

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

35 chemin des Maraîchers,
31 062 Toulouse Cedex 4

Introduction aux micro-organismes d'intérêt en santé

**Cours de l'Unité d'Enseignement spécifique
Pharmacie**

**PACES
2019-2020**

Pr C Pasquier, Pr A Valentin

Dr S Chapuy-Regaud, Dr A Coste, Dr H Authier et Dr M Bergé
Laboratoire de Micro-organismes et Biodiversité,

NB : ce polycopié ne peut en aucun cas être diffusé hors de la Faculté. Il reste la propriété de ses auteurs qui se réservent le droit d'utiliser tous les recours légaux en cas de manquement.

Sommaire

1. LE MONDE DES MICRO-ORGANISMES	6
1.1. LA TAILLE DES MICRO-ORGANISMES	8
1.1. LES EUCHARYOTES	8
1.2. LES BACTERIES ET ARCHEES	8
1.3. VIRUS ET AGENTS INFRA-VIRaux	9
1.4. LES UNICELLULAIRES (PROTOZOAires) METAZOAIRES ET MICROMYCETES SUR TERRE	9
1.5. LES BACTERIES SUR TERRE	10
1.6. LES VIRUS SUR TERRE	11
1.7. NOMENCLATURE	11
2. LES BACTERIES	12
2.1 LA STRUCTURE DE LA CELLULE BACTERIENNE	12
2.1.1. <i>Structures externes</i>	12
2.1.2. <i>Structures internes</i>	18
2.2. CROISSANCE ET CULTURE BACTERIENNE	19
2.2.1. <i>Eléments nécessaires à la croissance et à la multiplication bactérienne</i>	19
2.2.2. <i>Les milieux de cultures</i>	21
2.2.3. <i>La division bactérienne</i>	21
2.2.4. <i>Les phases de la croissance</i>	22
2.2.5. <i>Dénombrement des bactéries</i>	23
3. LES VIRUS.....	24
3.1. LA STRUCTURE DES VIRIONS	25
3.2. LA REPLICATION DES VIRUS	27
3.2.1. <i>Les conséquences de la réplication virale</i>	29
3.2.2. <i>Exemples de cycles viraux</i>	30
4. LES MICROMYCETES	32
4.1. STRUCTURE GENERALE	32
4.2. LA PAROI DES CHAMPIGNONS	33
4.3. SAPROPHYTISME ET IMMUNODEPRESSION	34
4.4. CULTURE ET IDENTIFICATION DES MICROMYCETES	35
5. LES PROTOZOAires	35
5.1. LOCOMOTION	36
5.1.1. <i>Mouvement amibioïde (caractéristique des Amibes)</i>	36
5.1.2. <i>Flagellés</i>	36
5.1.3. <i>Ciliés</i>	37
5.2. REPRODUCTION	37
6. LES HELMINTHES.....	39
6.1. LES VERS PLATS	40
6.1.1. <i>Classe des Trématodes</i>	40
6.1.2. <i>Classe des Cestodes</i>	43
6.2. LES VERS RONDS (NEMATODES)	44
7. ARTHROPODES ET VECTEURS.....	46
7.1. ORGANISATION	46
7.2. LOCOMOTION	48
7.3. RESPIRATION	49
7.4. ALIMENTATION ET DIGESTION	50
7.5. CYCLE BIOLOGIQUE	51
7.6. DEFENSES	51
7.7. ECOLOGIE	51
8. PHYSIOPATHOLOGIES DES INFECTIONS	52
8.1. LE POSTULAT DE KOCH	53
8.2. LES ETAPES D'UNE INFECTION	53
8.3. LES TOXINES BACTERIENNES	54
<i>Bactéries toxinogènes</i>	54

8.4. LES DEFENSES DE L'HOTE FACE A L'INFECTION	55
8.5. LES SUJETS A RISQUE D'INFECTIONS	55
9. STRATEGIES DIAGNOSTIQUES EN MICROBIOLOGIE	55
9.1. DIAGNOSTIC DIRECT DES INFECTIONS BACTERIENNES ET FONGIQUES.....	55
9.1.1. <i>Le prélèvement</i>	56
9.1.2. <i>L'examen direct</i>	56
9.1.3. <i>Isolement par culture.....</i>	57
9.1.4. <i>Identification des bactéries et des micromycètes</i>	58
9.1.5. <i>L'antibiogramme</i>	58
9.2. DIAGNOSTIC DIRECT DES INFECTIONS VIRALES	59
9.2.1. <i>Les prélèvements</i>	59
9.2.2. <i>La recherche de virus</i>	59
9.3. DIAGNOSTIC INDIRECT DES MALADIES INFECTIEUSES	61
10. BIBLIOGRAPHIE.....	62
LIVRES DE BASE	62
GROS LIVRES ILLUSTRES	62

Programme des enseignements :

17 h de Cours magistraux : Pr C. PASQUIER, Pr A VALENTIN, Dr A COSTE, Dr H AUTHIER

- Le monde des micro-organismes	1h
- Bactéries	
o Structure de la cellule bactérienne	3h
o Croissance et multiplication des bactéries	1h
- Virus	
o Structure des particules virales	1h
o Réplication des virus	1h
- Micromycètes	1h
o Biologie et structure des micromycètes	
o Saprophytisme et immunodépression	
- Protozoaires	2h
o <i>Plasmodium</i>	
o <i>Leishmania</i>	
o <i>Toxoplasma</i>	
- Plathelminthes	1h30
o <i>Fasciola</i>	
o <i>Taenia</i>	
- Némathelminthes	1h
o Cycles simples (Oxyure)	
o Cycles complexes (Ascaris, Anguillules)	
o Nématodes transmis par des arthropodes (Filaires)	
- Arthropodes et vecteurs	1h
- Physiopathologie des infections	1h30
- Stratégies diagnostiques en microbiologie	2h

3h d'Enseignements dirigés : Dr. H AUTHIER, Dr M BERGE, Dr S CHAPUY, Dr. A. COSTE

- TD Bactériologie et virologie	1h
- TD Parasitologie et micromycètes	1h
- TD Physiopathologie et diagnostic	1h

Entrainement aux QCM et réponses aux questions sur Moodle

Épreuve du concours : 20 QCM en 30 min (15 points)

- Les QCM portent uniquement sur les données du polycopié

En plus de ce polycopié, sont mis à votre disposition sur Moodle :

- Les supports de cours (.pdf)
- Les 3 TD de 20 QCM
- Une banque de QCM permettant de vous évaluer (sujets de 20 QCM aléatoire)

Merci à vous, bon travail et bon courage ...

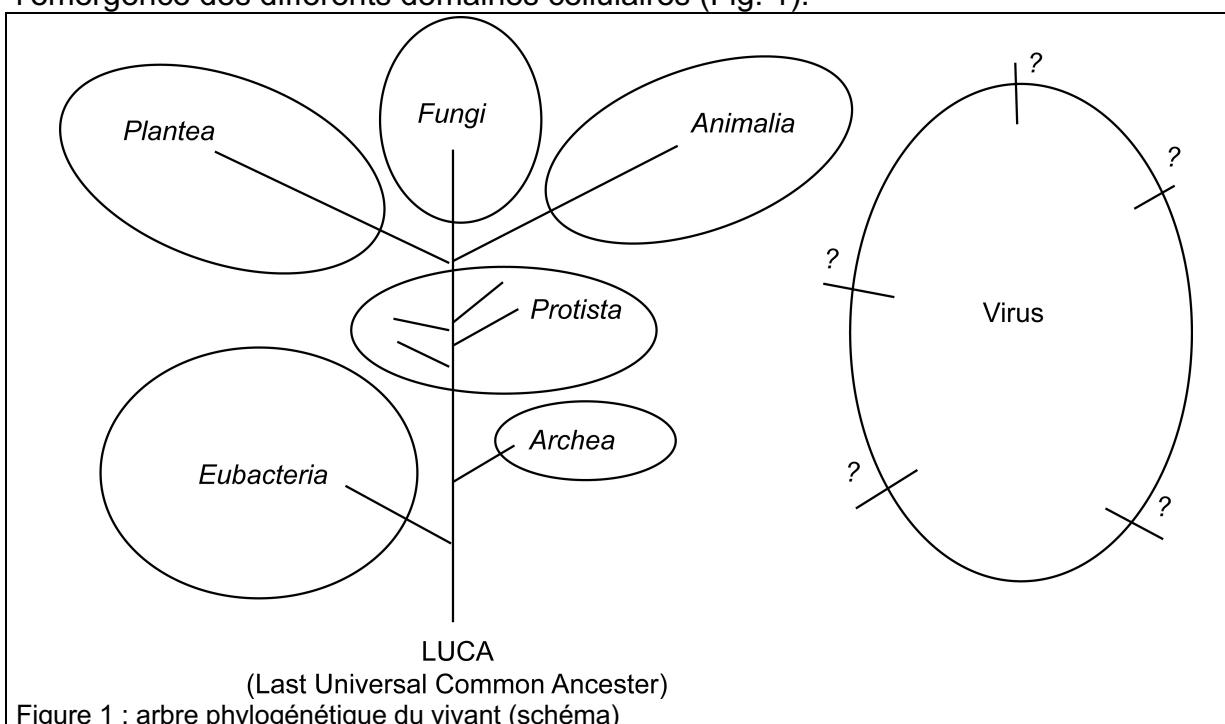
1. Le monde des micro-organismes

Les gènes sont caractérisés par leur capacité à se multiplier et à transmettre leurs caractères à leur descendance et par leur adaptabilité compétitive à l'environnement. Ils sont présents sous forme de 2 types d'organisations biologiques, les cellules et les virus :

Les **cellules** constituant le monde vivant proprement dit et sont actuellement séparées en 3 domaines : les eucaryotes (*Eukarya*), les archées (*Archea*) et les bactéries (*Bacteria* ou *Eubacteria*). Un quatrième domaine, récemment identifié, contient des virus géants dont nous ne parlerons pas dans ce cours car non significativement impliqués dans des infections humaines. Ces différentes cellules possèdent des caractéristiques structurales et métaboliques permettant de les différencier.

- Les **eucaryotes** possèdent, contrairement aux procaryotes, un noyau délimité par une membrane et ont un système de traduction cytoplasmique. Les protistes, végétaux, champignons et animaux sont constitués par ce type de cellules.
- Les **archées** sont des cellules procaryotes souvent retrouvées dans les milieux extrêmes. On ne connaît pas d'archée pathogène pour l'homme ou les animaux.
- Les **bactéries** sont des cellules procaryotes différenciables des archées en particulier par leurs composants. La très grande majorité des espèces bactériennes sont non pathogènes.

Les **virus** sont des agents infectieux simples capables de se multiplier dans les différentes cellules (**parasitisme obligatoire**). Leur diversité est très supérieure à celle des cellules. Les virus infectant les procaryotes sont appelés bactériophages (ou phages). Ils sont impliqués dans les échanges génétiques entre cellules. Certains arguments laissent penser qu'ils pourraient être à l'origine de l'utilisation de l'ADN comme support génétique et l'auraient transmis aux cellules avant l'émergence des différents domaines cellulaires (Fig. 1).



1.1. La taille des micro-organismes

Comme leur nom l'indique les micro-organismes sont le plus souvent de petite taille, invisibles à l'œil nu. De manière générale, la taille des bactéries se mesure en μm (micromètres) et celle des virus en nm (nanomètres). La microscopie optique permet de visualiser les cellules mais le plus souvent pas les virus. La microscopie électronique à transmission permet de visualiser l'ultrastructure des bactéries et la morphologie des particules virales. La diffraction des rayons X et la résonance magnétique nucléaire permettent de déterminer des structures moléculaires plus petites.

1.1.1. Les Eucaryotes

Les Eucaryotes d'intérêt médical se divisent en Unicellulaires (anciennement Protozoaires) et en Métazoaires. Les Unicellulaires sont, par définition, composés d'une seule cellule et leur taille varie de quelques μm (trophozoïte de *Plasmodium* : 2 μm) au quelques dizaine de μm (kyste d'amibes). Certains Unicellulaires sont capables de s'associer pour définir des super-organismes, précurseurs évolutifs des Métazoaires. Les Métazoaires sont pluricellulaires et leur éléments caractéristiques varient de quelques dizaine de μm (œufs d'helminthes) à plusieurs mètres (*Taenia saginata* : 6 à 8 m). Ils sont usuellement mis en évidence par microscopie optique. Les Fungi (champignons ou micromycètes) sont un règne à part dont les éléments vont de quelques μm (levure) à quelques dizaines de cm (thalle de champignons filamentueux).

1.2. Les bactéries et archées

A la différence des eucaryotes, il existe un **couplage de la transcription et de la traduction** pour les bactéries et les archées. Le terme historique « procaryote » n'est plus adapté pour désigner les bactéries et les archées. Ceci est possible car ces 2 phénomènes ont lieu dans un même compartiment : le cytoplasme. Chez les eucaryotes, la transcription est nucléaire et la traduction cytoplasmique. D'autres **différences générales** existent mais elles souffrent d'exceptions plus ou moins fréquentes (Tableau 1).

	Eucaryotes	Bactéries / Archées
Transcription / traduction	Séparées	Couplées (*)
Taille (μm)	2 à 100	0,1 à 10
Membrane nucléaire	Oui	Non
Chromosomes	multiples	Unique le plus souvent
Organites cytoplasmiques	Oui	Non
Phagocytose	Oui	Non
Mitose / Méiose	Oui	Non
Ribosome	80S	70S

Tableau 1 : Principales différences entre Eucaryotes et les deux autres types de cellules (bactéries et archées). (*) pas d'exception à cette règle.

Les archées se différencient des **bactéries** (ou eubactéries) par la composition de leur paroi (absence de peptidoglycane), de leurs membranes (lipides spécifiques en mono couche ou bicouche) et la nature de leurs ARNt, ribosomes et enzymes. Elles sont sur de nombreux points plus proches des eucaryotes que des bactéries. Les archées sont présentes dans des milieux extrêmes en termes de pression (barophile), de température (hyperthermophile), d'acidité (acidophile), de concentration en sels (hyperhalophile) ; certaines sont méthanogènes. Le domaine

Archea comprend 2 règnes : *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota*. *Thermophilus aquaticus*, l'archée à l'origine de la Taq polymérase, vie dans les sources d'eau chaude sous-marines.

1.3. Virus et agents infra-viraux

Les virus sont définis comme des organismes parasites qui vivent dans les cellules qu'ils infectent et produisent des virions (vecteurs inertes de structure spécifique) pour disséminer leurs gènes. Ils ne sont pas autonomes pour leur synthèse protéique ; ce qui conduit à un parasitisme cellulaire obligatoire.

Il existe des agents infectieux de nature plus simple que les virus (Tableau 2) : les **satellites** sont des agents ayant besoin d'un virus auxiliaire (« helper ») pour répliquer leur génome (il peut s'agir d'acides nucléiques satellites ou de virus satellite lorsqu'il code une capsid), les **viroïdes** sont des ARN infectieux (pas de traduction en protéine) et les **agents transmissibles non conventionnels** (ATNC ou prion) sont des protéines infectieuses.

	Satellites	Viroïdes	ATNC
Nature du génome	ARN (ou ADN)	ARN circulaire	absent
Taille du génome	< 1 500 nt	< 400 nt	-
Enveloppe	Variable	non	non
Capside	Variable	non	non
Hôtes	Animaux, Végétaux	Végétaux	Animaux, levures
Exemples :	Paralysie chronique de l'abeille (*)	Filosités des tubercules (tomates et pommes de terre)	Maladie de Creutzfeldt Jakob (homme)

Tableau 2 : Principales caractéristiques des agents infectieux infra-viraux. (*) chez l'homme le virus de l'hépatite D (HDV) se comporte comme un virus satellite vis-à-vis du virus de l'hépatite B (HBV), mais il est classé parmi les virus.

1.4. Les Unicellulaires (Protozoaires) Métazoaires et Micromycètes sur terre

Le rôle écologique des Unicellulaires est fondamentale dans la biosphère marine, en effet les unicellulaires végétaux (phytoplancton) et les algues, capables de photosynthèse et donc autotrophes, initient la **chaîne trophique** marine, puis les unicellulaires animaux hétérotrophes (zooplancton) les consomment et la chaîne se poursuit jusqu'aux prédateurs ultimes. Dans la biosphère terrestre, l'initiation de la chaîne trophique est plutôt le fait des végétaux inférieurs (Bryophytes, Thallophytes et Ptéridophytes) et supérieurs (Spermaphytes) associés aux bactéries et aux Fungi (mycorhizes).

Les organismes animaux ont donc des capacités de détection (chimiotactiques, visuelles, etc.) de leurs proies et des capacités "d'ingestion" de celles-ci. Ce dernier point va impliquer des capacités d'endocytose / phagocytose pour les Unicellulaires (avec des organites spécifiques comme chez les Paramécies) et le développement d'organes dédiés (bouche) chez les métazoaires. Associé au développement d'un système nerveux dédié à la détection des proies, à la fuite devant les prédateurs et au recueil d'information sur les milieux externes et internes, ce développement entraînera la céphalisation. En parallèle, les capacités de déplacement vont croître (amibioïsme et flagelles/cils chez les Unicellulaires, velum des Cnidaires, palettes natatoires ou capacité de reptation des Annélides, appendices articulés des Arthropodes et membres de Vertébrés pour aller jusqu'à la conquête du milieu aérien

(Oiseaux, Reptiles Mammifères). Un grand nombre d'interactions, entre les organes d'un même individu (Système nerveux et hormonal, etc.), entre les individus d'un même groupe (sexualité, protection, éducation, etc.) et entre individus de groupe différents (pathologie, relations trophiques, etc.) se développent (cf. cours Biodiversité) Un certain nombre d'Animaux parasites verront les spécialisations anatomiques s'amenuiser pour une spécialisation vers des fonctions de reproduction et de relation presqu'exclusive, on parlera alors de régression liée au parasitisme.

Les Fungi forment un règne à part (ni animal, ni végétal), ils sont en effet spécialisés dans le saprophytisme et le développement sur des tissus morts (ou incapables de se défendre dans le cas des Fungi pathogènes). Environ 90 000 espèces de champignons ont été décrites à ce jour, mais on estime que moins de 10 % des espèces sont connues et identifiées à ce jour. Un champignon est formé d'un appareil végétatif appelé thalle, sans tissus fonctionnels ni organes différenciés, constitué soit de cellules végétatives allongées et cloisonnées nommées hyphes (filaments mycéliens) ou de cellules uniques se multipliant par bourgeonnement (levures). Ils sont **absorbotrophes** et ont d'extraordinaires capacités d'absorption par diffusion qui est leur seul moyen de s'alimenter (l'ingestion est un caractère animal), ils sont en effet hétérotrophe, au moins pour le carbone. Hormis quelques champignons très inférieurs, ils sont dépourvus de système de déplacement et émettent un très grand nombre de spores qui vont contribuer à leur extension.

1.5. Les bactéries sur terre

Elles sont très probablement les descendantes de cellules primitives. On retrouve des fossiles de bactéries datant de plus de 3,5 milliards d'années soit 1 milliard d'années après la formation de la terre. Ces bactéries sont des **cyanobactéries** présentes dans des concrétions minérales appelées **stromatolithes** (une sorte de corail bactérien). Ces bactéries sont douées de photosynthèse et par leur production d'oxygène sont très probablement à l'origine de l'atmosphère terrestre (et de la couche d'ozone protectrice).

Au cours de l'évolution, des bactéries intracellulaires sont devenues des **organites cytoplasmiques** (chloroplastes et mitochondries) par **endosymbiose**. Ces organites conservent de nombreuses caractéristiques bactériennes (génome, chaînes métaboliques, division, ...).

Grâce à leurs importantes capacités de multiplication et d'évolution, les bactéries ont colonisé tous les milieux terrestres contenant de l'eau sous forme liquide. On estime qu'elles représentent une **biomasse** (masse de matière vivante), supérieure à celle des végétaux.

Les organismes supérieurs, dont l'Homme, sont colonisés par les bactéries. Ces relations sont en général bénéfiques aux 2 partenaires (**symbiose**). Les bactéries sont parfois indifférentes à leur hôte (**commensalisme**). On estime que 1,5 à 2% du poids d'un être humain est composé de bactéries ce qui correspond à 10^{17} bactéries (10^{14} dans l'appareil digestif, 10^{12} sur la peau, 10^{10} dans la bouche, ...) pour seulement 10^{16} cellules eucaryotes humaines. Cette population bactérienne constitue un véritable organe, le **microbiote**. Les bactéries sont indispensables à l'Homme en particulier pour sa digestion et la production de vitamines.

Elles sont également fort utiles dans l'industrie alimentaire (fermentations) et dans le recyclage de la matière organique dans l'environnement.

1.6. Les virus sur terre

L'origine des virus n'est probablement pas unique. Certains seraient les descendants des ARN auto-réplicatifs (ribozymes) à l'origine de la vie, d'autres pourraient être des descendants de cellules parasites intracellulaires s'étant simplifiées à l'extrême et enfin certains seraient des gènes cellulaires ayant acquis leur indépendance et la capacité à passer d'une cellule à une autre.

Ils ont un rôle majeur dans l'évolution par leur implication dans les échanges génétiques entre cellules qui permettent de diffuser les gènes ou les stratégies qu'ils ont explorées depuis plus de 3 milliards d'années (soit 10^{43} générations, contre moins de 10^4 pour l'*Homo sapiens*). Ils ont des capacités d'adaptation bien supérieures à celle des bactéries. On les retrouve dans tous les milieux où des cellules sont présentes. L'eau de mer contient ainsi plus de 10^7 virus / mL, essentiellement des bactériophages (soit 10^{31-32} phages au total, soit mis bout à bout une longueur supérieure à celle de l'univers visible – 10^{24} m). On estime que plus de 11 % du génome humain est d'origine virale et résulte de cicatrices d'infections survenues tout au long de l'évolution (seul 2,5 % de notre génome contient des gènes non répétés et peut être considéré comme « humain »).

1.7. Nomenclature

Pour les eucaryotes, ...

En taxinomie le nom binomial, ou binôme, provient de la combinaison de deux noms, servant à désigner un taxon de rang inférieur au genre. Initialisée et formalisée par Carl von Linné (Naturaliste suédois, 1707-1778), la nomenclature binominale constitue le "système linnéen". De manière simplifiée, le monde vivant est ainsi divisé en (exemple : Homme moderne et Homme de Néandertal):

Monde vivant : **Règne** (*Animalia*) → **Embranchement** (*Métazoa*) → **Phylum** (*Chordata*), [Superclasse (*Vertebrata*)] → **Classe** (*Mammalia*) → **Ordre** (*Primates*) → **Famille** (*Hominidae*) → **Genre** (*Homo*) → **Espèce** (*sapiens*) → **variété** (*sapiens* ou *Neandertalis*). Le nom du descripteur est ensuite rajouté, complet ou abrégé). De manière usuelle, on se sert du nom de genre et du nom d'espèce, en latin (nomenclature internationale permettant de s'affranchir des différences linguistiques : *Homo sapiens sapiens* est l'Homme, The Man, El Hombre, Der Mensch, 男, 等, etc.)

Pour les bactéries, la nomenclature est en latin. On distingue différents niveaux dans la classification identiques à ceux des eucaryotes, du plus haut au plus bas : **Règne** (*Prokaryotae*) → **Domaine** (*Bacteria*) → **Phylum** (*Proteobacteria*) → **Classe** (*Gammaproteobacteria*) → **Ordre** (*Enterobacteriales*) → **Famille** (*enterobacteriaceae*) → **Genre** (*Escherichia*) → **Espèce** (*Escherichia coli*), sous-espèce, souche. Le nom vernaculaire est colibacille.

En pratique courante, les bactéries sont nommées par le nom de **genre** suivi du nom **d'espèce** et éventuellement de sous-espèces ou de souche. Le nom de genre prend une majuscule à la première lettre. En abrégé on utilise uniquement l'initiale du genre. Les deux noms s'écrivent en italique. Par exemple : *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), ...

Dans certains cas il existe des noms d'usage ou vernaculaire : colibacille, staphylocoque doré, bacille pyocyanique ...

Pour les virus, la nomenclature est en anglais. On distingue différents niveaux dans la classification, du plus haut au plus bas : **Ordre** (*Herpesvirales*) → **Famille** (*Herpesviridae*) → **Sous-famille** (*Alphaherpesvirinae*) → **Genre** (*Simplexvirus*), espèce (*Human herpesvirus 1*), type. Tous sont écrits en italique avec une majuscule à la première lettre de chaque nom et des terminaisons spécifiques (notées entre parenthèses).

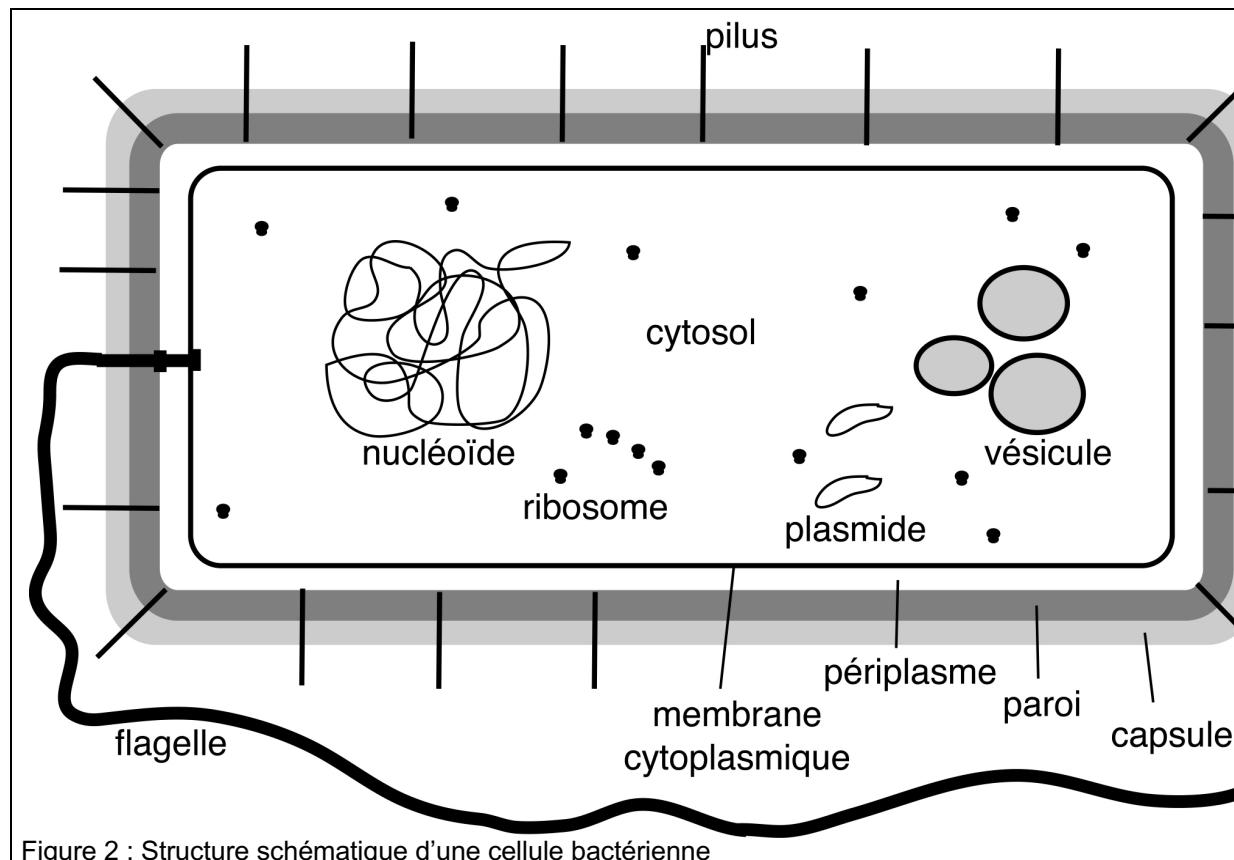
En pratique courante, les virus sont nommés par le nom d'**espèce** et éventuellement de type. Par exemple : *Human herpesvirus 1* (HHV-1), *B19 virus* (B19V), *Influenzavirus A*

Dans certains cas, il existe des noms d'usage : virus herpès simplex type 1 (HSV-1), parvovirus B19, virus de la grippe A ...

2. Les bactéries

2.1 La structure de la cellule bactérienne

Les cellules bactériennes sont délimitées par une membrane phospholipidique. Nous détaillerons les structures et éléments situés à l'extérieur de cette membrane puis les éléments internes (Fig. 2).



2.1.1. Structures externes

a) la membrane cytoplasmique

Elle est composée d'une **bicoche phospholipidique semi-perméable** séparant le cytosol bactérien du milieu extérieur. Elle doit médier les échanges avec l'environnement. Elle comporte diverses protéines impliquées dans le transport de

métabolites à travers la membrane et dans le métabolisme énergétique. Contrairement aux membranes des cellules eucaryotes, elles ne contiennent **pas de stérols** (cholestérol en particulier, sauf pour les *Mycoplasma*).

Les passages à travers la membrane sont **passifs** (diffusion des gaz : CO₂, O₂), **facilités** par des protéines pour des substrats concentrés dans l'environnement ou **actifs** pour les substrats peu concentrés (fer). Pour ces derniers, le transport nécessite une ou plusieurs protéines (récepteur, transporteur) et de **l'énergie**.

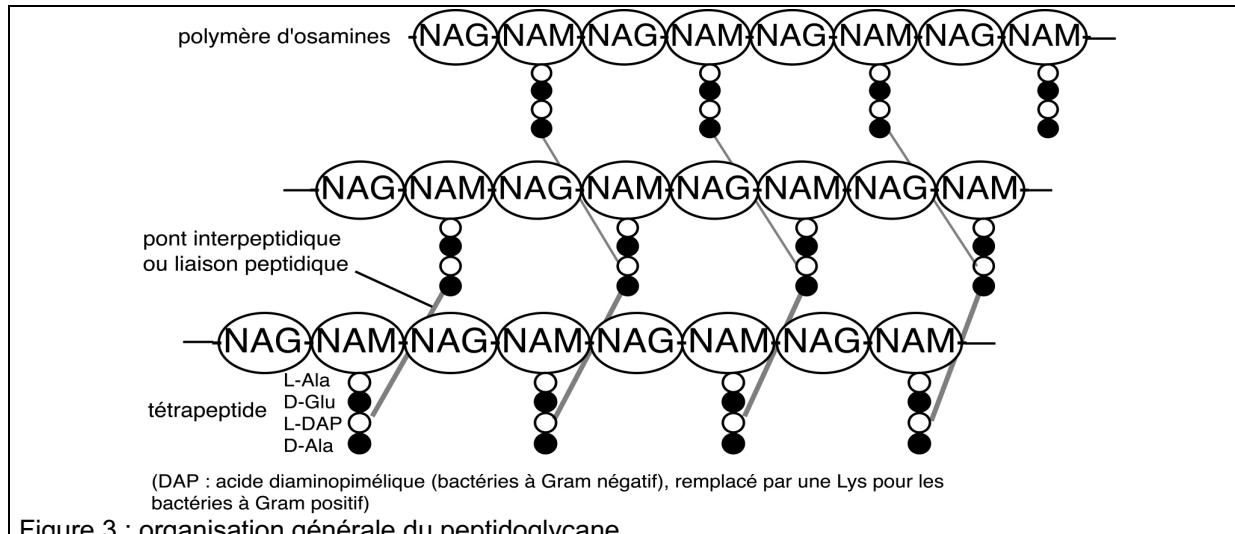
La face interne de la membrane cytoplasmique bactérienne est porteuse de protéines spécifiques constituant une **chaîne de transfert d'électrons** ayant une organisation proche de celle présente dans les mitochondries. Elles catalysent des réactions d'oxydoréductions conduisant à la formation **d'adénosine 5'-triphosphate** (ATP) et vont générer un gradient d'ions H⁺ de part et d'autre de la membrane. Le substrat servant d'accepteur final pour l'électron produit permet de définir le type de métabolisme de la bactérie : **respiration aérobie** s'il s'agit de l'oxygène (aérobiose) ou **respiration anaérobie**, s'il s'agit de substrats minéraux tels que SO₄²⁻, Fe³⁺, NO₃⁻. La bactérie peut également utiliser un composé organique (pyruvate par exemple) comme accepteur final d'électron sans mettre en jeu de chaîne respiratoire (processus de **fermentation**).

Les **récepteurs** présents à la surface des bactéries vont reconnaître les substrats extérieurs, éventuellement déterminer leur concentration pour permettre leur transport dans la bactérie ou la mobilité de la bactérie vers des concentrations plus élevées (**chimiotactisme**).

b) la paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique qui par sa rigidité va conférer sa forme à la bactérie et assurer son intégrité. Cette structure est absente chez certaines bactéries (Genre *Mycoplasma*) et les eucaryotes. Le composé principal et spécifique de la paroi bactérienne est le **peptidoglycane** (ou mucopeptide, parfois appelé muréine).

Le **peptidoglycane** est un polysaccharide structuré par des liaisons peptidiques. Sa composition est variable selon les bactéries mais sa structure générale est commune. Il est constitué de longues chaînes **polysaccharidiques d'osamines**, constituées d'une alternance de **N-acétyl glucosamine** (NAG) et d'acide **N-acétyl muramique** (NAM) liés entre eux par des liaisons glycosidiques en β-1,4. Les deuxièmes constituants sont de courtes **chaînes peptidiques** (4 acides aminés en général ou tétrapeptides) constituées d'une alternance d'acides aminés lévogyres (L) et dextrogyres (D). Les acides aminés 2 et 3 sont variables selon les espèces bactériennes. Ces peptides sont fixés sur les résidus d'acide N-acétyl muramique des polymères. Les derniers éléments sont des **liaisons peptidiques** ou chez les bactéries à Gram positif des ponts interpeptidiques (pentaglycine par exemple) qui vont lier entre eux les tétrapeptides et donc les polymères. L'ensemble forme un réseau dense et structuré (Fig.3).



La synthèse du peptidoglycane débute dans le cytoplasme bactérien avec la production du NAM à partir du NAG, de la D-Ala à partir de la L-Ala et avec la production de sous-unités constituées de NAG-NAM diphosphates associés à un transporteur. Un pentapeptide est fixé sur le NAM et se termine par un **motif D-Ala-D-Ala**. Le transporteur fait passer ses sous-unités à l'extérieur de la membrane plasmique où elles vont se polymériser pour former les chaînes polysaccharidiques. Des enzymes bactériennes, les **transpeptidases** et **DD-carboxypeptidases** vont lier les pentapeptides entre eux et libérer la D-Ala terminale pour former le tétrapeptide final décrit plus haut et les ponts interpeptidiques. La structure en réseau va ainsi acquérir sa cohérence et sa résistance.

Le peptidoglycane est une structure dynamique. Il est continuellement en cours de synthèse et de destruction du fait de la croissance de la cellule, de ses divisions et des agressions extérieures. Les bactéries vont pouvoir le détruire grâce à leurs autolysines. Le lysozyme, contenu dans la salive par exemple, va détruire les liaisons β -1,4 entre les résidus NAG et NAM. Certains antibiotiques, comme les bêta-lactamines (par exemple la pénicilline) sont reconnus par les transpeptidases et DD-carboxypeptidases (appelées également protéines liant les pénicillines ou PLP) et vont ainsi bloquer la synthèse du peptidoglycane et conduire à la destruction de la bactérie. Ces antibiotiques possèdent une structure mimant le motif D-Ala –D-Ala.

La paroi des bactéries dites à **Gram positif** (Fig. 4) est riche en peptidoglycane qui forme une couche épaisse (20 à 80 nm). Elle contient de plus des **acides teichoïques** (polyglycérol phosphate ou polyribitol phosphate essentiellement) fixés sur le peptidoglycane ou sur les lipides membranaires (acides lipoteichoïques). D'autres polymères, dont les acides teichuroniques, et des protéines sont également retrouvés. Le peptidoglycane va piéger de l'eau et des cations divalents (Ca^{2+}) constituant ainsi un manteau hydrophile autour de la bactérie. Les acides teichoïques sont porteurs d'antigènes spécifiques.

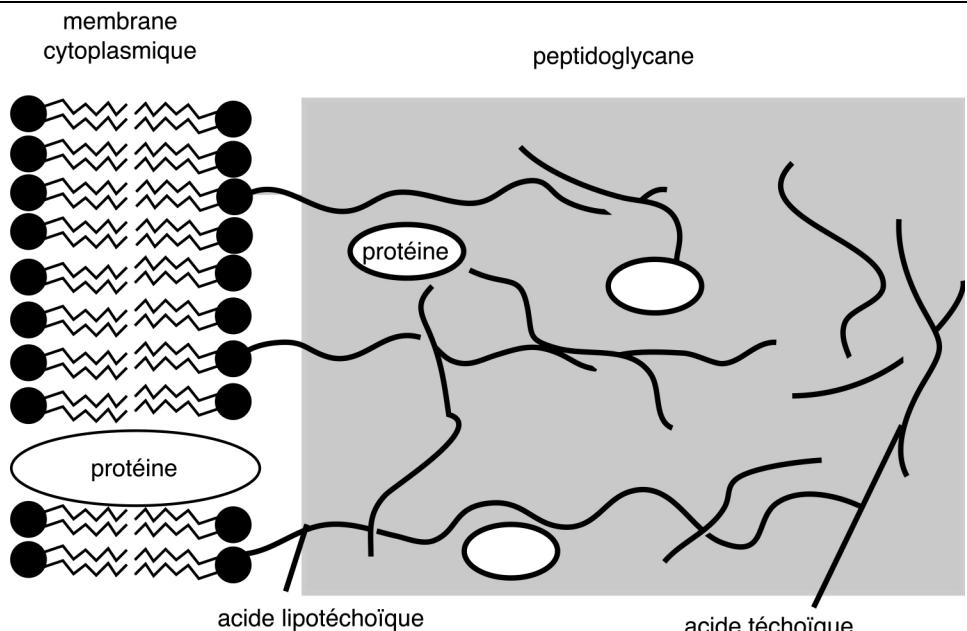


Figure 4 : Structure schématique de membrane cytoplasmique et de la paroi d'une bactérie à Gram positif.

La paroi des bactéries dites à **Gram négatif** comporte une **membrane externe** spécifique délimitant un espace périplasmique (ou périplasme) qui contient peu de peptidoglycane et des protéines (PLP notamment)(Fig. 5).

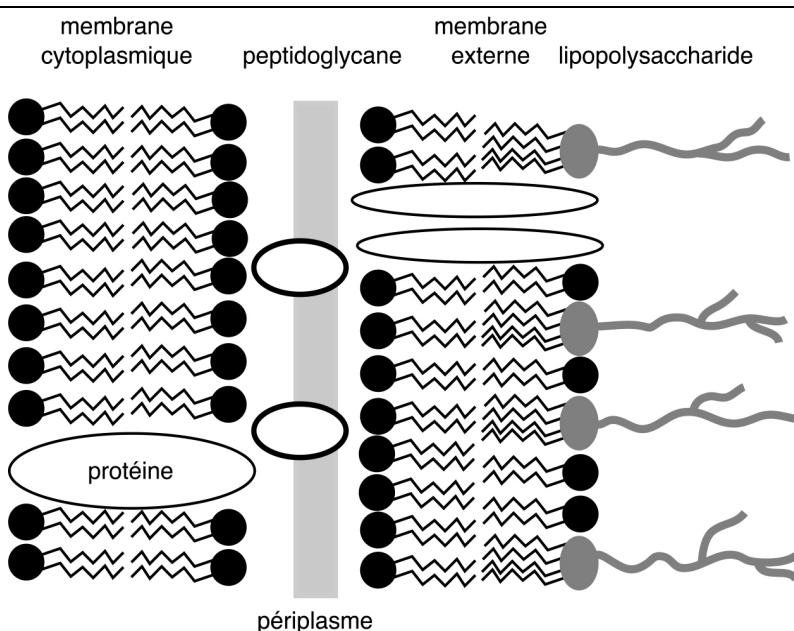


Figure 5 : Structure schématique de membrane cytoplasmique et de la paroi d'une bactérie à Gram négatif.

Cette membrane externe est également une bicouche phospholipidique, mais elle possède sur son feuillet externe des phospholipides particuliers : les **lipopolysaccharides (LPS ou endotoxines)**. Ce LPS est composé de 3 parties (Fig. 6) : une partie phospholipidique (ou **lipide A**), un **noyau** contenant des oses spécifiques et enfin **l'antigène O (AgO)** constitué de répétition de motifs osidiques. Cette membrane externe forme une barrière hydrophobe supplémentaire autour de la bactérie. Les **porines** sont des protéines transmembranaires assurant la diffusion de certaines molécules hydrosolubles à travers la membrane externe. L'antigène O forme une zone hydrophile riche en cations divalents (Ca^{2+}).

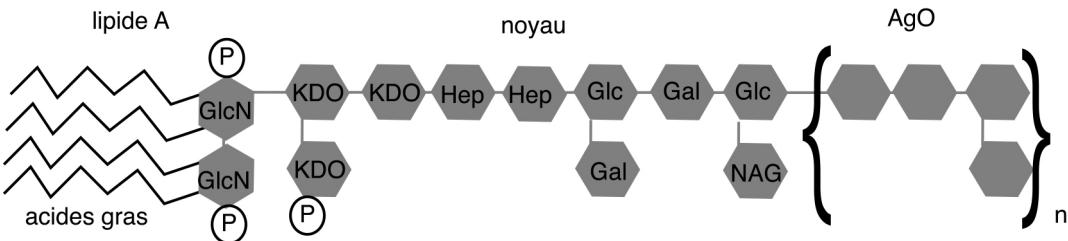


Figure 6 : Structure schématique du lipopolysaccharide.(GlcN, KDO, Glc et Gal sont des hexoses et Hep des heptoses).

La paroi des mycobactéries (exemple : bacille de la tuberculose ou *Mycobacterium tuberculosis*) possède, à l'extérieur d'une épaisse couche de peptidoglycane, des cires (arabinogalactanes sur lesquels sont fixés des acides mycoliques) qui forme avec des glycolipides une membrane mycobactérienne ou mycomembrane rendant ces bactéries particulièrement résistantes, notamment à la phagocytose (Fig.7). Au laboratoire, ce type de paroi est résistant aux acides et alcools (acido alcool résistante). Ceci est mis en évidence par la coloration de Zielh-Neelsen.

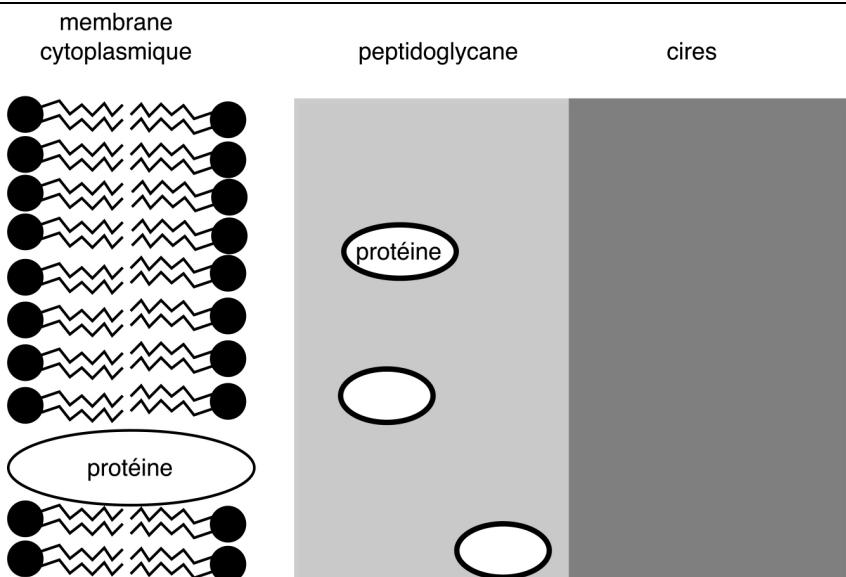


Figure 7 : Structure schématique de la membrane cytoplasmique et de la paroi des mycobactéries.

Les propriétés de la paroi bactérienne :

Elle va déterminer la **morphologie** des bactéries (Fig. 8). Après destruction du peptidoglycane des bactéries à Gram négatif par des Bêta-lactamines, on obtient en milieux isotoniques des **sphéroplastes**. Pour les bactéries à Gram positif, le lysozyme permet d'obtenir des **protoplastes**.



Figure 8 : principales formes des cellules bactériennes. Ces structures peuvent s'associer entre elles par 2 (diplocoques par exemple) ou plus (chaînes, amas, ...).

La coloration de Gram est un outil de base au laboratoire et permet d'observer en microscopie optique (grossissement X 1000 en immersion dans de l'huile) la morphologie des bactéries et la nature de leur paroi (Gram positif ou négatif). Les bactéries sont fixées, en général par la chaleur, sur une lame de verre dégraissée, puis colorées en violet par le **cristal violet**. Le colorant pénètre dans les cellules puis est insolubilisé grâce au lugol (iode). Une **décoloration** à l'alcool-acétone permet l'élimination du colorant violet des cellules à Gram négatif uniquement. Enfin une **recoloration** en rose par la fuchine permettra aux bactéries décolorées de devenir visibles. Les bactéries à Gram négatif apparaissent alors en **rose** alors que les bactéries à Gram positif sont **violettes**.

La paroi bactérienne est reconnue, grâce à des récepteurs, par les bactériophages. Ceci permet un typage des bactéries en fonction des bactériophages auxquels elles sont sensibles (**lysotypie**).

La paroi est porteuse d'antigènes bactériens (AgO, acides techoïques) qui peuvent permettre d'identifier une bactérie au laboratoire ou d'induire une réponse immunitaire naturelle ou par l'intermédiaire d'un vaccin les contenant.

c) le glycocalyx

Ce sont des fibres polysaccharidiques entourant la paroi. Le glycocalyx permet l'attachement des bactéries entre elles ou sur un support pour former des micro-colonies ou des **biofilms** (micro-colonies sur support).

d) la capsule

La capsule est plus dense et importante que le glycocalyx. La capsule est constituée de polymères d'acides uroniques (galacturoniques, glucuroniques, hyaluroniques), d'eau et de cations divalents. Elle se comporte comme un gel entourant une bactérie isolée (forme **planctonique**) ou un groupe de bactéries (micro-colonie). La capsule donne un **aspect muqueux** (lisse, brillant) des colonies bactériennes en culture et peut être mise en évidence en microscopie optique après **coloration à l'encre de Chine** (halo translucide entourant les corps bactériens). La capsule porte des antigènes pouvant être reconnus par des anticorps spécifiques ou être inclus dans des vaccins. La synthèse d'une capsule par les bactéries est souvent dépendante des conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent (stress, sécheresse). Ce phénomène est réversible. La bactérie capsulée a des capacités d'adhérence supérieures, peut échapper plus facilement aux défenses de l'hôte infecté et peut résister à la dessiccation (déshydratation).

e) les appendices externes

Ils sont fixés à la membrane et à la paroi bactérienne.

Les flagelles assurent la **mobilité** de la bactérie et sont visibles en microscopie optique grâce à des colorations spécifiques. Ce sont de longs filaments protéiques constitués de **flagelline** et porteurs de l'antigène H (**AgH**). Leur nombre (unique ou multiple) et leur disposition sont variables (**périthriche** : sur toute la bactérie, **lophotrichie** : en crinière, **polaire** : à 1 ou 2 extrémités d'un bacille). Le flagelle est ancré de manière complexe dans la membrane grâce à un axe coudé à son extrémité extérieure. Cet axe tourne sur lui-même (10 à 50 tours /min) grâce à l'énergie fournie par le potentiel de membrane (concentration différentielle en H^+) et provoque des battements du flagelle. La bactérie s'oriente dans l'espace en détectant les gradients de concentration des substrats ou des toxiques

(**chimiotactisme**), ce qui lui permet selon les cas, soit de se diriger vers la source, soit de la fuir. Elle progressent ligne droite puis s'arrête, s'oriente et repart.

Les pili (un pilus) sont de 2 types.

- Les **pili sexuels** sont des appendices externes longs, creux, aux extrémités renflées. Ils sont peu nombreux à la surface de la cellule et joue un rôle important dans les échanges génétiques entre bactéries par **conjugaison** (transfert de gènes d'une bactérie donatrice, mâle, vers une bactérie réceptrice, femelle). Ces pili sont codés par le **facteur F** (pour fertilité) d'origine le plus souvent plasmidique (plasmide conjugal). Seules les bactéries dites mâles possèdent ce facteur et expriment à leur surface des pili sexuels. Dans le pont cytosolique créé entre les deux bactéries par le pilo, l'ADN plasmidique passe sous forme simple brin. Dans la bactérie réceptrice, le second brin est synthétisé puis circularisé. Cette dernière devient alors mâle. Les plasmides conjuguatifs peuvent être rapidement perdus. Le facteur F peut s'intégrer au chromosome bactérien et permettre le transfert par conjugaison d'une partie du chromosome ; bactéries dites Hfr (Haute fréquence de recombinaison).

- Les **pili classiques** ou **fimbriae** constituent le second type de pilo. Ce sont des appendices protéiques, rigides, courts et nombreux surtout sur les bactéries à Gram négatif. Ils ont un rôle dans **l'adhérence** sur des supports organiques ou non et dans **la colonisation**.

2.1.2. Structures internes

a) le cytosol

Il est constitué d'une solution aqueuse contenant des protéines, des électrolytes et des acides nucléiques. Il contient le système de traduction de la bactérie (ribosomes) et parfois des vésicules de stockage (corps d'inclusion, vésicules gazeuses, lipidiques). Il n'existe pas de système membranaire complexe comme l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique rugueux (RER).

b) le génome bactérien

Le **chromosome** bactérien est le support principal de l'information génétique de la cellule. Il est le plus souvent unique (certaines bactéries en ont 2 ou 3) et constitué d'une molécule d'ADN double brin en général circulaire d'une taille de 1 à 6 Mpb. La séquence nucléotidique va définir les différents gènes (pas d'intron) et est spécifique de l'espèce. Les séquences nucléotidiques de nombreux génomes bactériens sont actuellement disponibles. L'ADN chromosomique est présent dans le cytosol sous **forme super-enroulée** et associée à des protéines (pas d'histones ni de nucléosome), des enzymes (transcription, réplication, réparation) et des ARN pour former une structure appelée **nucléoïde** (visible en microscopie électronique). Les gènes bactériens sont transcrits en ARNm dans le cytoplasme ; directement et immédiatement traduit par les ribosomes qui vont former des polyribosomes (ribosomes à la queue leu leu sur l'ARNm).

Les **plasmides** sont des ADN circulaires de taille inférieure à celle des chromosomes et ayant une réplication autonome (origine de réplication), c'est à dire indépendante de celle du chromosome. Ils ne sont pas indispensables à la survie bactérienne et leur présence est en général régulée (nombre de plasmide et incompatibilité entre plasmides différents). Les plasmides codent des protéines conférant à la bactérie des possibilités de synthèse et d'adaptation plus importante :

production de pili sexuels, de facteurs de virulence (toxines, ...), de facteurs de résistance dans l'environnement ou aux antibiotiques, de capacités métaboliques inhabituelles. Les plasmides de fonction inconnue sont dits cryptiques.

Des échanges génétiques horizontaux peuvent s'effectuer entre bactéries parfois d'espèces différentes. La **conjugaison** s'effectue d'une bactérie donatrice vers une bactérie réceptrice via les pili sexuels codé comme nous l'avons vu par le facteur F. La **transformation** consiste en la captation d'ADN en solution par des bactéries compétentes pour la transformation, puis à l'intégration éventuelle par recombinaison de ses ADN au génome bactérien. La transduction consiste à la transmission de fragment génomique via le bactériophage. La **transduction** peut être généralisée lorsque le génome bactérien est fragmenté et encapsidé au hasard dans les têtes des phages. La transduction est dite localisée lorsqu'un phage lysogène, c'est à dire sous forme de prophage, embarque une partie du génome cellulaire en continuité avec le prophage. Dans tous les cas les transposons permettent un brassage génétique aux sein du chromosome et des plasmides bactériens.

c) Les ribosomes

Les ribosomes bactériens (70S) sont différents de ceux des eucaryotes et sont constitués d'ARN et de protéines. Ils comprennent 2 sous-unités (30S et 50S) et permettent la synthèse des protéines bactériennes. Ils sont localisés à proximité de la membrane plasmique.

d) les endospores

Les **endospores** ou spores sont des formes de survie pour certaines bactéries, dites **sporulées**. Ces structures sont produites lorsque la bactérie se trouve dans des conditions environnementales difficiles pour elle. Elle produit alors cette structure reproductive très résistante lui permettant de survivre à ces conditions et de produire de nouveau une **forme végétative** par **germination** quand la situation redevient favorable. Contrairement à la forme végétative, la spore est non pathogène et n'a pas de métabolisme. Les spores sont résistantes à la chaleur, aux rayonnements ultraviolets, au froid, aux désinfectants, à la dessiccation et au vide. Elles sont visibles en microscopie optique et lorsqu'elles sont de taille importante vont déformer le corps bactérien (spore déformante terminale ou sub-terminale). Le bacille responsable du tétanos (*Clostridium tetani*) est une bactérie capable de sporuler et la spore est contaminante.

2.2. Croissance et culture bactérienne

2.2.1. Éléments nécessaires à la croissance et à la multiplication bactérienne

Ce sont les nutriments qui vont permettre la définition de milieux de cultures et les conditions environnementales qui vont, elles, définir les paramètres d'incubation des milieux.

- **les nutriments** sont des composés biochimiques directement assimilables par les bactéries (oses, acides aminés, ...). Ils sont nécessaires à l'entretien de la cellule bactérienne et à sa croissance. Ils doivent couvrir les besoins élémentaires en C, H, N, O, Fe, Ca, S, P, ... Selon la source utilisée pour obtenir ses nutriments, on distingue des bactéries **hétérotrophes**, qui nécessitent un apport en carbone organique qui sera métabolisé, et des bactéries **autotrophes** ou **lithotrophes** qui utilisent le carbone du CO₂.

Certaines bactéries ont en plus besoin de facteurs de croissance (acides aminés particuliers, vitamines, bases, ...) et sont dites **auxotrophes** (contrairement aux **prototrophes**). Les besoins énergétiques des bactéries sont couverts par l'énergie lumineuse lors de la photosynthèse (bactéries **phototrophes**) ou par oxydoréduction de substrats organiques ou minéraux (bactéries **chimiotrophes**, chimioorganotrophes ou chimiolithotrophes).

- **La température.** En fonction de l'optimum thermique (température permettant la meilleure croissance bactérienne), on distingue des bactéries **hyperthermophiles** ($>80^{\circ}\text{C}$), **thermophiles** ($45\text{-}70^{\circ}\text{C}$), **mésophiles** ($20\text{-}40^{\circ}\text{C}$), **psychrophiles** ($10\text{-}20^{\circ}\text{C}$) et **cryophiles**. ($<10^{\circ}\text{C}$). Les bactéries pathogènes pour l'homme sont principalement des mésophiles (37°C). La température est également utilisée pour détruire les bactéries et donc stériliser des produits. L'**ébullition** détruit la plupart des bactéries présentes dans l'eau mais pas les endospores. La **pasteurisation** ($72^{\circ}\text{C}, 15\text{s}$) et les ultra hautes températures (UHT – $>135^{\circ}\text{C}, < 5\text{s}$) permettent d'améliorer la conservation des produits laitiers en particulier. La référence pour la stérilisation de milieux ou de matériel est l'**autoclavage** ($>120^{\circ}\text{C}, > 1 \text{ atmosphère}, > 20 \text{ min}$).
- **Le pH** de l'environnement varie entre 0,5 (sols acides) et 10,5 (eaux alcalines). Les bactéries pathogènes se développent dans les milieux neutres ou légèrement alcalins. On distingue en fonction du pH optimal des bactéries, des bactéries **alcalinophiles** (pH alcalins) comme *Vibrio cholerae* (agent du choléra), **acidophiles** (pH acides) comme les *Lactobacillus* (présents dans les yaourts) et **neutrophiles** (pH neutres).
- **La pression osmotique** (concentration en NaCl ou en sucres dans l'eau) et la disponibilité en eau sont inversement proportionnelles. Les bactéries **halophiles** survivent en présence de fortes concentrations en sel ($>5\%$, jusqu'à 30% pour les hyperhalophiles). Les bactéries **osmophiles** nécessitent de fortes concentrations en sucres.
- **La pression partielle en oxygène.** L'oxygène est une molécule réactive, potentiellement toxique, qui peut intervenir dans le métabolisme énergétique des bactéries. L' O_2 est utilisé comme accepteur final de la chaîne de transfert d'électron pour les bactéries dites **aérobies**. Certaines bactéries utilisent des composés organiques (métabolisme **fermentatif**) ou minéraux (**anaérobies**) comme accepteur final ; l'oxygène n'est alors pas nécessaire. Les bactéries ayant une superoxyde dismutase (SOD) et/ou une catalase peuvent lutter contre les effets toxiques de l'oxygène par dégradation des métabolites toxiques générés par sa réactivité. Les bactéries anaérobies possédant ces enzymes peuvent ainsi se multiplier en présence d'oxygène, elles sont dites **aérotolérantes**. On peut distinguer 5 comportements différents vis-à-vis de la pression partielle en oxygène (Fig. 9).
 - Bactéries **aérobies strictes** : la croissance bactérienne n'a lieu qu'en présence de forte concentration en oxygène
 - Bactéries **anaérobies facultatives** : la croissance est maximale au contact de l'oxygène mais a lieu sur toute la longueur du tube.
 - Bactéries **anaérobies strictes** : la croissance a lieu seulement en absence d'oxygène, au fond du tube.
 - Bactéries **aérotolérantes** : la croissance est maximale au fond du tube mais a lieu également en surface.

- Bactéries **microaérophiles** : la croissance n'a lieu qu'en présence d'une quantité limitée d'oxygène.

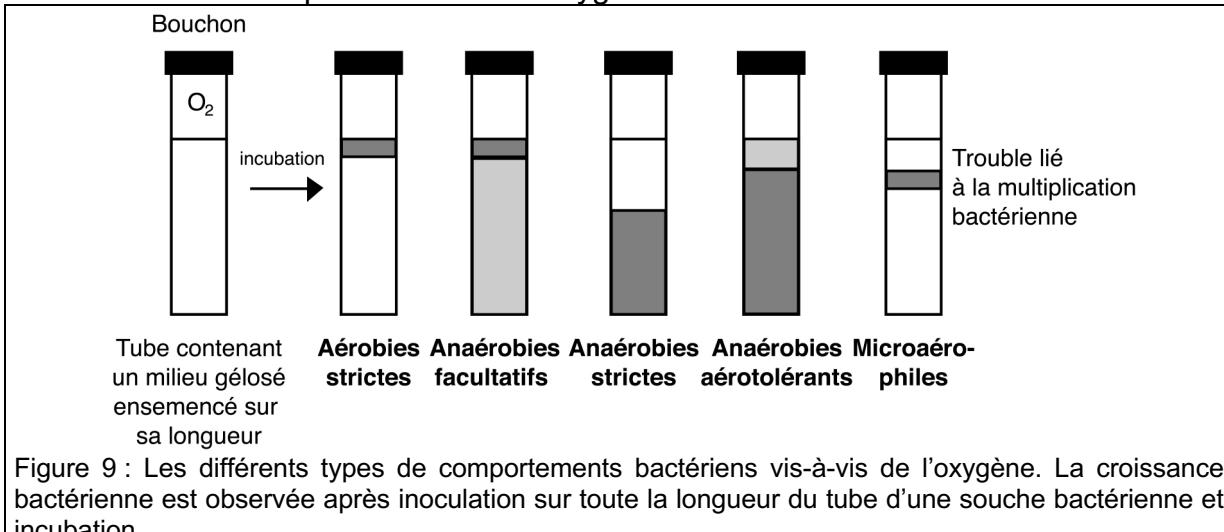


Figure 9 : Les différents types de comportements bactériens vis-à-vis de l'oxygène. La croissance bactérienne est observée après inoculation sur toute la longueur du tube d'une souche bactérienne et incubation.

- Certaines bactéries aérobies ont une croissance favorisée par la présence de CO₂. Elles sont dites **capnophiles**.

2.2.2. Les milieux de cultures

Les milieux de cultures sont des supports nutritifs stériles adaptés à la culture d'une ou plusieurs espèces bactériennes. Ils peuvent être **liquides** (bouillons) ou **solides** (gélose en boîte ou tube) par ajout d'agar-agar (polysaccharides d'algues). Ils sont de compositions empiriques (bouillon de viande) ou synthétiques (composition chimique connue).

Différents type de milieux de culture sont utilisés :

- **milieux d'enrichissement**: en général liquides, ils permettent la multiplication d'une bactérie présente en faible quantité dans un inoculum. (selles et sols en particulier)
- **Milieux sélectifs**: leurs compositions spécifiques favorisent la croissance d'une bactérie d'intérêt par rapport aux autres bactéries présentes dans l'échantillon inoculé (échantillons souillés par la flore commensale). La sélectivité est obtenue par rajout de sels (halophile), d'antibiotiques ou l'absence de certains nutriments.
- **Milieux différentiels**: ils permettent de différencier les bactéries par l'aspect des colonies obtenues ou la mise en évidence d'une propriété des bactéries (hémolyse sur gélose au sang, métabolites colorés, ...). Ils sont utilisés pour l'identification des bactéries sous formes de boîtes ou de galeries.

2.2.3. La division bactérienne

Pour se multiplier, les bactéries utilisent la division binaire (asexuée) par scissiparité (division en 2 bactéries filles de taille égale), plus rarement le bourgeonnement (2 bactéries filles de taille différente). Ce processus se divise en 3 phases (Fig. 10) :

- **phase C** : réPLICATION du matériel génétique
- **phase G** : latency et ségrégation chromosomique (séparation des 2 chromosomes à chacune des extrémités du corps bactérien).
- **phase D** : division proprement dite avec formation du septum entre les 2 bactéries filles et séparation.

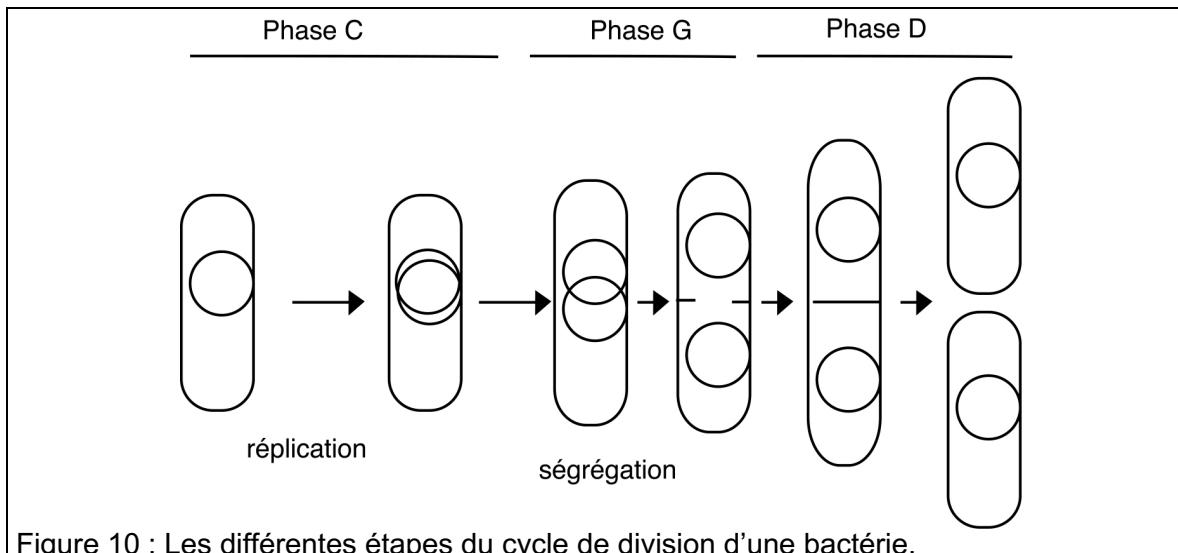


Figure 10 : Les différentes étapes du cycle de division d'une bactérie.

Le **temps de doublement** (td ou temps de génération) est le temps nécessaire à l'accomplissement d'un cycle de division. Ce td varie selon les espèces bactériennes et les conditions environnementales. Il est par exemple de 10 min pour *Pseudomonas aeruginosa*, de 20 min pour *Escherichia coli*, de 24 h pour *Mycobacterium tuberculosis* et de 15 j pour *Mycobacterium leprae* (responsable de la lèpre). À chaque cycle de division, le nombre de bactéries double. Le nombre de bactéries après n temps de doublement est théoriquement de 2^n bactéries, soit pour *E. coli* 10^{20} en 24 h de culture (2^{72}).

2.2.4. Les phases de la croissance

La culture des bactéries en milieu liquide fermé passe par différentes phases (Fig. 11) :

- **Phase de latence** : un inoculum bactérien introduit dans un nouveau milieu ne commence à se diviser qu'après synthèse de l'ADN bactérien et production des enzymes nécessaires.
- **Phase croissance exponentielle** : la production cellulaire débute et devient très intense. Le nombre de bactéries croît selon la règle 2^n .
- **Phase stationnaire** : Le nombre de cellule est très élevé, les nutriments restants sont en quantité limitée (division cellulaire moindre) et les métabolites cellulaires toxiques s'accumulent dans le milieu (augmentation de la mort cellulaire). L'ensemble de ces phénomènes en équilibre conduit à une stagnation du nombre de bactéries.
- **Phase de décroissance ou de déclin** : l'équilibre précédent est rompu et le nombre de bactéries qui meurent augmente exponentiellement.

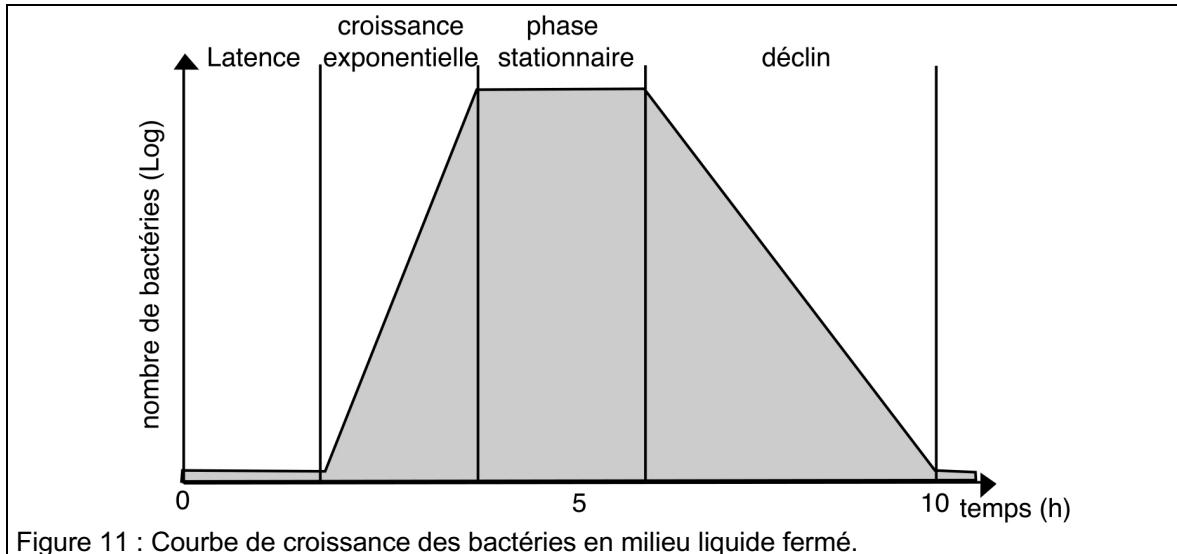


Figure 11 : Courbe de croissance des bactéries en milieu liquide fermé.

Dans l'industrie, les réacteurs (milieu ouvert) permettent un apport continu en nutriments et ainsi de maintenir les bactéries en phase exponentielle de croissance.

2.2.5. Dénombrement des bactéries

Pour mesurer le nombre de bactéries en suspension dans un milieu, plusieurs méthodes sont disponibles :

- **Numération des éléments bactériens au microscope** à l'aide d'une chambre de comptage ou cellule : cette technique est longue, fastidieuse et de plus en plus remplacée par le comptage automatisé.
- **Mesure du poids sec ou biomasse** : le milieu de culture après incubation est centrifugé, le culot bactérien séché et pesé. Le nombre de bactéries est évalué sachant que 1 mg correspond à quelques 10^9 bactéries.
- **Numération viable** : des dilutions de la suspension bactérienne de départ sont inoculées chacune sur une boîte de gélose, puis incubées et les colonies obtenues dénombrées. La multiplication du nombre de colonies par le facteur de dilution concerné permet de déterminer le nombre de bactéries vivantes (unité formant colonie, **UFC** ou **CFU** en anglais) de la suspension de départ (Fig.12).

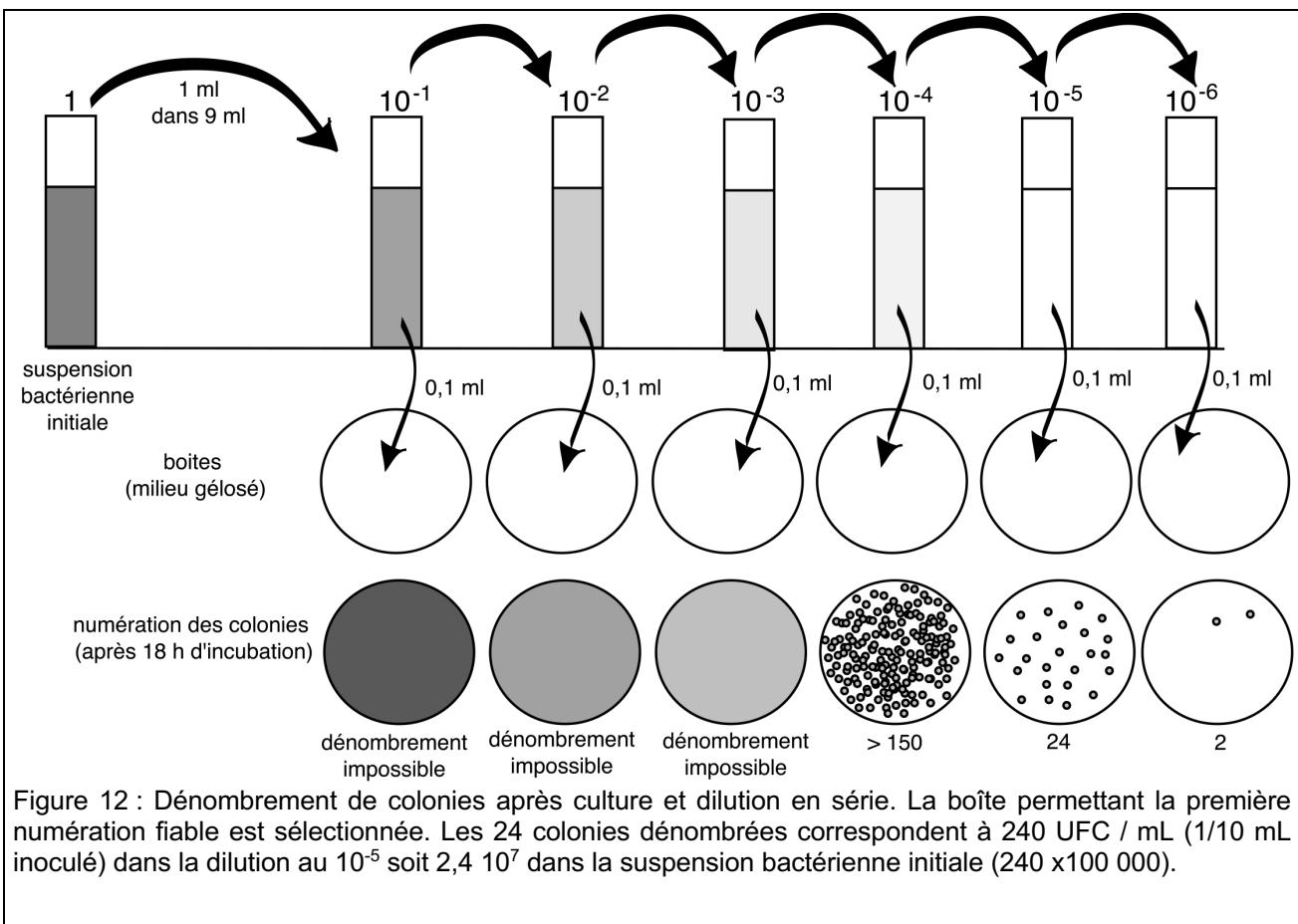


Figure 12 : Dénombrement de colonies après culture et dilution en série. La boîte permettant la première numération fiable est sélectionnée. Les 24 colonies dénombrées correspondent à 240 UFC / mL (1/10 mL inoculé) dans la dilution au 10^{-5} soit $2,4 \times 10^7$ dans la suspension bactérienne initiale (240 x100 000).

- **Turbidimétrie :** mesure au spectrophotomètre de l'absorbance (densité optique) du milieu contenant la suspension bactérienne. Plus le milieu est trouble, plus il contient de bactéries. Ceci n'est possible que pour des concentrations en bactéries entre 10 et 100×10^6 par mL.
- **Mesure de l'activité métabolique :** certains métabolites bactériens (enzymes, azote, CO_2 , ...) peuvent être dosés dans le milieu bactérien.

3. Les virus

Les virus sont des organismes biologiques et infectieux parasites obligatoires des cellules vivantes. Libres à l'extérieur d'une cellule, ils sont inertes et souvent de très petite taille, ont une structure propre appelée **virion** (ou particule virale). À l'intérieur d'une cellule (cellule hôte ou cellule virale) ils peuvent, à partir de leur génome (et parfois de composants viraux), se multiplier, persister, évoluer et parfois induire des perturbations responsables de maladies.

Les virions contiennent du matériel génétique sous la forme **d'un seul type d'acide nucléique** (ADN ou ARN, parfois les deux). Les virus se multiplient à partir de ce génome par **réplication**, sont des **parasites intracellulaires obligatoires** et ont chacun une **structure propre**. Il existe de multiples espèces de virus capables d'infecter les cellules humaines, animales, végétales ou les procaryotes (archées et bactéries). Les virus infectant les procaryotes sont des **bactériophages ou phages** (qui mangent les bactéries). Certains virus peuvent lors de leur cycle de réplication intégrer leur génome à celui de leur hôte pour donner un **provirus** (virus) ou un **prophage** (bactériophage). Ces génomes intégrés sont capables de produire des virions.

3.1. La structure des virions

Le matériel génétique viral est composé d'un ARN ou d'ADN qui est caractérisé par sa structure et sa séquence nucléotidique. Dans le virion ce **génome** est protégé par une structure protéique symétrique appelée **capside** (de caps, boite), parfois elle-même entourée d'une **matrice** protéique (ou manteau) et d'une **enveloppe** lipidique (ou péplas). La structure formée par le génome et la capsid s'appelle la **nucléocapside** et correspond à la structure des **virions nus** ou non enveloppé (Fig. 13).

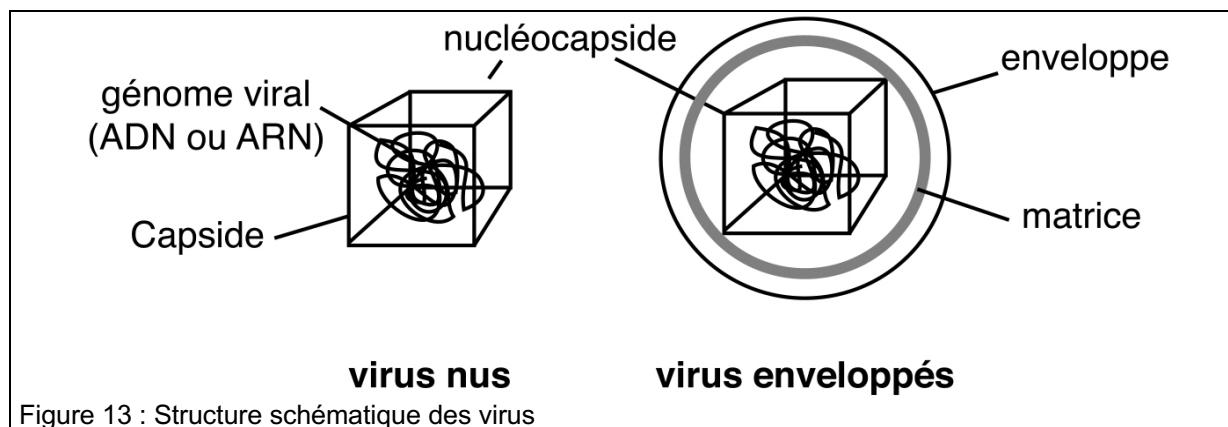


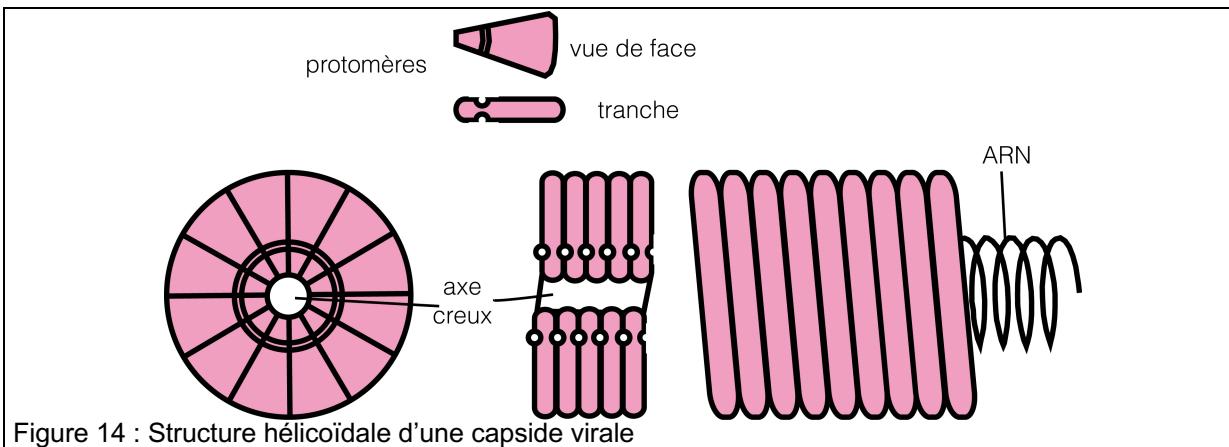
Figure 13 : Structure schématique des virus

- **Les génomes viraux.** Les génomes des **virus à ADN** sont le plus souvent bicaténaires (double brin) et linéaires. Les génomes des **virus à ARN** sont plus divers. Ils peuvent être double brin ou simple brin (**polarité** positive – sens ou négative – antisens ou ambisens), linéaires, circulaires et comporter un ou plusieurs segments génomiques.

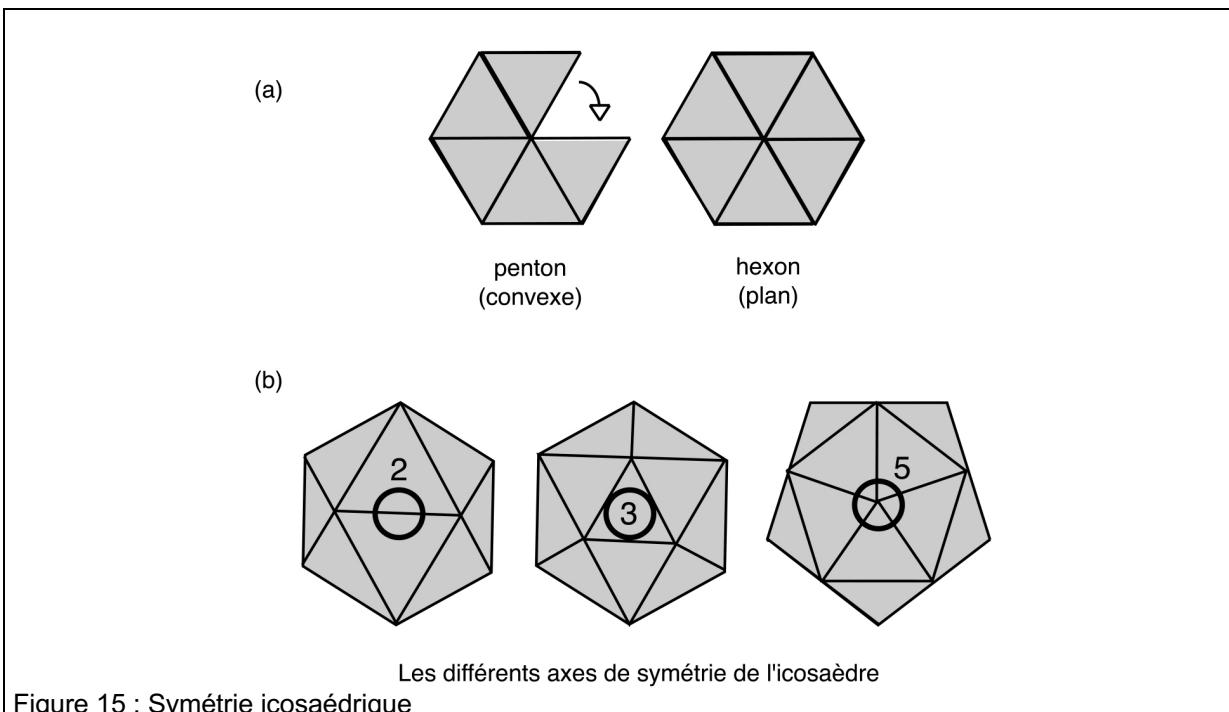
La taille des génomes à ADN varie de 5 000 pb à plus de 300 000 pb (record : *Pandoravirus* à 2,5 Mb) ce qui leur permet de coder de 3 à plus de 200 protéines virales. La taille des génomes viraux à ARN est globalement inférieure, de 3 à 20 kb, ce qui permet de coder 1 à 30 protéines virales. Les génomes des virus connus sont presque tous séquencés. Pour coder le maximum de protéines avec des génomes de taille réduite, les virus utilisent souvent plusieurs cadres de lecture, parfois se chevauchant, la maturation des ARN messagers (épissages alternatifs, édition, ...) et la maturation des protéines (clivages de polyprotéines, glycosylations, phosphorylation, ...).

- **La capsid.** Cette structure protéique est formée par l'auto-assemblage de sous unités protéiques codées par le virus. Ces **sous-unités** sont formées d'une ou plusieurs protéines et forment des **protomères** de forme triangulaire. Les protomères vont s'auto-assembler de manière symétrique autour d'un axe (symétrie hélicoïdale, comme un escalier en colimaçon) ou en icosaèdre.

Dans le cas de la **symétrie hélicoïdale**, chaque protomère va constituer une marche de l'escalier en colimaçon pour former un tubule protéique ayant un **axe creux**. Le génome viral (ARN) va alors être emprisonné dans une gouttière, présente sur chacune des marches, s'enroulant autour de l'axe. La structure comportant la capsid hélicoïdale et son génome ARN s'appelle une **ribonucléoprotéine** (Fig.14). Tous les virions des virus humains et animaux possédant des capsides de symétrie hélicoïdale ont un génome à ARN et sont enveloppés.



Dans le cas de la **symétrie cubique** (ou icosaédrique), la structure formée est un icosaèdre (Fig. 15). Il s'agit d'une forme géométrique composée de 12 sommets, 20 faces et 30 arêtes. Pour la constituer, les protomères s'auto-assemblent en capsomères par 5 pour former des pentons (structure convexe) présents au niveau de chacun des sommets. Dans certains cas, ils s'assemblent par 6 pour former les faces (hexons, structure plane). Les virions des *Herpesviridae* ont par exemple des capsides constituées de 12 pentons et 150 hexons, les *Adenoviridae* de 12 pentons et 240 hexons.



Certaines structures de capsides virales sont dites de **symétrie complexe** car mal identifiées ou dépourvues de structures symétriques (*Poxiviridae*) ou associant des symétries cubiques et hélicoïdales comme pour certains bactériophages (Fig. 16).

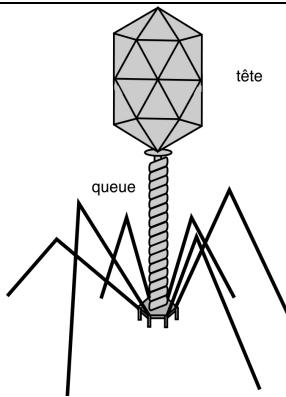


Figure 16 : Structure schématique d'un bactériophage de symétrie complexe (associant cubique et hélicoïdale).

- **La matrice** est une structure constituée de protéines virales. Elle est localisée entre la nucléocapside et l'enveloppe virale. Son rôle est probablement de stabiliser l'enveloppe.

- **L'enveloppe virale.** Elle est acquise par **bourgeonnement** à partir d'une membrane cellulaire (nucléaire, réticulum, golgi ou cytoplasmique). L'enveloppe est donc une bicouche lipidique qui va porter des **protéines virales** nécessaires à la reconnaissance du virus par son récepteur à la surface cellulaire, mais aussi parfois, des **protéines cellulaires** volées avec l'enveloppe. Les protéines virales exprimées à la surface des enveloppes virales sont souvent des glycoprotéines. Par exemple, pour le virion grippal (*Influenzavirus*), l'hémagglutinine virale est une protéine reconnaissant les acides sialiques cellulaires (récepteurs). Elle est également capable comme l'indique son nom d'agglutiner les globules rouges, ce qui fut utilisé pour la mise en évidence du virion.

Les enveloppes virales sont en fait un élément de fragilité pour le virion. Elles sont détruites par la chaleur, la dessiccation, les sucs digestifs et les détergents. Les virions enveloppés sont beaucoup plus **fragiles** que les virions nus.

Certains virions possèdent des membranes internes situées entre le génome et la capsidé (*Mimivirus*, certains bactériophages). Les virions des *Poxvirus* possèdent 2 à 3 enveloppes externes.

La **classification** des virus est basée principalement sur la nature du génome viral, la symétrie de la capsidé, la présence ou non d'une enveloppe. Les critères secondaires sont la taille, le mode de réPLICATION, la physiopathologie des infections et les hôtes infectés.

3.2. La réPLICATION des virus

Les virus ont besoin pour se répliquer du métabolisme d'une cellule. Ils vont systématiquement utiliser le **système de traduction** de la cellule, parfois son système de **transcription** et de **réPLICATION** de l'ADN. Le parasitisme des deux derniers systèmes nécessite la présence du génome viral dans le noyau cellulaire. La dépendance d'un virus vis-à-vis de sa cellule hôte est donc variable et va beaucoup dépendre des capacités de la taille du génome viral.

Quelques définitions :

- Le **spectre d'hôte** viral est l'ensemble des organismes sensibles à l'infection par un virus donné.
- Le **tropisme viral** est, au sein d'un organisme, l'ensemble des tissus ou cellules permissifs à l'infection par un virus donné.

- Une **cellule résistante** ne possède pas de récepteur permettant la pénétration du virus dans la cellule.
- Une **cellule permissive** possède tous les éléments nécessaires pour assurer la réPLICATION complète d'un virus donné. Elle permet une **infection productive**.
- Une **cellule non permissive**, possède le récepteur viral, ne permet pas la réPLICATION virale du fait de son métabolisme. L'infection est dite **abortive**. Cet état peut être temporaire.

La multiplication des virus est cyclique. Le **cycle de réPLICATION** comprend schématiquement plusieurs étapes successives conduisant à la dislocation du virion, une **phase d'éclipse** (sans virion visible) puis à la formation de nouveaux virions :

- **Attachement virus-cellule** après reconnaissance du récepteur viral par les protéines virales de capside (virions nus) ou de glycoprotéines d'enveloppe (virions enveloppés). Cette interaction est spécifique et irréversible
- **Pénétration du virion** dans la cellule. Deux mécanismes sont impliqués en général, l'injection et la fusion. L'injection consiste en une décapsidation avec passage du génome viral à travers la membrane cellulaire. La fusion des enveloppes virales avec la membrane cytoplasmique cellulaire ne concerne que les virions enveloppés. Les deux mécanismes peuvent être localisés à la surface de la cellule (membrane plasmique) ou après endocytose avec des fusions intervenant dans les endosomes tardifs (phagolysosomes).
- **Décapsidation.** Elle permet la libération du génome viral dans le cytosol après dislocation totale ou partielle de la capside.
- **RéPLICATION, transcription et traduction.** Ces 3 phénomènes interviennent dans un ordre variable selon les virus et sont bien souvent intriqués. Les réPLICATIONS et transcriptions ont lieu dans le cytoplasme (virus à ARN surtout) ou dans le noyau (virus à ADN surtout). Les génomes à ARN se multiplient par transcription. Les stratégies de réPLICATION dépendent principalement de la nature du génome viral comme décrit dans la classification de David Baltimore. Un **intermédiaire de réPLICATION** est la forme génomique permettant la synthèse des génomes viraux fils (Tableau 3).

Les virus vont utiliser des enzymes cellulaires et virales. Certaines enzymes nécessaires à la réPLICATION du génome viral doivent être codées par les virus car elles sont naturellement absentes des cellules : ARN polymérase ARN dépendante, ADN polymérase ARN dépendante.

Les virus à génome ARN de polarité négative (synthèse de l'ARN de polarité (+) qui sera traduit) et le HIV (synthèse de l'ADN double brin) doivent apporter avec eux l'enzyme capable de débuter la réPLICATION du génome. En effet, ces enzymes sont nécessaires pour obtenir des ARN de polarité (+) pouvant être traduit en enzymes virales. La traduction et la maturation des protéines sont cytoplasmiques.

Ex	Génome viral père	Intermédiaire de réPLICATION	Enzyme virale impliquée dans le cycle	Génome viral fils
ADN				
Virus herpès simplex (HSV)	ADN double brin linéaire	ADN double brin linéaire	ADN pol ADN Dep	ADN double brin linéaire
Virus de l'hépatite B (HBV)	ADN double brin circulaire	ARN simple brin linéaire polarité (+)	ADN pol ARN dep (transcriptase inverse)	ADN double brin circulaire
ARN				
Poliovirus	ARN simple brin linéaire polarité (+)	ARN simple brin linéaire polarité (-)	ARN pol ARN Dep	ARN simple brin linéaire polarité (+)
Virus de la grippe	ARN simple brin linéaire polarité (-)	ARN simple brin linéaire polarité (+)	ARN pol ARN Dep	ARN simple brin linéaire polarité (-)
HIV	2 ARN simple brin linéaire polarité (+)	ADN double brin intégré (provirus)	ADN pol ARN Dep (transcriptase inverse*)	2 ARN simple brin linéaire polarité (+)

Tableau 3 : Les principales stratégies de réPLICATION des virus. * les transcriptases inverses ont également des activités ADN polymérase ADN dépendante et RNase H.

- **Assemblage et maturation.** La maturation des protéines se fait souvent par clivages protéolytiques (protéases virales ou cellulaires), puis par passage dans le réticulum et/ou l'appareil de golgi. Les protéines matures vont s'auto-assembler en protomères, capsomères et en capsides en présence des génomes viraux. Les capsides icosaédriques peuvent s'assembler en absence de génomes viraux donnant des **particules virales défectives**.
- **Libération des virions.** Les virions sortent de la cellule hôte par bourgeonnement (virus enveloppés), exocytose ou lyse de la cellule.
- La production virale peut alors être mesurée par la quantification des particules virales dans le surnageant de culture (PCR ou RT-PCR quantitative avec des résultats en copies de génome/mL) ou pour les virus cytolytiques par la techniques des plages de lyses (proche de la numération viable bactérienne) avec des résultats en unités formant plage /mL. Il s'agit de dilution de la suspension virale que l'on inocule sur un tapis cellulaire que l'on couvre d'une gélose empêchant la diffusion des virions produits dans le surnageant. L'infection se propage de proche en proche en lysant les cellules et formant des plages de lyse.

3.2.1. Les conséquences de la réPLICATION virale

- Le **cycle viral productif** ou **cycle lytique** (production de virions) va provoquer des anomalies fonctionnelles des cellules infectées, une réduction de leur durée de vie (lyse cellulaire) et une dispersion des virions dans l'organisme et à l'extérieur de ce dernier.
- Le cycle viral n'est pas systématiquement productif. Certains virus peuvent rester présents dans les cellules sans se répliquer. Il s'agit **d'infections latentes** (cellule temporairement non permissive). Ce type d'infection peut redevenir productif sous l'effet de facteurs environnementaux. C'est le cas par exemple du HSV qui, après un premier contact avec un individu, devient systématiquement latent. Le sujet peut alors présenter des **réactivations** (reprise du cycle productif) sous forme de récurrences d'herpès labial (réactivations cliniques). Les provirus sont une forme possible de latence.

- Beaucoup de virus sont capables de transformer et d'immortaliser les cellules qu'ils infectent. Ceci peut conduire à la formation de cancers. Ces virus sont dits **oncogènes** (génération de cancers). Par exemple, le cancer du col de l'utérus est provoqué par des **Papillomavirus**.

3.2.2. Exemples de cycles viraux

Les Poliovirus ont des petits virions nus (25 nm) ayant une symétrie icosaédrique et un ARN simple brin linéaire de polarité positive (Fig.17). Leur capsid est constituée de 4 protéines virales. Après interaction avec un récepteur spécifique, les virions pénètrent par endocytose dans la cellule. La décapsidation a lieu dans les phagolysosomes et libère l'ARN viral dans le cytoplasme. L'ARN de polarité positive est directement traduit par les ribosomes cellulaires en une **polyprotéine**. Cette dernière sera clivée pour donner les protéines virales qui vont répliquer le génome (synthèse d'un ARN(-) puis de nouveaux génomes ARN(+)) et s'auto-assembler en capsomères et en capsides. Les virions sont libérés par lyse cellulaire.

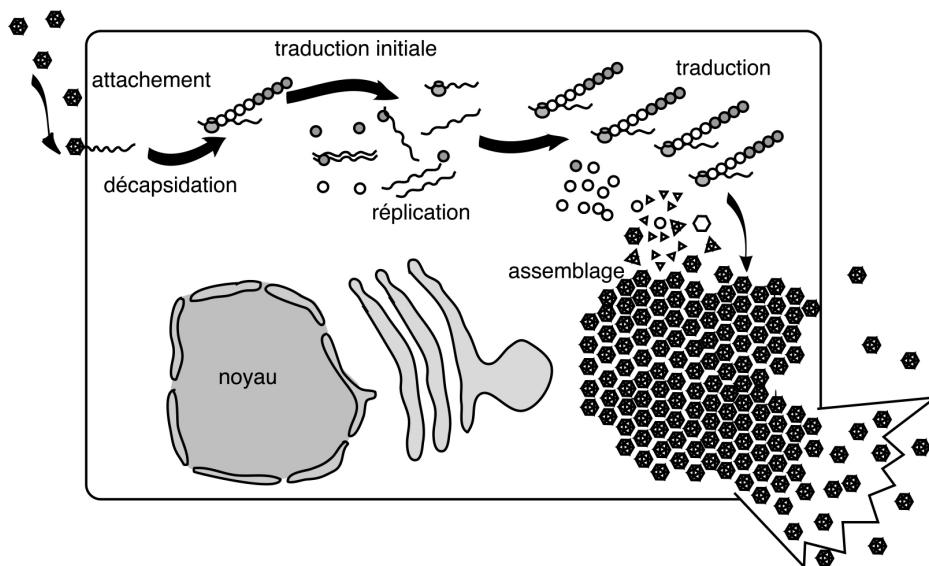


Figure 17 : Cycle de multiplication du Poliovirus.

Les Herpesviridae ont de gros virions (200 nm) enveloppés de symétrie icosaédrique contenant un génome à ADN double brin linéaire (Fig. 18). L'espèce type est le *Simplex virus 1* (ou virus de l'herpès, HSV-1). Après interaction avec un récepteur spécifique et fusion, la nucléocapside est libérée dans la cellule. La décapsidation permet la libération du génome viral dans le noyau. Le génome ADN linéaire se circularise pour donner un **épisome**. Le virus transcrit alors uniquement des ARNm codant les protéines de régulation de l'expression (protéines très précoces) et peut rester latent sous cette forme. Dans certaines circonstances, il peut débuter un cycle productif et transcrire séquentiellement des ARNm précoce (codant les protéines nécessaires à la réplication) puis des ARNm tardifs (codant les protéines de structures). L'ensemble des protéines migre dans le noyau où vont s'auto-assembler les virions. Les virions acquièrent leur enveloppe au niveau de la membrane nucléaire ou du réticulum avant d'être libérés par exocytose.

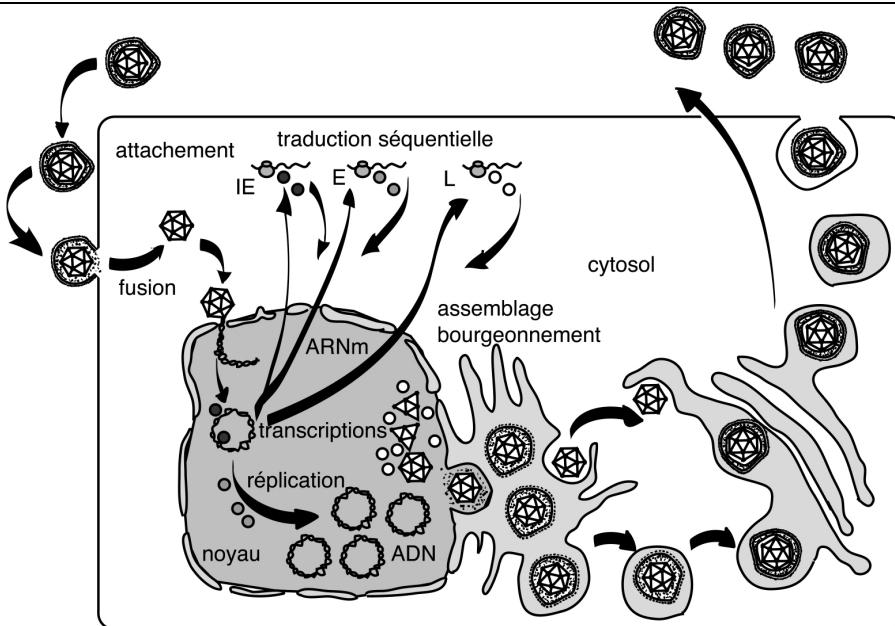


Figure 18 : Cycle de multiplication du virus herpès simplex 1.

Le **Human immunodeficiency virus** (HIV ou VIH) a un virion de taille moyenne (100 nm) enveloppé de symétrie cubique contenant un génome composé de 2 ARN linéaires de polarité positive (Fig. 19). Sa capsidé bien que de symétrie cubique a une forme de cône. Le virion reconnaît un récepteur sur les lymphocytes T (CD4) grâce à sa protéine de surface, fusionne avec la membrane cellulaire. Pendant que la nucléocapsidé migre vers le noyau, les 2 ARN de polarité positive sont transcrits en ADN double brin par la transcriptase. Cet ADN va devenir un provirus en s'intégrant dans le génome cellulaire grâce à l'**intégrase** virale. Le **provirus** peut être transcrit et ainsi débuter alors un cycle productif ou bien rester latent (latence). Le provirus est transcrit par les enzymes cellulaires en ARNm, qui vont maturer, être traduits dans le cytoplasme en protéines virales. Les protéines d'enveloppe sont produites dans le réticulum, clivées par les protéases cellulaires et exprimées à la surface de la cellule. Les protéines internes (capsidé, matrice, enzymes) sont regroupées sous forme de polyprotéines sur la face interne de la membrane cytoplasmique puis, après libération par bourgeonnement de la particule, clivées par une protéase virale. L'assemblage de la particule virale mature se fera hors de la cellule.

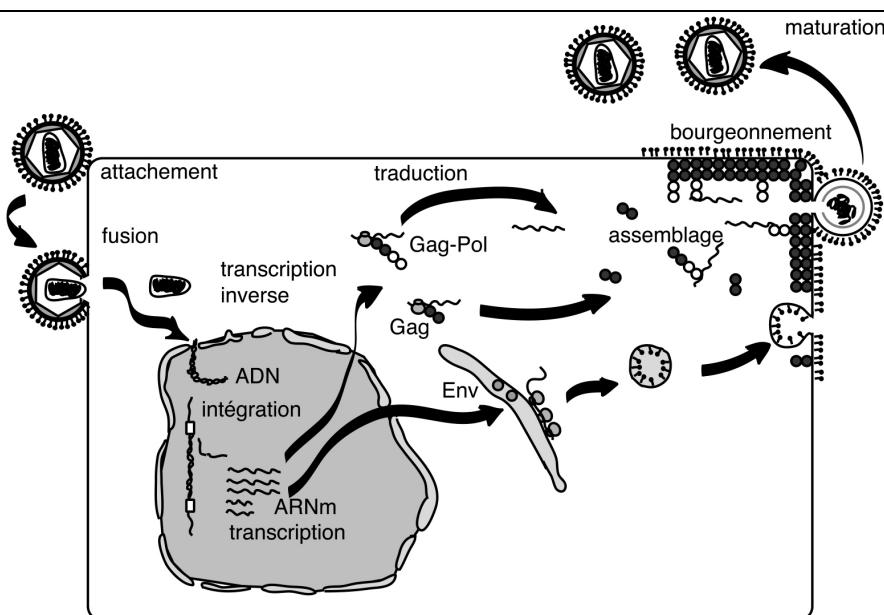


Figure 19 : Cycle de multiplication du HIV.

4. Les Micromycètes

Les micromycètes font partie du règne des Fungi (champignons). Un grand nombre de micromycètes sont utilisés par l'Homme à des fins industrielles (levure de bière, *Aspergillus*, etc.). Parmi les micromycètes d'intérêt médical sont regroupés quelques centaines d'espèces plus ou moins pathogènes et plus ou moins fréquentes. Une des caractéristiques des Fungi est qu'ils se développent sur des substrats dont les défenses sont diminuées ou absentes, on les retrouvera donc essentiellement chez des patients dont certains organes ou tissus sont affaiblis (prématurés, vieillards, immunodéprimés).

4.1. Structure générale

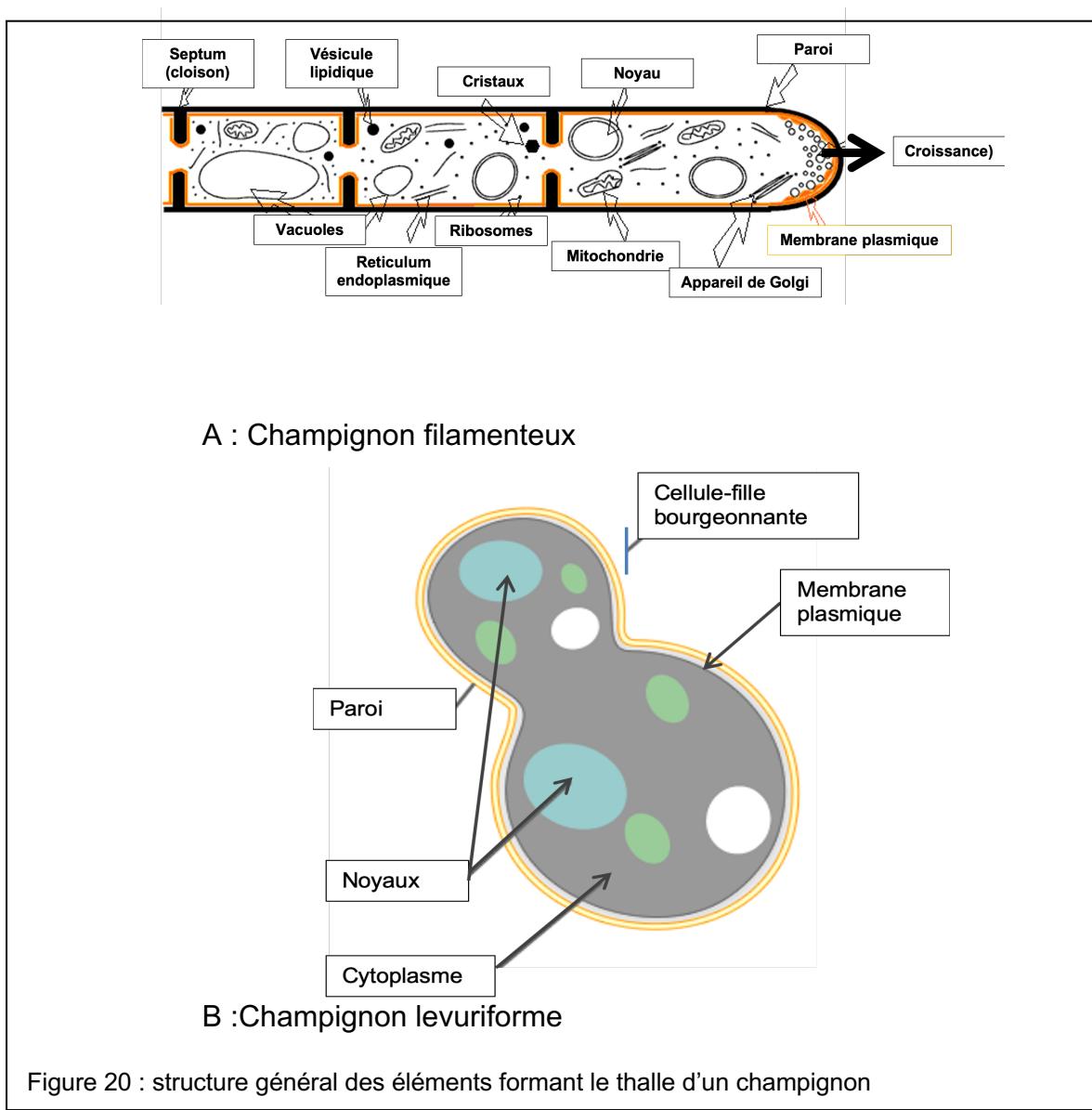


Figure 20 : structure général des éléments formant le thalle d'un champignon

Les champignons partagent des caractéristiques

- **Eucaryotes** : noyau entouré d'une membrane nucléaire, dissociation transcription/traduction, organites cytoplasmiques (mitochondries, vacuoles), stockage des sucres sous forme de glycogène (sucre complexe typique du règne Animal). Leur membrane cytoplasmique, de structure classique (cf. cours de Biologie cellulaire) comprend cependant des stérols particuliers dont l'ergostérol. La synthèse de

l'ergostérol par le champignon est une cible de certains médicaments antifongiques (Azolés).

- **Prokaryotes** : présence d'une paroi de structure complexe (cf. infra) permettant, entre autres, de maintenir la pression osmotique.

Les champignons peuvent se multiplier par bourgeonnement d'une cellule fille (Fig. 20 B) ou par développement d'un thalle filamentueux (Fig. 20 A) éventuellement porteur d'organes de production de spores. Ces deux modes de reproduction sont de type asexué, la multiplication sexuée, beaucoup plus complexe, qui est, entre autres, utilisée pour l'identification de certains d'entre eux, ne sera pas abordée à ce niveau. Pour les champignons levuriformes, l'identification (genre, espèce) est essentiellement basée sur des caractéristiques biochimiques (présence ou absence de certaines enzymes, cf. chapitre 6.1.4). Pour les champignons filamentueux, l'essentiel de l'identification se fait sur les caractéristiques morphologiques observées en culture (cf. infra). Cette identification est essentielle en terme d'épidémiologie (où et quand le patient a-t-il contracté le germe, est-il soumis à d'autres risques ?) de traitement (quel sera le médicament à choisir ?) et de pronostic (y-a-t-il un risque vital ?).

4.2. La paroi des champignons

Comme pour celle des bactéries, la cellule fongique est entourée d'une paroi (Fig 21). Cette paroi fongique est constituée de sucres complexes (β -glucanes) associés à des protéines glycosylées (mannoprotéines) et à de la chitine (protéine très fréquentes dans le règne Animal). Les mannoprotéines situées à l'extérieur de la paroi interagissent avec le milieu et sont capables de participer à la formation de biofilms (structures complexes associant les cellules et des glycoprotéines et permettant la colonisation de structures inertes comme les cathétér). Les mannoprotéines situées du côté intérieur de la paroi permettent l'association de celle-ci avec la membrane plasmique de la cellule fongique. Entre ces deux couches de mannoprotéines, on retrouve un arrangement complexe de β -glucanes et de chitine.

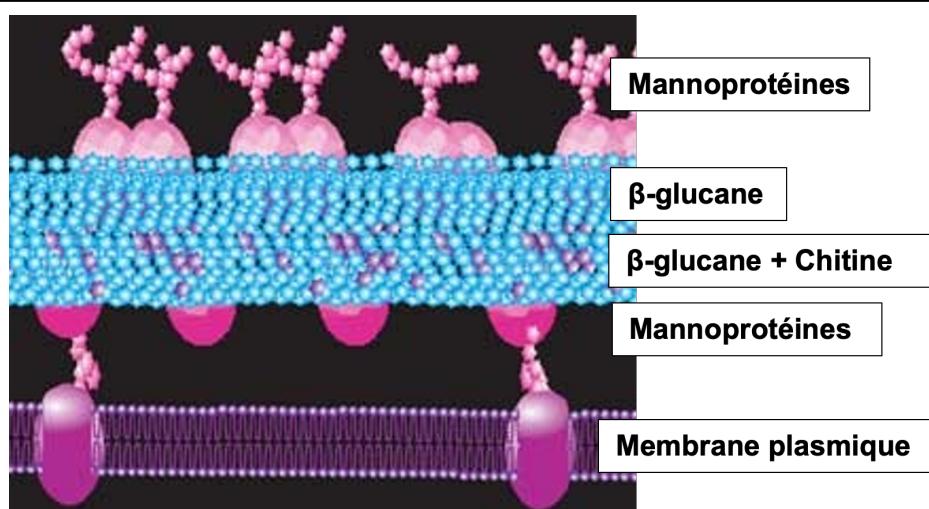


Figure 21 : Structure schématique de la paroi fongique



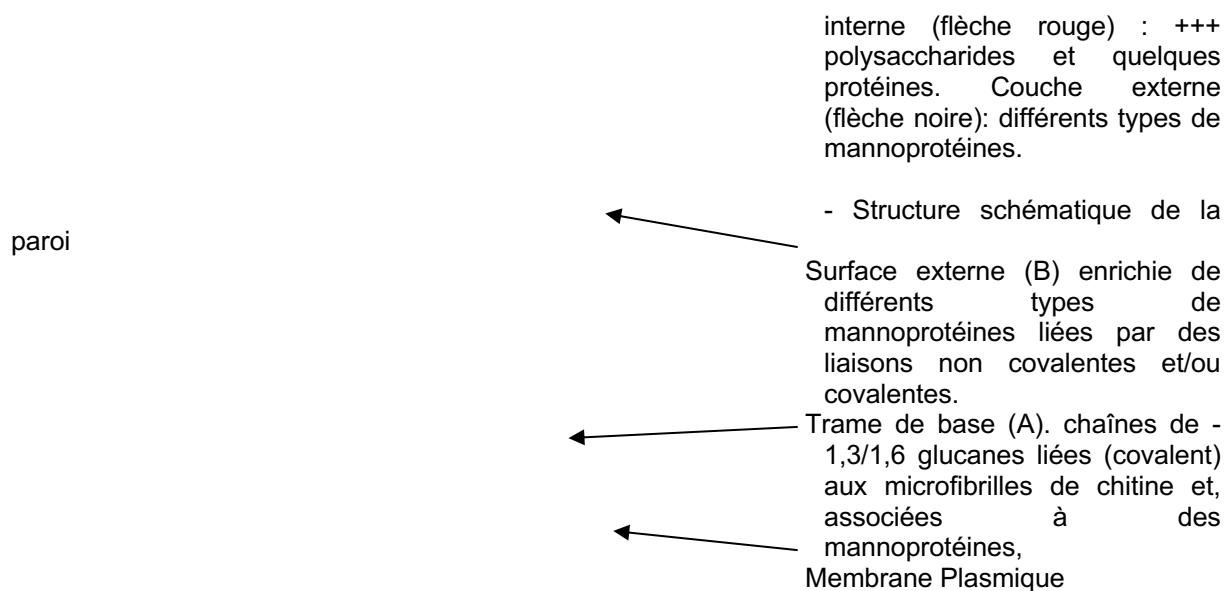


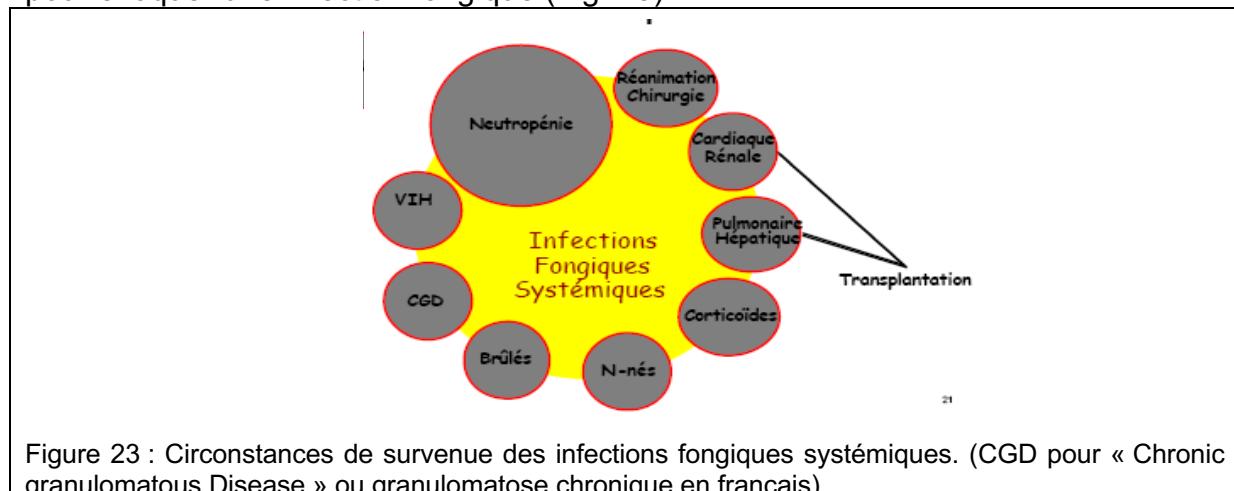
Figure 22 : Ultrastructure et structure schématique de la paroi de *Candida albicans*, champignon saprophyte du Tube digestif et potentiellement pathogène

L'enchainement de différents sucres (chez les levures (Fig. 22) : majoritairement du glucose, chez les Aspergillus, du glucose et du galactofuranose) par des liaisons α 2, α 3, β 2, β 5 ou β 6 forme une trame glucidique épaisse. Cette trame est rattachée à des Ser ou des Thr de la chitine, elle-même associée aux mannoprotéines. La synthèse de ces éléments est ciblée par les molécules antifongiques de la famille des candines.

La présence de ces sucres spécifiques de paroi dans la circulation sanguine (recherche d'antigènes fongiques circulants) concourt au diagnostic des infections fongiques généralisées pour lesquelles un foyer organique n'est pas identifié.

4.3. Saprophytisme et immunodépression

Les champignons se développent habituellement sur des substrats morts (bois morts) et/ou incapables de se défendre (ongles, peaux des brûlés, etc.). Lorsque les défenses naturelles d'un patient sont altérées, par exemple au cours d'une immunodépression naturelle ou iatrogène (due à un traitement), d'un diabète, du très jeune âge (prématureté) ou d'un âge avancé, des infections fongiques locales ou générales peuvent se développer. Il est donc crucial de connaître l'état du patient pour évoquer une infection fongique (Fig. 23).



Les infections fongiques systémiques (concernant l'ensemble de l'organisme et des organes profonds, par opposition aux infections de surface localisées) atteignent les patients dont les fonctions des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou les cellules régulant les réponses immunitaires (lymphocytes) sont altérées

4.4. Culture et identification des micromycètes

Comme en bactériologie, les milieux de cultures en mycologie sont des supports nutritifs stériles adaptés à la culture. Ils sont, la plupart du temps, solides (milieux gélosés en boîte ou tube). Ils sont de compositions empiriques (milieu de Sabouraud) ou synthétiques (composition chimique connue, RPMI, par exemple). Les milieux contiennent des antibiotiques antibactériens à très large spectre (gentamycine ou chloramphénicol, par exemple). En effet, la plupart des prélèvements mis en culture peuvent contenir des bactéries dont la vitesse de croissance (cf. supra) est bien supérieure à celle des Fungi (ce qui empêcherait ces derniers de pousser).

Pour les champignons levuriformes, l'identification repose partiellement sur la morphologie mais surtout sur des caractères biochimiques spécifiques mis en évidence sur des galeries d'identification ou sur des milieux chromogènes (milieux différentiels) sur lesquels les différentes espèces ont une morphologie et surtout des couleurs différentes (cf. cours).

Pour les champignons filamenteux, l'essentiel de l'identification repose sur la morphologie, et de la culture (aspect macroscopique) et des fructifications observées au microscope (aspect microscopique) qui nécessite une certaine expertise (Fig. 24). Là encore, certaines caractéristiques biochimiques peuvent aider au diagnostic.

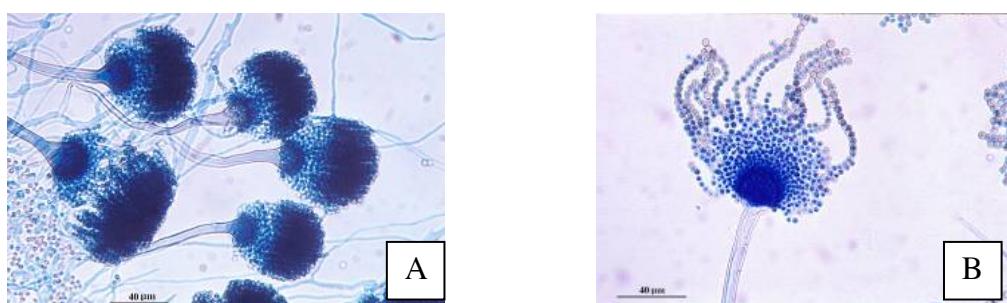


Figure 24 : Aspect des fructifications (têtes aspergillaires) de deux micromycètes d'intérêt médical, A : *Aspergillus fumigatus*, B : *Aspergillus flavus*.

En l'absence d'aspect caractéristique, ou pour accélérer le diagnostic (la pousse des champignons, en particulier filamenteux, n'est pas très rapide (quelques jours)), des techniques de biologie moléculaire (amplification par PCR, séquençage) peuvent être utilisées.

5. Les Protozoaires

Les protozoaires sont des organismes unicellulaires microscopiques qui, à cause de leur membrane nue, ne se retrouvent que dans les habitats humides ou aquatiques comme les océans, les lacs ou le sol. Ceux qui vivent dans le sol exploitent les microhabitats humides retrouvés entre les éléments du sol. Leur petite taille a également permis à certains d'entre eux, comme *Plasmodium* qui cause le paludisme, de devenir des parasites et ainsi d'affecter la destinée des hommes.

Chaque protozoaire est une cellule très spécialisée capable de remplir toutes les fonctions vitales. Les protozoaires doivent se déplacer, digérer, respirer, éliminer leurs déchets par excrétion et se reproduire pour survivre. Leur cellule unique est donc beaucoup plus complexe que les cellules retrouvées chez les métazoaires.

Il fut un temps où tous les organismes hétérotrophes unicellulaires étaient regroupés dans l'embranchement des Protozoaires. Cela n'est plus le cas. Quoique les taxonomistes ne s'entendent pas entièrement, on reconnaît 8 embranchements dans le règne des Protistes. Les protozoaires parasites sont responsables de grandes pandémies actuellement actives (paludisme : 880.000 morts en 2010, Leishmanioses : 350.000 morts en 2009, etc.)

5.1. Locomotion

5.1.1. Mouvement amiboïde (caractéristique des Amibes)

Le nom commun d'amibe fait référence à un groupe de Protistes unicellulaires qui se déplacent par des extensions du protoplasme leur permettant de glisser sur le substrat. Ce type de locomotion est appelé mouvement amiboïde. Le nom commun d'amibe est utilisé pour un groupe taxonomique, le sous-embranchement **Sarcodina** dans l'embranchement *Sarcomastigophora*. Le mouvement amiboïde n'est pas retrouvé uniquement chez les amibes mais est commun dans tout le règne animal. Plusieurs de ces cellules se déplacent par mouvement amiboïde à l'intérieur du corps des métazoaires (cf. embryologie). Les cellules amiboïdes ne doivent pas être confondues avec les amibes. Comme les autres protozoaires, les amibes (ou sarcodinés) peuvent être retrouvées dans tous les habitats humides. Elles s'alimentent, par phagocytose (fig. 25) de sources variées, mais les amibes parasites (*Entamoeba histolytica* /*dispar*) dépendent surtout des bactéries, d'autres protozoaires et du bol alimentaire puis des cellules du colon voire d'autres organes (foie, rein, etc.) autotrophes pour s'alimenter. Les amibes peuvent s'enkyster pour survivre plusieurs mois aux conditions difficiles que représente le monde extérieur.

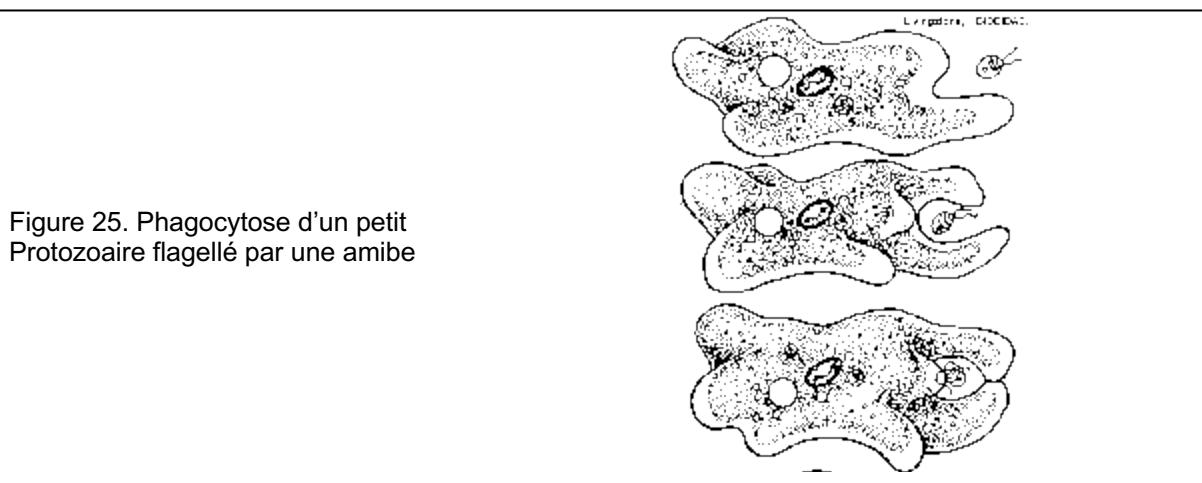
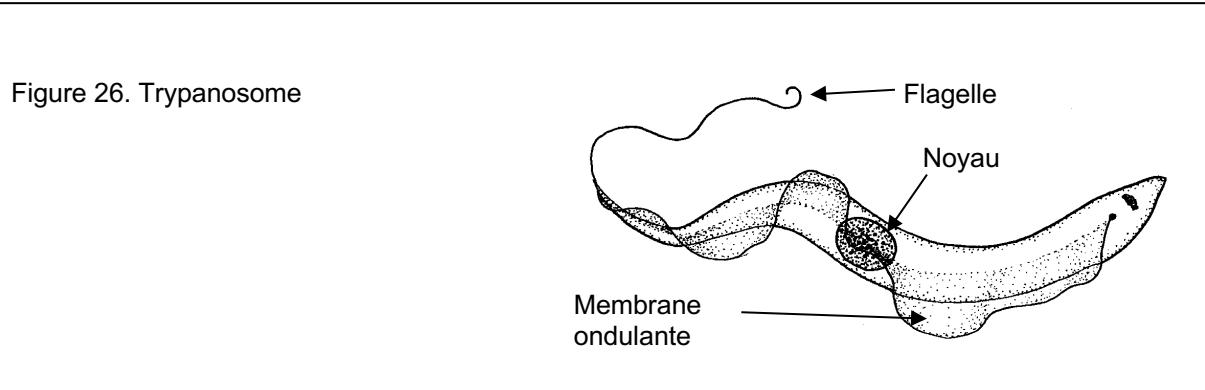


Figure 25. Phagocytose d'un petit Protozoaire flagellé par une amibe

5.1.2. Flagellés

Le deuxième sous-embranchement des *Sarcomastigophora* est celui des *Mastigophora* ou Flagellés. Le nom de l'embranchement est formé de ceux des deux sous-embranchements. Les *Mastigophora* se servent d'un ou de flagelle(s) pour se mouvoir. La raison pour laquelle les amibes et les flagellés sont réunis dans le même embranchement est que certains protozoaires utilisent le mouvement amiboïde à un stade de leur vie et leur flagelle à un autre stade. Si une espèce peut passer d'un mode de locomotion à un autre, il est probable que les organismes qui utilisent l'un

ou l'autre de ces modes de locomotion ont un ancêtre commun. C'est pourquoi ces deux groupes d'organismes sont regroupés en un seul embranchement. Chez les Trypanosomes (parasite responsable de la maladie du sommeil) le flagelle s'associe partiellement à la membrane plasmique pour définir une membrane ondulante (Fig. 26)



5.1.3. Ciliés

Le troisième mode de locomotion chez les protozoaires s'effectue à l'aide de cils. Les protozoaires ciliés, les *Ciliophora*, forment l'embranchement le plus diversifié des protozoaires. Contrairement aux flagellés, les cils des Ciliés se retrouvent sur toute la surface de ces organismes (Fig. 27). Ces cils permettent à l'organisme de se mouvoir et peuvent aussi être utilisés pour capturer les particules alimentaires

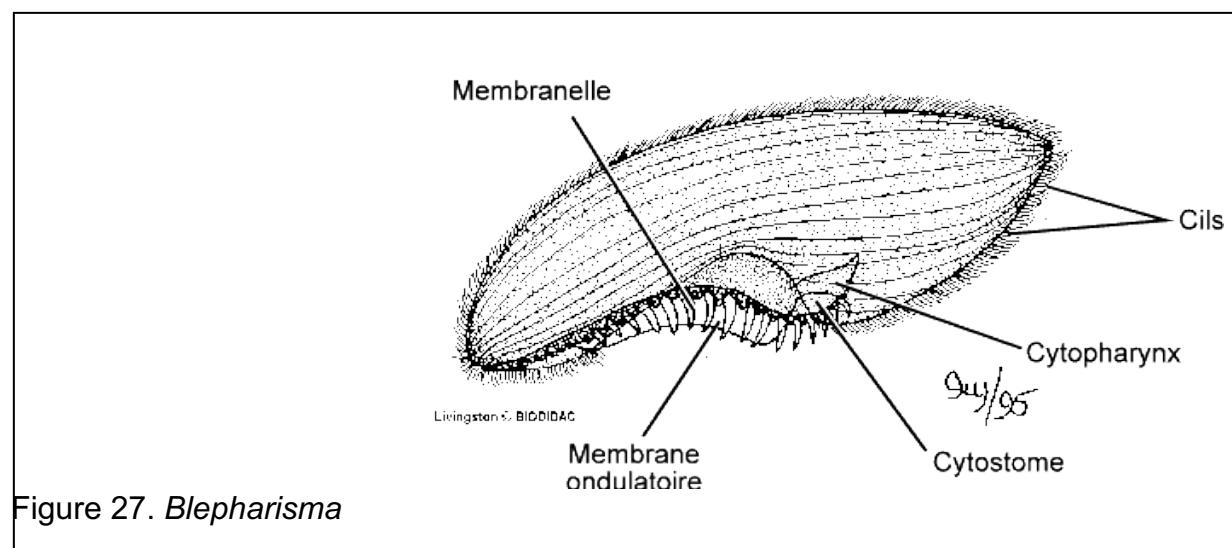


Figure 27. *Blepharisma*

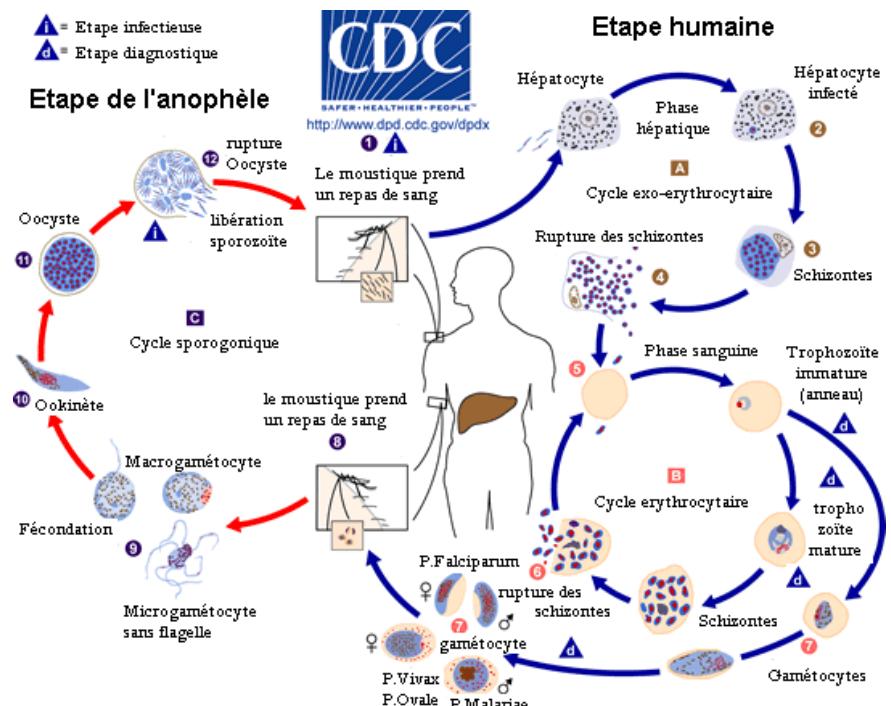
5.2. Reproduction

Un Protozoaire est, un être vivant unicellulaire, et donc composé d'un élément protoplasmique nucléé, le noyau, entouré d'une couche périphérique plus ou moins différenciée. Le noyau est impliqué, comme dans toute cellule, dans les fonctions de multiplication et de reproduction. Celle-ci a lieu par **scissiparité** (bipartition précédée de la division du noyau), par **bourgeonnement** (séparation de l'individu-mère d'une petite masse nucléée), enfin par **schizogonie** (division de la masse protoplasmique en une foule de fragments nucléés dont chacun forme un futur protozoaire-fils). Au moment de la reproduction, l'animal s'enkyste quelquefois (cet enkystement peut se produire hors de la phase trophique, par exemple quand les conditions ambiantes deviennent mauvaises). Chez les espèces supérieures, les phénomènes de la

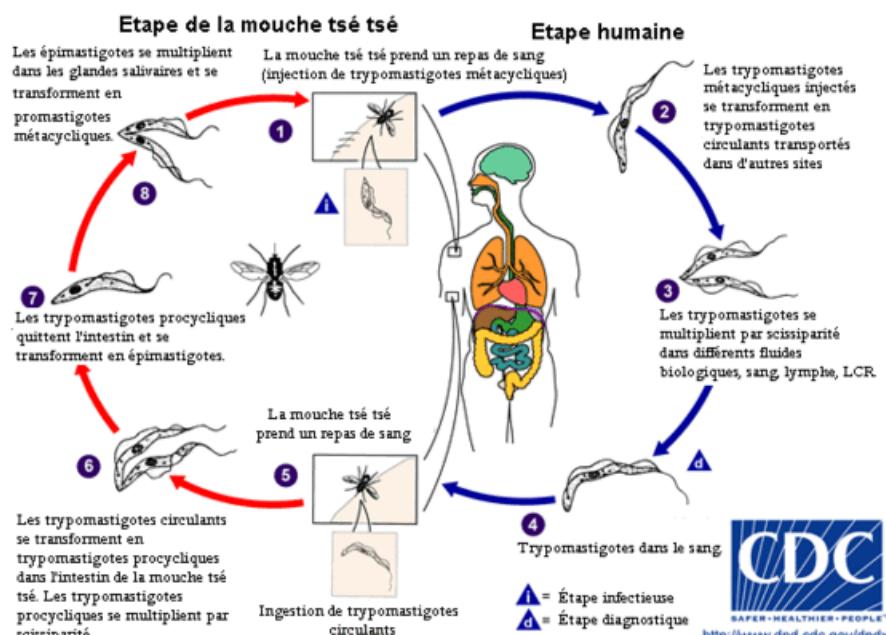
reproduction sont en étroite relation avec une conjugaison préalable, voire en de véritables gamètes (*Plasmodium* par exemple), qui concourent à la fusion de parties (éléments nucléaires) de deux individus différents. Ces phases de multiplication végétative ou de multiplication sexuée s'enchainent, éventuellement chez des hôtes différents et définissent le cycle biologique des Protozoaires.

Nous présenterons ici les cycles de trois protozoaires d'importance médicale : celui de *Plasmodium* (agent du paludisme), celui de *Trypanosoma brucei* (agent de la maladie du sommeil) et celui de *Toxoplasma gondii* (agent de la toxoplasmose).

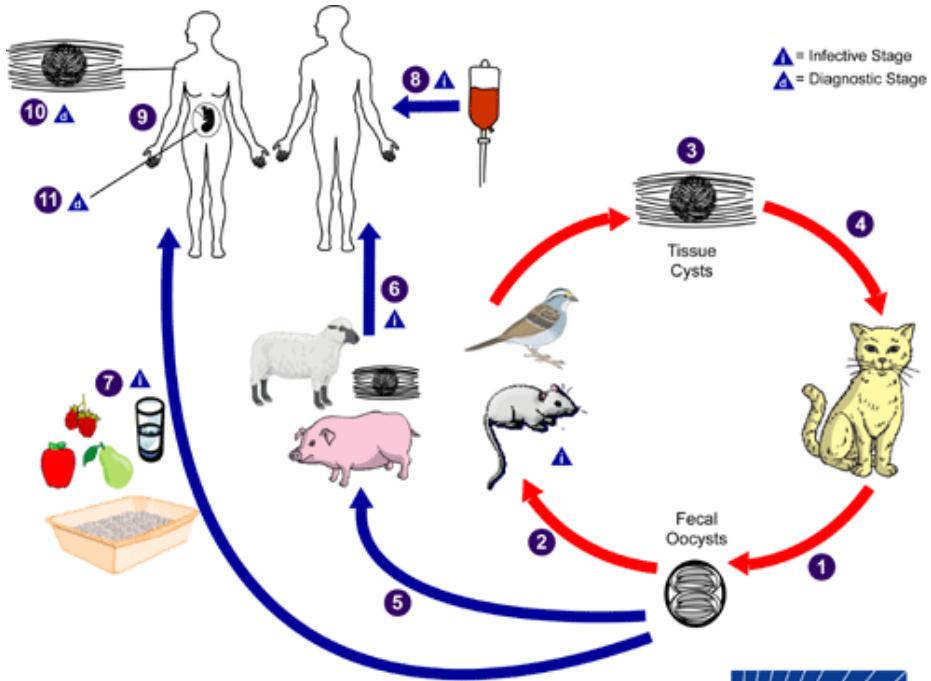
Cycle de *Plasmodium*



Cycle de *Trypanosoma brucei*



Cycle de *Toxoplasma gondii*



- 1- Emission d'oocystes infestants par les chats
- 2- Contamination de petits rongeurs
- 3- Enkystement dans les muscles des rongeurs
- 4- Carnivorisme
- 5- Contamination d'animaux de boucherie
- 6- Carnivorisme
- 7- Ingestion d'aliments souillés par les déjections des chats
- 8- Contamination par transfusion ou greffe d'organe : toxoplasmose maladie
- 9- Toxoplasmose maladie
- 10-Enkystement dans les tissus musculaires
- 11-Transmission materno-fœtale

6. Les Helminthes

Les Helminthes sont des Eumétazoaires (pluricellulaires triploblastiques, cf. Embryologie) parmi lesquels deux groupes sont régulièrement parasites, celui des Cestodes/Trématodes (vers plats segmentés/non segmentés) et celui des Nématodes (vers de section circulaire ou vers ronds) qui comprend aussi un grand nombre d'animaux non parasites.

On peut diviser les animaux triploblastiques en trois catégories majeures selon la présence ou l'absence d'une cavité corporelle ou cœlome. Les Plathelminthes font partie du premier groupe chez qui les trois couches de tissus sont collées ensemble; la seule cavité dans le corps est la cavité digestive. Ces animaux sont appelés accélomates. Les Nématodes appartiennent à une deuxième catégorie d'animaux appelés pseudocœlomates. Chez ce groupe, une cavité (pseudocœlome) se développe à partir du blastocœle embryonnaire, et n'est pas complètement revêtu de mésoderme à l'intérieur. Le troisième groupe d'animaux, les eucoelomates,

possèdent un cœlome ou véritable cavité corporelle (c'est le cas de l'Homme, par exemple). Contrairement au pseudocœlome, le cœlome se développe au sein du mésoderme et est habituellement complètement revêtu de tissu mésodermique (péritoine) sur sa surface interne.

6.1. Les vers plats

Les vers plats sont principalement des organismes benthiques, vivant en milieu marin et d'eau douce, bien que quelques-uns soient dans des habitats terrestres humides. Leurs dimensions varient de 5 à 500 mm, et on peut les trouver sous des roches ou autres objets durs dans les ruisseaux, les étangs et la zone littorale de l'océan. Contrairement aux vers parasites, ces espèces libres possèdent des systèmes digestif, excréteur, reproducteur, nerveux et musculaire développés, et ont des cycles de vie simples.

On distingue trois classes.

- Les Turbellariés sont libres, aquatiques et leur épiderme est cilié.
- Les Trématodes (Douves et Schistosomes par exemple) ont évolué vers un mode de vie parasite. Ils sont dits Monogènes dans le cas où leur cycle de reproduction est simple, Digènes dans le cas d'un cycle de reproduction complexe.
- Les Cestodes (Tænias par exemple) sont des parasites rubannés et segmentés.

6.1.1. Classe des Trématodes

Leur morphologie est comparable à celle des Turbellariés libres, les modifications qu'ils ont subies les ont adaptés au parasitisme. Il existe chez eux des dispositifs d'accrochage et d'adhérence par ventouses et crochets.

Le type des Trématodes est *Fasciola hepatica* (Fig. 28). Cet animal vit dans les canaux biliaires de ruminants enroulé sur lui-même selon un axe longitudinal. Il mesure entre 2 et 3 cm de long, son corps est grisâtre, ovale et plus large dans sa partie antérieure. Il présente un prolongement céphalique portant la bouche et une ventouse buccale. Sur sa face ventrale se trouve une ventouse postérieure. Entre les deux ventouses se trouvent les deux orifices génitaux mâle et femelle. La face dorsale porte l'orifice du canal de Laurer.

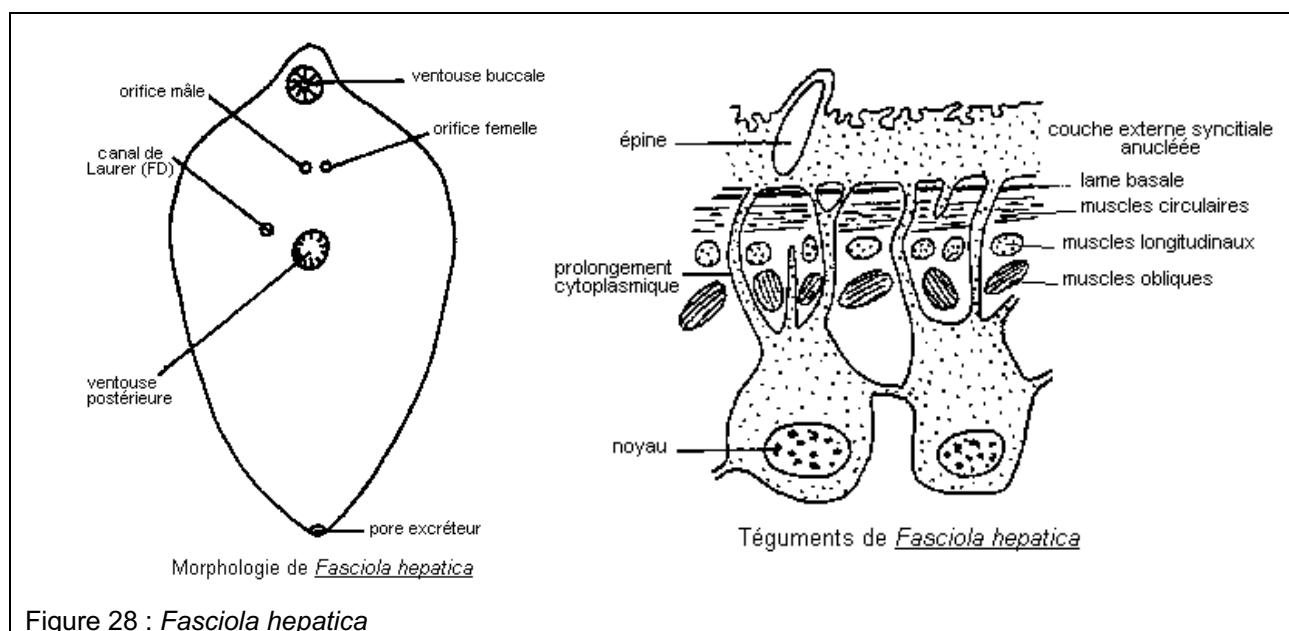


Figure 28 : *Fasciola hepatica*

Les téguments

La microscopie électronique montre qu'il n'y a pas de cuticule mais deux couches. La couche externe est syncipitale, anucléée et repose sur une lame basale. La couche interne est nucléée, située sous trois couches musculaires et au contact du parenchyme.

Les deux couches tégumentaires sont en communication grâce à de fins prolongements cytoplasmiques qui traversent les couches musculaires et la lame basale. La membrane plasmique est protégée du côté externe par un Glycocalix plus ou moins épais et forme des invaginations et replis de profondeur variable. La couche cytoplasmique externe secrète des épines intracytoplasmiques qui soulèvent la membrane.

Le système nerveux

Il est réduit (c'est un exemple de régression parasitaire). Il n'existe pas d'organes des sens, seulement des cellules sensorielles sous-tégumentaires (Fig. 29).

Le tube digestif

La bouche antérieure entourée d'une ventouse s'ouvre dans un pharynx musculeux prolongé par un œsophage court et ramifié en deux cordons intestinaux eux-mêmes très ramifiés et aboutissant à des caecums. L'évacuation des déchets se fait par antipéristaltisme, la bouche servant d'orifice excréteur.

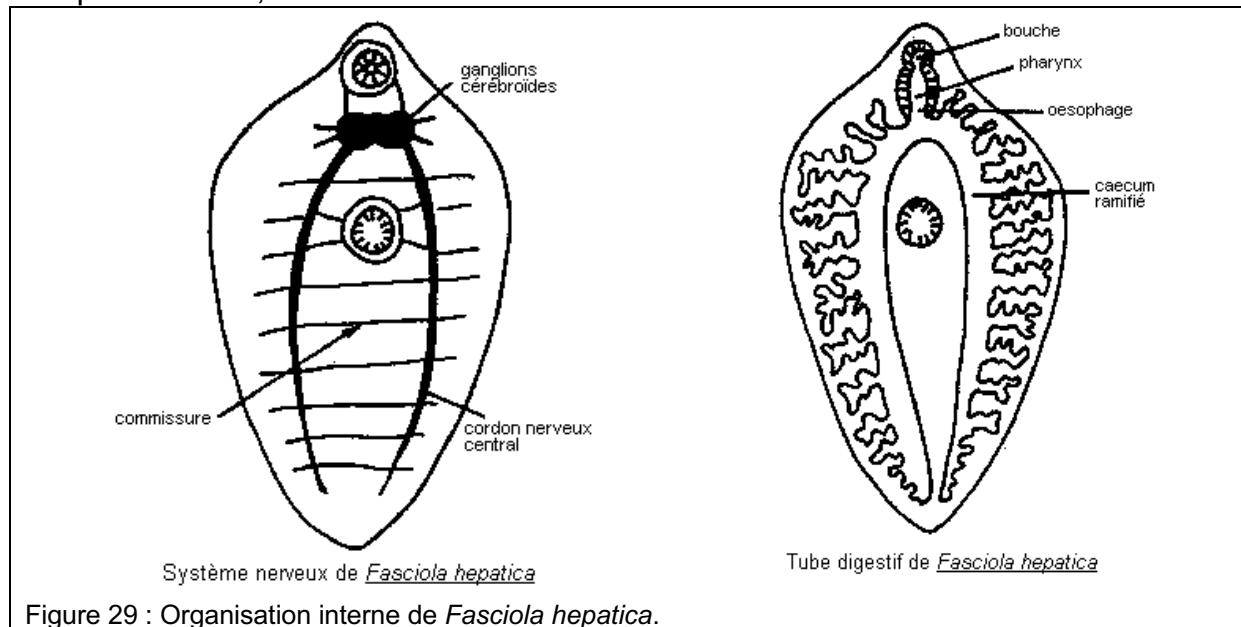


Figure 29 : Organisation interne de *Fasciola hepatica*.

Les appareils respiratoire et circulatoire

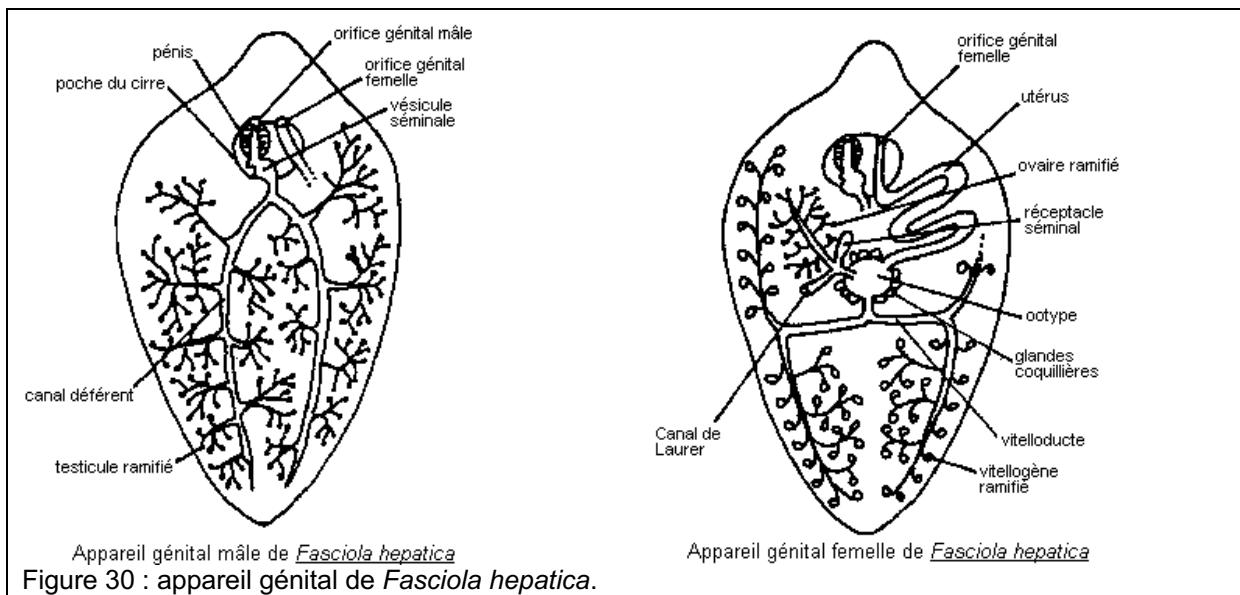
Ils n'existent pas. La Douve fonctionnerait en anaérobiose.

L'appareil génital

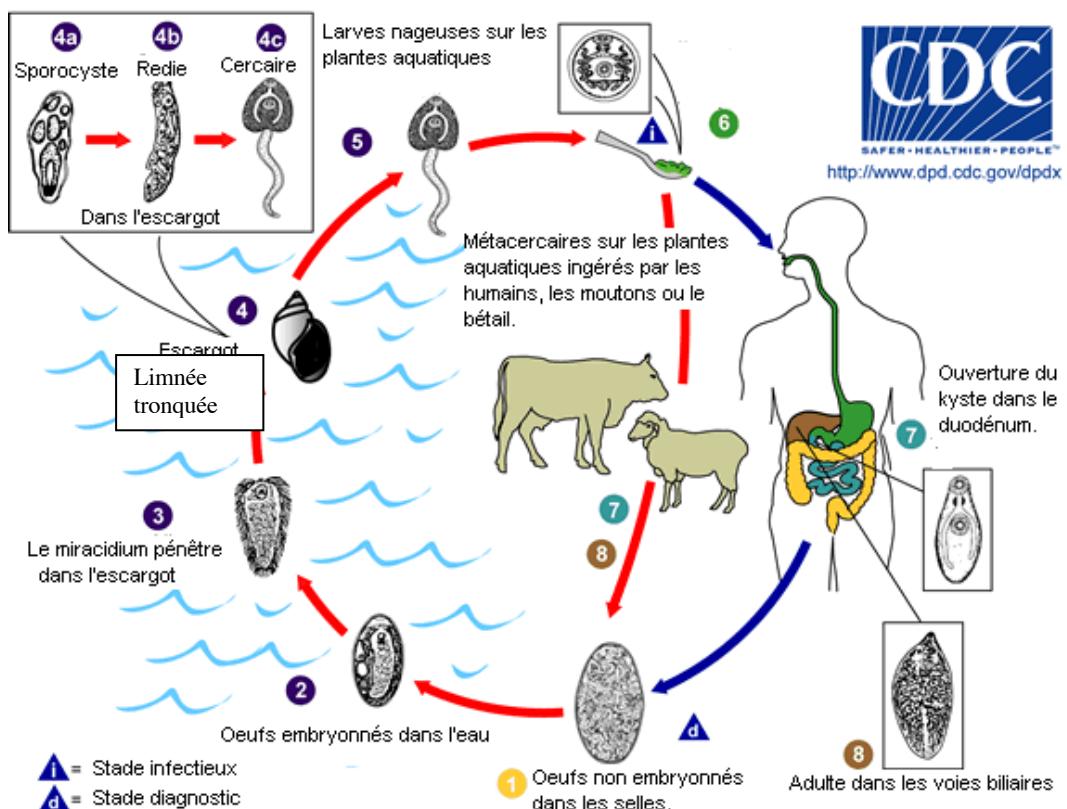
Les Trématodes sont hermaphrodites. Chaque individu a donc un appareil génital male et un appareil génital femelle (Fig.30).

L'appareil mâle est constitué de deux testicules ramifiés avec deux vésicules séminales.

L'appareil femelle est constitué d'un ovaire ramifié prolongé par un oviducte qui rejoint un Ootype ridé de cellules glandulaires qui forment les Glandes coquillaires. L'oviducte est en relation avec le **canal de Laurer** qui débouche à l'extérieur du côté dorsal et porte un réceptacle séminal. De nombreux vitellogènes se déversent dans deux vitelloductes rejoignant l'ovotype relié au pore génital femelle par un utérus circonvolué.



Cycle Biologique

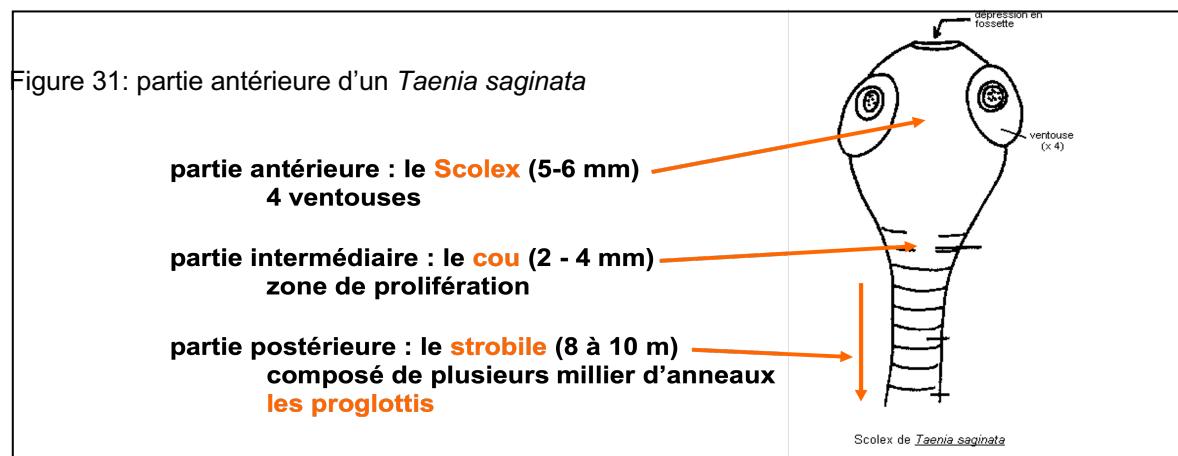


C'est un **parasite dixène** : son développement nécessite deux hôtes différents. Ce cycle est caractérisé par une multiplication au stade larvaire permettant d'augmenter le nombre des individus. Les œufs sont pondus dans les canaux biliaires du mouton et rejetés à l'extérieur avec les excréments. S'ils tombent dans l'eau ils éclosent avec libération d'un premier type larvaire qui va coloniser un second hôte, la Limnée tronquée. Dans ce second hôte aura lieu la polyembryonnie (multiplication asexuée au stade larvaire). Les parasites sortant du mollusque iront s'enkyster (métacercaires) sous les feuilles de végétaux de prairies inondables consommées par les herbivores.

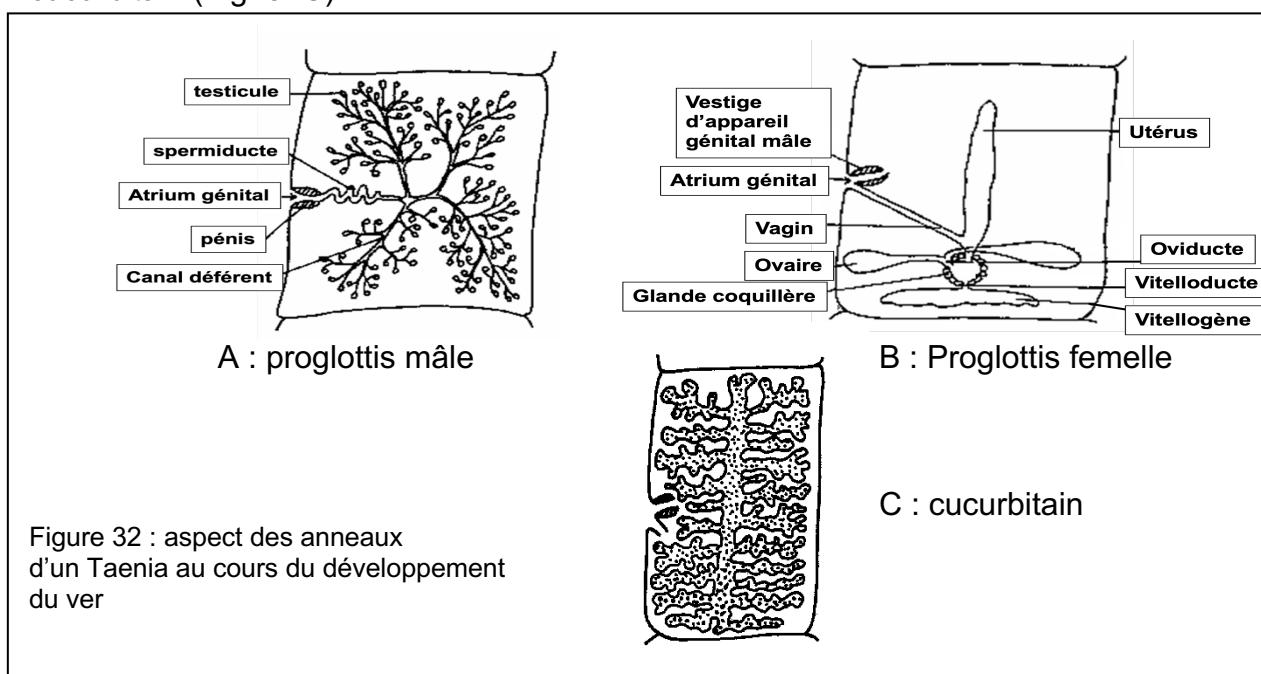
6.1.2. Classe des Cestodes

Ce sont tous des parasites hétéroxènes internes, le plus souvent de l'intestin ou du foie des Vertébrés. Ils sont très différents des Trématodes dont le corps est aplati : les Cestodes sont rubanés et segmentés.

Le type des Cestodes est *Taenia solium* ou Ver solitaire parasite intestinal chez l'Homme. Il mesure de deux à huit mètres de long et est formé de segments successifs ou Proglottis dont l'ensemble est appelé Strobile. Les proglottis sont bourgeonnés par une zone de prolifération ou Cou, située immédiatement en arrière de la partie antérieure nommée Scolex et qui porte les organes de fixation. Chez *Taenia* le scolex est appelé inerme car il ne porte pas de crochets (Fig. 31).



Après avoir bourgeonné à partir du cou, les proglottis sont tout d'abord immatures, puis acquièrent progressivement des caractéristiques mâles (Fig. 32 A) qui disparaissent progressivement en même temps qu'apparaissent des caractéristiques femelles (Fig. 32 B), ce phénomène s'appelle la **protandrie** et évite l'autofécondation d'un anneau. Les anneaux mâles, à l'occasion d'un repliement du vers dans le TD de son hôte rencontrent les anneaux femelles et la fécondation a lieu, conduisant à la formation d'un anneau mur, utérus gravide bourré d'œufs, qu'on appelle un cucurbitain (Fig. 32C).



Les cucurbitains sont évacués avec les matières fécales ou, le plus souvent, en dehors des périodes de défécation. Les œufs contaminent alors le sol et sont ingérés par l'hôte intermédiaire, un bovin.

6.2. Les vers ronds (Nématodes)

Les Nématodes sont des métazoaires triploblastiques cœlomates. Les nématodes ont un tube digestif complet, c'est-à-dire bouche et anus présents (différents des plathelminthes). Par contre, ils ne possèdent ni appareil respiratoire, ni appareil circulatoire, ni de tunique musculaire (muscles circulaires absents).

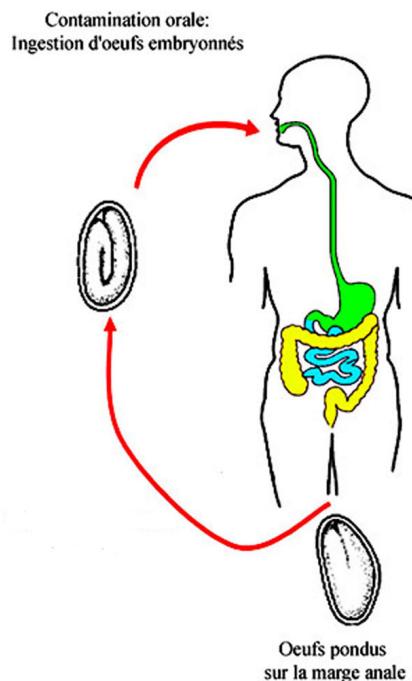
Le pseudo-cœlome correspond au blastocèle, qui est une cavité qui se forme lors du développement embryonnaire. La respiration se fait par diffusion au travers de la cuticule imperméable, percée de pores. Cette diffusion est passive, c'est-à-dire que l'organisme n'a plus de blastocèle; la blastula forme une cavité entre le tube digestif et le derme. Cette cavité est appelée cavité secondaire. Le système nerveux est formé d'un anneau céphalique, qui se prolonge par un cordon nerveux ventral et un cordon nerveux dorsal. Il y a un tube digestif complet composé d'un œsophage rhabditoïde (à deux renflements).

Les Nématodes libres se rencontrent dans des environnements très diversifiés : eaux douces, eaux saumâtres, eaux salées. *Caenorhabditis elegans*, qui vit dans le sol, est un organisme modèle en biologie. En effet, il y a une caractéristique unique chez les Nématodes: le nombre de cellules est fixe pour chaque espèce (eutélie). Les divisions cellulaires (mitose) arrêtent très tôt au cours du développement embryonnaire, et la croissance de ces vers est due à une croissance de leurs cellules plutôt que par un accroissement du nombre de cellules.

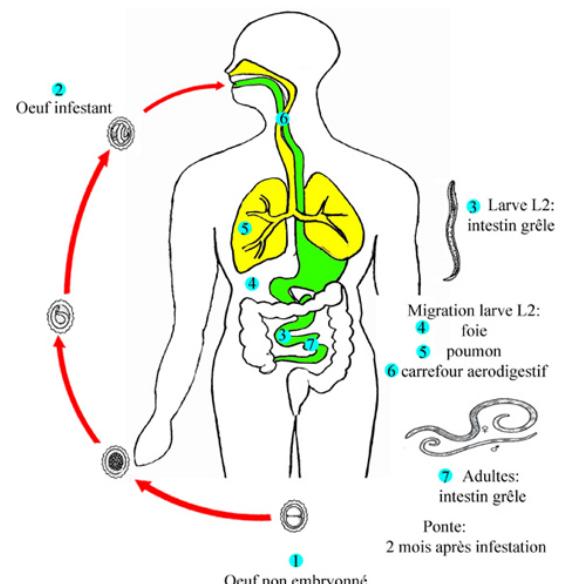
Les Nématodes sont dioïques. Le mâle possède des spicules pour garder ouvert le pore reproducteur de la femelle lors de l'accouplement. Le système reproducteur et le tube digestif des mâles et des femelles débouchent tous deux dans le cloaque. Les spermatozoïdes n'ont ni flagelle ni de cils chez les Nématodes (spermatozoïdes amiboides).

Les Nématodes parasites des invertébrés et des vertébrés vivent dans les cavités (intestin, rein), dans les vaisseaux sanguins ou dans les tissus. Les oxyures sont trouvés dans le tube digestif des Arthropodes et des Vertébrés (*Enterobius vermicularis* parasite l'Homme. Les *Ascaris* habitent le gros intestin des mammifères (*Ascaris lombricoïdes* est hébergé dans l'intestin de l'Homme). La filaire de Bancroft (*Wuchereria bancrofti*) parasite les vaisseaux lymphatiques de l'Homme et peut causer l'éléphantiasis. Leurs cycles respectifs sont plus ou moins complexes

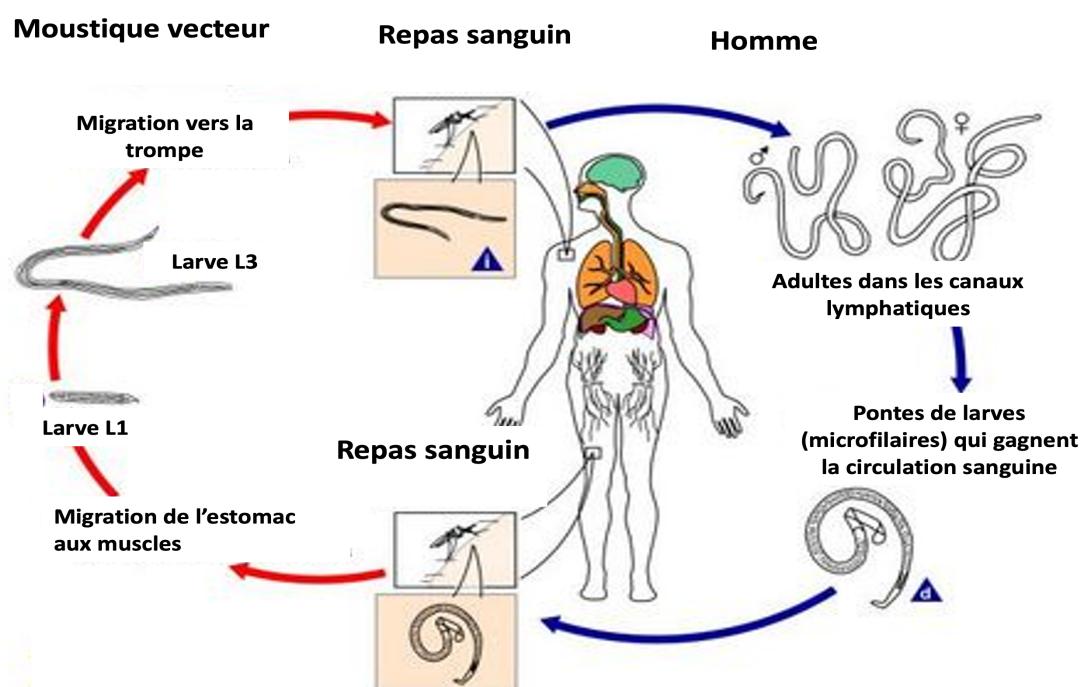
Cycle d'*Enterobius vermicularis*



Cycle d'*Ascaris lumbricoides*



Cycle de *Wuchereria bancrofti*



Un grand nombre de Nématodes sont aussi parasites de végétaux. On estime que chaque année aux États-Unis plus de 100 M \$ en nématocides (produits phytosanitaire visant à l'élimination des Nématodes) sont employés pour réduire les dommages causés au maïs, au blé et au tabac.

7. Arthropodes et vecteurs

L'embranchement des Arthropodes est le groupe d'animaux qui a le plus de succès sur notre planète. C'est aussi le groupe le plus diversifié en nombre d'espèce (plus d'un million et demi d'espèces, 80% des espèces décrites à ce jour font partie de ce groupe, et on considère qu'il y en a pratiquement autant qui ne sont pas décrites). On retrouve des Arthropodes en abondance dans tous les habitats, des pics de montagne neigeux aux fosses abyssales, et des déserts aux forêts tropicales. La caractéristique principale de ce groupe est la présence d'appendices articulés (grec Arthon= articulation) et d'un exosquelette. Ce dernier est formé d'une cuticule qui recouvre entièrement l'extérieur de l'animal et même la portion antérieure et postérieure du tube digestif, c'est la **carapace** des Insectes ou des Crustacés, par exemple.

7.1. Organisation

La cuticule, qui est sécrétée par l'épiderme, est rigide (Fig. 33). Elle est composée de deux couches principales: l'épicuticule et la procuticule (subdivisée en exocuticule et endocuticule). La rigidité de la cuticule provient de la procuticule composée de chitine (hydrate de carbone : N-acetylglucosamine avec des liaisons β -1,4) noyée dans une matrice protéique (arthropodine). L'ensemble est durci (tanné) par l'action de phénols oxydés en quinones qui relient la matrice de fibrilles de chitine aux autres protéines de l'endo et exocuticule. Cette réaction est appelée sclérisation, elle est observée au cours de la mue (cf. infra). Chez les Crustacés s'ajoutent des dépôts de carbonate et de phosphate de calcium. L'épicuticule est formée de protéines et de cires hydrophobes (surtout chez les Insectes); son rôle est d'imperméabiliser la cuticule.

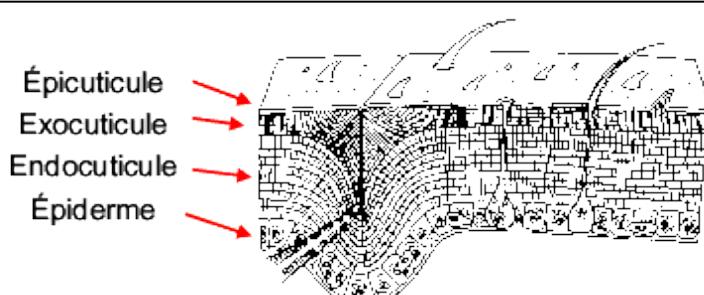


Figure 33. Structure de la cuticule des Arthropodes.

L'exosquelette des Arthropodes est robuste et permet des mouvements efficaces. Toutefois la sécrétion de la cuticule exige un investissement d'énergie considérable, et le squelette ajoute beaucoup de poids à l'animal. La présence d'un exosquelette ne permet pas une croissance continue; les Arthropodes doivent donc muer pour grandir ou changer de stade (passer d'un stade larvaire à un stade adulte).

Les Arthropodes ont en commun une organisation métamérique avec une spécialisation de certaines régions du corps (tagmose) en tagmes (Fig. 35, 36, 37), la présence d'appendices paires et de pattes articulées. L'embranchement se divise en trois sous-embranchement principaux d'après le type d'appendices: les Chélicérates, les Crustacés et les Uniramés.

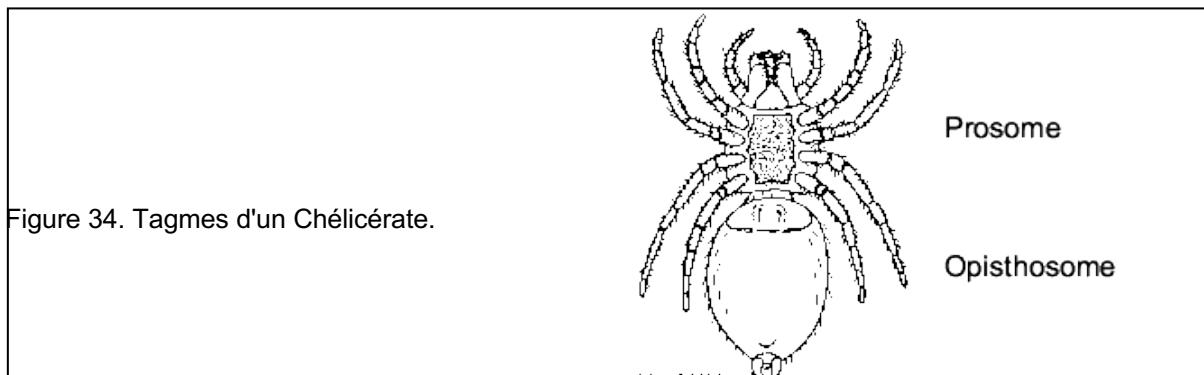


Figure 34. Tagmes d'un Chélicérate.

Les Chélicérates sont représentés par la classe des Arachnides (araignée, scorpion, tique, limule). Ces animaux n'ont pas d'antennes et sont munis de chélicères qui portent un croc qui sert à injecter le venin. Leur corps est divisé en deux parties (Fig. 34) : le prosome (tête et thorax) et l'opisthosome (abdomen) reliés par un rétrécissement du corps, le pédicelle. Les Arachnides ont 4 paires de pattes.

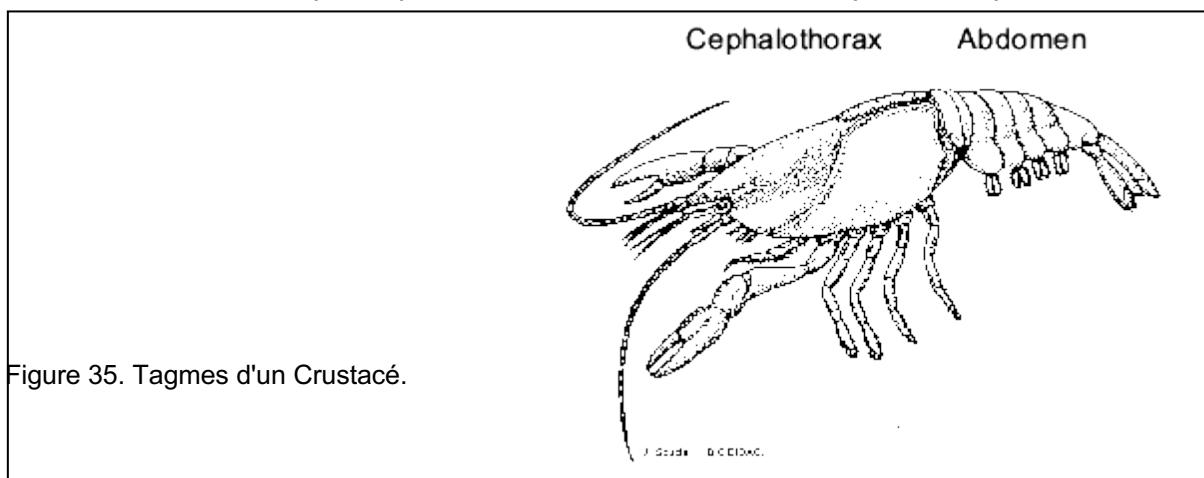


Figure 35. Tagmes d'un Crustacé.

Les Crustacés (homard, copépode, balane) sont essentiellement retrouvés dans le milieu marin. Leur corps est généralement divisé en deux tagmes (Fig. 35): le céphalothorax et l'abdomen. Ils possèdent deux paires d'antennes et des branchies sur les segments de l'abdomen.

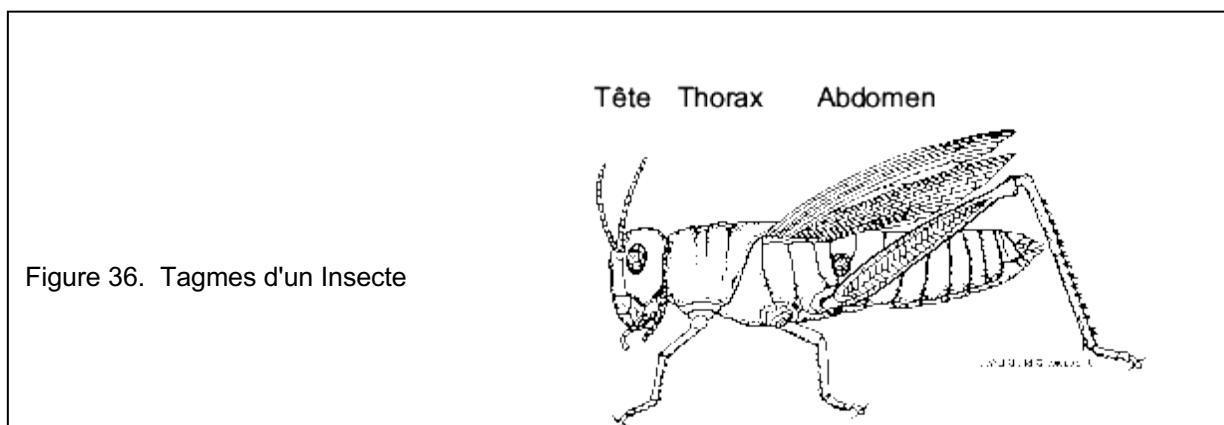


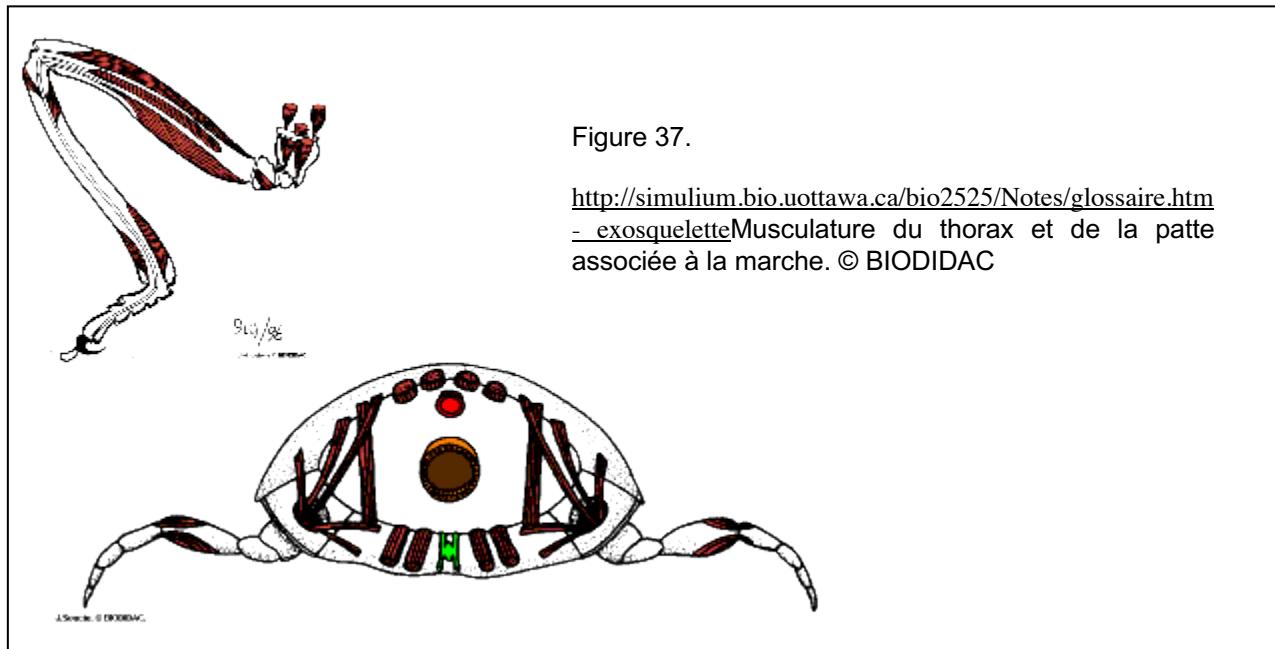
Figure 36. Tagmes d'un Insecte

Les Insectes font partie du sous-embranchement des Uniramés, avec les millipèdes et centipèdes (mille-pattes). Ils sont caractérisés par la présence d'une seule paire d'antennes, de mandibules, et de trois paires de pattes. Leur corps est divisé en trois tagmes (Fig. 36): la tête qui regroupe les éléments sensoriels, le thorax qui est le tagme du mouvement, et l'abdomen qui contient les viscères et l'appareil reproducteur. La plupart des Insectes ont deux paires d'ailes sur le thorax et ces

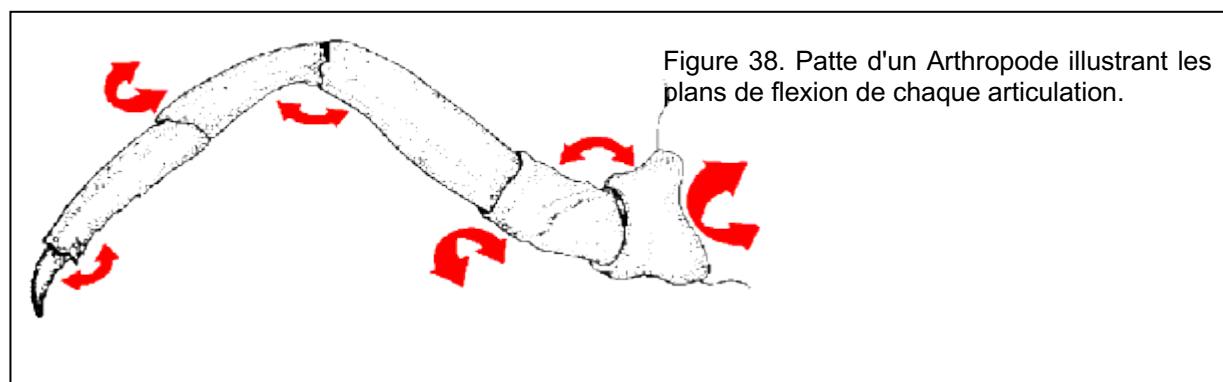
animaux ont conquis le milieu aérien bien avant que n'apparaissent les Vertébrés sur terre.

7.2. Locomotion

L'exosquelette et la présence d'appendices articulés procure aux Arthropodes un avantage locomoteur. D'une part, l'exosquelette procure la rigidité nécessaire au mouvement, fournit des points d'attache solides pour les muscles et des points d'appui pour des mouvements de levier (Fig. 37). D'autre part, les appendices permettent à l'animal de se déplacer sans avoir à utiliser toute sa musculature.



Les articulations des Arthropodes ne permettent des mouvements que dans un seul plan (comme la reliure d'un livre, Fig. 38). Par contre, les appendices sont composés de plusieurs unités dont les articulations sont orientées dans différents plans ce qui permet de déplacer l'extrémité de l'appendice dans toutes les directions.



Les Insectes qui ont des ailes (ptérygotes) ont un grand avantage car ils peuvent se déplacer rapidement sur de grandes distances. Les Insectes les plus évolués (les mouches et les abeilles) utilisent des muscles qui ne sont pas directement attachés à l'aile, mais plutôt au thorax. Leur action entraîne une déformation du thorax qui actionne les ailes. L'avantage de cette approche est que le système entre en résonnance et réduit ainsi la dépense musculaire liée au vol.

7.3. Respiration

La cuticule réduit énormément les échanges gazeux ou osmotiques au niveau de l'épiderme. Les Arthropodes sont donc munis d'organes spécialisés pour acquérir de l'oxygène.

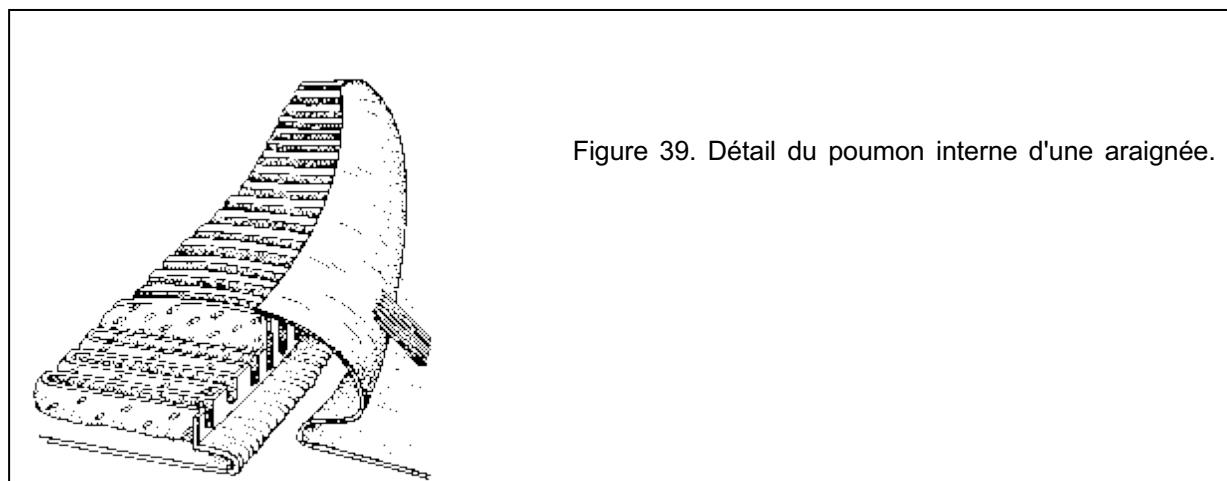


Figure 39. Détail du poumon interne d'une araignée.

Les araignées ont un poumon interne (Fig. 39) qui est composé de feuillets de tissus disposés comme les feuilles d'un livre, ce qui permet d'augmenter la surface de contact. Le poumon est ventilé par les mouvements de l'abdomen.

Les Crustacés ont des branchies protégées par la carapace qui forme une chambre branchiale. Les crabes terrestres ont des branchies beaucoup plus petites que ceux qui sont aquatiques, ce qui leur permet de réduire les pertes d'eau.

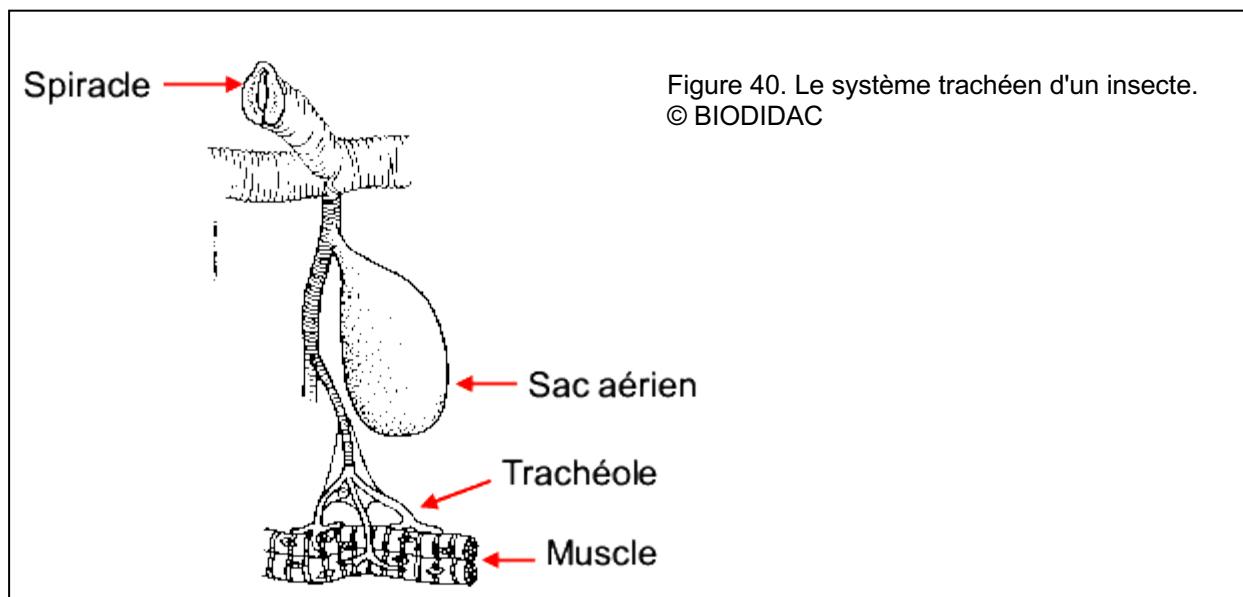


Figure 40. Le système trachéen d'un insecte.
© BIODIDAC

Les Insectes ont un système respiratoire unique dans le règne animal et extrêmement efficace: **le système trachéen** (Fig. 41). La cuticule est percée de pores, les spiracles munis de poils hydrophobes. Ces pores mènent à un réseau de trachées et de trachéoles qui peuvent occuper près de 50% du volume interne de l'insecte. Les trachéoles se ramifient en tubules qui entourent les muscles et les organes. Ces tubules sont remplis de fluide trachéolaire. La ventilation est assurée par des sacs aériens qui pompent ou expulsent l'air suivant les mouvements et

contractions de l'animal. Dans les tissus très actifs, comme les muscles alaires, les métabolites sécrétés font augmenter la pression osmotique entre les cellules. Le fluide contenu dans les tubules est aspiré par osmose dans les tissus, ce qui crée une pression négative dans les trachéoles qui vont aspirer l'air de l'extérieur. Le fluide permet les échanges gazeux et augmente l'efficacité du système.

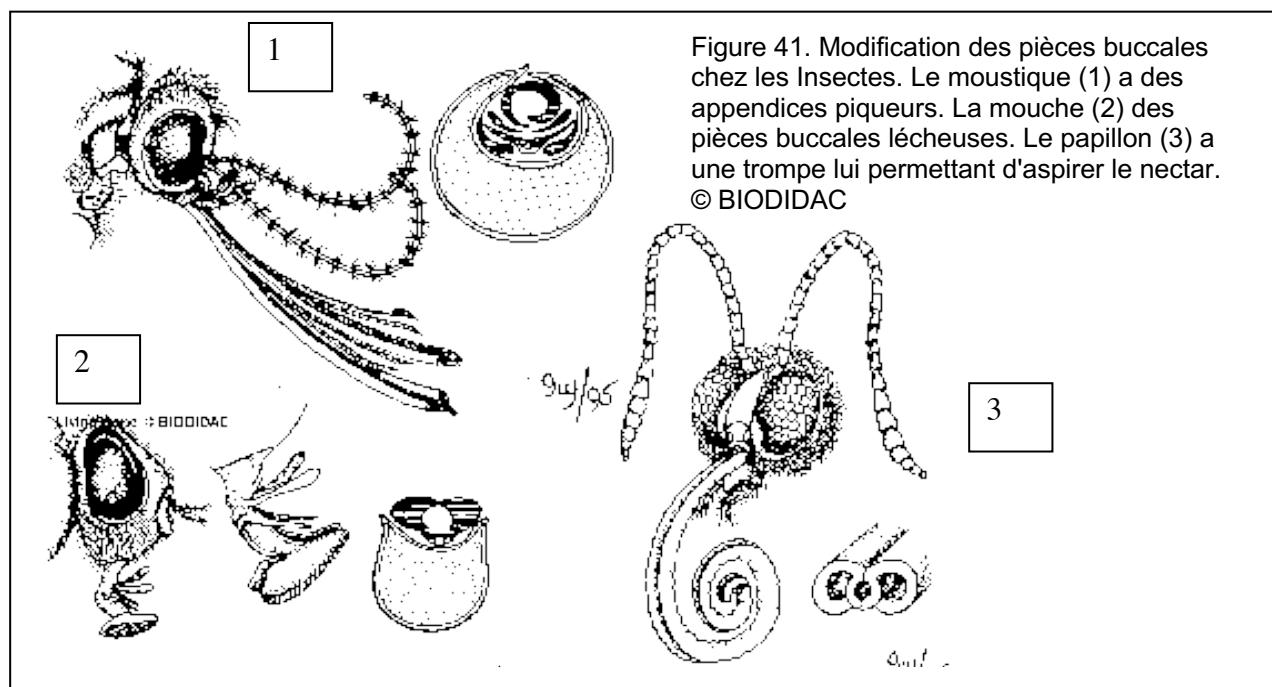
7.4. Alimentation et digestion

On retrouve toutes les stratégies alimentaires chez un groupe aussi vaste et diversifié que les Arthropodes. Les spécialisations alimentaires sont typiquement associées à des adaptations au niveau des appendices buccaux et du tube digestif. Seule la partie centrale du tube digestif est utilisée pour la digestion car les parties antérieure et postérieure sont recouvertes de cuticule.

Les araignées sont des prédateurs qui paralysent leurs proies à l'aide de venin injecté par les crocs des chélicères. Elles injectent alors leurs enzymes digestives dans la proie et sucent ensuite le liquide produit. Elles peuvent emmagasiner la nourriture dans des cæca.

Les Crustacés sont typiquement filtreurs (zooplancton) ou détritivores (écrevisse, homard). Leurs appendices servent à créer un courant qui amène les particules à la bouche.

Les pièces buccales des Insectes sont modifiées, parfois de façon très spécialisée, selon le type d'alimentation (Fig. 42). Par exemple, la sauterelle est un brouteur qui possède de fortes mandibules très sclérifiées qui résistent à l'abrasion causée par la silice contenue dans les tissus de nombreuses plantes. Le moustique (cf.infra) possède une trompe piqueuse qui lui permet d'injecter un anticoagulant et, lorsqu'il est vecteur de maladies, un virus, une bactérie ou un parasite et d'aspirer le sang. Le papillon a une longue trompe suceuse.



7.5. Cycle biologique

La reproduction chez les Arthropodes est sexuée et les animaux sont dioïques. Il y a généralement plusieurs stades larvaires dont la morphologie et l'écologie diffèrent de celles du stade adulte (métamorphose).

Chez les Insectes, la métamorphose peut être complète ou incomplète. Chez les sauterelles, insectes hémimétaboles, par exemple, la métamorphose est incomplète et les larves ressemblent beaucoup aux adultes (moins les ailes et les organes génitaux). Par contre, chez les moustiques et les papillons, insectes holométaboles, la métamorphose est complète. La larve est très différente de l'adulte, et il y a un stade nymphal au cours duquel la métamorphose s'effectue.

L'intérêt, chez les Insectes holométaboles, est alors de pouvoir se développer dans des biotopes différents (les eaux stagnantes pour les larves de moustiques et le milieu aérien pour les adultes) et donc de diminuer la compétition intraspécifique.

7.6. Défenses

L'exosquelette est la première ligne de défense des Arthropodes. Leur petite taille et leur agilité peut également servir à tromper leurs prédateurs. En fait, tous les moyens sont bons et se retrouvent chez certains représentants du groupe: mimétisme, venin, acides, mauvais goût, épines, etc. Leur système immunitaire est beaucoup moins élaboré que celui des vertébrés.

7.7. Ecologie

Les Arthropodes jouent un rôle important dans les chaînes alimentaires de tous les habitats. En milieu aquatique, les Crustacés planctoniques permettent les transferts d'énergie des plantes aux poissons. En milieu terrestre, les Insectes entrent en compétition avec l'Homme pour la nourriture et sont vecteurs de multiples parasites, comme Plasmodium l'agent responsable du paludisme (cf. supra).

Le grand succès des Insectes peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Leur petite taille leur permet de coloniser des microhabitats. Le vol est un moyen de défense et leur permet de se disperser facilement pour trouver de la nourriture ou exploiter des ressources temporaires. Leur exosquelette imperméable (grâce à l'épicuticule cireuse) offre protection contre les prédateurs et contre la dessiccation, et offre un support qui permet une locomotion efficace. La métamorphose et les différences entre les larves et les adultes permettent de réduire la compétition intraspécifique pour des ressources limitées et de coloniser un plus grand nombre de biotope. La grande fécondité et la multiplication rapide des Insectes leur permettent d'exploiter les ressources alimentaires rapidement avant que d'autres animaux en bénéficient, augmentant ainsi les chances de survie de l'espèce. Enfin, leur association avec les plantes à fleur et la coévolution de ces deux groupes leur a permis d'exploiter une source de nourriture abondante et variée.

On retrouve un grand nombre d'insectes vecteurs d'infection, par exemple :

Maladie	Vecteur	Agent	Mode de transmission	Importance épidémiologique	Localisation géographique
Paludisme	Anophèle (insecte diptère)	<i>Plasmodium</i>	Repas sanguin	+++++	Tropicale et intertropicale
Maladie du sommeil	Glossine (mouche Tsé-Tisé)	<i>Trypanosoma brucei</i>	Repas sanguin	++	Afrique sub-saharienne
Maladie de Chagas	Réduve	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Défécation	++	Amérique latine
Encépalite à Tiques	Ixodes ricinus	flavivirus	Repas sanguin	++	Europe de l'Est
Arboviroses	Phlébotome, Moustiques, Tiques	500 décrites	Repas sanguin	+++	Mondiales

Tableau 4 : quelques Arthropodes vecteurs et les infections qu'ils transmettent

Dans le ménage à trois que forment l'hôte vertébré (Homme par exemple), le pathogène (*Plasmodium* par exemple) et le vecteur (l'Anophèle femelle), les qualités d'un bon vecteur sont

- l'anthropophilie (attraction pour l'Homme),
- un comportement et un biotope compatible avec celui de l'hôte vertébré (les arthropodes aquatiques sont de mauvais vecteurs pour les parasités de l'Homme)
- une faible détectabilité (les moustiques秘ètent des anesthésiques dans leur salive et leur vol est très peu bruyant)
- une faible sensibilité du vecteur au pathogène.

8. Physiopathologies des infections

Très peu de micro-organismes (protistes, bactéries, virus) sont pathogènes pour l'Homme. Ceux qui sont pathogènes sont caractérisés par leur **virulence** (capacité à induire une maladie infectieuse). La virulence est évaluée par la mesure de la **dose infectante** (inoculum capable d'induire la pathologie). Plus le nombre d'agents à inoculer est faible plus ce dernier est virulent. Souvent, on mesure expérimentalement la **dose létale 50** (DL50) chez la souris (inoculum tuant 50% des souris contaminées expérimentalement).

L'infection est le résultat de l'interaction entre les **facteurs de virulence** du micro-organisme et les **défenses de l'hôte** au contact de cet agent. En effet, lors d'une épidémie avec un agent infectieux donné, tous les sujets ne sont pas atteints et les formes cliniques sont variables. La maladie infectieuse est souvent une rupture de l'équilibre entre l'agent et le sujet hôte. Il faut donc prendre en compte à la fois l'agent infectieux et l'hôte pour expliquer les infections.

En fonction du **terrain de l'hôte**, on peut définir arbitrairement des pathogènes dit « opportunistes » ou « spécifiques » :

- les **pathogènes opportunistes** infectent les sujets ayant une pathologie préexistante (plaies, immunodépression, ...), nécessitent de forts inoculums pour être pathogènes (faible virulence) et provoquent en général des infections peu spécifiques d'agent (exemples : surinfections, septicémies, ...).
- Les **pathogènes spécifiques** peuvent infecter également les sujets préalablement sains, ont une virulence importante et provoquent souvent des pathologies caractéristiques d'un agent infectieux (exemples : fièvre typhoïde, varicelle, ...)

8.1. Le postulat de Koch

Pour prouver la responsabilité d'un agent infectieux dans une pathologie, Robert Koch, éminent microbiologiste du XIX^{ème} siècle, proposa le postulat suivant :

- l'agent infectieux est présent chez tous les sujets atteints (et au site de la maladie),
- l'agent infectieux est isolé du sujet malade et cultivé pur,
- l'agent infectieux isolé provoque la maladie après inoculation à un sujet sensible,
- l'agent infectieux doit pouvoir alors être re-isolé.

De plus en plus, la culture et l'isolement sont remplacés par une caractérisation moléculaire de l'agent infectieux.

8.2. Les étapes d'une infection

Une infection se déroule schématiquement en plusieurs étapes : il y a **pénétration** de l'agent infectieux dans l'organisme, puis **prolifération** et **dissémination** de l'agent et enfin si tout va bien élimination de l'agent par l'hôte (**guérison**). Dans le cas contraire, il y a mort du sujet infecté. La phase de prolifération et de dissémination correspond à la période pendant laquelle le sujet est malade (**phase clinique** ou **symptomatique**) alors que la phase de pénétration est **asymptomatique** (inapparente cliniquement).

Certaines maladies infectieuses ne répondent pas à ce schéma général :

- maladies liées à l'action d'une **toxine** : tétanos, botulisme, ...
- maladies localisées uniquement à la surface de l'hôte : gonococcie (blennorragie), ...
- maladies localisées dans les épithéliums (peau, muqueuse) : shigellose, ...
- maladies chroniques : tuberculose, lèpre, ...

- Pénétration dans l'organisme : pour pénétrer dans un organisme, les bactéries sont capables de coloniser (**colonisation**) certains sites de la peau et des muqueuses d'où elles sont habituellement absentes. Il s'agit par exemple des voies urinaires ou de l'arbre respiratoire. Dans ces deux exemples, l'adhérence des bactéries aux cellules de l'épithélium est limitée par des mécanismes de défense de l'hôte. Le **flux urinaire** entraîne avec lui dans les urines les bactéries colonisant l'urètre évitant ainsi la présence de bactéries dans la vessie et donc les infections urinaires. Un urètre court (sexe féminin), des mictions rares (déshydratation) vont ainsi favoriser les infections urinaires. Dans l'arbre respiratoire, les cellules épithéliales ont des cils, ce qui constitue un **tapis muco-ciliaire**. L'ensemble des cils bat dans le même sens et permet aux particules inhalées (dont les bactéries) de remonter vers la bouche pour être dégluties (avalées) ou expectorées (crachées). Chez les sujets fumeurs ou après une infection virale, ce tapis muco-ciliaire devient

moins efficace, favorisant les infections respiratoires (bronchites, pneumopathies). Cette colonisation est essentiellement liée aux capacités d'adhérence des bactéries sur les cellules (et sur les **biomatériaux** : cathéter, prothèse, sonde urinaire,...) grâce à leur capsule, glycocalyx, pili et adhésines.

La pénétration de l'agent dans l'organisme peut être **passive** et liée à une brèche dans les épithéliums (plaies cutanéomuqueuses traumatiques ou chirurgicales, infection virale préalable, ...) ou **active**. Dans ce dernier cas, l'agent infectieux pénètre dans l'organisme par ses propres moyens, le plus souvent, en utilisant des cellules de l'organisme comme vecteur. Par exemple les bactéries des genres *Salmonella* et les *Shigella* utilisent les cellules épithéliales, alors que le bacille de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) utilise les phagocytes (cellules capables de phagocytose).

- **Prolifération dans l'organisme** : cette dernière se fait dans les tissus en extracellulaire le plus souvent pour les bactéries ou dans les cellules (intracellulaire) pour les virus et certaines bactéries (*Listeria*, *Shigella*, *Salmonella*, *Mycobacterium*, ...).

- **Dissémination dans l'organisme** : elle se fait soit de proche en proche, soit grâce à la circulation des fluides corporels. Elle utilise alors la lymphe (**voie lymphogène**) ou le sang (**voie hématogène**). La présence de bactéries dans le sang s'appelle une **bactériémie** et celle de virus une **virémie**.

8.3. Les toxines bactériennes

Deux grands types de toxines sont produits par les bactéries : les exotoxines et les endotoxines (ou LPS).

	exotoxines	endotoxines
Composition	protéine	lipopolysaccharide
Origine	Bactéries à Gram + surtout Bactéries toxinogènes	Bactéries à Gram - uniquement
Excrétion	Oui, le plus souvent	Non, libéré par la lyse bactérienne
Pouvoir毒ique	Important	faible
Présentation clinique	Spécifique	Commune, non spécifique Choc endotoxinique
Exemples	Toxine téstanique Toxine botulique Toxine cholérique ...	
Support génétique	Chromosome Plasmide Prophage	Chromosome
Sensibilité à la chaleur	Oui	Non
Sensibilité au formol	Oui	Non

Tableau 5 : Comparatif des propriétés des exotoxines et endotoxines.

Les exotoxines sont rendues inactives par la chaleur ou le formol et sont alors appelées **anatoxines**. Les anticorps contre les exotoxines ou leurs anatoxines sont appelés **antitoxines**. Les anatoxines sont de très bons **vaccins** car elles ont le pouvoir antigénique de l'exotoxine mais pas de toxicité (exemple : vaccin antitétanique).

8.4. Les défenses de l'hôte face à l'infection

Le premier signe d'infection est la présence d'une **fièvre** (élévation de la température corporelle centrale). Celle-ci est produite par la libération de médiateurs en réponse à l'infection. C'est un moyen de lutte contre les infections.

La protection d'un organisme vis-à-vis d'un agent infectieux s'appelle une **immunité**. Cette dernière peut être **innée** (présente dès la naissance) ou **acquise** (obtenue en général après un premier contact avec l'agent).

- **L'immunité innée** comprend schématiquement un ensemble de protections, comme la peau et la muqueuse nous séparant du milieu extérieur (**barrière cutanéo-muqueuse**), **l'inflammation** (chaleur, rougeur, douleur localisées au site de l'infection) qui permet l'afflux des cellules phagocytaires et l'initiation de la réponse immunitaire.
- **L'immunité acquise (ou adaptative)** est dite **active** lorsqu'elle est développée par le sujet en réponse à une infection ou une vaccination ou **passive** lorsqu'elle est transférée médicalement (séroprophylaxie) ou par l'allaitement maternel. L'immunité post-vaccinale ou post-infectieuse n'est présente qu'après un premier contact avec les antigènes de l'agent infectieux et protège contre les contacts ultérieurs. Elle consiste en la production d'anticorps spécifiques et de cellules spécifiques de l'agent infectieux en cause et permettent son élimination.

8.5. Les sujets à risque d'infections

Certains facteurs génétiques, physiologiques, pathologiques et comportementaux (tabac, alcool) vont favoriser les infections.

Les **sujets immunodéprimés** vont avoir plus de mal que les autres à se défendre contre les infections. Ces sujets peuvent être atteints d'immunodépression congénitale (génétique) ou plus fréquemment acquise durant leur vie :

- Les sujets aux âges extrêmes (prématurés, nouveau-nés, vieillards),
- Les sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) au stade du SIDA,
- Les sujets cancéreux ou leucémiques à des stades avancés,
- Les sujets neutropéniques (déficit en phagocytes),
- Les sujets sous traitement immunodépresseur (greffés).

Les sujets diabétiques ou aspléniques (sans rate) sont à risque pour certaines infections bactériennes.

9. Stratégies diagnostiques en microbiologie

9.1. Diagnostic direct des infections bactériennes et fongiques

Le diagnostic biologique des infections est bien souvent indispensable pour confirmer un diagnostic clinique fait par le médecin et s'assurer de l'efficacité du traitement. Ce processus se déroule au contact du patient (prélèvement d'un **échantillon biologique** pour analyse) puis au laboratoire pour l'analyse de l'échantillon qui suit toujours le même schéma. Les résultats validés par un biologiste (pharmacien ou médecin biologiste) sont ensuite communiqués au médecin prescripteur et au patient.

9.1.1. Le prélèvement

C'est l'acte de prélever un échantillon biologique à des fins d'analyses. Il est effectué sous la responsabilité du biologiste, par un médecin, une infirmière, un technicien préleveur ou un biologiste. Cet acte nécessite le plus souvent une **prescription médicale**. Pour prélever un échantillon conforme, il faut une technique de prélèvement selon les exigences du laboratoire mais aussi avoir suffisamment d'informations cliniques et épidémiologiques sur le patient pour faire une **recherche pertinente** (sexe, âge, terrain, circonstances, signes cliniques, traitement, ...). L'échantillon, s'il n'est pas prélevé au laboratoire, doit être **transmis rapidement** au laboratoire dans des conditions adaptées (délai, température, ...). Il peut s'agir d'un prélèvement sanguin, d'un écouvillonnage cutanéo-muqueux, de la ponction d'un liquide organique, d'une biopsie, ...

9.1.2. L'examen direct

L'examen direct consiste à examiner l'échantillon biologique à l'œil nu (ED macroscopique) ou au microscope (ED microscopique) à la recherche d'éléments en faveur d'une infection ou de l'implication d'une bactérie particulière.

- **examen macroscopique** : l'aspect trouble d'un liquide organique signe bien souvent la présence d'un nombre élevé de cellules phagocytaires en particulier, (comme les polynucléaires) et donc d'une infection. Les urines normalement claires sont troubles en cas d'infections urinaires. Le liquide céphalo-rachidien (LCR) normalement limpide (eau de roche) est trouble en cas de méningite bactérienne. La couleur ou l'odeur d'un pus peut également orienter vers l'implication de certaines bactéries.
- **examen microscopique** : il comprend deux étapes.
 - (1) La première est l'ED à l'**état frais**. Il consiste à déposer entre une lame de verre et une lamelle une goutte de l'échantillon (ou une suspension réalisée à partir de celui-ci) et à l'observer au microscope en contraste de phase (type de lumière favorisant la visualisation des contours) au grossissement x 400 (sans immersion). Pour des raisons d'hygiène (cellules vivantes), la lamelle est fixée à la lame de manière étanche par de la paraffine (lutage à la paraffine). Cette technique permet la visualisation des cellules (**polynucléaires**), de parasites, levures. Les bactéries sont également visibles. Un des principaux intérêts de la méthode est de mettre en évidence la **mobilité des bactéries et des protistes**. Par une coloration à l'encre de chine, on peut visualiser la présence d'une **capsule** bactérienne. La microscopie à **fond noir** permet de visualiser certaines bactéries spirillaires.
 - (2) **l'examen direct après coloration** apporte des informations complémentaires. A partir de l'échantillon, on réalise un dépôt sur lame de verre ou un frottis que l'on fixe à la chaleur ou par un autre procédé (tue les cellules et les colle au verre). La lame peut alors être colorée. De multiples colorations sont possibles mais les plus fréquentes sont le bleu de méthylène, la coloration de Gram et de Zielh-Neelsen (pour les bacilles ayant une paroi acido-alcoolo résistante comme *Mycobacterium*). La lecture se fait au microscope optique en immersion (dépôt d'huile entre la lame et l'objectif) à un grossissement de x1000.

Ces colorations permettent de visualiser la morphologie des cellules et des bactéries mais avec une plus grande définition. La coloration de Gram permet d'apporter des éléments complémentaires sur la nature de la paroi bactérienne.

	Paroi Gram positif	Paroi Gram négatif
Coque	<i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> (pneumocoque)	<i>Neisseria</i> (gonocoque, méningocoque)
Bacille	<i>Listeria</i>	<i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>

Tableau 6 : exemples de bactéries selon leurs morphologies et leurs types de paroi.

- Des techniques de recherche d'antigènes spécifiques par agglutination ou par immunofluorescence (anticorps marqués par une substance fluorescente) peuvent être réalisées à ce stade sur l'échantillon biologique. L'immunofluorescence permet de visualiser des micro-organismes en microscopie à fluorescence.

9.1.3. Isolement par culture

Il consiste, à partir d'un échantillon biologique pluri-microbien, à obtenir des colonies isolées pouvant être identifiées par la suite (une colonie est la descendance d'une cellule). En fonction de l'échantillon biologique et des agents recherchées, un ou plusieurs milieux de cultures seront sélectionnés. Des milieux riches non sélectifs seront utilisés pour les échantillons normalement stériles (LCR), alors que des milieux sélectifs seront utilisés pour les échantillons normalement porteurs d'une flore bactérienne pouvant masquer une bactérie pathogène.

La technique d'isolement est le plus souvent l'ensemencement par épuisement (Fig. 42). En pratique, une anse de platine est chauffée au rouge dans la flamme d'un bécu busen pour être stérilisée. Une fois froide, l'anse sert à prélever quelques microlitres de l'échantillon qui seront inoculés sur la totalité de la gélose par des stries non chevauchantes. Le dépôt des bactéries (et des micromycètes) sur la gélose se fait ainsi progressivement et permet d'obtenir des bactéries (et des micromycètes) isolées en fin d'étalement. Les boîtes ainsi ensemencées sont incubées dans des conditions environnementales adaptées (température, CO₂, ...) et une durée définies (souvent 18-24 h). Après ce délai, on obtient (si tout va bien) des colonies de bactéries ou de micromycètes isolées (UFC) au niveau des dernières stries inoculées.

Le technicien ou le biologiste sélectionne, d'après l'aspect des colonies (taille, forme, couleur, ...), le nombre des colonies, les milieux et les conditions de cultures, la ou les colonies devant faire l'objet d'une identification.

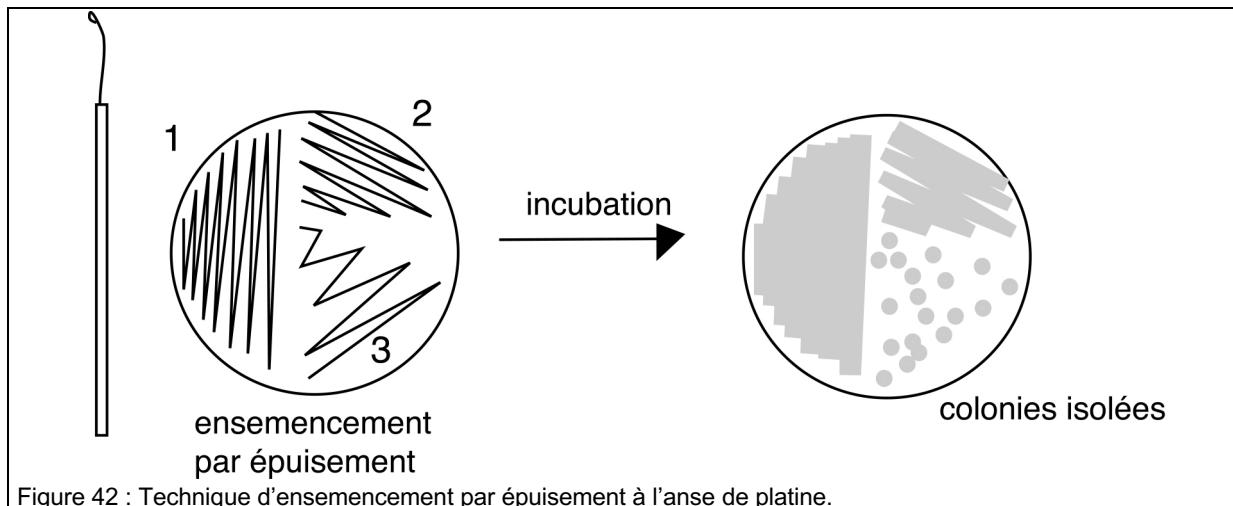


Figure 42 : Technique d'ensemagement par épuisement à l'anse de platine.

9.1.4. Identification des bactéries et des micromycètes

À partir des colonies pures sélectionnées, différents tests vont permettre d'identifier les bactéries.

- Un examen direct à l'état frais permet de connaître la morphologie de la bactérie (ou du micromycète) et sa mobilité.
- Un examen direct après coloration permet de connaître la morphologie de la bactérie et son type de paroi (coloration de Gram).
- Des tests rapides permettent de mettre en évidence certaines capacités métaboliques des bactéries (présence d'une catalase, d'une oxydase, ...) ou des propriétés antigéniques (agglutination)
- Une identification biochimique sur galerie (regroupant plusieurs milieux indicateurs) permettant de mettre en évidence le profil métabolique de la bactérie (utilisation de différents substrats). Un profil métabolique obtenu correspond en général à une espèce bactérienne.
- Des tests de biologie moléculaire (hybridation ou amplification) peuvent être utilisés pour certaines bactéries (*Mycobacterium*).

9.1.5. L'antibiogramme

Pour les infections bactériennes graves, l'antibiogramme (antifongigramme pour les Fungi) doit être systématiquement réalisé (Fig. 43). Il consiste à déterminer la sensibilité d'une bactérie, isolée et identifiée au préalable, vis-à-vis des **antibiotiques** pouvant être utilisés contre l'infection dont elle est à l'origine. Le choix des antibiotiques à tester dépend de l'espèce bactérienne en cause.

Un milieu riche est ensemencé, à partir d'une suspension bactérienne pure, de manière à obtenir une **culture confluente**. Des disques en papier, contenant une concentration connue des différents antibiotiques, sont déposés sur la gélose après inoculation. Les antibiotiques vont diffuser dans la gélose en formant un gradient de concentration décroissant autour du disque. Le milieu, ainsi préparé, est incubé dans des conditions adaptées.

En 18-24h, les colonies sont confluentes et on note autour des disques une zone circulaire où les bactéries ne se sont pas multipliées. Le **diamètre d'inhibition**, correspondant au diamètre de ces zones, est mesuré et comparé à des diamètres de références d et D . Si le diamètre d'inhibition est inférieur au diamètre d , la bactérie est **résistante** à l'antibiotique concerné et ce dernier ne doit pas être utilisé. Si le diamètre est supérieur au diamètre D , la bactérie est **sensible** et l'antibiotique concerné peut-être utilisé. Lorsque le diamètre d'inhibition est compris entre d et D ,

la bactérie est dite **intermédiaire** et l'efficacité clinique de l'antibiotique n'est pas certaine.

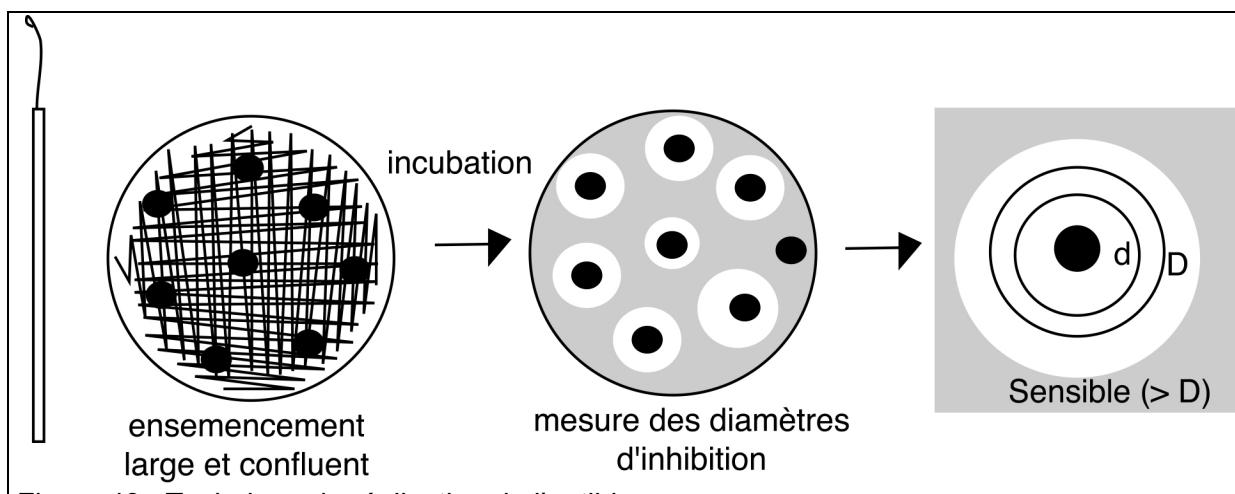


Figure 43 : Technique de réalisation de l'antibiogramme.

L'antifongigramme est basé sur le même principe que l'antibiogramme.

9.2. Diagnostic direct des infections virales

Comme pour les infections bactériennes, le biologiste à besoin d'un échantillon biologique correct, d'une prescription et de suffisamment d'informations cliniques (et biologiques) pour travailler efficacement (voir 2.3).

9.2.1. Les prélèvements

Ils sont réalisés au site de l'infection mais également souvent aux portes d'entrée et de sortie du virus (par exemple pour une recherche de poliovirus : LCR, gorge et selles). Les virus enveloppés sont très fragiles et doivent être, si possible, prélevés au laboratoire.

9.2.2. La recherche de virus

Elle consiste à mettre en évidence du virion par sa structure (**microscopie électronique**), ses antigènes (**immunofluorescence** ou **immunoenzymologie**), une propriété virale (**hémagglutination**) ou son génome (**biologie moléculaire**). Actuellement la microscopie électronique est abandonnée en diagnostic de routine. Le diagnostic direct peut être réalisé directement sur l'échantillon prélevé si les virions sont suffisamment concentrés ou après multiplication du virus en culture au laboratoire.

- **La culture virale** consiste à déposer une partie de l'échantillon biologique sur des cellules pour obtenir un enrichissement en virus par multiplication de ce dernier. Les cellules utilisées sont permissives pour les virus recherchés et proviennent directement d'organes animaux ou humains (**cellules de primo-explantation**), d'embryon (**cellules diploïdes**) ou de tumeurs cancéreuses (**lignées continues**). Les sourceaux nouveaux-nés et les œufs embryonnés ont été beaucoup utilisés autrefois. La culture de virus nécessite des milieux et des manipulations stériles car sinon la prolifération bactérienne détruit les cellules. En pratique, l'échantillon est traité par antibiotiques, pour inhiber la multiplication bactérienne, broyé et filtré si

nécessaire (biopsie) puis inoculé à un panel de cellules permissives. Les cellules inoculées sont incubées (37°C en présence de 5% de CO_2) pendant 1 à 15 jours selon les virus. La mise en évidence de la réplication virale se fera par visualisation, au microscope optique, de la déformation de la nappe cellulaire par la réplication virale (effet **cytopathique** ou **ECP**) en microscopie optique en contraste de phase. Des colorations cellulaires sont également possibles, mais elles obligent à fixer les cellules et donc, contrairement au contraste de phase, à arrêter la culture. L'ECP pourra être confirmé par des recherches d'antigènes viraux, de la biologie moléculaire ou historiquement des techniques d'agglutination. Attention, seuls certains virus sont capables de se multiplier dans des systèmes de cultures cellulaires. La technique des plages de lyse permet la quantification de virions infectieux responsables d'infections cytolytiques. Lors d'infections expérimentales ont défini un inoculum (quantité de l'agent infectieux inoculé) et en culture cellulaire la MOI (multiplicity of infections) qui correspond au nombre de virus par cellules permissives (moi à 10, 10 virus par cellule).

- Les **techniques de biologie moléculaire** sont de plus en plus utilisées en microbiologie et automatisées. Elles permettent de détecter (présence ou non de génomes), de quantifier (x copies de génome) et de caractériser (séquences nucléotidiques) de manière rapide et fiable les génomes viraux. Les détections et quantifications font appel aux techniques d'hybridation (ADN branché, Fig. 44) ou d'amplification (Fig. 45).

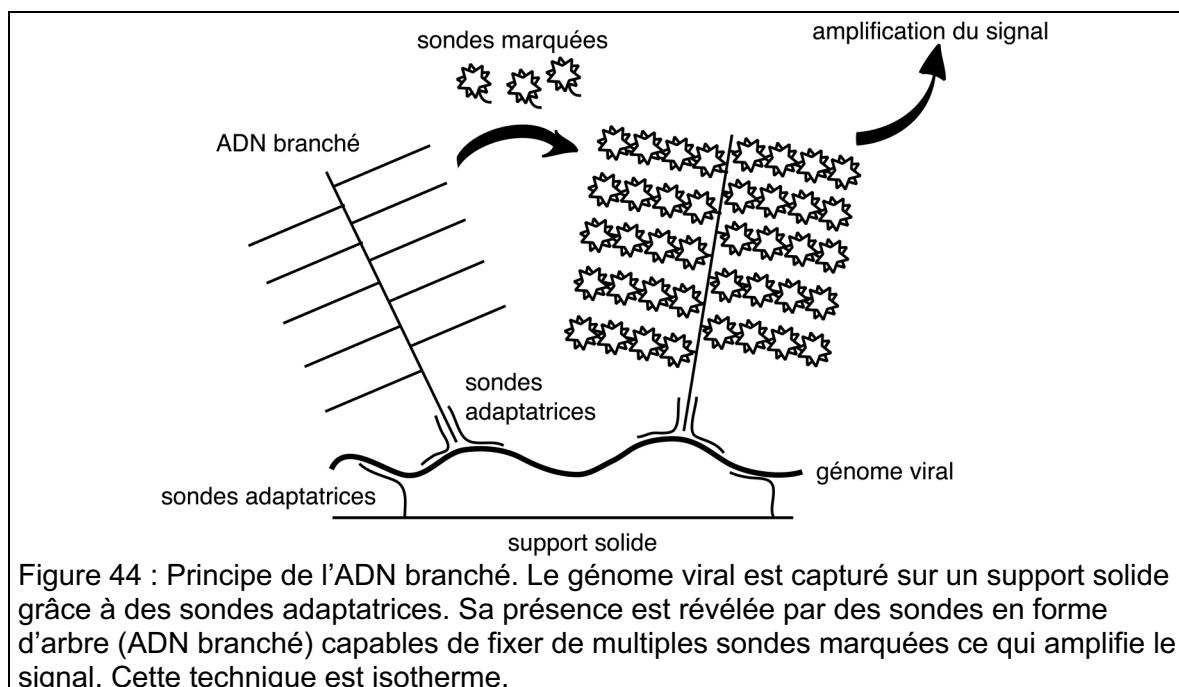


Figure 44 : Principe de l'ADN branché. Le génome viral est capturé sur un support solide grâce à des sondes adaptatrices. Sa présence est révélée par des sondes en forme d'arbre (ADN branché) capables de fixer de multiples sondes marquées ce qui amplifie le signal. Cette technique est isotherme.

Les amplifications sont basées sur le principe de réplication des acides nucléiques (PCR) ou de transcription (TMA et NASBA).

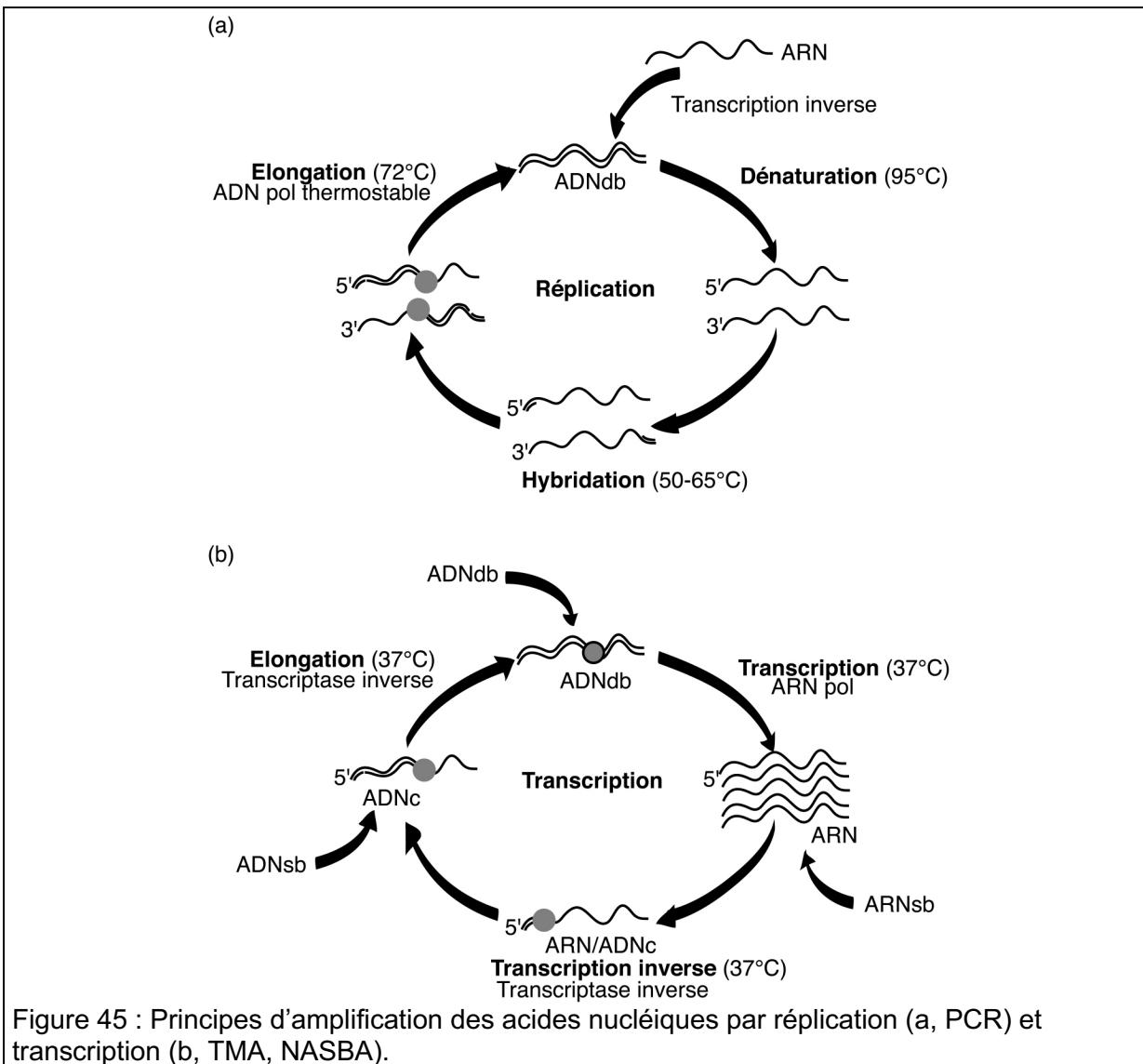


Figure 45 : Principes d'amplification des acides nucléiques par réPLICATION (a, PCR) et transcription (b, TMA, NASBA).

Elles permettent grâce à des gammes externes ou des étalons internes une quantification des génomes pendant (temps réel) ou après l'amplification. La révélation de la présence des produits d'amplifications (amplicons) se fait soit après migration sur gel d'agarose, coloration par des agents intercalants fluorescents et exposition aux ultraviolets, soit par des systèmes d'hybridation et de révélation colorimétrique ou en fluorescence (sondes marquées). Ces techniques exposent à des faux négatifs (réactions négatives à tort) liés à des problèmes d'extraction des acides nucléiques ou d'inhibiteurs de l'amplification (héparine, hémoglobine par exemple) et à des faux positifs (réactions positives à tort) liés à des contaminations par des produits de PCR de réactions précédentes. Dans tous les cas, la spécificité de ces réactions impose une orientation diagnostique précise lors de la prescription. La caractérisation des génomes viraux fait appel à l'hybridation et au séquençage des acides nucléiques (génotypes viraux associés à la résistance aux antiviraux).

9.3. Diagnostic indirect des maladies infectieuses

Il consiste à rechercher dans le sérum les anticorps spécifiques d'un agent infectieux (virus, bactérie, micromycète, parasite) produit au cours d'une infection virale ou après une vaccination (Fig. 46). Les techniques les plus utilisées sont les réactions **immuno-enzymatiques** (ELISA).

- Elles permettent de détecter les **IgM** présentes lors des **primo-infections** (premier contact avec un virus), plus rarement lors de réinfections, les **IgG** qui signent un contact viral qui peut être ancien.
- L'apparition d'anticorps vis-à-vis d'un agent infectieux s'appelle une **séroconversion**. Elle nécessite par définition deux échantillons (premier négatif puis second positif) et correspond à la survenue d'une primo-infection entre les deux prélèvements.
- Un diagnostic d'infection virale en cours doit être fait par une recherche d'IgM spécifiques ou mieux par une recherche directe du virus. Ceci est vrai également pour d'autres agents infectieux.
- Un diagnostic rétrospectif (souvent peu intéressant en pratique car le patient est guéri) peut être fait par la recherche d'IgG spécifiques et permet par exemple de connaître le **statut vaccinal** d'un sujet.

Les **tests de dépistage** détectent à la fois les IgG et IgM et leur spécificité (éliminer des faux positifs) doit être confirmée par des **tests de confirmation** (**western blot** ou **immunoblot**).

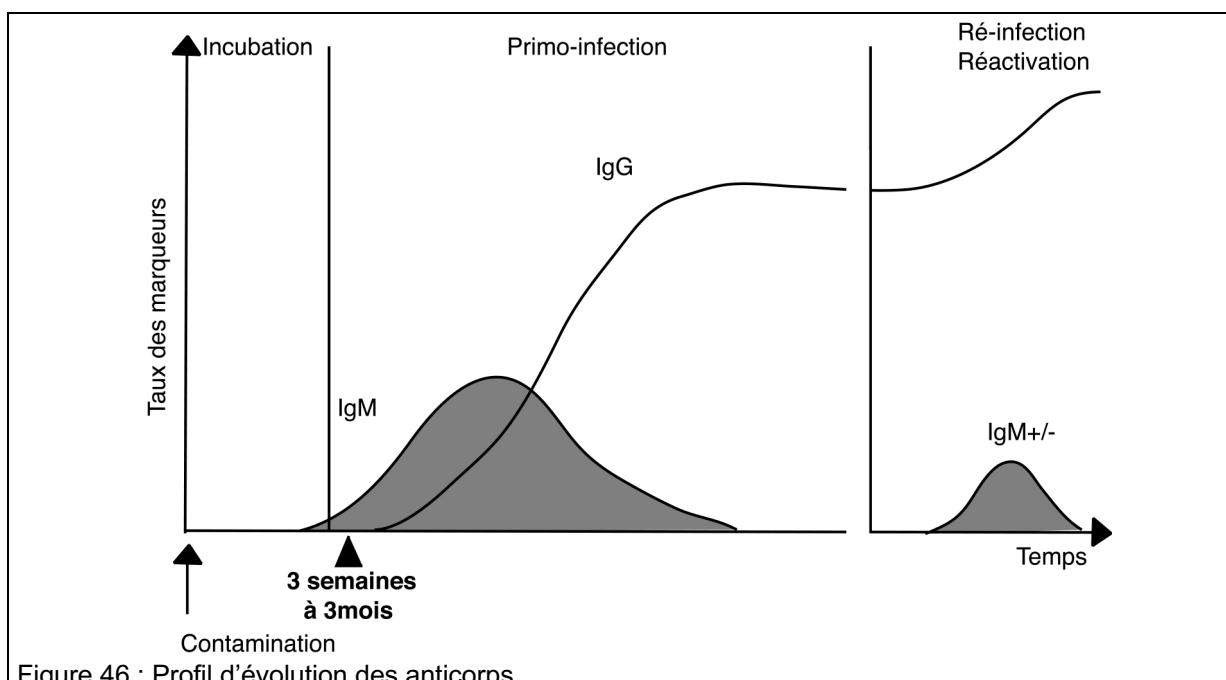


Figure 46 : Profil d'évolution des anticorps.

Les sérologies virales sont très utilisées souvent en première intention, alors que les sérologies bactériennes, fongiques ou parasitaires sont parfois d'interprétation plus difficile du fait de la complexité plus grande des antigènes.

10. Bibliographie

Livres de base

- AEMIP. 2003. **Microbiologie générale et santé**, Editions ESKA
- Nicklin J, Graeme-Cook K, Paget T et Killington R. 2000. **L'essentiel en microbiologie**, Editions Berti
- Pasquier C, Bertagnoli S, Dunia D et Izopet J. 2013. **Virologie humaine et zoonoses**, Editions Dunod

Gros livres illustrés

- Perry JJ, Staley JT et Lory S. 2004. **Microbiologie**, Editions Dunod
- Tortura GJ, Funke BR et Case. 2003. **Introduction à la microbiologie**, Editions Erpi
- Sherwood L, Willey J, Woolverton C et Harley JP. 2010. **Microbiologie**, Editions De Boeck
- Madigan M, Martinko J et Prieur D. 2007. **Biologie des micro-organismes Brock**, Editions Pearson.