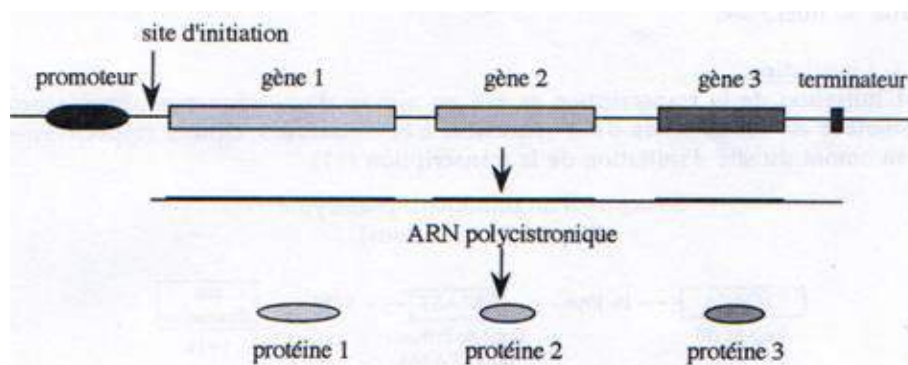


Figure VI.5 : Les ARNs polycistroniques.

### 1.3. Régulation de l'expression des gènes

Pour transcrire leurs gènes, les bactéries possèdent une **ARN polymérase**. Il s'agit d'un complexe enzymatique de 450 kDa, constitué de 5 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\sigma$ ). Le facteur  $\sigma$  est capable de reconnaître les séquences consensus des promoteurs qui permettent le démarrage de la transcription. Cependant, seuls les gènes codant pour les protéines constitutives sont

exprimés de manière constante, les enzymes de la glycolyse par exemple. Il existe donc une régulation permettant à la cellule de ne synthétiser que les enzymes qui lui sont nécessaires, en fonction de la nature du milieu. Ce contrôle est effectué au niveau transcriptionnel selon deux modes principaux : l'induction et la répression.

### 1.3.1. Systèmes inductibles : exemple de l'opéron lactose

Lorsqu'une souche d'*E. coli* est cultivée dans un milieu contenant du glucose puis transférée dans un milieu contenant du lactose, elle se met à synthétiser une enzyme jusqu'alors indétectable : la  $\beta$ -galactosidase (qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose). On dit que le lactose est un inducteur : sa présence dans le milieu augmente la quantité de  $\beta$ -galactosidase, mais aussi de  $\beta$ -galactoside perméase et de thiogalactoside transacétylase. Les trois gènes (respectivement appelés *lac z*, *lac y* et *lac a*) codant pour ces trois enzymes appartiennent à l'opéron lactose (figure VI.6).

- En amont de l'opéron lactose, il existe un gène régulateur (*lac I*) qui code pour un répresseur capable de se fixer sur l'opérateur en absence de lactose. Dans ce cas l'ARN polymérase est bloquée et les gènes ne sont donc pas transcrits.
- En présence de lactose, le répresseur fixe le lactose et devient alors incapable de se fixer sur l'opérateur : l'ARNm polycistronique est synthétisé par l'ARN polymérase puis traduit.

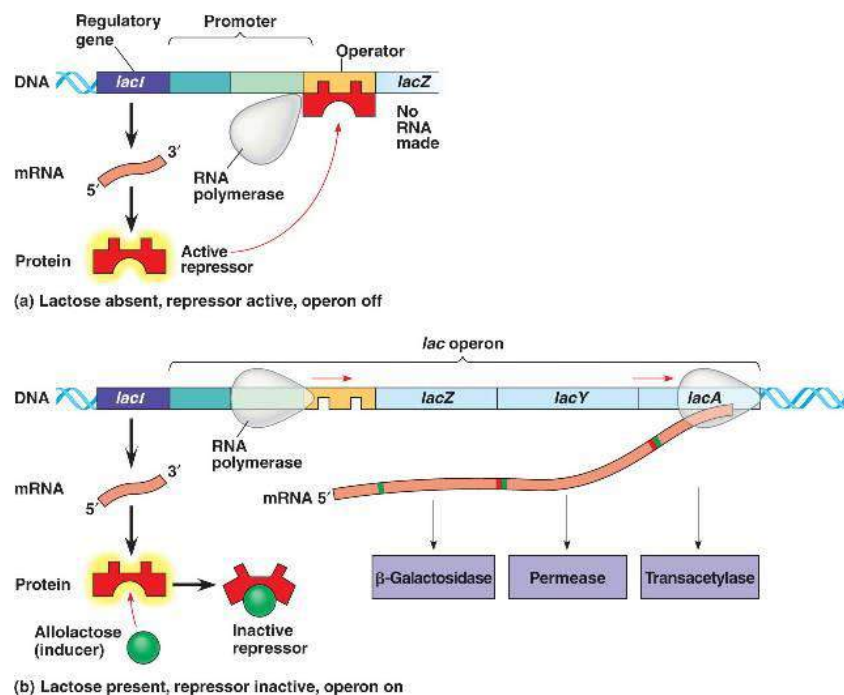


Figure VI.6 : L'opéron lactose.

### 1.3.2. Systèmes répressibles : exemple de l'opéron tryptophane

Lorsqu'une souche prototrophe d'*E. coli* est cultivée dans un milieu minimum, elle fabrique tous ses constituants organiques à partir de la seule source de carbone disponible. Si du tryptophane est ajouté à ce milieu minimum, la cellule cesse de fabriquer les enzymes qui interviennent dans la synthèse de cet acide aminé. Les gènes codant pour ces enzymes font

partie de l'opéron tryptophane. Un gène régulateur commande la synthèse d'un répresseur inactif qui n'est capable de se fixer sur l'opérateur qu'en présence de tryptophane, qui constitue le corépresseur. La présence du complexe répresseur – corépresseur sur l'opérateur empêche la transcription des gènes intervenant dans la biosynthèse du tryptophane.

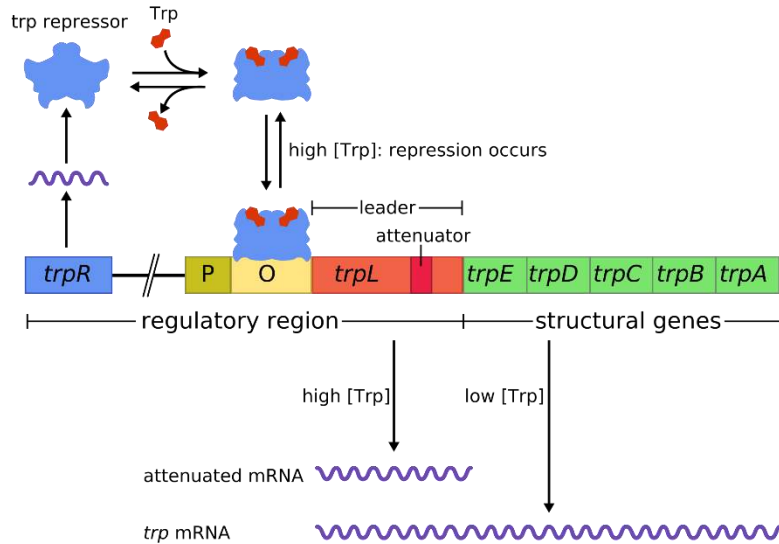


Figure VI.7 : L'opéron tryptophane.

## 2. La variabilité génétique des bactéries

### 2.1. Mutations

Lorsque l'enchaînement des nucléotides au sein de l'ADN est modifié, les séquences des gènes peuvent varier : ce sont les mutations. Ces modifications sont stables et héréditaires, et elles peuvent s'accompagner ou non de modifications phénotypiques. Les mutations spontanées apparaissent occasionnellement dans n'importe quelle cellule : elles résultent d'erreurs dans la réplication de l'ADN ou de lésions de l'ADN. Il existe différents types de mutations (figure VI.8) :

- **les substitutions :**
  - Une **transition** est un remplacement d'une purine par une autre purine ( $A \leftrightarrow G$ ) ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine ( $C \leftrightarrow T$ ) ;
  - Une **transversion** est un remplacement d'une purine par une pyrimidine (ou l'inverse).
- **L'addition ou la délétion** d'un ou plusieurs nucléotides entraîne un décalage du cadre de lecture. Ces mutations se produisent souvent lorsqu'une courte séquence nucléotidique est répétée.

Les erreurs commises lors de la réplication sont souvent corrigées par différents mécanismes (correction d'épreuve, réparation par excision-resynthèse, réparation par recombinaison, réparation « SOS »)

Le taux de mutation peut être nettement augmenté en utilisant des agents mutagènes (substances ou rayonnements qui altèrent directement l'ADN ou interfèrent avec ses mécanismes de réparation). Par exemple, les rayons X et ultra-violets sont de puissants agents mutagènes. A 260 nm (longueur d'onde d'absorption maximale de l'ADN), les bactéries sont en majorité tuées, tandis que les rares survivantes sont souvent des mutantes. La modification

chimique la plus fréquente dans ce cas est la formation de dimères de thymine lorsqu'elles sont adjacentes.

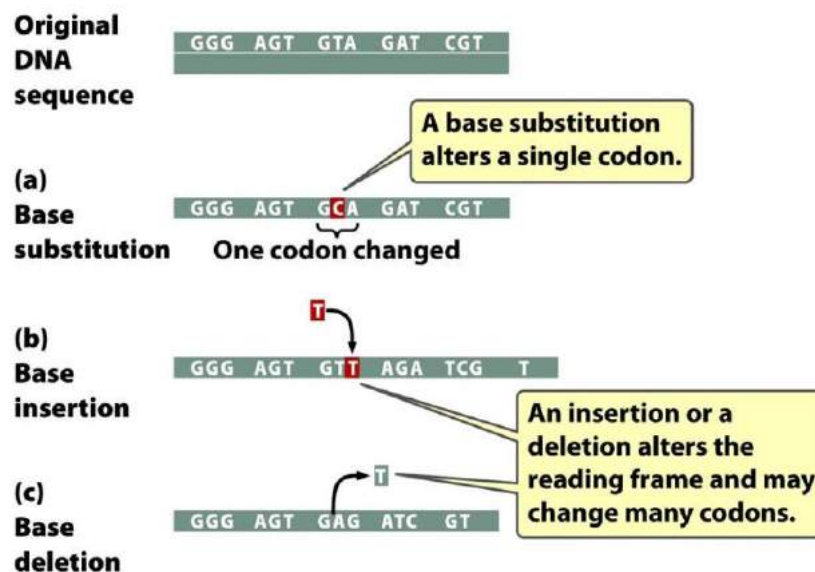


Figure VI.8 : Exemples de mutations.

## 2.2. Conséquences phénotypiques des mutations

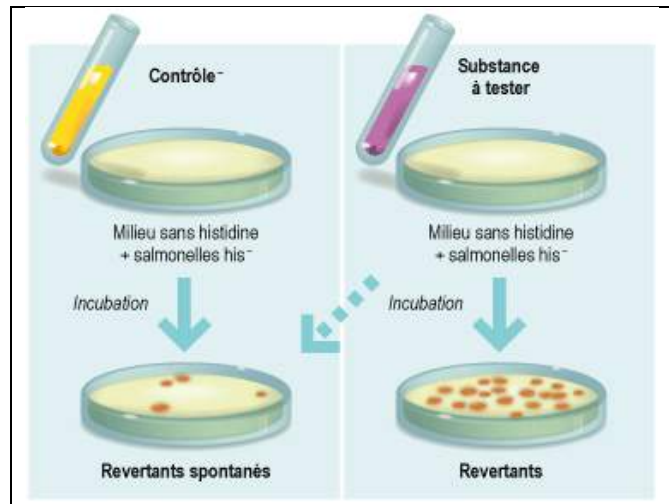
Les mutations sont soit silencieuses, soit elles modifient le phénotype du micro-organisme mutant.

- Les **mutations morphologiques** changent la forme ou la couleur de la colonie issue d'une cellule mutante (exemple : variation type «S» type «R» due à une mutation affectant un gène de synthèse du LPS, au niveau de la chaîne latérale O). Ces mutations peuvent également affecter les flagelles, la spore (chez *B. anthracis*, il existe des mutants asporogènes).

- Certains mutants peuvent acquérir une **résistance à un agent antimicrobien**, tel qu'un antibiotique. Si la cible de l'antibiotique est une enzyme, la mutation au niveau du gène codant pour cette enzyme peut entraîner une diminution voire une suppression de l'affinité de l'antibiotique pour l'enzyme (modification de cible). Ce phénomène est à l'origine de la résistance des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) : une mutation entraîne un changement de structure de la PLP2 (l'enzyme « mutée » est appelée PLP2a) qui ne fixe plus l'antibiotique.

- Les **mutations biochimiques** inactivent fréquemment les voies de biosynthèse et engendrent des mutants auxotrophes, incapables de se développer sur un milieu minimum. Il existe également des mutations réverses, restaurant le type sauvage prototrophe (application : test de Ames, voir figure VI.9).

Le test d'Ames consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Les souches utilisées dans le test sont des souches porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation His<sup>-</sup> rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations reversent spontanément vers His<sup>+</sup> et donc les cellules retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries His<sup>-</sup> à des agents mutagènes.

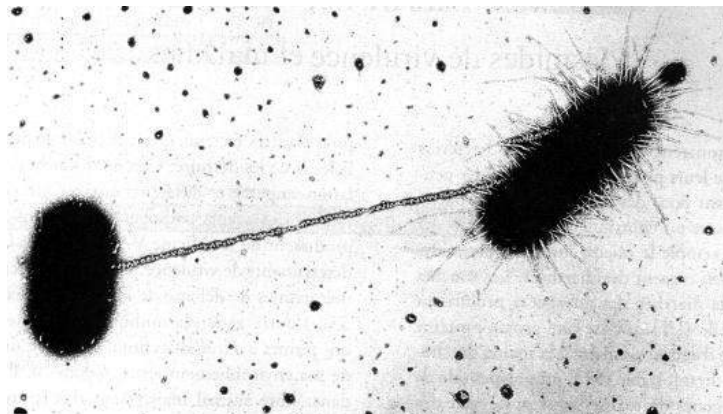


**Figure VI.9 :** Le test d'Ames.

### 3. Les transferts génétiques

#### 3.1. Conjugaison

La conjugaison est un mécanisme de transfert unidirectionnel de matériel génétique par contact entre deux bactéries « sexuellement » différenciée : une donatrice « mâle » et une réceptrice « femelle » (figure VI.10).



**Figure VI.10 :** Transfert génétique par conjugaison.

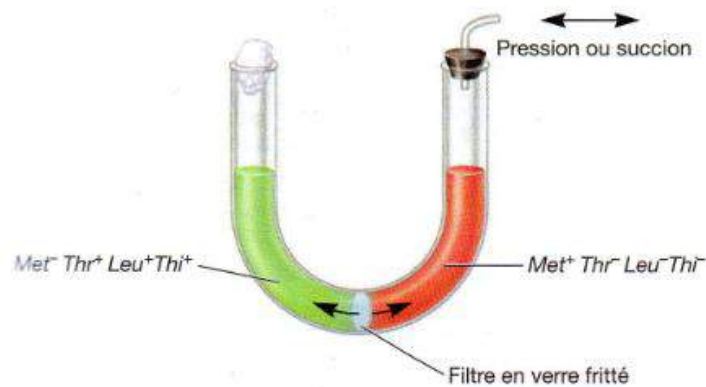
##### 3.1.1. Mise en évidence

La preuve initiale de la conjugaison bactérienne vint de l'expérience effectuée par Joshua Lederberg et Edward Tatum en 1946. Ils mélangèrent deux souches d'*Escherichia coli* auxotrophes pour plusieurs facteurs de croissance (tableau VI.1). Ces souches « triples auxotrophes » sont incapables de se développer sur milieu minimum. Par contre, si on incube un mélange de ces deux souches pendant plusieurs heures dans un milieu nutritif, et qu'on les transfère ensuite sur un milieu minimum, des colonies prototrophes apparaissent après incubation. Les bactéries formant ces colonies sont donc Biotine +, Phe +, Cys +, Thr +, Leu + et Thiamine +. Ces bactéries sont dites recombinantes car il y a obligatoirement eu transfert d'information génétique entre les deux souches initiales.

**Tableau VI.1 :** Les souches auxotrophes utilisées par Lederberg et Tatum.

Facteur de croissance	SOUCHE 1	SOUCHE 2
Biotine	–	+
Phénylalanine	–	+
Cystéine	–	+
Thréonine	+	–
Leucine	+	–
Thiamine	+	–

Lederberg et Tatum n'avaient pas directement prouvé que le contact physique des cellules était nécessaire pour le transfert de gènes. Ceci fut démontré par Bernard Davis (1950) qui construisit un tube en U, fait de deux tubes de verre coudés soudés à la base pour former le U, avec un verre fritté entre les deux moitiés. Le filtre permet le passage du milieu, mais pas des bactéries. Davis remplit le tube en U de milieux nutritifs et inocula chaque branche avec une souche auxotrophe différente d'*E. coli* (figure VI.11). Davis constata que lorsque les deux souches auxotrophes étaient séparées l'une de l'autre par le mince filtre, le transfert de gènes ne pouvait avoir lieu. Par conséquent, un contact direct était requis pour la recombinaison.



**Figure VI.11 :** L'expérience du tube en U.

### 3.1.2. Croisement $F^+$ x $F^-$

En 1952, William Hayes démontra que le transfert de gènes observé par Lederberg et Tatum s'effectuait dans un sens déterminé. C'est-à-dire qu'il existait des souches définies, des donneuses ( $F^+$  ou fertiles) et des receveuses ( $F^-$  ou non fertiles), et que le transfert de gènes n'était pas réciproque. Il démontra également que dans un croisement  $F^+$  x  $F^-$ , les descendants n'étaient que rarement modifiés dans leur auxotrophie (c'est-à-dire que les gènes bactériens n'étaient pas souvent transférés), mais les souches  $F^-$  devenaient fréquemment  $F^+$ .

La souche  $F^+$  contient un facteur F extrachromosomique qui porte les gènes pour la formation du pilus sexuel et pour le transfert du plasmide (figure VI.12). Le pilus sexuel sert à établir le contact entre les cellules  $F^+$  et  $F^-$ . Dès que le contact est établi, le pilus se contracte et met les cellules en étroit contact physique. La cellule  $F^+$  prépare alors le transfert d'ADN, le facteur F se réplique ; La répllication est initiée par un complexe de protéines appelé le



relaxosome, qui coupe un brin du facteur F au site *oriT* (pour *origin of transfer*). La relaxase, une enzyme associée au relaxosome, reste attachée à l'extrémité 5' du brin coupé. Quand le facteur F se réplique, le brin déplacé et la relaxase qui y est attachée migrent vers la cellule receveuse. Le brin entrant est copié pour donner un ADN double brin (figure VI.13). La fréquence de recombinaison est faible parce que les gènes chromosomiques sont rarement transférés avec le facteur F indépendant.

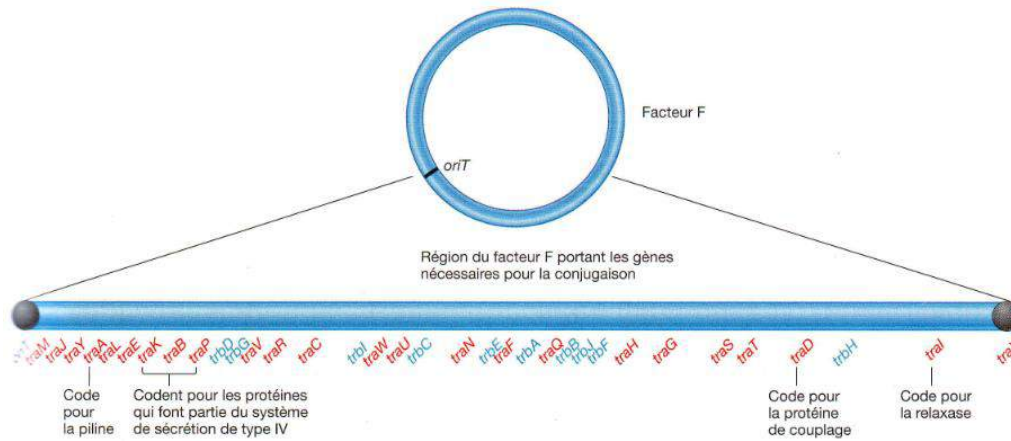


Figure VI.12 : Le plasmide F.

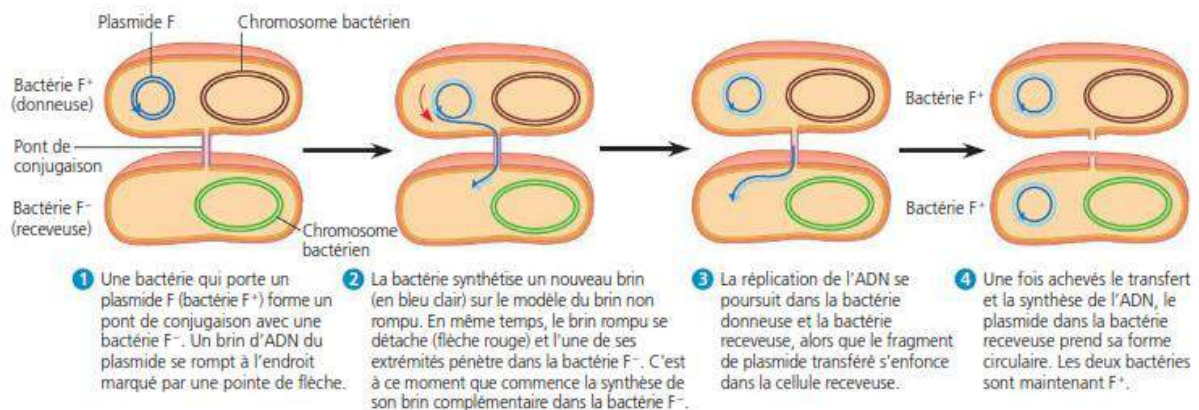
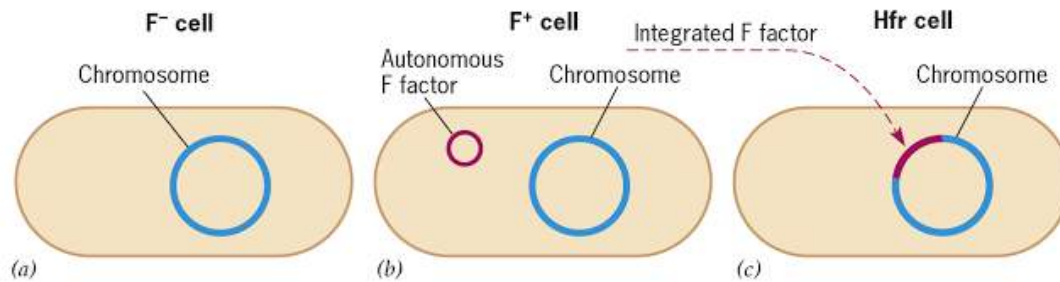


Figure VI.13 : conjugaison et transfert d'un plasmide F.

### 3.1.3. Souches Hfr

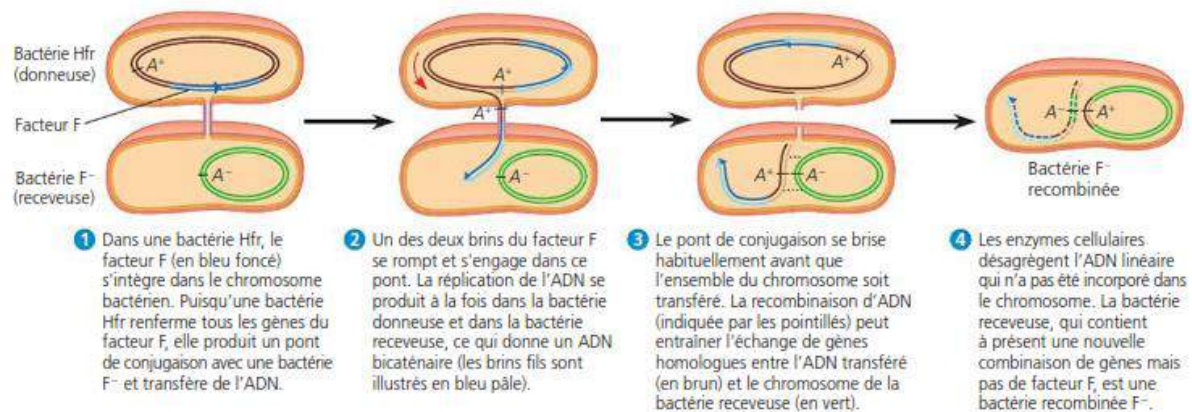
Un second type de conjugaison dû au facteur F fut a été découvert. Dans ce type de conjugaison, le donneur transfère des gènes chromosomiques avec une grande efficacité, mais ne transforme pas les bactéries receveuses en cellules  $F^+$ . À cause de la haute fréquence de recombinants produits par ce croisement, on parle de **conjugaison Hfr** et le donneur est dit de **souche Hfr**. Les souches Hfr contiennent le facteur F intégré dans leur chromosome plutôt que libre dans le cytoplasme (figure VI.14).



**Figure VI.14 :** Le Facteur F chez *E. coli*.

Lorsque le plasmide F est intégré, son opéron *tra* reste fonctionnel. Le plasmide peut diriger la synthèse de pili, effectuer la réplication par cercle roulant et transférer du matériel génétique dans une cellule  $F^-$  receveuse. Cependant, au lieu de se transférer lui-même, le facteur F dirige le transfert du chromosome de l'hôte. Le transfert de l'ADN commence par la coupure du facteur F intégré, à son site d'origine de transfert. Tout en se répliquant, le chromosome migre vers le receveur (figure VI.15). Comme le facteur F n'est transféré qu'en partie, le receveur  $F^-$  ne deviendra pas  $F^+$ , sauf si le chromosome est transféré en entier. Le transfert du chromosome entier plus le facteur F intégré demande environ 100 minutes chez *E. coli*, et la connection entre les cellules se rompt habituellement avant la fin du processus. Donc généralement, il n'y a pas transfert d'un facteur F complet et le receveur reste  $F^-$ .

Lorsqu'une souche Hfr participe à la conjugaison, des gènes bactériens sont fréquemment transférés au receveur. Ce transfert de gènes du chromosome circulaire peut se faire dans le sens horlogique ou antihorlogique, selon l'orientation du facteur F intégré. Quand le chromosome répliqué du donneur est entré dans la cellule receveuse, il peut être dégradé ou incorporé dans le génome  $F^-$  par recombinaison.



**Figure VI.15 :** Conjugaison et transfert d'une partie d'un chromosome d'une bactérie Hfr entraînant une recombinaison.

### 3.1.4. La conjugaison $F'$

Comme le plasmide F est un épisome, il peut quitter le chromosome bactérien et reprendre son statut autonome de facteur F. Au cours de ce processus, il arrive que le plasmide fasse une erreur d'excision et emporte une portion du chromosome. Il devient donc génétiquement distinct du facteur F original et on l'appelle des lors le plasmide  $F'$  (figure

VI.16). Il n'est pas rare d'observer l'inclusion d'un ou de plusieurs gènes chromosomiques dans des plasmides F excisés. Une cellule contenant un plasmide F' conserve tous ses gènes, bien que certains soient portés par le plasmide. Elle ne peut se croiser qu'avec une receveuse F<sup>-</sup>. La conjugaison F' x F<sup>-</sup> est similaire au croisement F<sup>+</sup> x F<sup>-</sup>. Ici aussi, le plasmide est transféré tout en étant copié par une répllication en cercle roulant. Cependant, les gènes bactériens du chromosome ne sont habituellement pas transmis.

Les gènes bactériens du plasmide F' sont transférés avec celui-ci et n'ont pas besoin pour être exprimés, d'être incorporés dans le chromosome receveur. La cellule receveuse devient F' et c'est un mérozygote partiellement diploïde, puisque les gènes bactériens présents sur le plasmide F' se trouvent aussi sur son propre chromosome. De cette manière, des gènes bactériens spécifiques peuvent se répandre rapidement dans une population bactérienne.

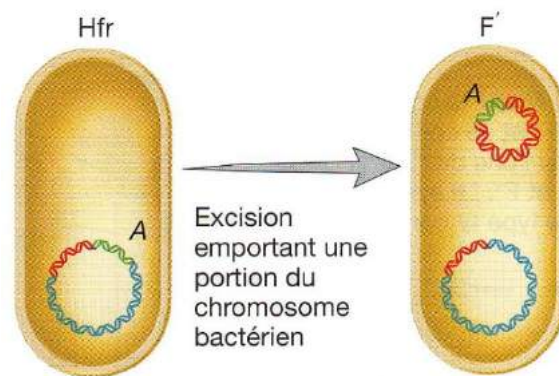


Figure VI.16 : La conjugaison F'.

### 3.2 Transformation

Le second moyen pour l'ADN de migrer d'une bactérie à l'autre est la **transformation**, découverte par Fred Griffith en 1928. La transformation est l'absorption par la cellule d'une molécule ou d'un fragment d'ADN nu, présent dans le milieu, et son incorporation dans le chromosome receveur sous une forme héréditairement stable. Dans la transformation naturelle, l'ADN vient d'une bactérie donneuse. Ce processus est aléatoire et toute portion du génome peut être transférée entre bactéries.

Lorsque les bactéries se lysent, elles libèrent des quantités considérables d'ADN dans le milieu environnant. Ces fragments peuvent être relativement grands et contenir plusieurs gènes. Si un fragment entre en contact avec une cellule compétente, capable d'absorber l'ADN et d'être transformée, il peut se fixer à la cellule et y pénétrer (figure VI.17). La compétence est un phénomène complexe qui dépend de plusieurs conditions. Les bactéries doivent avoir atteint un certain stade de croissance ; par exemple, *Streptococcus pneumoniae* devient compétent au cours de la phase exponentielle, lorsque la population atteint 10<sup>7</sup> à 10<sup>8</sup> cellules par ml. Quand une population devient compétente, les bactéries comme *S. pneumoniae* sécrètent une petite protéine, appelée **facteur de compétence**, qui stimule la production de 8 à 10 nouvelles protéines requises pour la transformation.

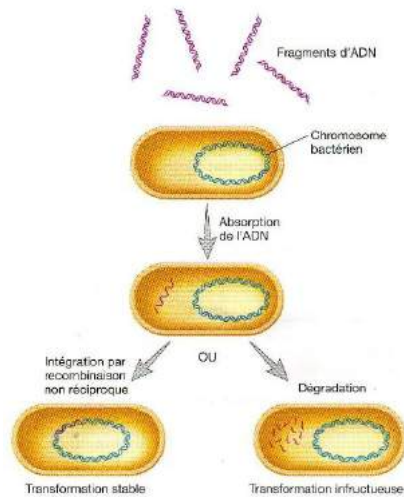


Figure VI.17 : Transformation par des fragments d'ADN.

Le mécanisme de transformation a été fort étudié chez *S. pneumoniae* (figure VI.18). Une cellule compétente lie un fragment d'ADN double brin, s'il n'est pas trop grand. Le processus se fait au hasard, les fragments donneurs sont en compétition entre eux. L'ADN est alors clivé par des endonucléases, en fragments double brin d'environ 5 à 15 kilobases. L'absorption d'ADN requiert une dépense d'énergie. Un brin est hydrolysé par une exonucléase associée à l'enveloppe ; l'autre brin s'associe avec de petites protéines et passe à travers la membrane cytoplasmique. Le fragment simple brin peut alors s'aligner avec une région homologue du génome et être intégré.

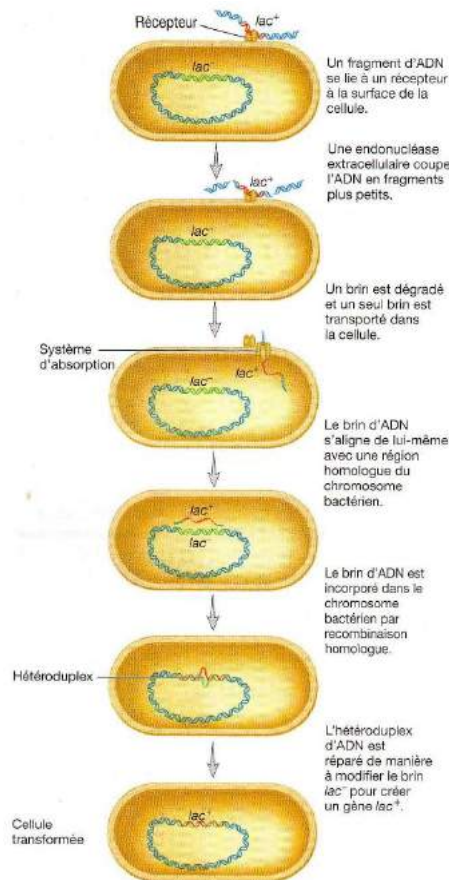


Figure VI.18 : La transformation bactérienne chez *S. pneumonia*

### 3.3. Transduction

La transduction est le transfert de gènes bactériens par l'intermédiaire de virus. Les gènes bactériens sont incorporés dans une capsid de phage, suite à des erreurs commises durant le cycle biologique du virus. Le virus qui contient ces gènes les injecte alors dans une autre bactérie, complétant le transfert. Il y a deux types différents de transduction : la transduction généralisée et la transduction spécialisée.

#### 3.3.1. La multiplication virale

Les virus sont de structure simple, souvent composés seulement d'un génome d'acide nucléique, protégé par un manteau protéique appelé capsid. Us sont incapables de se répliquer de façon autonome. Aussi infectent-ils et prennent-ils le contrôle d'une cellule hôte, la forçant à fabriquer de nombreuses copies virales. Les virus qui infectent les bactéries sont appelés bactériophages ou phages. Certains phages sont répliqués par leur hôte bactérien immédiatement après leur entrée. Lorsque les phages répliqués atteignent un certain nombre, ils provoquent la lyse de l'hôte. Ils sont ainsi libérés et peuvent infecter de nouvelles cellules hôtes (figure IV.19). Ce sont les bactériophages virulents et le processus s'appelle le **cycle lytique**.

D'autres bactériophages ne tuent pas immédiatement leur hôte. Nombre de ces virus entrent dans la bactérie hôte et au lieu de se répliquer, insèrent leurs génomes dans le chromosome bactérien. Une fois inséré, le génome viral est appelé prophage. Cela n'endommage pas la bactérie hôte, et le génome du phage est répliqué passivement en même temps que le génome de la cellule hôte. Ces bactériophages sont dits tempérés et la relation qui s'établit entre ces virus et leur hôte s'appelle la lysogénie. Les bactéries qui ont été lysogénisées sont dites lysogènes. Les phages tempérés peuvent rester dans leur hôte pendant de nombreuses générations. Cependant, ils peuvent être induits à basculer vers un cycle lytique dans certaines conditions, notamment par une irradiation aux UV. Lorsque ceci se produit, le prophage est excisé du génome bactérien et le cycle lytique se met en route.

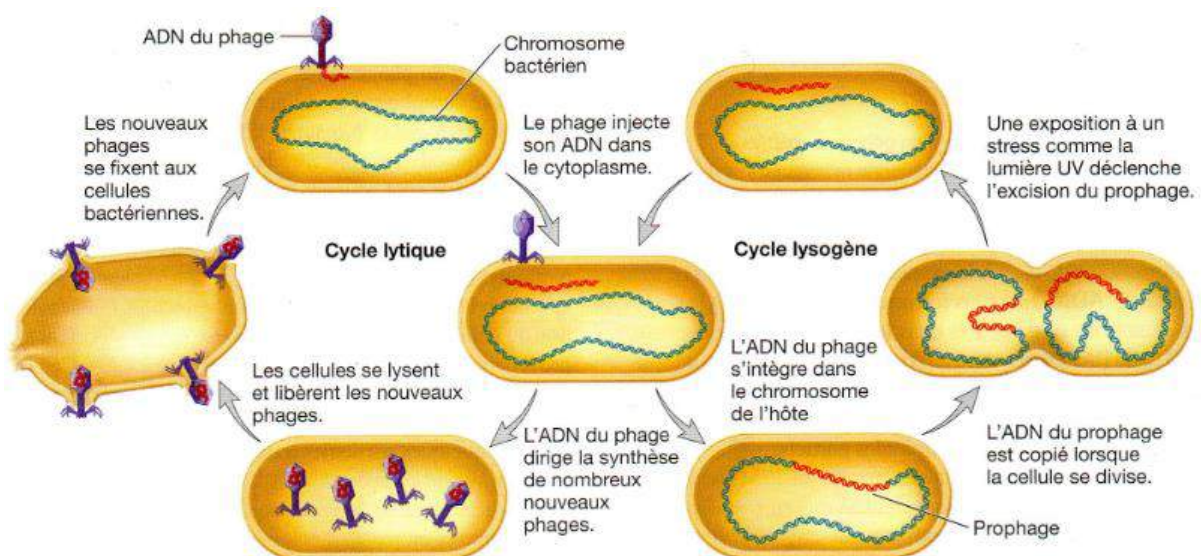


Figure VI.19 : Les cycles lytique et lysogène des phages tempérés.

### 3.3.2. La transduction généralisée

La transduction généralisée a lieu au cours du cycle lytique d'un phage virulent et de certains phages tempérés. Elle peut transférer n'importe quelle partie du génome bactérien (figure IV.20). Pendant le stade d'assemblage, lorsque les chromosomes viraux sont empaquetés dans les capsides protéiques, des fragments aléatoires du chromosome bactérien partiellement dégradé peuvent aussi être empaquetés, par erreur. Comme la capside ne peut contenir qu'une quantité limitée d'ADN, l'ADN viral est abandonné. La quantité d'ADN bactérien transporté dépend principalement de la taille de la capside. Le phage P22 de *Salmonella enterica* véhicule habituellement 1 % environ du génome bactérien. Le phage PI d'*E. coli* et de diverses bactéries Gram-négatives emporte de 2 à 2,5 % du génome. La particule virale résultante injecte son ADN dans une autre cellule bactérienne, mais ne peut pas initier de cycle lytique. Ce phage constitue une particule (ou phage) de transduction généralisée et est un simple transporteur d'information génétique de la première bactérie vers une autre. Tout comme au cours de la transformation stable, l'ADN injecté doit être intégré dans le chromosome de la cellule receveuse, afin de préserver les gènes transférés. L'ADN reste sous forme double brin durant le transfert et les deux brins sont intégrés dans le génome de l'endogote.

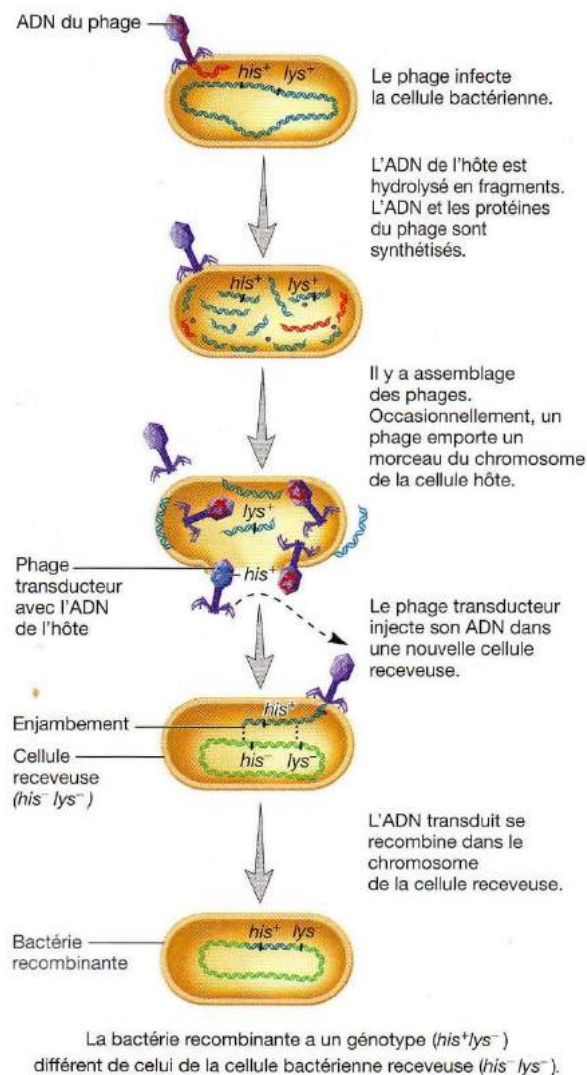


Figure VI.20 : La transduction généralisée chez les bactéries.

### 3.3.3. La transduction spécialisée

Dans la transduction spécialisée, la particule transductrice ne porte que certaines parties spécifiques du génome bactérien. La transduction spécialisée résulte d'une erreur dans le cycle lysogène des phages qui insèrent leur génome à un site spécifique du chromosome de l'hôte. Quand un prophage est induit et quitte le chromosome de l'hôte, l'excision se fait parfois de façon incorrecte. Le génome du phage qui en résulte contient des portions du chromosome bactérien (de 5 à 10 % de l'ADN bactérien) voisines du site d'intégration. Un génome de phage transducteur est habituellement défectif et manque d'une partie de son site d'attachement. La particule transductrice injectera les gènes bactériens dans une autre bactérie, même si le phage défectif ne peut se reproduire sans assistance. Dans les circonstances appropriées, les gènes bactériens sont intégrés de manière stable. L'exemple de transduction spécialisée le mieux étudié est le fait du phage lambda d'*E. coli*. Le génome de lambda s'insère dans le chromosome de l'hôte à des endroits spécifiques, les **sites d'attachement** ou *att* (figure VI.21). Les sites *att* du phage et les sites *att* bactériens sont similaires et peuvent se complexer l'un à l'autre. Le site *att* pour lambda est proche des gènes *gal* et *bio* sur le chromosome d'*E. coli*. En conséquence, quand les phages lambda font de la transduction spécialisée, ce sont souvent ces gènes bactériens-là qu'ils emportent. Le lysat, ou produit de la lyse cellulaire qui résulte de l'induction d'*E. coli* lysogène, contient des phages normaux et quelques particules transductrices détectives. Ces particules sont appelées soit lambda *dgal*, parce qu'elles contiennent les gènes de l'utilisation du galactose, ou lambda *dbio*, parce qu'elles portent le gène *bio* provenant de l'autre côté du site *att*. Ces lysats sont souvent appelés lysats transducteurs à basse fréquence (lysats LFT pour *Low Frequency Transduction*), parce qu'ils ne contiennent que quelques particules transductrices. Alors que le phage normal a un site *att* complet, les particules transductrices défectives ont un site d'intégration hybride non fonctionnel, en partie d'origine bactérienne et en partie d'origine virale. L'intégration du chromosome du phage défectif ne s'effectue pas facilement. Les phages transducteurs peuvent aussi avoir perdu certains gènes essentiels à leur reproduction. Des transduits stables ne peuvent apparaître que s'il se produit un double enjambement de part et d'autre du site *gal*.

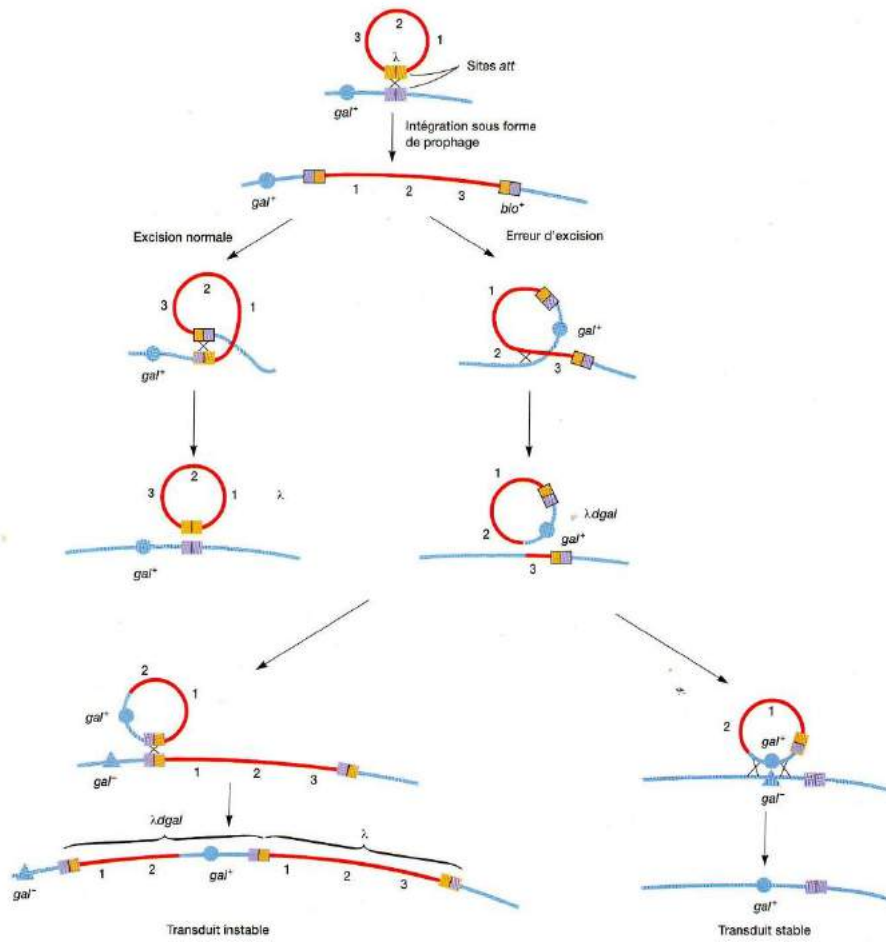


Figure VI.21 : Le mécanisme de transduction par le phage lambda chez *E. coli*.



# Chapitre 7 : ELEMENTS DE VIROLOGIE

## INTRODUCTION

Les virus se distinguent fondamentalement des autres micro-organismes. Ils ne possèdent pas de métabolisme propre et ne se multiplient ni par croissance ni par division, mais sont élaborés à partir de l'assemblage de leurs constituants dans la cellule infectée. Les virus mènent pour ainsi dire une double vie, selon leur position, à l'intérieur ou à l'extérieur d'une cellule hôte. Ils apparaissent ainsi sous au moins deux formes. À l'intérieur d'une cellule, le virus réalise son programme génétique ; en dehors de la cellule hôte, le virus existe en tant que particule virale stable aussi dénommée virion.

### 1. Structure des virus

Une particule virale est un élément inerte composé d'un acide nucléique, de protéines et pour certains virus, d'une enveloppe et d'autres composés Tableau VII.1.

Tableau VII.1 : Composition d'une particule virale (virion).

Constituants	Composition chimique	Présence
Matériel génétique	<ul style="list-style-type: none"><li>• Acide nucléique</li><li>• ADN ou ARN</li><li>• Mono ou double brin</li><li>• Un ou plusieurs éléments (segmentés)</li><li>• Linéaire ou circulaire</li></ul>	Obligatoire
Éléments structurels	<ul style="list-style-type: none"><li>• Protéines</li><li>• Lipides</li><li>• Hydrates de carbone</li></ul>	Facultative, le plus souvent présents
Éléments fonctionnels (enzymes)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Protéines</li><li>• Glycoprotéines</li></ul>	Facultative

### 1.1 Génome

#### 1.1.1 Les virus à ADN

Les virus à ADN sont génétiquement stables et possèdent (comme par exemple les Herpesvirus et le virus de la variole) souvent de grands génomes comprenant une quantité considérable d'informations génétiques. La majorité des virus à ADN sont à double brin (ds, pour *double strand*) et se présentent sous une forme de filament linéaire avec des extrémités définies, ou sous forme d'anneau (circulaire).

#### 1.1.2 Les virus à ARN

Les virus à ARN possèdent, en règle générale, un génome à un brin (ss, pour *single strand*), sujet à une fréquence de mutation élevée car les ARN polymérases n'ont pas les fonctions de correction d'erreurs des ADN polymérases. La taille du génome et son équipement génétique sont ainsi limités. Par contre, les virus à ARN, grâce à la mutation et à la sélection, ont une grande capacité d'adaptation. Des virus à ARN double brin existent mais restent des exceptions.

Les virus à ARN simple brin sont divisés en deux classes, en fonction de la polarité de leur génome. Les virus à ARN simple brin positif [virus (+) ssARN] possèdent un génome ARN à polarité positive, contenant les séquences codantes et servant directement d'ARN messenger (ARNm). Les virus à ARN simple brin négatif [virus (-) ssARN] portent un ARN non codant,

de polarité négative. Ce brin négatif doit d'abord être transcrit en ARNm à brin positif complémentaire, dans la cellule infectée, avant qu'ait lieu une synthèse protéique. Ceci est réalisé par une ARN polymérase dépendante de l'ARN, propre au virus, présente dans la particule virale, et qui est introduite dans la cellule hôte.

## 1.2. Capside

La capside est constituée de protéines virales et englobe l'acide nucléique génomique. La capside se compose de sous-unités appelées capsomères. Les capsomères pour leur part sont constitués d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques codées par le virus. La capside et l'acide nucléique sont en relation plus ou moins étroite. Chez beaucoup de virus, la capside entoure le génome comme un manteau de protéine. Chez d'autres virus, il existe une liaison intime entre l'acide nucléique et les protéines de la capside. Dans ce cas, les deux entités sont regroupées sous le nom de **nucléocapside**.

Les capsides de nucléocapsides sont organisées selon des plans de construction stricts (Figure VII.1). La plupart des virus ont une structure générale **hélicoïdale** ou **icosaédrique**, d'autre comme les bactériophages ont des symétries plus complexes. Ces derniers possèdent une structure de tête qui est un icosaèdre allongé. Un collier relie cette tête à un tube creux avec une symétrie hélicoïdale se terminant par une plaque de base complexe, avec des fibres. Certains virus à enveloppe, comme celui de la grippe, sont polymorphes et n'ont pas de symétrie particulière.

La capside virale remplit des fonctions essentielles. Parmi celles-ci, on trouve la protection de l'acide nucléique génomique contre les influences de l'environnement, et des étapes importantes dans l'infection de la cellule hôte. Les protéines de la capside déterminent, chez les virus sans enveloppe, la spécificité de l'hôte et le tropisme cellulaire. Elles portent des déterminants antigéniques qui sont importants pour la protection immunitaire et la classification antigénique des virus (sérotypes).

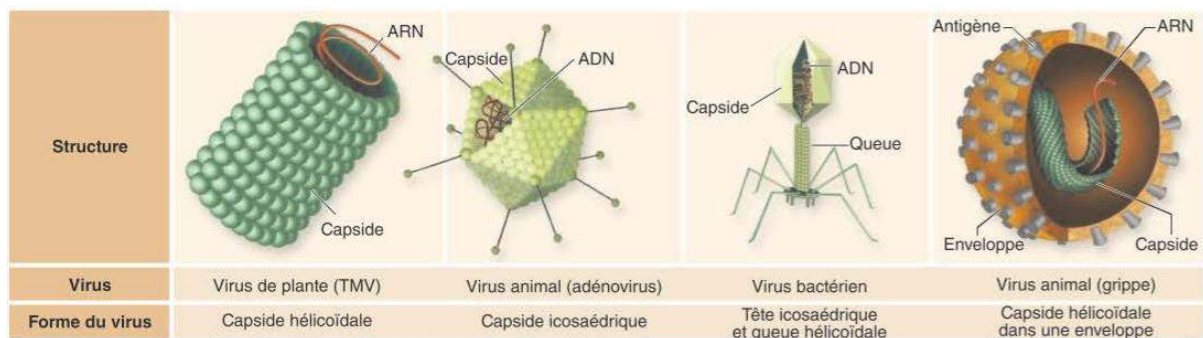


Figure VII.1 : Structure des virions.

## 1.3. Enveloppe

La capside de certains virus est entourée d'une enveloppe. Elle provient soit de la membrane plasmique de la cellule hôte, soit de membranes intracellulaires, essentiellement de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique. L'enveloppe porte des glycoprotéines virales qui, lors de l'infection, sont sélectivement incorporées dans les membranes cellulaires correspondantes et qui sont responsables, par la suite, de l'amarrage du virus à sa cellule cible et de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire de l'hôte. Les glycoprotéines membranaires de l'enveloppe virale servent de point d'attaque aux anticorps neutralisants et sont soumises à une forte pression de sélection de la part du système immunitaire. Les virus enveloppés sont sensibles aux influences extérieures comme la dessiccation et la chaleur. Ceci a une influence sur les voies de transmissions. Les virus nus sont, en règle générale, plus résistants que les virus enveloppés.

## 1.4 Autres composants

Selon le type de virus, d'autres structures protéiques sont présentes dans le virion, qui favorisent l'infection de la cellule hôte ou la rendent seulement possible. Des exemples sont constitués par les ARN polymérase ARN dépendantes des virus ARN à simple brin négatif, la transcriptase reverse des rétrovirus ou les protéines de tégument des Herpesvirus. À ceci s'ajoutent, chez certains virus, des éléments supplémentaires de la cellule hôte comme les ARNt des rétrovirus, qui jouent un rôle important dans la rétrotranscription.

## 1.5 Taille

En pratique, les virus sont communément définis comme des « agents filtrants », c'est-à-dire comme des agents infectieux capables de passer à travers d'un filtre de 500 nm. Une comparaison des tailles de différents virus est rapportée dans la figure VII.2. Des virus exceptionnellement grands ont été récemment mis en évidence, notamment les mimivirus (*microbe mimicking virus*) qui est un virion de 400 nm de diamètre, avec un génome de plus de 1 Mb (mégabase, ou un million de bases). On a isolé plusieurs autres « virus géants ou Megaviridae », et le plus grand actuellement connu est le pandovirus, isolé en 2013, avec des virions de l'ordre du micromètre et un génome d'ADN de 2,5 Mb.

La taille de ces virus est suffisante pour rendre difficile la distinction entre virus et cellules, mais le génome de certains de ces virus géants possède aussi des caractéristiques encore inconnues dans les génomes viraux.

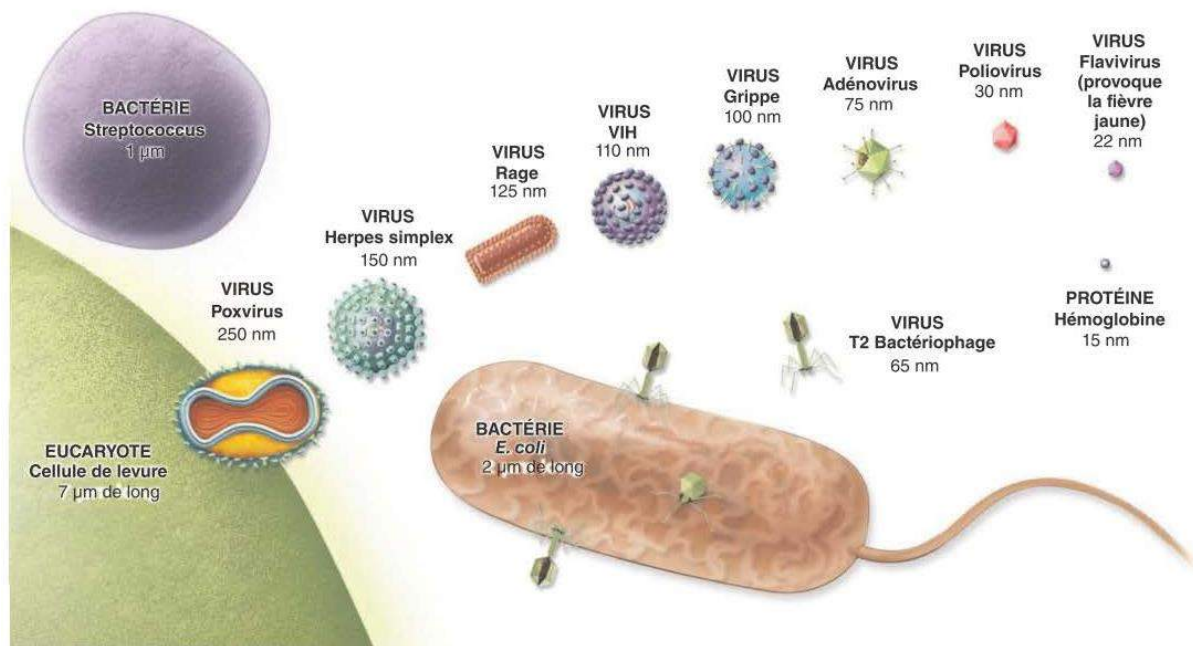


Figure VII.2 : Taille et forme de certains virus.

## 2. Classification des virus

Les premières classifications des virus se fondaient sur la nature des organismes parasités (Eucaryovirus, Bactérovirus, Archéovirus), leur mode de transmission (virus entériques, arbovirus, transmis par la voie digestive ou les arthropodes) ou la pathologie provoquée (virus de la rage, de la grippe).

Une classification proposée en 1962 par A. Lwoff, de structure linnéenne, hiérarchique et non phylogénétique utilisait quatre principaux critères : la nature de l'acide nucléique génomique, la morphologie et les dimensions de la particule virale, et la présence ou non d'une enveloppe. Adoptée en 1975 par le Comité international de taxonomie des virus (ICTV), elle a été complétée par l'ajout de nouveaux critères : maladies associées à l'infection, organismes et tissus affectés, données moléculaires, dont la séquence nucléique des génomes.

La classification actuelle met en avant ces critères moléculaires (nature [ADN/ARN], structure [double/simple brin, circulaire/ linéaire], polarité positive ou négative des génomes simple brin et processus de réplication), définissant ainsi sept groupes (Tableau VII.2). Les niveaux supérieurs (classe, phylum, domaine) n'existent pas, en raison de l'énorme difficulté à établir des liens phylogénétiques entre les virus. Cette classification utilise la nomenclature ... virales (ordre), ... viridæ (famille), ... virinæ (sous-famille), et virus pour le genre et l'espèce. Les sept groupes (ICTV 2017) répartissent les virus actuellement connus en neuf ordres, 134 familles, 455 genres et plus de 4 000 espèces. Les virus infectant les Bactéries (dont l'ordre des Caudovirales représente 96 % de ces virus) sont classés en douze familles, avec plus de 2200 génomes entièrement séquencés (bases de données virales des sites NCBI et ViralZone). Ainsi, le bactériophage T4 est classé : groupe I (virus à ADN double brin), ordre des Caudovirales, famille Myoviridæ (virus à queue contractile), sous-famille Tevenvirinæ (série T « paire »), genre T4, espèce *Escherichia virus* T4.

**Tableau VII.2 :** Caractères principaux définissant les sept groupes de classification des virus.

<b>Groupe/ Propriétés</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>
<b>Génomes :</b> type, morphologie et dimension	ADN db c/l, mp 4.5 - 2473kb	ADN sb c/l, mp/s (1 à 8) P (+)/(-) 4.5 – 12 kb	ARN db l, s (2 à 12) 3,7 – 18,2 kb	ARN sb l, s (1 à 5) P (+) 2,3 – 27,6 kb	ARN sb l, s (1 à 8) P (-) 11 – 17 kb	ARN sb c/l, mp P (+) 7 – 11 kb	ADN db l/c, mp 3,2 – 8,2 kb
<b>Réplication et transcription</b> Enzymes / Lieu	Enzymes de l'hôte N (Euc) ; C (Proc)	Enzymes de l'hôte N (réplication)	Polymérase/ transcriptase virale C	Polymérase virale C	Polymérase/ transcriptase virale C/N (épissage)	RT virale C	RT virale C
<b>Capsides</b> Morphologies Enveloppe	Icosaédrique filamenteuse complexe diverses (bâtonnet, citron, bouteille, tige)  Nenv/Env	Icosaédrique, filamenteuse géminée  NEnv	Icosaédrique  NEnv	Icosaédrique sphérique, filamenteuse  NEnv/Env	Sphérique Env filamenteuse Env flexible/rigide/ projectile Env bâtonnet NEnv  Nucléocapsides NEnv	Sphérique Env pléomorphe NEnv	Bacille NEnv sphérique Env pléomorphe Env

**Abréviations :** db/sb, double/simple brin ; c/l, circulaire/linéaire ; mp/s, monopartite/segmenté (nombre de segments) ; P, polarité positive (+)/ négative (-) ; N/C, noyau/cytoplasme ; Euc/Proc, Eucaryotes/procaryotes ; Env/NEnv, enveloppés/non enveloppés ; RT, rétro-transcriptase.

### 3. Le cycle viral

Le cycle d'infection d'une cellule par un virus peut être décomposé en trois grandes étapes (Figure VII.3) :

- L'attachement, la pénétration, et la décapsidation qui conduisent à l'internalisation du génome viral dans la cellule cible.
- L'expression des gènes et la réplication qui vont, respectivement, assurer la synthèse des protéines codées par le génome viral et permettre la multiplication de ce génome.
- L'assemblage et la sortie qui vont mener à la production et la libération de particules virales infectieuses, capables de propager l'infection à d'autres cellules.

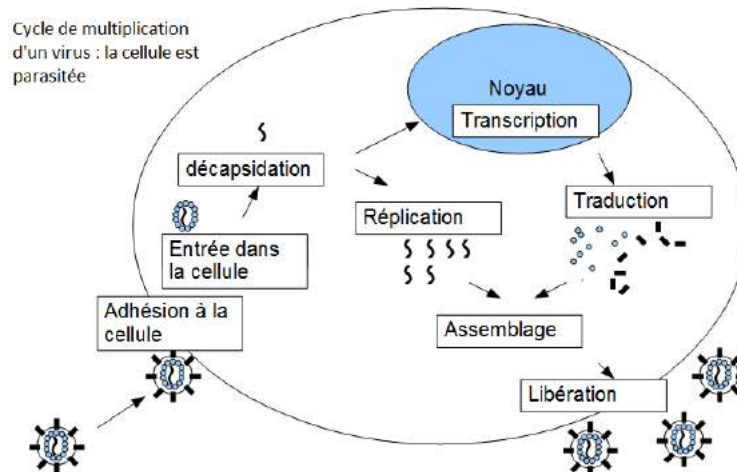


Figure VII.3 : Cycle de multiplication d'un virus.

#### 3.1. Attachement

Le cycle viral commence par l'attachement de la surface virale à la surface cellulaire. Il se fait par des protéines de la capsid pour les virus nus, par des glycoprotéines de l'enveloppe pour les virus enveloppés. Ces protéines ou glycoprotéines s'attachent à des récepteurs spécifiques situés sur la membrane cytoplasmique de la cellule hôte (Tableau VII.3).

Ce besoin de récepteurs cellulaires spécifiques pour les virus explique qu'un virus donné ne peut infecter qu'un nombre restreint d'espèces animales (tropisme d'hôte) et que certains tissus ou cellules chez celles-ci (tropisme tissulaire et cellulaire). Ainsi, les poliovirus infectent l'homme et, expérimentalement, les singes supérieurs, mais pas les rongeurs parce que les récepteurs des poliovirus se trouvent uniquement sur les cellules de primates. En revanche, le virus de la fièvre jaune, qui se multiplie chez l'homme, le singe et le moustique, a des récepteurs à la surface des cellules de ces trois espèces très différentes.

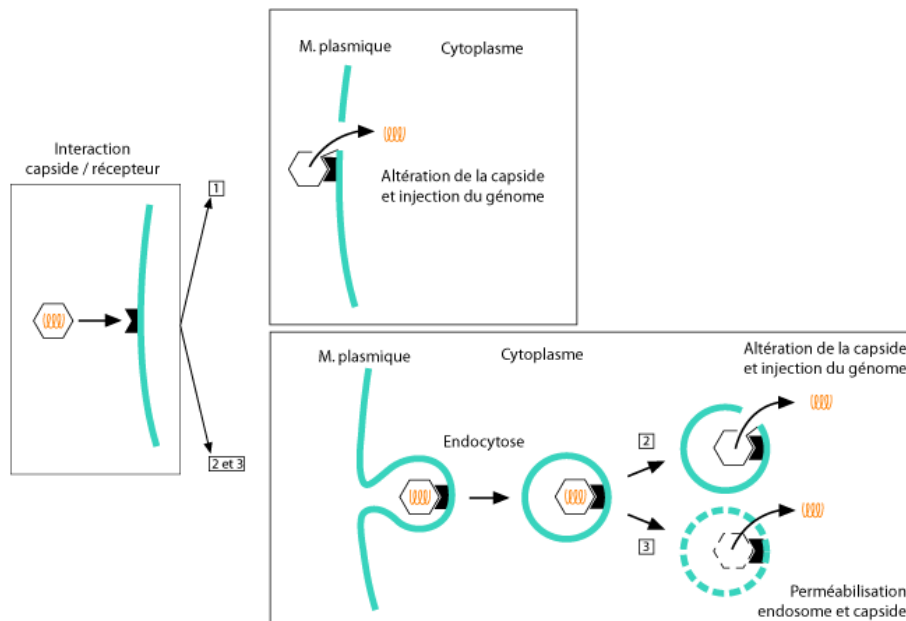
Tableau VII.3 : Fonctions cellulaires de récepteurs viraux.

Virus	Récepteur	Fonction du récepteur
VIH (virus du sida)	CD4	Protéine de surface impliquée dans l'interaction entre cellules immunitaires (lymphocytes et macrophages)
	CCR5 (co-récepteur)	Récepteur de chimiokine exprimé sur les macrophages
	CXCR4 (co-récepteur)	Récepteur de chimiokine exprimé sur les lymphocytes T
EBV (virus de Epstein-Barr)	CR2	Récepteur du complément (réponse immunitaire)
Rhinovirus	LDLR	Récepteur des lipoprotéines de faible densité
Adénovirus	CAR	Interaction homotypique entre cellules
Virus Cocksackie B		

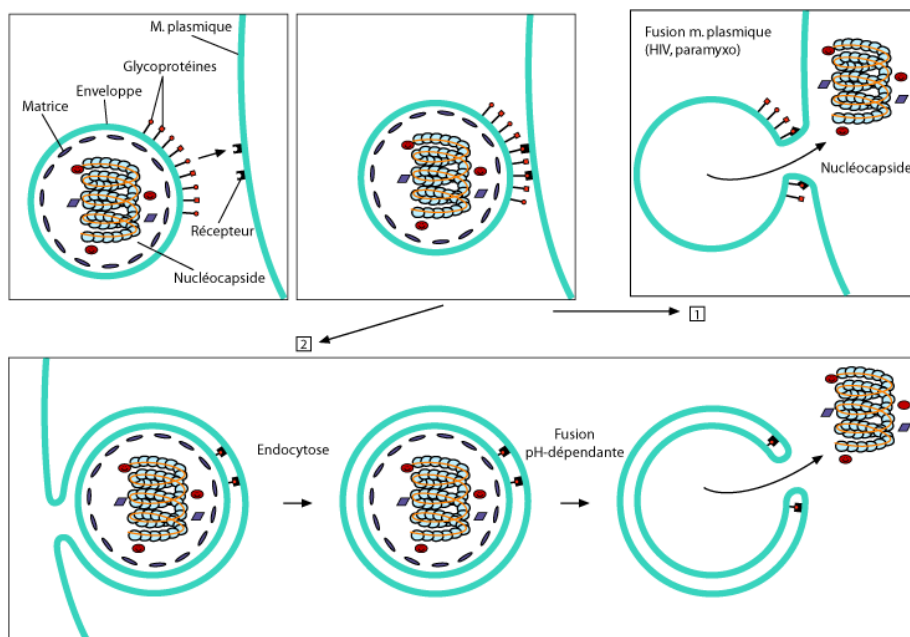
### 3.2. Pénétration

Les virus nus injectent leur génome dans le cytoplasme de la cellule. Cette étape peut se faire au niveau de la membrane plasmique, suite à l'interaction de la capside avec le récepteur. Elle peut aussi s'opérer après endocytose (Figure VII.3.a). Pour les virus enveloppés, cela s'effectue par endocytose ou directement par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cytoplasmique, processus dénommé fusion-lyse. Cette fusion-lyse conduit à la formation d'un pore qui permet le passage de la capside dans le cytoplasme. Elle résulte de l'action d'une glycoprotéine fusogène de l'enveloppe virale telle que la glycoprotéine gp41 dans le cas du HIV (Figure VII.3.b).

(a)



(b)



**Figure VII.3 :** Modalités d'entrée des virus nus (a) et des virus enveloppés (b).

### 3.3. Décapsidation

Les structures virales sont ensuite dégradées, à l'exception du génome qui, débarrassé de la capsid, se trouve libéré dans la cellule. Il est nécessaire que la capsid soit détruite, ou au moins très remaniée, pour que le génome puisse interagir avec la machinerie cellulaire.

### 3.4. Réplication

Le génome viral libéré prend la direction des synthèses dans la cellule, se substituant en totalité ou en partie au génome cellulaire. Désormais, la cellule va produire des virus. Plus précisément, elle va faire des copies (répliques) du génome viral, des protéines virales de capsid et glycoprotéines d'enveloppe pour les virus enveloppés. Le mécanisme de cette réplication virale varie selon que le génome est à ARN ou ADN (Figure VII.4). Mais, dans tous les cas, c'est par des ARN messagers viraux que les génomes viraux transmettent leur information et donnent leurs ordres à la machinerie cellulaire.

#### 3.4.1. Synthèse des ARN messagers

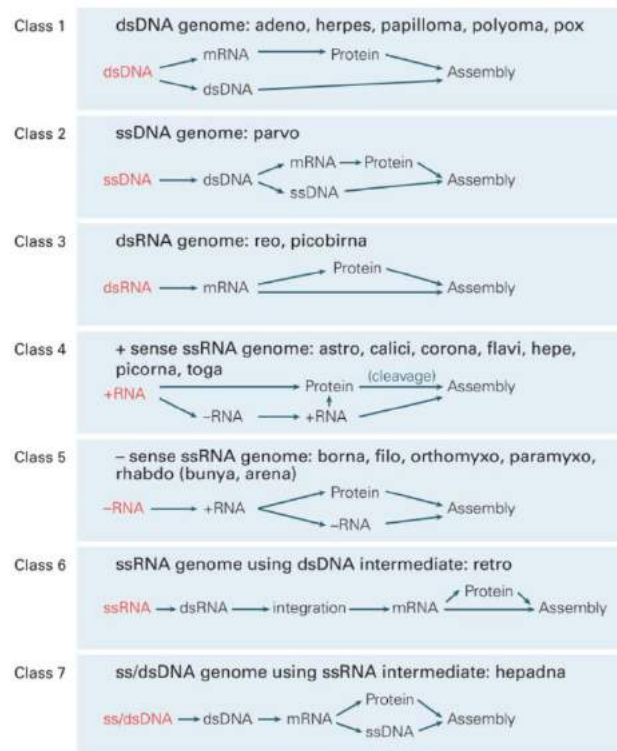
Suivant les virus, l'élaboration des messagers viraux ou transcription est une opération plus ou moins complexe. Pour les poliovirus, tout est simple : le génome est un ARN qui sert d'emblée de messager ; il est dit de polarité positive ou "positif" et immédiatement traduit par les ribosomes cellulaires en protéines virales, sans transcription préalable. Pour les virus à ADN, il faut nécessairement une transcription des messagers. Pour les rétrovirus, HTLV et HIV, il y a également une transcription mais particulière : transcription du génome à ARN en une copie d'ADN qui sera intégrée dans l'ADN cellulaire. Cette transcription est effectuée par une transcriptase virale dite inverse (TI) car elle catalyse l'opération inverse de la transcription cellulaire normale d'ADN en ARN. Les ARNm des rétrovirus sont ensuite transcrits à partir de la copie d'ADN intégrée, comme pour les gènes cellulaires.

#### 4.4.2. Synthèse des enzymes et protéines codées par le virus

La synthèse des composants viraux par la cellule exige généralement un réajustement de la machinerie cellulaire. Ainsi, la cellule normale est incapable de répliquer l'ARN des poliovirus, ce qui consiste à copier de l'ARN sur une matrice d'ARN. Cela nécessite une enzyme appelée **réplicase**, qui est une ARN polymérase ARN-dépendante. Dans la cellule normale, une telle enzyme n'existe pas : les ARN cellulaires sont synthétisés par des ARN polymérases ADN-dépendantes, utilisant une matrice d'ADN qui est le génome cellulaire. Pour se multiplier dans une cellule, les virus à ARN, doivent faire fabriquer par la cellule infectée la **réplicase** (enzyme viroinduite).

Certains gènes viraux codent des protéines **transactivatrices**, tel la protéine TAT du HIV qui active d'un facteur 50 la transcription des messagers viraux à partir de l'ADN proviral intégré dans la cellule. La synthèse des protéines virales passe, pour certains virus, par la synthèse d'un précurseur unique, polypeptide géant secondairement clivé par des protéases pour obtenir les différentes protéines virales. Certaines de ces protéases (exemples du HIV et du virus de l'hépatite C) sont des enzymes virales qui vont s'autocliner à partir d'un précurseur protéique.





**Figure VII.4 :** Stratégies de réplication selon le génome viral.

#### 4.5. Assemblage

Les étapes suivantes du développement viral sont l'assemblage de la capside et l'encapsidation du génome viral. Chez la plupart des virus à ADN, les protéines constituant la capside s'auto-assemblent, dans le cytoplasme ou dans le noyau, soit directement autour du génome viral soit préalablement à l'emballage. La capside des virus à ARN sb (-) (groupe V) s'assemble au fur et à mesure de la synthèse du génome. Les capsides de nombreux virus (Herpesvirus et virus à capsides complexes) exigent la participation de protéines d'échafaudage, qui forment une charpente sur laquelle se fixent les protéines capsidaires, réalisant une procapside. Les protéines d'échafaudage sont ensuite éliminées, et le génome intégré.

#### 4.6. Libération des virions

La libération des virus de la cellule productrice est une phase importante du cycle car elle assure la diffusion des virus dans l'environnement et l'infection de nouveaux hôtes. De nombreux systèmes ont été développés pour assurer cette fonction. Le processus est bien connu pour les bactériovirus qui, à la seule exception des phages filamenteux, utilisent principalement deux groupes de protéines : une **holine**, qui forme des pores membranaires, expose alors le peptidoglycane à des **endolysines** (enzymes lytiques) qui dégradent cette paroi cellulaire, induisant la cytolysse. Les phages filamenteux sont libérés par un système d'extrusion sans lyse cellulaire. Les eucaryovirus disposent de plusieurs mécanismes : destruction de la membrane plasmique, insertion des virus dans des bourgeons membranaires qui éclatent, libérant les particules, ou dans des nanotubes formant des connections intercellulaires qui permettent le passage du virus d'une cellule à une autre.