

Université Mohammed V
Agdal

Faculté des Sciences
Rabat

SVI – S3

Cours de
Microbiologie Générale

Préparé par

Pr El Bekkay BERRAHO

Automne 2009

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, B.P. 1014, Rabat – Maroc.

Tél. (212) 37 77 54 61, e-mail: berrahobek@hotmail.com

Introduction

I. Historique

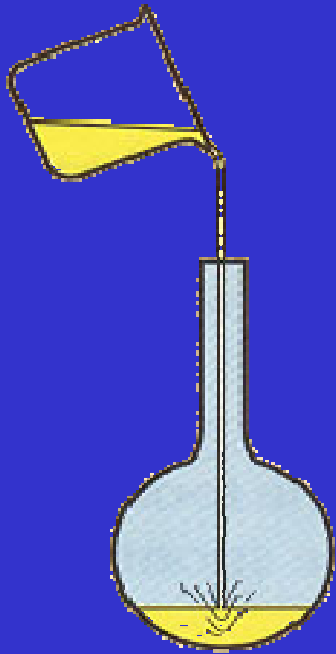
Découverte rattachée à l'invention du microscope

Le hollandais Antony Van LEEUWENHOEK (1632-1723)

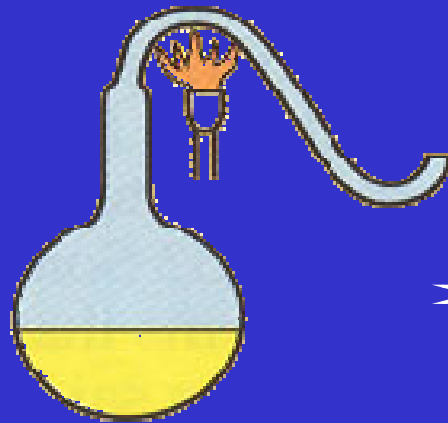
1. L'époque pasteurienne Louis PASTEUR (1822-1895)



Chute de la théorie de la génération spontanée



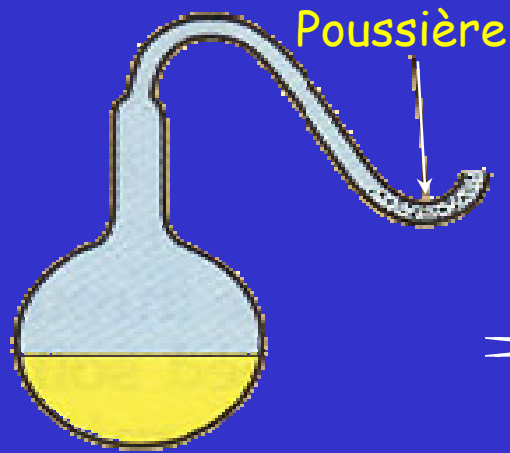
Infusion de foin
fraîchement préparée
(milieu de culture)



Couder le col du ballon
Sous l'effet de la chaleur

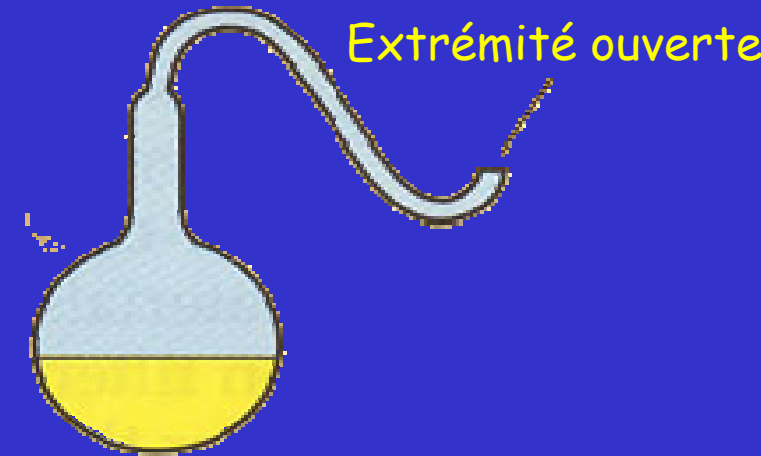


Stérilisation du milieu
Par la chaleur

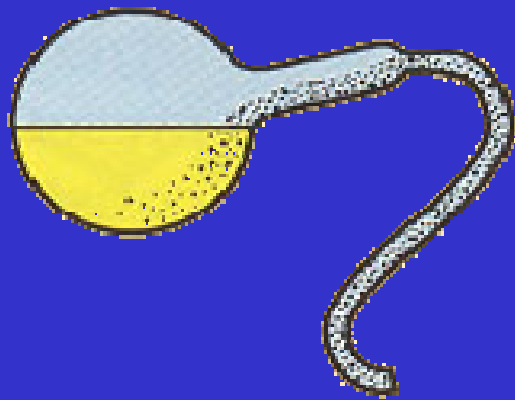


Refroidissement de l'infusion

Après un temps très long
(plusieurs années)

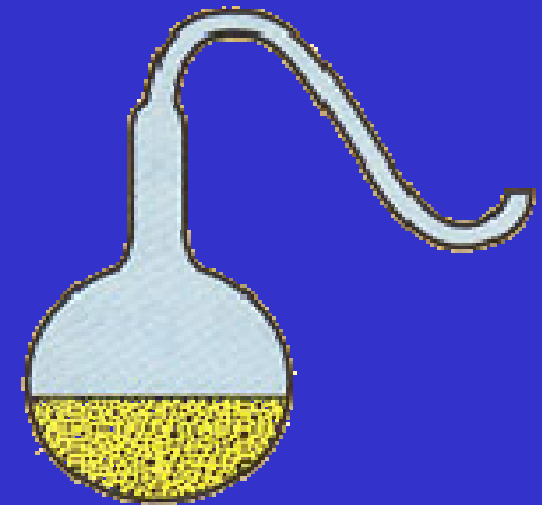


Liquide reste stérile



Contact entre poussière
et liquide stérile

Après un temps très court
(quelques heures)



Développement des
microorganismes

Conclusions: {
- *μ -organismes existent partout*
- *Stérilisation / chaleur humide*

➤ Pasteur et les fermentations (1857-1877)

- ➔ 1857: f. lactique: sucre $\xrightarrow[\text{plus petit qu'une levure}]{\text{Micro-organisme globuleux}}$ Acide lactique
- ➔ 1860: f. alcoolique: sucre $\xrightarrow{\text{levures}}$ Ethanol, glycérol + CO₂
- ➔ 1861: f. butyrique: sucre $\xrightarrow[\text{anaérobiose}]{\text{Vibrions (-O}_2\text{)}}$ Acide butirique
- ➔ 1866-1876: Maladies du vin et de la bière $\longrightarrow$ pasteurisation

➤ La bactériologie médicale

Louis Pasteur et Robert KOCH (1843-1910)

Maladie du charbon

Bacillus anthracis

Mise au point des techniques d'isolement et d'identification sur milieu de culture solide



La vaccination (1880 - 1885)

- 1880: choléra des poules,
- 1881: maladie du charbon,
- 1885: la rage (Joseph Meister : 1er être humain vacciné contre la rage)

2. L'époque actuelle

Il y a longtemps: microbiologie = étude des microbes

Actuellement: microbiologie = étude de tous les micro-organismes
(les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries)

Reproduction rapide → populations énormes et homogènes

⇒ outil privilégié ⇒ {
- études génétiques
- études biochimiques



naissance de la génie génétique et des biotechnologies

II. Place des μ -organismes dans le monde vivant

1. Classification contemporaine

➡ les animaux

➡ les végétaux

➡ les protistes: englobent tous les μ -organismes

- les algues,
- les protozoaires,
- les champignons,
- les bactéries

Selon l'organisation cellulaire, les protistes se subdivisent en:

- *Protistes supérieurs ou eucaryotes (cellules évoluées)*:
 - les algues (*sauf les algues bleu-vert*),
 - les protozoaires,
 - les champignons
- *Protistes inférieurs ou procaryotes: (cellules de type rudimentaire)*
 - Les algues bleu-vert ou Cyanophycées
 - les bactéries



phylogénétiquement

procaryotiques

eucaryotiques

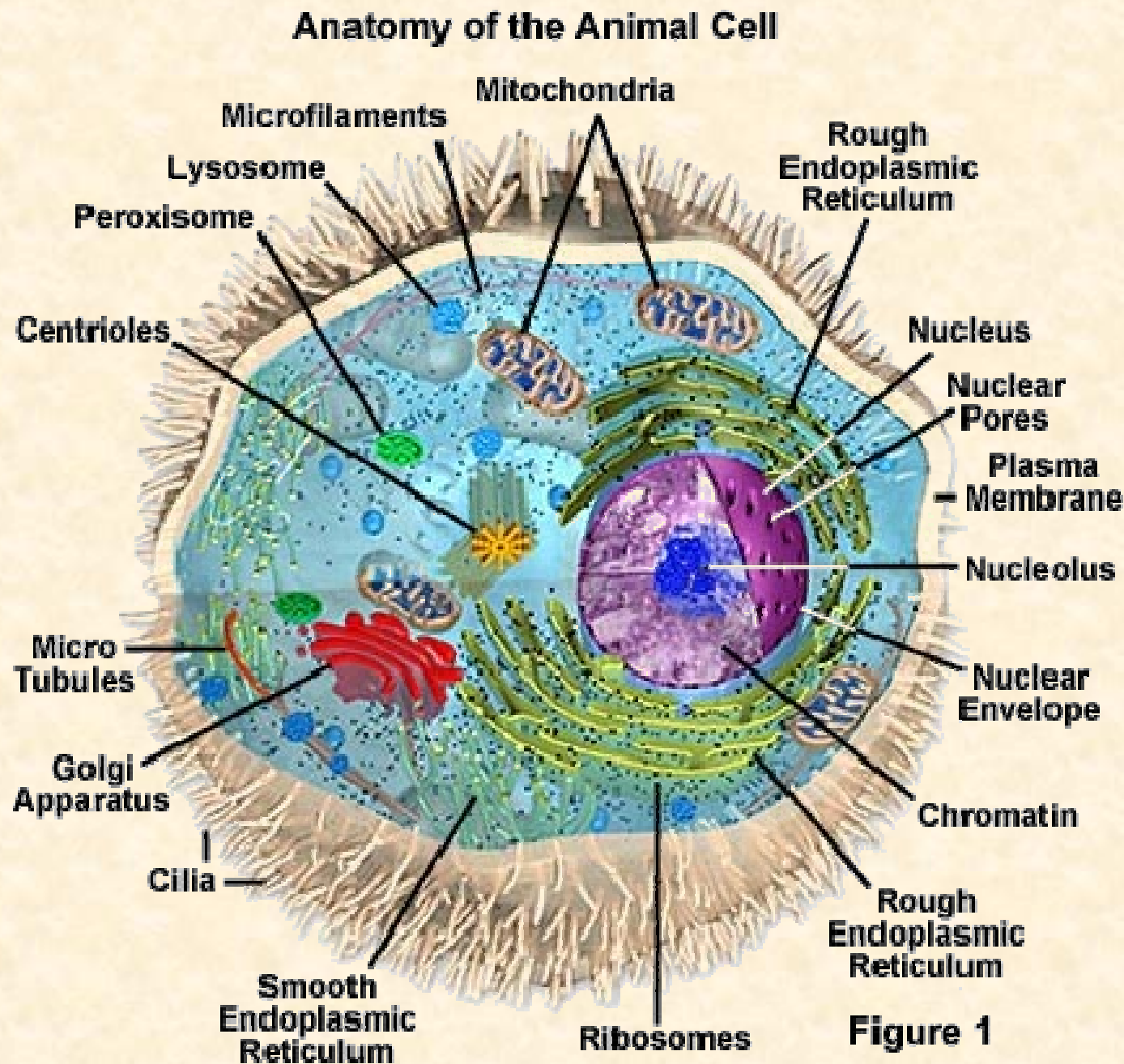
Archébactéries

Archéobactéries

➡ les virus: organismes acellulaires

parasites obligatoires

2. Comparaison entre cellules eucaryote et procaryote



Anatomy of the Plant Cell

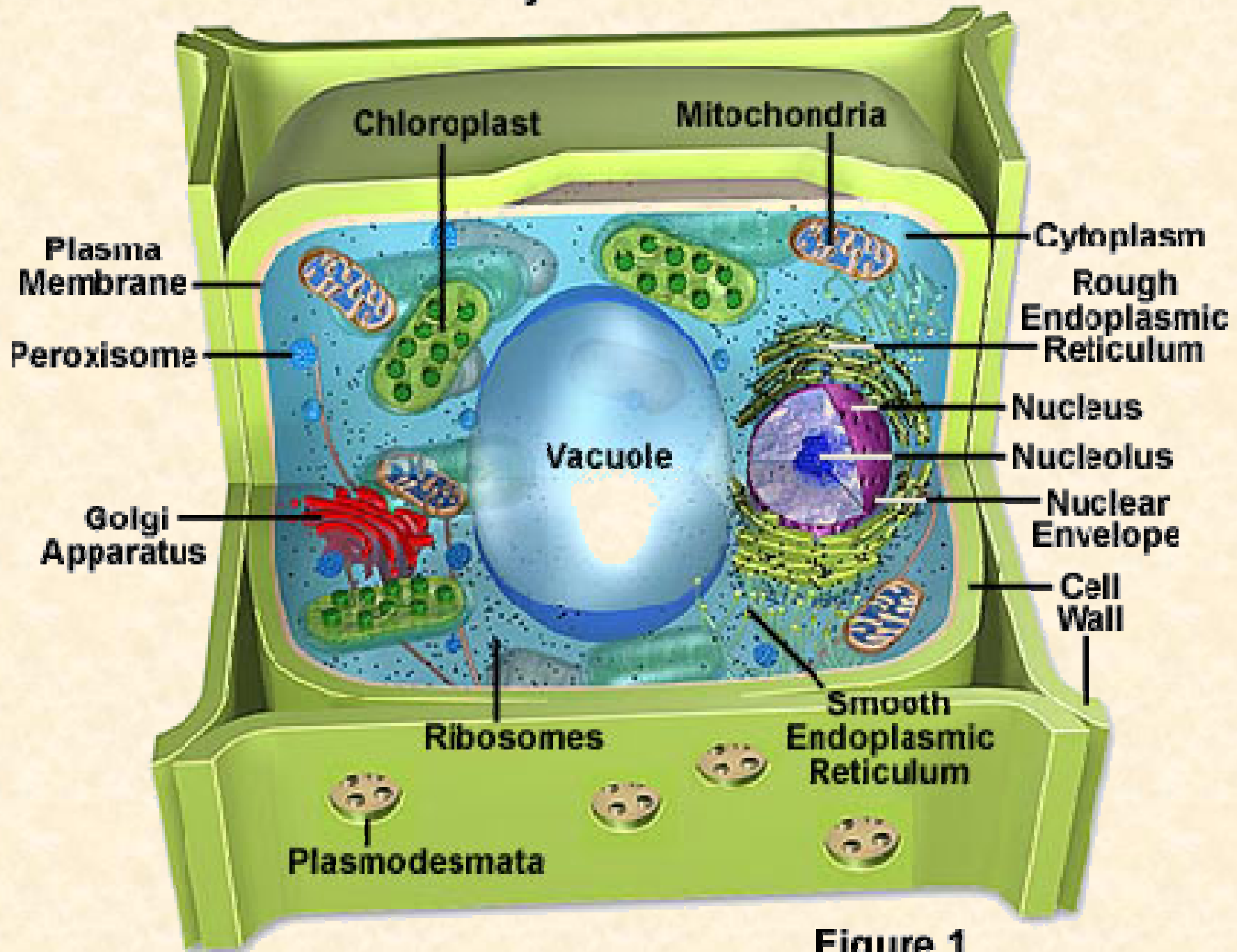


Figure 1

Prokaryotic Cell Structure

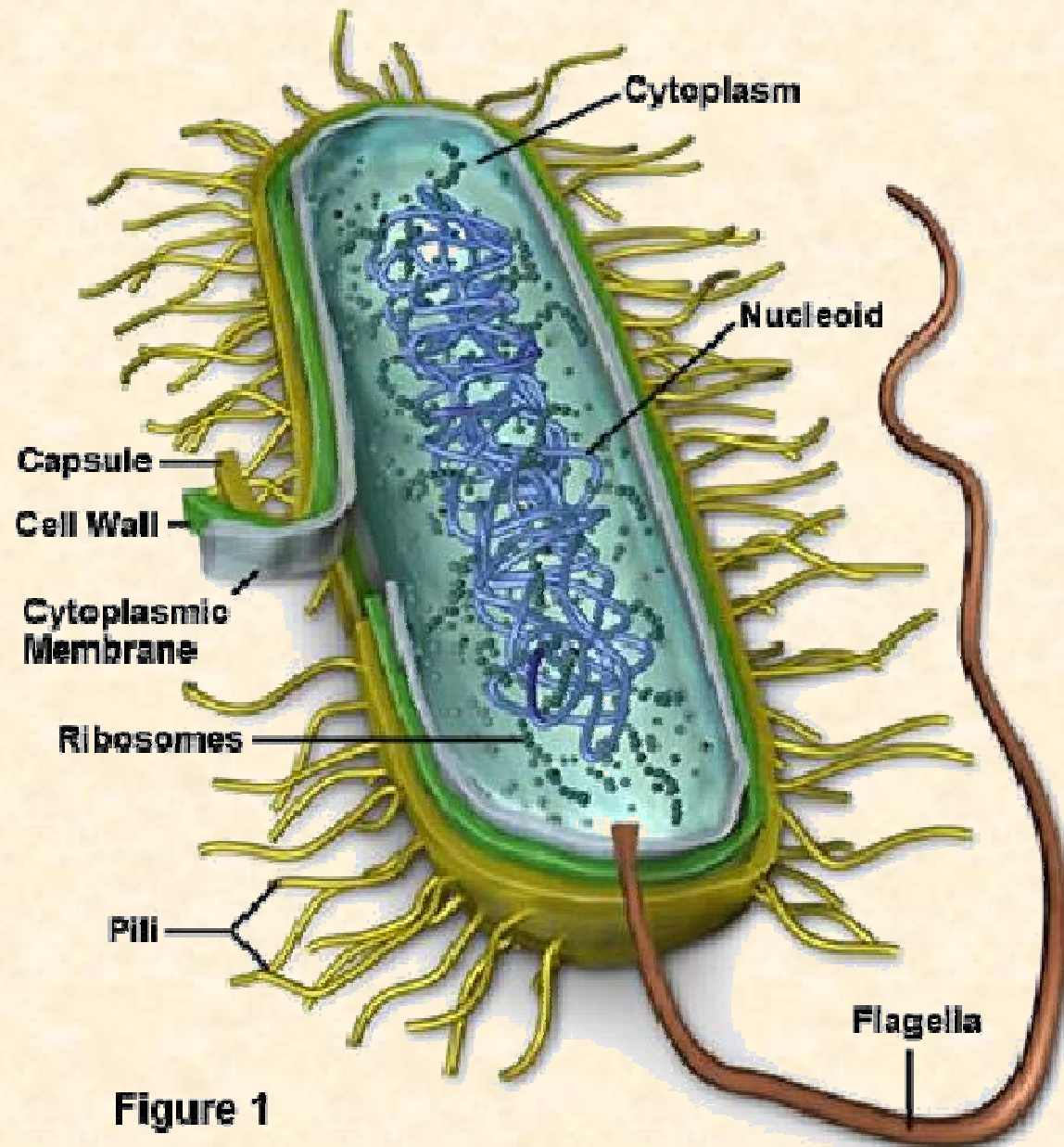


Figure 1

Comparaison entre les cellules Procaryote et Eucaryote

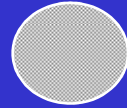
Propriétés	Procaryotes	Eucaryotes
Groupes	Bactéries, archéobactéries	Algues, champignons, protozoaires plantes, animaux
Taille	Diamètre < 2 μm	2 μm < diamètre < 100 μm
Structure nucléaire:		
- Membrane nucléaire	Absente	Présente
- Nucléoles	Absents	Présents
- Chromosome	Unique	Plusieurs
Association DNA-histones	Non	Oui
- présence d'autre ADN	Plasmidique	Mitochondriale et chloroplastique
- Division cellulaire	Amitose	Mitose
- Recombinaison génétique	Partielle	Totale
Structure membranaire et cytoplasmique:		
- Membrane plasmique	Présente	Présente
- Mitochondries	Absentes	Présentes
- Chloroplastes	Absentes	Présentes
- Ergastoplasme	Absent	Présent
- Appareil de Golgi	Absent	Présent
- Ribosomes	70 S	80 S

Propriétés	Procaryotes	Eucaryotes
- Paroi	Présente (composée de peptidoglycane)	- Absente chez animaux et protozoaires; - Présente chez plantes, champignons et algues (polysaccharides)
Système respiratoire:	Membrane cytoplasmique	Membrane mitochondriale
Photosynthèse:	chromatophores ou chlorosomes (système membranaire interne)	chloroplastes
Mobilité	- pas de mouvement amiboïde (paroi rigide). - mouvement flagellaire	- Mouvement amiboïde (eucaryotes sans paroi). - Mouvement flagellaire.

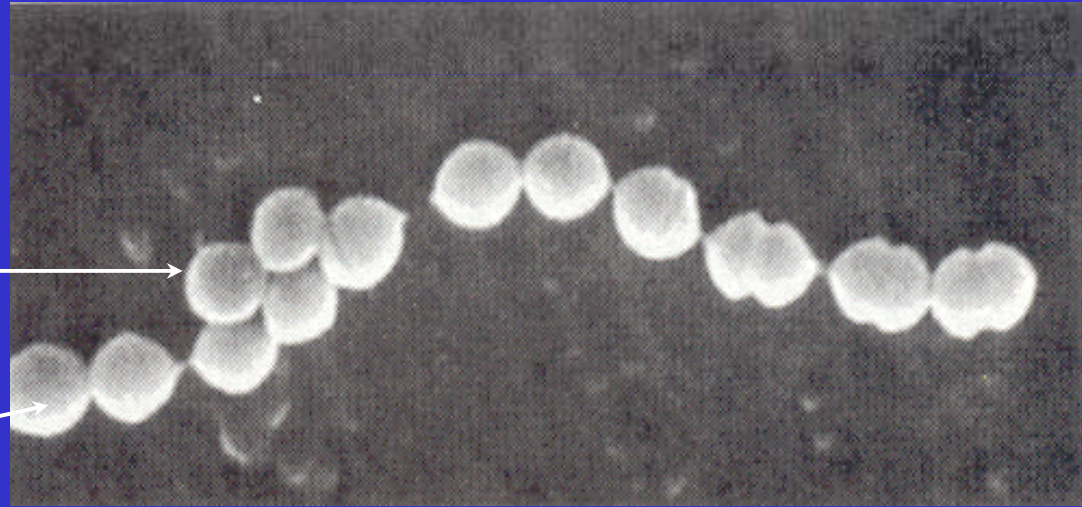
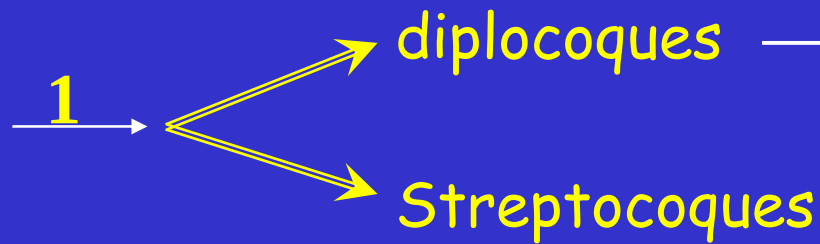
La cellule bactérienne

I. Morphologie bactérienne

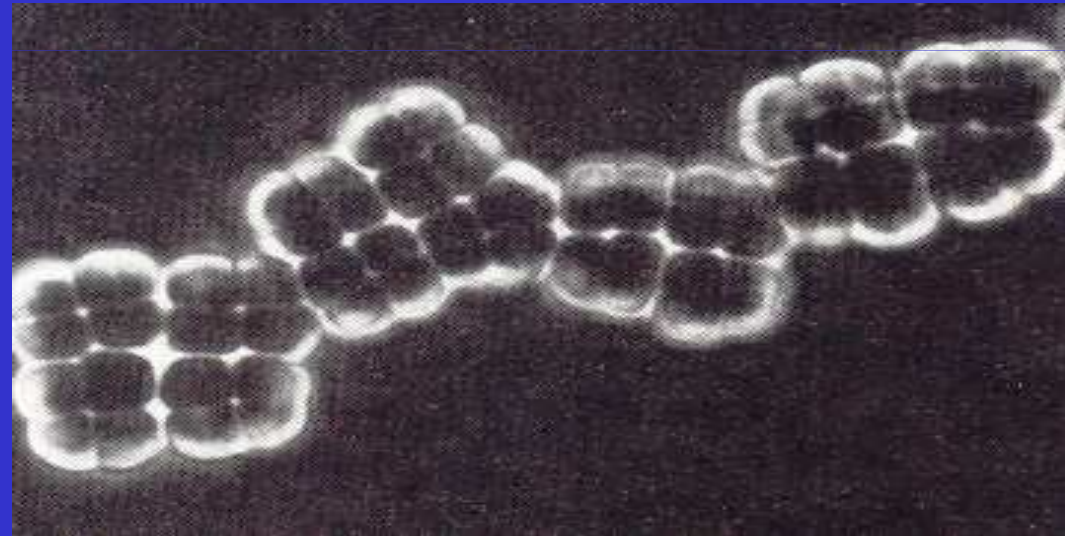
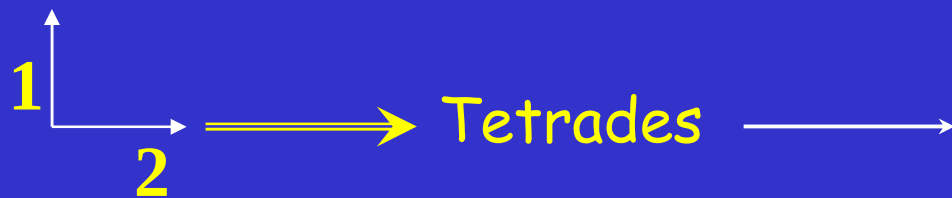
1. Les coques (Cocci):



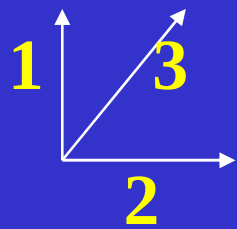
Selon le plan de division:



Streptococcus



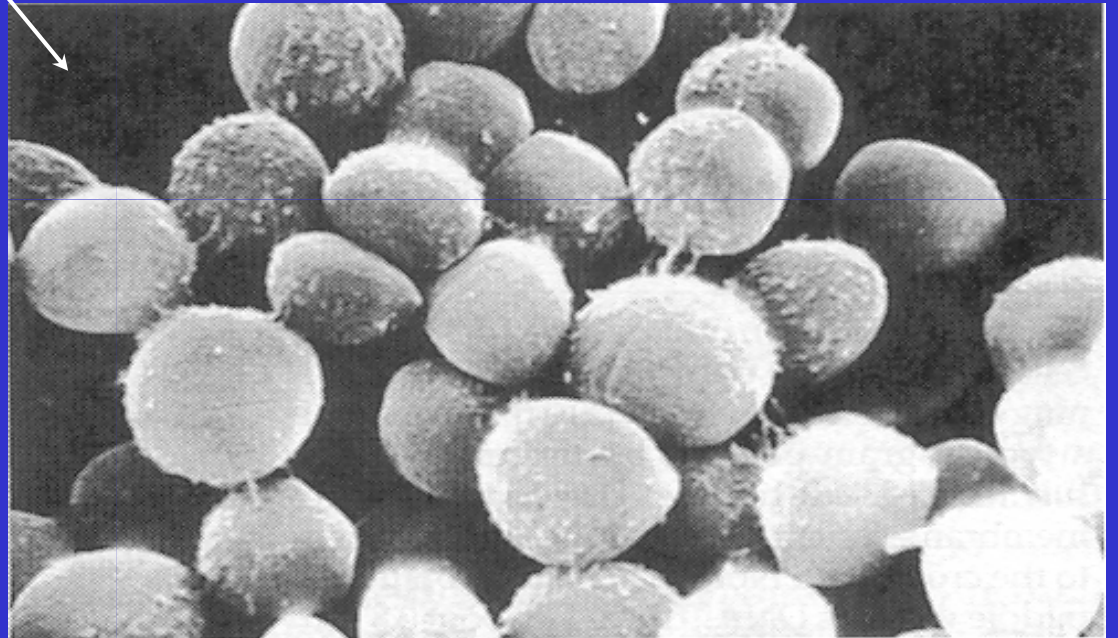
Bacillus anthracis



Grappes
de
raisin



Staphylococcus aureus



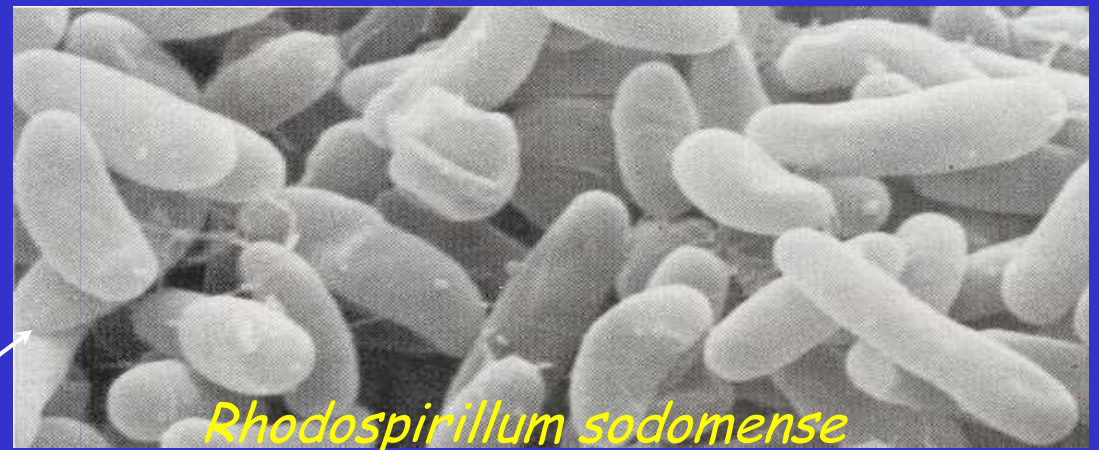
Staphylococcus

2. Les bâtonnets:

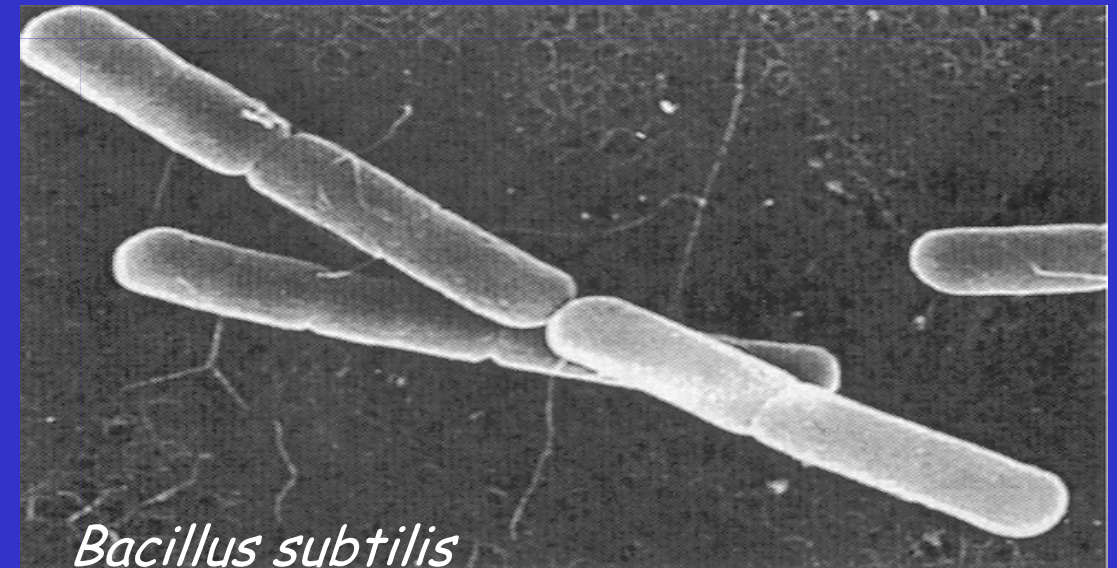
- Bâtonnets droits = Bacilles

Regroupements:

Bacilles isolés



Diplobacilles



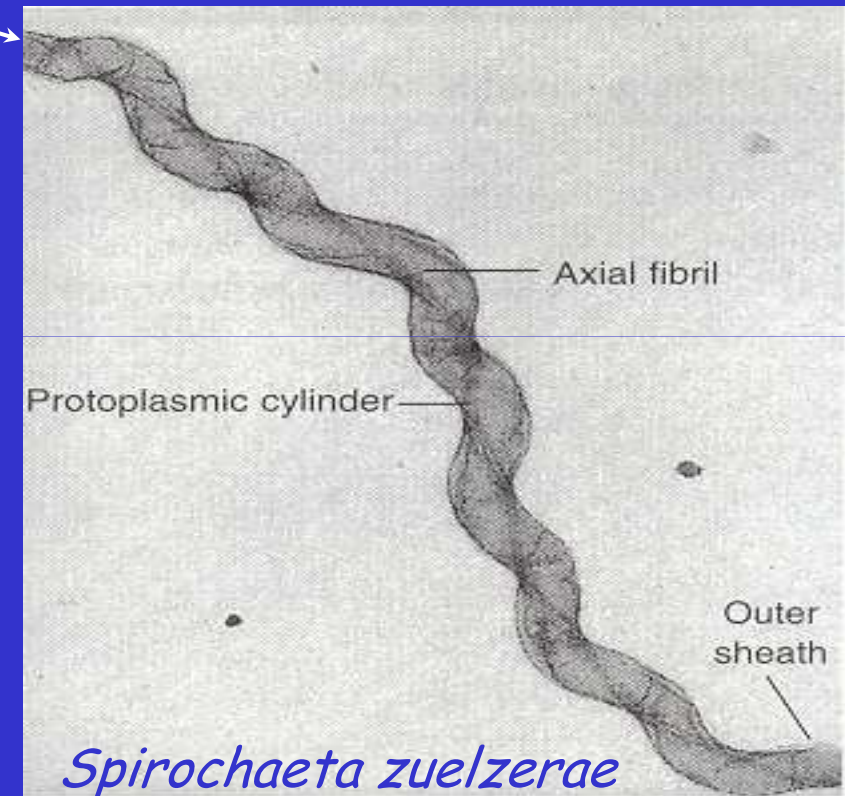
Streptobacilles



- Bacilles incurvés:



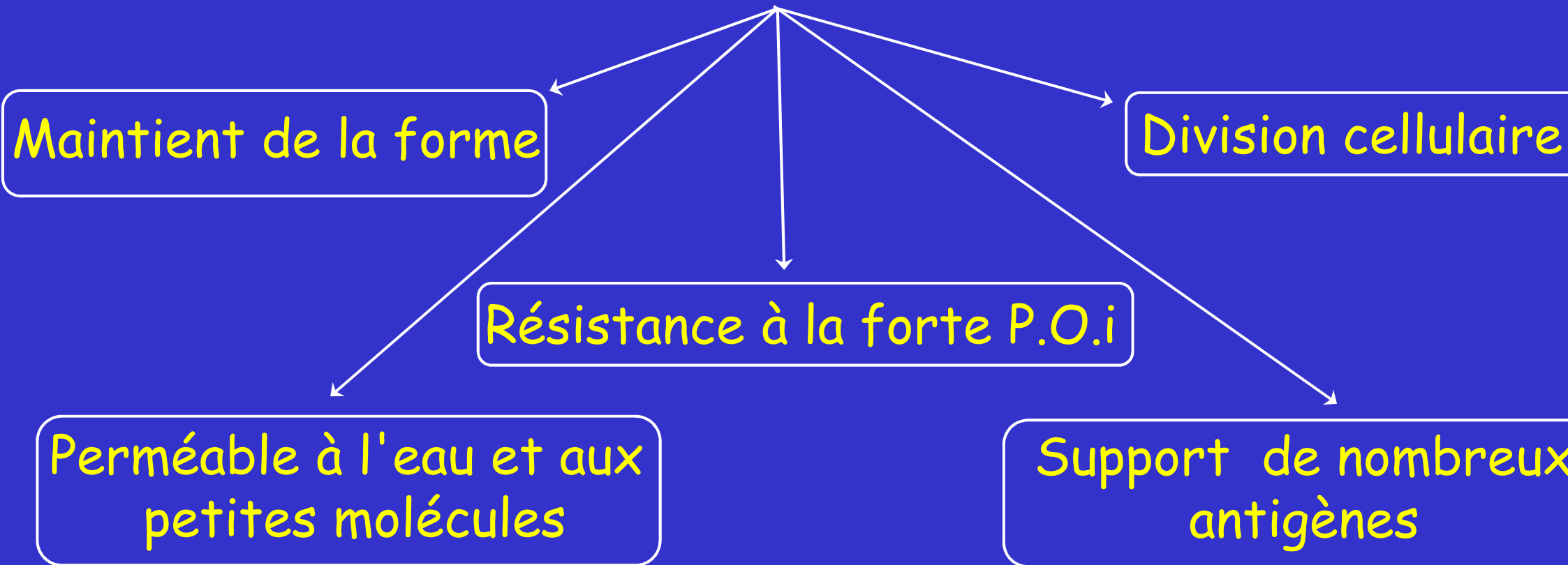
3. Les formes spiralées:



II. Paroi bactérienne

Enveloppe caractéristique des procaryotes

Rigide $\cong$ "exosquelette"



Peptidoglycane

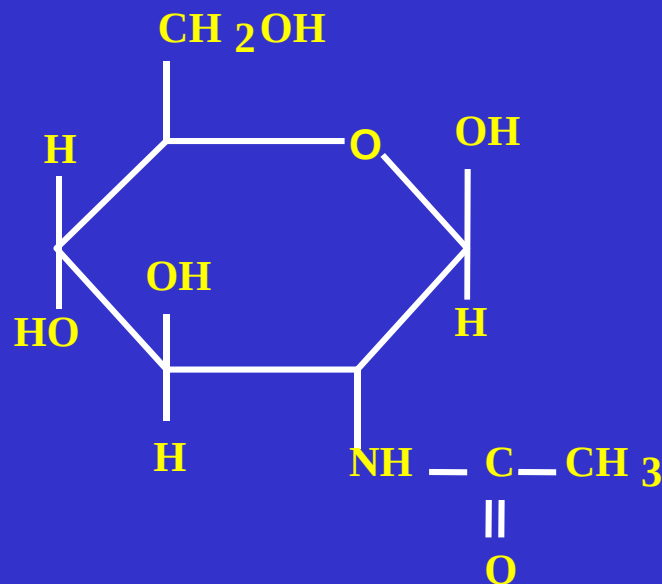
Gram ⁺

Gram ⁻

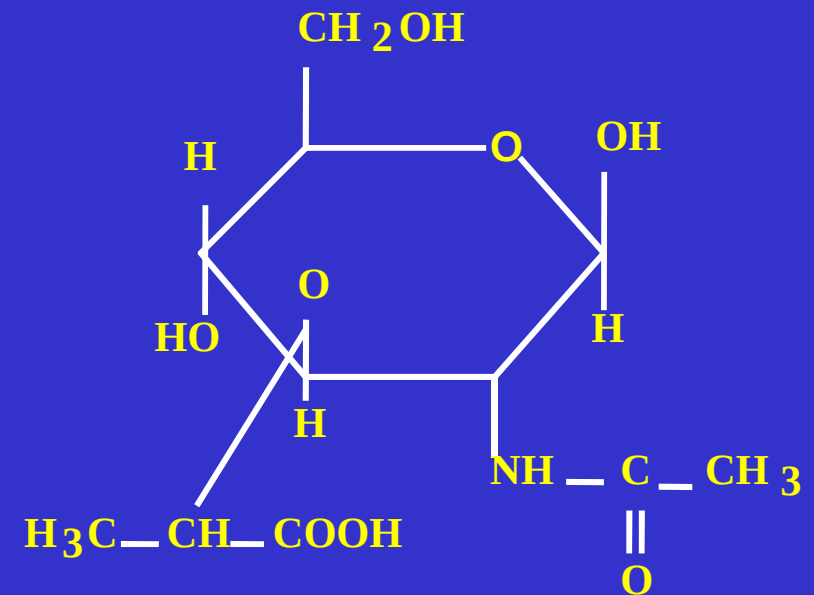
1. Composition chimique

α - Les osamines (sucres aminés)

❶ La N-acétylglucosamine



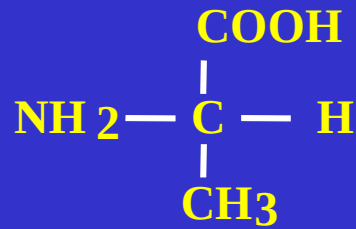
❷ L'acide N-acétylmuramique



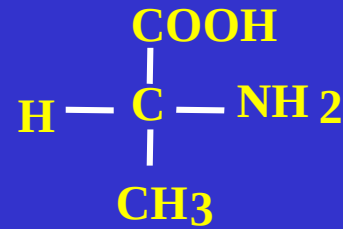
❸ La galactosamine:

Existe chez certaines espèces seulement et en faible quantité

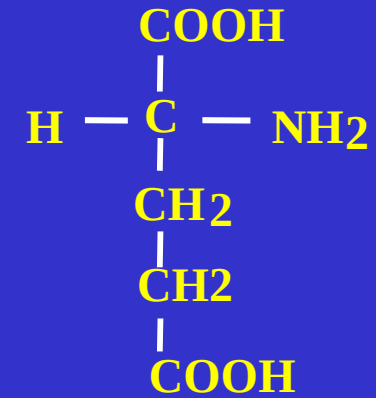
b- Les acides aminés



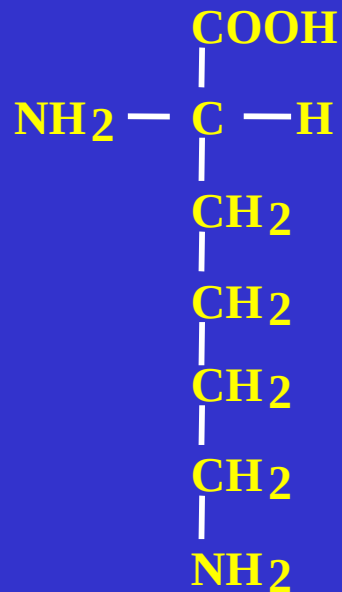
L-Alanine



D-Alanine

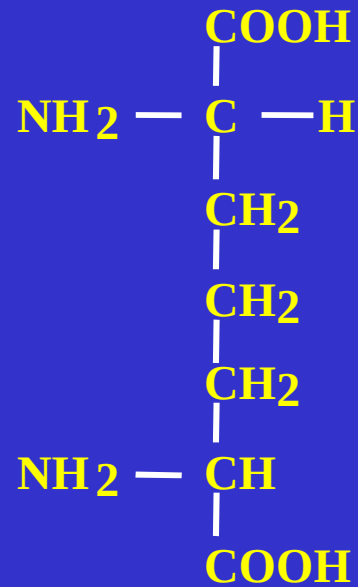


Acide D-Glutamique



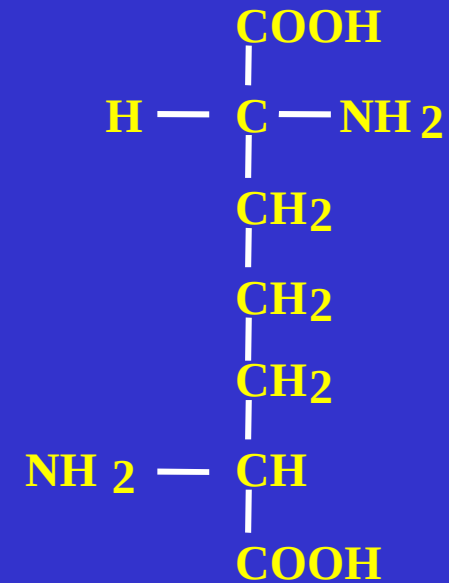
L-Lysine

ou



(Meso)

Acide Diamino-Pimélique (DAP)



(L)

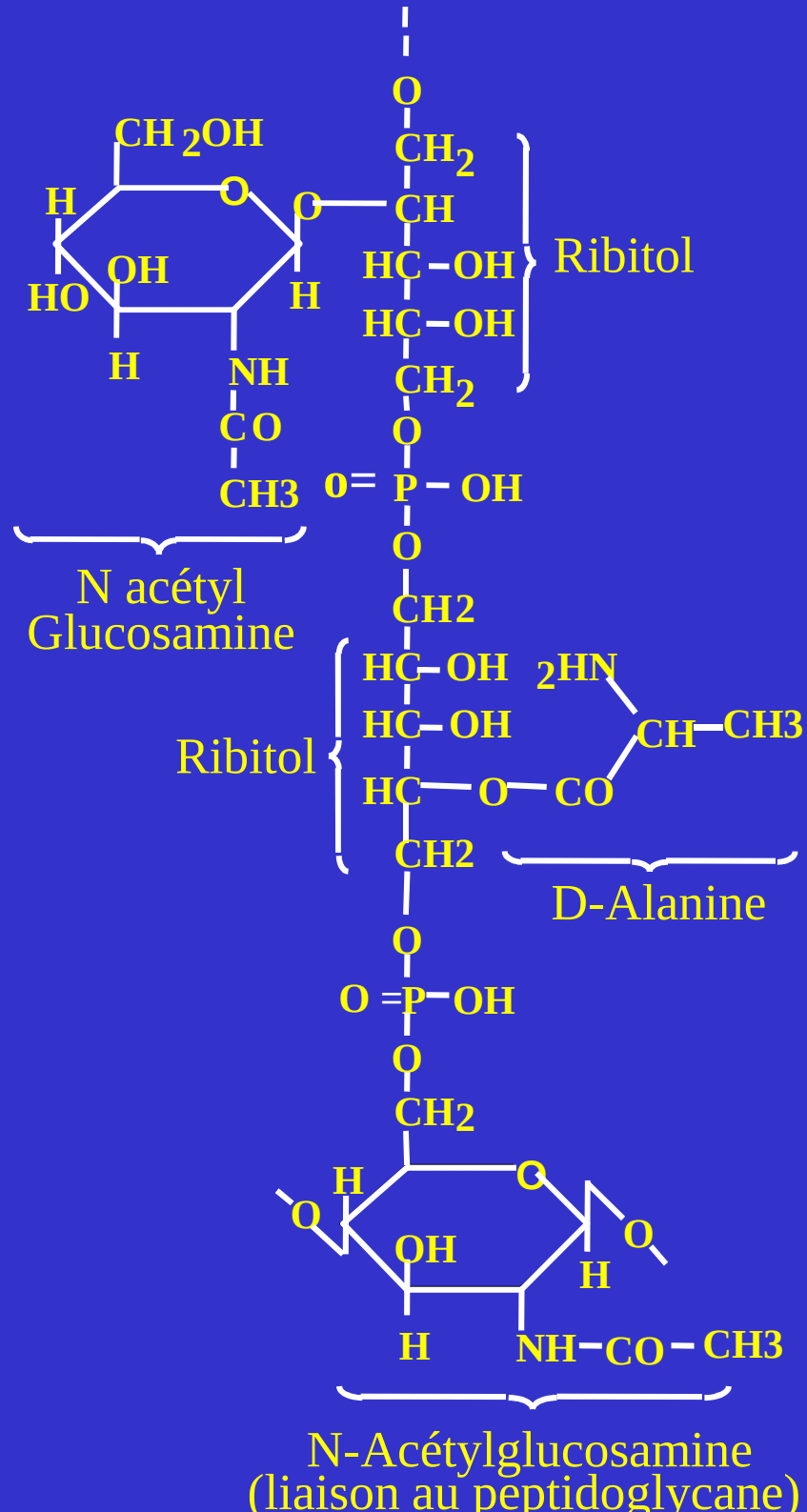
Glycine —————→ *Staphylococcus aureus*

Acide aspartique —————→ *Lactobacillus acidophilus*

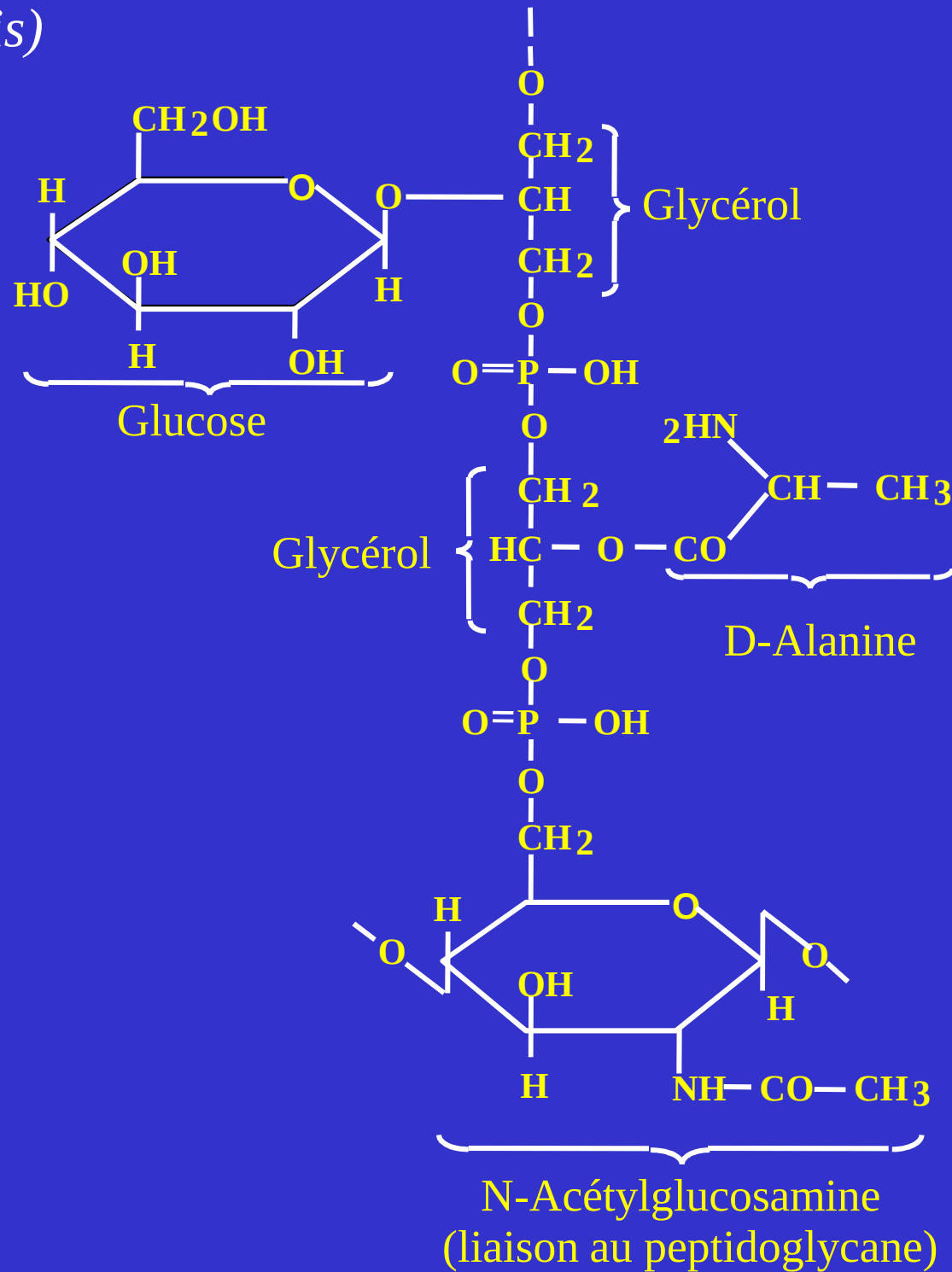
c- Les acides teichoïques

- ⇒ uniquement chez les bactéries Gram+
- ⇒ localisés à l'extérieur de la paroi
- ⇒ peuvent avoir un rôle antigénique.

- *Polyribitol phosphate*
(*Staphylococcus aureus*)



b- Polyglycérol-phosphate
(Bacillus subtilis)



d- Les oses simples

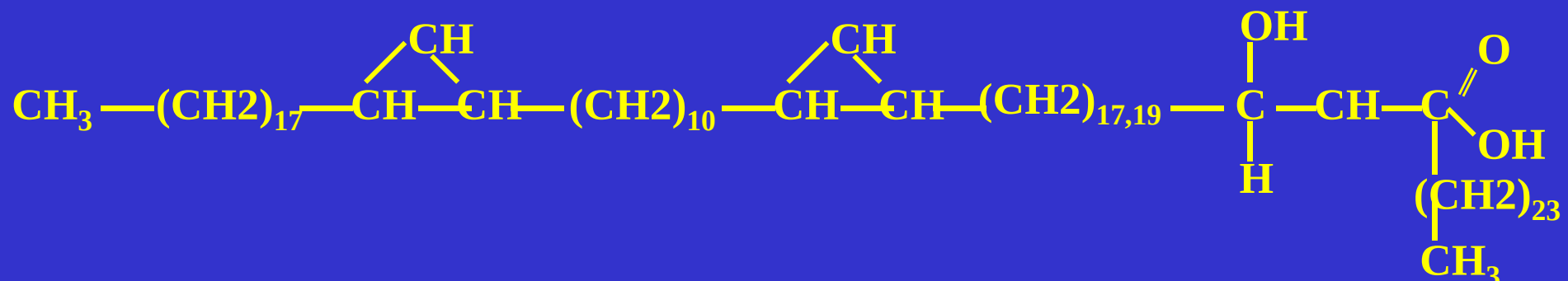
- ⇒ Glucose ⇒ Galactose ⇒ Mannose, etc...
- ⇒ Certains sont spécifiques (Rhamnose chez les *Streptococcus* du groupe A)
- ⇒ Leurs nature et type d'association ⇒ spécificité des antigènes

e- Les lipides

- ⇒ faibles quantité chez les Gram⁻ (10 à 22%)
- ⇒ presque absents chez les Gram⁺ (1 à 2,5%).

f- Les acides mycoliques

- ⇒ présents chez certaines espèces particulières (les mycobactéries)
- ⇒ acides gras à longues chaînes (C=60) Ex. Acide α-mycolique



g- Comparaison de la composition chimique globale de la paroi chez les bactéries Gram⁺ et les bactéries Gram⁻

	<i>Gram⁺</i>	<i>Gram⁻</i>
1. Osamines	Abondants	Peu
2. Acides aminés	24 - 35 %	≈ 50 %
Nombre	4 à 10	16 à 17
DAP	Présent sans lysine	Présent avec lysine
Acides Teichoïques	Présents	Absents
Oses	20 à 60 %	20 à 60 %
Lipides	1 à 2,5 %	10 à 22 %

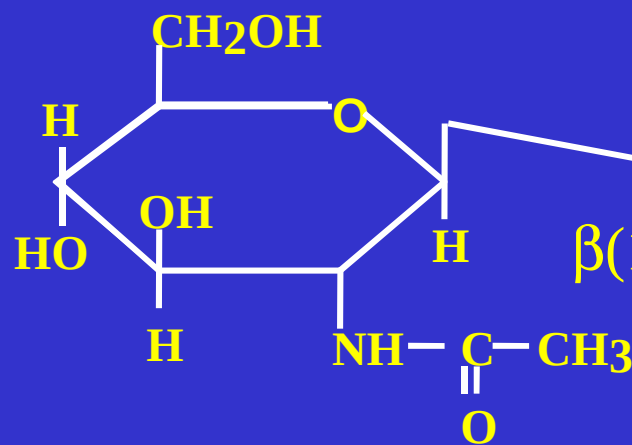
2. Structure moléculaire

Le peptidoglycane {
- Muréine
- Mucocomplexe
- mucopeptide

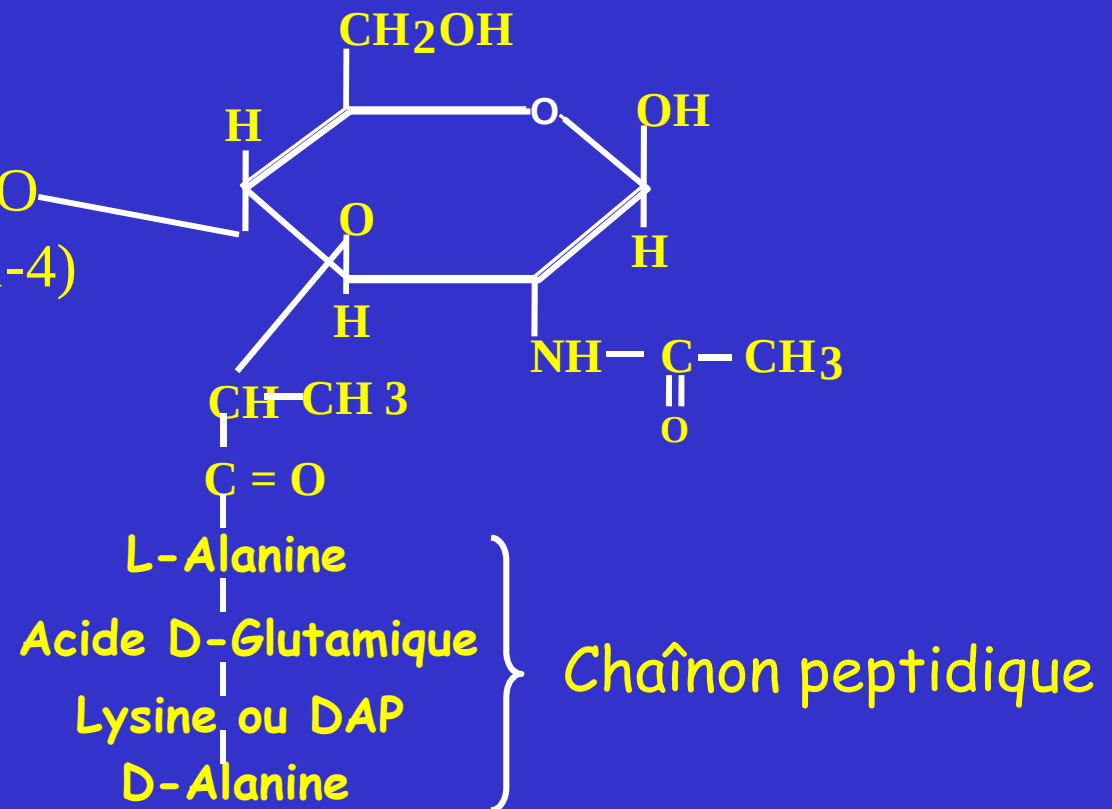
L'unité structurale du peptidoglycane, un glucosaminopeptide

Glycane

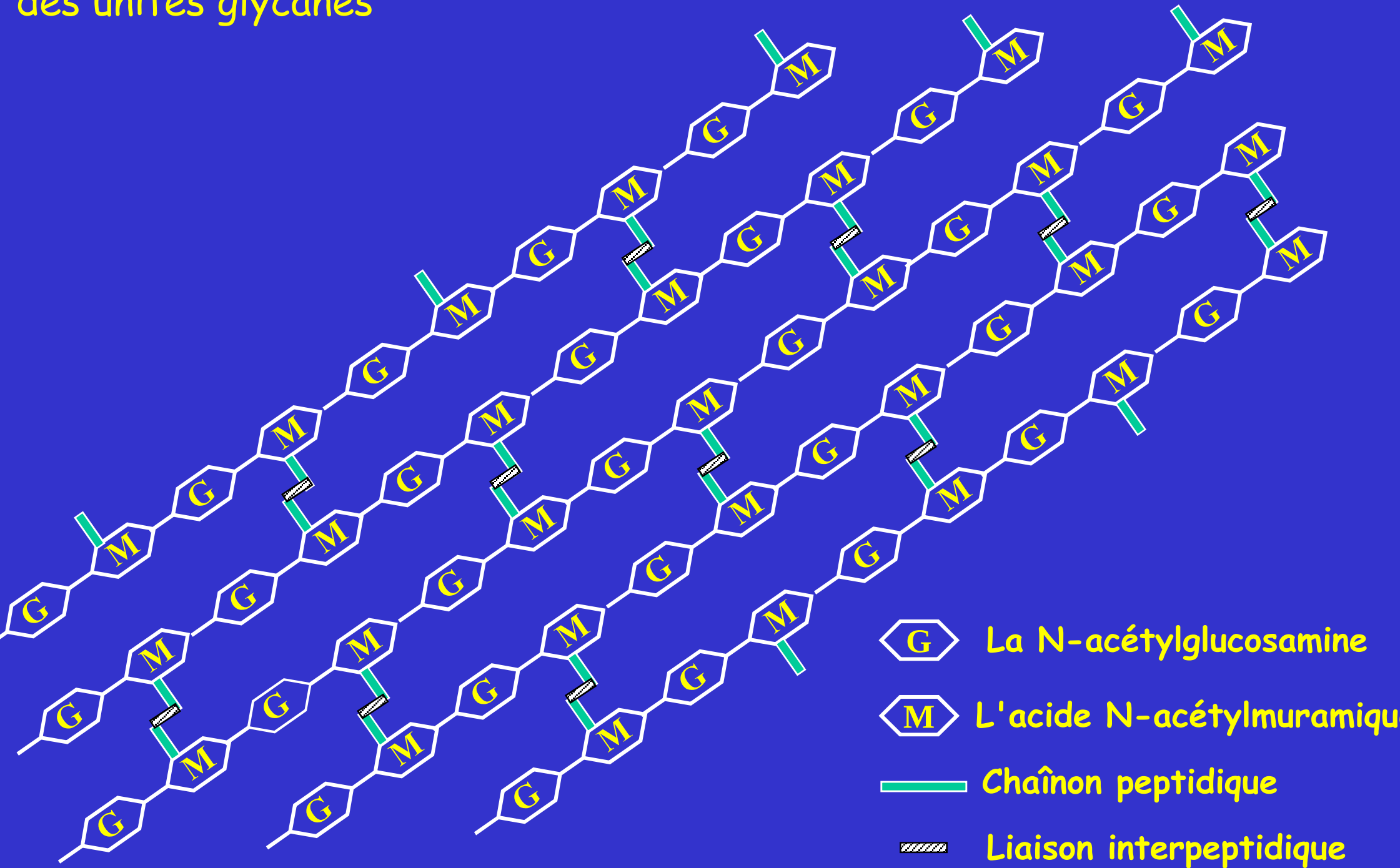
La N-acétylglucosamine



L'acide N-acétylmuramique



L'acide N-acétylmuramique joue un rôle central dans la polymérisation des unités glycanes



Structure en réseau du peptidoglycane

Cette structure de polymère en réseau, qui donne à la cellule sa rigidité, est caractérisée par:

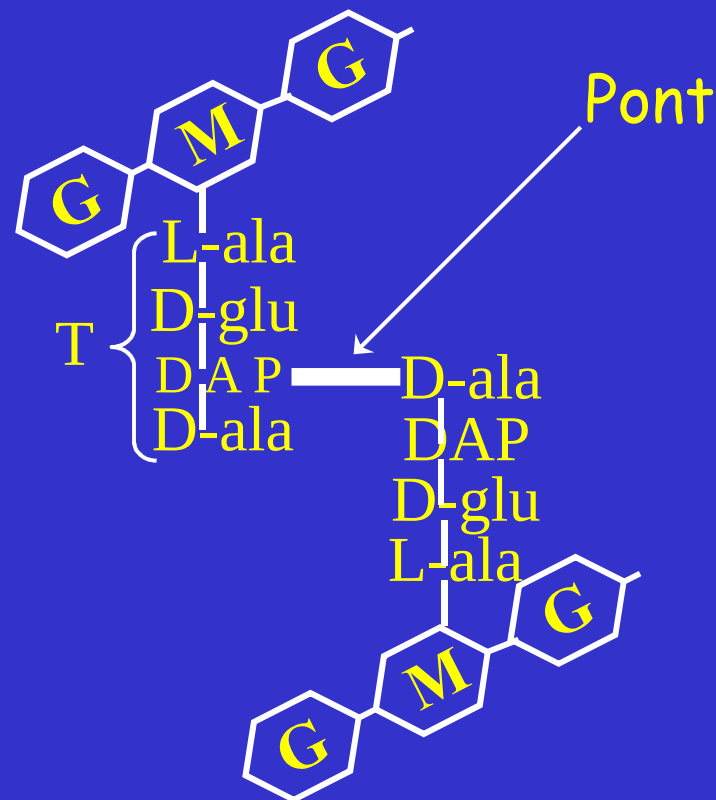
- ➔ les β (1,4) entre l'acide N-acétylmuramique et la N-cétylglucosamine
- ➔ l'ordre invariable des acides aminés qui forment le tétrapeptide
- ➔ la liaison β -glucosidique qui unie chez les Gram+, l'acide teichoïque au résidu N-acétylglucosamine
- ➔ le pontage entre la D-alanine d'un tétrapeptide et la L-lysine ou le DAP d'un tétrapeptide voisin

Le peptidoglycane peut différer selon les cas par des constituants secondaires, en particulier par:

- ➡ les acides aminés du tetrapeptide
- ➡ la nature des ponts interpeptidiques

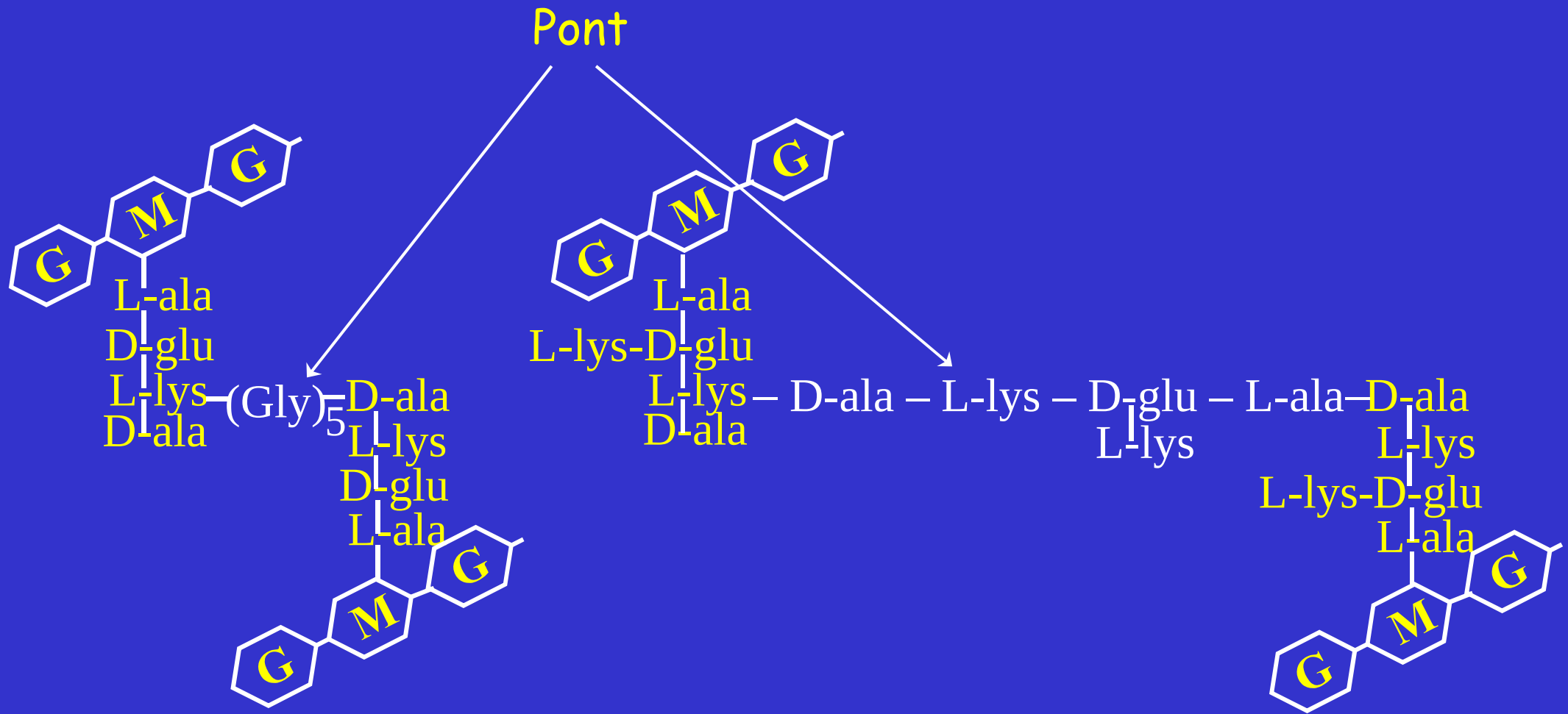
Cette dernière différence détermine un réseau plus ou moins serré (compact):

- 👉 Compact pour les forme bacillaires (liaisons interpeptidiques directes).



Escherichia . Coli

👉 Lâche pour les formes sphériques (liaisons interpeptidiques longues),



3. Différences structurales entre les parois des bactéries Gram + et Gram -

En microscopie électronique:

Nette différence structurale entre les parois des bactéries Gram + et Gram -

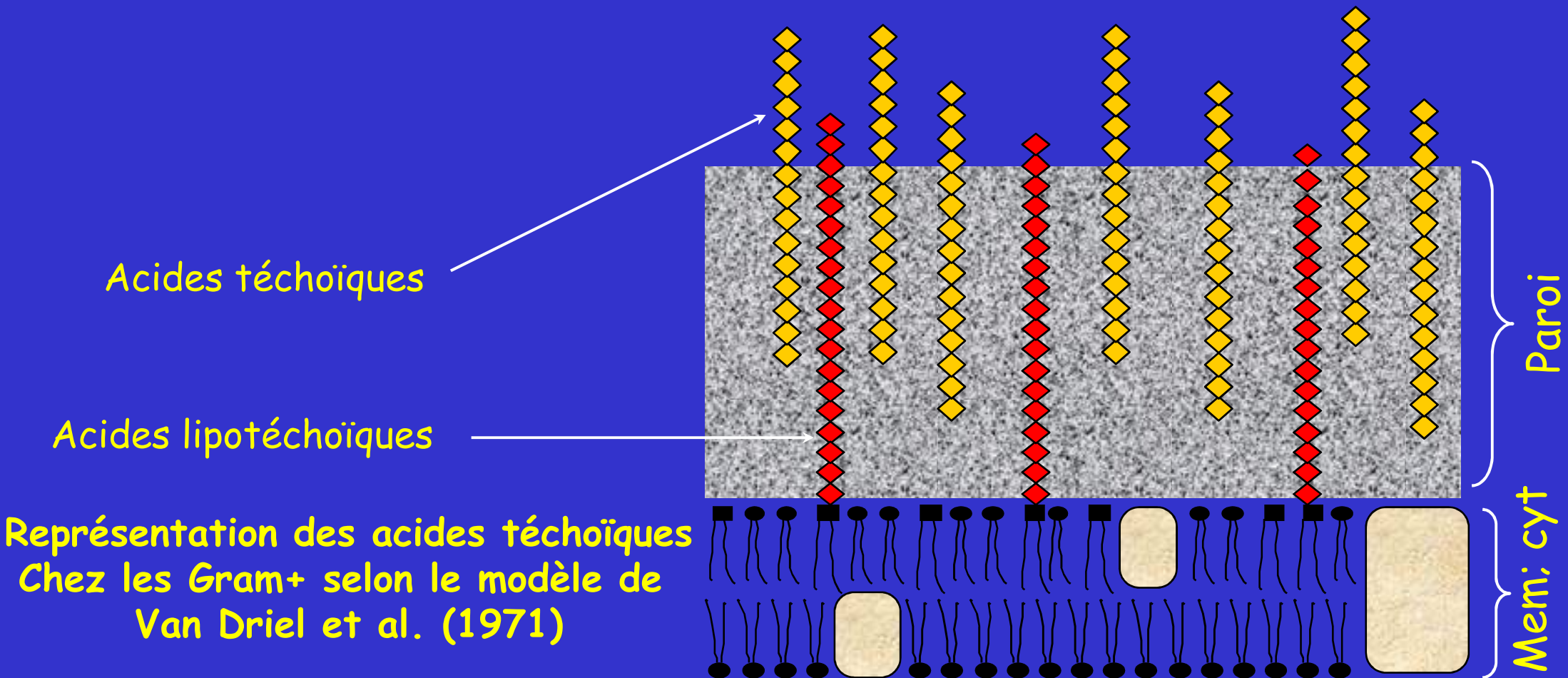
Chez Gram + : paroi épaisse (15 à 80 nm), aspect homogène.

Chez Gram - : paroi fine (6 à 15 nm), aspect stratifié et hétérogène.

a. Chez les bactéries Gram+

Les acides teichoïques : deuxième composant essentiel de la paroi des bactéries Gram+ (50% du PS de la paroi et 10% du PS de la cellule totale).

Leur localisation exacte au niveau des enveloppes est mal connue.



b. Chez les bactéries Gram -

En plus du peptidoglycane, on insiste sur la présence de 2 autres couches

b.1. L'espace périplasmique ou périplasma

bactéries Gram+ : Exoenzymes (Protéases) (Pénicillinase)
(Colicines) (Exotoxines)

Bactéries Gram- : *Périplasma retient les protéines élaborées dans le cytoplasme:*

- ☞ Un rôle dans la dégradation des molécules venant de l'extérieur (nucléases, phosphatases, pénicillinases...);
- ☞ Un rôle dans le transport de certaines substances nutritives vers l'intérieur de la cellule (protéines de liaisons ou *binding proteins*);
- ☞ certaines protéines peuvent être impliquées dans la chimiotaxie

b.2. La membrane externe

b.2.1. des protéines majeures:

70% des protéines de la membrane externe;

groupées pour former des pores porines

traversent toute la membrane externe et sont fortement liées au peptidoglycane;

transport des molécules de PM < à 600 da; sans spécificité mais de préférence les molécules neutres et les cations.

b.2.2. des protéines mineures:

transport spécifique de petites molécules incapables de passer à travers les porines (ex. la vitamine B12, les nucléosides ou les oligosaccharides comme le maltose);

servent aussi de récepteurs pour des bactériophages (ex. Lam B est spécifique au transport du maltose et à la fixation du phage λ).

b.2.3. Les lipoprotéines

protéines lipidiques libres ou fortement liées au peptidoglycane

Ex. lipoprotéine de Braun

petite molécule polypeptidique de 58 acides aminés, portant à son extrémité N-terminale des constituants lipidiques

Chez *E. coli* $7.5 \cdot 10^5$ lipoprotéines/cellule dont les 2/3 sont à l'état libre et le 1/3 sont liées au peptidoglycane.

La partie lipidique est enchâssée dans la membrane externe par des liaisons hydrophobes avec les phospholipides,

La partie protéinique est associée au peptidoglycane par des liaisons covalentes au niveau du DAP du chaînon peptidique.

Les lipoprotéines assurent une cohésion solide de l'ensemble de la structure.

b.2.4. Les lipopolysaccharides (LPS)

LPS = Endotoxines

α . lipide A:

considéré comme le support de la toxicité,

le lipide A est un glycophospholipide c-à-d polymère composé de:

- ✓ unités disaccharidiques de glucosamine reliées entre elles par des ponts pyrophosphates;
- ✓ longues chaînes d'acides gras parmi lesquelles on note la présence constante de l'acide β -hydroxymyristique (un acide gras en C14) spécifique et caractéristique du lipide A.

β. Le polysaccharide du LPS:

➤ core (partie centrale du LPS),

Composition en sucres variable selon les espèces. Cependant on y trouve toujours un sucre particulier en C8, le cétodésoxyoctonate (KDO).

Ex. chez *Salmonella*, le core est composé de

- cinq hexoses,
- deux heptoses
- trois KDO.

➤ Chaîne latérale du LPS

chaque chaîne contient les mêmes séquences répétitives (jusqu'à 40);

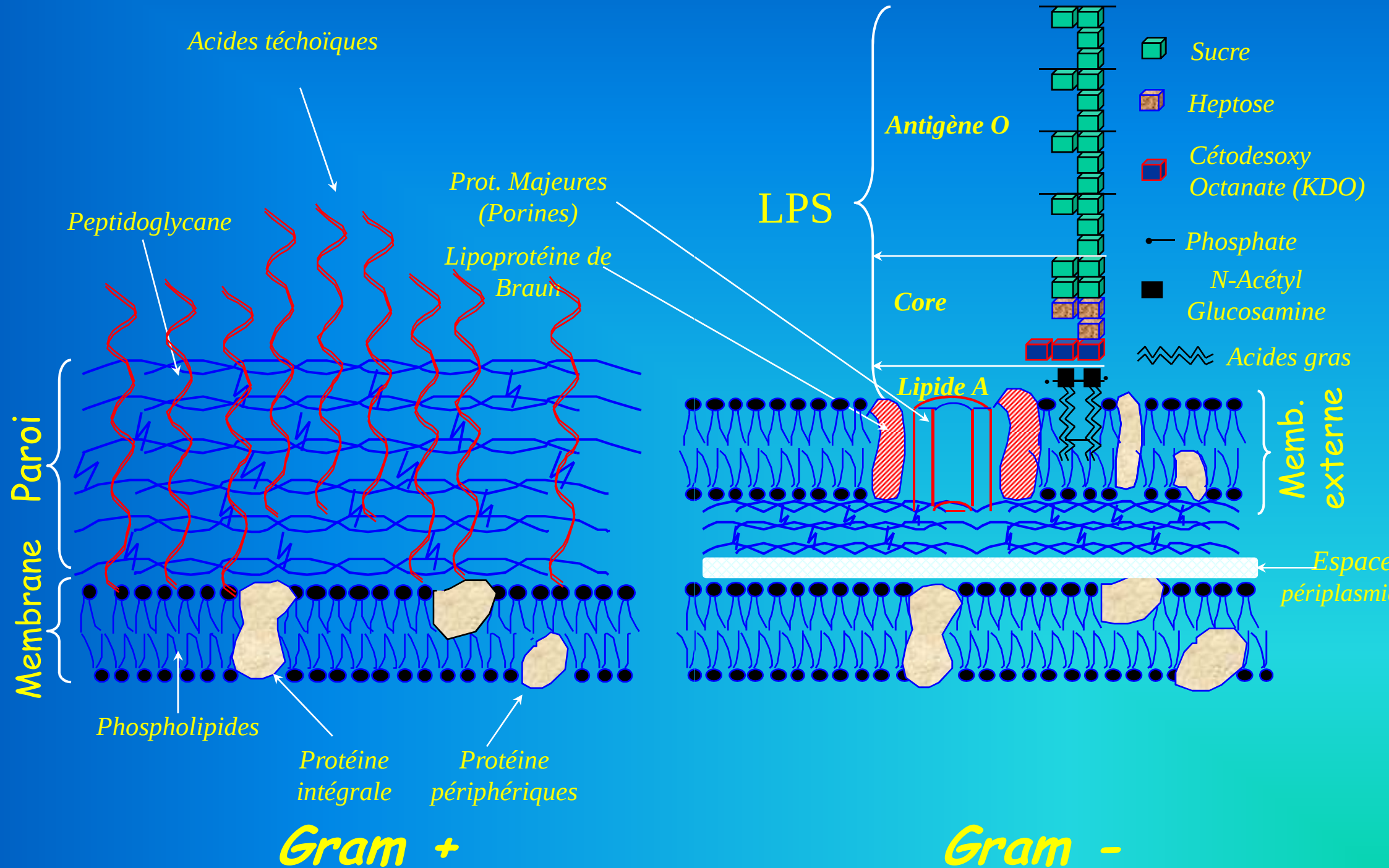
chaque séquences est constituée de 3, 4 ou 5 sucres ;

chez les entérobactéries, cette chaîne latérale est appelée antigène O;

cet antigène O comprend quatre hexoses:

- Galactose
- Glucose
- Rhamnose
- mannose.

Différences structurales entre les parois des bactéries Gram⁺ et Gram⁻



c. Autre types de paroi

- ✓ Chez les entérobactéries, les trois feuillets pariétaux sont intimement soudés l'un à l'autre.
- ✓ Par contre chez les bactéries spiralées *Spirochètes*
- ✓ Chez les Archéobactéries, l'élément structural de la paroi est un pseudopeptidoglycane.
 - ♣ N-acétyl D-glucosamine ou N-acétyl D-galactosamine
 - ♣ N-acétyl D-Talosaminuronique
 - ♣ Les tetrapeptides associées comprennent l'alanine (L et D), l'acide glutamique et la lysine.
- ✓ Chez les mycobactéries *Mycobacterium tuberculosis*
les acides mycoliques

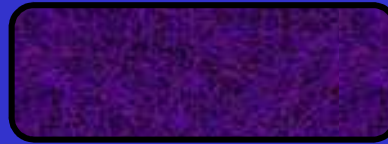
4. Fonctions de la paroi

a. Maintient de la forme et résistance à la POi

Lyzosyme

Bacillus subtilis

Gram +



+

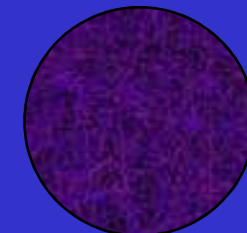
Lysozyme
(détruit les $\beta(1-4)$)

Milieu
hypotonique



Gonflement et éclatement
de la cellule

Milieu isotonique
(1 ‰ de saccharose)



Cellule sphérique sans
Paroi = **Protoplaste**

Régénération

NB. le protoplaste a perdu ses propriétés antigéniques,
ne fixe plus les bactériophages et ne se divise plus



Escherichia coli
Gram -



+

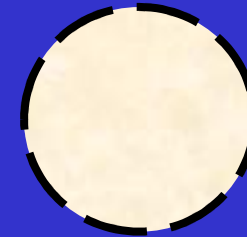
Lyzosyme
(détruit les $\beta(1-4)$)

Milieu
hypotonique



Gonflement et éclatement
de la cellule

Milieu isotonique
(1 ‰ de saccharose)



Cellule sphérique avec fragments
de paroi = **Sphéroplaste**

NB. le sphéroplaste conserve toutes les propriétés de la cellule initiale.

- ✓ différence entre protoplaste et sphéroplaste est logique: lysozyme agit au niveau des β (1,4) du peptidoglycane.
- ✓ rôle de la paroi: forme de la cellule et résistance à la POi
- ✓ Le peptidoglycane ne joue aucun rôle dans les propriétés antigéniques, la division cellulaire et la fixation des bactériophages

b. Propriétés antigéniques

➡ Chez les bactéries Gram⁺:

les acides teichoïques ou leurs sous-unités osidiques constituent les principaux antigènes

Chez les *streptocoques*, deux catégories d'antigènes ont été isolés:

- ✓ *Des antigènes de nature polysidiques: appelés antigènes C*

Classification antigénique de LANCE-FIELD qui a défini plusieurs groupes sérologiques: A, B, C, D, E, ... O

Chaque groupe est caractérisé par un antigène C composé de un ou de plusieurs polysides différents.

Exemples:

- ✓ le groupe sérologique A —————> streptocoques pathogènes pour l'homme

antigène C —————> { Le rhamnose
La N-acétyl glucosamine

- ✓ le groupe sérologique G

antigène C —————> { Le rhamnose
La N-acétyl galactosamine

- ✓ *Des antigènes de nature protéiques: appelés antigènes M, T, R*

La protéine M importante sur le plan sérologique et physiopathologique.

Elle permet de différencier à l'intérieur du groupe A, 56 types sérologiques.

Donc

Un groupe sérologique = ensemble de bactéries ayant le même antigène C

Un type sérologique = ensemble de bactéries ayant le même antigène C
et une protéine M identique

➡ *Chez les bactéries Gram - :*

La plus part des *Enterobacteriaceae*, les *Salmonella* en particulier,

Deux principaux antigènes: { un antigène somatique O
un antigène flagellaire H

La spécificité antigénique dépend de la nature des sucres ainsi que de leur mode de liaison.

En se basant sur la diversité des facteurs O et H, KAUFFMAN et WHITE ont pu classer les *Salmonella* en groupes sérologiques puis en sérotypes.

Exemple:

Le groupe sérologique D regroupe toutes les souches de différentes espèces de *Salmonella* ayant en commun l'antigène O9.

Ce groupe sérologiques se subdivise à son tour en sérotypes
(selon la diversité de l'antigène H)

c. Fixation des bactériophages

Propriété liée à la paroi où sont localisés les récepteurs spécifiques.

Chez les bactéries Gram-, les récepteurs sont en majorité des protéines mineurs de la membrane externe.

Chez les bactéries Gram+, récepteurs localisés au niveau des acides teichoïques.

Fixation des phages est une propriété utilisée pour identifier des lysotypes.

Un lysotype est groupe de bactéries capables de fixer le ou les mêmes phages

	Φ1	Φ2	Φ3	Φ4	Φ5	Φ6	Φ7	Φ8
B 1	+	+	-	+	+	-	+	-
B 2	-	-	+	+	+	+	+	+
B 3	+	+	-	+	+	-	+	-
B 4	-	-	+	+	-	+	+	+
B 5	+	+	+	+	+	+	+	+

lysotype I = [B1, B3]

lysotype II = [B2]

lysotype III = [B4]

lysotype IV = [B5]

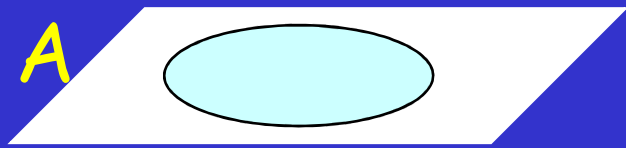
LIMITE

d. Coloration de Gram

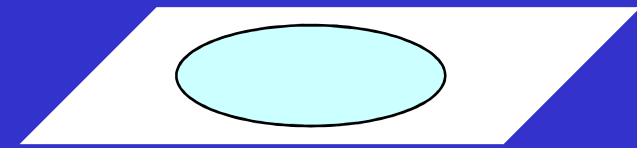
Gram, médecin danois (1884) une coloration différentielle

Frottis

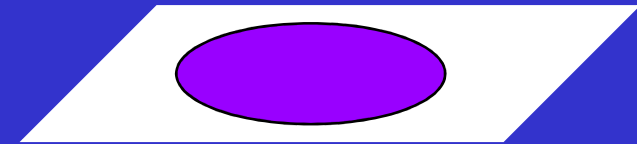
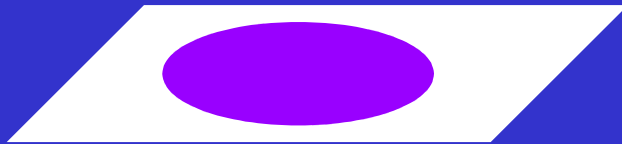
A



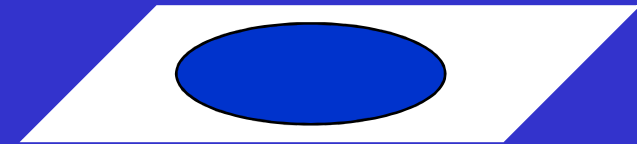
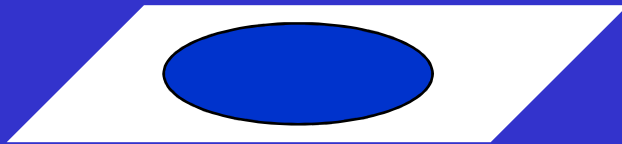
B



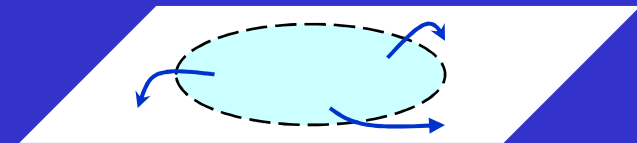
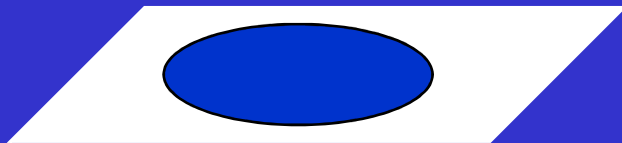
Coloration avec violet de Gentiane
(60 secondes)



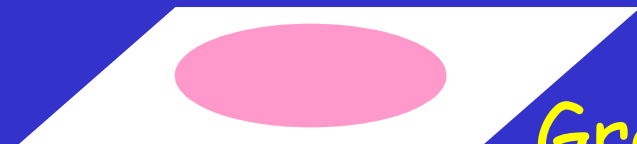
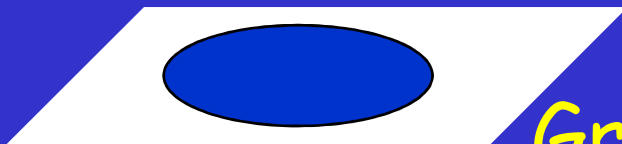
Rinçage suivi d'un traitement
avec le Lugol (30 s)



Traitement avec un mélange
d'alcool/acétone (30 s)



Coloration avec la fushine ou
safranine (60 s)

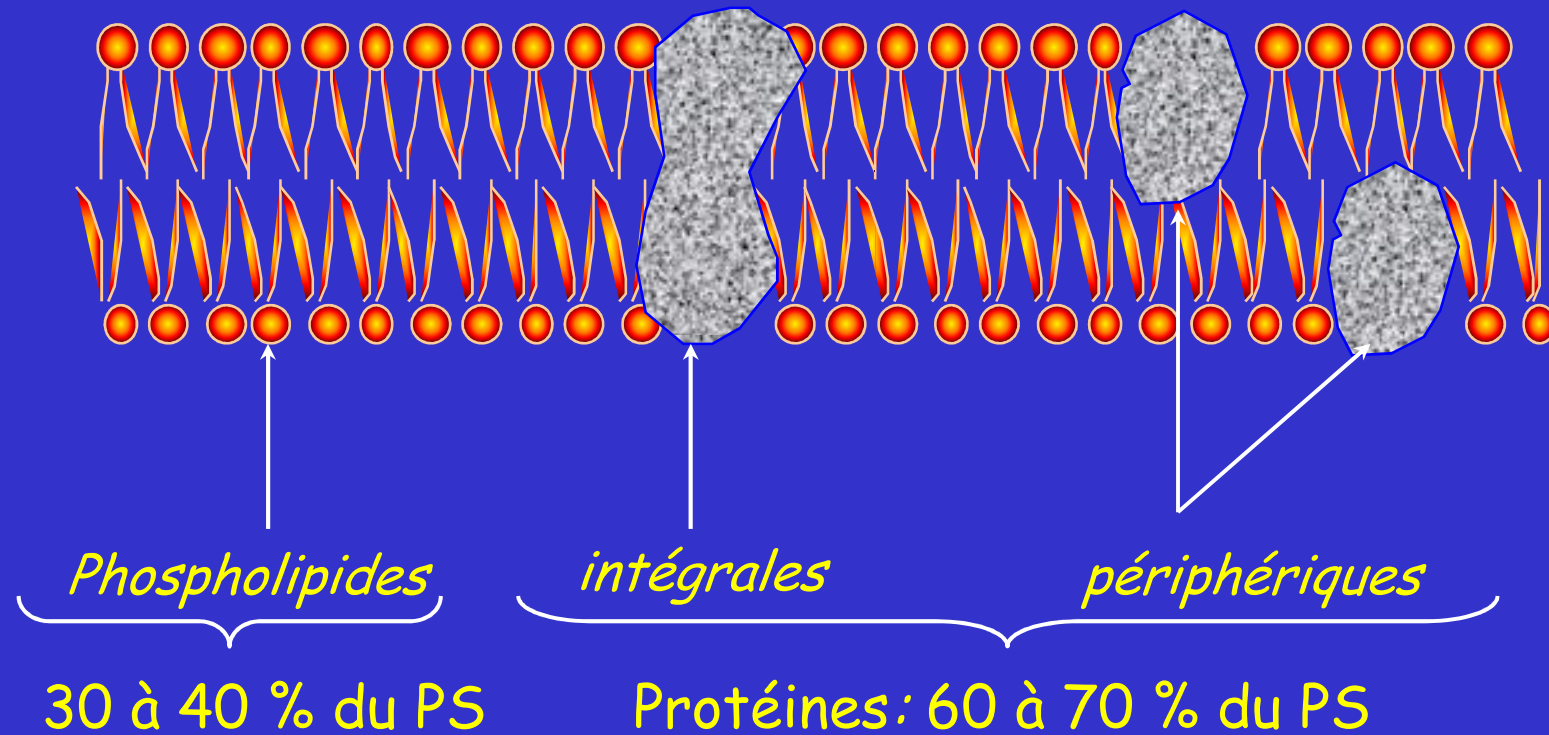


Gram +

Gram -

III. Membrane cytoplasmique

1. Composition chimique et structure moléculaire



a. Les phospholipides:

- rareté des phosphatidyl-cholines
 - phosphatidyl-éthanolamine (PE)
 - phosphatidyl-glycérol (PG)
- | | | |
|--|---|------------------------------------|
| | { | - <i>Brucella</i> |
| | | - <i>Agrobactérium tumefaciens</i> |
| | → | G - |
| | → | G + |

b. Les protéines:

Protéines extrinsèques (périphériques)

Protéines intrinsèques (intégrales)

c. Les glucides:

faiblement représentés (2 à 12%),
on y trouve particulièrement: glucose et glucosamine.

c. Les enzymes:

- Enzymes de la chaîne respiratoire c-à-d les déshydrogénases
- Coenzymes: cytochromes, les cytochromes oxydases ect...

2. Fonctions de la membrane

- Membrane cytoplasmique = support des enzymes de la respiratoire
- Elle est aussi le siège de la phosphorylation oxydative $\Rightarrow$ ATP

Transport

Protéines

H^+

H^+

Lactose

+++++

Na^+

Cytoplasme

Substrat

NADH

ADP + Pi

ATP

$3H_2O$

$2H^+$

$3OH^-$

$[H^+int]$

$H_2O \leftarrow 2H^+ + 1/2 O_2$

H^+

F_1

F_0

Membrane

ATP-synthétase

H^+

Phosphorylation

Respiration

$2e^-$

$2e^-$

$2e^-$

$2e^-$

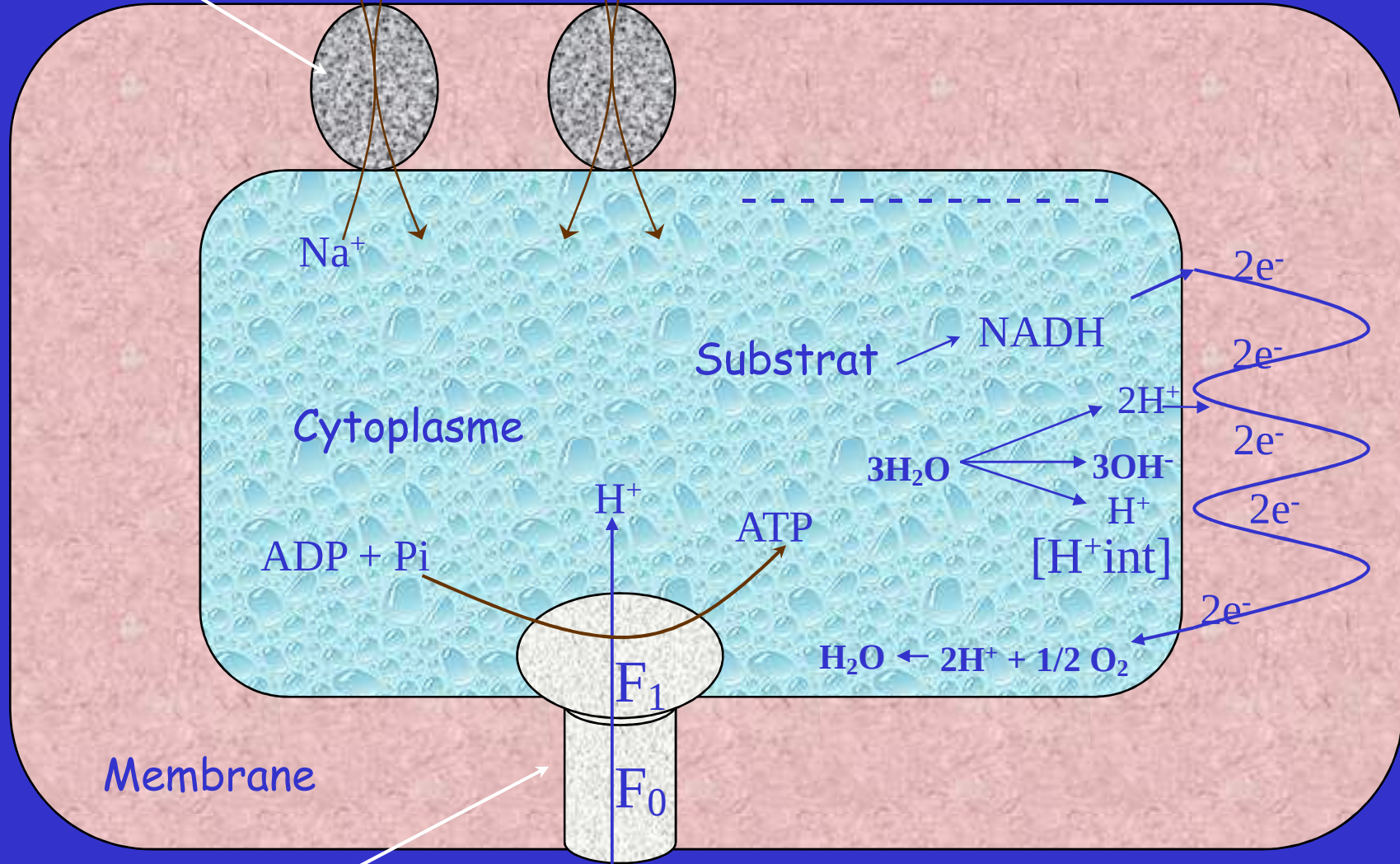
$2e^-$

H^+

H^+

$[H^+ext]$

H^+



2.1. Respiration

☞ circulation d'électrons le long d'une chaîne de transporteurs

☞ source d'électrons: substance organique ou inorganique

☞ récepteur terminal:

➤ $O_2 \longrightarrow$ aérobiose

➤ $\left\{ \begin{array}{l} \text{corps organique (fumarate)} \\ \text{Corps inorganique (nitrate)} \end{array} \right\} \longrightarrow$ anaérobiose

☞ transporteurs d'électrons sont très diversifiés:

$\implies$ ubiquinones $\implies$ flavoprotéines $\implies$ ferroprotéines

$\implies$ Métalloprotéines (Cu ou Mo) $\implies$ cytochromes $\implies$ hydrogénases

☞ conséquence de cette respiration :

➤ création de part et d'autre de la membrane d'une ddp

➤ création de part et d'autre de la membrane d'une $\neq$ de pH



gradient électrochimique de protons

=
force protomotrice

force protomotrice
=
Energie électrique transmembranaire



$$\Delta\mu_{H^+} = F\Delta\psi - 2,3 RT \Delta pH$$

Chez *E. coli*:

- Le ΔpH est d'environ 2 unités (l'extérieur étant plus acide).
- Le $\Delta\psi$ est à l'origine d'un champ électrostatique d'environ 70 mV (l'extérieur étant le côté positif).

2. 2. Phosphorylation oxydative

Au niveau de la membrane, l'ATP est synthétisée par une H^+ -ATPase (ou ATP-synthétase) utilisant la force protomotrice créée par la chaîne respiratoire.

Cette ATP-synthétase est constituée de deux parties distinctes:

- ☞ la partie F₀: une protéine intégrale (intrinsèque) qui traverse la membrane en créant un canal à protons.
- ☞ la partie F₁: une protéine périphérique (extrinsèque) localisée du côté du cytoplasme,

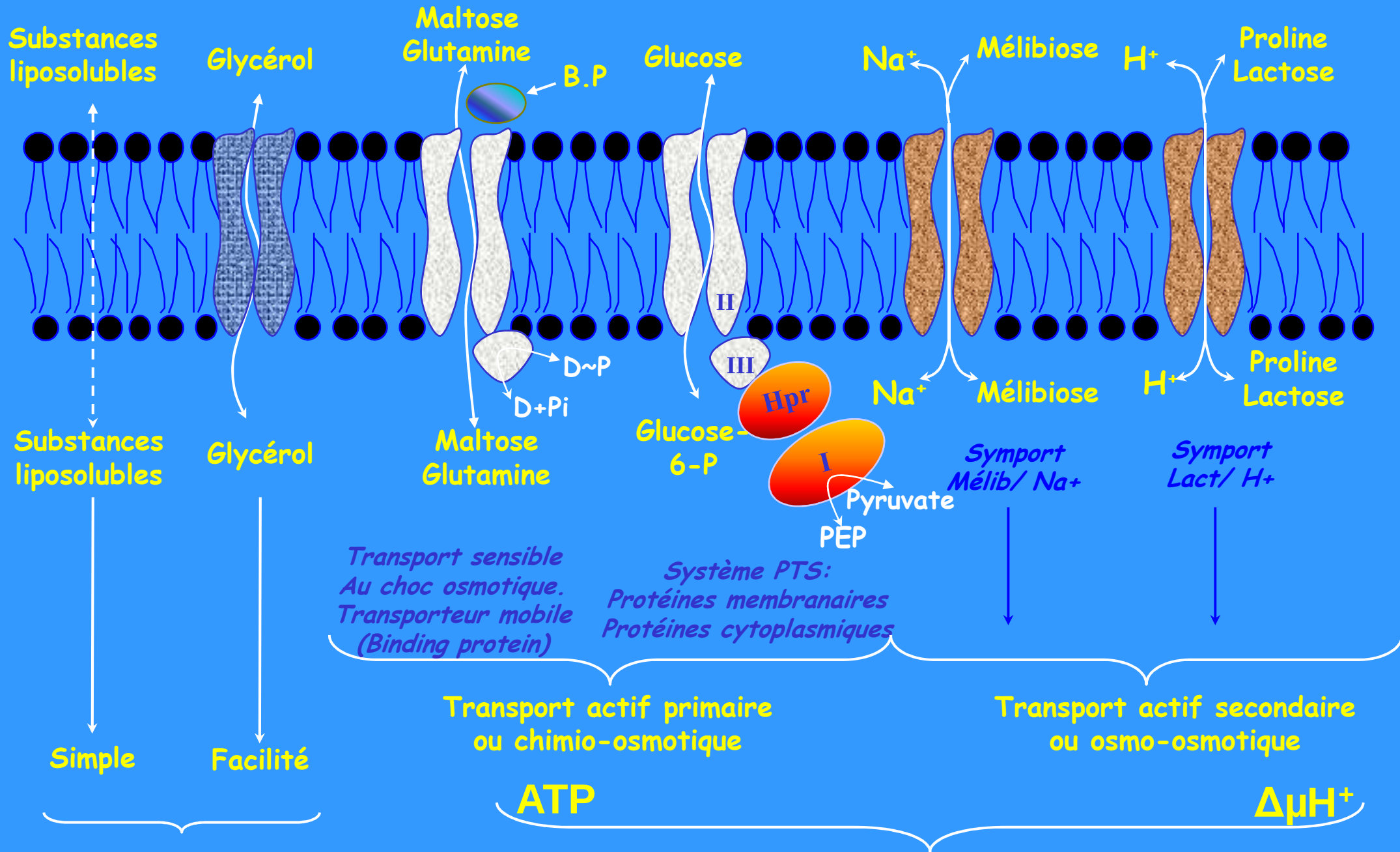
Ces ATP-synthétases sont aussi appelées F₁, F₀-ATP-ase et sont toutes semblables chez les mitochondries, les chloroplastes et les bactéries..

Conséquence de la respiration et de la phosphorylation oxydative



- ① une énergie chimique : ATP
- ② une énergie électrique transmembranaire: $\Delta \mu H^+$

2. 3. Transport



Transport passif

- ✓ Pas d'accumulation de substrat
- ✓ Pas besoin d'énergie

Transport actif

- ✓ Accumulation de substrat
- ✓ Besoin d'énergie

a. Transport passif

- Suit le gradient de concentration avec la tendance d'établir un équilibre entre les concentrations intra et extracellulaires d'un substrat donné.
- Ne nécessite aucune énergie et n'entraîne aucune accumulation.

➡ Transport simple:

Concerne les substances liposolubles et de petites tailles. Ces substances traversent la membrane sans l'aide d'aucune protéine.

➡ Transport facilité:

Concerne les molécules de taille relativement importante et se fait à travers une protéine membranaire(facilitateur).

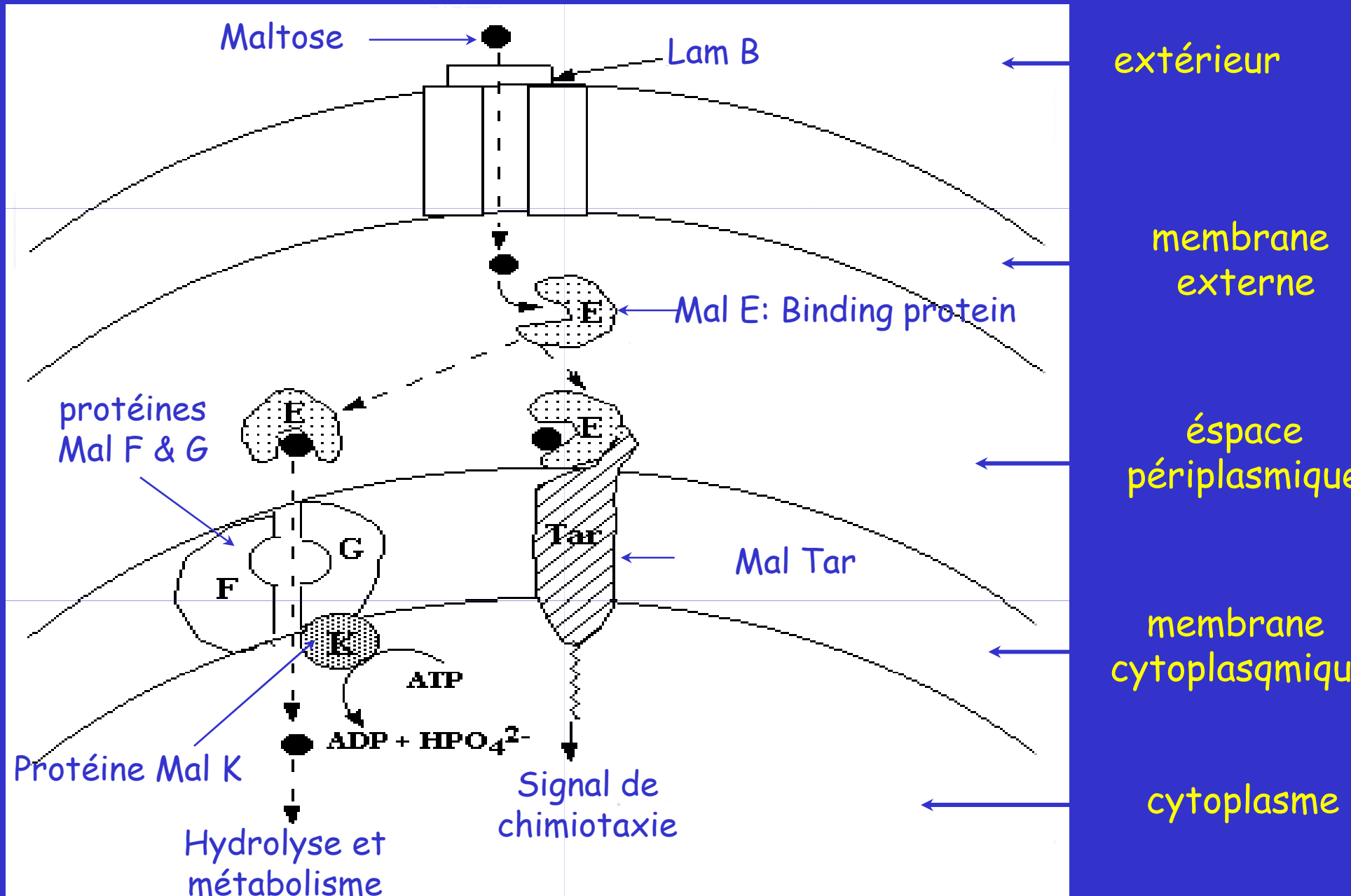
b. Transport actif

- Se fait contre le gradient de concentration c-à-d du moins concentré vers le plus concentré.
- Nécessite une énergie et entraîne une forte accumulation du substrat

➤ Transport actif primaire ou *chimio osmotique*

- sensible au choc osmotique
- fait intervenir l'ATP comme source d'énergie et plusieurs protéines de transport différentes:
 - au moins une, traverse la membrane pour former un canal
 - les autres font partie soit de la membrane externe (porines et protéines mineures) soit de l'espace périplasmique (protéines de liaison ou binding protein) ou encore des protéines solubles du cytoplasme.

Ex.1. transport du maltose chez *E. coli*



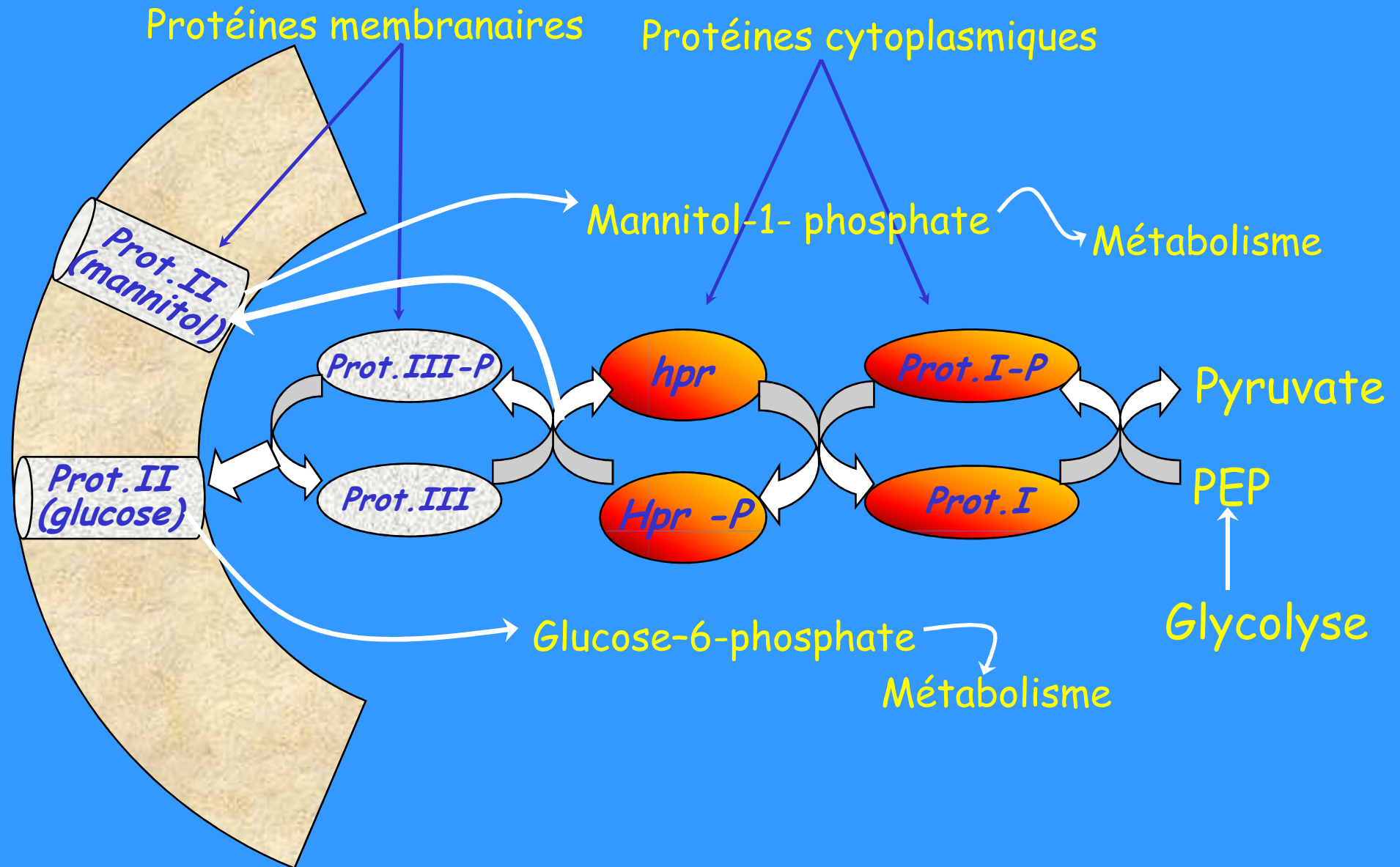
Ex.2. transport des sucres par le système PTS (= Systèmes Phosphotransférases)

- ✓ Un type de transport actif primaire ($\approx$ transport par translocation)
- ✓ Concerne en particulier les sucres (glucose, mannose, fructose, mannitol, N-acétylglucosamine et quelques β -glucosides)
- ✓ La caractéristique de ce transport c'est la phosphorylation du substrat qui a lieu au niveau de la membrane cytoplasmique
- ✓ La source d'énergie chimique = phospho-énol-pyruvate (PEP)

Chez *E. coli*, le système PTS est composé de deux types de protéines:

- ♣ Les protéines cytoplasmiques, communes à tous les systèmes PTS, prot. I et prot. Hpr, toutes les deux sont solubles dans le cytoplasme.
- ♣ Les protéines membranaires :
 - ✓ la prot. II
 - ✓ la prot. III

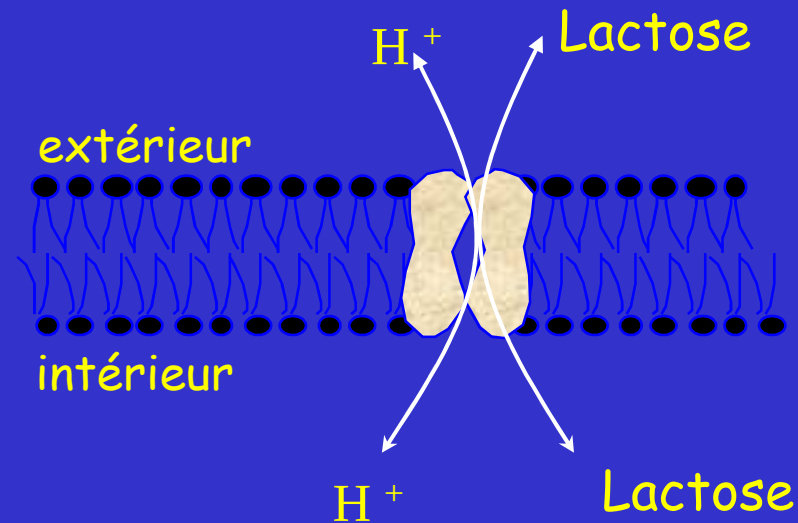
Transport des sucres par le système PTS (= Systèmes Phosphotransférases)



➡ Transport actif secondaire ou *osmo osmotique*

- fait intervenir le ($\Delta\mu_{H^+}$) comme source d'énergie,
- plus souvent une seule protéine de transport,
- caractérisé par le fait que la pénétration du substrat est couplée à celle d'un proton,

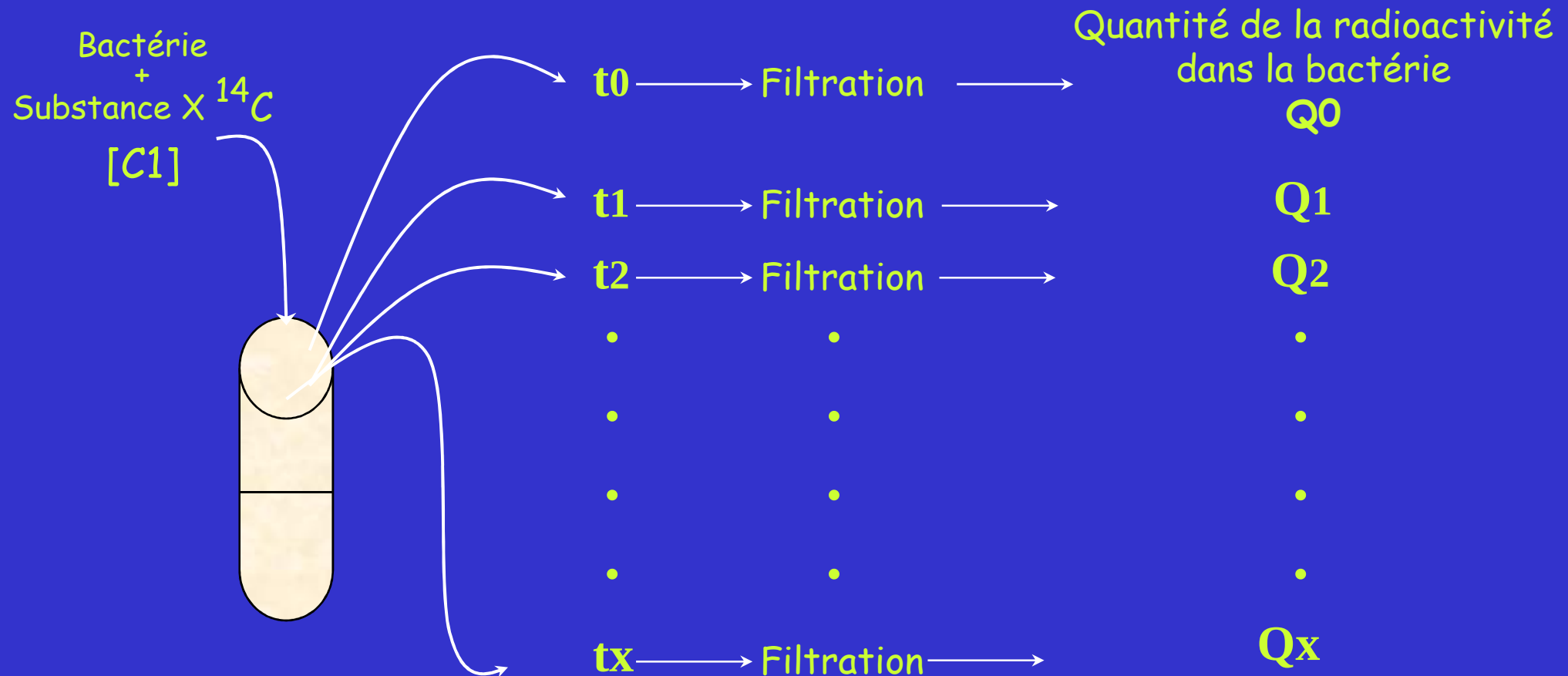
Ex. Transport du lactose
Chez *E. coli*



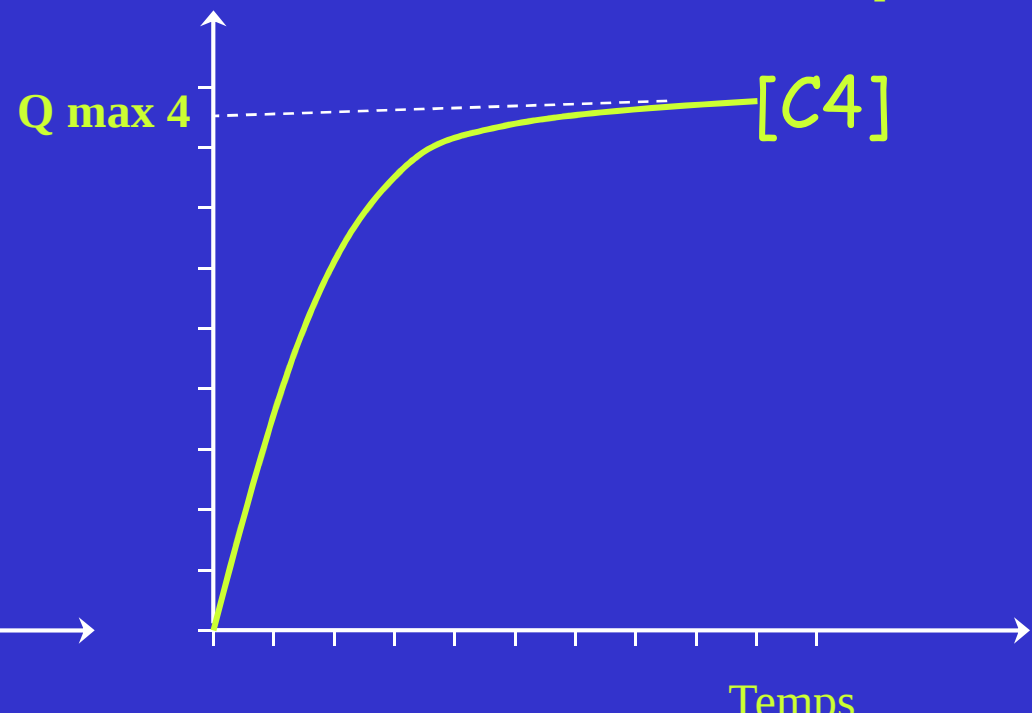
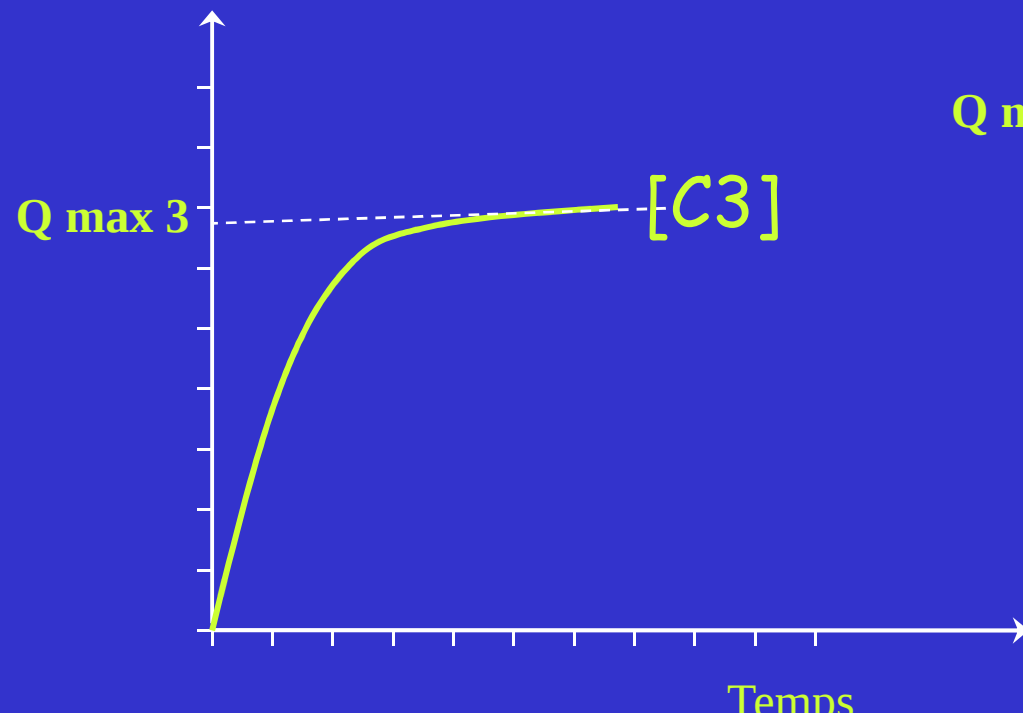
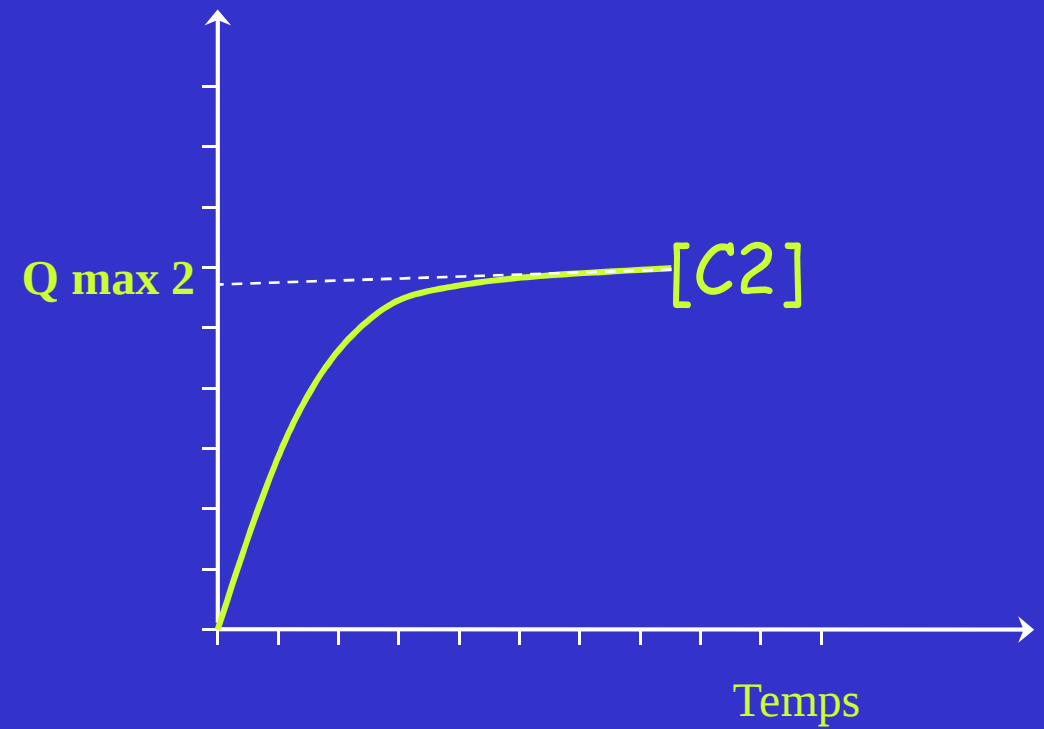
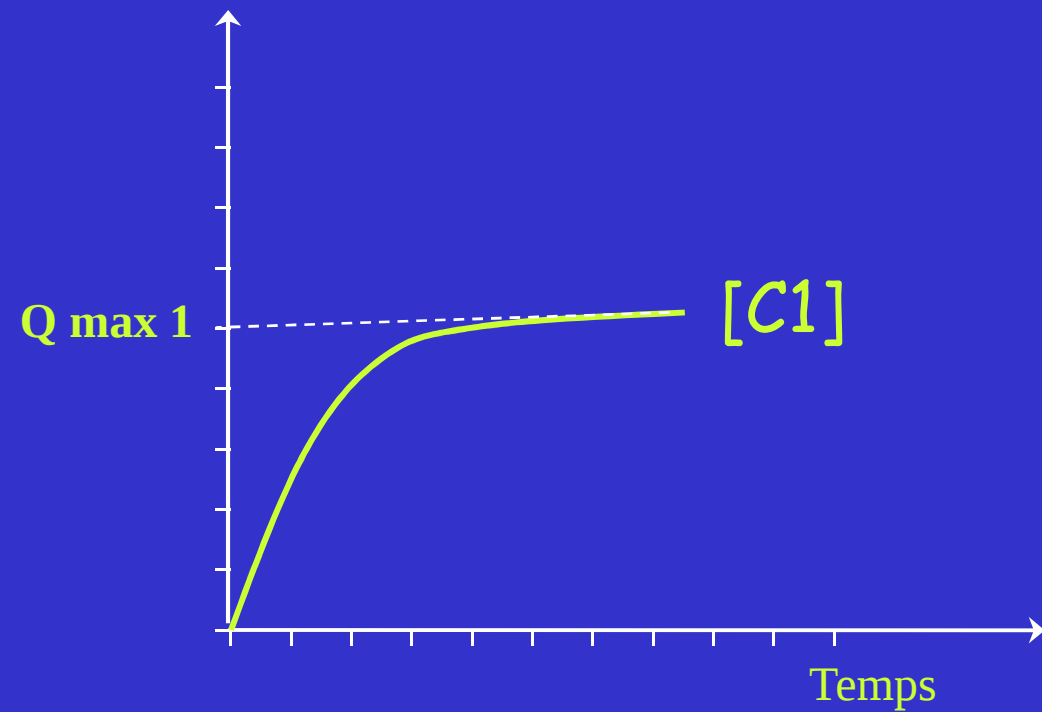
les deux éléments sont véhiculés par une protéine intrinsèque (perméase lac y),

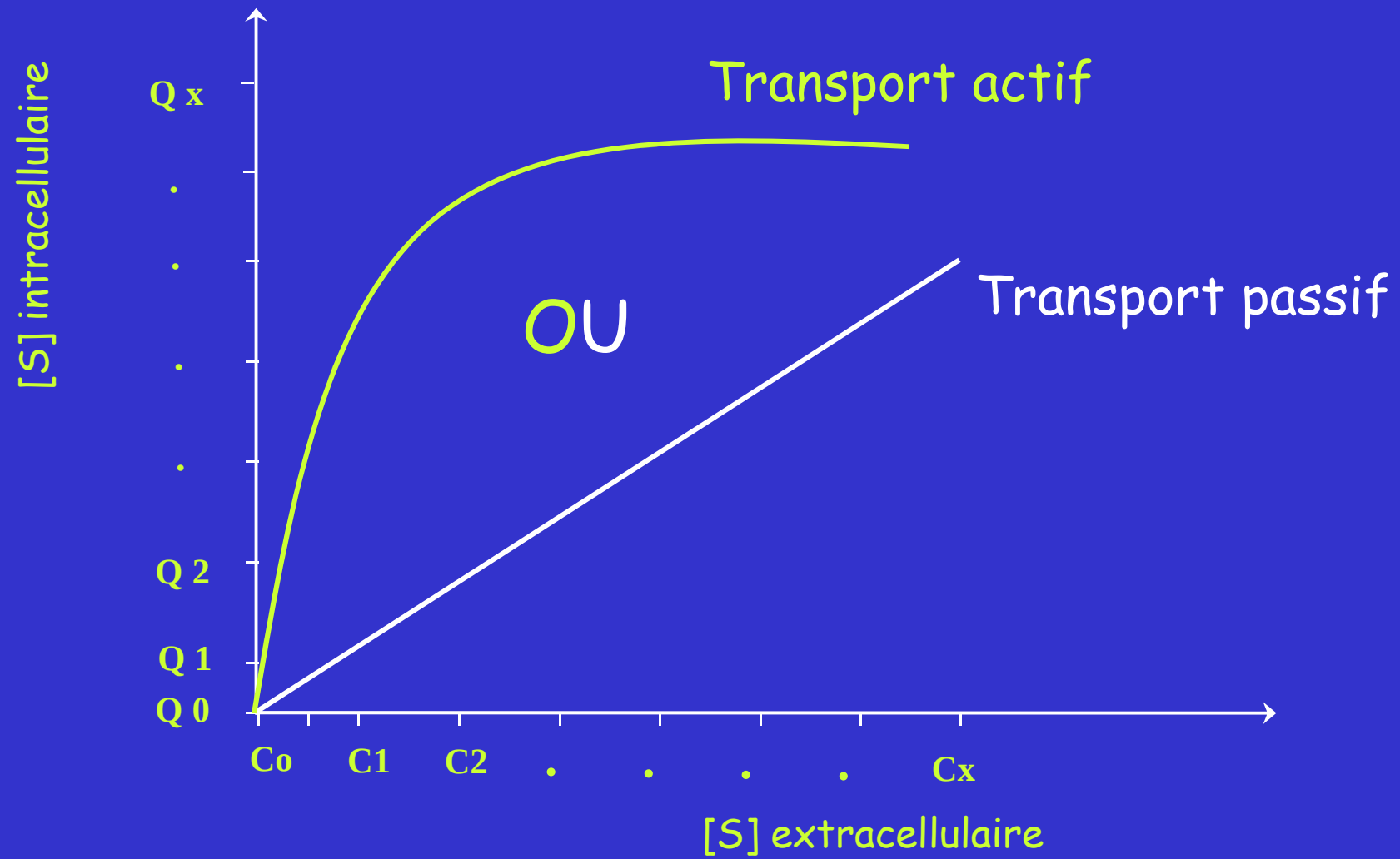
la synthèse de cette perméase est induite par la présence du lactose dans le milieu extracellulaire (voir plus loin S6).

➤ Méthodes d'étude du transport chez les bactéries



Quantité de la radioactivité
dans la bactérie





Comment distinguer entre les différents types de transport actif ?

inhibiteurs métaboliques : Ce sont des substances chimiques à action spécifique permettant d'éliminer une source d'énergie cellulaire bien déterminée.

- Les inhibiteurs de la chaîne respiratoire: cyanure qui inhibe la cytochrome oxydase.
- Les inhibiteurs de l'ATPase membranaire : azoture (1mM) et le DCCD (Dicyclohexylcarbodiimide) qui réagissent de manière covalente avec la composante FO de l'ATPase.
- Les inhibiteurs de l'ATP cellulaire: arséniate: analogue du Pi qui épuise l'ATP intracellulaire.

- ➡ Les inhibiteurs du gradient électrochimique ($\Delta\mu_{H^+}$) ou de l'une de ses composantes.

ionophores

substances chimiques qui s'intercalent dans la double couche lipidique de la membrane, créant des pores à travers lesquels vont passer des ions.

- ✓ le 2,4-DNP (2,4-Dinitrophénol): ionophore à protons qui découple la phosphorylation oxydative et inhibe le $\Delta\mu_{H^+}$ en totalité.
- ✓ la valinomycine et la monoactine: ionophores à potassium (K^+) qui permettent à ce cation d'entrer dans la cellule, ce qui entraîne un équilibre des charges positives sur les deux faces de la membrane, ce qui affecte spécifiquement le $\Delta\psi$.
- ✓ la nigéricine: ionophore qui réduit le ΔpH en échangeant le K^+ contre H^+ .

IV. Cytoplasme

➡ hydrogel colloïdal composé de:

une solution de sels minéraux et de composés solubles de nature lipoprotéique, de nucléoprotéines et de lipides

➡ $7 < \text{pH} < 7.2$

➡ Les principaux constituants du cytoplasme sont:

- ✓ les ribosomes et les acides ribonucléiques qui leur sont associés
- ✓ matériel héréditaire,
- ✓ les substances de réserve
- ✓ certains organites spécialisés

1. Ribosomes

- ➔ Granulations sphériques qui occupent tout le cytoplasme,
- ➔ Coefficient de sédimentation est de 70 S, PM = $3 \cdot 10^6$ daltons
- ➔ Constitués exclusivement d'ARN (63%) et de protéines (37%)
- ➔ Ces particules peuvent se dissocier en deux sous-unités:
 - ✓ La grande sous unité 50 S de PM= $2 \cdot 10^6$ daltons, constituée d'ARN 23 S et 5 S et de protéines L (Large = grande);
 - ✓ la petite sous-unité 30 S de PM= 10^6 daltons, constituée d'ARN 16 S et de protéine S (Small = petit).

Les deux sous unités sont reliées entre elles par l'intermédiaire de liaisons ARN - protéine et protéine - protéine.

- ➔ Structure en chapelets qu'on appelle **polysomes**.

2. Granulations et substances de réserve

- Amidon et glycogène
- Acide poly β -hydroxybutirique
- Granulations métachromatiques *Corynebacterium diphtheriae*
- inclusions de
 - soufre chez les thiobactéries
 - fer chez les sidérobactéries
 - oxyde de fer (Fe_3O_4): bactéries « magnétiques ».

3. Chromatophores et pigments

Chez les bactéries photosynthétiques, chromatophores

Dont l'ultrastructure est différente de celle des chloroplastes des végétaux supérieurs.

Leurs pigments photosynthétiques = des bactériochlorophylles.

Halobacterium halobium

bactériorhodopsine

- ✓ vitamine K2 chez *Bacillus subtilis*;
- ✓ caroténoïde, protecteur anti-UV, chez les corynébactéries;
- ✓ pyocyanine, pigment ayant une activité antibiotique, chez *Chromatobacterium violaceum*;

Certains pigments confèrent aux colonies bactériennes une teinte caractéristique:

- ✓ Zeaxanthène, pigment jaune chez *Staphylococcus aureus*;
- ✓ Xantophylle, pigment rouge chez *Sarcina*;
- ✓ pyocyanine bleue et pyoverdine bleu-vert fluorescent chez *Pseudomonas aeruginosa*.

V. Matériel héréditaire

1. Chromosome bactérien

- filament unique, continu et circulaire, formé d'une double chaîne d'ADN
- $PM \approx 3.10^9$ da, avec environ 5.10^6 paires de bases
- dans la cellule, la molécules d'ADN est formée de boucles resserrées et finement entrelacées, donnant une structure compacte mais fragile = *nucléoïde*.
- toute l'information génétique est stockée au niveau de l'ADN sous forme d'un code bien déterminé / la succession des nucléotides,
- Par le processus de la transcription, le message est copié fidèlement sous forme d'un ARN messenger puis exprimé, par le processus de la traduction, en séquences polypeptidiques qui formeront les protéines de structure et les enzymes.

- l'information génétique au niveau de l'ADN peut changer spontanément (faible fréquence) ou artificiellement par mutagenèse

Agents chimiques : acide nitreux ou physique : UV

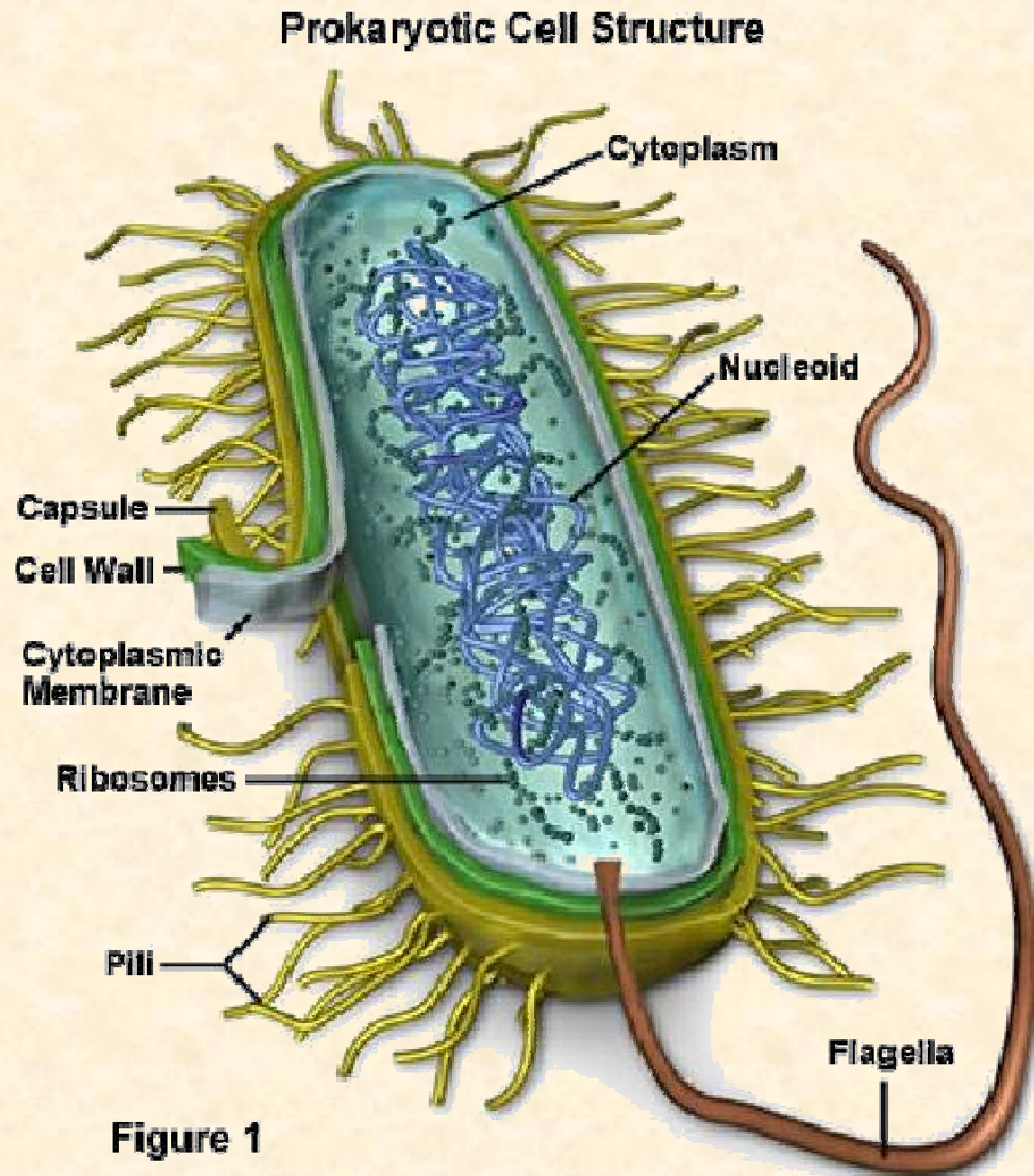
2. Plasmides

- éléments génétiques extra-chromosomiques capables d'autoreproduction
- petite taille (1/100ème environ de la taille du chromosome)
- structure torsadée (super enroulée)
- $0.5 \cdot 10^6 < PM < 400 \cdot 10^6$,
- leur nombre varie de 1 à 100/ cellule

Rôles des plasmides:

- ✓ Résistance aux antibiotiques (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol).
- ✓ Résistance aux métaux lourds comme le Hg, cd, pb
- ✓ Intervention dans la dégradation de certains composés aromatiques
- ✓ Intervention dans la production des substances à rôle pathogène.
- ✓ Intervention dans la production de bactériocines.

VI. Éléments inconstants

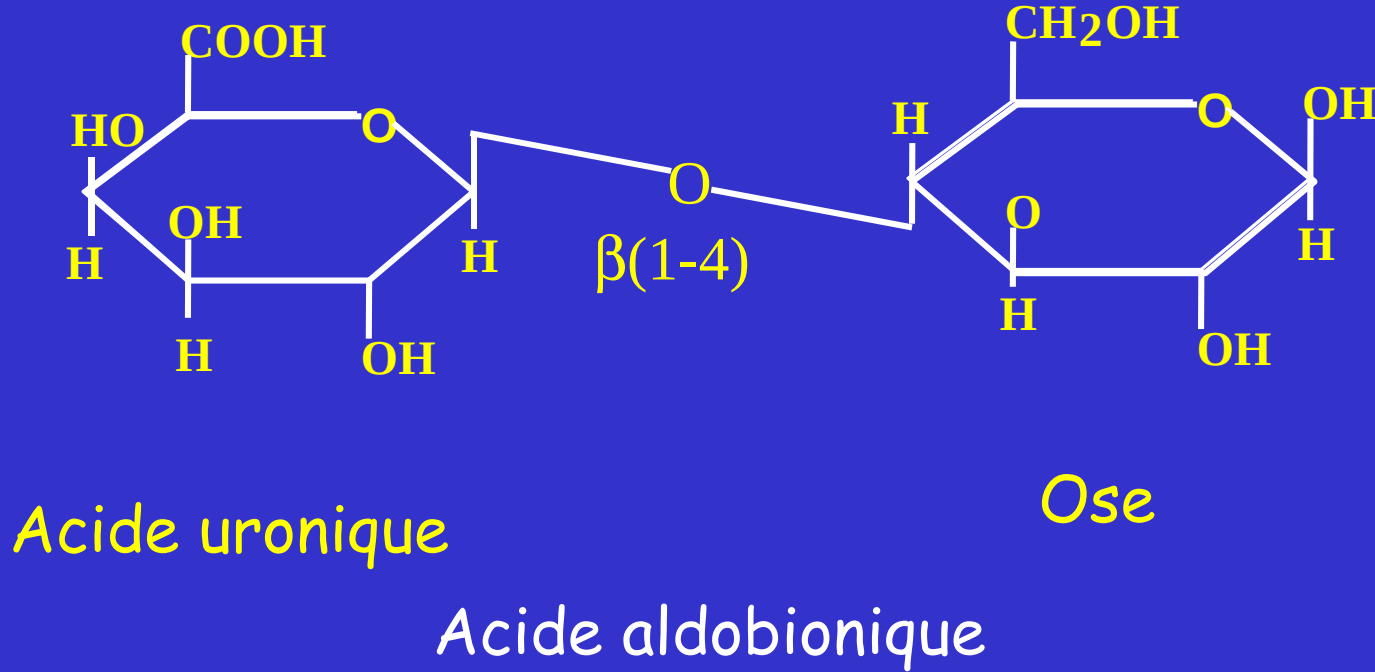


1. Capsule

- Couche organique visqueuse élaborée par certaines bactéries dans certaines conditions de culture,
- Généralement, elle entoure une cellule bactérienne.

a. Composition chimique

- ✓ souvent polyholosidique, quelquefois polypeptidique,
- ✓ chez le pneumocoque (Gram⁻), la capsule est polyholosidique formée de longues chaînes d'acides aldobioniques,



✓ selon les espèces et les souches bactériennes, la nature chimique de la capsule peut varier au niveau:

➤ des acides uroniques: {
- acide galacturonique
- acide glucuronique
- acide cellobiuronique, ...

➤ des oses: {
- glucose
- galactose
- rhamnose, ...

La capsule est également de nature polyholosidique chez de nombreuses bactéries Gram⁻ :

E. Coli

Klebsiella pneumoniae

Hemophilus influenzae

Chez les Gram⁺, les constituants capsulaires sont de nature polypeptides, constitués d'un seul acide aminé: l'acide D-glutamique.

Bacillus anthracis

Bacillus megaterium

Bacillus subtilis

b. fonctions

- Support de propriétés physiopathologiques et immunologiques,
- véritables facteurs de virulence,
- protège la bactérie contre la phagocytose,

➤ support d'antigénicité:

La nature des polysaccharides constitutifs de la capsule et de leur enchaînement, déterminent la spécificité sérologique.

70 types sérologiques sont actuellement reconnus chez les pneumocoques.

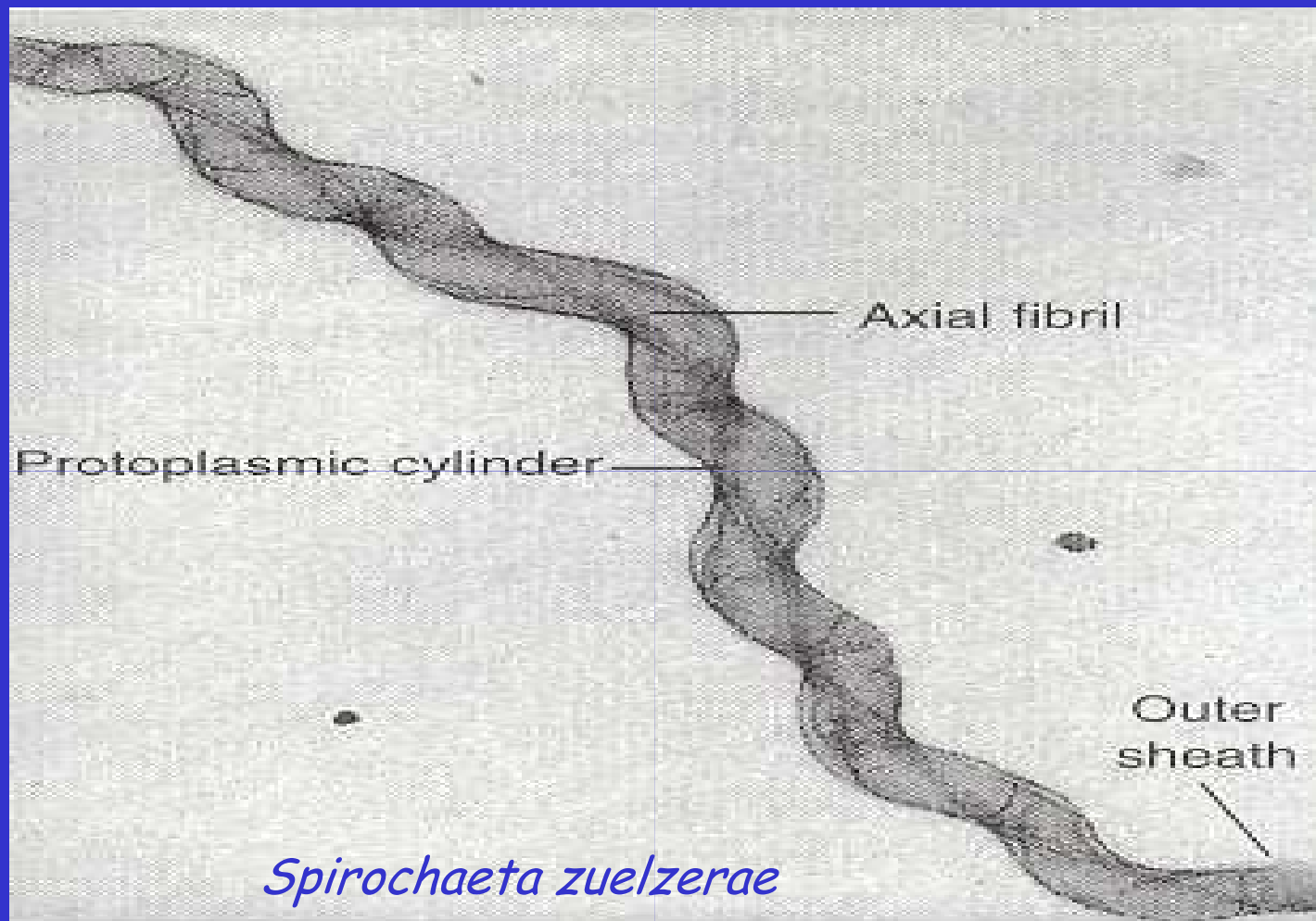
➤ dans l'environnement, la capsule protège la bactérie contre:

- ✓ la dessiccation.
- ✓ le pouvoir agressif des agents chimiques et physiques.
- ✓ empêche la fixation des bactériophages sur la bactérie.

2. Flagelles ou cils

2 types de mouvement:

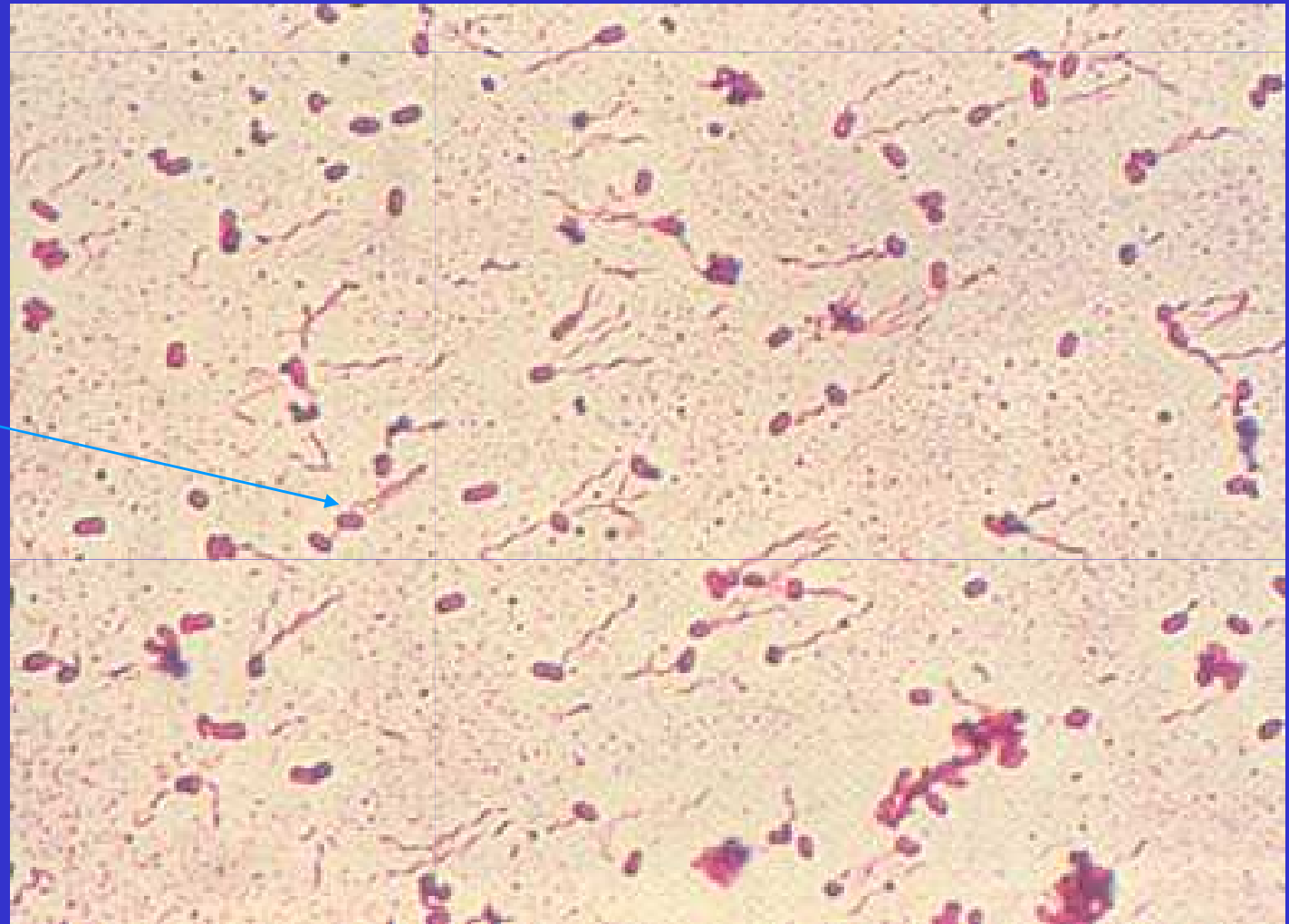
- Chez les myxobactéries: déplacement par glissement,
- Chez les eubactéries et les spirochètes, mouvement assuré par des organes locomoteurs spécialisés,
- ➡ Chez les spirochètes, mouvement assuré par un filament axial.



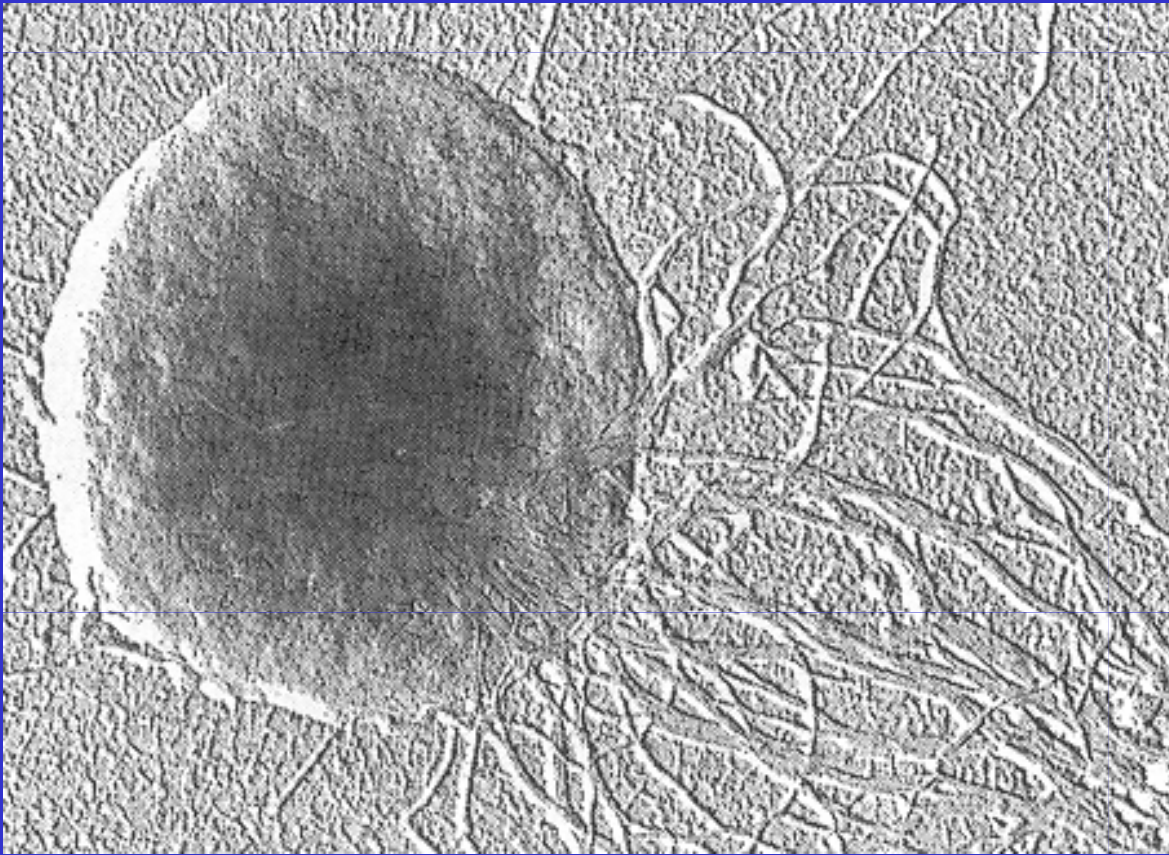
➔ Chez les eubactéries, la mobilité est assurée par des flagelles.

Invisibles en microscopie optique, mais peuvent être mis en évidence par des colorations spécifiques.

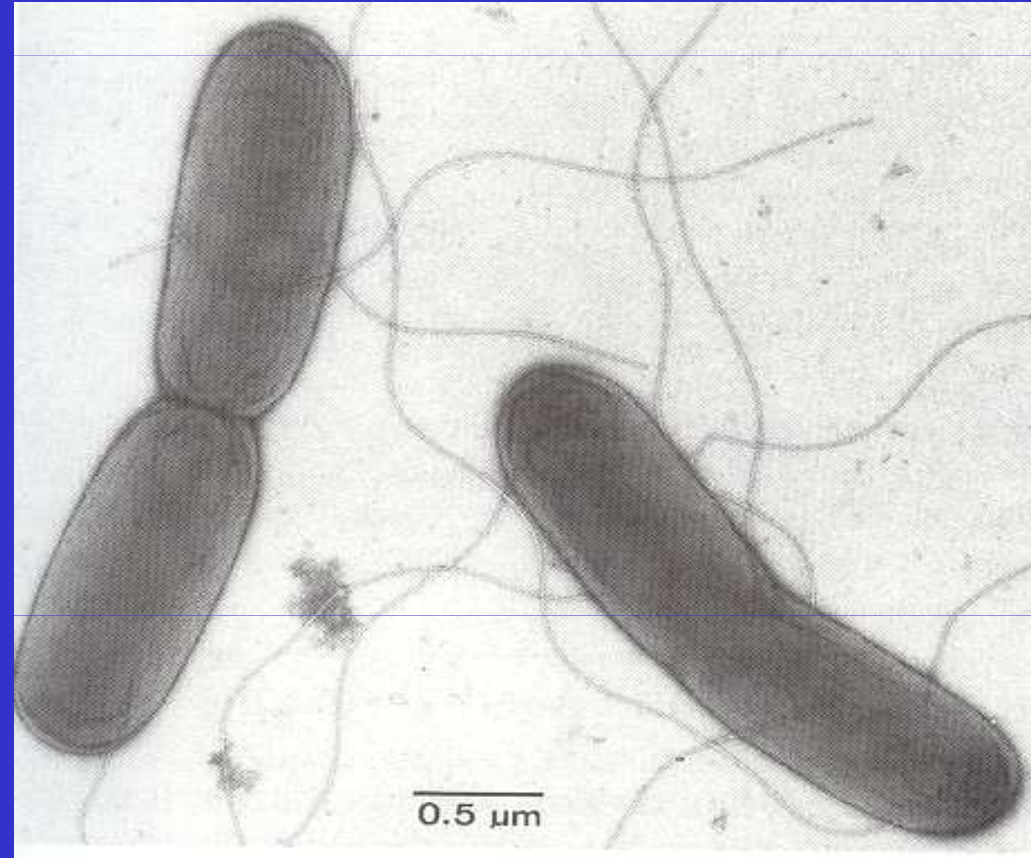
Proteus mirabilis



En microscopie électronique, ils apparaissent sous forme d'organites simples, filamenteux, sinueux, généralement plus long que la bactérie elle-même, de l'ordre de 6 à 20 μm .



Methanococcus jannaschii



Alcaligenes eutrophus

➤ Le nombre et le mode d'insertion des flagelles sur la bactérie, constituent un critère de classification.

on distingue deux principaux types d'insertion:

➤ *Insertion polaire:*

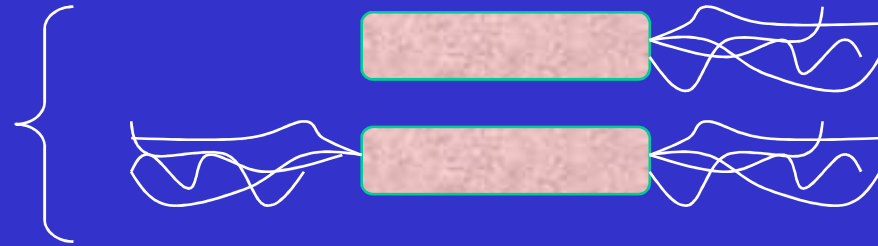
Monotriche



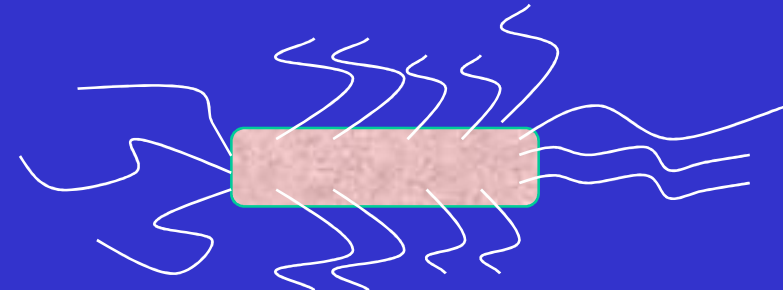
Amphitriche



Lophotriche



➤ *Insertion péritriche :*



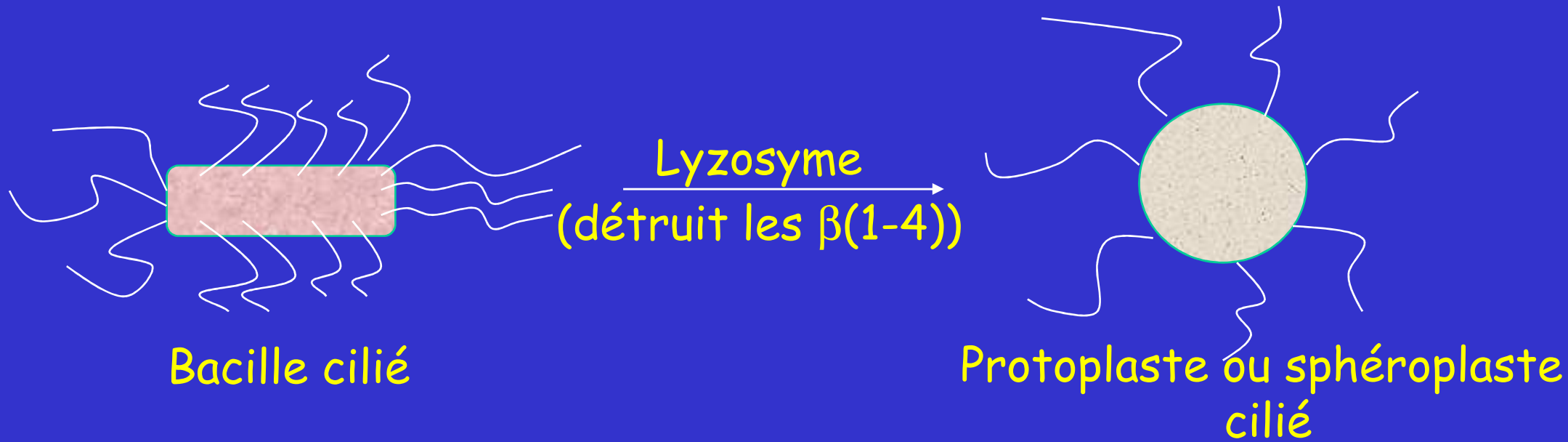
Flagelle constitué d'une protéine, de PM de 30 à 40 Kda, la flagelline qui fait partie de la famille des Kératomyosines.

La croissance du flagelle est assurée non pas à partir de la base, mais par un prolongement de l'extrémité.

En effet les molécules de flagelline formées dans le cytoplasme, traversent la partie centrale creuse du flagelle et s'additionnent à l'extrémité terminale.

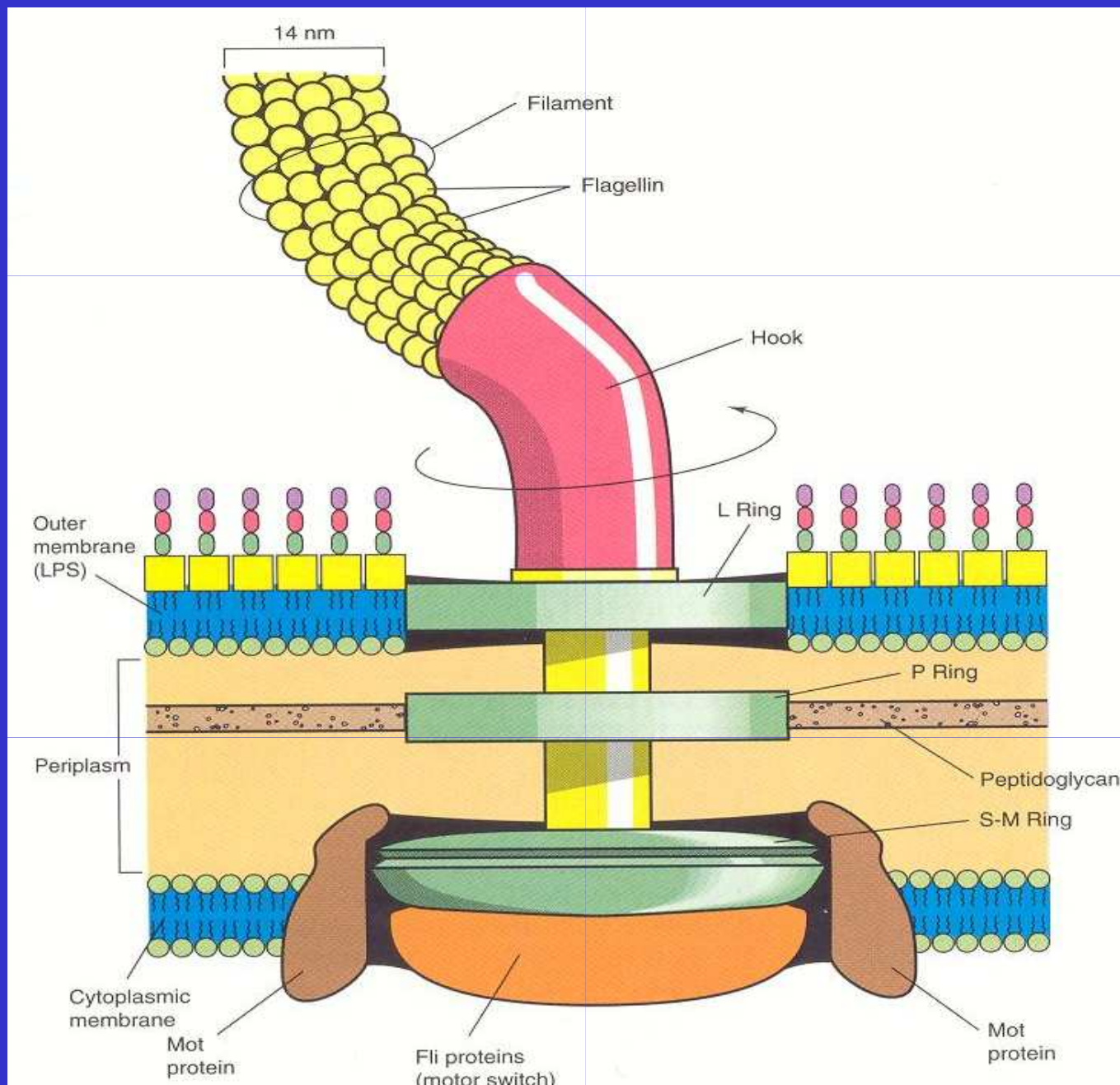
Ce processus de synthèse est appelé auto-assemblage et lorsqu'une fraction de l'extrémité est brisée, elle est régénérée.

La destruction de la paroi par des lysozymes aboutit à la formation de protoplaste ou sphéroplaste cilié.



- ✓ Origine du cil est au niveau du cytoplasme et non pas la paroi.
- ✓ Microscopie électronique montre que le flagelle traverse la paroi et prend racine dans le cytoplasme au niveau d'un granule basal de structure complexe, lié à l'enveloppe bactérienne.

➡ Ce corps basal comprend deux anneaux protéiques, le plus interne est lié à la membrane cytoplasmique, le plus externe visible surtout chez les bactéries Gram⁻, est lié aux LPS et au peptidoglycane.



- ➡ Le déplacement est assuré par rotation du flagelle à la manière d'une hélice.
- ➡ L'énergie nécessaire au mouvement provient du gradient électrochimique de protons.
- ➡ Autres fonctions du flagelle

- *Chimiotactisme*

sucre et acides aminés les attirent —————> chimiotaxie positive
phénols, acides et bases les repoussent —————> chimiotaxie négative

La réponse cellulaire vis-à-vis de ces substances serait due à un gradient d'informations transmis de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de récepteurs chimiques.

Les récepteurs par lesquels la bactérie perçoit la présence d'une substance dans son environnement sont des protéines spécifiques pariétales et/ou périplasmiques.

➤ *Propriétés antigéniques*

La spécificité des antigènes flagellaires repose sur le nombre et la séquence des acides aminés de la flagelline.

Ces différences ont été exploitées pour la caractérisation immunologique des types bactériens (Ex. classification des *Salmonella* par Kauffman & Withe).

3. Pili et fimbriae

- appendices filiformes différentes des flagelles,
- fréquents chez les Gram⁻, rares chez les Gram⁺.

☞ *les Pili communs (de type I)*

- grand nombre autour de la bactérie (100^{aine}),
- courts, rigides et cassants,
- rôle dans l'adhérence des bactéries Gram⁻ sur les cellules eucaryotes.

➡ *les Pili sexuels*

- Sont plus longs, se terminent par un renflement.
- Leur nombre varie de 1 à 4 /cellule.
- jouent un rôle important dans le transfert du matériel héréditaire entre deux bactéries par le phénomène de conjugaison.
- à l'extrémité renflée de ces pili, peuvent se fixer certains phages et injecter leur matériel génétique par le canal du pili.

En fin, l'analyse chimique de ces pili a montré qu'ils sont constitués d'une protéine appelée piline d'un PM ≈ 17000 daltons, associant des sous unités.

Ces dernières se dissocient par chauffage ou par traitement acide, et peuvent reformer à froid et à pH neutre la structure protéique originale.

La nutrition bactérienne

Pour vivre et se multiplier

Éléments nutritifs de base = **Besoins élémentaires**

milieu minimum :

- Eau
- Source d'énergie
- Source de carbone
- Source d'azote
- Éléments minéraux

Cependant, l'apport de nutriments supplémentaires est nécessaire

groupes nutritionnels = **types trophiques**

① Besoins élémentaires

☞ La source de carbone

Selon la nature de cet élément essentiel pouvant constituer jusqu'à 50 % de la cellule,

✓ *Les autotrophes:*

Bactéries capables de se développer en milieu purement minéral (*milieu minimum - source de carbone*),
le CO₂ étant l'unique source de carbone.

✓ *Les hétérotrophes:*

Bactéries exigeant des composés organiques.

NB. Parmi les hétérotrophes, certaines espèces ont des exigences strictes. Ex. *Pseudomonas methanica* n'utilise que le méthane ou le méthanol.

☞ La source d'énergie

✓ *Les phototrophes ou photosynthétiques*

Energie à partir des rayons lumineux : espèces photosynthétiques
synthèse d'ATP à partir de l'ADP et du Pi :

- organes photosynthétiques = **chromatophores**
- pigments = bactériochlorophylles,
- donneur d'électrons: minéral ou organique (sans libération d'O₂).

Chez les végétaux, le donneur est H₂O (avec libération d'O₂).

✓ *Les chimiotrophes ou chimiosynthétiques*

Source d'Energie = oxydation de composés organiques ou minéraux.

☞ La source d'électrons

✓ *Chez les phototrophes*

- Les photolithotrophes: Donneur d'électrons minéral (milieu minéral)

Bactéries sulfureuses vertes (*Chlorobacteriaceae*)
et les bactéries pourpres (*Thiorodaceae*).

- Les photoorganotrophes: Donneur d'électrons organique.

Bactéries pourpres non sulfureuses (*Athiorodaceae*).

✓ *Chez les chimiotrophes*

- Les chimiolithotrophes: Donneur d'électrons minéral

Bactéries vivant généralement dans le sol ou l'eau.

Exp. *Nitrosomonas* : oxydant l'ammoniaque

Nitrobacter : oxydant les nitrites

- Les chimioorganotrophes: Donneur d'électrons organique

La majorité des bactéries entrent dans cette catégorie

☞ La source d'azote

Nécessaire à la synthèse des protéines (10% du poids sec).

L'azote peut être d'origine:

✓ *minérale :*

- * NH_4^+ et NO_3^- utilisés par la plupart des bactéries
- * NO_2^- utilisé par les bactéries du genre *Nitrobacter*
- * N_2 utilisé par les bactéries fixatrices d'azote libres (*Azotobacter*) ou symbiotiques (*Rhizobium*)

✓ *Organique :*

Protéines, acides aminés (R-NH_2).

A partir de ces composés, il y a incorporation des NH_4^+ libérés après désamination ou utilisation du radical NH_2 par transamination.

➡ Le soufre et le phosphore

Le soufre se retrouve dans les protéines, précisément au niveau des groupements thiols (-SH) des AA soufrés (cystine et cystéine).

Il est incorporé sous forme de sulfates ou sous forme organique.

Le phosphore, incorporé sous la forme de phosphate inorganique, fait partie des acides nucléiques, de certains coenzymes et de l'ATP.

➡ Autres éléments minéraux

Macro-éléments:

Na, K, Mg, Cl: rôle dans l'équilibre physicochimique

Fe: pour les Cytochromes Mg: pour la Chlorophylle

Micro-éléments:

Co, Cu, Mo, Mn et autres: Cofacteurs ou activateurs d'enzymes.

② Facteurs de croissance

Substances organiques, indispensables à la croissance, non synthétisées

Microorganismes dits **auxotrophes** par opposition aux **prototrophes**.

➤ *Nature des facteurs de croissance :*

- ✓ Acide aminé: synthèse des protéines,
- ✓ Base azotée puriques ou pyrimidiques: acides nucléiques,
- ✓ Vitamine: rôle de coenzyme ou de précurseurs de coenzyme.

➤ *Propriétés des facteurs de croissance :*

- Action à très faible concentration:

25 mg/l dans le cas des acides aminés.

10 mg/l pour les bases azotées,

1 à 24 $\mu\text{g/l}$ pour les vitamines,

-Spécificité stricte:

un simple changement de position d'un groupement ôte son rôle au facteur de croissance.

La croissance bactérienne

① Définition de la Croissance

Généralement c'est l'accroissement de tous les composants d'un organisme.

Chez les organismes pluricellulaires, il y a augmentation de taille.

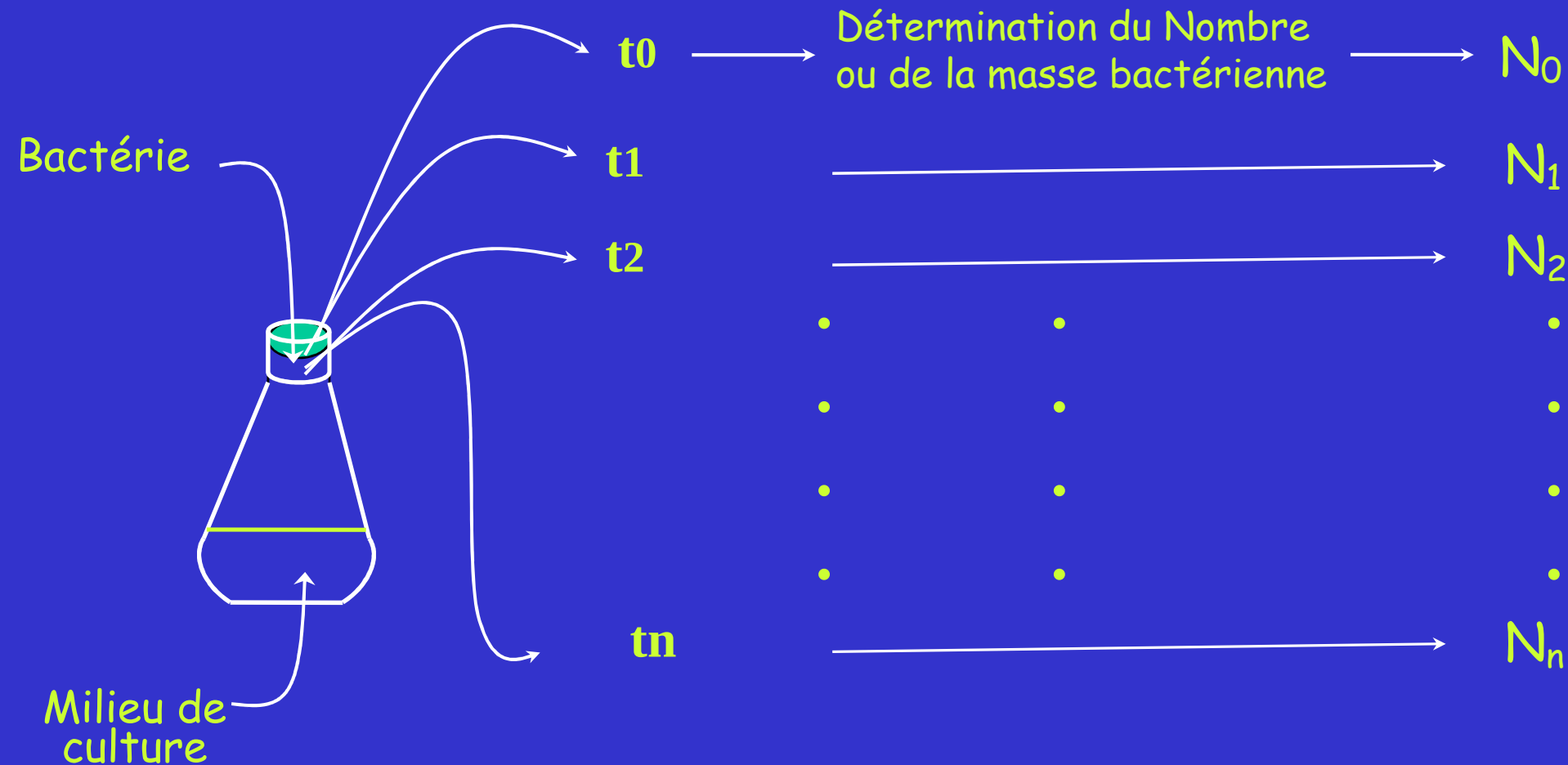
Chez les bactéries augmentation du nombre de cellules.

Cet accroissement est donc synonyme d'une multiplication bactérienne.

Chez *Escherichia coli*, toutes les 20 min environ, 1 bactérie donne naissance à 2 bactéries identiques

② Méthodes de mesure de la croissance

1- Principe



N.B. Durant la croissance la $T^{\circ}C$ et l'aération doivent être respectées

2-1. Mesure du nombre de cellules

➤ **Nombre de cellules totales**

- ✓ Cellule de Thomas
- ✓ Dispositif électronique (Compteur Coulter)

➤ **Nombre de cellules viables**

- ✓ Sur milieu solide
- ✓ Sur milieu liquide

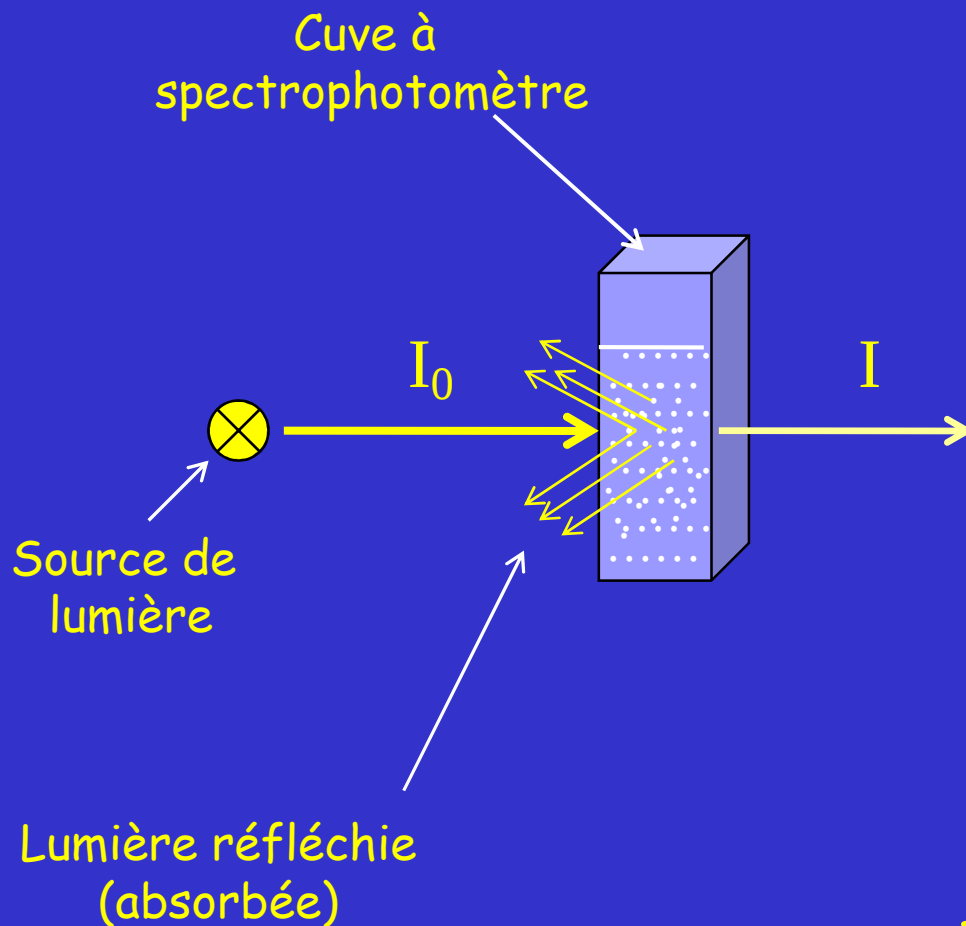
2-2. Mesure de la masse

- **Mesure du poids sec:** (P. frais d'1 bact.= $1,5 \cdot 10^{-12}$ g)
- **Dosage de l'azote total** (14% du poids sec).
- **La turbidimétrie:** consiste à mesurer le trouble bactérien.

La turbidimétrie

Une suspension cellulaire, traversée par un rayon lumineux, disperse la lumière (absorbe) et la quantité transmise est réduite par rapport à la quantité émise.

Ceci est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre.



Toute suspension bactérienne obéit à la Loi de Beer Lambert :

$$D.O = \log I_0 / I = \Sigma l C = K C$$

Σ = constante d'absorbance
 l = distance traversée par le rayon (1 cm)

Σ et l sont constantes, donc DO proportionnelle à C

La longueur d'onde utilisée pour la suspension bactérienne est comprise entre 550 et 660 nm (spectre d'absorbance).

③ Constantes et expression de la croissance

La croissance d'une bactérie est définie par 2 constantes:

➤ *Le temps de génération*

C'est le temps qui sépare 2 divisions successives (= temps nécessaire au doublement de la population).

$$G = t/n$$

t = temps de croissance (connu) et n = nombre de divisions

Ex. chez *E. coli* : $G = 20$ min

➤ *Le taux de croissance*

C'est le nombre de divisions par unité de temps.

$$\mu = n/t \quad \text{donc} \quad \mu = 1/G$$

μ est exprimé en nombre de divisions/unité de temps

Ex. chez *E. coli* : $\mu = 3$ div /h

④ Expression mathématique de la croissance

Temps

nombre de Bactéries

$$\begin{array}{llll} t_0 & \longrightarrow & N_0 = 1N_0 & \longrightarrow 2^0 N_0 \\ t_1 & \longrightarrow & N_1 = 2N_0 & \longrightarrow 2^1 N_0 \\ t_2 & \longrightarrow & N_2 = 2 \times 2 \times N_0 & \longrightarrow 2^2 N_0 \\ t_3 & \longrightarrow & N_3 = 2 \times 2 \times 2 \times N_0 & \longrightarrow 2^3 N_0 \\ t_4 & \longrightarrow & N_4 = 2 \times 2 \times 2 \times 2 \times N_0 & \longrightarrow 2^4 N_0 \\ \vdots & & & \\ \vdots & & & \\ t_n & \longrightarrow & N_n = \underbrace{2 \times 2 \times 2 \times 2 \times \dots}_{n \text{ fois}} N_0 & \longrightarrow 2^n N_0 \end{array}$$

(n = nombre divisions et N_0 = nombre de bactéries à t_0)

$$N = 2^n N_0 \text{ (avec } \mu = n/t \text{ et } n = \mu t) \text{ donc } N = 2^{\mu t} N_0$$

⑤ Représentation graphique de la Courbe de croissance

La croissance bactérienne est représentée par un graphe :

$$N = f(t) \quad \text{ou} \quad DO = f(t) \quad \text{ou autres}$$

☞ *Représentation arithmétique:* $N = f(t)$

A t_0 correspond N_0 (ordre 10^5 à 10^6)

A t_1 correspond $N_1 = 2N_0$ ($2 \cdot 10^5$ à $2 \cdot 10^6$) avec $t_1 - t_0 = G$

A t_2 correspond $N_2 = 4N_0$ ($4 \cdot 10^5$ à $4 \cdot 10^6$) avec $t_2 - t_1 = G$

Courbe:

Nombre élevés posent un problème pour une échelle arithmétique

Expression logarithmique

$$N = 2^n N_0 \text{ (avec } \mu = n/t \text{ et } n = \mu t) \text{ donc } N = 2^{\mu t} N_0$$



$$\log N = \log 2^n N_0 \Rightarrow (n = \mu t) \Rightarrow \log N = \log 2^{\mu t} N_0$$

$$\Rightarrow \log N = \log 2^{\mu t} + \log N_0 \Rightarrow \log N = \boxed{\mu} \boxed{t} \boxed{\log 2} + \boxed{\log N_0}$$

$$y = a x + b \quad \leftarrow \text{Équation d'une droite} \quad \leftarrow \text{Constante}$$



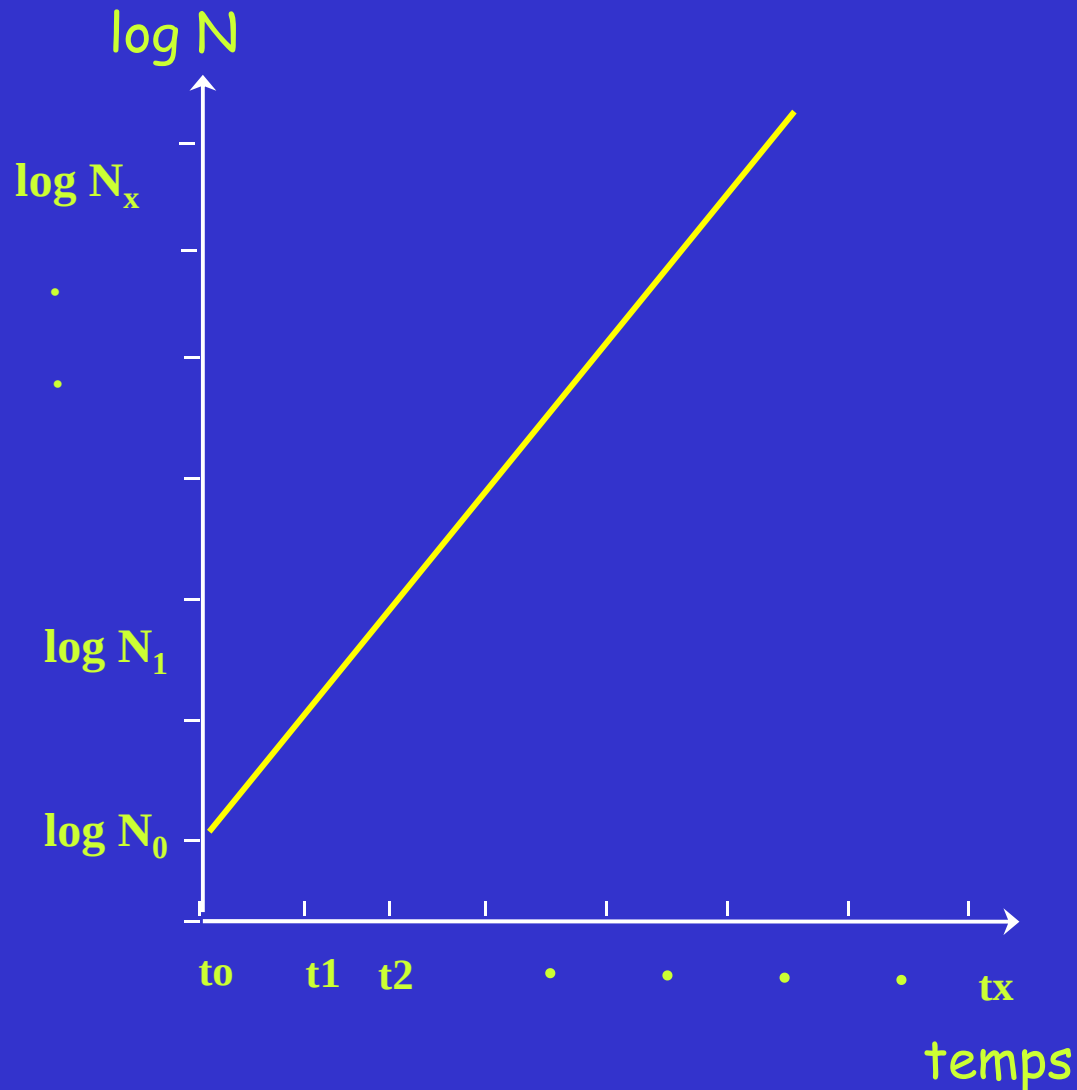
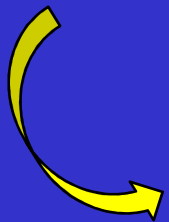
$$\text{Pente de la droite: } P = a = \mu \log 2 \Rightarrow \mu = P / \log 2$$

$$\mu = \frac{\log N - \log N_0}{t \log 2}$$

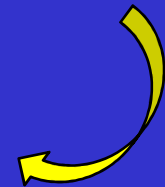
👉 Représentation logarithmique

Courbe: $\log N = f(\text{temps})$

Echelle
logarithmique



Echelle
arithmétique

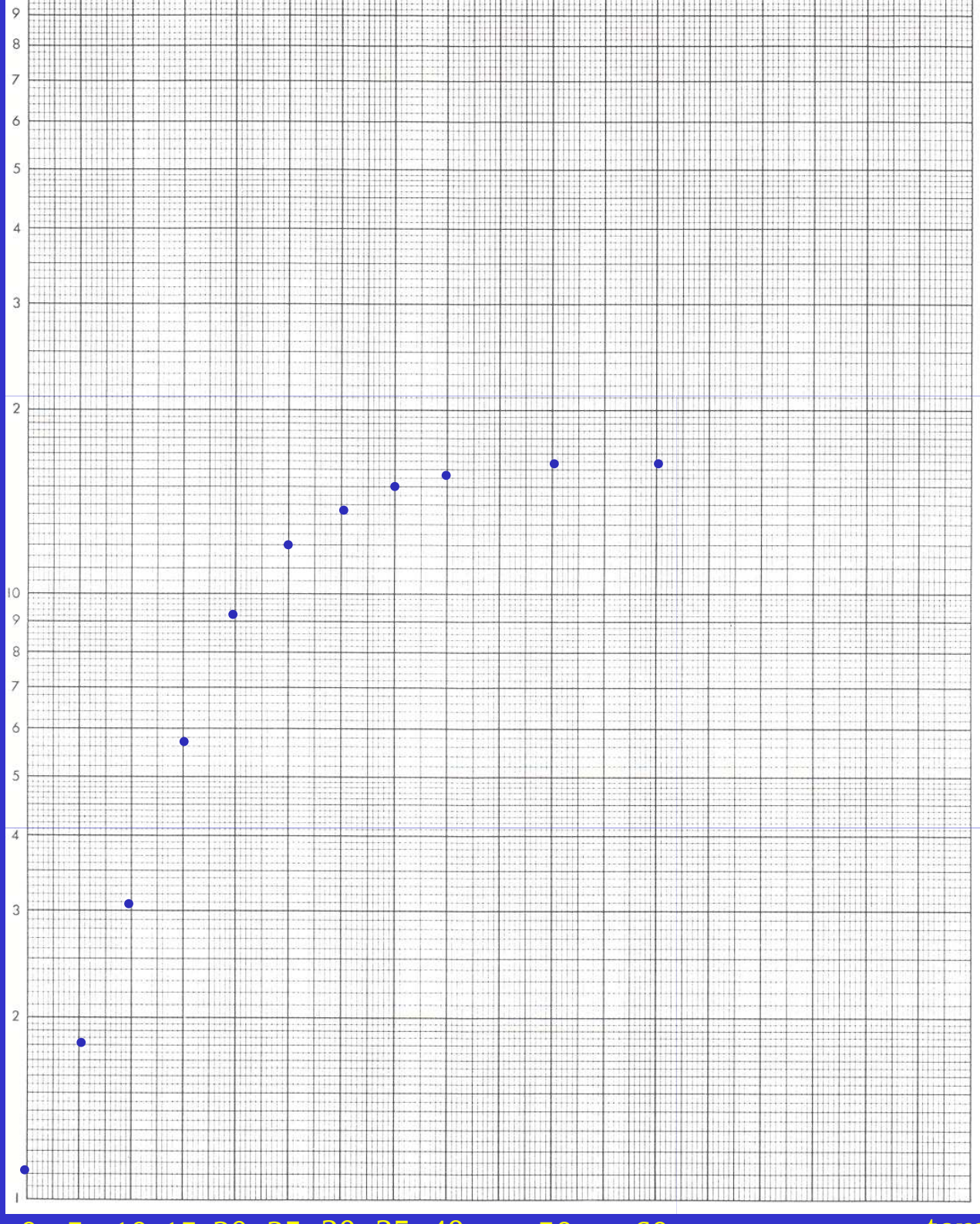


⊗ Tracer la courbe sur un papier semi-logarithmique

Log N
↑

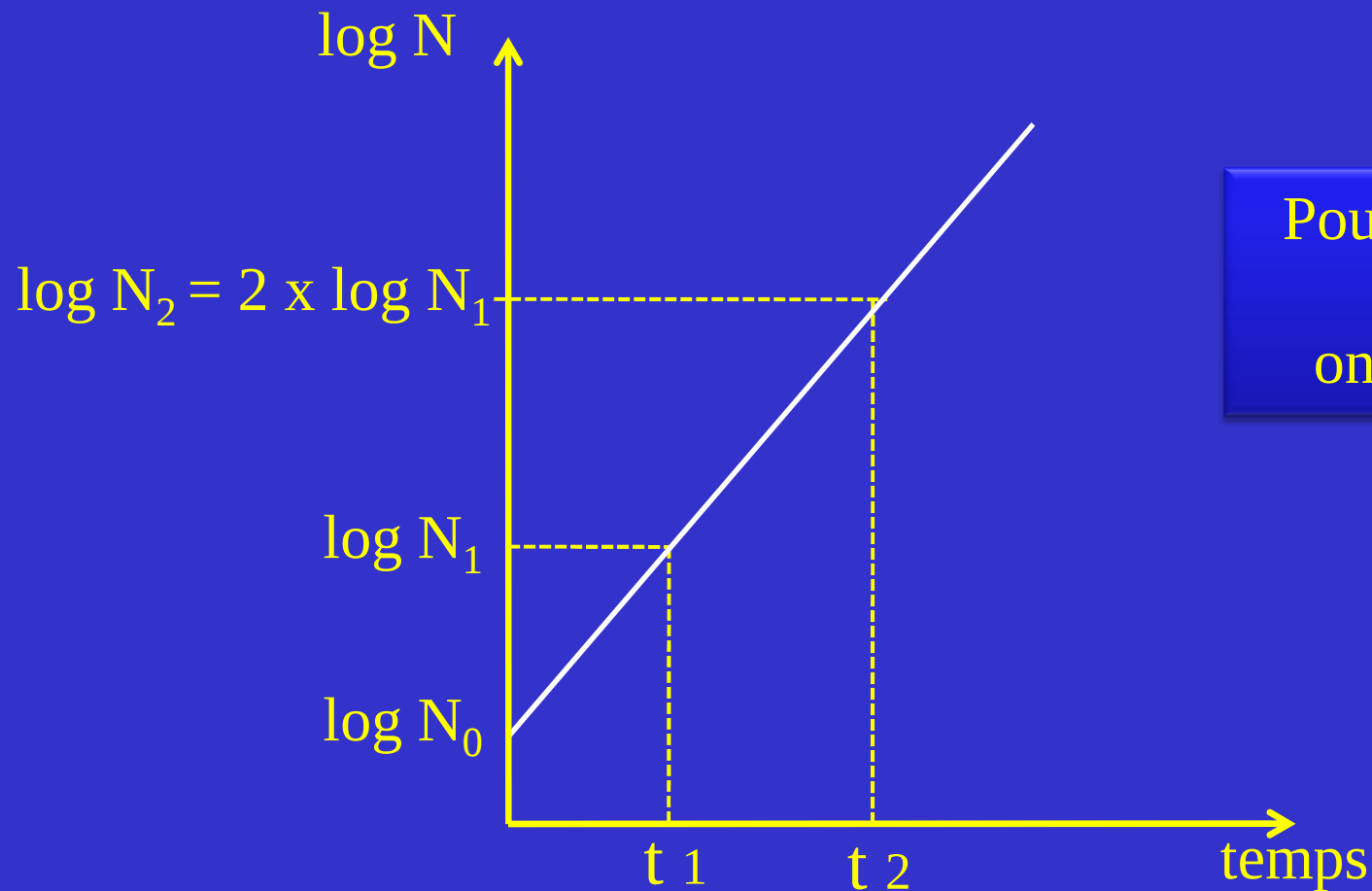
Log 10⁹

Log 10⁸



Temps en heure (H)	Nombre bactéries/ml
0	1,1 10 ⁸
5	1,8 10 ⁸
10	3,1 10 ⁸
15	5,4 10 ⁸
20	9,2 10 ⁸
25	1,2 10 ⁹
30	1,4 10 ⁹
35	1,55 10 ⁹
40	1,6 10 ⁹
50	1,65 10 ⁹
60	1,65 10 ⁹

⑥ Détermination théorique des paramètres



Pour G, prendre $N_2 = 2 N_1$
on a alors $G = t_2 - t_1$

Pour calculer μ :

$\mu =$

$$\frac{\log N_2 - \log N_1}{(t_2 - t_1) \log 2}$$

Ou

$$\mu = 1/G$$

Eviter de prendre en considération le N_0 .

* *La croissance n'est pas toujours exponentielle.*

Justification:

E. coli, à 37°C, G est de 20 min

$$\mu = 1/G = 1/20 = 0,05 \text{ div / min} = 3 \text{ div / heure}$$

Après 48 heures de croissance exponentielle et si on part au to d'une seule bactérie ($N_0 = 1$):

$$\text{Log } N = \mu t \log 2 + \log N_0 \quad \text{Log } N = 3 \times 48 \times 0,301 = 43,344$$

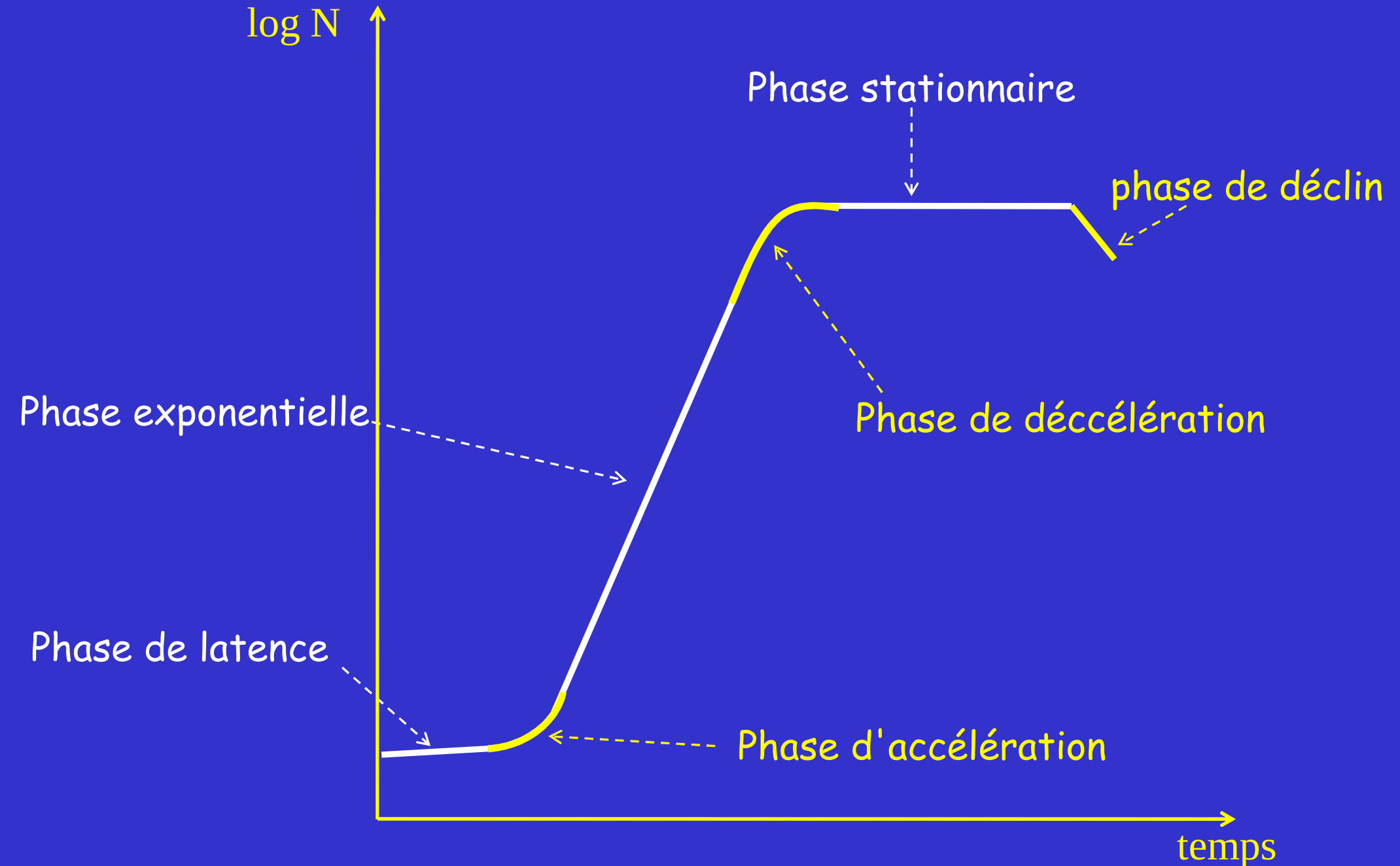
Le nombre de bactéries est: $N = 2,2 \cdot 10^{43}$ bactéries.

Le poids 1 bactérie = $1,5 \cdot 10^{-12}$ g

la masse bactérienne = $3,3 \cdot 10^{31}$ g soit $3,3 \cdot 10^{25}$ tonnes

(poids de la terre = $5 \cdot 10^{21}$ tonnes)

⑦ Les phases de croissance



La phase de latence

- Pas de croissance, $N_0 = \text{Constant}$ et donc : $\mu = 0$

Causes:

- L'âge des bactéries
- La composition du milieu de culture

La phase d'accélération

- Début de croissance, le nombre bactérien augmente $\mu > 0$

Causes:

début d'adaptation des bactéries au milieu

La phase exponentielle

- C'est la phase physiologique idéale pour la croissance
- Le temps de génération **G est minimal**
- Le taux de croissance **$\mu > 0$, maximal et constant**
- Sur papier semi logarithmique: **phase exponentielle = droite**
(relation proportionnelle entre le log N et le temps).

$$\text{Log } N = \mu t \log 2 + \log N_0$$

(équation d'une droite: $Y = ax + b$)

- La phase exponentielle dure généralement quelques heures.

☞ *La phase de ralentissement*

- Taux de croissance μ diminue
- L'augmentation de N dans le temps est plus faible que durant la phase exponentielle,
- Le milieu devient moins favorable à la croissance.

☞ *La phase stationnaire*

- Il n'y a plus de croissance: $\mu = 0$
- Nombre de cellules viables est constant:

Equilibre entre cellules qui meurent et celles qui apparaissent ou même nombre de cellules viables sans division ni disparition.

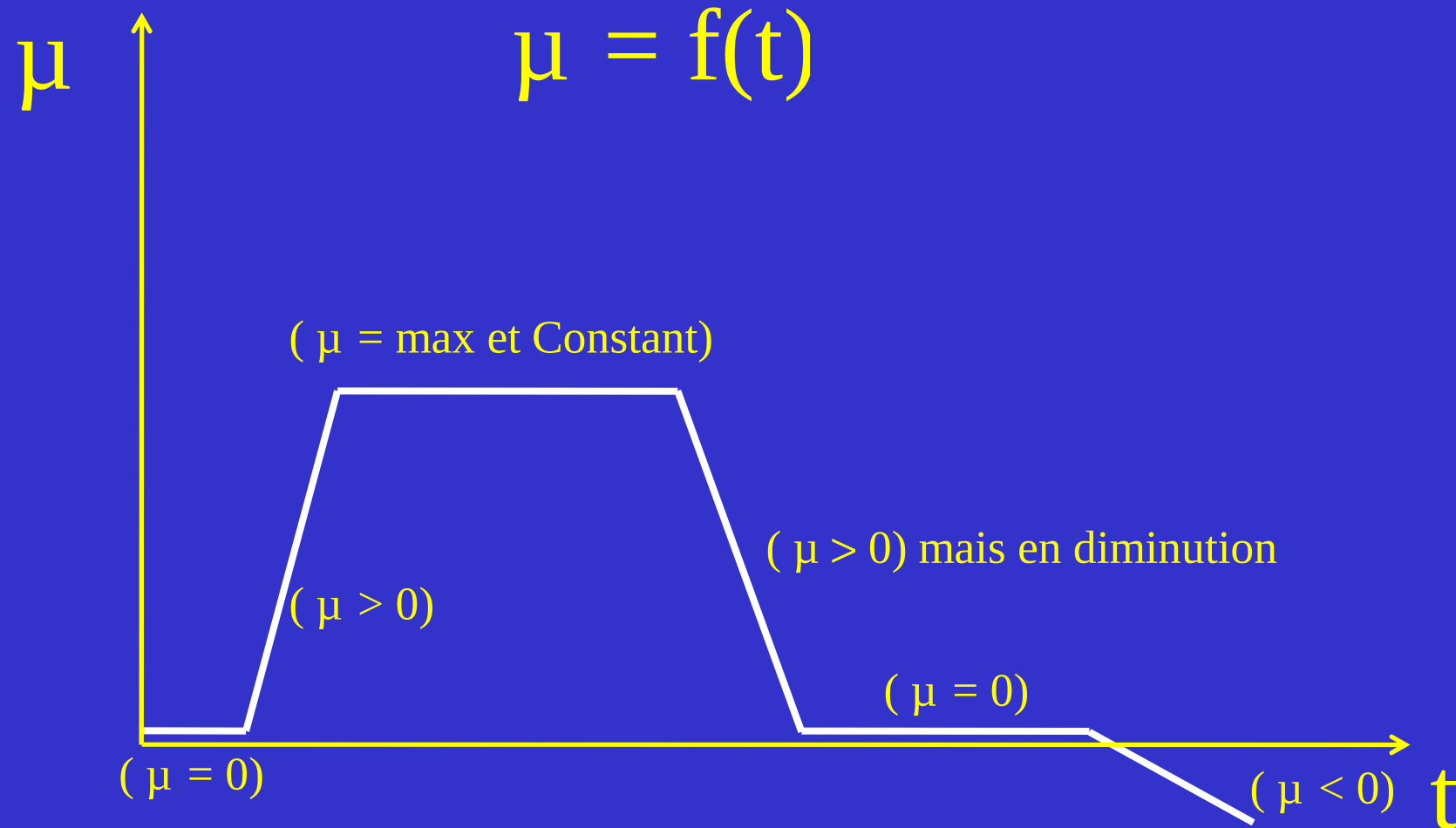
Causes:

- ✓ l'épuisement du milieu de culture,
- ✓ l'accumulation de métabolites toxiques,
- ✓ l'évolution défavorable des conditions physico-chimiques

La phase de déclin

- Le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$).
- Les bactéries ne se divisent plus, beaucoup meurent et certaines sont lysées
- Cette phase est visible ou pas selon la méthode d'étude:
nb bactéries viables (toujours) / turbidimétrie (si lyse)

⑧ Variation de μ pendant les phases de croissance

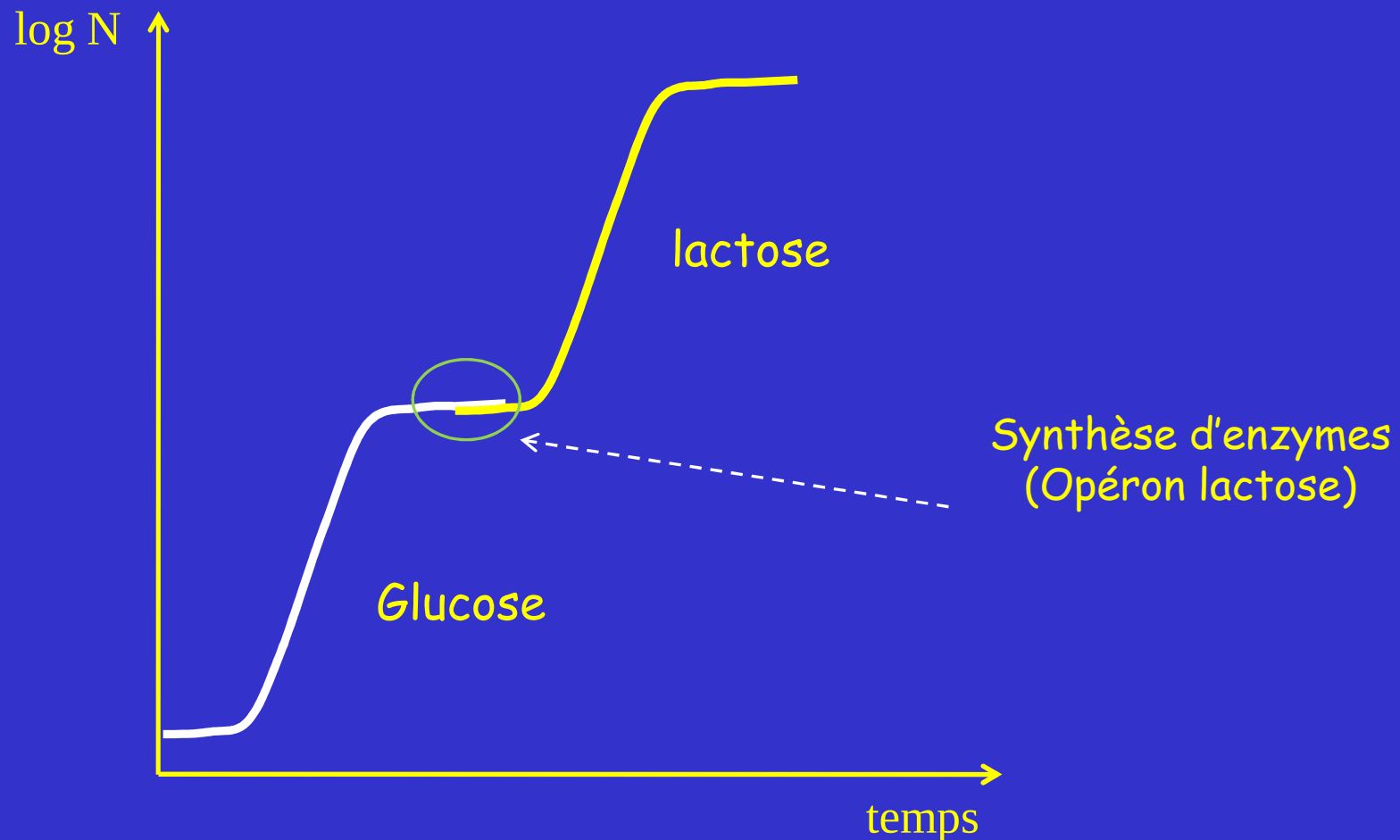


⑨ Cas particuliers de croissance

9.1. Cas de la diauxie

Croissance dans 1 milieu synthétique en présence de 2 substrats carbonés.

Exemple: croissance d'*E. coli* en présence de glucose et de lactose

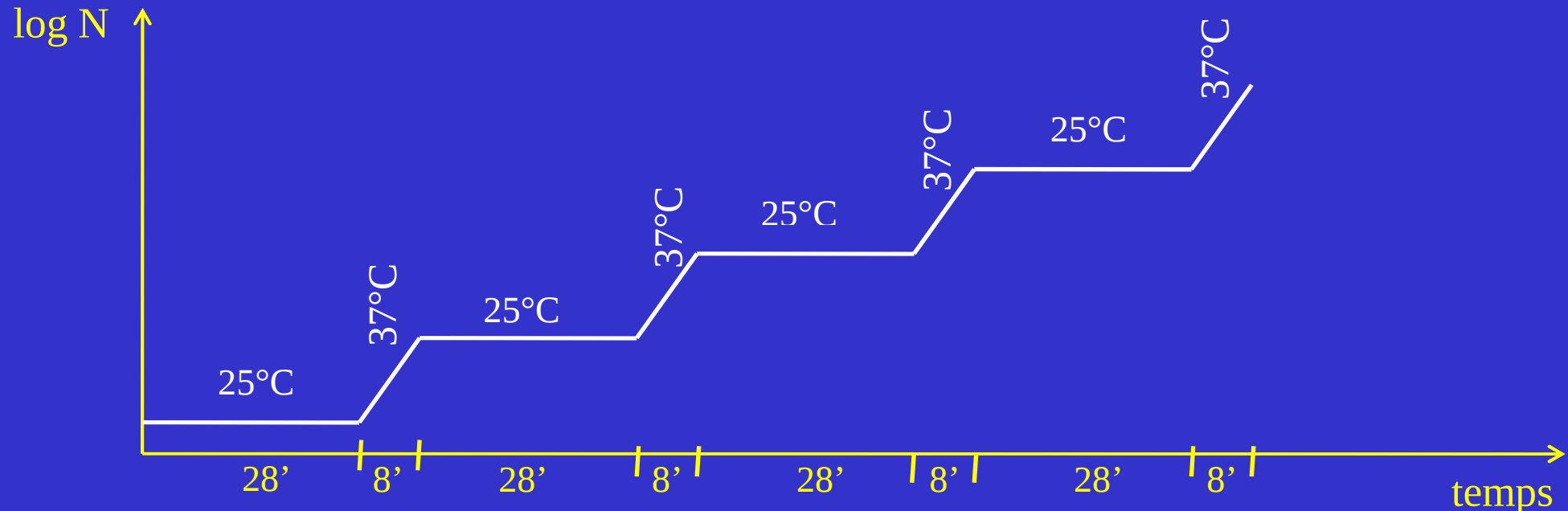


Courbe de croissance diphasique (diauxie)

9.2. Croissance synchrone

On peut amener les bactéries à se diviser au même moment, ce qui donnerait une croissance synchrone.

Par choc thermique chez *Salmonella typhimurium* : les bactéries sont incubées alternativement à une température de 25°C pendant 28 min, puis à 37°C pendant 8 min



La courbe montre une série de paliers successifs correspondant chacun à un doublement

9.3. Croissance continue

Dans les conditions habituelles de croissance, la phase exponentielle ne peut durer que quelques heures.

Expérimentalement, on peut maintenir une culture en croissance exponentielle pendant plusieurs heures voir plusieurs jours.

Pour cela, il faut renouveler constamment le milieu de culture tout en éliminant les produits résultant du métabolisme cellulaire.

C'est le principe des fermenteurs industriels.

Fermenteur de laboratoire

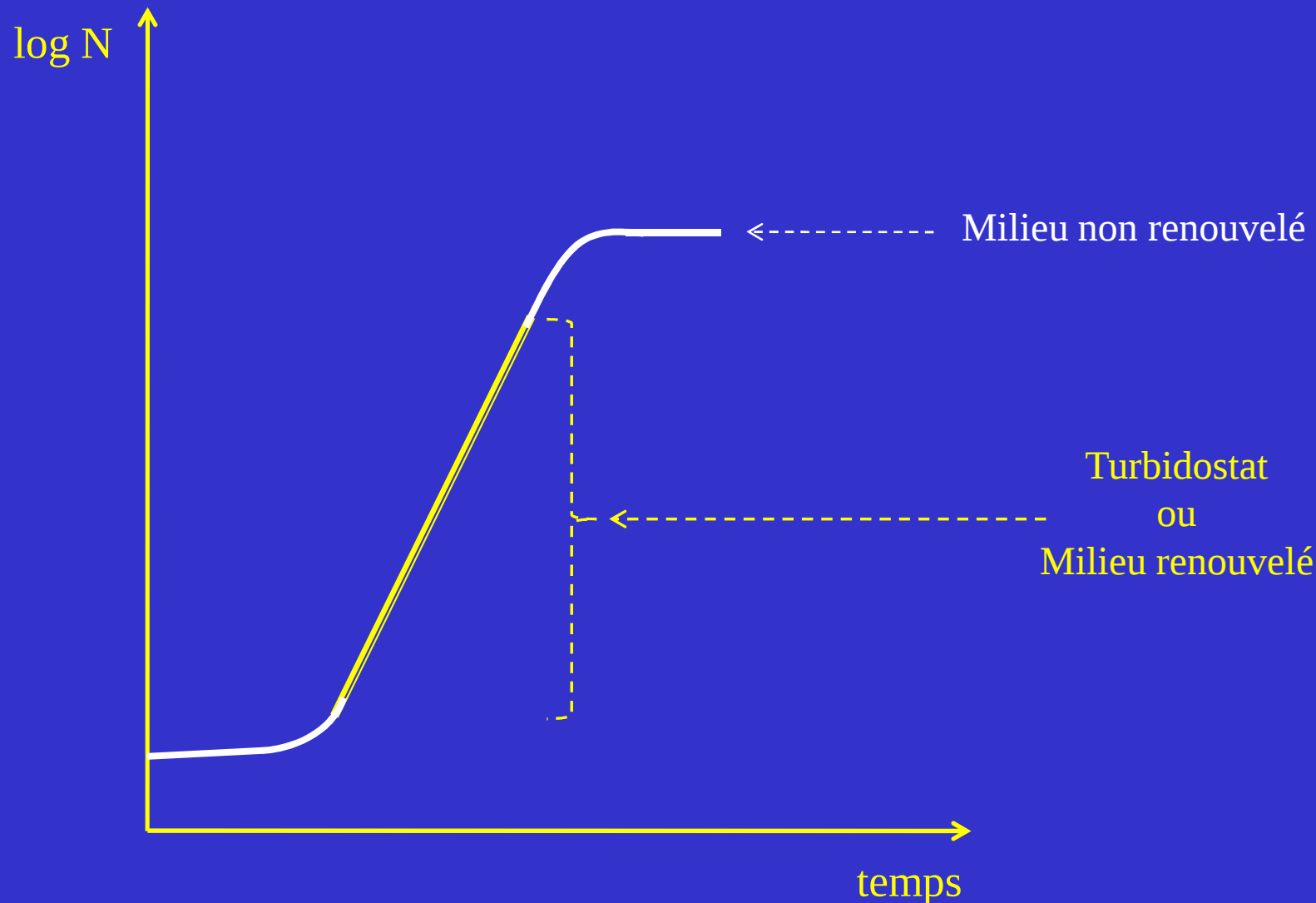


Fermenteurs industriels



μ : taux de croissance maximal et N : population constante

N est choisi en phase exponentielle et μ est maintenu constant par renouvellement du milieu



NB. régulation du taux de dilution qui doit être égal au taux de croissance

10. Facteurs influençant la croissance bactérienne

- ✓ Composition du milieu de culture
- ✓ Facteurs physico-chimiques: pH, température, oxygène
- ✓ Agents antimicrobiens: les antibiotiques

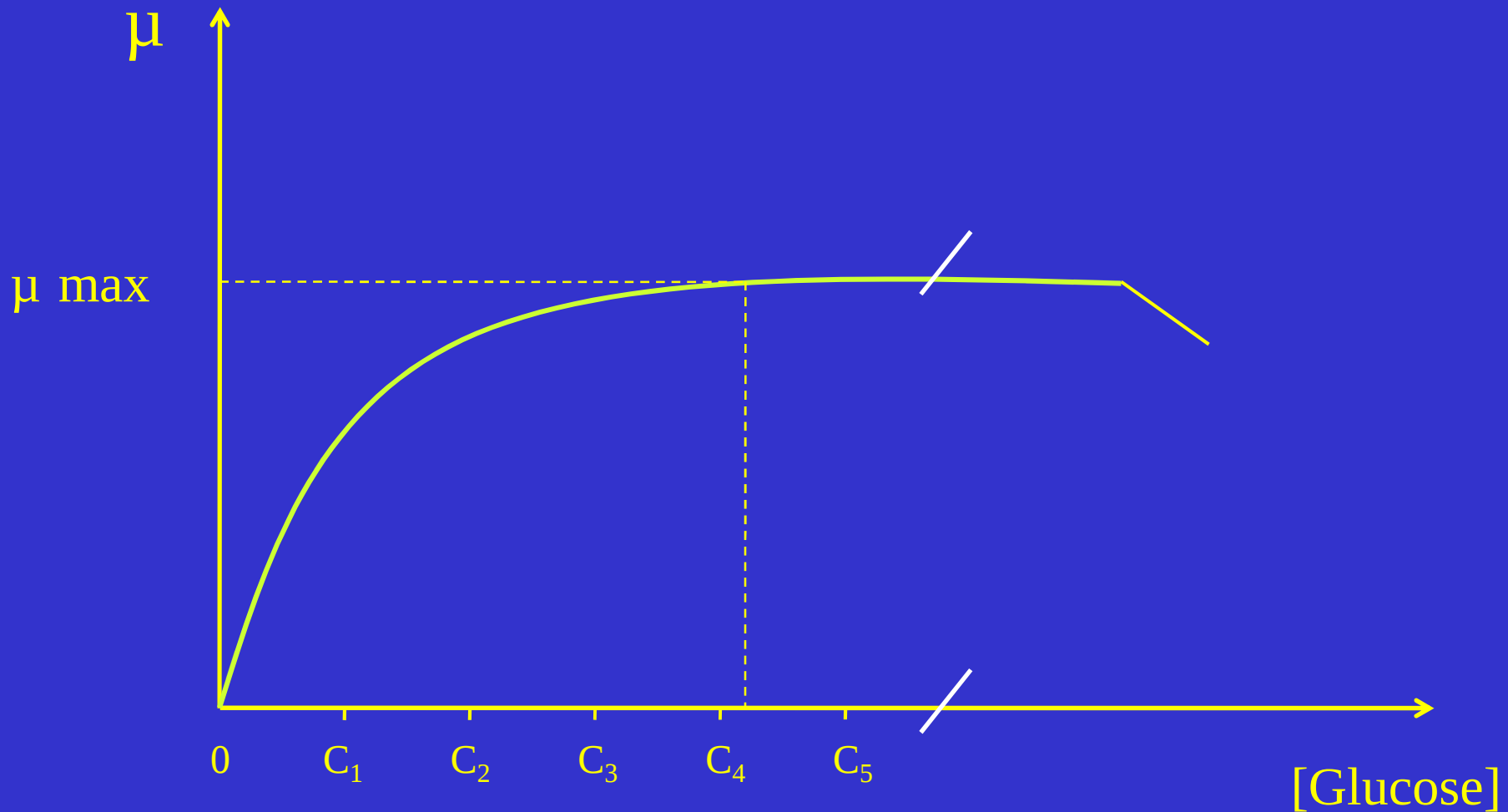
10.1. Composition du milieu de culture

Le taux de croissance d'une bactérie dépend du milieu de culture:

Ex. Bacillus subtilis: $\mu = 0,3$ div/h sur milieu synthétique
 $\mu = 3$ div/h sur bouillon nutritif.

Cas de l'effet de la concentration du substrat carboné

chez *E. coli*, μ augmente proportionnellement à la quantité de glucose jusqu'à une valeur à partir de laquelle il est inutile d'augmenter la concentration du glucose (C optimale).



NB: Un substrat fourni en concentration trop élevée peut avoir un effet bactériostatique (arrêt de croissance) ou bactéricide (mort des bactéries).

Substrat/rendement

En phase stationnaire, la biomasse cellulaire est directement proportionnelle à la concentration de la source de carbone.

Cette biomasse détermine le rendement:

$$R = \frac{X - X_0}{C} \times 100$$

avec: X_0 = P.S. des bact. à t_0 (en g)
 X = P.S. des bact. phase stat.
 C = Quantité substrat consommé

A la concentration optimale, le taux de croissance est optimal mais le rendement peut continuer à augmenter

10.2. Facteurs physico-chimiques:

➡ Effet du pH sur la croissance

La majorité des bactéries prolifèrent en milieux neutres ou légèrement alcalins. (tampons /exp: K_2HPO_4 et KH_2PO_4).

Il existe des bactéries présentant des tolérances particulières au pH:

Certaines exigent des **pH bas**: on parle de bactéries **acidophiles**
cas de *Thiobacillus thiooxydans* qui a un pH optimal de l'ordre de 2

Inversement, les bactéries qui exigent un **pH élevé** sont dites des **basophiles** exp: *Vibrio* a un pH optimal de 9

Les bactéries ne se développant qu'au voisinage de la neutralité sont dites **neutrophiles**.

➡ Effet de la température sur la croissance

Les limites de température entre lesquelles les organismes vivants peuvent croître sont:

- 5°C : point de congélation de l'eau dans les cellules vivantes
- + 80°C : thermolabilité des protéines et des acides nucléiques

Selon la température optimale de développement, on distingue:

Types	T° min	T° opt	T° max
Psychrophiles	-15°C	+ 10°C	+ 20°C
Mésophiles	5 à 10°C	30 à 37°C	40 à 43°C
Thermophiles	40°C	42 à 55°C	60 à 80°C

A 37°C: G de *E. coli* est de 20 mn, A 42°C: G devient 50 mn

➡ Effet de la pression osmotique sur la croissance

La bactérie accumule dans le cytoplasme une concentration élevée en substrats



$$PO_{\text{int}} > PO_{\text{ext}}$$

Si forte augmentation de l'osmolarité du milieu extracellulaire

➡ risque d'efflux d'eau ➡ plasmolyse



inhibition de processus vitaux: biosynthèse de macromolécules, réplication de l'ADN etc... : arrêt de croissance,

pour éviter cela, la bactérie doit ajuster sa pression osmotique interne à une valeur supérieure à celle du milieu externe,

C'est l'osmorégulation: accumulation de K^+ , d'acides aminés, sucres etc...

Selon ce pouvoir d'osmorégulation, on distingue 4 groupes de bactéries

Groupe	Exemple	[NaCl] tolérée
Non Halophiles	<i>E. coli</i>	0 à 4 %
Halophiles	<i>Pseudomonas marina</i>	0,2 à 5 %
Halophiles modérés	<i>Pediococcus halophilus</i>	2,3 à 20,5 %
Halophiles extrêmes	<i>Halobacterium</i>	5 à 36 %

10.3. Agents antimicrobiens:

Agents chimiothérapeutiques:

Au sens strict:

Agent antimicrobien, produit par des microorganisme, tue ou inhibe d'autres microorganismes.

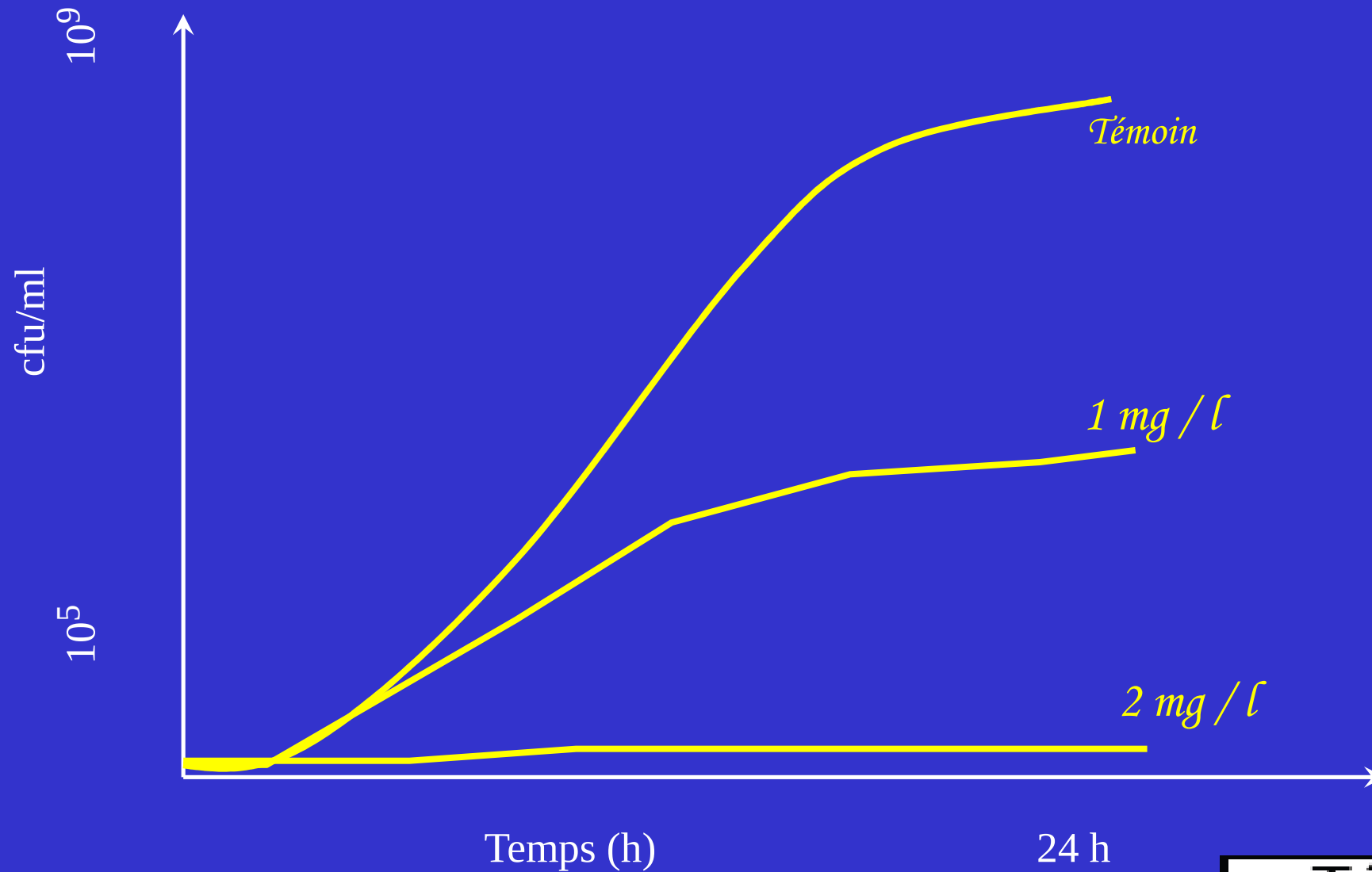
Au sens large:

Toute molécule de faible PM d'origine naturelle (*les antibiotiques*), synthétique ou hémisynthétique (*les sulfamides*) pouvant avoir un effet létal (bactéricide) ou statique (bactériostatique).

La toxicité est sélective

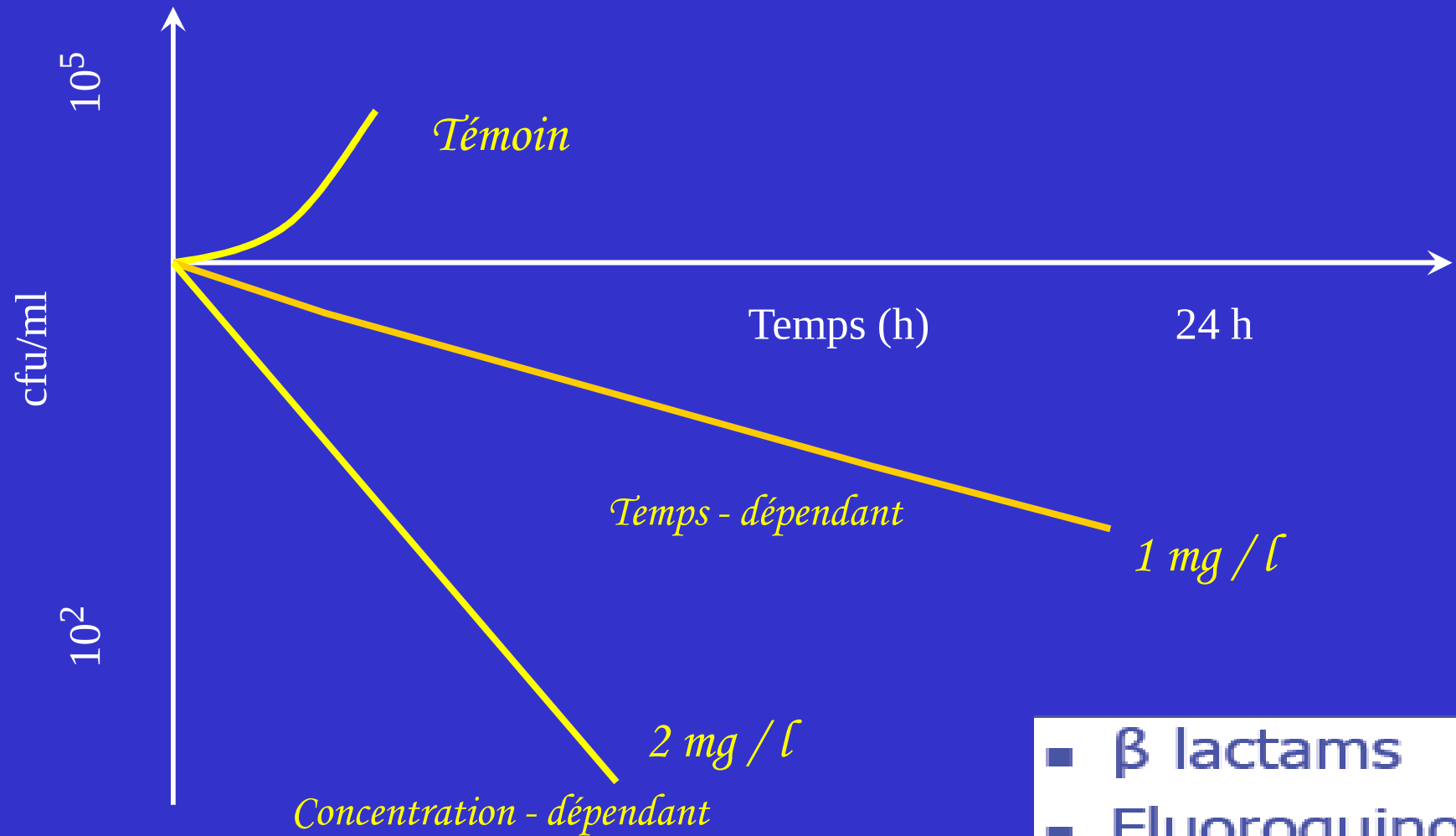
Modalité d'action:

Bactériostatique
inhibe la croissance



- Tétracycline
- Chloramphénicol
- Linezolide

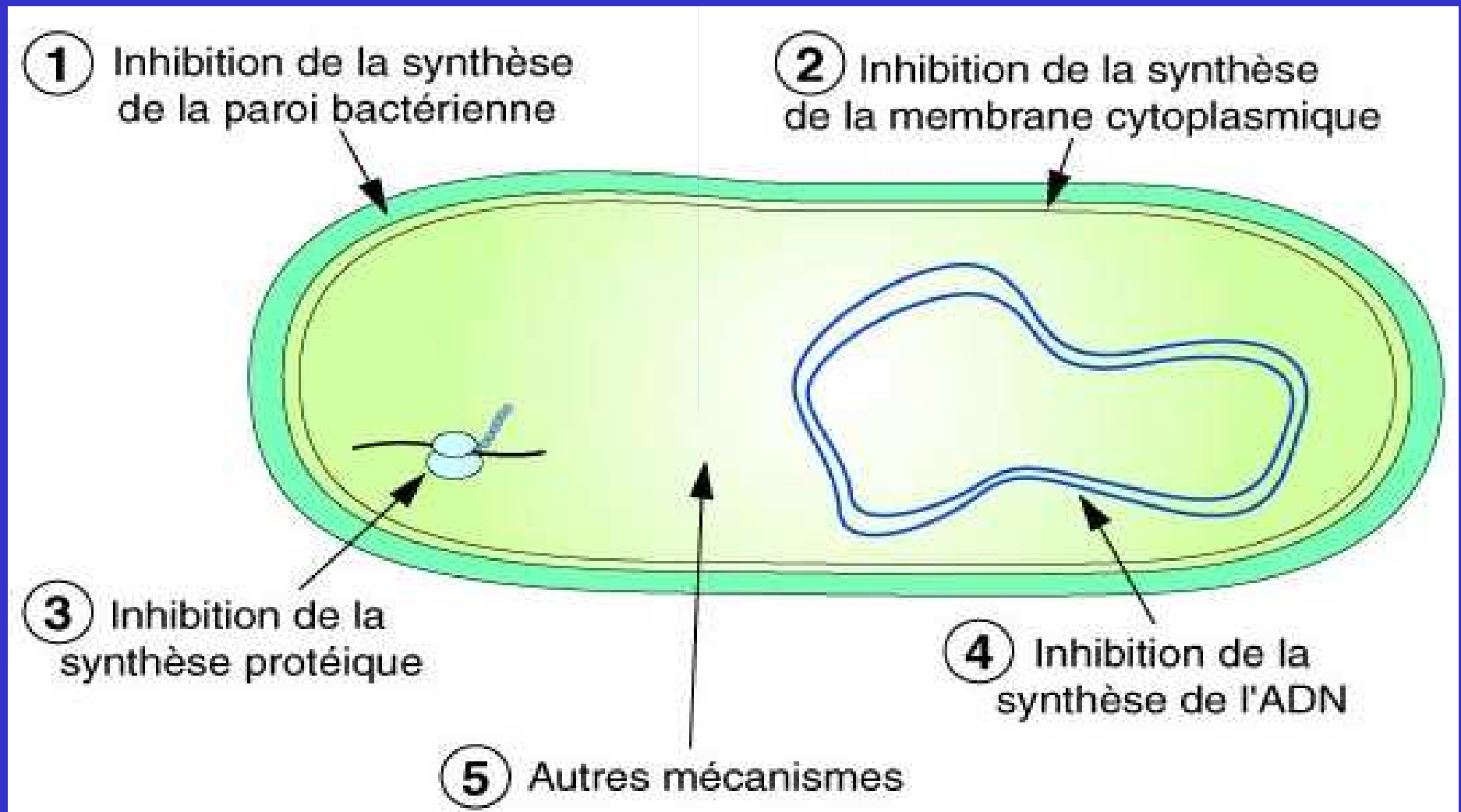
Bactéricide tue les bactéries



- β lactams
- Fluoroquinolones
- Aminoglycosides
- Vancomycine

Mode d'action

- ✓ Action sur la synthèse de la paroi
- ✓ Action sur la membrane cytoplasmique
- ✓ Action sur la synthèse des protéiques
- ✓ Action sur les acides nucléiques



Action sur la synthèse de la paroi:

Ex. la Pénicilline = analogue structural du dipeptide D-alanine, il empêche son incorporation dans le chaînon peptidique.

Il y a multiplication mais éclatement cellulaire par suite de l'absence de la paroi.

Action pendant la phase active de croissance: Effet bactéricide

Action sur la membrane cytoplasmique:

Ex. la polymixine = Antibiotique de nature polypeptidique qui altèrent la membrane plasmique en y formant des pores qui seront à l'origine de perturbation des échanges membranaires.

Action pendant et en dehors de la croissance. Effet bactéricide

Action sur la synthèse des protéines:

Les antibiotiques agissent sur les ribosomes pour empêcher la lecture du code ou la fausser.

Ex. 1: L'erythromycine se fixe au niveau de l'unité 50 S du ribosome

Elle empêche la fixation du complexe acides aminés-ARNt,

⇒ inhibition de la synthèse protéique.

Action pendant la phase active de croissance. Effet bactériostatique

Ex. 2: La streptomycine se fixe au niveau de l'unité 30 S du ribosome

Il y a des erreurs de lecture du code génétique et l'incorporation d'acides aminés ne correspondant pas à l'information des ARNm,

Il y a synthèse de protéines non sens (*léthales*).

Action pendant la phase active de croissance. Effet bactéricide

Action sur les acides nucléiques

Action sur l'ADN:

Ex. la mitomycine forme des ponts entre les hélices de l'ADN

Elle empêche la réplication par la polymérase et bloque la croissance

Action pendant la phase active de croissance. Effet bactériostatique

Action sur l'ARN:

Ex. l'actinomycine bloque l'ARN polymérase

Taxonomie bactérienne

Principe

- ✓ tout individu appartient à une espèce,
- ✓ les espèces proches sont groupées en un genre,
- ✓ les genres rapprochés sont réunis en une famille,
- ✓ les familles présentant des similitudes forment un ordre,
- ✓ les ordres apparentés sont rangés en une classe,
- ✓ les classes semblables sont réunies en une division ou phylum.

Taxonomie = Systématique: science qui étudie la diversité des êtres vivants ainsi que les relations qui existent entre eux.

Elle consiste à:

- ➡ Caractériser les bactéries,
- ➡ Les classer sur la base de leur similitude, en groupes ou taxons (genres, espèces...),
- ➡ Appliquer le code international de la nomenclature bactérienne pour les nommer (Exp: *Escherichia coli*),
- ➡ Identifier de nouveaux organismes et déterminer leur appartenance ou non à l'une des espèces connues.

L'unité taxonomique = l'espèce

- Une espèce biologique est un ensemble d'individus qui présentent un haut degré de ressemblance phénotypique.

Chez les organismes supérieurs, la notion d'espèce est fondée sur l'interfécondité des individus: patrimoine héréditaire.

Or: bactéries = microorganismes haploïdes, se reproduisant par voie asexuée, généralement par division binaire.

Pour définir une espèce bactérienne les taxonomistes sont amenés à fixer une limite arbitraire de différences à partir de laquelle deux types doivent être classés en deux espèces différentes.

- LWOFF définit un **biotype**: "un groupe d'individus possédant le même patrimoine héréditaire et ont en commun la grande majorité de leurs caractères".
- Le biotype dérive du **clone** qui représente la population bactérienne issue d'une même et unique cellule qui s'est multipliée par divisions binaires.
- Cette population bactérienne issue d'un clone est appelée **souche bactérienne**. Les individus d'une souche sont en principe identiques sauf en cas de mutation.
- Une **espèce** regroupe les souches bactériennes présentant une grande similitude de caractères.

① *La taxonomie classique*

➤ Critères morphologiques et structuraux

Insuffisants mais ➡ un premier regroupement simple et pratique,
Cependant, certains caractères sont sujets à des variations:

Exp: les Gram+ âgés prennent l'aspect des Gram- (*Bacillus subtilis*)

➤ Critères biochimiques

✓ *Fermentation des glucides / exp la Fermentation du glucose (test Voges Prauskauer)*

✓ *Dégradation des protéines / exp Dégradation de la peptone*

✓ *Dégradation des lipides*

Cas particuliers: catalases (H_2O_2) et coagulases (plasma)

➤ Critères immunologiques

L'établissement de la carte antigénique = **sérotypage**.

Chaque sérotype étant un groupe de souches présentant une réaction avec un même anticorps ou un groupe d'anticorps.

Les souches du même sérotype peuvent appartenir à la même espèce

➤ Critères de lysotypie

La fixation des bactériophages est liée à des sites sur la paroi bactérienne.

Le site de fixation est une protéine **spécifique** d'un phage.

Si phage virulent: lyse bactérienne (cycle lytique).

Deux souches capables de fixer les mêmes phages et développant des cycles lytiques appartiennent au même **lysotype** et peuvent appartenir à la même espèce.

② *La taxonomie moléculaire*

Dans la taxonomie classique, l'étude des phénotypes ne donne qu'une information incomplète: les caractères morphologiques, biochimiques, sérologiques etc... ne traduisent qu'une faible proportion du génome.

C'est pourquoi une approche génétique est nécessaire en taxonomie bactérienne. Elle concerne la nature physico-chimique du génome bactérien.

- *Le %GC ou le coefficient de Chargaff*
- *L'analyse et séquençage des ARN ribosomaux*
- *L'hybridation ADN / ADN*

2.1. *Le GC% ou le coefficient de Chargaff*

La technique de Chargaff est basée sur l'évaluation quantitative des deux groupes de bases azotées (GC et AT) en spectrophotométrie à UV (260 nm).

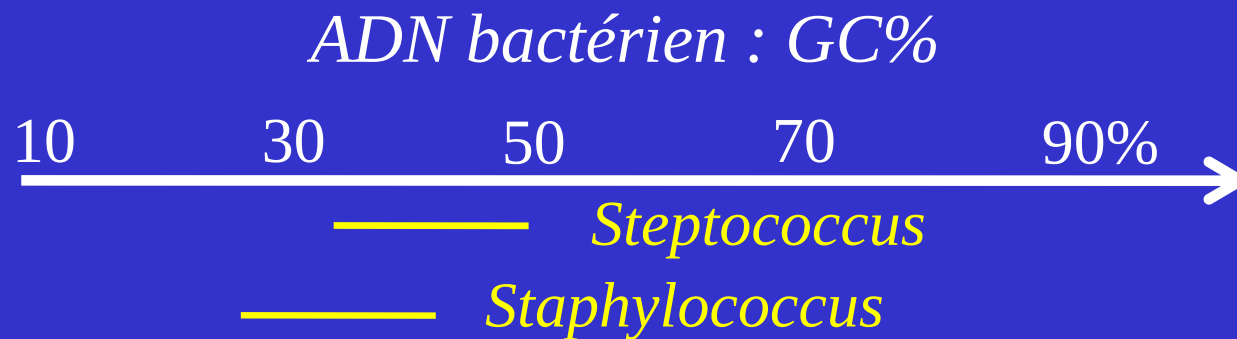
Le coefficient GC% = nombre de couples (guanine+cytosine) pour 100 couples de bases dans l'ADN de la bactérie étudiée.

Chez les bactéries, le GC% varie de 30 à 75 %

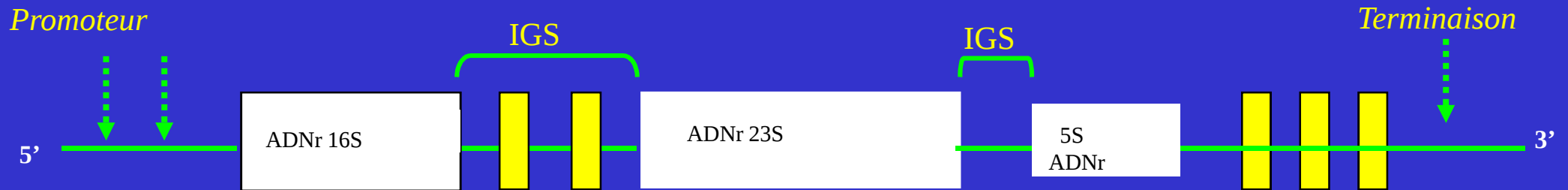
Pour que deux souches soient considérées comme appartenant à la même espèce, il faut que la différence entre les GC% de leur ADN soit inférieur à 5%.

Mais: si le %GC est une information importante en taxonomie, il comporte des limites:

Deux bactéries peuvent avoir le même %GC mais ne pas présenter les mêmes **séquences** nucléotidiques et être donc génétiquement très éloignées.



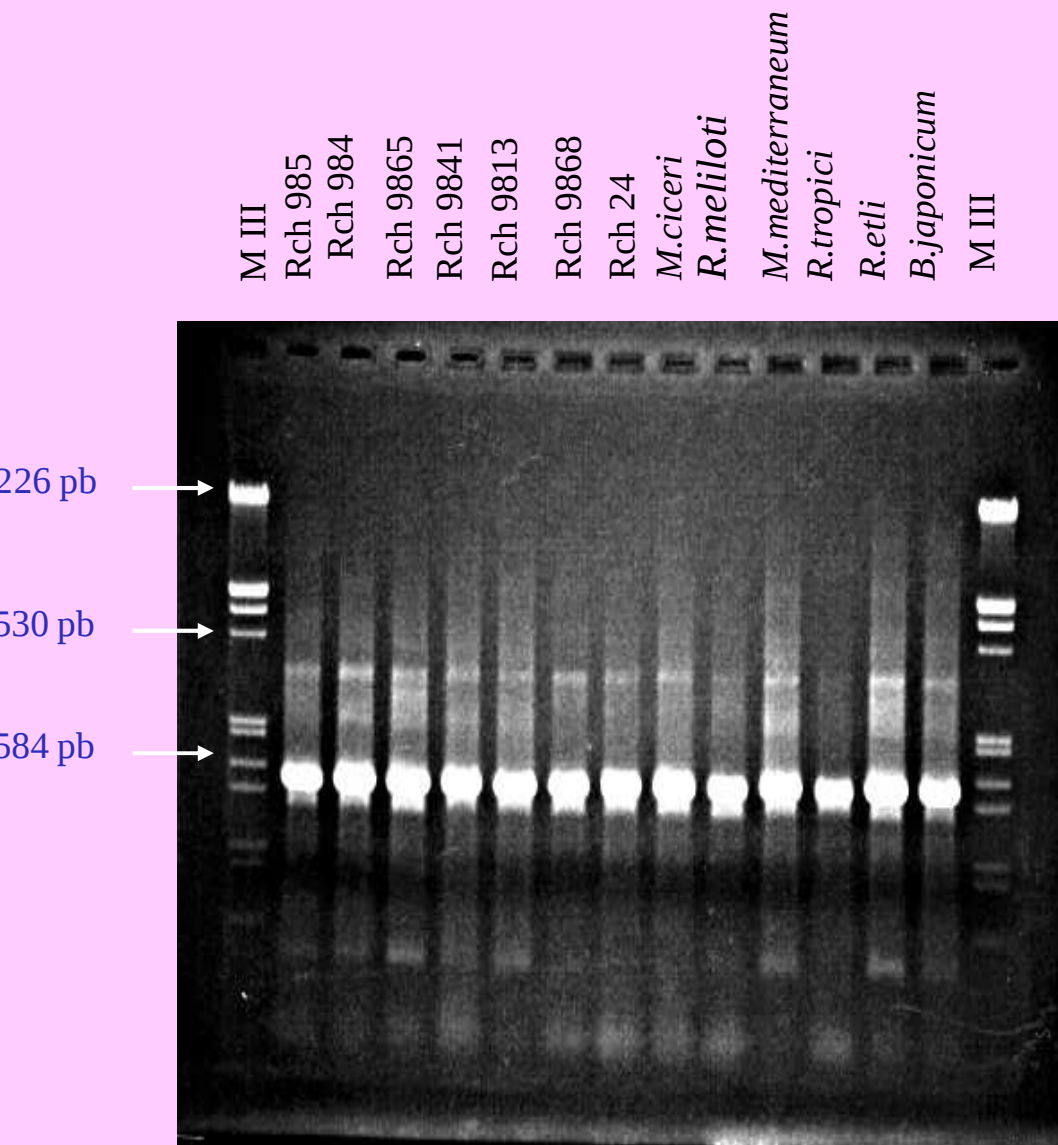
2.2. L'analyse des ADN ribosomaux



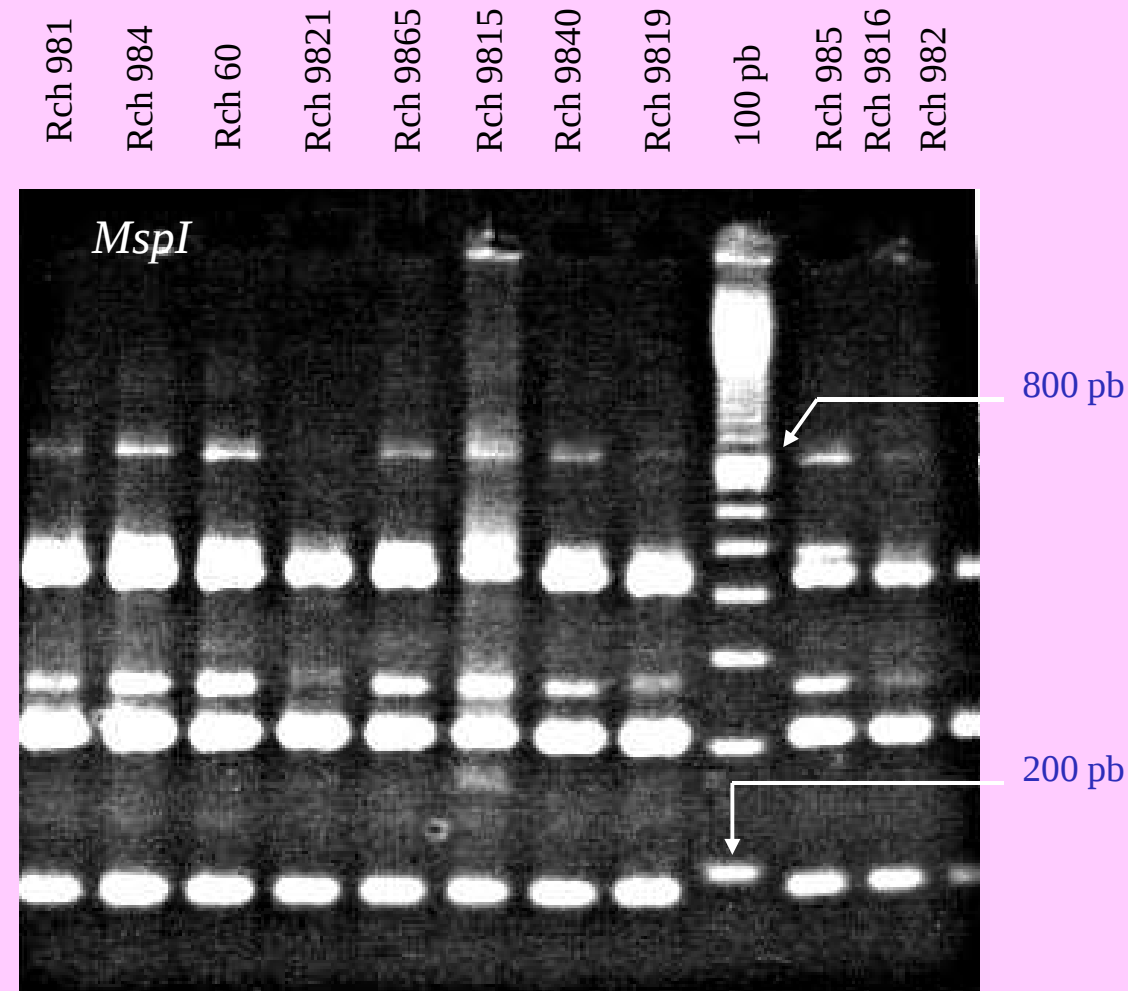
Outil phylogénétique répondant aux critères nécessaires à une étude évolutive, en particulier *la stabilité*

Analyse du gène rDNA-16S

- ✓ Amplification et analyse du polymorphisme des fragments de restriction: PCR/RFLP
- ✓ Séquençage total ou partiel



Electrophorèse sur gel polyachrylamide
du 16 S amplifié



Gel des profils de restriction
du 16 S par *MspI*

2.3. L'hybridation ADN/ADN

- ✓ Le chauffage d'un ADN bicaténaire donne deux brins homologues à séquences complémentaires: c'est la dénaturation.
- ✓ Un refroidissement entraîne un réappariement des deux brins d'ADN: c'est la renaturation *in vitro*.
- ✓ Si on mélange deux ADN dénaturés provenant de deux espèces bactériennes, l'ADN monobrin d'une espèce peut éventuellement se réassocier avec le monobrin issu de la deuxième bactérie pour former un ADN bicaténaire hybride: c'est l'hybridation.
- ✓ Ainsi, plus deux espèces sont proches génétiquement, c'est-à-dire plus leurs séquences de bases se ressemblent (degré d'homologie important) plus il est facile de former des ADN hybrides.
- ✓ Chez les *Enterobacteriaceae*, on considère que 2 souches sont de la même espèce si le taux d'hybridation ADN/ADN est de 70 à 100%.

③ *La taxonomie numérique*

- Pour construire une classification à l'aide des caractères phénotypiques et/ou moléculaires, le chercheur est amené à donner plus d'importance à certains d'entre eux. Cette conception est arbitraire et donc peu fiable.
- Pour s'y soustraire, Adonson (botaniste) a proposé d'affecter à tous les caractères le même poids. De ce fait on parle de taxonomie numérique ou adansonnienne (Adonson).
- **Principe:** Tous les caractères phénotypiques d'un organisme ont la même valeur.
- Les distances taxonomiques entre deux organismes sont exprimées par un ***coefficient de similitude*** calculé d'après le nombre de caractères partagés par rapport au nombre total de caractères examinés.

Exp programme: UPGMA

48 souches de rhizobium:
nodulant le pois-chiche

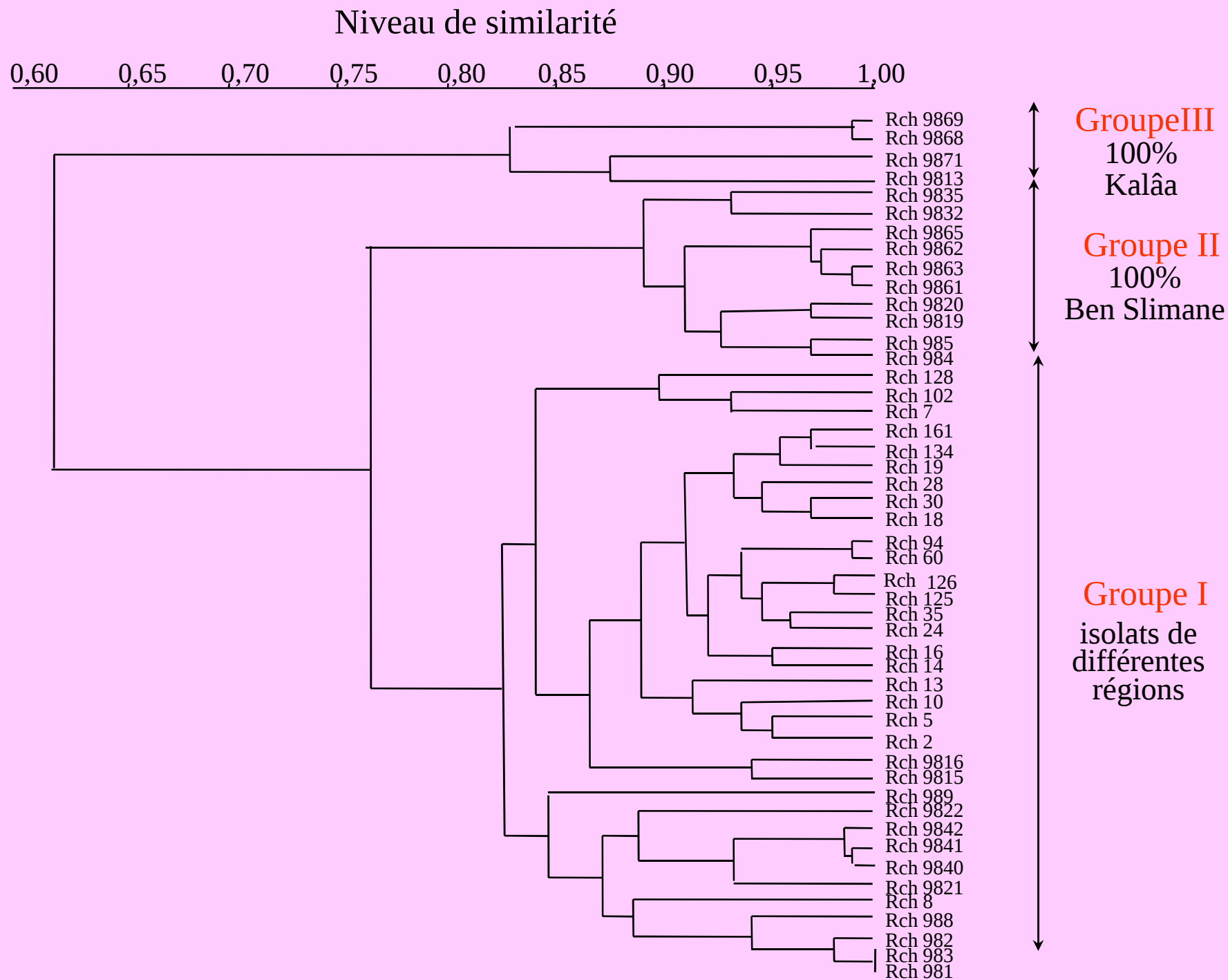


nodosités racinaires

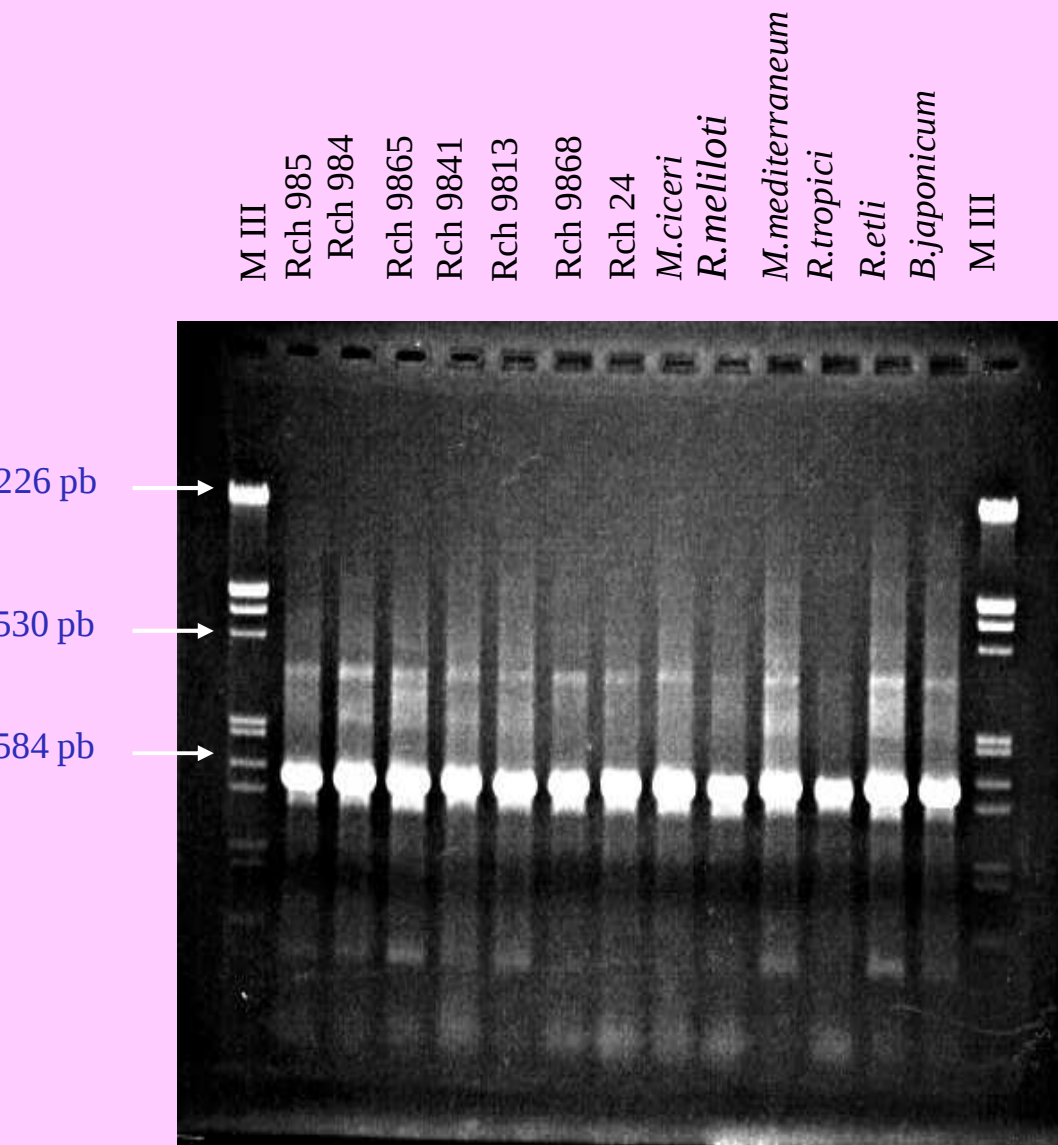
13 régions du Maroc

≠ étages bioclimatiques

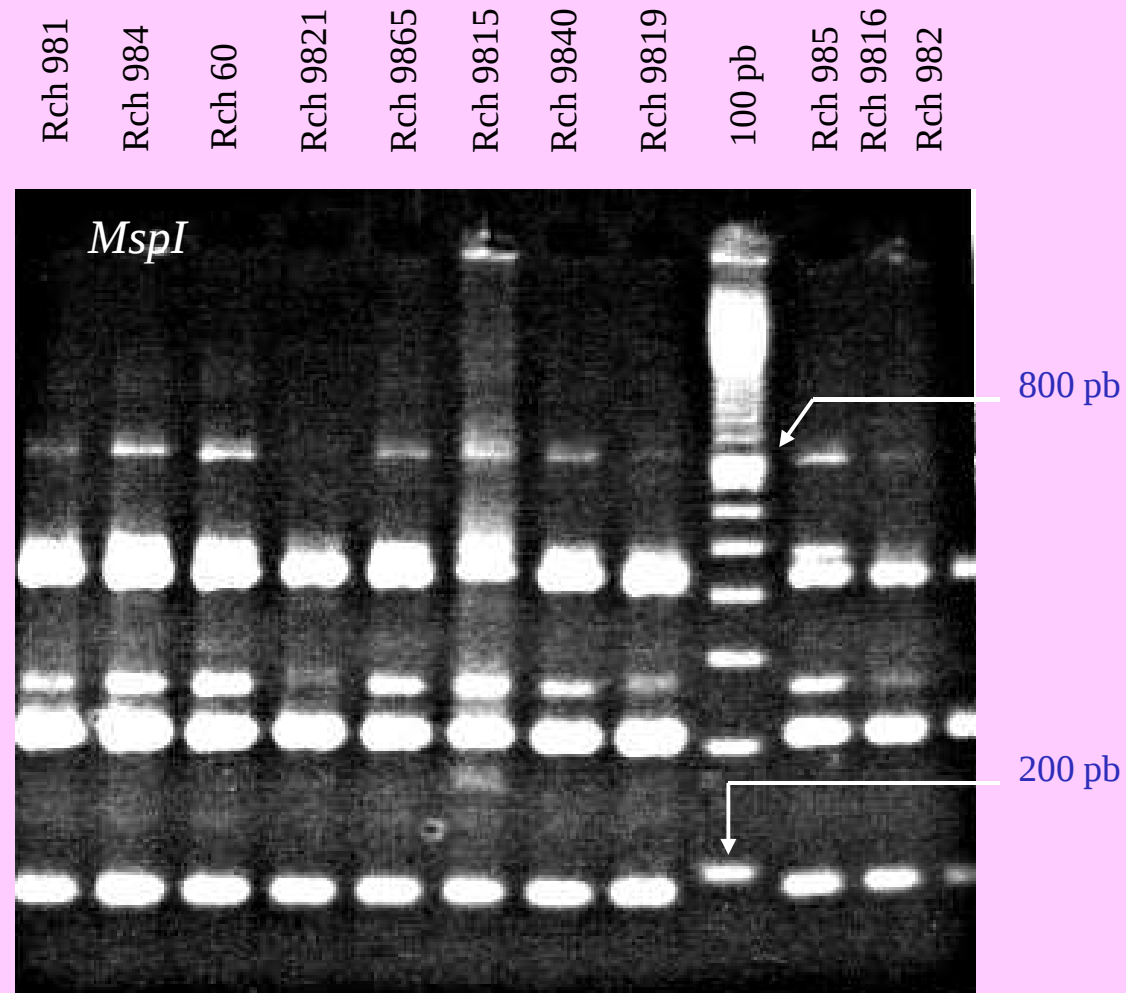
- ▶ Performance symbiotique (nodulation et fixation d'azote)
- ▶ Croissance sur milieu YEM (taux de croissance)
- ▶ Tolérance à la salinité▶ (NaCl, KCl, CaCl₂, Na₂SO₄, K₂SO₄, CaSO₄)
- ▶ Tolérance aux pHs▶ (de 4 à 9,5)
- ▶ Tolérance à la température ..▶ (de 5 à 45°C)
- ▶ Résistance intrinsèque : antibiotiques, métaux lourds
- ▶ Assimilation de 49 carbohydrates
- ▶ Analyse numérique : ..▶ UPGMA



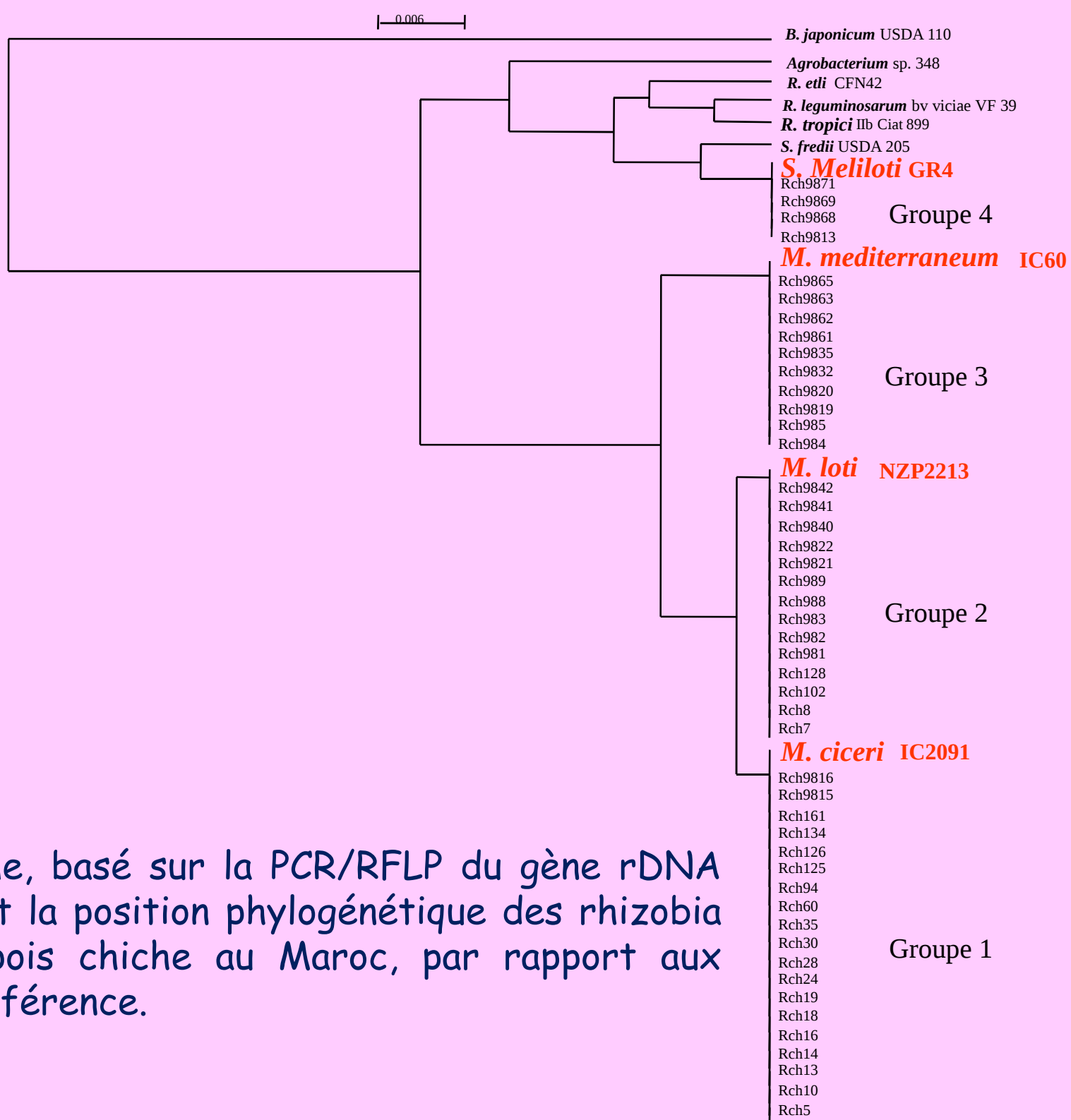
Phénogramme représentant la similarité phénotypique entre les rhizobia du pois chiche de différentes régions du Maroc.



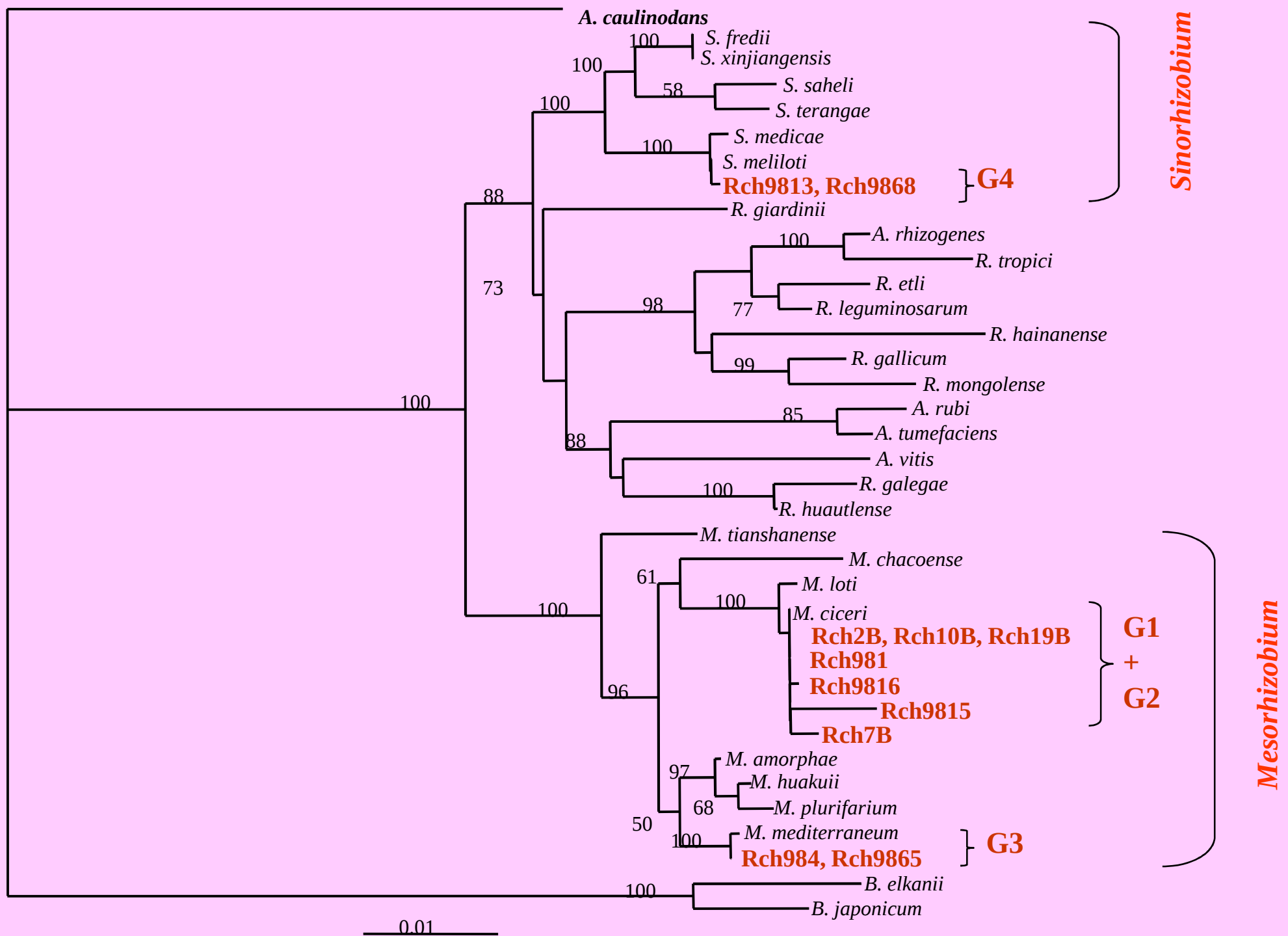
Gel polyachrylamide
du 16 S amplifié



Gel des profils de restriction
du 16 S par *MspI*



Dendrogramme, basé sur la PCR/RFLP du gène rDNA 16S, montrant la position phylogénétique des rhizobia nodulant le pois chiche au Maroc, par rapport aux souches de référence.



Arbre phylogénétique basé sur le séquençage des rDNA-16

<i>Groupes et souches</i>	<i>Espèces de référence</i>	<i>Taux de similitude</i>	<i>Nombre de bases différentes</i>
G 1: Rch 9816, 2, 10, 19 Rch 9815	<i>M. ciceri</i>	99.8%	2 bases
	<i>M. loti</i>	99.6%	4 bases
G 2: Rch 7, 981	<i>M. Ciceri</i>	99,8%	2 bases
	<i>M. Loti</i>	98.6%	4 bases
G 3: Rch 984, Rch 9865	<i>M. Mediterraneum</i>	99.9%	1 base
	<i>M. tianshanense</i>	99.4%	6 bases
G 4: Rch 9813, Rch9868	<i>S. Meliloti</i>	99.7%	3 bases
	<i>Sinorhizobium sp</i>	99.6%	4 bases

% de similitude des séquences des ADNr 16S entre les groupes de rhizobia de pois chiche et les espèces des genres *Mesorhizobium* et *Sinorhizobium*

**Merci
de
votre attention**

bonne chance