



Université sultan Moulay Slimane
École Supérieure de Technologie
Béni Mellal

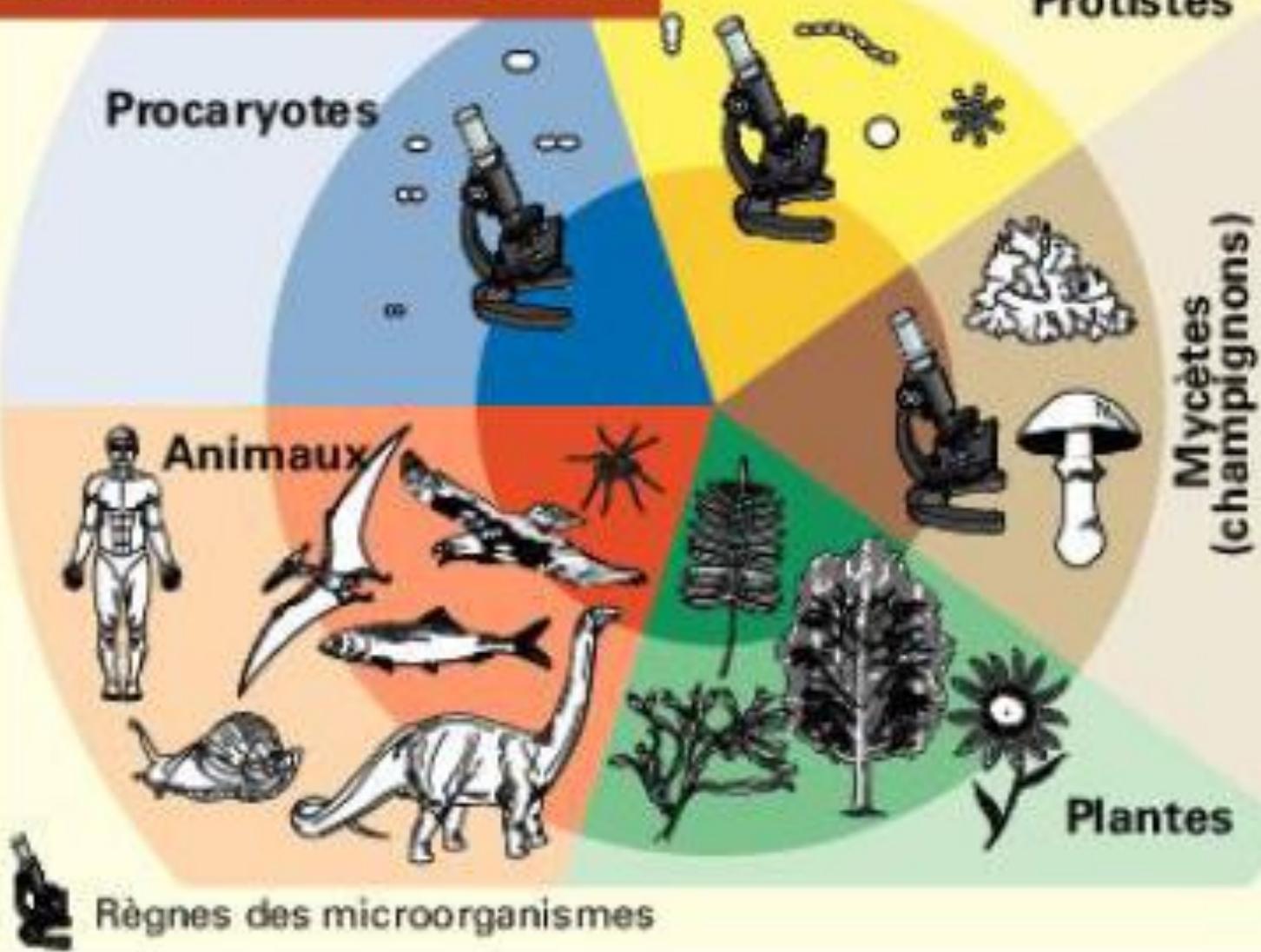


COURS DE MICROBIOLOGIE GENERALE

Pr. Khalid BOUTOIAL

Introduction

Classification contemporaine



Introduction

1. Qu'est-ce que la microbiologie ?

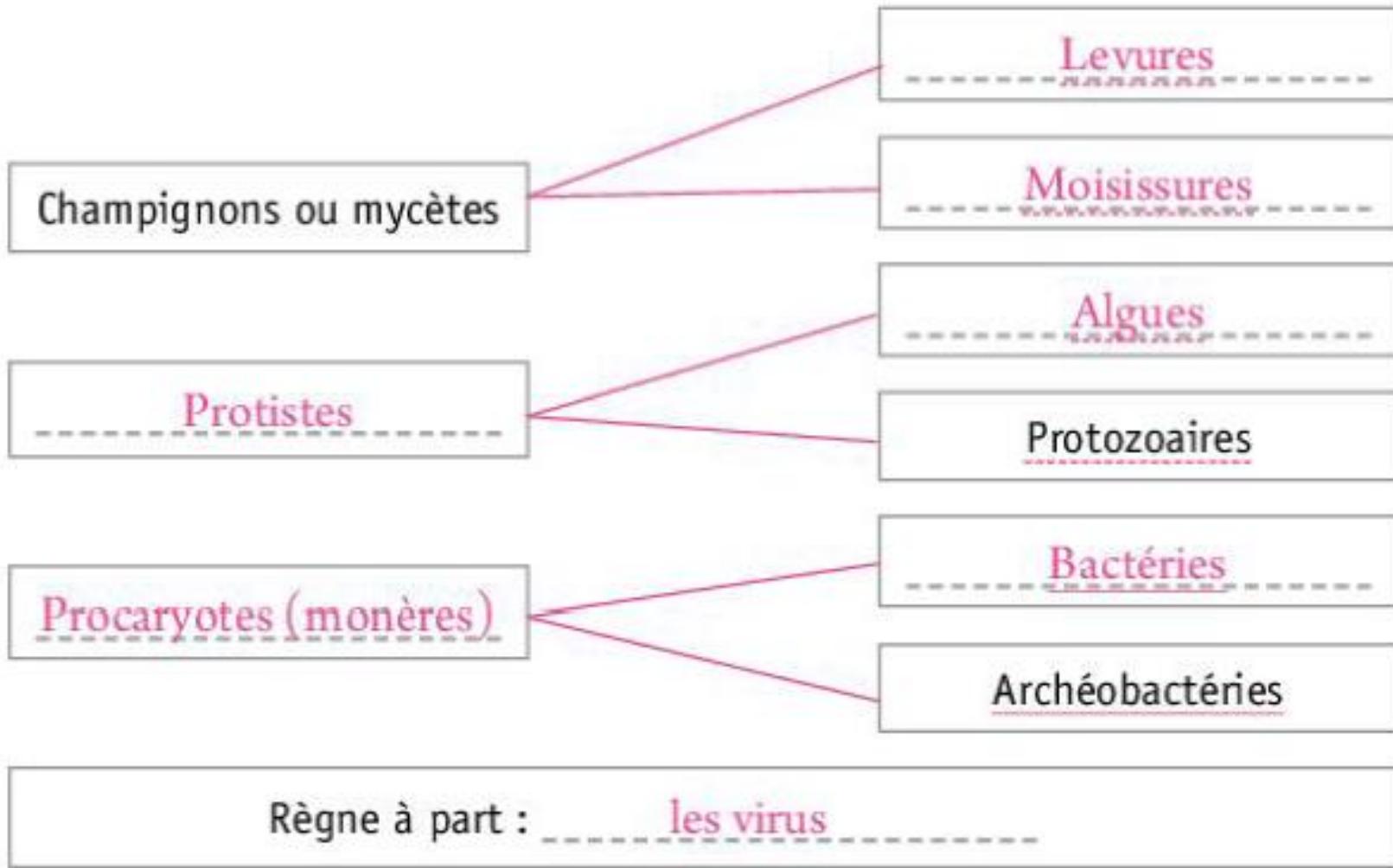
B. Définition

Science qui étudie les êtres vivants invisibles à l'œil nu:
cad de taille inférieure à 0,1 mm : les micro-organismes

2. Qui sont les micro-organismes ?

Malgré leur taille = moitié de la biomasse totale de la biosphère

Classification des microorganismes



- les champignons ou mycètes (levures, moisissures) ;
- les protistes (algues, protozoaires) ;
- les monères ou prokaryotes (bactéries, archéobactéries) ;

- les végétaux ;
- les animaux.

Les virus, quant à eux, doivent être considérés comme un règne à part.

Chapitre 1: Histoire de la microbiologie

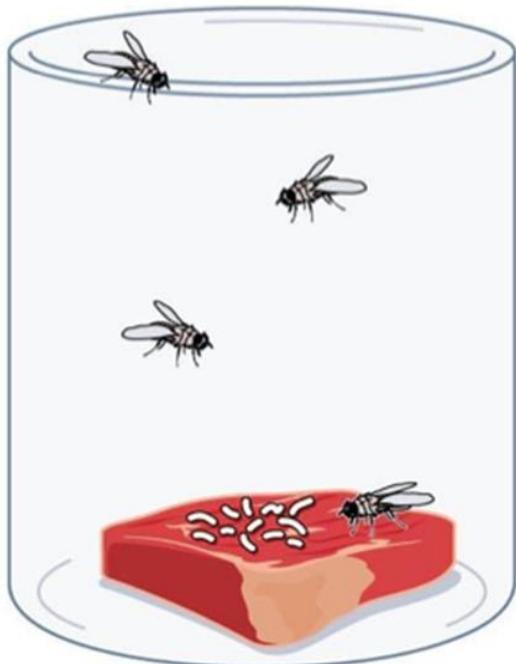
- **Antonie van Leeuwenhoek** (1632-1723)
- observe et décrit en 1676 des micro-organismes grâce au microscope qu'il a lui-même construit.
- Il emploie le terme «animalcules» pour qualifier les diverses formes présentes dans des échantillons d'eau, des bouillons de foin ou dans la salive.



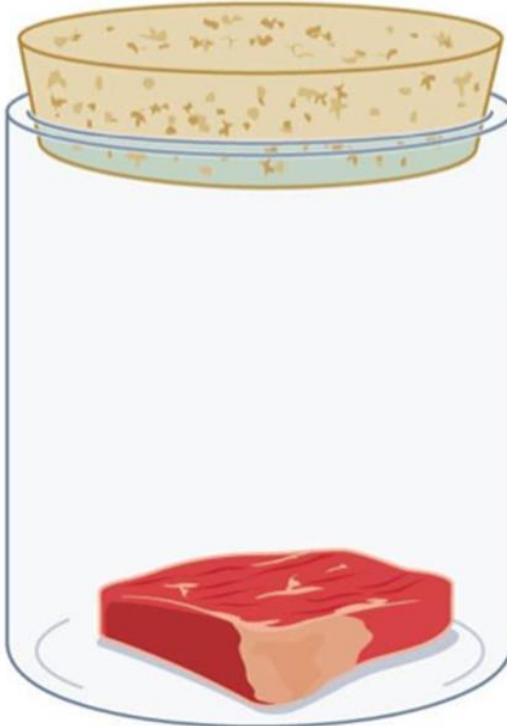
- Pendant très longtemps, les gens croire en théorie de génération spontanée:
«les microorganismes vivants pouvaient se développer à partir de matière morte ou en décomposition».
- La théorie est mise en doute par le médecin Italien **Francesco Redi** (1626-1697): réalisa une série d'expériences
- a conclus que la viande ne produise pas spontanément de larves mais la production des larves due à la présence d'œufs des mouches



1626 -1697 (71 ans)
Pise, Italie



Flask unsealed



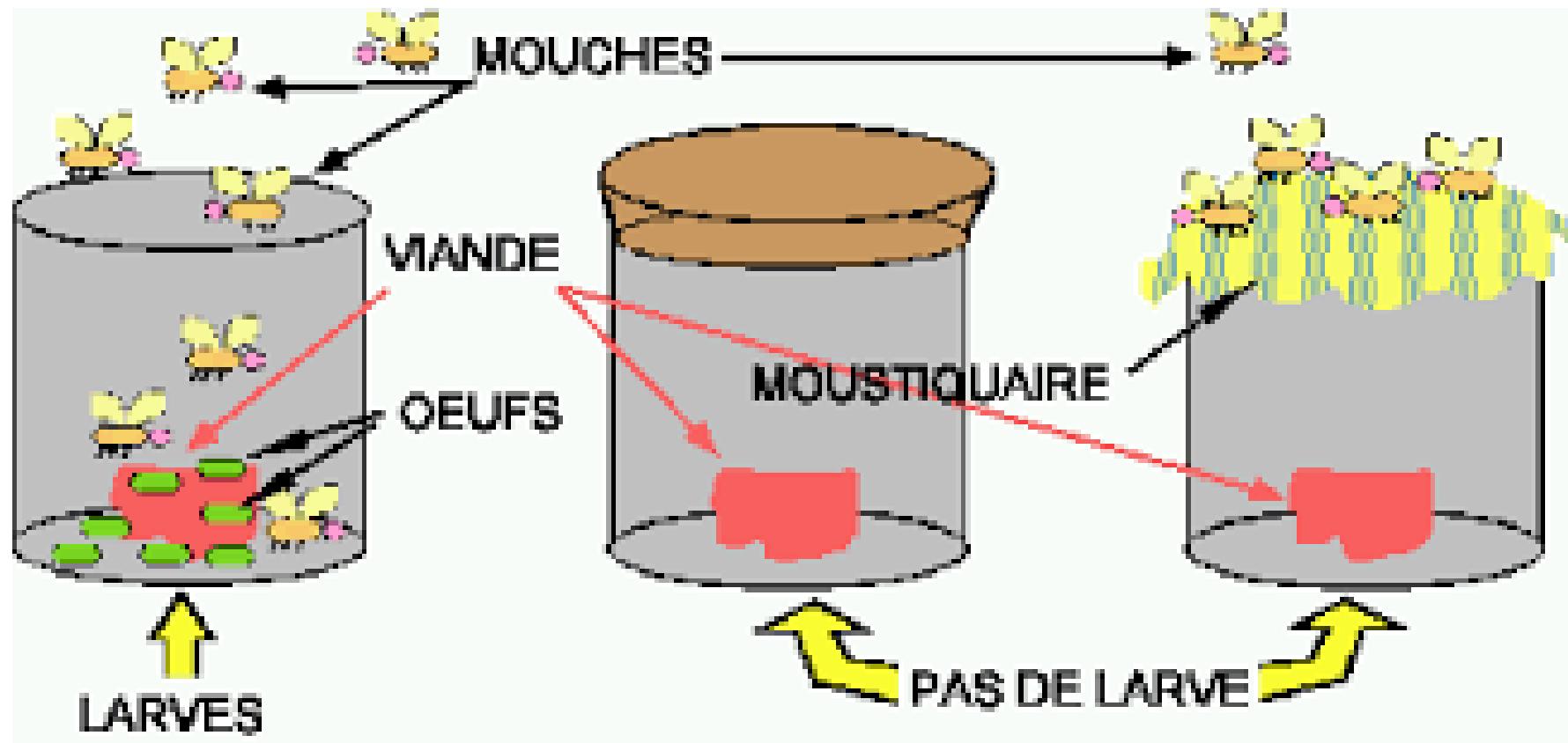
Flask sealed



**Flask covered
with gauze**

Expérience de Francisco Redi

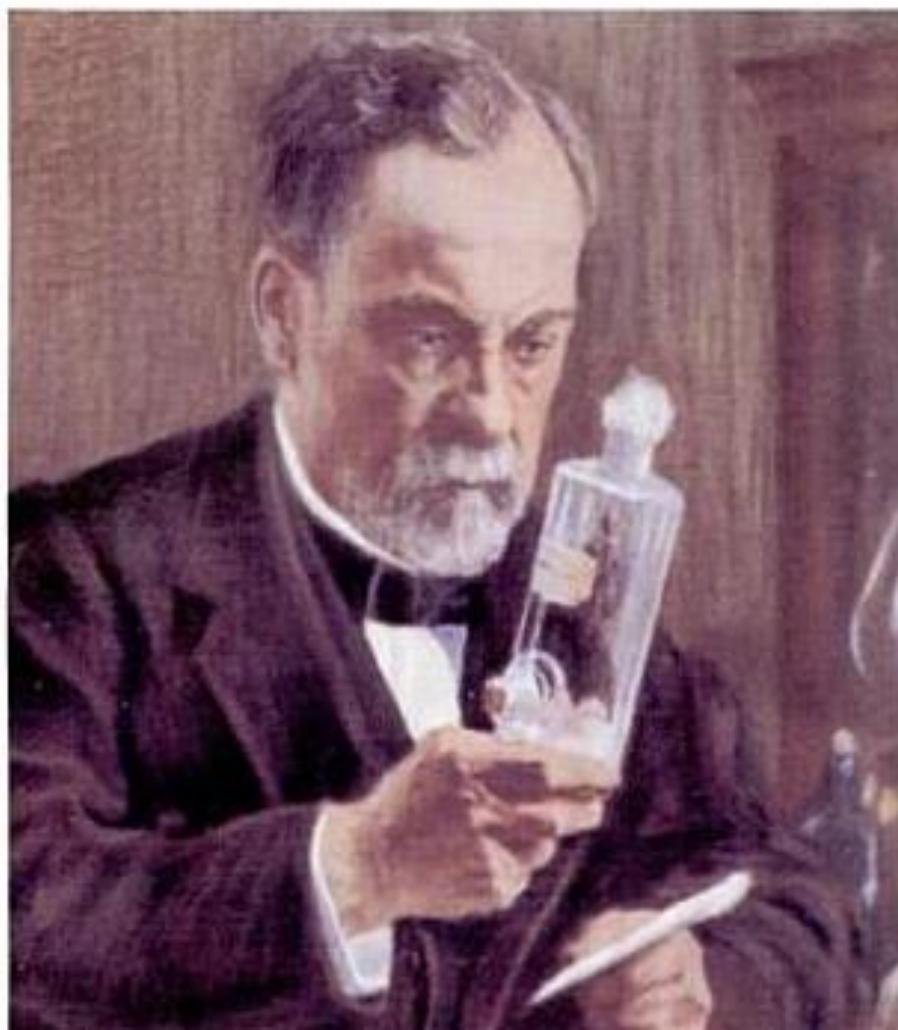
L'apparition des vers dans les cadavres n'est pas un phénomène de génération spontanée, mais que les vers naissent d'œufs pondus par des mouches.



Résultats de l'expérience de Francisco Redi

La période pasteurienne

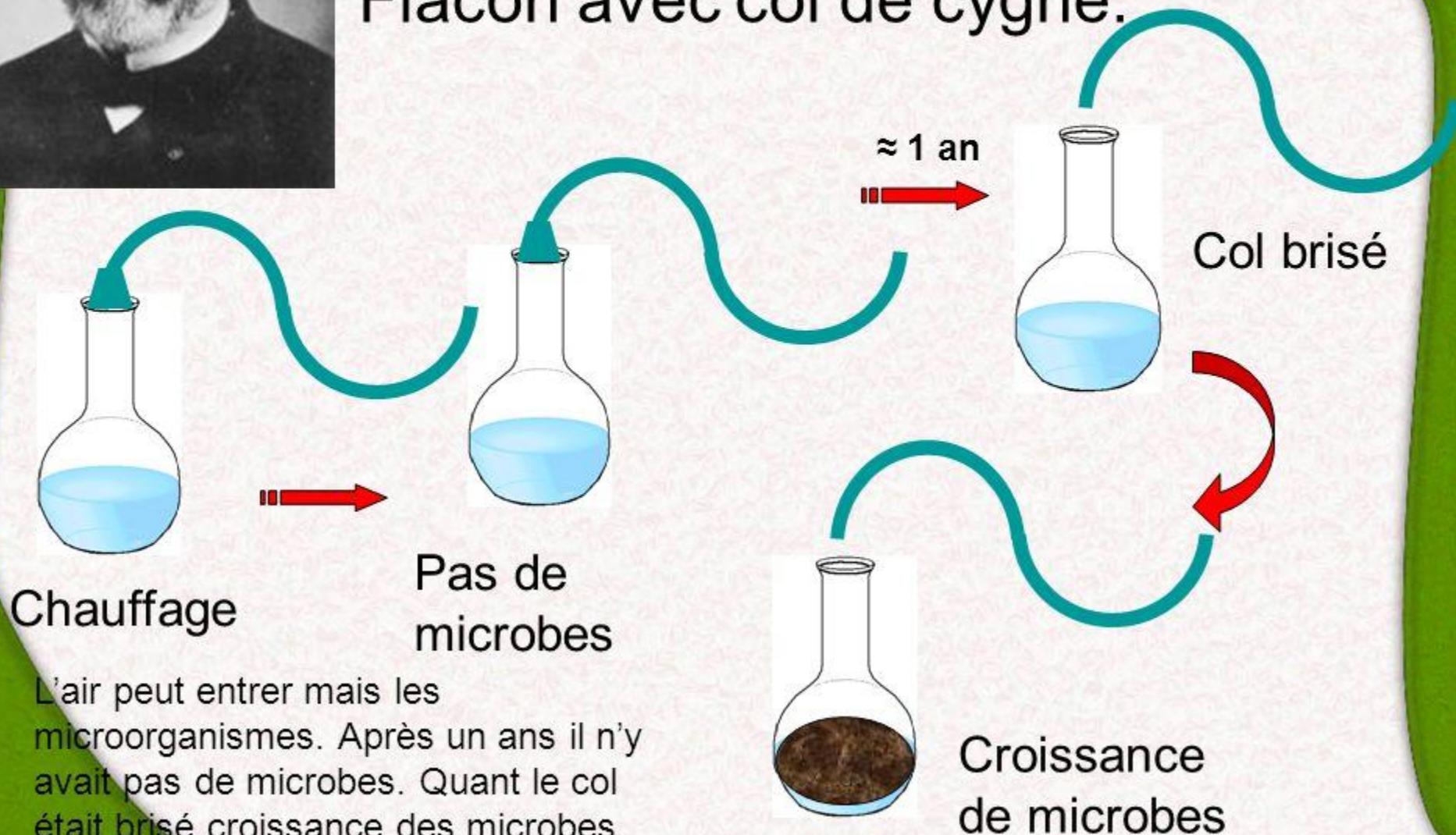
Pasteur avait résolu la controverse de la génération spontanée en 1861





Louis Pasteur 1862

La fin de la génération spontanée. Flacon avec col de cygne.



- Pasteur à résoudre ce problème une fois pour toutes, pasteur filtra d'abord l'air à travers de coton et trouva que des objets ressemblant à des spores végétales y étaient piégés.
- Si le morceau de coton était placé dans un milieu stérile après que de l'air y ait filtré une croissance microbienne était observée.
- Ensuite il plaça des solutions nutritives dans les flacons, chauffa leur goulot à la flamme et les étira de diverses façons en gardant l' extrémité ouverte à l'air.
- Pasteur fit alors bouillir des solutions pendant quelques minutes puis les refroidit.

- Aucune croissance n'apparut même si des contenus des flacons avaient été exposés à l'air.
- Pasteur fit observer qu'il n'y avait pas de croissance parce que la poussière et les germes avaient été piégés sur les parois des tubes courbés.
- Si les tubes étaient cassés, la croissance commençait immédiatement.
- Pasteur avait non seulement résolu la controverse en 1861 mais encore, il avait montré comment garder des solutions stériles.
- Les travaux de Pasteur à l'aide de flacons à col ont marqués le début de l'âge d'or de la microbiologie.

- Durant les 60 ans (1857-1914) un certain nombre de micro-organismes furent découvertes de grands progrès dans la compréhension du métabolisme microbien furent faits et les techniques d'isolement et de caractérisation des microorganismes furent améliorées
- En 1857, Louis **Pasteur** (1822-1895) démontre que la fermentation du sucre en acide lactique est due à un microorganisme.

L'âge d'or de la microbiologie : microbiologie médicale

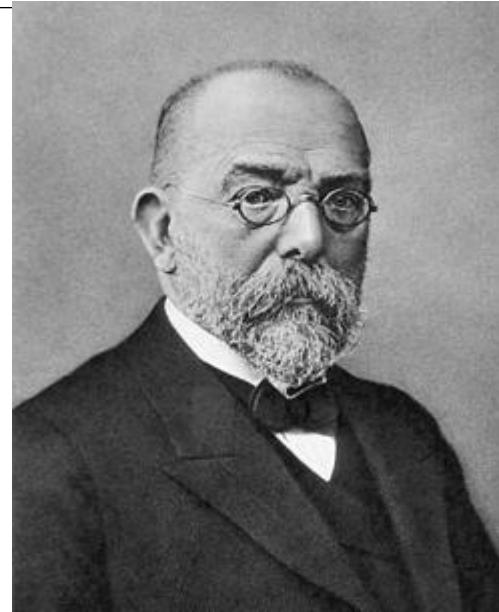
- 1835, Bassi, une maladie du vers à soie = mycète
- 1845, Berkeley Brunissement des pommes de terre
= *P. infestans*
- 1865, Pasteur, Pébrine, maladie du ver à soie = protozoaire
- 1870, Lister, désinfection des plaies et stérilisation des instruments chirurgicaux et pansements (chaleur-phénol)
- 1877, Koch, anthrax-maladie du charbon = bactérie
= *Bacillus anthracis*



Postulat de Koch

La période de Koch

- En 1876, Robert Koch démontre que le charbon est dû à *Bacillus anthracis*.
- Il a cultivé des bactéries sur la gélatine, puis découvre l'agent de la tuberculose (le bacille de Koch: *Mycobacterium tuberculosis*).
- Les postulats de Koch sont publiés pour la première fois en 1884.

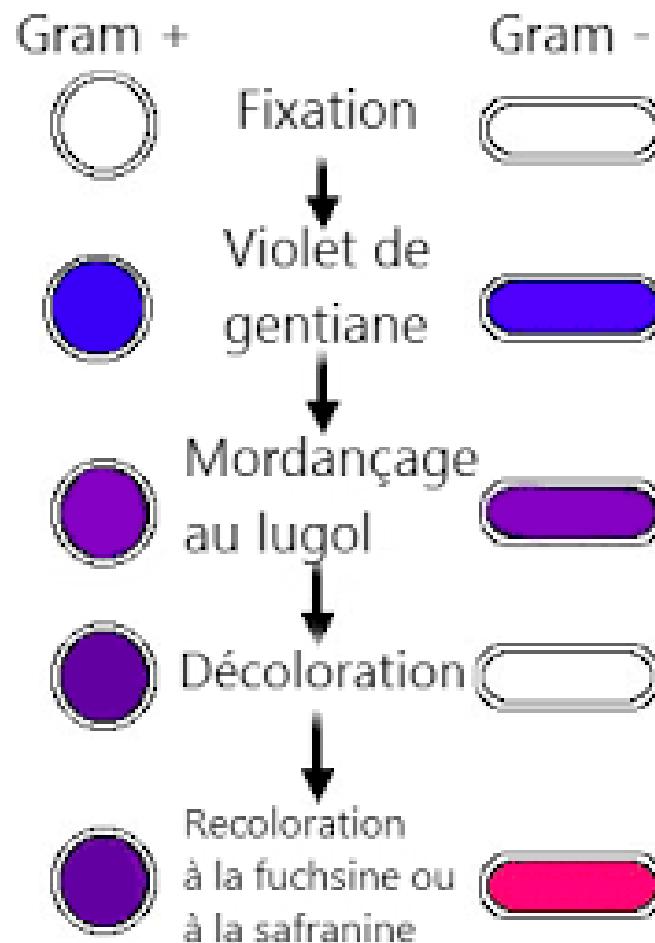


Robert Koch
1843- 1910 (66 ans)
Allemagne

Prix de Nobel EN MEDCINE EN 1905

Période de Hans Gram

- En 1884, Hans Christian **Gram** (1853-1928) a développé une technique de coloration qui est encore aujourd’hui la plus utilisée dans l’étude et la classification des bactéries.

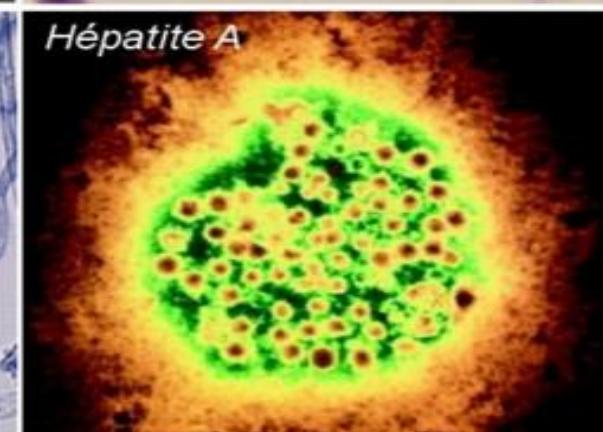
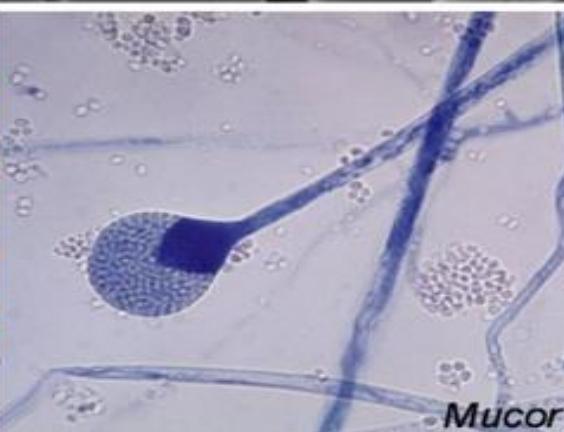
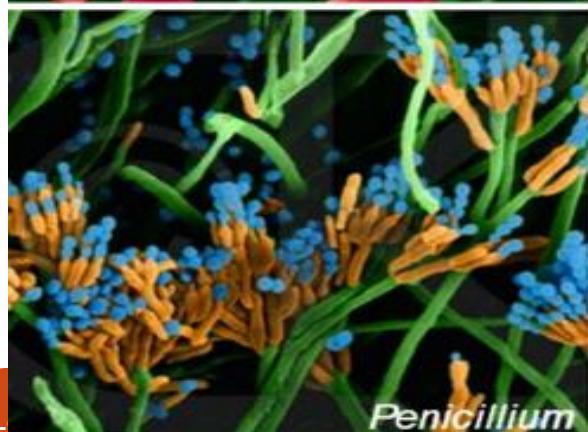
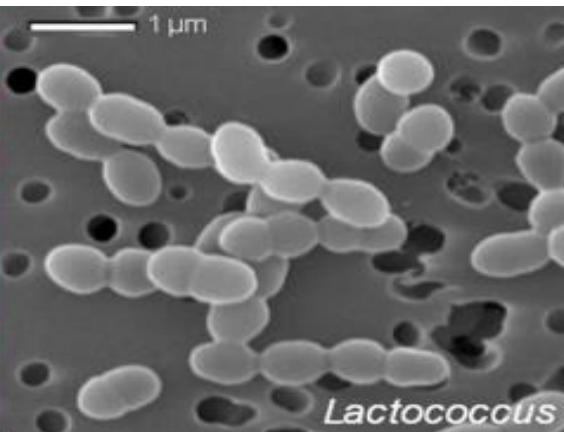


Autres découvertes

- En 1928, Griffith découvre la conjugaison bactérienne.
- En 1929, Fleming découvre la pénicilline.
- En 1952, Zinder et Lederberg découvrent la transduction généralisée.
- En 1961, Jacob et Monod proposent le modèle de l'opéron pour la régulation des gènes.

Chapitre 2: Introduction à la microbiologie

- La microbiologie : science des formes de vie microscopiques
- de nombreux êtres vivants nommés micro-organisme, leur taille est généralement inférieure à un millimètre:



- Un micro-organisme (du grec, **mikrós**: petit et de **organismós**: organisme)
- microbe : organisme vivant, invisible à l'œil nu, qui ne peut être observé qu'à l'aide d'un microscope.
- Avant la découverte des microorganismes tous les êtres vivants étaient classés à l'intérieur du règne animal ou végétal.
- Les organismes animaux tirent leur énergie de l'oxydation des matériaux organiques, accumulent des substances de réserve sous forme des graisses ou de glycogènes sont animés de mouvements actifs; ils sont aussi dépourvus de parois cellulaires.

- Les végétaux, au contraire sont photosynthétique, utilisant la lumière comme source d'énergie; ils synthétisent de l'amidon comme réserve nutritive, sont dépourvus de mouvements et possèdent une paroi cellulaire.
- La découverte de nouvelles formes vivantes microscopiques rendait de plus en plus difficile leur classement dans le règne animal ou végétal.
- Parmi elles les algues et les champignons pouvaient être rapprochés des plantes.
- Les protozoaires mobiles et non photosynthétiques étaient plutôt considérés comme des animaux, mais la place des bactéries restait à fixer.

- En 1886 le zoologiste allemand **Haeckel** proposa une solution logique en demandant la création pour ces formes microscopiques un troisième règne celui des protistes qui réunit les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries.
- 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 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**.

Microbiologie

VIROLOGIE

- Prions 35 000 Da
- Viroïdes 130 000 Da
- Virus 25 à 300 nm

BACTERIOLOGIE

- Bactéries 0,2 à 10 µm

MYCOLOGIE

- Levures 5 à 10 µm
- Moisissures

MICROBIOLOGIE

PHYCOLOGIE

- Algues unicellulaires
10 à 50 µm

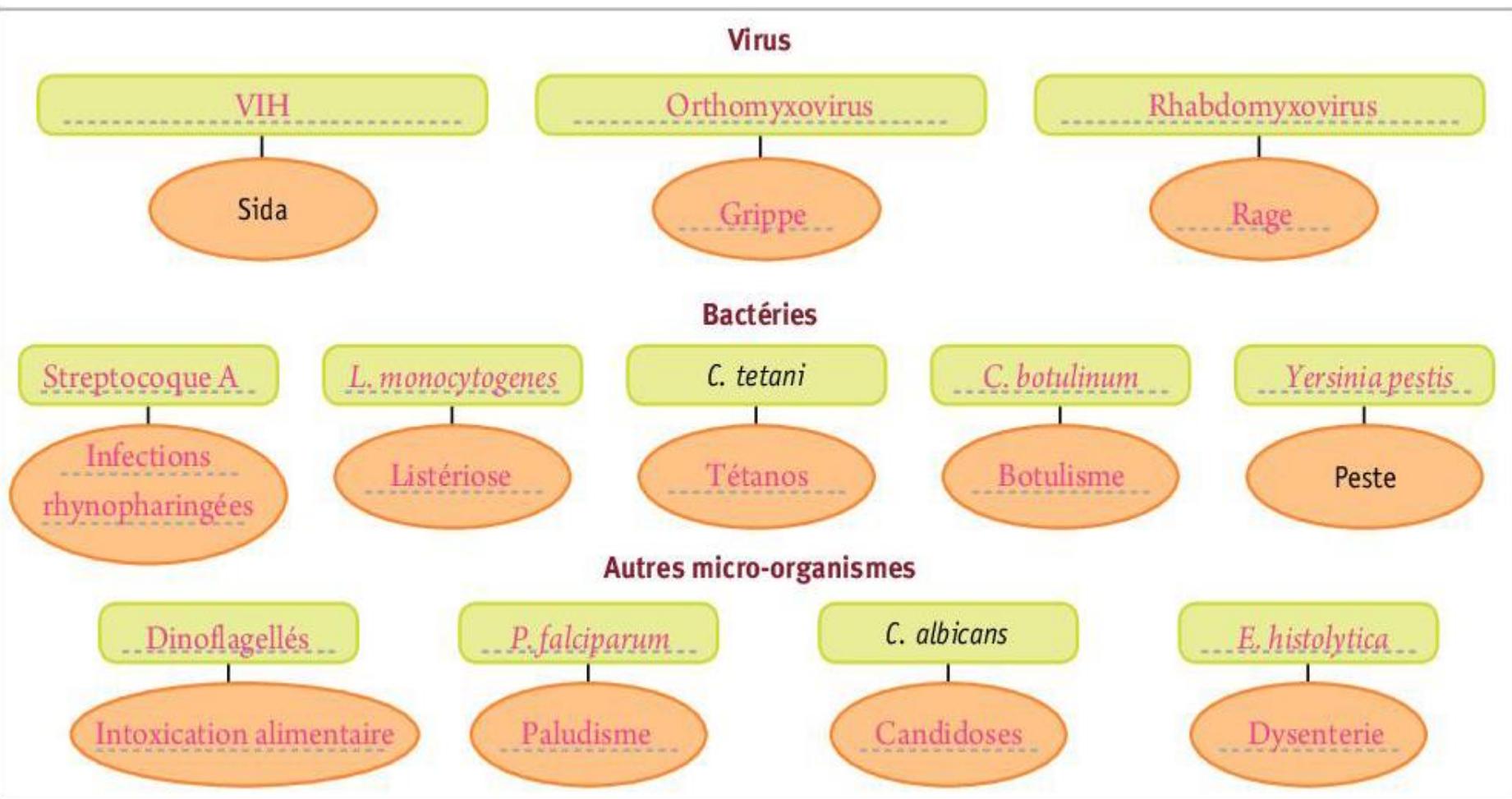
PARASITOLOGIE

- Protozoaires
1 à 150 µm
- Helminthes
1 mm à 10 m !

Les principales flores résidantes et transitoires de l'homme

Nature de la flore	Localisation de la flore	Exemples de m-o résidants	Exemples de m-o transitoires
Flore nasale	nez	- <i>Staphylococcus epidermidis</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> (= staphylocoque doré)
Flore buccopharyngée	Bouche pharynx	- <i>Streptococcus salivarius</i> - <i>Neisseria</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Flore intestinale	intestin	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Shigella</i>	- <i>Pseudomonas</i> - <i>lactobacilles</i>
Flore cutanée	peau	- <i>Staphylococcus epidermidis</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> - entérobactéries
Flore vaginale	vagin	- <i>Lactobacilles</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i>	- Enterobactéries - <i>Staphylococcus aureus</i>

Microorganisme et maladies



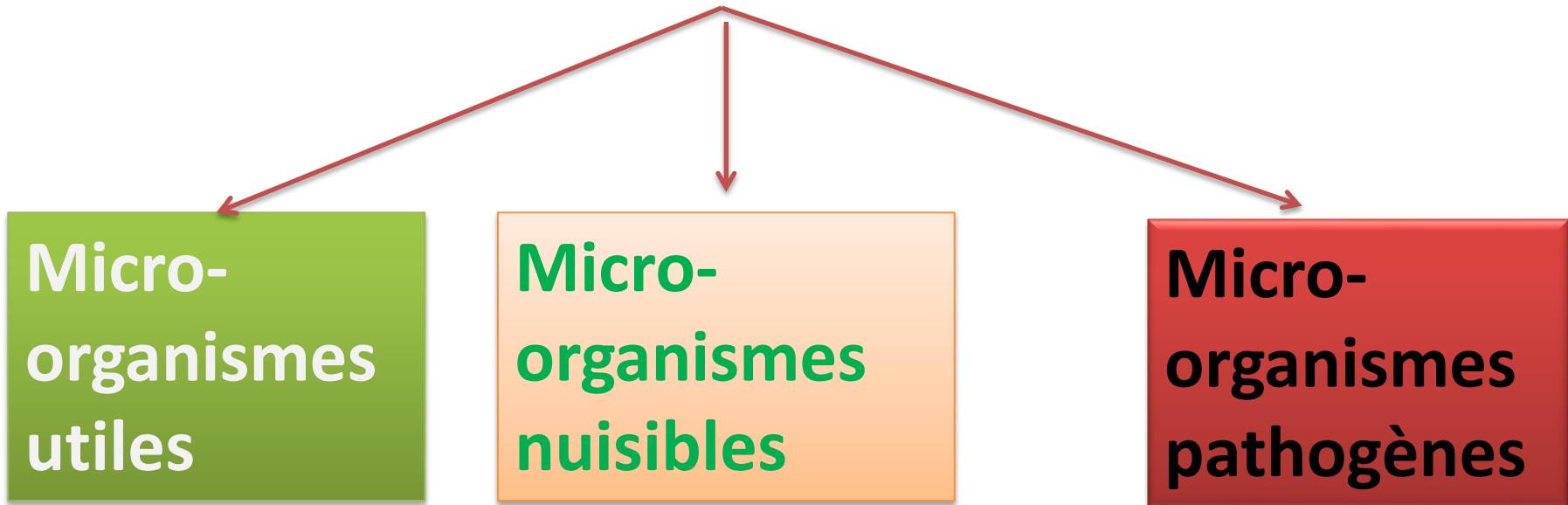
Origine et comportement des microorganismes des aliments



Les aliments
sont pas stériles

- L'aliment "de départ" est rarement stérile.
- Avant sa transformation, il abritait déjà une « flore initiale».
- A cette flore initiale s'ajoutent d'autres micro-organismes apportés par l'air ou des contacts liés aux manipulations successives subies par l'aliment.

Les microorganismes dans les aliments sont divisés en:

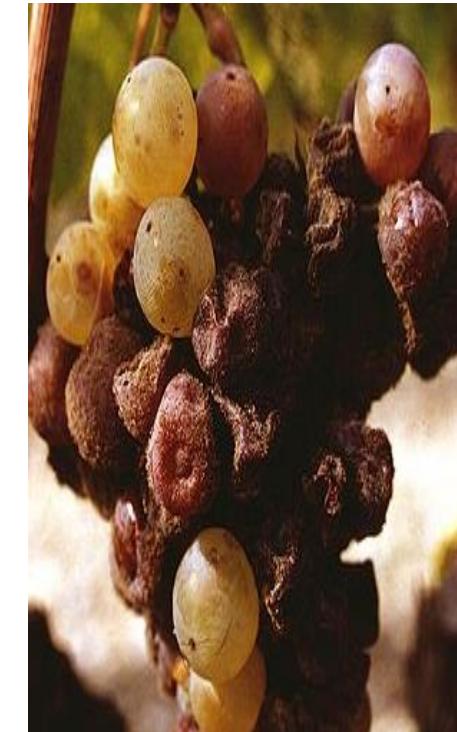


Microorganismes utiles



Bactéries lactiques, levures,
champignons,,,

Microorganismes de détérioration des aliments (nuisibles)



Effets des micro-organismes nuisibles sur l'aliment

- Les micro-organismes nuisibles sont les micro-organismes pathogènes, ou non, responsables d'intoxications alimentaires ou non pouvant causer des altérations des aliments.
- Ces altérations peuvent causés:

Altérations de l'aspect ou de la texture

- Ces altérations peuvent ne pas présenter de toxicité mais rendent le produit peu appétissant voir invendable.



Altérations du goût

- Odeur de moisissure (moisissures,...)
- Odeur de rance (oxydation des lipides)
- Odeur de soufre (production de H_2S ou d'indole)



Altérations des qualités nutritives

- Elles peuvent être dues à :
 - ✓ l'apparition de substances toxiques
 - ✓ la destruction de molécules nutritives (exemple: acides aminés essentiels) d'où une diminution de la valeur nutritive de l'aliment.

Microorganismes pathogènes



➤ Les micro-organismes pathogènes ou responsables d'altérations sont apportés par diverses façons :

- Par l'homme (mains sales, cheveux...)
- Par les insectes (mouches)
- Par du matériel souillé
- Par l'air, l'eau et sol...

Origine des microorganismes

Bactéries

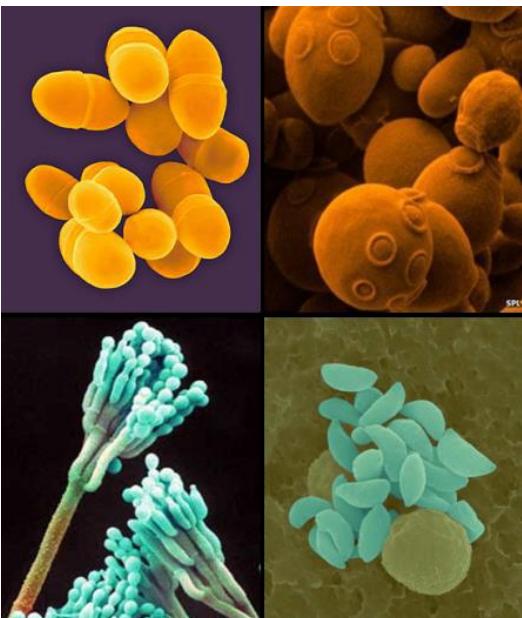
Levures,

Moisissures

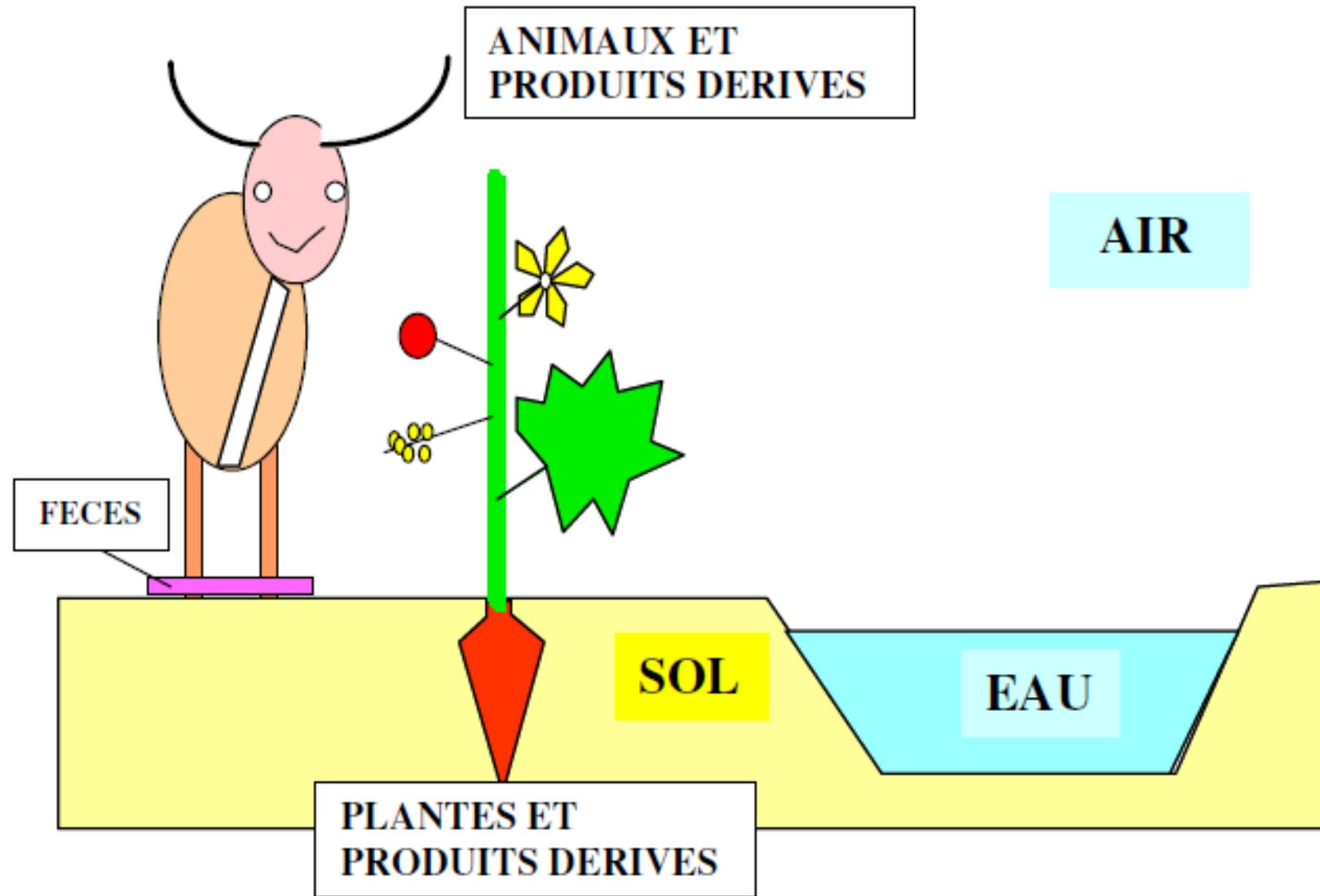
Virus

Protozoaires

- Eau (douce et mer) , sol
- Air, poussières
- Flore intrinsèque (surface végétaux, peaux et muqueuses animales ...)
- Process industriel (personnel, opérations technologiques, stockage)



Sources primaires de microorganismes



- De ce fait le risque de contamination pour un produit alimentaire, transformé ou non est permanent au long de la chaîne alimentaire





Eau et Sol

- La qualité microbiologique de l'eau a une très grande influence sur la contamination des produits alimentaires.



- L'eau est employée pour de multiples usages (lavages, douchages, nettoyages, ...).



- Elle doit être de bonne qualité microbiologique sinon elle peut provoquer des contaminations post-fabrication.

- L'eau est un produit consommé puis rejeté par l'homme.
- Si aucun traitement n'est effectué sur les eaux usées, la pollution est importante par les microbes pathogènes (choléra)



- Les produits en contact avec l'eau de mer peuvent être contaminés par une flore d'altération variée
- Des bactéries responsables de putréfaction peuvent ainsi contaminer la chair de poisson : **Aeromonas, Bacillus, Coryanobacterium, Pseudomonas...**

- Les huîtres peuvent concentrer à l'intérieur de leurs tissus des coliformes fécaux ou des *Vibrio*
- L'élimination se fait par un séjour d'eau de mer purifiée avant la commercialisation



- Les germes hydriques sont souvent:

➤ des bactéries ayant une origine commune avec :

le sol:



ou avec la matière fécale de l'homme ou des animaux



Bactéries

- *Achromabacter*
- *Enterobacter*
- *Alcaligenes*
- *Clostridium*
- *Corynebacterium*
- *Micrococcus*
- *Proteus*
- *Pseudomonas*
- *Serratia*
- *Sarcina*
- *Bacillus*
- *Streptomyces , etc...*

Moisissures

- *Aspergillus*



- *Rhizopus*



- *Penicillium*



- *Trichothecium*



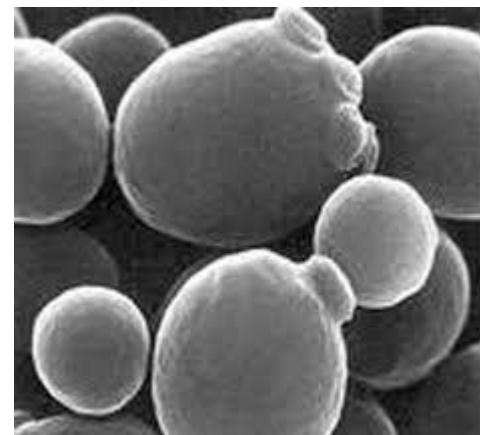
- *Botrytis*

- *Fusarium*

Levures

souvent associées
aux plantes

- *Saccharomyces*



- *Rhodotorula*



- *Torula (Candida utilis)* problèmes allergiques



- Aussi une flore microbienne pathogène:
 - *Salmonella*
 - *Shigella*
 - *Yersinia enterocolitica* (eau potable et eau de mer)
 - *Listeria monocytogene* et *innocua* (eaux d'épurations)
 - *Aeromonas spp* (dans les eaux potables traités au chlore , est un pathogène psychrotrophe)

Les virus

➤ peuvent infester les individus soit directement, soit par les **coquillages** et les légumes irrigués (**hépatite A**).



iiiijNombreuse interaction entre eau et sol iii

- Dans le sol on trouve les microorganismes cités pour l'eau certains germes cependant sont considérés comme ayant une origine tellurique, c'est le cas des bactéries nitrifiantes, autotrophes obligatoires.

- Les clostridium sont également souvent cités pour leur provenance terrestre, ainsi que les moisissures et les levures
- Ces microorganismes vont contaminer les enveloppes des légumes et des fruits (altération ou fermentation)

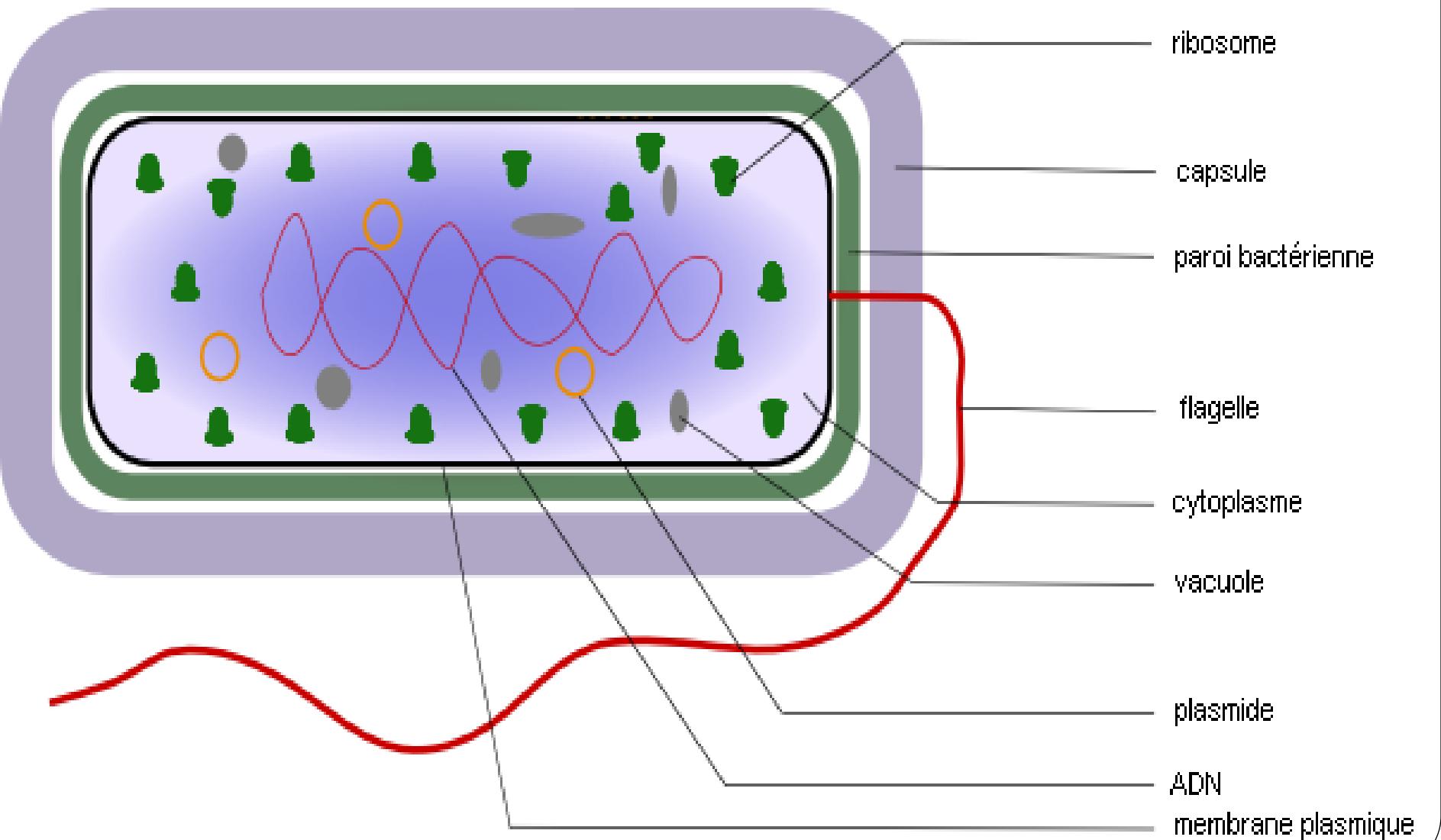




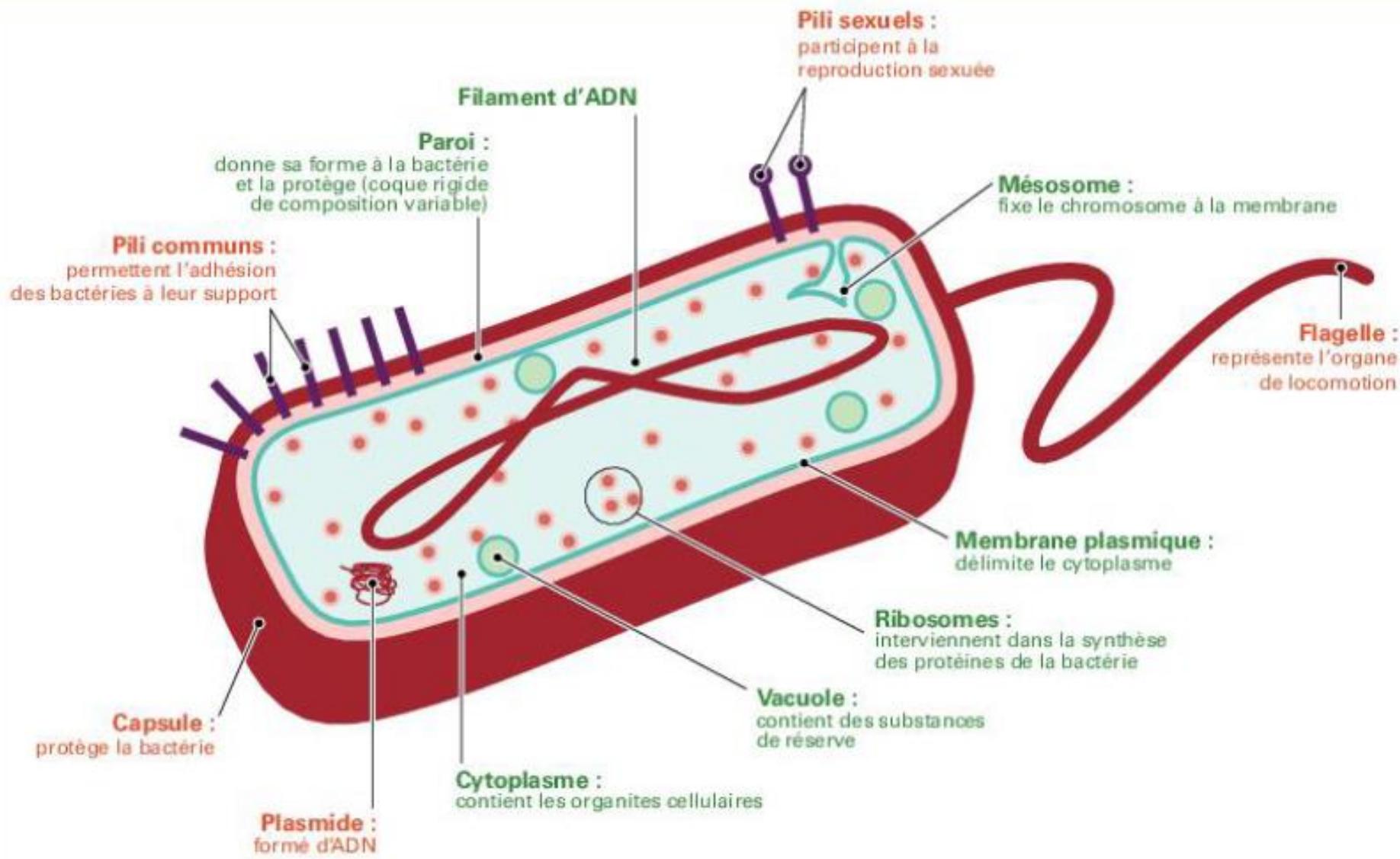
Contamination par des microorganismes de l'air et de poussières

- La plupart des bactéries et des moisissures et de très nombreuses levures y sont présentes.
- **Bactéries** : *Bacillus, Sarcina, Micrococcus*
- **Moisissures** : *Torulopsis*

Chapitre 3: La cellule bactérienne



Coupe schématique d'une bactérie (grossissement × 100 000)



I- Morphologie cellulaire

I.1- La taille

- La taille d'une bactérie est de l'ordre du **micromètre** ($1 \text{ } \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$).
- Les plus petites bactéries ont une taille similaire à celle des plus grands virus tandis que les plus grandes atteignent la taille de certaines algues unicellulaires.
- Quelques exemples :
 - *Mycoplasma pneumoniae*: $0,2 \text{ } \mu\text{m}$
 - *Escherichia coli*: $1 \times 2 \text{ } \mu\text{m}$
 - *Treponema pallidum* (Spirochète): $0,1 \times 10 \text{ } \mu\text{m}$
 - *Oscillatoria* (Cyanobactérie): $7 \text{ } \mu\text{m}$

I. 2- La forme

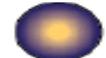
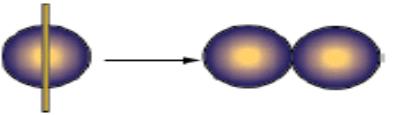
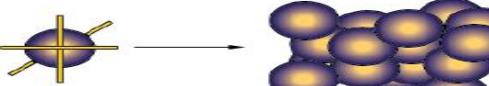
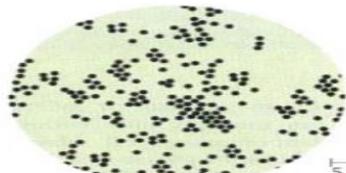
Les bactéries les plus communes se présentent sous deux formes :

- **sphérique** : il s'agit des **coques** (ou *cocci*) ;
- **cylindrique** (en bâtonnet) : il s'agit des **bacilles**,
- Spirale ou hélicoïdale

I. 2.1. formes sphériques

- Selon leur mode de division, les espèces bactériennes forment des arrangements caractéristiques appelés **groupements**, observables au microscope photonique.
- Elle caractérise les Cocci.
- Leur mode de division donne naissance à des groupements typiques, utiles à observer du point de vue diagnostique.

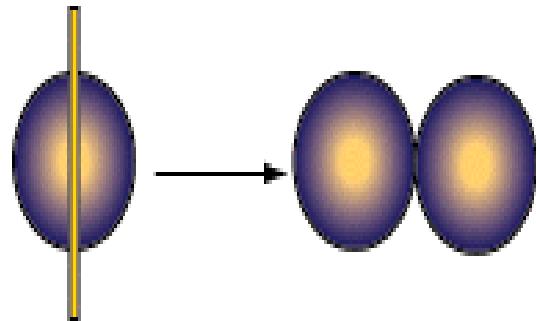
Regroupement des coques selon leurs modes de division

Forme sphérique	Regroupement	
isolées	Coques 	
en paires	Diplocoques 	
Regroupement de 4 cellules	Tétrades 	
Regroupement cubique de 8 cellules	Sarcines 	
en chaînettes	Streptocoques 	
en grappes	Staphylocoques 	 5 µm

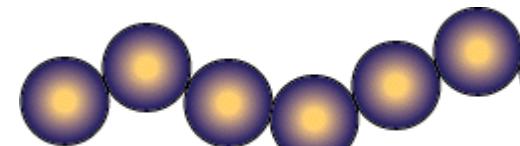
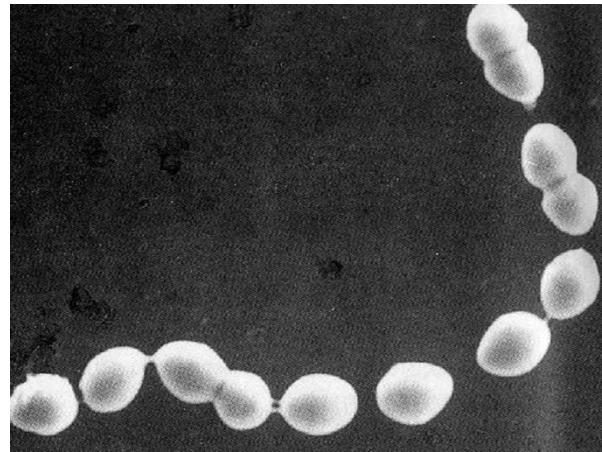
- Les coques sont des bactéries de type sphérique (coccus = grain, baie).
- Toutes les bactéries cocciformes n'ont pas une forme sphérique parfaite : certaines sont allongées, d'autres présentent une face aplatie, etc.
- Les coques se multiplient selon **un**, **deux** ou **trois** plans de division.
- Les formes qui en résultent sont respectivement des **chaînettes**, des **tétrades** ou des **amas**.
- La taille moyenne des coques est de 0,8 à 1 µm avec des extrêmes de 0,5 à 2 µm .

1. Diplocoques (Diplo = deux)

- Les **diplocoques** sont formés de deux coques assemblés : *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria* spp.
- Les **streptocoques** Streptocoques (*Streptus* = pliable, flexible) sont formés de chaînettes de coques.
- Ces chaînettes sont plus ou moins longues : *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.



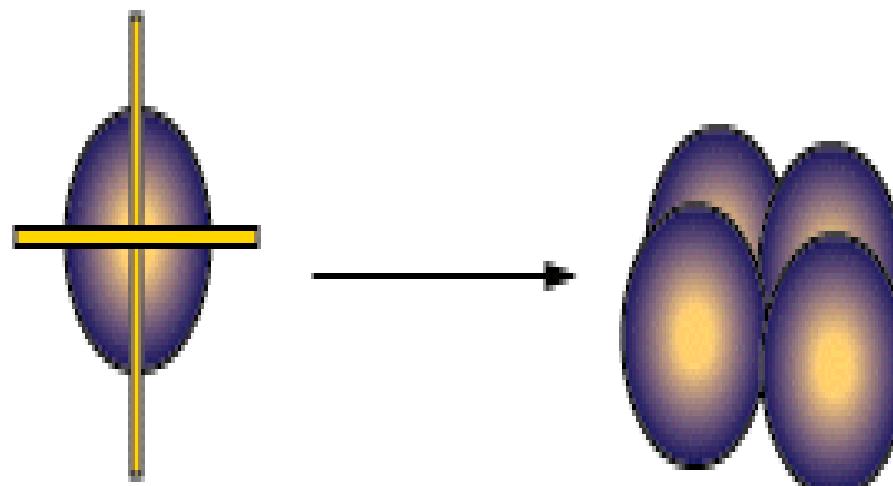
Diplocoques



Streptocoques

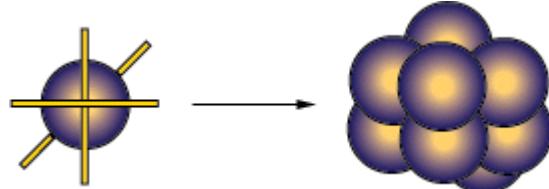
2. Tétrades

- Les tétrades sont des amas de quatre bactéries formés suite à l'existence de deux plans de division cellulaire.



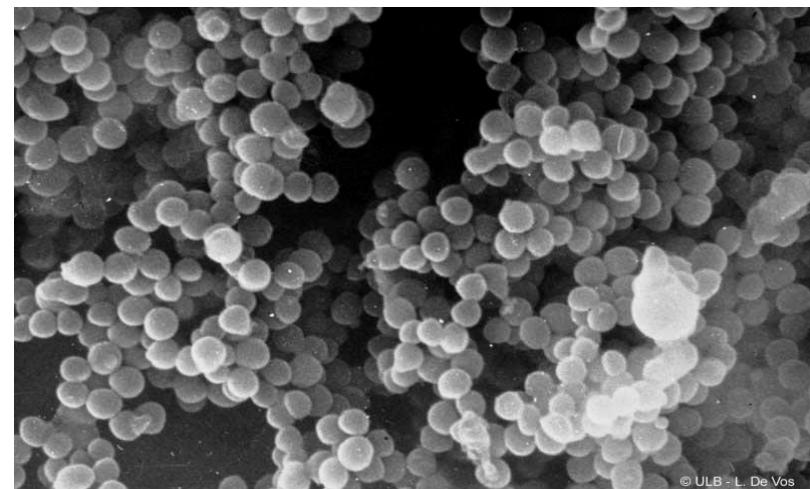
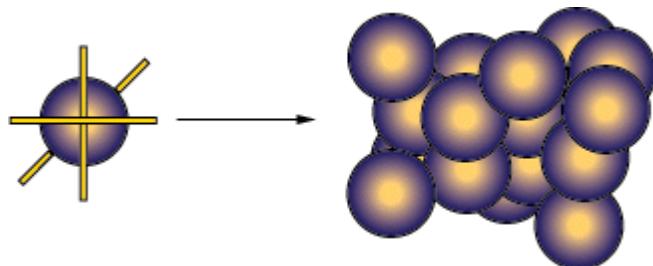
3. Sarcines (*Sarcina* = un paquet)

- Les sarcines sont des amas réguliers en trois dimensions de huit cellules bactériennes suite à l'existence de trois plans de division cellulaire se succédant de manière ordonnée : *Sarcina* spp.

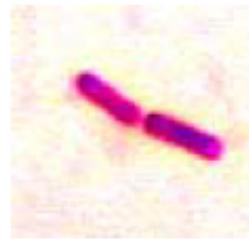
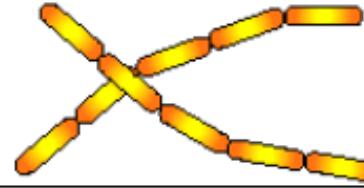
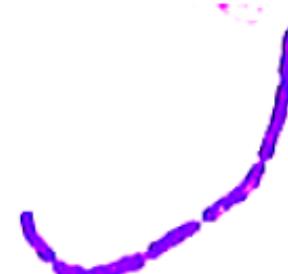


4. Staphylocoques (*Staphylo* = grappe de raisin)

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



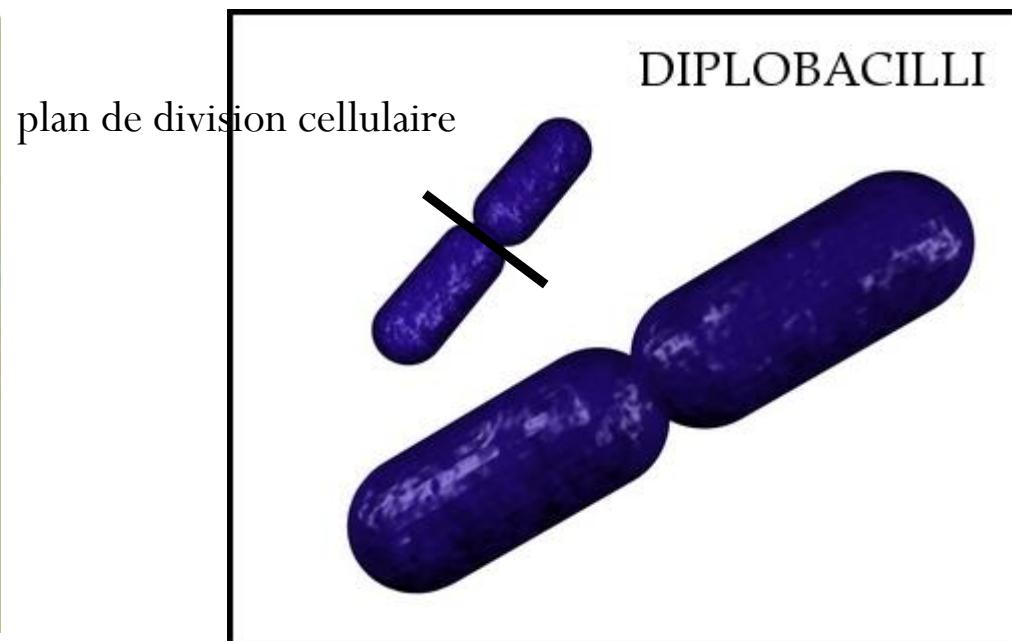
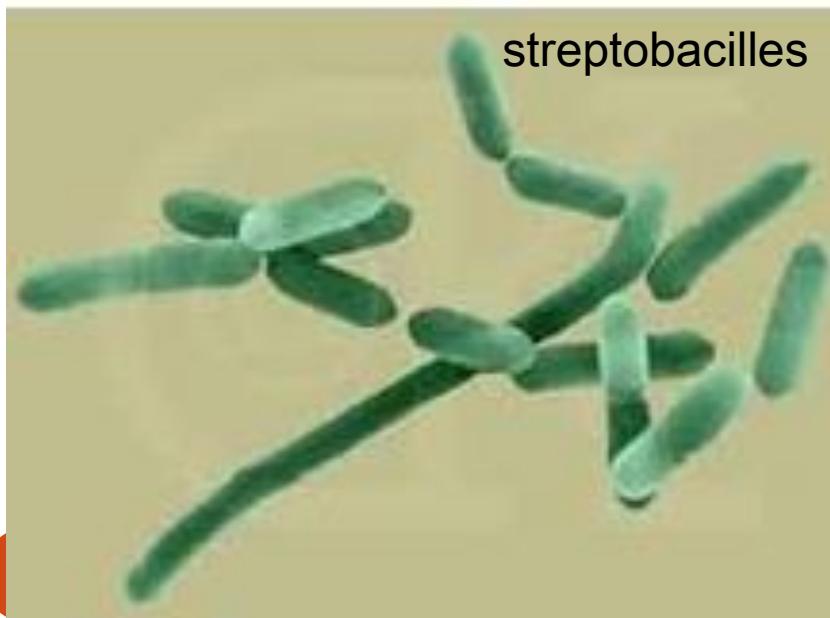
I.2.2. Formes en bâtonnets

Forme en bâtonnet	Regroupement	
en paires	Diplobacilles 	
en chaînettes	Streptobacilles 	
	Cocobacilles 	



- Les bacilles sont des bactéries allongées dont un axe est plus grand que l'autre.
- Il n'y a pas toujours une limite bien nette et franche entre les bâtonnets et les coques : certains coques sont allongés ; certains bâtonnets sont très courts et à extrémités arrondies (**coccobacilles**).
- La longueur du bâtonnet peut varier dans certaines limites selon les conditions et l'âge de la culture pour une souche donnée.

- Les bâtonnets ne présentent qu'un seul plan de division cellulaire : médian.
- Dans une culture en multiplication, les bâtonnets sont isolés, en paires, en chaînettes plus ou moins longues (streptobacilles), en amas plus ou moins irréguliers (en lettres chinoises) selon les espèces, les souches et les conditions de culture.



1. Coccobacilles

- Il s'agit de la forme typique d'un grand nombre de bactéries pathogènes telles les pasteurelles et apparentées (famille *Pasteurellaceae*) et les entérobactéries (famille *Enterobacteriaceae*).
- Ces bactéries ne sont pas beaucoup plus longues que larges et les extrémités sont arrondis.



Enterobacteriaceae

2. Bacilles corynéformes (*coryne* = une massue)

- Il s'agit de courts bâtonnets de forme irrégulière présentant une extrémité épaissie sous forme de massue ou de baguette de tambour.
- En général, cette extrémité apparaît colorée plus intensément.
- Il s'agit de la forme typique du bacille de la diphtérie (*Corynebacterium diphtheriae*).
- Par analogie, les bactéries avec cette morphologie ont été appelées bâtonnets corynéformes ou diphtéroïdes, bien que toutes ne soient pas rattachées à l'espèce *C. diphtheriae* taxonomiquement

Corynebacterium diphtheriae



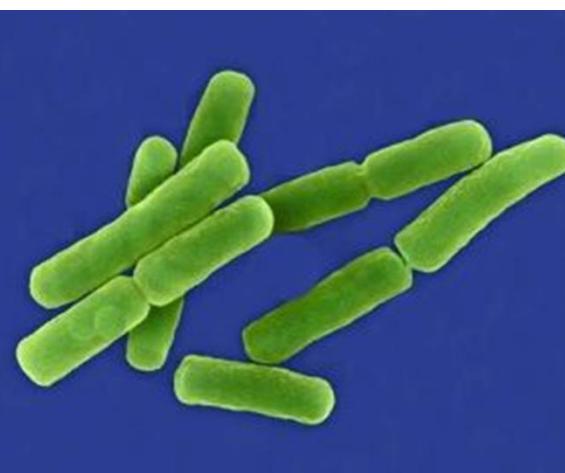
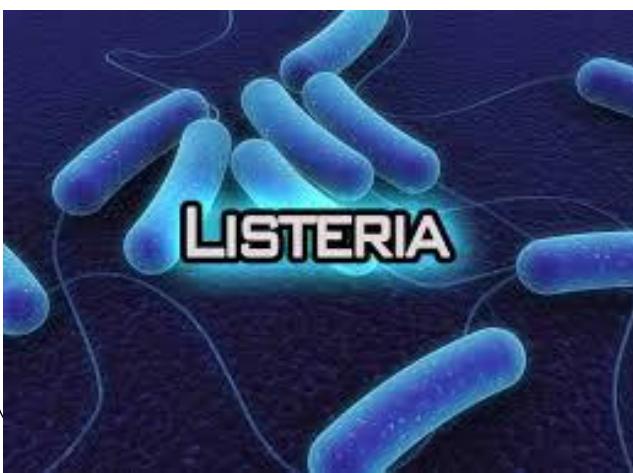
- *Corynebacterium diphtheriae* : une bactérie pathogène responsable de la diphtérie
- Appelée le bacille de Klebs-Loeffler, car elle a été découverte en 1884 par les bactériologistes allemands **Edwin Klebs** (1834-1913) et **Friedrich Loeffler** (1852-1915).

DIPHTHERIA



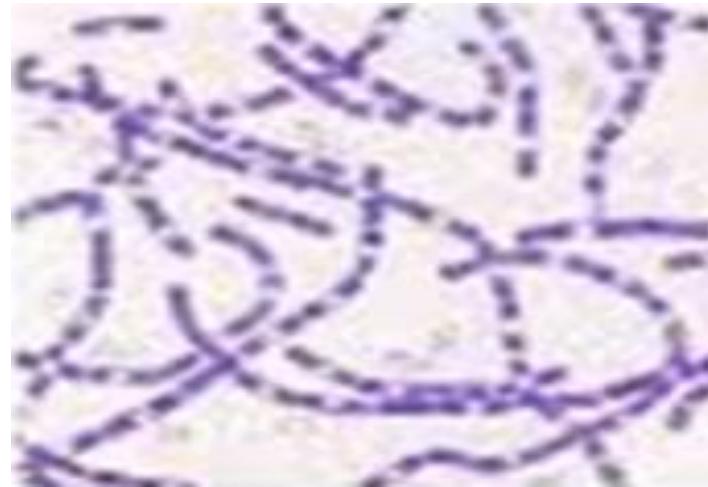
3. Vrais bacilles

- Les vrais bacilles ont des tailles variables.
- Leur forme est régulière, leur longueur est bien plus grande que leur largeur.
- Un très grand nombre de bactéries peuvent être reprises dans ce groupe : *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Listeria* spp., *Bacteroides* spp., *Pseudomonas* spp.
- Leur taille varie de 0,5 µm sur 0,2 µm à 15 µm sur 1 µm (*Clostridium septicum*).
- Les extrémités sont, en général, moins arrondies que chez les coccobacilles.



4. Bacilles filamenteux

- Les bacilles filamenteux sont de très longs bâtonnets.
- Certaines espèces de bacilles peuvent être qualifiées de bâtonnets filamenteux dans certaines conditions de croissance (*Clostridium septicum*).
- Ce caractère filamenteux peut d'ailleurs être rapidement perdu en culture.



Bacilles filamenteux

5. Bacilles fusiformes (*fusus* = un fuseau)

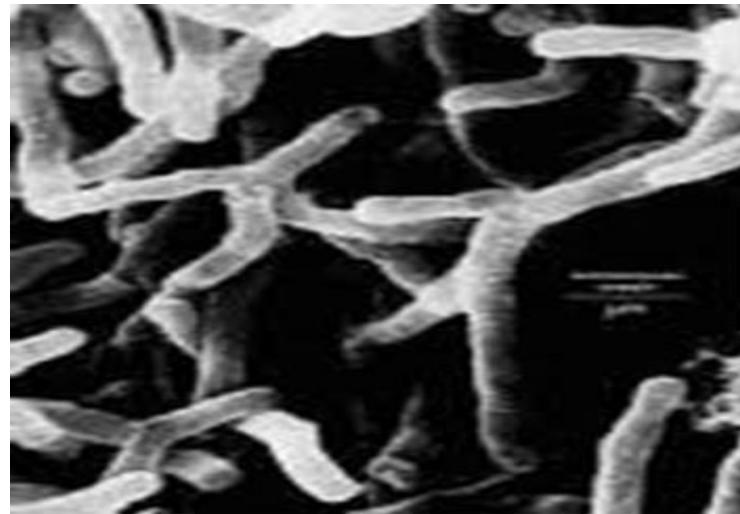
- Les bacilles fusiformes sont des bâtonnets plus ou moins longs qui ont des extrémités diminuées (*Fusiformis* spp.)
- En subculture, ces formes typiques disparaissent et des formes bacillaires classiques apparaissent.



Fusiformis spp

6. Bacilles ramifiés

- Certaines bactéries peuvent former des ramifications à un moment au moins de leur cycle.
- Cette forme les fait ressembler à des mycéliums, d'où leur nom d'actinomycètes (*aktinos* = rayon ; *mykes* = champignon) qui comprennent les genres *Mycobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp. et *Dermatophilus* spp.



Bacilles ramifiés

I. 2.3. Formes en spirale

Ces bactéries sont des bâtonnets qui ne sont pas droits, mais courbés et qui forment des tours de spires.

Deux groupes sont distingués selon leur longueur.



Formes en spirale

Forme en spirale

Amas de bactéries isolées

Vibrions



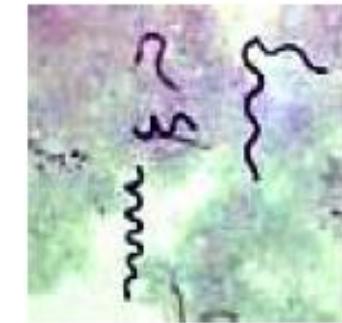
Amas de bactéries isolées

Spirilles



Amas de bactéries isolées

Spirochètes



1. Vibrions (vibrio = qui bouge rapidement)

- Les vibrions sont des bâtonnets recourbés en virgule.
- Ces bâtonnets sont courts ($< 5 \mu\text{m}$) et ne présentent qu'un à deux tours de spire.
- Les genres de vibrions d'intérêt médical sont : Vibrio spp., Campylobacter spp., Helicobacter spp.



Vibrio Cholerae

2. Spirilles (*spirillum* = petite spirale) et spirochètes

Les spirilles sont des bâtonnets recourbés en longues spirales (jusqu'à 20 µm et plus, car certains spirochètes atteignent 0,5 mm de longueur) présentant de nombreux tours de spire.

- Ils sont fins tels les spirochètes (*spira* = un tour ; *chaeta* = un cheveu) avec les genres *Treponema* spp., *Brachyspira* spp. et *Serpulina* spp. à spires étroites et régulières, *Borrelia* spp. à spires larges et régulières et *Leptospira* spp. à spires étroites et irrégulières, ou très épais tel le genre *Anaerobiospirillum* spp.

Staphylococcus

Coques en amas
(en "grappe de raisin")

Streptococcus

Coques en chaînettes

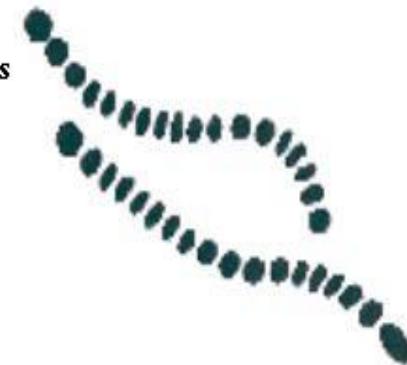


Diplocoques en "grains de café"



Entérobactéries
Bacilles et
coccobacilles

Spirochètes
Forme spiralee



Streptococcus pneumoniae

Diplocoque capsulé



Corynebacterium
En "massue"



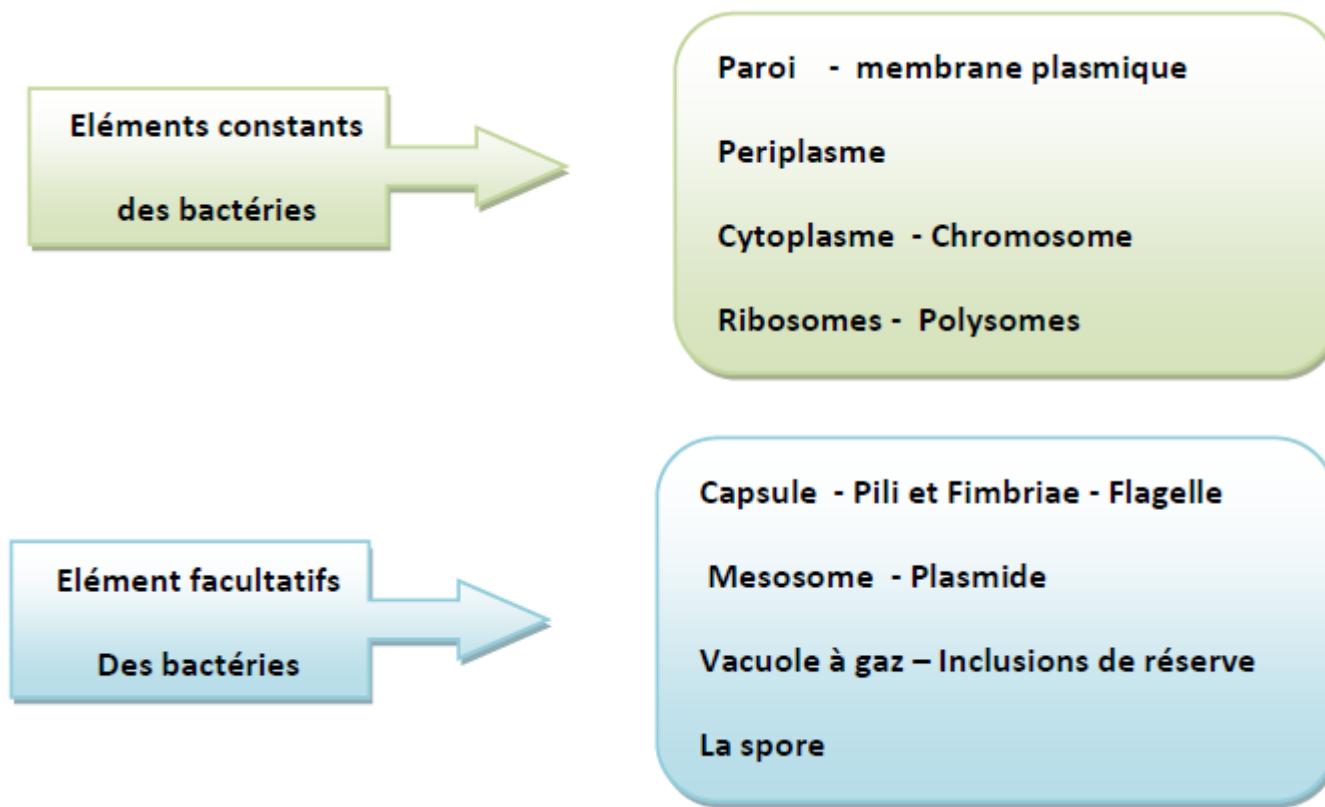
Bacillus
Grands bacilles en
chaînette



Quelques exemples des bactéries

II. 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 ».



Composition élémentaire de la cellule bactérienne (ex: 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

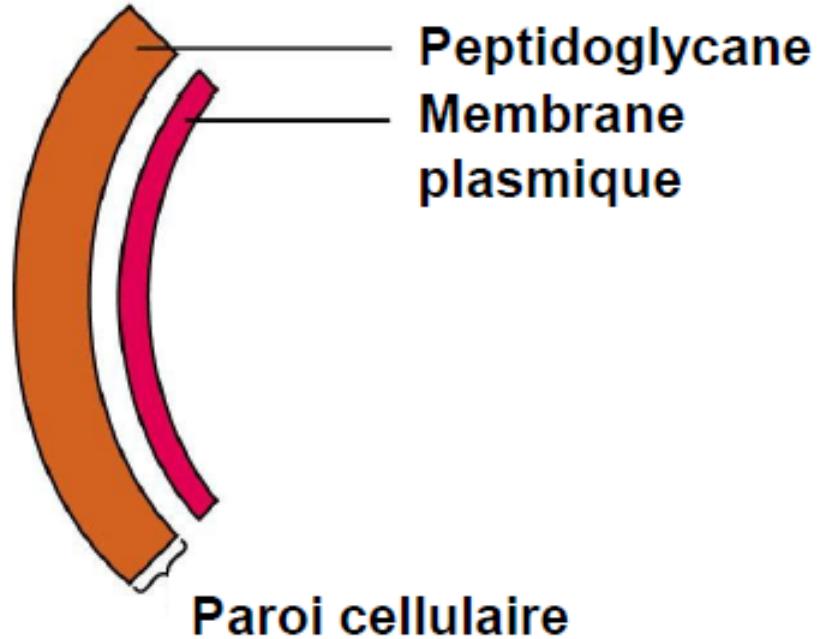
II.1. les éléments constants

1- La paroi bactérienne :

- C'est une barrière rigide présente chez presque toutes les bactéries.
- Elle joue un rôle de protection mécanique vis-à-vis de l'extérieur.
- C'est elle qui donne sa forme à la bactérie.
- sa composition qui est à l'origine des différentes réactions à la coloration de Gram (beaucoup moins développées chez Gram+).

La paroi joue un rôle essentiel dans la division cellulaire tout en servant de vecteur primaire à sa propre biosynthèse

Paroi d'une cellule Gram-positive



Paroi d'une cellule Gram-négative

Paroi cellulaire

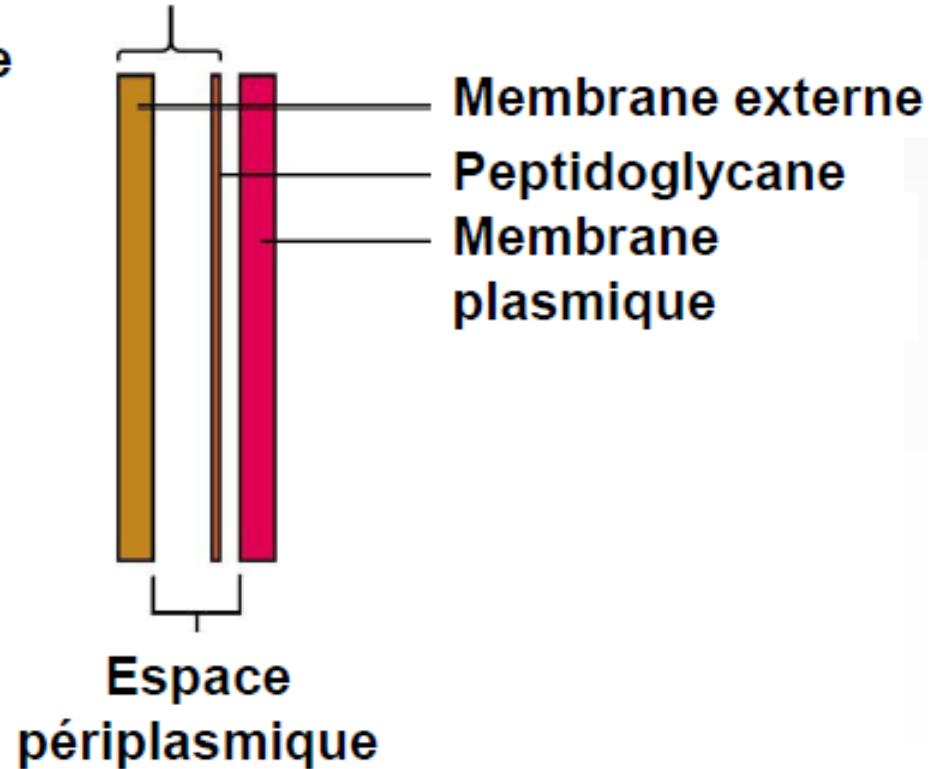


Schéma de la paroi bactérienne

La mise en évidence de la paroi

- Un isolement de la paroi aux autres éléments cellulaires pour son étude basé sur:
 - 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.

- Purification des parois brutes par centrifugation différentielle
- Un lavage à l'eau distillée pour éliminés les autres composants cytoplasmiques
- Observation par microscope électronique pour la vérification
- Étude chimique après la purification

La composition chimique des parois

- La paroi représente 20% du poids sec de la cellule bactérienne.
- On y rencontre des éléments diversement représentés selon les espèces.

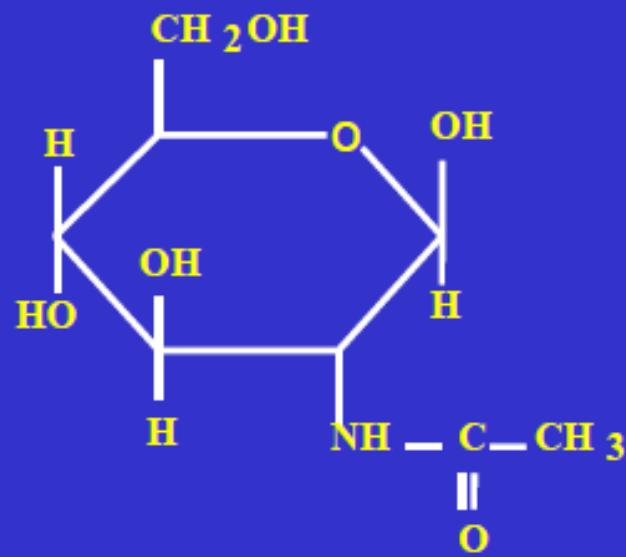
	bactéries à Gram +	bactéries à Gram -
Osamines	+++	+
Acides aminés	24-35%	50%
Acide diaminopimélique	+++	+
Acides teichoïques	+++	-
Oses	20-60%	20-60%
Lipides	1-2,5%	10-22%

Composition chimique globale de la paroi chez les bactéries à Gram (+ et -)

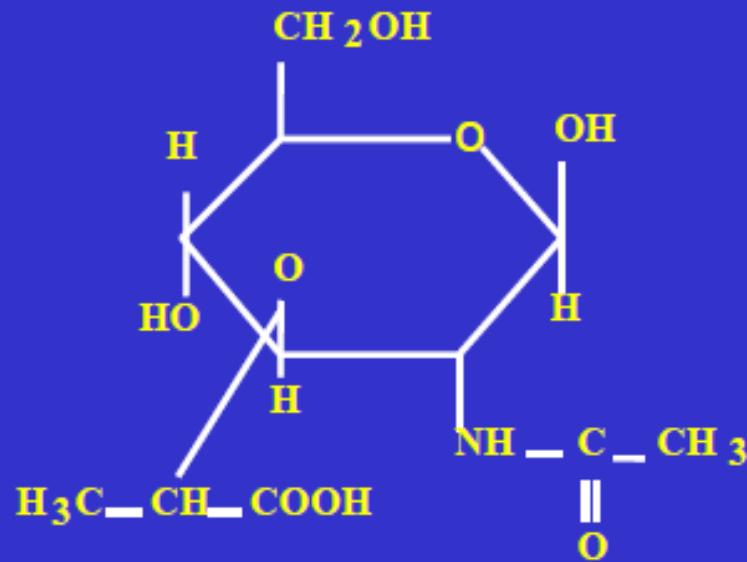
a- Les osamines (sucres aminés)

Sont des oses dont une fonction alcool (-OH) a été substituée par une amine (-NH₂)

① La N-acétylglucosamine

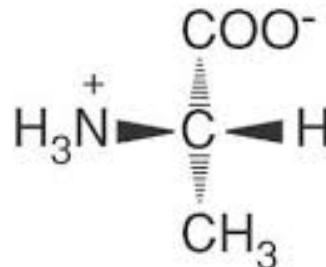


② L'acide N-acétylmuramique

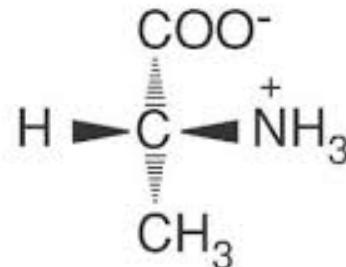


La galactosamine: Existe chez certaines espèces seulement et en faible quantité

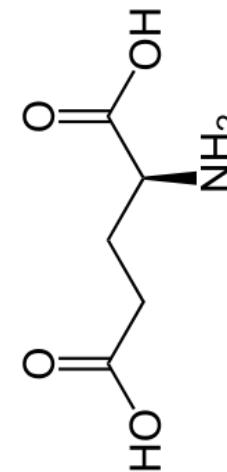
b- Les acides aminés



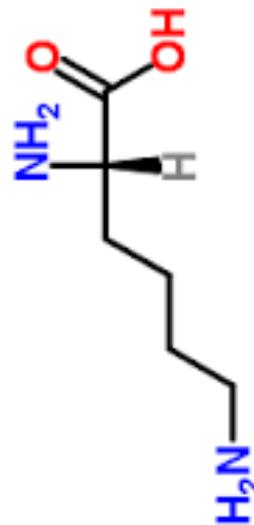
L-Alanine



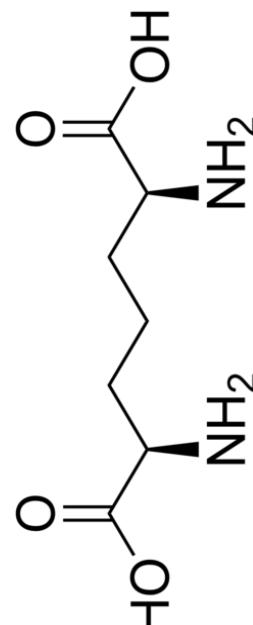
D-Alanine



Acide D-Glutamique



L-Lysine

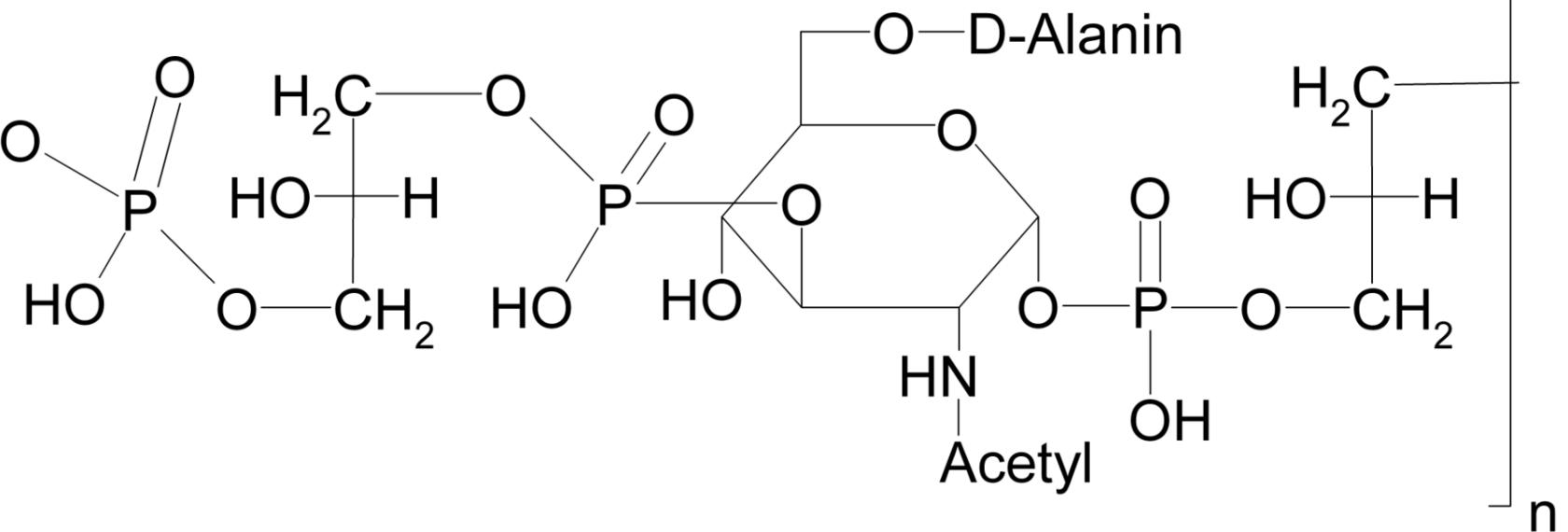


Acide Diamino-Pimélique (DAP)

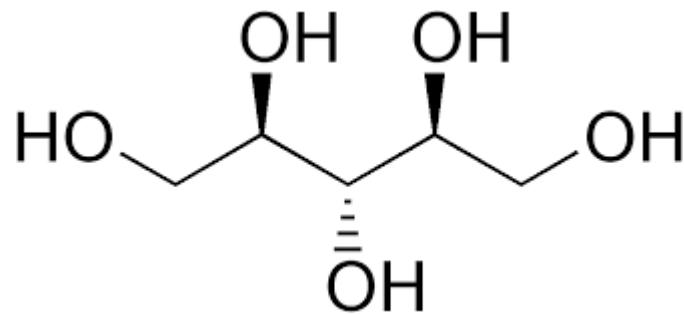
- Glycine → *Staphylococcus aureus*
- Acide aspartique → *Lactobacillus acidophilus*

c- Les acides téichoïques

- Les acides téichoïques sont composés de phosphates associés au glycérol ou au ribitol.
- localisés à l'extérieur de la paroi, qui permet au peptidoglycane de s'attacher à la membrane des bactéries
- Uniquement chez les bactéries Gram+, ce qui explique le fait que les bactéries à Gram - possèdent moins de peptidoglycane (5 à 20 % de la paroi).
- peuvent avoir un rôle antigénique.

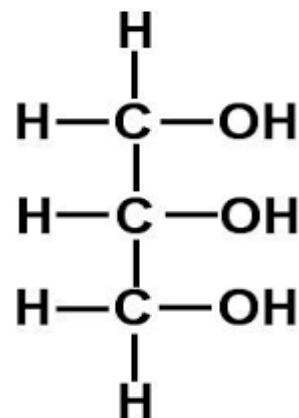


Les acides teichoïques



91

Ribitol



Glycerol

• d- Les oses simples

- Glucose, Galactose, Mannose ...
- Certains sont spécifiques (Rhamnose chez les *streptococcus* du groupe A)
- Leurs nature et type d'association: spécifié des antigènes

e- Les lipides

- faibles quantité chez les Gram -
- Presque absents chez les Gram +

f- Les acides mycoliques

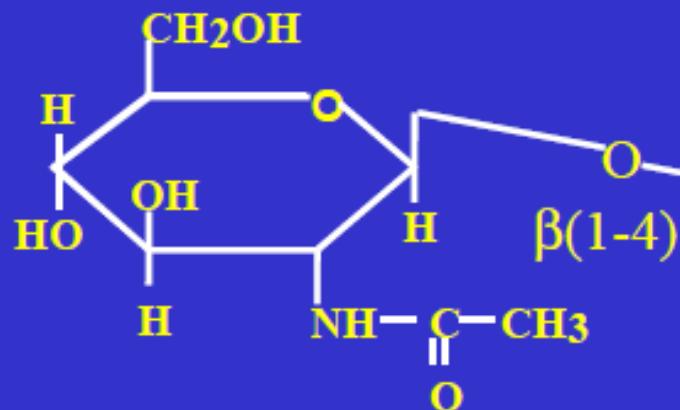
- présents chez certaines espèces particulières (les mycobacteries),acides gras a longues chaines (C=60)

Ex. Acide α -mycolique

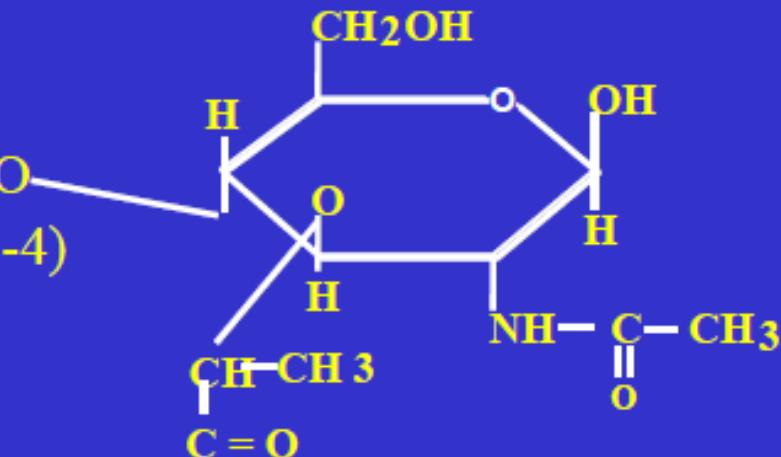
Structure moléculaire des PDG

- Le peptidoglycane: Muréine, Mucocomplexe, Mucopeptide
- L'unité structurale du peptidoglycane: un glucosaminopeptide

La N-acétylglucosamine



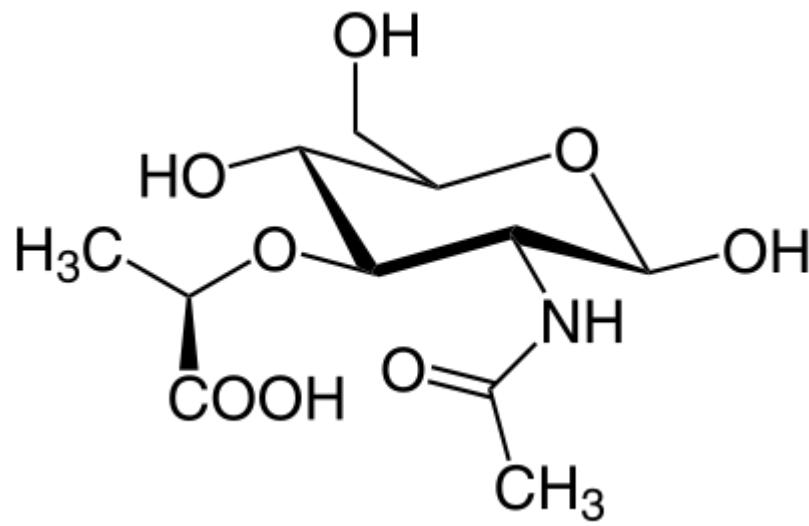
L'acide N-acétylmuramique



L-Alanine
Acide D-Glutamique
Lysine ou DAP
D-Alanine

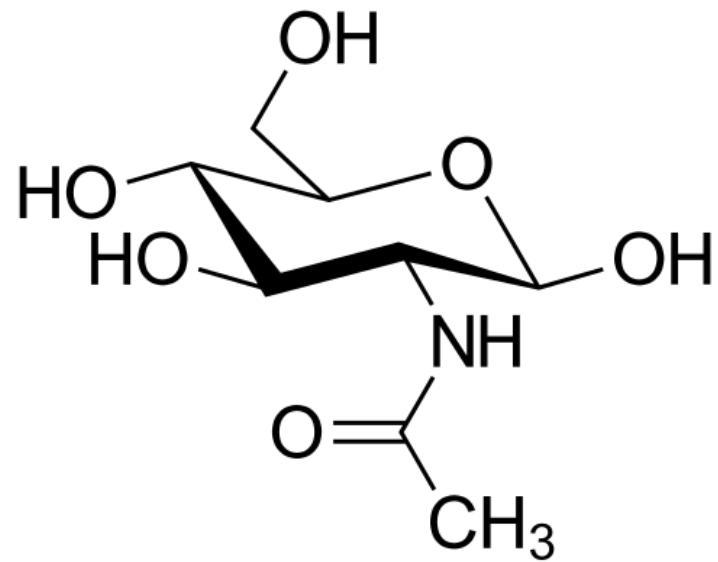
Chaînon peptidique

L'acide N-acétylmuramique

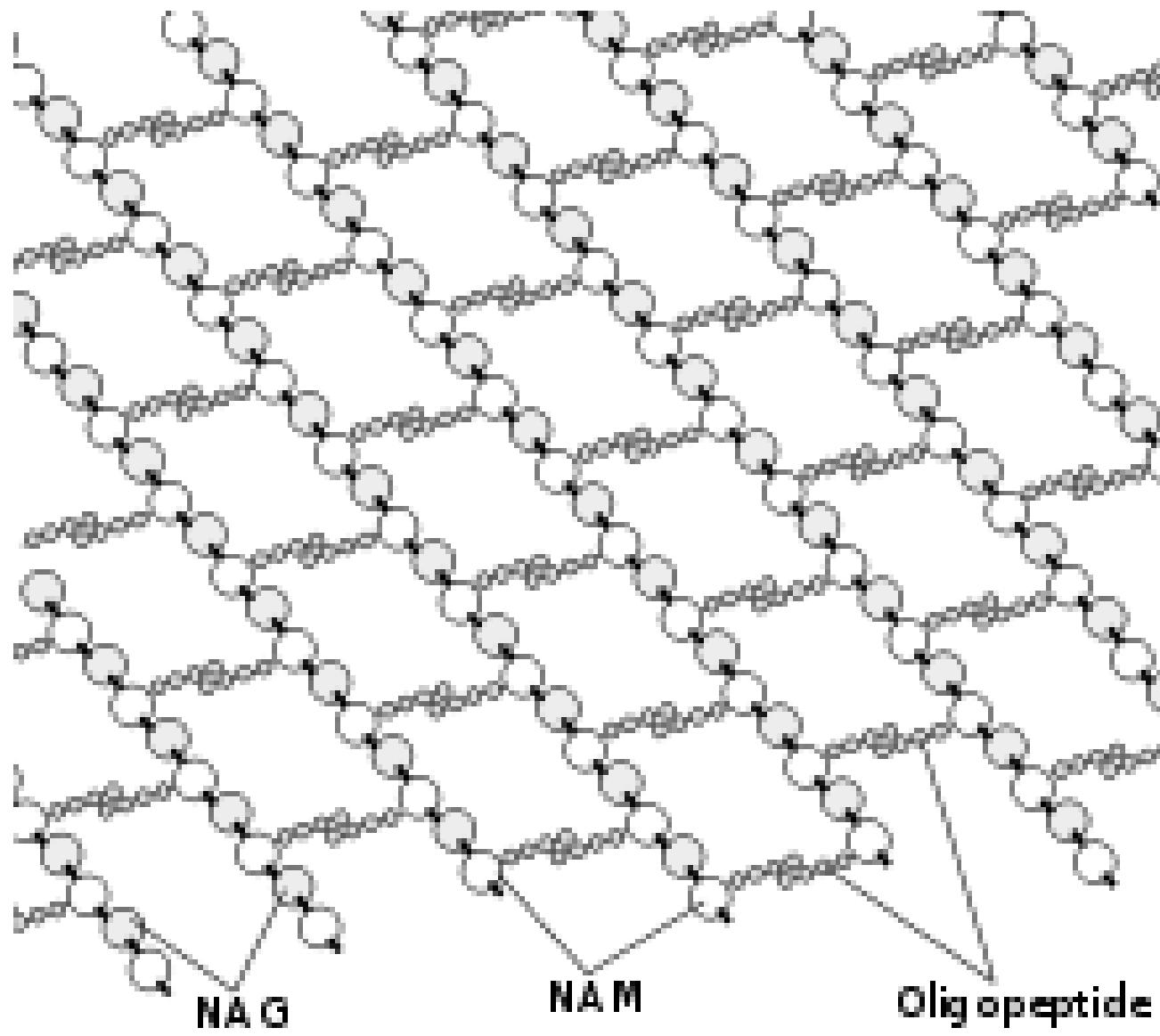


L'acide N-acétylmuramique (MurNAc) : éther d'acide lactique et de N-acétylglucosamine (GlcNAc)

N-acétylglucosamine

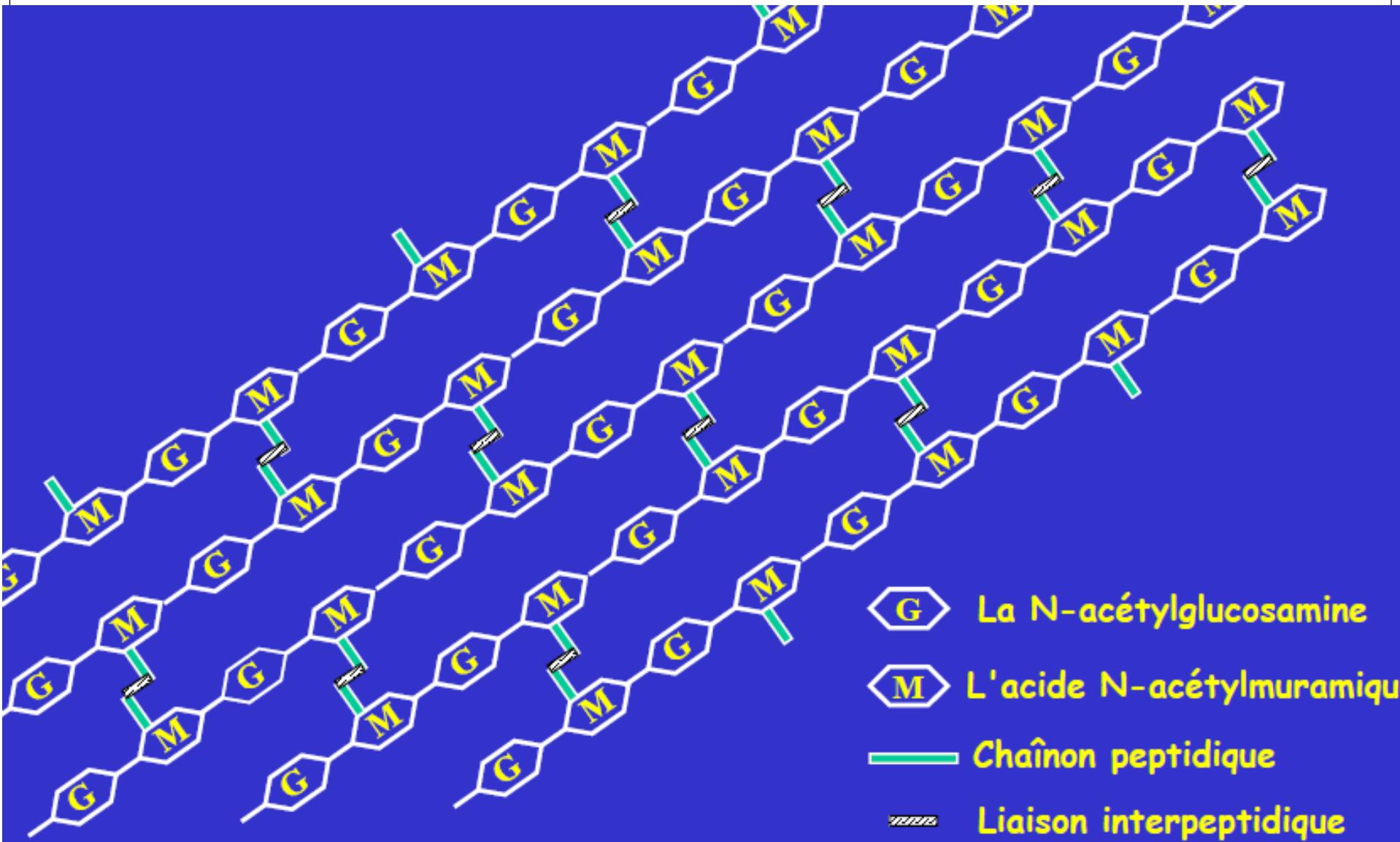


la N-acétylglucosamine: ose modifiée sur le carbone 2 où la fonction alcool est remplacée par un groupement N-acétyl constitué d'une fonction amide et du squelette de l'acide acétique.



Structure de peptidoglycane

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



Fonctions

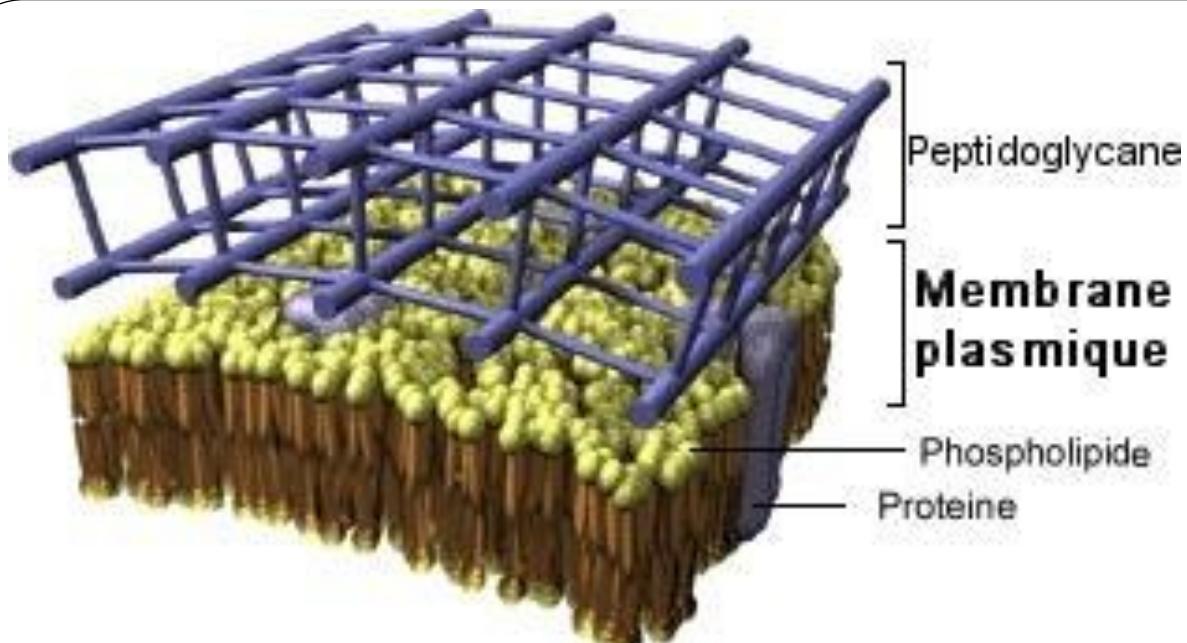
- La molécule de PDG assure la rigidité et la forme cellulaire.
- Capable de supporter des stress extrêmement élevés dus à la différence entre la pression osmotique du cytoplasme et celle du milieu extérieur à la bactérie.
- La pénicilline empêche la synthèse du peptidoglycane par les bactéries en s'intercalant dans le polymère.
- Cette synthèse étant inhibée, des mécanismes de lyse cellulaire se déclenchent : la pénicilline a donc un effet bactéricide, comme les autres antibiotiques de la famille des bêta-lactamines.

Paroi des bactéries à Gram positif

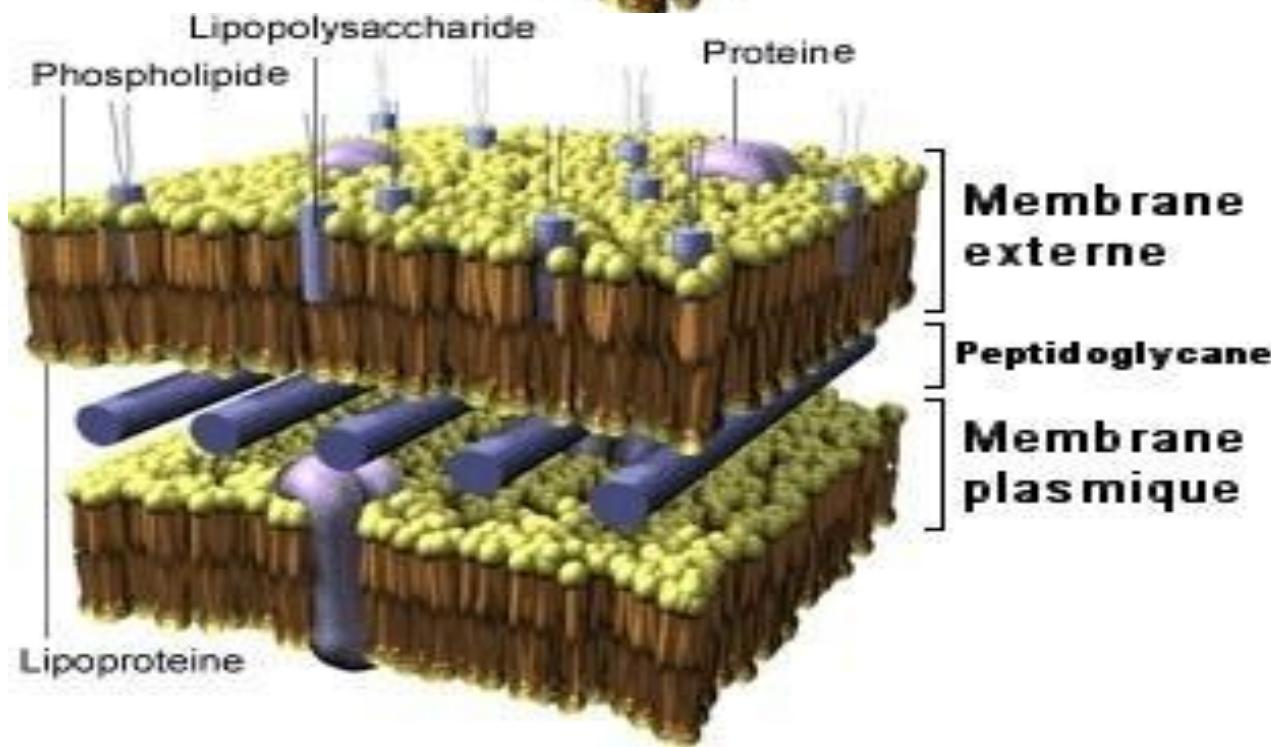
- paroi épaisse, d'aspect homogène.
- principal constituant = peptidoglycane associé à divers constituants (protéines, polysaccharides, acides teïchoiques (= antigènes importants)).

Paroi des bactéries à Gram négatif

- structure complexe
- couche mince de peptidoglycane
- à l'extérieur : la membrane externe comporte :
 - des lipopolysaccharides (LPS) avec un lipide A (toxique) + 1 partie polysaccharidique externe qui porte les antigènes O.
 - des protéines formant des canaux (porines).

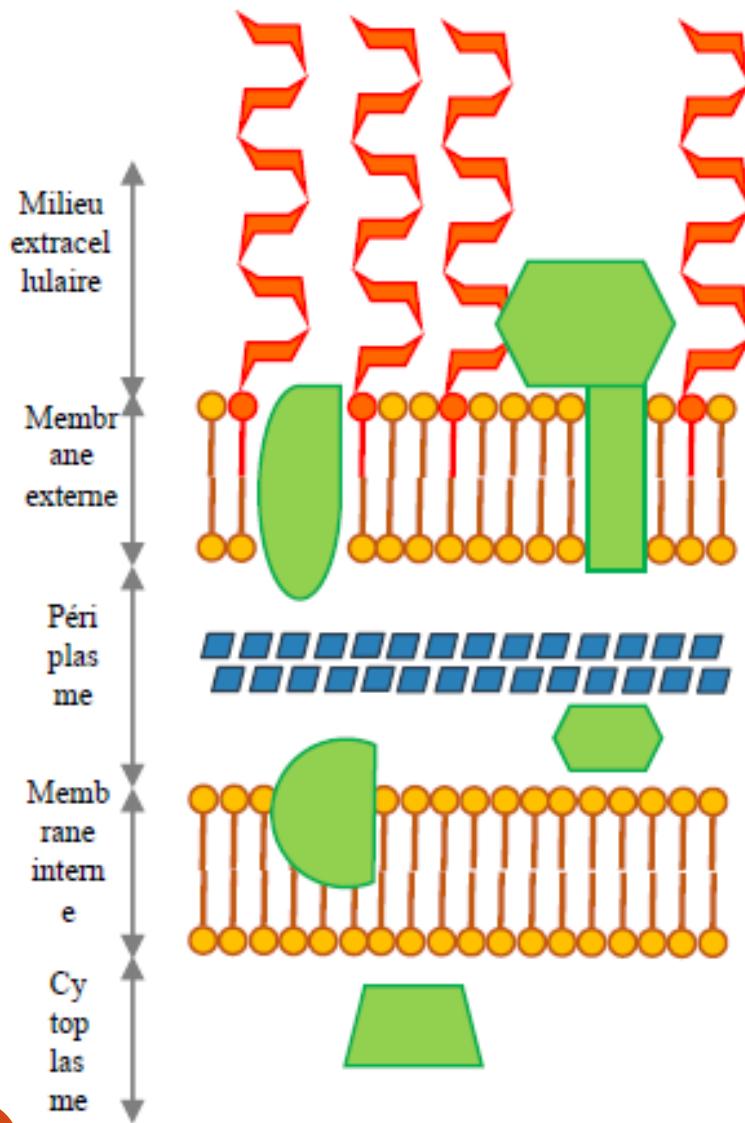


BACTERIE GRAM +

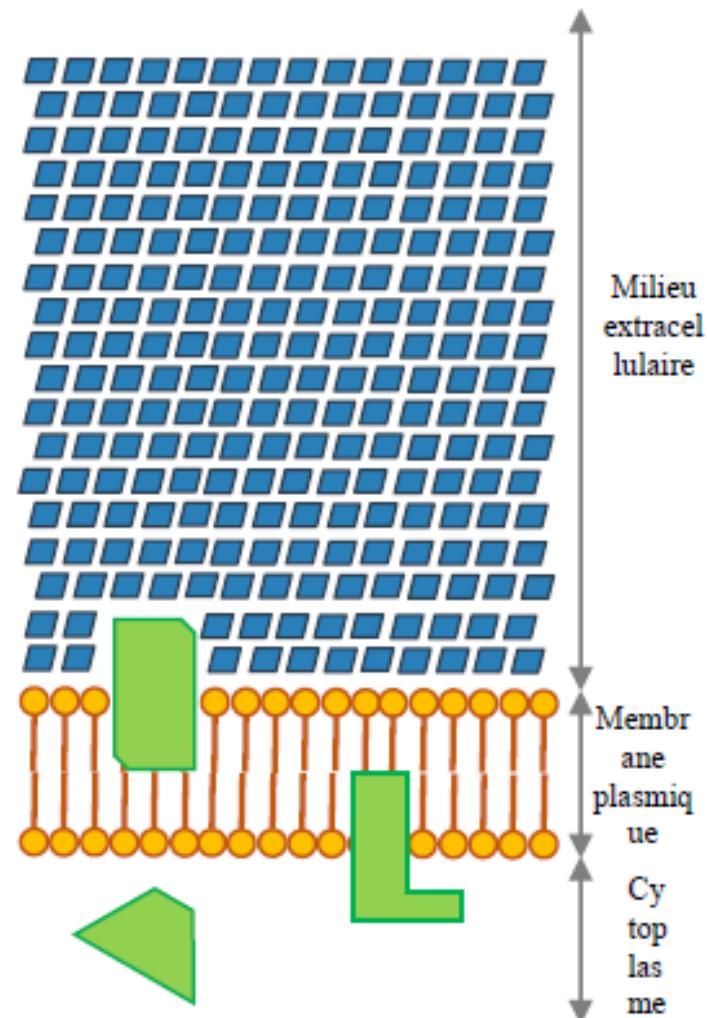


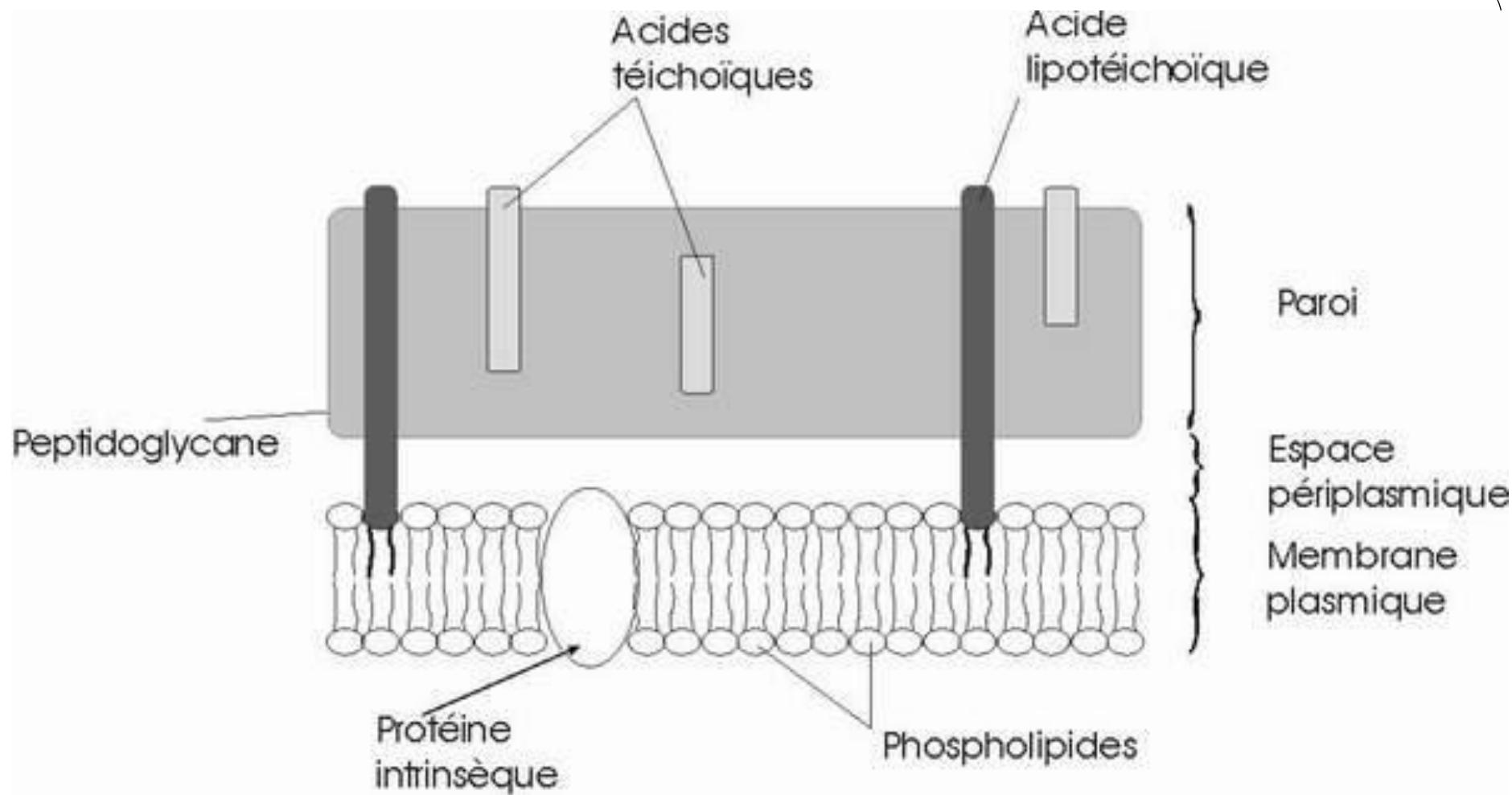
BACTERIE GRAM -

Gram négatives



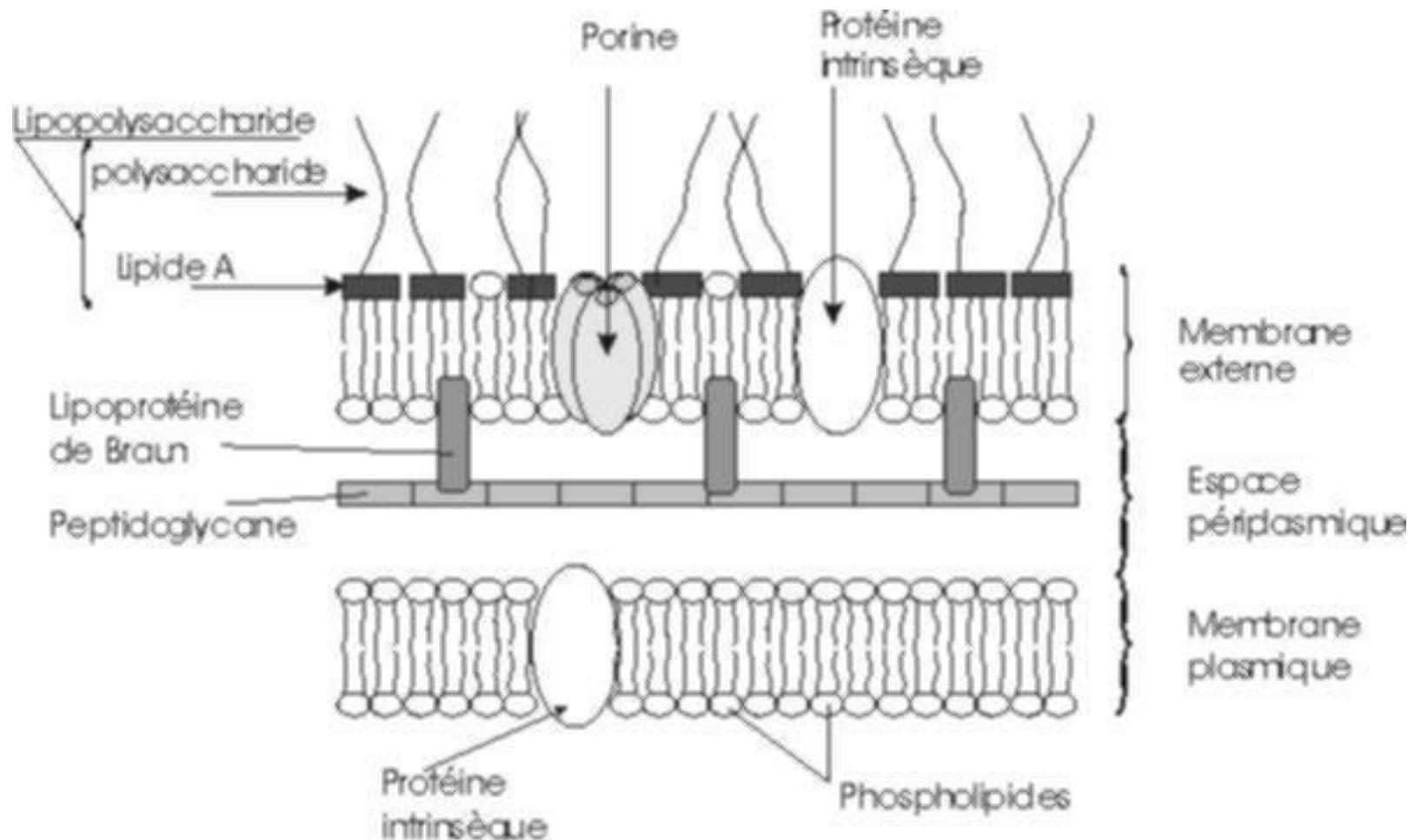
Gram positives





Paroi d'une bactérie Gram positif.

R.Moreda Lycée Lacroix Nafponne



Paroi d'une bactérie Gram négatif.

R.Moëda Iycée Sacré Coeur Narbonne

A. Paroi des Gram positifs

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

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

- Les bactéries Gram- possèdent une grande molécule externe appelée **lipopolysaccharide** (LPS).
- Composée d'une partie lipidique qui permet son ancrage dans la membrane externe et d'une longue chaîne de sucres.
- Cette molécule participe à la stabilisation de la paroi des Gram-.
- De façon intéressante, sa composition est très différente entre les espèces et légèrement différentes entre les différentes souches d'une même espèce.
- Quand deux souches d'une même espèce ont un LPS différent, on parle de **sérotypes** différents.

- Le LPS est donc souvent utilisé comme marqueur d'identification d'un échantillon bactérien.
- De plus, cette molécule est facilement reconnue par le système immunitaire humain, et sa détection entraîne une inflammation et une réponse immunitaire ;
- Le LPS est, du point de vue humain, un élément important de la réponse immunitaire face aux infections bactériennes.

• Principe de coloration de Gram

- La coloration de Gram colore les cytoplasmes des bactéries Gram+ en violet et des Gram- en rose.
- La différence de couleur obtenue par la coloration de Gram s'explique par une différence structurelle au niveau de la paroi des bactéries.
- Les bactéries Gram+ ont une paroi très épaisse, et une seule membrane.
- Les bactéries Gram- ont une paroi globalement plus fine et plus fragile, mais deux membranes lipidiques.

- L'étape dans l'alcool permet la décoloration des cellules, uniquement si elles sont Gram-, l'alcool ne pouvant franchir la couche de PDG des Gram+.
- La contre-coloration à la safranine marque les deux types de cellules mais ne se voit que sur les Gram- parce qu'elles ont été décolorées ; le rose ne se voit pas sur le fond déjà violet des Gram+.
- La couleur des cellules est déterminée par observation au microscope.

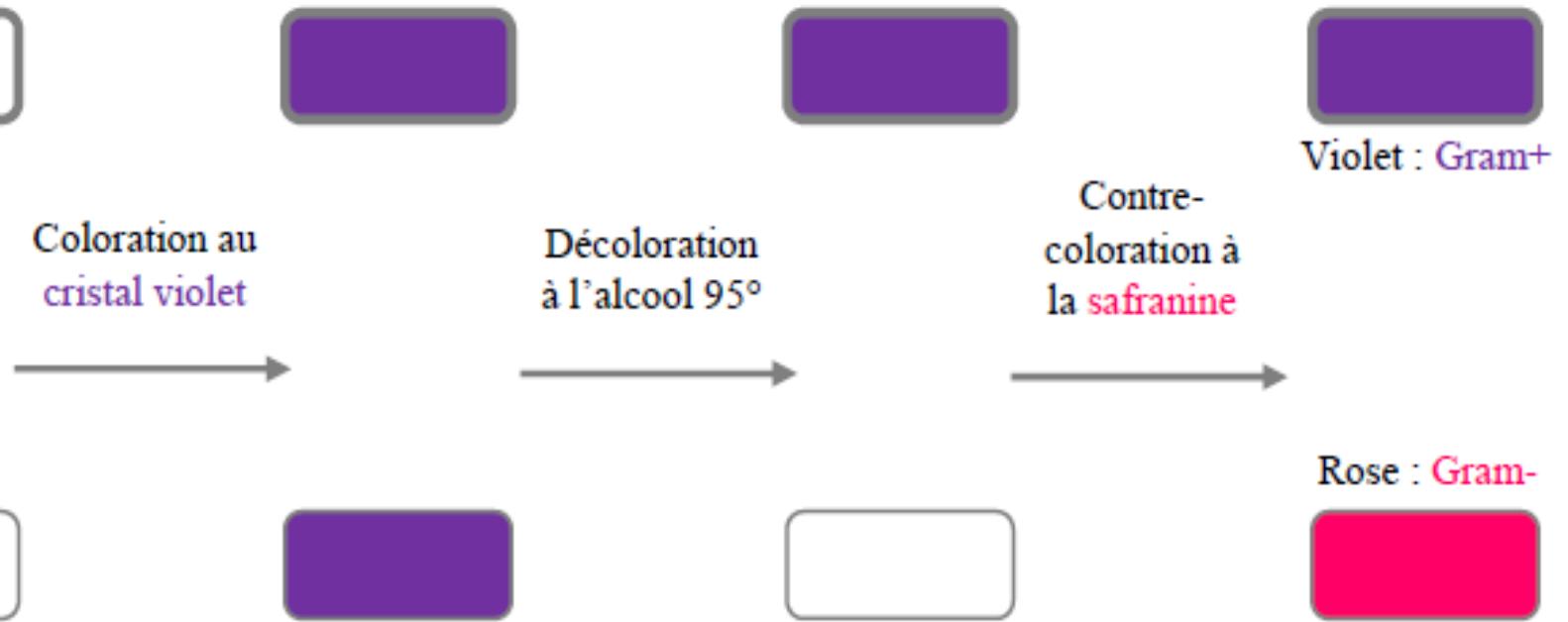


Figure: Schéma de la coloration de Gram

2. La membrane externe

Composition et structure

- La membrane externe est une structure particulière aux bactéries Gram négatives.
- Comme son nom l'indique, elle est localisée à l'extérieur de la molécule de PDG.
- Au microscope électronique, elle apparaît constituée de deux couches comme la membrane cytoplasmique, à laquelle elle est aussi apparentée par une composition chimique semblable.
- Il s'agit d'une membrane en bicouche lipidique contenant de nombreuses protéines à fonctions diverses, ainsi que des lipopolysaccharides.

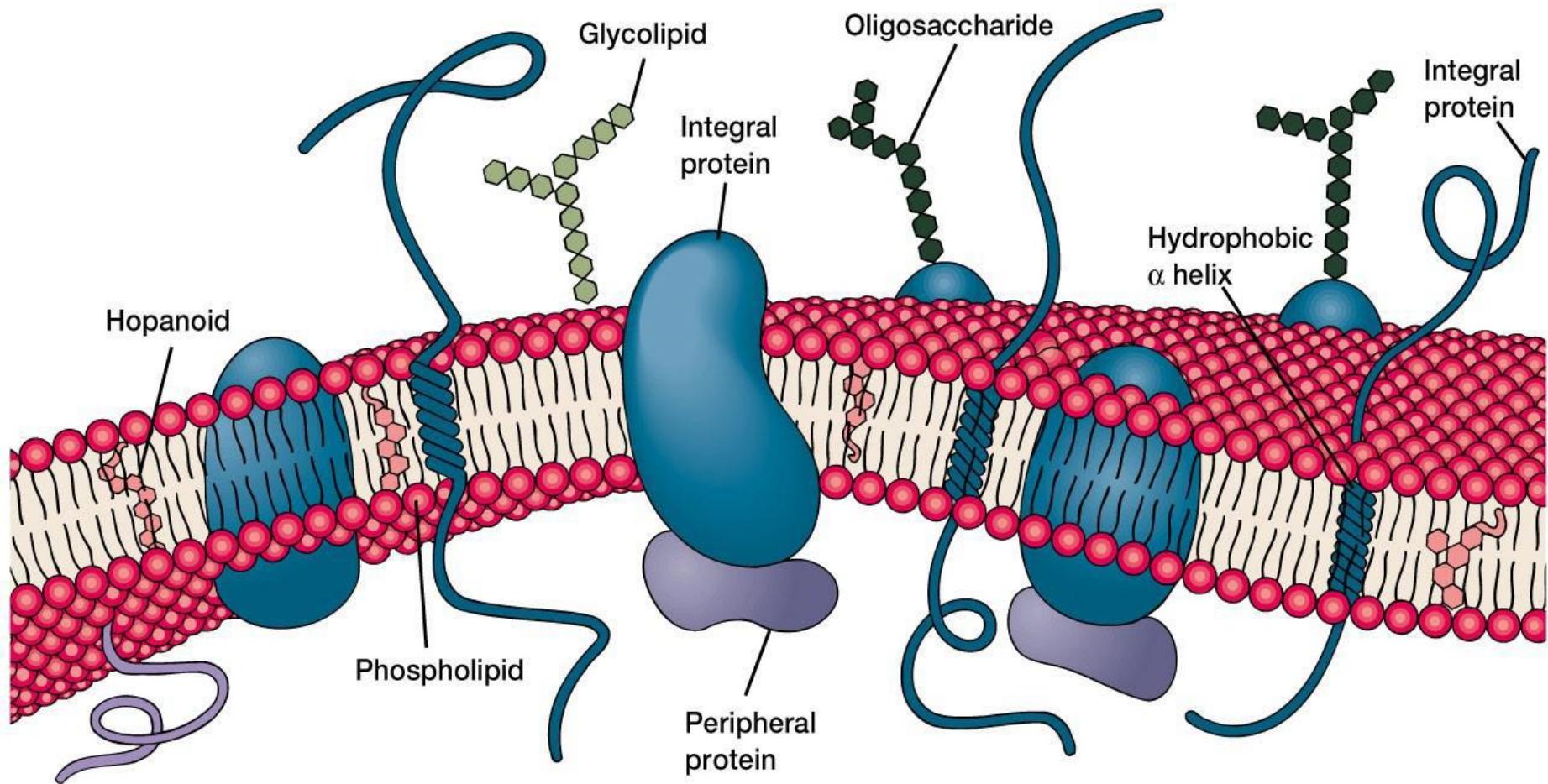
- Elle est reliée à la membrane plasmique par des jonctions appelées “ ponts de Bayer ”, jonctions à hauteur desquelles les couches lipidiques des deux membranes fusionnent.

3. L'espace périplasmique

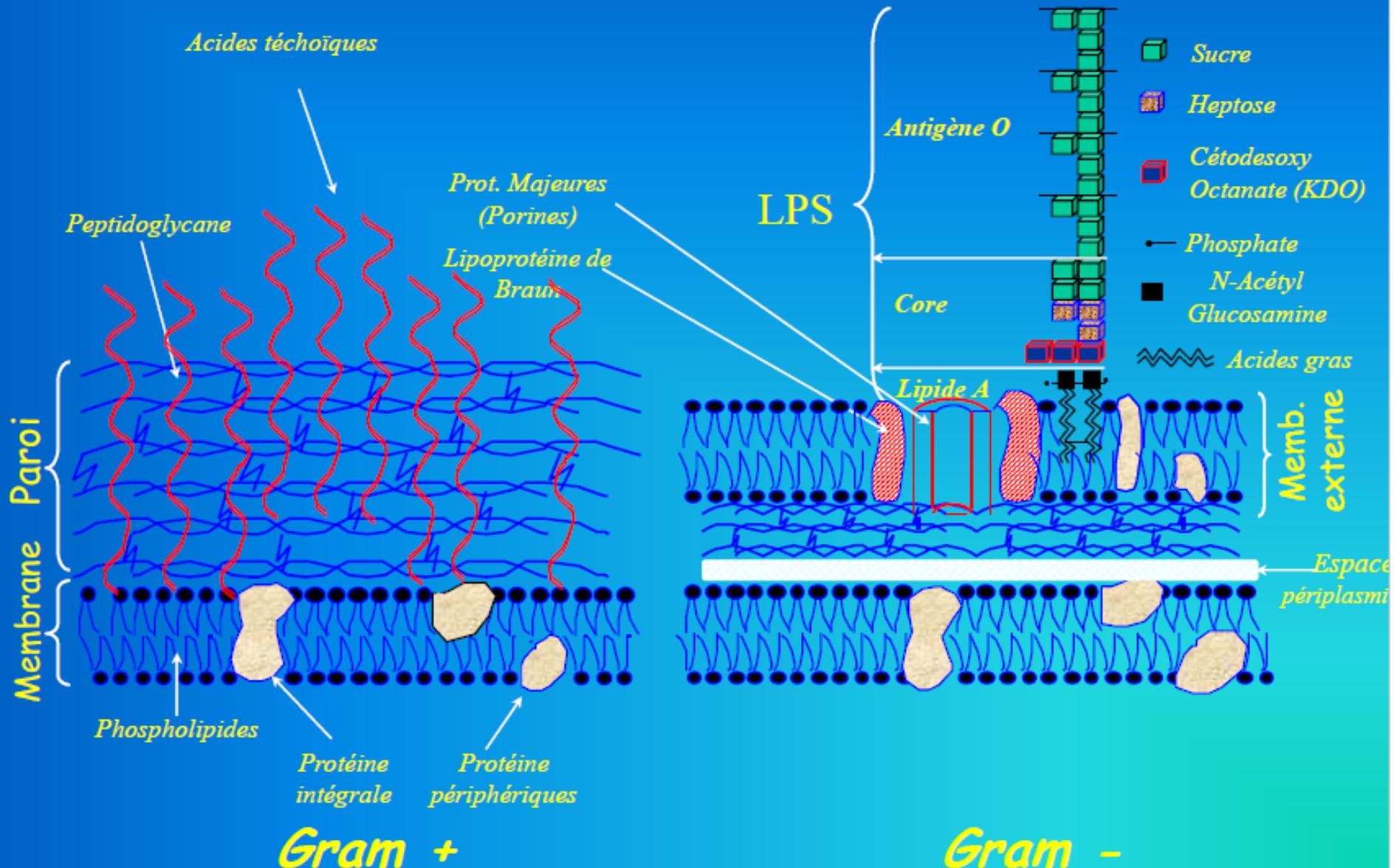
- Le périplasme est l'espace compris entre les membranes interne et externe des bactéries Gram négatives.
- Espace entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire (bactérie Gram-positive).
- Il s'y trouve des protéines qui assurent le transport de nutriments et d'autres molécules, la biogenèse de l'enveloppe cellulaire, la détoxification de molécules...
- Ces protéines sont attachées à l'une des deux membranes ou sont libres.
- Espace périplasmique : peut contenir des enzymes inactivant certains ATB.

4. Membrane plasmique

- La membrane plasmique des bactéries a une structure proche de celles des eucaryotes, elle sert de barrière chimique entre l'environnement extérieur et le cytoplasme de la bactérie.
- Représente le point principal de contact avec le monde extérieur.
- La membrane plasmique est composée de lipides et de protéines.
- Les lipides forment une double couche.
- Les protéines sont enfouies dans la membrane.
- Structure organisée, asymétrique, flexible et dynamique.



Modèle de la membrane en mosaïque fluide



Composition et structure

- La membrane plasmique des bactéries est semblable à celle des cellules eucaryotes et joue le même rôle : limiter le cytoplasme.
- Elle est identique pour l'ensemble des eubactéries.
- Sa structure est : une double couche (8 nm) de lipides (30 à 40 %) avec insertion de protéines (60 à 70 %).
- Les phospholipides qui la composent représentent 75 % de la teneur cellulaire totale en lipides.

- Les protéines membranaires interviennent dans de nombreux processus de la vie de la cellule bactérienne : réactions enzymatiques, transports actifs, relais d'hormones et de toxines qui ne peuvent la franchir.
- Certains antibiotiques (les polymyxines), divers antiseptiques et des toxines bactériennes (colocines, bactériiocines) ont pour lieu d'action la membrane plasmique.

Fonctions

- Son rôle essentiel est d'être une barrière hydrophobe et osmotique.
- L'eau et certaines petites molécules hydrophiles diffusent librement, tandis que les plus grosses molécules hydrophiles la franchissent par l'intermédiaire de transporteurs protéiques (perméases).
- Si cette imperméabilité fonctionnelle est perturbée par création de pores, les grosses molécules diffuseront librement et la mort cellulaire s'ensuivra.
- Inversement, les protéines sécrétées doivent la traverser pour atteindre le périplasme et le milieu extérieur.

- Divers composants de la chaîne respiratoire qui assurent le transport d'électrons et les phosphorylations oxydatives sont aussi localisés dans la membrane cytoplasmique.
- Les enzymes de synthèse du peptidoglycane y sont aussi localisés.

5. Cytoplasme

- Est un gel colloïdal, qui contient 80 % d'eau et des substances organiques et minérales, à une pression interne considérable (5 à 20 atmosphères).
 - plus simple que les Eucaryotes.
 - dépourvues des mitochondries
 - très riche en ARN soluble, surtout ribosomal : environ 15000 ribosomes.
 - les ribosomes sont constitués de protéines et d'ARN (ARNr16S, ARNr23S et ARNr5S).

Ils sont classiquement divisés en 2 sous-unités : 30S et 50S.

6. Chromosome ou appareil nucléaire

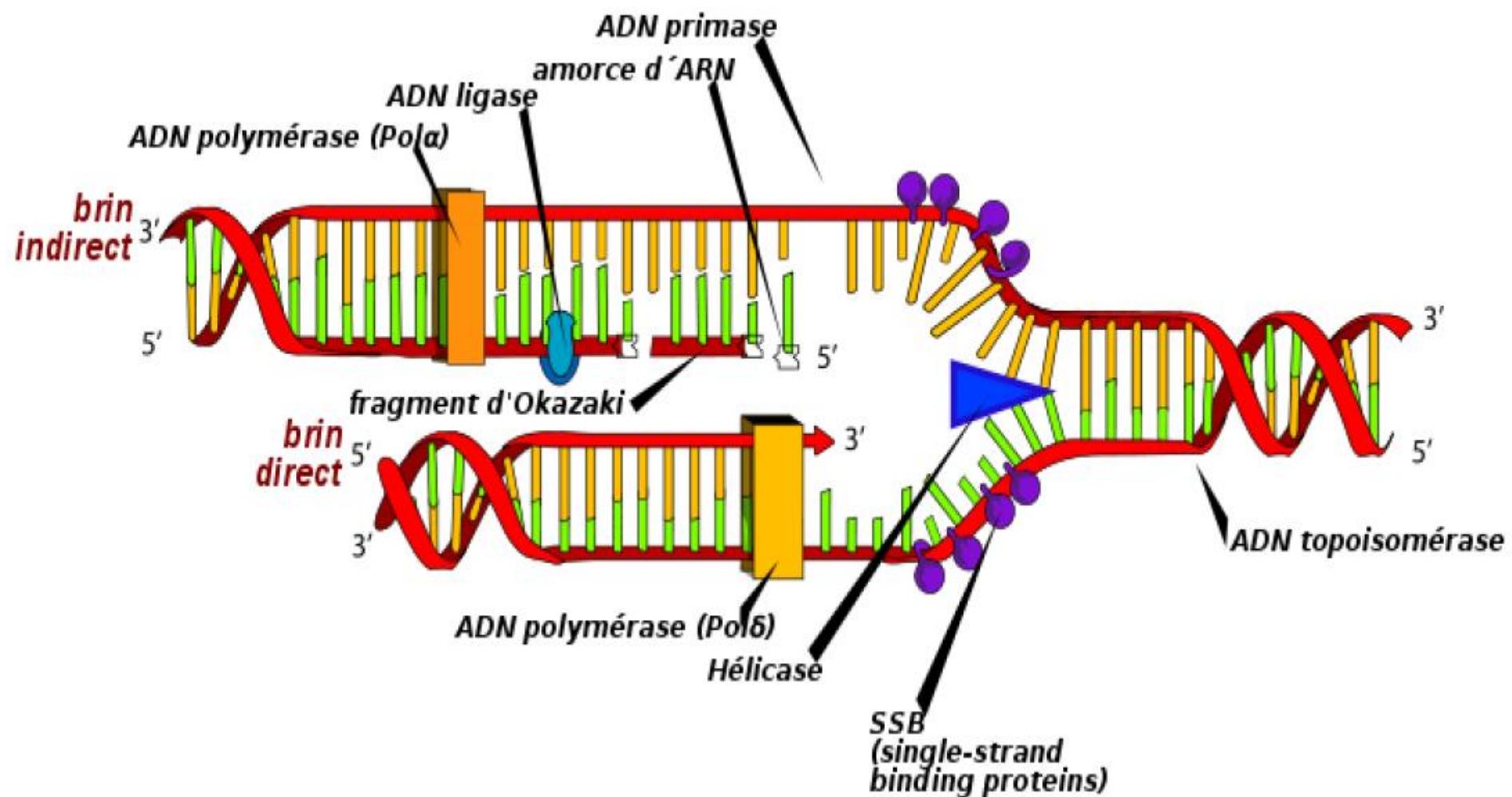
- Le chromosome de la cellule procaryote est situé dans une région de forme irrégulière appelée nucléoïde.
- Le chromosome est le plus souvent unique
- C'est le support de l'information génétique.
- Il s'agit d'une formation en double hélice circulaire (parfois linéaire), surenroulée grâce aux topo-isomérases. Longueur 1 mm.

Composition

- L'ADN ou acide désoxyribonucléique est un polymère de PM élevé, composé d'unités appelées nucléotides.
- Nucléotide : Groupement phosphoré + sucre à 5 atomes + une base purique ou pyrimidique .
- Bases puriques : Adénine A et Guanine G
- Bases pyrimidiques : Cytosine C et Thymine T
- Le sucre : Désoxyribose
- Le groupement phosphoré : est un phosphate diester en 3' et 5' du désoxyribose
- Il y a autant de « A que de T » et autant de « C que G » par contre le rapport $(A+T)/(G+C)$ mieux connu sous le nom de coefficient de Chargaff varie selon les espèces.
- On l'exprime en GC%: 50% chez E.coli, 60% chez Pseudomonas, 25 à 45% chez Clostridium.

RéPLICATION de l'ADN

- Permet d'obtenir, à partir d'une molécule d'ADN, deux molécules identiques à la molécule initiale.
- La réPLICATION est semi-conservative : Chaque chaîne parentale reste associée à la nouvelle chaîne pour qui elle sert de matrice.
- La réPLICATION est bidirectionnelle.



Mécanisme de réPLICATION d'ADN chez les procaryotes

Mécanisme moléculaire de la réPLICATION

- Plusieurs enzymes sont impliquées :
 - **ADN polymérase I, II, III** : catalysent l'addition de désoxyribonucléotides à l'extrémité d'une chaîne d'ADN, elles ont aussi une activité exonucléasique.
 - **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.
 - **Hélicase** : Elle ouvre les chaînes d'ADN avant la réPLICATION.
 - **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 déspiralisation se fait à 10000 Tours/minute.

C'est grâce à la découverte de la Gyrase qu'on a pu expliquer ce phénomène.

- La réPLICATION déBUTE en un point spéCIFIQUE (le point d'initiation).
- Au niveau de 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: est appelé brIN préCOCE ou avANCÉ.

L'autre à extrémité 5' sera synthétisé par fragments d'Ogasaki : brIN tardif.

- Ces fragments de 1000 à 2000 résidus nécessitent des amorces d'ARN synthétisées par une ARN polymérase DNA dépendante appelée primase.
- Ensuite ces amorces ARN sont excisées par l'ADN polymérase I et les délétions sont remplacées par de l'ADN par cette même enzyme.

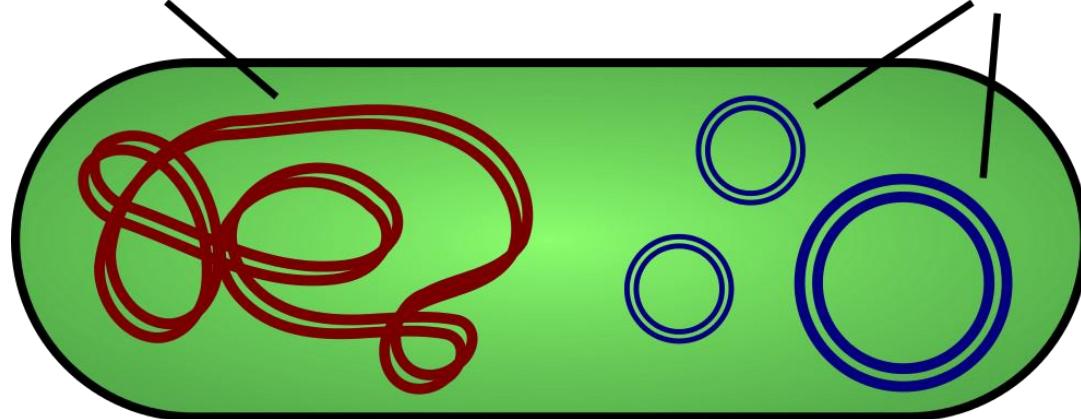
- Enfin l'ADN ligase relie les différentes séquences au niveau de leurs extrémités 3'OH et 5'OH libre.
- Durant toutes ces étapes, les d'ADN matrice sont maintenus déroulés et stabilisés par des protéines appelées « DNA binding proteins ».

II. 2. les éléments facultatifs

1. Plasmides

- Des molécules d'ADN double brin qui se répliquent indépendamment du chromosome, qui peuvent s'intégrer à celui-ci et qui sont transmissibles.
- Ils sont porteurs de caractères de fertilité (Facteur F), de résistance aux antibiotiques (Facteur R), de bactériocines (plasmides Col), de virulence, de résistance aux antiseptiques, de caractères métaboliques.
- Les plasmides peuvent donner un avantage sélectif à la bactérie.
- Les plasmides peuvent être éliminés spontanément de la cellule hôte.

ADN bactérien



Plasmides

Schéma d'une bactérie



Plasmide observé par microscope électronique

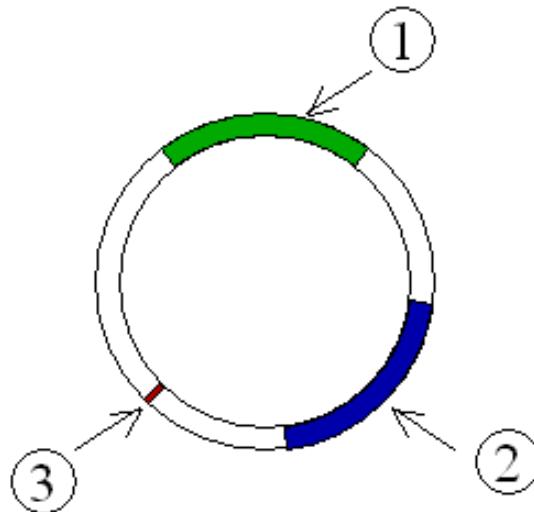


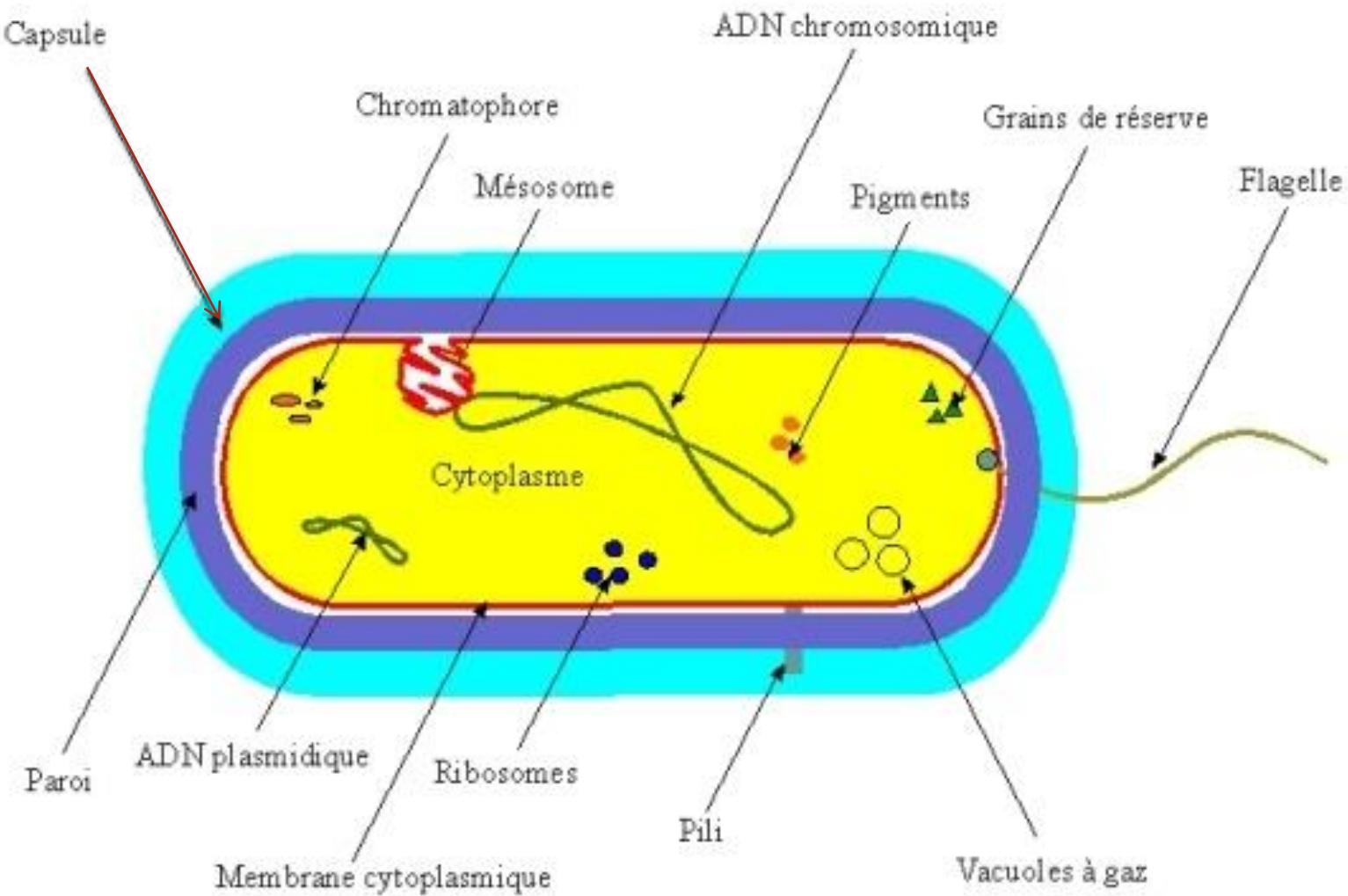
Schéma d'un plasmide codant la résistance à un antibiotique donné.

- 1 , 2: Gènes codants la résistance.
3: Origine de réPLICATION.

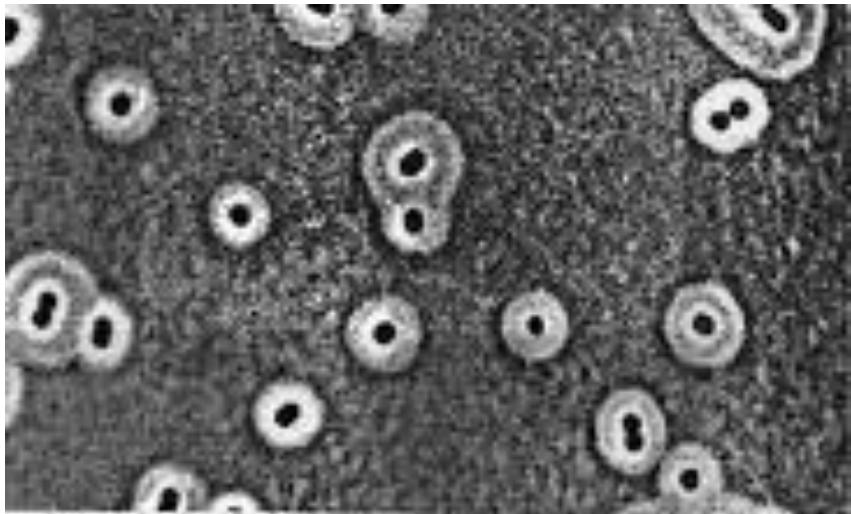
2. Capsules

- Ce constituant inconstant est le plus superficiel.
- Sa mise en évidence s'effectue par coloration négative (le colorant, encre de Chine ou Nigrosine est repoussé par la capsule et apparaît en clair sur fond noir).
- Constitué de polysaccharides acides (sucres sous forme d'acides uroniques tel l'acide galacturonique, l'acide glucuronique, mais aussi sous forme de sucres phosphorés)
- Ce composant est lié à certains pouvoirs pathogènes, car il empêche la phagocytose.

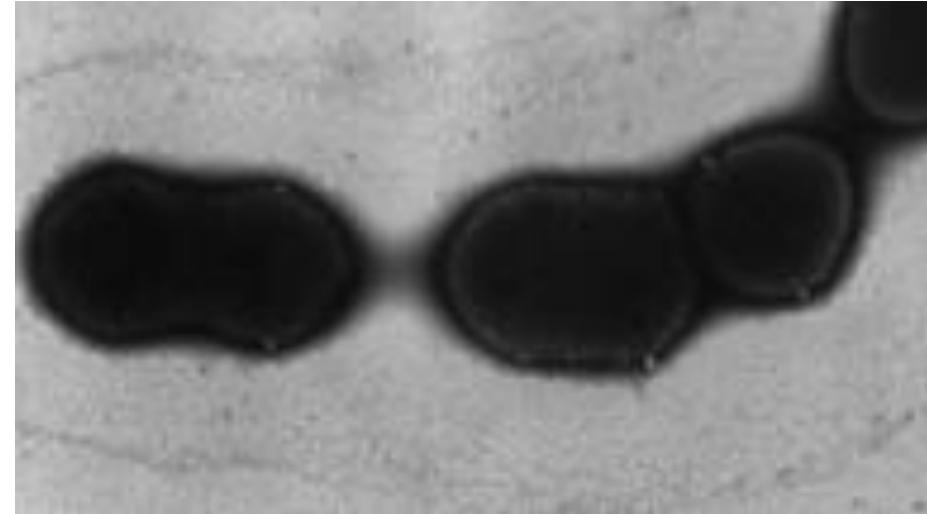
cellule bactérienne



- La capsule de *Bacillus anthracis* est constituée d'un polypeptide d'acide D-glutamique.
- Les polymères capsulaires purifiés sont la base de certains vaccins (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*).



Coloration à l'encre de chine



Observation de capsule par microscopie électronique

- 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.
 - ✓ **Antigénique** : les Ag capsulaires sont responsable de la spécificité sérologique (Ag K).

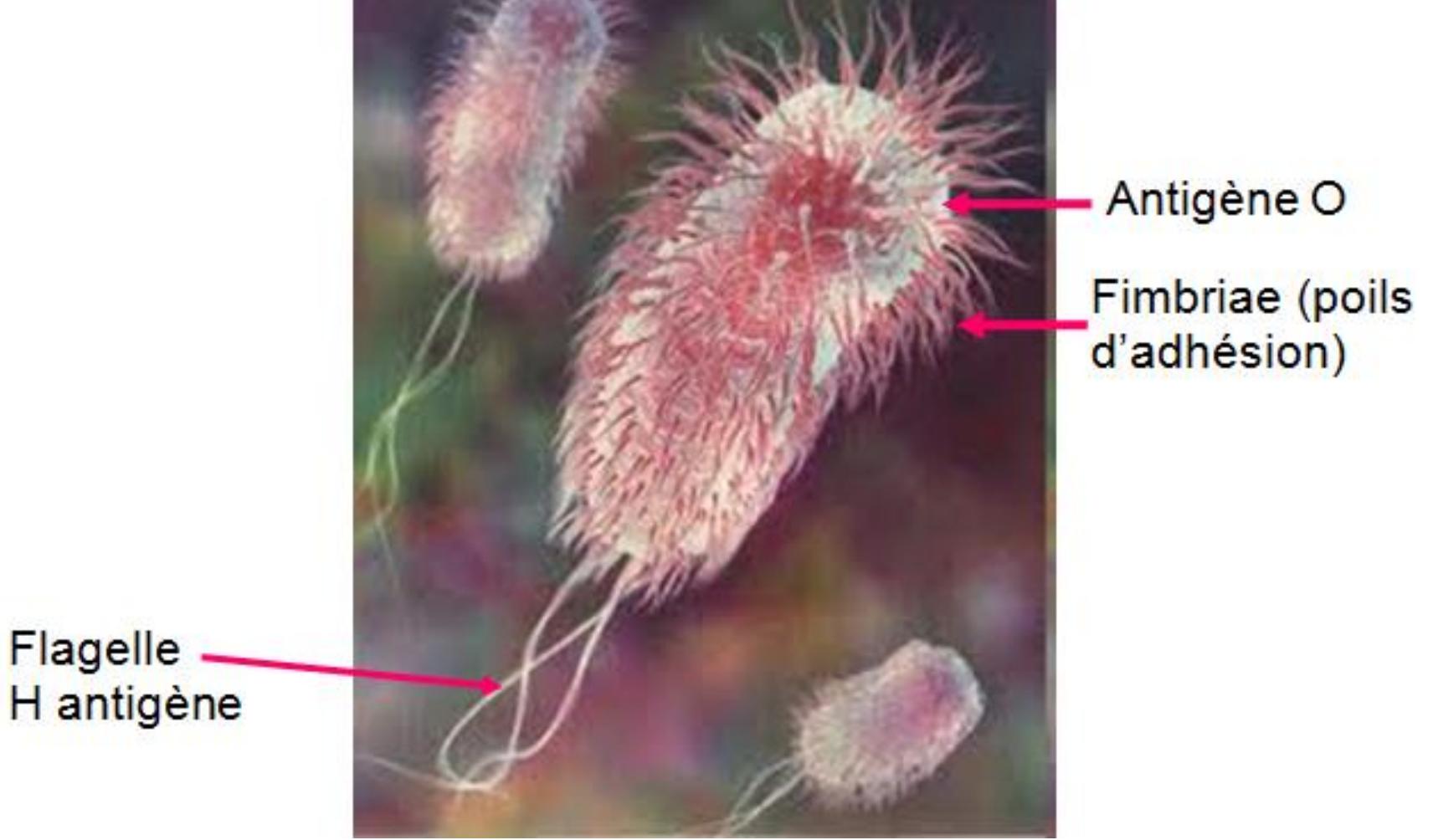
A partir de cette propriété, une classification peut être établie (ex : 70 types sérologiques différents chez *Streptococcus pneumoniae*).

3. Glycocalyx

- Ce sont des polymères de nature polysaccharidique extrêmement fréquents entourant la bactérie et difficiles à visualiser, sauf en microscopie électronique.
- Le feutrage des fibres de glycocalyx est constant dans le cas de bactéries vivant en biofilm dans les conditions naturelles.
- Le glycocalyx est aussi appelé slime car il englue les cellules.
- Il est responsable de l'attachement des bactéries aux cellules (cellules buccales, respiratoires, par exemple), à des supports inertes (plaque dentaire sur l'email dentaire, biofilms sur les cathéters, ou les prothèses dans le cas de bactéries d'intérêt médical).

4. Flagelles

- Ce sont des structures inconstantes.
- De nature protéique (flagelline), long de 6-15 µm.
- Ancrés dans le cytoplasme par une structure complexe.
- Ont un rôle :
 - la mobilité de la bactérie (implantation monotrichie/polaire ou péritrichie)
 - antigénique utilisé (sérodiagnostic) pour la différentiation des espèces bactériennes.



Escherichia coli O₁₀₄H₄ observée au microscope

Il y a 4 types de ciliature:

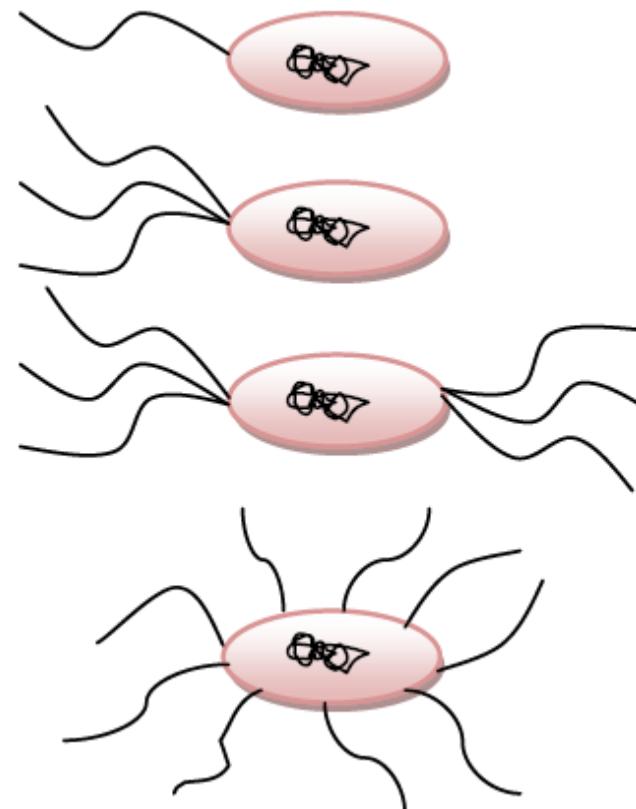
Monotrichie : 1 seul flagelle polaire (*Pseudomonas aeruginosa*)

Lophotrichie : plusieurs flagelles polaires (*Stenotrophomonas maltophilia*)

Amphitrichie : 1 flagelle à chaque pôle (déplacement oscillant)

Péritrichie : flagelles entourant la bactérie: Entérobactéries

Monotrichie



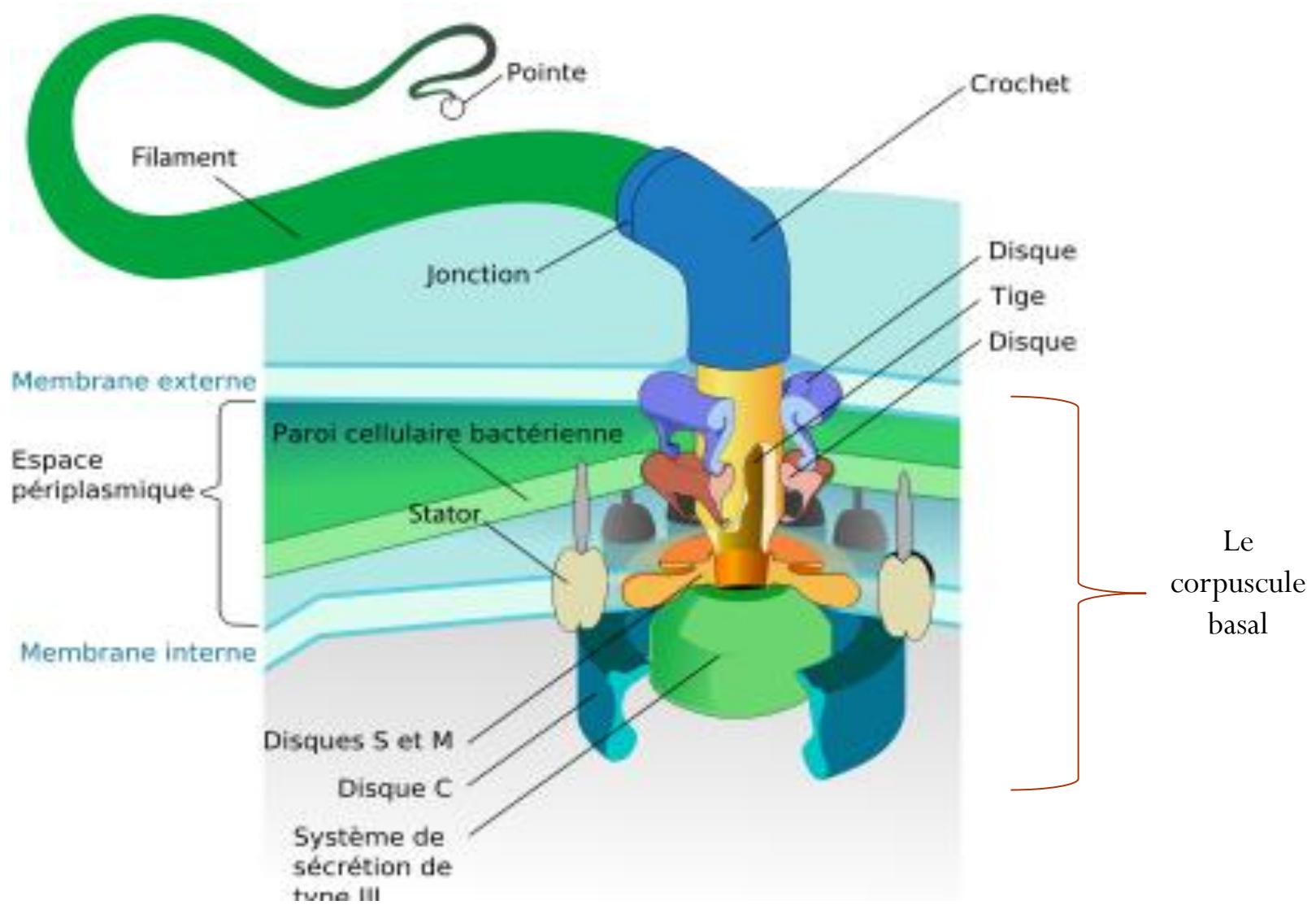
Lophotrichie

Amphitrichie

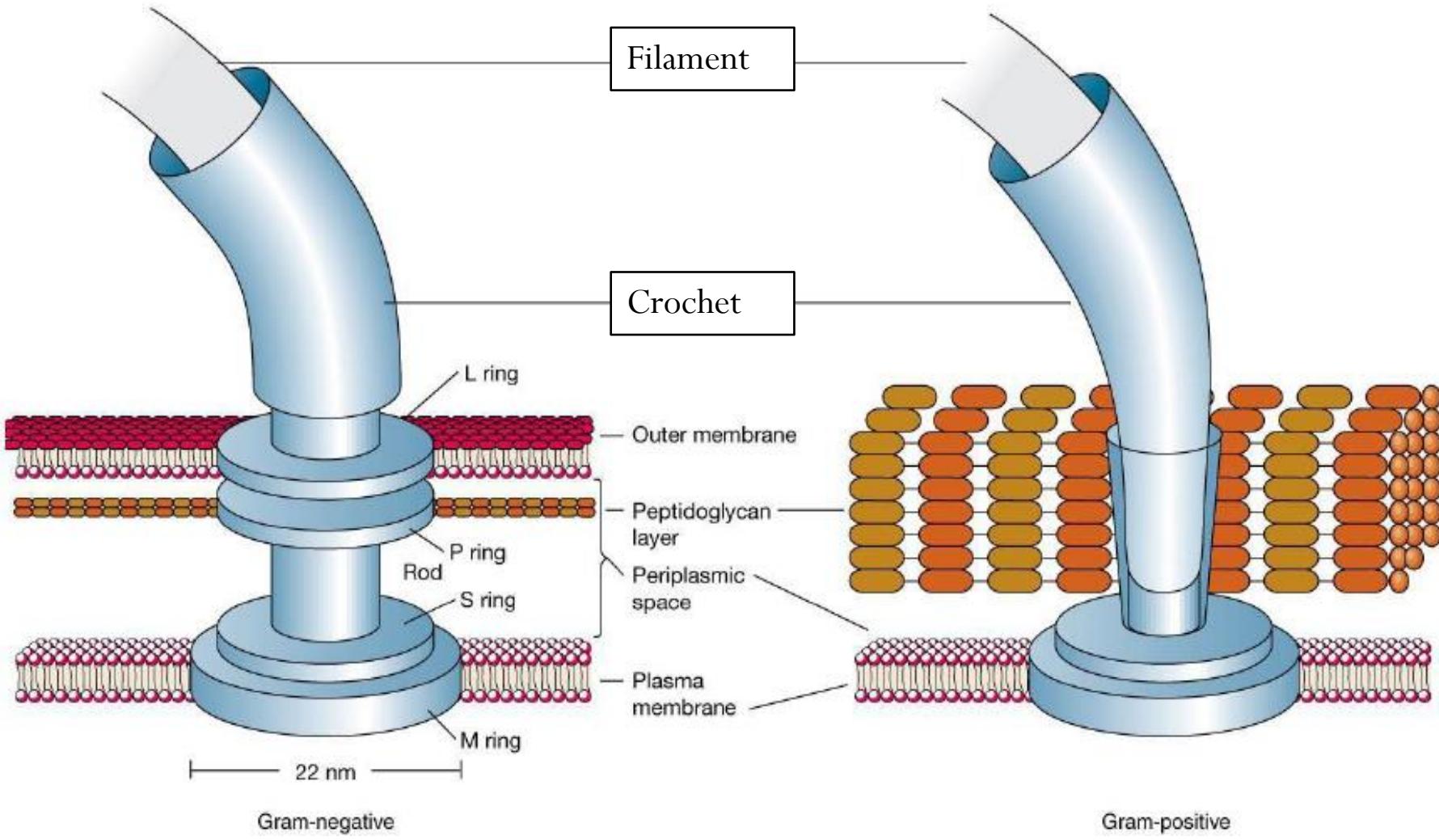
Peritrichie

Insertions polaires

Insertion Péritrichie



Structure des flagelles



Structure du flagelle de bactéries Gram négatives et positives

➤ **Le filament**

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

➤ **Le crochet**

- Lie le filament au corpuscule basal.
- Il a la même composition que le filament, ce forme 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.
- La liaison du crochet au filament est assurée par des « protéines associées au crochet » = protéines HAP (Hook Associated Proteins).

➤ **Le corpuscule basal**

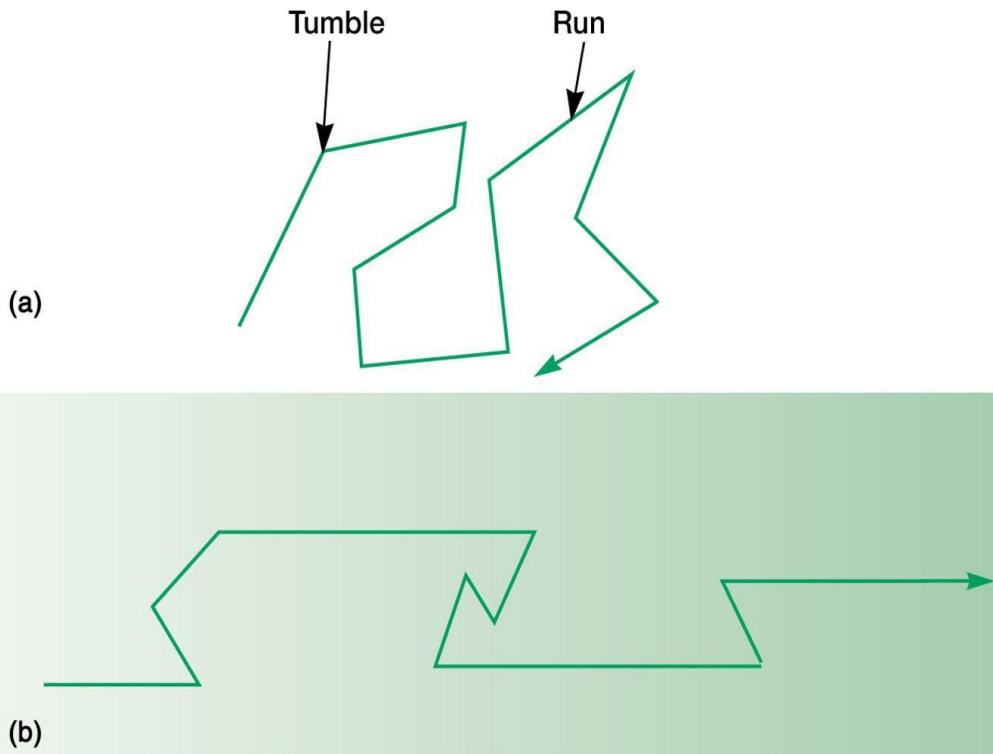
- Enfoui dans la cellule, il insère le flagelle dans le corps cellulaire.

• Chimiotactisme

- Mouvement orienté vers des substances attractives ou en sens opposé si il s'agit de substances répulsives.
- Des concentrations faibles de substances attractives ou répulsives sont détectées par des chimiorécepteurs protéiques situés dans l'espace périplasmique ou dans la membrane plasmique.
- Le mouvement dirigé chez les bactéries

- Dans un environnement constant, les bactéries se déplacent de façon aléatoire.

- Si les conditions s'améliorent, les culbutes sont réduites et la cellule privilégiera cette direction.

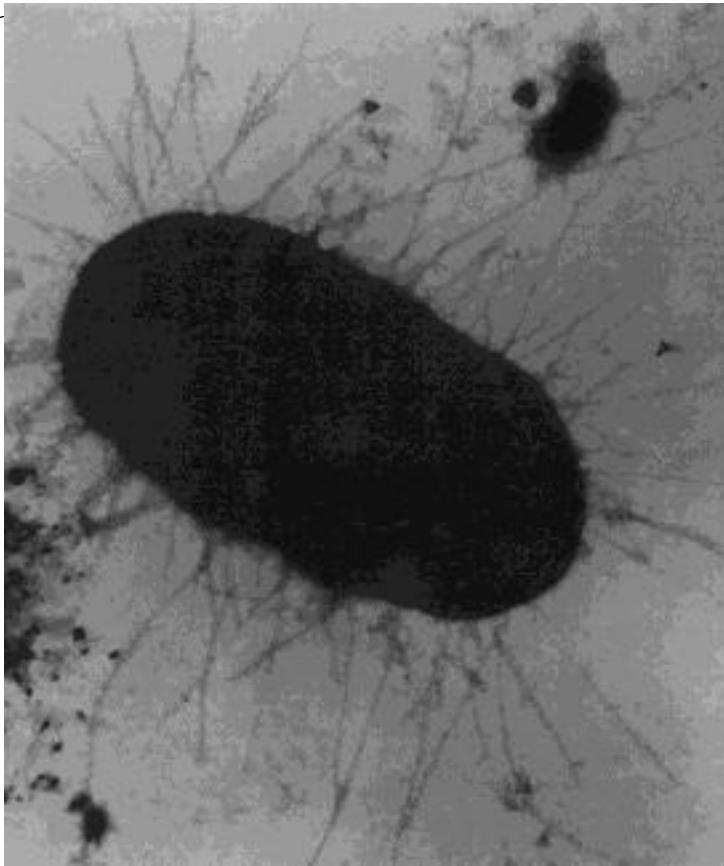


5. Pili ou fimbriae

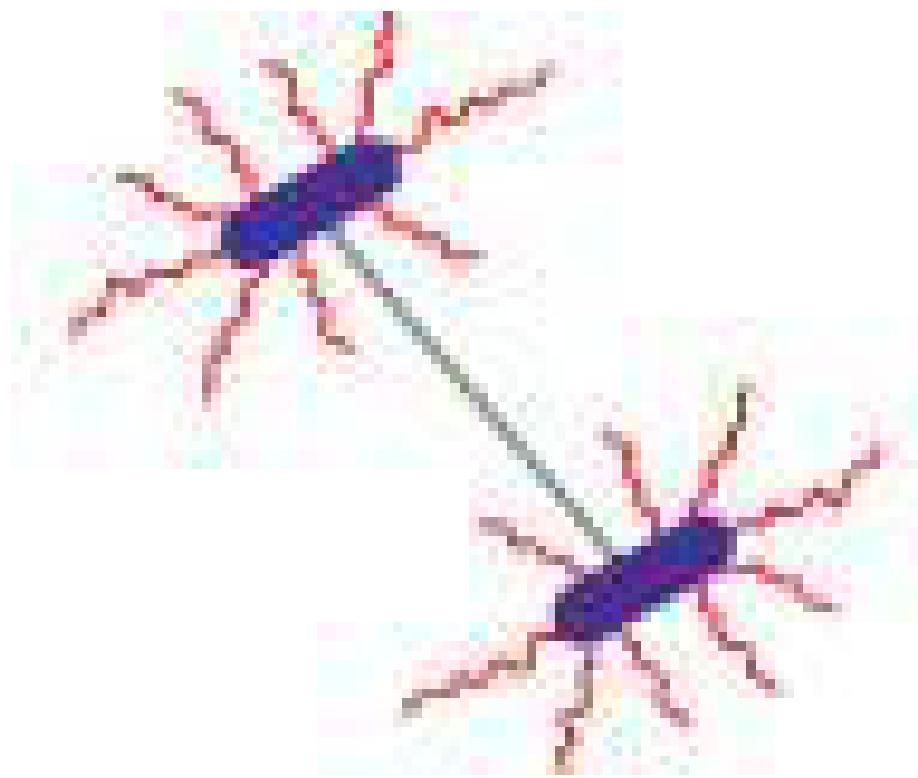
- Les pili (ou poils) sont des appendices périphériques visibles seulement au microscope électronique situées à la surface, plus fines que des flagelles : les pili ou fimbriae.

✓ 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).



Fimbriae (singulier, fimbria)



Pili sexuels (singulier, pilus)

Les types des pilis des bactéries

✓ Pili sexuels

- Ils sont plus longs et sont codés par des plasmides (facteur F).
- Ils ont un rôle dans l'attachement des bactéries entre elles (conjugaison) et sont le récepteur de virus bactériens ou bactériophages spécifiques
- Chez les bactéries à Gram positif, des protéines de surface assimilées aux fimbriae jouent un rôle dans l'adhérence bactérienne.

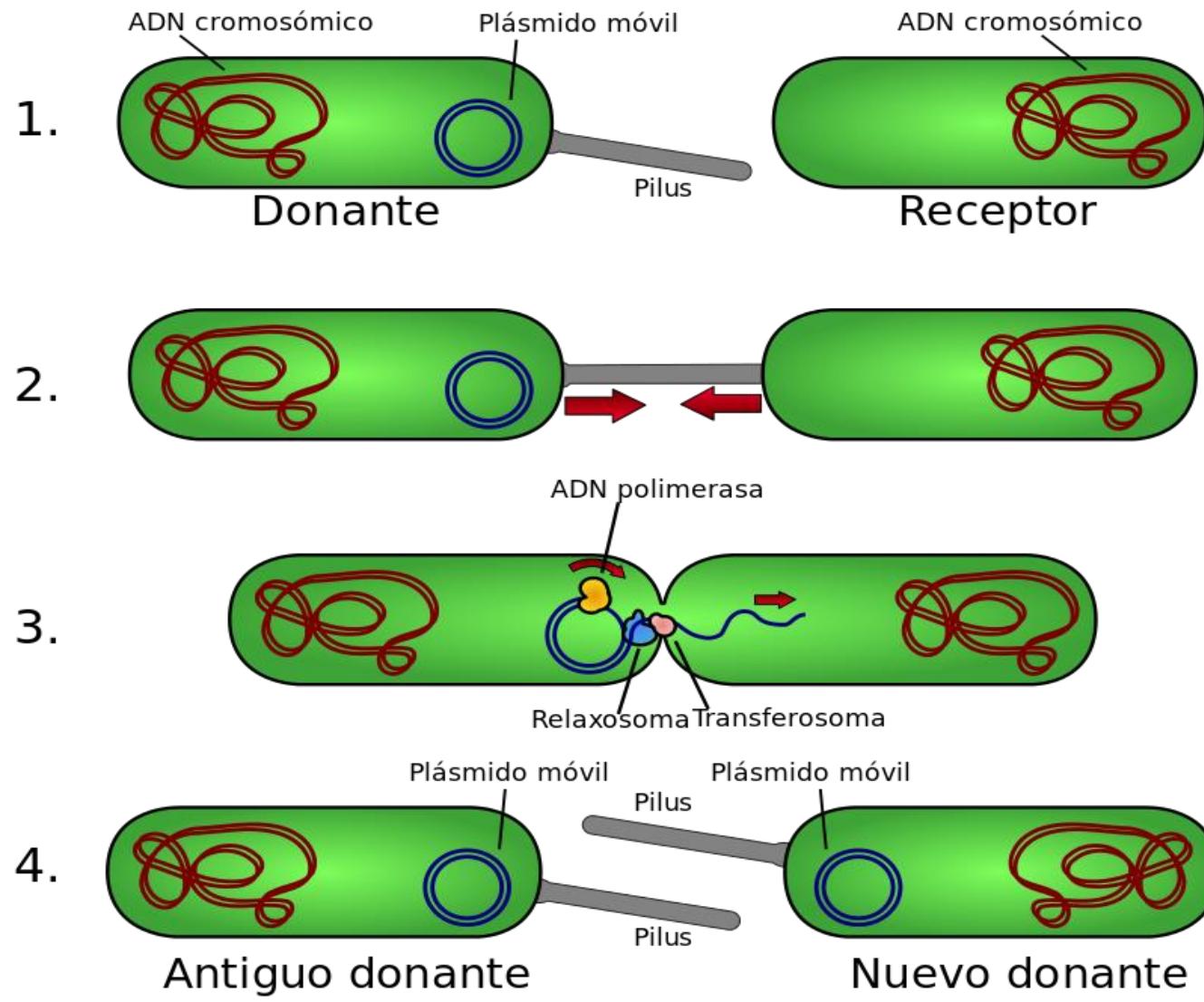


Schéma de conjugaison bactérienne.

1: La cellule génère un pili. 2: pilus se lie à la cellule réceptrice, 3- Le plasmide mobile est désarmé et un brin d'ADN est transféré dans la cellule receptrice. 4 Les deux cellules synthétisent le deuxième brin et régénèrent un plasmide complet.

6. Spore bactérienne

- 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*.

Mise en évidence

- Les spores sont visibles à la coloration de Gram où elles apparaissent comme des espaces vides à l'intérieur des bactéries.

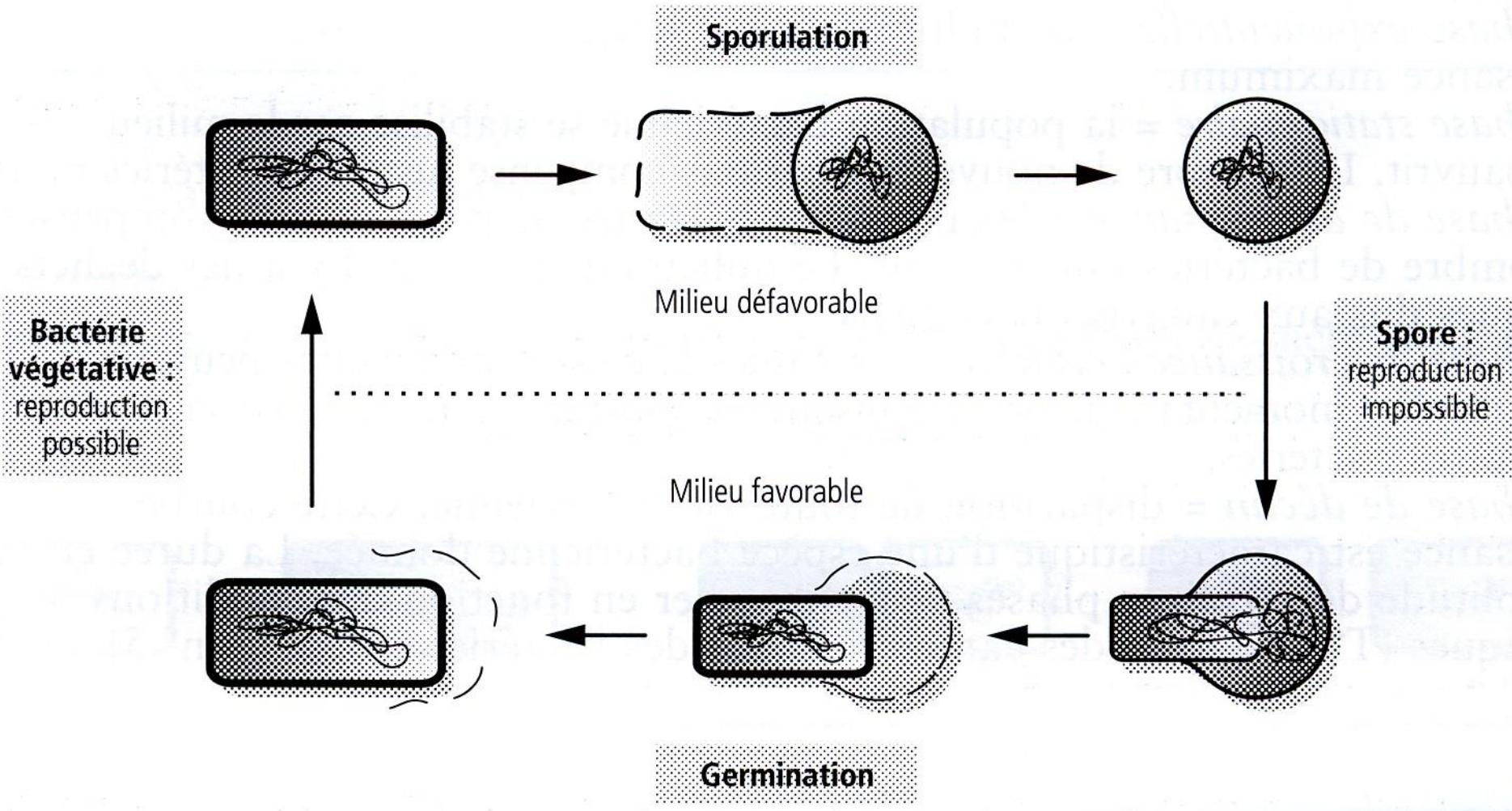
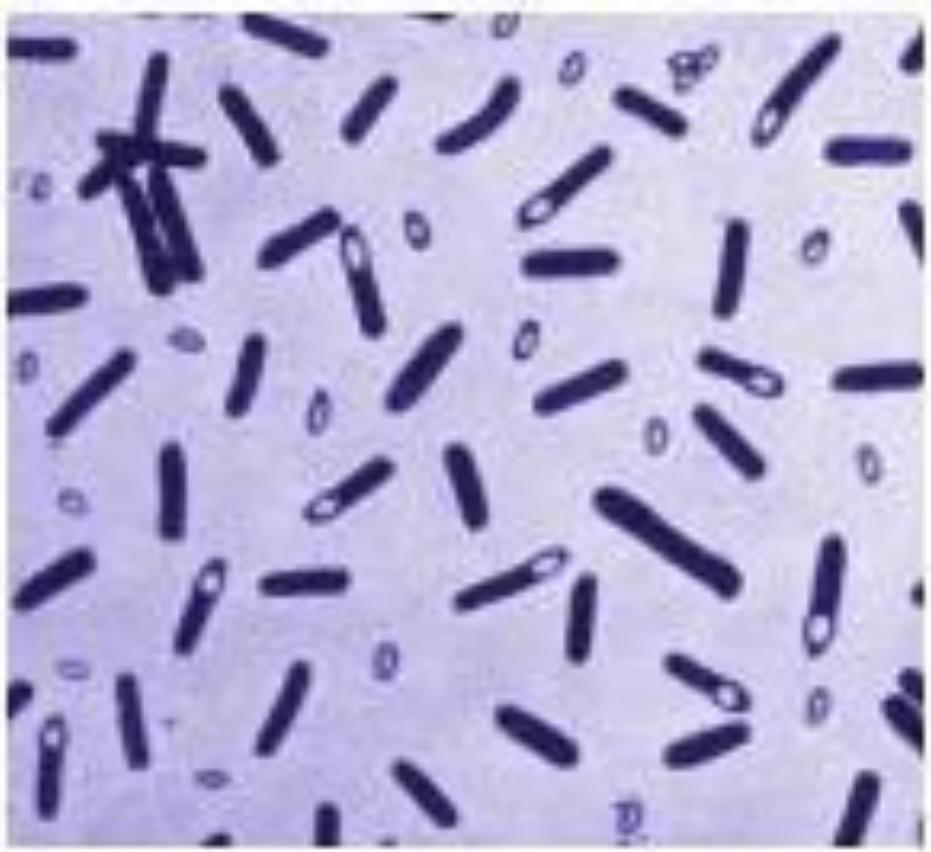


Schéma de la sporulation et de la germination bactérienne



Observation des spore après coloration de Gram chez *Bacillus* et *Clostridium*

Morphologie

- Sont de petites unités ovales ou sphériques.
- Elles peuvent se déformer ou non le corps bactérien.
- Leur position dans la cellule est variable :
 - ✓ centrale, terminale, subterminale.
- 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.

Différentes formes de la spore



spore sphérique



spore cylindrique



spore ovoïde

Différentes positions de la spore dans le bacille



spore centrale



spore subterminale



spore terminale

Différentes déformations du bacille par la spore



spore non déformante

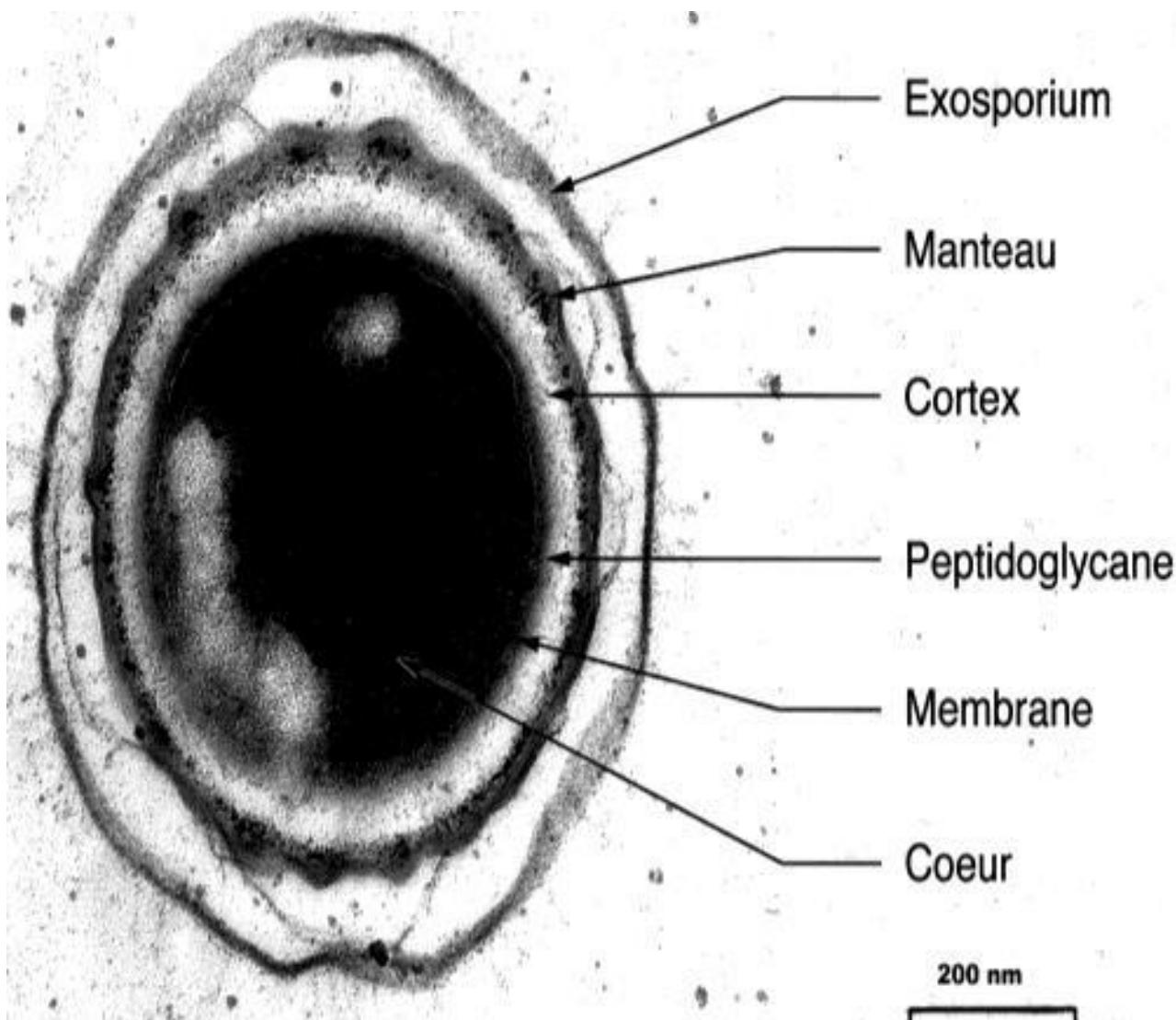


spore déformante

Différentes formes des spores

La structure

- 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.
- Le protoplaste (cytoplasme) ou cœur de la spore, contient les ribosomes, le nucleoïde et des enzymes inactives.



ique : plusieurs
illets protéiques

Structure d'un endospore de *Bacillus anthracis* (x
150000)

Phénomène de sporulation

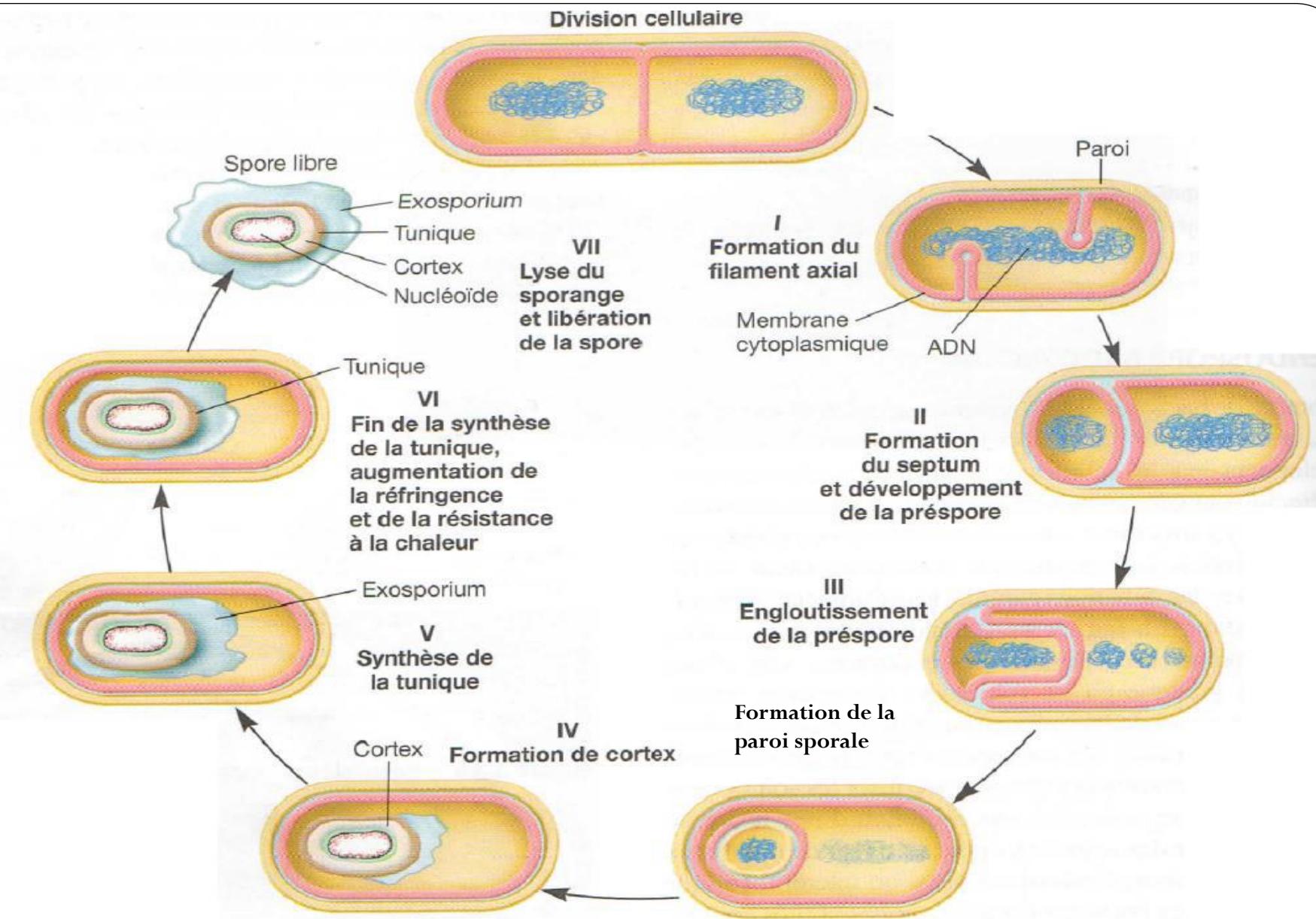
- Des conditions défavorables de croissance entraînent la sporulation ou l'absence de germination de la spore.
- Il représente le passage de la forme végétative à la forme sporulée.
- La sporulation dure environ 10.5 heures, chez *Bacillus megaterium*.
- Elle est provoquée par l'épuisement du milieu 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 7 stades :

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

- **Stades V and VI** : apparition des tuniques et après maturation.
- **Stade VII** : la cellule végétative se lyse et libère la spore.

Les différences entre endospores et cellules végétatives

Characteristic	Végétative cell	Endospore
Structure	Typical gram-positive cell	Thick spore cortex Spore coat Exosporium Refractile
Microscopic appearance	Nonrefractile	
Calcium content	Low	High
Dipicoliruc acid	Absent	Present
Enzymatic activity	High	Low
Metabolism (O ₂ uptake)	High	Low or absent
Macromolecular synthesis	Present	Absent
mRNA	Present	Low or absent
Heat resistance	Low	High
Radiation resistance	Low	High
Resistance to chemicals (for example H ₂ O ₂) and acids	Low	High
Stainability by dyes	Stainable	Stainable only with spécial methods
Action of lysosome	Sensitive	Resistant
Water content	High, 80-10%	Low, 10 - 25% in core
Small acid-soluble proteins (products of <i>ssp</i> genes)	Absent	Present
Cytoplasmic pH	About pH 7	About pH 5,5 – 6,0 in core

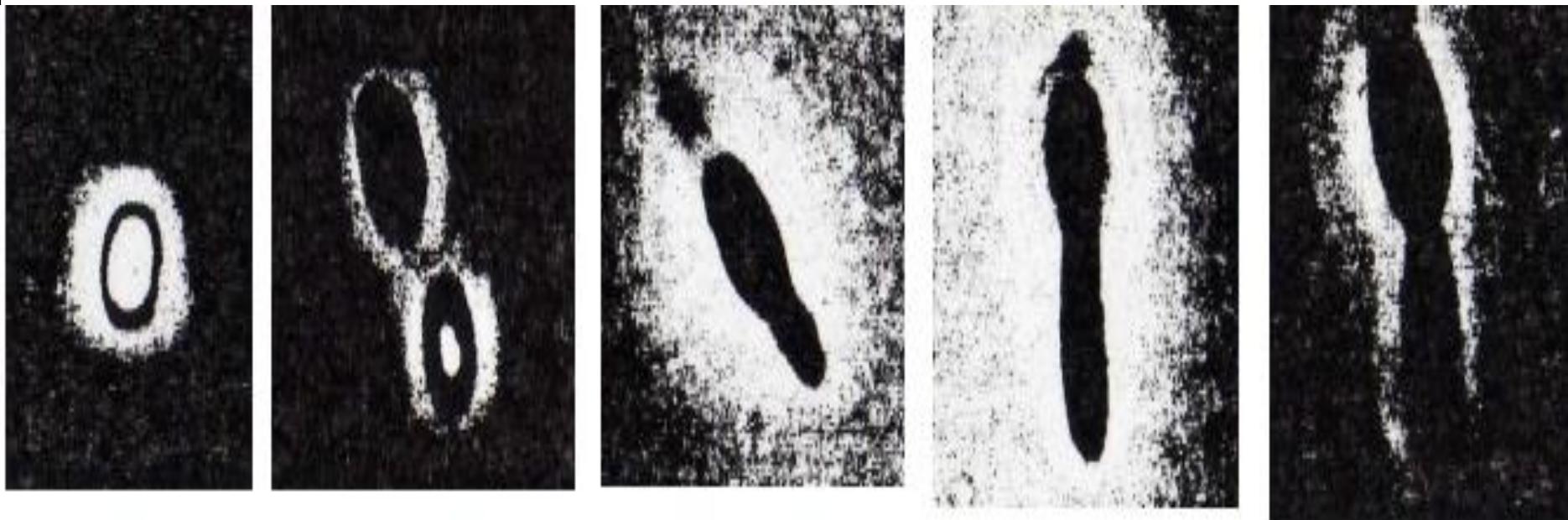


Germination

- Afin que la spore germe, elle doit se trouver dans des conditions favorables : eau, nutriments, pH, force ionique, température convenable, aucun d'agent antimicrobien.
- la spore redonne naissance à une cellule végétative.
- On distingue 3 stades dans le processus de germination :
- **L'activation** : Pour pouvoir germer, la spore doit être activée par un agent capable de léser les multiples enveloppes sporales. Cet agent peut être de nature :
 - mécanique : choc, phénomène d'abrasion...
 - physique : chaleur (procédé de tyndallisation)
 - chimique : acidité.

- **L'initiation:** n'intervient qu'en conditions favorables :
 - forte teneur en eau,
 - milieu riche contenant des métabolites effecteurs (adénine, adénosine, Mg²⁺).
- Ces éléments pénètrent à travers les enveloppes endommagées et déclenchent un processus autolytique avec dégradation du peptidoglycane du cortex et libération de l'acide dipicolinique.
- La spore se gonfle d'eau et perd ses caractéristiques.

- **Emergence :**
- Après sa réhydratation, la spore donne une nouvelle cellule végétative qui entre en phase active de biosynthèses : la synthèse de l'ADN reprend, la cellule double son volume, elle devient à nouveau capable de se multiplier.



Stades de germinations des spores d'une bactérie

III. Nutrition bactérienne

Pour vivre, les microbes ont besoin :

- d'eau
- d'air
- de nourriture
- d'une chaleur douce
- d'un milieu plus ou moins acide
- d'un support adapté



III.1- Besoins nutritionnelles

- Les micro-organismes se multiplient à partir des aliments ou nutriments présents dans les milieux de culture.
- Ils ont tous un certain nombre de besoins communs, nécessité d'eau, de source d'énergie, source de carbone, source d'azote et des éléments minéraux
- Beaucoup dans ces conditions peuvent croître et se multiplier
- Ces besoins de base sont appelés **besoins élémentaires**.

✓ 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'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

➤ 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

Source d'azote

- L'azote dont l'origine peut être variée.

Certaines bactéries sont capables d'assimiler l'ammoniac, les nitrates, l'azote atmosphérique et d'autres vont assimiler des acides aminés.

- fixation d'azote moléculaire (*Rhizobium*)
- nitrites (*Nitrobacter*)
- source organique groupements aminés des composés organiques (R-NH₂)

Soufre et phosphore

- Le phosphate et le soufre nécessaires aux bactéries pour synthétiser respectivement les acides nucléiques et les acides aminés soufrés sont principalement d'origine inorganique.
- **soufre** : présent chez certains acides aminés groupements thiols (-SH)
- **phosphore** : composant des acides nucléiques et coenzymes de l'ATP

Autres éléments minéraux

- Constituant d'enzyme et coenzyme
 - Fer, magnésium
- oligoéléments (cofacteurs ou activateurs enzymatiques)
 - Calcium, cobalt, cuivre, manganèse ...

Besoins spécifiques: Facteurs de croissance

- Les facteurs de croissance sont des composés organiques non synthétiser mais qui sont indispensables pour certaines souches bactériennes et qui sont :
 - **Les acides aminés**
 - **Les bases puriques et pyrimidiques**
 - **Les vitamines** ou des **précurseurs de coenzymes**
(de NAD, de coenzyme A, de FMN, de FAD)

Les facteurs environnementaux, 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.

III. 2- FACTEURS DE DEVELOPEMENTS DES MICROBES

Facteurs physiques

1-Température

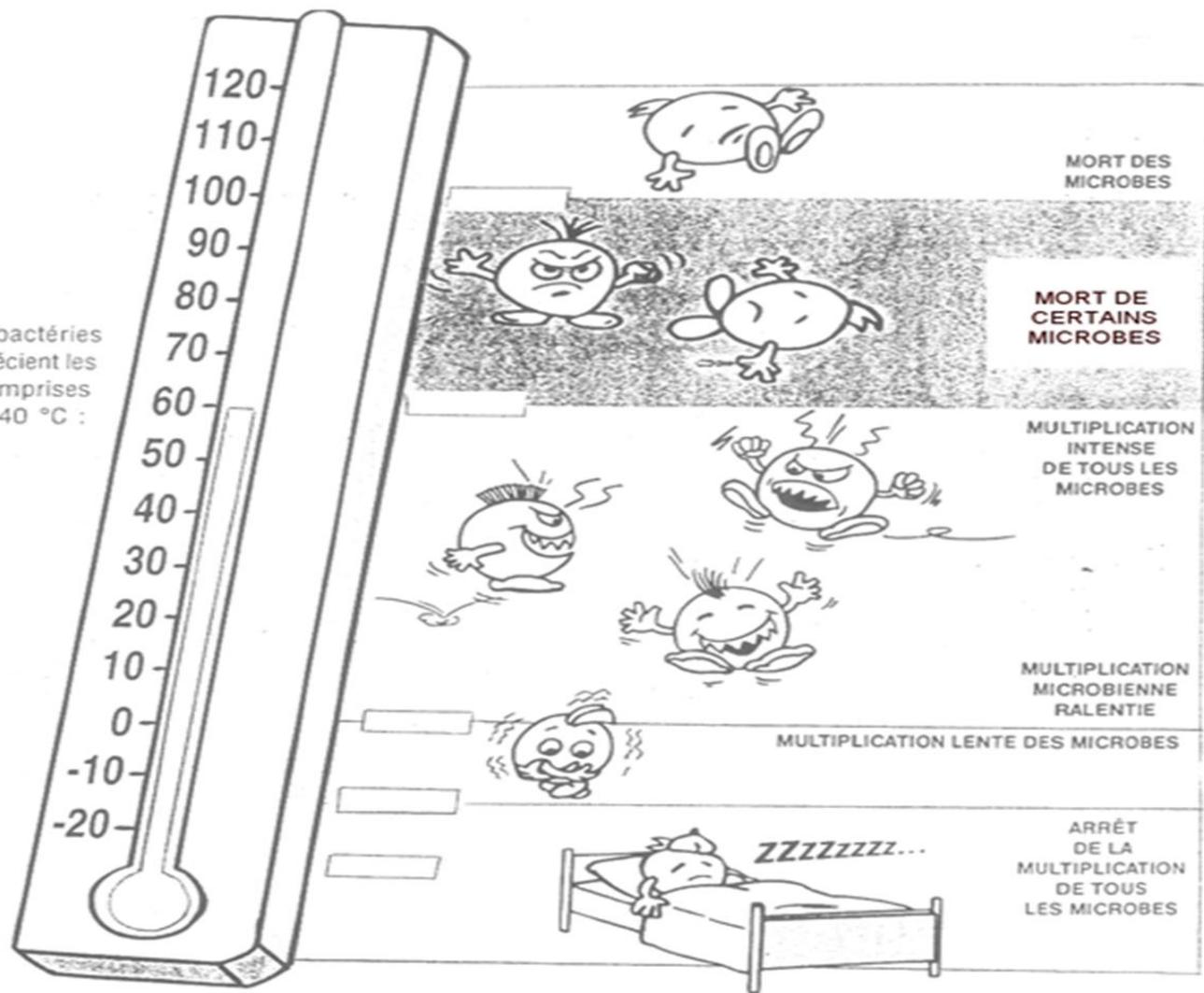
Pour vivre, les microbes ont besoin

- d'eau
- d'air
- de nourriture
- d'une chaleur douce
- d'un milieu plus ou moins acide
- d'un support adapté



Effet de la température sur la croissance microbienne

La plupart des bactéries pathogènes apprécient les températures comprises entre + 20 et + 40 °C :

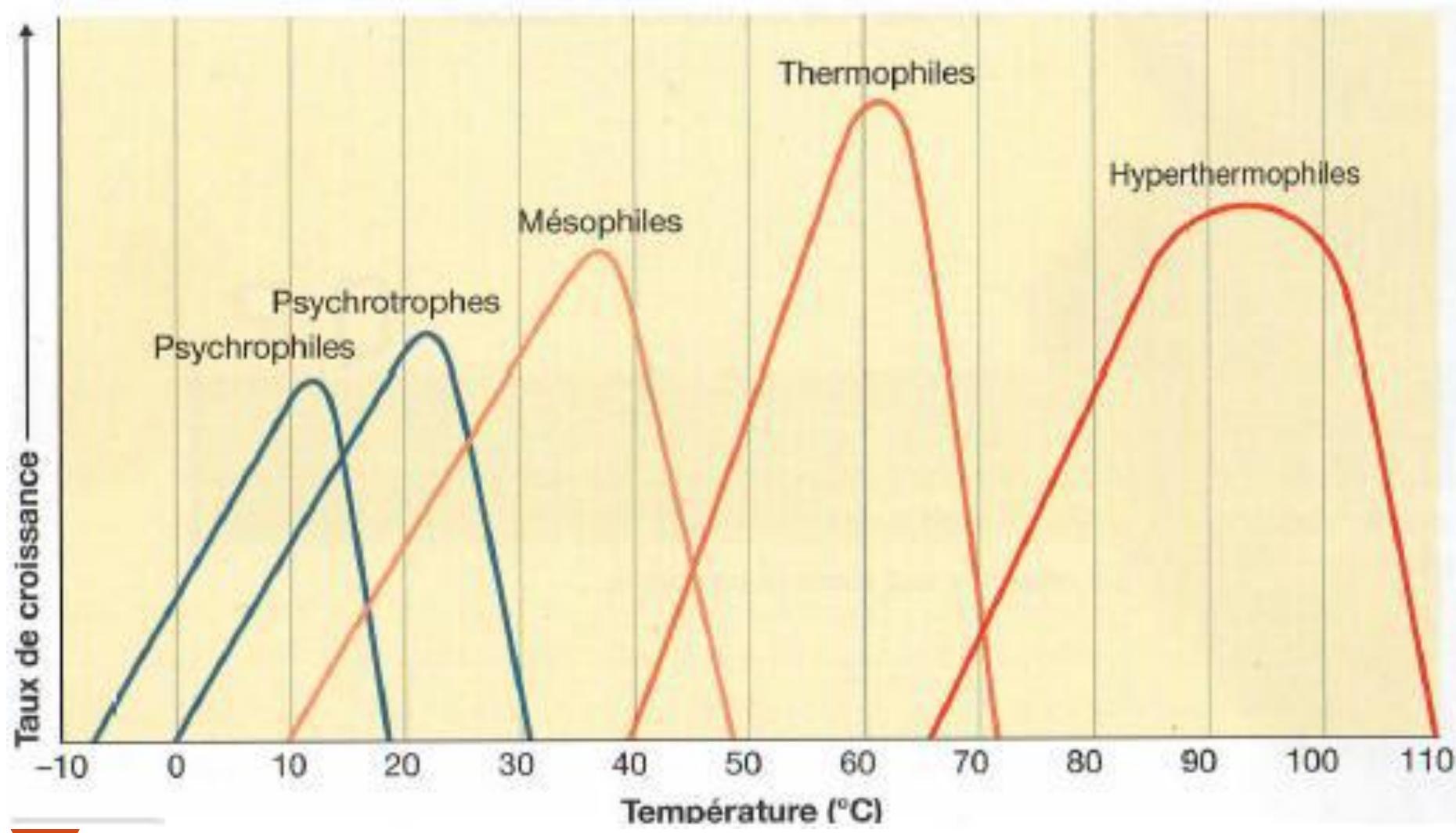


- **Les bactéries psychrophiles** : Température maximale 20°C et la température minimale: -15 °C.
- **Les mésophiles**: croissance entre 25 et 40 °C.
Optimum à 37°C
la majorité des bactéries pathogènes

Les thermophiles : température optimale entre 50 et 60 °C.

Les hyperthermophiles ont une température optimale de croissance entre 70 °C et 110°C.

Les zones thermiques de croissance bactériennes



Le froid



- 2 types de froid:

- Positif : Réfrigération
- Négatif : Congélation et surgélation

A partir de -18°C, arrêt de toute multiplication microbienne (mais non destruction)

- $T < -18^\circ\text{C}$: Arrêt du développement
- -18 à 0°C: Ralentissement du développement
- A partir de 3°C : Limite de développement des microbes pathogènes



A une température de + 100°C, tous les micro-organismes sont détruits !



- 2 Types de traitement thermique:
 - Pasteurisation entre 65 et 100°C
 - Stérilisation supérieur à 100°C
- **10 à 65°C : Multiplication et toxinogénèse intenses**
- **65 à 100°C : La plupart détruits nuisibles**
- **A partir de 100°C : tous microbes détruits et les enzymes sont détruits**



2- le pH

Pour vivre, les microbes ont besoin



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.

Ex: lactobacilles , pH optimal est de 6.

Thermoplasma acidophilum , pH optimal entre 0,8 et 3.

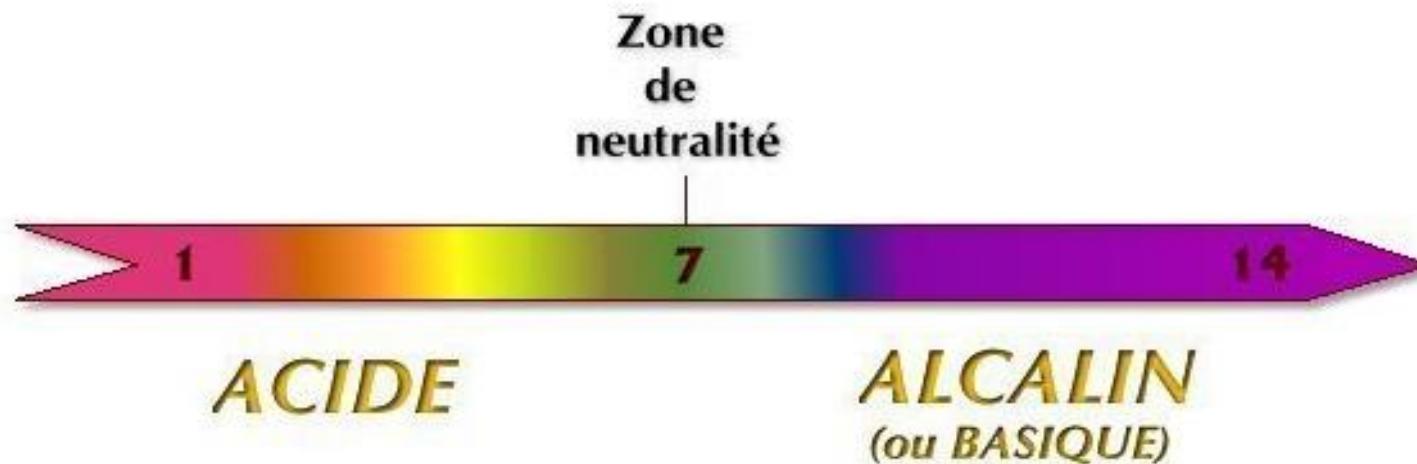
Les alcalophiles préfèrent des pH alcalins

Ex: *Vibrio cholerae*: pH optimal est de 9 pour la multiplication

Alkaliphilus transvaalensis : pH de 12,5.

Qu'est-ce que le "pH" ?

pH : potentiel d'Hydrogène



- Classification des produits:
- pH < 4.5 : fortement acides
- $4.5 \leq \text{pH} \leq 6.2$: faiblement acides

Exemples suite:

- Pommes : 2.9 - 3.5
- Fraises : 3.0 - 4.2
- Lait : 6.3 - 6.8
- Miel : 6.0 - 6.8
- Beurre : 6.1- 6.4
- Dattes : 6.2 - 6.4
- Viande de Bœuf : 5.3 - 6.2
- Viande des volailles t : 5.5 - 6.4

3- activité d'Eau

Pour vivre, les microbes ont besoin :

- d'eau
- d'air
- de nourriture
- d'une chaleur douce
- d'un milieu plus ou moins acide
- d'un support adapté



L'activité de l'eau (A_w)



L' A_w mesure la disponibilité de l'eau, c'est-à-dire la quantité d'eau disponible ou libre pour les micro-organismes.



**Sans eau, pas
de multiplication
microbienne...**



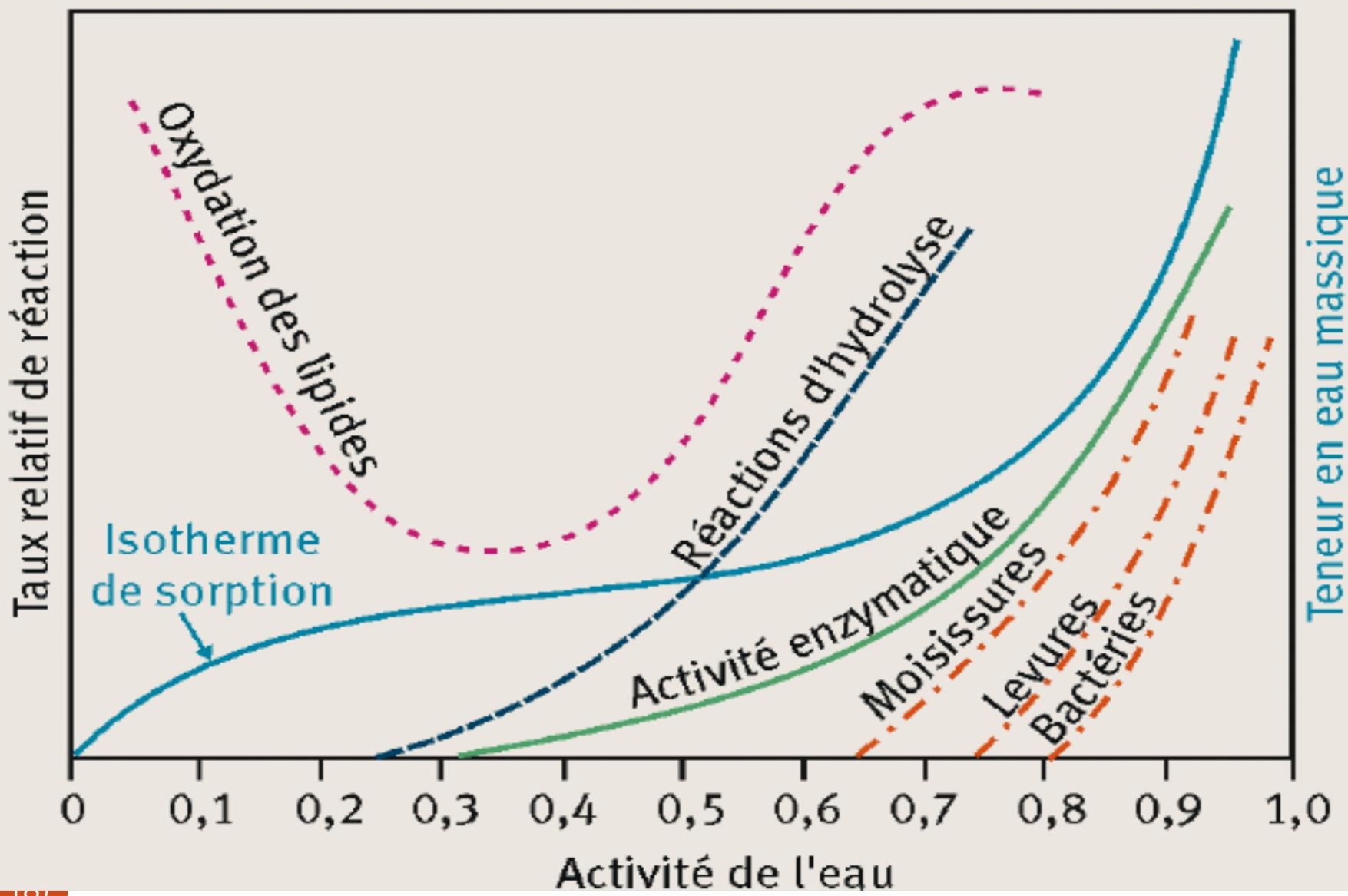
*...mais pas de mort
systématique sans eau !*

- L'eau est utilisée de deux manières par les micro-organismes:
 - comme solvant des nutriments, permettant ainsi leur transport et leur disponibilité
 - Comme agent chimique des réactions d'hydrolyse

L' a_w quantifie la disponibilité de l'eau

- Sa valeur est comprise entre 0 et 1.
- Exprimée comme le rapport de la pression de vapeur d'eau du milieu sur celle de l'eau distillée à même température ($aw = P/P_o$)

① Taux relatifs de réaction des principaux agents de dégradation des matrices organiques en fonction de l' a_w .



a_w à 25 °C	NaCl en g/100 g d'eau	Saccharose en g/100 g d'eau
0,99	1,75	11
0,96	7,01	25
0,94	10,34	93
0,92	13,50	120
0,90	16,50	144
0,85	23,60	208

Micro-organismes	Aliments
<i>Acinetobacter</i> (0,99)	Viandes (0,99)
<i>Clostridium botulinum</i> (0,97)	Raisin (0,986)
<i>Ps. fluorescens</i> (0,957)	Pommes (0,98)
<i>E. coli</i> (0,95)	Cerises (0,977)
<i>Salmonella spp</i> (0,95)	Confiture (0,75-0,80)
<i>St. aureus</i> (0,86)	Céréales (< 0,70)
Bactéries halophiles (0,75)	Chocolat (< 0,60)
<i>Sc. cerevisiae</i> (0,90-0,94)	
Levures halophiles (0,62)	
<i>Fusarium</i> (0,90)	
<i>Mucor</i> (0,80-0,90)	
<i>Aspergillus flavus</i> (0,78)	

FACTEURS DE DEVELOPEMENTS DES MICROBES : eau ,exemple

Aw	<i>Micro-organismes inhibés</i>	<i>Exemples de produits alimentaires</i>
1.00-0.91	Tout les microbes	Produits frais : ex viandes, poissons, fruits et fromages...
0.91-0.87	levures	Saucisson sec, Fromage pâte pressée
0.87-0.80	moisissures	Légumes secs, farines, lait concentré sucré, gâteaux secs et pain
0.80-0.75	Bactéries halophiles	Aliments renfermant 26% de sel
0.75-0.65	Moisissures xérophiles	Aliments riche en sucre

4- oxygène

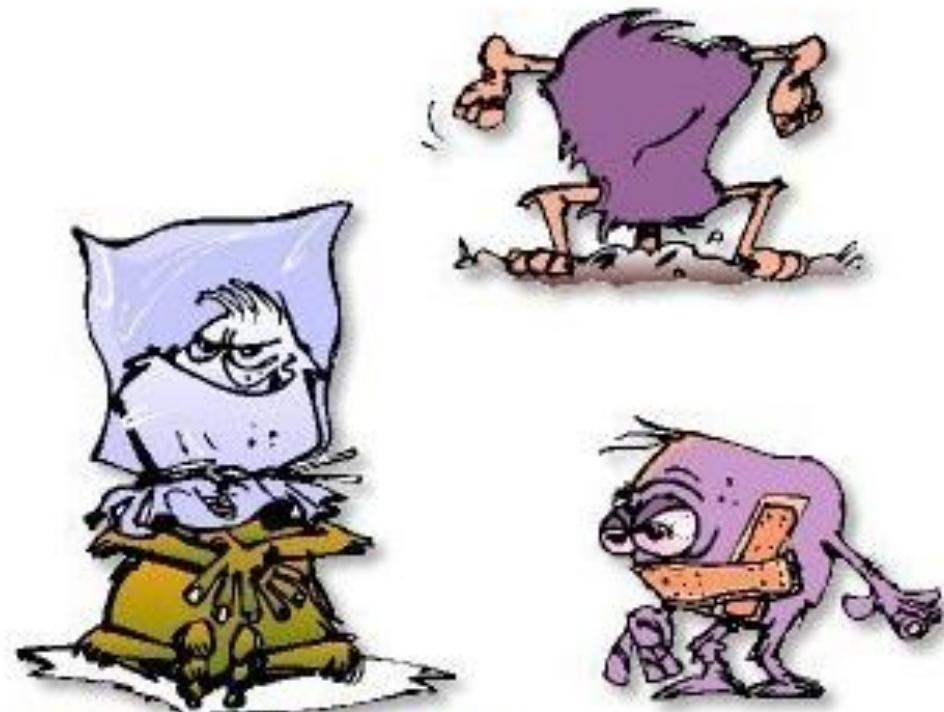
Les microbes n'ont pas tous besoin d'oxygène

La majorité des microbes a besoin d'oxygène.



Ce sont les AÉROBIES.

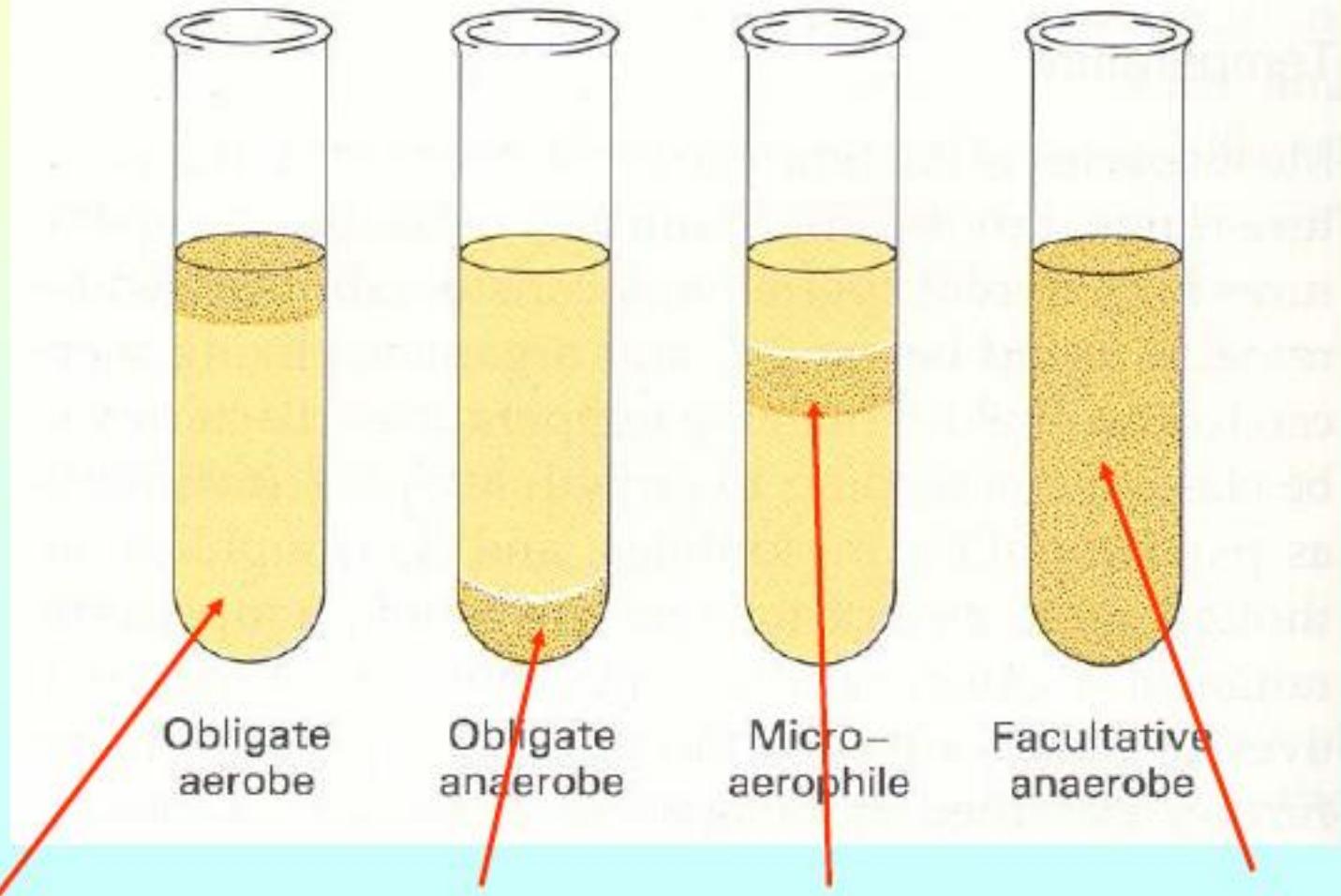
D'autres microbes ne peuvent pas se développer en présence d'oxygène.



Ce sont les ANAÉROBIES.

Selon le mode d'utilisation du gaz (O_2 ou CO_2) on peut distinguer :

- **Les aérobies stricts:** utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons.
- **Les anaérobies facultatifs:** peuvent croître en absence ou en présence d'oxygène. Mais leurs 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*.
- **Les anaérobies stricts:** Leur croissance doit se faire dans une atmosphère dépourvue d'oxygène. Ex: *Clostridium*.



Pseudomonas
Neisseria

Clostridium
Bacteroides

Campylobacter
Streptococcus

Entérobactéries
Staphylocoques

	a) Aérobies stricts	b) Anaérobies facultatifs	c) Anaérobies stricts	d) Anaérobies aérotolérants	e) Microaérophiles
Effet de l'oxygène sur la croissance	Croissance aéробie seulement; la présence de molécules d'O ₂ est essentielle.	Croissance aéробie ou anaéробie; croissance optimale en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance anaéробie seulement; arrêt de la croissance en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance anaéробie seulement; toutefois, la croissance se poursuit en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance aéробie seulement; les molécules d'O ₂ sont essentielles en faible concentration.
Croissance bactérienne dans un tube contenant un milieu de culture solide					

5- La pression osmotique

La plupart des bactéries sont pratiquement insensibles aux variations de pression osmotiques

Elles sont protégées par leur paroi rigide

Selon leur sensibilité à la pression osmotique on distingue:

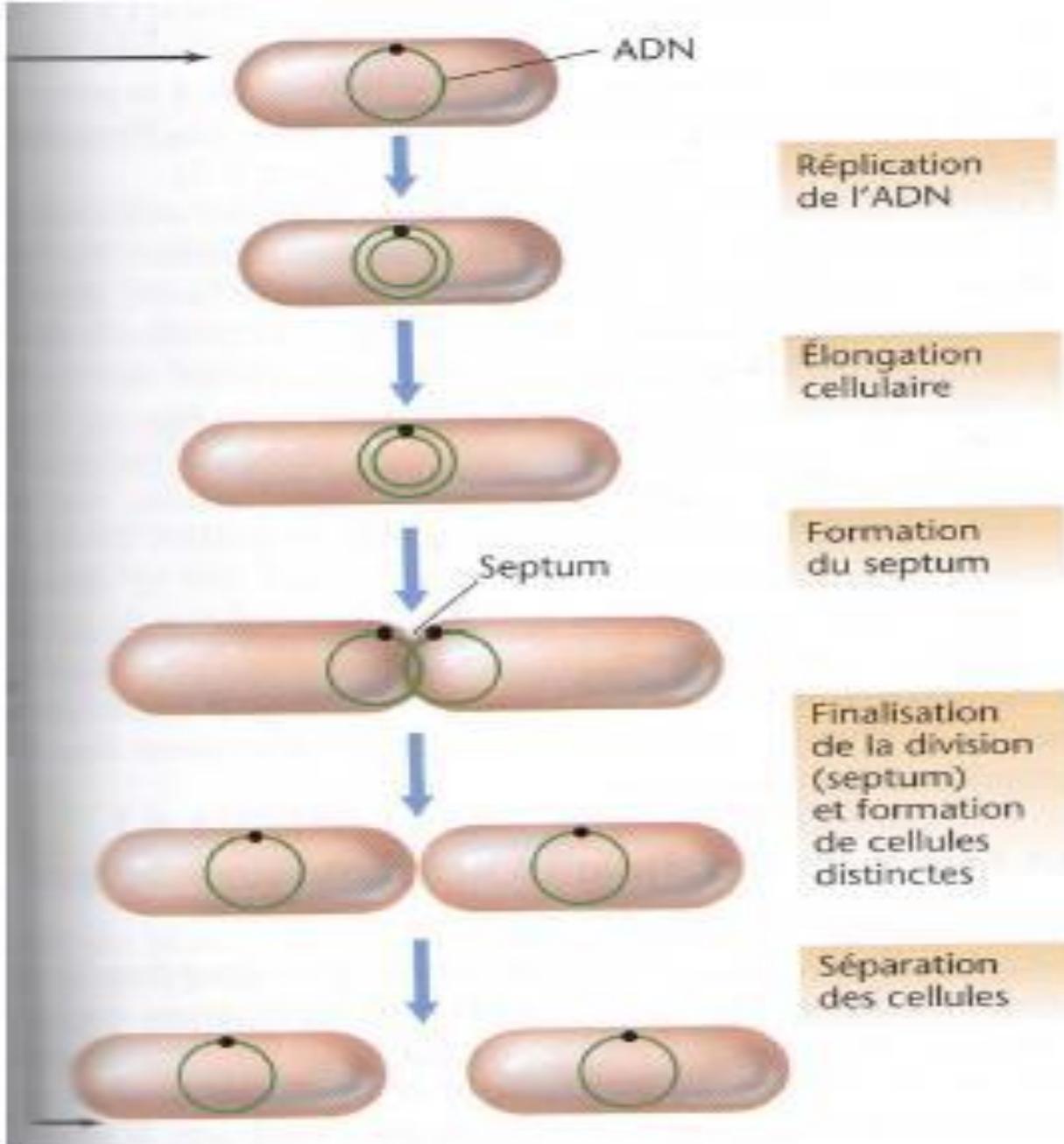
- **Les bactéries non-halophiles** : NaCl est inférieure à 0,2 M.
- **Les espèces halophiles** : NaCl supérieure à 0,2 M pour les moins halophiles (*Cobetia marina*) à 5,2 M pour les plus halophiles *Halobacterium salinarum*.
- **Les espèces halotolérantes** comme les *Staphylococcus*, les *Listeria* ou les *Lactobacillus*. Ils tolèrent 7,5 à 15% de NaCl.

Les anciens conservent les aliments en rajoutant du sel ce qui entraîne une augmentation de la pression osmotique. La croissance des bactéries est limitée.

Croissance bactérienne

La multiplication bactérienne

- La croissance bactérienne se traduit par __
- ✓ Augmentation du nombre de bactéries
- En premier lieu 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.



Etapes de la division cellulaire

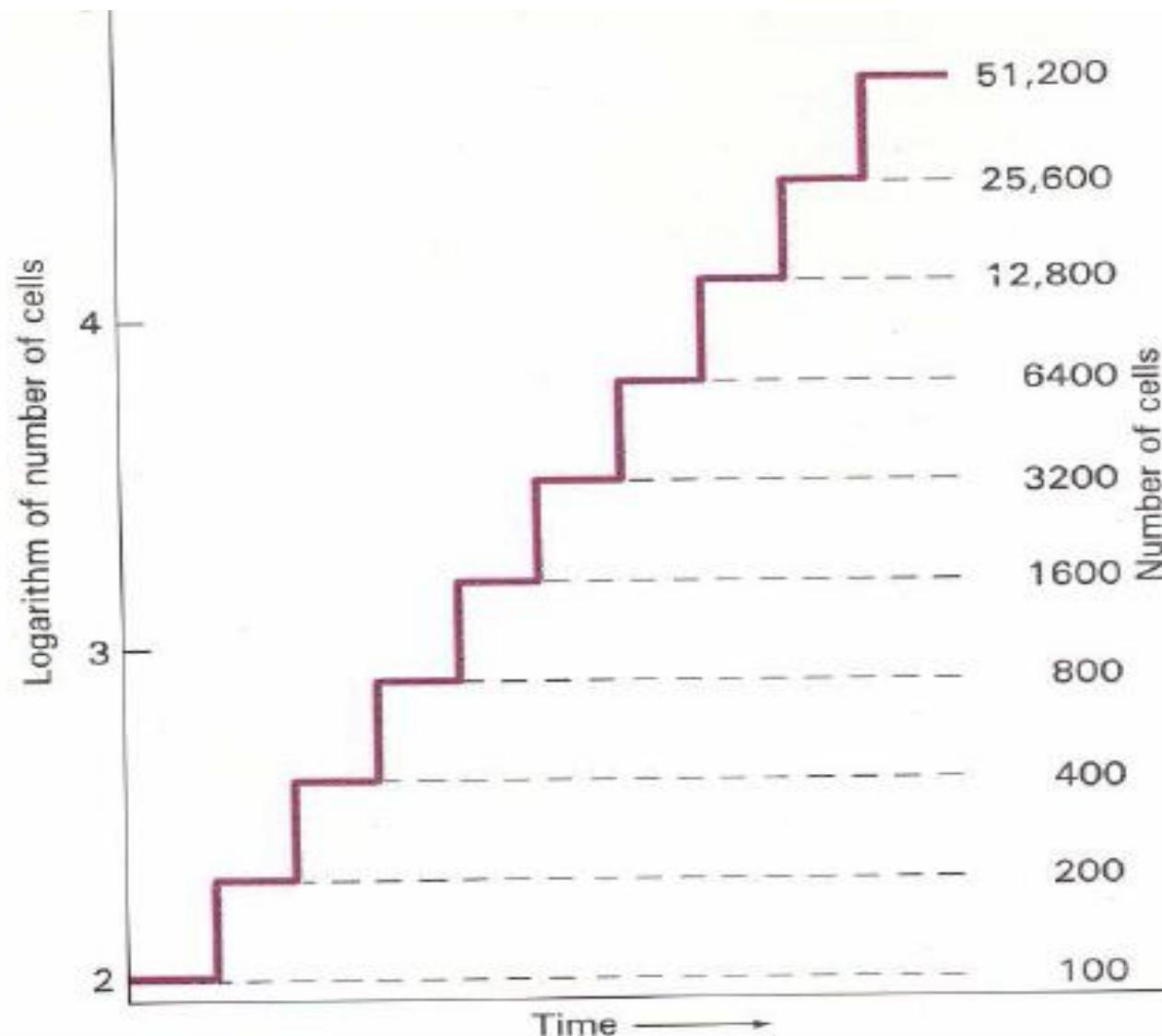


Division des bacilles

Paramètres de la croissance bactérienne

- La division cellulaire répond une progression exponentielle à temps régulier.
- Une cellule → 2 cellules → 4 cellules → 16 C → 32 C...
- Le temps nécessaire au doublement du nombre de cellules est appelé **temps de génération (G)**.
- Le temps de génération est spécifique à chaque espèce et il dépend des conditions environnementales.
- (G) est de 20 minutes pour *Escherichia coli*
- de 1000 minutes pour *Mycobacterium tuberculosis*.

En théorie la croissance microbienne est exprimée dans la courbe



Temps de génération (G)

$$G = t/n$$

t : temps connu ; n : nombre de divisions

– E. coli : 20 minutes (60/3)

Taux de croissance (μ)

C'est le nombre de divisions par unité de temps

$$\mu = n/t = 1/G$$

n = nombre de divisions ; t = temps connu

– E. coli = 3/1 = 3

Temps

nombre de Bactéries

t_0	$N_0 = 1N_0$	$2^0 N_0$
t_1	$N_1 = 2N_0$	$2^1 N_0$
t_2	$N_2 = 2 \times 2 \times N_0$	$2^2 N_0$
t_3	$N_3 = 2 \times 2 \times 2 \times N_0$	$2^3 N_0$
t_4	$N_4 = 2 \times 2 \times 2 \times 2 \times N_0$	$2^4 N_0$
.		
.		
.		
t_n	$N_n = \underbrace{2 \times 2 \times 2 \times 2 \times \dots \times N_0}_{n \text{ fois}}$	$2^n N_0$

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

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

Expression logarithmique

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



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

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

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



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

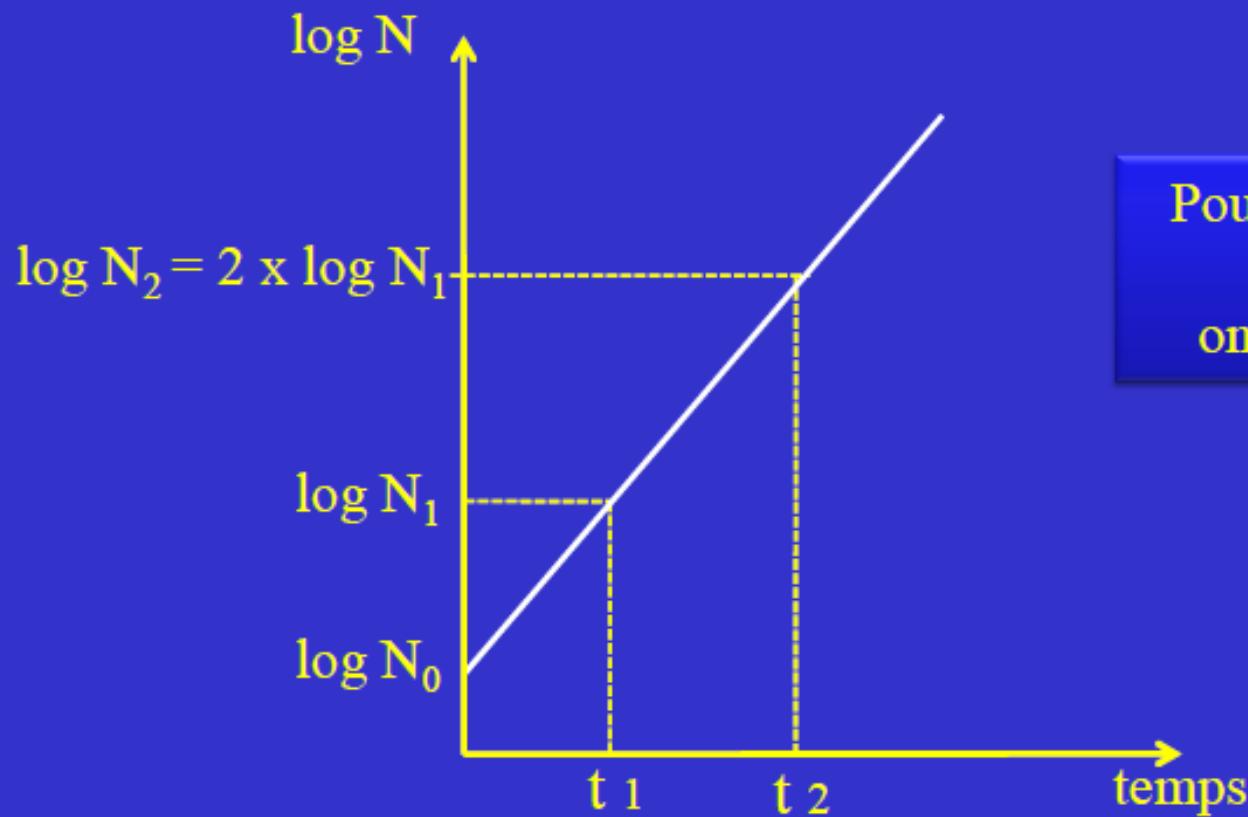
$$\mu = \frac{\log N - \log N_0}{t \log 2}$$

Représentation graphique de la Courbe de croissance

- La croissance bactérienne est représentée par un graphe :

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

- 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

$$\mu = 1/G$$

Courbe de croissance en milieu non renouvelé, culture discontinue

- Dans une culture discontinue, la croissance n'est pas synchrone et ou les nutriments s'épuisent avec le temps, la croissance suit une courbe à 5 phases.
- **La phase de latence**
- **la phase de croissance exponentielle**
- **La phase de ralentissement**
- **La phase stationnaire**
- **La phase de déclin.**

1-phase de latence

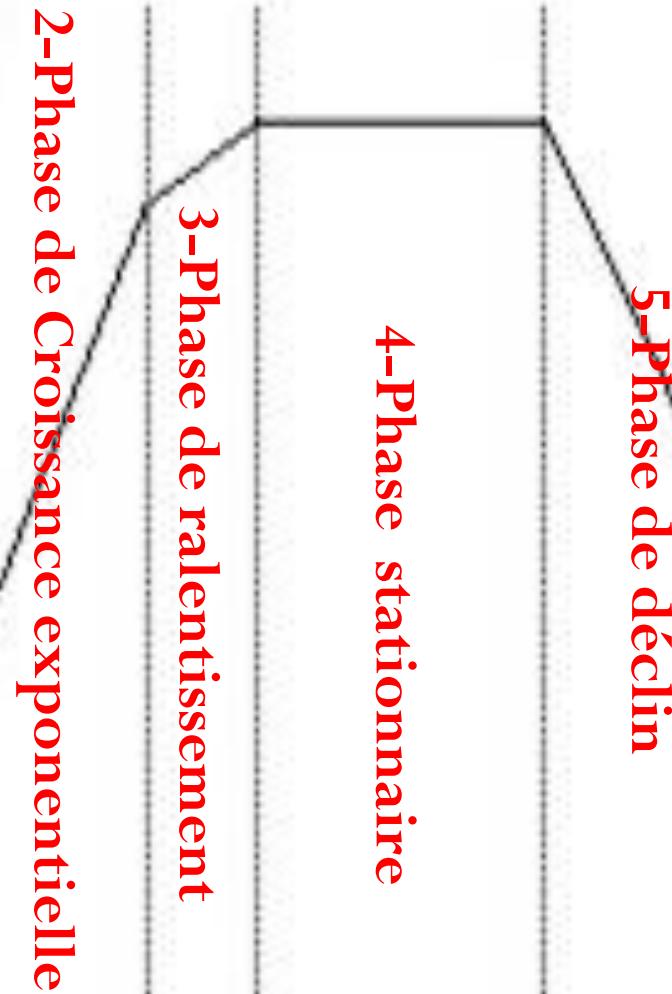


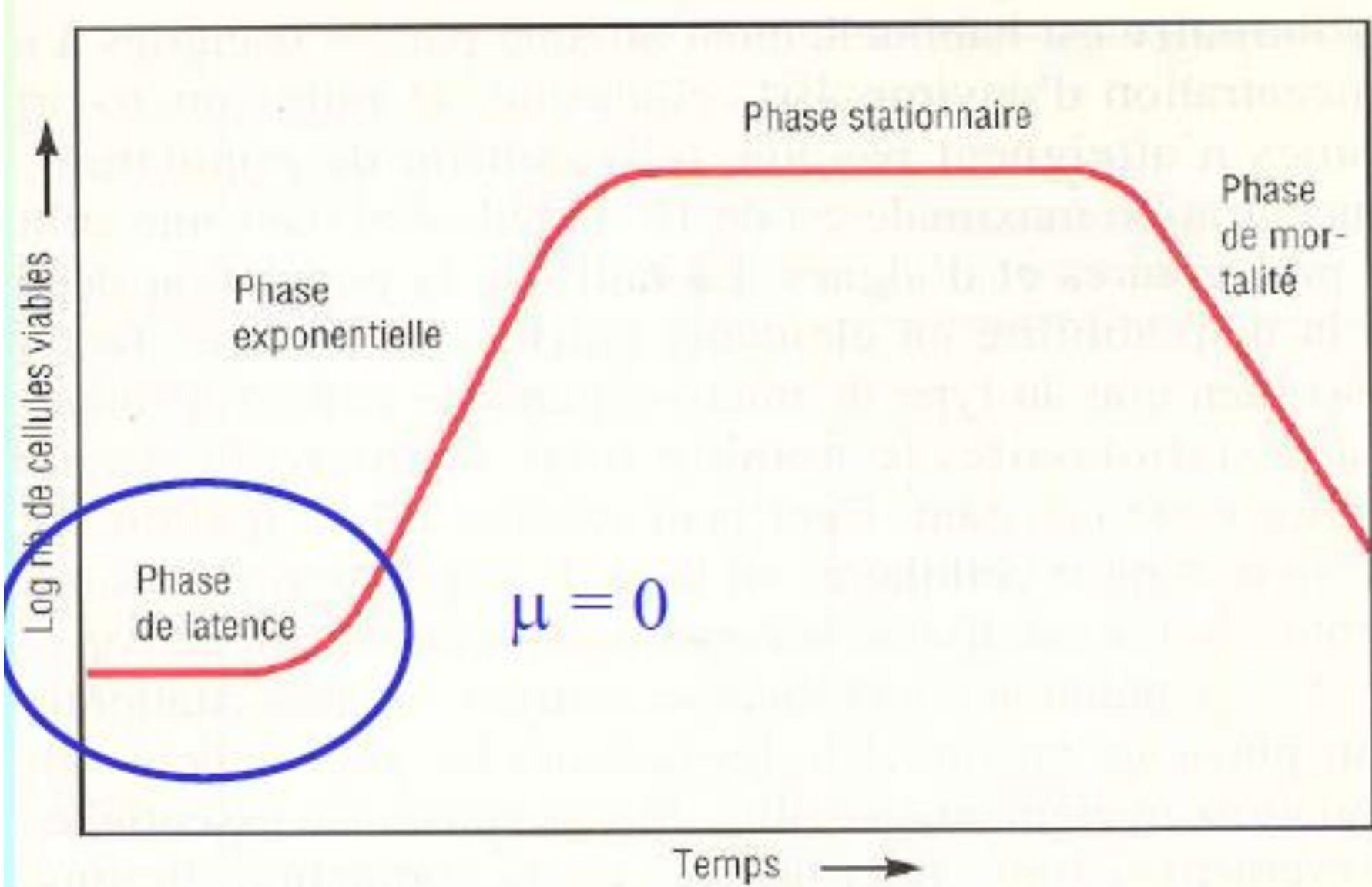
Figure : Courbe de croissance bactérienne

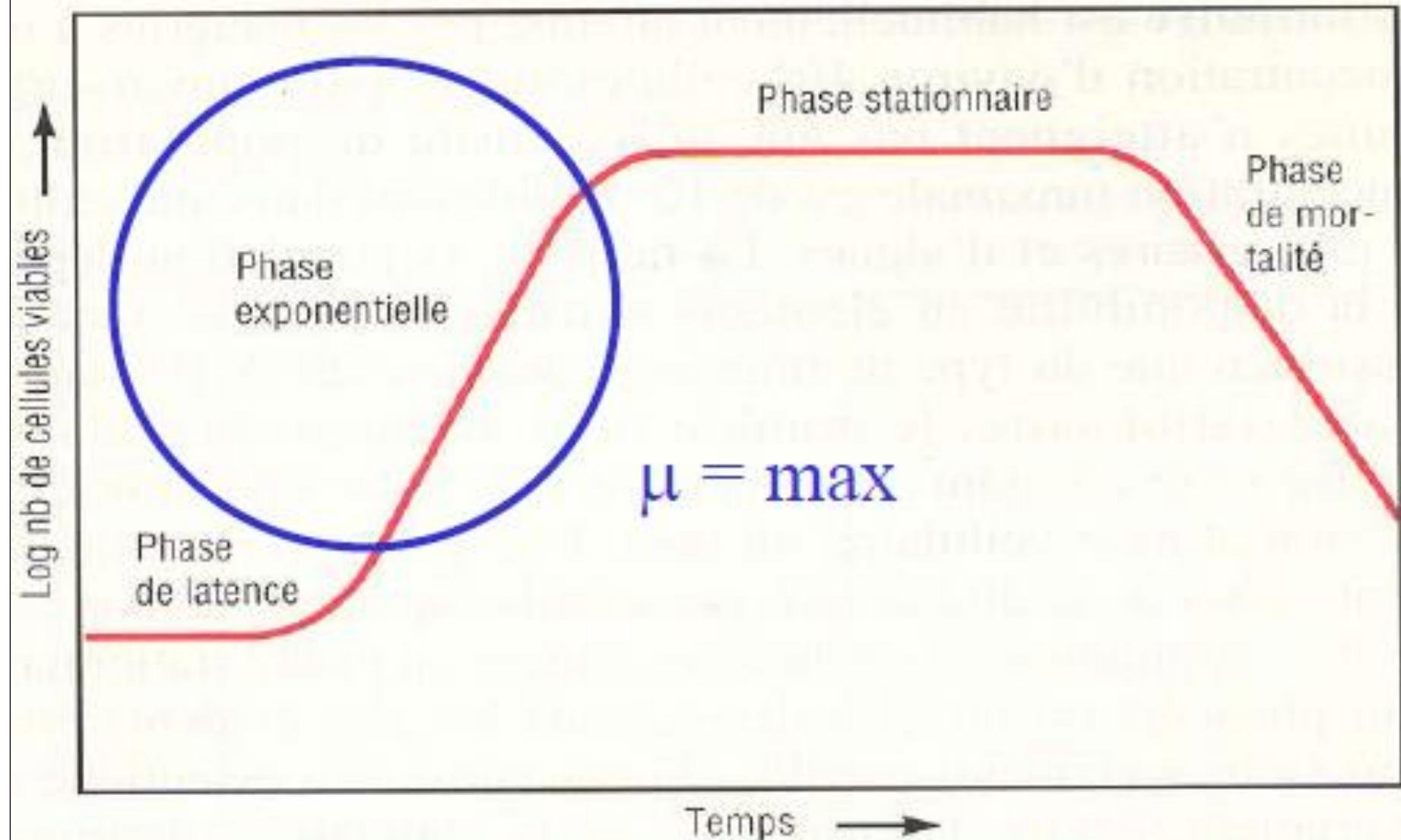
1-phase de latence :

- Le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat
- le taux de croissance est nul ($\mu = 0$)
- la durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu.

2-Phase de Croissance exponentielle :

- Le temps de doublement des bactéries
- plus court, la masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle)
- le taux de croissance atteint un maximum, $\mu > 0$: $\mu = \text{max}$ dure tant que la vitesse de croissance est constante.





3- Phase de ralentissement :

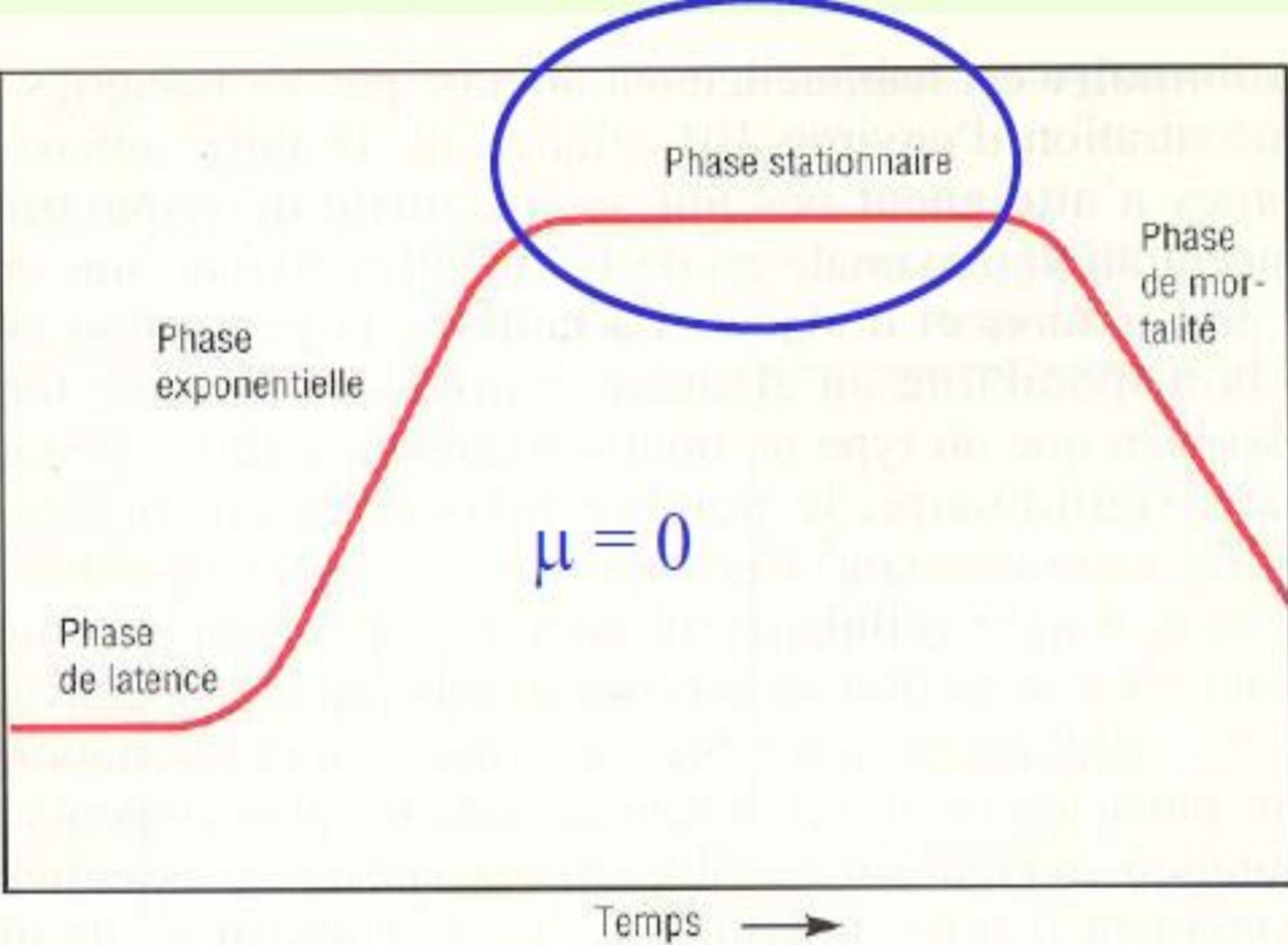
- la vitesse de croissance régresse
- Un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets
- Un début d'autolyse des bactéries ($\mu > 0$, mais inférieure à celle de phase exponentielle).

4- Phase stationnaire :

- Le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$)
- Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent
- 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

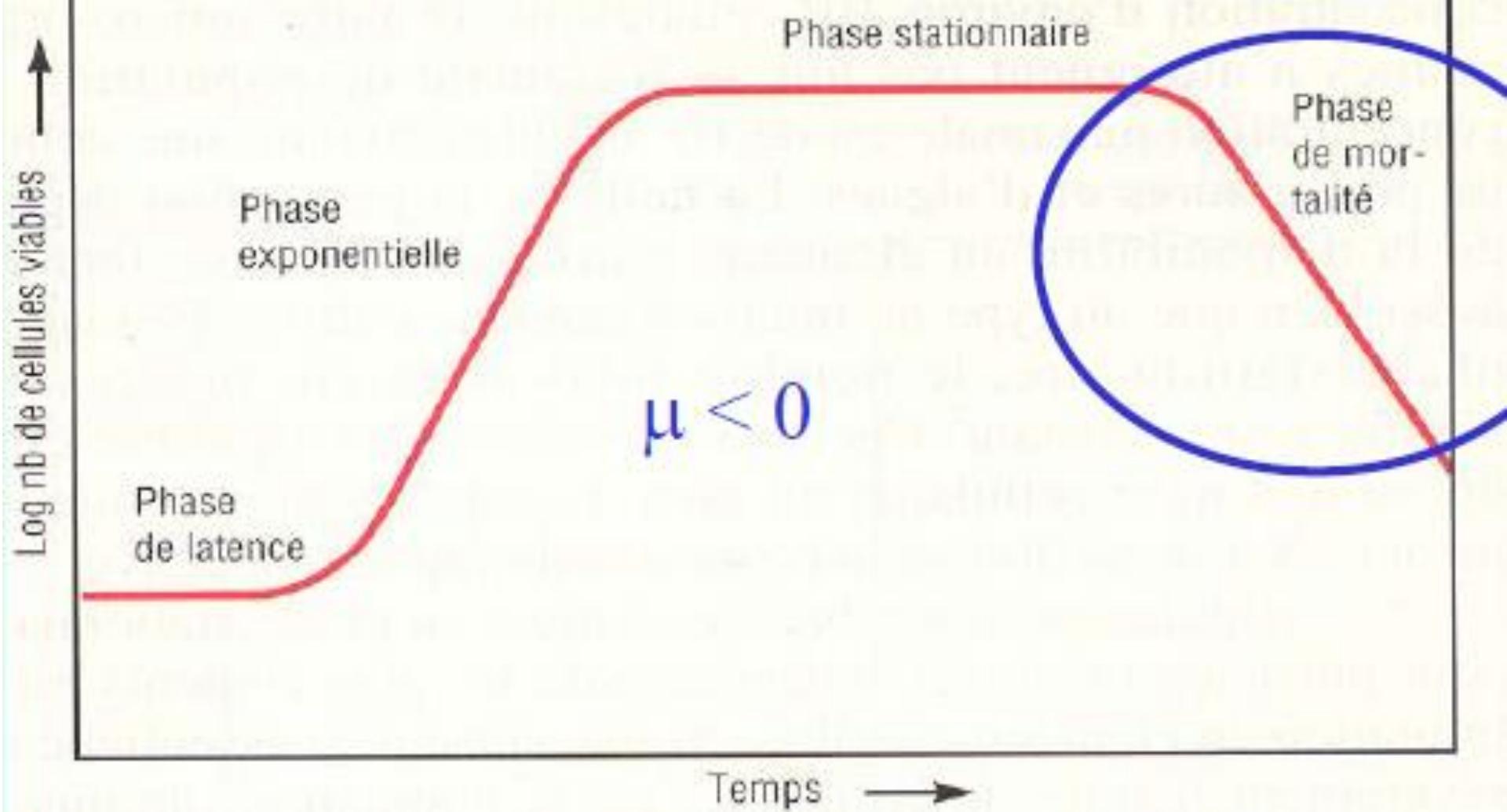
- Le nombre de cellules ne varie plus
- Il y a autant de division que de mort cellulaire
- Une croissance cryptique, ou des cellules se nourrissent du contenu libéré par des cellules mortes.

Log nb de cellules viables



5-Phase de déclin :

- Le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$)
- Toutes les ressources nutritives sont épuisées
- Il y a accumulation de métabolites toxiques
- Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes
- Il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique).



Mesure de la croissance

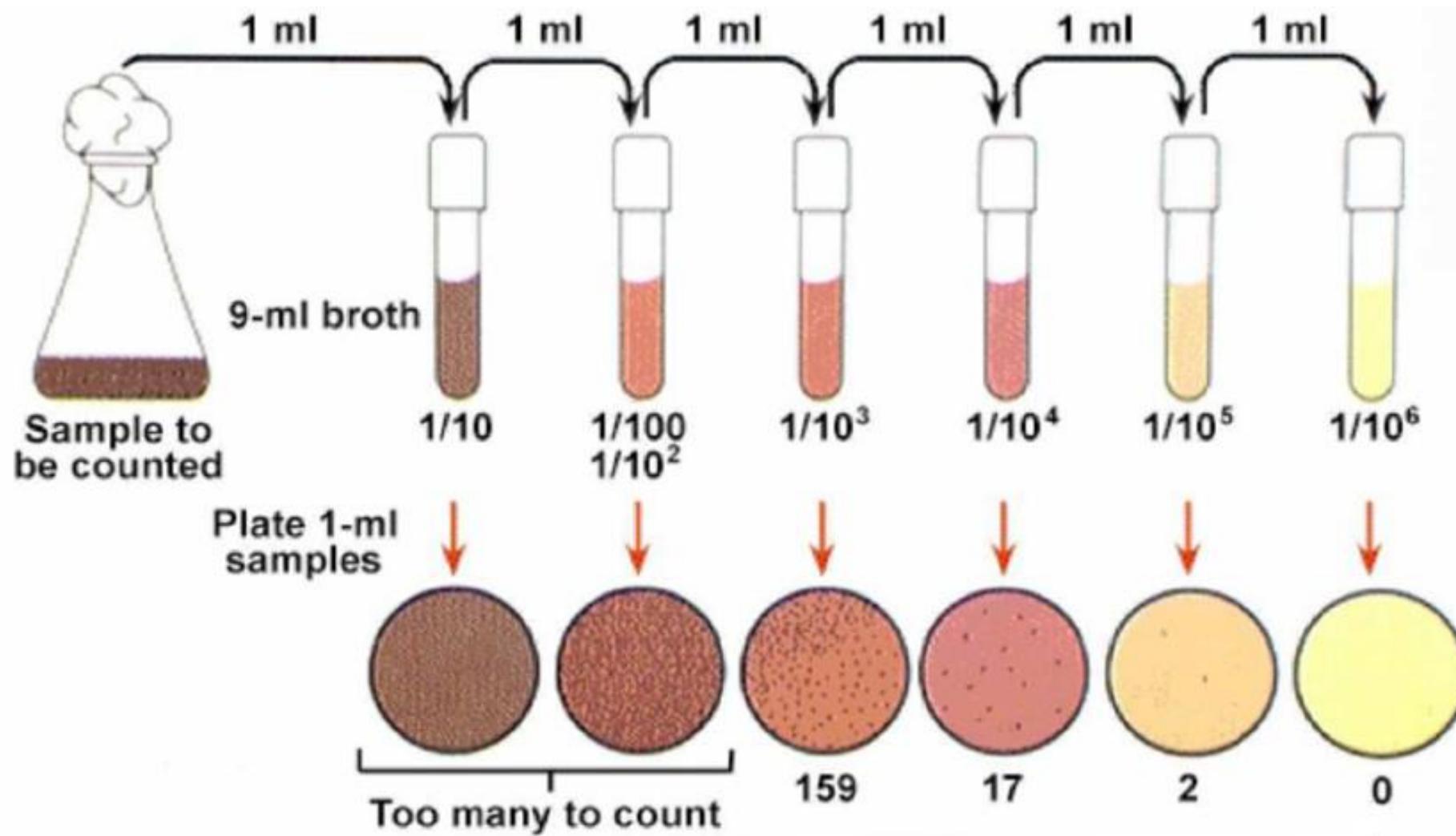
- Plusieurs techniques sont utilisées pour analyser, suivre et mesurer la croissance
- Chacune a des avantages et des inconvénients.
- On distingue les méthodes directes et les méthodes indirectes.
- Certaines distinguent les cellules vivantes des cellules mortes et d'autres, en sont incapables.

Mesures directes

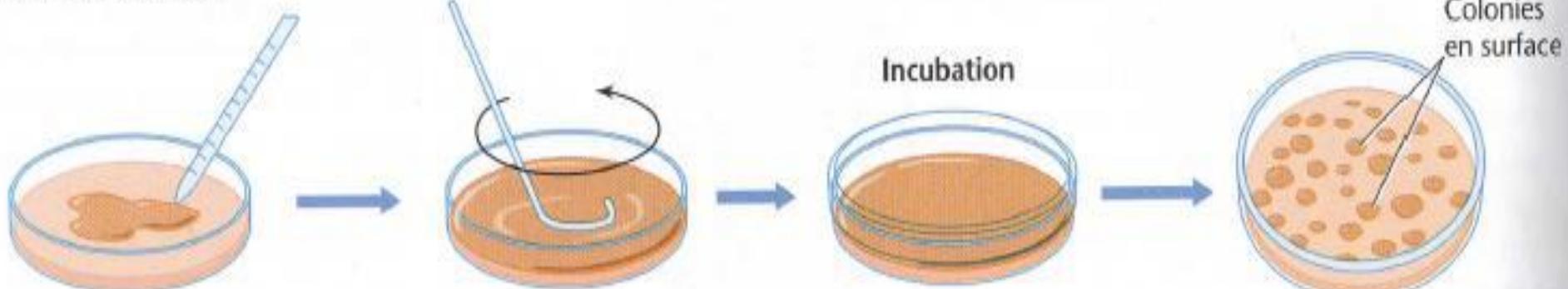
1- Dénombrement des bactéries après culture

- Le résultat est exprimé en nombre de unités formant colonie UFC / 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 boite de Petri.

Dénombrement après culture



Étalement sur boîte



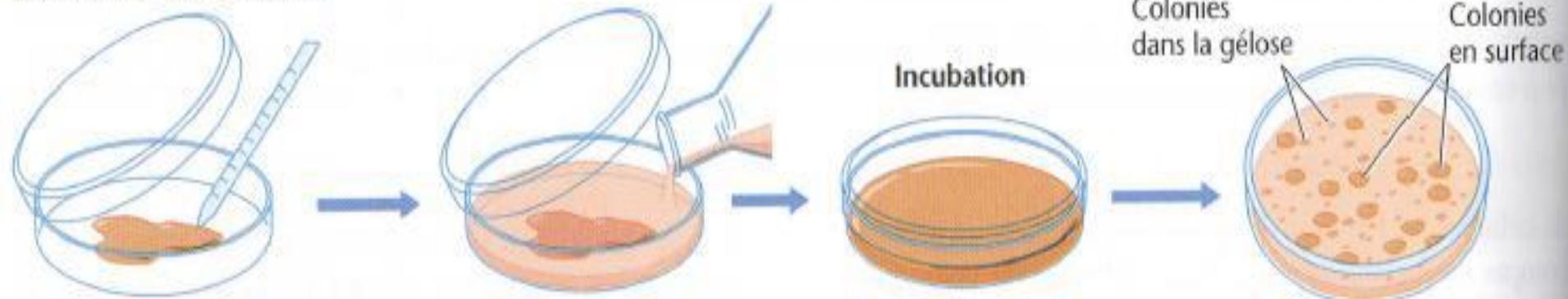
L'échantillon, ou sa dilution,
est placé à la surface
du milieu gélosé
(0,1 mL ou moins)

L'inoculum est étalé
sur l'ensemble de la surface
de la boîte de Petri à l'aide
d'un râteau de verre

Incubation

Résultat type pour les géloses
ensemencées par étalement

Ensemencement en masse



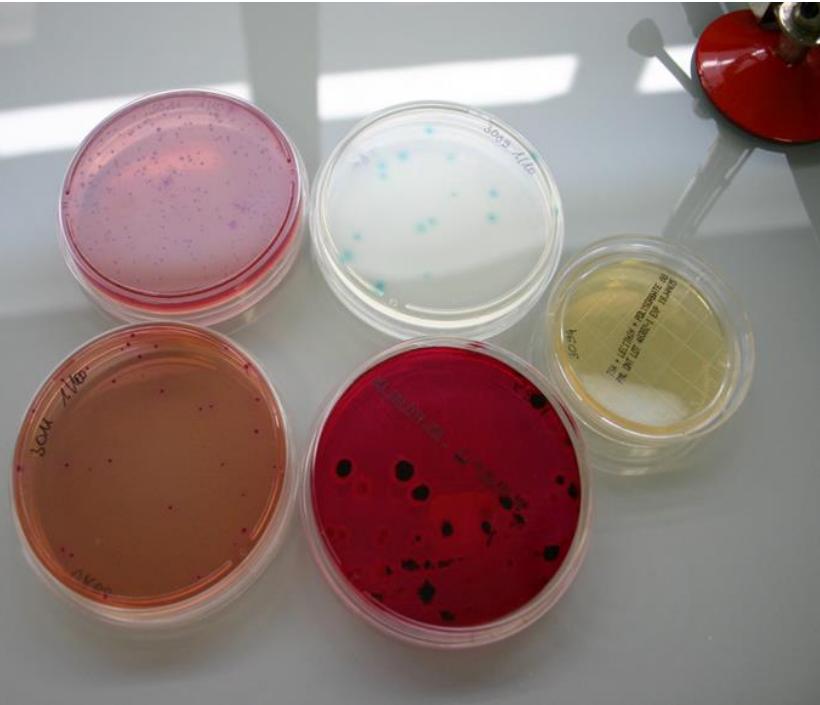
L'échantillon, ou sa dilution,
est placé dans la boîte de Petri

Le milieu stérile est additionné
et mélangé avec l'inoculum

Incubation

Résultat type pour les géloses
ensemencées en masse

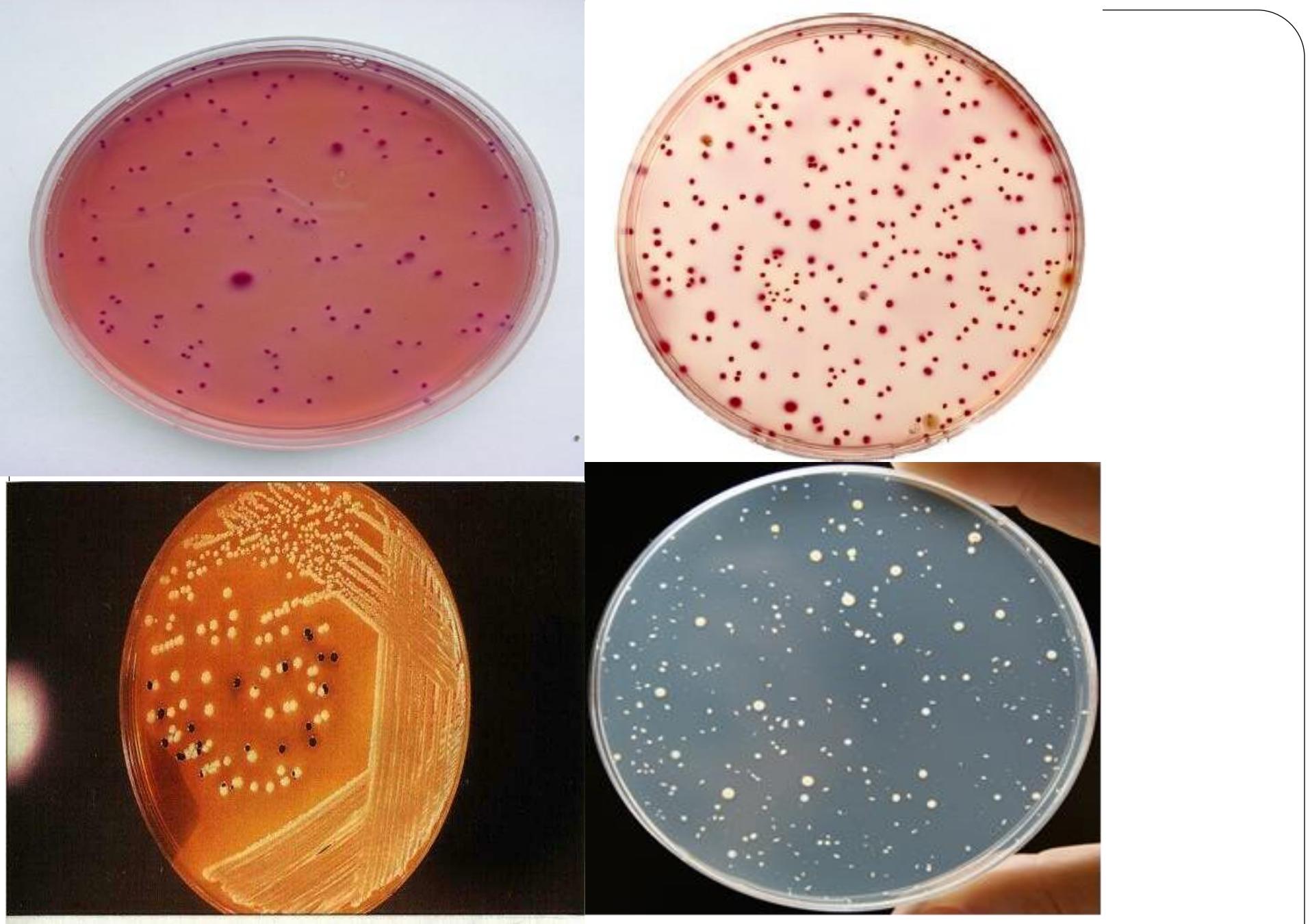
Types d'étalement sur la boîte de Pétri



Etalement en surface
Etalement sur la surface de
milieu de culture solide

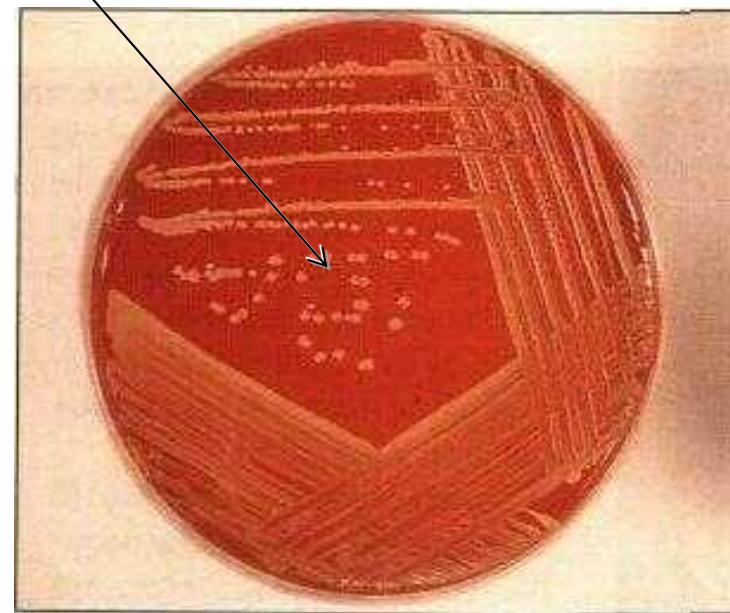


Étalelement en profondeur:
En mettant la suspension mère et en
couvrant avec le milieu de culture



Exemples des colonies après culture

Dénombrement



Comptage



Dénombrement

But : est de déterminer combien d'organismes d'un groupe ou d'une espèce donnée sont présents dans une quantité donnée d'échantillon.

Il y a deux méthodes de base pour déterminer ce nombre : **le dénombrement direct sur un milieu solide** (comptage par boîte) et **la méthode NPP** ou méthode du nombre le plus probable.

Dénombrement sur milieu solide

Principe du comptage par boîte :

- Avoir des colonies bien distinctes les unes des autres
- Compter le nombre de colonies/boîte
- Rapporter à la quantité d'échantillon prélevé

Une bactérie, placée sur un milieu favorable, donnera naissance à une colonie macroscopiquement visible.

UFC = Unité formant colonie



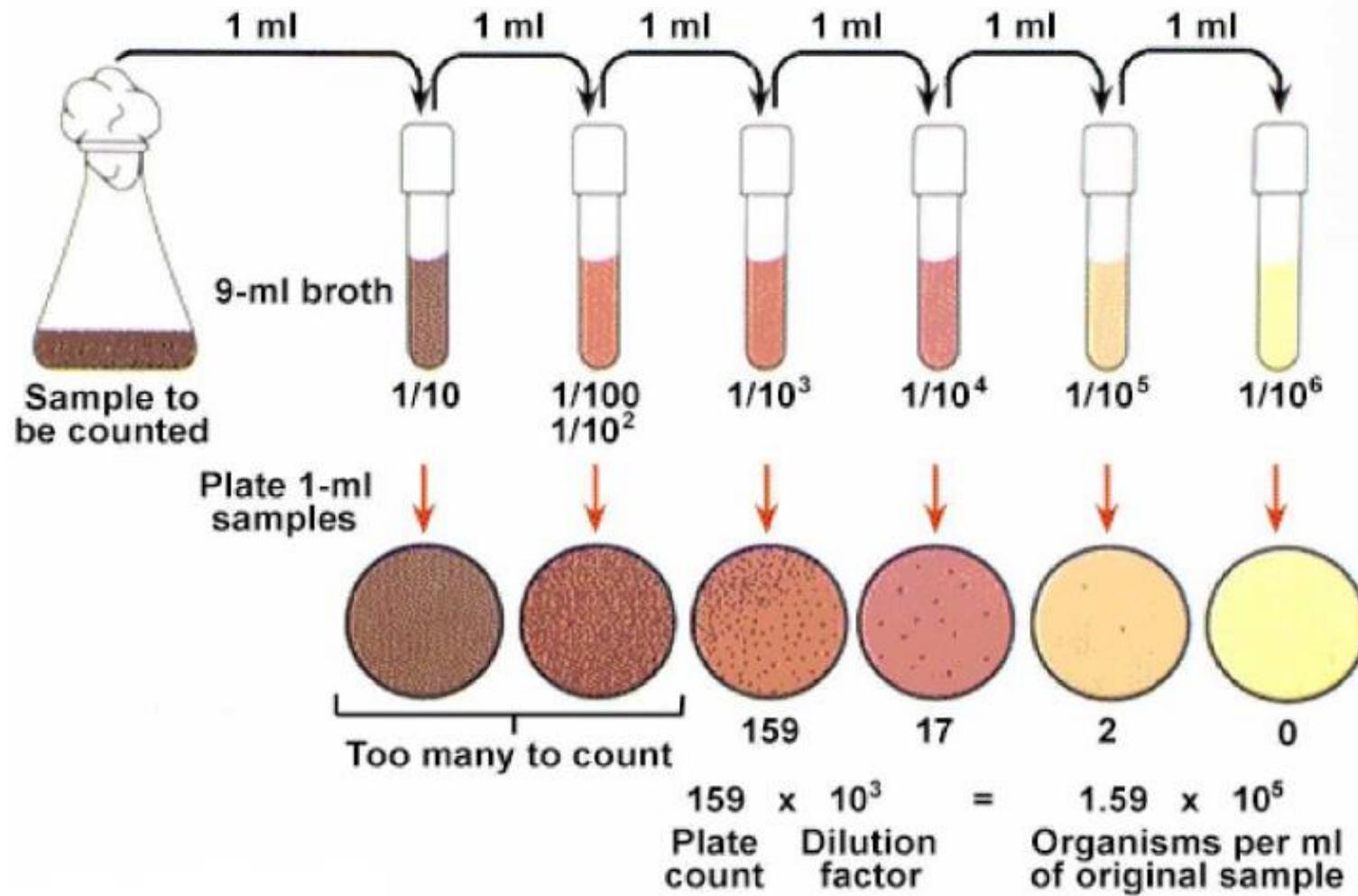
Calcul du nombre de microorganismes par unité d'échantillon

- Cas général sans identification d'après la norme ISO 7218 de mai 1996
- On considère deux dilutions successives ayant donné au moins une boîte contenant plus de 15 colonies.
- On calcule le nombre N de microorganismes présents dans l'unité de mesure de l'échantillon, selon la formule : \,

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{V_{SM}}{V_{pr}}$$

- Avec
- $\sum c$ = nombre total de colonies compté sur les boîtes retenues.
- n_1 = nombre de boîtes comptées à la dilution retenue la plus faible.
- n_2 = nombre de boîtes comptées à la seconde dilution retenue.
- d = facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages sont réalisés : dilution la plus faible .
- V = volume de prise d'essai inoculé en mL.
- V_{SM} = volume de la suspension mère en mL.
- $V_{pr \text{ OU } mpr \text{ OU } Spr}$ = volume de produit (mL) ou masse de produit (g) ou surface de produit (cm²) ayant constitué la suspension mère.

Exemple pour le dénombrement des colonies sur un milieu solide



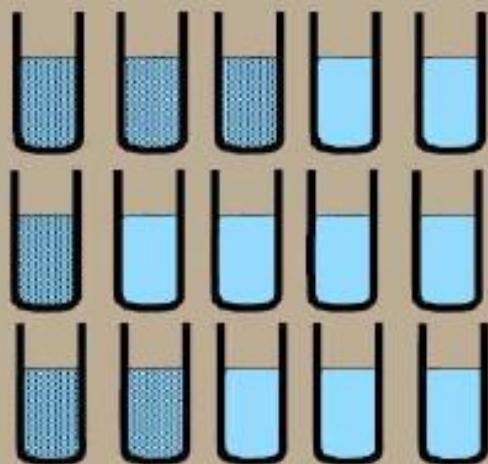
Dénombrement en milieu liquide

- Pour chaque série de culture issue de la même dilution on compte le nombre de tubes positifs (3 séries identiques)
- On compose le nombre caractéristique, et la lecture de la table de **Mac Grady** nous donne le **Nombre le Plus Probable**: NPP.

2.2. CULTURE LIQUIDE

Estimation statistique

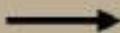
Nombre le plus probable (NPP)



1 ml dans 9 ml

Table de Mac Grady

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
+	+	+	-	-
+	-	-	-	-
+	+	-	-	-
3	2	1	0	0



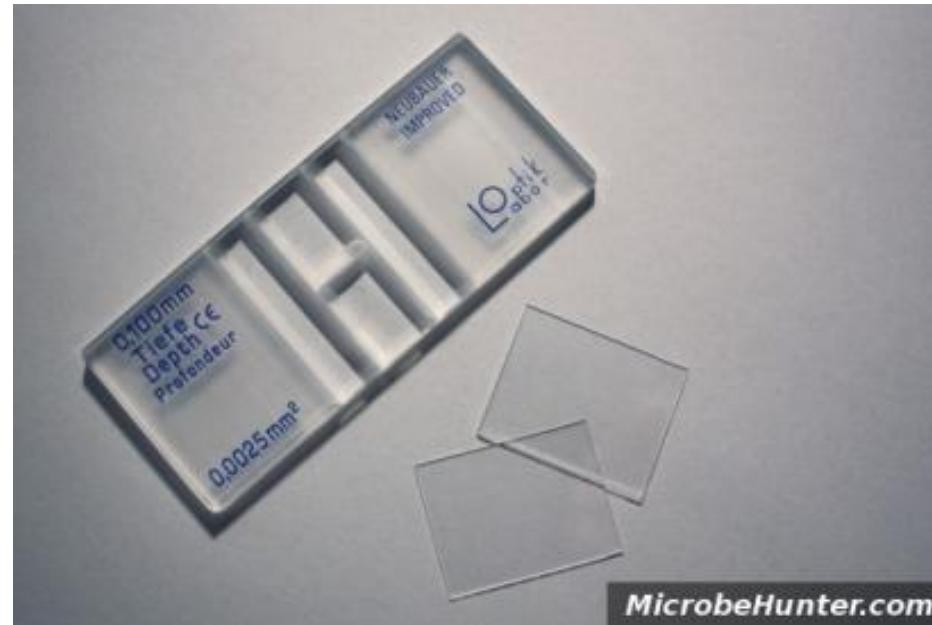
NPP			
3	2	0	9
3	2	1	15
3	2	2	21

Table de Mac Grady pour 3 tubes par dilution

Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP	Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP
0	0	0	< 0,3	2	2	1	2,8
0	0	1	0,3	2	3	0	2,9
0	1	0	0,3	3	0	0	2,3
0	2	0	0,6	3	0	1	4
1	0	0	0,4	3	0	2	6
1	0	1	0,7	3	1	0	4
1	1	0	0,7	3	1	1	7
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	2	0	9
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	3	0	1,6	3	2	2	21
2	0	0	0,9	3	2	3	29
2	0	1	1,4	3	3	0	20
2	1	0	1,5	3	3	1	50
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	2	0	2,1	3	3	3	> 110

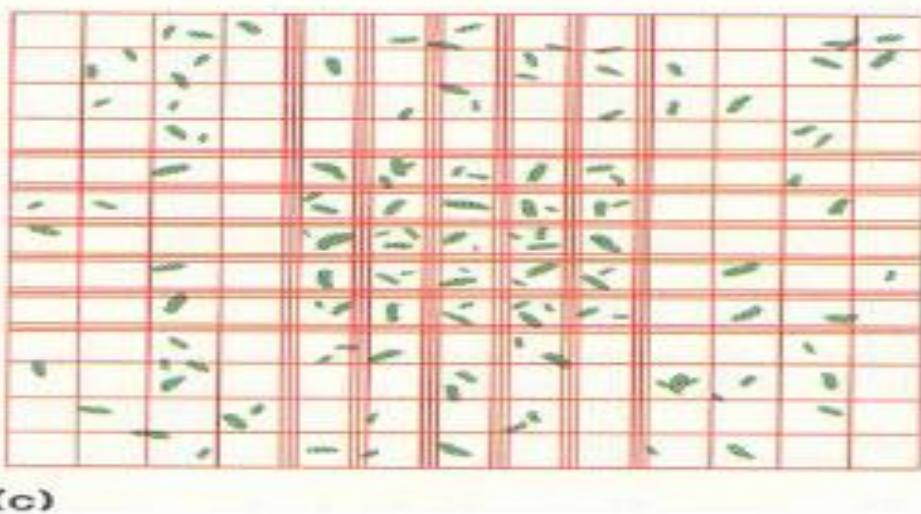
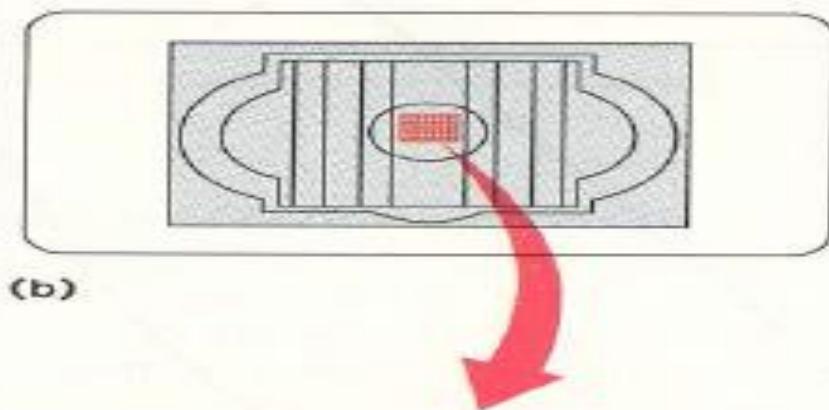
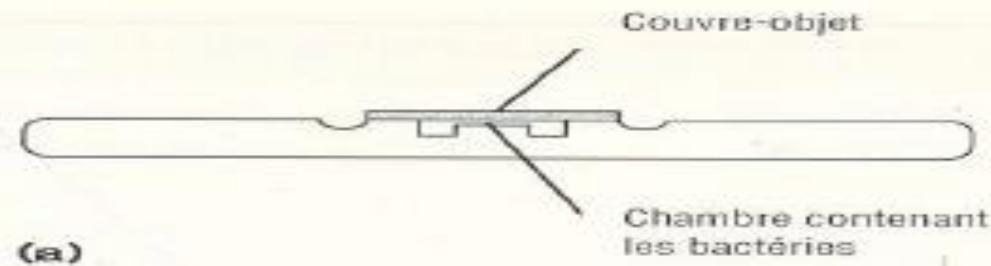
2- Mesure directe par microscope

- 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.



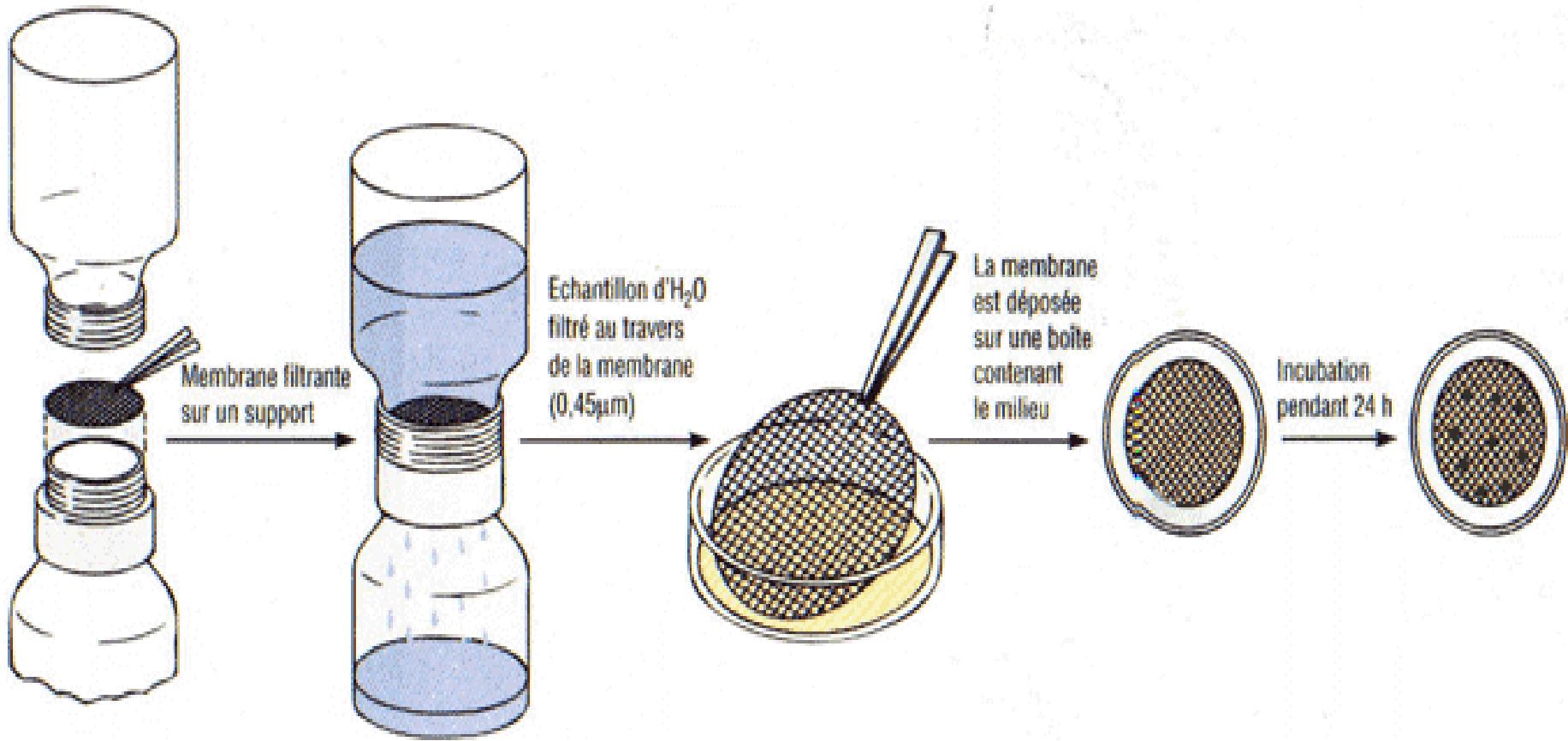
Chambre de comptage de Petroff-Hausser

Cellule de Petroff-Hausser



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
- Une filtration sur membrane de 100 ml d'eau puis la membrane est mise en culture sur boite de Pétri avec la présence de gélose.

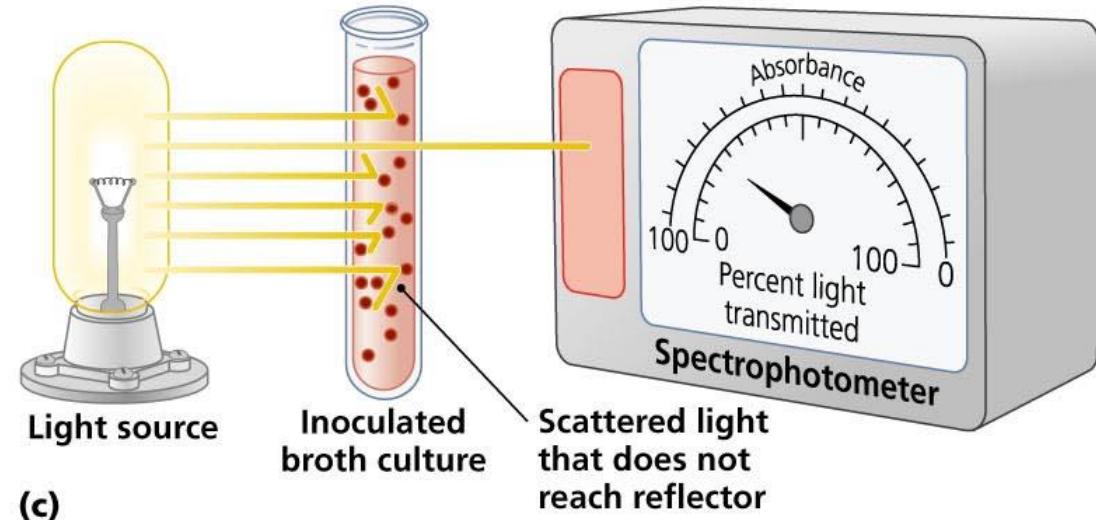
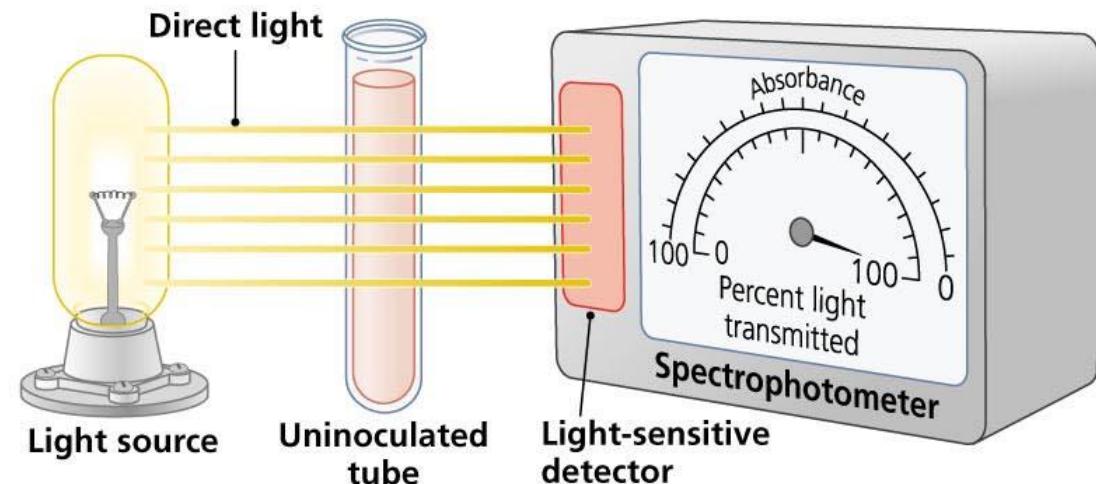


Filtration d'eau sur membrane et dénombrement

Mesures indirectes

Mesure par de la turbidimétrie

- Plus une bactérie pousse dans un liquide plus ce dernier devient trouble.
- On utilise **un spectrophotomètre** pour mesurer cette **turbidimétrie** à travers une mesure appelée densité optique (DO) ou Absorbance (A).
- Plus, il y a de bactéries, plus l'absorbance est basse
- On peut tracer des courbes de corrélation entre le nombre de bactéries et l'absorbance
- Dans la phase exponentielle, elle est représentée par une droite.
- il faut au moins 10^7 bactéries/ml pour pouvoir mesurer DO



Mesure la turbidimétrie

Mesure indirecte par la biomasse sèche

- Les micro-organismes filamentueux ne se prêtent pas facilement aux techniques décrites ci-dessus.
- Leur culture en milieu liquide, peut être centrifugée ou bien filtrée, puis séchée dans un dessiccateur.
- On procède ensuite au pesage.
- Plus la biomasse est élevée plus le nombre de bactérie est grand.
- Cette technique ne différencie pas les bactéries vivantes des mortes.

Mesure indirecte par l'activité métabolique

- On peut suivre la variation du pH, la consommation d'oxygène, de l'ATP par le test de la luciférase.
- L'ATP-métrie correspond à la réaction suivante.



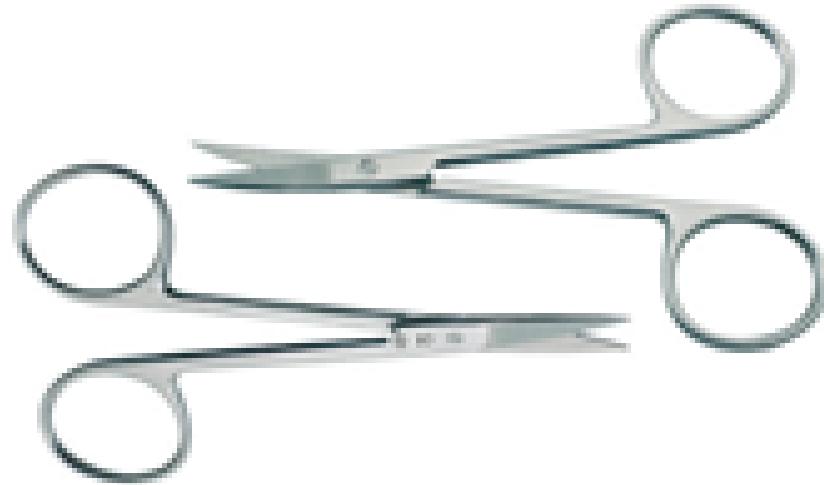
La quantité de lumière émise est inversement proportionnelle à la croissance des bactéries.

1 ATP \approx 1 000 bactéries.

Matériel nécessaire pour une analyse microbiologique



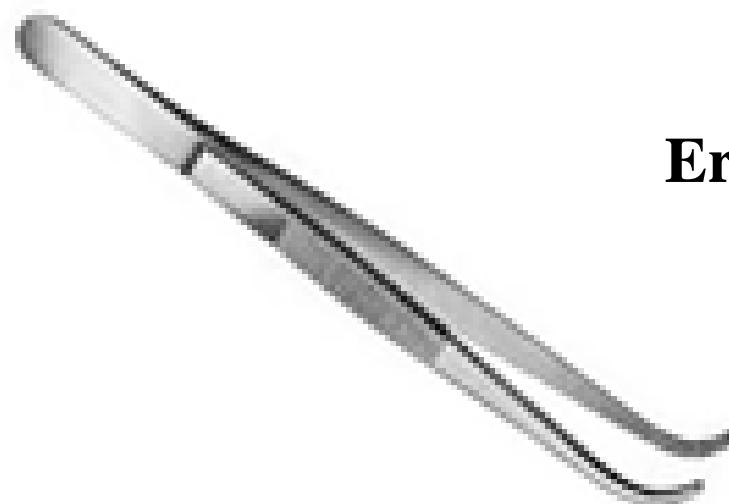
Stomacher



ciseaux



Éprouvette



Erlen Meyer

Pince





Autoclave



Une hotte à flux laminaire

Préparation des milieux de culture



Sélection des ingrédients



Peser les pourcentages



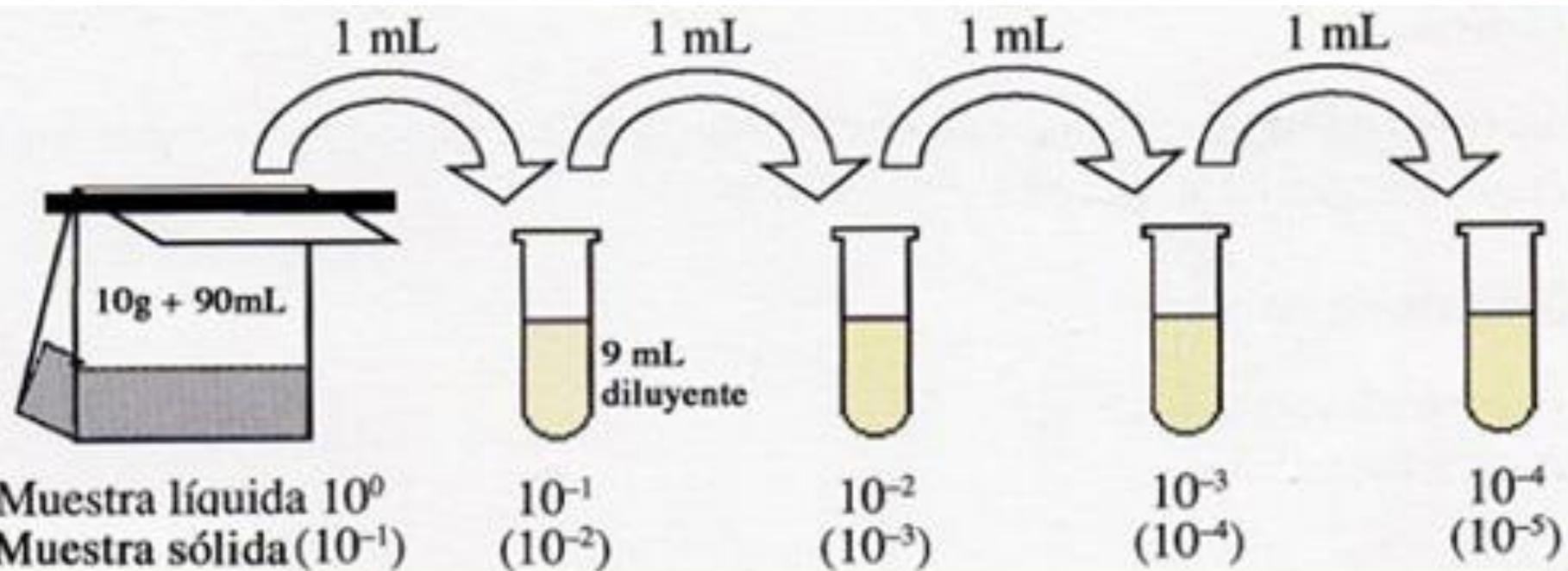
Chauffage et fusion des ingrédients



Garder les milieux de culture jusqu'au moment de son utilisation



Préparation de l'échantillon



Préparation des dilutions



Homogénéisation des tubes



Étalement du milieux de culture dans la boite de pétri



Avec une pipette ensemencer les différents dilutions dans les boites de pétri



Faire une simple agitation de la boîte de pétri



Étuve ventilée

Microorganisme	Milieu de culture	T^a (°C)	Temps (h)	Mode d'ensemencement
FMAT	Plate count agar (PCA)	37	24-48	Ensemencement en masse
Enterobacteries	Violet red bile glucose (VRBG)	30	24-48	Ensemencement en masse (double couche)
Coliformes/ <i>E.coli</i>	RAPID' <i>E.coli</i> 2	45	24	Ensemencement en masse
Staphilococos Aureus	Baird Parker + (yema de huevo con tellurito)	37	48	Ensemencement en superficie
Pseudomonas spp	Pseudomonas Agar Base	25-30	24	Ensemencement en superficie
Levures et moisissures	Dichloran Rose Bengale chloramphénicol (DRBC)	18-25	120	Ensemencement en masse



Lecture de résultat