

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Hassiba Ben Bouali Chlef
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et des Sciences Agronomiques

Polycopié de cours de Microbiologie Générale

Auteur : Dr Soraya Rahmani

2019

Préface

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

Prérequis

Bases solides en Biologie générale, biochimie, génétique et biologie moléculaire. L'étudiant doit avoir aussi une notion globale sur les agents pathogènes.

Objectifs du cours de Microbiologie

- Bases qui seront utilisées dans d'autres parties du tronc commun et dans les modules intégratifs.
- Structures, génétique, métabolisme et physiologie
- Interactions avec les autres composants de la biosphère (biotique et abiotique). Rôle dans l'équilibre écologique de la planète et importance dans les activités humaines.

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

Dr Soraya Rahmani

Spécialité : Microbiologie

Email : rahmanisoraya11@gmail.com

2019

Liste des figures

Figure 1 : Microscope d'Anthony Van Leeuwenhoek.....	7
Figure 2 : Bactéries de la bouche dessinées par A. Van Leeuwenhoek.....	7
Figure 3 : Expérience de Pasteur qui acheva la théorie de la génération spontanée.....	8
Figure 4 : Arbre phylogénétique universel.....	9
Figure 5 : Protistes unicellulaires.....	11
Figure 6 : Protistes pluricellulaires.....	11
Figure 7 : Techniques d'observation de la cellule bactérienne.....	12
Figure 8 : D'autres méthodes d'observation de la cellule bactérienne.....	13
Figure 9 : Les différentes formes et associations bactériennes.....	14
Figure 10 : Dessin schématiques du peptidoglycane	16
Figure 11 : La composition des sous unités du peptidoglycane.....	16
Figure 12 : Structure moléculaire d la paroi des Gram négatives et positives.....	17
Figure 13 : Structure d'un acide téchoïques : Phosphate +glycérol + 5(Alanine, Glucose.).....	17
Figure 14 : Structure de la membrane cytoplasmique bactérienne.....	20
Figure 15 : Vacuoles à gaz de cyanobactéries au microscope électronique.....	22
Figure 16 : Chromosome entier d'E.coli en cours de réplication.....	24
Figure 17 : Fourche de réplication de l'ADN chez E.coli.....	24
Figure 18 : Représentation schématique d'un plasmide.....	24
Figure 19 : Commercial Plasmide au microscope.....	24
Figure 20 : Réplication de Type Thêta.	25
Figure 21 : Réplication de Type Rolling cercle.....	25
Figure 22 : Pili sexuel de type II.....	26
Figure 23 : Fimbriae de type I.....	26
Figure 24 : Mise en évidence de la capsule.....	27
Figure 25 : Types flagellaires et modes d'insertion.....	29
Figure 26 : Pili.....	30
Figure 27 : Mise en évidence de la spore.....	31
Figure 28 : Morphologies des spores.....	32
Figure 29 : Structures d'un endospore de <i>Bacillus anthracis</i> (x 150000).....	32
Figure 30 : Le cycle sporale.....	33
Figure 31 : Tests métaboliques en mini galerie API.....	36
Figure 32 : Lysotypie d'E.coli par un bactériophage (absence de culture signifie une lyse).....	37
Figure 33 : Tailles des génomes.....	38
Figure 34 : Hybridation ADN/ADN.....	39
Figure 35 : Métabolisme bactérien.....	43

Figure 36 : Fumeurs noirs au fond des océans.....	44
Figure 37 : Le cycle biogéochimique simplifié de l'azote.....	45
Figure 38 : Taux de croissance en fonction de la température.....	46
Figure 39 : Comportement des bactéries vis-à-vis de l'oxygène et types respiratoire.....	49
Figure 40 : La division par scissiparité.....	49
Figure 41 : Mesures directes : Dénombrement des bactéries après culture.....	50
Figure 42 : Dénombrement des bactéries viables.....	51
Figure 43 : Chambre de comptage de Petroff-Hausser.....	51
Figure 44 : Comptage au microscope.....	51
Figure 45 : Filtration d'eau sur membrane et dénombrement.....	52
Figure 46 : Courbe de croissance	53
Figure 47 : Phase I (Glucose) – Phase II (Lactose).....	54
Figure 48 : Principe du chemostat.....	55
Figure 49 : Croissance sur milieux de culture liquide.....	55
Figure 50 : Colories de différents micro-organismes sur gélose.....	56
Figure 51 : Agents antimicrobiens.....	58
Figure 52 : Cycle biologiques des chytridiomycète.....	64
Figure 53 : Cycle biologiques des zygomycètes.....	65
Figure 54 : Reproduction des conidiophores.....	66
Figure 55 : La reproduction sexuée chez les ascomycètes.....	66
Figure 56 : Différents appareils sexuels des ascomycètes.....	67
Figure 57 : Cycle vital d'un basidiomycète.....	68
Figure 58 : Cycle vital d'un oomycète.....	68
Figure 59 : Filtres de Chamberland en porcelaine.....	69
Figure 60 : Virus polyédriques à ARN, de l'hépatite A.....	71
Figure 61 : Virion VMT.....	71
Figure 62 : Virion Ebola.....	71
Figure 63 : Comparaison d'un virus nu et d'un virus enveloppée.....	72
Figure 64 : Bactériophage à symétrie complexe.....	72
Figure 65 : Réplication du rétrovirus VIH.....	74
Figure 66 : Cycle lytique et lysogénique du bactériophage lambda dans <i>E. coli</i>	74

Chapitre 1 : Le monde bactérien

1-1.Historique.....7
 1-2.Place des microorganismes dans le monde vivant.....8
 1-3.Caracréristiques générales de la cellule procaryote.....10

Chapitre 2 : La cellule bactérienne

2-1. Techniques d’observation de la cellule bactérienne.....12
 2-2. La morphologie cellulaire.....14
 2-3.La paroi.....15
 2-3-1.Composition chimique.....15
 2-3-2.Structure.....17
 2-3-3.Fonctions.....18
 2-3-4.Coloration de Gram.....19
 2-4.La membrane plasmique.....19
 2-4-1.Composition chimique.....19
 2-4-2.Structure.....19
 2-4-3.Fonctions.....20
 2-5.Le cytoplasme.....21
 2-5-1.Les ribosomes.....21
 2-5-2.Les substances de réserve.....21
 2-6.Le chromosome.....22
 2-6-1.Morphologie.....22
 2-6-2.Composition.....22
 2-6-3.Réplication chimique.....23
 2-6-4.Structure.....23
 2-7.Les plasmides.....24
 2-7-1.Structure.....24
 2-7-2.Réplication.....25
 2-7-3.Propriétés.....26
 2-8. Pili.....26
 2-8-1.Structure.....26
 2-8-2.Fonction.....26
 2-9.La capsule.....27
 2-9-1.Morphologie.....27
 2-9-2.Composition chimique.....27
 2-9-3.Fonctions.....27
 2-10.Les cils et flagelles.....28
 2-10-1.Mise en évidence.....28
 2-10-2.Structure.....28
 2-10-3. Fonctions.....30
 2-11.La spore.....31
 2-11-1.Morphologie.....31
 2-11-2.Structure.....32
 2-11-3.Phénomènes de sporulation.....32
 2-11-4.Propriétés.....34
 2-11-5.Germination.....34

Chapitre 3 : Classification bactérienne	
3-1.Classification phénétique.....	36
3-2.Classification phylogénétique.....	37
3-3.Classification de Bergey.....	40
Chapitre 4 : Nutrition bactérienne	
4-1.Besoins élémentaire.....	42
4-2.Facteurs de croissance.....	43
4-3.Types trophiques.....	43
4-4.Paramètres physico-chimiques.....	46
Chapitre 5 : Croissance bactérienne	
5-1.Mesure de croissance.....	49
5-2.Parametres de la croissance.....	52
5-3.Courbe de la croissance.....	53
5-4.Culture bactérienne.....	55
5-5.Agents antimicrobiens.....	57
Chapitre 6 : Notions de mycologie et de virologie	
6-1.Mycologie.....	62
6-1-1.Taxonomie.....	62
6-1-2.Morphologie.....	63
6-1-3.Reproduction.....	65
6-2.Virologie.....	69
6-2-1.Morphologie (capside et enveloppe).....	70
6-2-2.Différents types de virus.....	72
Travaux Pratiques	
TP 1 : Introduction au laboratoire de Microbiologie.....	76
TP 2 : Méthode d'étude des micro-organismes et les différents procédés de stérilisation.....	78
TP3 : Méthodes d'ensemencement.....	80
TP 4 : Etude microscopique des bactéries, coloration simple.....	82
TP 5 : Etude morphologique des différentes colonies bactériennes sur milieu de culture.....	84
TP 6 : Coloration de Gram.....	86
TP 7 : Les milieux de culture.....	88
TP 8 : Etude de la croissance bactérienne.....	90
TP 9 : Critères d'identification biochimique des bactéries.....	94
TP 10 : Levures et cyanobactéries.....	97
TP 11 : Les inhibiteurs de la croissance, l'antibiogramme.....	103
TP 12 : Isolement de la flore totale et spécifique de certains produits (eau, lait.....)	105
Travaux dirigés	
TD1	109
TD2	111
TD3	113
TD4	115
TD5	116
References bibliographiques	117

Chapitre 1 : Le Monde microbien

Introduction

Les micro-organismes aussi appelés microbes et protistes, forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques, invisibles à l'oeil nu. C'est leur seul point commun, car ils diffèrent et varient par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie. [1]

Les protistes se composent : **des bactéries, des protozoaires, des champignons (Mycètes)** microscopique, et **des algues. Les virus** sont considérés comme des micro-organismes non vivants, acellulaires qui dépendent entièrement des cellules hôtes infectées. [1]

1.1. Historique

Robert Hooke (1665) est le père de la théorie cellulaire (**la plus petite unité structurale d'un organisme vivant est la cellule**).

Anthony VAN LEEUWENHOEK (1632-1723), un marchand hollandais et grand amateur d'instruments d'optique, découvrit et décrivit pour la première fois, dans une série de lettres à la « *Royal society of London* », entre 1674 et 1687, **le monde microbien**. Il appela ces micro-organismes **des animalcules**. Il observa, l'eau de pluie, sa propre matière fécale, la matière prélevée de ses dents. [1]

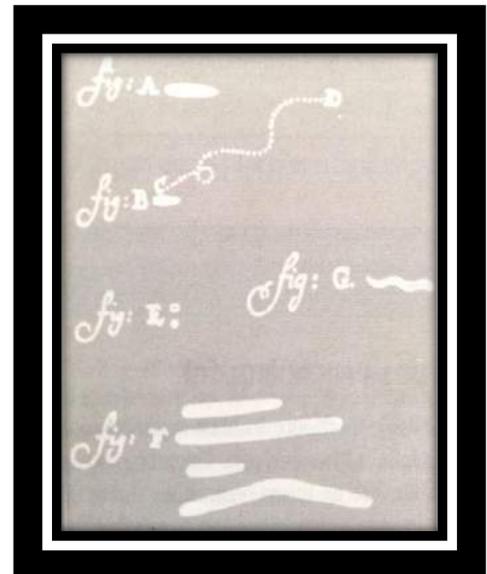
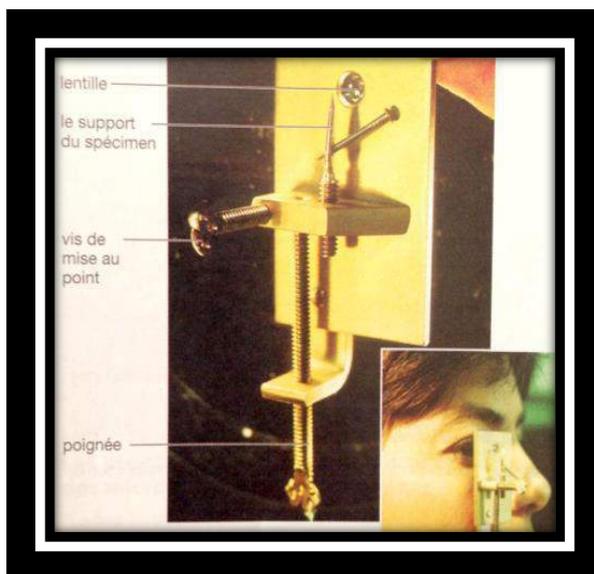


Figure 1 : Microscope d'Anthony Van Leeuwenhoek [1] **Figure2** : Bactéries de la bouche dessinées par A. Van Leeuwenhoek [1].

Le concept ou théorie de la génération spontanée existe depuis plusieurs dizaines de siècles. Le philosophe Aristote défendait cette théorie. On croyait que les organismes vivants naissaient de végétaux et d'animaux en décomposition grâce à une mystérieuse force vitale. Après la découverte des animalcules par Van Leeuwenhoek, cette théorie se confirma, notamment par les expériences de **John Needham, en 1745**, qui démontra la croissance des micro-organismes dans des flacons contenant des bouillons de viande ou de maïs. Ces bouillons furent chauffés avant d'être enfermés dans des flacons. Puis, **Lazzaro Spallanzani** démontra que les flacons de **Needham** n'étaient pas étanches. Il ferma les flacons avant le chauffage et aucune croissance ne fut observée. **Donc, les micro-organismes proviennent de l'air**. Ses travaux furent critiqués par **Needham** (les bouchons ont empêché l'entrée de la force vitale !) et par **Lavoisier** (La fermeture des flacons empêche l'entrée de l'oxygène, nécessaire à la vie !). [2]

Le concept de la génération spontanée resta très ancré dans les esprits jusqu'en 1861. Le chimiste **Louis Pasteur**, partisan de la biogenèse prit en charge cette question. Il montre qu'aucun micro-organisme ne se développe dans un ballon fermé et stérilisé contenant de la matière organique. Bref, que la génération spontanée n'existe pas. Il affirma la biogenèse (que l'apparition de vie dans une solution non vivante provient de la contamination par des micro-organismes présents dans l'air). Cette prouesse lui vaudra le prix de l'académie des sciences en 1862. [2]

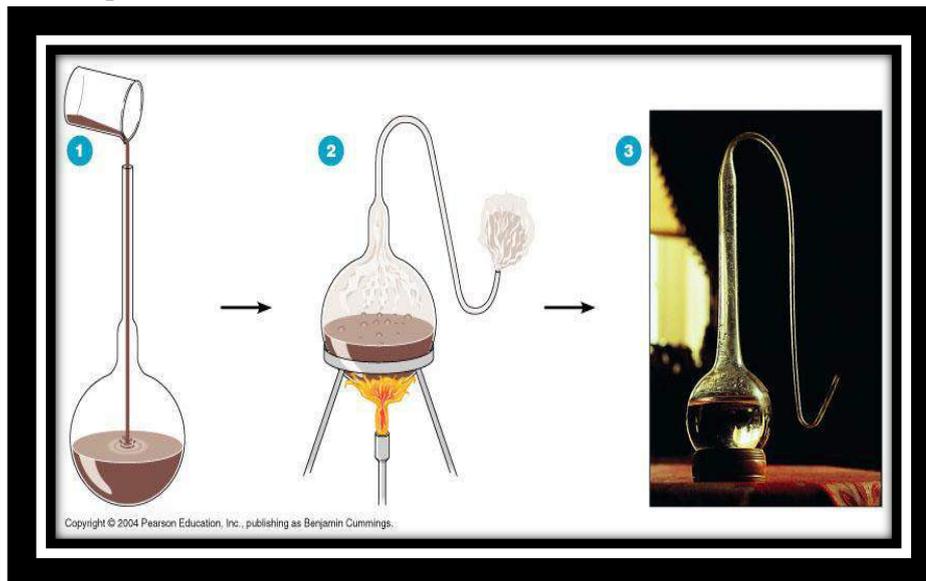


Figure 3 : Expérience de Pasteur qui acheva la théorie de la génération spontanée [2].

La microbiologie est devenue une science à part entière, lorsqu'on a réussi à obtenir **des cultures pures**, grâce au développement **des milieux de culture gélosés** (solides) et **les boîtes de Petri**. Aussi, grâce à **la fabrication de microscopes** plus puissants que les premières loupes et l'élaboration de **colorations spécifiques**... [3]

La relation directe entre une bactérie et une maladie a été démontrée par **le médecin allemand Robert Koch (1843-1910)** en étudiant la tuberculose et son agent *Mycobacterium tuberculosis*. Pour affirmer cette causalité, il faut vérifier plusieurs critères rassemblés sous le nom de « **Postulats de Koch** ». [3]

1-Le micro-organisme doit être présent chez tous les sujets malades, et absent chez les sujets sains.

2-Le micro-organisme doit être isolé et cultivé en culture pure

3-A partir de ces cultures pures on doit être en mesure de provoquer la maladie par inoculation expérimentale

4-Le même micro-organisme doit être de nouveau isolé des malades expérimentaux.

En même temps et par la suite d'autres scientifiques célèbres :

Tyndall 1877 : découverte des spores, leur thermorésistante et il mit au point **la tyndallisation**.

Winogradsky 1856-1953 : Travaux sur les bactéries nitrifiantes, les bactéries fixatrices de l'azote, sulfureuses et la décomposition bactériennes de la cellulose dans les sols.

Beijerinck 1851-1931 : les bactéries fixatrices de l'azote, symbiotiques. [3.1]

1.2 Place des micro-organismes dans le monde vivant

Depuis leur découverte par **Anthony van Leeuwenhoek**, la place des bactéries dans le monde vivant a beaucoup évoluée. Le botaniste suédois **Carl van Linné (1735)**, élaborera une première classification des organismes vivants en deux règnes *Plantae et Animalia*. En 1857, **Karl van Nägeli** proposa de classer les bactéries et les champignons dans le règne des Plantes. [3,1]

1.2.1 Classification de Haeckel

En 1866, **E. Haeckel** divise le monde vivant en trois règnes, **le règne animal, le règne végétal et le règne des protistes** qui rassemble les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries. [3,1,2]

1.2.2 Distinction entre cellules eucaryotes et procaryotes selon Edward Chatton.

En 1937 et grâce à l'invention du microscope électronique, Edward Chatton mis en opposition deux types de cellules, la cellule eucaryote (noyau est entouré d'une membrane et qui renferme des d'organites cellulaires) et la cellule procaryote (noyau sans membrane et dont l'organisation est très simple).

En 1938, H.F. Copeland sépare le règne des bactéries (ou "*Monera*") de celui des protistes. Cette définition des procaryotes fut renforcée en 1961 par Roger Stanier. [3,2]

1.2.3 Classification selon Murray

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

Au sein du règne des Procaryotae, R.G.E. Murray distinguait 04 divisions retrouvées dans le manuel de Bergey: La division des "*Gracilicutes*". Regroupant les bactéries à Gram négatif.

La division des "*Firmicutes*". Regroupant les bactéries à Gram positif.

La division des "*Tenericutes*". Bactéries dépourvues de paroi.

La division des "*Mendosicutes*". Archaeobactéries. [3.2]

1.2.4 Classification à cinq règnes

En 1969, Robert H. Whittaker décrit une classification à cinq règnes. Quatre règnes eucaryotes (Animal, Végétal, Champignons et Protistes). Les procaryotes se regroupent dans le règne des monères. Bien qu'elles ne peuvent s'accorder, les deux classifications, d'E. Chatton et de R.H. Whittaker ont existé simultanément pendant une longue période. [3.2, 1]

1.2.5 Classification Génomique selon, CR, Woese (1978)

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de caractériser les gènes qui codent pour les ARN ribosomiaux (ARNr). En comparant une multitude de séquences d'ARNr 16S, appartenant à divers organismes vivants, il est arrivé à diviser les organismes vivants en trois domaines. Le domaine des *Bacteria* ou *Eubacteria*, le domaine des *Archaea* et le domaine des *Eucarya* (animaux, plantes, les mycètes et les protistes). [4]

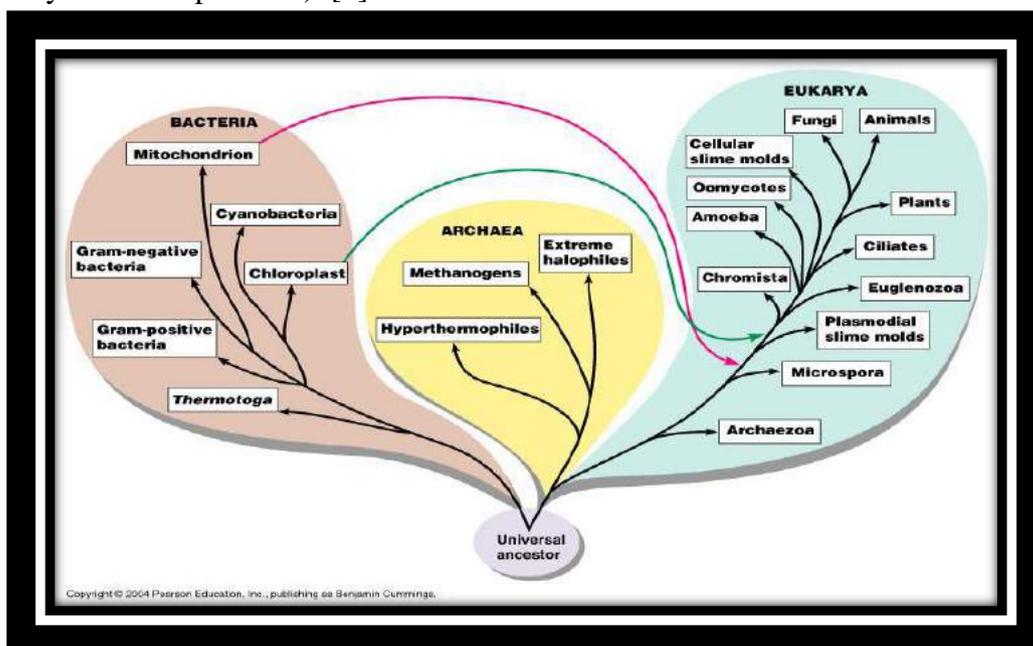


Figure 4 : Arbre phylogénétique universel [3].

1-3 Caractéristiques générale de la cellule procaryote

1.3-1 Les Protistes

Les protistes sont définis par des propriétés communes et spécifiques : leur taille microscopique, leur organisation simple et unicellulaire pour la plus part. Si pluricellulaires, alors leurs cellules sont équivalentes, sans aucune différence morphologique, physiologique ou fonctionnelle. Les protistes se distinguent des animaux et des végétaux par leur structure, leur physiologie et leur écologie. [4.1]

1.3.2 Structure et fonction

Une taille de loin plus réduites que celles des cellules animales et végétales. Les cellules animales et végétales sont incapables d'exister indépendamment de leur organisme.

La taille réduite des protistes confère des avantages physiologiques. Un rapport surface /volume supérieur à celui de tous les autres organismes vivants. Ce qui permet des échanges et des interactions remarquables avec le milieu. Sans oublier une dissémination et une distribution dans la nature unique et impressionnante. [4.2]

1.3.3 Reproduction

Les protistes et en particulier les bactéries ont des modes de reproduction simples, spécifiques et rapides (temps de génération courts). *Escherichia coli* par exemple, se reproduit par simple division binaire en 20 minutes. Cela se produit bien sûr en conditions optimales de culture en laboratoire. Ces taux de croissance exceptionnels induisent des rendements de croissances incomparables. [4.3]

1.3.4 Métabolisme

Les micro-organismes et en particulier les bactéries ont une propriété fondamentale qui est la diversité de leur métabolisme. Individuellement, chaque micro-organisme est spécifiquement adapté à la métabolisation d'un nombre plus ou moins limité de substrats. Ce qui explique leur distribution en fonction des caractéristiques nutritionnelles et physicochimiques du milieu. Mais, pris dans leur ensemble, les micro-organismes peuvent métaboliser toutes les substances organiques naturelles et même synthétiques. [4.3.1]

- Ce processus constitue la minéralisation de la matière vivante et le recyclage des éléments chimiques qui forment la matière organique. Ceci permet de préserver l'environnement.

- Une des armes métaboliques des bactéries est la synthèse d'enzymes inductibles uniquement en présence de leurs substrats spécifiques. Une adaptation exceptionnelle aux conditions du milieu. [4.3.2]

1.3.5 Ecologie

Les micro-organismes sont ubiquitaires, ils sont présent dans tous les écosystèmes :

- **Dans les mers et les océans**, ils constituent la **biomasse** (base du 1er échelon de la chaîne alimentaire) qui nourrit l'ensemble de la faune marine. [4.3.1]

- **Dans le sol**, ils jouent un rôle dans la décomposition de la matière organique, la fourniture de l'azote assimilable aux plantes, la minéralisation de la matière organique. Les micro-organismes participent activement aux équilibres gazeux de l'atmosphère, en étant à la fois producteurs et consommateurs, d'O₂, H₂, N₂, CO₂, CH₄. [5]

- **Le long de l'appareil digestif des animaux**. En effet, ce dernier est tapissé de bactéries très utiles à notre bien-être digestif, puisqu'elles nous procurent les enzymes nécessaires à la digestion de certains aliments. De plus, elles évitent que d'autres micro-organismes dangereux colonisent le tube digestif et nous rendent malades. La majorité d'entre elles sont apportées à la naissance par la mère, puis, par l'environnement et la nourriture. Tout au long de la vie, les populations évoluent. [5]

1.4 Organisation biologique des protistes

Les protistes se présentent selon trois types différents d'organisation biologique :

Unicellulaires

Pluricellulaires

Coénocytiques

1.4.1 Protistes unicellulaires

C'est le cas de la plus part des protistes, **bactéries, protozoaires, levures et de nombreuses algues**. Une cellule unique qui se suffit à elle-même et qui constitue un organisme complet et autonome, donc doué de toutes les fonctions de la vie : nutrition, croissance et reproduction. [5]

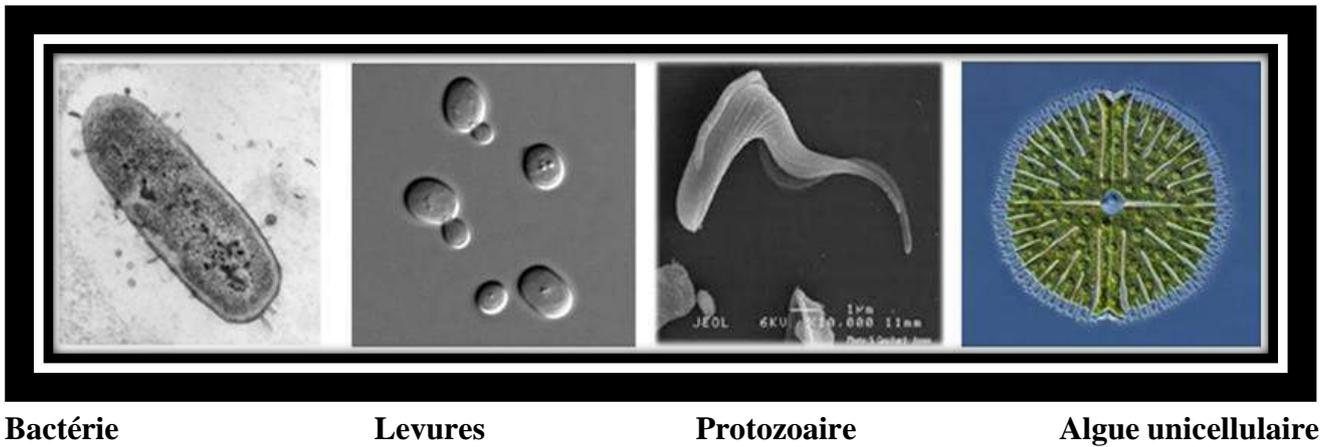


Figure 5 : Protistes unicellulaires [5].

1.4.2 Protistes pluricellulaires

Ce sont principalement des champignons (Fungi) et des algues formés de plusieurs cellules identiques, sans aucune différence structurale ou physiologique. [5.2]

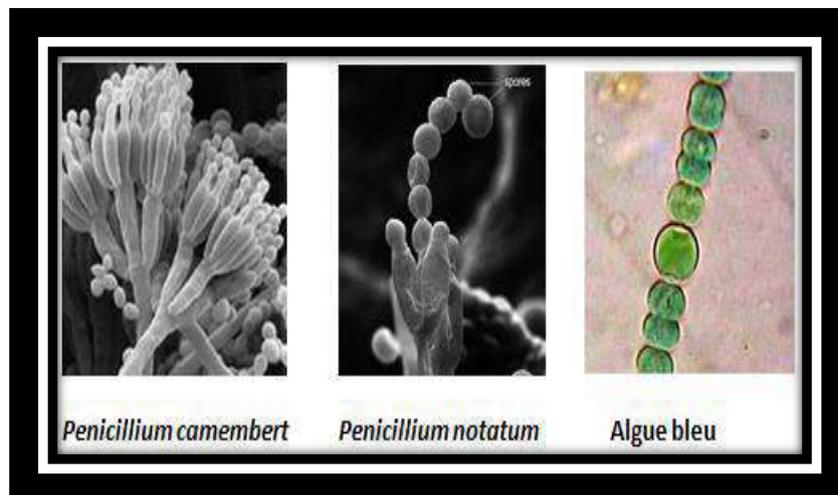


Figure 6 : Protistes pluricellulaires [5].

Chapitre II

2-La cellule bactérienne

Les bactéries typiques sont des organismes unicellulaires procaryotes. Elles n'ont pas de noyau et leur génome est le plus petit des cellules vivantes.

Les bactéries se divisent en eubactéries et en archaebactéries [5.3]

2.1 Techniques d'observation de la cellule bactérienne

Observation de la cellule

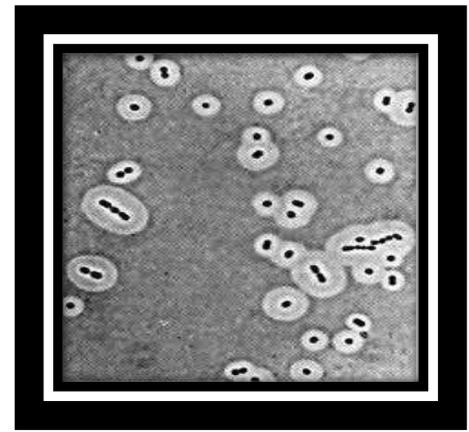
La mise au point du premier microscope par A. Van Leeuwenhoek marque le point de départ de la microbiologie. Depuis, cet appareil a été largement amélioré. Avec des grossissements pouvant aller jusqu'à 2500 x, on peut observer des structures de l'ordre de 1 μm .

On distingue :

L'observation entre lame et lamelle, dite à l'état frais de bactéries en milieu liquide et sa variante, la coloration à l'encre de Chine (pour la mise en évidence de la capsule). Les capsules correspondent au halo clair entourant les corps bactériens en noir. [5.2]



Observation à l'état frais



Coloration à l'encre de chine

Figure 7 : Techniques d'observation de la cellule bactérienne [5].

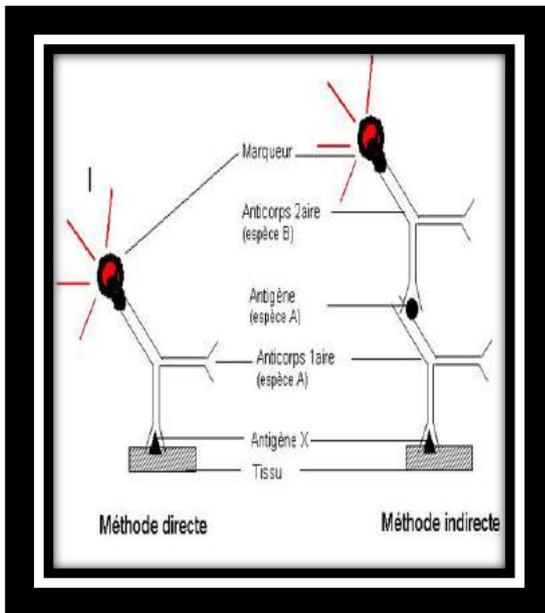
Observation des frottis séchés, fixés et colorés.

Les colorations de Gram et de Ziehl-Nielsen permettent la reconnaissance des bactéries pathogènes, d'autres font apparaître spécifiquement les cils, les flagelles, les spores...

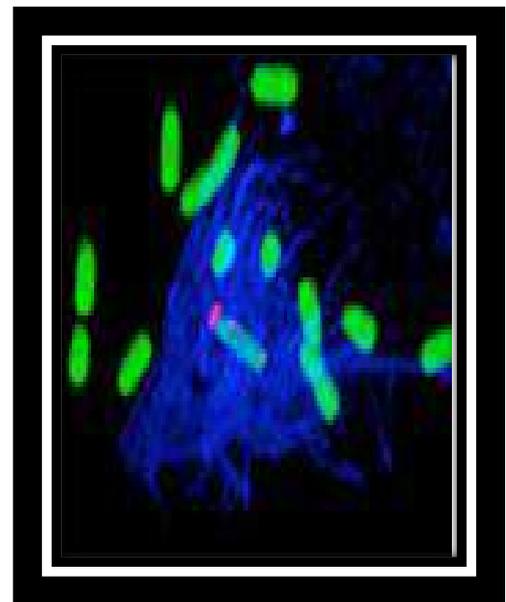
Les frottis sont observés à l'immersion avec une goutte d'huile spéciale entre l'objectif et la préparation, cela permet d'obtenir une image plus nette. [5.3]

Toutes ces méthodes font partie de la microscopie photonique (utilisation du rayonnement lumineux). Pour observer des structures de l'ordre de 5 nm à 10 nm, **on utilise la microscopie électronique**. Certaines structures peuvent retenir ou laisser passer les électrons. Cette approche nécessite ou non la fixation de l'échantillon. [5.4]

Enfin, les méthodes immunocytochimiques, permettent de localiser dans la cellule des molécules bactériennes. On utilise des anticorps marqués par la peroxydase, la biotine ou des molécules fluorescentes comme la fluorescéine. La formation d'un complexe stable antigène-anticorps permet de repérer la présence d'une molécule dans la cellule. [5.3]



a)



b)

Figure 8 : D'autres méthodes d'observation de la cellule bactérienne [5].

a) Immunocytochimie directe et indirecte. b) Invasion d'une cellule épithéliale par *Shigella flexneri* Des cellules *Hela* sont infectées par *Shigella* analysées par immunofluorescence. Bleu: F-actin; vert: bactérie; rouge: protéine bactérienne sécrétée et impliquée dans l'invasion.

Séparation des constituants cellulaires.

On utilise l'ultracentrifugation ou la centrifugation sur gradient de densité (gradient de Saccharose), pour séparer les différents organites cellulaires. Pour cela il faut ouvrir les différentes enveloppes membranes, paroi. Plusieurs méthodes pour le faire :

- Les ultrasons
- Les enzymes, tel que le lysozyme qui détruit la paroi bactérienne.
- La pression osmotique, après traitement au lysozyme, les bactéries sont placées en milieu hypotonique, gonflent et éclatent.
- La pression mécanique, ou broyage par des billes en verre pour casser la paroi et la membrane.
- Le froid par plusieurs cycles de congélation/décongélation successives [6]

La composition chimique d'une bactérie

On peut obtenir séparément les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques. En utilisant des enzymes comme des endopeptidases, exopeptidases, glucosidases, endonucléases, exonucléases et lipases associés des techniques de chromatographie et de séquençage des protéines ou des acides nucléiques on a pu déterminer la composition chimique globale d'*Escherichia coli*. [6.4]

Composition élémentaire d'*Escherichia coli*

Elément % du poids sec

Carbone	50 +/- 5
Azote	10 à 15
Phosphore	3.2
Soufre	1.1
Cendre	12.5
Sels fixe	7.25
Sels libres	5.5
Macromolécules	

Protéines	50%
ADN	3 à 4%
ARN	10%

Polysaccharides	4 à 5%
Lipides	10 à 15%

Pool de métabolites

Acides aminés, Nucléotides libres, sucres acide organiques, esters, oligopeptides, ATP, vitamines, coenzymes.

2.2 Morphologie cellulaire

2.2.1 Formes des cellules bactériennes : les bactéries sont des organismes unicellulaires de formes variées. [6]

- bactéries de forme arrondies ou cocci, isolées, en chaînette, en amas (nombre variable de cellules) : Staphylocoques, Streptocoques ... [6]
- bactéries de forme allongée ou bacille, isolée, en chaînette ou en amas, de longueur et de diamètre variables : *E.coli*, *Salmonella*, *Bacillus*. [6.5]
- bactéries de forme spiralée : spirilles, spirochètes, comme *Treponema*.
- un groupe particulier de bactéries de forme filamenteuse se rapprochant des moisissures : les Actinomycètes. [6.5]

2.2.2 Taille : les bactéries les plus petites ont une taille d'environ 0,2 µm (*Chlamydia*) et les plus longues certains Spirochètes peuvent atteindre 250 µm de long. En moyenne la taille se situe entre 1 et 10 µm [6]

2.2.3 Associations cellulaires : une espèce bactérienne peut apparaître sous forme de cellules isolées séparées ou en groupements caractéristiques variables selon les espèces : association par paires, en amas réguliers, en chaînette, par quatre (tétrades). [6.3]

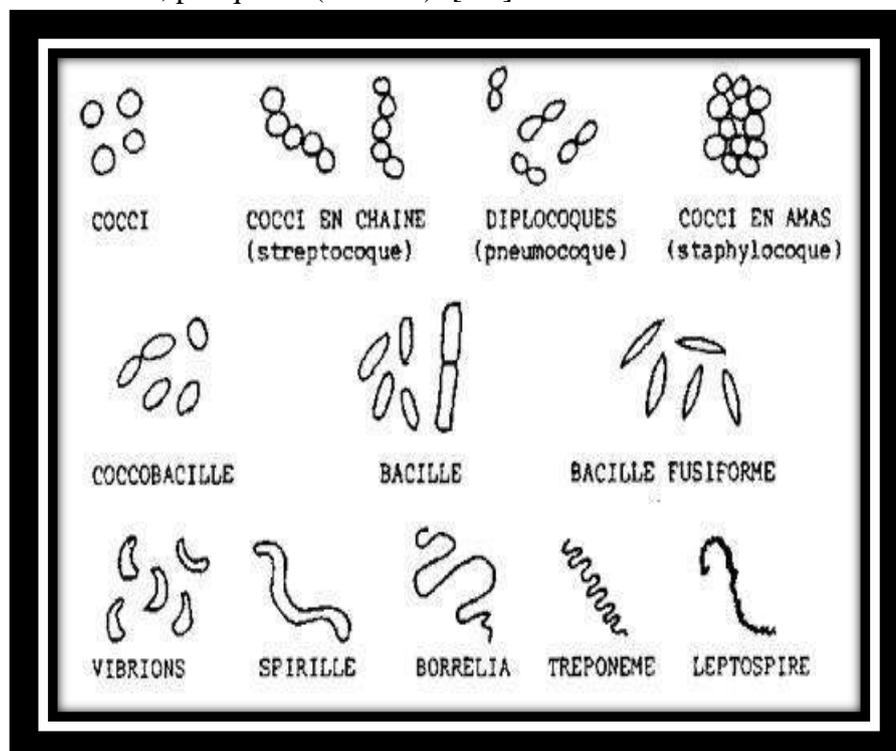
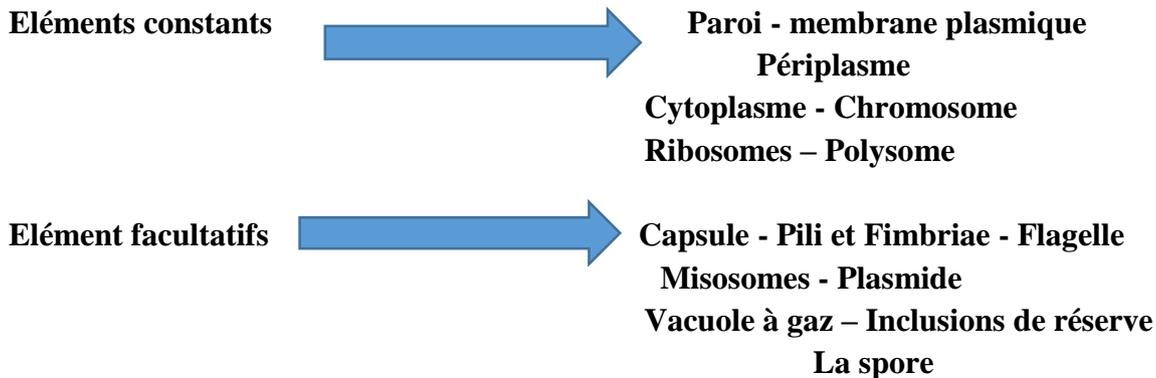


Figure 9 : Les différentes formes et associations bactériennes [6].

2.2.4 Eléments constants et inconstants de la structure bactérienne

Certaines structures sont présentes chez toutes les bactéries, ce sont les éléments « constants » ; d'autres sont retrouvés seulement chez certaines bactéries : ce sont les éléments « inconstants » ou « facultatifs ». [6.4]



2.3 La Paroi

Enveloppe rigide assurant l'intégrité de la bactérie. Elle est responsable de la forme des cellules.

Elle protège des variations de pression osmotique. Elle est absente chez les Mollicutes, (*Mycoplasma*). [7]

2.3.1 Composition chimique de la paroi

Gram positive

Très peu de lipides (1 à 2 %

Acides téchoïques et
Lipotéchoïques

4 Acides aminés majeurs

Ala (D et L) D-Glu, L-Lys, acide

Lys

Diaminopomélique (DAP)

Gram négative

Lipides en grande quantité
(10 à 20 %, Membrane externe

Il n y a pas d'acides téchoïques ou
Lipotéchoïques

Mêmes acides aminés

Beaucoup moins de DAP et de L-

Osamines

N-acétyl glucosamine (NAG) et Acide N-acétylmuramique (ANAM)

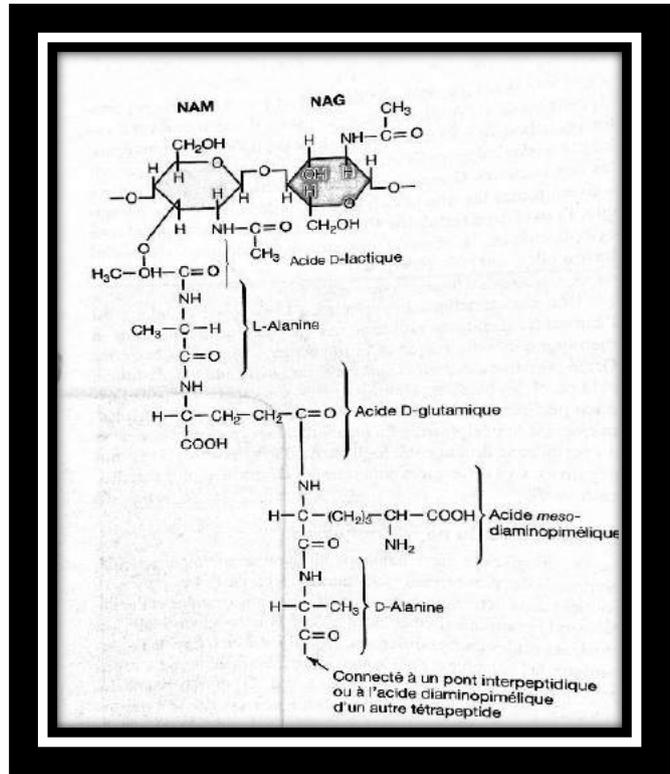
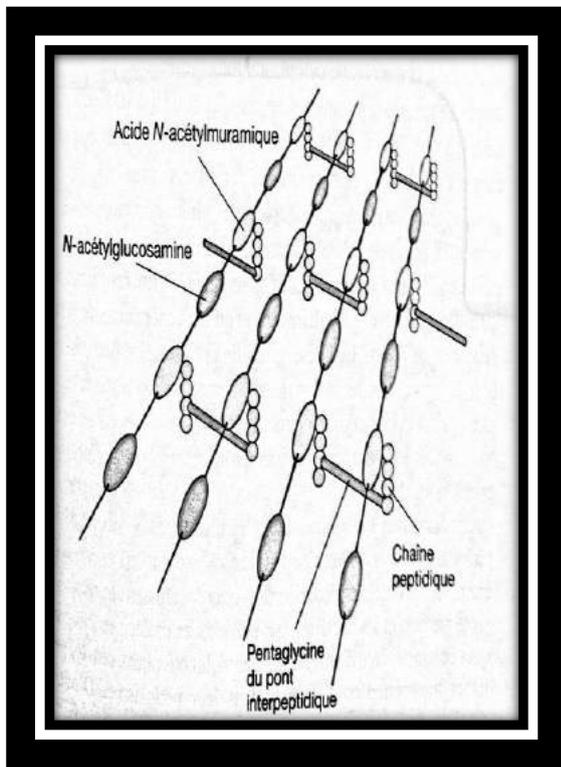


Figure 10 : Dessin schématique du peptidoglycane [6] **Figure 11 :** La composition des sous unités du peptidoglycane [7]

La chaîne polysaccharidique: faite d'une alternance de molécules de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N acétylmuramique (NAM). Les chaînes latérales peptidiques identiques, composés de 4 acides aminés (tétra peptide), attachées aux NAM. Chez les Gram positifs, un ensemble de ponts « interpeptidiques » (penta peptide) qui partent du 4e acide aminé du tétra peptide vers le 3eme acide aminé du tétra peptide d'une seconde chaîne polysaccharidique et ainsi de su[7.5]

2.3.2 Structure moléculaire de la paroi des Gram négatives et positives

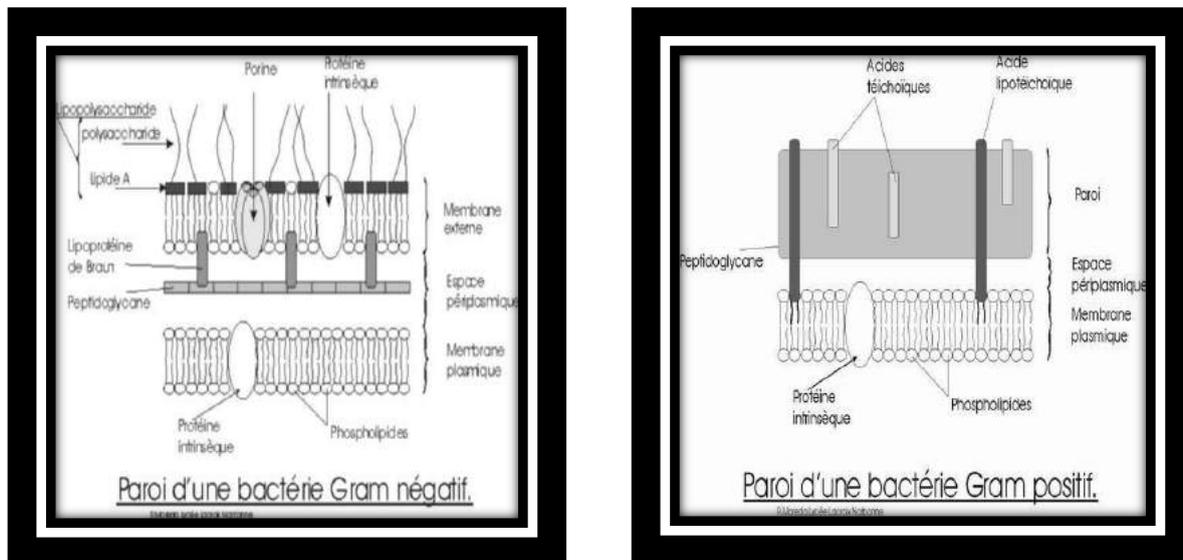


Figure 12 : Structure moléculaire de la paroi des Gram négatives et positives [6].

A. Paroi des Gram positifs

- Le peptidoglycane est le constituant majeur (90%)
- Le reste correspond à un feutrage d'acides téichoïques (10%)
- Le peptidoglycane est très solide, les liaisons croisées entre chaînes glucidiques sont nombreuses.
- Présence de flagelles. [7.4]

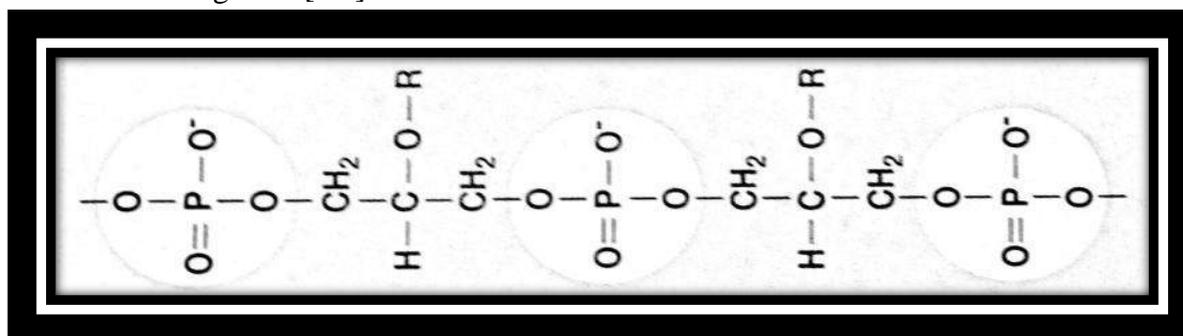


Figure 13 : Structure d'un acide téichoïque : Phosphate + glycérol + R (Alanine, Glucose...) [7].

B. Paroi des Gram négatifs

- Beaucoup plus complexe, elle est constituée du peptidoglycane et de la membrane externe. Il y a plusieurs couches :
- Peptidoglycane en couche mince.
- Phospholipides
- Lipopolysaccharides (LPS) : formé de 3 parties :
 - **Le lipide (A)** couplé à la glucosamine et à des résidus phosphore qui est amphiphile, possédant une partie hydrophobe et une hydrophile. Il y a analogie entre les appellations « endotoxine », « lipide A » et « membrane externe »

- **Le polysaccharide central**, constitué de 10 sucres. [6,4]
- **La chaîne latérale O, ou antigène O**, chaîne courte, sa composition varie selon la souche bactérienne. [7]

Le LPS joue plusieurs fonctions, telle que l'attachement sur les surfaces, bloque l'entrée de substances toxiques. Il agit comme une endotoxine (lipide A) qui cause les symptômes des maladies induites par des Gram négatives. On note également la présence de PORINES (protéines de passage trimérique) : seules structures de transport des composés hydrophiles, essentielles à la vie de la bactérie comme les monosaccharides, mais aussi à l'action de certains antibiotiques. D'autres protéines servent à la captation d'ions (fer), ou de vitamines (facteurs de croissance. [7.6]

2.3.3 Fonctions de la paroi

Afin d'étudier les rôles de la paroi, on utilise un enzyme, le lysozyme.

Le lysozyme coupe les liaisons 1-4 glycosidiques entre le NAG et l'ANAM. Il en résulte une destruction totale du peptidoglycane chez les bactéries Gram(+), et une fragmentation de celui-ci chez les Gram(-) car le peptidoglycane est moins accessible à cause de la membrane externe. [8]

Expérience :

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

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

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

4- On fait la même expérience avec *Escherichia coli* (bacille Gram-) : en milieu isotonique + lysozyme, les bactéries prennent une forme sphérique appelée : SPHEROPLASTE. Les sphéroplastes conservent toutes les propriétés initiales de la bactérie. [8]

Rôle 1 de la paroi : assurer le maintien de la forme de la bactérie

Rôle 2 de la paroi : assurer une protection contre la pression osmotique intracellulaire (car forte concentration en métabolites à l'intérieur de la cellule >> l'eau rentre).

Un protoplaste ne possède plus les propriétés antigéniques de la bactérie d'origine. En effet, les antigènes pariétaux (de la paroi) : Chez les Gram sont (+peptidoglycane + acides téchoïques et lipotéchoïques + polyside C (Streptocoques).

Chez les Gram (-) : les antigènes O du LPS.

Rôle 3 de la paroi : propriétés antigéniques

L'étude des protoplastes met également en évidence d'autres rôles :

Rôle 4 de la paroi : permettre la fixation des bactériophages. Ils reconnaissent des récepteurs localisés sur le peptidoglycane des Gram(+) ou la membrane externe des Gram(-). Cette propriété est utilisée pour l'identification de certaines bactéries : c'est la Lysotypie.

Rôle 5 de la paroi: participer à la mobilité. En effet, les flagelles sont implantés dans la membrane cytoplasmique mais ne peuvent pas fonctionner en absence de peptidoglycane (d'où immobilité des protoplastes).

Rôle 6 de la paroi : toxicité. Chez les Gram(-), le LPS est une endotoxine (effet toxique porté par le lipide A) qui peut donner fièvres et lésions.

Rôle 7 de la paroi : perméabilité. La paroi laisse passer de petites molécules comme l'eau, les sels minéraux ou des métabolites simples. Par contre elle est plus ou moins perméable à certains solvants (exemple l'alcool. cf. coloration de Gram. [8.6])

L'espace péri plasmique : Contient des enzymes qui participent à la nutrition (hydrolases) et des protéines qui sont impliquées dans le transport de molécules à l'intérieur de la cellule.

Les Gram (+) excrètent plutôt les enzymes hors de la cellule. Ce sont alors des « **exo enzymes** ». Celles des Gram – sont retenues entre les membranes Interne et Externe. [8]

2-3-4-Coloration de Gram

Coloration de Gram : elle est fondée sur l'action successive d'un colorant, le cristal violet, d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Christian Gram (1853-1938) a été l'inventeur de la coloration en 1884. Son intérêt est de donner une information rapide et médicalement importante, car le pouvoir pathogène et la sensibilité aux antibiotiques sont radicalement différents. [8.7]

Elle permet de distinguer la paroi des bactéries ayant + du peptidoglycane. Coloration en **4 étapes** :

1. coloration par le violet de gentiane ;
2. mordantage avec du Lugol (solution d'iode iodo-iodurée) ;
3. décoloration par l'alcool
4. coloration par la safranine

Etapes 1 et 2 = coloration en violet du contenu de la bactérie et fixation par le Lugol des structures internes.

Etape 3 = décoloration du cytoplasme des bactéries ayant une paroi pauvre en peptidoglycane qui laisse passer l'alcool pour éliminer le violet de gentiane = bactérie à Gram négatif

Etape 4 = contre-coloration par la safranine teintant en rose les bactéries précédemment décolorées.[8]

Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet (pas de passage à travers la couche de Peptidoglycane. Le nucléoïde ou chromosome est visible grâce à la coloration de Feulgen. [8.5])

2.4 La membrane plasmique

2.4.1 Composition Chimique

Elle possède le même type de structure que celle d'une cellule eucaryote (bicouche phospholipidique) mais avec beaucoup moins de glucides et jamais de stérols (sauf chez les mycoplasmes).

Elle est composée de 60 à 70 % de protéines et 30 à 40 % de lipides. La membrane plasmique contient les enzymes de la chaîne respiratoire, les déshydrogénases et les coenzymes associés : NAD⁺, FAD, cytochromes, cytochrome oxydase.

D'autres enzymes impliquées dans la synthèse des lipides et dans la réplication de l'ADN y sont localisées. [8.6].

2.4.2 Structure de la membrane plasmique

Les lipides sont à la base de la structure de la membrane. Chaque molécule de lipide est amphipathique ; formée d'une partie hydrophobe soluble dans l'huile insoluble dans l'eau et une partie hydrophile ayant des propriétés opposées et portant un groupement phosphate chargé négativement. Ces deux couches moléculaires induisent une organisation en double feuillet. Cette organisation n'est pas statique, elle répond au modèle dit en mosaïque fluide (Les molécules peuvent se déplacer latéralement en échangeant leurs places). [8]

On distingue deux catégories de protéines : les protéines périphériques et les protéines intégrales qui traversent complètement le double feuillet. [9]

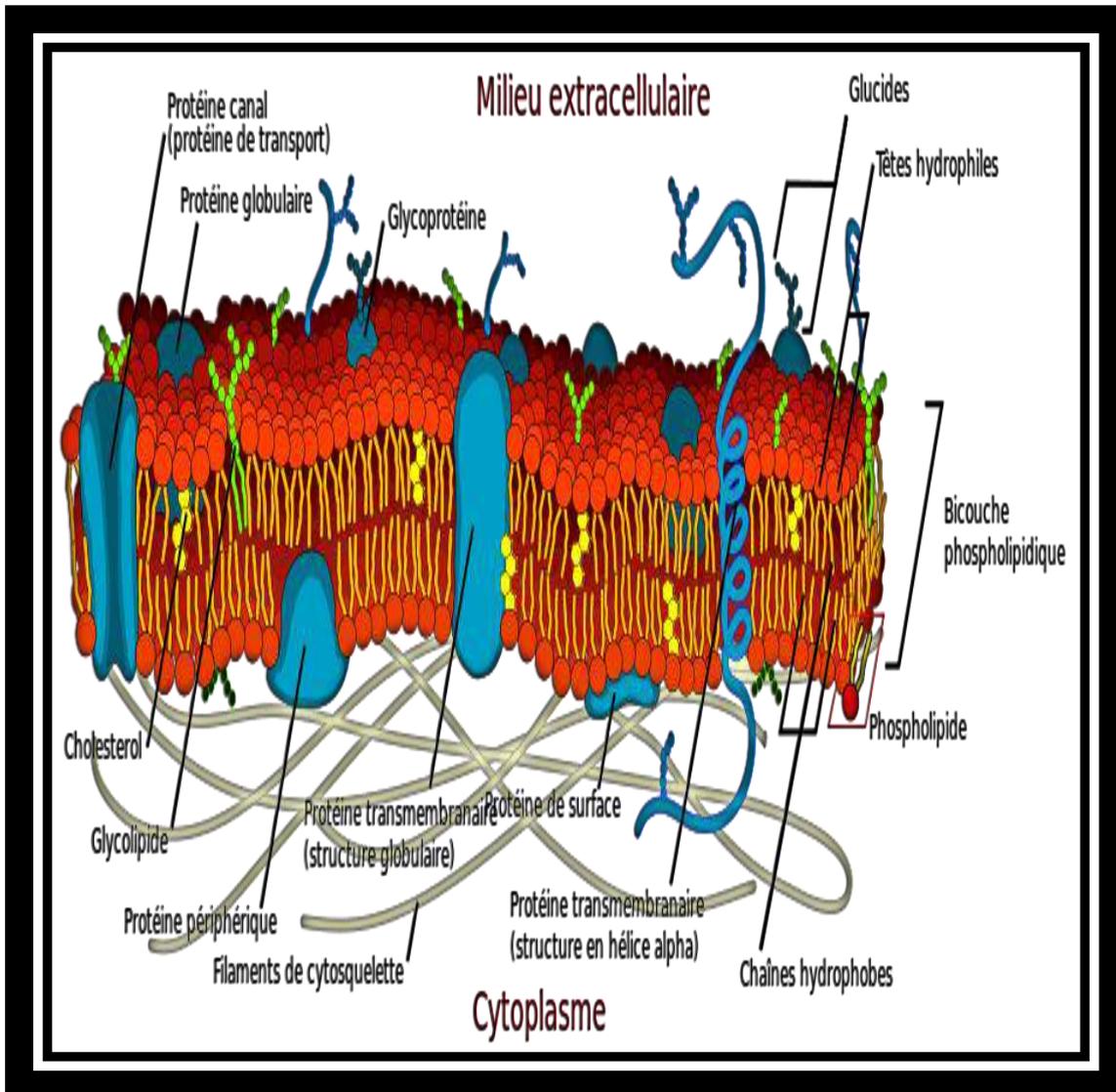


Figure 14 : Structure de la membrane cytoplasmique bactérienne [9].

2.4.3 Fonctions de la membrane plasmique

a-rôle de barrière semi-perméable (ou semi sélective): elle permet le passage de molécules lipophiles et empêche le passage des molécules hydrophiles. [9]

On distingue 2 grands types de transport :

Le transport passif : il se fait dans le sens du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie. [9.7]

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

b- Site de fixation des flagelles (voir « les flagelles » plus loin)

c- Possède des protéines membranaires ayant pour rôles :

Enzymes responsables de la biosynthèse et de l'excrétion dans l'espace péri plasmique de molécules nécessaires à la synthèse de la paroi. Des **Enzymes de la chaîne respiratoire** permettant la synthèse d'ATP et celles de la photosynthèse. Enfin, des **transporteurs** de diverses molécules (ions, sucres, ...) dans les 2 sens. [9.7].

De plus la membrane joue un rôle important dans la détection des signaux et de composés présents dans le milieu environnant grâce à la présence de protéines transmembranaires du chimiotactisme. Ceci permet aux bactéries dotées de flagelles, de nager vers les endroits les plus riches en nutriments, ou bien, de s'éloigner des endroits défavorables comme ceux qui contiennent des substances toxiques. Ces protéines interviennent dans le sens de rotation des flagelles. [9.7.6]

2.5 Le cytoplasme

Délimité par la membrane cytoplasmique. C'est un sorte de gel à pH neutre contenant de l'eau et :

Des ribosomes: qui interviennent dans la synthèse des protéines. Sont associés en chapelets sur l'ARNm sous forme de polysomes

2-5-1 Les Ribosomes : Ils sont constitués d'ARN et de protéines. Les ribosomes bactériens comprennent **deux sous-unités (30S, 50S)**. [9.7.6]

Fonctionnellement, il y a deux sites essentiels pour la synthèse des protéines : le **site aminoacyl** qui accueille l'acyl-tARN et le **site peptidyl** qui accueille la chaîne d'acides aminés en cours de constitution. Ils sont particulièrement présents à proximité de la membrane cytoplasmique, site de synthèse de la paroi et des protéines exportées. Ils n'ont pas la structure des ribosomes des eucaryotes expliquant la spécificité propre au monde bactérien. Des antibiotiques perturbent la synthèse des protéines à leur niveau (tétracyclines). [9]

2-5-2-Les substances de réserve = inclusions cytoplasmiques : en général, chaque groupe de bactéries synthétise une seule catégorie de substances de réserve qui forment des agrégats, parfois de grande taille. Cela peut être des **glucides** (amidon et glycogène), des **lipides** (polyhydroxy-butyrates), du polyphosphate, et parfois des minéraux (fer, soufre).

- ✓ Des organites spécialisés : On trouve des chromatophores (organites spécialisés dans la photosynthèse), des vacuoles à gaz (permettant aux bactéries aquatiques de flotter à la surface de l'eau). [9]

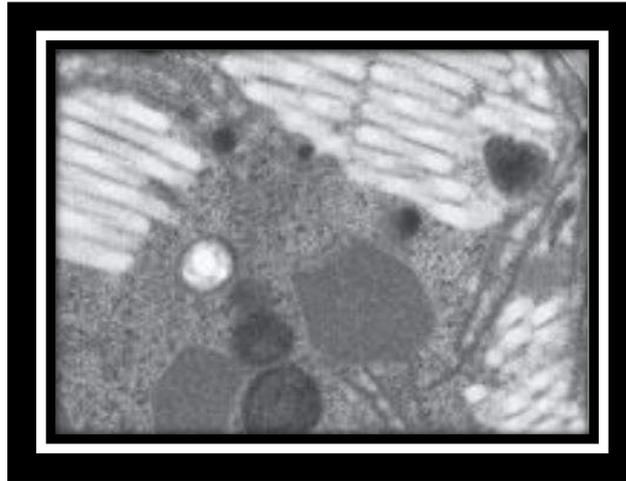


Figure 15 : Vacuoles à gaz de cyanobactéries au microscope électronique [9].

2.6 Le Chromosome

2.6.1 Morphologie et structure

La majorité des bactéries possèdent un chromosome unique, circulaire. Par contre, *Vibrio cholerae* en possède deux, un grand de 2,9 millions de bases et un petit de 1 million de bases. Celui d'*Escherichia coli* est empaqueté et se trouve dans une région qu'on appelle nucléoïde ou corps nucléaire. Il mesure 1400 μm et 300 Å d'épaisseur. La morphologie des corps observés est variable selon la phase de croissance et de division de la bactérie. [9.8]

Chez les cocci, on observe une petite masse sphérique ou ovoïde, souvent centrale. Chez les bacilles, un bâtonnet situés transversalement dans la cellule. Il est généralement mononucléaire chez les cocci et pluri nucléaires chez les bacilles. Cet aspect est visible chez les bactéries jeunes en phase exponentielle. L'appareil nucléaire se réplique plusieurs fois avant que la cellule ne se divise. [9.8]

Cet ADN est associé à des protéines notamment des topoisomérases qui interviennent dans le repliement de la molécule d'ADN, par contre on ne trouve pas d'histones comme chez les eucaryotes. On trouve par contre des polyamines analogues aux histones, tel que la protéine II, riche en Arginine. [9]

2.6.2 Composition

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

Nucléotide : « Groupement phosphoré + sucre à 5 atomes + une base purique ou pyrimidique ». [10]

Bases puriques : Adénine A et Guanine G

Bases pyrimidiques : Cytosine C et Thymine T

Le sucre : Désoxyribose

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

Il y a autant de « A que de T » et autant de « C que G » par contre le rapport (A+T)/(G+C) mieux connu sous le nom de coefficient de Chargaff varie selon les espèces. On l'exprime en GC%. 50% chez *E.coli* 60% chez *Pseudomonas*, 25 à 45% chez *Clostridium*. [10.8]

2.6.3 Réplication Chimique

L'ADN se réplique, c'est-à-dire qu'il se reproduit lui-même. La séquence sur une chaîne détermine automatiquement la séquence sur l'autre chaîne.

La réplication **est semi-conservative** : Chaque chaîne parentale reste associée à la nouvelle chaîne pour qui elle sert de matrice. [10.8]

La réplication est bidirectionnelle : Cairns a été le premier à observer un chromosome entier *d'E.coli* en cours de réplication. Il a associé des techniques de marquage isotopique et d'autoradiographie, suivie d'observation en microscopie électronique. Après avoir cultivé des bactéries dans un milieu contenant de la thymidine tritiée à faible activité spécifique, pendant un temps dépassant la durée du cycle, il met au point une méthode de lyse de la cellule permettant de libérer l'ADN directement sur une grille de microscopie électronique, en minimisant les risques de cassures mécaniques de la molécule [10.9.7]

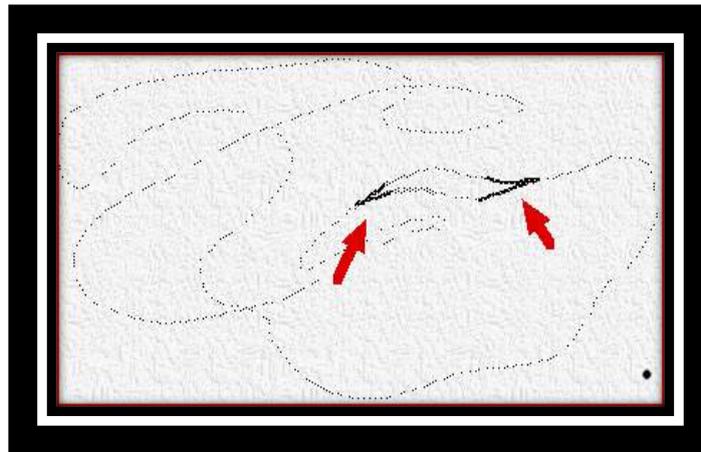


Figure 16 : chromosome entier *d'E.coli* en cours de réplication. [10].

La préparation est recouverte d'une émulsion photographique et après exposition et développement, l'examen révèle des grains d'argent le long de la molécule d'ADN. Ces premières observations ont montré la circularité du chromosome *d'E.coli*. Dans un second temps, Cairns a effectué des marquages plus courts et déduit des images présentée que la réplication commence en un point du chromosome bactérien, **l'origine de la réplication** et fait le tour de celui-ci. [10.9]

2-6-4-Structure

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

ADN ligase : unit les extrémités de deux chaînes d'ADN en catalysant la synthèse d'un pont phosphodiester entre un 3'OH et 5'P. Elle répare les coupures d'ADN et circularise l'ADN bactérien. [10.7]

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

Gyrase ou Topoisomérase II : Le chromosome *d'E.coli* fait 1360 μm (4.106 paires de Nt, donc 4.105 tours de spires) si la réplication se fait en 30 min, alors la désérialisation se fait à 10000 Tours/minute. C'est grâce à la découverte de la Gyrase qu'on a pu expliquer ce phénomène. [10.8.7]

La **Gyrase** fait une coupure au niveau de l'un des brins, ce qui induit la désérialisation de l'ADN super enroulée en molécule circulaire enroulée.

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

Au niveau d la fourche de réplication, l'un des deux brins est synthétisé dans le sens de déplacement (3'OH libre), catalysé par la DNA polymérase III. Il est **appelé brin précoce ou avancé**. L'autre à extrémité 5' sera synthétisé par **fragments d'Okasaki** et il est appelé **brin tardif**. [10.8]

Ces fragments de 1000 à 2000 résidus nécessitent **des amorces d'ARN** synthétisées par une ARN polymérase DNA dépendante appelée **primase**. [10]

Ensuite ces amorces ARN sont excisées par l'**ADN polymérase I** (activité exonucléasique) et les délétions sont remplacées par de l'ADN par cette même enzyme. [10.8]

Enfin l'ADN ligase relie les différentes séquences au niveau de leurs extrémités 3'OH et 5'OH libre.

Durant toutes ces étapes, les d'ADN matrice sont maintenus déroulés et stabilisés par des protéines appelées « **DNA binding proteins** ». [10.9]

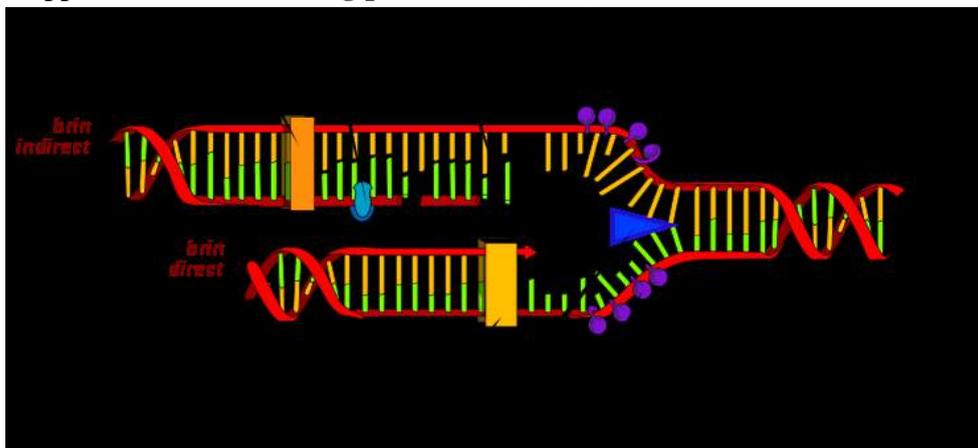


Figure 17 : Fourche de réplication de l'ADN chez *E. coli* [10].

2.7 Les Plasmides

La cellule bactérienne peut contenir des éléments génétiques extra chromosomiques, capables d'autoréplication. On les appelle **plasmides**. Certaines bactéries possèdent plusieurs plasmides différents. Les plasmides permettent à la bactérie une meilleure adaptation à son environnement [11]

2.7.1 Structure des plasmides

Ce sont des molécules d'ADN bicaténaire, généralement **circulaires**, mais **il en existe des linéaires**. Parfois ils s'intègrent dans le chromosome et on les appelle des **épisomes**. Ils sont transmissibles aux cours des générations mais pas de façon équitable comme pour le chromosome. La perte d'un plasmide est dite **curage**. [11]

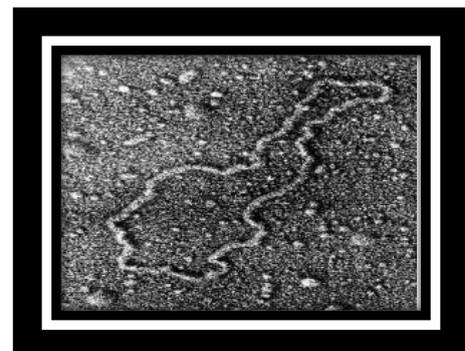
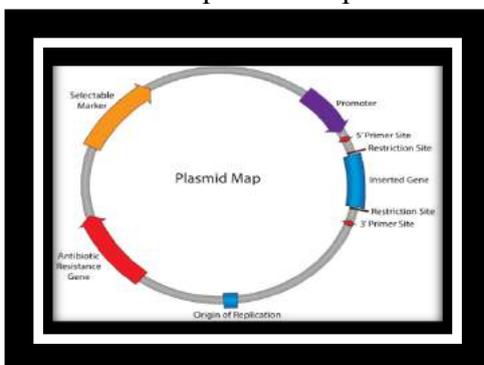


Figure 18 : Représentation schématique d'un plasmide [11] **Figure 19** : commercial Plasmide au microscope électronique [11]

<http://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid> PNAS in November 1973 by Stanley N. Cohen et al
 Les plasmides sont généralement de petite taille, (1 kb à 400 kb), 1/100 du chromosome bactérien. Ils portent très peu de gènes, moins de 30. On classe les plasmides selon leur fonction et leur propagation. [11.9]

On distingue ainsi : des **plasmides conjugatifs**, qui portent le gène responsable de la synthèse des pili sexuels, nécessaires à la conjugaison.

Des **plasmides R** (facteurs de résistances) : ils permettent aux bactéries de résister aux antibiotiques. [11.9]

Des **plasmides Col** qui codent pour des protéines dites **bactériocines**, telle que **la colicine d'E.coli**. Les bactériocines donnent un avantage à la bactérie en tuant des souches très proches systématiquement parlant d'E.coli. [11.10]

Des **plasmides de virulence** qui codent pour des **toxines** responsables des symptômes causés par des bactéries pathogènes. [11.10]

Des **Plasmides métaboliques** qui codent pour des enzymes capables de cataboliser des molécules complexes, aromatiques qui polluent notre environnement (pesticides) ou bien des nutriments comme le lactose, citrate de Na, urée. Enfin la fixation de l'azote chez *Rhizobium*. [11]

2.7.2 Réplication

Le plasmide peut se répliquer selon deux modèles :

La réplication de type Thêta θ , uni ou bidirectionnelle, à partir d'une origine de réplication en utilisant l'équipement enzymatique de la bactérie hôte. [11.8]

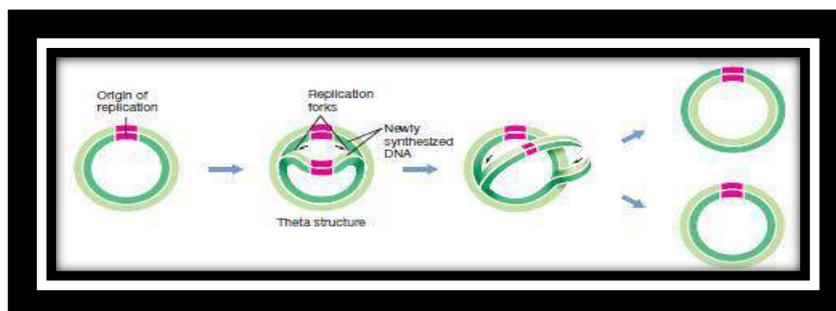


Figure 20 : Réplication de Type Thêta θ [11].

Une réplication de type « Rolling cercle » ou cercle déroulant. Un brin est coupé par une nucléase. Ce brin va se dérouler autour de l'autre brin dans le sens 5'P et la bactérie va synthétiser un brin complémentaire simultanément aux deux brins parents. [11.6]

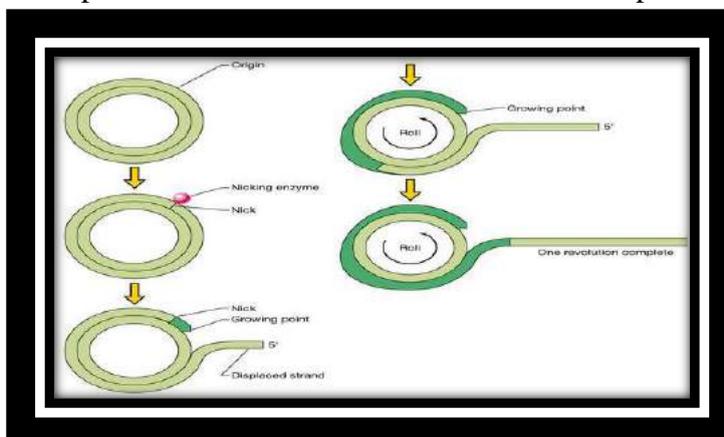


Figure 21 : Réplication de type « Rolling cercle » [11].

2.7.3 Propriétés (voir également les différents types de plasmides ci-dessus)

- a) **Résistance aux antibiotiques** (90% plasmidique) les 10% restant (chromosomique).
- b) **Résistance aux métaux lourds** (mercure, sels de cadmium, bismuth, de plomb, d'antimoine et arsénites. [11.10])
- c) **Production de substances à rôle pathogène.** L'exemple le plus étudié est rencontré chez les *Escherichia coli*, responsables de diarrhées [12]
- d) **Le pouvoir pathogène** dans les 3 cas est contrôlé par une information génétique **portée par un plasmide**, codant pour des **entérotoxines** et des **facteurs de colonisation** permettant l'attachement des bactéries à la surface de l'intestin (épithélium intestinal). [12]
- e) **Production de bactériocines**
- f) **Caractères métaboliques** : un grand nombre de caractères biochimiques des bactéries sont d'origines plasmidiques. [12]

2.8. Pili

2.8.1. Structure

A ce jour on distingue **4 types de Pili (I, II III et IV).**

Il est plus juste de nommer les **types I, III, IV des Fimbriae** et le **type II un Pili sexuel.**

Les Fimbriae : mot latin, signifie filament ». C'est un appendice court (de l'ordre de 1µm), creux, rigide, composé de protéines disposées en hélice. Il est largement retrouvé en grand nombre autour du corps bactérien (1000) chez les Gram négatives et exceptionnellement chez les Gram positives. [12.11]

Les Pili sexuels ou de type II : Pili en latin signifie cheveu. Ils sont plus longs et plus épais que les Fimbriae (10 µm, 9 nm respectivement) et moins nombreux (1 à 4 par cellule). Le gène *Pili* est porté par un plasmide conjuguatifs. [12]

2.8.2 Fonction

Les Fimbriae de type I, III, jouent un rôle dans l'adhésion des bactéries aux différents supports vivant ou non. Ils favorisent la formation de biofilm [12.11]

Les Fimbriae de type IV, retrouvés par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa*, en plus de l'attachement, ils sont impliqués dans un autre mode de mobilité, dite **saccadée**. On les retrouve au niveau des pôles des cellules bactériennes. Les Fimbriae IV se contractent et se rétractent comme un ressort, pour permettre la mobilité de la bactérie. [12]

Le Pili sexuel ou de type II: Il a un rôle dans la conjugaison bactérienne (un des 3 modes de transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre). Les Pili sexuels de la bactérie donatrice vont permettre de reconnaître une bactérie réceptrice (de l'amarrer) et entraîner la création d'un pont cytoplasmique entre les 2 bactéries, permettant ainsi le passage d'une molécule de plasmide. [12.10]

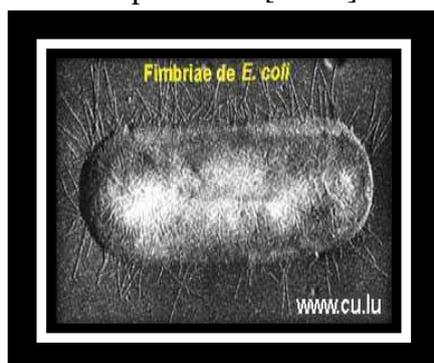


Figure 22 : Pili sexuel de type II [12]

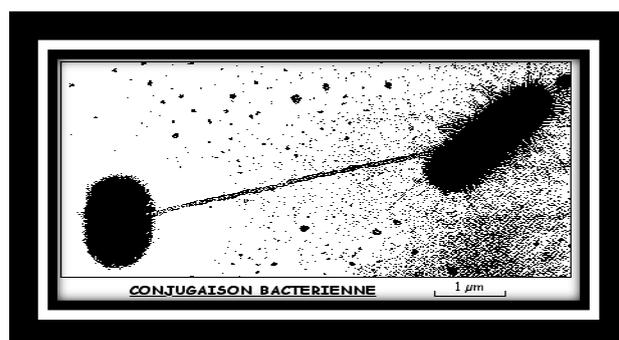


Figure 23 : Fimbriae de type I [12]

2.9. La capsule

2.9.1 Morphologie

Certaines bactéries possèdent des structures entourant la paroi. On distingue en réalité 3 types de couches, **la capsule, les couches mucoïde et la couche S** selon les bactéries. [12,11]

La capsule, est bien organisée, bien définie et elle est difficilement détachable de la bactérie.

La couche mucoïde, retrouvée chez les bactéries aquatiques est moins bien organisée, diffuse, elle est facilement détachable de la bactérie. [12.11]

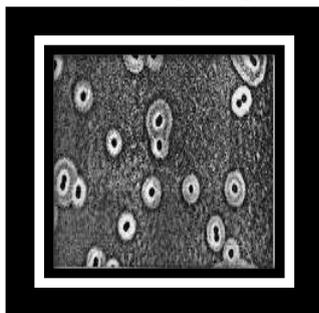
La couche S, plus rigide, très structurée. C'est une couche de surface mise en évidence que par microscopie électronique. Elle est constituée de sous unités protéiques organisées de façon. [12.11]

Mise en évidence de la capsule

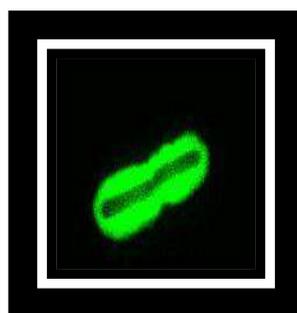
Etat frais à l'encre de chine : les bactéries apparaissent sur fond sombre avec un halo clair autour du corps bactérien qui correspond à la capsule. [12]

Microscopie électronique

Techniques immunochimiques : des Anticorps anti-capsulaires se fixent sur les Ag capsulaires. Le complexe Ag-Ac précipite et augmente l'épaisseur de la capsule qui devient visible au microscope. Cette réaction est appelée : **Réaction de gonflement de la capsule de NEUFELD**. [12.9]



Coloration à l'encre de chine
électronique



Techniques immunochimiques



Microscopie

Figure 24 : Mise en évidence de la capsule [12].

2.9.2 Composition chimique

La capsule et les couches mucoïde peuvent être regroupées sous le terme de **glycocalyx**. Le glycocalyx est un réseau de polysaccharides. *Bacillus anthracis* agent de la maladie du charbon, possède une capsule de nature protéique. [12.11]

La couche mucoïde est fréquente chez les bactéries aquatiques et particulièrement importante chez les bactéries du genre *Zooglea* qui produisent des masses gluantes. Certains polysides produits par des bactéries **ont un intérêt industriel et sont produits comme gélifiant** notamment en industries alimentaires : *Leuconostoc mesenteroides* produit des dextrans, *Xanthomonas* des xanthanes ...

La couche S est composé de protéines et de glycoprotéines, organisés en pavement. [12.10.11]

2.9.3 Fonctions de la capsule

Les bactéries peuvent vivre sans la capsule, mais cette dernière lui confère des avantages grâce à ses rôles :

De protection : contre les Ultraviolets, la dessiccation, les agents physiques et chimiques.

De Virulence (la pathogénicité) : Elle s'oppose à la phagocytose en diminuant l'adhésion de bactéries aux macrophages. Elle exerce un chimiotactisme négatif sur les leucocytes.

Antigénique : les Ag capsulaires sont responsable de la spécificité sérologique (Ag K). A partir de cette propriété, une classification peut être établie (ex : 70 types sérologiques différents chez *Streptococcus pneumoniae*). [12.10]

La Couche S : Elle est trouvée chez des Archéobactéries (*Methanococcus par ex*) et chez des Bactéries (*Chlamydia, Treponema, Helicobacter, Bacillus Clostridium ...*). La couche S joue un rôle en tant que structure pariétale en plus de la paroi. Elle est impliquée dans l'adhésion, dans la résistance aux protéases des macrophages et dans la protection vis à vis des bactériophages. La couche S sert de filtre excluant aussi bien l'entrée que la sortie des molécules trop grosses. [13]

2.10. Les cils et flagelles

Le flagelle

Ce sont des organes locomoteurs spécialisés. Ils sont très rares chez les coques. [13]

2.10.1 Mise en évidence

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

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

Coloration de Rhodes Les flagelles sont fragiles et la préparation du frottis est délicate

Technique : Préparation du frottis (utiliser une lame neuve) : laisse couler, sur lame inclinée à 45° au-dessus de la cuve à coloration (mettre de l'eau de Javel dans la cuve), 2 gouttes d'une culture en bouillon (culture jeune : 6 à 12 heures) de la souche à étudier. Laisser sécher. [13]

Recouvrir la préparation de mordant de Rhodes (préparé extemporanément) pendant 3 mn
Laver soigneusement à l'eau distillée. Recouvrir de nitrate d'argent ammoniacal (préparé extemporanément), chauffé presque à ébullition, et laisser agir 3 à 5 mn. Rincer à l'eau distillée à l'eau distillée. Sécher et observer à l'immersion. [13.11.9]

2.10.2 Structure

Ils mesurent en moyenne 16 à 20 µm (beaucoup plus que la bactérie) et sont très fins (300 Å d'épaisseur). [13.12]

Il existe différents modes d'insertion des flagelles, selon le nombre et la position de ceux-ci

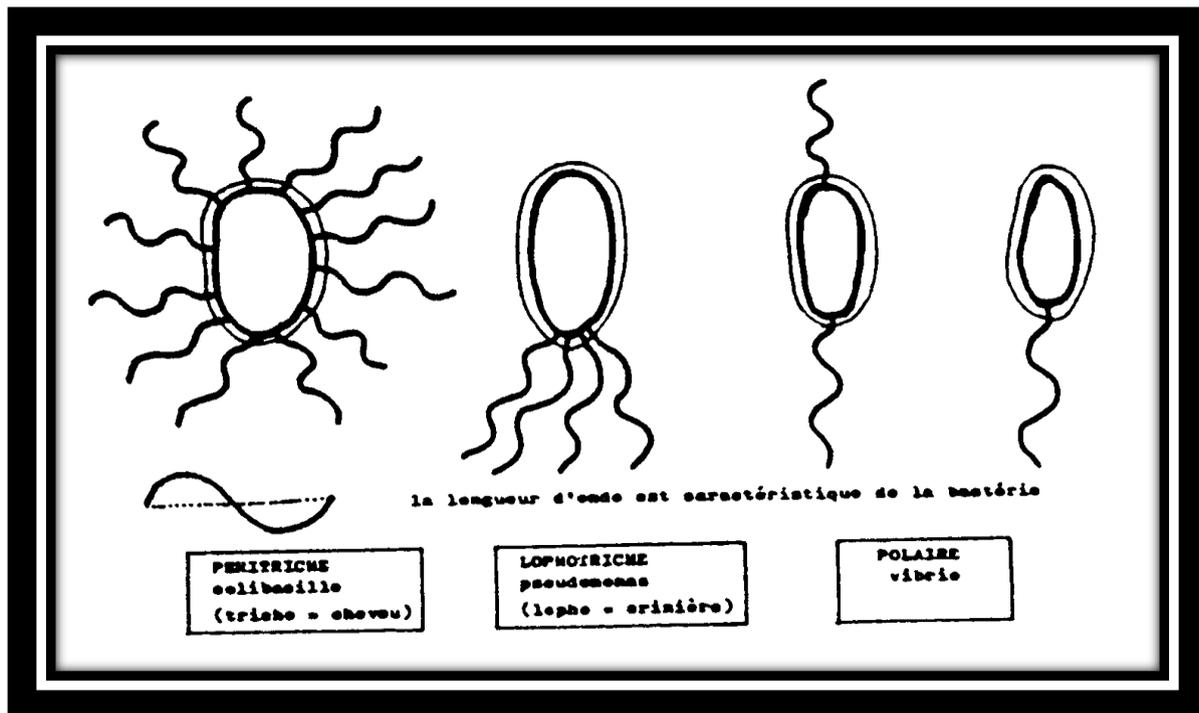


Figure 25 : Types flagellaires et modes d'insertion [13]

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

Ils sont mobiles par rotation, **comme une hélice**, grâce à un mécanisme similaire à un « **rotor** » fonctionnant grâce à l'énergie fournie par un gradient de protons. [13]

Le mécanisme de rotation s'effectue grâce à un complexe mécanisme impliquant des récepteurs et des kinases situé dans la membrane plasmique et impliquant aussi la paroi. [13.10]

Architecture moléculaire : Le flagelle bactérien est constitué de **3 parties** :

Le filament hélicoïdal

Le crochet

Le corpuscule basal

Le filament

C'est un **cylindre creux** constitué d'une seule protéine multimérique : **la flagelline**

La flagelline, **protéine fibreuse**, se positionne en hélice rigide qui tourne à la manière de l'hélice d'un bateau. [13.12]

Le crochet

Il lie le filament au corpuscule basal.

Il a la **même composition que le filament**, mais à cet endroit, la flagelline ne possède **pas le même pas d'hélice**, ce qui permet la **formation d'un coude**.

Le crochet est **plus court** que le filament, mais **plus large**. **Très flexible**, il permet d'induire le mouvement de la bactérie. [13]

La liaison du **crochet au filament** est assurée par des « **protéines associées au crochet** » = protéines **HAP** (« Hook Associated Proteins »).

Le corpuscule basal

Enfoui dans la cellule, il insère le flagelle dans le corps cellulaire. Son architecture, assez complexe, peut être simplifiée en **3 parties** :

Une partie mobile = **le rotor**.

Une partie fixe = **le stator**.

Un **inverseur** qui déclenche le mouvement soit dans le sens des aiguilles d'une montre soit dans le sens inverse. [13.9]

Sa **composition est différente** chez les bactéries Gram (+) et Gram (-).

20 à 30 gènes sont impliqués dans la synthèse des flagelles. La synthèse du flagelle se fait par un **assemblage séquentiel** des différents composants : disques, du corps basal, puis du crochet et enfin du filament. [13.11]

C'est une **force « proton motrice »** qui est responsable de la rotation (mécanisme pas totalement élucidé). C'est-à-dire qu'un **gradient de protons** se dispersant au travers des 2 anneaux fournit l'énergie nécessaire à la rotation. [13.10.8]

L'ATP ne semble pas être impliquée dans la rotation du flagelle. Selon le sens de rotation du flagelle, la bactérie ne se comporte pas de la même manière [14]

2.10.3 Fonctions du flagelle

La locomotion

Mises en évidence sur des **milieux semi-gélosés** (diffusion dans la gélose) ou sur **milieu solide** (envahissement de la surface de la boîte. Ex : *Proteus*). [14.10]

Rôle antigénique

Les **antigènes flagellaires (Ag H)** déterminent différents sérotypes (exemple : sérotypage des *Salmonella*). En présence de l'anticorps correspondant à leur Ag H, les bactéries agglutinent et les bactéries s'immobilisent. La **spécificité antigénique** repose sur le **nombre et la séquence des acides aminés** de la flagelline. [14.9]

Fixation des bactériophages

Les flagelles sont le **lieu de fixation de certains bactériophages**. [14.12]

Pili ou Fimbriae

Chez les **bactéries à Gram négatif (exceptionnellement à Gram positif) peuvent exister des structures fibrillaires et rigides** situées à la surface, plus fines que des flagelles : les Pili ou Fimbriae. Il s'agit de la polymérisation d'une sous-unité polypeptidique (**piline**) assemblée à des **polypeptides mineurs** comme l'**adhésine**. [14]

Pili communs

Ils peuvent attacher spécifiquement des bactéries à la surface de cellules eucaryotes, phase essentielle dans certains pouvoirs pathogènes (*Escherichia coli* au cours de certaines infections urinaires, *Vibrio cholerae* sur les entérocytes). [14.9.8]

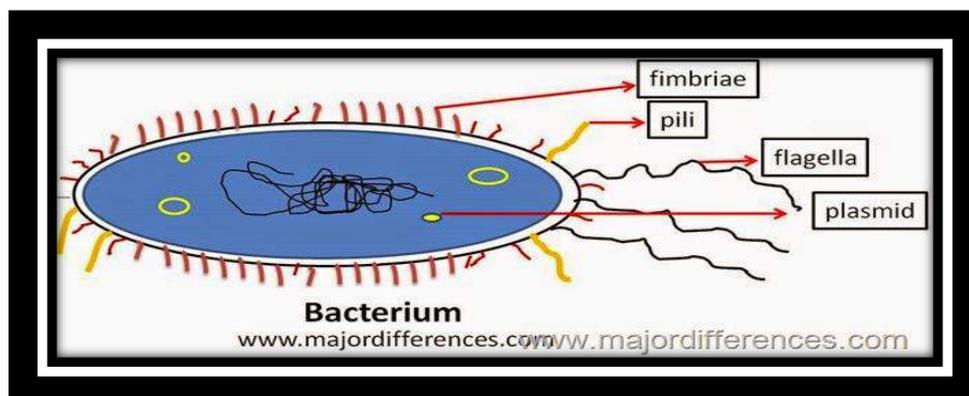


Figure 26 : Pili [14].

2.11. La spore

Ce sont des **structures de résistance** formées par certaines bactéries lorsque les **conditions deviennent défavorables**. Elle permet aux bactéries sporulantes de survivre dans des conditions difficiles et extrêmes de l'environnement. **Les genres bactériens** les plus connues qui forment des **endospores** sont *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*. Ce sont toutes des bactéries Gram (+). D'autres genres sont capables également de sporuler. [14.11]

Mise en évidence : Les spores sont visibles à la **coloration de Gram** où elles apparaissent comme des espaces vides à l'intérieur des bactéries : seul le contour de la spore apparaît coloré. A l'**état frais**, elles apparaissent comme de petites masses réfringentes au sein de la bactérie, ou libres dans le milieu. Il existe des colorations spéciales basées sur le **caractère acido-alcool-résistant** des spores. Exemple : **coloration au vert de malachite = coloration de Benito-Trujillo**. Après une contre coloration par la fushine, les spores apparaissent **vertes** dans la bactérie **rose**. [14.11]



Coloration au vert de malachite
Bacillus

Coloration de Gram

Coloration

de Gram
Clostridium

Figure 27 : Mise en évidence de la spore [14]

2.11.1 Morphologie

Les spores sont de petites unités **ovales ou sphériques**. Elles peuvent **déformer ou non** le corps bactérien. Leur **position** dans la cellule est variable : centrale, terminale, subterminales. Elles servent également dans l'identification bactérienne. La spore peut-être **libre ou non**. La recherche de tous ces caractères se fait dans un **but taxonomique**. [14.13]

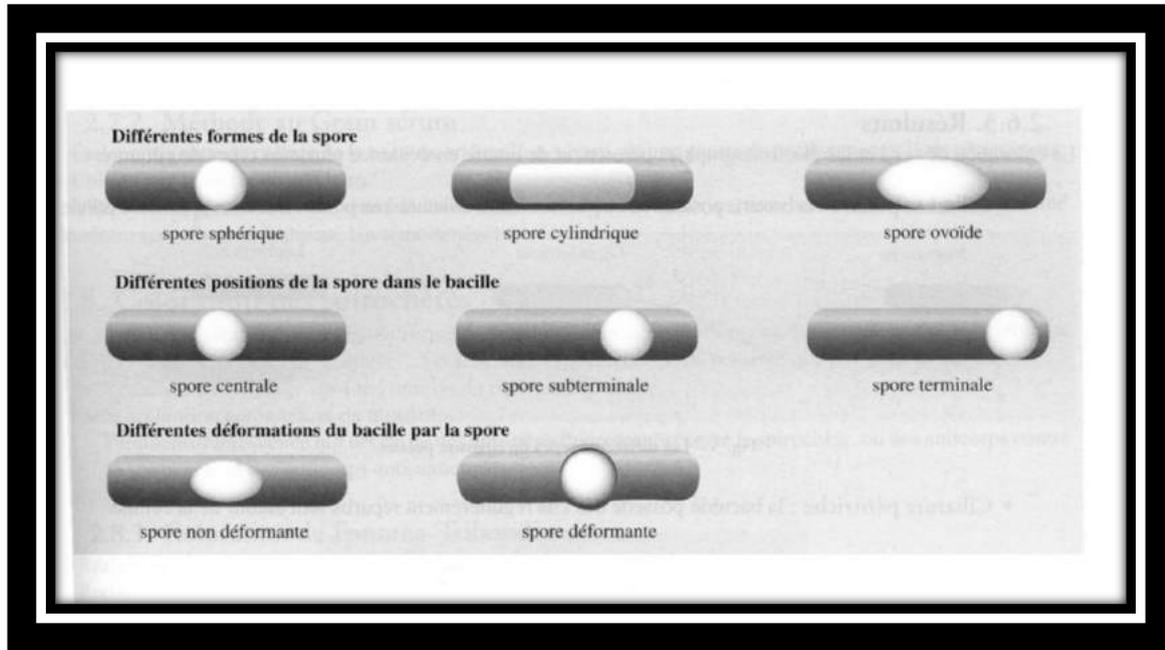


Figure 28 : Morphologie des spores

2.11.2 Structure

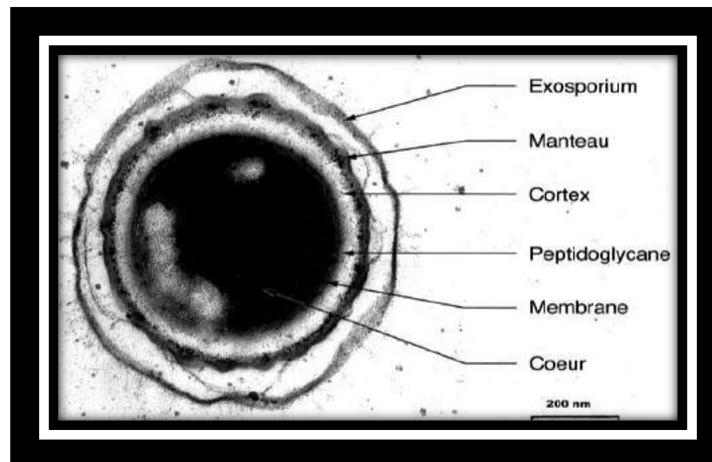


Figure 29 : Structure d'un endospore de *Bacillus anthracis* (x 150000)[14].

La spore possède **une paroi et une membrane plasmique** identiques à celle de la cellule végétative. L'enveloppe la plus externe est mince, appelée **exosporium**. Sous l'exosporium on trouve **le manteau ou la tunique**, composée de plusieurs feuillets protéiques. **Le cortex** est localisé juste sous la tunique. Enfin le **protoplaste** (cytoplasme) ou cœur de la spore, contient les ribosomes, le nucléoïde et des enzymes inactives. [14]

2.11.3 Phénomène de sporulation

Des conditions défavorables de croissance entraînent la sporulation ou l'absence de germination de la spore. Il représente le passage de la forme végétative à la forme sporulée. La sporulation dure environ **10.5 heures**, chez *Bacillus mégathérium* [14]

Elle est provoquée par l'épuisement du milieu en substrat nutritif et elle peut nécessiter des conditions particulières : **absence d'oxygène** pour les Clostridium, **présence d'oxygène** au

contraire pour *B. anthracis*. Le processus de sporulation débute à la fin de la phase exponentielle et se déroule en 6 étapes :

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

Stade II : les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales. Ce septum va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une pré spore caractéristique. [15]

Stade III : Englobement du pré spore.

Stade IV : entre les deux membranes limitant le pré spore se forme la paroi sporale puis apparaît rapidement le cortex. [15]

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

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

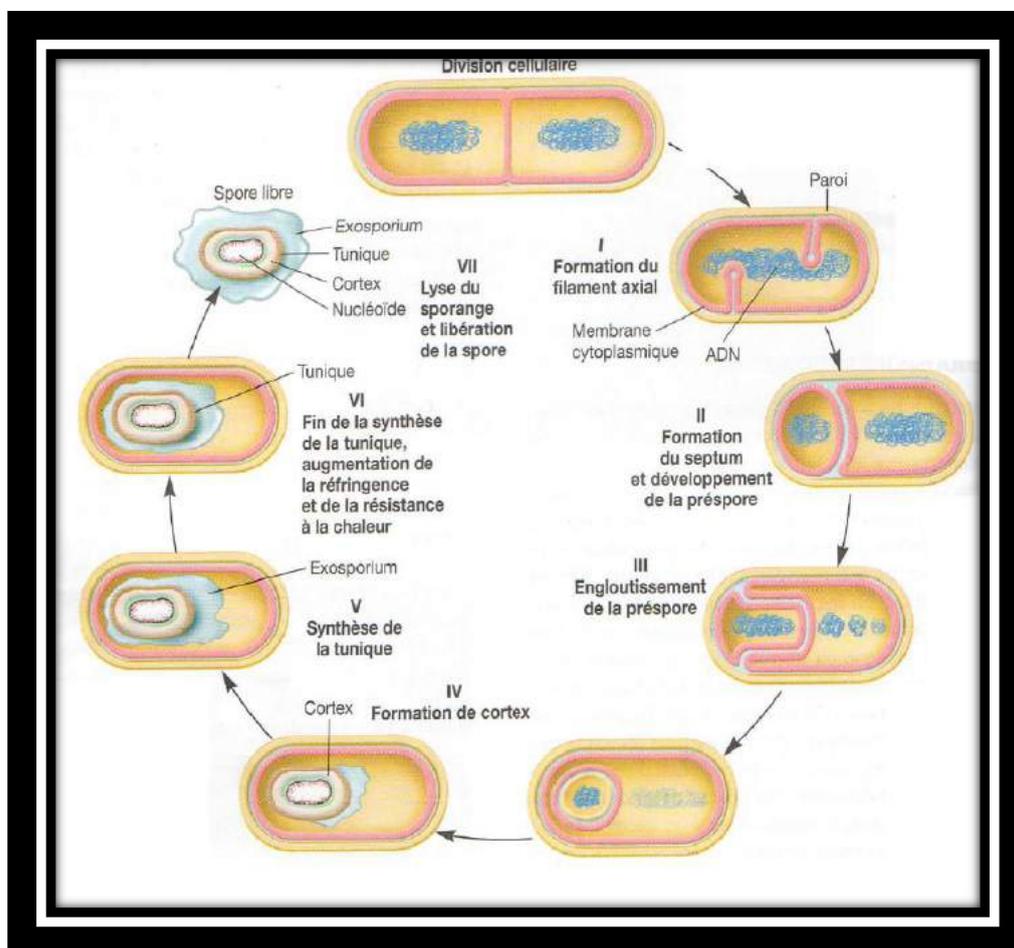


Figure 30 : Le cycle sporale [15].

2.11.4 Propriétés

La spore possède de nouvelles propriétés par rapport à la cellule végétative :

Dans la nature (conditions naturelles), la spore permet de résister aux manques d'eau et de nutriments. [15.14]

Expérimentalement on a démontré les propriétés suivantes :

La thermo résistance : La spore résiste en général à des températures de **70-80°C pendant 10 minutes**, parfois plus. Cette propriété est due à la présence de **l'acide dipicolinique, la déshydratation de la spore et aux protéines « SASP » (petites protéines acides et solubles pouvant se fixer à l'ADN.** [15]

Résistance aux agents physiques et chimiques : La spore résiste aux rayons Ultraviolets, aux rayons gamma (Calcium, et SASP). Aux antiseptiques, désinfectants, antibiotiques (la tunique). [15.13]

Synthèse d'antibiotiques : Certaines bactéries synthétisent des antibiotiques au début de la phase de sporulation. *Exemple* : *Bacillus licheniformis* synthétise ainsi la **Bacitracin** ; *Bacillus polymyxa* la **polymyxine**. Mais aussi **des toxines** (entérotoxines de *Clostridium perfringens*) ou des substances à activité bio pesticide (toxines qui tue des insectes), **le corps parasporal** de *Bacillus thurengiensis* et de *Bacillus sphaericus*. C'est un cristal protéique, lorsqu'il est ingéré par les insectes, il se dissout dans l'intestin et détruit l'épithélium. Les peptides clivés par les protéases passent dans le sang et provoquent la paralysie, suivie de la mort de l'insecte. [15]

2.11.5 Germination

Afin que la spore **germe**, elle doit se trouver dans des **conditions favorables** : eau, nutriments, pH, force ionique, température convenable, aucun d'agent antimicrobien. [15.12.13]

Placée dans des conditions favorables (eau glucose acides aminés) la spore redonne naissance à une cellule végétative. On distingue 3 stades dans le processus de germination :

L'activation : correspondant à une lésion des enveloppes sporales par des agents physiques (choc thermique) ou chimiques (acides, lysozyme) ou mécaniques (abrasion, choc).[15]

Remarque : l'activation thermique est mise à profit au cours de la tyndallisation qui consiste à chauffer 3 fois le produit à stériliser : 30 min à 60°C (destruction des formes végétatives et induction de la germination d'éventuelles spores), le deuxième chauffage à 60°C et pendant 30 minutes, tue les spores issues de la germination et induit la germination des spores résiduelles. Le troisième chauffage dans les mêmes conditions, détruit les dernières formes végétatives. [15.14]

L'initiation débute en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites effecteurs (alanine, magnésium, adénosine) qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées. Des enzymes hydrolytiques dégradent les constituants de la spore ; il y a libération du dipicolinate de calcium. Le cortex ainsi détruit, la spore s'imbibe d'eau et gonfle. [15]

L'émergence de la nouvelle cellule végétative, grâce à l'altération des enveloppes. [15]

Chapitre 3 : Classification bactérienne

Introduction

La science des règles de la classification s'appelle **taxinomie**. Du grecs taxis, qui veut dire ordre et *-nomie* qui signifie lois. La taxinomie permet de nommer les organismes vivants (**la nomenclature**) et de les classer en unités (**taxons**), au sein desquels, ils partagent un grand nombre de caractéristiques communes. [15]

En microbiologie, cela nous permet d'identifier (**l'identification**) les micro-organismes pour mieux les utiliser ou les exploiter (ceux qui sont bénéfiques) ou bien pour mieux s'en protéger et de les contrôler (ceux qui sont pathogènes). [15.12]

La taxinomie microbienne **est en perpétuelle évolution**. Chaque année, de nouvelles espèces sont découvertes. A l'heure actuelle, on connaît à peine 10 à 15% des micro-organismes existant. Le reste est à découvrir. Ce constat est du à notre **incapacité de les isoler** et de les cultiver. L'obtention d'une culture pure est nécessaire pour toute étude taxinomique au sens large, ou plus simplement pour toute identification d'un agent infectieux. [15]

Une confusion existe entre taxinomie et **systematique**. La systematique étudie la diversité biologique et permet de classer, d'organiser les taxons dans un ordre logique. [15.13]

Enfin, on doit définir la phylogénie, comme l'étude de l'histoire évolutive d'un groupe d'organisme à partir d'un ancêtre commun. Elle permet de regrouper les organismes selon leurs liens de parenté. [15.14]

La nomenclature est l'ensemble des règles qui permettent de donner un nom stable à chaque taxon et de réglementer la façon de faire (code international de nomenclature des bactéries).

On distingue deux catégories de noms : **Les noms informels, noms spécialisés et les noms scientifiques des taxons** [15]

Par exemple : **Colibacille** = nom informel - *E.coli O157*, nom spécialisé. On parlera de l'espèce *E. coli* du genre *Escherichia* de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Les noms scientifiques sont des mots latins. [15]

Règles de formation des noms : On utilise le **système binomial** du botaniste suédois **Carl Von Linné**.

La première partie du nom est le nom du Genre, la seconde partie est celui de l'espèce. [16]

Le genre : écrit en Italique. Avec sa première lettre en **majuscule**. Après sa citation le nom du genre est abrégé à sa première lettre. [16]

L'espèce : écrite en Italique (ou souligné dans les livres et manuscrits). Avec sa première lettre en minuscule. [16]

La famille : Le nom est fondé sur un genre valide, il est féminin, pluriel et se termine par **-aceae**. [16.14]

Les principaux taxons par ordre décroissant (hiérarchie taxinomique)

Domaine	Bacteria
Règne	non défini
Phylum	<i>Protéobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i> (ensemble d'espèces)
Espèce	<i>Escherichia coli, E. coli</i> (ensemble de souches)

« *Il ne faut pas confondre classification et identification des micro-organismes. Une étude de classification permet de sélectionner une liste de caractéristique et une approche qui facilitera l'identification. Les techniques d'identification sont plus simples et rapide à faire au laboratoire, comparées aux méthodes de classification* ».

Plusieurs méthodes ont été développées pour la classification et l'identification des micro-organismes. On distingue, les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques [16.15]

3.1. Classification phénotypique

Depuis la classification proposée par Cohn en 1872 et jusqu'au début des années soixante, toute la taxonomie bactérienne reposait sur une classification phénétique. [16.12.13]

La classification phénétique (ou phénotypique) utilise un nombre de caractères considérés comme importants :

Observations macroscopiques, microscopiques et caractères tinctoriaux :

Descriptions des **colonies** (forme, taille, couleur, odeur) ; **la morphologie des cellules** (bacille, coque) ; leurs **arrangements**. **Les colorations** (Gram, bleu méthylène, acido-alcool-résistante). Observation de **la mobilité** à l'état frais. On peut également rechercher la présence **d'endospores**, la croissance **aérobie, anaérobie**. [16]

Les caractères morphologiques sont utiles pour l'identification, mais ne peuvent pas démontrer à eux seuls les relations phylogénétiques. [16]

-Les Tests métaboliques :

Très importants, ils peuvent distinguer des bactéries très apparentées. On recherche la présence d'enzymes (oxydase, catalase), la dégradation de l'urée, de l'esculine. La transformation du lactose et la production de gaz, l'utilisation de différents sucres comme source de carbone, l'utilisation du citrate, la production d'acétoïne. [16]

Ces techniques ont été miniaturisées dans des galeries spécialisées (API), on peut faire 20 tests sur une même galerie spécifique des entérobactéries [16]



Figure 31 : Tests métaboliques en mini galerie API [16].

-La méthode sérologique : Le sérodiagnostic et le stéréotypage est basé sur la réaction spécifique **antigène – anticorps**. Cette méthode permet de différencier des espèces et même des souches au sein d'une même espèce. Les antigènes ciblés sont les Ag O chez les Gram négatives, les Ag H flagellaires et les Ag K capsulaires. [16.12]

-Les tests d'inhibition : On évalue la croissance des micro-organismes sur des milieux sélectifs, en présence d'antibiotiques (**antibiogramme**). [16.12]

-La chimio taxonomie : On détermine le profil **des acides gras des parois**. Le Profil **des protéines totales** par électrophorèse (séparation selon le pHi et le poids moléculaire). [16.14]

-La Lysotypie : Infection par des bactériophages et formation de plages de lyses. [16]

On définit le **lysovars** ou le **lysotype**

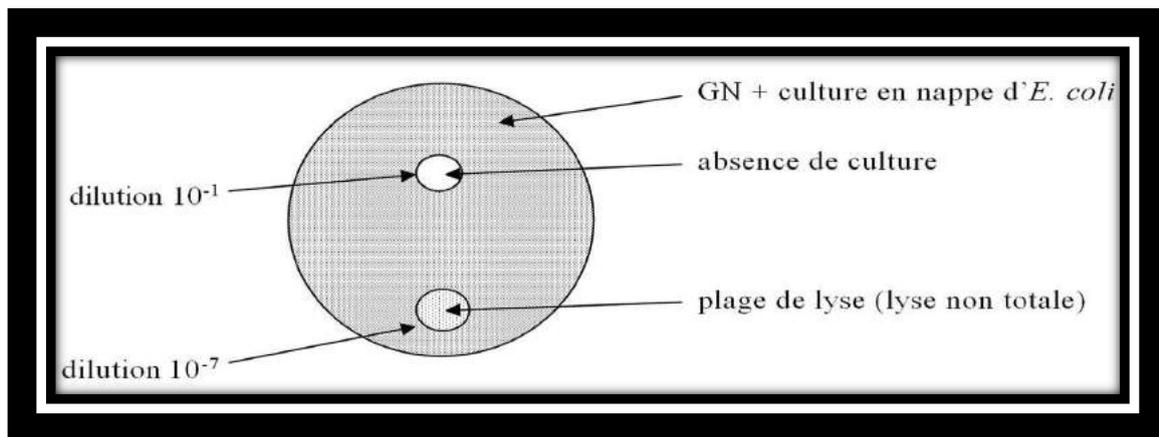


Figure 32 : Lysotypie d'*E. coli* par un bactériophage (absence de culture signifie une lyse). [16]

Pour construire une classification avec ces caractères phénotypiques, il faut donner un poids ou une valeur. [16.12]

Cette approche a été appliquée aux bactéries en 1957 par Sneath. Cette approche est appelée taxinomie numérique. [16]

Une bonne étude de taxinomie numérique doit contenir, en plus des isolats inconnus, **des souches sauvages** et des **souches types de collections**. [16]

Le nombre de caractère analysés doit être compris entre 50 et 100 au mieux. Le résultat sera codé en code binaire pour chaque test (0 ou 1). [16]

0 = test négatif ou absent & 1= test positif ou présent

Il faut bien sélectionner les tests, (enlever les tests toujours positifs ou négatifs, les tests redondants comme mobilité et présence de flagelle). [16.11.13]

L'analyse se fait par un programme informatique (**programme d'agrégation** ou « **Cluster analysis** ». Il évalue la ressemblance entre les souches en calculant **l'indice numérique, l'indice de Jacquard**. [16.15]

3.2. Taxonomie génétique ou phylogénique

Les critères sont recherchés :

La taille du génome

La composition des bases d'ADN sous la forme de pourcentage de G+C (GC%)

Le taux d'hybridation ADN/ADN

La séquence de l'ADN qui code pour l'ARN ribosomal 16 S

3.2.1. La taille du génome

Selon les espèces voir les genres la taille du génome est variable. Les bactéries paratrophes (parasite, intracellulaire obligatoire) le génome est très réduit. [17]

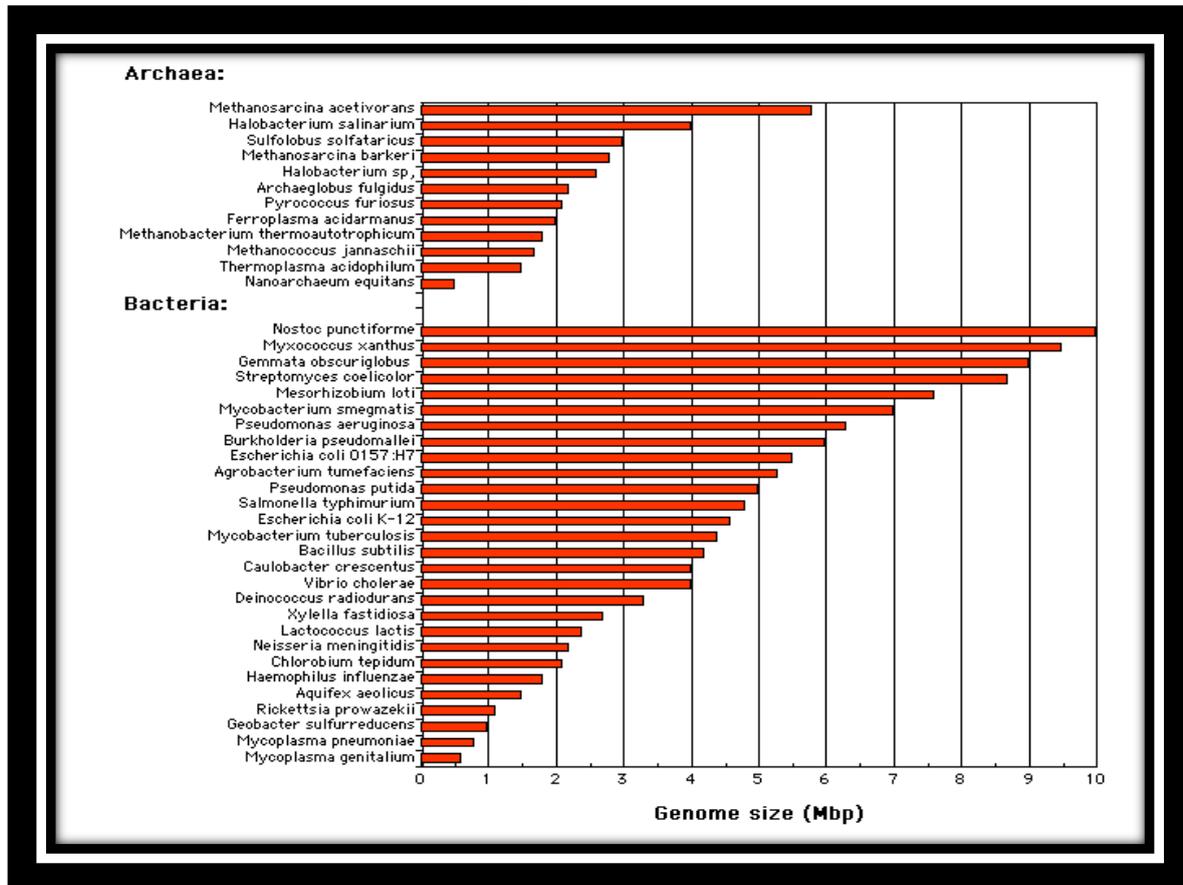


Figure 33 : Taille des génomes

Tiré de : <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/chroms-genes-prots/genomes.html>

3.2.2 Composition en base d'ADN (Coefficient de Chargaff)

Du nom de la personne qui a remarqué (dans les années 1940) que :

Quel que soit l'espèce d'origine, l'ADN contient toujours autant de purine que de pyrimidine soit :

$$(A + G) = (C + T) \text{ ou } (A+G) / (C+T) = 1$$

De plus, il y a autant de thymine que d'adénine $A/T = 1$, autant de guanine que de cytosine $G/C = 1$

Par contre, le rapport $(A+T)/(C+G)$ varie beaucoup : **il est caractéristique de l'espèce.**

Ce coefficient est appelé coefficient de Chargaff. Il peut être calculé suite à un séquençage par la formule suivante $((G+C) / (A+T+G+C)) \times 100$

Ou bien par une méthode de spectrométrie ultra-violet. [17]

Les deux brins d'ADN peuvent se séparer par rupture des liaisons hydrogènes qui lient les bases. [17]

On peut observer ce phénomène en chauffant la solution (ou milieu acide ou basique qui ionise les bases). Ce phénomène est appelé **fusion**. La température de fusion (**Tm**), est la

température ou 50% de l'ADN est déroulé. On la mesure par spectrophotométrie à 260 nm. Lors de la fusion la DO₂₆₀ augmente c'est l'effet hyperchrome. [13.8]

La température de fusion T_m varie avec la teneur en GC% de l'ADN. [13.8]

Exemple: *E. coli* T_m = 72°C (GC% = 50) • *P. aeruginosa* T_m = 79°C (GTC% = 66). La valeur du T_m est variable, il dépend de la composition en bases de l'ADN. Plus la teneur en (G+C) d'un ADN est importante, plus la valeur du T_m est grande car les 2 brins sont d'autant plus difficiles à séparer car maintenues par plus de liaisons H. (3 liaisons pour GC contre seulement 2 pur AT) [17.16]

3.2.3 Hybridation ADN/ADN

Les températures clés et leurs définitions

T_m : Point de fusion (Thermal elution midpoint) : Température de dénaturation de 50% de l'hybride

T_{or} : Température optimale de renaturation : 25° à 30°C < Température de dénaturation

T_{rr} : Température restrictive de renaturation: 10 à 15 °C < Température de dénaturation

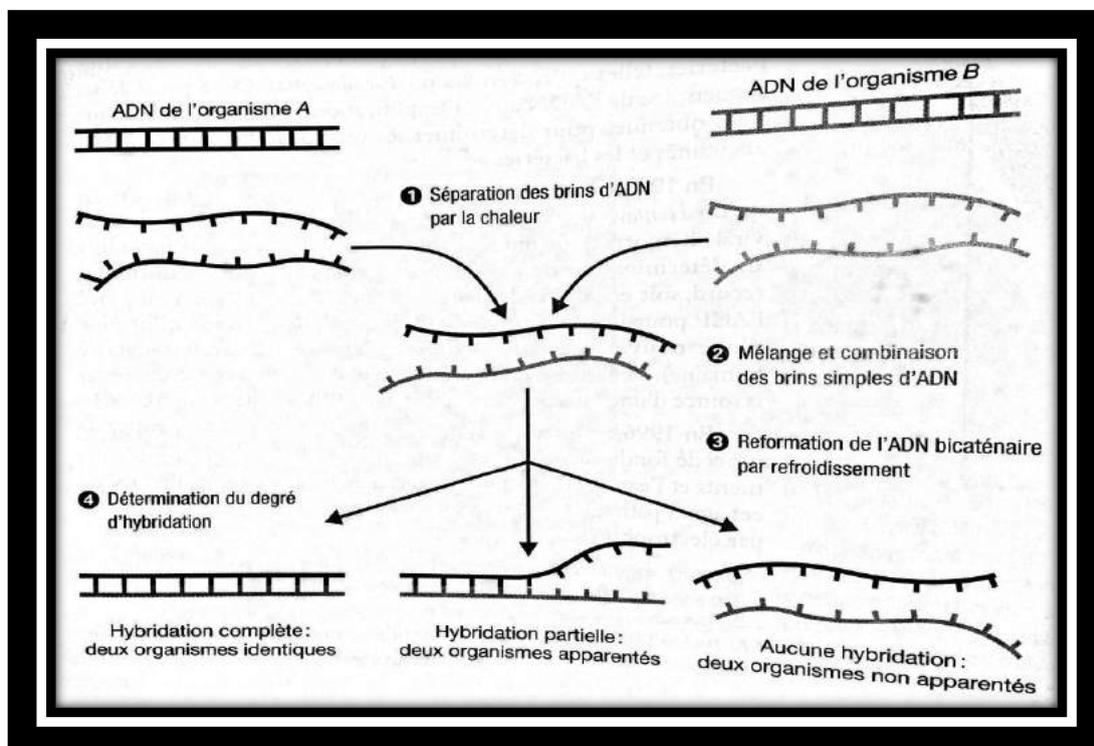


Figure 34 : Hybridation ADN/ADN [17].

Grace à cela on a démontré qu'en réalité que *Shigella* et *Escherichia* forment génétiquement la même espèce, ainsi que *Salmonella* et *Arizona*.

A. Homologie ADN/ADN à T_{or}

La renaturation ou hybridation, est maximum à T_{or}.

T_{or} = 60°C pour les Entérobactéries.

L'homologie, c'est-à-dire le % de base appariées / aux bases totales est de 70 à 100 % pour des mêmes espèces. [17]

Elle est de 0 à 60 % pour des espèces différentes

B. Stabilité thermique des hybrides

On utilise le T_m . Après l'obtention des hybrides à T_{or} (Température optimale de renaturation), On augmente la température doucement au-dessus de T_{or} pour avoir que 50% de dénaturation de l'hybride. [17.16]

On compare les hybridations homologues et hétérologues en parallèle (A x A et A x B). La différence de stabilité thermique ΔT_m est proportionnelle au % de bases non appariées.

1 à 1,6 °C de $\Delta T_m = 1\%$ de bases non appariées. [17]

Mêmes espèces : ΔT_m entre 1 et 5°C (5% de base non appariées).

Espèces différentes : ΔT_m entre 7 et 20° C. [17.15]

De nombreux taxinomistes pensent que seule une combinaison des données génotypiques et phénotypiques peut permettre d'établir une phylogénie. **C'est l'approche polyphasique.**

Les taxonomistes utilisent un maximum de caractères écologiques, morphologiques, métaboliques comme des propriétés moléculaires, afin d'obtenir les résultats les plus fiables et les plus réalistes. [17.15]

3.3 La Classification selon le manuel de Bergey

Ce qu'il faut savoir c'est qu'il n'existe pas une classification officielle des bactéries, mais on se réfère à la classification du manuel de Bergey. Cette classification est la plus acceptée par tous les microbiologistes. [17]

Dans ces premières éditions, en 1936, elle se basait sur l'étude :

De leur morphologie microscopique (bactérie de type coque, bacille, vibrion ; isolés, par deux, en chaînettes...). [17.13]

De leur morphologie macroscopique (taille, forme, couleur... des colonies sur milieux de culture gélosés) [17]

De leur mobilité (mobilité ou immobilité à une température donnée)

De la présence de spores (à l'état frais ou après coloration)

Du résultat de la coloration de Gram (coloration de Gram positive ou négative)

De la température de croissance (4° C, 20° C, 30° C, 37° C...), du type respiratoire (aérobie, anaérobie strict, aéro-anaérobie facultatif, micro aérophile..), des besoins nutritionnels (nécessité de substances particulière pour le développement), de la capacité à utiliser certaines sources de carbone ou d'azote (on parlera de biotypes ou biovars). [18]

A cette période, les procaryotes étaient répartis en 4 divisions reconnues sur la base de l'existence ou non de la paroi. : Les Gracilicutes, les Firmicutes, les Tenericutes, les Mondosicutes. [18]

I-Gracilicutes *Gracilis cutis* : peau fine. (Eubactéries Gram -)

Anoxyphotobacteriae (photosynthèse sans production d'oxygène)

Photobacteriae (cyanobactéries)

Scotobacteriae (pas de photosynthèse)

II-Firmicutes *Firmus cutis* : peau dure. (Eubactéries Gram +)

Firmibacteriae (% G+C faible)

Thallobacteriae (%G+C fort, ramifiées)

III-Tenericutes *Tener cutis* : peau tendre. (Eubactéries sans paroi, gram -)

Mollicutes

IV-Mendosicutes *mendosus c cutis* : peau défectueuse

Archaeobacteria (archéobactérie gram + / -).

Dans l'édition récente, moderne avec l'utilisation de la classification polyphasique :

Les procaryotes sont divisés en **deux domaines** *Eubacteria* et *Archaeobacteria* qui comprennent **34 phylums**. 30 pour *Eubacteria* et 5 pour *Archaeobacteria*

Chapitre 4 : Nutrition bactérienne

Introduction

Une bactérie peut avoir un métabolisme intense qui se traduit par une augmentation de la taille, mais, surtout du nombre des cellules. Cet état est dit **végétatif**. Dans certaines conditions, la bactérie ralentit son métabolisme et ne se divise plus. C'est l'état **de repos**. Dans les deux états, la bactérie a des besoins nutritifs (pour se diviser ou juste se maintenir en vie). Selon la nature de ces besoins, on définit des bactéries **prototrophes** et des bactéries **auxotrophes**. [18.17]

Les bactéries prototrophes ont des besoins élémentaires (**Eau-source d'énergie-source de carbone et d'azote – macro et micronutriments**). Les bactéries auxotrophes nécessitent en plus des besoins élémentaires, **des facteurs de croissances**. **Les facteurs environnementaux** sont également très importants pour la croissance, le **pH, la température, la pression osmotique, la présence ou non d'oxygène**. [18.16]

4.1 Besoins élémentaires

4.1.1 L'eau

L'eau représente 70% du poids cellulaire total chez *Escherichia coli*. Elle solubilise les nutriments, elle joue un rôle important dans leur transport et ceci dans les deux sens. C'est le solvant de la vie, où se déroulent toutes les réactions métaboliques (catabolisme plus anabolisme). [18.17]

Un paramètre appelé « **Activity of water** », **Aw, ou activité de l'eau**) quantifie la disponibilité de l'eau libre, non associée aux nutriments. Elle varie de 0 à 1

Certains germes ne se développent que pour une valeur de l'Aw supérieure à 0,97. A l'opposé, les bactéries halophiles qui nécessitent la présence de sel (NaCl, 1 à 15%) l'Aw est de l'ordre de 0.75. [18]

Les endospores peuvent survivre dans un environnement dépourvu d'eau libre. Le degré d'humidité des aliments a une influence sur leur conservation et leur séchage. C'est un procédé de conservation basé en partie sur la diminution de l'Aw. [18.17]

4.1.2 Source d'énergie

Sur la base de la source d'énergie, on distingue **les bactéries chimiotrophes et les bactéries phototrophes**. [18.17]

Les bactéries chimiotrophes puisent leurs énergies des réactions chimiques d'oxydoréduction. Si les composés (donneurs d'électrons) sont inorganiques comme H₂S, H₂, Fe²⁺ ou NH₃ ..., les bactéries sont dites **chimiolithotrophe**. Si le donneur d'électron est organique, elles sont dites **chimioorganotrophe**. La réaction type peut se résumer comme suit : D = donneur électrons ; A= accepteur d'électron

DH₂ + A D + AH₂ + énergie [18]

Les bactéries phototrophes puisent leur énergie de la lumière. Si la source d'électrons est minérale, les bactéries sont dites **photolithotrophes**, si la source d'électrons est organique, les bactéries sont dites **photoorganotrophes [18]**

4.1.3 Source de carbone

Le carbone est l'élément constitutif le plus abondant chez les bactéries. Si la source est le dioxyde de carbone (CO₂) les bactéries sont dites **autotrophes**, c'est le cas des bactéries **phototrophes** et la plupart des bactéries **chimiolithotrophe**. Si la source de carbone assimilable est un substrat organique, ces bactéries sont qualifiées **d'hétérotrophes**. [18]

Les bactéries **hétérotrophes** peuvent dégrader de nombreuses substances hydrocarbonées : alcools, acides organiques, sucres ou polyholosides. La liste des substrats carbonés utilisables par une souche bactérienne comme unique source de carbone et d'énergie constitue **l'auxanogramme de la souche**. [18]

4.2 Facteurs de croissance

Selon les besoins nutritionnels nécessaire à la croissance des bactéries, on a défini les bactéries **prototrophes** et les bactéries **auxotrophes**. Les prototrophes ont des besoins élémentaires, alors que les auxotrophes nécessitent en plus, un ou plusieurs **facteurs de croissance** qu'elles sont **incapables de synthétiser**. Soit ils sont fournis par l'environnement ou rajouter dans le milieu de culture. [19]

A ne pas confondre avec **un métabolite essentiel** est un composé organique indispensable à la croissance des bactéries mais, qu'elles sont capables de synthétiser. [19]

Les facteurs de croissance sont **des vitamines B1, B6, B12, acide folique, des précurseurs de coenzymes (de NAD, de coenzyme A, de FMN, de FAD)**. La **syntrophie** est un phénomène d'interaction métabolique, qui se traduit sur un milieu solide par la présence de colonies satellites d'une bactérie auxotrophe autour de celles d'une bactérie Prototrophe productrice du facteur de croissance. [19]

4.2-1 Particularités du métabolisme bactérien

Les cellules bactériennes sont trop petites pour stocker toutes les enzymes nécessaires à leur métabolisme. Elles les synthétisent au fur et à mesure de leurs besoins et selon la nature des substrats. Les enzymes sont généralement inductibles par la présence du substrat. De plus, les grosses molécules (2) ne peuvent pas traverser la paroi et la membrane plasmique. [19]

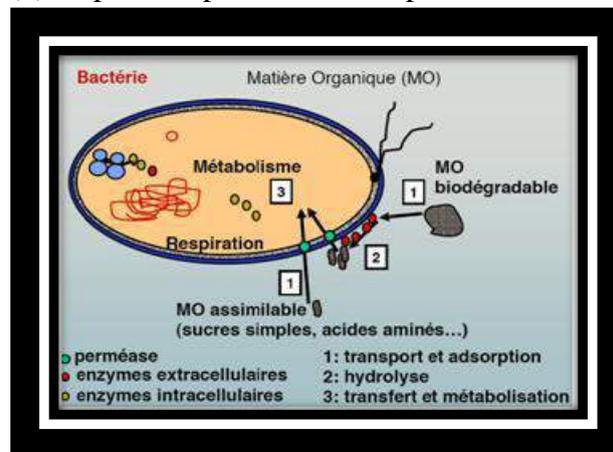


Figure 35 : Métabolisme bactérien [19].

Les bactéries sécrètent des exo enzymes pour les dégrader en petites molécules transportables par des perméases (1). Une partie du catabolisme est effectuée à l'extérieur de la cellule. [19.18]

4-3- Types trophiques

Les **photos autotrophes** sont photosynthétiques. On peut citer les cyanobactéries, les bactéries vertes, les bactéries pourpres non sulfureuses. [19.18]

La photosynthèse bactérienne est différente de celle des végétaux supérieurs. Elle ne conduit jamais à la libération d'oxygène libre. Les pigments et les donneurs d'électrons sont également différents (hydrogène, soufre, jamais l'eau comme chez les plantes). [19.18]

Les **photo hétérotrophes** sont photosynthétiques et puisent le carbone de composés organiques. [19.18]

Les **chimio autotrophes**, n'ont besoin ni de matière organique, ni de lumière du soleil. Ils puisent leur énergie de substance inorganique et transforme le CO₂ en matière organique. Comme exemples, les bactéries des sources chaudes hydrothermales profondes (fumeurs noirs). Elles nourrissent tout un écosystème [19]

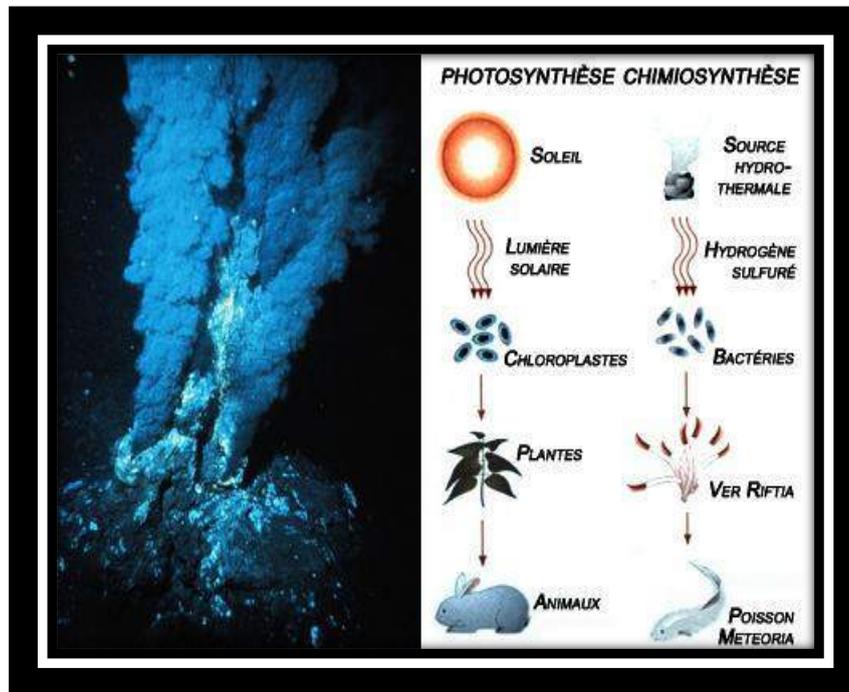


Figure 36 : Fumeurs noirs au fond des océans [19].

Comme deuxième exemple, on peut citer les **bactéries méthanogènes** (Archaea) qui synthétisent le méthane (CH₄) à partir de CO₂. [17.18]

Les **chimio hétérotrophes** puisent leur énergie et leur carbone des substances organiques. C'est le cas de la plus part des bactéries d'intérêt médical (pathogènes). [19-18]

La synthèse des protéines et des acides nucléiques nécessite des substances azotées. L'azote représente 12% du poids sec des bactéries et 80% de l'air qu'on respire. [19-18]

Le cycle biogéochimique simplifié de l'azote:

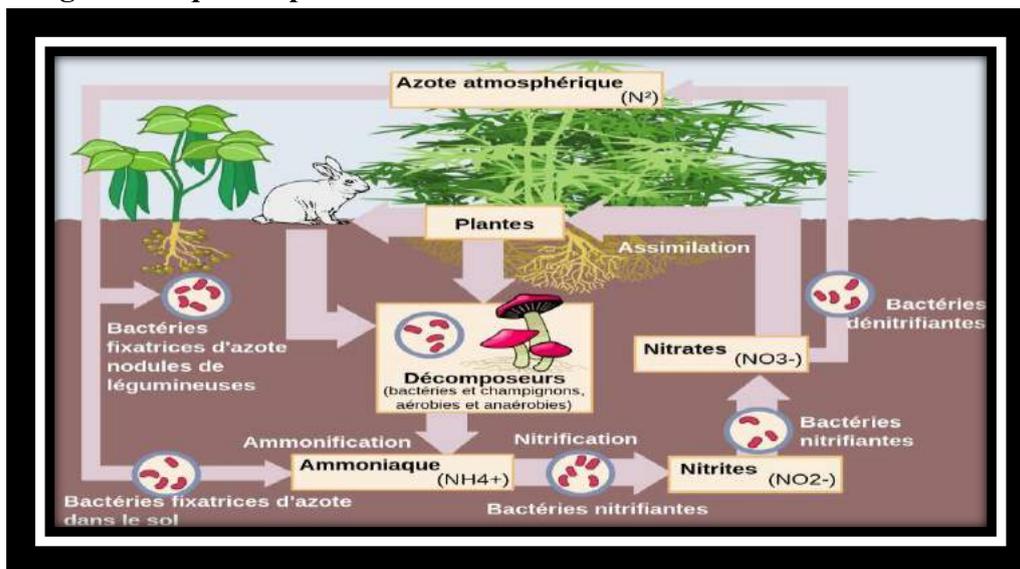


Figure 37 : Le cycle biogéochimique simplifié de l'azote [19].

L'azote moléculaire (N_2) est fixé par quelques bactéries vivant en symbiose avec des légumineuses (bactéries fixatrices d'azote) ou des champignons ou par des bactéries jouant un rôle dans la fertilisation des sols. [19-17]

Pour la majorité des bactéries la source d'azote est constituée par d'autres composés inorganiques (ammoniaque, nitrites, nitrates) ou par des sources organiques (groupements amines des composés organiques). [19-17]

4.3-1 Macronutriments

Les bactéries ont besoin de **phosphore, de soufre, de magnésium, de calcium et de sodium.**

Le phosphore est important dans la synthèse des acides nucléiques et phospholipides des membranes plasmiques et externes. Sans oublier l'ATP (énergie). [19-17]

Il est apporté sous forme de phosphate organique et inorganique [19]

Le soufre est retrouvé au niveau de deux acides aminés qui jouent un rôle dans les ponts disulfure (**la méthionine et la cystéine**). Il intervient dans les structures complexes des protéines. Il est également utilisé dans la synthèse des vitamines. (Biotine, coenzyme A). Le soufre cellulaire est d'origine inorganique (sulfate SO_4^- , sulfure métallique FeS , CuS , ZnS). [19.17]

Le potassium joue un rôle comme cofacteur enzymatique, **le magnésium** aussi, qui, en plus a une fonction de stabilisateur de structures cellulaires. [19.18]

Le calcium joue un rôle important dans la résistance à la chaleur des endospores (chez *Bacillus*, *Clostridium*). Il stabilise également la paroi des bactéries. [19.18]

Le sodium est important pour la croissance des bactéries **halophiles** (du grec halo, sel et philein, aimer). [19]

Enfin **le Fer**, qui intervient dans la chaîne respiratoire (bactéries aérobies), élément des cytochromes au niveau de la membrane plasmique. Les bactéries possèdent des **Siderophores** qui capturent **le fer** insoluble et le transportent à l'intérieur des cellules bactériennes. [19]

4.3-2 Les oligoéléments

Ils sont indispensables à la cellule en très faibles quantités. On peut citer le cobalt, le zinc, le bore, le cuivre, le manganèse, le sélénium... Très importants pour le fonctionnement des enzymes. Ils ne sont pas tous requis par une même espèce. [19.18]

4-4- Les paramètres physico-chimiques

Les facteurs environnementaux, comme la température, le pH, la salinité, l'osmolarité et l'oxygène influencent et contrôlent la croissance bactérienne. Chaque bactérie possède des valeurs optimales pour chaque facteur et par conséquent, selon les valeurs optimales, on définit différentes catégories de bactéries. [19.16]

4-4-1 Température

Les psychotroques : Peuvent se cultiver à 0°C. Température optimale de multiplication entre 20 à 25 °C. Les bactéries psychrophiles : Température maximale 20°C. Température optimale de croissance inférieure à 15 °C. [19]

Les cryophiles : peuvent se développer à des températures négatives. Elles sont souvent isolées des matières fécales d'animaux polaires. Température optimale de croissance (- 5 °C).

Les mésophiles : croissance entre 25 et 40 °C. Optimum à 37°C. la majorité des bactéries pathogènes. Les thermophiles : température optimale entre 50 et 60 °C. Les hyperthermophiles ont une température optimale de croissance entre 70 °C et 110°C. [19]

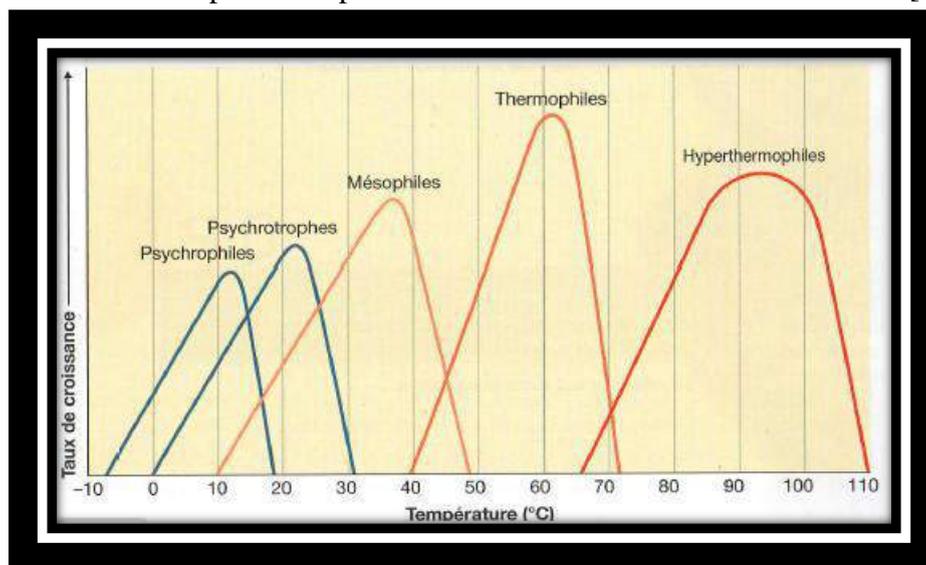


Figure 38: Taux de croissance en fonction de la température [19]

4-4-2 pH

La majorité des bactéries se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (6,5 à 7,5), mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH. On distingue :

Les acidophiles préfèrent un pH acide. C'est le cas des lactobacilles dont le pH optimal est de 6. *Thermoplasma acidophilum* a un pH optimal entre 0,8 et 3. [19]

Les **alcalophiles** préfèrent des pH alcalins. Ainsi, le pH optimal est de 9 pour la multiplication de *Vibrio cholerae*. *Alkaliphilus transvaalensis* est capable de croître à un pH de 12,5. En culture, le métabolisme bactérien engendre des acides qui inhiberaient la multiplication bactérienne. Pour éviter cela, on rajoute des solutions tampons qui maintiennent un pH optimal. [19]

4-4-3 Pression

Les bactéries **barophiles** (du grec *baros*, poids, pesanteur), ont une La croissance optimale dans une atmosphère dont la pression est supérieure à la pression atmosphérique. Ce sont les bactéries des eaux profondes des mers et des océans. [19]

4-4-4 Pression osmotique

Les bactéries sont peu sensibles aux variations de pression osmotique car elles sont **protégées par leur paroi**. A l'inverse des Mycoplasmes. [18-19]

Selon leur sensibilité à la pression osmotique, on distingue trois catégories de bactéries. **Les bactéries non-halophiles** : NaCl est inférieure à 0,2 M. [19.20]

Les espèces halophiles : NaCl supérieure à 0,2 M pour les moins halophiles (*Cobetia marina*) à 5,2 M pour les plus halophiles *Halobacterium salinarum*. [19]

Les espèces halotolérantes comme les *Staphylococcus*, les *Listeria* ou les *Lactobacillus*. Ils tolèrent 7.5 à 15% de NaCl. Les anciens conservent les aliments en rajoutant du sel ou du sucre ce qui entraine une augmentation de la pression osmotique. La croissance des bactéries est limitée. [20]

Les bactéries **osmophiles** se multiplient en présence de grandes concentrations de sucre. [20,19]

4-4-5 Besoins gazeux

L'oxygène est en réalité un gaz très toxiques s'il n'est pas neutraliser par les cellules qui en ont besoin. Lors de la respiration aérobie, il est neutralisé en se combinant à l'hydrogène pour former une molécule d'eau. C'est le cas des **aérobies stricts**. Ils utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons et neutralisent les différentes formes toxiques (radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle ...) par différentes enzymes (**catalase, oxydase, superoxyde dismutase**) [20]

	a) Aérobie stricts	b) Anaérobies facultatifs	c) Anaérobies stricts	d) Anaérobies aérotolestants	e) Microaérophiles
Effet de l'oxygène sur la croissance	Croissance aérobie seulement; la présence de molécules d'O ₂ est essentielle.	Croissance aérobie ou anaérobie; croissance optimale en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance anaérobie seulement; arrêt de la croissance en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance anaérobie seulement; toutefois, la croissance se poursuit en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance aérobie seulement; les molécules d'O ₂ sont essentielles en faible concentration.
Croissance bactérienne dans un tube contenant un milieu de culture solide					
Explication du modèle de croissance	La croissance a lieu seulement là où une forte concentration de molécules d'O ₂ a diffusé dans le milieu.	La croissance est optimale là où la concentration de molécules d'O ₂ est la plus élevée, mais elle a lieu partout dans le tube.	La croissance a lieu seulement là où il n'y a pas de molécules d'O ₂ .	La croissance est uniforme partout dans le tube; la molécule d'O ₂ n'a aucun effet.	La croissance a lieu seulement là où une faible quantité de molécules d'O ₂ a diffusé dans le milieu.
Explication des effets de l'oxygène	La présence d'enzymes (catalase et superoxyde dismutase SOD) permet la neutralisation des formes toxiques de la molécule d'O ₂ , qui peut alors être utilisée.	La présence d'enzymes (catalase et SOD) permet la neutralisation des formes toxiques de la molécule d'O ₂ , qui peut alors être utilisée.	Il n'y a pas d'enzyme permettant la neutralisation des formes toxiques de la molécule d'O ₂ ; la molécule d'O ₂ n'est pas tolérée.	La présence d'une enzyme, la SOD, permet la neutralisation partielle des formes toxiques de la molécule d'O ₂ ; la molécule d'O ₂ est tolérée.	Des quantités létales de formes toxiques de la molécule d'O ₂ sont produites en présence d'O ₂ atmosphérique.

Figure 39 : Comportement des bactéries vis-à-vis de l'oxygène et types respiratoire [20]

Les anaérobies facultatifs peuvent croître en absence ou en présence d'oxygène. Mais leur croissance est maximale en présence de ce dernier (Production d'ATP élevée). En absence d'oxygène, elle utilise la fermentation ou la respiration anaérobie pour produire de l'énergie. C'est le cas *d'E. Coli*. [20]

Les anaérobies stricts n'ont aucune enzyme capable de neutraliser les formes toxiques de l'oxygène. Leur croissance doit se faire dans une atmosphère dépourvue d'oxygène. C'est le cas de *Clostridium*. [20]

Les anaérobies aérotolérants n'utilisent pas l'oxygène pour leur croissance mais ce gaz n'a aucun effet sur elles. C'est le cas des **Lactobacilles**. [20]

Les micros aérophiles qui ont besoin d'oxygène, mais à une proportion inférieure à celle de l'air. [20]

Enfin, les **coprophiles** qui exigent la présence de concentration très élevées de CO₂ (10 à 30 fois supérieures à celle de l'air). Ces bactéries poussent à l'intérieur des hôtes (humain ou animaux). C'est le cas de *Helicobacter pylori* ; *Neisseria gonorrhée* [20.19]

Chapitre 5 : Croissance bactérienne

Introduction

La croissance bactérienne se traduit par **une augmentation du nombre de bactéries**. On observe également un allongement de la taille et une augmentation du volume, plus visibles chez les formes en bâtonnets. Ces dimensions, lorsqu'elles sont atteintes, déclenchent la division cellulaire par **scissiparité**. Une bactérie donne deux cellules filles [21]

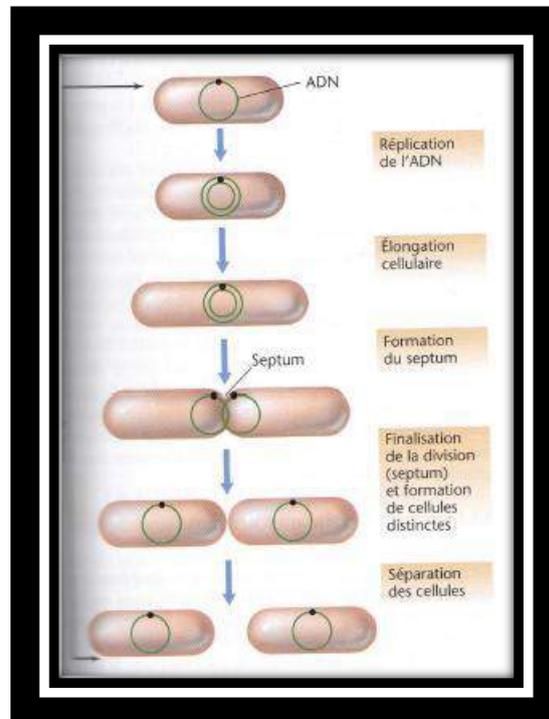


Figure 40 : La division par scissiparité [21].

D'autres mécanismes de division existent chez des bactéries particulières, comme **le bourgeonnement** (observé chez les cyanobactéries) et **la fragmentation** (chez les bactéries filamenteuses). [21]

Le point de division est appelé septum qui va former la cloison qui séparera les deux cellules filles. Chaque cellule recevra une copie du chromosome et la moitié des composants cellulaires. [21.20]

Chez *Escherichia coli*, des protéines appelées **Fts (filaments sensibles à la chaleur)**, ressemblant aux microtubules des cellules animales, jouent un rôle important dans cette division en formant un anneau **FtsZ** transversal où vont se concentrer toutes les enzymes nécessaires à la division, synthèse du septum, de la paroi des cellules filles... [21.19]

5.1 Mesure de la croissance

Plusieurs techniques sont utilisées pour analyser, suivre et mesurer la croissance. Chacune a des avantages et des inconvénients. On distingue les méthodes directes et les méthodes indirectes. Certaines distinguent les cellules vivantes des cellules mortes et d'autres, en sont incapables. [21]

5.1.1 Mesures directes : Dénombrement des bactéries après culture

Le résultat est exprimé en nombre **de bactéries par ml**. On peut partir de 1 ml de lait, de jus ou quelques mg de viandes broyées, dans 9 ml d'eau stérile (**première dilution 1/10**).

On procède ensuite à une dilution en série de **1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000**. Ensuite, 1 ml de chaque dilution est étalé soit **en profondeur** soit **en surface** en utilisant des milieux solides sur boîte de Pétri. [21]

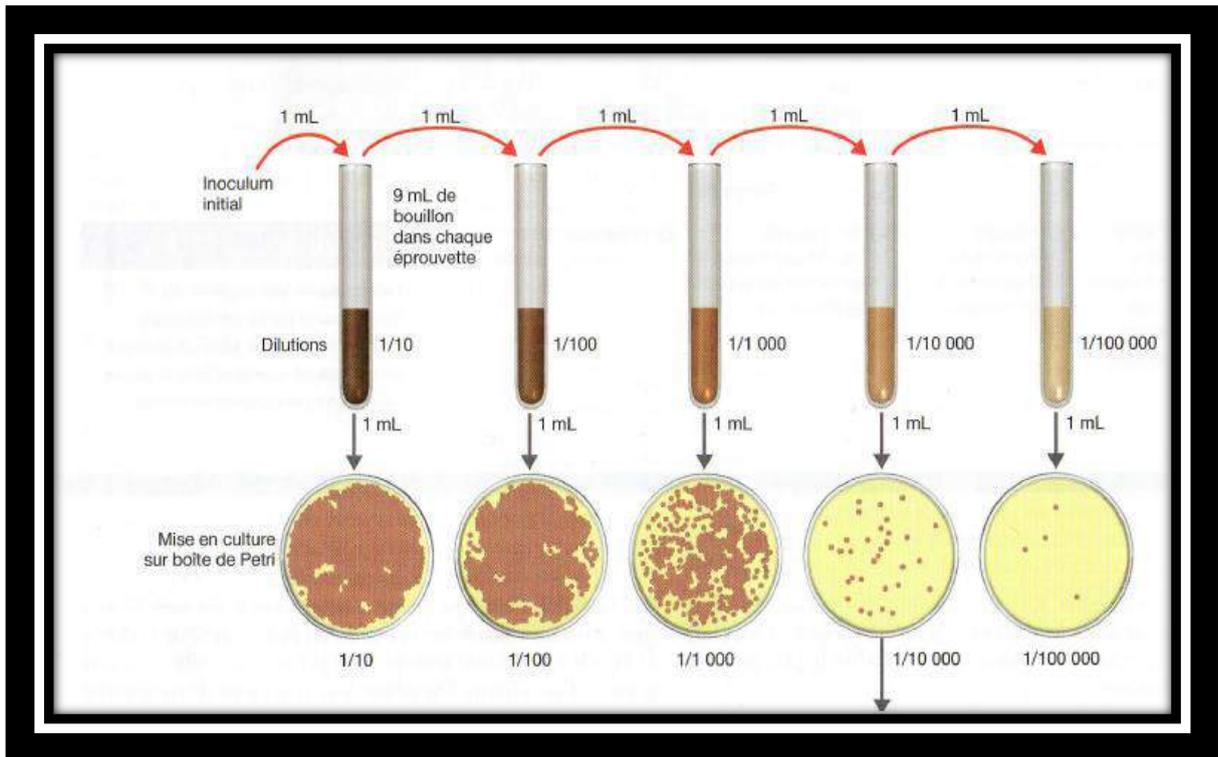


Figure 41 : Mesures directes : Dénombrement des bactéries après culture [22].

On prend en considération les boîtes de 30 à 300 colonies. [22]

Le nombre de bactérie. [22]

Le calcul se fait comme suit : **(dilution 1/10000, 125 colonies obtenues) : $125 \times 10000 = 1,25$ million bactérie par ml.** [22]

On suppose dans ce cas que chaque colonie est issue d'une bactérie, mais **en réalité c'est faux**. On parle d'unités formant colonies (**UFC**). Chaque colonie provient de plusieurs bactéries en chaînettes ou en amas. [22.21]

L'ensemencement par étalement présente l'inconvénient que l'échantillon peut **ne pas être absorbé dans sa totalité**. [22.21]

L'ensemencement **en profondeur** ou en masse exige que les bactéries puissent supporter la température de la gélose liquide en surfusion (50°C). L'échantillon est mélangé avec la gélose et les colonies vont pousser en profondeur et en surface. [22]

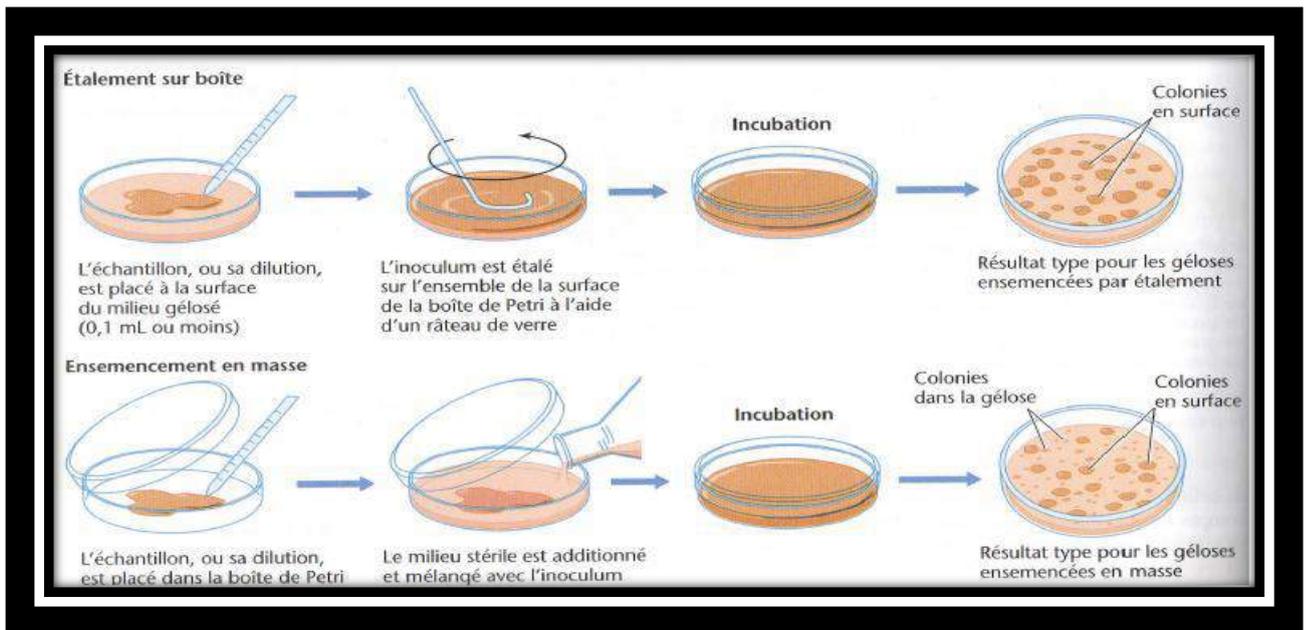


Figure 42 : Dénombrement des bactéries viables [22].

5.1.2 Mesure directe du nombre de cellules

A partir d'un volume connu d'une suspension bactérienne on peut faire une numération totale des cellules au microscope. On utilise une lame spéciale appelée **chambre de comptage de Petroff-Hausser**. [22.19]

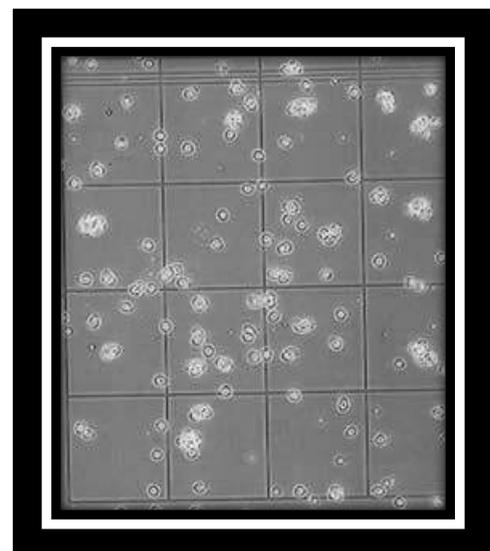


Figure 43 : Chambre de comptage de Petroff-Hausser [22] Figure 44 : Comptage au microscope [22].

5.1.3 Mesure par filtration sur membrane

Très utiles lorsque le nombre des bactéries est très bas. Utilisée pour la recherche des coliformes dans l'eau, comme preuve de contamination fécale. On procède par filtration sur membrane de 100 ml d'eau puis la membrane est mise en culture sur boîte de Pétri (Gélose). [22.18.19]

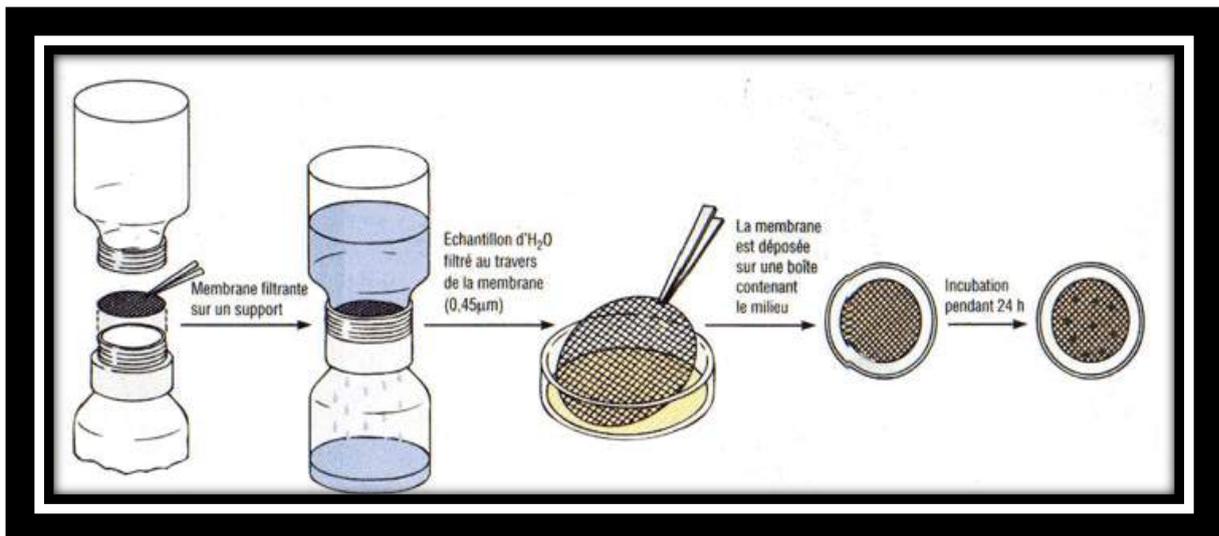


Figure 45 : Filtration d'eau sur membrane et dénombrement [22].

5.2 Paramètres de la croissance

Ces paramètres sont appelés également constantes de la croissance. [23]

La division cellulaire répond une progression exponentielle à temps régulier. 01 cellule donne 02 cellules, qui donnent 04 cellules, puis 16, puis 32 et ainsi de suite. [23.20]

Le temps nécessaire au doublement du nombre de cellules est appelé **temps de génération (G)**. [23]

Le temps de génération **est spécifique à chaque espèce** et il dépend des conditions environnementales. [23.20]

(G) est de 20 minutes pour *Escherichia coli*, de 1000 minutes pour *Mycobacterium tuberculosis*. [23]

Calcul du nombre de génération (phase exponentielle)

Soit N = nombre de cellule en division au temps (t) et N_0 le nombre de bactérie initial

Après 1 division : $N_1 = 2 \cdot N_0$ Après 2 divisions : $N_2 = 2^2 \cdot N_0$ Après n division : $N_n = 2^n \cdot N_0$

Donc $\text{Log} N = \text{Log} 2^n \cdot N_0 = n \text{Log} 2 + \text{Log} N_0$

Donc $n = \frac{\text{Log} N - \text{Log} N_0}{\text{Log} 2}$

Log2

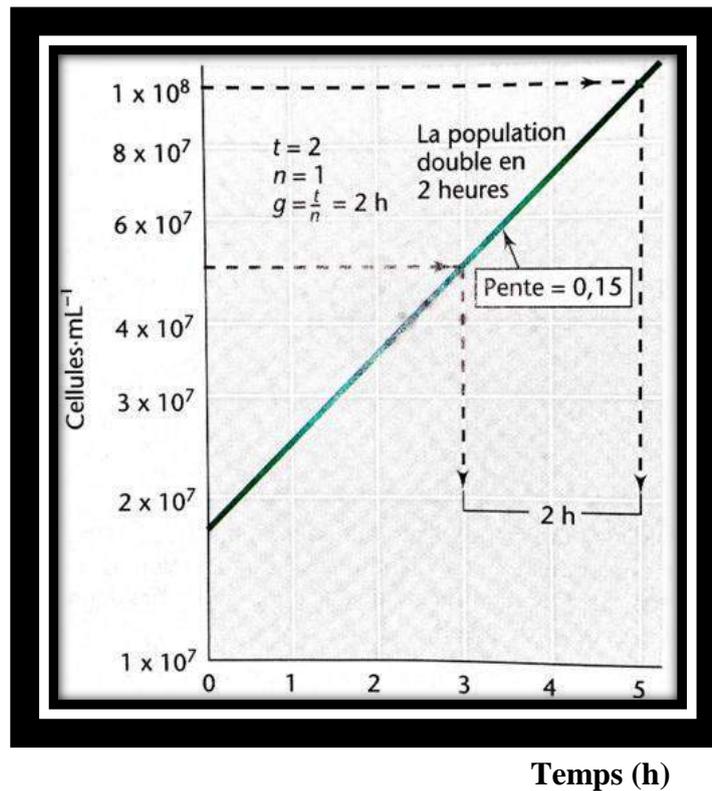
Le temps de génération $G = \frac{t_n - t_0}{n}$

Ainsi par e, si une population bactérienne croît de 10³ à 10⁹/ml en 10h. [23].

$n = \frac{\text{Log} 10^9 - \text{Log} 10^3}{\text{Log} 2} = \frac{6}{0.3} = 20$ division

$G = \frac{10}{20} = 0.5\text{h} = 30 \text{ mn}$

Le temps de génération peut être calculé en fonction de la pente de la représentation semi-logarithmique. Soit l'exemple suivant :



La pente = $\text{Log}_2 n/t = 0,301 * 1/2 = 0,15 = \text{Log}_2/G$ $G = \text{Log}_2/\text{pente} = 0,301/0,15 = 2h$
 $\text{Log}_2 n/t = 0,301 n/t = (k)$ Taux de croissance spécifique = 0.15.
 Enfin, $1/G$ représente le taux de division (h^{-1}) et noté (nombre de division par unité de temps lors d'une croissance discontinue) [23.21]

5.3 Courbe de croissance en milieu non renouvelé, culture discontinue

Dans une culture discontinue ou la croissance n'est pas synchrone et ou les nutriments s'épuisent avec le temps, la croissance suit une courbe à **04 phases**. La phase de **latence**, la phase de **croissance exponentielle**, la phase **stationnaire** et la phase de **déclin** [23]

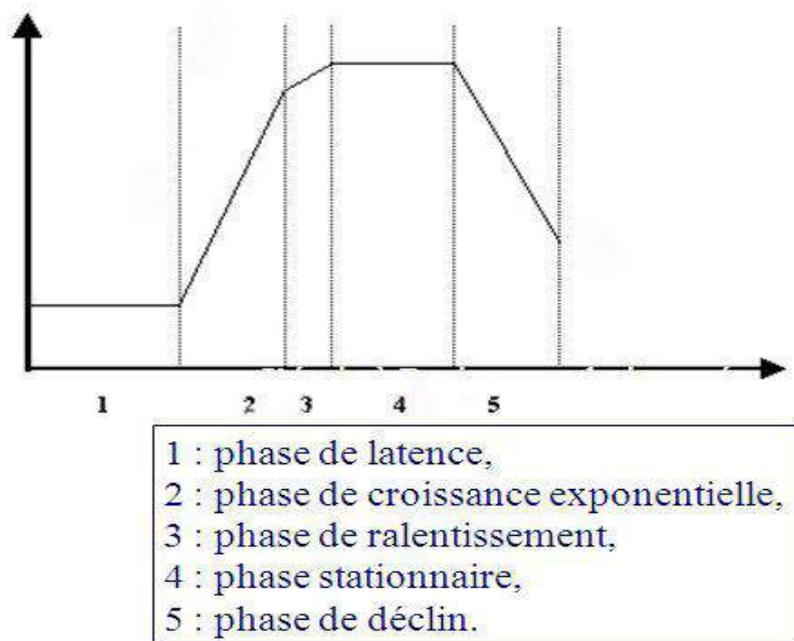


Figure 46 : Courbe de croissance [23].

La phase de latence

Le taux de croissance (k) est égal à zéro. Les bactéries ne se divisent pas, mais s'adaptent aux conditions de leur milieu environnemental. Elles synthétisent les enzymes nécessaires spécifiques des substrats (nutriments) présents. [23]

Si on inocule le même milieu avec des bactéries prélevées en phase exponentielle, il n'y aura pas de phase de latence. [23]

La phase de croissance exponentielle

Les cellules bactériennes se divisent sans arrêt, tant que les nutriments sont disponibles et les substances toxiques absentes et le pH est optimal. Le taux de croissance (k) est maximal. L'état physiologique est maximal également. [23]

La phase stationnaire

Lorsque la culture est faite dans un flacon ou un tube, à un moment donné, les nutriments s'épuisent, les produits toxiques s'accumulent et le pH change. Le nombre de cellules ne varie plus. Il y a autant de division que de mort cellulaire. Le taux de croissance (k) est constant. On parle même d'une **croissance cryptique**, où des cellules se nourrissent du contenu libéré par des cellules mortes. [23.21.22]

La phase de déclin

Les bactéries ne se divisent plus. Elles meurent par lyse cellulaire. Le taux de croissance (k) est négatif. [24]

5.3.1 Phénomène de diauxie (deux croissances en grec)

Le phénomène de diauxie, est une croissance qui se traduit par une courbe biphasique. Cette croissance est observée lorsqu'on utilise un milieu synthétique contenant deux sources de carbone. Dans un milieu contenant du glucose et du lactose, les bactéries vont utiliser en premier le glucose grâce à des enzymes constitutives. La dégradation du lactose est sous la dépendance d'enzymes inductibles dont l'induction est réprimée en présence de glucose. Lorsque le glucose est consommé, les bactéries utiliseront le lactose et initieront une nouvelle phase de croissance exponentielle après un temps de latence adaptatif. [24]

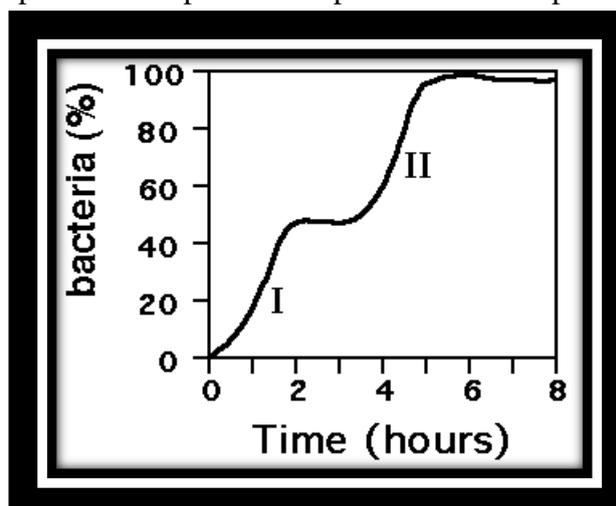


Figure 47: Phase I (Glucose) –Phase II (Lactose) [24]

5.3.2 Les Cultures continues

Dans un milieu non renouvelé, la phase de déclin est vite atteinte. Cela crée des problèmes pour les bio-industries. **Du point de vue économique**, il est très important de prolonger la phase exponentielle plusieurs jours. La solution est de renouveler constamment le milieu de culture et en récupérant les produits du métabolisme et les déchets. Les croissances continues sont obtenues à l'aide de chemostat et d'autres équipements plus complexes. Le principe du chemostat repose sur le contrôle indépendamment, du taux de croissance et de la production de biomasse. Cela est possible en jouant sur le taux de dilution et la concentration des nutriments. Le système est constamment agité et alimenté en air stérile. [24.23]

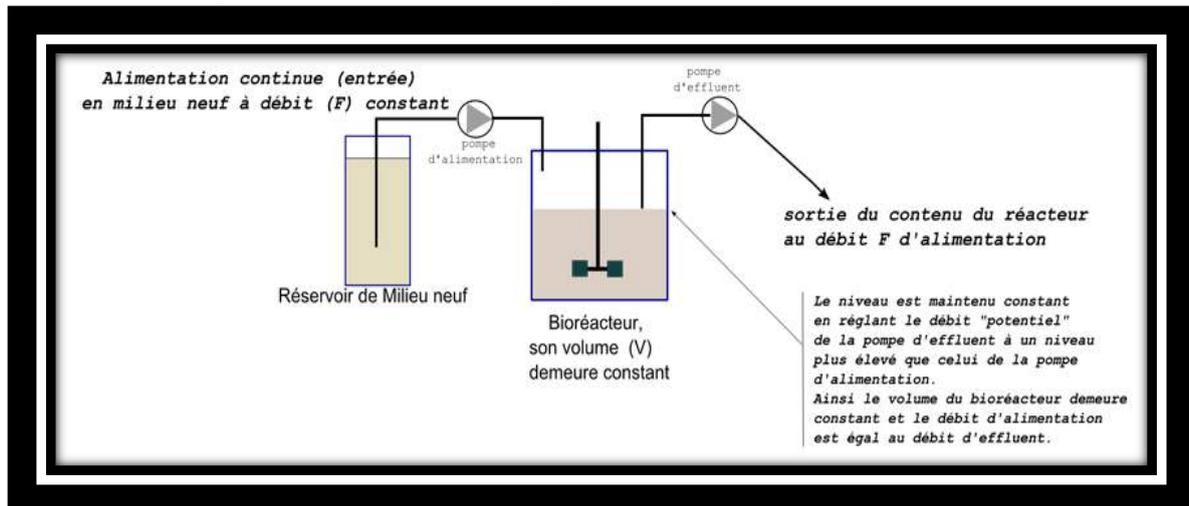


Figure 48 : Principe du chemostat [24].

5.4 Culture bactérienne

Une préparation nutritive qu'on prépare au laboratoire pour cultiver les micro-organismes est appelé **milieu de culture**. Les bactéries introduites dans le milieu de culture constituent l'**inoculum**. Les micro-organismes qui s'y développent forment **une culture**. [24.23]

Classification des milieux selon la consistance

Selon les analyses et les expériences à effectuer, on peut cultiver des bactéries sur **des milieux liquides** qu'on appelle **bouillons de culture**. Si on rajoute de l'**agar-agar** (polysaccharides isolés des algues), on obtient **des milieux solides**. Les micro-organismes se développent sous forme d'**un trouble ou voile** en suspension. [24]

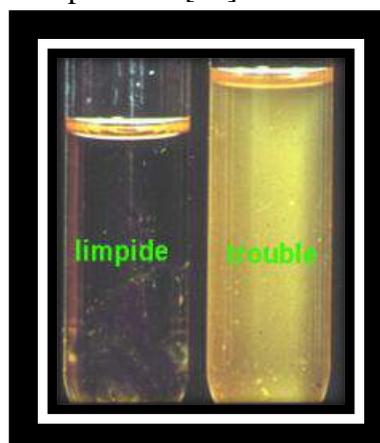


Figure 49 : Croissance sur milieux de culture liquide [24].

Les **milieux solides** peuvent être préparés sur **boîte de Pétri** ou en **tube (gélose inclinée, gélose profonde)**. Selon la quantité d'agar rajoutée, on a des **géluses solides** (1,5%) et des

géloses molles (0,75%). Il est déconseillé de dépasser 1,5% car cela pourrait inhiber la croissance de certaines bactéries à cause **d'une forte pression osmotique**. [24.22]

Les bactéries se développent sous forme de colonies, dont la forme, la couleur, l'odeur, dépendent à la fois de l'espèce et du milieu utilisé. La colonie **s'agrandit radialement** avant de pousser **verticalement** à une taille et une hauteur limitées. [24]

L'agar fond lorsqu'on la réchauffe à 100°C et se solidifie lorsqu'elle se refroidit (dès 40°C). Généralement, on prépare les boîtes de Pétri avec une gélose stabilisée à 50°C. [24].



Figure 50 : Colonies de différents micro-organismes sur gélose [24].

Culture spéciales et bactéries non cultivables

D'autres bactéries sont dites non cultivables. En réalité, **il faut dire que l'on ne sait pas encore cultiver à ce jour**. Beaucoup d'entre elles sont identifiées uniquement sur la base de leur **ARNr 16S**. [24]

En microbiologie clinique, l'agent de la lèpre, *Mycobacterium leprae* est cultivé **dans un petit animal appelé Tatou**. Enfin, les bactéries intracellulaires obligatoires (Rickettsies, Chlamydias), sont cultivées **dans des cellules mammifères en monocouches**. [24.23]

Les anaérobies stricts ont besoin de milieux réducteurs et d'équipements spéciaux comme **la jarre anaérobie ou une hôte anaérobie étanche**, dont l'air est contrôlé. [24.20]

Classification des milieux de culture selon la composition chimique

Selon le type trophique de la bactérie et de ses exigences, **il faudrait adapter** la composition et le pH. [24.21.22]

On a développé différentes catégories de milieux de cultures :

Les milieux synthétiques

On connaît avec exactitude la composition chimique de type de milieu, qualitativement et quantitativement. Ils sont constitués chimiquement, de corps purs. Ils sont utilisés pour les bactéries autotrophes ou des tests bien précis. [25]

Exemple : Milieu **urée – indole** (L-tryptophane (0,3 g), KH₂PO₄ (0,1 g), K₂HPO₄ (0,1 g), NaCl (0,5 g), urée (2 g), alcool à 95 (1 ml), rouge de phénol 1%, eau distillée (100 ml)). [25]

Les milieux complexes ou empiriques

Très nutritifs de composition indéfinie. Utilisés pour la culture de nombreux organismes. Ce sont les plus appropriés. Employés pour la culture des chimio hétérotrophes. [25]

Ils sont constitués d'extrait de soja, de viande, de levure, digérés par des enzymes. Ils fournissent une source de carbone, d'azote, vitamines B. Leur composition varie d'un lot à

l'autre. Ils sont préparés par macération ou par décoction. Exemple : bouillon nutritif (Peptone (5g), extrait de bœuf (3g), NaCl (8g), Eau distillée (1 litre)). [25.21.22]

Les milieux semi-synthétiques

Comme leur nom l'indique c'est **un mélange** de composés chimiques purs et de substances naturelles empiriques. Exemple milieu de Chapman, qui est également sélectif pour les Staphylocoques. Peptone (10 g), Extrait de viande de bœuf (1 g) Chlorure de sodium (75 g), Mannitol (10 g), Rouge de phénol (0,025 g), Agar (15 g), Eau distillée (qsp 1 Litre). pH = 7,4 [25]

Les milieux sélectifs

Ces milieux inhibent la croissance de la majorité des micro-organismes et stimulent celles des bactéries qu'on cherche à isoler. On fait intervenir un pH acide, une concentration de sel élevée. [25.21.22]

Les milieux différentiels

Contiennent un indicateur (colorant) qui permet de différencier deux types bactériens qui poussent sur le même milieu, mais ne dégradent pas tous les deux un substrat particulier. La gélose Hektoën, qui différencie la fermentation de 3 glucides (lactose, saccharose et salicine) ainsi que la production de sulfure d'hydrogène [25]

Les milieux enrichis

Ils contiennent, outre les composants de base, des composants indispensables aux bactéries, que celles-ci ne peuvent pas synthétiser. Ce sont des milieux utilisés pour l'obtention des bactéries dites *exigeantes* et auxotrophes. Par exemple : les milieux au sang frais. [25]

Les milieux d'identification

Utilisés dans la mise en évidence des caractères biochimiques des bactéries dans l'identification différentielle. [25.24]

Les milieux de conservation

Ce sont des milieux pauvres au sein desquels les bactéries survivent dans un état de vie ralentie. [25]

Obtention et conservation des cultures pures

Pour étudier et utiliser des micro-organismes on doit obtenir **des souches pures (culture pure)** [25]

On peut utiliser pour cela deux techniques, par dilution en milieu liquide et par épuisement en milieu solide. [25]

Dilution en milieu liquide : Le produit d'où l'on veut isoler la souche est dilué de 10 en 10 dans un milieu stérile. [25.23]

5.5 Agents antimicrobiens

Introduction

Au cours du 20^e siècle, les scientifiques ont développé une série de méthodes physiques et chimiques pour lutter et contrôler la croissance des micro-organismes. Tous ces efforts étaient dans un cadre de pratique médicale pour diminuer le pourcentage de décès post chirurgicaux ou après des accouchements. L'altération des aliments et le développement d'approches efficaces pour leur conservation constituaient également une motivation d'ordre sanitaire et économique. [25]

A. Définitions

La stérilisation : est l'action de tuer toutes les formes de vie microbienne contenues dans une préparation ou présents à la surface d'un objet. Le matériel traité est dit stérile lorsqu'aucun micro-organisme ne peut être revivifié. [25.22]

Il faut souvent emballer les objets avant leur stérilisation et bien fermer les préparations pour éviter la contamination postérieure. [26]

La désinfection : est une mesure qui a comme objectif de détruire les microbes pathogènes. Elle est inefficace sur les endospores. Elle utilise un produit chimique qu'on nomme **désinfectant** sur des produits inertes. C'est une opération **au résultat momentané**. Elle détruit les microbes présents, mais il faut répéter le traitement en cas de contamination postérieure. Si elle est appliquée à un tissu vivant en parle **d'antisepsie** et le produit utilisé est un **antiseptique**. On n'utilise pas les mêmes produits pour les tissus vivants et les objets inertes. L'antiseptique doit être non toxique et non irritant pour l'homme ou l'animal. [26]



Désinfectant pour salle de bain



Antiseptique pour la peau

Figure 51: Agents antimicrobiens [26].

La décontamination : comme la désinfection est une action au résultat non permanent. Elle permet d'inhiber les micro-organismes, sans forcément les tuer. Elle s'applique à des tissus vivants. [26]

L'asepsie est l'ensemble des règles à respecter par les équipes médicales pour éviter l'apport de microbes exogènes. [26.24]

Selon l'effet de l'agent antimicrobien sur la croissance des micro-organismes, on distingue : Une action **bactériolytique** avec une lyse (la mort) des cellules. Les nombres de bactéries totales et viables diminuent brutalement [26.23.24]

Une action **bactéricide**, les agents se lient à leurs cibles de façon étroite et même si une dilution a lieu, ils ne se détachent pas de leur cible et le nombre de cellules viables diminue sans lyse cellulaire de façon exponentielle en fonction du temps. [26]

Enfin une action **bactériostatique**, si la concentration diminue, la croissance bactérienne reprend. Il peut se détacher de sa cible. Dans des concentrations normales d'utilisation, le nombre totale de bactérie est stable et égale au nombre de bactéries viables [26]

B. Les modes d'action des agents antimicrobiens

Qu'ils soient physiques ou chimiques, ils agissent sur la croissance bactérienne en altérant la paroi, ou la membrane plasmique. En dénaturant les protéines cytoplasmiques ou les acides nucléiques. [26]

On distingue 3 classes d'agents antimicrobiens :

- Les agents physiques
- Les agents chimiques
- Les agents chimio-thérapeutiques

5.5.1 Les méthodes physiques

A. La température

Elle peut être utilisée pour **la conservation** des aliments soit par le froid (**réfrigération, congélation**) soit par la chaleur (**la pasteurisation**). Dans les deux cas, le nombre de micro-organismes est stabilisé par le ralentissement de la croissance. [27]

La température permet également **de détruire** les micro-organismes (stérilisation, appertisation). Son action dépend du milieu, de la physiologie et du nombre de cellules.

Les destructions thermiques utilisent **la chaleur humide ou la chaleur sèche**. [27.25]

Chaleur humide (stérilisation)

L'appertisation, méthode fiable, efficace et simple. Développé par Nicolas Appert en 1785 et confirmé par Pasteur en 1801. Consiste à plonger des légumes enfermés hermétiquement dans des bouteilles, dans de l'eau bouillante. Cette approche est très utilisée dans l'industrie des conserves. [27]

L'autoclave, est une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle on chauffe de l'eau sous pression (120°C à 1 atm) pour faire agir la vapeur d'eau pressurisé, pendant 15 à 20 minutes. La stérilisation est obtenue par dénaturation des protéines. Il y'a plusieurs modèles d'autoclaves de tailles et de formes différentes.[27]

La tyndallisation

Il est possible d'arriver à stériliser les matières fragiles, très altérables par la chaleur, en leur faisant subir une série de chauffages à température moins élevée (60°C), séparées par des périodes de repos à la température ordinaire. C'est la tyndallisation. Elle est utilisée pour éliminer les endospores qui ont réactivées en cellules végétatives, éliminées à chaque cycle de chauffage. [27]

La pasteurisation

Développée **par Pasteur entre 1866 et 1876**. Un chauffage pas très élevé (60°C) permet de détruire la flore pathogène (Salmonella, Listeria, Escherichia...) et ralentie la croissance des germes d'altération. Elle préserve les qualités nutritives de l'aliment (lait), l'équilibre chimique et les vitamines. [27.26]

La pasteurisation ne peut être considérée comme une stérilisation, on l'applique à des produits pour préserver les caractères organoleptiques, (gout, couleur, odeur, saveur) et en permettant leur conservation pendant une période. On distingue :

- La pasteurisation haute température** : Le lait est porté à 90°C pendant 30 secondes puis refroidi à 10°C. [27.24]
- La pasteurisation basse température** : Chauffage à 60 à 70°C pendant des temps plus longs. [27]

-**La pasteurisation Ultra Haute Température (UHT)** : La plus récente, elle est appliquée au lait et au jus de fruit. Une température de 140°C pendant quelques secondes, puis on refroidit brutalement. [27.23.24]

La chaleur sèche

Les objets (verrerie, matériel chirurgical), ne peuvent être stérilisés par la chaleur humide. Il faut utiliser le **four Pasteur ou Poupinel** à circulation d'air pour une bonne répartition de la chaleur. [27.25]

La stérilisation est obtenue par une dénaturation des protéines : **180°C (30 mn) - 170°C (1h) - 160°C (2h)**. [28.24]

Action du froid

L'activité de l'eau est grande lors de la réfrigération (développement des psychrophiles), par contre la congélation la diminue. [28]

Les 3 règles à respecter dans l'application du froid :

- ✓ Il faut réfrigérer un aliment sain
- ✓ Le plus tôt que possible (rapidement)
- ✓ La réfrigération doit être continue (aucune rupture dans la chaîne du froid)

B. les radiations

On a les **rayonnements ionisants** comme les rayons gamma, les rayons X et les faisceaux d'électrons. Ils ont une longueur d'onde très petite et ils transportent plus d'énergie. L'énergie agit sur l'eau des cellules qui sera ionisée avec formation d'ions hydroxyles qui agissent sur l'ADN en le modifiant chimiquement ou en le coupant. [28]

Les rayonnements non ionisants comme les ultraviolets, surtout ceux dont la longueur d'onde est de 270 nm. Ils provoquent la formation de liaisons anormales entre des bases de thymine proches dans l'ADN. Ceci, va induire des problèmes au niveau de la réplication de l'ADN. Les UV du soleil sont moins puissantes et certaines bactéries utilisent des pigments pour s'en protéger. [28]

5.5.2 Les méthodes chimiques

Ils sont très actifs mais toxiques pour l'homme. Ils ne peuvent être ingérés.

L'activité est très diverse. Leur **action est brutale et non spécifique** (à la différence des ATB). [28.26]

On distingue :

Oxydation et dénaturation des protéines : L'eau oxygénée oxyde les SH libre des enzymes, les sels de métaux lourds se combinent aux SH et inactivent les protéines. L'alcool agit comme la chaleur et coagule les protéines [28.25]

Altération de la membrane cytoplasmique : les agents liposolubles (phénoliques, savons, et surtout détergents) détruisent la membrane plasmique et laissent s'échapper le cytoplasme et ses composants. [28]

Action sur le métabolisme : Les cyanures et les fluorures attaquent la chaîne respiratoire. Les colorants basiques (bleu de méthylène, violet de gentiane, réagissent avec les acides ribonucléiques. D'autres agents sont mutagènes, comme l'acridine, ou chélateurs comme la quinoléine et ses dérivés. On a isolé des plasmides de résistance secondaire aux antiseptiques. [29.26]

Comme exemples :

Oxydants : Eau oxygénée, l'eau de javel, l'alcool iodé.

Alcool : Ethanol dilué à 70% (l'alcool diluée et plus efficace que l'alcool pur)

Métaux lourds et leurs sels : Les sels d'argents en ophtalmologie, en ORL. Les sels de mercure comme antiseptique de la peau et des muqueuses (Mercurochrome Mercryl, Merseptyl). **Le sulfate de cuivre** comme antifongique. Ils tuent la cellule en précipitant les enzymes ou en se combinant aux groupements thiols SH. Ils ont très toxiques pour l'homme. **Phénol et Aldéhydes** très toxiques pour l'homme, ils ont bactéricides, fongicides et virucides. Ils dénaturent la membrane, l'ADN et les protéines [29.28]

Les Savons, leur action est mécanique. Ils augmentent le pouvoir mouillant de l'eau et emprisonnent les germes dans la mousse et les éliminent avec le rinçage. D'autres composés à pouvoir mouillant, très bactéricides ont été synthétisés. Ce sont les **détergents ou surfactants**. [29]

Les colorants, antiseptiques à usage local, quelques-uns sont utilisés par voie digestif. Le vert de malachite et le vert brillant pour le traitement des plaies superficielles, le violet de méthyle comme antiseptique urinaire, le violet de gentiane comme désinfectant. On les utilise dans la préparation des milieux de culture pour leurs actions sélectives. Ils sont souvent plus actifs sur les Gram (+) en sélectionnant du coup les Gram (-). [29]

Stérilisation par les gaz, on les utilise pour stériliser les produits instables à la chaleur, la désinfection des locaux (hôpitaux), ou la stérilisation des objets en plastique comme les boîtes de Pétri et tubes. [29.28]

5.5.3 Agents chimio-thérapeutiques antimicrobiens

C'est en 1929 avec **Flemming**, que l'ère véritable des antibiotiques débuta. Il observa de façon anodine, l'inhibition de la croissance de Staphylocoques par des moisissures de *Penicillium*, sur une boîte de Petri oubliée sur la paillasse. Il cultiva en masse le *Penicillium* et montra que les extraits étaient bactéricides sans être toxiques pour les cellules animales. Il appela Pénicilline le principe actif du filtrat. [29.27]

En 1939 Florey et Chain, on purifié la pénicilline à grande échelle et effectué des essais cliniques avec des résultats spectaculaires. [29]

En 1944, Waksman, découvrit la Streptomycine à partir *Streptomyces griseus*

En 1953, Newton et Abraham, La céphalosporine C à partir d'une culture de *Cephalosporium acremonium*. [29.28]

Depuis 1965, une nouvelle ère débuta, celle des antibiotiques **semi-synthétiques**, tel que les B-lactamines

B. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont très nombreux et peuvent être classés selon divers critères :

B.1 En fonction de leur origine

Les antibiotiques naturels ou produits par les micro-organismes : Champignons (Pénicilline, Céphalosporine). [29.28]

Bactéries (Streptomycine, Chloramphénicol, polypeptides).

Les antibiotiques synthétiques ou produits obtenus entièrement par voie chimique : Sulfamides. Acides nalidixiques. [29]

Les antibiotiques semi-synthétiques : Ces antibiotiques sont obtenus à partir d'une fraction moléculaire naturelle sur laquelle a été greffé un radical chimique. [30]

Chapitre 6 : Notion de mycologie et de virologie

6.1 Mycologie (Levure et moisissure)

La mycologie est l'étude des mycètes ou champignons. On distingue trois groupes majeurs de champignons. **Les moisissures (champignons filamenteux), les levures (unicellulaires) et les champignons macroscopiques.** Il y a 1.5 millions d'espèces de mycètes. [30]

Grace à leurs exo enzymes, ils recyclent les parties dures des végétaux. Certains sont symbiotiques et développent des mycorhizes avec les racines des plantes. Ils sont aussi utiles à des insectes pour dégrader la cellulose et la lignine qui leur servira de nourriture. L'homme également s'en sert pour la fabrication de médicament (antibiotiques, vitamines), d'aliment (pain, fromages), d'enzymes... [30.29]

Les mycètes sont des **eucaryotes saprophytes**. Ils se nourrissent de matières organiques en décomposition qu'ils transforment en matière minérale, par absorption à travers une membrane. [30.29]

Commensales dans leur majorité, donc vivant en association symbiotique avec d'autres organismes. Mais certains sont parasites et hautement pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes (causant des pertes économiques considérables aux agriculteurs). [30]

Le type respiratoire est **aérobie**, à l'exception de ceux que l'on trouve dans le tube digestif des mammifères. Les levures sont **anaérobies facultatives**. Du point de vue des facteurs physicochimiques, les mycètes sont **mésophiles**, Température optimale de croissance entre 25 et 35°C. Le maximum observé est de 62°C. Ils tolèrent **des milieux acides** $5.5 < \text{pH} < 7.5$ et ils sont moins exigeant en humidité par rapport aux autres micro-organismes. [30]

Chimio hétérotrophes, ils utilisent la matière organique comme source d'énergie d'électrons et de carbone. Ils oxydent la matière organique pour puiser l'énergie nécessaire à leur développement et croissance. Les molécules simples sont absorbées directement (acide aminé, monosaccharides). Les molécules plus complexes sont hydrolysées à l'extérieur par un équipement enzymatique sécrété ou associé à la paroi. [30]

Les mycètes **ont une paroi**, principalement constituée de 10 à 20% de protéines, 80% de polysaccharides antigéniques : **la chitine** (polymère linéaire de β -D-1-4- N Acétyl-glucosamine), de la cellulose (polymère linéaire de β -D-1-4- glucose) des mannanes ou des glucanes. La majorité, sont **immobiles** à l'exception de quelques espèces aquatiques. [[30]

L'appareil végétatif des mycètes est appelé **un thalle**. Le thalle peut être constitué d'une seule cellule (levures). La plupart des champignons ont des thalles pluricellulaires constitués d'un mycélium et d'organes de fructification (les moisissures). [30.27.28].

La croissance **est apicale**, elle se fait au niveau de l'apex des hyphes. L'ensemble des hyphes forment **un mycélium**. Les levures sont **unicellulaires** et se reproduisent **par bourgeonnement** mais également **par fission binaire** ou **scissiparité** comme *Schizosaccharomyces pompe*. [30.28]

Leur cycle vital peut se faire **par reproduction sexuée ou asexuée**. Dans la reproduction sexuée, **les spores** présentent des différences notables en termes de forme, taille et autres caractéristiques, **spécifiques de l'espèce**. [31]

6.1.1 Taxinomie et reproduction des mycètes

Les moisissures et les levures sont classées donc sur **la base de la diversité des cycles de reproduction**, en tenant compte **de la formation de spores sexuées différentes**. [31]

La reproduction la plus répandue se fait sans recombinaison génétique. Les spores asexuées sont produites par une mitose suivie d'une division cellulaire. [31]

Elle peut avoir lieu par fragmentation du mycélium (arthrospore), par bourgeonnement d'une cellule mère végétative (blastospores), si elles sont enveloppées, elles sont dites chlamydospores, ou à l'extrémité d'un hyphes: conidiospores. Elles peuvent être formées à l'intérieur d'un sporange : sporangiospores. [31]

La reproduction sexuée implique la formation de gamètes ou cellules sexuelles. Les gamètes de deux thalles fusionnent leur patrimoines génétiques et forme un nouvel individu.

On reconnaît 3 règnes de mycètes, **le règne des Eumycota, des Straminipila et des fongiformes**, selon leur morphologie et leur mode de reproduction. [31]

A. Le règne des Eumycota (champignons vrais) on distingue **5 phylums qui dérivent probablement d'un ancêtre commun choanoflagellés. [31.29]**

Phylum Chytridiomycota

Phylum Zygomycota

Phylum Glomeromycota

Phylum Ascomycota

Phylum Basidiomycota

B. Le règne des Straminipila comprend 3 phylums qui dérivent probablement d'un groupe de protistes comme les diatomées et certaines algues dorées. Le plus important est celui des Oomycota [31]

Phylum Oomycota

Phylum Hyphochytridiomycota

Phylum Labyrinthulomycota

C. Le règne des fongiformes ou moisissures glaireuses avec 4 phylums

Phylum Myxomycota

Phylum Plasmodiophoromycota

Phylum Dycytosteliomycota

Phylum Acrasiomycota

6-1-2-Morphologie

6.1.2.1 Phylum des chytridiomycètes

Ce sont des champignons inférieurs, le mycélium n'est pas septé (sauf dans des structures en cours de reproduction). Les Chitrides produisent des zoospores dans des sporanges. **Les zoospores sont mobiles généralement par un flagelle.** La reproduction sexuée se fait par la formation d'une spore diploïde après la fusion de 2 cellules haploïdes ou la fusion d'un gamète haploïde avec un œuf immobile. La spore peut subir une méiose et produit un mycélium haploïde ou germer et produire un mycélium diploïde. Le mycélium diploïde peut donner naissance à des sporanges, qui après méiose forment des zoospores haploïdes qui germent en mycélium végétatif haploïde. [31]

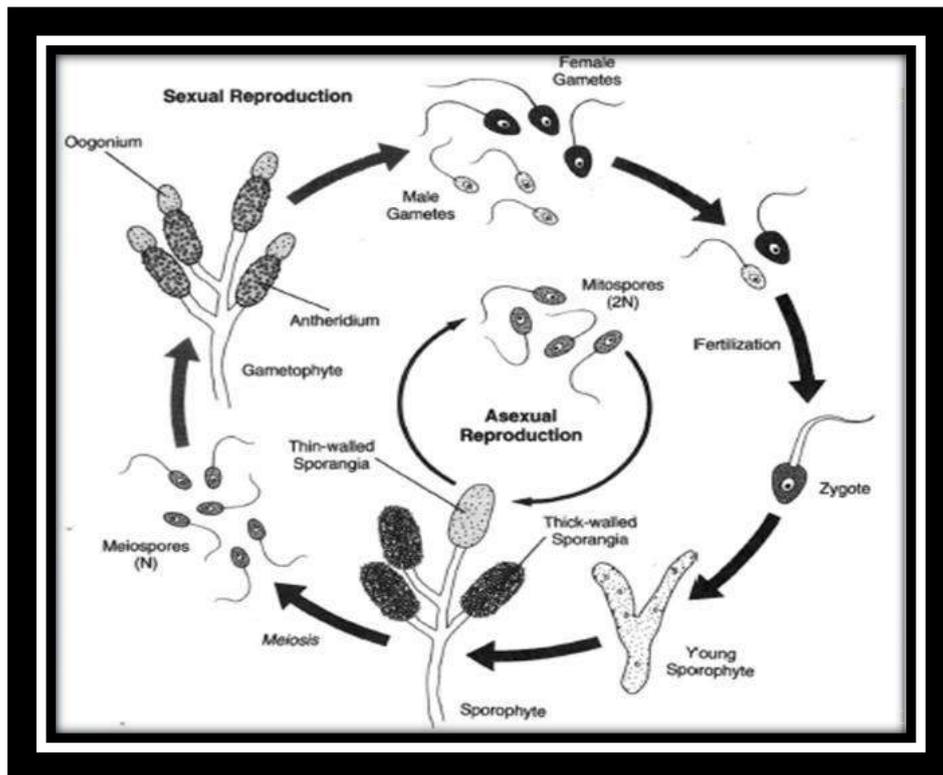


Figure 52 : Cycle biologiques des chytridiomycètes [31].

6.1.2.2 Phylum des zygomycètes

Lors de la reproduction asexuée, il y'a formation d'un hyphe aérien, l'extrémité du hyphe est appelée **spongiospore**, elle est séparée de l'hyphe par un septum appelé columelle. Les éléments contenus dans le cytoplasme de l'extrémité d'un hyphe se transforment **en sporange** contenant de nombreuses **spores asexuées**. Les spores contiennent des noyaux haploïdes issus de division mitotique d'un noyau du mycélium végétatif. La dissémination se fait par l'intermédiaire de l'eau et le vent. [31.30]

Dans la reproduction sexuée, deux noyaux de signes contraires fusionnent dans une structure appelée **zygospore**. Si c'est le même mycélium (homothalisme) si deux mycéliums distincts (hétérothalisme). La fusion se fait au niveau des extrémités différentes des hyphes, appelées pro gamétanges et donne la zygospore. Après une méiose, 3 noyaux dégénèrent et un seul reste pour donner le mycélium végétatif. Il y'a formation de nouvelles spongiospores à partir de la zygospore. [32.31]

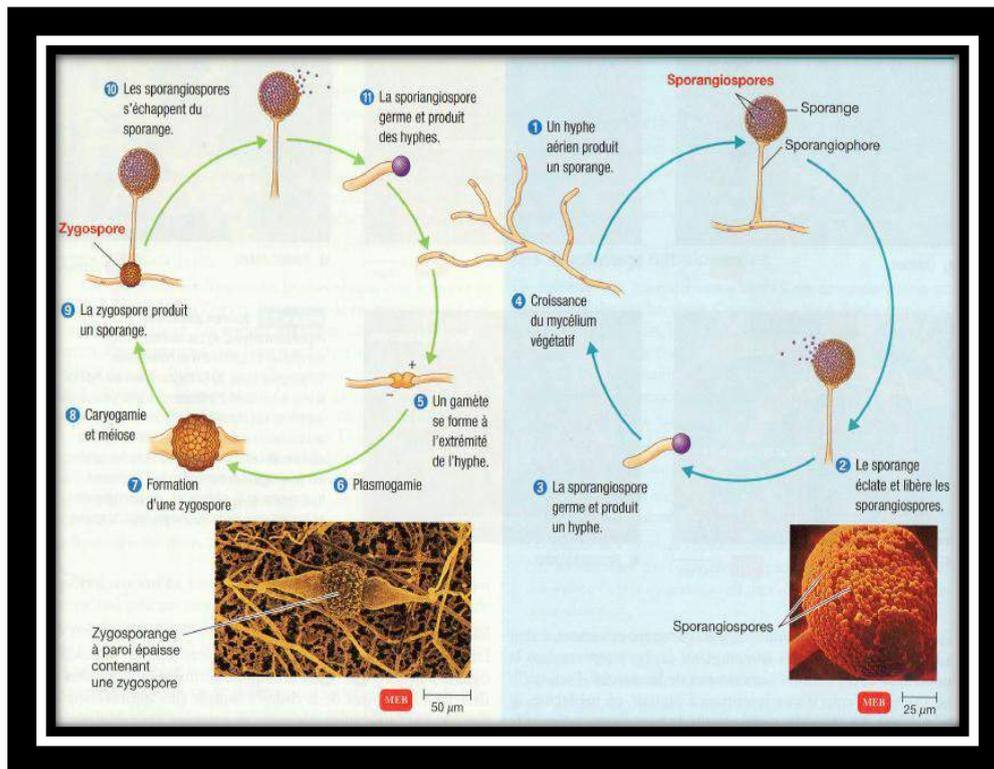


Figure 53 : Cycle biologique des zygomycètes [31].

6.1.2.3 Phylum des Glomeromycètes

Ils ont été récemment définis par la comparaison des séquences de l'ADN ribosomal. Il inclut essentiellement des espèces qui vivent en association obligatoire avec des plantes ainsi qu'une espèce vivant en association avec des cyanobactéries, *Geosiphon pyriforme*. Ils jouent un grand rôle écologique en formant les mycorhizes avec 90% des arbres. [32]

6.1.2.4 Phylum des ascomycètes

Ils produisent des mycéliums complexes avec des septums perforés. Ils produisent des conidiospores asexuée et des ascospores sexuées dans des structures sacciformes appelées **asque**. [32.29]

6-1-3-Reproduction

La reproduction végétative ou asexuée s'accompagne par la production de spores appelées conidiospores à l'extrémité des hyphes aériens appelés **conidiophores**. [32]

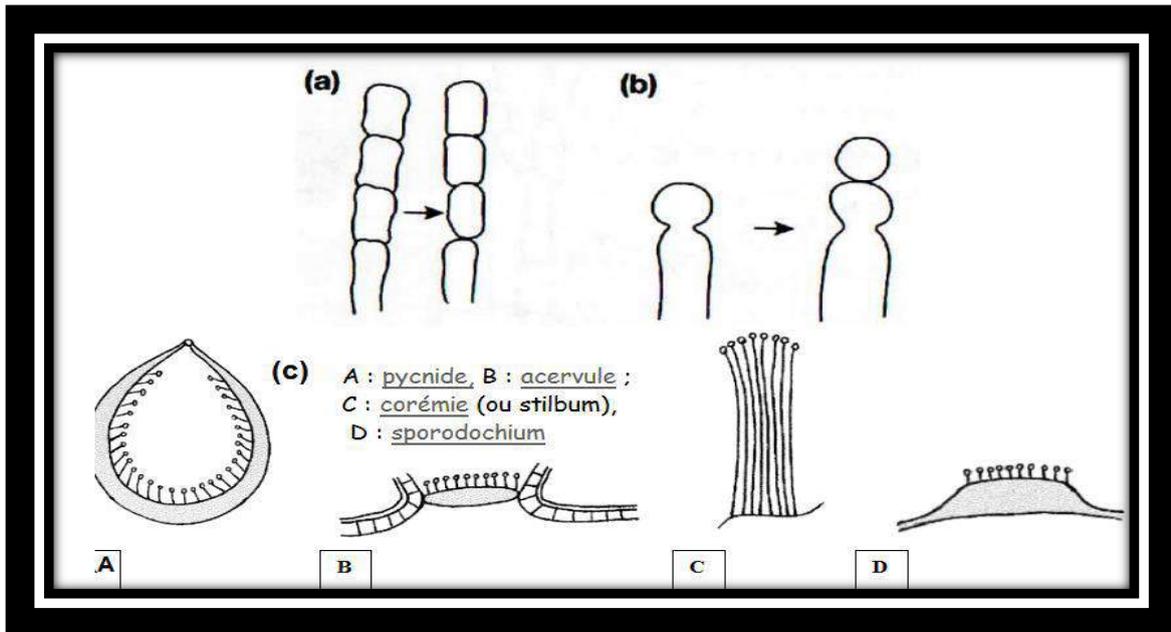
Si les spores sont séparées par des parois transversales, on obtient des **arthrospores**, si c'est un bourgeonnement de la cellule mère, on obtient la formation de **blastospores**. [32]

Les conidiophores peuvent s'agréger sous **différentes structures en forme de tiges** :

Les spores non protégées, à leur sommet : **Coremie**

Protégées dans des tissus mycéliens stériles : **Picnide**

Dans des tissus végétaux, dans l'épiderme des plantes : **Acervule**



(a) Arthrospore ou spores thaliques (b) Blastospores, ou spores Blastiques.

(c) Agrégation de conidiophores ou hyphes aériens.

Figure 54 : Reproduction des conidiophores [32].

La reproduction sexuée a lieu par une union somatique de deux mycéliums de sexe différent. Une courte phase diploïde est suivie par la formation d'ascospores à l'intérieur d'asques sacciformes. Les hyphes se courbent pour donner des structures appelées « Crozier » ou bâton de bergers qui possèdent des septums distincts à leur base, permettant la présence des 2 noyaux de sexe différent dans une cellule terminale. La formation du septum est coordonnée avec la division nucléaire, qui aboutit à la formation d'un asque. [32.32]

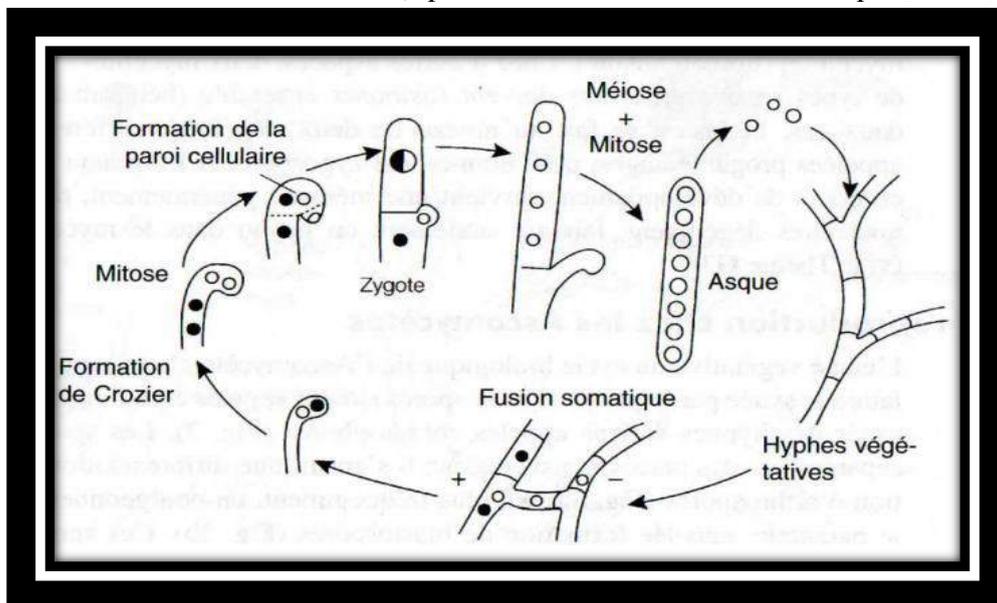


Figure 55 : La reproduction sexuée chez les ascomycètes [32]

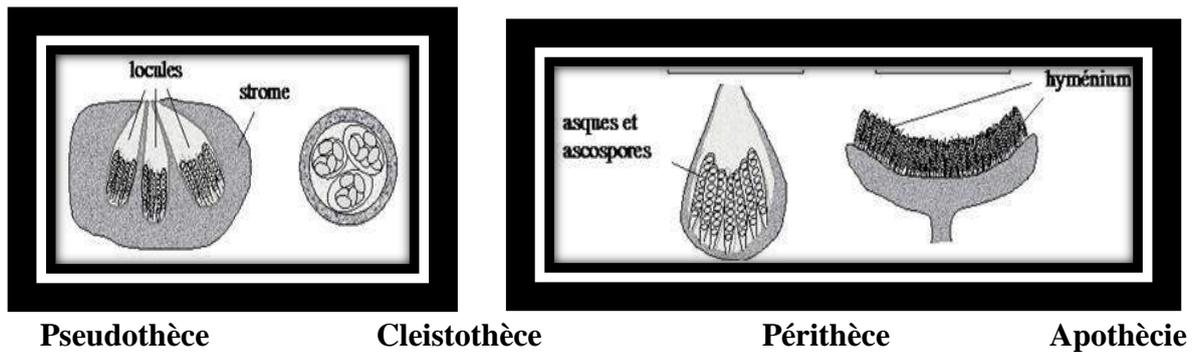


Figure 56 : Différents appareils sexuels des ascomycètes [32].

La levure, mycète unicellulaire, est également un ascomycète. *Saccharomyces cerevisiae* est l'exemple type. Elle possède deux modes de reproduction, asexuée et sexuée. Les cellules diploïde bourgeonnent et donnent des individus identiques. Si le milieu devient pauvre en azote et en carbone, un diploïde a/a , subit une méiose et donne un asque qui va libérer des spores a et des spores a (haploïdes). Ces spores peuvent se reproduire par bourgeonnement individuellement et dès que les conditions redeviennent favorables, une cellule (a) peut fusionner avec une cellule et reformer une cellule diploïde.[32]

6.1.3.1 Phylum des basidiomycètes

Elles sont dites **mycètes à massue**. Leur hyphe est complètement cloisonné par des septums. La forme en massue est appelée **baside**, à l'extrémité de l'hyphe, d'où sont émises **les basidiospores**. La majorité, sont phytopathogènes (la rouille du blé, le charbon des céréales). Mais, les champignons à chapeau font partie de ce groupe. [33]

Les basidiomycètes produisent rarement des spores sexuelles. Ils sont souvent sous la forme de mycélium végétatif. La reproduction asexuée a lieu lorsqu'un fragment de l'hyphe se détache et forme un nouveau mycélium. [33.32]

La reproduction sexuée passe par la formation d'un stade dicaryote issue de la formation de deux noyaux de sexe différent suite à la fusion de deux mycéliums compatibles. C'est les conditions environnementales qui conditionnent l'initiation des spores sexuelles. Les mycéliums se disséminent et donnent des basidiums. [33]

Quatre spores bourgeonnent au niveau du basidiums. Les basidiums se regroupent pour former des hyphéniums, très sensibles à la présence de l'eau.[33.31]

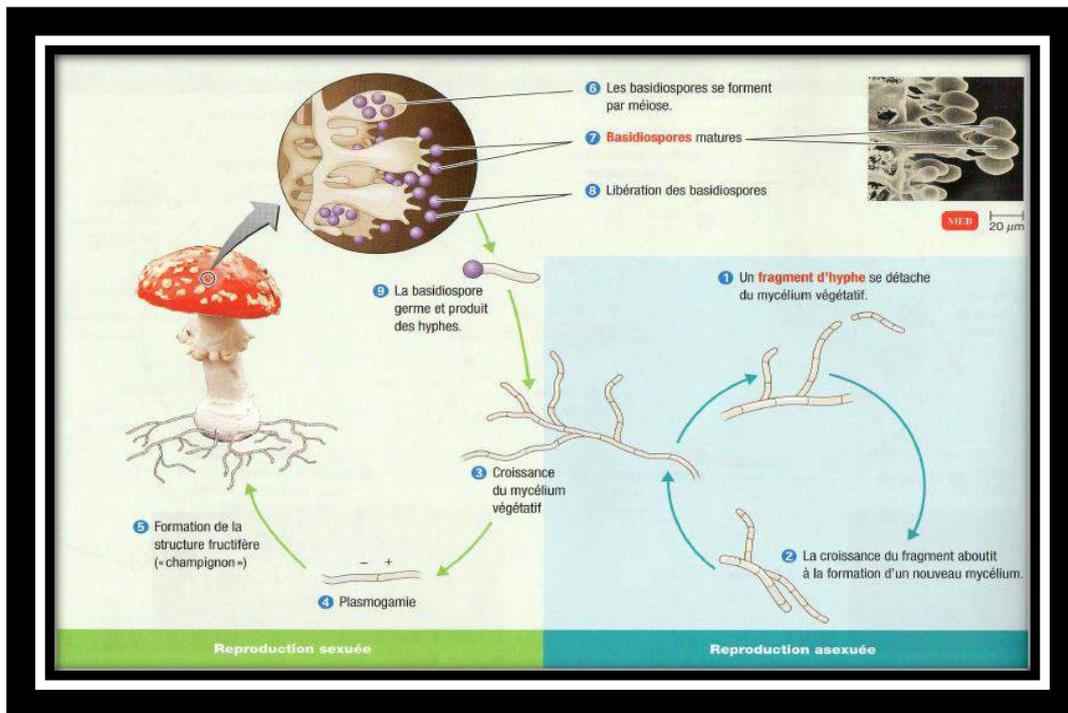


Figure 57 : Cycle vital d'un basidiomycète [33].

6.1.3.2 Phylum des oomycètes

Ce sont des moisissures aquatiques formant **des hyphes coenocytiques**. Phytopathogènes importants, avec comme maladies de références, **le mildiou de la pomme terre, la rouille de la pomme de terre et des maladies de poissons**. Ils se comportent comme des champignons vrais, mais ils possèdent des caractéristiques des plantes en étant non photosynthétiques. Un noyau diploïde, une paroi cellulosique, des stérols de plante au niveau de la membrane au lieu d'ergostérol des mycètes, des citernes de golgi plates et celles des mitochondries tubulaires (inversées pour les mycètes).[33]

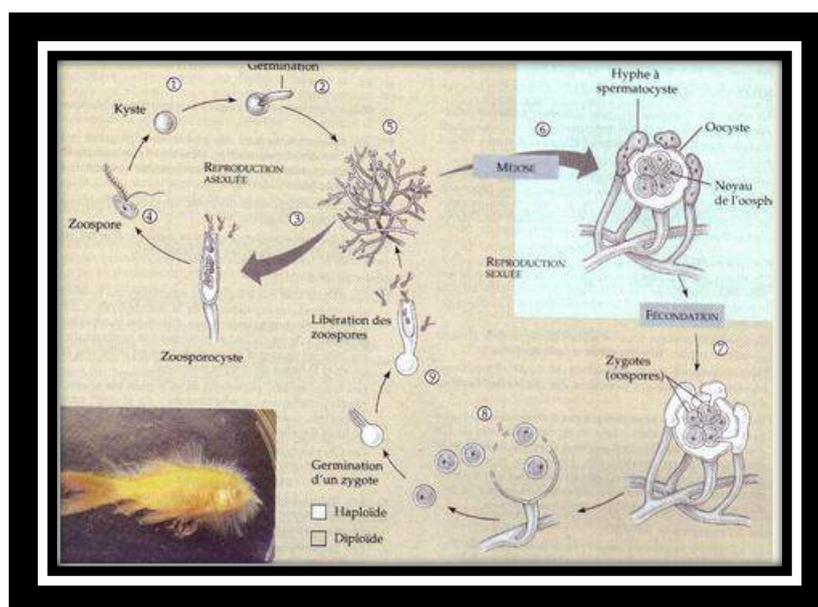


Figure 58 : Cycle vital d'un oomycète [33].

La reproduction sexuée des oomycètes, commence par les spores enkystées qui se posent sur un substrat favorable et germent. Puis se forme un réseau d'hyphes coenocytiques. A l'extrémité des hyphes se forment des zoosporocystes tubulaires qui relâchent des **zoospores à deux flagelles** et qui vont s'enkyster. [33]

Les hyphes peuvent entamer une reproduction sexuée en formant des structures sexuées. La méiose produit des oosphères à l'intérieur des oocystes et des hyphes à spermatocytes (**antheridium ou anthéridie**) sur le pourtour de l'oosphère. Les hyphes vont déposer leurs noyaux dans les oosphères. Cette dernière se désintègrera et libèrera les oospores. Les oospores vont germer pour libérer les zoospores qui vont générer un nouvel hyphe.[33.32]

6.2 Notion de virologie

Introduction

Le premier virus découvert est celui de la mosaïque fluide du tabac. Ivanovski démontre en 1892 qu'un extrait de feuille malade reste infectieux après filtration à travers un filtre. Les bactéries sont retenues par ces filtres, mais autre chose passe à travers le filtre. Un nouveau monde est découvert : **les agents pathogènes filtrants**. Beijerinck, en 1898, sera le premier à appeler « **virus** », l'agent causal de la mosaïque du tabac.[34]



Figure 59 : Filtres de Chamberland en porcelaine [34].

Les virus ont une structure composés de deux ou trois éléments. Ils ne sont pas considérés comme des organismes vivants. A l'extérieur de l'hôte, **c'est une structure acellulaire**, incapable d'effectuer le moindre métabolisme. Du point de vue médical, les virus une fois à l'intérieur de l'hôte, deviennent très actifs et ils prolifèrent comme les bactéries, les mycètes et les protozoaires. Donc, du point de vue clinique on considère qu'ils sont vivants.[34.31]

Les virus ne possèdent qu'un seul type d'acides nucléiques (ADN ou ARN), renfermé dans une coque protéique. Dans la cellule hôte, ils détournent le métabolisme énergétique à leur profit pour synthétiser de nouveaux virions. [34.33]

Du point de vue thérapeutique, vu que le virus n'a pas ou très peu, d'enzymes spécifiques, les traitements antiviraux sont également toxiques pour l'homme et l'animal.[34]

6.2.1 Morphologie

6.2.1.1 La spécificité ou spectre d'hôtes cellulaires

C'est l'ensemble des cellules qu'un virus est capable d'infecter. La majorité infecte un type spécifique de cellules, voire d'une espèce particulière. [34.33]

Ce concept de **barrière d'espèce** est tombé avec la grippe et ses différents virus. Le virus humain H3N2 est transmissible au porc. Le virus H7N7 de la grippe aviaire (oiseaux) est transmissible également au porc. Ce dernier possède son propre virus H1N1 (grippe porcine). [34]

Des recombinaisons entre les trois virus a fait émerger de nouveaux virus très dangereux transmissibles du porc à l'homme. [34]

6.2.1-2 La taille des virus

Elle varie de 20 nm (virus de la poliomyélite) à 1000 nm (virus d'Ebola).

La poliomyélite est une maladie qui touche les petits enfants et qui entraîne une paralysie. Le virus Ebola est d'actualité (2014-2015, épidémie en Afrique). Il provoque une fièvre hémorragique, mortelle. Comme comparaison *E.coli* fait 2000 sur 1000 nm. L'épaisseur d'une membrane plasmique d'un globule rouge est de 10 nm. [34.32]

6.2.1-3 La structure virale

Le virion est la particule virale complète sur le plan structural. Elle possède une capsidie qui entoure un matériel génétique. Parfois cette capsidie est elle-même entourée d'une enveloppe. Le virion infecte une cellule et induit la synthèse de plusieurs particules virales identiques à la particule initiale. [34.32]

Il existe une classification basée sur la structure virale. Elle est basée sur **la capsidie** qui entoure le matériel génétique. L'ensemble capsidie plus acide nucléique forme **la nucléocapsidie**. [34]

La capsidie est composée de sous unités protéiques appelées **capsomères**. C'est la plus petite unité structurale observable au microscope électronique. Selon l'assemblage des capsomères on définit les différentes formes de capsides, caractéristiques du type de virus. [34]

Les virus polyédriques

La capsidie se présente sous la forme **d'un icosaèdre**, composé de 20 faces triangulaires et 12 sommets. Les capsomères forment un triangle équilatéral. Cette structure est observée chez la majorité des virus animaux, végétaux et bactériophages [34.31]

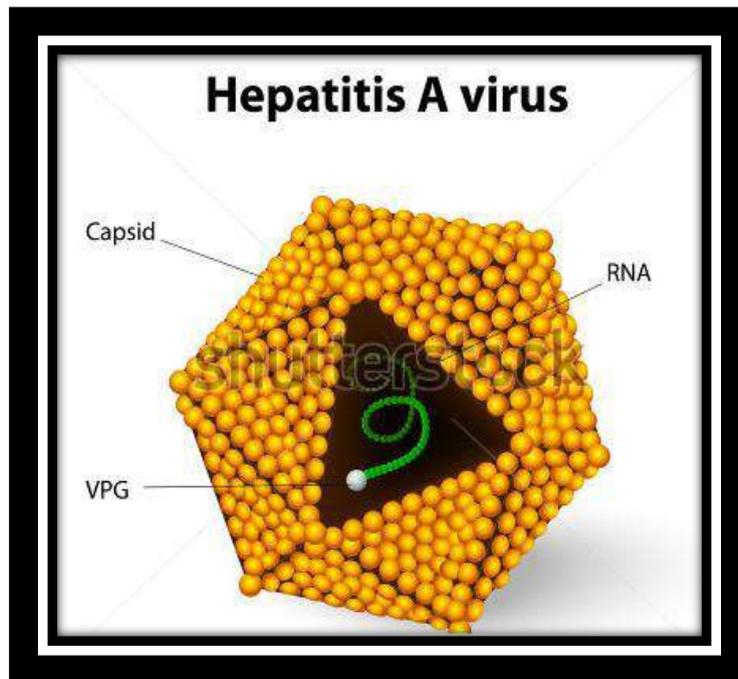


Figure 60 : Virus polyédrique à ARN, de l'hépatite A [34].

Les virus hélicoïdaux

Ce sont des virus sous la forme d'un filament creux ou d'un cylindre. Les capsomères s'enroulent en spirale autour de l'acide nucléique. **Le virus de la mosaïque du tabac (VMT), de la rage et Ebola** ont ce type de symétrie. [34]

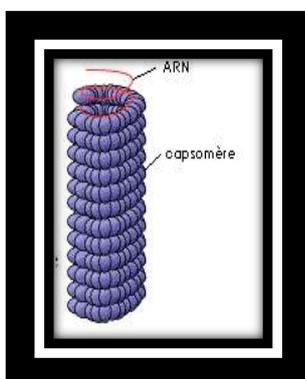


Figure 61 : Virion VMT [34]

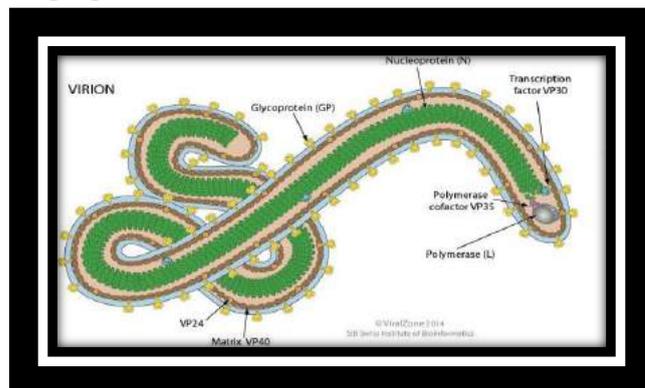


Figure 62 : Virion Ebola [34]

Les virus enveloppés

Parfois la capside est entourée d'une enveloppe. Chez les virus des animaux, cette enveloppe provient d'une portion de la membrane plasmique de la cellule hôte. Le virus y rajoute des glycoprotéines et des récepteurs viraux. Lorsque le virus possède une enveloppe, **il est dit enveloppé**, s'il n'en a pas, **il est dit nu**. Un exemple de virus enveloppé, le virus de la grippe [35]

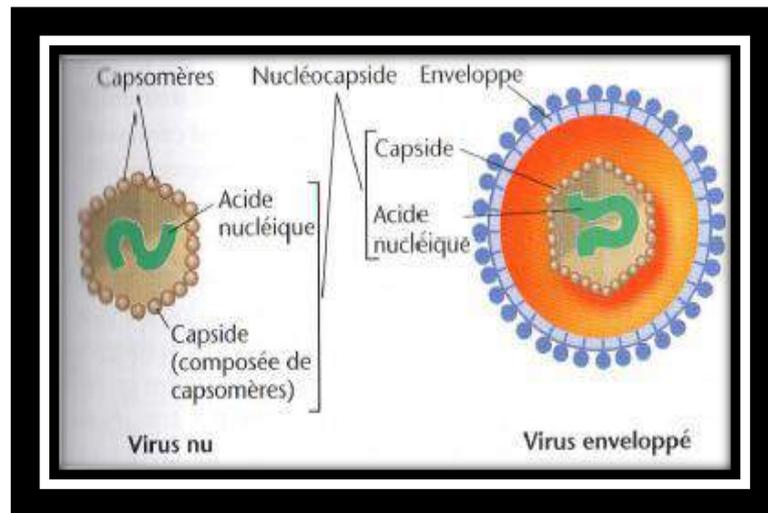


Figure 63 : Comparaison d'un virus nu et d'un virus enveloppée [35].

Les virus complexes

Retrouvé chez certains **bactériophages comme le T4 d'E.coli**. Il possède **une tête à symétrie icosaédrique** renfermant l'acide nucléique et **une queue à symétrie hélicoïdale** [35.34]

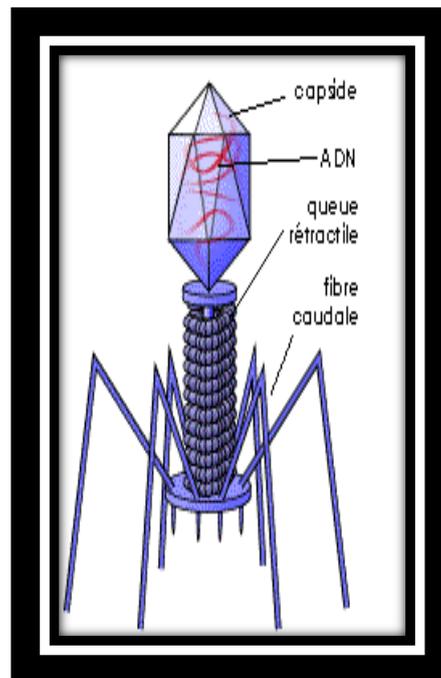


Figure 64: Bactériophage à symétrie complexe [35]

6.2.2 Différents types de virus

Les bactériophages et les virus animaux sont classés selon système de la classification de Baltimore qui se base sur le type de génome et le mode de reproduction. On distingue 07 classes de virus (classe I, II, III ... à VII). [35]

Classe I : Génome à ADN double brin. (Bactériophages Lambda et T4 ; virus de l'herpès, poxivirus). [35]

Une enzyme **cellulaire** transcrit l'ADN viral dans le noyau en ARNm (+) positif. [35]

Une enzyme **virale** transcrit l'ADN viral dans le cytoplasme pour donner des virus.[35.34]

Classe II : Génome à ADN simple brin. (Bactériophage ϕ 174 et virus de l'anémie du poulet, *Parvoviridae*). [35.34]

Une enzyme **cellulaire** transcrit l'ADN viral dans le noyau en ARNm (+) positif.

Classe VII : Génome à ADN double brin possédant une reverse transcriptase, se répliquant avec un intermédiaire à ARN. (*Hepadnavirus*, l'agent de l'hépatite B). [35]

Une enzyme **cellulaire** transcrit l'ADN viral dans le noyau en ARNm (+) positif. Une transcriptase inverse fabrique de l'ADN viral à partir de l'ARNm. [35]

Classe III : Génome à ARN double brin. (Bactériophage ϕ 6, *Reoviridae*, comme le rotavirus qui provoque des diarrhées chez les enfants). [35.33]

L'enzyme virale copie dans le cytoplasme le brin négatif de l'ARN viral double brin, pour fabriquer ARNm (+) positif. [36]

Classe IV : Génome à ARN simple brin à polarité positive. (Bactériophage MS2, entérovirus, poliovirus). [36]

Le brin positif sert de matrice pour la synthèse de l'enzyme **ARN polymérase ARN dépendante (ARN répliqueuse)**. Cette enzyme va servir à fabriquer des ARN négatifs complémentaire de l'ARN positif, pour ensuite les utiliser pour synthétiser de nombreux ARN positifs qui seront incorporés dans les capsides.

Classe V : Génome à ARN simple brin à polarité négative. (virus de la grippe, virus de la rage. [36]

L'ARN viral (-) ne peut pas servir de messenger. L'ARNm doit être fabriqué en premier. Les cellules de l'hôte n'ont pas cette enzyme. Donc cette enzyme doit être apportée par le virion. Elle va faire de l'ARNm qui servira pour la synthèse des protéines virales et servira également comme matrice pour la transcription des ARN à polarité négative, qui seront incorporés dans les capsides. [36.35]

Classe VI : Génome à ARN simple brin se répliquant par un intermédiaire à ADN. (Rétrovirus, HIV agent du SIDA, Le Virus du Sarcome de Rous une forme de cancer).

L'ARN (+) de ce type de virus ne peut être utilisé comme ARNm. L'enzyme clé **est la transcriptase inverse** qui permet de synthétiser de l'ADN simple brin à partir de l'ARN positif du rétrovirus. Cet ADN simple brin va servir de matrice pour synthétiser un double brin qui sera intégré dans le génome de la cellule hôte. L'ADN double permettra la transcription d'ARNm viral qui servira pour la traduction des protéines virales et l'assemblage de nouveaux virions [36.33]

6.2.2-1 Deux exemples de cycles de réplication {un virus humain (HIV) et d'un bactériophage (lambda)}

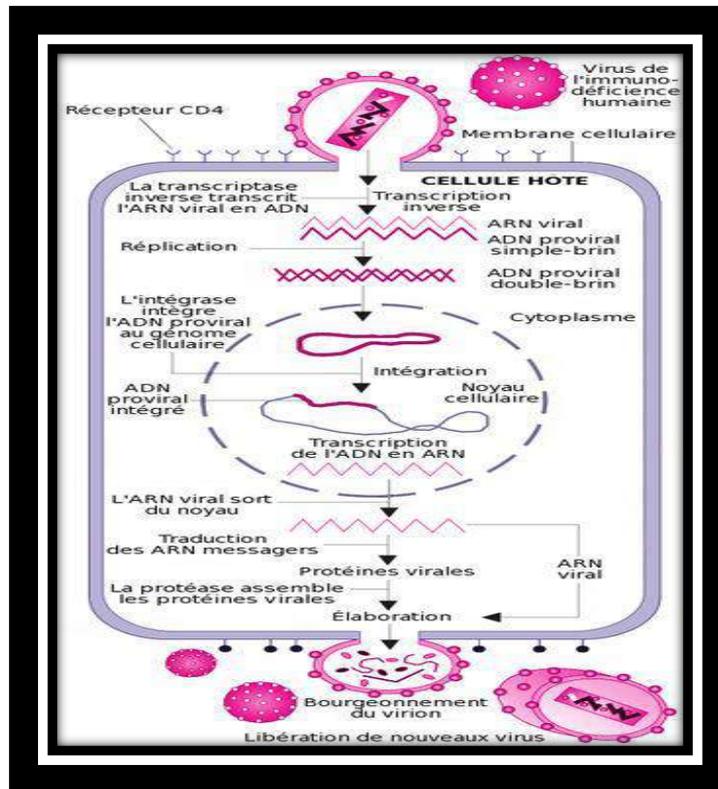


Figure 65 : Réplication du rétrovirus VIH [36]

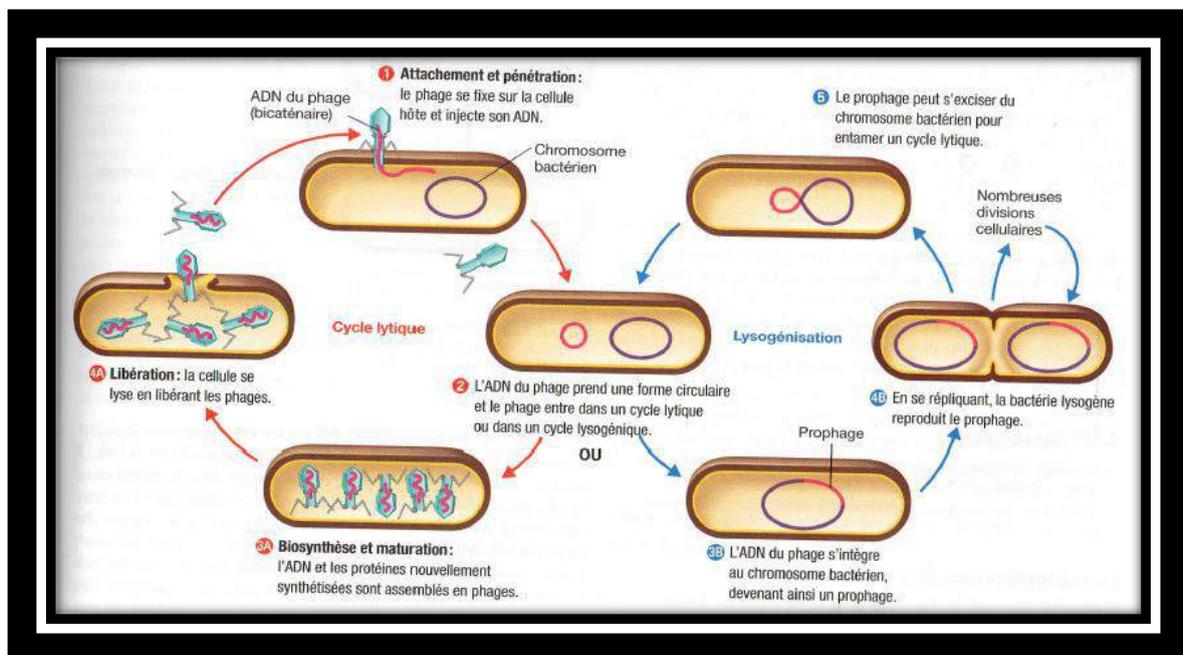


Figure 66 : Cycle lytique et lysogénique du bactériophage lambda dans *Escherichia coli* [36]

La principale différence entre les deux multiplications **est au niveau de la pénétration**. La nucléocapside du bactériophage ne pénètre pas dans la cellule. **Le phage injecte** son acide nucléique et **la capsid reste vide à l'extérieur**. [36]

Chez le virus animal ou humain, la nucléocapside pénètre dans la cellule hôte par **endocytose** ou par **fusion** avec la membrane cytoplasmique. Ensuite, une étape de décapsidation libère l'acide nucléique dans le cytoplasme de la cellule hôte. [36]

6.3 Les prions

Un prion est un **type d'agent pathogène de nature protéique** (constitué d'une protéine de 30 kDa ayant adopté une conformation ou un repliement anormal) qui au contraire des autres agents infectieux tels que les virus, les bactéries ou encore les parasites, **ne contiennent pas d'acide nucléique (ADN et ARN) comme support de l'information infectieuse**. Ce terme correspond à l'acronyme de **Proteinaceous Infectious Only particle** (particule protéique infectieuse). Les maladies à prions provoquent **une dégénérescence** du système nerveux central qui est toujours fatale. [37]

6.4- Viroïdes

Un viroïde est une particule, **plus petite** que **les virus** (de 50 nm de long environ), composée d'un seul ARN circulaire et sans capsid. Les viroïdes **infectent des plantes économiquement importantes**, comme la pomme de terre, la tomate, le concombre, la vigne, les arbres fruitiers. L'infection des végétaux cultivés peut se révéler extrêmement catastrophiques, les conséquences allant de la perte de rendements jusqu'à la mort de la plante. À l'heure actuelle il n'existe aucun traitement contre les infections viroïdaires. Les viroïdes **ne codent pas de facteurs de virulence**. Cependant, ils peuvent **modifier l'expression des protéines** dans leur cellule-hôte en entraînant **le clivage des ARNm, ou l'inhibition de leur traduction**. Ci-dessous la structure d'un col viroïde (isolé d'une plante ornementale, le Coléus). [37]

Travaux Pratiques

TP 1 : Introduction au laboratoire de Microbiologie

OBJECTIFS :

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

1. Visite des locaux :

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



Etuve



Autoclave

2. Présentation d'un poste de travail :

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

3. Les consignes de sécurité :

- Procéder à un lavage minutieux des mains, avec brossage des ongles avant et après les manipulations, et avant toute sortie même momentanée de la salle de TP.
- Éviter les ouvertures des fenêtres pendant les manipulations
- Ouvrir avec précaution les récipients contenant des cultures microbiennes, afin d'éviter toute projection.
- Flamber, avant et après manipulations, les anses métalliques utilisées pour les prélèvements, en commençant par chauffer la partie moyenne de l'instrument afin de dessécher les restes de culture avant de porter l'extrémité dans la flamme, ceci pour éviter toute projection.
- Prévenir immédiatement le responsable de TP en cas de bris d'un récipient contenant une culture en cas de contamination accidentelle d'un manipulateur ou tout incident dispersant le matériel microbien.

- Interdiction formelle de boire, manger et fumer pendant les TP
- Stériliser tout le matériel septique à la fin de la manipulation -
- Prendre toutes dispositions indispensables pour la mise à l'abri des souches microbiennes ainsi que leur destruction afin d'éviter toute contamination.

TP 2 : Méthode d'étude des micro-organismes et les différents procédés de stérilisation

La stérilisation est l'opération qui consiste à éliminer les micro-organismes d'un objet et ce de manière durable. En microbiologie, le but de la stérilisation est d'une part de maîtriser les micro-organismes introduits dans le milieu d'étude, et d'autre part d'éviter la contamination du milieu extérieur et des personnes. Il existe deux grands moyens de Stérilisation :

1. La chaleur
2. La filtration

I. La stérilisation par la chaleur

La chaleur détruit les bactéries et les spores. On distingue les procédés à chaleur « Sèche » ou « humide ».

1. Chaleur sèche :

a. Flambage : Le passage dans la flamme (bec BUNSEN) de la surface de matériel non inflammable assure une parfaite stérilisation. On stérilise de cette façon les fils de platine et les pipettes Pasteur.

B. Four pasteur : C'est un four-étuve à air chaud et sec. Il est utilisé à 180°C pendant 90 minutes. Cet appareil n'est utilisé que pour la stérilisation de la verrerie préalablement nettoyée et séchée ou de matériels métalliques (instruments de dissection) pouvant tolérer de très hautes températures Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières

2. Chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités

- la stérilisation à l'autoclave
- La Pasteurisation,
- La Tyndallisation

a. Autoclave : c'est un appareil indispensable dans un laboratoire de microbiologie. Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 120°C pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients. Ce procédé tue toutes les cellules végétatives et les endospores.

b. Pasteurisation : la pasteurisation est un traitement à chaud de liquides, tuant des pathogènes mais pas forcément toutes les bactéries. Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C.

c. Tyndallisation : La tyndallisation est une série de 3 chauffages brefs à des températures de 70°C à intervalles réguliers, ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant.

Par exemple la destruction des pathogènes du lait se fait par un cycle de 63°C pendant 30 minutes suivie de 73°C pendant 15 minutes

II. La filtration

La filtration est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 µm. Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre.

Cette technique est intéressante lors d'utilisation de produits thermolabiles comme certains acides aminés aromatiques, vitamines, hormones de croissance, acides nucléiques et une bonne partie des antibiotiques.

III. Autres procédés de stérilisation

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

1. Radiations :

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

2. Agents chimiques :

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

TP3 : Méthodes d'ensemencement



L'ensemencement

Les germes se trouvent souvent dans la nature sous forme de mélange de plusieurs espèces. Isoler c'est séparer les divers micro-organismes contenus dans le prélèvement initial.

Un ensemencement peut être envisagé pour :

- Séparer des micro-organismes différents au sein d'un mélange (prélèvement par exemple)
- Purifier une souche contaminée ou contrôler sa pureté.

L'ensemencement peut être réalisé par épuisement de la semence en étalant le produit initial à la surface d'un milieu solide approprié. Pendant l'incubation, chaque micro-organisme déposé se multiplie pour donner un clone de cellules identiques. Lorsque les microorganismes déposés sont suffisamment éloignés, le clone se développe abondamment pour produire une colonie (amas de cellules identiques). L'objectif de l'isolement est donc d'obtenir pour chaque micro-organisme différent des colonies distinctes.

Les colonies obtenues, en étalant une souche pure, doivent toutes présenter les mêmes caractères. A l'opposé, l'isolement d'un mélange donnera autant de colonies différentes que de micro-organismes différents contenus dans ce mélange.

Notez : deux colonies de même aspect et de mêmes caractères ne contiennent pas forcément des micro-organismes identiques

Rappel : les boîtes doivent être placées couvercle en bas

1. Matériel par groupe

- Eau physiologique (tube de 9ml)
- Anse de platine
- Gélose nutritive
- Boîte de pétri

2. Principe

Diluer dans de l'eau physiologique une fraction du mélange de germe jusqu'à obtention d'une suspension opalescente,

Prélever ensuite une fraction de cet échantillon dilué puis étaler sur la plus grande surface possible de milieu nutritif à l'aide d'un instrument d'isolement (anse de platine, pipette pasteur boutonnées etc...).

Le nombre de germe restant sur l'instrument sera de plus en plus faible, ce qui va permettre d'obtenir des colonies distantes les unes des autres.

3. Mode opératoire (Technique utilisant la boîte de pétri) :

a. Méthode de nevot

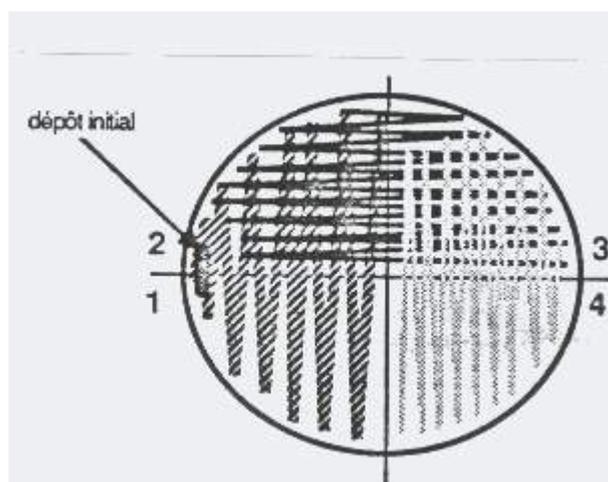
- Prélever à l'aide de l'anse de platine une fraction de l'inoculum
- Ensemencer par stries fines et très serrées le premier demi- cercle
- Flamber l'anse de platine, laissé refroidir
- Ensemencer le deuxième demi- cercle
- Flamber l'anse de platine
- Ensemencer le troisième demi-cercle

b. Technique des 4 séries de stries

- Tracer sur le fond extérieur de la boîte de pétri deux diamètres perpendiculaires séparant la boîte en quatre secteurs.
- Prélever à l'anse (stérile) la suspension ou le bouillon dans le cône stérile.
- Avec la main gauche maintenir entrouverte la boîte dans le cône stérile et étaler le prélèvement par stries très serrées dans une moitié de quadrant (quadrants 1 et 2 Flamber l'anse et laisser refroidir)
- Etaler à nouveau le prélèvement par stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 2 et 3.
- Flamber l'anse et laisser refroidir.
- Répéter une dernière fois l'étalement en stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 3 et 4

c. technique de butiaux :

On se sert d'une pipette pasteur boutonnée; la petite boule est plongée dans l'inoculum, ensuite on balaye toute la surface de la gélose



Ensemencement par épuisement

TP 4 : Etude microscopique des bactéries, coloration simple

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

I. Examen à l'état frais

C'est l'examen microscopique de bactéries vivantes, en milieu liquide. Il permet d'apprécier leur mobilité (ou immobilité) et leur morphologie.

Préparation :

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

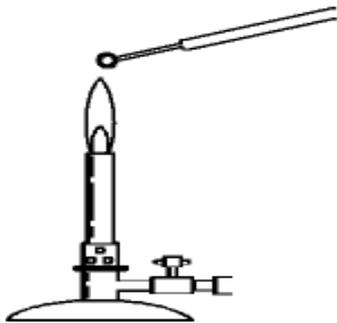
Déposer sur une lame propre soit le contenu d'une « anse de platine » soit « une petite goutte » à l'aide d'une pipette Pasteur. Recouvrir la goutte d'une lamelle.

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

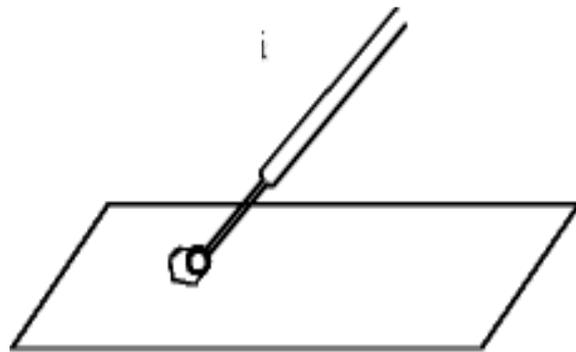
Déposer une gouttelette de liquide (milieu liquide ou eau) sur la lame. Prélever une trace de culture à l'anse de platine et l'émulsionner dans le liquide.

Recouvrir d'une lamelle.

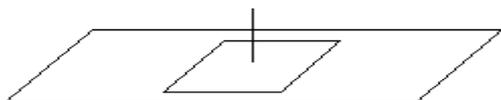
3. Recouvrir d'une lamelle



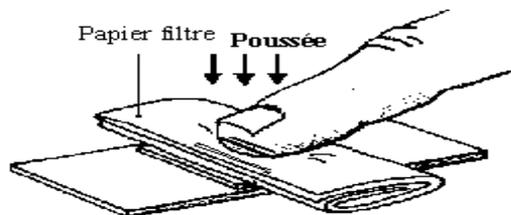
1. Flamber l'anse de Platine



2. Déposer une goutte de la suspension bactérienne



3. Recouvrir d'une lamelle



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

- Coloration simple (un seul colorant)

- Coloration différentielle type Gram
- Colorations spéciales des structures bactériennes (capsules, spores...).

Remarque :

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

1. Réalisation des frottis :

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

1. Etalement sur lame de verre :

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

2. Séchage :

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

3. Fixation du frottis sec :

Cette étape consiste à tuer les bactéries et les coller sur la lame, sans en altérer la structure. La fixation s'effectue par la chaleur :

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

COLORATIONS SIMPLES : (Coloration au bleu de Méthylène)

La coloration au bleu de méthylène peut apporter des informations concernant la morphologie des germes.

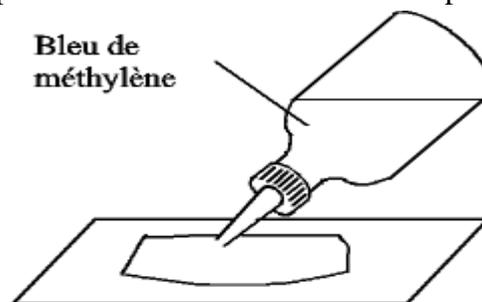
Mode opératoire :

Sur le frottis fixé et refroidi :

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

Résultats

Les bactéries sont colorées en bleu sombre. Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries.



Coloration au bleu de méthylène

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

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation.

Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées : les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées.

La colonie peut apparaître à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies

1. Aspect de colonies en surface sur milieu solide

1.1. La taille

Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant de micromètres oculaires..

1.2. La forme

- Allure de contours : lisse, dentelés, déchiquetés, irréguliers
- Relief : surface bombée, demi-bombée, plate, Centré : parfois surélevé, parfois ombiliquée (en creux)

1.3. L'aspect de la surface

La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueux, renvoyer la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé.

1.4. L'opacité

Les colonies sont décrites comme :

- Opaques (ne laissent pas passer la lumière)
- Translucides (laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli)
- Transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre, on parle de gouttes de rosée"

1.5. La consistance

Au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes).

1.6. La couleur et/ou pigment

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

2. Aspect des colonies en profondeur :

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

3. Aspect des colonies en surface sur gélose linéaire

1. filiformes

2. légèrement envahissantes avec bords ondulés
3. légèrement envahissantes avec bord érodé
4. envahissante

II. Aspect de la pousse en milieu liquide

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

III. Mode opératoire :

a. Milieu solide :

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

b. Milieu liquide :

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



Vue par dessus



ronde



à bords dentelés



en étoile

TP 6 : Coloration de Gram

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

Réactifs :

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

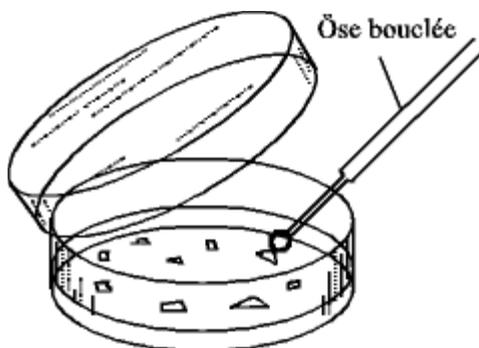
Mode opératoire :

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

Résultats :

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

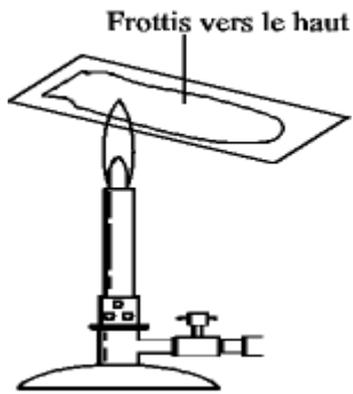
- Des bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, 'le gram' elles sont dites 'Gram positif' ;
- Des bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, 'le Gram' elles sont dites 'gram négatif'.



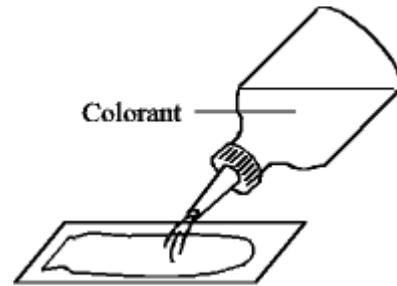
1. Prélever une partie d'une colonie isolée



2. Réaliser un étalement sur lame



3. Fixer à la chaleur



4. Réaliser les étapes de coloration

TP 7 : Les milieux de culture

Les micro-organismes exigent pour leur croissance des aliments. Ces aliments leur sont fournis au laboratoire par des milieux nutritifs ou milieux de culture. Pour permettre le développement des microbes le milieu doit :

*contenir tous les aliments nécessaires en quantité suffisante et en proportion relative convenable : le milieu doit être nutritif et équilibré.

*avoir un pH, une pression osmotique, une viscosité des caractéristiques physicochimiques compatibles avec la vie microbienne. Comme les besoins nutritionnels des microorganismes et les conditions de leurs développements sont très variés il n'existe évidemment aucun milieu universel sur lequel tous les microbes soient capables de se multiplier. Toutefois, certains milieux conviennent au développement d'une grande variété de germes microbiens ; le choix de tels milieux repose sur la connaissance de l'habitat naturel et de la physiologie alimentaire du groupe de germes que l'on désire cultiver. D'une manière très générale, on peut distinguer :

1. Milieux synthétiques

Préparés exclusivement avec des produits chimiques purs. Le milieu synthétique de composition bien définie, constitue le milieu de culture idéal. Ce type de milieu permet d'obtenir des résultats comparables et de déceler avec précision les modifications qui il subit au cours du développement microbien. Il n'en est généralement pas de même avec les milieux non synthétiques qui sont constitués par des éléments complexes de composition variable. Les milieux synthétiques conviennent surtout aux moisissures (champignons microscopiques) mais fort peu aux bactéries

2. Milieux complexes :

Milieu dont on ne connaît que partiellement la composition. Ces milieux de culture peuvent contenir des extraits de levure (cellule de levure déshydratée et lysées) qui fournissent une source d'acide aminé de vitamine et d'azote, des extraits de malt apportant une source de carbone, des peptones (protéine animale, de poisson, de caséine de lait) source d'azote organique qui intéresse les individus hétérotrophes. (Ex. bouillon nutritif, bouillon au soja.). Parmi ces 2 types de milieu, il existe **des milieux sélectifs** : qui vont permettre de sélectionner le type de bactéries qui pourront cultiver dessus, alors que tous les autres micro-organismes présents sont inhibés. Un milieu de culture est rendu sélectif pour une espèce microbienne lorsque sont seules satisfaites les exigences nutritives et les conditions de développement particulières à cette espèce Les principaux facteurs de sélection microbienne utilisés seuls ou en association sont :

*la température d'incubation

*Le pH du milieu

*La faculté d'utiliser une source nutritive déterminée (carbone, azote).

*La résistance à l'action bactéricide d'un antiseptique ou d'un antibiotique

Les milieux sont soit **liquides**, soit **solides**. On utilise fréquemment la gélose ou agar-agar un polymère de sucre tiré d'une algue rouge. Elle ne constitue qu'un support du milieu de culture.

Capable d'absorber 200 à 250 fois son poids d'eau, la gélose forme une gelée qui se liquéfie à 65-70° en refroidissant, cette gelée demeure en surfusion jusqu'à 40-45° et prend une masse aux températures inférieures. La gélose est généralement incorporée aux milieux liquides à la dose de 15 à 20%.

Les milieux solides présentent un grand intérêt en Microbiologie. Ils permettent, lorsque la technique d'ensemencement est convenable, le développement des germes en colonies apparentes, isolées les unes des autres, provenant en principe, de la multiplication d'un seul germe (clone) et à partir desquelles peuvent être obtenues des cultures pures.

Mode opératoire

Matériels :

- 2 béchers de 500 ml, thermomètre, agitateur, bec bunsen, trépied et sa grille, boîtes de pétri, des tubes à vis ou cotonnés stériles, pince en bois ou gants

Produits :

- Bouillons nutritif (BN) et Gélose Nutritive (GN), en poudre,
- Eau distillée,

Protocole :

- Peser la masse nécessaire de poudre GN pour 250 ml d'eau distillée.
- Dissoudre la poudre dans le diluant à l'aide de l'agitateur.
- Chauffer au bec bunsen jusqu'à l'ébullition
- Laisser refroidir la préparation dans le cône stérile du bec bunsen
- Lorsque la préparation a atteint une température inférieure à 60°C couler dans des boîtes de pétri et des tubes à vis stériles

TP 8 : Etude de la croissance bactérienne

On effectue une étude des paramètres de la croissance de la souche *Hafnia alvei* (bacille Gram-), impliquée dans l'affinage du fromage (Camembert) et ayant un impact positif sur la production de composés Aromatiques).

Principe :

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

La mesure de la croissance se fera par le suivi de l'absorbance en fonction du temps et parallèlement par comptage en cellule de Thomas.

10mL d'une préculture fraîche de la nuit de la souche sélectionnée *Hafnia alvei* en bouillon cœur—cerveau (BCC) sont introduits dans un erlen contenant le même milieu de culture dans les mêmes conditions de pH et de température. A partir de cet instant considéré comme t₀ des prélèvements

Stériles sont effectués pour les analyses microbiologiques.

Manipulations :

-Les BCC stériles et la préculture sont placés dans un bain--marie thermostaté à 37°C sous agitation.

- Bien homogénéiser la pré--culture avant de prélever

- Verser les 10 ml le plus stérilement possible dans l'erlen contenant le BCC

- **Dès cet instant déclencher le chronomètre = t₀**

- **Prélever 1 ml à la pipette paille dans les conditions stériles et le verser dans une Cuve à spectrophotomètre= échantillon 0.**

- Mettre la cuve immédiatement dans la glace pilée pour arrêter toute réaction

- Les autres prélèvements s'effectueront de la même façon toutes les 10 minutes pendant la première heure puis toutes les 15 minutes ensuite.

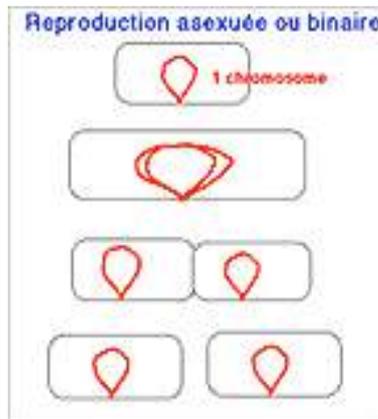
- Relever dans un tableau les différentes valeurs d'absorbance en fonction du temps ainsi que le nombre de cellules comptées/ml.

Compte rendu :

- Tracer la courbe $\ln A = f(t)$ en tenant compte qu'une unité d'absorbance = $5 \cdot 10^8$ cellules/ml

DOCUMENT 1

Lors de la croissance bactérienne, il y a **reproduction asexuée par scission binaire** ou de scissiparité en l'**absence de toute recombinaison génétique** (pas de zygote). La bactérie est haploïde (possède un chromosome)

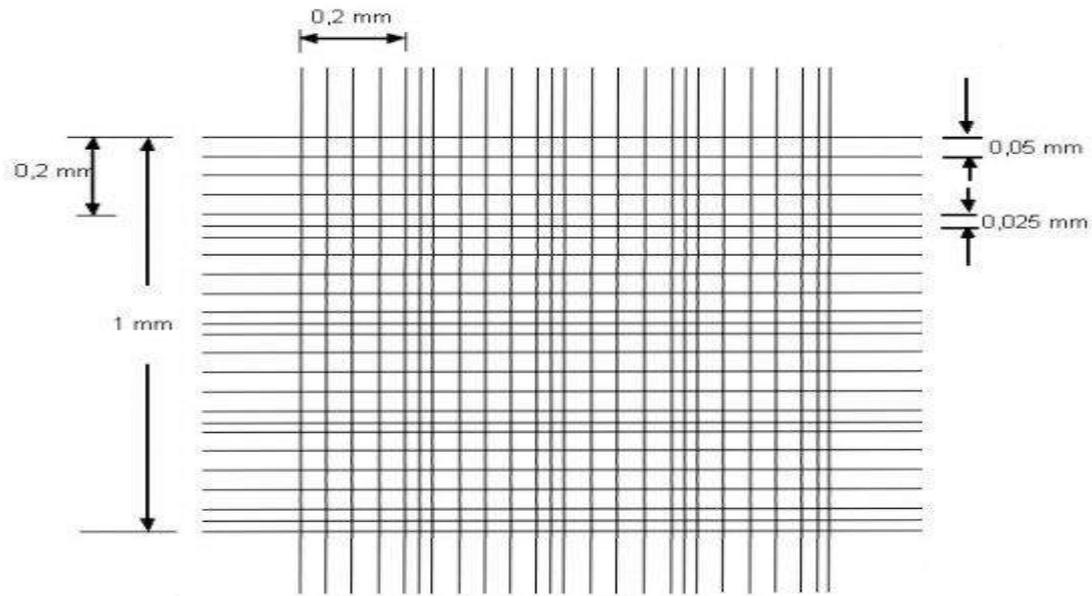


Chaque bactérie donne deux bactéries filles à chaque génération, on définit deux paramètres de la croissance:

- Le **temps de génération (G)** : le temps que met une bactérie mère pour se dédoubler en deux bactéries filles ou temps nécessaire au doublement de la population. G s'exprime en heure ou en minute
- Le **taux de croissance horaire (r)** : le nombre de divisions par heure, r s'exprime en h^{-1}

Génération	Descendance d'une bactérie après 3 divisions	Temps de multiplication à 40 °C		Nombre de bactérie
		E. coli	Mycobacterium tuberculosis	
	bactérie mère	0 min	0 min	$1 = 2^0$
première génération		20 min	4 heures	$2 = 2^1$
deuxième génération		40 min	8 heures	$4 = 2^2$
Troisième génération		1 heure		

DOCUMENT 2 :



Cellule de Thomas

Description

Le quadrillage total

Volume : 0,1 µl

Cote : 1 mm

Hauteur : 0,1 mm

Manipulation :

Homogénéiser le liquide à analyser (ou sa dilution), l'introduire dans la cellule. Attendre au moins 4 min, la cellule bien à l'horizontal, (les éléments cellulaires doivent sédimenter).

Compter les éléments cellulaires

Avant de faire le comptage :

-Faire une observation à l'objectif x10 non seulement pour repérer le quadrillage mais aussi pour vérifier que les cellules à compter sont réparties de façon homogène. Passer à l'objectif x40 pour effectuer le comptage.

- Pour les éléments chevauchant les lignes, comptez tous ceux qui chevauchent les lignes à gauche et en haut. Ne comptez aucun élément qui chevauche les lignes à droite et en bas.

Calcul du nombre de cellules par microlitre

Soit n le nombre d'éléments comptés, N le nombre d'éléments par microlitre (μl), V le volume de comptage. Thomas : $V = 0,1 \mu\text{l}$ (totalité du quadrillage)

$$N = n / V \text{ donc } N = n / 0,1$$

Si le Comptage est effectué sur du liquide dilué : ne pas oublier de multiplier le nombre d'éléments comptés par le taux de dilution.

TP 9 : Critères d'identification biochimique des bactéries
PAR LA MICRO-METHODE API
Applications aux familles des Entérobactéries et des Micrococcaceae

Objectif général :

Connaître la **micro-méthode API**, actuellement la plus employée en Algérie, pour l'identification biochimique des bactéries les plus fréquemment rencontrées.

Objectifs spécifiques :

L'étudiant doit être capable :

- de déterminer le **Gram** d'une souche inconnue et de justifier les différentes étapes de la coloration de Gram.
- d'effectuer les **tests d'orientation** (morphologie, Gram, oxydase, catalase...) afin de justifier le choix de la galerie API
- de savoir ensemer, lire et effectuer les tests sur les **galeries API** (20E et 20Staph) et, de savoir établir le diagnostic à l'aide du catalogue analytique correspondant.

II-MANIPULATIONS (par binôme ou trinôme)**1) Premier jour**

Tests d'orientation et ensemencements

Vous disposez de **4 souches bactériennes inconnues (n°)** en culture pure sur gélose nutritive

a) Faire pour chacune des souches un **examen macroscopique** (taille, texture, aspect...) **et microscopique** (Gram)

b) Effectuer, selon le résultat obtenu pour la morphologie et le Gram, **les tests d'orientation** appropriés (oxydase, catalase) **NE PAS UTILISER D'ANSE METALLIQUE.**

Conclure et orienter le diagnostic

c) **A partir de la souche se présentant comme un bacille Gram - aérobic et oxydase -,** réaliser une suspension d'opacité au moins égale à **0,5 de Mc Farland**, à partir de colonies prélevées sur gélose nutritive, dans **5mL d'eau physiologique stérile.**

A partir de cette suspension :

- effectuer un **isolement à l'anse** par la méthode des quadrants sur le milieu **BCP**
- ensemencer une galerie **API 20 E** (**Suivre les instructions fournies dans le manuel d'utilisation : remplir seulement le tube, ou le tube et la cupule, ou rajouter une goutte d'huile...**)
- incuber à 37°C pendant 24H

d) **A partir de la souche se présentant comme une coque Gram + aérobic et catalase +**, réaliser une suspension d'opacité au moins égale à **0,5 de Mc Farland**, à partir de colonies prélevées sur gélose nutritive, dans **l'ampoule Staph médium**.

A partir de cette suspension :

- effectuer un **isolement à l'anse** par la méthode des quadrants sur le milieu **Chapman**
- ensemencer une galerie **API 20 Staph** (Suivre les instructions fournies dans le manuel d'utilisation : remplir seulement le tube, ou le tube et la cupule, ou rajouter une goutte d'huile...)
- incuber à 37°C pendant 24H

e) **A partir de la souche se présentant comme une coque Gram + aérobic, catalase -**, réaliser une suspension dense à partir de colonies prélevées sur gélose nutritive, dans **2mL d'eau physiologique stérile**.

A partir de cette suspension :

- effectuer un **isolement à l'anse** par la méthode des quadrants sur la **gélose esculine**
- incuber à 37°C pendant 24H

2)Deuxième jour

a) **A partir de la souche se présentant comme un bacille Gram – aérobic et oxydase - :**

- faire une lecture (aspect macroscopique et caractères biochimiques) du milieu **BCP**. Vérifier la pureté de la souche.
- faire la lecture et les tests biochimiques sur la galerie **API 20 E**. Reporter les résultats sur la fiche de résultats API 20 E. Identifier le genre et l'espèce de la souche inconnue à l'aide du catalogue analytique.

b) **A partir de la souche se présentant comme une coque Gram + aérobic et catalase +**,

- faire une lecture (aspect macroscopique et caractères biochimiques) du milieu **Chapman**. Vérifier la pureté de la souche.
- faire la lecture et les tests biochimiques sur la galerie **API 20 Staph**. Reporter les résultats sur la fiche de résultats API 20 Staph. Identifier le genre et l'espèce de la souche inconnue à l'aide du catalogue analytique.

c) **A partir de la souche se présentant comme une coque Gram + aérobic, catalase -**,

- faire la lecture (aspect macroscopique et caractères biochimiques) du **milieu esculine**.
- Conclure et orienter le diagnostic au moins jusqu'au genre.

III) COMPTE-RENDU PAR BINOME ou TRINOME

10 pages maximum

- Rappeler le ou les buts du TP
- Rédiger le compte-rendu en suivant une démarche logique d'identification.

-Noter les résultats des observations (Schémas, tableaux, photos...peuvent être réalisés, ils doivent comporter un titre et des légendes)

-Préciser les informations obtenues sur les bactéries et justifiez les résultats et les raisonnements

-Conclusion générale

NE PAS OUBLIER D'INDIQUER LES N° DE SOUCHES

TP 10 : Levures et cyanobactéries

Lecture des graphiques

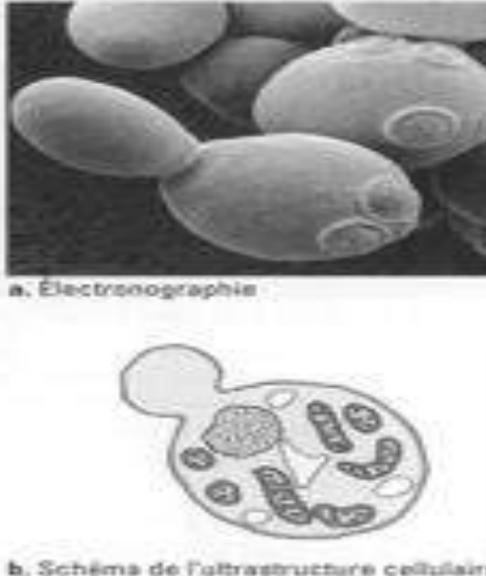
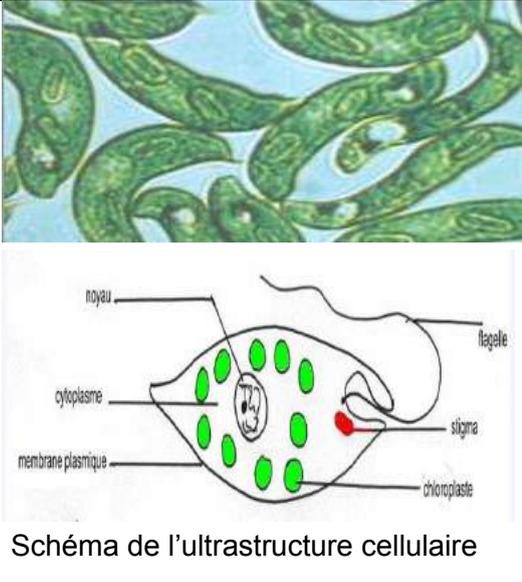
La levure est l'un des êtres vivants les mieux connus et à côté de son utilisation millénaire dans la fabrication de différents aliments, elle constitue l'un des outils les plus utilisés dans la biotechnologie, notamment en génie génétique.

Les algues bleues nommées Cyanophycées ou Cyanobactéries forment avec les bactéries l'embranchement des Schizophytes. Trois caractères donnent à cet embranchement son originalité ; les cellules ne présentent ni noyau véritable ni plaste, il n'y a pas de reproduction sexuée.

-On se demande si ces cellules fonctionnent de la même manière (Produisent leur énergie de la même façon).

-On réalise des expériences afin de tester cette hypothèse.

Les cellules étudiées

Levures	Euglènes
<p>La levure est un organisme unicellulaire eucaryote appartenant au groupe des champignons.</p>	<p>L'euglène est une algue chlorophyllienne, eucaryote, unicellulaire, elle est mobile</p>
 <p>a. Electronographie</p> <p>b. Schéma de l'ultrastructure cellulaire</p>	 <p>noyau</p> <p>cytoplasme</p> <p>membrane plasmique</p> <p>flagelle</p> <p>stigma</p> <p>chloroplaste</p> <p>Schéma de l'ultrastructure cellulaire</p>

Expériences 1 : Résultats des cultures de cellules

1) Culture de levures

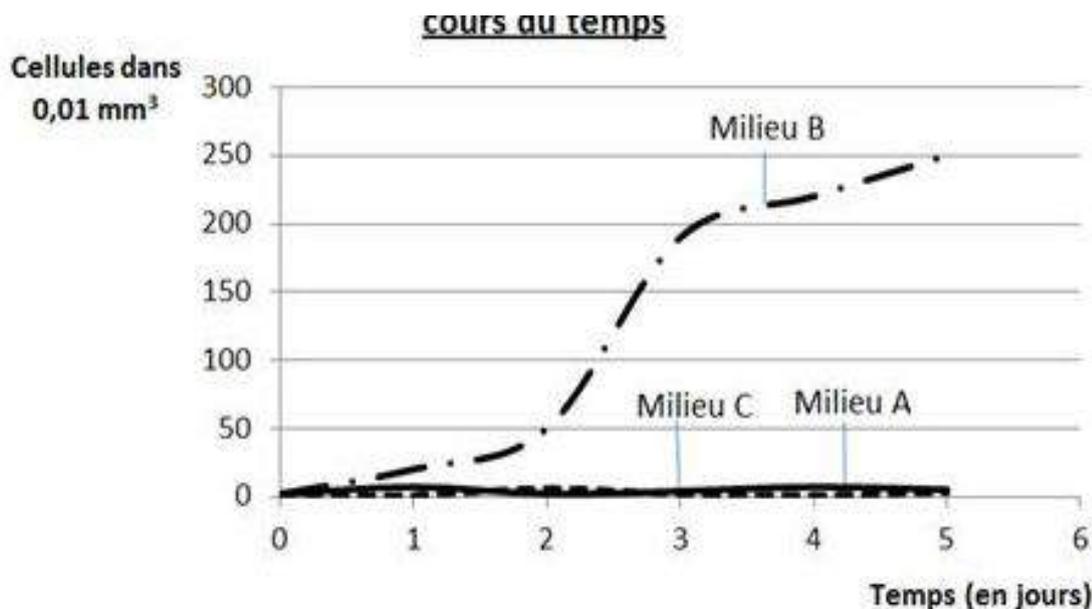
On réalise des cultures de ces 2 cellules dans différents milieux de culture. On évalue le développement des cellules. Si les cellules se développent, se multiplient c'est qu'elles auront trouvé dans le milieu tout ce dont elles ont besoin.

	Milieu A	Milieu B	Milieu C	Milieu D
Eau distillée	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
Sels minéraux	-	3,75 g	3,75 g	-
MO	-	30 g	-	30 g

Les résultats sont identiques à la lumière et à l'obscurité.

On recherche donc leurs besoins nutritifs.

Document 2 : Résultats : la croissance des cellules dans les différents milieux



- Donnez un titre au graphique

Nombre de levures en fonction du temps et des milieux, à la lumière et à l'obscurité

- En une phrase donnez l'information apportée par le graphique

Je vois que les levures ne se développent que dans les milieux qui contiennent de la matière Organique (B et D)

- Quels sont les besoins des levures

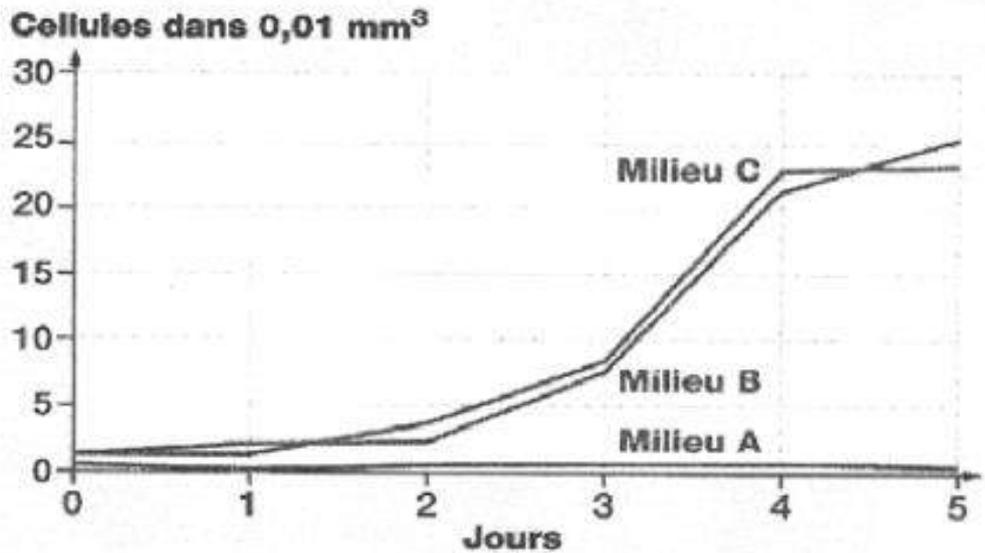
J'en déduis que les levures ont besoin de matière organique

2) Culture d'euglènes

Document 1 : les milieux de culture

	Milieu A	Milieu B	Milieu C	Milieu D
Eau distillée	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
Sels minéraux	-	3,75 g	3,75 g	-
MO	-	30 g	-	30 g

Document 2



Le document 2 représente les résultats à la lumière. **A l'obscurité on n'observe aucun développement dans aucun milieu.**

-Donnez un titre au graphique

Nombre d'euglènes en fonction du temps et des milieux, à la lumière.

- En une phrase donnez l'information apportée par le graphique

Les euglènes ne se développent que dans les milieux qui contiennent des éléments minéraux (C et B) A LA LUMIERE

- Quels sont les besoins des Euglènes?

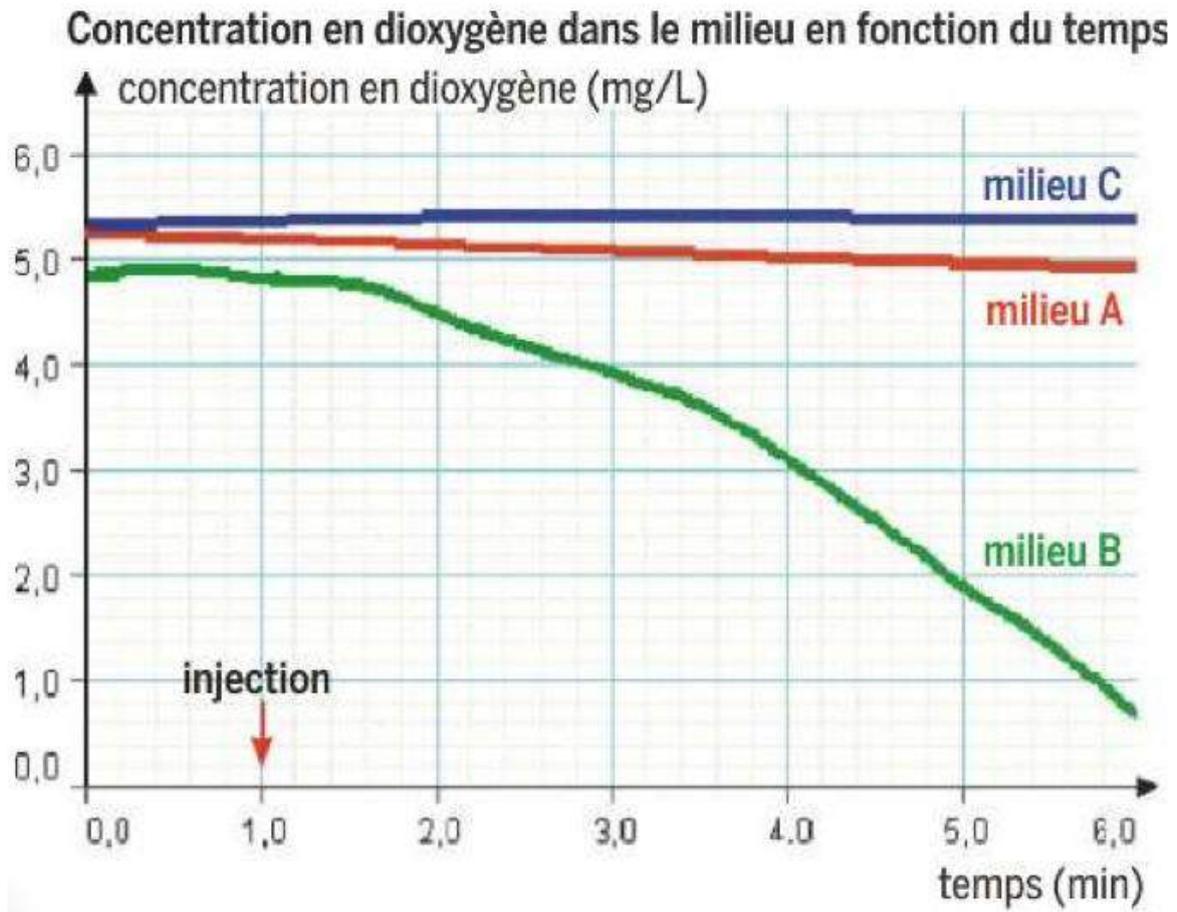
Les euglènes ont besoin d'éléments minéraux et de lumière

2 définitions : 2 métabolismes différents (Compléter par le terme manquant).

Autotrophes : cellules (ou organismes) pouvant produire leur matière vivante en utilisant exclusivement des nutriments minéraux prélevés dans leur milieu. C'est la lumière solaire qui fournit généralement l'énergie indispensable. = **EUGLENES**

Hétérotrophes : cellules (ou organismes) ne pouvant produire leur matière vivante qu'à condition de trouver dans leur milieu des nutriments organiques qui fournissent l'énergie nécessaire à leur activité = **LEVURES**

Expériences 2 : étude des échanges gazeux.



- Donnez un titre

Evolution de la concentration en O₂ en fonction du temps et du milieu.

- Décrivez l'évolution de l'O₂

L'O₂ reste stable dans les milieux sans MO (C et A) et diminue dans les milieux avec MO (B et D)

- Qu'en déduisez-vous ?

Les levures consomment de l'O₂

- Quel mécanisme mettez-vous en évidence ?

La respiration

- En quoi consiste-t-il ?

La respiration consiste à absorber de l'O₂ et des matières organiques...

- Quel est le rôle de ce mécanisme ?...afin de produire de l'énergie : l'O₂ oxyde (« brûle ») les matières organiques (glucose) ce qui libère de l'énergie et des déchets (CO₂ + H₂O)

Evolution de l'O₂, CO₂ (et glucose) en fonction du temps et d'une injection de glucose

Je vois que la diminution de l'O₂ augmente à partir l'injection de glucose, cette diminution est

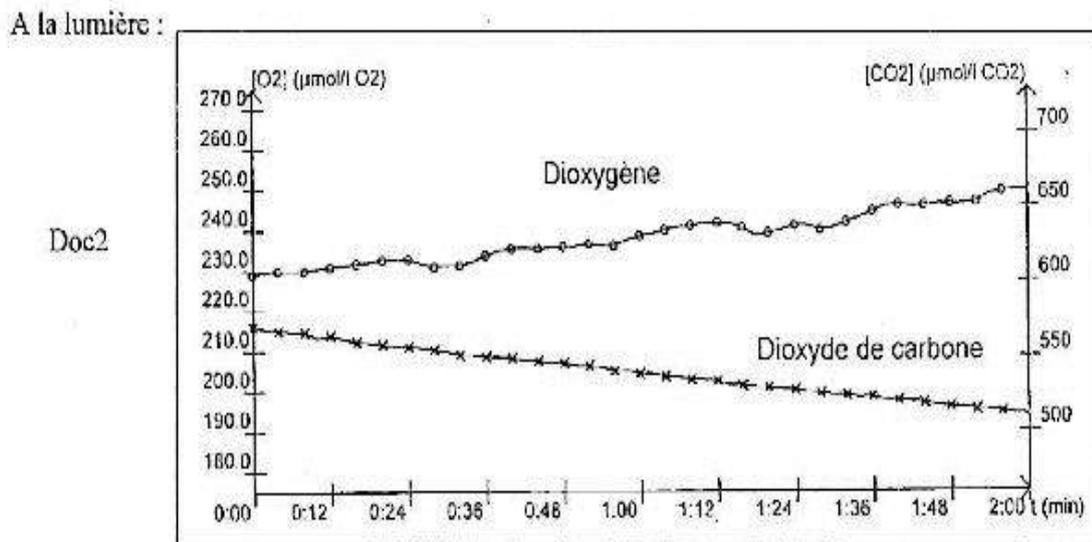
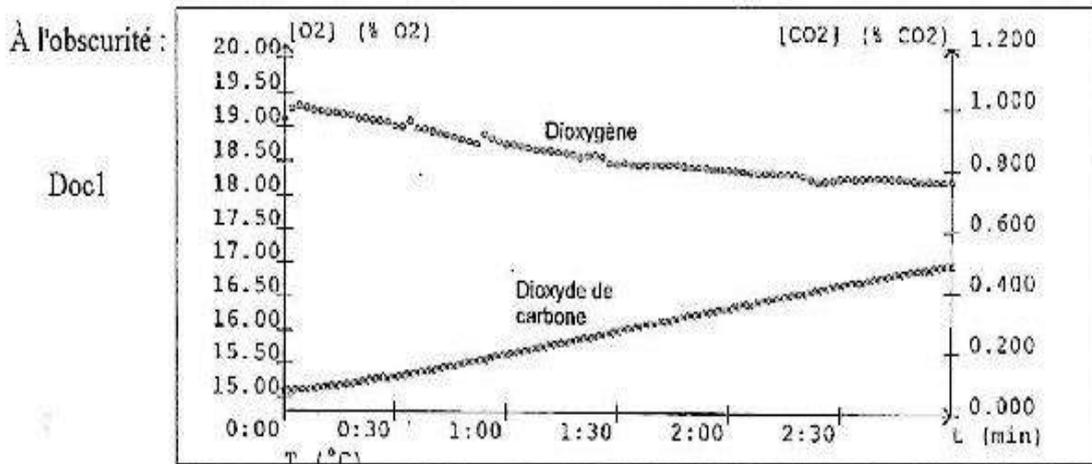
parallèle à la diminution du glucose et symétriquement, le CO₂ augmente-

- Ce document confirme-t-il votre hypothèse ?

Oui car je sais que la respiration s'accompagne d'une production de CO₂, qui augmente donc dans le milieu

BILAN : les levures respirent : elles produisent de l'énergie en consommant du glucose et de l'O₂. L'O₂ oxyde le glucose dans les mitochondries, ce qui produit de l'énergie et des déchets : CO₂ + H₂O

2) Chez les euglènes, dans les milieux B et C



- Donnez un titre au 1^{er} graphe

Evolution de l'O₂ et du CO₂ en fonction du temps à l'obscurité.

- Décrivez l'évolution du O₂ et du CO₂ à l'obscurité

Je vois que L'O₂ diminue (il est consommé) et le CO₂ augmente (il est produit)

Qu'en déduisez-vous ?

A l'obscurité, les euglènes respirent

- Donnez un titre au 2eme graphe

Evolution de l'O₂ et du CO₂ en fonction du temps à la lumière.

- Décrivez l'évolution du O₂ et du CO₂ à l'obscurité

Je vois que le CO₂ diminue (il est consommé) et l'O₂ augmente (il est produit)

- Qu'en déduisez-vous ?

A la lumière, les euglènes réalisent l'échange gazeux inverse ?????

- Quel(s) mécanisme(s) mettez-vous en évidence ?

nous savons que cet échange gazeux correspond à la photosynthèse.

- En quoi consiste le nouveau mécanisme mis en évidence ?

La photosynthèse correspond à la production de glucose à partir de CO₂ (+ eau et éléments minéraux) grâce à la lumière, et d'un déchet : l'O₂, dans les chloroplastes.

BILAN : Toutes les cellules produisent leur énergie par respiration mais à la lumière, les cellules végétales chlorophylliennes réalisent la photosynthèse.

NB : comme elles photo synthétisent plus qu'elles ne respirent, on ne voit que l'échange gazeux de la photosynthèse à la lumière.

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

Un certain nombre de facteurs physique externes peuvent intervenir dans le développement des microorganismes.

La variation de certains entre eux (pH du milieu, la température, la pression osmotique etc....) peut accélérer, retarder, ou arrêter la croissance microbienne. Nous étudions dans cette séance l'influence de la variation de température

Variation de la température

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

1. But d'expérience

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

2. Matériel par groupe

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

3. Mode opératoire

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

4-Lecture des résultats

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

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

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

ETUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des composés chimiques, élaborés par un micro-organisme ou produit par synthèse et dont l'activité spécifique se manifeste à dose faible sur les microorganismes. La détermination de la sensibilité d'une bactérie à divers antibiotiques est d'une grande importance en microbiologie. Elle permet l'élaboration des milieux d'isolement sélectifs, le contrôle d'une infection par chimio thérapeutique et enfin elle peut être utilisée comme approche dans la caractérisation et l'identification bactérienne. L'antibiogramme d'une souche peut être déterminé en milieu liquide par la méthode de la CMI (concentration minimale inhibitrice) ou par la technique des disques.

1. Matériel par groupe

- Disques de celluloses imprégnés d'antibiotique
- Boite de pétri + de gélose
- Culture microbienne en suspension
- Râteau

2. Mode opératoire

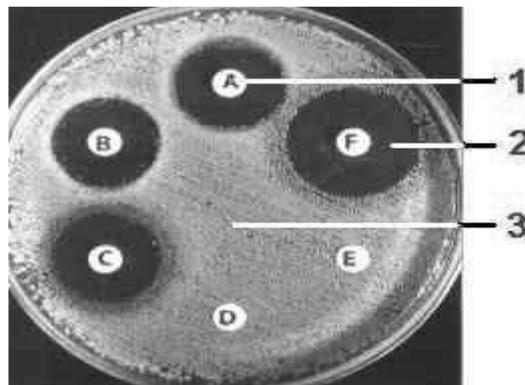
- Couler la gélose dans une boite de pétri
- Laisser prendre en masse
- Prélever 2 ou 3 gouttes de la suspension bactérienne, les déposer a la surface de la gélose les étaler avec un râteau
- S'assurer que la surface de la gélose est bien séchée, et y déposer les disques de celluloses imprégnés d'antibiotique
- Placer la boite de pétri à basse température +4°C pendant 15 à 30mn afin de permettre aux antibiotiques de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier
- Retirer la boites du réfrigérateur et la placer dans l'incubateur, à la température optimale de croissance du germe a étudier (37 °C) pendent 24 h

Rappel : les boites doivent être placées couvercle en bas

3-Lectures des résultats

L'activité de chaque antibiotique sera appréciée, par le diamètre de l'auréole d'inhibition provoqué autour du disque

Remarque : Cette méthode est une application de la diffusion en gélose .Le diamètre de l'auréole dépend de la vitesse de diffusion de l'antibiotique dans la gélose.



Zones d'inhibition

TP 12 : Isolement de la flore totale et spécifique de certains produits (Eau)

Introduction

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

Objectif

Evaluer la qualité microbiologique de l'eau potable distribuée dans la ville de Chlef.

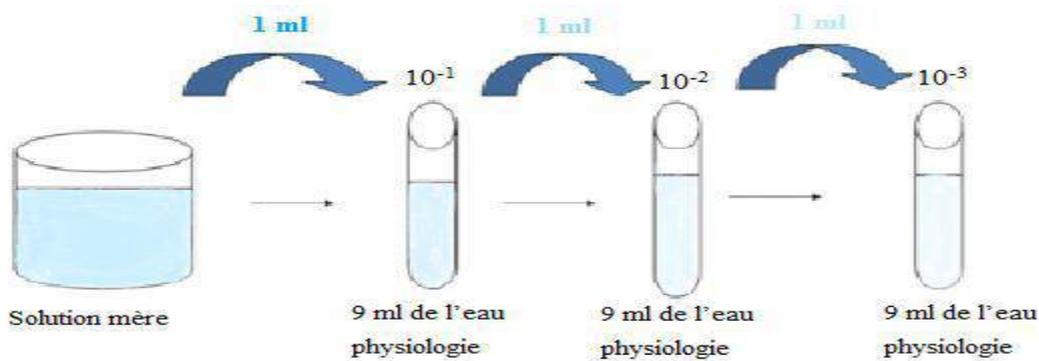
Méthode de prélèvement

Pour effectuer les analyses microbiologiques, le prélèvement a été réalisé à partir du robinet disposé à la partie inférieure de la cuve, dans un flacon stérile avec un bouchon à vis. Le robinet est flambé au préalable, les premiers jets ont été éliminés et le flacon a été rempli de volume 3/4.

Préparation des dilutions

Avant d'ensemencer les milieux de culture, des dilutions ont été effectués en cascades de la 10⁻¹ à la 10⁻³. Nous prélevons du flacon contenant l'eau à analyser 1ml que nous déposons dans un des tubes contenant les 9 ml de l'eau physiologie (la première dilution marquer par chiffre 10⁻¹), nous homogénéisons le tube par une légère mouvement, puis nous prélevons 1 ml de ce tube pour le mettre dans un deuxième tube (la deuxième dilution marquer par chiffre 10⁻²), nous répétons la même action pour obtenir la dilution 10⁻³.

Il faut noter que la pipette ne doit pas entrer en contact, ni avec la paroi des tubes, ni avec l'eau physiologique. Il est nécessaire par sécurité d'utiliser une poire en caoutchouc



Dilutions décimales

Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (Annexe 02)

Les microorganismes aérobies et aéro-anaérobies facultatifs se développent dans un milieu nutritif gélosé défini non sélectif incubé à 37°C pendant 24 heures. Ils apparaissent sous forme de colonies de tailles et de formes différentes.

Mode opératoire

On introduit 1ml de chaque dilution dans une boîte de Pétri (deux boîtes de Pétri sont ensemencées par dilution), puis on coule le milieu gélosé fondu au préalable au bain marie et maintenu à 45°C. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

Le comptage des germes contenus dans 1 ml d'échantillon n'est autre que le nombre de colonies comptées, multiplié par l'inverse du rapportée de dilution. Le nombre de germes totaux retenu est la moyenne arithmétique du nombre de germes trouvés pour les différentes dilutions. Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonies (U.F.C) par millilitre d'eau analysée.

Méthode de Dénombrement d'une flore d'un produit microbien

A. Dénombrement en milieu Liquide :

Mise en place du nombre caractéristique

Dilutions et aspect des tubes après incubation (lecture d'un trouble associé à la production de gaz collecté dans une cloche).	Résultats (trois essais par dilution)				
	10^{-n}	$10^{-(n+1)}$	$10^{-(n+2)}$	$10^{-(n+3)}$	$10^{-(n+4)}$
Résultats	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -	- - -
Nombre de tubes +	3	3	2	1	0
Combinaison possible	3	3	2		
Combinaison possible		3	2	1	
Combinaison possible			2	1	0

B-Dénombrement en milieu solide

Tables de Mac Grady

Deux tubes par dilution		Trois tubes par dilution					
Nombre caractéristique	NPP	Nombre caractéristique	NPP	Nombre caractéristique	NPP	Nombre caractéristique	NPP
000	0,0	000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,5	001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,5	010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,9	011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,9	020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,6	100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	1,2	101	0,7	221	3,0	321	15,0
110	1,3	102	1,1	222	3,5	322	20,0
111	2,0	110	0,7	223	4,0	323	30,0
120	2,0	111	1,1	230	3,0	330	25,0
121	3,0	120	1,1	231	3,5	331	45,0
200	2,5	121	1,5	232	4,0	332	110,0
201	5,0	130	1,6	300	2,5	333	140,0
210	6,0	200	0,9	301	4,0		
211	13,0						
212	20,0						
220	25,0						
221	70,0						
222	110,0						

$$N = \frac{NPP \times k}{V}$$

N	nombre de micro-organismes par mL de produit NPP x k analysé ou de « suspension mère »
NPP	nombre lu dans la table
k	facteur de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique (combinaison retenue)
V	volume de l'inoculum (1 mL en général)

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

$\sum C$	Somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues
V	Volume de l'inoculum (1 mL dans la masse/0,1 mL en surface)
d	Dilution correspondant à la première boîte retenue, avec l'inoculum le moins dilué

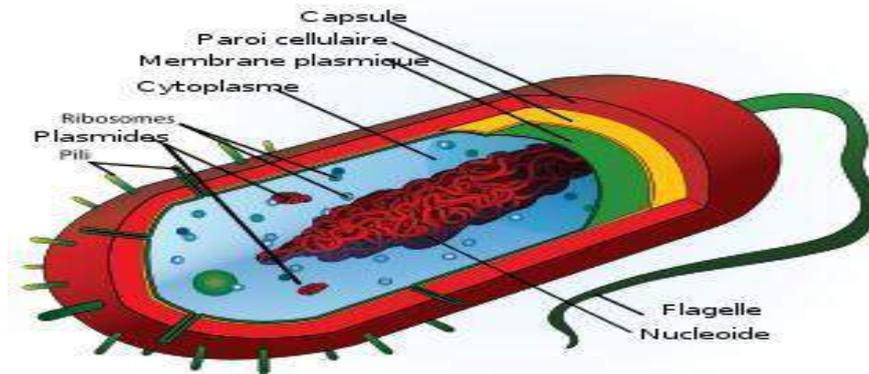
Travaux dirigés : TD TD1

Exercice 1

Répondre aux questions suivantes :

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

3-Titrez la figure suivante



Exercice 2 :

Complétez le tableau suivant

Exercice 2 :

Complétez le tableau suivant

Structure bactérienne	Description	Role
1-Chromosome bactérien		
2-Hyaloplasme bactérien		
3-Paroi bactérienne		

Exercice 3 :

On centrifuge 25 ml d'une culture de *Bacillus megaterium*. Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 20 ml de Tampon phosphate 0.04 mol/l pH7.2 de façon à laver les cellules bactériennes. Après avoir de nouveau centrifugé, décanté et recommencer deux fois le lavage, on remet le culot de cellules bactériennes en suspension dans 2.5 ml de tampon phosphate pH7.2

1- On prélève 1 ml de la suspension bactérienne, on ajoute 1 ml de solution de Saccharose à 2 mol/l : Tube1

2-On prélève 1 ml de la suspension bactérienne, on ajoute 1 ml d'eau distillée : Tube 2.

3-Après homogénéisation, on prélève une goutte de chaque tube et on passe à l'observation des frottis

au microscope optique au plus fort grossissement. Les résultats des observations microscopiques sont schématisés dans la figure 1.

4-a-Comparer les résultats des deux observations microscopiques et les justifier par les conditions expérimentales.

5--On ajoute dans les deux suspensions précédente (Tube1 et 2) 0.2ml de lysozyme. On examine de nouveau au microscope optique après 5 ; 15 et 30 minutes. Les résultats des observations sont schématisés dans la figure 2.

6-1-Que deviennent les cellules bactériennes dans les Tube 1 et 2 ? 2-preciser le rôle du lysozyme

7-3-Intrepreter les observations microscopiques en fonction des conditions expérimentales imposées sur les Tube 1 et 2.

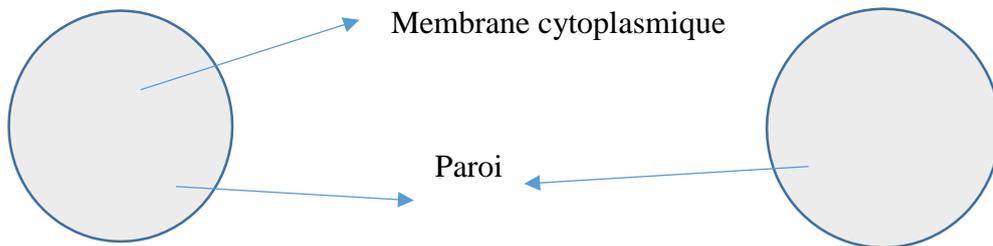
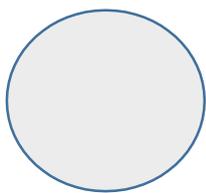
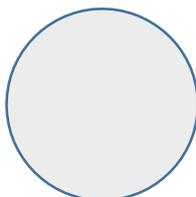


Figure 1

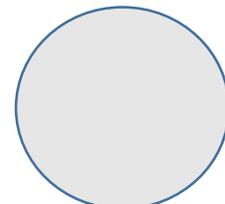
Tube 1 + Lysozyme



5minutes

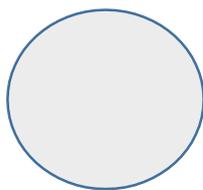


15 minutes

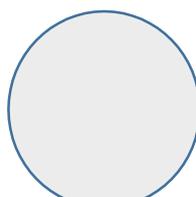


30 minutes

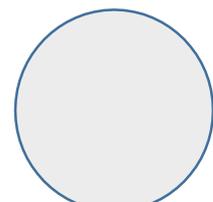
Tube 2 + Lysozyme



5minutes



15 minutes



30 minutes

Figure 2

TD 2

Exoercice1

-*Haemophilus Influenza*, petit bacille à Gram – présente une capsule. En donner la définition et la situer dans la cellule bactérienne.

-Les capsules sont visualiser par

- la coloration de Gram
- la coloration de Ziehl Nielsen
- la coloration au Bleu de Méthylène
- la coloration Négative

Exercice 2

Compléter le tableau suivant

	Nature biochimique	Rôle dans la coloration de Gram	Présence dans les Bactéries à Gram +	Présence dans les Bactéries à Gram -
Enveloppe externe				
Peptidoglycane				

Exercice 3

On chauffe un frottis de clostridium en présence d'un colorant : le vert de Malachite. On lave à l'eau puis on contre colore avec un autre colorant : la Fushine. Au microscope, les endospores vont paraître : 1 et les cellules : 2.

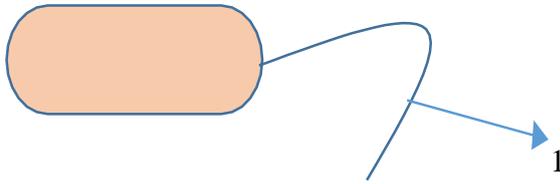
- a-1-vertes ; 2-roses b-1-roses ; 2-transparentes c-1-trasparentes ; 2-roses d-1-vertes ; 2-trasparentes e-1-roses ; 2-vertes.

Exercice 4

Expliquer les termes suivants

- Uniport : le transport de...../ions dans... .. via un transporteur membranaire.
- Symport : le transport de/ions dans via un transporteur membranaire.
- Antiport : le transport de...../ions dans... .. via un transporteur membranaire.

Exercice 5



1-A quoi correspond le chiffre 1, préciser le type de ciliature et le type de Gram.

2-Compléter

L'élément 1 est de nature.....Il joue un rôle principal dans.....et également un rôle dans.....Ce dernier se traduit par un changement de rotation du en présence d'un milieu attractif ou répulsif.

TD 3

Exercice 1

Compléter le tableau suivant

Besoin	Source	Type trophique	
Energie	Lumineuse	Substrat minéral	
		Substrat organique	
	Chimique	Substrat minéral	
		Substrat organique	
Carbone	Minéral		
	Organique		
Facteurs de croissance	Non indispensables		
	Indispensables		

Exercice 2

Milieu A	Composition
Phosphate d'Ammonium	0.2
Phosphate mono potassique	1
Sulfate de Magnésium	0.2
Chlorure de Calcium	0.1
Chlorure de Sodium	5

Milieu B	Composition
Milieu A+ Citrate tri sodique	2

Milieu C	Composition
Milieu A+ les Additifs suivants :	
Biotine	10 ³
Histidine	10 ³
Méthionine	2.10 ³
Thiamine	0.0001
Pyridoxine	0.00001
Acide Nicotinique	0.00001
Tryptophane	2.10 ³
Pantothénate de Calcium	10 ³
+ Oligo éléments	
+ Glucose	

L'analyse des types trophiques des souches I et II à l'aide des milieux de culture A, B, C dont la composition est donnée en g/l a donné les résultats suivants :

Souche pure	Milieu		
	A	B	C
I	-	+	+
II	-	-	+

Questions

1-Comment qualifier le milieu A

2- Certaines bactéries peuvent se développer dans le milieu A à condition de les incuber en atmosphère enrichie en CO₂. Expliquer pourquoi et donner leur type trophique vis-à-vis du Carbone.

3- Quel est le type trophique vis-à-vis du Carbone et des besoins nutritionnels spécifiques de la souche I?

4-Quelle est sa source d'Azote?

5-Qu'apporte le Glucose dans le milieu C?

6- Quel est le type trophique vis-à-vis du Carbone par rapport au métabolisme énergétique? 7-Définir et expliquer la présence d'Oligo éléments

8-Les composants additifs du milieu C appartiennent à 2 groupes distincts, lesquels? 9-A quelle catégorie appartiennent ces composants? Donner une définition

TD 4**Exercice 1**

Dans un milieu de culture liquide de 10ml, on ensemence 10^3 d'Escherichia coli, après 3h d'incubation sans phase de latence, on dénombre 10^8 germes par millilitre.

-Calculer le temps de génération de ce germe.

Exercice 2

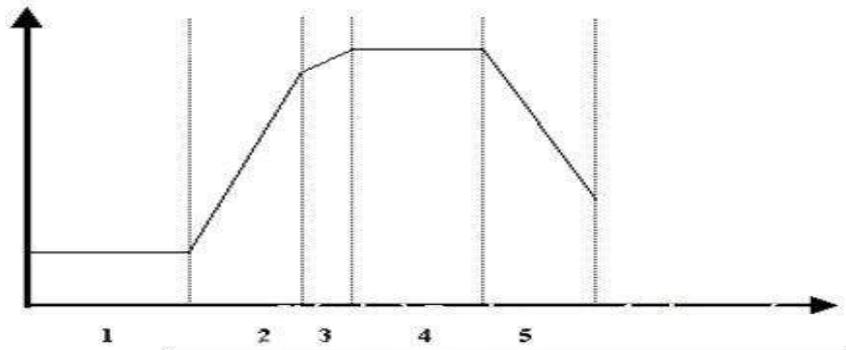
On veut déterminer le nombre de bactéries vivantes dans l'urine d'un malade atteint d'une infection bactérienne et suivant un traitement antibiotique. Les dénombrements avant le traitement ont montré que l'urine du patient contient une concentration de 10^8 cellules bactériennes vivantes/ml d'urine. Après 1 jours de traitement au Bactrim, le biologiste dépose un volume de 0.01 ml à la surface d'une cellule de Thoma. Après 30 minutes de repos permettant la décantation des cellules. La lame est examinée au microscope optique au fort grossissement.

-Calculer la concentration des cellules par ml dans cette urine sachant qu'on a compté 350 cellules dans 10 petits carrés dans une solution 10 fois plus concentré que l'urine originale.

Après coloration au Bleu de Méthylène, le pourcentage de cellules bleues était de 80% ; Quelle est la signification de ce résultat pour le comptage des cellules? Et pour le patient, le traitement est-il efficace?

TD 5

Exercice 1



1 : phase de latence,
 2 : phase de croissance exponentielle,
 3 : phase de ralentissement,
 4 : phase stationnaire,
 5 : phase de déclin.

-Décrivez ce que présente ce graphique et expliquer ce que présente chaque phase telles quelles sont représentées sur le graphique.

-Que se passerait-il pour le graphique précédent si la culture était effectuée en milieu renouvelé? Schématiser

-Que se passerait-il pour le graphique précédent si la cellule était synchrone? Schématiser.

Exercice 2

L'analyse bactériologique d'une urine infectée donne le tableau des résultats suivants, Sachant que l'on a ensemencé 0.1ml de chaque dilution par boîte de milieu de culture.

dilution	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Essai1	Inc	490	95	2
Essai2	Inc	501	110	0
Essai3	Inc	520	120	5

Inc : Incomptable

1-Définissez une colonie

2-Quelle dilution doit-on utiliser pour réaliser le dénombrement?

3-Determiner le nombre de bactéries par ml d'urine

References bibliographiques

- [1] Brock, T.D. (1970) "Biology of Microorganisms», Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey
- [2] Burdon, K.L., & Williams, R.P. (1968) "Microbiology", The Macmillan Co., New York
- [3] Fasquelle, R. (1970) "Eléments de bactériologie medicale", Flammarion, Paris
- [4] Fasquelle, R. (1971) "Eléments de virologie medicale», Flammarion, Paris
- [5] Golvan, Y.-J. (1969) "Eléments de parasitologie medicale", Flammarion, Paris
- [6] Javillier, M., et *al.* (1972) "Traite de biochimie générale", Tome III, fasc. III, Masson & Cie, Paris
- [7] Lambin, S., & Germain, A. (1969) "Précis de microbiologie», Masson & Cie, Paris
- [8] Larpent, J.P., & Larpent-Gourgaud, M. (1970) "Microbiologie pratique", Hermann, Paris
- [9] Leclerc, H. (1969) "Microbiologie", Doin, Deren & Cie, Paris
- [10] Burrows, W., Moulder, J.W., Lewert, R.M., & Rippon, J.W. (1968) "Textbook of Microbiology", W.B. Saunders Co., Philadelphia
- [11] Busch, A.W. (1971) "Aerobic Biological Treatment of Waste Waters", Oligodynamics Press, Houston, Texas
- [12] Carpenter, P .L. (1967) "Microbiology", W. B. Saunders Co., Philadelphia
- [13] Cruickshank, R., ed. (1972) "Medical Microbiology, A Guide to the Laboratory Diagnosis and Control of Infection", Churchill; Livingstone, Edinburgh & London
- [14] Frobisher, M. (1969) "Fundamentals of Microbiology" , W. B. Saunders Co., Philadelphia
- [15] Frobisher, M., Sommermeyer, L., & Fuerst, R. (1969) "Microbiology in Health and Disease", W.B. Saunders Co., Philadelphia
- [16] LeGuyon, R. (1961) "Précis de bactériologie", G. Doin & Cie, Paris
- [17] Lehninger, A.L. (1973) "Biochimie", Flammarion, Paris

- [18] Moustardier (1972) "Bactériologie médicale», Maloine, Paris
- [19] Pilet, P. E. (1968) "La Cellule: structure et fonctions", Masson & Cie, Paris
- [20] Polonovski, M. et al. (1972) "Biochimie médicale», Masson & Cie, Paris
- [21] Prevot, A.-R. (1961) "Traite de systématique bactérienne", Tomes I et II, Dunod, Paris
- [22] Gaden, E.L., ed. (1969) "Global Impacts of Applied Microbiology", Biotechnology and Bioengineering Symposium, Interscience Publishers, New York
- [23] Gebhardt, L.P., & Anderson, D.A. (1965) "Microbiology", The C.V. Mosby Co., Saint Louis
- [24] Jawetz, E., Melnick, J. L. & Adelberg, E.A. (1972) "Review of Medical Microbiology", Lange Medical Publications, Los Altos, California
- [25] Lamanna, C., & Mallette, F. (1965) "Basic Bacteriology", The Williams & Wilkins Co., Baltimore
- [26] Laskin, A.I., & Lechevalier, H.A., Ed. (1973) "Handbook of Microbiology", Press Division of Chemical Rubber Co., Cleveland
- [27] Schapira, G. (1970) "Eléments de biochimie générale», Flammarion, Paris
- [28] Senez, J. E. (1968) "Microbiologie générale", Doin, Deren & Cie, Paris
- [29] Stanier, R.Y., Doudoroff, M., & Adelberg, E.A. (1966) "Microbiologie générale", Masson & Cie, Paris
- [30] Well, J.-H. (1972) "Biochimie générale», Masson & Cie, Paris
- [31] Pelczar, M.J., & Reid, R.D. (1972) "Microbiology", McGraw-Hill Book Co., New York
- [32] Salle, A.J. (1967) "Fundamental Principles of Bacteriology", McGraw-Hill Book Co., New York
- [33] Silver, I.H. (1970) "Aerobiology", Academic Press, New York & London
- [34] Smith, D.T., Conant, N.F., & Overman, J. R. (1964) "Microbiology", Appleton-Century-Crofts, Inc., New York

[35] Swatek, F.E. (1967) "Textbook of Microbiology" , The C.V. Mosby Co., Saint Louis

[36] Sykes, G., & Skinner, F.A. (1971) "Microbial Aspects of Pollution», Academic Press,
New York & London

[37] Walter, W.G., & McBee, R.H. (1962) "General Microbiology", D. Van Nostran4 Co., Inc.,
New York