

UNIVERSITE DE KINSHASA



Faculté des Sciences Pharmaceutiques

COURS DE MICROBIOLOGIE GENERALE

A l'usage des Etudiants de 11^e Graduat

PAR

PROFESSEUR DR. TAKAISI KIKUNI

Edition 2014

MICROBIOLOGIE GENERALE

AVANT-PROPOS

Ce **Cours de Microbiologie Générale** tient de manuel destiné aux étudiants en Pharmacie et en Médecine, et constitue aussi, pour le Pharmacien et le Médecin, un moyen de mise à jour de leurs connaissances en microbiologie fondamentale. Il présente les notions fondamentales de la microbiologie : la structure, la physiologie, la biochimie, la génétique et la classification des micro-organismes et des virus ainsi que les fondements biologiques de la chimiothérapie antimicrobienne et antivirale.

A la fin de ce cours, l'étudiant doit savoir et comprendre l'importance de la microbiologie dans l'amélioration de la vie des êtres vivants, les mécanismes physiologiques, biochimiques et génétiques fondamentaux de la vie des micro-organismes et des virus, l'importance de la pathogénicité des germes dans les processus infectieux, les moyens de désinfection et de stérilisation et les mécanismes d'action des antibiotiques utilisés pour prévenir et traiter les maladies infectieuses, ainsi que les mécanismes de résistance des microorganismes aux produits antimicrobiens.

La microbiologie moderne, marquée par le développement de la génétique, de la biologie cellulaire et moléculaire et du génie génétique, se révèle un domaine riche et prometteur à la fois au plan fondamental et dans ses applications importantes en Pharmacie, en Médecine et en Agronomie (ex., les biotechnologies, les bio-industries,...).

Dr.rer.nat. TAKAISI KIKUNI

Professeur Ordinaire

Mars 1998

Juillet 2014

CHAPITRE I : INTRODUCTION : MICROBIOLOGIE

1. EVOLUTION DE LA MICROBIOLOGIE

1.1. Les origines de la microbiologie

Les premières observations microscopiques

La propagation des certaines maladies parmi les populations suggérait depuis longtemps l'existence des agents infectieux invisibles et transmissibles.

One of the most important discoveries in the history of biology occurred in 1665 with the help of a relatively crude microscope. After observing a thin slice of cork, an Englishman, **Robert Hooke**, reported to the world that **life's smallest structural units were "little boxes," or "cells," as he called them.** Using his improved version of a compound microscope (one that uses two sets of lenses), Hooke was able to see individual cells. Hooke's discovery marked the beginning of the cell theory the theory that ***all living things are composed of cells.***

Though Hooke's microscope was capable of showing large cells, he lacked the resolution that would have allowed him to see microbes clearly. The Dutch merchant and amateur scientist Anton van Leeuwenhoek was probably the first actually to observe live microorganisms through the magnifying lenses of more than 300 microscopes he constructed. Between 1673 and 1723, he wrote a series of letters to the Royal Society of London describing the **"animalcules"** he saw through his simple, single-lens microscope. Van Leeuwenhoek made detailed drawings of "animalcules" in rainwater, in his own feces, and in material scraped from his teeth. These drawings have since been identified as representations of bacteria and protozoa. Because of Leeuwenhoek's extraordinary contributions to microbiology, he is sometimes considered the father of bacteriology and protozoology.

L'existence des organismes microscopiques vivants (microbes), généralement non acceptée, fût démontrée par le marchand **Hollandais Antonie (Antony / Anton) Philips van LEEUWENHOEK** (24 octobre 1632 – 30 août 1723 à Delft) qui conçut le microscope le plus simple et rudimentaire, la loupe, avec un grossissement de 300 fois. Observateur génial, il révéla au monde scientifique en 1677 la prodigieuse diversité des micro-organismes invisibles à l'oeil nu, qu'il appelait « **animalcules** », et qui incluait les bactéries, les protozoaires, les levures, les algues. Dans des échantillons d'eau de rivière, ou des décoctions de foin ou de la salive, il décrivit le grouillement d'une infinie variété d'**animalcules** mobiles ou immobiles, en forme de sphères, de bâtonnets, de spirilles. Il put faire des comparaisons précises entre des micro-organismes et des hématies ou des grains de sable.

L'utilisation du microscope optique composé en microbiologie n'a été large qu'après l'élimination de ses aberrations optiques au 19^e siècle. LINNAEUS en 1767 ne distingua que 6 espèces de microbes, mais 600 types figuraient en 1838 dans l'Atlas d'EHRENBERG.

Le passage de la microbiologie d'une science descriptive à une science expérimentale se fit lentement avec le développement d'une méthodologie spéciale.

La clé fût l'utilisation des matériels stériles et des techniques aseptiques. Car en microbiologie, une seule cellule contaminante peut ruiner une expérience. Ce n'est qu'après avoir appris à éviter une telle contamination que les chercheurs découvrirent et caractérisèrent une grande variété de microbes.

1.1.2. La génération spontanée

Il était bien évident jusqu'au 19^e siècle que les organismes vivants pouvaient apparaître **spontanément** dans la matière inerte ou en décomposition. Déjà au 17^e siècle, REDI démontra que l'apparition des asticots (vers) dans la viande en décomposition était due aux œufs des mouches. Malgré cela, l'idée de la génération spontanée persista.

Au 18^e siècle, SPALLANZANI (1729-1799) introduisit l'utilisation des milieux de culture stériles : il montra qu'un « liquide putrescible », comme une infusion de viande, pouvait rester indéfiniment clair s'il était bouilli et proprement fermé. En outre, SCHWANN, en 1837, obtint des résultats similaires même si l'air rentrait dans le récipient avant la fermeture, pourvu que l'air passe à travers un tube chauffé. Pour éviter les contaminants de l'air, SCHROEDER et VON DUSCH introduisirent l'usage du bouchon d'ouate (coton).

Néanmoins, la controverse continua, car quelques chercheurs furent incapables de reproduire la stabilité des infusions ainsi stérilisées. C'est alors que **LOUIS PASTEUR (1822-1895)** entra en lice. L'essor de la microbiologie au cours du 19^e siècle a été déclenché puis dominé par le génie de Pasteur. Il réfuta les thèses en cours sur la génération spontanée en montrant la présence de germes dans l'atmosphère, leur destruction par la chaleur (stérilisation) et leur rétention dans ses fameux **ballons à col de cygne**. Les organismes et les micro-organismes ne peuvent donc pas apparaître spontanément, comme on le croyait à l'époque, mais ils existent autour de nous dans l'air, l'eau, la terre et leur activité peut se révéler utile (ex. : les fermentations) ou nuisible (ex. : les maladies).

Pasteur entreprit des études sur les fermentations lactique, alcoolique, butyrique, acétique, et sur les maladies qui les affectent et qui sont dues à des contaminants que l'on peut détruire par chauffage doux à 56°C (pasteurisation du vin, de la bière, du lait, des produits laitiers,...). Pasteur montra que « différentes espèces de microbes sont associées aux différents types de fermentation », et il suggéra « que des microbes spécifiques seraient aussi les causes des maladies spécifiques chez l'homme ».

Heinrich Hennann Robert KOCH (1843-1910) et Louis Pasteur sont les véritables fondateurs de la bactériologie médicale où la théorie des germes trouve une nouvelle forme en même temps qu'une nouvelle vigueur. C'est à Koch et ses collaborateurs que l'on doit aussi d'avoir mis au point et porté d'emblée à un état de perfection incomparable (toutes) les techniques d'isolement et d'identification des bactéries. **Heinrich Hennann Robert Koch: He was a German physician. He became famous for isolating *Bacillus anthracis* (1877), the Tuberculosis bacillus (1882) and the *Vibrio cholerae* (1883) and for his development of Koch's postulates. He was**

awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine for his tuberculosis findings in 1905. He is considered one of the founders of microbiology. He inspired such major figures as Paul Ehrlich and Gerhard Domagk.

For thousands of years, people believed that certain living things arose from **vital forces** present in nonliving or decomposing matter. This ancient idea, known as **spontaneous generation**, was continually reinforced as people observed that meat left out in the open soon "produced" maggots, that mushrooms appeared on rotting wood, that rats and mice emerged from piles of litter, and that other magical phenomena occurred. Not much more than 100 years ago, people commonly believed that toads, snakes, and mice could be born of moist soil; that flies could emerge from manure; and that maggots, the larvae of flies, could arise from decaying corpses.

Though some of these early ideas seem quaint and ridiculous in light of modern knowledge, we must remember that, at the time, mysteries in life were accepted and the scientific method was not widely practiced.

Over the subsequent 200 years, scientists waged an experimental battle over the two hypotheses that could explain the origin of simple life forms. Some tenaciously clung to the idea of **abiogenesis**, which embraced spontaneous generation. On the other side were advocates of **biogenesis**, saying that living things arise only from others of their same kind.

The issue was still unresolved in 1858, when the German scientist **Rudolf Virchow** challenged the case for spontaneous generation with the concept of **biogenesis**, the claim that living cells can arise only from preexisting living cells. Arguments about spontaneous generation continued until 1861, when the issue was resolved by the French scientist **Louis Pasteur**. Pasteur's work provided evidence that microorganisms cannot originate from **mystical forces** present in nonliving materials. Rather, any appearance of "spontaneous" life in non-living solutions can be attributed to microorganisms that were already present in the air or in the fluids themselves.

Scientists now believe that a form of spontaneous generation probably did occur on the primitive Earth when life first began, but they agree that this does not happen under today's environmental conditions.

1.2. La période moderne

La période actuelle est marquée par l'essor de **la génétique, de la biologie moléculaire, du génie génétique et des biotechnologies**.

Les micro-organismes sont faciles à cultiver, se reproduisent et donnent rapidement naissance à des populations énormes à travers un grand nombre de générations successives. Ils constituent ainsi un outil adéquat en **génétique**, la science qui étudie les caractères héréditaires et leurs variations. L'étape essentielle fût franchie avec la découverte du DNA (ADN) et de son rôle dans l'hérédité par **AVERY, Mac LEOD et Mc CARTY en 1944**.

La biologie moléculaire est née de la convergence de la génétique et de la biochimie. Elle s'intéresse à la structure des macromolécules (acides nucléiques et protéines) et à leurs relations fécondes, la synthèse des protéines étant gouvernée par des gènes.

Le génie génétique consiste à mettre en œuvre, in vitro, des recombinaisons génétiques (obtenir des recombinants d'intérêt approprié), véritables greffes entre deux molécules de DNA. Par le processus de clonage, le génie génétique permet de fabriquer un **DNA hybride** ayant un programme déterminé. La cellule bactérienne qui reçoit ainsi une information nouvelle (d'une autre bactérie, d'une cellule animale ou végétale) devient capable de produire la substance dont on lui a confié le programme.

Les biotechnologies se réfèrent aux applications variées des résultats du génie génétique dans la production des biomasses ou des biocombustibles, dans les fermentations industrielles, dans la lutte biologique, dans la production animale, végétale, pharmaceutique, etc...

2. MICROBIOLOGIE

2.1. Définitions

La microbiologie est le domaine de la science qui étudie les micro-organismes ou microbes (Mikros du grec = petit; bios du grec = vie et logos du grec = étude).

Les microorganismes constituent des êtres vivants infiniment petits et généralement unicellulaires et dont certains peuvent former des groupes multicellulaires; ils sont dénués de différenciation cellulaire (les cellules végétatives sont toutes équivalentes) et ne peuvent habituellement être observés qu'à l'aide d'un microscope.

Ils comprennent :

- **les bactéries,**
- **les cyanobactéries,**
- **les archaea ou archéobactéries,**
- **les champignons,**
- **les algues inférieures et**
- **les protozoaires (animaux unicellulaires).**

La microbiologie est, à côté de la botanique et de la zoologie, une branche récente de la biologie; elle a été fondée au 17^e siècle grâce à la découverte du microscope (voir ci-dessus). Elle se subdivise en deux grands domaines:

- La microbiologie générale ou fondamentale et
- La microbiologie appliquée ou spéciale qui comprend la microbiologie médicale, pharmaceutique, alimentaire, la microbiologie du sol, etc.

2.1.1. Microbiologie générale ou fondamentale

Elle est la branche de la microbiologie qui s'occupe généralement des problèmes fondamentaux de la morphologie, de la structure, de la physiologie et du métabolisme, de la systématique et taxonomie, de la phylogénie et de l'écologie des micro-organismes.

2.1.2. Microbiologie industrielle (technique) ou économique

Elle comprend la recherche et l'utilisation des micro-organismes dans de grands procédés techniques (ou industriels) dans les industries chimico-microbiologiques, pharmaceutiques et alimentaires [ex. : les fermentations industrielles pour la production des boissons alcooliques (bière, vin, spiritueux) ou des acides organiques (acide acétique, acide citrique,...); la production des enzymes et des antibiotiques; la préparation des produits laitiers (beurre, yoghurt, fromage, choucroute,...)].

2.1.3. Microbiologie médicale

Elle étudie les micro-organismes pathogènes pour l'homme et l'animal (microbiologie vétérinaire), les maladies infectieuses causées par ces microbes ainsi que la lutte contre ces maladies.

2.1.4. Microbiologie pharmaceutique

Elle étudie les microorganismes qui sont utilisés ou qui peuvent être utilisés dans le domaine pharmaceutique : la production des médicaments comme les antibiotiques ou les pharmaceutins, l'analyse microbiologique des médicaments, les essais et le contrôle de l'activité antimicrobienne des substances naturelles d'origine végétale ou le contrôle de qualité de l'eau et des produits alimentaires.

2.1.5. Microbiologie alimentaire

Elle étudie les multiples relations entre les micro-organismes et les denrées alimentaires, notamment la production des aliments et les infections et intoxications alimentaires d'origine microbienne.

2.1.6. Microbiologie du sol

Elle étudie les micro-organismes vivant dans le sol, leurs activités et leurs rôles dans cycles géochimiques dans la nature [ex. : la minéralisation du carbone, de l'azote et du soufre organiques (conversion en CO_2 , NH_3 ou NO_3^- , SO_4^{2-} ou S^{2-}) pour qu'ils

soient utilisés dans le cycle de croissance des animaux et des plantes supérieurs; les bactéries nitrifiantes qui augmentent la fertilité du sol en transformant l'ammoniac volatil en nitrate non volatil, etc.].

2.1.7. Microbiologie des eaux

Elle s'occupe de l'analyse et du traitement microbiologiques des eaux potables, naturelles et résiduaires ou usées (de lavage).

2.1.8. Géomicrobiologie

Elle étudie l'action des micro-organismes sur la formation, la modification et l'altération (destruction) des roches et des minéraux.

2.2. Infection et Contamination

2.2.1. Contamination

La contamination est la souillure (ou la pollution) des êtres vivants, des aliments, des objets et de l'environnement (ex. : salles, nature, espaces) par les micro-organismes.

2.2.2. Infection

L'infection est l'entrée et la multiplication d'un agent pathogène dans un organisme (homme, animal, plante). Elle est la condition pour une maladie infectieuse.

La contagion ou le contage est le transfert (ou le passage) d'un agent potentiellement pathogène d'un hôte malade ou sain à un autre. Elle est la condition pour une infection.

Les micro-organismes potentiellement pathogènes peuvent être portés par certaines personnes qui les transmettent à d'autres personnes chez qui ils causent infection et maladie : on parle alors des personnes porteuses (ou carriers).

On distingue :

- **Les porteurs malades** : ce sont des personnes malades (donc infectées) qui sont porteuses des germes et qui constituent ainsi une source d'infections (ex. : tuberculose, maladies infantiles, dermatologiques ou sexuelles) par contact direct ou indirect (poussière, gouttelettes, salive, sexe,...);
- **Les porteurs sains** qui représentent une source de germes des maladies infectieuses dans une période limitée (ou déterminée) et comprennent :

- Les porteurs temporaires qui excrètent (dans les urines, les selles) des germes pathogènes pendant quelques semaines ou mois après une maladie infectieuse donnée (ex. : la scarlatine);
- Les porteurs chroniques (ou permanents) qui excrètent des germes pathogènes durant quelques années après une maladie infectieuse (ex. : la sécrétion de *Salmonella* Typhi après une fièvre typhoïde ou de *Corynebacterium diphtheriae* après une diphtérie chez les enfants).

2.3. Pathogénicité et virulence

Des termes spécifiques sont employés pour décrire certaines propriétés (attributs) des micro-organismes infectieux, c'est-à-dire pouvant provoquer des maladies.

La pathogénicité est la capacité d'un micro-organisme de pouvoir provoquer une maladie infectieuse chez l'homme, l'animal ou la plante. C'est la capacité d'infecter d'un microbe. Le terme pathogène signifie tout simplement que le micro-organisme est infectieux, c'est-à-dire qu'il peut, dans certaines circonstances, causer une infection et par conséquent une maladie infectieuse. Il est ainsi souvent rapporté comme étant virulent (toxique).

La plupart de microbiologistes maintiennent cependant que, bien qu'un microbe pathogène soit un agent provoquant une maladie infectieuse, le terme **virulence** devrait se référer au degré de pathogénicité qui s'exprime entre autres par la capacité d'invasion et de production de toxine d'un micro-organisme. Mais, des cliniciens préfèrent, pour éviter la confusion, utiliser les termes pathogène et virulent comme des synonymes.

3. ENVIRONNEMENT MICROBIEN

3.1. Réservoirs de germes

3.1.1. L'homme

Les êtres humains (ainsi que les animaux et les plantes) vivent dans un environnement microbien. Un être humain est habité (parasité) par un nombre incroyable de divers types de microbes incluant la **flore microbienne normale endogène ou commensale** [(« indigenous microbiota »)]. Tous ces micro-organismes sont des symbiotes ou des parasites vivant aux dépens de l'hôte sur la peau, les membranes muqueuses, dans les intestins et autres cavités ou dans les cellules des tissus. Ils constituent ainsi des agents potentiels des maladies, car tout dépend de l'état des défenses de l'hôte.

L'homme infecté (porteur malade ou porteur sain) peut aussi transmettre des germes pathogènes (ex. : les agents responsables de la malaria, de la typhoïde, de la tuberculose, du choléra, de la poliomyélite, de la syphilis, etc.).

3.1.2. La nature / L'environnement

Les être humains sont aussi en contact avec une large population microbienne exogène de l'univers qui comprend les micro-organismes se trouvant dans l'air (ex. : *Aspergillus*, *Staphylococcus*), dans le sol (ex. : *Clostridium tetani*), dans l'eau (ex. : entérobactéries) et dans les denrées alimentaires (ex. : *Clostridium botulinum*). La plupart de ces micro-organismes sont des saprophytes et ne causent pas de maladies. Cependant, beaucoup de saprophytes peuvent causer une infection si les mécanismes de défense de l'hôte deviennent suffisamment défectueux; ils sont ainsi des pathogènes opportunistes.

3.1.3. Les animaux inférieurs

Une autre large population microbienne se trouve chez les animaux inférieurs. Beaucoup de ces micro-organismes causent des maladies non seulement chez ces animaux mais aussi chez l'homme qui entre en contact avec ces derniers dans des circonstances appropriées. En outre, ces microbes peuvent aussi être transmis de l'animal à l'homme par le biais d'un vecteur comme un arthropode. Les maladies des animaux qui sont transmissibles aux hommes sont appelées zoonoses (ou anthroponozoonoses).

Des trois sources générales de l'infection mentionnées ci-dessus, la plus importantes est de loin l'homme lui-même. Si la résistance de l'hôte s'affaiblit, des membres de la flore microbienne commensale peuvent saisir cette opportunité pour l'envahir et s'y multiplier : on parle dans ce cas de micro-organismes pathogènes opportunistes.

3.2. Modes de transmission des micro-organismes (pathogènes)

3.2.1. Sources humaines

Les micro-organismes peuvent être transmis d'homme à homme par plusieurs voies :

- Les poussières et les gouttelettes sèches de l'air : des germes provenant de la flore microbienne commensale ou d'un porteur (par la toux et l'éternuement) et se trouvant sur des particules de poussière ou sur des gouttelettes de salive desséchées (« droplet-nuclei ») dans l'atmosphère peuvent être inhalés (ex. : germes de la tuberculose, de la psittacose des perroquets : *Chlamydia psittaci*);
- Les contacts intimes : le baiser, les relations sexuelles, serrer la main augmentent le taux de transfert des micro-organismes (ex. : la blennorragie, la syphilis, le SIDA, la grippe, le rhume, etc.);
- La transfusion sanguine : ex. : l'hépatite, le SIDA, etc.;
- Les mains : se laver les mains (à la maison ou à l'hôpital) représente la meilleure mesure de prévention (ex. : cas d'infections oro-fécales ou hospitalières en chirurgie, en pédiatrie ou en gynécologie);

- Les contacts indirects : les objets, les aliments ou l'eau contaminés par un porteur malade ou sain (ex. : un livreur ou un cuisinier porteurs de *Shigella* ou de *Salmonella*, la contamination fécale de l'eau par les entérobactéries ou les entérocoques etc.).

3.2.2. Sources non humaines

L'infection des êtres humains peut aussi provenir des sources non humaines telles que :

- la souillure des blessures (ou des plaies) par le sol contaminé par la nature ou par des sécrétions humaines ou animales (excréments, urines) [ex. : cas de tétanos par le *Clostridium tetani* ou de tularémie par les selles d'un lapin infecté de *Francisella tularensis* ou de charbon par le *Bacillus anthracis*];
- l'infection par le biais d'un arthropode vecteur, très importante dans la transmission des protozoaires (ex. : le *Plasmodium* de la malaria par le moustique anophèle, le *Trypanosoma* de la maladie du sommeil par la mouche tsé-tsé) ou des virus (ex. : le virus de la fièvre jaune ou l'arbovirus de l'encéphalomyélite par le moustique) et aussi dans celle de certaines bactéries (ex. : *Borrelia* de la fièvre récurrente par le pou et la tique, le *Yersinia pestis* de la peste par les puces du rat,...).

3.3. Théorie du germe pathogène (responsable de l'infection)

Le rapport symbiotique hôte-parasite est initié à la période où le nouveau-né (animal ou plante) devient une part du miasme (souillure) microbien de l'univers. L'infection microbienne des surfaces intérieures et extérieures de l'être humain commence à la naissance et résulte de la flore microbienne normale (« indigenous microbiota »). La période des rapports symbiotiques représente un arrangement de gain (de bonne santé) pour tous, microbe (symbiote parasite) et hôte infecté (symbiote parasité), dont toute perturbation (ex. : par la chimiothérapie antimicrobienne, les opérations chirurgicales, la malnutrition, les stress ou la déficience immunitaire) menace leur bien-être respectif.

Ainsi, l'hôte devient susceptible à la colonisation par les microbes non symbiotiques et invasifs qui occupent le territoire de la flore microbienne indigène. Alternativement, les défenses affaiblies de l'hôte permettent aux membres de la flore microbienne normale de pénétrer derrière leurs localisations anatomiques usuelles et de provoquer ainsi que maladies systémiques menaçantes pour la vie de l'hôte (infections opportunistes).

Postulats de HENLE-KOCH

Après avoir identifié le bacille tuberculeux, Koch a formalisé en 1875 les trois critères introduits par **HENLE** en 1840 qui caractérisent un microbe pathogène.

Pour démontrer qu'un micro-organisme est responsable d'une **maladie (ou lésion) infectieuse**:

- (1) le **germe** doit toujours être trouvé dans une maladie infectieuse ;
- (2) il doit être isolé en culture pure sur des milieux artificiels en dehors de l'organisme infecté ;

(3) l'inoculation du germe isolé à un animal expérimental doit produire une maladie typiquement similaire (symptômes semblables) et le germe doit être isolé (retrouvé) des lésions ou organes de cet animal ;

(4) la présence d'anticorps spécifiques contre ce germe est à démontrer (critère ajouté).

Il est cependant à noter que certains micro-organismes et tous les virus ne peuvent pas pousser sur des milieux artificiels et d'autres ne sont pathogènes que pour l'homme.

Par tradition, on postule que pour être pathogène un micro-organisme doit être **transmissible** et **invasif**. Par transmissible, on entend qu'un micro-organisme soit transmis d'une source (individu ou objet infectés) à un être sain. Or le rôle du micro-organisme dans ce cas est passif, car son destin dépend des conditions sur lesquelles il n'a aucun contrôle. Le pouvoir invasif se réfère à la capacité d'un micro-organisme de se multiplier dans/sur les tissus de l'hôte; ceci étant pour une large part dépendant des propriétés du micro-organisme lui permettant de résister aux mécanismes de défense de l'hôte. Bien que l'invasion implique un processus actif de la part du parasite, la résistance aux mécanismes de défense constitue en soi un processus passif dans la mesure où le parasite est concerné.

En général, il y a seulement deux attributs (propriétés) qui sont requis par le parasite pour provoquer une maladie :

(1) le micro-organisme doit être capable de métaboliser et de se multiplier dans / sur les tissus de l'hôte; ceci implique une tension d'oxygène satisfaisante, un pH approprié (concentration en ions hydrogène), une température convenable et un milieu nutritionnel favorable disponible ;

(2) assumant que toutes ces conditions soient remplies (réunies) - pour le métabolisme et la multiplication -, le micro-organisme doit être capable de résister aux mécanismes de défense de l'hôte pendant une période suffisante pour atteindre le nombre (ou la quantité) requis pour provoquer une maladie à manifestations cliniques évidentes.

Considérant la pathogenèse en termes de virulence des microbes infectants et de défenses de l'hôte infecté (« envahi »), il y a de bonnes raisons de croire que le développement d'une maladie infectieuse à manifestations cliniques est la conséquence d'une rupture dans le rapport harmonieux entre le parasite microbien et l'hôte parasité; c'est-à-dire une rupture transitoire dans les mécanismes de défense de l'hôte au lieu d'une exposition de coïncidence aux ou d'une colonisation par des micro-organismes possédant des attributs spécifiques de provoquer des maladies qui les rendent ainsi pathogènes.

La présence d'un germe est une condition nécessaire mais pas suffisante pour une maladie infectieuse ; la constitution génétique et l'état physiologique de l'hôte peuvent être décisifs (déterminants) pour la manifestation d'une maladie infectieuse.

3.4. Réponses immunitaires de l'hôte et contrôle des maladies infectieuses

Le système immunitaire, comme mécanisme de défense, joue un rôle essentiel dans la résistance aux menaces infectieuses potentiellement létales pendant une période assez longue pour permettre aux formes de vie inférieures et supérieures de se reproduire et de perpétuer ainsi la variété d'espèces. Ainsi, une connaissance profonde du système immunitaire devient indispensable à la compréhension de la nature de base (du fondement) de la prévention et du traitement des maladies infectieuses. Notre compréhension des mécanismes immunologiques de défense de

l'hôte ouvre une nouvelle ère de la thérapie immunologique (immunothérapie) qui peut procurer à l'hôte immunodéprimé le(s) produit(s) qu'il ne peut pas normalement fabriquer (synthétiser (ex.: les gammaglobulines chez les enfants souffrant d'agammaglobulinémie).

Parmi les méthodes efficaces de contrôle et de prévention des maladies infectieuses, on peut citer :

- Un système sanitaire adéquat et un personnel d'hygiène qualifié : assainissement du milieu, contrôle hygiénique et microbiologique de l'eau, des aliments et des porteurs potentiels, désinsectisation, etc.;
- La vaccination et la chimiothérapie antimicrobienne.
- Ces mesures ont largement contribué aussi bien à l'éradication (ex. : la variole) qu'à la réduction de l'incidence de certaines maladies infectieuses dans le monde (ex. : la typhoïde, le choléra, la diphtérie, la coqueluche, la poliomyélite, la tuberculose, la syphilis,...).

Nous vivons dans un univers (monde) rempli de germes. Des microbes d'une variété et complexité infinies colonisent nos surfaces et orifices corporels. Des maladies infectieuses constitueront un fléau pour les êtres vivants (homme, animal, plante) et continueront ainsi à les harceler aussi longtemps qu'ils vivront dans ce monde. Le devoir du pharmacien, du médecin ou du microbiologiste, qui ont à s'attaquer à cette provocation, est de bien comprendre les principes fondamentaux de la microbiologie et de l'immunologie et de savoir combien ces principes sont essentiels à une prise de décision rationnelle dans le milieu clinique ou tout autre.

CHAPITRE II: MICROORGANISMES

1. REGNES ANIMAL ET VEGETAL

Les différences dans la forme (morphologie) et la constitution des animaux et des plantes sur lesquelles se fondait la division des êtres vivants jusqu'au dernier siècle (19^e siècle) sont claires et reposent fondamentalement sur les différents modes de nutrition.

1.1. Règne animal

Les animaux se nourrissent des substances organiques qui sont traitées, digérées et résorbées dans leur tube digestif : ce sont des C-hétérotrophes (hétéros du grec = l'autre).

1.2. Règne végétal

Les plantes, par contre, élaborent seules leurs aliments à partir des composés inorganiques (minéraux) simples (ex. : CO₂) en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie (photosynthèse par le biais des pigments comme la chlorophylle ou les caroténoïdes). Ce sont des C-autotrophes (autos du grec = seul, soi-même).

Cette classification resta consistante aussi longtemps que peu de chose était connu sur les micro-organismes. Mais quand le monde microbien commença à être systématiquement exploré, les organismes nouvellement découverts étaient classés dans le type familial des deux règnes. Ainsi, les protozoaires furent considérés comme des animaux primitifs et les algues comme des plantes. Pour des raisons vagues (ou obscures), les champignons (Eumycètes) ainsi que les bactéries (Schizomycètes) étaient groupés avec les plantes.

Néanmoins, cette classification présentait beaucoup d'inconsistances. Les champignons et la plupart de bactéries ne sont pas photosynthétiques et plusieurs bactéries sont mobiles; quelques champignons et les algues ont des spores mobiles (zoospores) et peuvent ainsi être pris pour des protozoaires, alors que les moisissures étaient revendiquées aussi bien par les zoologistes que par les botanistes.

Cependant, avec la reconnaissance de l'évolution par sélection naturelle et l'évidence que les plantes et les animaux auraient un ancêtre commun, il est devenu plus raisonnable aujourd'hui de considérer les microbes comme des descendants, peut-être avec un peu de changement, de l'ancêtre primitif commun des règnes animal et végétal.

La solution logique fût proposée par le zoologiste allemand **HAECKEL** en 1866, mais resta longtemps ignorée : c'est l'établissement du **3^e règne biologique**, celui des **PROTISTES** ou **MONERA**, distinct des animaux et des plantes et ayant une organisation simple.

From the time of Aristotle, living organisms were categorized in just two ways, as either plants or animals. In 1735, the Swedish botanist **Carolus Linnaeus** introduced a formal system of classification dividing living organisms into two kingdoms- Plantae and Animalia. He used latinized names to provide one common "language" for systematics. As the biological sciences developed, however, biologists began looking for a *natural* classification system - one that groups organisms based on ancestral relationships and allows us to see the order in life. In 1857, **Carl von Nägeli**, a contemporary of Pasteur, proposed that bacteria and fungi be placed in the plant kingdom. In 1866, **Ernst Haeckel** proposed the **Kingdom Protista**, to include bacteria, protozoa, algae, and fungi. Because of disagreements over the definition of protists, for the next 100 years biologists continued to follow von Nägeli's placement of bacteria and fungi in the plant kingdom. It is ironic that recent DNA sequencing places fungi closer to animals than plants. Fungi were placed in their own kingdom in 1959.

With the advent of electron microscopy, the physical differences between cells became apparent. The term **prokaryote** was introduced in 1937 by **Edouard Chatton** to distinguish cells having no nucleus from the nucleated cells of plants and animals. In 1961, **Roger Stanier** provided the current definition of prokaryotes: cells in which the nuclear material (nucleoplasm) is not surrounded by a nuclear membrane. In 1968, **Robert G.E. Murray** proposed the **Kingdom Prokaryotae**.

In 1969, **Robert H. Whittaker** founded the five-kingdom system in which prokaryotes were placed in the Kingdom Prokaryotae, or **Monera**, and eukaryotes comprised the other four kingdoms. The Kingdom Prokaryotae had been based on microscopic observations. Subsequently, new techniques in molecular biology revealed that **there are actually two types of prokaryotic cells and one type of eukaryotic cell**.

2. REGNE DES PROTISTES

2.1. Définition des Protistes

Les protistes sont des organismes qui se distinguent des animaux et des plantes par leur organisation structurale **fondamentalement unicellulaire** ou multicellulaire et relativement simple ainsi que par leur minimale différenciation cellulaire et morphologique ; c'est-à-dire leurs cellules végétatives sont toutes équivalentes et ne présentent aucune spécialisation fonctionnelle (ne forment pas de tissus différenciés). Les protistes sont donc des cellules complètes et autonomes (indépendantes) pouvant assurer seules leurs fonctions de nutrition, de métabolisme, de croissance et de reproduction.

La cellule, qui est la plus petite unité vivante (c'est-à-dire capable de vivre de façon autonome), constitue l'unité physique et physiologique de base des organismes. Sa composition chimique est commune chez tous les êtres vivants. Le DNA, le RNA,

des protéines, des lipides et des phospholipides constituent les composants essentiels (fondamentaux) de la cellule. L'étude de la structure moléculaire (ultrastructure) par le microscope électronique a révélé des différences remarquables basées sur la complexité de l'organisation cellulaire entre les bactéries et les cyanobactéries d'une part, et les plantes, les animaux et leurs représentants inférieurs (algues, champignons et protozoaires) d'autre part.

En fonction de leur structure et de leurs fonctions cellulaires, les protistes furent subdivisés en 2 groupes par **CHATTON** en 1937 :

- **les protistes supérieurs ou eucaryotes** qui, par leur constitution cellulaire, ressemblent aux animaux et aux plantes et **ont un noyau vrai** entouré par une membrane nucléaire; ils comprennent les **algues**, les **champignons** et les **protozoaires**;
- **les protistes inférieurs ou procaryotes** qui, par leur structure cellulaire, sont différents des autres organismes et **n'ont pas de vrai noyau**; ils comprennent les **bactéries** ou Schizomycètes, les **cyanobactéries** (anciennement algues bleu-vert ou cyanophycées ou schizophycées) et les **archéobactéries** ou **archaea**. La distinction entre les cellules archéales et bactériennes n'est pas basée sur leurs structures ou organisation internes, car elles sont toutes des procaryotes, mais plutôt sur les différences biochimiques fondamentales qui reflètent leur évolution distincte.

La découverte des cellules procaryotes larges (80 x 600 µm) et macroscopiques de *Epulopiscium fishelsoni*, une bactérie croissant dans les intestins d'un poisson (sturgeonfish) de la Mer Rouge, ainsi que l'existence du petit eucaryote *Nanochlorum* indiquent que la taille est un critère incorrect pour différencier les procaryotes des eucaryotes.

Les analyses phylogénétiques sur base de la comparaison de similarité des séquences de RNA ribosomiaux 16 S menées par des biologistes moléculaires conduits par **Carl WOESE** (dans les années 1980) ont révélé que tous les organismes sont largement répartis en **trois lignées principales d'évolution formant ainsi trois branches séparées de l'évolution cellulaire** appelées **Domaines** : **Eubacteria** (bactéries et cyanobactéries), **Archaea** (archéobactéries) et **Eukarya** (Animalia, Plantae, Algae, Protozoa et Mycetae).

Three-domain system: The three-domain system is a biological classification introduced by **Carl Woese** in 1990 that divides cellular life forms into **archaea, bacteria, and eukaryote domains**. In particular, it emphasizes the separation of prokaryotes into two groups, originally called *Eubacteria* and *Archaeobacteria*. Woese argued that, on the basis of differences in 16S rRNA genes, these two groups and

the eukaryotes each arose separately from an ancestor with poorly developed genetic machinery, often called a progenote. To reflect these primary lines of descent, he treated each as a domain, divided into several different kingdoms.

The Three Domains

The discovery of three cell types was based on the observations that ribosomes are not the same in all cells (see Chapter 4, page 95). Ribosomes provide a method of comparing cells because ribosomes are present in all cells. Comparing the sequences of nucleotides in ribosomal RNA (see page 292) from different kinds of cells shows that there are three distinctly different cell groups: the eukaryotes and two different types of prokaryotes- the bacteria and the archaea.

In 1978, **Carl R. Woese** proposed elevating the three cell types to a level above kingdom, called **domain**. Woese believed that the **archaea** and the **bacteria**, although similar in appearance, should form their own separate domains on the evolutionary tree. Organisms are classified by cell type in the three domain systems. In addition to differences in rRNA, the three domains differ in membrane lipid structure, transfer RNA molecules, and sensitivity to antibiotics.

In this widely accepted scheme, animals, plants, fungi, and protists are **kingdoms** in the **Domain Eukarya**. The **Domain Bacteria** includes all of the pathogenic prokaryotes as well as many of the nonpathogenic prokaryotes found in soil and water. The photoautotrophic prokaryotes are also in this domain. The **Domain Archaea** includes prokaryotes that do not have peptidoglycan in their cell walls. They often live in extreme environments and carry out unusual metabolic processes.

2.2. Eucaryotes

2.2.1. Structure des cellules eucaryotes

2.2.1.1. Le noyau cellulaire: la structure du noyau ainsi que sa façon de se diviser constituent les critères fondamentaux qui différencient la cellule eucaryote (ou eucyte) de celle procaryote. L'eucyte possède un vrai noyau (karyon, nucleus) contenant des acides nucléiques (DNA et RNA) et entouré d'une enveloppe poreuse et à double couche appelée membrane nucléaire. Celle-ci permet le transport des acides ribonucléiques (RNA), des protéines et des métabolites entre le noyau et le cytoplasme.

Le DNA qui contient les informations génétiques (génome) est associé à des protéines dites histones et est divisé (ou organisé) en sous-unités plus compactes et facilement maniables appelées chromosomes. Ceux-ci constituent le support de l'information génétique.

La division nucléaire s'effectue par la mitose qui remplit deux fonctions :

(1) la réplication (duplication) du matériel génétique par scission en longueur et dédoublement des chromosomes et

(2) la distribution équitable (équipartition) d'un set (jeu) de chromosomes dans chacune des cellules-filles après la réplication chromosomique.

Les plantes et les animaux supérieurs procèdent (réalisent) à un changement de phase du noyau lors de la reproduction sexuée. Par la fécondation, les gamètes mâle et femelle (ainsi que leurs noyaux respectifs) forment un zygote (cellule-fille) qui est diploïde, car il contient deux sets (jeux) de chromosomes homologues ($2n = 2$ fois le nombre des chromosomes n de l'espèce) apportés chacun respectivement par les gamètes mâle et femelle qui sont eux haploïdes; c'est-à-dire ils ne contiennent chacun qu'un jeu de chromosomes (n). Cette réduction du nombre de chromosomes s'effectue par un processus appelé méiose ou division réductionnelle, phénomène qui permet ainsi le passage à la prochaine génération sexuée pour les organismes se multipliant par la reproduction sexuée (fécondation). La méiose remplit deux fonctions :

(1) la réduction du nombre des chromosomes et

(2) la nouvelle combinaison des gènes paternels et maternels.

2.2.1.2. Le cytoplasme: le protoplasme est entouré d'une enveloppe extérieure appelée membrane cytoplasmique. Celle-ci sépare la cellule du monde extérieur. Le cytoplasme, siège des activités métaboliques de dégradation et de synthèse, est constitué d'un milieu homogène, le hyaloplasme, qui contient plusieurs poches réactionnelles ou organites cellulaires (vacuoles, vésicules ou citernes, mitochondries, chloroplastes, ribosomes, lysosomes,...) dus à la structure de la membrane cytoplasmique. Le prolongement interne de cette dernière forme le réticulum endoplasmique (ER) dont une partie constitue la membrane nucléaire et une autre partie est occupée par des **gros ribosomes (80 S, SVEDBERG)** qui sont soit libres (nageant dans le cytoplasme) ou liés au ER. Ils sont constitués de 2 sous-unités : **60 S et 40 S**. Ils constituent les sites (lieux) de synthèse des protéines. Seuls les cellules végétales et les champignons possèdent une paroi cellulaire.

Des organites membranaires spéciaux, l'appareil de Golgi chez les animaux et les dictyosomes chez les plantes, servent à la sécrétion des enzymes synthétisées dans les vésicules (citermes) qu'ils contiennent. Le processus de sécrétion extérieure des enzymes ou autres métabolites par ces vésicules est appelé exocytose.

2.2.1.3. Les mitochondries et les chloroplastes:

Les mitochondries servent d'organes de respiration. Leur membrane interne contient des constituants et des enzymes de la chaîne de transport d'électrons du substrat sur l'oxygène ainsi que de l'ATP-synthétase.

Les cellules des algues (comme celles des plantes vertes) contiennent en outre les chloroplastes dont les membranes intérieures (thylacoïdes) constituent les sites des pigments de la photosynthèse et des constituants du transport photosynthétique des électrons. La photosynthèse est le processus de transformation de l'énergie solaire en énergie biologique.

2.2.1.4. L'endocytose:

La capacité de prendre des aliments solides ou liquides est caractéristique des eucaryotes. La prise des particules solides (par ex., par les leucocytes du sang ou par les amibes) est connue sous le nom de phagocytose, tandis que celle des aliments liquides constitue la pinocytose. Ces deux formes de prise des matières extérieures par la cellule eucaryote constituent l'endocytose. Les procaryotes sont incapables d'endocytose. On peut, en outre, considérer l'endocytose comme la condition et le mécanisme de la formation d'une endosymbiose (ex. : prise d'une cellule vivante par une autre cellule).

2.2.1.5. Les organes de mouvement:

On observe chez les eucaryotes des possibilités de mouvement dues aux déplacements de la matière cytoplasmique. Une autre possibilité de mouvement est constituée par les **cils** qui sont des filaments ancrés dans la couche intérieure de la membrane cytoplasmique par un grain basal ou un blépharoplastie partant du centriole. On peut trouver des cils chez les protozoaires, les algues et les spermatozoïdes et les flagelles chez les procaryotes.

2.2.2. Les algues

Sont des microorganismes eucaryotes photosynthétiques dont plusieurs sont unicellulaires et d'autres multicellulaires et organisés en filaments et en d'autres formes multicellulaires. Certaines algues ont été reclassées sur base de leurs structures et organisation : les anciennes algues bleu-vert sont maintenant considérées comme des cyanobactéries à cause de leurs cellules qui sont procaryotes; les algues brunes et rouges sont considérées maintenant comme des plantes, parce qu'elles sont des organismes multicellulaires présentant une différenciation des tissus.

Algae (singular: alga) are photosynthetic eukaryotes with a wide variety of shapes and both sexual and asexual reproductive forms. The algae of interest to microbiologists are usually unicellular. The cell walls of many algae are composed of a carbohydrate called *cellulose*. Algae are abundant in fresh and salt water, in soil, and in association with plants. As photosynthesizers, algae need light, water, and carbon dioxide for food production and growth, but they do not generally require organic compounds from the environment. As a result of photosynthesis, algae produce oxygen and carbohydrates that are then utilized by other organisms, including animals. Thus, they play an important role in the balance of nature.

2.2.3. Les champignons

Les champignons (fungus, fungi) sont des microorganismes eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires, aérobies stricts ou facultatifs, qui possèdent un ou

plusieurs noyaux entourés d'une membrane nucléaire et un cytoplasme entouré d'une membrane cytoplasmique et d'une paroi cellulaire protectrice composée de chitine et d'autres polysaccharides et qui se nourrissent des composés organiques. Ils produisent des spores qui sont des cellules spécialisées impliquées dans leur reproduction, leur dissémination et leur survie. Certains champignons, appelés **levures**, sont unicellulaires (levures de 2 - 8 µm de diamètre) ; d'autres, des **moisissures** ou champignons filamenteux, forment des filaments multicellulaires appelés hyphae (hyphes).

La Mycologie est la branche de la Microbiologie qui étudie les champignons. Ce terme dérive du mot grec mykes qui signifie champignon (comestible).

2.3. Procaryotes

Ils sont différents des autres organismes par leur structure cellulaire très peu compartimentée. Ils ont un noyau rudimentaire non isolé par une membrane nucléaire, mais constitué d'un chromosome unique et circulaire (**DNA chromosomique**) et dépourvu d'histones. Ils sont haploïdes. Le chromosome des procaryotes contient toutes les informations nécessaires à la multiplication cellulaire par fission binaire ou scissiparité (amitose). La cellule procaryote (ou protocyte) contient des organites en nombre réduit, comme les **petits ribosomes (70 S)** et des inclusions ou substances de réserve. Les ribosomes sont constitués de 2 sous-unités : **50 S et 30 S**. Ils constituent les sites (lieux) de synthèse. La membrane cytoplasmique est entourée d'une paroi cellulaire. Elle constitue le site de gain d'énergie par la respiration ou la photosynthèse. Les cellules procaryotes mobiles possèdent un ou plusieurs **flagelles** comme organes de mouvement / locomotion.

De la nature des ribosomes et des enzymes de la synthèse des protéines ainsi que de la composition de la paroi cellulaire découle l'activité spécifique de plusieurs antibiotiques.

Les procaryotes apparaissent ainsi comme un groupe évolutif distinct s'étant stabilisé (arrêté) au stade primitif de l'évolution de la cellule, ceci à cause de leurs morphologie et structure peu différenciées. Un large vide évolutif les sépare des eucaryotes, c'est-à-dire leur développement vers les eucaryotes représente une grande discontinuité dans le processus de l'évolution des organismes.

2.3.1. Les bactéries

Les bactéries ou Schizomycètes sont des micro-organismes **unicellulaires** et autonomes, de forme arrondie, cylindrique, spiralée ou polymorphe. Elles sont les plus petits organismes connus capables de métabolisme, de nutrition, de croissance et de reproduction aux dépens des substances nutritives. Leur diamètre est habituellement d'environ 1 µm. La cellule bactérienne est constituée essentiellement par des structures **constantes**, qui sont toujours présentes chez toutes les

bactéries : l'appareil nucléaire, le cytoplasme, la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire. D'autres structures peuvent éventuellement s'y adjoindre chez certaines bactéries : la capsule, les flagelles, les pili et la spore qui constituent des structures **facultatifs** ou **inconstantes** de la cellule bactérienne.

Les bactéries constituent une collection extrêmement diverse des microorganismes procaryotes présentant de grandes différences morphologiques et physiologiques.

La Bactériologie est la branche de la Microbiologie qui étudie les bactéries.

2.3.2. Les Archæa ou archéobactéries

Constituent plusieurs types physiologiques de microorganismes procaryotes hautement spécialisés qui vivent dans des conditions environnementales difficiles dans lesquelles d'autres organismes ne peuvent pas survivre. Certains sont des thermophiles extrêmes (*Sulfolobus*, *Pyrodictum*), des acidophiles (*Thiobacillus*), ou des thermoacidophiles (*Hydrogenobacter acidophilus*), d'autres sont des halophiles (*Halobacterium salinarum*, *Hydrogenobacter halophilus*) ou des méthanogènes (*Methanococcus*). Like bacteria, archaea (ar'ke-a) consist of prokaryotic cells, but if they have cell walls, the walls lack peptidoglycan.

Archaea, often found in extreme environments, are divided into three main groups. The *methanogens* produce methane as a waste product from respiration. The *extreme halophiles* /la/op/tiles (halo = salt; philic = loving) live in extremely salty environments such as the Great Salt Lake and the Dead Sea. The *extreme thermophiles* (therm = heat) live in hot sul furous water, such as hot springs at Yellowstone National Park. Archaea are not known to cause disease in humans.

Malgré son faible degré de différenciation, la cellule procaryote présente une multiplicité et une flexibilité physiologiques particulières se traduisant par une **croissance rapide** et un **taux de synthèse élevé**. Plusieurs procaryotes sont en mesure de vivre en l'absence de l'air (anaérobiose = mode de photosynthèse sans production d'oxygène) et de tirer leur énergie nécessaire à la croissance par fermentation ou respiration anaérobique. Certains groupes peuvent utiliser l'énergie lumineuse et synthétiser leurs substances cellulaires à partir des composés ou éléments inorganiques ou du CO₂. En outre, d'autres groupes gagnent l'énergie par oxydation des composés organiques, stockent le carbone sous forme de poly-β-hydroxybuturate ou fixent l'azote moléculaire (ex.: les cyanobactéries fixent le CO₂ et l'N₂ atmosphériques dans des composés organiques).

La désignation « **micro-organismes** » ou « **microbes** » se rapporte aux petites dimensions de ces (prétendus) organismes et correspond au sens du mot « **Protistes** ».

Actuellement, les êtres vivants sont classés dans cinq règnes (**Robert H. Whittaker, 1969**):

1. **Plantae**
2. **Animalia**
3. **Monera / Prokaryotae**: Procaryotes : Bactéries, Cyanobactéries et Archéobactéries

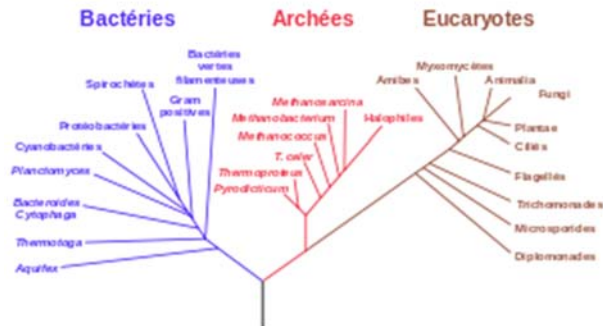
4. **Protista**: Protozoaires et Algae
5. **Mycetae**: Fungi ou Champignons.

Domaine Eukarya : Plantae, Animalia, Protista, Mycetae ;

Domaine Bacteria : Monera: Bactéries, Cyanobactéries ;

Domaine Archaea: Monera: Archéobactéries.

Arbre phylogénétique de la vie



3. VIRUS

Le terme « **VIRUS** » (latin = poison), longtemps utilisé comme synonyme « d'agent infectieux », se rapporte aux agents non cellulaires plus petits que les bactéries, qui constituent des unités (entités) biologiques composées d'un seul acide nucléique (DNA ou RNA) et des protéines constituant une coque appelée **capside** et, qui peuvent être des germes potentiels des maladies infectieuses. Le virion est la particule virale en dehors de la cellule-hôte.

Les virus n'ont pas de structure cellulaire et ne possèdent pas leur propre métabolisme. Ils sont ainsi incapables de produire seuls de l'énergie, de croître et de se reproduire. Ils nécessitent pour ces fonctions une cellule hôte vivante (eucaryote ou procaryote). Leur acide nucléique contient les informations nécessaires à la synthèse des macromolécules par la cellule infectée. Les virus constituent ainsi des parasites intracellulaires obligatoires.

Viruses are **very different from the other microbial groups** mentioned here. They are **so small** that most can be seen only with an electron microscope, and they are acellular (not cellular). Structurally very simple, a virus particle contains a core made of only one type of nucleic acid, either DNA or RNA. This core is surrounded by a protein coat. Sometimes the coat is encased by an additional layer, a lipid membrane called an envelope. All living cells have RNA and DNA, can carry out chemical reactions, and can reproduce as self-sufficient units. Viruses can reproduce only by using the cellular machinery of other organisms. **Thus, viruses are considered to be living when they multiply within host cells they infect. In this sense, viruses are parasites of other forms of life. On the other hand, viruses are not considered to be living because outside living hosts, they are inert.**

La VIROLOGIE est la branche de la Microbiologie qui étudie les virus. Elle a évolué comme une discipline scientifique depuis cette découverte de Loeffler et Frosch. La

virologie a contribué au développement de la biologie moléculaire et aussi à la création de la génétique moléculaire.

4. PRIONS

Les **prions** sont des agents infectieux « lents » non conventionnels responsables des encéphalopathies subaiguës spongiformes (ESS) qui sont des affections transmissibles du S.N.C. et qui sont mortelles. Ils étaient jadis appelés « virus lents » bien que n'étant pas des virus.

Il s'agit d'une protéine infectieuse. Cette protéine est présente dans le cerveau sous deux formes : **PrPc normale** et **PrPsc infectieuse**; elle s'étire et elle prend une autre forme.

La forme PrPsc infectieuse est capable de transformer lentement la forme normale en forme pathogène: il s'en suit une accumulation entraînant une explosion de la cellule.

En faisant une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, cette protéine se présente comme une bande unique avec un PM de 27-30 kD : on l'a ainsi désignée **PrP27-30** («**PrP** = **prion protein**»). C'est une sialoglycoprotéine avec 55 acides aminés rattachés à des glucides, à l'acide neuraminique (acide sialique) et à un inositol. La PrP s'accumule dans le SNC dans les proportions reflétant fidèlement le titre infectieux.

Les protéines prions de plusieurs espèces possèdent des séquences d'acides aminés similaires ainsi qu'une même antigénicité, mais ne sont pas identiques. Elles dérivent de protéines précurseurs de 253 acides aminés qu'on désigne **PrP33-35** appelé **PrP^C** (C = control / cellular) chez des animaux normaux ou **PrPsen** (protease-sensitive). Pr27-30 est résistant aux protéases, tandis que PrP33-35 est sensible aux protéases. **PrP^C** est une protéine normale des neurones. Elle s'accumule sous une forme biochimique particulière qui la rend peu sensible à l'action de la protéinase K (protéine kinase). **PrP27-30 = PrPres** et PrPres = **PrP^{Sc}** pour les animaux qui font la scrapie et **PrP^{CJD}** pour les hommes qui font la maladie de CREUTZFELDT-JAKOB.

CHAPITRE III : CLASSIFICATION DES MICRO-ORGANISMES

1. NOMENCLATURE

1.1. Description des micro-organismes

Elle consiste à donner les **caractères morphologiques** du micro-organisme: la forme (coccus, bacillus, spirillum,), le mode de groupement (isolé, en chaînette, en paquet, en filament...), la présence d'une capsule ou des cils/flagelles, la formation de spore, la coloration au Gram.

La description morphologique devra être complétée par :

- les **caractères physiologiques et biochimiques** (conditions de croissance, utilisation de certains substrats, production de certains enzymes et métabolites ou de pigments, composition de la paroi cellulaire ou de la capsule, sensibilité aux antibiotiques),
- les **propriétés antigéniques** (différences sérologiques) et par
- les **caractères génétiques** (séquences des bases du DNA, GC %, coefficient de Chargaff, séquences nucléotidiques de rRNA 16 S, sensibilité vis-à-vis des bactériophages).

1.2. Nomenclature des micro-organismes

La dénomination des micro-organismes, comme celle des plantes et des animaux, obéit à des règles internationales extrêmement strictes. On utilise pour ce fait une nomenclature binaire : tous les micro-organismes sont désignés par **deux noms latins dont le premier, en majuscule, représente le genre et le second, en minuscule, l'espèce**.

Ex. : *Escherichia coli* ou *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium tetani*, *Aspergillus flavus*, *Cryptococcus neoformans*,...

Les noms des genres découlent des mots latins ou grecs qui souvent se rapportent (BEIJERINCK et WINOGRADSKY):

1°) à la forme du micro-organisme : *Streptococcus* (streptos, collier), *Staphylococcus* (staphyle, grappe, amas),

2°) aux noms des personnes : *Pasteurella* de Pasteur, *Neisseria* de Neisser, *Bordetella* de Bordet, *Yersinia* de Yersin,...

3°) aux caractères physiologiques ou biochimiques : *Acetobacter* (produit l'acide acétique), *Azotobacter* (fixe l'azote moléculaire), *Amylobacter* (utilise l'amylose), *Haemophilus* (utilise le sang), *Nitrosomonas* (oxyde NH_3 en NO_2^-), *Methanobacterium* (produit le méthane),...

4°) à l'écologie : *Dermatophilus* (derme), *Enterococcus* et *Enterobacter* (tube digestif).

Les noms des espèces se réfèrent

1°) aux caractères physiologiques : *Streptococcus pyogenes* (purulent), *Enterobacter aerogenes* (produit beaucoup de gaz),

2°) des noms des personnes : *Coxiella burnettii* (Burnet), *Bacillus pasteurii* (Pasteur), *Nitrobacter winogradskyi* (Winogradsky),...

3°) des maladies qu'ils provoquent : *Yersinia pestis* (peste), *Vibrio cholerae* (choléra), *Streptococcus pneumoniae* (pneumonie), *Salmonella Typhi* (fièvre typhoïde), *Shigella dysenteriae* (dysenterie),...

4°) de l'écologie : *Enterococcus faecalis* (faeces), *Gardnerella vaginalis* (vagin), *Mycobacterium bovis* (bovins).

2. CLASSIFICATION ET TAXONOMIE

2.1. Classification

Par classification, on entend le rangement des unités simples ou de base en groupes d'unités complexes. L'unité de base ou la culture pure d'un micro-organisme isolé est la **SOUCHE**. Les souches ayant un grand nombre de caractères communs (identité complète ou très large des génomes) sont groupées en une **ESPECE**. L'espèce, qui constitue la **base du système de classification**, est l'ensemble d'individus ou de souches des micro-organismes présentant une grande similitude des caractères, c'est-à-dire une grande affinité génétique (et dont le croisement fait au hasard donne des descendants féconds entre eux). Une espèce rassemble les souches descendant d'un ancêtre commun.

Une espèce peut être subdivisée en sous-espèces (« **subspecies** », **spp.**) ou variétés en raison de caractères constants déterminés tels que :

- les propriétés antigéniques: **sérotypes** (sérovirs), importants chez les *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*,
- les propriétés biochimiques ou de croissance : **biotypes** (biovars), importants chez les *Enterobacteriaceae*,
- la composition chimique : **chimiotypes** (chimiovars), chez les *Enterobacteriaceae*,
- le comportement envers les bactériophages : **lysotypes** (phagovars), importants chez les *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,
- le comportement vis-à-vis des bactériocines : **bactériocinotypes** (bactériocinovars), chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*,
- la morphologie : **morphotypes** (morphovars),
- la différence génétique : **génotypes**.

Les espèces ayant en commun un certain nombre de caractères sont rangées dans un même GENRE; les genres apparentés dans une même FAMILLE, et les familles comparables dans un même ORDRE. Les ordres ayant des affinités sont groupés en une CLASSE et les classes en un REGNE, en passant par les DIVISIONS et les EMBRANCHEMENTS.

2.1. Taxonomie

La taxonomie (ou la systématique) s'occupe de l'établissement d'un système ordonné pour les organismes, c'est-à-dire la description, la nomenclature et la classification ou le rangement des êtres vivants dans un système hiérarchisé en fonction de leurs relations d'affinité des caractères (ou de parenté).

CHAPITRE IV : BACTERIES

1. DEFINITION

Les bactéries ou schizomycètes sont des micro-organismes procaryotes unicellulaires de forme arrondie, cylindrique, spiralée ou pléiomorphe. Leur diamètre est habituellement d'environ 1 μm . La cellule bactérienne est constituée essentiellement de l'appareil nucléaire, du cytoplasme, de la membrane cytoplasmique et de la paroi cellulaire qui sont des **structures constantes** qui sont toujours présentes. D'autres structures peuvent éventuellement s'y adjoindre : la capsule, les flagelles, les pili ou fimbriae et la spore, qui constituent **des structures inconstantes ou facultatives** de la cellule bactérienne. Elles sont les plus petits organismes connus capables de nutrition, de métabolisme, de croissance et de reproduction aux dépens des substances nutritives.

2. MORPHOLOGIE DES BACTERIES

L'examen au microscope optique révèle trois formes principales des bactéries (bactéries et cyanobactéries) :

- la forme sphérique (arrondie) ou coccoïde avec un diamètre moyen de 0,5-1 μm : **coques** ou **cocci** (coccum du latin : noyau, baie) : *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ;
- la forme cylindrique ou en bâtonnet de $\pm 5 \mu\text{m}$ de long et $\pm 1 \mu\text{m}$ de large: **bacilles** ou **Bacilli** (bacillum du latin = bâtonnet) : *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* ;
- la forme spiralée ou hélicoïdale : **spirilles** ou **Spirilla** (spira du latin : tour, repli, sinuosité, torsion) : *Thiospirillum jenense*, *Leptospira interrogans*.

Selon les plans de division cellulaire, les coques peuvent se présenter

- isolés
- en paires: x accolés deux à deux: ex.: *Diplococcus*
 - x en forme de reins ou grains de café (ou petits pains): ex.: *Neisseria* (gonocoques)
 - x en forme de lancettes ou en flamme de bougie (effilée): ex.: *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*)
- en chaînettes: ex. : *Streptococcus* (streptos du grec = cordon, tortueux) ;
- en amas irréguliers, genre grappes de raisins: ex.: *Staphylococcus* (staphyle du grec = grappe);

- en amas réguliers cubiques ou tétraédriques: ex.: *Sarcina* (sarcina du latin = paquet).

Les **bacilles** se présentent en

- Bacillus: ont des extrémités coupées en angles droits: ex.: *Bacillus anthracis*;
- Coccobacilles : sont inhabituellement courts et ont des extrémités arrondies: ex.: *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* ;
- Bacilles fusiformes : ont les deux extrémités effilées: ex.: *Fusobacterium necrophorum* ;
- Formes filamenteuses, croissent en filaments: ex.: *Actinomycetes*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*;
- Vibrio : sont incurvés en virgule: ex.: *Vibrio cholerae*, *Campylobacter*.

Les **spirilles** présentent les formes suivantes :

- *Leptospira* : spires régulières et serrées (10 - 15 µm): ex.: *Leptospira interrogans*;
- *Spirochaeta* : spires lâches et irrégulières (30 - 500 µm): ex.: *Borrelia recurrentis*;
- *Treponema* : 10 - 12 spires régulières (5 - 20 µm): ex.: *Treponema pallidum*.

Il n'existe que très peu de bactéries géantes comme les Spirilla, les bactéries sulfureuses (*Thiospirillum jenense*) ou ferrugineuses (*Chromatium okenii*, *Achromatium*, *Sphaerotilus*).

3. STRUCTURE DES BACTERIES

3.1. Corps ou Appareil nucléaire

La combinaison des méthodes cytologiques classiques et de la microscopie électronique a démontré que les bactéries, qui ne possèdent pas un vrai noyau, ont une région nucléaire (nucléoplasme) contenant un DNA non réparti de façon diffuse (non répandu dans tous les sens) dans le cytoplasme, mais localisé dans des régions (ou zones) discrètes dites **nucléoïdes** ou **appareils nucléaires** et se divisant avant la division cellulaire. Cette région nucléaire, qui est remplie de façon régulière de fins filaments (du DNA), apparaît comme une masse compacte, localisée au centre de la cellule bactérienne, mais moins dense que le cytoplasme qui contient les ribosomes. On observe l'absence d'une membrane nucléaire

séparant les deux régions. Le nombre d'appareils nucléaires par cellule végétative peut varier. Les cocci sont habituellement mononucléaires, tandis que les bacilles sont fréquemment multinucléaires et contiennent deux ou plusieurs (multiple de deux) nucléoïdes selon le stade de croissance.

La morphologie des corps nucléaires est variable selon la phase de croissance et de division de la bactérie. Chez les cocci, on observe une petite masse sphérique ou ovoïde ou en massue, plus ou moins centrale. Chez les bacilles, ce sont plutôt des bâtonnets situés transversalement dans la cellule, très fréquemment appariés.

Le nucléoïde contient 60 % de DNA, 30 % de RNA et 10 % de protéine et représente environ 10 % du volume cellulaire. Le DNA représente seulement 2 - 3 % du poids sec cellulaire.

La totalité de l'information génétique de la cellule bactérienne est contenue dans **un filament unique de DNA, le chromosome bactérien**. Celui-ci est une molécule de DNA bicaténaire (double chaîne, deux brins), **continue, circulaire** (en forme d'anneau), **spiralée et surenroulée** (superenroulée), de poids moléculaire autour de $3 \cdot 10^6$ kD et d'environ $5 \cdot 10^3$ Kb (1kilobase = 1000 paires de bases) et d'une longueur de 0,25 - 3 mm. La réplication du DNA (division et dédoublement), qui précède toujours la division cellulaire, doit conduire à la formation des deux DNA chromosomiques totalement identiques.

- Structure du DNA : l'acide désoxyribonucléique (ADN ou DNA en anglais) est une macromolécule (polymère polynucléotidique) de poids moléculaire élevé, composée d'unités dites nucléotides (nucléoside + phosphate; nucléoside = base + sucre). Par hydrolyse acide (ex. : HCl 1 M), le DNA se décompose en désoxyribose, acide phosphorique et 4 bases différentes dont deux puriques, l'adénine (A) et la guanine (G) et deux pyrimidiques, la cytosine (C) et la thymine (T). Chaque nucléotide est constitué d'une base purique ou pyrimidique, d'un sucre, le désoxyribose et d'un groupement phosphoré. Les bases sont attachées chacune à un pentose qui en plus porte en positions 3' et 5' le groupement phosphoré qui est un phosphate diester. Le DNA constitue ainsi une chaîne de nucléotides contenant alternativement un pentose et un phosphate et présentant ainsi une structure polaire. Les nucléotides s'unissent les uns aux autres par des liaisons diester établies entre les fonctions acides de l'acide phosphorique et les fonctions alcools du sucre formant ainsi de longues chaînes polynucléotidiques.

En 1950, **CHARGAFF** a démontré que, dans la molécule de DNA,

(1°) il existe autant de molécules d'adénine que de molécules de thymine ($[A] = [T]$) et autant de molécules de guanine que de molécules de cytosine ($[G] = [C]$), et que

(2°) la somme des bases puriques $[A + G]$ est égale à celle des bases pyrimidiques $[C + T]$: $[A + G = C + T]$.

Le rapport $\frac{[G + C]}{[A + T]}$, connu sous le nom de **coefficient de Chargaff**, varie

$\frac{[A + T]}{[G + C]}$

énormément d'une espèce bactérienne à l'autre, mais reste cependant constant pour chaque espèce (chez toutes les souches d'une même espèce). Il va de 0.27 à 3.16 pour toutes les espèces bactériennes.

La façon la plus courante de rendre compte de la composition en bases de la molécule de DNA d'un organisme particulier n'est pas de donner le rapport, mais de déterminer la fraction des bases G et C parmi l'ensemble des bases. On l'exprime en **contenu en G et C ou GC %** ou pourcentage des moles de guanine et de cytosine dans le DNA qui représente le rapport (en %) de moles de guanine et de cytosine sur la somme de moles de toutes les bases du DNA. GC % est spécifique de l'espèce et sert ainsi de **critère taxonomique**. D'une façon générale, il est proche de 0.50 pour les organismes supérieurs et il varie très peu d'une espèce à l'autre. Par exemple, pour les primates, il varie de 0.49 à 0.51. Par contre, pour les organismes inférieurs, il varie largement d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre. Les deux extrémités chez les bactéries sont 0.27 (27 %) pour *Clostridium* et 0,76 (76 %) pour *Sarcina* (GC% pour *E. coli* = 50 %).

Cette découverte de Chargaff fût formulée en une brillante théorie par **James WATSON et Francis CRICK** en 1953 dont le modèle présente le polynucléotide (la molécule du DNA) comme une double hélice enroulée à la manière d'une échelle de corde autour d'un axe imaginaire et dont les deux parties sont reliées entre elles par des ponts-hydrogène : $A = T$ et $C \equiv G$.

Le chromosome des *Archae* est une molécule circulaire ressemblant à celle des bactéries. La différence existe dans l'organisation de ce chromosome qui contient des protéines semblables aux histones (histone-like proteins) qui sont associées au DNA et qui sont impliquées dans le maintien de la structure du chromosome et dans l'expression des gènes.

3.2. Cytoplasme

Le cytoplasme, qui contient plusieurs vésicules et granulations y compris l'appareil nucléaire, est entouré de la membrane cytoplasmique et de la paroi cellulaire. Il ne constitue pas une solution homogène de protéines. Après plusieurs heures de

centrifugation à 100.000 x g, le cytoplasme se sépare en une fraction dite soluble contenant des enzymes et des acides ribonucléiques (RNA) solubles ainsi que des sels minéraux et en une fraction particulaire contenant des membranes et surtout des ribosomes. Les enzymes solubles catalysent plusieurs réactions de dégradation et de synthèse, tandis que les RNA solubles (RNA-messager et RNA de transfert) ainsi que les ribosomes participent à la synthèse des protéines.

3.2.1. Ribosomes : le cytoplasme bactérien contient un nombre élevé de ribosomes (entre 5000-50.000 ribosomes) qui constituent les lieux de synthèse des protéines et contiennent plus de 80 % des RNA bactériens. Ces organites sont des granulations sphériques ayant des dimensions moyennes de 16 x 18 nm (10 à 30 nm de diamètre), une constante de sédimentation **de 70S (S = SVEDBERG = unité de la vitesse de sédimentation)** et un poids moléculaire de $3 \cdot 10^6$ D. Elles sont exclusivement constituées de protéines (37 %) et de RNA (63 %).

Les ribosomes 70S consistent en deux sous-unités qui se dissocient par centrifugation en l'absence des Mg^{2+} et sédimentent à des vitesses de 30S et 50S: ce sont **les sous-unités 30S ($1 \cdot 10^6$ D) et 50S ($2 \cdot 10^6$ D)** reliées entre elles par l'intermédiaire de liaisons RNA-protéine et protéine-protéine.

Chaque sous-unité possède son RNA et ses protéines propres :

- **Pour la sous-unité 30S : rRNA 16S et une vingtaine (21) de protéines S (small = petit) ;**

- **Pour la sous-unité 50S : rRNA 23S et 5S et une trentaine (34) de protéines L (large = grand).** Les ribosomes des *Archae* possèdent un rRNA supplémentaire, **RNA 7S** qui joue probablement un rôle dans des activités associées aux ribosomes. L'association particulière dans la sous-unité 50 S du RNA et des protéines L détermine **deux sites spécifiques** qui jouent un rôle précis au cours de la traduction des chaînes de RNA en protéines : **le site peptidique « P »** (comme peptidyl) où s'enchaînent les acides aminés par liaison peptidique et **le site aminoacide « A »** (comme aminoacyl) où se fixent les acides aminés suivants.

Les sous-unités 50S et 30S sont des structures « participatives » au cours de la synthèse des protéines dont les fonctions sont mal connues. Le mRNA, le tRNA et d'autres facteurs d'initiation de la synthèse protéique s'associent à la sous-unité 30 S pour former le **complexe de préinitiation 30S** sur lequel se fixera la sous-unité 50S pour former le complexe d'initiation 70S.

Les différences existant dans les séquences nucléotidiques des RNA ribosomiaux font que ces structures, spécialement **les rRNA 16S**, sont utilisées dans la classification taxonomique des bactéries.

Les ribosomes sont souvent groupés en chaînes (structures en chapelets) dites **polyribosomes** ou **polysomes** par une chaîne de RNA messenger. Les polysomes sont attachés à la membrane cytoplasmique. Les ribosomes bactériens équivalent les mitochondries et les chloroplastes d'après leur taille et leurs propriétés.

3.2.2. RNA (mRNA et tRNA) se différencie du DNA par leur composition et leur structure secondaire. La molécule de RNA contient un ribose au lieu d'un désoxyribose et l'uracile à la place de la thymine ainsi que plusieurs bases rares (pseudouracile). Elle existe le plus souvent sous forme d'une seule hélice dans la cellule (monocaténaire) est surtout caractérisée par son manque de spécificité : la séquence des bases constitutives est la même quelles que soient les espèces bactériennes.

3.2.3. Vésicules et pigments : chez les bactéries photosynthétiques (bactéries pourpres, *Chromatiaceae* et *Rhodospirillaceae*), le cytoplasme contient des organites spécialisés dits **chromatophores** qui sont des vésicules dont la membrane prolonge la membrane cytoplasmique et qui renferment des pigments qui interviennent dans la conversion de l'énergie lumineuse émise par le soleil en énergie chimique. Ces pigments chlorophylliens, de composition chimique différente de la chlorophylle des algues et des plantes supérieures, sont appelés **bactériochlorophylles**. Celles-ci, ainsi que d'autres composants de l'appareil photosynthétique, sont liées à des systèmes membranaires particuliers qui forment des vésicules intracytoplasmiques. Chez les bactéries vertes (*Chlorobiaceae*), ces vésicules sont attachées à la membrane cytoplasmique, tout en restant distinctes; on les appelle les **vésicules** de *Chlorobium*. Chez les cyanobactéries et les algues, ces vésicules contenant l'appareil photosynthétique sont dénommées **thylacoïdes**

D'autres pigments peuvent être rencontrés chez des bactéries comme la vitamine K2 (*Bacillus subtilis* et *B. cereus*), la caroténoïde protecteur anti-UV (corynébactéries), la pyocyanine et la violacéine (*Chromobacterium violaceum*), la xanthophylle et la sarcinaxanthène (caroténoïdes), pigments rouges (*Sarcina*), la pyocyanine bleue et la pyoverdine bleu-vert fluorescente (*Pseudomonas aeruginosa*), un dérivé pyrrolique rouge ou prodigiosine (*Serratia marcescens*), la bactériorhodopsine, pigment voisin des pigments de la rétine de l'œil (*Halobacterium halobium*, bactéries vivant dans les milieux salés).

3.2.4. Granulations et substances de réserve : le cytoplasme de nombreuses espèces bactériennes peut contenir différents types de granules insolubles. Certains de ceux-ci sont de réserves alimentaires. Chez certaines espèces bactériennes, le cytoplasme contient comme substance de réserve, un polyphosphate dénommé **volutine**. Les granules de volutine se colorent anormalement en présence certains

colorants. Ces granulations métachromatiques de polyphosphates sont des produits de synthèse colorables en rouge pourpre par des colorants basiques (ex. : bleu de toluidine) et visibles au microscope. C'est la **métachromasie** : le fait que les granules de polyphosphate prennent une coloration différente de celle du colorant. Leur observation peut être d'un intérêt diagnostique (ex. : *Corynebacterium diphtheriae*).

La bactérie peut accumuler des matériaux organiques ou inorganiques constituant généralement des réserves d'énergie et de source de carbone. Les substances accumulées sont soit de l'amidon, du glycogène (*Enterobacteriaceae*, *Clostridium*), de l'acide poly-β-hydroxybutyrique (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Sphaerotilus*...).

Des inclusions ou granules de soufre ou de fer sont aussi caractéristiques de certains groupes bactériens : les thiobactéries (*Beggiatoa*, *Thiothrix*) qui tirent leur énergie de l'oxydation de l'hydrogène sulfuré et les sidérobactéries qui ont les gaines incrustées d'hydroxyde de fer et le cytoplasme parsemé d'inclusions du même type. Chez certaines spirilles aquatiques dites bactéries « magnétiques » (*Aquaspirillum magnetotactium*), le fer peut également être présent sous forme de particules d'oxyde de fer magnétique (magnétite : Fe_3O_4), incluses dans des vacuoles cytoplasmiques appelées magnétosomes. Ces espèces bactériennes peuvent être déplacées dans un champ magnétique.

3.3. Enveloppes cellulaires

3.3.1. Membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique entoure le cytoplasme bactérien et le sépare de la paroi cellulaire. Le **protoplaste** est la cellule bactérienne sans paroi cellulaire et ayant pour enveloppe uniquement la membrane cytoplasmique. Celle-ci comprend une **double couche (bicouche) lipidique** (lipid bilayer) constituée surtout des **phospholipides** présentant leurs têtes hydrophiles vers l'extérieur et leurs queues hydrophobes vers l'intérieur de la membrane, des protéines **structurales** intégrées dans la double couche lipidique et des protéines **périphériques (non structurales)** attachées à la membrane. La membrane cytoplasmique des *Archae* est unique en termes de structure et de composition chimique : elle possède un contenu élevé en protéines ainsi que divers lipides, incluant des phospholipides, des sulfolipides, des glycolipides et un lipide isoprénoïde non polaire. La couche lipidique est composée des lipides diéther de glycérol. La membrane cytoplasmique de certains *Archae* est une monocouche des lipides tétraéther de glycérol.

Rôles de la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique joue un rôle essentiel dans les fonctions métaboliques de la cellule bactérienne.

- Elle constitue la barrière osmotique à **perméabilité sélective** de la cellule et est ainsi responsable des échanges (transferts passifs) entre la bactérie et le milieu extérieur : elle contrôle l'entrée des substances solubles dans la cellule ainsi que la sortie des métabolites.
- Elle est aussi le site du système des transports actifs et sélectifs de certaines substances (sucres, acides aminées, ions, minéraux) assurés surtout par des enzymes, les **perméases** «**uniporters**» et «**cotransporters**». Les uniporters sont utilisés dans l'**uniport** qui implique le mouvement d'une seule substance par une perméase, tandis que les cotransporters le sont dans le **cotransport** qui implique le mouvement simultané de deux substances par une perméase, soit par **symport** ou par **antiport**. Lors du symport, les deux substances sont transportées dans une même direction, tandis que lors de l'antiport, elles le sont dans des directions opposées. On suggère aussi que les protéines intégrées dans la couche lipidique, appelées «**carrier proteins**», constitueraient des pores par lesquelles s'effectue le transport contrôlé des substances.
- La membrane cytoplasmique contient des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique (siège de la chaîne respiratoire), comme le transport d'électrons et la phosphorylation oxydative (ex. : perméases, cytochromes, enzymes du cycle de Krebs,...⇒ même rôle que les mitochondries des eucaryotes).
- Elle est le siège du métabolisme biosynthétique : la synthèse des lipides complexes et des constituants de la paroi et de la capsule cellulaires ainsi que dans la réplication de DNA (synthèse du peptidoglycane, des lipides, des polysaccharides, des protéines). Elle contient un nombre considérable des ribosomes qui y sont attachés et joue ainsi un rôle dans la synthèse et la sécrétion des protéines (exoenzymes, exotoxines).
- Elle joue un rôle dans la mobilité et le chimiotactisme : les flagelles ont leur point d'insertion dans la membrane; les mouvements de la membrane permettent le chimiotactisme, même si la bactérie n'a pas de flagelles.
- Elle possède des invaginations irrégulières (sorte de vésicules) appelées mésosomes. Les mésosomes latéraux possèdent une fonction dans la sécrétion, tandis que les mésosomes septaux participent à la réplication de DNA, car ils portent un site d'attachement du chromosome bactérien, et par conséquent à la division cellulaire par scissiparité. La séparation des cellules filles commence souvent par une invagination de la membrane cytoplasmique au niveau d'un mésosome formant ainsi une cloison appelée septum. Le clivage du septum conduit à la séparation des deux bactéries filles.

N.B. Il a été démontré récemment que les mésosomes sont des artefacts provenant d'une altération de la membrane cytoplasmique lors de la préparation des

échantillons pour la microscopie électronique, et non des structures cellulaires ayant des fonctions définies.

- Elle est le site d'action de diverses substances antimicrobiennes : les phénols, les antiseptiques cationiques, les antibiotiques polypeptidiques,...

3.3.2. Paroi cellulaire

La paroi cellulaire est l'enveloppe externe qui entoure la membrane cytoplasmique de la cellule bactérienne. Le médecin bactériologiste danois **Hans CHRISTIAN GRAM** a développé en 1884 une technique de coloration appelée **coloration de GRAM** qui permet de subdiviser les bactéries en deux groupes en fonction de leur habilité à retenir ou non un colorant basique (violet de gentiane / cristal violet) après fixation par l'iode :

- **les bactéries à Gram positif** ou bactéries gram-positives qui ont la capacité de retenir le premier colorant basique après fixation par l'iode;

- **les bactéries à Gram négatif** ou bactéries gram-négatives qui ne retiennent pas ce premier colorant après fixation par l'iode et décoloration par l'alcool ou l'acétone.

Cette propriété de retenir ou non le colorant basique est basée sur les différences majeures dans la structure et les fonctions de la paroi cellulaire des bactéries gram-positives et gram-négatives, tel que démontré plus tard par la microscopie électronique et les analyses chimiques.

3.3.2.1. Coloration de GRAM

Le procédé consiste à colorer les bactéries fixées par la chaleur sur une lame avec du cristal violet ou violet de gentiane suivi d'une fixation de ce colorant basique par une mixture iodo-iodurée (solution de Lugol) formant ainsi une laque (vernis) insoluble dans l'eau. Après lavage (décoloration) avec de l'alcool ou de l'acétone qui « différencient » les cellules bactériennes, les bactéries gram-positives retiennent le complexe colorant-iode et se colorent en **bleu** ou **violet**, tandis que les bactéries gram-négatives sont décolorées par l'alcool. Une coloration postérieure par un colorant de contraste (fuchsine, safranine ou éosine) permet de les rendre visibles (**rouges** ou **roses**).

Quand, après coloration de Gram, les cellules gram-positives sont traitées par le lysozyme, leurs protoplastes restent colorés et ne se décolorent qu'après traitement avec l'alcool. En outre, les spores (ex. *Bacillus subtilis*) et les cellules jeunes (première génération) et vieilles des bactéries gram-positives se comportent comme des cellules gram-négatives. Ces constatations démontrent que le colorant se trouve

localisé sur le protoplaste (membrane cytoplasmique) et que c'est la paroi cellulaire qui constitue une grande barrière à l'extraction du complexe colorant-iode.

3.3.2.2. Structure de la paroi cellulaire

La structure de base de la paroi cellulaire est une macromolécule dite **peptidoglycane** ou **muréine** (ou mucopeptide) qui donne à la paroi sa rigidité et qui entoure le protoplaste. Cet hétéropolymère comprend des chaînes glycosaminopeptidiques linéaires dans lesquelles s'alternent deux sucres aminés, la **N-acétylglucosamine (Glc NAc)** et son **3-O-D-lactyl éther, le N-acétylmuramate (Mur NAc)**, reliés par une liaison β -1,4-glycosidique. La partie muramique est reliée par le groupement lactyl à la chaîne de quatre acides aminés, le **chaînon tétrapeptidique**, contenant généralement les acides aminés suivants : L-alanine, D-glutamate, L-lysine ou m-diaminopimélate (Dpm/DAP) et D-alanine. Des peptides d'une chaîne polysaccharidique sont souvent liés à des peptides d'une autre chaîne **directement** ou par l'intermédiaire d'un **pont peptidique** supplémentaire (liaison inter-chaîne). Chez *S. aureus*, il y a un **pontage inter-chaîne** entre la D-alanine d'un tétrapeptide et la L-lysine ou le L-DAP ou la D-alanine d'un autre tétrapeptide voisin, grâce à un **pentapeptide de L-glycine** (sensible aux pénicillines). Chez les bactéries gram-négatives, ce pontage se fait souvent par la **liaison directe** entre le DAP d'une chaîne et la D-alanine terminale d'une autre chaîne.

- Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif

Chez les bactéries gram-positives, le peptidoglycane est une couche épaisse de 30 - 50 nm et constitue 30 - 70 % du poids sec de la paroi cellulaire. Il contient le plus souvent L,L-Dpm ou L-lysine. Les acides aminés varient selon les espèces. La structure spécifique du squelette muréinique constitue ainsi un critère taxonomique pour les espèces bactériennes. Le contenu en protéines est faible. On constate aussi la présence des molécules d'**acides teichoïques** ou **teichuroniques** et d'**acides lipoteichoïques** qui sont des polymères constitués de chaînes de 8 - 50 molécules de ribitol et / ou de glycérol reliées par des ponts-phosphate (polymères de ribitolphosphate ou de glycérolphosphate). Les acides teichoïques sont attachés à la N-acétylglucosamine du peptidoglycane par des phosphates amidiques, tandis que les acides lipoteichoïques, non liés au peptidoglycane, sont fixés dans la membrane cytoplasmique par un glycolipide. Les acides teichoïques fixent des ions bivalents comme le Mg^{2+} et contrôlent leur passage à travers la paroi.

- Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries gram-négatives, la muréine n'est qu'une mince couche basale de 3 - 5 nm et constitue moins de 10 % du poids sec de la paroi cellulaire. Le chaînon tétrapeptidique contient presque exclusivement le m-DAP. La structure du peptidoglycane est la même chez toutes les bactéries à Gram négatif. Elle n'est pas

spécifique et ne constitue donc pas un critère de taxonomie. La paroi cellulaire comporte aussi une couche trilamellaire dite **membrane externe** séparée du corps bactérien par un espace appelé **périplasme** ou **gel** (espace) **périplasmique**. Cet espace est rempli du peptidoglycane poreux sous forme de gel à travers lequel peuvent migrer des protéines.

La membrane externe est constituée d'une couche interne de **phospholipides (PL)**, de **protéines (P)** et de **lipoprotéines (LP)** et d'une couche externe formée d'un polymère, le **lipopolysaccharide (LPS)**. La membrane externe constitue 80 % de la paroi cellulaire. Cette structure de nature essentiellement lipidique est stabilisée par les ions Ca^{++} (stabilisation de la couche lipopolysaccharidique).

Le LPS est constitué par une tête lipidique appelée lipide A + core polysaccharidique et par une chaîne polysaccharidique se développant à l'extérieur de la paroi. Le core est constitué par le kétodéoxyoctonate (KDO) et d'un oligosaccharide basal (un heptose : glycéro-D-mannoheptose) et est la partie centrale du LPS. Le lipide A est un glycophospholipide et constitue **l'endotoxine**, responsable de l'effet toxique du LPS (choc endotoxinique lors d'une infection à bactéries à Gram négatif). Il est constitué des unités répétées de polysaccharide contenant de la glucosamine phosphorylée qui est estérifiée aux acides gras. La chaîne polysaccharidique est immunogène et constitue l'antigène somatique O spécifique de l'espèce (utile en sérologie).

La membrane externe comporte par ailleurs des protéines dites **porines** qui servent à transporter sélectivement des éléments nutritifs (et les antibiotiques) vers l'intérieur. Les porines se trouvent par groupe de trois et forment des pores ou canaux à travers la membrane externe pour le passage par diffusion libre et sélective de petites molécules, surtout des molécules hydrophiles comme les acides aminés et les sucres. Cette membrane renferme également des « **nutrient-binding proteins** » ou protéines liant les nutriments qui sont des systèmes transporteurs de certains composants nutritifs comme la vitamine B12. **PBP : penicillin-binding proteins**

- Structure de la paroi cellulaire des mycobactéries

La paroi cellulaire des mycobactéries est caractérisée par une grande richesse en lipides originaux (60 % de la paroi) ramifiés, d'un poids moléculaire élevé et constitués par des **acides mycoliques** et des **cires**. Ils sont liés à des polysaccharides et des protéines et confèrent à ces bactéries **l'alcool-acido-résistance**, propriété à la base de la coloration de ZIEHL-NEELSEN ou de KINYOUN, recommandée pour l'identification des mycobactéries.

3.3.2.3. Rôles de la paroi cellulaire

- La paroi cellulaire constitue une enveloppe (structure) rigide de la bactérie qu'elle protège contre la lyse en résistant aux variations de la pression osmotique (rôle protecteur).

- Elle permet la diffusion facilitée (perméabilité sélective) des sels et de nombreuses substances (ex. : les nutriments) à faible poids moléculaire par les porines ou par d'autres protéines dites «nutrient-binding proteins» (protéines liant les nutriments).
- Elle est le support des antigènes somatiques (pariétaux) ou de surface (antigènes O) qui constituent un moyen de diagnostic par identification sérologique des bactéries.
- La biosynthèse de la paroi (peptidoglycane) et la structure phospholipidique de la membrane externe constituent des sites d'action de plusieurs antibiotiques et antiseptiques antibactériens.

3.3.3. Capsule

La capsule est une structure facultative (inconstante) et l'enveloppe la plus externe observée chez certaines bactéries. Sa composition dépend de la bactérie considérée. La plupart de capsules sont des hétéropolymères répétitifs formés à partir des nucléotides glycosidiques par des réactions de transglycosylation. Chez *Streptococcus pneumoniae*, la capsule est constituée par de larges polymères polysaccharidiques formant des gels hydrophiles à la surface des micro-organismes. Chez certaines espèces de *Bacillus* (*B. anthracis*, *B. subtilis*), les capsules sont constituées des polypeptides (surtout des acides D-polyglutamiques).

La capsule est mise en évidence par microscopie électronique ou par la microscopie optique après **coloration négative** à l'aide de la nigrosine, du rouge Congo ou de l'encre de Chine (technique de BURRI) qui colorent le fond : la capsule, non colorée, apparaît sous l'aspect d'un halo clair et brillant autour du corps bactérien sur un fond noir. L'exposition de la capsule aux anticorps spécifiques augmente sa refractibilité et la rend ainsi plus visible. Ce processus est appelée «**Quellung**»-**reaction de NEUFELD**, car il donne l'effet d'un gonflement.

Rôles de la capsule

- La capsule est d'une importance particulière chez les bactéries pathogènes, car elle les protège de la phagocytose et augmente ainsi leur virulence.
- Elle constitue le support des antigènes capsulaires dits antigènes **K** (K = Kapsel en allemand).

3.4. Flagelles

Les flagelles sont des appendices ou filaments sinueux des cellules bactériennes ayant leur point d'insertion (de départ ou d'attachement) sur la face interne de la membrane cytoplasmique (dans le cytoplasme). Ils sont très minces ($\phi = 12 - 25$ nm) et ont une longueur de 3 - 20 μ m et sont essentiellement constitués des protéines de poids moléculaire élevé dites **flagellines**.

Les flagelles peuvent être mis en évidence au microscope ordinaire par des colorants spéciaux contenant un agent précipitant comme l'acide tannique ou au microscope électronique. Ils sont difficilement visualisés au microscope à champ noir.

3.4.1. Modes d'insertion ou dispositions des flagelles

La disposition des flagelles sur la cellule bactérienne est une caractéristique de la bactérie mobile et a de ce fait une valeur taxonomique. Les flagelles peuvent être polaires ou latéraux. Selon le mode d'insertion des flagelles, un bacille peut être

- monotriche monopolaire : un flagelle à l'une de ses extrémités (ex. : *Vibrio metschnikovii*, *Caulobacter spp.*);
- polytriche monopolaire ou lophotriche : une touffe de flagelles à l'une des deux extrémités (ex. : *Pseudomonas*, *Chromatium*);
- monotriche ou polytriche bipolaire ou amphitriche : un flagelle ou une touffe de flagelles aux deux extrémités (ex. : *Spirillum*);
- péritriche : des flagelles sur tout le corps, surtout sur les côtés latéraux du bacille (ex. : *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*).

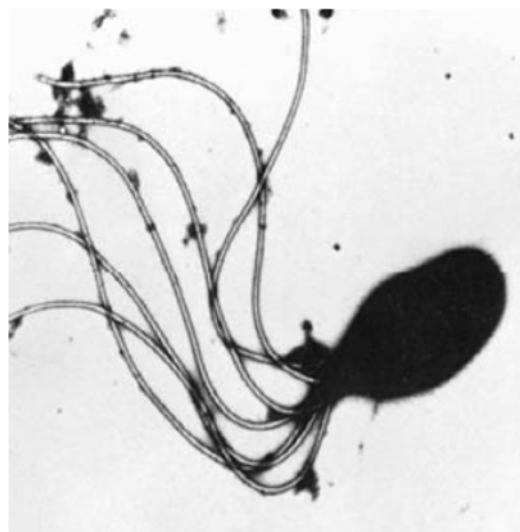
3.4.2. Rôles des flagelles

- Les flagelles sont des organes de locomotion (de mouvement) assurant la mobilité de certaines bactéries par leurs mouvements de rotation pouvant atteindre 3000 tours / min, soit une vitesse de 1,6 - 12 mm / min.
- Ils constituent le support des antigènes flagellaires dits antigènes **H** (H = Hauch en allemand = colonies en essaim; ex. : *Proteus vulgaris*). D'autres souches ne donnant pas la forme H sont immobiles et constituent la forme O portant les antigènes somatiques (de surface), dits antigènes O (O = ohne Hauch).

(a)



(b)



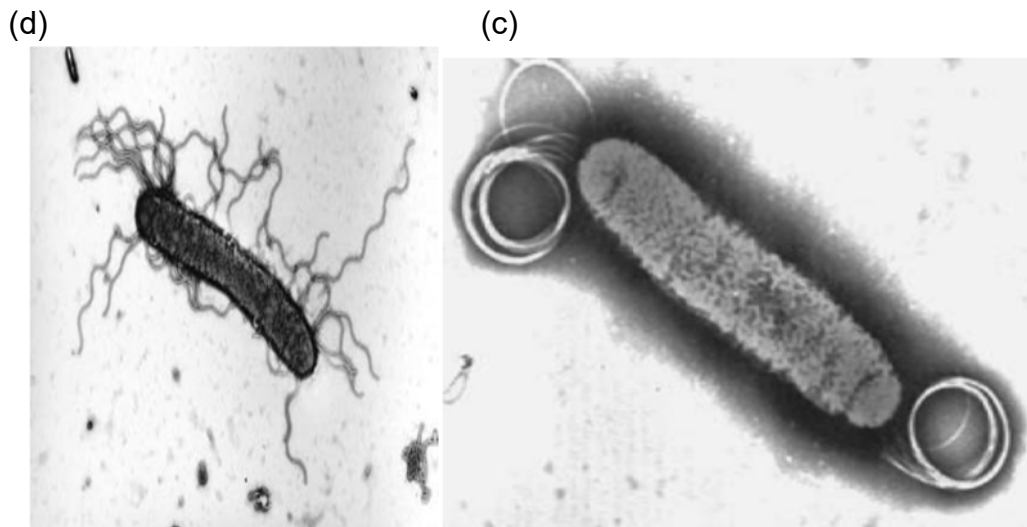


Figure : Electron micrographs depicting types of flagellar arrangements.

(a) Monotrichous flagellum on the predatory bacterium *Bdellovibrio*. **(b) Lophotrichous** flagella on *Vibrio fischeri*, a common marine bacterium (23,0003). **(c)** Unusual flagella on *Aquaspirillum* are **amphitrichous** (and lophotrichous) in arrangement and coil up into tight loops. **(d)** An unidentified bacterium discovered inside *Paramecium* cells exhibits **peritrichous** flagella.

3.4.3. Autres types de locomotion

- La mobilité de bactéries peut aussi être assurée par de mouvements de flexion (plis) du corps bactérien (ex. : les Spirochètes).
- Certaines bactéries se déplacent par des mouvements de glissement (lents) sur des surfaces solides (ex. : cyanobactéries, Mycoplasma et myxobactéries).

3.5. Pili

Les pili (pluriel de pilus en latin) sont des appendices filamenteux ou structures fibrillaires rigides, très fins, plus courts ($\leq 12 \mu\text{m}$) et plus minces ($\phi = 7 - 10 \text{ nm}$) que les flagelles qu'on observe surtout à la surface des bacilles gram-négatifs au microscope électronique. Ils ne sont pas des organes de locomotion. Ils sont constitués de protéines dites **pilines**. Les pili sont des complexes phosphate-carbohydre-protéine, constitués d'un seul type de sous-unité peptidique appelée piline.

Bacterial surface appendages that are involved in interactions with other cells but do not provide locomotion, except for some specialized pili.

On distingue deux types de pili :

- Les pili communs ou somatiques ou **fimbriae** (100 - 200 / bactérie) jouent un rôle dans l'adhérence bactérienne aux surfaces des cellules épithéliales des tissus eucaryotes. Ils constituent ainsi un facteur de virulence pour les bactéries (exemple :

pili P d'*Escherichia coli* des voies urinaires) et aussi le support des propriétés hémagglutinantes observées chez certaines bactéries.

Chez des bactéries à Gram positif, on observe des **protéines fibrillaires de surface**, assimilables à des fimbriae, se présentant sous forme de monomères ou polymères associés aux acides lipoteichoïques et jouant aussi un rôle dans l'adhérence (exemple : protéine A de *S. aureus*, protéine M de *S. pyogenes*).

- Les pili sexuels ou **F-Pili** (1 - 2 / bactérie) constituent des tuyaux vides de protéines de 0,5 - 10 µm de long qui permettent le transfert par conjugaison du matériel génétique (ex. : le facteur sexuel F ou les facteurs de résistance R) de la cellule donatrice ou mâle vers la cellule femelle ou réceptrice.

3.6. Spore

La spore est une structure qui permet à certaines bactéries dites sporogènes ou sporulées de survivre quand les conditions de vie deviennent défavorables (froid, chaleur, dessiccation). Elle constitue ainsi la forme de résistance et de conservation de la cellule bactérienne.

La spore est constituée d'un cytoplasme contenant le DNA bactérien qui est entouré, de l'intérieur vers l'extérieur, de plusieurs enveloppes très épaisses et rigides : la membrane et la paroi sporales, le cortex et les deux tuniques (manteaux).

Par sa localisation, la spore peut être

- centrale
- subterminale
- terminale

La spore permet à la bactérie de résister à la chaleur (thermorésistance) de stérilisation, aux antibiotiques et à certains antiseptiques.

CHAPITRE V : CHAMPIGNONS

1. GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS

1.1. Définitions

La Mycologie est la branche de la Microbiologie qui étudie les champignons. Ce terme dérive du mot grec «*mykes*» qui signifie champignon (comestible).

Les champignons (fongus ; pluriel, fungi) sont des microorganismes eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires, aérobies stricts ou facultatifs, qui possèdent un ou plusieurs noyaux entourés d'une membrane nucléaire et un cytoplasme entouré d'une membrane cytoplasmique et d'une paroi cellulaire. Par contre, ils ne contiennent pas des pigments photosynthétiques comme la chlorophylle. Ils sont ainsi des chimio-organotrophes ou chimio-hétérotrophes (C-hétérotrophes) vivant en saprophytes, (organismes se nourrissant de matières organiques en décomposition), en symbiotes (deux organismes vivant en association favorable pour les deux), en commensaux (deux organismes vivant en relation bénéfique pour l'un et non pour l'autre) ou en parasites (organismes vivant aux dépens de son hôte et en lui étant nuisibles). Ils sont unicellulaires (levures de 2 - 8 µm de ϕ) ou pluricellulaires (hyphae ou hyphes : filaments branchés de 2 - 10 µm de ϕ).

Il existe environ 250 000 espèces de champignons dont presque 150 sont connues comme pathogènes de l'homme.

1.2. Habitat

Les champignons occupent plusieurs niches écologiques dans l'environnement. Selon leur origine, on a

- des champignons exogènes : en général, les champignons vivent librement et en abondance dans la nature : sol, plantes, air, eau (ex. : lieux de bain),...
- des champignons endogènes : un petit nombre de champignons sont rencontrés dans la flore normale des êtres humains : muqueuses, téguments (peau, poils), organes.

1.3. Rôles

- Les champignons sont des pathogènes potentiels pour les êtres vivants (homme, animal et plante), chez qui ils causent des maladies.

- Ils contribuent à la dégradation des aliments, des textiles et de plusieurs matières synthétiques.
- Ils jouent un rôle dans la décomposition des restes complexes des animaux et des plantes dans le sol, en les dégradant en petites molécules pouvant être absorbées par les plantes des générations futures.
- Ils sont bénéfiques pour l'homme :
 - * production industrielle d'antibiotiques, des acides organiques, des stéroïdes et des produits de fermentations (ex. : alcools, boissons alcoolisées) ;
 - * production de CO₂ utile pour la fabrication du pain ou des aldéhydes, cétones et acides organiques dans le lait pour la préparation des fromages ;
 - * ils servent de modèle dans l'étude de la génétique, des processus biochimiques et des relations hôte-parasite.

1.4. Pathogénicité

Les champignons sont responsables des affections suivantes chez l'homme :

- 1) les mycotoxicoses dues aux **mycotoxines** produites par certains champignons ;
ex. : aflatoxines produites par *Aspergillus flavus*; *Claviceps purpurea* qui parasite l'ergot de seigle et produit des alcaloïdes (amides simples de l'acide lysergique et ergopectines) dont certains sont bénéfiques pour l'homme (ergométrine, ergotamine utilisées en médecine) et d'autres toxiques (néfastes : LSD ou diéthylamide de l'acide lysergique ou LSD25 ou lysergide, ergotoxine), car pouvant induire des nécroses des tissus (gangrène, ...) ;
- 2) les maladies d'hypersensibilité dues à l'inhalation des spores des champignons ;
ex. : pneumonite : rhinite, asthme bronchique, alvéolite,...;
- 3) les mycoses qui sont des maladies de colonisation causées par des infections des tissus et organes par des champignons :
 - mycoses superficielles et cutanées qu'on retrouve à la surface des muqueuses et de l'eau, dans l'épiderme, aux cheveux et aux ongles ;
 - mycoses sous-cutanées qui attaquent le derme, les tissus sous-cutanés, les muscles,...
 - mycoses systémiques ou profondes qui se rencontrent au niveau de différents organes et des viscères (langue, gorge, bronches, tube digestif, poumons, méninges) ainsi que dans le sang.

2. STRUCTURE ET REPRODUCTION

2.1. Structure cellulaire

Les champignons possèdent une structure typique des cellules eucaryotes :

- un cytosol complexe contenant des macro- et microvésicules, des microtubules, des ribosomes de 80 S, des mitochondries, un appareil de Golgi, un réticulum endoplasmique à double membrane, des noyaux et d'autres structures;
- les noyaux sont entourés par une membrane nucléaire qui, à l'encontre de celle des cellules animales et végétales, persiste pendant le cycle mitotique.
- le cytosol est entouré d'une autre membrane appelée plasmalemm ou membrane cytoplasmique, composée des glycoprotéines, des lipides et **d'ergostérol** (et non de cholestérol comme chez les cellules des mammifères \Rightarrow action des antifongiques);
- une paroi cellulaire rigide et à plusieurs couches entoure le plasmalemm et contient la **chitine**, un polymère de N-acétylglucosamine. Des polysaccharides complexes en association avec des polypeptides forment des couches sur la chitine. Cette paroi peut aussi contenir de la **cellulose** à la place de la chitine (ex. : chez les champignons inférieurs comme les *Oomycetes*).
- certains champignons produisent une capsule polysaccharidique qui constitue une structure isolant l'organisme du milieu environnant. Cette structure capsulaire ainsi que la paroi cellulaire déterminent la virulence et jouent un rôle dans l'obtention des réponses immunes de l'hôte (ex. : *Cryptococcus neoformans*).

2.2. Morphologie et reproduction

Les champignons peuvent être divisés en deux groupes morphologiques :

- sphériques ou ovoïdes (levuviformes) : **levures** ;
- filamenteux ou mycéliens : **hyphae** (hyphes) ou **moisissures**.

Ces deux phases sont fréquemment présentes simultanément dans des cultures en croissance et ne peuvent pas être aisément séparées.

La morphologie des champignons n'est pas fixe ; car, certains (ex. : *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*) peuvent exister en morphologie mycélienne ou levuriforme (dimorphisme) en fonction des conditions environnementales de croissance (dans le sol, sur la végétation en décomposition ou dans les tissus de l'hôte).

2.2.1. Levures (« YEASTS »)

Ce sont des formes unicellulaires rondes ou ovales de 2.5 à 6 µm de ϕ qui se reproduisent asexuellement par bourgeonnement ou par fission binaire.

- *Bourgeonnement* à partir de la cellule-mère par formation de blastoconidies (bourgeons ; conidie : spore asexuée externe) : ex.: *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*.

Les blastoconidies peuvent rester attachées à la cellule-mère, continuer à bourgeonner (assemblage bout à bout des bourgeons) et former des clusters (amas) de blastoconidies constituant ainsi une chaîne qui s'allonge en filaments appelés **pseudo-hyphæ** pouvant former un **pseudomycelium** (fausse filamentation ou hyphae non cloisonné) ex. : *Candida albicans*, *Mucorales*.

- *Fission* : scission binaire de la cellule-mère comme chez les bactéries : ex. : *Schizosaccharomyces pombe*.

Les levures constituent une partie de la flore commensale de la surface corporelle et du tractus gastro-intestinal. Elles sont en outre la cause la plus commune des infections humaines dues aux champignons (*Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*). L'incidence des infections à levures a sensiblement augmenté avec l'avènement des antibiotiques à large spectre, des corticoïdes immunodépresseurs et des agents anticancéreux. Ces infections consistent en des affections bénignes et localisées, aussi bien passagères que chroniques, ou disséminées et parfois fatales.

2.2.2. Champignons filamenteux : Moisissures

2.2.2.1. Structure des champignons mycéliens

La plupart de champignons sont constitués des filaments tubulaires et branchés dits hyphae qui s'allongent à leurs extrémités par un processus appelé extension apicale. Ces structures filamenteuses sont soit coenocytiques (creuses non cloisonnées et multinucléées), soit segmentées par des cloisons transversales dites septum.

L'ensemble de masse des hyphae est appelé mycelium qui constitue le corps végétatif du champignon filamenteux et correspond au thallus des champignons supérieurs. Un hyphae végétatif est un hyphae qui croît à l'intérieur du milieu de culture ou à sa surface. Un hyphae aérien se projette au-dessus de la surface du milieu de culture en produisant des structures spécialisées dites *conidies* et qui sont des spores asexuées (externes) disséminées dans l'air et dans l'environnement.

2.2.2.2. Reproduction des champignons mycéliens

Les modes de reproduction sont variés : sexué ou asexué. Tous les champignons se reproduisent par des processus asexués et la plupart le font par des mécanismes sexués. La phase ou la forme asexuée observée chez un champignon isolé est dite anamorphe, tandis que la phase ou la forme sexuée est qualifiée de téléiomorphe. Le champignon entier est appelé collectivement holomorphe. Certains champignons produisent plus d'un anamorphe. Si un champignon isolé produit plus d'un anamorphe, le terme synanamorphe est utilisé pour désigner toutes les formes existantes concurremment. Exemple, *Scedosporium* et *Graphium* sont des synanamorphes du téléiomorphe *Pseudallescheria boydii*. Ces deux termes, **anamorphe** et **téléiomorphe**, sont souvent utilisés pour décrire le statut taxonomique du microorganisme dans la nomenclature. En clinique, on se réfère généralement à des désignations asexuées, car l'état anamorphe est isolé des échantillons cliniques, tandis que la phase sexuée se rencontre sous des conditions de culture bien contrôlées.

The fungi we have looked at thus far are teleomorphs; that is, they produce both sexual and asexual spores. Some ascomycetes have lost the ability to reproduce sexually. These asexual fungi are called anamorphs. *Penicillium* is an example of an anamorph that arose from a mutation in a teleomorph.

2.2.2.2. a) Reproduction sexuée

Elle se fait, comme chez les eucaryotes, par la fusion des deux noyaux haploïdes portant respectivement des gamètes mâle et femelle (caryogamie) qui se produit après celle des deux protoplastes (plasmogamie).

Les gamètes mâle et femelle peuvent provenir soit

→ d'une même spore ou d'un même mycelium (thallus) : champignons homothalliques ou hermaphrodites;

→ des spores ou mycelia (thallus) différents : champignons hétérothalliques.

Les spores sexuées résultent de la méiose : les noyaux méiotiques se trouvent à l'intérieur ou à la surface des cellules fonctionnant comme des spores (ascospores, basidiospores, ...).

* Types de spores sexuées

1. Zygospores : Chez certains *Zygomycetes*, les tiges des hyphae voisins fusionnent, la méiose se produit et une large cellule à enveloppe épaisse se développe. (ex. : *Rhizopus*)

2. Ascospores : 4 - 8 spores se forment à l'intérieur d'une cellule spécialisée appelée ascus (asque), dans laquelle la méiose s'était produite (ex.. : *Ascomycetes*).

3. Basidiospores : 4 spores se forment après la méiose à la surface d'une cellule spécialisée appelée basidium. (ex. : *Basidiomycetes*).

4. Oospores : spores produites par la fusion des cellules différentes entraînant l'union d'un petit gamète mâle et d'un gamète femelle (ex. : *Oomycetes*).

2.2.2.2. b) Reproduction asexuée

Elle se fait généralement par la formation des spores, organes essentiels de reproduction, par des parties bien déterminées de l'hyphae. On distingue les structures spécialisées suivantes:

→ les conidies sont des spores asexuées externes nues et immobiles, formées au bout (au sommet, à l'extrémité) de l'hyphae (du conidiophore); ex. : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Microscoporum* (*Ascomycetes*, *Deuteromycetes*);

→ les sporangies ou sporangiospores sont des spores asexuées internes formées au sommet du sporangiophore de l'hyphae, à l'intérieur d'une structure appelée sporangium; ex. : *Rhizopus*, *Mucor* (*Zygomycetes*);

→ les arthrospores sont des spores formées de la désintégration du mycelium ou de l'hyphae, chaque segment constituant une spore qui se développe en un nouvel hyphae; ex. : *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Coccidioides*;

→ les chlamydospores ou chlamydoconidies (chlamy du grec = manteau) sont des spores rondes et à enveloppe épaisse formées des cellules terminales ou intercalées dans l'hyphae; ex. : *Candida albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*.

* Spores asexuées formées par certains champignons

1. Conidies (konis du grec = poussière)

Ce terme est utilisé parfois génériquement pour toutes les spores asexuées, parfois plus spécifiquement pour les spores asexuées externes formées singulièrement (seules) ou au sommet (bout) des branches de l'hyphae (conidiophores).

2. Aleurioconidies ou Aleuriospores (aleuron du grec = blé, céréales)

Spores ou conidies produites seules comme des éclatements des conidiophores sur des branches latérales courtes ou directement sur l'hyphae; ex. : *Blastomyces dermatitidis*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Chrysosporium*, *Histoplasma*.

3. Arthroconidies ou Arthrospores : (arthron du grec = joint, articulation)

Conidies ou spores en forme de cellules cylindriques formées par fragmentation (double septation) de l'hyphae en cellules individuelles; ex. : *Geotrichum spp.*, *Coccidioides*.

4. Blastoconidies ou Blastospores (grec blastos = bourgeon)

Conidies en forme de bourgeons provenant de conidiophores préexistants ou des cellules-mère levuriformes; ex. : *Cladosporium spp.*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Xylohypha*.

5. Annelloconidies ou Anellospores

Conidies produites comme des blastoconidies dans la séquence d'un conidiophore (annellide) qui s'allonge après la production de chaque conidie, laissant une cicatrice circulaire (annulus) sur chaque surface extérieure à l'endroit où chaque conidie a été produite; ex. : *Scopulariopsis spp.*, *Exophiala*, *Phaeoannellomyces*, *Scedosporium*.

6. Poroconidies ou Porospores

Conidies produites à travers des pores du conidiophore; ex. : *Drechslera spp.*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Exserophilum*.

7. Phialoconidies ou Phialospores

Conidies produites à l'intérieur d'un conidiophore (phialide) qui, notablement, ne s'allonge pas; ex. : *Phialophora verrucosa*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Malassezia*, *Lecythophora*.

8. Sporangiospores (grec angeion = récipient, bâtiment)

Spores internes se trouvant dans des structures en forme de sac (sporangies) au bout de l'hyphae ou sur des branches spéciales de l'hyphae (sporangiophores); ex. : *Phycomyces*.

9. Chlamydospores (chlamy du grec = manteau)

Spores rondes et à enveloppe épaisse formées des cellules terminales ou intercalées de l'hyphae; ex. : *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*.

3. CLASSIFICATION DES CHAMPIGNONS

Les champignons sont des eucaryotes non photosynthétiques qui étaient initialement classés dans le règne végétal, ensuite dans celui des protistes et enfin transférés dans un cinquième règne distinct des autres sur base de leur structure cellulaire : Règne des **MYCETAE (FUNGI)**.

La nomenclature des champignons se fait selon le Code International de Nomenclature Botanique (1987). La morphologie joue un rôle important dans l'identification des champignons (surtout des moisissures). Beaucoup de champignons d'importance médicale peuvent se trouver sous les deux morphologies, levuriforme et mycélienne. Un champignon est dit dimorphe, si sa forme tissulaire diffère de celle rencontrée dans la nature. Si d'autres formes sont présentes, le terme polymorphe ou pléiomorphe peut être appliqué.

Le règne des Champignons MYCETAE est subdivisé en six classes réparties en 2 groupes :

- Champignons inférieurs ou **PHYCOMYCETES** comprenant les classes suivantes :

- **Zygomycetes** (Sous-division : Zygomycotina)
- **Oomycetes** (Sous-division : Diplomastigomycotina)

- Champignons supérieurs ou **EUMYCETES** ayant les classes suivantes :

- **Ascomycetes** (Sous-division : Ascomycotina)
- **Archiascomycetes** (Sous-division : Ascomycotina ; *Pneumocystis*)
- **Basidiomycetes** (Sous-division : Basidiomycotina)
- **Deuteromycetes** ou Fungi Imperfecti (Sous-division : Deuteromycotina)
- **Chytridomycetes**

Historically, fungi whose sexual cycle had not been observed were put in a "holding category" called **Deuteromycota**. Now, mycologists are using rRNA sequencing to classify these organisms. Most of these previously unclassified deuteromycetes are anamorph phases of Ascomycota, and a few are basidiomycetes.

Most *water molds*, or **Oomycota**, are decomposers. They form the cottony masses on dead algae and animals, usually in fresh water. Asexually, the oomycetes resemble the zygomycete fungi in that they produce spores in a sporangium (spore sac). However, oomycete spores, called zoospores (Figure 12.14b), have two flagella; fungi do not have flagella. Because of their superficial similarity to fungi, oomycetes were previously classified with the fungi. Their cellulose cell walls always raised the question about their relationship to algae, and recent DNA analyses have confirmed that oomycetes are more closely related to diatoms and dinoflagellates than to fungi. Many of the terrestrial oomycetes are plant parasites.

CHAPITRE VI: VIRUS

1. DEFINITION DES VIRUS

Le terme « **virus** » (en latin = poison), longtemps utilisé comme synonyme « d'agent infectieux », se rapporte aux agents non cellulaires plus petits que les bactéries, qui constituent des unités (entités) biologiques composées d'un seul acide nucléique (DNA ou RNA) et des protéines. Ils sont parfois considérés comme des « microorganismes » non cellulaires. Certains peuvent être des germes potentiels des maladies infectieuses. Le virion est la particule virale en dehors de la cellule-hôte.

Les virus n'ont pas de structure cellulaire et ne possèdent pas leur propre métabolisme. Ils sont ainsi incapables de produire seuls de l'énergie, de croître et de se reproduire. Ils nécessitent pour ces fonctions **une cellule hôte vivante** (eucaryote ou procaryote). Leur acide nucléique contient les informations nécessaires à la synthèse des macromolécules par la cellule infectée. Les virus constituent ainsi des **parasites intracellulaires obligatoires**.

Le premier virus reconnu pathogène pour les plantes, le virus de la mosaïque du tabac, membre du groupe bactériologiques des « virus ou filtrables » ou ultrafiltrables (qui passent à travers les filtres bactériologiques), fut découvert indépendamment par IWANOVSKI en 1892 en Russie et par BEIJERINCK en 1899 en Hollande. Des virus filtrables des animaux furent démontrés pour la première fois pour les maladies des pattes et de la bouche des boeufs (Aphtovirus) et le virus de la rage par LOEFFLER et FROSCHE en 1897. Le premier virus d'une maladie humaine, la fièvre jaune, fut découvert par la Commission de l'armée américaine sous la direction de Walter REED en 1900.

Les virus qui infectent des bactéries sont des **bactériophages** et furent découverts par TWORT (1915-1916) en Angleterre et par d'HERELLE (1917) en France. Cette découverte a offert un important système de modèles pour des investigations en virologie fondamentale.

La Virologie est la branche de la Microbiologie qui étudie les virus. Elle a évolué comme une discipline scientifique depuis cette découverte de Loeffler et Frosch. La virologie a contribué au développement de la biologie moléculaire et aussi à la création de la génétique moléculaire.

2. STRUCTURE DES VIRUS

2.1. Morphologie générale

Le virion (ou particule virale : 10 - 300 nm) est constitué d'un acide **nucléique mono-** ou **bicaténaire** (DNA ou RNA : le core) entouré d'une coque de matière protéique appelée **capside**. L'ensemble capsid et acide nucléique, la nucléocapside, peut se présenter

nu, (ex. : Virus de la mosaïque de tabac, virus de la verrue, Adénovirus, Papovavirus, Reovirus, Pavrovirus), ou

enveloppé, c'est-à-dire entouré d'une enveloppe membranaire extérieure (ex. : Influenzavirus, Herpesvirus, Togavirus, Rhabdovirus, Rétrovirus, Paramyxovirus,...).

2.2. Le génome viral

Contrairement aux bactéries et autres micro-organismes, le génome des virus n'est constitué que d'un seul type d'acide nucléique, le DNA ou le RNA, qui peut être à simple brin (monocaténaire) ou à double brin (bicaténaire), segmenté ou non, linéaire ou circulaire. Son poids moléculaire varie largement :

- pour les virus à DNA : de 2×10^6 D (Hepadnaviridae) à 160×10^6 D (Poxviridae), et
- pour les virus à RNA : de 2×10^6 D (Picornaviridae) à 15×10^6 (Reoviridae).

La quantité de l'information génétique par virion varie d'environ 3 à 300 Kb (kilobases) par brin. Si 1 Kb est prise comme la taille moyenne d'un gène, les petits virus contiennent alors 3 ou 4 gènes et les gros virus quelques centaines de gènes. De cette pauvreté de l'information génétique chez le virion résulte son parasitisme intracellulaire absolu, car ce nombre restreint de gènes

1°) empêche les virus de coder la synthèse de différentes enzymes du métabolisme intermédiaire, des RNA de transfert, et des ribosomes;

2°) explique aussi la structure polymérisée des capsides virales où seule l'accumulation de nombreux exemplaires d'une même protéine ou de quelques protéines différentes permet de construire une capsid au prix d'une dépense génétique limitée compatible avec les possibilités de codage très réduites du virus.

La composition de l'acide nucléique est limitée soit à une seule molécule de polynucléotide ou chromosome (DNA ou RNA non segmenté ou non fragmenté, ex. :

Picornavirus), soit à plusieurs chromosomes séparés (DNA ou RNA segmenté ou fragmenté, ex. : Orthomyxovirus).

La plupart de virus à DNA ayant une importance clinique chez les hommes ont des molécules de DNA à double brin présentant une structure générale similaire aux chromosomes des cellules eucaryotes (segmentés). Cependant, la plupart de virus à RNA ont un génome ayant des molécules à simple brin (haploïdes), à l'exception des Reovirus (respiratory enteric orphan virus) et des Retrovirus qui eux ont des molécules de RNA à double brin (diploïdes).

2.3. La capside virale

La capside est composée de protomères ou des capsomères qui sont des unités de structure de nature protéique, rangées symétriquement et constituées d'un seul (protomères) ou de plusieurs types (capsomères) de polypeptides.

Selon la disposition (l'arrangement) des capsomères et des protomères, la structure de la capside présentera une symétrie

- hélicoïdale (bâtonnet spiralé ou filamenteux) : virions hélicoïdaux à capsides tubulaires ou filamenteux ou cylindriques (ex. : Paramyxovirus, Rhabdovirus, Orthomyxovirus, bactériophage M13, tabac mosaïc virus,...);
- cubique (polyèdre régulier) : virions (ou capsides) cubiques ou icosaédriques ressemblant à des petits cristaux (ex. : Picornavirus, Reovirus, Adenovirus, Papovavirus, bactériophages ϕ x 174 coliphage f2);
- complexe : virions à structure plus complexe, (morphologie compliquée et contenant des lipides) : ni cubique, ni hélicoïdale souvent sphérique, en forme d'une balle (ex. : Retrovirus, Arenavirus, Poxivirus : virus de la variole et de la vaccine...).

Dans les capsides icosaédriques, les unités de structure sont généralement regroupées en oligomères (monomères de protéines) appelés capsomères, régulièrement disposés. Le nombre de capsomères est le même pour chaque type de capsides, c'est-à-dire pour les virus d'une même espèce, et varie d'un type à l'autre de capsides (espèces). La plupart des virus icosaédriques ont un capsomère à 5 unités de structure ou penton (5 protomères = pentamère) sur chacun de 12 sommets de l'icosaèdre et des capsomères à 6 unités de structure ou hexons (6 protomères = hexamère) sur les faces et les arêtes.

Caractéristiques :

- diamètre de la capside et
- nombre fixe de capsomères.

Dans les capsides hélicoïdales, les unités de structure appelées protomères consistent en un seul type de protéine. Elles ne se regroupent pas en capsomères, mais toutes équivalentes, elles s'empilent en colimaçon, maintenant l'acide nucléique enroulé entre deux tours de spires. Le tube creux ainsi obtenu garde chez certains virus des plantes un aspect rigide en bâtonnet, alors que chez les virus des animaux, ce tube, flexible, s'enroule sur lui-même en un peloton.

Caractéristiques : longueur et diamètre du tube de la capside.

2.4. Les enveloppes virales

Les enveloppes virales appartiennent à deux types de structure :

- les enveloppes membranaires ou **peplos** (du grec : manteau) : terme proposé par Lwoff et Tournier;
- les enveloppes plus complexes (Poxviridae, virus de l'hépatite B).

L'enveloppe étant une structure souple (non rigide), les virus à enveloppes sont donc pléiomorphes et ont des structures variables dans les différentes conditions expérimentales.

Le peplos, comme la plupart de membranes biologiques ou cellulaires, comprend une double couche de lipides (lipid bilayers) et les protéines structurales ou intégrales : la matrice protéique et non structurales : les glycoprotéines.

Les glycoprotéines sont exposées vers la surface extérieure des virions et sont reconnues au microscope électronique comme des spicules protéiques (spikes) appelées **péplomères**. Les spicules présentent parfois des propriétés hémagglutinantes (hémagglutinines) sur les globules rouges ou une activité de la neuraminidase (hydrolyse de l'acide sialique de la paroi ou de la membrane cellulaires).

Les protéines de matrice, non glycosylées, qui forment une couche à la surface intérieure de l'enveloppe chez les Orthomyxovirus, Paramyxovirus et Rhabdovirus, semblent établir une connexion entre l'enveloppe et la capside des virions.

Les protéines de l'enveloppe, comme celles de la capside, sont d'information virale et contribuent aux spécificités antigéniques majeures des virions. Les lipides et les carbohydrates, cependant, proviennent de la cellule hôte et sont souvent différents dans un même virus cultivé sur des cellules différentes.

La formation du peplos se fait par bourgeonnement de la membrane cytoplasmique (ex. : Mixoviridae) ou de la lamelle interne de la membrane nucléaire (ex. : Herpesviridae).

L'enveloppe lipoprotéique entoure la nucléocapside et joue un rôle important dans l'attachement et la pénétration des virions dans la cellule hôte. Sa présence ou son absence peut être utile pour le diagnostic. Les virus qui possèdent une enveloppe sont particulièrement susceptibles à l'inactivation par plusieurs solvants organiques (ex. : éther) et leur exposition à ces solvants peut, en peu de temps, réduire leur infectivité.

3. RÉPLICATION ET MULTIPLICATION DES VIRUS

Les virus ne croissent pas et ne se divisent pas. Etant des parasites intracellulaires stricts, ils ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule hôte. Ils utilisent pour ce fait le système producteur d'énergie, les RNA de transfert et les ribosomes de la cellule. Le virus n'apporte que l'information génétique nécessaire à la fabrication, par la cellule hôte, des molécules qui le constituent. Ce détournement de voies métaboliques cellulaires s'accompagne le plus souvent d'une diminution ou d'une inhibition complète (mort) des synthèses cellulaires.

3.1. Mécanismes de l'infection virale

Le cycle complet de l'infection ou de la multiplication virale comprend, au niveau cellulaire, plusieurs étapes qui sont communes à tous les virus des animaux :

(1) attachement du virion à la surface de la cellule hôte, (2) pénétration du génome viral et décapsidation, (3) réplication biochimique, (4) assemblage ou maturation des virus, et (5) libération des virus néoformés (infectieux).

3.1.1. L'attachement ou l'adsorption (fixation)

Virus et cellule entrent en contact lors d'une collision fortuite. L'attachement implique dans un premier stade les interactions électrostatiques (de nature ionique) entre des récepteurs spécifiques de nature protéique de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte et les macromolécules de la surface virale. Cette liaison est réversible par changement de pH ou de concentration en sels. La présence de ces récepteurs est déterminée génétiquement; si un type de récepteur est absent, la cellule sera naturellement résistante à l'infection par le virus correspondant, ce dernier ne pouvant se fixer sur elle.

Le second stade de l'attachement est considérablement ferme (solide) et irréversible grâce à un renforcement ultérieur des liaisons, dû peut être à une redistribution des récepteurs à la surface cellulaire. Il peut même causer des altérations dans la structure de la capsid virale.

3.1.2. La pénétration du génome viral dans la cellule et la décapsidation

Lors de la pénétration cellulaire des virus animaux, c'est la nucléocapside virale dans sa totalité qui franchit la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote, alors que seul l'acide nucléique des bactériophages est injecté à travers la paroi de la bactérie.

Les virus nus pénètrent par pinocytose et sont d'abord contenus dans des vacuoles intracytoplasmiques (phagocytose-like vesicles) avant d'arriver à leur site de multiplication. Les virus à peplos, par contre, pénètrent par fusion (fusion-lyse) de l'enveloppe virale et de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte, ce qui introduit la nucléocapside directement dans le cytoplasme. Les virus complexes, comme les Poxvirus, qui possèdent une double enveloppe, pénètrent dans le cytoplasme de la cellule hôte par phagocytose. L'enlèvement de l'enveloppe externe est déterminé par des facteurs cellulaires tandis que celui de l'enveloppe interne est dirigé par le virion seul. La pénétration est un phénomène actif dépendant de la température.

La décapsidation ou la désagrégation de la capsid, qui libère l'acide nucléique, peut se faire en même temps que la pénétration ou plus tardivement; elle peut être totale ou partielle (ex. : reovirus) et est principalement déterminée par les facteurs cellulaires et, éventuellement, par des protéines d'information virale.

3.1.3. La réplication biochimique des composants viraux

Elle commence après la libération de l'acide nucléique dans la cellule. Le mécanisme de la réplication biochimique des composants viraux varie et une simple généralisation simple inadéquate. Il repose sur deux processus fondamentaux : la réplication du génome viral et la transcription de RNA messagers viraux qui sont traduits en protéines virales par les ribosomes cellulaires en utilisant l'ATP cellulaire, les RNA de transfert et de nombreuses enzymes. A ce stade commence la phase d'éclipse, car le virus a cessé d'exister en tant que particule organisée et naturellement infectante.

Pour les virus à DNA : une première transcription conduit à la synthèse d'un lot de protéines dites précoces ou non structurales, intervenant en particulier dans la synthèse du DNA viral mais généralement non incorporées dans la particule virale (ex. : enzymes de la réplication du génome virale). Le DNA répliqué (dans le noyau cellulaire), une transcription tardive aboutit à la synthèse de protéines structurales (de structure) ou virioniques, incorporées dans l'édifice (structure) viral.

Pour les virus à RNA : si le RNA génomique a la structure d'un RNA messager (virus à RNA de polarité positive), il est immédiatement traduit en protéines par les ribosomes cellulaires. Dans le cas contraire d'un virus à RNA de polarité négative (antimessager), il ne peut être lu directement par les ribosomes et doit être transcrit, au préalable, en un RNA complémentaire positif qui sera le messager par une transcriptase virionique.

3.1.4 L'assemblage et la maturation des virus

C'est un auto-assemblage à partir des composants fabriqués séparément qui conduit à la formation des virions végétatifs infectants. Du fait d'une synthèse en excès, une partie reste inutilisée. Successivement ou simultanément surviennent l'assemblage de la capside à partir des protéines capsidales et son association à l'acide nucléique par une interaction de nature biophysique ne requérant ni l'intervention des enzymes spécifiques ni un apport d'énergie.

Les virus à péplos tirent leur enveloppe des membranes cellulaires, cytoplasmique ou nucléaire, qui sont modifiées par l'adjonction de protéines virales : glycoprotéines sur la face externe de la membrane, protéines de matrice sur sa face interne.

L'assemblage peut se faire dans le noyau ou dans le cytoplasme de la cellule hôte. La région cellulaire de l'assemblage ou de maturation des virus est spécifique pour chaque type de virus.

3.1.5. La libération des virus néoformés

La libération des virus nus se fait par l'éclatement (lyse) de la cellule, tandis que celle des virus à péplos se fait par bourgeonnement à travers la membrane cellulaire : la nucléocapside détermine au sein de cette membrane porteuse de protéines virales une évagination qui s'isole ensuite dans le milieu extérieur, et permet ainsi l'acquisition de l'enveloppe.

L'apparition de virus complets dans les cellules et dans le milieu extracellulaire marque la fin de la période d'éclipse : ces virus néoformés peuvent à leur tour infecter d'autres cellules et initier de nouveaux cycles de multiplication.

3.2. Aspects cellulaires de la multiplication virale

L'expression des gènes viraux dans cellule infectée peut entraîner diverses modifications cellulaires qui définissent les différentes modalités de l'interaction entre le virus et son hôte.

3.2.1. Cycle productif ou lytique

Il about à la mort cellulaire. Au sein de la cellule, l'inhibition des synthèses, la fragmentation des chromosomes par des enzymes viro-induites et l'accumulation des composants viraux conduisent à des lésions dégénératives et à la lyse terminale, par le biais d'une activation des lysosomes. Cela aboutit à la destruction des cellules avec production d'un effet cytopathique (ECP). L'ECP est défini par des altérations morphologiques des cellules infectées, directement observables en microscopie optique : la nappe cellulaire est détruite, les cellules sont ballonisées ou rétractées, leur réfringence est augmentée : on obtient des plages de lyse dans un tapis cellulaire.

L'apparition des protéines virales dans les cellules infectées ou à leur surface peut être mise en évidence par immunofluorescence. Les virus hémagglutinants peuvent être détectés grâce à la capacité de la nappe cellulaire infectée de fixer les hématies à l'aide de l'hémagglutinine se trouvant à la surface de la cellule.

3.2.2. Cycle abortif

C'est un cycle de multiplication qui, après la pénétration du génome viral, s'arrête prématurément et n'aboutit pas à la production de virus. C'est le propre des cellules non permissives provenant dans la plupart des cas d'un animal qui n'est pas l'hôte naturel du virus (ex. : cellules simiennes pour les adénovirus humains). Ces cellules s'avèrent incapables d'exprimer entièrement le programme des synthèses virales. Il n'y a pas d'altérations morphologiques des cellules infectées.

3.2.3. Transformation cellulaire

L'infection transformante est le résultat de l'intégration du génome viral au génome cellulaire, intégration stricto sensu dans la continuité du DNA cellulaire ou sous forme d'un épisome. Ainsi, l'expression de certains gènes viraux ne provoque pas la mort cellulaire mais, au contraire, donne à la cellule des caractères propres aux cellules malignes, en particulier une vitesse de croissance accrue et l'immortalité : il y a immortalisation et modifications morphologiques et fonctionnelles des cellules infectées. Le virus responsable est dit oncogène (virus de cancer). Il persiste sous sa forme intégrée dans la cellule et dans toute sa descendance (présence d'antigènes viraux dans la cellule transformée).

3.2.4. Infections virales persistantes

La cellule infectée continue de vivre en hébergeant un virus dont le niveau d'expression est variable, allant de la latence à l'infection chronique productive.

Dans l'infection endosymbiotique, toutes les cellules de la culture sont le siège d'une infection tempérée : elles produisent des virus sans être détruites et continuent à se diviser, donnant des cellules filles elles aussi productrices. Il n'y a pas de modification cellulaire évidente. Il pourrait s'agir d'une forme d'intégration du génome viral sans transformation ou d'une incapacité du virus à bloquer le métabolisme de son hôte (état de latence : pas de production virale).

Dans l'infection lytique compensée (carrier state), seule une faible partie de la population cellulaire est infectée par un virus lytique qui, une fois libéré, peut infecter d'autres cellules. Il y a destruction d'une fraction de la population cellulaire sans ECP évident. Ce processus reste limité du fait d'un équilibre entre la production du virus et la multiplication des cellules saines et, sans doute aussi, du fait de la résistance à l'infection d'une partie des cellules (infection chronique productive).

4. PATHOGÉNICITÉ DES VIRUS

Les virus présentent deux propriétés qui expliquent que les virus sont des agents infectieux, pathogènes :

- les virions produits dans une cellule peuvent envahir d'autres cellules et provoquer ainsi une infection propagée ;
- les virus causent d'importantes altérations morphologiques et fonctionnelles des cellules infectées, conduisant souvent à la mort de celles-ci ou à leur transformation en cellules malignes ou cancéreuses (virus encogènes).

En fonction du type de l'hôte, les virus sont subdivisés en trois principales classes :

- virus des animaux (et de l'homme)
- virus des plantes
- virus des procaryotes (phages; pour les bactéries, bactériophages).

Dans chaque classe, chaque virus est capable d'infecter certaines espèces de cellules seulement. Cette limitation d'hôte est déterminée par la spécificité de l'attachement aux cellules, laquelle dépend des propriétés de l'enveloppe ou de la capside du virion (anti-récepteurs glycoprotéiques) et des récepteurs spécifiques sur la surface cellulaire.

4.1. Virus animaux

Ce sont des virus à DNA généralement bicaténaire ou à RNA monocaténaire. Ils sont transmis aussi bien par contact que par des insectes (ex. : moustiques pour Alphavirus, tiques et moustiques pour Flavivirus) et sont pris par les cellules animales par phagocytose ou pinocytose.

Chez les hommes et les animaux, ces virus sont responsables des maladies suivantes : la variole, la vaccine (variole des vaches, veaux, moutons et lapins), la varicelle, la rougeole, la rage, la poliomyélite, la grippe, le rhume, l'hépatite, les oreillons, etc...

4.2. Virus des plantes

Ce sont des virus à RNA. Les viroïdes, virus de quelques maladies des plantes, sont de petites molécules nues et libres de RNA non entourées d'enveloppes de protéines. Dans la nature, les virus de plantes sont transmis par contact ou par des vecteurs (insectes) dans lesquels ils se multiplient dans le tube digestif et infectent ainsi les plantes par piqûres après un temps d'incubation dans l'insecte. Souvent, ils pénètrent à l'intérieur des cellules des plantes ou dans les tissus des feuilles par des lésions ou des blessures (et non pas par une entrée active dans la plante) causées par des frottements ou des raclages (grattages).

Ces virus ou viroïdes sont responsables des maladies chez plusieurs plantes : pomme de terre, cocotier, chrysanthème, houblon, concombre, tabac, citronnier, etc...

4.3. Rôle des virus dans la formation des tumeurs

L'unité des cancers tient à l'irréversibilité de la prolifération cellulaire et de l'essaimage métastatique qui aboutissent à la mort de l'organisme. Cependant, les cancers diffèrent par leur aspect anatomique, leur mode évolutif, la localisation habituelle de leurs métastases et par leurs facteurs étiologiques.

On distingue en effet des cancers induits par des agents physiques (rayons UV, X, radioactivité), par des agents chimiques (goudrons, nitrites, hydroxylamine,...), ou par des virus, à côté d'une grande majorité de cancers sans étiologie reconnue.

Les virus capables de provoquer de manière reproductible des tumeurs chez l'animal sont dits oncogènes (oncos du grec = tumeur). La majorité des virus oncogènes sont capables de « transformer » des cellules en culture in vitro : ils confèrent à quelques cellules certaines des propriétés attribuées aux cellules cancéreuses. Leur pouvoir transformant se manifeste bien souvent sur des cellules non permissives, c'est-à-dire incapables de répliquer le virus.

5. CLASSIFICATION DES VIRUS

Depuis 1960, un système de classification dit LHT (LWOFF, HORNE et TOURNIER) retient 4 caractères / critères objectifs de classification des virus :

- 1°) la nature de l'acide nucléique, permettant de distinguer les virus à DNA et les virus à RNA;
- 2°) la symétrie de la nucléocapside : hélicoïdale, cubique ou complexe;
- 3°) la présence d'une enveloppe : les virus qui en possèdent une étant dits enveloppés et les autres nus;
- 4°) le nombre des capsomères dans le cas de virus icosaédriques ou le diamètre de la nucléocapside si elle est hélicoïdale.

Depuis 1975, le Comité International de Taxonomie des virus a dressé une classification des virus en

- familles : terminaison **viridae**; ex. : *Adenoviridae*, *Retroviridae*, *Filoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*;
- sous-familles : terminaison **virinae**; ex. : *Oncovirinae* (Retroviridae), *Alphaherpesvirinae*,...
- genres (ou groupes) : terminaison **virus**; ex. : *Adenovirus*, *Rhinovirus*, *Enterovirus*, *Oncovirus*;
- espèces : désignées souvent par des noms vernaculaires ou des maladies qu'ils causent; ex. : virus de la variole, virus de la grippe, poliovirus, Herpes simplex virus, virus de la rage, virus de la varicelle et du zona.

6. VIRUS HUMAINS D'INTERET MEDICAL

6.1. VIRUS A DNA

6.1.1. **POXVIRIDAE** :

DNA bicaténaire, enveloppés, symétrie complexe

* *Chordopoxvirinae* : Poxvirus des vertébrés

- *Orthopoxvirus* : virus de la variole, virus de la vaccine (smallpox), monkeypoxvirus, cowpoxvirus

- *Parapoxvirus* : virus du nodule du trayeur, virus d'Orf

- *Molluscipoxvirus* : virus Molluscum contagiosus

- *Yatapoxvirus* : virus tanapox, virus yatapox.

* *Entomopoxvirinae* : Poxvirus des insectes

6.1.2. *HERPESVIRIDAE* :

DNA bicaténaire, enveloppés, symétrie cubique (icosaédrique)

* *Alphaherpesvirinae* :

- Simplexvirus : Herpes simplex virus types 1 et 2 : HSV1 et HSV2
- Varicellovirus : virus de la varicelle et du zona : VZV (HHV3)

* *Betaherpesvirinae* :

- Cytomegalovirus (humain): CMV (HHV5)
- Roseolovirus : VI^e et VII^e Herpesvirus humains : HHV6 et HHV7

* *Gammapherpesvirinae* :

- Lymphocryptovirus : virus d'Epstein-Barr : EBV (HHV4)
- Rhadinovirus : VIII^e Herpesvirus humain : HHV8

6.1.3. *ADENOVIRIDAE*

DNA bicaténaire, nus, symétrie cubique (icosaédrique)

- Mastadenovirus : Adenovirus humains :

6.1.4. *HEPADNAVIRIDAE*

DNA bicaténaire, torsadé, enveloppés, sphériques capsides à symétrie cubique

- Hepadnavirus : virus de l'hépatite B humaine : HBV

6.1.5. *PAPOVAVIRIDAE : PAPILLOMAVIRIDAE ET POLYOMAVIRIDAE*

DNA bicaténaire, nus, symétrie icosaédrique

- Papillomavirus : virus de papillomes humains : HPV
- Polyomavirus : virus BK humain : BKV
virus JC humain : JCV

6.2. VIRUS A RNA

6.2.1. *PICORNAVIRIDAE*

RNA monocaténaire, nus, symétrie icosaédrique

- Enterovirus : Poliovirus, Coxsackie virus A et B, Echovirus (Enteric, Cytopathogenic, Orphan virus), Enterovirus 68-71
- Heparnavirus ou Hepatovirus : Hepatite A virus : HAV (Enterovirus 72)
- Rhinovirus : virus des rhumes humains
- Aphtovirus : Foot-and mouth disease viruses of cattle

6.2.2. *CALICIVIRIDAE*

RNA monocaténaire, nus, symétrie icosaédrique

- Calicivirus : Hepatite E virus (HEV), Norwalk group viruses,...

6.2.3. *REOVIRIDAE*

RNA bicaténaire, nus, symétrie icosaédrique

- Reovirus des mammifères : homme, singes (Respiratory, Enteric, Orphan virus)
- Rotavirus (rota = roue) humains (gastro-entérites)

6.2.4. *ORTHOMYXOVIRIDAE*

RNA monocaténaire, enveloppés, sphériques, capsid hélicoïdale

- Influenzavirus : virus de la grippe types A, B et C.

6.2.5. *PARAMYXOVIRIDAE*

RNA monocaténaire, enveloppés, sphériques, capsid hélicoïdale

- Paramyxovirus : virus des oreillons, virus parainfluenza humain
- Morbillivirus : virus de la rougeole
- Pneumovirus : virus respiratoire syncytial

6.2.6. *TOGAVIRIDAE*

RNA monocaténaire, enveloppés sphériques, capsid icosaédrique

- Alphavirus (Arbovirus type A) : Sindbis virus, Semliki Forest virus,...
- Rubivirus : virus de la rubéole (rubella virus, rougeole germanique)

6.2.7. FLAVIVIRIDAE

RNA monocaténaire, enveloppés, sphériques, capsidie icosaédrique

- Flavivirus (Arbovirus type B) : virus de la fièvre jaune, virus de la dengue, virus des atteintes encéphaloméningées.
- Hepacivirus : Hépatite C virus : HCV (probable : ressemble aux Flaviviridae)

6.2.8. RHABDOVIRIDAE

RNA monocaténaire, enveloppés, boulets, capsidie hélicoïdale

- Lyssavirus : virus de la rage
- Vesiculovirus : (stomatite des chevaux, porcs, boeufs)

6.2.9. BUNYAVIRIDAE

RNA monocaténaire, enveloppés, sphériques, capsidie hélicoïdale

- Bunyavirus : Bunyawera virus }
- Nairovirus : virus Congo-Crimée } fièvres hémorragiques
- Phlebovirus : virus de la fièvre du Rift Valley }
- Hantavirus: Hantaan virus of hemorrhagic fever with renal syndrome

6.2.10. ARENAVIRIDAE

RNA monocaténaire, enveloppés, sphériques, capsidie hélicoïdale.

- Arenavirus : virus Lassa, virus de la chorioméningite lymphocytaire, virus Machupo, virus Junin

6.2.11. FILOVIRIDAE

RNA monocaténaire, enveloppés, filamenteux, capsidie hélicoïdale

- Filovirus : virus (de) Marburg, virus (d') Ebola

6.2.12. RETROVIRIDAE

2 X RNA monocaténaire, enveloppés, sphériques, capside hélicoïdale

* *Oncovirinae*:

- Oncovirus: HTLV-BLV group, Types B, C, D (Oncovirus groups)

* *Lentivirinae* :

- Lentivirus : HIV, BIV, Visna/Maedi,...

* *Spumavirinae*:

- Spumavirirus: syncytial and foamy viruses of humans, cattles, cats.

6.3. AGENTS INFECTIEUX NON CONVENTIONNELS

6.3.1. PRIONS : protéines fibrillaires, agents des encéphalopathies subaiguës spongiformes :

- PrP (prion Protein) : PrP-Sc / SAF (Scrapie Associated Fibrils) ou GFAP (Glial Fibrillar Acid Protein).

7. BACTERIOPHAGES

7.1. DÉFINITION

Les phages sont des virus des procaryotes. **Les bactériophages** sont virus qui infectent des bactéries. Ce sont des virus à DNA ou à RNA monocaténaires ou bicaténaires qui ont les bactéries pour cellules hôtes. Ils peuvent lyser les cellules bactériennes sensibles (**virus ou phages virulents**) ou être intégrés comme **prophages** dans le génome des bactéries hôtes (**lysogénie : virus ou phages tempérés**).

Les bactériophages furent découverts par TWORT (1915-1916) en Angleterre et par d'HERELLE (1917) en France. Cette découverte a offert un important système de modèles pour des investigations en virologie fondamentale.

7.2. MORPHOLOGIE ET CLASSIFICATION DES BACTÉRIOPHAGES

Les phages présentent différentes morphologies et leur classification s'est faite en fonction de leur structure morphologique et de la nature de leur acide nucléique. On peut ainsi, d'après BRADLEY (1967) et TIKHONENKO (1970) classer les phages dans les groupes suivants en fonction de leurs structures :

- **Groupe I** : phages ayant une tête hexagonale, une queue hélicoïdale ayant un canal axial (tube central creux) entouré d'une gaine contractile (fourreau), et une plaque basale ayant des fibres caudales et des épines caudales (= spicules) terminales. Ce sont des phages de la famille de Myoviridae. Ex. : coliphages T2, T4, et T6 et phage E 79 de *Pseudomonas aeruginosa*.

- **Groupe II** : phages ayant une tête hexagonale avec une queue longue et flexible, mais sans gaine contractile. Ce sont les phages de la famille de Siphoviridae. Ex. : coliphages T1, T5 et λ .

- **Groupe III** : phages ayant une tête avec une queue courte. Ce sont les phages de la famille de Podoviridae. Ex. : coliphages T3 et T7, phage P22 de *Salmonella*.

- **Groupe IV et V** : phages ayant une structure sphérique sans queue (famille de Cystoviridae: SSV1 ou SSV1-groupe). La tête est soit icosaédrique (18 faces : 2 x 6 aux sommets, 6 faces latérales) : ex. : phages ϕ x 174 et f2, soit octaédrique.

- **Groupe VI** : phages filamenteux; famille des Inoviridae. Ex. : coliphages fd et f1, phage M13.

La tête des phages est constituée des capsomères entourant l'acide nucléique (DNA ou RNA). En fonction de la nature de leur acide nucléique, il y a

- des phages à DNA bicaténaire : T7, T2, T4, T6, λ , PM2, PRD1, SSV1, Mu,...

- des phages à DNA monocaténaire : ϕ x 174, f1, fd, M13,...

- des phages à RNA monocaténaire : MS2, f2, fr, R17, Q β ,... (3.500-4.500 nucléosides)

- des phages à RNA bicaténaire : ϕ 6 de *Pseudomonas phaesicola*.

7.3. MULTIPLICATION DES PHAGES

Les phages sont incapables de se multiplier en dehors de la cellule bactérienne (ils sont inertes in vitro). La multiplication végétative des phages dans la cellule bactérienne peut conduire

- à la lyse de la cellule : **phages virulents** (non tempérés) ;

- à la lysogénie par l'intégration du génome phagique dans le DNA bactérien, un état appelé **prophage** : **phages tempérés**.

7.3.1. Multiplication d'un phage virulent : cycle lytique

Elle comporte les phases suivantes : (1) adsorption du phage aux récepteurs spécifiques de la paroi cellulaire, (2) pénétration par injection de l'acide nucléique du phage, l'enveloppe protéique restant dehors, (3) transcription du génome phagique,

translation des mRNA viraux, réplication des acides nucléiques phagiques et synthèse des constituants structuraux (protéines) du phage, (4) assemblage et maturation des phages, (5) libération des phages mûrs néoformés par lyse de la cellule bactérienne par la lysozyme des phages.

L'adsorption se réalise par attachement du phage à la surface bactérienne grâce

- à la plaque basale et aux filaments de sa queue ou
- à une protéine de l'enveloppe virale ou de la capside qui se lie à un récepteur spécifique de la surface bactérienne pouvant être contenu dans la lipoprotéine ou le lipopolysaccharide. L'absence de ces récepteurs rend la bactérie résistante au phage infectant.

L'injection du DNA (ou RNA) du phage dans la bactérie cause une inversion totale du métabolisme de la cellule infectée : arrêt immédiat de la synthèse du DNA bactérien, suivi quelques minutes après de celui de la synthèse des RNA et des protéines bactériens. Mais la quantité totale de protéines augmente continuellement et la synthèse du DNA reprend. Le DNA phagique est synthétisé à la place du DNA bactérien. Les enzymes nécessaires à la synthèse du DNA (protéines « précoces » non structurales) ont été formées juste après l'infection. Les protéines « tardives » ou structurales de la capside et de l'enveloppe phagiques ainsi que certaines enzymes (le lysozyme ou l'endolysine) du phage sont produites dans la deuxième partie de la période de latence.

La maturation consiste à l'assemblage des DNA ou RNA et de l'enveloppe protéique en phages mûrs qui seront libérés après la lyse de la paroi cellulaire de la bactérie par le lysozyme des phages ou bien par bourgeonnement.

La période de latence est le temps entre le début de l'infection de la bactérie par le phage et la libération des phages infectieux mûrs.

7.3.2. Développement d'un phage tempéré : lysogénie

Certains bactériophages infectent leur bactérie hôte sans qu'ils s'y multiplient ni qu'ils conduisent à sa lyse. Ce sont des phages dits tempérés et la bactérie est dite lysogène. Cet état non infectieux des phages qui est transmis de cellule à cellule (héréditaire) fut qualifié de **prophage** par LWOFF. Le DNA du phage étant intégré dans le DNA bactérien grâce à son intégrase, il devient, comme les autres gènes bactériens, héréditaire et est répliqué de façon synchrone et régulière avec le chromosome de l'hôte.

L'immunité des bactéries lysogènes envers les prophages n'est pas due à l'empêchement de l'adsorption (comme en cas de résistance contre les phages virulents), mais à la production d'une protéine dite répresseur cytoplasmique qui empêche la multiplication des phages végétatif ainsi que la synthèse d'autres protéines du phage. L'inactivation de la molécule du répresseur par les rayons UV, la mitomycine C, les agents alkylants ou l'augmentation de la température à 44°C conduit à une induction de la formation des phages végétatifs infectieux par le prophage et à leur libération par lyse bactérienne.

Les espèces lysogènes se trouvent naturellement chez les *Salmonella*, les bactéries coliformes et autres entérobactéries, chez *P. aeruginosa*, chez *Staphylococcus* et chez beaucoup d'autres bactéries.

7.4. RÔLES DES BACTÉRIOPHAGES

7.4.1. Spécificité d'hôte : le spectre d'hôte d'un bactériophage donné est restreint et se limite soit à un nombre d'espèces d'un seul genre de bactéries (ex. : phages de *S. aureus*, de *C. diphtheriae*, de *P. aeruginosa*, de *S. pyogenes*, etc.), soit à des espèces des genres apparentés de bactéries (ex. : phages de *E. coli-Shigella*). Ce spectre d'hôte spécifique et limité permet d'utiliser les phages à la différenciation des types chez les espèces dans un genre (**lysotypie**) en fonction de la sensibilité des souches bactériennes aux bactériophages.

7.4.2. Les bactériophages peuvent exprimer leurs gènes qui confèrent à la bactérie des propriétés supplémentaires (**conversion lysogénique** après intégration du phage dans le génome bactérien); ex. : production de la toxine diphtérique, de l'entérotoxine A et l' α -toxine chez certaines espèces de *S. aureus*, formation de certains antigènes à la surface bactérienne (antigènes O chez les *Salmonella*)

7.4.3. Certains bactériophages peuvent transférer des caractères héréditaires (matériel génétique) d'une bactérie à une autre (transduction).

7.4.4. Les bactériophages constituent des modèles importants dans l'étude des propriétés (caractéristiques) générales des virus. Ils constituent ainsi des objets appropriés pour la recherche fondamentale en génétique moléculaire.

CHAPITRE VII : PHYSIOLOGIE BACTERIENNE

1. NUTRITION

La croissance des microorganismes est liée à la présence de **l'eau**. Les substances qui y sont dissoutes constituent des nutriments (aliments) que les micro-organismes peuvent utiliser ou assimiler pour synthétiser leurs constituants cellulaires et autres métabolites (besoins constitutifs pour la croissance) ainsi que pour gagner de l'énergie (besoins énergétiques). Les bactéries se multiplient à partir des aliments présents dans les milieux de culture qui comprennent des substances constitutives de la cellule bactérienne et des substances énergétiques.

1.1. Besoins nutritifs élémentaires

Ce sont les besoins constitutifs et énergétiques de la bactérie qui sont couverts par des aliments (substances) dits constitutifs ou plastiques et des substances énergétiques qui servent à l'élaboration (la synthèse) des constituants propres de la cellule et au gain d'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire. Ils comprennent **l'eau, une source de carbone, une source d'azote, une source d'énergie ainsi que des éléments minéraux.**

1.1.1. Sources de carbone et d'énergie

Les micro-organismes tirant leur énergie de la **photosynthèse** ou de **l'oxydation** des composés inorganiques sont capables d'utiliser le CO_2 comme principale source de carbone. Ce sont des **C-autotrophes** qui réduisent le CO_2 (ex. : *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Brucella*). D'autres microorganismes, les **C-hétérotrophes**, couvrent leurs besoins en carbone en dégradant des aliments organiques qui sont soit assimilés (synthèse des constituants cellulaires) soit oxydés (gain d'énergie). Ce sont surtout les polysaccharides comme la cellulose et l'amidon ainsi que les mono- et disaccharides (glucose, fructose, maltose,...), ainsi que d'autres composés organiques comme l'alcool, l'acide acétique, l'acide lactique, le méthanol (ex. : *Pseudomonas methanica*). Le carbone est un constituant de tous les composés cellulaires organiques.

1.1.2. Oxygène

Il se trouve dans les cellules sous forme d'eau, de CO_2 ou d'autres composés organiques cellulaires. L'oxygène moléculaire O_2 sert d'accepteur final d'électrons dans la respiration aérobie et est réduit en H_2O .

En fonction de leur exigence en O₂, les bactéries sont subdivisées en trois groupes.

- **Les bactéries aérobies strictes (obligatoires)** : ne se développent qu'en présence d'O₂ et ne gagnent de l'énergie que par respiration aérobie (elles sont incapables de pratiquer la fermentation) : métabolisme respiratoire (ex. : bacille tuberculeux : *Mycobacterium tuberculosis* et bacilles sporogènes : *Bacillus*). Les bactéries aérobies sont aérophiles, si en milieu liquide, elles se développent en présence d'une concentration élevée d'oxygène (ex. : *Vibrio*). Beaucoup de bactéries aérobies sont microaérophiles : c'est-à-dire elles ne tolèrent qu'une faible concentration d'O₂ d'environ 5 % (tension d'O₂ : 0,01 - 0,03 bar) qui est inférieure à celle de l'air ([O₂] : 20 %; 0,20 bar). Généralement, les microorganismes microaérophiles ne croissent pas en présence de l'air. Certains microaérophiles, cependant, poussent en présence de concentrations élevées de CO₂ (5 à 10 %) : ce sont des capnophiles.

- **Les bactéries anaérobies strictes (obligatoires)** : ne se développent qu'en l'absence d'O₂ qui leur est toxique : gain d'énergie par métabolisme fermentatif (ex. : *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Veillonella*,...). Le sous-groupe des aérotolérants comprend les bactériens qui peuvent croître en présence de l'air sans pourtant l'utiliser, leur métabolisme restant fermentatif (ex. : la plupart des bactéries lactiques);

- **Les bactéries aéro-anaérobies facultatives (anaérobies facultatives)** : se développent aussi bien en présence qu'en l'absence d'O₂ : ils sont capables de métabolismes fermentatif et respiratoire (ex. : *Enterobacteriaceae*).

Ces microorganismes possèdent **plusieurs systèmes de régulation métabolique**, comme **Arc** et **Fnr**, qui sont impliqués dans l'adaptation à l'anaérobiose (respiration anaérobie, fermentation : Fnr) ou à l'aérobiose (respiration aérobie : Arc) :

- respiration anaérobie : nitrate ou fumarate comme accepteurs finaux d'électrons : **système Fnr** ;
- respiration aérobie : oxygène comme accepteur final d'électrons : **système Arc**.

Système Arc : **aerobic respiration control** : C'est un système de signalisation à deux composants : **Arc B** (histidine kinase) pour le contrôle de la respiration aérobie et **Arc A** (response regulator) qui permet la respiration anaérobie en réponse à l'anaérobiose. Quand la [O₂] devient suffisamment basse (tend vers l'anaérobiose par déplétion d'O₂, Arc B devient phosphorylé par l'histidine de sa séquence carboxyl terminale par une réaction couplée avec la conversion de l'ATP en ADP. Arc B phosphorylé peut transférer le phosphate à Arc A. Arc A phosphorylé par l'aspartate de son amino-terminal est responsable de la repression de la transcription de gènes impliqués dans la croissance aérobie.

Système Fnr : formate déshydrogénase, fumarate réductase, nitrate réductase et pyruvate lysase (activation en l'absence d'O₂) ; repression de cytochrome oxydase (cytochromes **d** et **o**) et de NADH déhydrogénase. C'est un système de signalisation à deux composants qui active les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la respiration anaérobie ou la fermentation. Fnr est une protéine régulatrice qui est activée pendant la croissance anaérobie. Il agit comme un represseur des gènes exprimés aérobiquement et un inducteur des gènes exprimés anaérobiquement, permettant ainsi l'utilisation du fumarate ou du nitrate comme accepteur final d'électrons dans le métabolisme respiratoire (anaérobie). Le cytochrome **o** est utilisé à une concentration élevée d'oxygène, tandis que le cytochrome **d** l'est à une faible concentration d'oxygène.

Fnr inactif

Présence d'O₂

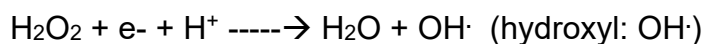
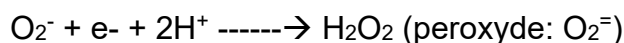
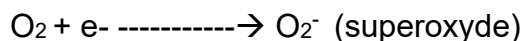
Absence d'O₂

Fnr actif

Respiration anaérobie : répression de cytochrome oxydase et de NADH déhydrogénase.

Activation de formate déhydrogénase, de fumarate réductase, nitrate réductase,...

Les microorganismes aérobies synthétisent des enzymes qui les aident à détruire les dérivés toxiques de l'oxygène (le radicaux libres : hydroxyl, **OH·**; peroxyde, **O₂^{••}**; superoxyde, **O₂^{•-}**) : la **catalase** et la **peroxydase** catalysent la dégradation des peroxydes en les transformant en eau, tandis que la **superoxyde dismutase** catalyse la dégradation des superoxydes en peroxydes. La catalase et la superoxyde dismutase sont généralement trouvées chez les microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs qui les protègent des dommages dus à la présence de l'oxygène. Des microaérophiles peuvent ou non avoir une catalase, mais habituellement une superoxyde dismutase. Par contre, les microorganismes anaérobies stricts ne synthétisent pas ces enzymes ou ils les produisent uniquement en faible quantité; ainsi, ils ne peuvent pas croître en présence d'oxygène moléculaire de l'air.



1.1.3. Éléments minéraux

Les éléments minéraux dont la bactérie a besoin pour sa croissance et son métabolisme comprennent :

- **des macroéléments** (10) : carbone, hydrogène, oxygène, azote, soufre, phosphore, potassium, calcium, magnésium, fer, qu'on trouve dans tous les organismes; S, P, Ca, Mg et K doivent être disponibles en très faible quantité;
- **des oligoéléments** ou microéléments qui sont sous forme de traces et qui ne sont pas exigés par les organismes : manganèse, molybdène, zinc, cuivre, cobalt, nickel, vanadium, bore, chlore, sodium, sélénium, silicium, wolfram et autres; la plupart de ces éléments se trouvent dans les sels des macroéléments et dans les milieux de culture. Ils jouent le rôle de cofacteurs ou d'activateurs enzymatiques.
- Azote et soufre interviennent dans la synthèse des protéines (groupements sulfhydryl et amino). Leurs formes oxydées (sulfate, nitrate) sont réduites par les micro-organismes (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, *Paracoccus denitrificans*, *Enterobacter*, *E. coli*,...). L'azote est un constituant des protéines, des acides nucléiques et des coenzymes. Les sels d'ammonium constituent la principale source d'azote (ex, *Nitrosomonas*), car les bactéries incorporent l'azote des autres composés, après réduction, sous forme de sels d'ammonium. Les nitrates sont utilisés par de nombreux groupes bactériens et les nitrites par les *Nitrobacter*. Certains micro-organismes utilisent les acides aminés ou les groupements aminés des composés organiques (protéines, peptones) comme source d'azote. Quelques bactéries saprophytes fixent l'azote moléculaire atmosphérique N_2 (*Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*) et sont ainsi d'un grand intérêt en microbiologie du sol et en Agronomie (fertilisation du sol). Le soufre est aussi utilisé sous forme de composés organiques, comme les acides aminés dans des protéines et coenzymes (cystéine), ou inorganiques (H_2S , SO_4^{2-}).
- Phosphore est utilisé sous forme de phosphate inorganique et joue un rôle capital dans la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie (ATP). Il fait partie des acides nucléiques, des phospholipides et de certaines coenzymes.
- Sodium, potassium, magnésium, chlorure (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^-) interviennent dans l'équilibre physico-chimique de la bactérie et sont aussi exigés par plusieurs enzymes : Na^+ important dans les transports membranaires; K^+ dans de fonctions des ribosomes et cofacteurs pour certaines réactions enzymatiques; Mg^{2+} dans l'intégrité des ribosomes et cofacteurs dans plusieurs réactions enzymatiques, dans la bactériochlorophylle).
- Fer est utilisé dans plusieurs réactions enzymatiques et est un constituant des cytochromes et de certaines protéines (hème).
- Autres éléments minéraux : certaines bactéries exigent le Zn^{2+} et le Mn^{2+} pour leurs enzymes et le Mo^{2+} pour la fixation de l' N_2 et la réduction du nitrate. Le Co^{2+} est utilisé par les bactéries produisant la vitamine B12 (*Propionibacterium*, *Clostridium*, *Streptomyces*). Le Ca^{2+} est un constituant majeur de la paroi des bactéries gram-négatives et des spores bactériennes et aussi un cofacteur dans certaines réactions enzymatiques.

1.2. Besoins nutritifs spécifiques (ou additifs)

Les besoins nutritifs spécifiques de la bactérie sont couverts par des substances organiques essentielles qui sont indispensables à la croissance d'un micro-organisme et qu'on appelle **facteurs de croissance**. Ces aliments spécifiques,

nécessaires à la synthèse d'un composant indispensable à la vie cellulaire ou aux fonctions métaboliques cellulaires, ne peuvent le plus souvent pas être élaborés par la bactérie à partir d'autres nutriments simples : ils lui font défaut et doivent ainsi lui être fournis par un apport extérieur (additifs). Ce sont :

- les **vitamines** : parties prosthétiques ou coenzymes remplissant plusieurs fonctions enzymo-catalytiques,
- les **purines** et **pyrimidines** dans les acides nucléiques,
- les **acides aminés** dans les protéines.

Les bactéries qui exigent des facteurs de croissance sont dites **auxotrophes**, et celles qui n'en exigent pas, **prototrophes**.

Phénomène de syntrophie ou **satellitisme** : le fait que les besoins en facteurs de croissance d'une espèce microbienne donnée puissent être couverts par des métabolites synthétisés par une autre espèce microbienne est appelé **phénomène de syntrophie** (repas avec) ou de **satellitisme**. Exemple, *Staphylococcus aureus* élabore le facteur V (NAD) dont a besoin *Haemophilus influenzae* en culture sur gélose au sang frais (avec le facteur X : hémine).

1.3. Modes de nutrition

Les termes hétérotrophe (source de carbone = molécules organiques) et autotrophe (source de carbone = CO₂) ne suffisent pas pour décrire les différents modes de nutrition des micro-organismes en fonction de leurs besoins constitutifs et énergétiques. Car ils ne déterminent que la source de carbone. On utilise ainsi d'autres terminologies se rapportant à la source d'énergie, au donateur d'électrons et à la source de carbone.

1.1.1. Selon la source d'énergie utilisée, on trouve

- des bactéries **phototrophes** ou photosynthétiques qui utilisent les rayons électromagnétiques de la lumière (ex : la lumière solaire) comme source d'énergie; la plupart ne produisent pas l'oxygène (ex : *Chlorobiaceae* ou bactéries anaérobies vertes sulfureuses, *Chromatiaceae* ou bactéries pourpres sulfureuses et *Rhodospirillaceae* ou bactéries pourpres non sulfureuses), tandis que d'autres comme les cyanobactéries (*Synechococcus*, *Anabaena*, *Nostoc*,...) en produisent en réalisant ainsi une **photosynthèse oxygénique (oxyphotobactéries)**;
- des bactéries **chimiotrophes** ou chimiosynthétiques qui gagnent de l'énergie dans des réactions d'oxydoréduction des composés chimiques organiques ou inorganiques (respiration oxydative ou fermentation) : la plupart de bactéries.

1.1.2. En fonction du donateur d'électrons (nature du substrat chimique et probablement de la source de carbone), on rencontre

- des bactéries **organotrophes** qui utilisent des composés organiques comme donateurs d'électrons (beaucoup de bactéries);
- des bactéries **lithotrophes** qui utilisent des composés inorganiques comme source d'électrons (ex. : *Nitrobacter*, *Thiobacillus*, *Sulfolobus*,...)

1.1.3. En rapport avec le processus de gain d'énergie et le donateur d'électrons, on peut reconnaître

- des bactéries **photolithotrophes** qui, comme les plantes, gagnent de l'énergie par les rayonnements lumineux et qui utilisent les composés minéraux comme sources d'électrons; elles sont capables de se développer dans un milieu purement minéral (ex. : les cyanobactéries et les bactéries sulfureuses pourpres et vertes : *Chromatiaceae* et *Chlorobiaceae*); elles sont photoautotrophes ou photosynthétiques, car elles utilisent le CO₂ inorganique comme seule source de carbone;
- des bactéries **photoorganotrophes** qui gagnent leur énergie par les rayons lumineux et nécessitent des composés organiques comme sources d'électrons (ex. : les bactéries pourpres non sulfureuses : *Rhodospirillaceae* et *Athiorhodaceae*) ; elles sont photohétérotrophes, car elles utilisent les substances organiques comme source de carbone;
- des bactéries **chimiolithotrophes** qui gagnent l'énergie par des réactions redox et utilisent les composés inorganiques comme donateurs d'électrons (ex. : les bactéries nitrifiantes : *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*; les bactéries oxydant les composés réduits du soufre : *Thiobacillus*, *Thiobacterium*, *Sulfolobus*; ou bactéries oxydant l'hydrogène par l'oxygène gazeux : *Hydrogenobacter*, *Aquifex*). Une bactérie chimiolithotrophe peut être : (1) chimioautotrophe, si elle synthétise ses composés organiques cellulaires exclusivement à partir du CO₂ comme source de carbone (*Aquifex pyrophilus*, *Hydrogenobacter thermophilus*, *H. acidophilus*); (2) chimiohétérotrophe, si elle part des composés organiques comme source de carbone (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*);
- des bactéries **chimioorganotrophes** qui, comme les animaux, gagnent leur énergie dans des réactions redox et utilisent des composés organiques comme donateurs d'électrons (ex : la plupart des bactéries); elles sont des hétérotrophes habituels ou obligatoires (bien que la plupart puissent assimiler le CO₂).

1.4. Milieux de culture

Pour procéder à la culture, à l'isolement et à l'identification des bactéries, il est nécessaire, dans la plupart des cas, d'ensemencer le produit à examiner ou le microorganisme sur des **milieux de culture**. Ceux-ci contiennent des substances nutritives indispensables à la croissance des micro-organismes. On les utilise ainsi à des fins diverses : diagnostic, recherche, fermentations industrielles, production d'antibiotiques et autres composés organiques, etc.

Pour cultiver une espèce microbienne donnée, on ajoute à un milieu de culture stérile adéquat (approprié) un petit échantillon ou **inoculum** contenant des cellules vivantes de cette espèce. L'addition de l'inoculum au milieu s'appelle une **inoculation** ou un **ensemencement**.

1.4.1. Caractéristiques des milieux de culture

Les milieux de culture sont **liquides** ou **solides**. Dans des milieux liquides, les microbes forment un trouble (bactéries anaérobies facultatives), des agglomérats, des dépôts (bactéries anaérobies) ou des voiles superficiels (bactéries aérobies).

L'état solide ou semi-solide (milieu gélosé) est obtenu en présence d'un polyside complexe, l'agar ou la gélose, un agent gélifiant obtenu à partir d'une variété d'algues marines et utilisé abondamment comme agent d'épaississement dans la cuisine japonaise. L'agar est ajouté au milieu liquide à une concentration d'environ 15 à 20 ‰.

Sur des milieux solides, les microbes forment des colonies. Une colonie est une masse compacte, un agglomérat des cellules microbiennes (ex bactéries) descendant toutes d'une seule cellule microbienne isolée. Elles ont une identité (homologie) génétique totale.

1.4.2. Composition des milieux de culture

- Milieux naturels ou empiriques : sont des milieux de composition mal définie (ex : bouillon nutritif ou gélose nutritive contenant de l'extrait de viande et de la peptone).
- Milieux synthétiques ou définis : sont des milieux de composition chimique bien définie; ils sont surtout utilisés dans l'étude des besoins nutritionnels d'une bactérie (ex : milieu urée-indole),
- Milieu synthétique minimal : ce milieu synthétique est un mélange simple ne contenant pas de composés organiques autre qu'une source de carbone (sucre). Un milieu minimum typique contient des ions Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , PO_4^{3-} et SO_4^{2-} ainsi qu'une source de carbone comme le glucose, le glycérol ou le lactate.

1.4.3. Types des milieux de culture en fonction de leur utilisation

- Milieux basaux : un milieu basal est un milieu qui permet la croissance d'espèces peu exigeantes comme les *Enterobacteriaceae*. Exemples : bouillon nutritif, gélose nutritive, eau peptonée.
- Milieux enrichis : un milieu enrichi est un milieu basal dans lequel on a ajouté un supplément nutritionnel, comme l'œuf, le serum, le sang, pour favoriser la croissance des bactéries incapables de croître dans un milieu basal. Exemple : gélose au sang frais, gélose-chocolat (gélose au sang cuit).

- Milieux sélectifs : ils permettent la croissance de la bactérie que l'on recherche en inhibant le développement des autres germes grâce à la présence d'un agent sélectif qui y est incorporés. Ils sont ainsi rendus sélectifs en y ajoutant des antibiotiques, des antiseptiques (ex : des colorants) ou des sels biliaries qui inhibent la croissance de certaines espèces microbiennes sans modifier celle des espèces qu'on recherche. Exemple : Sabouraud + chloramphénicol, milieux de Chapman pour *Staphylococcus*, gélose ou bouillon de MacConkey ou gélose au desoxycholate-citrate pour *Enterobacteriaceae*, Columbia- ANC, Azide blood agar.
- Milieux différentiels : ils permettent de distinguer certaines espèces les unes des autres grâce aux différences de mode de croissance qu'elles présentent. En fonction de la nature des produits de leur métabolisme, les colonies se distinguent par des réactions d'identification, leur coloration (gélose de MacConkey) ou par la présence d'une hémolyse (sur gélose au sang). Un milieu peut être à la fois sélectif et différentiel (gélose de MacConkey, mannitol-salt agar).
- Milieux d'enrichissement : ce sont des milieux liquides (ou parfois solides) qui contiennent des agents sélectifs et/ou des substances qui sont destinés à favoriser la croissance de l'espèce microbienne recherchée (envahir le milieu en germe recherché) en éliminant d'autres espèces. Ils sont utilisés surtout dans les cas où un inoculum ne contient qu'une très faible proportion d'une espèce à isoler parmi un grand nombre d'autres espèces. Exemple : bouillon sélénite ou milieu SS pour l'enrichissement des *Salmonella* et *Shigella*; milieu de Müller- Kaufmann pour *Salmonella*,... Ils peuvent aussi contenir des substances qui favorisent la croissance de l'espèce recherchée tout en n'inhibant pas nécessairement les autres. Ces milieux fournissent des conditions nutritionnelles et environnementales qui favorisent la croissance jusqu'à un niveau détectable du microorganisme recherchée qui se trouve en petit nombre dans un échantillon de sol ou de selles.
- Milieux d'isolement : ce sont des milieux solides de composition simple sur lesquels de nombreuses espèces bactériennes peuvent se développer en formant des colonies isolées et différentes (morphologies différentes). Exemples : gélose nutritive, Eugon Agar, gélose chocolat, thioglycollate,...
- Milieux d'identification : ils servent à identifier des bactéries précédemment isolées par la mise en évidence d'une ou de plusieurs propriétés biochimiques (tests biochimiques). Exemples : fermentation des sucres, présence d'une enzyme, production de gaz comme H₂S, formation d'indole ou d'acétone, etc.
- Milieux de stockage ou d'entretien: ils permettent de stocker certaines souches bactériennes. Exemple : gélose nutritive. Il existe aussi des milieux solides exempts de gélose ou de gélatine, comme le lait écrémé ou le milieu à l'œuf de Costello qui résulte de la coagulation par chauffage du mélange d'un homogénat d'œuf de poule et de sel.

- Milieux de transport : ils servent au transport et à la conservation d'un produit pathologique ou matériel biologique à partir duquel on se propose d'isoler un ou des microorganismes (anaérobies ou fragiles comme *Neisseria*). Leur rôle est maintenir en vie ces microorganismes à isoler ; ils ne doivent pas favoriser leur croissance. Exemple : Milieu de transport de Stuart, Milieu de Cary-Blair.

2. CROISSANCE BACTERIENNE

2.1. Conditions physico-chimiques de la croissance

Beaucoup de bactéries peuvent résister à de larges variations de température, de pression osmotique et de pH.

2.1.1. Température

Chaque espèce bactérienne croît de façon optimale à une température donnée : c'est la température optimale de croissance. En fonction de leur température optimale de croissance (d'incubation) respective permettant un taux maximal de reproduction (la **croissance normale ou maximale**), on trouve :

- **des bactéries cryophiles : psychrophiles et psychrotrophes** : ce sont des bactéries qui atteignent leur taux optimal de croissance à basse température, c'est-à-dire leur température minimale de croissance respectivement est inférieure ou égale à 0°C à $\pm 4^\circ\text{C}$ et leur température maximale de développement inférieure à 20°C (bactéries marines ou ferreuses comme *Gallionella*;...); les bactéries **cryophiles** ou **psychrotrophes** sont celles qui croissent à des températures de 0°C ou moins jusqu'à $\pm 4^\circ\text{C}$ (bactéries vivant dans les mers arctique et antarctique ou pouvant se développer dans les aliments congelés), tandis que les bactéries **psychrophiles** se développent à des températures entre 4°C et au plus 20°C, avec un optimum entre 10 et 15°C (bactéries pouvant se développer dans les réfrigérateurs comme *Listeria*);
- les bactéries **cryophiles** ou **psychrophiles** sont celles qui croissent à des températures de 0°C ou moins jusqu'à $\pm 4^\circ\text{C}$ (bactéries vivant dans les mers arctique et antarctique ou pouvant se développer dans les aliments congelés), avec un optimum de croissance entre 10 et 15°C (bactéries pouvant se développer dans les réfrigérateurs comme *Listeria*); tandis que les bactéries **psychrotrophes (psychrophiles facultatives)** peuvent se développer à des températures entre 0 et 4°C, mais elles ont un optimum de croissance entre 20 et 30°C;

Psychrophiles, for example, were originally considered simply to be organisms capable of growing at 0°C. However, there seem to be two fairly distinct groups capable of growth at that temperature. One group, composed of **psychrophiles in the strictest sense**, can grow at 0°C but has an optimum growth temperature of about 15°C. Most of these organisms are so sensitive to higher temperatures that

they will not even grow in a reasonably warm room (25°C). Found mostly in the oceans' depths or in certain polar regions, such organisms seldom cause problems in food preservation. The other group that can grow at 0°C has higher optimum temperatures, usually 20-30°C and cannot grow above about 40°C. Organisms of this type are much more common than psychrophiles and are the most likely to be encountered in low-temperature food spoilage because they grow fairly well at refrigerator temperatures. We will use the term **psychrotrophs**, which food microbiologists favor, for this group of spoilage microorganisms.

- **des bactéries mésophiles** qui ont leur température optimale de croissance entre 20 et 42°C (ex : la plupart des bactéries pathogènes);
- **des bactéries thermotolérantes** ou **thermoduriques** sont des bactéries dont l'optimum de température est inférieure à 45°C, mais qui peuvent croître (tolérer) à des températures élevées jusqu'à 50°C (ex : *Methylococcus capsulatus*) ;
- **des bactéries thermophiles** « sensu stricto » qui croissent à des températures supérieures à 45°C jusqu'à 75°C (ex : *Bacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomyces vulgaris*; *Hydrogenobacter thermophilus*, 70 à 75°C); dans ce groupe on trouve le sous-groupe **des bactéries thermophiles extrêmes** ou **hyperthermophiles** qui croissent à des températures supérieures ou égales à 80°C pouvant atteindre jusqu'à 105°C (ex : *Sulfolobus acidocaldarius*, *Methanococcus igneus* et *M. jannaschii*, 80°C; *Aquifex pyrophilus*, 85°C; *Pyrodictium occultum*, 105°C,...).

Les bactéries **sténothermales** croissent uniquement à des températures proches de leur température optimale de croissance, tandis que les bactéries **eurythermales** se développent à un spectre large de températures.

2.1.2. pH

Il est important d'ajuster le pH optimal au début de la culture et de le maintenir constant tout au long de la croissance microbienne. La plupart des micro-organismes sont des **neutralophiles** et se multiplient de façon optimale lorsque les concentrations des ions H⁺ et OH⁻ sont presque égales (pH neutre : 6,5 - 7,5). Beaucoup de bactéries préfèrent un pH élevé, c'est-à-dire un milieu légèrement alcalin (pH 8,6 - 9,2) : ce sont des bactéries **basophiles** ou **alcalophiles** (ex. : *Vibrio cholerae*, *Rhizobium*, actinomycètes, bactéries nitrifiantes, comme *Nitrosomonas*, et celles dégradant l'urée).

Très peu de bactéries tolèrent des pH acides et sont dites **acido-tolérantes** ou aciduriques (pH 6,0-6,5 : *Acetobacter*, *Sarcina ventriculi*), d'autres sont même **acidophiles**, car elles supportent et préfèrent des pH acides extrêmes inférieurs à 6,0 (*Thiobacillus thiooxydans* qui produit l'acide sulfurique et *Sulfolobus acidocaldarius*, pH 2,0 – 2,8; *Hydrogenobacter acidophilus*, pH 3,0 – 4,0; *Lactobacillus* dans le vagin, pH 4,0 – 5,0). Les champignons sont acidophiles, car ils préfèrent un pH faible (pH 5,0). Certaines bactéries et archaea sont des

thermoacidophiles (*Hydrogenobacter acidophilus*, *Sulfolobus*) ou des hétérotrophes mésophiles acidophiles (*Acidophilium*, *Acidomonas*, *Acidobacterium capsulatum*).

2.1.3. Teneur en eau et pression osmotique

2.1.3.1. Teneur en eau

Les microorganismes se différencient par leur besoin en eau, exprimé comme **activité de l'eau** ou hydroactivité (activité hydrique: **Aw** ou **a_w = water activity**). Ce paramètre se réfère à la phase vapeur se trouvant en équilibre avec du matériel solide ou de l'eau pure ou une solution. Il donne le quotient de la concentration en eau à l'état de vapeur dans un espace donné sur le matériel ou sur l'eau pure à une température donnée. L'activité de l'eau est ainsi un indice ou une mesure de la quantité de l'eau qui est actuellement « libre » ou disponible pour réagir, c'est-à-dire pour l'utilisation par les microorganismes. Elle est inversement proportionnelle à la pression osmotique. Elle correspond ainsi à **l'humidité relative (RH : relative humidity)** qui est la mesure atmosphérique de la disponibilité de l'eau ou le pourcentage de la saturation en eau de l'atmosphère : **RH = 100 Aw**. Une humidité relative de 90 % correspond à une Aw de 0.90. L'eau distillée pure (ou l'eau pure) a une valeur de l'Aw = 1.0. L'eau est indispensable pour la croissance des microorganismes. Ces derniers se développent à des valeurs d'hydroactivité de **a_w = 0,998 à 0,6**.

Les bactéries ne peuvent croître que dans un milieu où la teneur en eau libre est élevée. La disponibilité relativement faible de l'eau dans l'atmosphère contribue à l'incapacité des bactéries de se développer dans l'air, mais aussi sur de surfaces sèches (ex. : sur du pain ou du bois secs), sauf si l'humidité relative est élevée (cas des zones tropicales). La plupart de bactéries exigent ainsi une Aw > 0.90 pour un métabolisme actif, à l'exception des bactéries halophiles qui exigent une Aw de ± 0.75. Cependant, certaines bactéries sont capables de croître à des valeurs de l'Aw assez basses et de résister aussi à la dessiccation (sécheresse). Elles font ainsi partie des microorganismes appelés **xérotolérants**, comme les champignons.

Généralement, les champignons peuvent croître à des valeurs de l'Aw plus basses que celles exigées par les bactéries. Ils poussent ainsi sur plusieurs surfaces où la disponibilité en eau ne permet pas la croissance des bactéries. C'est pourquoi, on observe, par exemple, la croissance des champignons, et non celle des bactéries, sur du pain sec. Les levures osmotolérantes (*Saccharomyces rouxii*) croissent à une valeur de l'a_w de 0,6. *Aspergillus glaucus* et autres champignons (moisissures) poussent à partir d'une a_w = 0,8.

L'activité de l'eau permet ainsi d'estimer le degré (la capacité) de résistance des bactéries et autres microorganismes (pathogènes) à la dessiccation, ainsi que les conséquences dans la transmission des maladies infectieuses. Par exemple, *Mycobacterium tuberculosis* a une résistance élevée : transmission indirecte par

gouttelettes sèches de l'air; par contre, *Treponema pallidum* a une résistance moindre : transmission par contact intime direct.

2.1.3.2. Pression osmotique

Les structures de la paroi cellulaire des bactéries les rendent résistantes à des variations de pression osmotique (PO). Cependant, des valeurs de PO extrêmes peuvent causer leur mort. En solutions hypertoniques, des bactéries sont contractées (rétractées : réduction du volume, «schrink») et deviennent desséchées. En solutions hypotoniques, par contre, les cellules bactériennes gonflent et éclatent («burst»).

Les microorganismes **osmotolérants** sont ceux qui peuvent croître dans des solutions avec des concentrations élevées en **soluté** et de faibles valeurs de A_w . Ils sont ainsi des **barotolérants**, car ils tolèrent et peuvent résister à de hautes valeurs de PO. Par exemple, les levures osmotolérantes, comme *Saccharomyces rouxii*, croissent à des concentrations élevées de sucres (glucides) et à une A_w de 0.6.

Certains microorganismes sont **osmophiles**, car ils exigent (requièrent) ou préfèrent pour leur croissance une concentration élevée en soluté (ex. : *Xeromyces* : $A_w = 0.90$). Ces microorganismes sont des **barophiles**, car ils préfèrent une PO élevée pour leur développement (ex. : les bactéries vivant dans les profondeurs des océans). Ainsi, des solutions avec des concentrations élevées en sucre (saccharose) sont utilisées dans des procédés de laboratoire pour protéger des protoplastes et des sphéroplastes contre la lyse due aux variations de pression osmotique.

2.1.3.3. Salinité

La salinité constitue un facteur (effet) important de la pression osmotique (PO). Les bactéries sont assez tolérantes vis-à-vis des concentrations ioniques inférieures à 2 % de NaCl. Certaines bactéries dites **halophiles** exigent pour leur croissance des concentrations en NaCl de plus de 2 % pouvant aller jusqu'à plus de 20 %. Les bactéries **halophiles modérées**, incluant beaucoup de bactéries marines, poussent mieux en présence des concentrations de sel d'environ 3 % (1.5 – 3 %). La membrane externe des bactéries marines requiert au moins une concentration de 1.5 % de NaCl pour maintenir son intégrité (ex. : *Vibrio parahaemolyticus*).

Les bactéries **halophiles** (sensu stricto) croissent mieux dans des concentrations en NaCl supérieures à 3 % jusqu'à 15 % (ex. : *Staphylococcus aureus* : ± 7 %; *Hydrogenobacter halophilus*). Les bactéries **hyperhalophiles** ou **halophiles extrêmes (obligatoires)** tolèrent et exigent pour leur croissance maximale des [NaCl] supérieures à 15 % pouvant atteindre 30 % (bactéries présentes dans des saumures ou dans les mers et les lacs salés, comme *Halobacterium salinarium*, $A_w = 0.75$). Des concentrations élevées en sel détruisent les systèmes de transport membranaire et dénaturent des protéines. Ainsi, les bactéries halophiles extrêmes

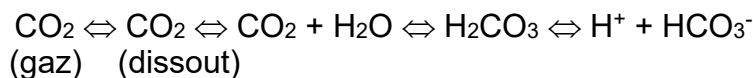
possèdent une membrane cytoplasmique inhabituelle et des enzymes qui ont une activité élevée exigeant des concentrations élevées de sels.

2.1.4. Tension gazeuse (aération)

L'oxygène moléculaire O_2 est l'accepteur d'électrons nécessaire à tous les micro-organismes aérobies stricts. Les plaques d'agar en boîte de Pétri et les couches minces des milieux liquides contiennent suffisamment d' O_2 pour ces bactéries. Dans une culture liquide dense, les bactéries aérobies ne poussent qu'à la surface, car les conditions sont de plus en plus anaérobiques dans le fond. Ceci nécessite une aération du milieu en profondeur pour y permettre la croissance de ces bactéries, car les micro-organismes n'utilisent que de l' O_2 dissout. L'aération des cultures liquides se fait avec de l'air pour les aérophiles ou avec un mélange d' O_2 , d' N_2 et de CO_2 pour les microaérophiles.

Les micro-organismes autotrophes (fixant le CO_2), mais aussi des hétérotrophes (parasites du sang, des tissus, des intestins) ont besoin d'une teneur élevée en CO_2 dans l'atmosphère ($\pm 10\%$) ou en $NaHCO_3$ ($\pm 0.2\%$) pour leur croissance. Ce sont des microorganismes microaérophiles capnophiles.

On doit toujours ainsi tenir compte du rapport entre le pH, la concentration en HCO_3^- et la tension partielle en CO_2 de l'atmosphère :



La relation entre le pH, $[HCO_3^-]$ et la pression partielle en CO_2 de l'atmosphère est donnée par l'équation de HENDERSON-HASSELBALCH :

$$pH = pK' + \log \frac{c(HCO_3^-)}{P(CO_2) \cdot \alpha} \quad \alpha = \text{coefficient de solubilité.}$$

C'est-à-dire, la concentration en CO_2 est égale au produit de la pression partielle de CO_2 et de α .

2.2. Physiologie de la croissance bactérienne

2.2.1. Définition de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne est l'accroissement de la matière cellulaire vivante qui, le plus souvent, se caractérise par l'augmentation de la **biomasse** (la taille) et du **nombre** (division par scission) des cellules bactériennes. Chez les unicellulaires, on doit distinguer l'augmentation du nombre des cellules de celle de la biomasse cellulaire (la taille).

Pour les études biochimiques, la croissance bactérienne est habituellement définie en termes de masse bactérienne, tandis que pour les études génétiques ou d'infection, le nombre des cellules est plus pertinent.

Délimitations terminologiques du nombre et de la masse des bactéries

Paramètres	Nombre des bactéries	masse bactérienne
par unité de volume	Concentration bactérienne (nombre cellules/ml)	densité bactérienne (poids sec mg - µg/ml)
duplications ou divisions par unité de temps	taux de croissance horaire (ou taux de division) ν (h^{-1})	taux exponentiel (népérien) de croissance μ (h^{-1})
intervalle de temps par duplication / division	Temps de génération g (h)	temps de duplication (doubling time) t_d (h)

Pour la détermination du nombre (concentration) ou de la masse (densité) des bactéries, il faut partir généralement d'une suspension bactérienne homogène.

2.2.2. Méthodes de mesure de la croissance bactérienne

2.2.2. a) Détermination du nombre des bactéries : Dénombrement ou Numération

La numération totale des bactéries donne le nombre total de (toutes) les cellules des bactéries présentes dans une suspension bactérienne.

La numération des bactéries viables donne le nombre des bactéries pouvant former des colonies sur un milieu solide ou des suspensions dans un milieu liquide. Elle est exprimée en **colony-forming units CFU** ou unités formant des colonies UFC.

- Le nombre total des cellules : pour la numération totale des bactéries, on utilise les techniques suivantes :

* comptage (numération) microscopique des bactéries étalées sur couche mince (0,02 m) dans une cellule de comptage (compte-bactéries) comparable à un hématimètre (volume $5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^3$). Le nombre de cellules comptées est à multiplier par $2 \cdot 10^7$ pour obtenir le nombre des bactéries par ml (techniques de Neubauer, de Thoma ou de Petroff-Hauser) ;

* numération relative des bactéries (parfois après coloration) en rapport (comparaison) avec un nombre connu (préalablement dénombré) des levures ou des érythrocytes (Ca. $5 \cdot 10^6$ érythrocytes/ml) → méthode indirecte ;

* utilisation d'un compteur électronique « Coulter-counter » qui exploite la perte de conductibilité d'une solution d'électrolyte qui se produit lors du passage d'une cellule bactérienne à travers une ouverture étroite ;

* utilisation d'une membrane-filtre dans les cas de moins de 10 cellules/ml : l'eau de mer, d'étang ou potable est filtrée sur une (filtre de membrane), celle-ci est séchée, colorée, rendue transparente et examinée au microscope.

- Le nombre des cellules viables : d'après la technique de Koch de coulée en boîte, un aliquot (volume connu) d'une dilution connue d'une suspension bactérienne homogène est mélangé avec un milieu solide en surfusion (40 - 45°C) et ensuite coulé dans une boîte de Pétri. La suspension bactérienne peut aussi être directement appliquée et étalée sur le milieu solide en boîte de Pétri avec une spatule (triangulaire) de Drigalsky ou avec un filtre après filtration de la suspension. (Filtres membranaires de Göttingen). Après incubation à 1 T° optimale, on compte les colonies apparues, chacune correspondant à la prolifération d'une cellule de bactérie.

Cette technique ne s'applique qu'à des suspensions homogènes de bactéries et non à celles hétérogènes (population mixte).

2.2.2. b) Détermination de la masse des bactéries

Pour estimer le rendement (ou le produit) cellulaire d'une culture, on calcule le **poids humide** (frais) ou le **poids sec des bactéries**.

Les teneurs en protéines ou en azote servent de mesure pour les activités métaboliques ou enzymatiques. La densité bactérienne peut aussi être estimée par turbidimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre.

- Méthodes directes :

* le poids humide est déterminé par pesée après centrifugation des cellules et, après dessiccation, on peut en estimer le poids sec (ou biomasse);

* l'estimation de l'azote total (techniques de micro-KJELDAHL ou de microdiffusion d'ammonium) et celle du carbone total (d'après SLYKE-FOLCH) sont beaucoup plus précises;

* la détermination de la concentration de protéines des bactéries se fait par les modifications de la méthode de Biuret et par d'autres réactions colorimétriques ou par des microméthodes (d'après LOWRY ou FOLIN-CIOCALTEU).

- Méthodes indirectes

* La turbidité d'une suspension bactérienne est déterminée en mesurant sa densité optique comme extinction à l'aide d'un spectrophotomètre entre 490-660 nm (turbidimétrie). Dans certains cas, la mesure de la dispersion de la lumière (néphélométrie) est plus précise. La turbidité n'est linéaire à la masse bactérienne

que dans un domaine de faible densité entre 0,01 mg - 0,5 mg/ml (poids sec), soit Ca. 10^7 cellules. La dispersion de la lumière dépend du diamètre, de la forme et de l'index de réfraction de la particule dispersante et aussi des constituants de la cellule. Une pression osmotique élevée du milieu contractant les cellules augmente l'index de réfraction et ainsi la dispersion de la lumière (les bactéries présentent un index de réfraction élevé → diminution de la transmission due à la dispersion de la lumière; celle-ci est très grande à de faibles λ).

* Les activités métaboliques (prise d'O₂, production de CO₂, d'acides ou de protéines, production et utilisation de l'ATP, activités enzymatiques) peuvent servir de mesure adéquate de la masse microbienne. Pour ce fait, on utilise des techniques titrimétriques, manométriques, électrochimiques ou biochimiques.

* La microcalorimétrie permet de déceler les faibles quantités de chaleur libérées au cours de la croissance microbienne par des échantillons de faible volume. Ce dégagement de chaleur est lié à la dégradation des substrats énergétiques. L'appareil de mesures est un calorimètre / microcalorimètre isotherme à conductivité thermique. Il est constitué d'un réservoir calorimétrique de 1 à 4 ml de capacité, où se produit la réaction et dont la paroi représente l'enceinte interne. Cette cellule est placée dans un bloc d'aluminium (enceinte externe) de grande conductibilité thermique. La chaleur dégagée dans la cellule (dans le cas d'une réaction exothermique) diffuse rapidement vers l'enceinte externe. La différence de température entre les deux enceintes est très faible. On ne mesure pas l'augmentation de température, comme c'est le cas avec un calorimètre adiabatique de BERTHELOT, mais une grandeur proportionnelle au flux thermique qui s'établit entre les deux enceintes. Le système de détection est constitué par un réseau de thermocouples (thermopiles) montés en série qui entoure l'enceinte interne et qui est en contact avec l'enceinte externe. La force électromotrice engendrée par le passage d'un flux de chaleur à travers la thermopile est amplifiée et enregistrée (en puissance μW ou en tension μV). Le tracé obtenu est un thermogramme ou une courbe puissance/temps (courbe P/t) dont l'amplitude de chacun des points est proportionnelle à la puissance thermique (dQ/dt) dégagée à l'instant considéré. Elle est exprimée en watts (W) ou microwatts (μW). Le thermogramme traduit globalement les événements énergétiques qui accompagnent la croissance. Son tracé est simple lorsque le substrat énergétique est le seul élément limitant la croissance. L'accroissement de la puissance thermique est étroitement associé à l'augmentation de la biomasse (à l'utilisation du substrat).

2.2.3. Cinétique de la croissance exponentielle et paramètres de la croissance

Les bactéries se multiplient par division binaire, leur accroissement en nombre se faisant suivant une progression géométrique de raison 2 : $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$.

Si un volume donné d'une culture statique contient au départ N_0 cellules, le nombre N des cellules après n divisions ou générations et un temps t s'élèvera à $N_0 \cdot 2^n$.

Si N_0 = nombre initial des cellules

Après un cycle de division, 1 génération : $N_1 = 2 \times N_0 = 2^1 N_0$

Après 2 générations : $N_2 = 2 \times 2^1 N_0 = 2^2 N_0$

Après 3 générations : $N_3 = 2 \times 2^2 N_0 = 2^3 N_0$

Après n générations : **N_n ou $N_t = N = N_0 \cdot 2^n = 2^n N_0$ ou $N_f = N_i \cdot 2^n$**

$\log N = \log N_0 + n \cdot \log 2$;

Le nombre de divisions ou générations n sera

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

1^{er} paramètre : le taux horaire de croissance v ou k (ou taux de division) est le nombre des divisions cellulaires par unité de temps, c'est-à-dire le nombre de générations par unité de temps (heure, minute). Il est estimé en rapport avec le nombre des cellules et correspond à la réciproque du temps de génération.

$$v = \frac{n}{t} = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2 (t - t_0)} \quad (h^{-1}) \quad (\log 2 = 0,3010)$$

2^e paramètre : le temps de génération g est le temps nécessaire au cycle de division; c'est le temps nécessaire pour une population bactérienne se reproduisant activement pour doubler sa taille.

$$g = \frac{t}{n} = \frac{1}{v} \quad (h) \quad \text{Exemples : } Escherichia coli : 20 \text{ min ;}$$

Nitrobacter et *Nitrosomonas* : 5 - 10 h ;
Streptococcus agalactiae: 40 - 50 min (Takaisi-Kikuni, 1990); *Mycobacterium tuberculosis*: 800 - 900 min.

Si une suspension bactérienne se multiplie pendant 10 h de 10^3 à 10^9 cellules, quels seront son taux horaire de croissance et son temps de génération ?

$$v = \frac{\log 10^9 - \log 10^3}{0,3010 \times 10} = \frac{6}{3} = 2 \text{ h}^{-1}$$

$$g = \frac{t}{n} = \frac{1}{v} = \frac{1}{2} \text{ h} (= 30 \text{ min}) \quad n = t/g = 600 \text{ min}/30 \text{ min} = 20.$$

3^e paramètre : le taux exponentiel (ou népérien) de croissance μ

Dans la cinétique de croissance, on considère la population bactérienne croissante comme un système autocatalytique croissant. Ainsi, on prend la densité bactérienne X (= biomasse) comme base d'estimations. La vitesse de changement de la densité bactérienne est à chaque moment proportionnelle à la densité bactérienne présente et suit ainsi la cinétique d'une réaction de 1^{er} ordre.

Le taux exponentiel (ou népérien) de croissance est alors donné par l'équation

$$\mu X = \frac{dX}{dt} \quad \frac{dX}{dt} = \text{variation de la biomasse cellulaire}$$

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

μ est une **constante instantanée** du taux de croissance. Il constitue une mesure pour la vitesse de la croissance en masse des cellules dans la phase exponentielle de croissance; c'est-à-dire le taux de croissance pendant la phase logarithmique d'une population bactérienne en reproduction active.

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

Par intégration, il en résulte

$X = X_0 \cdot e^{\mu t}$; X_0 = biomasse initiale et X ou X_t = biomasse après un temps t . Le taux exponentiel de croissance se calcule ainsi pour les densités bactériennes X_0 et X_t , mesurées aux temps t_0 et t :

$$\log X_t = \log X_0 + \mu t \times \log e$$

$$\log X_t - \log X_o = \mu t \times \log e$$

$$\mu = \frac{\log X_t - \log X_o}{\log e (t - t_o)}$$

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_o}{t - t_o} \quad (h^{-1}); \log e = 0,43429.$$

Pour une duplication de la masse cellulaire

$$X_t = 2 X_o$$

$$2X_o = X_o \cdot e^{\mu \cdot t_d} \quad (t_d = t - t_o);$$

$$\mu = \frac{\ln 2 + \ln X_o - \ln X_o}{t_d}$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d}$$

4^e paramètre : le temps de dédoublement ou de duplication t_d (doubling-time) de la biomasse :

De la formule ci-dessus résulte le temps de duplication t_d

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (h); \quad (\ln 2 = 0,693).$$

En comparant le taux exponentiel de croissance μ et le taux de croissance horaire v , il faut noter que le nombre des cellules n'est pas identique ou proportionnel à la masse des cellules, et que leurs relations se modifient pendant la croissance dans une culture statique. Si on détermine et compare le poids sec et le nombre des cellules dans les conditions sous lesquelles l'augmentation du nombre correspond à celle de la masse (cas des « cellules standards »), alors on aura $t_d = g$ et

$$\mu = \ln 2 \cdot v = \frac{\ln 2}{g}$$

5^e paramètre : le rendement X : il représente la différence entre la masse bactérienne maximale X_{max} obtenue pendant la croissance et la masse bactérienne initiale X_o présente au début de la culture.

$X = X_{max} - X_o$ (g). Il est exprimé en poids sec bactérien (en g).

Il est plus important d'estimer le rapport entre le rendement et l'utilisation d'un substrat (X/S), dont le quotient est défini comme le coefficient de rendement ou taux de croissance en fonction du substrat : $Y = X/S$ (growth yield).

Calculé en fonction de la quantité du substrat en mole, on parlera alors du coefficient molaire de rendement ou taux molaire de croissance Y_m (molar growth yield) $Y_m = g \text{ cellules} / \text{mole substrat}$. C'est la masse de cellules bactériennes, exprimée en poids sec, produite après consommation d'une mole du substrat.

Ex. : *Streptococcus agalactiae*, souche NCTC8181 (Takaisi-Kikuni, 1990) :

$Y_m = 30$: substrat glucose

$Y_m = 60$: substrat maltose. Ce germe croît mieux en présence de maltose que de glucose.

Y_m peut aussi être calculé en fonction de la quantité d'ATP obtenue (ou à obtenir) à partir d'une source d'énergie (substrat) donnée (g cellule/mole ATP)

Ex. : *Escherichia coli* : $Y_{ATP} = 12,4$
Klebsiella pneumoniae : $Y_{ATP} = 14$

2.3. Modes de croissance des bactéries

2.3.1. Croissance en milieu liquide

2.3.1.1. Croissance bactérienne dans une culture statique

C'est la croissance dans un système « fermé », en milieu non renouvelé, dans lequel les bactéries poussent dans un milieu liquide jusqu'à l'épuisement de celui-ci. Durant le processus de croissance, ni le milieu de culture en épuisement, ni les métabolites produits ne sont éliminés du récipient de culture.

En portant les logarithmes du nombre ou de la masse des bactéries en fonction du temps sur un graphique, on obtient une courbe de croissance sigmoïde présentant plusieurs phases : de latence, exponentielle, stationnaire, de déclin.

a) Phase de latence ou lag-phase

C'est l'intervalle de temps entre l'ensemencement et le début de croissance pendant lequel le taux de croissance est presque nul. Cette période de grossissement et d'adaptation du germe ensemencé aux conditions du nouveau milieu de culture dépend

- de l'âge du germe à ensemer : cellules jeunes ou âgées (en phase stationnaire) de la préculture ;
- de la source d'énergie ou de carbone utilisée dans le nouveau milieu (parfois différente de celle de la préculture) et des facteurs de croissances (présents ou absents);
- des conditions de culture : pH, température, tension gazeuse, pression osmotique ;
- de l'état physiologique du germe : préculture en présence d'un inhibiteur (antibiotique,...) ou dans un environnement défavorable et traumatisant pour le germe.

b) Phase exponentielle ou logarithmique (log-phase)

Elle est caractérisée par un taux maximal de croissance presque constant. Le logarithme de la masse bactérienne augmente de façon accélérée, c-à-d le temps de génération est réduit, la densité bactérienne augmente et les métabolites s'accumulent. Elle constitue la période idéale pour étudier ou déterminer les paramètres de croissance et l'influence des facteurs du milieu.

c) Phase stationnaire (maximum stationnaire)

Cette phase correspond à la période où il n'y a plus d'augmentation du nombre total de bactéries. Elle est caractérisée par la baisse / la réduction de la croissance des bactéries et la diminution (ou la chute) du taux de croissance dus à l'épuisement du milieu (substrat), à l'accumulation des métabolites ou autres déchets toxiques, au changement de pH (acidification ou alcalinisation) ou de tension gazeuse (basse pression partielle d'O₂). Les bactéries restent longtemps viables, à l'exception de cellules très sensibles qui meurent par autolyse (activation des autolysines bactériennes).

d) Phase de déclin (ou de mort ou de mortalité)

Les bactéries ne se multiplient plus (l'arrêt de la croissance des bactéries), elles meurent et le taux de mortalité est constant en fonction du temps (le nombre des cellules qui meurent est proportionnel au temps : diminution exponentielle des cellules vivantes). Les causes de cette mort sont peu connues. Chez les

Lactobacillus, *Streptococcus agalactiae* et *Escherichia coli*, la cause de la mort semble être l'accumulation des acides synthétisés pendant la croissance (acidification du milieu de culture).

2.3.1.2. Croissance diauxique

Si une bactérie a à sa disposition dans le milieu de culture deux substrats au lieu d'un, elle peut utiliser préférentiellement l'un des deux (généralement le plus simple et facile à dégrader) et ne commencer à recourir au second que lorsque le premier est épuisé. Lors du passage d'un substrat à l'autre, la croissance peut ralentir et même cesser. La courbe de croissance se décompose alors en deux. Ce processus de croissance s'appelle **diauxie**. C'est le cas, par exemple, d'*Escherichia coli* qui, en présence d'un mélange de glucose et de lactose, consomme d'abord complètement le glucose avant d'utiliser le lactose.

2.3.1.3. Croissance bactérienne dans une culture continue (en milieu renouvelé)

Étant donné que dans une culture statique les conditions de culture se modifient progressivement (augmentation de la densité bactérienne, épuisement du structure), il est souhaitable, pour beaucoup d'études physiologiques, de maintenir et de laisser croître les cellules bactériennes pendant longtemps dans une concentration de substrat et/ou des conditions du milieu qui restent constantes tout au long de la culture. Pour ce fait, on ajoute continuellement du bouillon (milieu de culture) frais à la population croissante des bactéries en même temps qu'une quantité égale de suspension bactérienne est retirée du récipient de croissance. Ce procédé est à la base du chimostat et du turbidostat.

a) Chimostat ou bactogène : il consiste en un récipient de culture dans lequel arrive (coule) à un flux constant le milieu de culture se trouvant dans un réservoir et duquel sort à la même vitesse la suspension bactérienne. L'oxygénation et la diffusion rapide des substrats contenus dans le milieu frais sont assurées par l'aération et l'agitation mécanique. Si le taux du flux du milieu est $f = l/h$ et le volume du récipient de culture est V (l), le taux de dilution $D = f/V$ et donne le volume du milieu changé par heure. Ce système se laisse facilement automatiser en stabilisant la vitesse de flux du milieu et en limitant le taux de croissance par élimination partielle du substrat.

$$dX/dt = \mu X - DX$$

$$D.X = - dX/dt$$

$$X = X_0.e^{-Dt}$$

μ_{max} = taux maximal de croissance à des concentrations de saturation du substrat.

Durant la période de plateau de la culture continue en chimostat, la concentration du substrat limitant la croissance reste constante, parce qu le taux du flux du milieu (f) ou le taux (la fréquence ou la vitesse) d'addition du nutriment (substrat) égale celui auquel il (le nutriment) est utilisé par la culture, plus ce qui est éliminé par lavage.

Bien que des bactéries se reproduisent continuellement, un nombre des cellules bactériennes est continuellement éliminé du récipient de culture par lavage. Ainsi, un nombre constant de cellules bactériennes est maintenu dans le récipient de culture en chimostat pour garantir un taux de croissance $\mu > \frac{1}{2} \mu_{max}$ et $D < k_s$ (k_s = constante de saturation définie comme la concentration du substrat à $\frac{1}{2} \mu_{max}$). Le nombre des cellules et la concentration du nutriment limitant changent peu à des taux faibles de dilution. Quand le taux de dilution D approche k_s , la concentration (le nombre) en cellules chute rapidement vers zéro, et la concentration du substrat limitant approche celle dans le réservoir contenant le milieu frais.

b) Turbidostat : il consiste à maintenir constant une densité bactérienne (turbidité, nombre des cellules bactériennes) donnée tout au long de la croissance. Un turbidimètre règle le système de commande de ravitaillement en milieu de culture. Les substances nutritives sont en excès dans le récipient de culture et les bactéries se multiplient à un taux de croissance presque maximal.

2.3.1.4. Croissance synchrone

Dans une culture bactérienne en croissance, les cellules sont distribuées parmi tous les stades de leur cycle de division. Elles ne se divisent pas toutes au même moment. Pour pouvoir étudier les processus métaboliques pendant le cycle de division, on a besoin d'une suspension des bactéries dont la division des cellules se fait au même moment, presque simultanément (de façon synchronisée). Dans ce cas, la portion exponentielle de la courbe de croissance présente une allure en escalier : elle est constituée par une série de paliers, séparés par des discontinuités brusques qui correspondent aux duplications. L'identité des phases métaboliques dans les différentes cellules se réalisent par synchronisation de la population bactérienne à l'aide de différentes astuces comme le changement de température (choc thermique, ex., +27°C et +37°C), la limitation des aliments, l'excitation lumineuse ou le triage des cellules de même taille par filtration.

2.3.2. Croissance bactérienne en milieu solide

La croissance bactérienne sur des milieux solides obéit aux mêmes principes que la culture en milieu liquide. Mais l'étude de ses aspects qualitatifs (paramètres) paraît plus difficile à réaliser.

En raison de la viscosité du milieu solide, la bactérieensemencée donne naissance à des cellules-filles qui restent au voisinage les unes des autres en formant des agglomérats (masses compactes), qui, en quelques heures, deviennent visibles à l'œil nu et sont appelés **colonies** (une colonie compte environ 10^7 cellules).

Un clone ou une culture pure (une souche) est une colonie isolée et est défini comme un groupe d'organismes issus d'un même organisme parental par reproduction végétative et possédant ainsi le même patrimoine génétique. Ainsi chaque culture pure de bactéries est un clone et la progéniture d'un mutant s'y développant est un sous-clone.

Cette croissance est grandement exploitée pour

- la numération des cellules bactériennes viables ;
- l'isolement des cultures pures à partir d'un mélange de plusieurs espèces bactériennes en utilisant des milieux de culture sélectifs;
- l'identification des micro-organismes ;
- les bioessais des substrats ou des agents antimicrobiens.

Morphologie des colonies

Chaque espèce bactérienne donne habituellement naissance à des colonies caractéristiques : elles se distinguent par leur taille et leur forme ainsi que par leur couleur et leur consistance.

Les colonies bactériennes peuvent avoir la forme suivante: **ronde, irrégulière, crénelée, lobée, dentée, échancrée, plane, légèrement convexe, convexe, en dôme (bombée), ombiliquée (en accolade), saillante**.

L'une des plus importantes propriétés diagnostiques d'une colonie est sa **texture de surface** ou sa **consistance** qui est caractéristique de la bactérie / de l'espèce bactérienne qui lui a donné naissance. La texture ou la consistance des colonies permet de les différencier. Elle peut être lisse, mucoïde ou rugueuse.

a) **Colonies S ou smooth** : elles sont lisses, grisâtres, translucides, brillantes, à bords circulaires et à surface régulièrement bombée. Elles reflètent la présence d'une capsule (bactéries gram-positives) ou de chaînes polysaccharidiques de la membrane extérieure (bactéries gram-négatives). Elles sont virulentes. Ex. : *Pneumococcus*, *Enterobacteriaceae*.

b) **Colonies M ou mucoïdes**: ce sont des colonies muqueuses, ressemblant à du mucus, opaques, rondes, volumineuses et ayant une consistance visqueuse. Chez les bactéries gram-négatives (ex., *Klebsiella*), une capsule peut être formée conduisant à des colonies mucoïdes ou brillantes (glacées, lustrées) et jouant un rôle dans la virulence. Les colonies S et M portent des antigènes somatiques O et capsulaires K.

c) **Colonies R ou Rough** : elles sont rugueuses, ternes, plates, à bords réguliers ou déchiquetés (ondulés, rideux) et de consistance sèche. Elles sont formées par des bactéries n'ayant pas de capsule ou croissant en filaments. Elles sont dépourvues d'antigènes O et K et sont presque toutes avirulentes.

Il convient de noter que la nature du milieu de culture peut modifier l'aspect des colonies. En outre, leur taille peut dépendre de l'épuisement des nutriments ou de l'accumulation des produits de déchet ou des deux facteurs à la fois. Les colonies trop proches tendent à rester plus petites que celles qui sont bien espacées. La température influence aussi fortement la vitesse de croissance des colonies.

Les bactéries qui réalisent la synthèse de **pigments** forment des colonies fortement **colorées en rouge, en jaune, en violet, en bleu, en vert** ; par contre, celles dépourvues de pigments présentent **un aspect grisâtre, blanchâtre ou crémeux**.

Si en ensemençant le milieu de culture on répand un grand nombre de cellules à la surface du gel, les colonies ne disposent plus d'un espace vital suffisant ; il se forme une couche continue recouvrant toute la surface. La croissance est dite **confluente**. Ce type de croissance s'observe aussi à partir de quelques bactéries qui sont mobiles. Leurs cellules en croissance ont la propriété de nager dans le film liquide superficiel du milieu gélosé et de se propager sur toute la surface. On n'obtient pas de colonies isolées. C'est le cas, par exemple, du phénomène **d'essaimage** ou de « **swarming** » observé chez *Proteus* qui forment des **cellules migratrices** possédant de nombreux flagelles et se divisant en bacilles par scission transversale. Ces bacilles donnent naissance à plusieurs générations normales qui forment un anneau concentrique entourant la colonie initiale. Puis une nouvelle génération de cellules migratrices apparaît sur le bord externe de l'anneau et le cycle recommence. Finalement, toute la surface du milieu nutritif est recouverte d'**anneaux concentriques**.

CHAPITRE VIII : METABOLISME BACTERIEN

1. DEFINITION DU METABOLISME

Le flux (la circulation) de l'énergie et des matières (substances, molécules) dans une cellule constitue les caractéristiques essentielles de la vie. En circulant dans des cellules vivantes l'énergie est transformée et redistribuée par des voies qui permettent aux cellules de croître, de se multiplier, d'exécuter d'autres fonctions cellulaires et d'effectuer le travail cellulaire. Les réactions chimiques accompagnant ce flux de l'énergie constituent dans l'ensemble le processus connu comme **métabolisme cellulaire**.

1.1. Métabolisme

Le métabolisme cellulaire est le « mode de fonctionnement » de la vie. Il consiste en un réseau complexe des réactions chimiques localisées à l'intérieur des cellules qui captent de l'énergie et des matières premières de l'environnement et qui les convertissent (transforment) dans des formes utilisables pour entretenir la vie cellulaire. Chacune de ces réactions est catalysée par une enzyme spécifique. Le métabolisme comprend deux parties : le **catabolisme** et l'**anabolisme**.

Le catabolisme est la voie métabolique dégradative. Il consiste à des réactions métaboliques cellulaires impliquant la dégradation enzymatique des composés (molécules) organiques ou inorganiques en composés organiques ou inorganiques plus simples avec production (libération) de l'énergie libre. C'est un processus de **gain d'énergie**. Energie libre $\Delta G \rightarrow$ libération de chaleur (2/5) + formation d'ATP (3/5). $ATP \rightarrow$ réactions cellulaires biosynthétiques (anabolisme) + libération d'ATP ($ATP \rightarrow ADP + P_i + E$).

L'anabolisme est la voie métabolique de biosynthèses. Il constitue le processus de synthèse des constituants cellulaires et d'autres métabolites en utilisant l'énergie et les produits du catabolisme.

Une voie métabolique consiste en une séquence de réactions chimiques cellulaires conduisant à la transformation d'un composé en un autre ou en plusieurs autres.

1.2. Métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique est le mécanisme d'approvisionnement des cellules vivantes en énergie empruntée à l'environnement. De nombreuses réactions métaboliques exigent un apport d'énergie. La cellule a aussi besoin d'énergie pour

d'autres fonctions comme la motilité et le transport actif des aliments (leur accumulation contre un gradient de concentration).

Les organismes vivants (ex. bactéries) puisent leur énergie dans des composés chimiques trouvés dans leur milieu (**métabolisme chimiotrophe**) ou de l'énergie lumineuse (**métabolisme phototrophe**). Ces sources d'énergie, provenant du milieu ambiant, ne peuvent être utilisées telles quelles. Elles doivent d'abord être transformées en une « monnaie » (forme) utilisable par la cellule pour ses besoins énergétiques : l'ATP, la force protonmotrice, des coenzymes comme le NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide), NADP, FAD (flavine adénine dinucléotide). Ces molécules constituent des réservoirs ou des monnaies d'échange d'énergie libre, c'est-à-dire elles servent au **stockage** (à la conservation) et au **transfert d'énergie**. La formation et l'utilisation de l'ATP et de la force protonmotrice sont les clés des transformations cellulaires de l'énergie et le point central du métabolisme cellulaire.

L'ATP stocke l'énergie chimique sous forme de **composé phosphate riche en énergie** (ou liaisons phosphate à haute énergie). Il peut libérer de grandes quantités d'énergie libre (- 7,3 Kcal / mole) en scindant sa liaison phosphate terminale à haute énergie (conversion de l'ATP en ADP et P_i + E).

D'autres molécules servant de monnaie d'échange cellulaire stockent l'énergie sous forme de «**pouvoir réducteur**» : ce sont les coenzymes comme la NAD^+ , le NADP (NAD phosphate) ou la FAD (coenzyme contenant la riboflavine ou vitamine B2). Ces molécules peuvent recevoir des électrons et par conséquent de l'énergie provenant par exemple d'un intermédiaire métabolique. Les molécules qui ont été ainsi réduites, peuvent alors transférer leurs électrons à une autre molécule, soit, ce qui est le cas chez beaucoup de bactéries, être re-oxydées en formant de l'ATP.

1.3. Sources de génération de l'énergie cellulaire autotrophie et hétérotrophie

Différentes stratégies métaboliques pour la génération de l'énergie cellulaire ont été développées chez les microorganismes. Il s'agit des métabolismes autotrophe et hétérotrophe.

1.3.1. Métabolisme autotrophe

Le métabolisme autotrophe («self-feeding metabolism, self-sufficient cells») signifie que les microorganismes qui en sont capables n'ont pas besoin de substances organiques comme source de carbone pour synthétiser les matières organiques exigées par la cellule. Ils utilisent le CO_2 inorganique comme source de carbone et l'ammonium comme source d'azote pour synthétiser des protéines, des lipides, du DNA, des RNA et des polysaccharides. Ils obtiennent aussi l'énergie nécessaire

aux fonctions cellulaires soit par le métabolisme des substrats inorganiques ou par la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Le métabolisme autotrophe possède ainsi deux voies de gain d'énergie :

1°) le métabolisme chimiolithotrophe ou chimioautotrophe qui utilise l'énergie provenant des substances inorganiques pour fournir de l'énergie libre nécessaire à la génération de l'ATP (ainsi que pour la biosynthèse des composés organiques de la structure cellulaire) ;

2°) le métabolisme photolithotrophe ou photoautotrophe qui capte l'énergie de la lumière (des rayons lumineux) et la transforme en énergie chimique de l'ATP (et utilise le CO₂ inorganique comme source de carbone).

Les deux métabolismes chimiolithotrophe et photolithotrophe sont basés sur l'établissement d'un gradient de protons à travers une membrane et sur la génération chimioosmotique subséquente de l'ATP.

1.3.2. Métabolisme hétérotrophe

Le métabolisme hétérotrophe utilise des composés organiques comme source de carbone pour la production de la biomasse cellulaire. Par contre, le gain d'énergie peut être réalisé par deux voies suivantes :

1°) le métabolisme chimioorganotrophe ou chimiohétérotrophe qui convertit les substrats organiques en énergie chimique utilisée pour former l'ATP. Il existe deux types de métabolisme hétérotrophe de génération cellulaire de l'ATP : la respiration et la fermentation ;

2°) le métabolisme photoorganotrophe ou photohétérotrophe qui gagne l'énergie en convertissant l'énergie lumineuse en énergie chimique de l'ATP.

2. METABOLISME DES BACTERIES CHIMIOTROPHES

Les bactéries chimiotrophes se subdivisent en deux groupes : les chimioorganotrophes qui empruntent leur énergie à des composés organiques et les chimiolithotrophes dont les sources d'énergie sont des composés (ou des éléments) minéraux (type métabolique observé uniquement chez les bactéries).

2.1. MÉTABOLISME DES BACTÉRIES CHIMIOORGANOTROPHES

L'ensemble des bactéries chimioorganotrophes se nourrit de composés organiques très divers. Les substances alimentaires servant à la production d'énergie sont consommées selon deux processus métaboliques fondamentaux : la **fermentation**

et la **respiration**. La fermentation exige un accepteur final d'électrons interne provenant d'un substrat organique initial, tandis que la respiration exige un accepteur final d'électrons extérieur ne provenant pas d'un substrat organique.

2.1.1. Fermentation

2.1.1.1. Phosphorylation au niveau du substrat

La fermentation est un type de métabolisme producteur d'énergie qui est anaérobie, car elle s'observe normalement en l'absence d'oxygène. Dans ce processus métabolique de régénération d'ATP, un substrat organique initial agit comme un donateur d'électrons tandis qu'un produit du substrat sert d'accepteur d'électrons. Le donateur aussi bien que l'accepteur d'électrons sont à «internes» au substrat organique, c'est-à-dire l'accepteur éventuel d'électrons dérive du substrat originel (initial). Il n'y a aucun changement dans le degré d'oxydation des produits par rapport aux molécules de substrat de départ. Les produits oxydés sont exactement contre-balançés par les produits réduits, maintenant ainsi l'équilibre d'oxydo-réduction exigé. Lors qu'un composé intermédiaire est oxydé, cette oxydation est nécessairement compensée par une réduction équivalente d'un ou de plusieurs intermédiaires de cette voie. Les produits de la fermentation ont donc, dans leur ensemble, le même degré d'oxydation que le substrat. Des coenzymes, par exemple le NAD^+ , qui sont réduites au début d'une fermentation sont réoxydées ultérieurement dans cette voie. En fait, elles ne sont pas consommées lors de ce processus.



La fermentation consiste dans la dégradation par oxydation d'un composé organique, par exemple le glucose, selon une voie métabolique déterminée (en fonction du microorganisme). Le long de cette chaîne métabolique, certaines réactions **exergoniques**, libérant de l'énergie, sont utilisées pour la synthèse de l'ATP à partir d'ADP : il y a **phosphorylation au niveau du substrat** ; c'est-à-dire, il y a couplage d'une réaction chimique libérant de l'énergie avec la génération d'ATP exigeant cette énergie libérée.

kinase



Le substrat organique activé par un groupement phosphate, (XP), est un **composé organophosphoré riche en énergie** formé à un niveau donné de la chaîne

métabolique. XP va céder le groupement phosphate à l'ADP pour former l'ATP. Ce type de phosphorylation est le seul mode de production d'énergie par la fermentation. Elle n'exige pas l'oxygène. La fermentation est par conséquent un **processus anaérobie**, même si elle peut se produire en présence de l'oxygène moléculaire chez certains microorganismes.

La fermentation produit ainsi moins d'ATP ou d'énergie ($\Delta G^\circ = - 58 \text{ kcal / mole de glucose}$) que la respiration ($\Delta G^\circ = - 686 \text{ kcal / mole de glucose}$), car la molécule de substrat organique doit servir aussi bien de donateur interne d'électrons et d'accepteur interne d'électrons et, ainsi, les atomes, de carbone et d'hydrogène ne peuvent pas être complètement oxydés en CO_2 et H_2O .

Les bactéries fermentatives obligatoires, comme les *Streptococcus*, possèdent un système FoF1-ATPase dans leur membrane cytoplasmique (ATPase, proton translocating ATPase, ATP synthétase, ATP synthase : peut catalyser la synthèse ou l'hydrolyse de l'ATP).

L'ATP, généré par phosphorylation au niveau du substrat, est utilisé pour pomper les protons et les autres ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) dans la direction inverse (vers le cytoplasme) à travers la membrane par le complexe FoF1-ATPase : l'ATP est converti en ADP et en P_i par l'ATPase, et l'énergie de cette réaction est couplée à l'export des protons de la cellule. Le système FoF1-ATPase génère (crée) ainsi une **force protonmotrice** à travers la membrane cytoplasmique. Cette force maintient le pH intracellulaire à une valeur appropriée et procure un mécanisme pour des processus de transport actif dépendant de la force protonmotrice à travers la membrane, comme la prise (l'entrée) active de sucres ou d'autres substances, l'export (la sortie) de Na^+ et Ca^{2+} , et la rotation des flagelles.

Les étapes initiales de la fermentation et de la respiration sont identiques. Une voie fermentative complète débute avec un **substrat**, inclut la **glycolyse** et se termine par la **formation des produits finaux**. La voie métabolique de fermentation des glucides (carbohydrates) commence avec la glycolyse (1^{ère} étape de la fermentation et de la respiration) et se termine par la réduction du pyruvate (par exemple, en lactate ou en éthanol) et la reoxydation de NADH en NAD^+ .

2.1.1.2. GLYCOLYSE

La glycolyse (du grec, glyco, sucre, et lysis, dégradation) est le processus de dégradation d'un sucre. Les voies glycolytiques constituent des voies cataboliques du métabolisme des sucres qui conduisent à leur dégradation en de petites molécules pouvant servir de substrat pour d'autres réactions métaboliques. La

chaîne des réactions enzymatiques de la glycolyse se termine par la formation du pyruvate et est accompagnée par la synthèse d'ATP par la réaction de **phosphorylation au niveau du substrat**.

Trois différents types de transformation chimique se produisent pendant la glycolyse :

- (1°) la dégradation du glucose (6 carbones) pour générer deux molécules de **pyruvate** (3 carbones),
- (2°) la phosphorylation de l'ADP en **ATP** par des composés phosphate (organophosphorés) riches en énergie formés pendant la glycolyse,
- (3°) le transfert des atomes d'hydrogène ou des électrons : **la réduction de NAD⁺ ou NADP⁺ respectivement en NADH ou en NADPH** (énergie sous forme de pouvoir réducteur).

Il existe diverses voies glycolytiques utilisées par des microorganismes pour dégrader les glucides : la voie d'Embden-Meyerhof, les voies phosphorylée et non phosphorylée d'Entner-Doudoroff, la voie de pentose phosphate, la voie de méthylyglyoxal,...

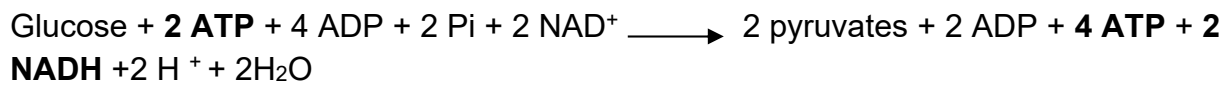
2.1.1.2.a) Voie d'EMBDEN-MEYERHOF

La voie d'EMBDEN-MEYERHOF ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas représente la voie principale du catabolisme du glucose chez la plupart de cellules eucaryotes ainsi que chez un grand nombre de bactéries anaérobies et anaérobies facultatives, à l'exception des archéobactéries.

Dans cette voie glycolytique, une molécule de glucose est dégradée au cours d'une séquence d'une d'au moins neuf réactions enzymatiques en deux molécules de pyruvate. Le glucose est d'abord converti en fructose 1,6- diphosphate par une série de réactions enzymatiques, successivement par l'hexokinase, la phosphoglucosomérase et la **6-phosphofructokinase**, l'enzyme-clé dans la régulation de la fréquence (ou de la vitesse) de la glycolyse. Le fructose 1,6-diphosphate est à son tour clivé pour former deux sucres isomères à 3 carbones (glycéraldéhyde 3-phosphate et dihydroacétone phosphate), qui, à leur tour,, subissent un ensemble des réactions conduisant à la formation des **deux pyruvates**. La dernière réaction de formation de pyruvate inhibe à son tour l'activité de la phosphofructokinase. Cette deuxième série de réactions sont **exergoniques** et sont couplées à la synthèse de **deux molécules d'ATP** (composé phosphoré riche en énergie) à partir d'ADP par une réaction de phosphorylation au niveau du substrat. Elles sont aussi accompagnées de la formation des **deux molécules de coenzyme réduit NADH** (énergie sous forme de pouvoir réducteur). Les 2 molécules d'ATP

synthétisées pendant la glycolyse constituent la quantité totale d'énergie de la fermentation.

Le bilan de la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof est :



Les étapes initiales de la voie d'Embden- Meyerhof impliquent des **réactions endergoniques** qui requièrent une réaction exergonique libérant de l'énergie. Pour ce fait, la voie démarre par l'utilisation de l'ATP. Des cellules initient la voie d'Embden-Meyerhof en couplant la conversion du glucose en glucose 6- phosphate avec celle de l'ATP en ADP, ou, dans le cas de beaucoup de bactéries, en utilisant le système phosphoénolpyruvate : phosphotransférase (PEP : PTS) qui convertit le glucose en glucose 6- phosphate lors du transport à travers la membrane cytoplasmique. Le bilan énergétique de PEP : PTS est équivalent à celui de la conversion directe utilisant l'ATP.

2.1.1.2. Fermentation lactique

Au cours de ce processus de fermentation, le pyruvate est réduit en **acide lactique** : NADH cède ses électrons à l'acide pyruvique ; ainsi, la réoxydation du NADH en NAD⁺ est couplée à la réduction du pyruvate en lactate. Cette dernière réaction est catalysée par la **lactate déshydrogénase**. Ce type de fermentation est réalisé par des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Ces lactobactéries sont des fermentants obligatoires et des anaérobies aérotolérants.

2.1.1.2.a) Fermentation homolactique

La fermentation homolactique conduit à la **production exclusive du lactate** lorsque la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof (voie du fructose-diphosphate) est utilisée lors de la fermentation du glucose.



Elle est réalisée par

- *Streptococcus lactis*, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *S. bovis*, *S. salivarius*,
- *Enterococcus faecalis*
- *Lactobacillus lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. debrückii*, *L. bulgaricus* (interviennent dans la digestion humaine)
- *Lactococcus spp.*
- *Pediococcus spp.*

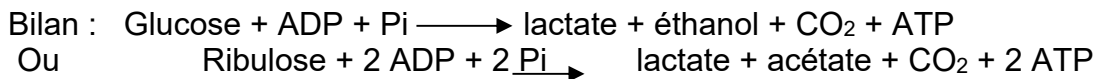
La fermentation homolactique est importante dans l'industrie laitière où elle constitue la voie principale de fermentation du lait conduisant à la production du yaourt (yogourt), du fromage frais et d'autres produits laitiers. Elle intervient aussi dans l'élaboration du fourrage en silo.

Lactobacillus spp. interviennent dans la digestion humaine et aident certaines personnes à digérer les produits laitiers par les enzymes que ces bactéries produisent (ex. *L. acidophilus*).

Les streptocoques vivant à la surface des dents dans la cavité buccale produisent par la fermentation homolactique de l'acide lactique qui attaque la dent par la plaque dentaire et détruit l'émail de la dent en créant des caries dentaires.

2.1.1.2.b) Fermentation hétérolactique

Certaines lactobactéries, ne possédant pas des enzymes fructose-diphosphate aldolase et triose phosphate isomérase, procèdent à la fermentation hétérolactique en dégradant le glucose par la voie de pentose-phosphate (voie de WARBURG-DICKENS-HORECKER. Cette fermentation conduit à la formation du **lactate** (90 %) et d'**autres produits secondaires** comme le CO₂ et l'éthanol ou l'acétate, ainsi que d'une seule molécule d'ATP



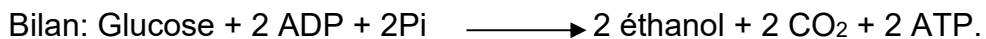
La fermentation hétérolactique est réalisée par :

- *Leuconostoc mesenteroides*, *L. cremoris*
- *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. viridescens*, *L. casei* (ribose) *L. plantarum* (pentose),...
- *Bifidobacterium bifidum* (chez les nouveau-nés et nourrissons).

Elle est mise en jeu au cours de la production de la choucroute, du kéfir (lait fermenté acide, légèrement alcoolisé et gazeux au Moyen-Orient) et du fromage blanc. Elle est le plus souvent nocive, provoquant des altérations des jus de fruits, de la bière et du vin.

2.1.1.3. Fermentation alcoolique (ou éthanolique)

La fermentation alcoolique consiste à la dégradation du glucose (ou des glucides) généralement par la voie glycolytique d'Embden- Meyerhof, suivie par la conversion du pyruvate obtenu en **éthanol** et en **CO₂** (produits finaux) ;



La transformation du pyruvate en éthanol et CO₂ comprend deux étapes :

(1°) le pyruvate est décarboxylé en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase avec la participation de thiamine phosphate ;

(2°) l'acétaldéhyde est réduit en éthanol par l'alcool déshydrogénase ; cette réaction finale est couplée à la conversion (l'oxydation) de NADH en NAD⁺.

En milieu alcalin, la fermentation s'accompagne d'autres produits (glycérol, acétate), qui peuvent, par exemple, être responsables de la « maladie du vin »

La fermentation alcoolique est réalisée

- surtout par plusieurs levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae* (vin et quelque fois bière, brasserie, boulangerie), *S. carlsbergensis* (brasserie : fermentation basse du moût de malt) ou *Kloeckera* (vin) ;

- et par quelques bactéries anaérobies ou anaérobies facultatives, telles que *Zymomonas mobilis* (voie d'Entner-Doudoroff), *Leuconostoc mesenteroides* (voie de pentose-phosphate), *Sarcina ventriculi* (voie d'Embden-Meyerhof).

La fermentation alcoolique est importante en microbiologie alimentaire et industrielle : elle est à la base de la production industrielle de l'alcool et à la fabrication du vin, de la bière, des spiritueux et du pain (CO₂ pour la levée du pain).

2.1.1.4. Fermentation acide mixte

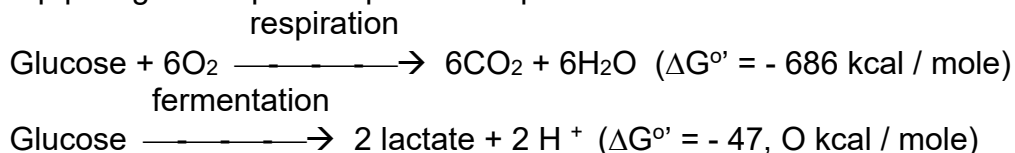
La fermentation acide mixte est un processus fermentatif réalisé par des *Enterobacteriaceae* comme *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* et *Proteus*. Dans cette voie métabolique, le pyruvate formé pendant la glycolyse par la voie d'Embden-Meyerhof est converti en différents produits incluant **l'éthanol, l'acétate, le succinate, le formate le lactate, l'hydrogène moléculaire et le dioxyde de carbone.**

Le CO₂ est produit exclusivement à partir du formate par le système enzymatique **formate lyase** du pyruvate. La formation de l'acétate est aussi accompagnée d'une phosphorylation au niveau du substrat et de la production d'ATP supplémentaire. Durant la formation de ces différents produits, le NADH est réoxydé en NAD⁺.

Les produits finaux de la fermentation acide mixte peuvent être détectés par le test de rouge de méthyle (MR-test, méthyl red : virage jaune au rouge) basé sur la réaction colorée de l'indicateur de pH méthyl rouge. Ceci parce que la concentration des produits acides formés est quatre fois supérieure à celle des produits neutres. En outre, la décomposition de l'acide formique en CO₂ et H₂ par certaines souches bactériennes donne lieu à un dégagement gazeux (production de gaz). Ces souches sont de ce fait qualifiées d'**aérogènes**.

2.1.2. RESPIRATION

Chez les microorganismes, la respiration est un processus de production et de stockage d'énergie au cours duquel un composé organique est oxydé au moyen d'un **agent oxydant accepteur d'électrons provenant du milieu environnant**. Elle exige ainsi un accepteur final d'électrons extérieur ne provenant pas d'un substrat organique. L'oxydation complète d'un composé organique lors de la respiration, par exemple celle du glucose en CO₂ et H₂O, procure à la cellule une quantité d'énergie beaucoup plus grande que lorsque ce composé est soumis à une fermentation.



Le métabolisme respiratoire du glucose et d'autres substrats se réalise en trois étapes (phases) majeures distinctes.

1°) **Le catabolisme des substrats organiques** : glucides, acides gras et quelques acides aminés : la molécule du substrat organique est dégradée (oxydation) en molécules plus petites de **2 carbones** constituées par des groupements **acétyl** du complexe **acétyl-coenzyme A** (transporteur du groupement acétyl), généralement

avec génération d'ATP. Dans le cas de glucides, une molécule du substrat, comme le glucose, est initialement dégradée par glycolyse en pyruvate.

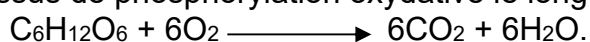
2°) **Le cycle des acides tricarboxyliques** : les petites molécules comprenant les groupements acétyls sont oxydées (dégradées enzymatiquement) en CO₂ et H₂O, en produisant de l'ATP et des **coenzymes réduits (NADH, FADH)** contenant des **atomes d'hydrogène riches en énergie**. Le CO₂ est le produit final de l'oxydation des substrats organiques.

3°) **La phosphorylation oxydative ou la phosphorylation par transport d'électrons** : c'est un processus au cours duquel les coenzymes réduits sont réoxydés en libérant des protons (H⁺) et des électrons riches en énergie (séparation des atomes d'hydrogènes en H⁺ et en électrons sur des **quinones**). Pendant que les protons traversent la membrane, ces électrons sont transférés (transportés) le long d'une série (chaîne) de molécules transporteuses d'électrons (**cytochromes**) liées à la membrane cytoplasmique de la bactérie, appelée **chaîne respiratoire**, à un accepteur final d'électrons, comme l'oxygène dans la respiration aérobie. Ce transport d'électrons le long de la chaîne respiratoire ainsi que la translocation des protons à travers la membrane par un transporteur des protons (pores associées à une enzyme, ex., ATPase) établissent (créent) un gradient (flux) de protons, appelée **force protonmotrice**, à travers la membrane qui attire les protons et d'autres cations à rentrer vers le cytoplasme et à synthétiser l'ATP par **chimioosmose** (flux de protons vers l'intérieur de la cellule) résultant du transport des électrons et de la force protonmotrice (théorie du biochimiste anglais Peter Mitchell). L'accepteur final d'électrons est alors réduit par les protons et les électrons. La force protonmotrice est l'énergie provenant de la séparation des protons H⁺ et des électrons à travers la membrane cytoplasmique. La chimioosmose est la génération d'ATP par le flux des protons à travers la membrane cytoplasmique.

Pendant la respiration, le substrat organique initial subit une oxydation, tandis que l'accepteur final d'électrons extérieur est réduit pour former un processus d'oxydo-réduction équilibré. L'accepteur externe d'électrons le plus communément utilisé dans la voie respiratoire est l'**oxygène moléculaire : respiration aérobie**. Mais, certaines bactéries utilisent des accepteurs finaux d'électrons alternatifs, comme le **NO₃⁻, le SO₄²⁻, le Fe³⁺, le CO₃²⁻, le CO₂ ou le soufre : respiration anaérobie**.

2.1.2.1. Respiration aérobie

La respiration aérobie est le processus respiratoire au cours duquel l'oxygène moléculaire sert d'accepteur final d'électrons, c'est-à-dire il exige la présence de l'air. Cette voie commence par l'oxydation d'une molécule de substrat organique dans un processus d'oxydo-réduction qui se termine avec la formation de CO₂ et de H₂O. Au cours de ce processus, une quantité substantielle d'ATP est produite : **38 molécules d'ATP** pour une molécule de glucose. Le CO₂ est formé pendant le cycle des acides tricarboxyliques, tandis que la majorité des molécules et d'ATP le sont pendant le processus de phosphorylation oxydative le long de la chaîne respiratoire.



Chez la plupart des bactéries, les premières étapes de la dégradation du glucose sont communes à la respiration et à des nombreux types de fermentation : le glucose est transformé en acide pyruvique par la voie d'Embden-Meyerhof. Dans la respiration aérobie, il y a l'oxydation et la décarboxylation du pyruvate par le

coenzyme A et NAD^+ pour former l'acétyl-coenzyme A qui va alimenter le cycle des acides tricarboxyliques. Cette réaction est catalysée par le complexe multi-enzyme pyruvate déshydrogénase.



2.1.2.1. a) Cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de KREBS

Le cycle de Krebs, aussi connu sous le nom du cycle des **acides tricarboxyliques (TCA cycle)** ou **cycle de l'acide citrique**, constitue la seconde phase du métabolisme respiratoire du glucose ou d'autres substrats. Dans cette phase, l'acétyl-CoA (obtenu de la β -oxydation des acides gras ou du pyruvate provenant de la glycolyse des carbohydrates et / ou du catabolisme des protéines) entre dans le TCA cycle. Ce qui résulte à la production de **CO_2 , de l'eau, des coenzymes réduits (NADH et FADH_2)** et de **d'ATP**.

Dans la première étape du cycle de Krebs, acétyl-CoA réagit avec oxaloacétate pour former le **citrate** et libérer le CoA. Le TCA cycle va alors, à travers une série des réactions impliquant des acides carboxyliques, régénérer l'oxaloacétate. Durant ce cycle :

(1) **le CO_2** est libéré par 2 réactions de décarboxylation oxydative :

- la conversion de l'isocitrate (composé à 6 carbones) en α -cétooglutarate (composé à 5 carbones), et
- la conversion subséquente de l' α -cétooglutarate en succinyl-CoA (composé à 4 carbones).

(2) Le coenzyme réduit **NADH** est généré au cours de trois réactions :

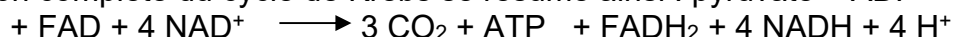
la conversion de l'isocitrate en oxalosuccinate, celle de l' α -cétooglutarate en succinyl-CoA et enfin lors de l'oxydation du malate en oxaloacétate.

(3) Le **FAD est réduit** en FADH_2 lors de la conversion du succinate en fumarate.

(4) L'unique réaction exergonique du TCA cycle, la conversion du succinyl-CoA en succinate, est directement couplée avec la génération d'un composé phosphate riche en énergie, l'**ATP** ou le **GTP** (chez les eucaryotes et certaines bactéries). L'énergie stockée dans GTP est équivalente à celle stockée dans ATP. Le groupement phosphate riche en énergie de GTP peut être transféré à l'ADP pour former l'ATP :



La réaction complète du cycle de Krebs se résume ainsi : pyruvate + ADP + P_i



Le cycle de Krebs est une voie **amphibolique**, car il remplit une double fonction :

1° de catabolisme oxydatif des glucides, des acides gras et des peptides en complétant la dégradation de leurs petites molécules,

2° d'anabolisme en utilisant les petites molécules, produits intermédiaires du cycle, comme substrats organiques précurseurs pour les biosynthèses des acides aminés (α -cétooglutarate, oxaloacétate, succinate), des glucides et des acides gras.

2.1.2.1. b) Phosphorylation oxydative

Les coenzymes réduits (NADH , FADH_2), générés pendant la glycolyse et le TCA cycle et servant de « monnaies » d'échange d'énergie (de protons et d'électrons riches en énergie), doivent être réoxydés afin que la respiration puisse se poursuivre : c'est le processus de **phosphorylation oxydative ou phosphorylation par transfert d'électrons**. Les électrons et protons libérés par les **quinones** sont transférés à l'oxygène, l'accepteur final d'électrons, par une chaîne de transporteurs

d'électrons (**cytochromes**) liés la membrane cytoplasmique, **chaîne respiratoire** ou **chaîne de transport d'électrons**, et en établissant un gradient de protons ou la **force protonmotrice** à travers la membrane, conduisant ainsi à une **chimioosmose** (théorie du biochimiste anglais **Peter MITCHELL**).

La chaîne respiratoire constitue une sorte de fil conducteur le long duquel les électrons se déplacent grâce à une série de réactions d'oxydoréduction couplées à des molécules de transporteurs (cytochromes) liés à la membrane cytoplasmique. Ce transport d'électrons se termine avec la **réduction de l'accepteur final d'électrons** (ex. l'oxygène en H₂O) et la **synthèse d'ATP** par **chimioosmose** et les ATPases membranaires qui catalysent la phosphorylation de l'ADP lors du passage des protons.

Le rendement énergétique de la respiration aérobie en métabolisant une molécule de glucose est de 38 molécules d'ATP : la phosphorylation oxydative donne 34 molécules d'ATP par molécule de glucose oxydée; approximativement 3 molécules d'ATP proviennent de chacune de 10 molécules de NADH (30 ATP) et 2 de chacune de FADH₂ (4 ATP). A cela, il faut ajouter 4 molécules d'ATP provenant de la phosphorylation au niveau du substrat durant la glycolyse (2 ATP) et le cycle de Krebs (2 GTP, équivalent de l'ATP).

La réaction globale du métabolisme respiratoire du glucose par une cellule bactérienne (chez les procaryotes) en utilisant la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof peut être exprimée comme suit :



Chez les eucaryotes, la respiration aérobie ne produit au total que 36 molécules d'ATP. Il y en a moins que chez les procaryotes, parce qu'une partie de l'énergie est perdue lorsque les électrons traverse la membrane mitochondriale qui sépare la glycolyse (dans le cytoplasme) de la chaîne respiratoire des électrons.

The Electron Transport Chain (System) consists of a sequence of carrier molecules that are capable of oxidation and reduction. As electrons are passed through the chain, there occurs a stepwise release of energy, which is used to drive the chemiosmotic generation of ATP. The final oxidation is irreversible.

In eukaryotic cells, the electron transport chain is contained in the inner membrane of mitochondria; in prokaryotic cells, it is found in the plasma membrane. There are three classes of carrier molecules in electron transport chains. The first are **flavoproteins**. These proteins contain flavin, a coenzyme derived from riboflavin (vitamin B₂), and are capable of performing alternating oxidations and reductions. One important flavin coenzyme is flavin mononucleotide (**FMN**). The second class of carrier molecules are **cytochromes**, proteins with an iron-containing group (heme) capable of existing alternately as a reduced form (Fe²⁺) and an oxidized form (Fe³⁺). The cytochromes involved in electron transport chains include cytochrome *b* (**cyt b**), cytochrome *c*₁ (**cyt c1**), cytochrome *c* (cyt *c*), cytochrome *a* (cyt *a*), and cytochrome *a*₃ (cyt *a*₃). The third class is known as **ubiquinones**, or **coenzyme Q**, symbolized **Q**; these are small nonprotein carriers.

The electron transport chains of bacteria are somewhat diverse, in that the particular carriers used by a bacterium and the order in which they function may differ from those of other bacteria and from those of eukaryotic mitochondrial systems.

Even a single bacterium may have several types of electron transport chains. However, all electron transport chains achieve the same basic goal: **to release energy as electrons are transferred from higher-energy compounds to lower-energy compounds.**

The electron transport chain in the mitochondria of eukaryotic cells:

The first step in the mitochondrial electron transport chain involves the transfer of high-energy electrons from NADH to FMN, the first carrier in the chain. This transfer actually involves the passage of a hydrogen atom with two electrons to FMN, which then picks up an additional H^+ from the surrounding aqueous medium. As a result of the first transfer, NADH is oxidized to NAD^+ , and FMN is reduced to $FMNH_2$. In the second step in the electron transport chain, $FMNH_2$ passes $2H^+$ to the other side of the mitochondrial membrane and passes two electrons to Q. As a result, $FMNH_2$ is oxidized to FMN. Q also picks up an additional $2H^+$ from the surrounding aqueous medium and releases it on the other side of the membrane. The next part of the electron transport chain involves the cytochromes. Electrons are passed successively from Q to cyt *b*, cyt *c*₁, cyt *c*, cyt *a*, and cyt *a*₃. Each cytochrome in the chain is reduced as it picks up electrons and is oxidized as it gives up electrons. The last cytochrome, cyt *a*₃, passes its electrons to molecular oxygen (O_2), which becomes negatively charged and then picks up protons from the surrounding medium to form H_2O .

Notice that $FADH_2$, which is derived from the Krebs cycle, as another source of electrons, adds its electrons to the electron transport chain at a lower level than NADH. Because of this, the electron transport chain produces about one-third less energy for ATP generation when $FADH_2$ donates electrons than when NADH is involved.

An important feature of the electron transport chain is the presence of some carriers, such as FMN and Q, that accept and release protons as well as electrons, and other carriers, such as cytochromes, that transfer electrons only. Electron flow down the chain is accompanied at several points by the active transport (pumping) of protons from the matrix side of the inner mitochondrial membrane to the opposite side of the membrane. The result is a buildup of protons on one side of the membrane. Just as water behind a dam stores energy that can be used to generate electricity, this buildup of protons provides energy for the generation of ATP by the chemiosmotic mechanism.

La chimiosmose exige des membranes et des ATPases liées aux membranes. La génération de l'ATP implique 2 processus distincts :

- la génération d'un gradient ou flux des protons à travers la membrane cytoplasmique,
- l'utilisation de l'énergie stockée dans le gradient pour conduire la phosphorylation de l'ADP par l'ATPase.

Le mécanisme de production d'ATP par chimiosmose

Le mécanisme de synthèse d'ATP au moyen de la chaîne de transport des électrons s'appelle **chimiosmose**.

La **diffusion passive** des substances à travers les membranes s'effectue à partir des régions où leur concentration est élevée vers les régions où leur concentration est basse ; cette diffusion **libère** de l'énergie. Par contre, le mouvement des substances **contre** un tel gradient de concentration **nécessite** de l'énergie, et, lors de ce **transport actif** de molécules ou d'ions à travers les membranes biologiques, l'énergie requise provient habituellement de l'ATP.

Dans la chimiosmose, l'énergie libérée par une substance qui se déplace en suivant le gradient est utilisée pour **synthétiser** de l'ATP. Dans le cas présent, la **substance** est représentée par des **protons (H^+)**. Au cours de la respiration, la chimiosmose est responsable de la majeure partie de la production d'ATP.

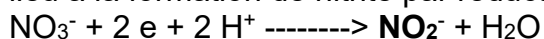
Les étapes de la chimiosmose sont les suivantes :

1. Au fur et à mesure que les électrons chargés d'énergie en provenance du NADH / FADH₂ (ou de la chlorophylle) descendent le long de la chaîne de transport, certains des transporteurs de cette chaîne **font passer par transport actif** – des protons d'un côté de la membrane à l'autre. Ces transporteurs sont appelés des **pompes à protons**. Le flux d'électrons le long de la chaîne respiratoire entraîne le pompage d'ions hydrogène ou protons du cytoplasme vers l'extérieur.
2. Comme la membrane cytoplasmique est normalement imperméable aux ions, ce pompage crée un déséquilibre de pH et de charge électrique de part et d'autre de la membrane. Le cytoplasme devient alcalin et négatif par rapport à la surface externe de la membrane. Il en résulte une force appelée la **force protonmotrice** qui attire les protons vers le cytoplasme par le mécanisme suivant. La membrane, qui se compose de phospholipides, est normalement imperméable aux protons, si bien que ce pompage à sens unique crée un **gradient de protons** (une différence entre concentration de protons) de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. En plus du gradient de concentration, il se forme un gradient de charges électriques. Le surplus d'ions H⁺ d'un côté de la membrane confère une charge positive à ce côté par rapport à l'autre. Le gradient électrochimique ainsi formé est porteur d'énergie potentielle, appelée **force protonmotrice** ou **force protonique motrice**.
3. Les protons situés du côté de la membrane où leur concentration est plus élevée ne peuvent traverser la membrane par diffusion qu'en passant par des canaux protéiques spécifiques qui contiennent une enzyme appelée F₀F₁ **ATPase (ATP synthase ou ATP synthétase)**. Lorsqu'ils empruntent ces canaux, il y a **libération d'énergie** qui est utilisée par l'enzyme pour **synthétiser de l'ATP** à partir d'ADP et de Pi.
Ce flux de protons vers l'intérieur de la cellule fournit ainsi l'énergie nécessaire à divers phénomènes cellulaires : la **phosphorylation** de l'ADP, le transport transmembranaire des ions et de divers substrats, la mobilité des flagelles.

2.1.2.2. Respiration anaérobie

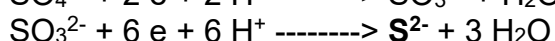
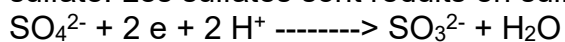
Chez certaines bactéries, la respiration peut exister en anaérobiose. Comme l'oxygène est absent du milieu, une autre substance inorganique est utilisée comme accepteur terminal d'électrons: **NO₃⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻**.

Respiration nitrique : De nombreuses bactéries utilisent le nitrate en l'absence d'oxygène. C'est le cas de *Pseudomonas* qui ne peut pas recourir à la fermentation, et de nombreux membres de la famille des *Enterobacteriaceae* qui peuvent avoir recours à la fermentation. L'énergie résultant de la respiration nitrique est moindre que dans le cas de la respiration aérobie. Le transfert d'électrons au nitrate donne lieu à la formation de nitrite par réduction :

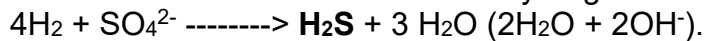


Dénitrification : Certaines bactéries peuvent franchir une étape supplémentaire en réduisant le nitrite en azote. Chez d'autres espèces, l'azote est finalement transformé en ammoniac.

Les bactéries des genres *Desulfovibrio* et *Desulfotomaculum* sont des anaérobies stricts dont la chaîne respiratoire possède comme accepteur final d'électrons l'ion sulfate. Les sulfates sont réduits en sulfites puis en sulfures :



Une partie de ce sulfure peut servir aux besoins en soufre de la cellule, par exemple, à la synthèse des acides sulfurés comme la cystéine ; le reste est éliminé dans le milieu ambiant à l'état de sulfure d'hydrogène :



Some bacteria, such as *Pseudomonas* and *Bacillus*, can use a nitrate ion (NO_3^-) as a final electron acceptor, the nitrate ion is reduced to a nitrite ion (NO_2^-), nitrous oxide (N_2O), or nitrogen gas (N_2). Other bacteria, such as *Desulfovibrio*, use sulfate (SO_4^{2-}) as the final electron acceptor to form hydrogen sulfide (H_2S). Still other bacteria use carbonate (CO_3^{2-}) to form methane (CH_4). Anaerobic respiration by bacteria using nitrate and sulfate as final acceptors is essential for the nitrogen and sulfur cycles that occur in nature. The amount of ATP generated in anaerobic respiration varies with the organism and the pathway. Because only part of the Krebs cycle operates under anaerobic conditions, and because not all the carriers in the electron transport chain participate in anaerobic respiration, the ATP yield is never as high as in aerobic respiration. Accordingly, anaerobes tend to grow more slowly than aerobes.

CHAPITRE IX: GENETIQUE BACTERIENNE ET MOLECULAIRE

1. INTRODUCTION

1.1. La génétique est la science qui s'occupe de la transmission des caractères héréditaires (des gènes), de leurs variations et de la régularité de l'hérédité. Elle est une science abstraite et logique grâce à laquelle les facteurs génétiques déterminant certaines propriétés des cellules vivantes peuvent être localisés les uns par rapport aux autres. La génétique permet également d'exprimer en termes quantitatifs des changements dans ces propriétés.

1.2. L'hérédité constitue la conservation des propriétés spécifiques des cellules vivantes ou des organismes vivants. Elle détermine la constance des caractères et fait que chaque être vivant (ou cellule vivante) ressemble à ses ancêtres.

1.3. Le génome est l'ensemble des déterminants héréditaires, des gènes, d'un organisme. Il est constant (stable) et transmissible de génération en génération.

1.4. Un gène est le porteur ou l'unité de l'information génétique. Il code pour (détermine) un caractère (une propriété) donné. L'expression d'un caractère est due à l'action des enzymes. Selon l'hypothèse un gène-une enzyme, un gène structural code pour une chaîne polypeptidique bien déterminée, c'est-à-dire il contient l'information nécessaire à la synthèse d'une enzyme / protéine bien déterminée.

La modification d'un gène (ex., par mutation) conduit à une suppression ou à une variation (modification) de l'enzyme et par conséquent du caractère. La génétique se base ainsi sur l'étude des différences ou des variations des caractères (héréditaires) qui proviennent des formes alléliques (alternatives) d'un gène.

1.5. Types de variations

Il convient de distinguer les variations phénotypiques de celles génotypiques.

- Les variations phénotypiques constituent une adaptation à de diverses conditions extérieures intéressant l'ensemble des populations du même génotype. Elles sont induites, progressives, non permanentes, réversibles et instables; elles disparaissent avec les variations du milieu et sont non transmissibles à la descendance.

Exemples : * perte des flagelles chez *Salmonella* en culture en milieu phéniqué;

* adaptation enzymatique : cas des *Staphylococci* qui synthétisent les pénicillinases en présence de la pénicilline (résistance à la pénicilline), ou l'induction de la synthèse de la β -galactosidase en présence du lactose dans un milieu de culture.

Les variations phénotypiques peuvent aussi être provoquées par des modifications génotypiques. Dans ces cas, elles sont stables, héréditaires et indépendantes des conditions du milieu.

- Les variations génotypiques constituent une modification du génome (du génotype). Elles sont **stables**, rares, brusques, spontanées, indépendantes des changements du milieu et héréditaires. Elles sont parfois exprimées par des changements phénotypiques.

Exemples : * transformation des colonies smooth en colonies rugueuses;

* acquisition des facteurs de résistance ou de virulence.

Ces changements génotypiques s'effectuent par les mécanismes suivants : les **mutations, les recombinaisons génétiques et les transferts de gènes** (transformation, conjugaison, transduction et conversion lysogénique).

2. MUTATIONS

2.1. Définition

Le terme mutation (du latin : muto/mutare = modifier, changer) s'applique aux changements spontanés et héréditaires se produisant dans la séquence nucléotidique du génome d'un organisme. En 1900, quelques mois après que DE VRIES eut découvert les mutations chez les plantes, son compatriote BEIJERINCK proposa que le même mécanisme serait aussi responsable des changements héréditaires observés chez les bactéries.

Ces variations génotypiques consistent en l'apparition d'une bactérie présentant un caractère différent transmis à sa descendance dans une population jusque-là homogène. Cette nouvelle bactérie est appelée un mutant. L'apparition du phénotype mutant est due à la présence d'un gène différent du type normal ou du type sauvage.

Souche bactérienne sauvage----→ *Souche bactérienne mutante*.

La **réversion** ou mutation réverse est le processus inverse dans lequel l'on passe du phénotype mutant au phénotype sauvage par reconstitution de la séquence nucléotidique sauvage. Elle peut être intragénique ou extragénique.

Souche bactérienne mutante----→ *Souche bactérienne sauvage*.

Les mutations peuvent être létales, c'est-à-dire elles conduisent à la mort de la bactérie; elles peuvent aussi lui être bénéfiques, c'est-à-dire elles lui permettent un meilleur développement en fonction du milieu. Les mutations sont généralement spontanées, ponctuelles, mais elles peuvent aussi être induites par des mutagènes. On reconnaît ordinairement les mutations par leurs expressions sur le phénotype. Mais d'autres mutations dites « silencieuses » n'ont aucune conséquence phénotypique.

2.2. Caractéristiques des mutations

2.2.1. Rareté : la probabilité d'une mutation par cellule et par génération est définie comme le taux de mutation. Chez la bactérie, le taux de mutation spontanée se situe entre 10^{-4} et 10^{-11} ; il est de l'ordre de 10^{-5} pour un gène déterminé et de 10^{-8} pour une paire de nucléotides. La fréquence de mutations peut être élevée par des agents mutagènes :

- physiques : rayons X, U.V. (260 nm), β , γ ,...
- chimiques : nitrites, hydroxylamine, agents alkylants, antimétabolites (bromo-uracil, 2-aminopurine), peroxydes, acridine,...
- biologiques : plasmides, bactériophages, transposons,...

2.2.2. Spontanéité : un mutant isolé par un agent sélecteur (ex., la streptomycine) : la mutation peut toujours se produire de façon spontanée et indépendamment de l'agent sélecteur. Celui-ci n'induit pas la mutation, c'est-à-dire il n'a pas de pouvoir

mutagène. Les antibiotiques ne déterminent pas la résistance, mais sélectionnent seulement les bactéries déjà résistantes (expérience de LEDERBERG).

2.2.3. *Spécificité* : une mutation n'affecte qu'un caractère bien déterminé, c'est-à-dire un gène déterminé.

2.2.4. *Indépendance* : les mutations apparaissent indépendamment d'autres mutations et du milieu; il y a la probabilité pour une bactérie de subir simultanément deux mutations distinctes.

2.2.5. *Stabilité* ou *constance* : un caractère nouvellement apparu ou modifié reste constant / stable et se transmet indéfiniment de génération en génération (à la descendance), même en l'absence des agents mutagènes ou sélecteurs.

2.2.6. *Discontinuité* : une mutation est brusque et ne s'effectue pas à travers une suite continue des formes intermédiaires, mais en une seule étape, selon la loi du tout ou rien.

2.3. Classes des mutations

D'après la structure génétique des mutants et en tenant compte de la nature du changement et du nombre de paires de bases modifiées, on groupe les mutations en 2 classes: les mutations ponctuelles et les mutations multiples.

2.3.1. *Mutations ponctuelles* : elles n'impliquent qu'une seule paire de bases.

2.3.1.1. Substitution (remplacement) des nucléotides : une base ou une paire de bases peut être remplacée par une autre au sein de l'alignement (séquence) polynucléotidique du DNA. On peut ainsi observer :

a) **des transitions** : une purine est remplacée par une autre purine et une pyrimidine par une autre pyrimidine (purines : A et G; pyrimidines : C et T) :

$\underline{A} = T \rightarrow \underline{G} \equiv C$ (l'orientation Pu – Py est maintenue);

b) **des transversions** : une purine est remplacée par une pyrimidine et vice versa :

$\underline{A} = T \Leftrightarrow \underline{C} \equiv G$ (l'orientation Pu – Py est modifiée en Py – Pu et Py – Pu en Pu – Py).

Ces remplacements n'intéressent qu'une seule paire de nucléotides et entraînent le plus souvent

- une erreur du code génétique par introduction d'un seul acide aminé différent (remplacement d'un acide aminé): **mutation faux sens**, ou
- un arrêt prématuré de la synthèse protéique par introduction d'un codon d'arrêt de lecture ou codon stop (codon non sens : UAG, UAA, AGA): **mutation non-sens**. Il n'existe pas de tRNA dont l'anticodon soit complémentaire du codon non-sens UAG.

2.3.1.2. Microdélétion et microinsertion des nucléotides : une seule base ou paire de bases (un seul nucléotide) peut être supprimée de la séquence de nucléotides (microdélétion) où y être insérée (microinsertion). **Frameshift mutation (décalage du cadre de lecture)**

2.3.2. *Mutations multiples* : délétion, insertion et transposition des nucléotides : elles impliquent au moins deux paires de bases.

2.3.2.1. Délétion (suppression) : plusieurs bases (parties de DNA, plusieurs gènes) peuvent être perdues (suppressions larges) ou excisées.

2.3.2.2. Insertion : intégration d'une séquence ou d'un fragment de DNA étranger dans un chromosome bactérien;

2.3.2.3. Transposition : plusieurs bases changent (modifient) leur position dans le chromosome (ex., à la suite de l'intégration d'un transposon dans le DNA bactérien).

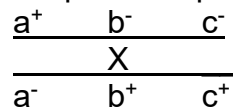
3. RECOMBINAISONS GENETIQUES

3.1. Définition

La recombinaison génétique inclut une variété de phénomènes permettant le réarrangement de loci génétiques dans un chromosome d'un organisme vivant. C'est un processus permettant à deux gènes localisés initialement sur deux chromosomes différents d'être réassociés sur un même chromosome. Exemple : le modèle du mécanisme de « couper-coller » : deux chromosomes possédant respectivement les génotypes $a^+ b^-$ et $a^- b^+$ s'apparient, sont clivés et sont ensuite assemblés pour former deux chromosomes recombinants dont les génotypes sont $a^+ b^+$ et $a^- b^-$.



Dans la cartographie génétique, la distance sur le chromosome entre deux loci recombinants détermine la fréquence de recombinaison. Tant que les deux loci ne sont pas trop près l'un de l'autre et les coupures se font au hasard, la fréquence de recombinaison est proportionnelle à la distance. Ainsi, dans le croisement suivant, les génotypes des chromosomes sont $a^+ b^- c^-$ et $a^- b^+ c^+$, les gènes sont placés par ordres alphabétiques et équidistants :



Il apparaît deux fois plus de recombinants $a^+ c^+$ que de recombinants $a^+ b^+$ du fait que le locus a est deux fois plus éloigné du locus c que du locus b.

3.2. Recombinaison génétiques chez les bactéries

Chez les eucaryotes, le transfert de gènes s'effectue par reproduction sexuée qui consiste en la mise en commun et en une nouvelle recombinaison des deux sets (jeux) complets de gènes provenant des deux organismes diploïdes (mâle et femelle) pour former un zygote diploïde (possédant des paires de chromosomes homologues). La division de réductionnelle (ou méiose) de chaque paire de gènes homologues conduit à la formation des gamètes haploïdes (mâle ou femelle). La fusion d'un gamète mâle et d'un gamète femelle donne un zygote diploïde.

On a cru pendant longtemps qu'une telle recombinaison génétique ne se produisait que chez les eucaryotes et que les bactéries ne se multipliaient uniquement que par clonage (fission binaire). Cependant, entre 1944 et 1952, trois différents mécanismes de transfert de gènes d'une bactérie à une autre furent découverts :

- prise d'un DNA « nu » et isolé : transformation
- accouplement entre cellules en contact : conjugaison
- infection par un virus non létal : transduction et conversion lysogénique.

Le transfert de gènes est suivi par une recombinaison du gène donneur avec le DNA du receveur pour donner ainsi un génome (DNA) recombiné chez le receveur.

Les bactéries sont presque toujours haploïdes, car ne possédant qu'un simple set (jeu) de gènes. Les mécanismes bactériens de transfert de gènes sont ainsi tous primitifs et produisent des zygotes (ou diploïdes) partiels dits **mérozygotes** (meros du grec = partie) : en général, une partie seulement du génome (ou matériel génétique) d'une cellule donatrice est transférée dans une cellule réceptrice (pas d'union des cellules). Le chromosome de la cellule réceptrice et le fragment du chromosome de la cellule donatrice subissent une recombinaison, c'est-à-dire excision (coupure) et intégration par substitution (échange) ou par addition au génome (chromosome) récepteur au moyen de cross-over moléculaire. Après divisions nucléaire (réplication) et cellulaire, il se forme une nouvelle cellule qui ne contient que le chromosome recombiné : cette cellule est ainsi appelée un recombinant.

Le terme recombinaison génétique possède actuellement deux sens :

- 1°) le processus global d'assemblage de nouvelles combinaisons des gènes des deux parents : mise en jeu d'un échange du matériel génétique après le transfert de celui-ci d'une cellule à une autre ;
- 2°) le processus moléculaire de crossing-over entre deux chaînes ou séquences de DNA, incluant aussi des **réarrangements des gènes dans un génome (crossing-over** : rupture et réunion des molécules de DNA).

3.3. Mécanismes de recombinaison génétique

A l'état actuel de la recherche, on distingue au moins trois différents mécanismes par lesquels un DNA étranger (ou un plasmide) est recombiné in vivo dans le chromosome bactérien :

- recombinaison homologue généralisée ou légitime,
- recombinaison homologue spécifique localisée,
- recombinaison non homologue ou illégitime (irrégulière).

3.3.1. Recombinaison homologue généralisée ou légitime

C'est le mécanisme par lequel le DNA étranger (ou fragment de ce DNA), ayant pénétré dans une cellule, est intégré (recombiné) au DNA de la cellule réceptrice par un échange réciproque des régions (sections) de DNA disposant d'une homologie maximale. Les DNA partenaires recombinants doivent disposer d'une homologie maximale, c'est-à-dire posséder des séquences des bases (des gènes) identiques. Ce processus est parfois l'expression d'un dommage ou d'une réparation du DNA (ex. : ruptures dues aux radiations ionisantes).

La recombinaison légitime est sous le contrôle du gène *rec A*. Les bactéries et les phages *rec A*-dépendants exigent les produits de plusieurs gènes comme ceux exigés pour la réplication du DNA (DNA-polymérases, ligase, protéine déstabilisant l'hélice du DNA). Les exo- et endonucléases (ex. : exonucléase V d'E. coli) sont principalement impliquées dans cette recombinaison.

3.3.2. Recombinaison spécifique localisée

Elle consiste en l'intégration d'un petit fragment de la double hélice du DNA étranger dans une région spécifique et d'homologie très limitée d'un grand DNA ou chromosome bactérien (bactérie réceptrice). Le petit fragment perd ainsi son autonomie. L'insertion est catalysée par l'intégrase et elle est rec A-indépendante (ex. : l'insertion du phage lambda λ dans un chromosome bactérien).

3.3.3. *Recombinaison non homologue ou illégitime (irrégulière) :*

C'est le processus d'intégration des fragments de DNA étranger dans un DNA récepteur en l'absence de toute homologie entre les deux séquences de DNA. C'est-à-dire, dans ce processus prennent part des fragments de DNA n'ayant pas d'homologie génétique : absence de toute homologie (ou relation) entre les séquences du site donneur et du site receveur. Il s'agit d'une forme intégrative de recombinaison, catalysée par des enzymes codées par le DNA donneur, c'est-à-dire qu'il s'agit d'une addition de DNA (ou fragments de DNA) et non d'un échange. Elle est aussi rec A-indépendante, se produisant à une faible fréquence dans le chromosome bactérien et causant une duplication (dédoublage) de gènes et quelques types de délétion.

Les molécules de DNA suivantes sont capables de recombinaison illégitime : les éléments transposables ou transposons (séquences d'insertion et transposons *sensu stricto*), les bactériophages Mu, les plasmides et les phages tempérés.

3.3.3.1. Transposons : les éléments transposables sont de courtes séquences de DNA qui ont la propriété de se mouvoir (se déplacer) d'un site (locus) génétique à un autre. Ce mouvement est appelé transposition.

a) **Séquences d'insertion** (IS-elements : « Insertion Sequences ») : elles sont constituées de 800-1400 paires de bases (0,8-1,4 Kb); ce sont de petits éléments cryptiques de DNA qui ne codent pour aucun caractère phénotypique perceptible (reconnaissable) et leur fonction est peu connue. Ils sont de localisation non définie et peuvent migrer d'un site génétique vers un autre. Elles constituent ainsi les plus petits éléments capables de transposition. Leur action mutagène repose sur leur insertion dans le DNA et par conséquent sur des erreurs de transcription. Les éléments IS joueraient un rôle essentiel dans la réorientation et la recombinaison du matériel génétique.

b) **Transposons** (Tn-elements = « Transposable elements ») : ce sont de courtes séquences de DNA bicaténaire de plus de 2.000 paires de bases (0,7-10 Kb) qui sont intégrées en plusieurs régions du génome bactérien ou plasmidique et qui peuvent « sauter » (passer) d'un chromosome bactérien à un plasmide ou vice versa, d'un plasmide à un autre plasmide ou d'un chromosome bactérien à un autre. Leurs gènes déterminent des caractères extérieurs perceptibles, comme la résistance aux antibiotiques (pénicilline, tétracycline ou kanamycine) ou la virulence (ex : gènes d'entérotoxine LT chez *E. coli*). Les transposons constituent, par propriétés, une banque de gènes dans laquelle les bactéries puisent en fonction de leur nécessité d'adaptation.

3.3.3.2. Bactériophage Mu : il possède aussi la propriété d'intégration comme les IS et les Tn, dispose des propriétés typiques de phage et se présente comme un transposon géant. Il semble pouvoir s'insérer à n'importe quel site du chromosome et n'a pas d'exigences en séquence de nucléotides (séquence cible) pour son site d'insertion.

4. TRANSFERTS DE MATERIEL GENETIQUE

4.1. Transformation

4.1.1. Définition

Des gènes peuvent être transférés en l'absence de tout contact des cellules ou d'un vecteur. La transformation est définie comme le transfert d'un gène d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par le biais d'un DNA libre, isolé et soluble qui est excrété ou extrait de la bactérie donatrice.

La transformation fût découverte en 1928 par GRIFFITH qui observa la conversion d'une souche non capsulée R de *Streptococcus pneumoniae* en une souche capsulée S. Les souches sauvages de pneumocoques sont généralement capsulées S (type « smooth » S) et virulentes. Après repiquages successifs en culture solide, elles donnent des mutants de type R « rough » n'ayant pas de capsule et étant avirulents.

4.1.2. Expérience de Griffith

1°) L'Injection I.P. de *S. pneumoniae* de **type SIII encapsulés vivants** à la souris provoque une septicémie suivie de la mort de celle-ci.

2°) Les pneumocoques **S III tués** à la chaleur laissent la souris en vie.

3°) L'injection des pneumocoques **mutants de type R III vivants**, non capsulés et avirulents, dérivant des souches virulentes encapsulées S III n'entraînent pas la mort de la souris.

4°) L'injection d'un **mélange de RIII vivants et de S III tués** conduit à une septicémie mortelle de la souris et à l'isolement dans le sang de celle-ci des pneumocoques SIII vivants.

5°) L'injection d'un mélange des **mutants R II vivants** et avirulents (dérivant de la souche virulente SII) et de S III tués conduit aussi à la mort de la souris et à la production de *S. pneumoniae* de **type SIII vivants**. Notez que la capsule de SII est sérotypiquement différente de celle de SIII.

Griffith conclut au transfert du matériel génétique de SIII tués vers les souches R vivantes qui, ainsi, se sont transformées en SIII vivantes.

En 1944, Oswald AVERY, Maclyn MacLEOD et Colin M. McCARTY découvrirent que le DNA constituait la substance-support ou responsable de la transformation, c'est-à-dire le « principe de transformation » et par conséquent le support chimique de l'hérédité. Le DNA extrait de la bactérie donatrice S III a pénétré dans la cellule réceptrice par adsorption et a été intégré au chromosome de cette dernière par crossing-over (substitution à la partie allélique du chromosome) : rupture du DNA chromosomique de la réceptrice et recombinaison par échange des fragments de DNA homologues correspondants, c'est-à-dire recombinaison entre les allèles des gènes homologues de S III et de R III (ou R II). Cette recombinaison ne se fait qu'entre les DNA des espèces bactériennes apparentées (recombinaison homologue légitime). L'adsorption se fait par fixation du DNA bicaténaire du donateur à des **récepteurs spécifiques chez les bactéries à Gram positif ou aux transformasomes chez les bactéries à Gram négatif**. Un brin de la double chaîne du DNA donneur est dégradé tandis que l'autre est intégré dans le chromosome récepteur au site d'homologie.

La transformation est un phénomène général de transfert de caractères observé chez *S. pneumoniae*, *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium* et chez plusieurs autres bactéries.

4.1.3. Compétence

La capacité d'être transformé est apparemment limitée aux bactéries qui peuvent prendre en soi une molécule intacte de DNA (double hélice de poids moléculaire élevé). La compétence est ainsi définie comme la capacité d'une cellule de recevoir (prendre) un DNA étranger par adsorption (fixation à la surface de la cellule réceptrice) et intégration de celui-ci. Pour la transformation, on a besoin d'une très faible concentration de DNA : 0,1 µg de DNA/ml de suspension bactérienne suffit pour transformer au maximum 15% d'une suspension de cellules réceptrices compétentes.

4.2. Conjugaison

4.2.1. Définition

La conjugaison constitue le transfert du matériel génétique par contact direct d'une bactérie donatrice et d'une bactérie réceptrice. Le matériel génétique transféré peut être un chromosome ou une particule extrachromosomique (plasmide) : gènes chromosomiques ou gènes plasmidiques. La conjugaison est un processus sexuel strict qui nécessite un contact préalable et un appariement (accouplement) entre bactéries de sexes différents.

4.2.2. Expérience de Lederberg et Tatum

En 1946, Joshua LEDERBERG et Edward TATUM ont réalisé une expérience décisive de croisement avec **2 mutants d'*E. coli* K12 (M1 et M2)**. Chacun de ces mutants était auxotrophe pour deux acides aminés. M1 était auxotrophe pour A et B (leucine et thréonine), mais pouvait synthétiser C et D (biotine et méthionine) : [A⁻ B⁻ C⁺ D⁺]. M2 était auxotrophe pour C et D et prototrophe pour A et B : [A⁺ B⁺ C⁻ D⁻]. Ces mutants ne peuvent pas se développer sur un milieu de culture minimal (synthétique) et y former de colonies. Mais un mélange des deux mutants ensemencé sur le même milieu synthétique forme des colonies sur ce milieu, dont les cellules sont toutes prototrophes pour les quatre acides aminés, c'est-à-dire elles ont la capacité de synthétiser seules ces acides aminés : [A⁺ B⁺ C⁺ D⁺]. Elles ont été définies comme des recombinants génétiques, car elles réunissent l'information génétique des deux cellules-mères réciproquement défectueuses.

Des expériences de croisement entre partenaires dont chaque fois une des souches était résistante à la streptomycine ont démontré que

- le matériel génétique n'est transmis que dans une seule direction : transfert d'une souche donatrice ou mâle à une souche réceptrice ou femelle;
- les recombinants n'apparaissent que si la souche réceptrice survit : tout le processus de recombinaison et de ségrégation a lieu dans la souche réceptrice; les recombinants héritent la majorité de leurs caractères de la cellule réceptrice, alors que la cellule donatrice ne met à leur disposition que des fragments du génome.

4.2.3. Facteur F et recombinaison à haute fréquence (Hfr)

Les études sur le processus d'accouplement et de différenciation sexuelle ont démontré que l'état de donateur chez les bactéries est lié à la présence dans la cellule mâle d'éléments de DNA transférables dits Facteur F ou facteur sexuel (F =

fertilité). Les cellules qui en manquent sont F^- et servent comme cellules femelles réceptrices.

Le facteur F est une molécule de DNA en forme d'anneau (hélice circulaire) avec une masse particulière de 45×10^3 kDa. Étant un élément (particule) extrachromosomique de DNA se répliquant de façon autonome, il est ainsi classé comme un plasmide. Il est transféré par conjugaison, c'est-à-dire par contact direct des cellules, d'une cellule mâle F^+ à une cellule femelle F^- , la cellule femelle étant transformée en une potentielle cellule donatrice : $F^+ \times F^- \rightarrow F^+$. Dans ce cas précis, aucun caractère chromosomique n'est transféré.

Le facteur F contient des gènes qui déterminent des structures spéciales de la surface cellulaire, comme les pili F qui sont indispensables à la conjugaison. Ceux-ci servent vraisemblablement à la prise de contact entre les cellules donatrice et réceptrice et permettent ainsi la formation des ponts de conjugaison intercellulaires par lesquels le DNA de la donatrice serait injecté dans la réceptrice.

Le mécanisme de conjugaison devint beaucoup plus clair quand CAVALI (en Italie) isola par hasard d'une souche F^+ un sous-clone ayant un taux de recombinaison avec F^- de 1000 fois plus élevé que celui de F^+ avec F^- . Ces cellules bactériennes conduisant à une si « haute fréquence de recombinaison », dites cellules Hfr (high frequency of recombination ou high frequency of recombinants), dérivent évidemment de F^+ par changement dans l'état du plasmide F, car Hfr peuvent revenir à l'état F^+ alors que les cellules F^- ne donnent jamais de Hfr (F^- manquent de plasmide F). $10^7 F^+ \times 10^9 F^- \rightarrow 10^2 - 10^4$ recombinants F^+ .

A Paris, JACOB et WOLLMAN démontrèrent par leurs expériences que dans les souches Hfr le plasmide F était intégré dans le chromosome bactérien, de telle façon que, pendant la conjugaison, le transfert de son segment était suivi par le chromosome. Il n'y a que très peu de bactéries d'une population F^+ qui soient capables de transférer le DNA chromosomique (marqueurs génétiques situés sur le chromosome). L'insertion du facteur F s'effectue à des endroits spécifiques et limités du chromosome bactérien (recombinaison spécifique localisée).

L'intégration dans une souche Hfr est réversible à faible fréquence restaurant habituellement l'état F^+ originel. Cependant, le plasmide F intégré est occasionnellement excisé de façon imprécise et porte ainsi un segment (de longueur variable) de chaque région adjacente du chromosome hôte. Le plasmide hybride qui en résulte est appelé plasmide F' et peut être transféré aux cellules F^- avec une haute efficacité comme dans le croisement normal $F^+ \times F^-$.

L'échange des gènes par conjugaison et leur mobilisation par des plasmides est probablement très répandu dans le règne des procaryotes (ex : le transfert des gènes de résistance). Le transfert de gènes par conjugaison, découvert d'abord chez les *E. coli*, est très fréquent chez les *Enterobacteriaceae* (*Salmonella*, *Shigella*,...) et a été aussi étudié chez *Streptomyces coelicolor*, *Nocardia*, *Rhizobium* et chez d'autres espèces bactériennes.

4.3. Transduction

4.3.1. Définition

La transduction est définie comme le transfert d'un fragment de DNA d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par l'intermédiaire d'un bactériophage à DNA bicaténaire appelé **phage transduisant**.

Le phénomène de transduction a été découvert par en 1951 par LEDERBERG et ZINDER chez *Salmonella Typhimurium* et a été aussi observé chez d'autres bactéries : *E. coli*, *Shigella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Rhizobium*.

On distingue deux types de transduction :

- transduction généralisée et
- transduction spécifique et restreinte. Dans les deux cas, les phages transduisants sont défectueux, c'est-à-dire ils ont perdu leur capacité de lyser la bactérie réceptrice comme le font les phages normaux.

4.3.2. Transduction généralisée et non spécifique

4.3.2.1. Transduction complète

Le **phage virulent**, au cours de son cycle lytique, produit une **nucléase** qui fragmente le DNA de la bactérie hôte. N'importe quel fragment du DNA bactérien (n'importe quel gène) peut être pris au hasard par le phage à la place du génome phagique ou, en plus du génome viral (phagique), être intégré dans la capsid du phage.

Le phage transduisant formé peut alors injecter son DNA (fragment de DNA bactérien) dans une cellule réceptrice. Ce fragment de DNA étranger va alors se recombinaison avec une région homologue du chromosome bactérien récepteur (recombinaison légitime). Le recombinant ou transductant ainsi obtenu transmettra le caractère transduit à toute sa descendance (ex : transduction du caractère de mobilité). L'homologie entre le DNA bactérien et le DNA du phage est de l'ordre de 1-2 %.

Dans leur expérience, LEDERBERG et ZINDER (1951) ont infecté une souche de *S. Typhimurium* donatrice B⁺ (tryptophane +) avec un phage tempéré P22. Après la lyse de la cellule hôte, les phages sécrétés furent incubés avec une souche réceptrice B⁻ (tryptophane-), différente d'un caractère de la souche B⁺. Après culture sur un milieu sélectif approprié, ils observèrent l'apparition des recombinants qui portaient les caractères de la souche B⁺ (tryptophane+).

4.3.2.2. Transduction abortive

Dans certains cas, le fragment du DNA transduit n'est pas recombinaison (intégré) avec le chromosome récepteur, restant ainsi à l'état extrachromosomique. Il n'est donc pas répliqué avec ce dernier. La cellule réceptrice constitue alors un hétérozygote (un mérozygote). Par conséquent, lors de la division cellulaire, seule l'une des cellules-filles portera et exprimera le caractère transduit. Ce phénomène est appelé transduction abortive.

4.3.3. Transduction spécifique et restreinte (localisée)

Elle permet le transfert de régions bien déterminées de DNA de la bactérie hôte. Le DNA du **phage tempéré**, intégré dans le chromosome-hôte à l'état de **prophage**, est excisé avec quelques gènes adjacents (contigus) du chromosome bactérien (certains gènes phagiques sont ainsi remplacés par des gènes de la cellule hôte).

Le cas le plus connu est celui du phage lambda λ de *E. coli* K12 qui transduit normalement les gènes *gal* et *bio* (propriété de métaboliser le galactose et la biotine) en s'intégrant à l'état de prophage dans le chromosome de la cellule réceptrice dans la région entre les gènes *gal* et *bio*. Ainsi, ces gènes voisins du DNA phagique peuvent se substituer à une partie du génome du phage et être transduits avec le DNA de ce dernier. En infectant une cellule bactérienne réceptrice manquant les gènes concernés (ex : *gal*⁻) avec ces phages transduisants, il peut se produire une recombinaison par addition du gène *gal*⁺ au chromosome récepteur ou par échange du gène défectueux de la bactérie réceptrice par le gène intact transduit. Les transductants qui en résultent sont dans ce cas *gal*⁺ (recombinaison spécifique localisée).

4.4. Conversion lysogénique

La conversion lysogénique consiste en l'acquisition par la bactérie-hôte d'un nouveau caractère génétique (à expression somatique) particulier introduit et déterminé par le génome d'un prophage (DNA du bactériophage intégré dans le DNA chromosomique bactérien). Ce caractère, qui s'exprime dans toutes les bactéries lysogénisées, est lié à l'état lysogène et disparaît avec la perte de cet état (ex. : attribution de l'hérédité infectieuse chez *Corynebacterium diphtheriae* : production de la toxine diphtérique, ou chez *Salmonella* : conversion des antigènes de surface). Ce phénomène, découvert chez les *Salmonella*, a été aussi observé chez *Shigella*, *E. coli*, *Pseudomonas*. Il s'agit probablement d'un processus de recombinaison non homologue.

La **lysogénie** indique une relation évolutive entre phages et bactéries et dépend d'une remarquable congruence des sites d'attachement entre le DNA du phage et celui de la bactérie-hôte. La plupart de phages peuvent lysogéniser certaines souches bactériennes.

Il est à noter que, bien que les phénomènes de transduction et de conversion fassent intervenir le phage (prophage), ils diffèrent sur le plan génétique. Dans la transduction, le phage ne joue que le rôle d'un agent vecteur de gènes, son propre génome n'intervenant pas dans le processus de transfert; tandis que, dans la conversion lysogénique, le génome du prophage détermine et transmet le nouveau caractère à la bactérie qui est ainsi lysogénisée (le DNA phagique est responsable de l'apparition du nouveau caractère dans la bactérie lysogénisée).

5. PLASMIDES

5.1. Définition

Les plasmides sont des éléments génétiques ou de petites molécules extrachromosomiques de DNA observés dans plusieurs bactéries. Ils constituent de petites molécules de DNA circulaires, surenroulées et bicaténares se répliquant de façon autonome. Ils sont transmis d'une cellule bactérienne à une autre par conjugaison ou par transduction. Ils sont reconnus par les propriétés phénotypiques qu'ils confèrent à leurs cellules-hôtes. Les plasmides pour lesquels aucune propriété phénotypique perceptible n'est décrite sont appelés des plasmides cryptiques.

Un épisome est un plasmide intégré dans le chromosome bactérien.

Les plasmides ont été découverts grâce à leur rôle dans le transfert de la fertilité (F-facteur). D'autres plasmides ont été découverts par la suite : facteurs R de résistance aux antibiotiques, bactériocinogènes de synthèse de protéines bactéricides,...

5.2. Classes des plasmides

On distingue deux classes principales des plasmides :

5.2.1. *Les gros plasmides*, de 60 - 120 Kb de long, sont surtout des **plasmides conjugatifs** et autotransmissibles ou autotransférables (self transmissible) : ils codent pour un appareil ou une structure dans une bactérie servant à leur propre transfert par contact avec une autre cellule. Exemples, les facteurs F et R et certains facteurs bactériocinogènes.

5.2.2. *Les petits plasmides*, de 1,5 - 15 Kb de long, sont **non conjugatifs et non-transférables**, mais ils peuvent souvent être mobilisés par un plasmide conjugatif dans la même cellule. Ils peuvent aussi être transférés sans contact des cellules par **transfection** (prise d'un DNA infectant dans une solution; ex. : transformation au CaCl_2 : le DNA plasmidique peut être introduit dans une cellule bactérienne en le mélangeant simplement avec des cellules réceptrices resuspendues dans une solution froide de chlorure de calcium).

5.3. Types et propriétés des plasmides

5.3.1. Facteurs F de fertilité

Ce sont des plasmides de fertilité pouvant être intégrés dans le chromosome de l'hôte qu'ils mobilisent et dont ils arrangent le transfert dans une autre cellule (voir conjugaison).

5.3.2. Facteurs R de résistance

Ils ont été découverts en 1959 au Japon chez les *Shigella*. Ils constituent la cause de résistance multiple des bactéries aux antibiotiques pouvant être transmise à d'autres bactéries. Les facteurs R contiennent des gènes qui rendent la bactérie hôte résistante aux sulfonamides, à la streptomycine, au chloramphénicol, aux tétracyclines,... Quelques R- facteurs causent la résistance jusqu'à huit antibiotiques; d'autres celle aux métaux lourds toxiques comme Hg, Ni, Cd et Co.

Le R- plasmide porte deux groupes de gènes répartis dans 2 régions contiguës:

- la majorité de gènes est responsable du transfert du plasmide par conjugaison (gènes *tra*) et forme le « **facteur de transfert de résistance, RTF** » (resistance transfer factor), d'environ 80 Kb de long; RTF porte les gènes contrôlant la répllication et le nombre de copies du plasmide ainsi que ceux impliqués dans le transfert (parfois les gènes codant pour la résistance à la tétracycline *Tc*);
- une faible partie de gènes déterminant la résistance aux médicaments, **gènes R ou déterminants R**, de 3 - 15 Kb, est localisée sur des transposons hautement mobiles; ils déterminent la résistance aux antibiotiques tels que la pénicilline *Pen*, l'ampicilline *Amp*, le chloramphénicol *Cam*, la streptomycine *Str*, la kanamycine *Kan*, les sulfamides *Sul*, etc. Exemples : plasmide R6K d'*E. coli* : Sm^r , Amp^r ; plasmide RK2 de *Klebsiella aerogenes* : Km^r , Tc^r , Amp^r ; plasmide NR1 de *Shigella* : Cm^r , Fu^r , Sm^r , Sp^r , Km^r , Tc^r .

5.3.3. Facteurs bactériocinogènes

Beaucoup de bactéries produisent des protéines qui sont toxiques (qui tuent) pour d'autres espèces bactériennes en inhibant la croissance de ces dernières. Ces protéines, appelées bactériocines, ont été observées pour la première fois chez *E. coli* en 1925 par le Belge GRATIA (Colicine) et ensuite chez d'autres bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (pyocine), *Bacillus megaterium* (mégacine),... Les plasmides qui codent pour les bactériocines sont appelés facteurs bactériocinogènes. Les plasmides colicinogènes, plasmides Col, codent pour les colicines d'*E. coli*.

5.3.4. Facteurs de virulence

Ils comprennent les facteurs d'adhérence bactérienne à la surface des muqueuses, comme les plasmides pCol V-B188 des *Enterobacteriaceae*, ou les plasmides portant les gènes pour des toxines bactériennes, comme les entérotoxines et de l'hémolysine d'*E. coli*, les entérotoxines et l'exfoliatine de *S. aureus*, ainsi que les facteurs de résistance au sérum humain (ex. : pCol V-292).

5.3.5. Autres types et propriétés des plasmides

Des plasmides peuvent aussi porter des gènes pour des propriétés biochimiques spéciales :

- la prise de fer, comme le plasmide pJM1 de *Vibrio anguillarum* : sidérophore externe qui lie le fer avec une haute affinité et qui se fixe à un récepteur spécifique de surface qui permet la pénétration du complexe fer-sidérophore;
- des gènes pour les enzymes de dégradation des substances organiques : camphre, acide salicylique, naphtaline, octane, lactose,...
- des gènes induisant les tumeurs malignes (plasmides oncogènes) chez les plantes dicotylédones (ex. : infection par *Agrobacterium tumefaciens* contenant le gros plasmide Ti, tumor inducing, causant des tumeurs appelées *crown gall disease*) ou chez les animaux (ex. : Polyomavirus, Retrovirus de sarcome,...); le plasmide Ti est devenu très important en amélioration des plantes (stratégie pour introduire des gènes conférant la résistance à des insectes, à des ions ou à des herbicides): obtention des plantes transgéniques (nouvelles variétés de plantes créées par génie génétique);
- des gènes pour la fixation de l'azote moléculaire N₂ (plasmides de *Rhizobium* codant pour la nodulation), pour la prise des sucres, la formation de l'hydrogénase, du diacétyl, de l'acide indolylacétique, etc;
- plasmides de *Bacillus thuringiensis* et *B. sphaericus* qui portent les gènes qui codent pour la production des protoxines pendant la sporulation. Ces protoxines, ingérées par des larves des insectes, sont transformées en toxines insecticides.

Ceci démontre que des gènes ou des groupes de gènes sont plus ou moins échangés entre chromosome et plasmide. Les plasmides semblent ainsi avoir joué un rôle déterminant (décisif) dans l'évolution des procaryotes.

5.3.6. Plasmides des levures

- Plasmide killer (tueur): molécule de RNA bicaténaire avec un PM de 15 x 10⁶ D qui comporte 10 gènes impliqués dans sa réplication et des gènes impliqués dans la synthèse de la substance *killer*, une protéine de type colicine.
- Plasmide 2 µm : molécule de DNA de 2 µm de long qui est associé à des histones et existant en 60 copies par cellule, toutes localisées dans le noyau de la cellule, mais jamais intégrées dans le chromosome de la levure hôte. Il a constitué un modèle de choix pour l'étude de la réplication de DNA chez la levure. Il est surtout

utilisé, maintenant, comme base pour la construction de vecteurs de clonage autorépliquatifs chez la levure.

5.4. Classification des plasmides : Incompatibilité

Beaucoup de bactéries contiennent plusieurs gros plasmides différents. On classe (divise) les plasmides en **groupes d'incompatibilité** : les plasmides appartenant à un même groupe ne peuvent pas coexister dans une même cellule bactérienne. Ainsi, **deux plasmides analogues ou apparentés**, c'est-à-dire ayant le même répresseur spécifique et une homologie extensive de DNA, ne peuvent pas coexister : ils sont incompatibles ou insupportables. En effet, l'incompatibilité donne une idée sur le degré de ressemblance (closeness) ou d'homologie génétique des plasmides. La coexistence de différents plasmides dans une même cellule bactérienne signifie que ces plasmides sont supportables ou compatibles : ils peuvent ainsi se répliquer dans une même cellule.

CHAPITRE X: INTERACTIONS HOTE-MICROORGANISME

1. FACTEURS DE PATHOGENICITE

Les maladies microbiennes sont le résultat d'un conflit entre le microbe dit « pathogène » et l'hôte : le microbe tend à envahir les tissus de l'hôte tandis que l'organisme réagit pour éliminer ou détruire le micro-organisme. Pour agir, le micro-organisme possède deux sortes de facteurs de pathogénicité :

- les facteurs d'envahissement des cellules et tissus de l'hôte qui assurent la multiplication du microbe à l'intérieur de l'organisme après une période d'incubation ;
- les facteurs toxinogènes, liés à la production des toxines par le microbe, la toxine constituant aussi un facteur de virulence pour certaines bactéries.

Selon les mécanismes du pouvoir pathogène du germe responsable, on peut définir trois types principaux d'infections :

- (1) infections dues à la multiplication des germes invasifs, non toxinogènes ;
- (2) infections dues aux germes toxinogènes : intoxications ou intoxinations (et toxi-infections) causées surtout par des toxines protéiques ;
- (3) infections dues aux germes invasifs et toxinogènes (capacité d'invasion et pouvoir toxique combinés) : toxi-infections.

2. FACTEURS D'ENVAHISSEMENT

Les facteurs d'envahissement sont ceux qui confèrent au micro-organisme les capacités

- de se fixer, de coloniser et d'envahir les cellules de la peau, des tissus et des muqueuses de l'hôte,
- de franchir et d'atteindre les espaces sous-cutanés ou sous-muqueux,
- d'atteindre les viscères par dissémination hématogène.

2.1. Colonisation cutané-muqueuse

La majorité des infections spontanées ont comme point de départ la surface des muqueuses. La colonisation des muqueuses par le germe pathogène se réalise grâce à sa capacité d'adhérer à la surface des cellules épithéliales des muqueuses. L'adhésion/l'adhérence est un phénomène spécifique qui intervient après une étape réversible d'adsorption spécifique ou non spécifique.

- Adsorption non spécifique mettant en jeu des adhésines (pili ou fimbriae, glycocalyx, slime) ou des facteurs de colonisation, CFA (colonisation factor antigen) et leurs récepteurs cellulaires correspondants (glycolipides ou glycoprotéines membranaires, fibronectine) : ex., chez les bactéries. Les adhésines sont des structures de composition chimique protéique ou polysaccharidique et sont présentes aussi bien chez les bactéries à Gram positif : *Staphylococcus* (acide lipoteichoïque), *Streptococcus pyogenes* (protéine M, acide lipoteichoïque), que chez les bactéries à Gram négatif : *Neisseria*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis* (pili ou fimbriae), *Escherichia coli* entérotoxigènes (CFA),...

- Adsorption spécifique mettant en jeu des protéines ou glycoprotéines (spicules) virales dites anti-récepteurs et des récepteurs cellulaires spécifiques de surface de nature glycoprotéique.

Rôles de l'adhésion

- L'adhésion permet une meilleure résistance des germes aux mécanismes naturels de défense de l'organisme : ex, l'adhérence à la muqueuse urinaire empêche l'élimination des bactéries par les flots des urines (infections urinaires); l'adhérence aux muqueuses respiratoires compromet l'efficacité de l'« escalator » mucociliaire (infections respiratoires).
- L'adhésion renforce l'efficacité de l'action des toxines et des enzymes microbiennes diffusibles lorsque le microbe qui les sécrète adhère spécifiquement à leurs cellules cibles : ex., entérotoxines d'*E. coli* entérotoxigènes (diarrhées), toxines de *Bordetella pertussis* ou de *Mycoplasma pneumoniae* (infections respiratoires).
- L'adhésion microbienne (bactérienne) peut s'exercer à la surface des biomatériaux (cathéters, prothèses cardiaques et osseuses, valves...) implantés dans l'organisme (infections particulièrement chroniques, graves et difficiles à traiter).

2.2. Invasion de la peau et des muqueuses

L'attachement microbien aux muqueuses n'est pas nécessairement suivie d'une pénétration des cellules épithéliales (maladies de colonisation du territoire muqueux : **infections localisées**). Certains germes, cependant, traversent la barrière muqueuse et pénètrent dans les cellules épithéliales (pénétration intracytoplasmique) et l'envahissent (ex., *Shigella*, *Escherichia coli* entéroinvasifs, *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes*, Spirochètes, *Neisseria*, protozoaires, virus). Des nombreux facteurs interviennent pour assurer au germe :

- la pénétration : forte mobilité (flagelles), traumatismes des muqueuses, chimiotactisme, reprise par des cellules phagocytaires; **invasine** : protéine produite par une bactérie pathogène qui facilite l'invasion des tissus hôte après adhésion; elle stimule des cellules humaines à englober une cellule bactérienne par phagocytose;
- la survie et la multiplication : résistance à la phagocytose par la survie à l'intérieur des phagocytes : présence de la capsule (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria*, *Klebsiella*,...), de la protéine M (*Streptococcus pyogenes*), lyse de la vacuole phagocytaire dans le cytoplasme (*Listeria*, *Shigella*), absence de fusion lysosomiale et résistance à l'attaque des enzymes du phagocyte (cires de la paroi de *Mycobacterium*), Mip de *Legionella pneumophila*, une protéine qui facilite sa pénétration dans les macrophages où il survit et se reproduit (Mip : macrophage infectivity potentiator).

2.3. Dissémination dans l'organisme

Des germes pathogènes peuvent, après l'invasion des cellules épithéliales, se propager dans l'organisme et provoquer

- une atteinte (une infection) des tissus sous-cutanés ou sous-muqueux où ils se multiplient en réalisant **un foyer infectieux ou une infection localisée** (abcès, furoncle) qui est le plus souvent circonscrit / limité par les moyens de défense de l'hôte;
- **une infection généralisée ou systémique**, lorsque le germe atteint la circulation sanguine (dissémination hématogène), soit directement, soit après une étape lymphatique transitoire (ganglions lymphatiques) conduisant à une **bactériémie**, **fongémie** ou **virémie** (passage unique et éphémère, sans gravité particulière), ou à une **septicémie** (passages réitérés, quasi permanents du germe dans le sang et plus sévères). Les germes déversés dans le sang peuvent essaimer dans les viscères sous la forme d'abcès métastatique multiples observés lors d'une septicopyohémie.

Lors d'une infection humaine, les bactéries se multiplient difficilement dans les tissus et pratiquement pas dans le sang. Pour déterminer une infection, le germe doit se multiplier et atteindre un nombre suffisant, nécessaire pour

- causer une infection : dose infectante, DI ou
- tuer son hôte : dose létale DL. Ce nombre est apprécié indirectement par la détermination de la quantité de germes (bactéries) nécessaire pour infecter ou tuer 50 % ou 100 % des animaux du lot expérimental : **dose infectante** 50 % (DI₅₀) ou 100 % (DI₁₀₀); **dose létale** 50 % (DL₅₀) ou 100 % (DL₁₀₀). Cette quantification permet d'apprécier les variations du niveau de la virulence.

Pour que le germe pathogène puisse se propager dans l'organisme, il doit

- se multiplier dans l'organisme,
- résister aux mécanismes de défense de l'organisme : résister à la phagocytose (voir ci-dessus), résister au pouvoir bactéricide (germicide) du sérum (surtout bactéries à Gram négatif : LPS pariétal, capsule comme l'Ag K1 d'*E. coli*), compétition avec d'autres facteurs limitant la multiplication microbienne (transferrine, lactoferrine, hémosidérine, lysozyme, opsonines, complément, agglutinines,...), invasine bactérienne, Mip de *Legionella pneumophila*;
- créer des lésions au niveau des tissus de l'hôte grâce surtout à ses toxines et ses diverses enzymes extracellulaires et aussi grâce à la réaction inflammatoire produite par l'hôte.

3. TOXINOGENESE BACTERIENNE

Les bactéries peuvent élaborer des substances toxiques et antigéniques. On distingue deux types de toxines bactériennes :

- les toxines protéiques : essentiellement des **exotoxines** des bactéries à Gram positif,
- les toxines glucido-lipido-protéiques : **endotoxines** des bactéries à Gram négatif.

3.1. Toxines protéiques

3.1.1. Propriétés physico-chimiques

Les toxines protéiques sont pour la plupart des exotoxines excrétées dans le milieu extérieur par la bactérie

- pendant la phase exponentielle de croissance : toxine diphtérique de *Corynebacterium diphtheriae*, toxine alpha de *Staphylococcus aureus* et de *Clostridium perfringens*,
- en partie au cours de la phase exponentielle et en partie à la fin de cette dernière par autolyse bactérienne : toxines de *Clostridium botulinum* et de *C. tetani*,
- ou demeurent liées au corps bactérien (ne sont jamais libérées) : toxines de *Shigella dysenteriae* (shiga-toxine), de *Yersinia pestis* et de *Bordetella pertussis* (pertussis-toxine).

Ces toxines sont thermolabiles, ont une toxicité et un pouvoir antigénique très élevés. D'où l'utilisation de certaines toxines comme vaccins (**anatoxines**) après leur détoxification par le formol ou pour l'obtention des sérums thérapeutiques (**antitoxines**) contenant des anticorps neutralisants spécifiques.

3.1.2. Toxinogénèse

La production des toxines protéiques est déterminée

1°) par les gènes

- chromosomiques : ex, cholera-toxine de *Vibrio cholerae*,
 - plasmidiques : ex, entérotoxines et hémolysines d'*Escherichia coli*, entérotoxines et exfoliatines de *S. aureus*,
 - d'un prophage : ex, toxine diphtérique de *C. diphtheriae*, alpha-toxine de *S. aureus*;
- 2°) par la composition du milieu de culture : présence de certains facteurs toxigènes : acides aminés, certains ions (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , HCO_3^-), glucides, pH, température,...

3.1.3. Pathogénicité

Les exotoxines jouent un rôle majeur dans l'expression clinique de certaines maladies infectieuses. Par exemple,

- la diphtérie : toxine diphtérique de *Corynebacterium diphtheriae*,
- le tétanos : toxine tétanique (tétanospasme) de *Clostridium tetani*,
- les éruptions scarlatineuses : toxines érythrogènes de *Streptococcus pyogenes*,
- les gangrènes gazeuses : perfringolysine O (PFO) de *Clostridium perfringens*,
- le choléra : toxine cholérique de *Vibrio cholerae*,
- les intoxications alimentaires : le botulisme dû à la toxine botulique de *Clostridium botulinum*, les diarrhées causées par les entérotoxines de *Staphylococcus aureus*, d'*E. coli*, de *Vibrio parahaemolyticus*, de *Bacillus cereus* et de *Clostridium perfringens*,
- le syndrome de choc toxique staphylococcique : TSST1 (toxic shock syndrome toxin) de *Staphylococcus aureus*.

3.1.4. Pouvoir antigénique

Les toxines protéiques peuvent être détoxifiées par le formol (blocage de 30 % de groupes aminés libres de la lysine par le formaldéhyde) et transformées en **anatoxines** : celles-ci ont perdu leur pouvoir toxique, mais conservé leur pouvoir immunogène (antigénique) d'induire la formation des anticorps spécifiques homologues. Ainsi certaines anatoxines sont utilisées comme vaccins (ex, anatoxines tétaniques et diphtériques).

Les toxines protéiques détoxifiées injectées à un organisme vivant suscitent la formation d'anticorps correspondants, des **antitoxines**, qui neutralisent l'activité biologique (effets toxiques) des toxines. Le sérum antitoxine est ainsi utilisé en séroprophylaxie et en sérothérapie des maladies causées par certaines toxines (tétanos, botulisme, diphtérie,...).

3.2. Toxines glucido-lipido-protéiques

3.2.1. Propriétés physico-chimiques

Les **endotoxines** correspondent au **lipopolysaccharide (LPS)** de la membrane externe de la paroi cellulaire (membrane externe) des bactéries à Gram négatif. Elles ne sont libérées qu'après lyse bactérienne ou par des moyens physiques ou chimiques. De toxicité et pouvoir antigénique moindres, elles sont thermorésistantes (2 h à 100°C) et alcool-stables.

3.2.2. Propriétés biologiques

Les activités biologiques des endotoxines correspondent à chacune des parties qui les composent :

- a) fraction protéinique : responsable de l'immunogénicité;
- b) fraction polysaccharidique : responsable de la spécificité antigénique (antigènes somatiques O, AgO),

c) fraction lipidique ou lipide A : responsable des effets toxiques et des propriétés pharmacologiques :

- effet leucopéniant : baisse de 60 % des leucocytes dans le sang suivie d'une hyperleucocytose réactionnelle après injection I.V.,
- effet pyrogène indirect consécutif à l'action leucopéniente par libération de substances pyrogènes à partir des leucocytes détruits agissant sur le centre thermorégulateur de l'hypothalamus antérieur, la région préoptique (élévation de la température corporelle),
- effet toxique caractérisé par l'association de deux séries de manifestations :
 - 1°) troubles hémodynamiques, hypotension, diminution de la circulation veineuse de retour, congestion des organes, tachycardie pouvant aller jusqu'au collapsus cardiovasculaire voire même l'état de choc et la mort;
 - 2°) diarrhées accompagnées d'hémorragies intestinales secondaires aux effets de l'endotoxine sur les plaquettes et le complément.

Tous ces effets peuvent conduire au **choc endotoxinique** par libération brutale d'endotoxine qui constitue une complication sévère observée surtout dans des cas de septicémie dus aux bactéries à Gram négatif.

3.2.3. Pouvoir antigénique

Le pouvoir antigénique des endotoxines est faible. Les anticorps anti-endotoxines ne neutralisent pas les effets biologiques des endotoxines.

La coexistence chez une même bactérie de certains facteurs de pathogénicité ajoutée au caractère réceptif de l'hôte représente les conditions optimales de leur expression et donc du pouvoir pathogène.

CHAPITRE XI: FONDEMENTS BIOLOGIQUES DE LA CHIMIOTHERAPIE ANTIMICROBIENNE

1. DEVELOPPEMENT DE LA CHIMIOTHERAPIE

1.1. Chimiothérapie antimicrobienne

La chimiothérapie est un terme inventé par **EHRlich** en 1904 pendant qu'il étudiait des substances chimiques synthétiques qui montraient une plus grande affinité pour les parasites que pour leurs cellules-hôtes. Le développement de la chimiothérapie antimicrobienne a commencé en 1935 avec la découverte des **sulfonamides** par **DOMAGK**. Le terme chimiothérapeutique était ainsi souvent utilisé pour distinguer les composés chimiques synthétiques (substances chimiques de synthèse) des antibiotiques (substances chimiques d'origine biologique). Cependant, il est plus intéressant de considérer la définition originelle d'Ehrlich des agents antimicrobiens qui soulignait la distinction entre la toxicité sélective, dirigée contre les parasites et non contre leurs cellules-hôtes, et la toxicité non sélective. En outre, quelques antibiotiques sont maintenant produits par synthèse chimique et beaucoup sont de dérivés semi-synthétiques préparés par modifications chimiques de produits de base naturels.

1.2. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances chimiques ou biologiques d'origine microbienne (champignons, bactéries) ou chimique (synthèse, modifications chimiques) qui, déjà à une faible concentration, inhibent la croissance des micro-organismes et éventuellement les tuent. On distingue ainsi des substances qui inhibent la croissance microbienne (bactériostatiques et fongistatiques) et celles qui tuent les micro-organismes (bactéricides et fongicides).

Des relations symbiotiques ou antagonistes entre micro-organismes étaient déjà connues depuis le 19^e siècle. L'inhibition de certains microbes par d'autres fut mentionnée pour la première fois par Pasteur en 1877 quand il observa la stérilisation de ***Bacillus anthracis*** dans une culture contaminée.

En 1928, Sir **Alexander FLEMING**, un médecin écossais, rapporta qu'une colonie contaminante du champignon ***Penicillium notatum*** inhibait la croissance des colonies adjacentes de *Staphylococcus aureus* par lyse des cellules. L'agent lytique qui diffusait dans ce milieu d'agar fut purifié 10 ans plus tard (1938) à Oxford par **Ernst CHAIN** et **Howard FLOREY** et appelé **pénicilline**. Cette substance se montra efficace contre certaines infections.

En 1944, **Selman WAKSMAN** (immigré russe) découvrit à New Jersey (USA) la **streptomycine** produite par *Streptomyces griseus* (un actinomycète du sol). Actuellement, plus de 2000 antibiotiques ont été caractérisés, mais seule une centaine est utilisée en chimiothérapie.

1.3. Spectre d'activité

Les antibiotiques ne sont pas indistinctement actifs sur toutes les espèces bactériennes. On définit le spectre d'activité d'un antibiotique comme la liste des espèces bactériennes sur lesquelles il est susceptible d'être actif. C'est une notion

théorique qui dépend de la résistance naturelle des souches bactériennes sauvages. Ce spectre d'activité peut être

- large pour les antibiotiques pouvant agir sur la majorité des espèces de bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif;

- étroit, voire très étroit (limité) pour les antibiotiques pouvant agir sur un groupe de bactéries (ex. : antibiotiques des bactéries à Gram positif ou des bactéries à Gram négatif) ou sur quelques espèces d'un même genre (ex. : antibiotiques antistaphylococciques, antibiotiques antituberculeux).

La résistance acquise peut rétrécir le spectre d'activité d'un antibiotique donné.

2. PRINCIPES DE BASE DE LA CHIMIOThERAPIE

Ehrlich a défini deux propriétés (principes) essentielles pour un médicament pouvant être utilisé en chimiothérapie :

- (1) **une affinité** entre une partie du médicament et une structure du parasite qui lui sert de **récepteur** (liaison chimique spécifique entre les parasites et les médicaments);

- (2) **un potentiel (pouvoir) toxique (activité)** du médicament qui lui confère la capacité de détruire le parasite ou d'inhiber sa croissance (empêcher sa viabilité) dès que la liaison s'est établie [« nihil agit nisi fixatur » : pas d'action sans fixation].

- (3) À ces 2 propriétés, il faut ajouter la **toxicité sélective** du médicament.

Avant qu'un antibiotique puisse agir, il doit, en premier lieu, réagir avec une partie du parasite ou du micro-organisme pathogène dans l'hôte humain ou animal. Cette interaction, moins spécifique que la liaison définie par Ehrlich, doit être initiée par un processus spécifique de transport actif qui sert à augmenter la concentration intracellulaire non liée de l'antibiotique au-dessus de celle atteinte par la diffusion passive. Cette concentration élevée de l'antibiotique conduit à une interaction spécifique de la molécule médicamenteuse avec une enzyme ou un constituant subcellulaire du micro-organisme.

Le succès d'une chimiothérapie antimicrobienne exige que le processus métabolique du microbe à attaquer (ou bien la structure-cible) soit aussi différent que possible de celui de l'animal hôte. L'antibiotique doit, pour cela, avoir un index thérapeutique favorable (rapport de la dose curative sur la dose toxique). Certains antibiotiques (ex. streptomycine, chloramphénicol) sont toxiques aussi bien pour l'hôte que pour le micro-organisme. La majorité des antibiotiques, cependant, se sont révélés très toxiques pour être utilisés en clinique comme agents chimiothérapeutiques : leur index thérapeutique est défavorable.

Il est souvent une défaillance clinique de tuer un micro-organisme pathogène ou d'inhiber sa croissance aux dépens de la vie ou du bien-être du patient. Le dommage réel pouvant être causé au patient par l'agent antimicrobien doit être balancé contre le degré du danger pour sa vie causé par le micro-organisme. Le choix des médicaments relativement toxiques est souvent inapproprié et leur utilisation sans supervision adéquate potentiellement dangereuse.

3. CHIMIOThERAPIE ANTIBACTERIENNE

3.1. Mécanismes d'action des antibiotiques antibactériens

Les voies par lesquelles un antibiotique peut désorganiser la physiologie d'un parasite ou d'un agent pathogène sont infinies (nombreuses). En dépit de la multitude de sites-cible pour les antibiotiques, ceux utilisés en médecine humaine et vétérinaire tombent dans des catégories d'action bien définies. Seuls quelques domaines de la physiologie microbienne sont affectés :

- (1) réplication génétique de la cellule (réplication et transcription) ;
- (2) expression de cette information génétique en protéines fonctionnelles (translation ou traduction) ;
- (3) synthèse et / ou fonction des constituants cellulaires telles la paroi ou les membranes cellulaires des micro-organismes;
- (4) activités enzymatiques cellulaires.

Une discussion sur les bases biochimiques du mode d'action des antibiotiques à usage clinique repose sur la compréhension des processus physiologiques et métaboliques fondamentaux dans l'hôte humain. En outre, pour comprendre les mécanismes d'acquisition de la résistance ou de blocage de l'action d'un antibiotique actif, il est nécessaire de connaître les bases biochimiques du mode d'action du médicament. Ceci est particulièrement essentiel si la résistance est due à un changement ou à une modification de la cible cellulaire de l'antibiotique.

Expliquer comment agit un antibiotique donné implique une ou plusieurs activités biochimiques ou biophysiques de la cellule microbienne. La présence d'un médicament cause des changements biochimiques primaires et secondaires dans la cellule microbienne qui sont souvent difficiles à séparer en groupes.

Un agent antimicrobien peut affecter une fonction métabolique ou physiologique ou une structure d'une cellule microbienne. Dans cette section, les antibiotiques sont ainsi groupés en fonction de leur structure chimique de base et de leur cible majeure (principale) d'action. On trouve ainsi :

- (1) des inhibiteurs de la synthèse ou des fonctions des acides nucléiques,
- (2) des inhibiteurs de la synthèse des protéines,
- (3) des inhibiteurs du fonctionnement normal des membranes cellulaires (membrane cytoplasmique et membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif).
- (4) des inhibiteurs de l'activité d'une enzyme spécifique ou d'un système d'enzymes microbiennes,
- (5) des inhibiteurs de la synthèse (et du fonctionnement) de la paroi cellulaire.

3.2. Antibiotiques affectant la synthèse ou les fonctions des acides nucléiques

Un nombre important d'antibiotiques pouvant inhiber la réplication ou la transcription sont connus, mais très peu sont utilisés en clinique, probablement à cause du fait que la biochimie de la réplication et de la transcription chez la bactérie n'est pas suffisamment différente de celle chez les cellules humaines. Ce qui ne permet pas un index thérapeutique favorable. Par exemple, les actinomycines et les mitomycines inhibent la synthèse du DNA. Les actinomycines forment des complexes avec le DNA en se fixant sur les résidus déoxyguanosine. Le complexe DNA-actinomycine inhibe la RNA-polymérase DNA-dépendante et bloque ainsi la formation du mRNA (ARNm) et, par conséquent, la transcription. Les actinomycines sont très toxiques pour l'homme et ne sont qu'occasionnellement utilisées comme agents anticancéreux (anti-tumoraux). Les mitomycines se lient fermement aux brins complémentaires de DNA et bloquent ainsi la réplication du DNA. Les actinomycines et les mitomycines inhibent aussi bien les cellules bactériennes que les cellules

animales et ne sont pas suffisamment sélectives pour être employées en chimiothérapie antibactérienne.

3.2.1. Antibiotiques inhibiteurs de la transcriptase : Rifamycines :

Rifamycine B : Rifampin (Rifampicine, Rimactan^R, Rifadine^R); Rifamycine SV : Rifabutin (dérivé de Rifamycin S), ansamacrolides avec les streptovaricines et les tolypomycines.

Elles sont produites par *Streptomyces mediterranei*. Les rifamycines sont des inhibiteurs spécifiques de la RNA-polymérase DNA-dépendante (dépendante du DNA), la transcriptase, en se liant à la sous-unité β du noyau de l'enzyme polymérase, bloquant ainsi la phase d'initiation de la synthèse du mRNA bactérien, et par conséquent la transcription. Chez les poxvirus, les rifamycines bloquent le stade tardif de l'assemblage viral en interférant avec la formation de l'enveloppe.

La rifampicine est active in vitro contre certains coques à Gram positif et à Gram négatif, certaines entérobactéries, les mycobactéries et les poxvirus. La rifabutine est un antimycobactérien actif contre *Mycobacterium avium* complex)

3.2.2. Antibiotiques inhibiteurs de la DNA-gyrase (topoisomérase II)

3.2.2.1. Quinolones

Les quinolones inhibent la réplication (la synthèse) du DNA bactérien par blocage de la sous-unité A de la DNA-gyrase bactérienne : blocage prompt, sélectif et réversible de la synthèse du DNA et par conséquent de la division cellulaire des bactéries, donc de la croissance bactérienne. Il y a inhibition du surenroulement de la double hélice de DNA. Certains quinolones (ex. : norfloxacin) inhibent la sous-unité B de l'enzyme empêchant ainsi la fixation d'ATP et par conséquent le transfert d'énergie nécessaire à l'activité de l'enzyme.

A) Anciens quinolones ou de 1^{ère} Génération: acide nalidixique (Neg Gram^R) et ses dérivés (modifiés): acide oxolinique (Urotrate^R), acide pipémidique (Pipram^R) et acide piromidique (Purim^R); fluméquine (Aporone^R), cinoxacin (Cinobac^R), rosoxacin (Eracine^R): ils diffusent peu et n'atteignent pas les concentrations systémiques antibactériennes après une prise orale et sont rapidement éliminés dans les urines. Ils sont ainsi indiqués comme des antiseptiques urinaires chez l'adulte. Ils sont principalement actifs sur les bacilles à Gram négatif, surtout les entérobactéries. La rosoxacin (Eracine^R), nouveau quinolone non fluoré, est uniquement utilisée contre la blennorragie.

B) Fluoroquinolones (nouveaux quinolones) ou de 2^e Génération : ciprofloxacine (Ciprobay^R, Shalcip^R, Ciflox^R), norfloxacine (Noroxine^R), ofloxacine (Tarivid^R, Oflozet^R), exoxacin (Gyramid^R), pefloxacine (Péflaxine^R), fleroxacin, temafloxacine, lomefloxacine, levofloxacine, sparfloxacine, clinafloxacine, amifloxacine, rufloxacine, grepafloxacine, gatifloxacine, rosofloxacine : ils ont un spectre d'activité plus large ; mais, les streptocoques, entérocoques, *Listeria* et *Bacteroides* sont peu sensibles.

C) Quinolones de 3^e Génération (7-azabicyclomodifiés): moxifloxacine, trovafloxacine : ils ont une activité plus élevée contre les bactéries à Gram positif (streptocoques, entérocoques, staphylocoques) et les anaérobies (*Bacteroides fragilis*).

Les quinolones ont un effet **bactéricide**. Ils peuvent aussi, à des concentrations élevées, inhiber la transcription : effet alors bactériostatique.

3.2.2.2. Novobiocine (*Streptomyces niveus*)

La novobiocine inhibe la synthèse (réplication) du DNA en empêchant la fixation d'ATP sur la sous-unité B de la DNA-gyrase : elle entre en compétition avec l'ATP requis par cette enzyme pour catalyser l'enroulement négatif du duplex DNA superenroulé (l'enzyme introduit des surenroulements hélicoïdaux négatifs dans le DNA par un mécanisme de coupure des 2 brins du duplex DNA, de passage d'un autre segment de DNA à travers la coupure et en reliant les brins de DNA scindés). La novobiocine est active sur les bactéries à Gram positif, essentiellement les staphylocoques. Elle est **bactériostatique** et peu utilisée.

3.2.3. Antibiotiques affectant la molécule de DNA bactérien

3.2.3.1. Nitrofuranes

Ils agissent sur le DNA en provoquant des coupures de brins de DNA et sur plusieurs enzymes bactériens après réduction préalable de leur groupement -NO₂ (production des radicaux nitroxyloxy toxiques) par les **bactéries aérobies ou anaérobies**. Ce sont des antibiotiques de synthèse à large spectre, mais inactifs sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Serratia* et *Acinetobacter*. On les utilise per os pour traiter :

- les infections urinaires : nitrofurantoïne (Furadantine^R), hydroxy-méthyl-nitrofurantoïne (Urfadyn^R) ou
- les infections intestinales : furazolidone (Furoxane^R), nifuroxazide (Ercéfuryl^R).

3.2.3.2. Nitro-imidazoles

Métronidazole (Flagyl^R), tinidazole (Trinigyn^R, Fasigyn^R), ornidazole (Tiberal^R), secnidazole (Flagentyl^R), nimarazole (Naxogin^R).

Leur activité est conditionnée par la réduction partielle de leur groupement -NO₂, réalisée uniquement par la nitroréductase des **bactéries anaérobies**. Ces dérivés réduits, radicaux libres très toxiques, se fixent sur le DNA, provoquent des coupures des brins et un déroulement du DNA. Ils sont **bactéricides**. Les 5-nitro-imidazoles sont des agents antibactériens de spectre limité aux bactéries anaérobies (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Clostridium*) et aussi à d'autres bactéries des genres *Gardnerella*, *Campylobacter* et *Capnocytophaga*. Ils ont aussi une activité antiparasitaire (*Entamoeba*, *Giardia*, *Trichomonas*).

3.2.3.3. Méthénamine

C'est une amine tertiaire avec des propriétés de base monoacide. Elle n'a aucune activité antibactérienne, mais est convertie par hydrolyse à un pH acide (comme dans les urines à pH < 5.5) en ammonium et formaldéhyde. C'est ce dernier agent alkylant qui procure une action antiseptique. Le formaldéhyde n'est libéré que dans les urines (pH < 5.5) et non lors de la circulation de méthénamine dans le corps (pH physiologique dans le sérum). Ainsi, la méthénamine est utilisée comme antiseptique urinaire. Elle est activée en étant combinée chimiquement à un acide faiblement métabolisé et est administrée sous forme de sels de mandelate (Mandelamine^R) ou d'hippurate ((Hiprex^R, Urex^R).

3.3. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Le processus de synthèse protéique dans la bactérie diffère dans peu de détails essentiels de celui dans les cellules eucaryotes. Les sous-unités ribosomales impliquées dans la translation du RNA messager (mRNA) dans le système bactérien sont plus petits (30S et 50S) que celles impliquées dans la translation chez les

eucaryotes (40S et 60S). Leur composition chimique ainsi que leurs spécificités fonctionnelles respectives sont suffisamment différentes pour expliquer pourquoi les médicaments antimicrobiens (ex. : tétracyclines, aminoglycosides, etc.) peuvent inhiber la synthèse protéique dans les ribosomes bactériens (70S) sans pour autant avoir un effet majeur sur les ribosomes eucaryotes (80S) des mammifères (ex. : puromycin).

Dans la synthèse protéique microbienne normale, le message (information) du mRNA est simultanément lu par plusieurs ribosomes (polysomes) le long du brin de mRNA. Chez une bactérie, la synthèse polypeptidique commence par l'association d'une sous-unité 30S (et non pas du ribosome 70S entier), d'une molécule de mRNA, d'une molécule de tRNA acylée avec un acide aminé méthionine modifié, la N-formylméthionine (fMet - tRNA), de trois protéines regroupées sous le nom de facteurs d'initiation et d'une guanosine triphosphate (GTP). Ces molécules constituent le **complexe de préinitiation 30S**. Après la formation du complexe 30S de préinitiation, l'autre sous-unité ribosomale 50S se fixe sur ce complexe pour former un **complexe d'initiation 70S**.

3.3.1. Antibiotiques agissant sur la sous-unité ribosomale 30S

3.3.1.1. Aminoglycosides (aminosides)

- Streptomycine et Dihydrostreptomycine (Abiocrine^R)
- Néomycine, paromomycine (Humatin^R) et framycétine (Soframycine^R) : utilisées pour les traitements locaux ou intestinaux.
- Kanamycine, tobramycine (Nebcine^R), dibekacine (Icacine^R), amikacine (Amiklin^R), gentamicine (Gentalline^R), sisomicine (Baymicine^R, Sisolline^R), netilmicine (Netromicine^R), isépacine (Isépalline^R).
- Spectinomycine (Trobicin^R), est un aminocyclitol isolé de *Streptomyces spectabilis*.

Origines :

- *Micromonospora* spp. : gentamicine, sisomicine et netilmicine.
- *Streptomyces* spp. : streptomycine, néomycine, kanamycine, tobramycine et paromomycine.
- *Streptomyces spectabilis* : spectinomycine.
- Amikacine et netilmicine : semi-synthétiques.

Tous les aminoglycosides contiennent un aminocyclitol plus un ou deux sucres aminés; tandis que la spectinomycine n'a qu'un aminocyclitol.

Le mode d'action de la streptomycine a été le plus étudié que celui des autres aminosides, mais tous agissent probablement de la même façon. L'effet primaire de la streptomycine et des autres aminoglycosides est l'interférence avec la fonction de la sous-unité ribosomale 30S et l'habilité du ribosome à former un complexe de préinitiation avec le mRNA, le fMet-tRNA aminoacylé et les autres facteurs d'initiation : inhibition de l'étape d'initiation de la synthèse protéique et par conséquent de la translation (ou traduction) de mRNA.

La fixation de l'aminoglycoside sur une protéine particulière de la particule 30 S empêche la fixation de fMet-tRNA sur le site P de la sous-unité 50S (streptomycine et néomycine) : empêchement de la formation du complexe d'initiation 70 S.

- 1ère étape : attachement de l'aminoglycoside à un récepteur spécifique, une protéine de la sous-unité ribosomale 30S (protéine P 12 dans le cas de la streptomycine).
- 2ème étape : l'aminoglycoside bloque l'activité normale du complexe de préinitiation (mRNA + fMet - tRNA) de la synthèse peptidique.
- 3ème étape : induction d'une mauvaise lecture du message ou des codons de mRNA, produisant ainsi des erreurs de translation : insertion du faux acide aminé dans le peptide résultant en une protéine non fonctionnelle (**protéine non-sens**).
- 4ème étape : l'attachement de l'aminoglycoside résulte en une rupture des polysomes et leur séparation en monosomes incapables de synthétiser les protéines. Ces activités se font presque simultanément, et l'effet global conduit généralement à la mort de la cellule bactérienne : les aminoglycosides sont donc des antibiotiques **bactéricides**.

La sensibilité des bactéries à la streptomycine est déterminée par la présence de la protéine P 12 dans la sous-unité ribosomale 30 S. Des mutants n'ayant pas cette protéine sont résistants à la streptomycine.

Les aminoglycosides sont des antibiotiques à large spectre. Les streptocoques et les *Listeria* sont peu sensibles et les bactéries anaérobies résistantes. La spectinomycine est utilisée uniquement dans le traitement de la blennorragie (gonococcie).

3.3.1.2. Tétracyclines

- Tétracycline et dérivés : oxytétracycline (Terramycine^R), rolitétracycline (Reverin^R, Transcycline^R), chlortétracycline (Auréomycine^R), déméthylchlortétracycline ou déméclocycline (Lédermycine^R, Mexocine^R), métacycline ou méthylénecycline (Rondomycine^R, Lysocline^R, Physiomycline^R), lymécycline (Tétralysal^R).
- Tétracyclines à longue durée d'action : Doxycycline (Vibramycine^R), Minocycline (Mynocine^R)
- Association : Amphocycline^R (tétracycline + amphotéricine B).

Les tétracyclines sont des substances amphotériques qui tendent à former des complexes insolubles avec des cations Mg²⁺, Ca²⁺, etc. D'où leur faible absorption gastro-intestinale après l'ingestion des aliments. Elles sont isolées des espèces de *Streptomyces*.

L'effet primaire des tétracyclines est la liaison presque stoechiométrique avec la sous-unité ribosomale 30S, causant ainsi l'inhibition de la fixation subséquente de l'aminoacyl-tRNA chargé à cette sous-unité. Elles empêchent ainsi l'introduction de nouveaux acides aminés dans la chaîne peptidique naissante et bloquent, par conséquent, la synthèse protéique. Cette inhibition est réversible. Ainsi, les tétracyclines sont des antibiotiques **bactériostatiques**. Une altération dans la moitié protéique de la particule 30S conduit à la résistance de la bactérie aux tétracyclines.

Les tétracyclines sont des antibiotiques à large spectre et sont actives sur de très nombreuses espèces bactériennes à Gram positif ou négatif (*Vibrio*, *Shigella*, *Neisseria*, *Yersinia*). Elles ont une importante concentration intracellulaire, ce qui fait d'elles des produits de choix contre les infections à parasitisme intracellulaire (*Mycoplasma*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Brucella*, *Plasmodium*).

3.3.1.3. Oxazolidinones : Linezolid (Zyvoxid^R, comprimé pelliculé)

Les oxazolidinones constituent un groupe d'antibiotiques synthétiques (Pharmacia & Upjohn, 1970) qui interfèrent avec la formation du complexe de préinitiation impliquant la sous-unité ribosomale 30S, et bloquant ainsi la phase d'initiation de la synthèse protéique bactérienne. Ils présentent une activité contre la plupart de bactéries à Gram positif et les mycobactéries, mais inactifs contre les bactéries à Gram négatif. La linezolide est active contre les staphylocoques, les streptocoques et les entérocoques. Elle est **bactériostatique**, mais est bactéricide vis-à-vis des pneumocoques.

3.3.2. Antibiotiques agissant sur la sous-unité ribosomale 50S

3.3.2.1. Phénicolés

Chloramphénicol et Thiamphénicol (Thiophénicol^R); association : Fluimucil Antibiotic^R ou acétylcystéinate de thiamphénicol.

Originellement élaboré par *Streptomyces venezuelae*, le chloramphénicol est maintenant produit par synthèse chimique, de même que son dérivé, le thiamphénicol.

Le Chloramphénicol se fixe à la sous-unité ribosomale 50S. Il bloque ainsi l'attachement de nouveaux acides aminés à la chaîne peptidique naissante en inhibant la peptidyl transférase, le complexe enzymatique qui permet le processus de la transpeptidation : la formation d'une liaison peptidique entre la N-formylméthionine (provenant du site P) avec l'acide aminé adjacent après l'occupation du site A. Lorsque la liaison est formée, la N-formylméthionine (liée à l'acide aminé) est séparée du fMet - tRNA dans le site P, ce qui résulte en l'élongation de la chaîne peptidique naissante. L'action du chloramphénicol conduit à l'inhibition de la phase d'élongation dans la synthèse protéique par sa liaison réversible avec la particule 50S. Ainsi le chloramphénicol est principalement **bactériostatique**. Sa liaison avec la particule 50S est assez faible par rapport à celle de l'érythromycine ou de la lincomycine. L'association du chloramphénicol et de l'érythromycine est additive et les deux produits ont un effet synergique.

Le chloramphénicol est un antibiotique à large spectre contre les bactéries aérobies et anaérobies. Ses indications préférentielles sont :

- les infections à *Salmonella* comme les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes,
- les méningites à *Neisseria meningitidis*,
- les infections à *Haemophilus influenzae* et aux souches productrices de bêtalactamases (ex. : en cas de résistance ou d'allergie aux pénicillines),
- les infections sévères à *Rickettsiae* et *Chlamydiae* (substitut des tétracyclines),
- les infections oculaires et otiques.

La toxicité du chloramphénicol (dyscrasie du sang, anémie aplasique et dépression de la fonction de la moelle osseuse : aplasie médullaire rare, mais souvent mortelle) est probablement due à sa capacité de pénétrer la cellule eucaryote (particulièrement la mitochondrie) et d'y inhiber la synthèse des protéines. Le Grey syndrome chez le nouveau-né et le petit nourrisson (vomissements, douleurs abdominales, déshydratation, collapsus mortel) est lié à un défaut de conjugaison.

3.3.2.2. Macrolides

- Macrolides à 14 carbones : Erythromycine A (Erythrocin^R, Abbotcin^R, Propiocrin^R, Lozecin^R, dérive de *Streptomyces erythreus*), Roxithromycine (Rulid^R, Claramid^R), Oléandomycine, Trioléandomycine. (T.A.O), Clarithromycine (Naxy^R, Zeclor^R), Spiramycine (Rovamycine^R), Dirithromycine (comprimés enrobés gastrointestinaux).

- Macrolides à 15 carbones : Azithromycine (Zitromax^R, spectre beaucoup plus large que celui d'érythromycine).
- Macrolides à 16 carbones : Josamycine (Josacine^R), Tylosine (Tylan^R), Niddamycine, Maridomycine.
- Kétolides (apparentés aux macrolides) : Télithromycine (Ketek^R, comprimés pelliculés).
- Association : Rodogyl^R : spiramycine + métronidazole.

L'érythromycine et les autres macrolides inhibent la synthèse protéique RNA-dépendante en se liant d'abord, de façon réversible, à la sous-unité ribosomale 50S (site de liaison : rRNA 23S) et ensuite au monosome fonctionnel 70S dès sa formation. Ils bloquent ainsi les réactions de translocation de l'aminoacyl et de l'élongation de la chaîne polypeptidique. Ils interfèrent aussi avec la formation des complexes d'initiation. Leur effet étant réversible, les macrolides sont des antibiotiques **bactériostatiques**.

Les macrolides ont un spectre d'activité relativement large : ils sont actifs sur

- des bactéries à Gram positif : streptocoques du groupe A, pneumocoques, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*;
- des bactéries à Gram négatif : *Legionella*, *Campylobacter*, *Neisseria*, *Bordetella*, *Helicobacter pylori*, etc.;
- des bactéries intracellulaires : *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Treponema*, etc.

3.3.2.3. Lincosamides (ou Lincosamines)

- Lincomycine (Lincocin^R)
- Clindamycine (Dalacin^{RC}), dérivé 7-chloré de lincomycine.

Ce sont des antibiotiques initialement isolés de *Streptomyces lincolnensis*.

Leur mode d'action est semblable à celui des macrolides. La lincomycine se lie à la sous-unité ribosomale 50S. Son site de liaison couvre celui de l'érythromycine mais n'est pas identique. La lincomycine ne se lie pas très fort au ribosome comme l'érythromycine, mais une fois liée, elle est un inhibiteur plus potentiel de la synthèse protéique que l'érythromycine (antagonisme: érythromycine peut déplacer lincomycine du site de liaison sur le ribosome).

Le spectre d'activité des lincosamides est large et inclut

- les coques à Gram positif, aérobies : *Staphylococcus*, *Streptococcus* (ex. : staphylocoques méthicillino-résistants, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*,...)
- les bactéries anaérobies strictes : *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*.

Les *Enterobacteriaceae*, *Neisseria* et *Enterococcus* sont résistants. La clindamycine a été utilisée pour traiter l'actinomycose, la malaria, la toxoplasmose (encéphalique).

3.3.2.4. Streptogramines ou Synergistines

Ce sont des polypeptides cycliques naturels de *Streptomyces spp.* Ces produits résultent de l'association de deux molécules antibiotiques (groupe A et groupe B) agissant en synergie (synergistines). Les streptogramines sont essentiellement des antistaphylococciques. Elles se fixent sur la sous-unité 50S après une entrée par diffusion passive : le groupe A se fixe le premier et ceci induit un changement dans la conformation du ribosome qui augmente son affinité pour le groupe B. Spectre très étroit : antistaphylococciques.

- Pristinamycine (Pyostacine^R)
- Virginiamycine (Staphylomycine^R).

- Quinupristin-dalfopristin (pristinamycin I_A + pristinamycin II_A : 30 :70)
(Pristinamycine II_A et II_B : Groupe A; pristinamycin I_A et I_C : Groupe B).

3.3.3. Antibiotiques agissant sur d'autres facteurs de la synthèse protéique

3.3.3.1. Acide fusidique (Fucidin[®])

Il est le seul antibiotique stéroïdien (à structure stérolique) et dérive du champignon *Fusidium coccineum*. L'acide fusidique interfère avec le facteur G impliqué dans le processus de translocation des acides aminés sur le complexe ribosomal bactérien, inhibant ainsi la synthèse protéique (inhibition de la phase d'élongation de la chaîne peptidique). L'antibiotique est actif sur les bactéries à Gram positif, surtout les staphylocoques (les streptocoques sont peu sensibles), et sur les cocci à Gram négatif (*Neisseria*).

3.3.3.2. Mupirocin

C'est un agent antibactérien topique (crème à 2 %) dérivant des produits de fermentation de *Pseudomonas fluorescens* (ancien nom : acide pseudomonique A). La mupirocine inhibe l'isoleucyl-tRNA synthétase résultant ainsi à la cessation des synthèses de tRNA et, par conséquent, des protéines. Elle est utilisée dans le traitement des infections superficielles des tissus mous causées par des staphylocoques (*Staphylococcus aureus* méthicillino-résistants) et des streptocoques.

3.4. Antibiotiques affectant la fonction des membranes cellulaires : membrane cytoplasmique et membrane externe

Les différences dans la structure des membranes des bactéries et des champignons avec celles des cellules animales rendent possible une activité chimiothérapeutique sélective. La toxicité des agents agissant sur les enveloppes membranaires se manifeste du fait qu'ils affectent non seulement la membrane cytoplasmique microbienne, mais aussi les cellulaires des érythrocytes et des autres cellules humaines. Ceci à cause de la similitude dans leur structure fondamentale (ou de base). Certains agents sont ainsi utilisés dans des cas d'application topique ou d'infusion en compartiments fermés.

3.4.1. Polymyxines

- Polymyxine B

- Polymyxine E ou Colistine ou Colistiméthate (Colimycine[®])

Ce sont des polypeptides cycliques dérivant de *Bacillus polymyxa*. Les polymyxines agissent comme des détergents ou surfactants cationiques de façon sélective sur les membranes riches en phospholipides (phosphatidyléthanolamine) des bactéries à Gram négatif. Elles affectent ainsi les fonctions de transport actif et de barrière en augmentant la perméabilité membranaire et en perturbant l'intégrité osmotique. Ceci résulte en la perte des constituants (du contenu) intracellulaires bactériens et à la mort de la cellule. L'action primaire s'exerce sur la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif, suivie de celle sur la membrane cytoplasmique, d'où l'antagonisme avec le calcium. L'action bactéricide des polymyxines est réduite en présence des ions Ca⁺⁺ qui interfèrent avec leur attachement à la membrane cellulaire extérieure.

Les polymyxines ont un spectre d'activité étroitement limité aux infections aux bacilles à Gram négatif, y compris celles à *Pseudomonas* (ex., action synergique en

association avec cotrimoxazole sur les infections sérieuses dues aux bacilles multirésistants comme *Serratia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*). La polymyxine B est souvent utilisée en association avec la néomycine ou la bacitracine en application topique pour le traitement des infections de la peau, des membranes muqueuses, des yeux ou des oreilles.

3.4.2. Gramicidines et Tyrocidines

Ce sont des oligopeptides cycliques naturels constitués par des molécules hautement chargées. Elles agissent comme des détergents cationiques qui lèsent la membrane cytoplasmique de la cellule bactérienne, par réaction avec les phospholipides : la perméabilité membranaire est ainsi sérieusement affectée. Elles sont actives sur les bactéries à Gram positif.

Leur toxicité limite leur utilisation à un usage local (ex. : infections buccales). On les utilise aussi dans la recherche comme ionophores pour leur propriété de transport sélectif des ions à travers la membrane (ex. : valinomycine pour le transport des K^+).

3.5. Antibiotiques affectant des systèmes enzymatiques microbiens.

Ces antibiotiques bloquent des étapes métaboliques spécifiques qui sont essentielles pour les micro-organismes. Plusieurs d'entre eux sont très toxiques pour l'homme pour qu'ils puissent être utilisés comme agents antimicrobiens en clinique.

3.5.1. Antimétabolites inhibiteurs de la synthèse des folates

Les folates (acide folique, acide tétrahydrofolique) jouent un rôle essentiel dans de nombreuses réactions du métabolisme des purines et des pyrimidines et des acides aminés. Ils sont donc impliqués (indirectement) dans la synthèse des acides nucléiques (synthèse de DNA) et des protéines et, par conséquent, dans la croissance (humaine et bactérienne). Les mammifères (cellules animales) sont incapables de synthétiser de novo les folates. Ils assimilent l'acide folique exogène fourni par l'alimentation grâce à une dihydrofolate réductase (DHFR) capable de réduire l'acide folique en acide dihydrofolique et en acide tétrahydrofolique.

Par contre, beaucoup de bactéries, à l'exception d'*Enterococcus faecalis*, n'assimilent pas l'acide folique exogène; elles synthétisent seules l'acide tétrahydrofolique. Cette synthèse comporte deux étapes essentielles :

1°) la synthèse de l'acide dihydrofolique à partir de la condensation de 2-amino-4-hydroxyl-6-hydroxyméthyl-ptéridine avec l'acide para-aminobenzoïque (PABA) pour donner l'acide dihydroptéroïque; celui-ci sera converti en acide dihydrofolique par incorporation de l'acide glutamique. La première réaction de condensation est catalysée par la **dihydroptéroate-synthétase (DHPS)**;

2°) la réduction de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique par la **dihydrofolate-réductase (DHFR)**.

3.5.1.1. Sulfonamides : Sulfamides

En fonction de leur durée d'action :

- sulfamides à durée d'action courte ou intermédiaire (demi-vie de 2-12 heures) : sulfaméthizole, sulfisoxazole, sulfaméthoxazole, sulfadiazine ;
- sulfamides à durée d'action longue (demi-vie de 150-200 heures) : sulfadoxine.

En fonction de leur utilisation :

- sulfamides pour infections générales : sulfadiazine (Adiazine^R), sulfafurazol (Gantrisine^R), sulfisoxazole. Ce sont des sulfamides dits solubles qui diffusent bien dans les différents organes et tissus (ex., le LCR) et qui sont rapidement absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle,
- sulfamides « urinaires » sont aussi des sulfamides solubles : sulfaméthoxazole (Gantanol^R), sulfaméthizol (Rufol^R),...
- sulfamides « intestinaux » : sulfaguanidine (Ganidan^R), succinyl-sulfathiazol, phtalyl-sulfathiazol (Talidine^R). Ce sont des sulfamides dits insolubles qui sont très peu absorbés au niveau du tractus digestif.

Les sulfonamides sont des dérivés de sulfanilamide qui est un analogue de structure de PABA. Ils agissent ainsi par inhibition compétitive de la modification (l'utilisation) bactérienne de PABA en dihydrofolate en inhibant la dihydroptéroate synthétase (DHPS). Les sulfamides sont bactériostatiques et actifs sur certaines bactéries à Gram positif et à Gram négatif, *Chlamydia*, *Nocardia* et sur les protozoaires (*Pneumocystis carinii*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*). La résistance de nombreuses souches bactériennes aux sulfamides fait que ces médicaments sont moins prescrits aujourd'hui, à l'exception de leurs associations avec quelques diaminopyrimidines.

3.5.1.2. Diaminopyrimidines

- Triméthoprim (Wellcoprim^R)
- Pyriméthamine (Daraprim^R)

Ces produits agissent par inhibition de la dihydrofolate réductase (DHFR) bactérienne, l'enzyme qui réduit le dihydrofolate en tétrahydrofolate. C'est une étape dans la séquence conduisant à la synthèse des purines et à celle de DNA. Le triméthoprim a plus d'affinité pour l'enzyme bactérienne qu'il inhibe 500.000 fois plus efficacement que l'enzyme des mammifères. La pyriméthamine, par contre, est plus active sur l'enzyme des mammifères et est, de ce fait, plus toxique pour l'homme que le triméthoprim. Elle est surtout utilisée dans le traitement des infections causées par des protozoaires.

Les diaminopyrimidines sont bactériostatiques, parfois bactéricides. Leur spectre d'action est large et inclut plusieurs coques à Gram positif et bacilles à Gram négatif.

3.5.1.3. Associations Sulfamides-Diaminopyrimidines

Sulfamide et triméthoprim peuvent chacun être utilisé seul pour inhiber la croissance bactérienne. L'utilisation simultanée de sulfonamides et de diaminopyrimidines résulte en une inhibition séquentielle des étapes métaboliques et, par conséquent, en une augmentation de l'activité antibactérienne (synergie).

- Sulfaméthoxazole + triméthoprim (5:1) ou cotrimoxazole (Bactrim^R, Eusaprim^R, Sulfamide, Maxtrim^R)
- Sulfadiazine + triméthoprim (5:1) (Antrima^R)
- Sulfisoxazole + triméthoprim (5:1)

Ces associations sont utilisées généralement contre les infections des voies urinaires, les otites, les sinusites, les bronchites et la pneumonie; elles sont actives contre les *Shigella*, *Salmonella*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* et *Pneumocystis carinii*.

- Sulfadiazine + pyriméthamine est utilisée avec succès dans le traitement de la toxoplasmose.
- Sulfadoxine + pyriméthamine (Fansidar^R, Falcidox^R), est utilisée dans la prophylaxie et la thérapie de la malaria à *Plasmodium falciparum*.

3.5.1.3. Sulfones : Dapsone / Acedapsone

Le dapsone (diaminodiphénylsulfone) est un antibiotique synthétique utilisé dans le traitement de la lèpre. Les sulfones sont, comme les sulfamides, des analogues de structure de PABA et aussi des inhibiteurs compétitifs de la dihydroptéroate synthétase dans la synthèse bactérienne des folates. Ils sont bactériostatiques. Acédapsone est une prodrogue qui se convertit in vivo en dapsone actif. Il a une longue durée d'action (demi-vie \pm 100 jours) : administration de 300 mg/2-3 mois.

3.5.2. Agents antituberculeux

3.5.2.1. Acide para-aminosalicylique (PAS)

Le PAS est un agent synthétique bactériostatique, de structure analogue à celle de PABA et ayant un mode d'action similaire à celui des sulfamides. PAS n'est pas un agent antimicrobien en général, car la plupart de bactéries sont résistantes à ce produit. Mais il est un inhibiteur spécifique du *Mycobacterium tuberculosis*, alors que les autres mycobactéries atypiques lui sont résistantes. Les raisons de sa sélectivité (action sélective) sur différents micro-organismes sont inconnues. A cause de l'émergence des mutants résistants, le PAS est généralement utilisé en association avec d'autres antituberculeux dans la multithérapie des infections à *M. tuberculosis*.

3.5.2.2. Isoniazide ou Hydrazide de l'acide isonicotinique ou I.N.H. (Rimifon^R).

L'I.N.H. est un agent antimicrobien synthétique introduit en 1952 pour la chimiothérapie de la tuberculose, en combinaison avec la streptomycine et le PAS ou la rifampicine, l'éthambutol et la pyrazinamide, ceci en vue de réduire l'émergence des souches résistantes de *M. tuberculosis*.

L'I.N.H. inhibe la synthèse des acides mycoliques de la paroi des mycobactéries en bloquant la mycolase synthétase, ainsi que l'oxydation du NADH en NAD. Son analogie de structure avec la nicotinamide (NAD) et la pyridoxamine fait que l'INH puisse être incorporé enzymatiquement à la place de ces composés, conduisant ainsi à une certaine toxicité clinique (antagonisée par de fortes doses de pyridoxine). [NAD participe à plusieurs réactions enzymatiques comme le transfert d'électrons. Pyridoxine est cofacteur de plusieurs enzymes]. La mycolase synthétase est une enzyme unique nécessaire à la synthèse des acides mycoliques. L'INH est bactéricide sur les bacilles de *M. tuberculosis* à multiplication active (caverne tuberculeuse) et bactériostatique sur ceux des autres phases. Il est aussi actif sur les bacilles phagocytés par les macrophages.

3.5.2.3. Pyrazinamide et Ethambutol

- Pyrazinamide est un dérivé synthétique de la nicotinamide utilisé dans chimiothérapie de courte durée de la tuberculose à *M. tuberculosis*. Son mécanisme d'action précis est inconnu, mais il semble proche de celui de l'INH. Il est bactéricide, mais inactif sur les bacilles phagocytés.

- Ethambutol (Myambutol^R, Dexambutol^R) est un composé synthétique qui inhibe la fixation, au niveau de la paroi, des acides mycoliques nouvellement synthétisés, et aussi la synthèse de la spermidine chez les mycobactéries. Il est bactériostatique sur les bacilles de *M. tuberculosis* à multiplication active et sur les bacilles phagocytés.

3.5.2.4. Ethionamide

L'éthionamide est un agent synthétique dérivé de l'acide isonicotinique qui inhibe aussi la synthèse des acides mycoliques dans l'assemblage de la paroi cellulaire des mycobactéries. Il est métabolisé dans le foie en sulfoxydes qui sont actifs sur *M. tuberculosis*. Il est bactériostatique sur *M. tuberculosis*. L'éthionamide montre une activité bactéricide comme celle de la rifampin sur *M. leprae*.

3.5.2.5. Riminophénazines : Clofazimine ou Lamprène (B663)

Le mécanisme biochimique d'action des riminophénazines n'a pas encore été bien défini. Il a été suggéré que la génération du peroxyde d'hydrogène intracellulaire contribuerait à leur activité antimycobactérienne. Clofazimine inhibe les microorganismes en se liant aux bases guanine du DNA. D'autres études ont montré que l'activité pro-oxydative des riminophénazines : elles stimulent l'activité de la phospholipase A2 conduisant à une accumulation intracellulaire des lysophospholipides (lysophosphatidylcholine et acide arachidonique) dans les phagocytes (neutrophiles et macrophages), ce qui, par conséquent, cause la libération des anions superoxydes et l'inhibition des bactéries à Gram positif et des mycobactéries. Clofazimine et plusieurs analogues s'accumulent préférentiellement dans les cellules du système phagocytaire mononucléé (macrophages, neutrophiles). A cause de son accumulation intracellulaire dans les macrophages, clofazimine est utilisée dans le traitement de la tuberculose et de la lèpre. Clofazimine a montré une efficacité clinique dans le traitement de la tuberculose, en particulier de celle causée par des souches multirésistantes de *Mycobacterium tuberculosis*. Ce produit n'induit presque pas de résistance et inhibe l'émergence de la résistance à l'isoniazide chez *M. tuberculosis*. Clofazimine a aussi montré une excellente activité chimiothérapeutique dans le traitement des infections causées par les souches *Mycobacterium avium* complex en combinaison synergique dans les macrophages aussi bien avec clarithromycine qu'avec roxithromycine.

Ayant contribué de façon significative au contrôle de la lèpre, particulièrement à celle causée par des souches de *M. leprae* résistantes au dapsons, Clofazimine a été recommandée par l'OMS pour le traitement de la lèpre en polychimiothérapie avec un régime comprenant le dapsons, la rifampicine et la clofazimine.

3.6. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire.

Les cellules des mammifères ne possèdent pas de paroi cellulaire, un agent qui affecte la synthèse normale de cette structure bactérienne ou fongique n'aura pas à inhiber ou à affecter un processus biochimique similaire chez l'hôte humain.

Les antibiotiques qui inhibent la formation de la paroi cellulaire ne sont actifs que sur les populations croissantes (en phase de croissance) des bactéries, les cellules mûres n'étant pas inhibées. Les antibiotiques de ce groupe sont de ce fait efficaces dans la prévention d'une prolifération rapide ou incontrôlée des bactéries pathogènes.

3.6.1. Bêtalactamines : Pénicillines, Céphalosporines, Carbapénems et Monobactams

3.6.1.1. Modes d'action

- Les bêtalactamines sont des inhibiteurs sélectifs de la synthèse de la paroi cellulaire: elles bloquent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, la transpeptidation, en inhibant l'activité des plusieurs enzymes impliquées dans les réactions de transpeptidation (transpeptidases, carboxypeptidases), notamment les

PBP, « **penicillin-binding proteins** » (**PLP : protéines liant la pénicilline**). La liaison du médicament avec ces récepteurs, PBP, constitue ainsi la première étape conduisant à une élongation anormale de la cellule (formation des bactéries ovoïdes ou filamenteuses : des sphéroplastiques) ou à des défauts à la surface (périphérie) de la paroi cellulaire (formation des protoplastes) pouvant résulter à la lyse cellulaire (activité bactéricide). Ceci est dû suite à l'arrêt de la réaction de transpeptidation et au blocage de la synthèse du peptidoglycane. L'inhibition des PBP entraîne une dégradation plus ou moins importante du peptidoglycane (arrêt du processus de renouvellement de la paroi cellulaire par turn-over du peptidoglycane). Les bêta-lactamases sont hydrophiles et diffusent ainsi librement à travers le peptidoglycane par l'intermédiaire des porines.

- L'inhibition des enzymes de transpeptidation (des transpeptidases) est due à l'analogie de structure tridimensionnelle des bêta-lactamines (noyau β -lactame) avec la D-alanine ou le dipeptide acyl-D-alanyl-D-alanine se trouvant dans le monomère UDP-muramyl-pentapeptide (UDP : uridine diphosphate) dont la polymérisation extracellulaire conduit à la formation du peptidoglycane de la paroi cellulaire. La réaction de transpeptidation implique la perte d'une D-alanine du pentapeptide.

- L'étape suivante de l'action des bêta-lactamines et qui est le plus en relation avec leur effet bactéricide consiste en leur capacité des déclencher l'activité des enzymes autolytiques (action des **autolysines**) associées aux membranes en inactivant leur inhibiteur. L'activation de ces enzymes qui détruisent la paroi cellulaire conduit à la lyse cellulaire dans un environnement isotonique, ou à la formation des protoplastes ou des sphéroplastiques vivants dans un milieu hypertonique.

- D'autres modes d'action mineurs des bêta-lactamines consistent en l'inhibition de l'endopeptidase et de la glycosidase bactériennes impliquées dans la croissance cellulaire, et, enfin, probablement en l'inhibition de la synthèse de RNA dans certaines bactéries, causant la mort sans lyse cellulaire.

- Les bêta-lactamines, surtout naturelles, sont habituellement plus actives sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. On a ainsi produit des bêta-lactamines semi-synthétiques dans le but :

- (1) d'augmenter la résistance à l'inactivation par les bêta-lactamases des bactéries (pénicillinases, céphalosporinases),
- (2) d'élargir le spectre d'activité sur les bactéries gram-négatives et
- (3) d'augmenter le pouvoir d'action en améliorant la diffusion dans les tissus après une administration orale.

3.6.1.2. Pénicillines

Les pénicillines comprennent un groupe des antibiotiques naturels et semi-synthétiques contenant le noyau chimique d'acide 6-aminopénicillamique : cycle bêta-lactame fusionné à un cycle thiazolidine. Les composés naturels sont produits par *Penicillium spp.*

3.6.1.2.1. Pénicillines naturelles

a) Pénicilline G ou benzylpénicilline (I.M., I.V.)

Ses formes retard utilisées en I.M. (Dépôt-pénicillines) :

- Procaïne-pénicilline
- Benzathine-pénicilline (Extencilline^R, Retarpen^R)

- Bénéthamine-pénicilline (Biclinocilline^R)
- Clemizol-pénicilline

b) Pénicillines orales

- Pénicilline V ou phénoxyéthyl pénicilline (Ospen^R, Oracilline^R, Isocilline^R, Starpen^R, Megacilline orale^R...);
- Propicilline (Oricillin^R, Baycillin^R).

Ces pénicillines sont sensibles aux bêta-lactamases. La résorption des pénicillines orales dépend de la prise des aliments et ne sont pas indiquées dans le traitement de la gonorrhée. Les pénicillines naturelles ont pour spectre d'activité les bactéries à Gram positif et les cocci à Gram négatif, à l'exception des souches productrices de pénicillinases. Elles sont aussi actives contre *Treponema pallidum* et plusieurs bactéries anaérobies, excepté *Bacteroides fragilis*.

3.6.1.2.2. Pénicillines semi-synthétiques

a) Pénicillines résistantes aux pénicillinases :

Ces sont des pénicillines dites M, et qui sont des anti-staphylococciques :

- | | |
|---|---|
| - Méthicilline (inactive par voie orale) | |
| - Nafcilline | |
| - Oxacilline (Bristopen ^R , Stapenor ^R , Cryptocilline ^R) | Isoxazolyl
pénicillines
actives par voie orale. |
| - Cloxacilline (Cloxyphen ^R) | |
| - Dicloxacilline (Dichlor-Stapenor ^R , Diclocil ^R) | |
| - Flucloxacilline (Staphylex ^R , Floxapen ^R) | |

b) Pénicillines à large spectre :

Ce sont des pénicillines dites A, ayant un spectre élargi aux bacilles à Gram négatif, mais étant sensibles à l'action de diverses bêta-lactamases.

b.1) Aminopénicillines (per os, I. M., I.V.)

- Ampicilline (Pen-Bristol^R, Totapen^R, Pénicline^R, Binotal^R)
- Amoxicilline (Clamoxyl^R, Amoxypen^R, Hiconcil^R, Bristamox^R, Bactox^R, Gramidil^R, Agram^R, Zamoxy^R)
- Prodrogues de l'ampicilline : Bacampicilline (Bacampicine^R), Hétacilline (Versapen^R), Metampicilline (Magnipen^R, Survipen^R), Pivampicilline (Proampi^R, Pondocil^R).

Elles sont inactives sur *Pseudomonas aeruginosa*.

b.2.) Carboxypénicillines

Elles sont actives contre *Pseudomonas aeruginosa* :

- Carbénicilline (Pyopen^R)
- Ticarcilline (Aerugipen^R)
- Temocilline (Temopen^R)

b.3) Urédopénicillines (acylaminopénicillines)

- | | |
|---|--|
| - Mezlocilline (Baypen ^R) | |
| - Azlocilline (Securophen ^R) | } actives contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . |
| - Piperacilline (Pipril ^R , Pipérilline ^R) | |
| - Apalcilline (Lumota ^R) | |

b.4) Amidinopénicillines (per os)

Elles ne sont actives que sur les bacilles à Gram négatif, surtout les entérobactéries responsables des infections urinaires.

- Amidinocilline ou mécillinam
- Pivmécillinam (Selexid^R), prodrogue de mécillinam.

3.6.1.2.3. Inhibiteurs des bêtalactamases

Ce groupe comprend des produits ayant une activité antibactérienne très faible, mais doués d'une forte affinité pour les bêtalactamases dont ils inhibent l'activité. Ils sont ainsi utilisés en association synergique avec certaines pénicillines.

- Acide clavulanique + Amoxicilline (Augmentin^R)
+ Ticarcilline (Timentin^R, Claventin^R)
- Sulbactam + Ampicilline (Unasyn^R)
+ Céfopérazone (Cebane^R)
- Tazobactam + Piperacilline (Zosyn^R).

Compléter

3.6.1.3. Céphalosporines

Les céphalosporines (ou céphems) sont des dérivés semi-synthétiques de la **céphalosporine C** et d'autres produits de fermentation des champignons **Cephalosporium spp.** Elles contiennent un noyau acide 7-aminocéphalosporanique: un cycle β -lactame fusionné à un cycle dihydrothiazine. L'addition d'un groupement methoxy à la position 7 du noyau β -lactame résulte à l'obtention d'un nouveau groupe de composés 7- α -methoxy-céphalosporines, appelés **céphamycines**, hautement résistants aux β -lactamases.

Les céphalosporines sont plus résistantes aux β -lactamases que les pénicillines et ont toutes un spectre d'activité large. Elles sont ainsi les plus utilisées dans les cas où la sensibilité du germe aux antibiotiques n'est pas connue; mais elles sont plus chères.

3.6.1.3.1. Céphalosporines I ou de 1ère Génération

Elles sont actives sur les bactéries à Gram positif, mais ont une moindre activité sur les bactéries à Gram négatif.

- Céphalotin / Cefalotine (Cepovenin^R, Cephologlycine^R)
- Cefazoline (Gamaxin^R, Elzogram^R, Cefacidal^R)
- Cephalexine (Orale : Oracef^R, Ceporexine^R, Cefamor^R, Keforal^R, Cefacet^R)
- Cefadroxil (orale : Bidocef^R, Oracefal^R)
- Cephazedon (Refosporin^R)
- Cephaloridine (Céporine^R)
- Céfapirine (Cefaloject^R)
- Céfatrizine (orale : Cefaperos^R)
- Céfacétrile (Celospor^R)
- Cefradine (Zeefra500^R, Dexef^R, Kelsef^R)

3.6.1.3.2. Céphalosporines II ou de 2ème Génération

Elles sont stables vis-à-vis de certaines céphalosporinases des bactéries à Gram négatif, résultant à une augmentation de l'activité sur ces germes et à l'élargissement du spectre d'action.

- Céfacloz (orale : Panoral^R, Alfatil^R)
- Céfamandole (Mandokel^R, Kefandol^R)
- Céfuroxime (per os, I.M/I.V. : Zinnat^R, Zinacef^R)
- Céfotiam (Spizef^R, Pansporine^R)

- Céfonid
- Céforanide
- Cefprozil
- Loracarbef
- Cefmetazole
- Céfoxitine (= céphamycine : Mefoxitine^R, Mefoxin^R) : très active contre les bactéries anaérobies
- Céfotetan (= céphamycine : Apacef^R) : prophylaxie et thérapie des infections abdominales mixtes (entérobactéries et anaérobies).

3.6.1.3.3. Céphalosporines III ou de 3^è Génération

Elles sont moins actives sur les cocci à Gram positif que les céphalosporines de 1^{ère} génération. Mais elles ont une grande résistance aux céphalosporinases et une meilleure activité contre les bactéries à Gram négatif comme les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*.

- Ceftriaxone (Rocéphine^R)
- Céftaxime (Claforan^R, Oritaxim^R)
- Céfménoxime (Tacef^R, Cemix^R) } ressemblent à
- Céftizoxime (Ceftix^R, Cefizox^R) } la céftaxime
- Cefixime (Oroken^R)
- Moxalactam ou Latamoxef : infections abdominales mixtes
- Cefetamet (Globocef^R) : bactéries à Gram positif et négatif aérobies et à Gram positif anaérobies, *Bacteroides spp.* autres que *Bacteroides fragilis*)
- Cefdinir
- Cefpodoxime
- Ceftibuten
- Céftazidime (Fortum^R) : peut être combinée à
 - * la clindamycine (infections anaérobies)
 - * la flucloxacilline ou la vancomycine (staphylocoques)
 - * la tobramycine (infections graves à *Pseudomonas aeruginosa*)
- Céfopérazone (Céfobis^R) : à indications limitées, mais elle a une meilleure activité (plus efficace) contre *P. aeruginosa* et les anaérobies
- Cefsulodine (Pseudocef^R, Pyocéfal^R) : spectre d'action réduit aux infections à *Pseudomonas* (uniquement antipycocyanique).

3.6.1.3.4. Céphalosporines IV ou de 4^è Génération

Elles ont un spectre élargi, mais elles sont non actives contre les entérocoques et les anaérobies.

- Céfépime
- Cefpirome.

3.6.1.4. Carbapénems

L'imipénème (N-formimidoyl thienamycine) est le premier (le seul) carbapénem antimicrobien actuellement utilisé. C'est un dérivé semi-synthétique de thienamycine produite par *Streptomyces spp.* L'imipénème agit en se fixant sur les PBP1 et PBP2 des bactéries gram-positives et gram-négatives, causant ainsi une elongation cellulaire et la lyse. Il est stable vis-à-vis de diverses bêta-lactamases et possède le plus large spectre d'activité. Il est utilisé par voie parentérale (I.V.).

Autres carbapénems : Méropénème, Panipénème, Biapénème.

3.6.1.5. Monobactams

Les monobactams ont un noyau limité au cycle β -lactame. L'aztréonam (Azactam^R) est le seul antibiotique monobactam entièrement synthétique actuellement utilisé par voie intraveineuse. Il se lie à la PBP3 des bactéries gram-négatives aérobies, y compris *P. aeruginosa*, bloquant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire. Il est stable vis-à-vis de diverses β -lactamases. Son spectre d'activité est limité aux bacilles à Gram négatif aérobies.

3.6.2. D-Cyclosérine

La D-cyclosérine est un dérivé des produits de fermentation de *Streptomyces orchidaceus* et *S. garyphalus*. Par sa très grande analogie de structure avec la D-alanine, la D-cyclosérine interfère dans la formation de la chaîne pentapeptidique de la paroi cellulaire par inhibition compétitive des deux peptidases :

- la L-alanine racémase qui catalyse la conversion de la L-alanine en D-alanine et
- la D-alanyl-D-alanine synthétase impliquée dans la synthèse du dipeptide D-alanyl-D-alanine dans le cytosol et dans l'attachement de ces molécules de D-alanine au pentapeptide du peptidoglycane de la paroi cellulaire : inhibition de la biosynthèse de la chaîne UDP-NAc-muramyl pentapeptide (UDP : uridine diphosphate) par blocage de l'élongation de chaîne pentapeptidique du peptidoglycane. Le produit, bien qu'ayant un spectre d'activité large, est utilisé comme antituberculeux. Il est actif sur *Mycobacterium tuberculosis* et sur les mycobactéries atypiques (*M. kansasii* et *M. avium-intracellulare*).

3.6.3. Bacitracine

La bacitracine est un antibiotique peptidique (polypeptide naturel) isolé de *Bacillus licheniformis* et constitué d'une mixture des peptides (acides aminés attachés à un peptide). Elle bloque au niveau de la membrane cytoplasmique la formation du lipide transporteur, «undecaprenol phosphate carrier» ou bactoprenol phosphate, **BP-P**, en se combinant à son précurseur diphosphate, « lipid pyrophosphate, **BP-P-P** », dont elle inhibe la déphosphorylation, étape essentielle pour la synthèse de la paroi cellulaire. La bacitracine désorganise (perturbe) aussi la membrane cytoplasmique des bactéries.

La bacitracine est active principalement contre les bactéries à Gram positif, particulièrement les staphylocoques et les streptocoques β -hémolytiques du groupe A, et les *Neisseria spp.*. Sa toxicité interdit son utilisation par voie systémique. Elle est actuellement réservée à l'usage topique.

3.6.4. Vancomycine / Ristocétine / Teicoplanine

La vancomycine, la ristocétine et la teicoplanine sont des antibiotiques glycopeptidiques bactéricides. La vancomycine (Vancocin^R) est un glycopeptide naturel obtenu de *Streptomyces orientales*. La teicoplanine (teichomycin A) est un nouveau glycopeptide complexe chimiquement apparenté à la vancomycine.

Ces glycopeptides inhibent l'une des premières étapes de la synthèse du peptidoglycane dans la paroi cellulaire en complexant la portion D-alanyl-D-alanine du précurseur du peptidoglycane, N-acétyl-muramyl pentapeptide-N-acétyl-glucosamine, BP-P-P-MurNac-pentapeptide-GlcNac ou BP-P-P-(G-M)_n, substrat impliqué dans la biosynthèse de la chaîne B-P-P-(G-M)_{n+1} qui devra être reliée au peptidoglycane préexistant. Ces antibiotiques causent ainsi le blocage de l'élongation de la chaîne du peptidoglycane néoformé ainsi que sa liaison au peptidoglycane préexistant de la paroi cellulaire (BP-P-P-MurNac-pentapeptide-GlcNac-**peptidoglycane préexistant**).

Ces antibiotiques sont actifs principalement contre les bactéries à Gram positif aérobies et anaérobies, incluant les staphylocoques méthicillino-résistants, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Clostridium* et *Actinomyces*. La vancomycine est utilisée strictement par voie intraveineuse en clinique. Toxicité : irritation rénale et du 8e nerf crânien (risque de surdité).

3.6.5. Fosfomycine

La fosfomycine (Fosfocine^R) est un antibiotique à large spectre dérivé de l'acide phosphonique isolé de *Streptomyces spp.* Elle agit sur bactéries à Gram positif et négatif en inhibant la première étape de la synthèse du peptidoglycane : inhibition de la pyruvyltransférase, une enzyme du cytoplasme bactérien qui catalyse la formation du complexe N-acétylmuramate-uridine diphosphate (UDP-MurNAc) à partir de UDP-GlcNAc à cause de son analogie de structure avec le phosphoénol pyruvate.

Elle est bactéricide et est surtout employée dans les infections à staphylocoques méthicillino-résistants (surtout des voies urinaires) en administration parentérale (I.M./I.V.). Elle doit être utilisée en association avec un autre antibiotique afin d'éviter la sélection de mutants résistants.

5. CHIMIOThERAPIE ANTIFONGIQUE

Les antibiotiques antifongiques sont des agents antimicrobiens d'origine naturelle (biologique) ou synthétique (synthèse chimique) qui sont utilisés pour traiter les mycoses (affections dues aux champignons levuriformes ou mycéliens).

Selon leurs modes d'utilisation, on distingue :

- des agents topiques : utilisés en application directe sur le site d'infection pour traiter les mycoses superficielles et cutanées (ex. : Pityriasis versicolor, dermatophytoses dues aux *Trichophyton*, *Epidermophyton* et *Microsporum*) ;
- des agents systémiques : utilisés par voie orale ou parentérale pour traiter les mycoses sous-cutanées (sporotrichose, chromoblastomycose) et systémiques (histoplasmoses, cryptococcose, coccidioidomycose) et parfois des cas compliqués de mycoses cutanées.

5.1. AGENTS ANTIFONGIQUES TOPIQUES

Les agents antifongiques topiques sont utilisés pour traiter les mycoses superficielles et cutanées par application directe sur le site d'infection (contact avec le champignon infectant).

5.1.1. Agents à action indirecte

Ils exercent leur action antifongique en altérant le microenvironnement immédiat de l'hôte, compromettant ainsi la croissance des champignons.

5.1.1.1. Agents kératinolytiques : ils détruisent la kératine et enlèvent ainsi le substrat nutritionnel pour certains champignons : acide salicylique, hyposulfite et thiosulfate utilisés contre les dermatophytes.

5.1.1.2. Agents anhydrotiques (sels d'Al et de Zn) et **astringents** (borates et bicarbonates) : ils retardent la croissance des dermatophytes en séchant et en diminuant l'inflammation : borate de phénylmercure, sulfure de sélénium (Selsun^R).

5.1.2. Agents à action directe

Ils exercent une action directe sur le champignon infectant et sont soit fongistatiques, soit fongicides. Ils sont utilisés surtout en thérapie antifongique topique (application locale externe).

5.1.2.1. Acides organiques : ils sont fongistatiques et moins efficaces : acides benzoïque, propionique, caprylique et undécylénique.

5.1.2.2. Thiocarbamates : ils sont fongicides contre les dermatophytes, mais inefficaces contre *Candida spp.* : tolnaftate.

5.1.2.3. Polyènes : nystatine et natamycine : ils sont fongicides contre les agents des mycoses superficielles, mais ne pénètrent pas bien dans les sites d'infection et irritent les tissus.

Nystatine (Mycostatine^R) : est le principal polyène utilisé en application topique, surtout contre les candidoses et autres levures : suspension de 100.00 U/ml, comprimés ou ovules vaginaux de 500.000 U et crèmes de 100.000 U/g.

5.1.2.4. Imidazoles : ils inhibent la synthèse des stérols (ergostérol) dans les membranes cellulaires des champignons ; ils augmentent ainsi la perméabilité membranaire. Ils ont un avantage sur les polyènes par leur spectre large et leur efficacité sur les dermatophytes et les levures : diamizol (Asterol^R), nitrate de miconazole (Daktarin^R ou Gyno-Daktarin^R : crèmes de 1 %, poudre de 2 %, ovules vaginaux), clotrimazole (Canesten^R : crème de 1-2 %, comprimés vaginaux), éconazole (Pévaryl^R ou Gyno-Pevaryl^R : crème de 1 %, pessaires ou ovules vaginaux).

5.1.2.5. Autres produits topiques :

- Buclosamide (N-butyl-4-chlorosalicylamide, Jadit^R) : solution, crème à 10 % ;
- Chorquinaldol (Sterosan^R ou Gyno-Sterosan^R, Colposeptine^R + promestriène) : en application topique à une concentration de 3 % et en comprimés vaginaux de 200 mg ;
- Amorolfine : agent topique : crèmes de 0.125, de 0.25 et de 0.5 %, solutions de 2 à 5 %, comprimés de 50 et 100 mg.

Origine : composé synthétique dérivé de morpholine

Modes d'action : fongicide

Interférence avec la synthèse de l'ergostérol par inhibition des enzymes $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -stérol isomérase et Δ^{14} réductase : diminution de la production d'ergostérol, accumulation des déméthylstérols non naturels hyperfluidité de la membrane cytoplasmique ; épaissement de la paroi cellulaire fongique par dépôt de la chitine.

Spectre d'activité : dermatophytoses, candidoses vaginales, *Sporothrix*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Pseudallescheria*, *Alternaria*.

5.2. AGENTS ANTIFONGIQUES SYSTEMIQUES : ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES

5.2.1. Griséofulvine (Fulcine^R, Fulvicin^R, Griselfuline^R)

5.2.1.1. Origine : phénol-éther produit par *Penicillium spp.*

5.2.1.2. Mode d'action : fongistatique

Mécanisme non clarifié

- Effet antimitotique : interférence avec la réplication du DNA entraînant l'arrêt de la division cellulaire et la production des cellules géantes multinucléées.
- Affection de la synthèse de la chitine de la paroi cellulaire des champignons.
- Dépôt sur la kératine de la peau: elle rend celle-ci et la kératine néoformée résistantes aux dermatophytes.

5.2.1.3. Spectre d'activité : fongistatique efficace contre les dermatophytes (*Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Microsporum*).

2.1.4. Dosages : comprimés à 125, 165, 250, 330 et 500 mg ; maximum 1 g/j pendant plusieurs semaines ou mois.

5.2.2. Polyènes hepténiques : Amphotéricine B (AmB, Fungizone^R) et Hamycine

5.2.2.1. Origine

- Amphotéricine B : *Streptomyces nodosus*

- Hamycine : *Streptomyces pimprina*

5.2.2.2. Modes d'action : agents polyéniques systémiques fongicides.

Ces agents se combinent avec les stérols (cholestérol / ergostérol) de la membrane cellulaire (cytoplasmique) qui leur servent de ligand : la liaison est plus forte avec l'ergostérol de la membrane cytoplasmique des champignons qu'avec le cholestérol de la membrane cellulaire des mammifères, des helminthes et des protozoaires. Les stérols (ergostérol) sont des agents stabilisants de la membrane ; leur interaction avec les polyènes conduit à la perturbation des fonctions membranaires : dommages oxydatifs directs de la membrane et perte du contenu intracellulaire, comme les cations et des grosses molécules intracellulaires (ex. nucléoprotéines), culminant à la mort de la cellule fongique.

Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. Studies have found evidence that amphotericin opens up ion channels in membranes, perhaps making them leakier to charged atoms that could disrupt a cell. Most scientists assumed that this was the drug's main mode of action. But the evidence also suggested that amphotericin interacted with sterols, such as cholesterol in animal cells and ergosterol in yeast. *Nature Chemical Biology*, 2014; DOI: [10.1038/nchembio.1496](https://doi.org/10.1038/nchembio.1496)

5.2.2.3. Spectre d'activité : produits efficaces dans le traitement de mycoses disséminées (systémiques) causées par *Aspergillus spp.*, *Blastomyces spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma spp.*, *Sporothrix schenckii*, *Zygomycetes*.

5.2.2.4. Dosages : 3 formulations lipidiques moins toxiques : AmB lipid complex, AmB colloïd dispersion et AmB liposomal form. Injection IV dans une solution glucosée à la dose de 0.4 à 0.8 mg/Kg/j, avec une dose initiale de 5 mg/j.

5.2.3. Flucytosine ou 5-Fluorocytosine (5FC)

2.3.1. Origine : une des pyrimidines halogénées synthétisées comme agents anticancéreux putatifs, mais présentant une activité antifongique.

2.3.2. Mode d'action : fongicide

C'est un antimétabolite de la cytosine, inhibiteur de la synthèse des pyrimidines et, par conséquent, de celle du DNA et du RNA. 5 FC n'est pas en soi cytotoxique pour les champignons. Ces germes susceptibles à la 5FC la transforment, grâce à leur

cytosine déaminase (absente chez l'homme), en 5-fluorouracil (5 FU) qui est létale comme la fluorouridine / fluorocytidine triphosphate qui inhibe la thymidylate synthase: interférence avec la synthèse des acides nucléiques entraînant la production des RNA anormaux qui soit bloquent la synthèse des protéines, soit mènent à la synthèse des protéines défectueuses (action due à la formation de fluorouridine triphosphate et de fluorocytidine triphosphate). L'enzyme cytosine perméase liée à la membrane est responsable de la prise de 5FC dans la cellule fongique.

5.2.3.3. Spectre d'activité :

5FC est active contre les mycoses cutanées, sous-cutanées et systémiques à *Candida*, à *Cryptococcus*, à *Torulopsis* et à d'autres levures.

5.2.3.4. Dosages : comprimés à 250 et 500 mg à la dose de 150 mg/Kg/j per os ou solution de 1 % dans une solution de NaCl à 0.09 % en IV à la dose de 3 à 8 g/j (en plusieurs doses), surtout dans des cas de fongémies et de méningites causées par les germes susceptibles. La 5FC est utilisée seule ou le plus souvent en association avec AmB pour éviter l'apparition des mutants résistants.

5.2.4. Azoles : Imidazoles et Triazoles

5.2.4.1. Origine : composés synthétiques. Ils sont tous des produits de synthèse chimique présentant un large spectre d'action et étant moins toxiques que l'amphotéricine B.

Agents topiques : Clotrimazole (Canestène[®]), Miconazole (Daktarin[®], Micozol[®]), Econazole (Pévaryl[®]), Diamizole (Astérol[®]).

Agents systémiques :

- **Imidazoles :** miconazole, ketoconazole (Nizoral[®]), fenticonazole (Lomexin[®]) ;
- **Triazoles :** fluconazole (Triflucan[®], solution inj. IV à 2 mg/ml, comprimés à 50, 100 et 200 mg), itraconazole (Sporanox[®], gélules à 50 et 100mg), saperconazole, genaconazole, voriconazole.

5.2.4.2. Modes d'action : fongistatiques

Inhibition des enzymes dépendantes du cytochrome P-450 membranaire, le système lanostérol 14- α – déméthylase cytochrome microsomal P-450 dépendant, entraînant l'inhibition de la biosynthèse des lipides, la diminution de la synthèse de l'ergostérol et l'accumulation des stérols – 14 méthylés intermédiaires par affection des activités des enzymes de surface (chitine synthétase, enzymes oxydatives, enzymes du métabolisme des lipides). Conséquences : altération de la fluidité et de la perméabilité du complexe membrane cytoplasmique-paroi cellulaire du champignon, rétention des métabolites (ex. : le glucose) et affection de la croissance des champignons. Antagonisme avec AmB.

5.2.4.3. Spectre d'activité : large

- Dermatophytes, *Aspergillus*
- Levures : *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Sporothrix*.

5.2.5. Allylamines

5.2.5.1. Origine : ce sont des dérivés des spironaphthalénones hétérocycliques synthétisés par inadvertance dans un programme pour produits actifs sur le système nerveux central.

Naftifine : agent topique

Terbinafine (Lamisil[®]) : agent systémique (per os) et topique

5.2.5.2. Mode d'action : fongicides

Interférence avec la synthèse de l'ergostérol dans la membrane cytoplasmique : la cible primaire est la squalène époxydase qui transforme le squalène en 2,3-oxyclosqualène conduisant au lanostérol. L'inhibition de l'enzyme est spécifique, non compétitive et réversible, résultant à la non synthèse de l'ergostérol et l'accumulation du squalène qui conduit à la mort du champignon.

5.2.5.3. Spectre d'activité :

- Naftifine : dermatophytes
- Terbinafine : dermatophytes, *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Sporothrix schenckii*.

5.2.6. Peptides

5.2.6.1. Origine :

Cilofungin, Saramycetin

Cilofungin est un agent semi-synthétique (lipopeptide amphiphile)

Saramycetin : *Streptomyces saraceticus* (« Orphan » drug).

5.2.6.2. Mode d'action : fongicides

Agents systémiques (Injection IV)

- Cilofungin : inhibe de la synthèse du composé β 1, 3 glucan de la paroi cellulaire en bloquant l'enzyme glucan synthase fongique, conduisant ainsi à la lyse cellulaire.
- Saramycetin : cause des changements/modification dans la paroi cellulaire culminant à la lyse cellulaire du champignon.

5.2.6.3. Spectre d'activité :

- Cilofungin : *Candida spp.*
- Saramycetin : *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides* et *Sporothrix*, *Aspergillus*, *Zygomycetes*.

5.2.7. Mucilagineux

5.2.7.1. Origine :

Agents topiques : **Ciclopiroxolamine, Haloprogin, Acrisorcin**

Agent systémique et topique: **Ambructicin** (per os) : composé majeur (acide cyclopropyl-polyène-pyran) de *Polyangium cellulosum subsp. fulvum*

5.2.7.2. Modes d'action : Ambructicin : fongicide

- Interférence avec la synthèse du RNA
- Inhibition de la prise d'acides aminés
- Blocage du métabolisme des glucides

5.2.7.3. Spectre d'activité /Ambructicin :

- *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Sporothrix*, *Histoplasma*, *Aspergillus*, *Pseudallescheria boydii*
- Mycétome eumycotique : *P. boydii*.

2.8. Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire

5.2.8.1. Inhibiteurs de la synthèse du 1-3,- β -D-glucan : Echinocandin, Caspofungin, Pneumocandin

5.2.8.1.1. Mode d'action :

Ces agents inhibent la synthèse de 1, 3- β -D-glucan de la paroi cellulaire en bloquant l'enzyme glucan synthase de la paroi cellulaire des champignons, conduisant ainsi à la lyse des cellules fongiques en état de croissance. Le 1-3, β -D-glucane est un composant de la paroi de plusieurs champignons pathogènes.

5.2.8.1.2. Spectre d'activité :

- *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon beigelii*
- *Phialophora spp.*, *Rhizopus arrhizus*,
- *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*

- *Cladophialophora bantiana*, *Aspergillus*

5.2.8.2. Inhibiteurs de la synthèse de la chitine : Nikkomycin Z

5.2.8.2.1. Mode d'action :

Inhibition de la chitine synthase de la paroi cellulaire des champignons, entraînant ainsi le blocage de la synthèse de la chitine.

5.2.8.2.2. Spectre d'activité :

- *Candida spp.*
- *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides*.

CHAPITRE XII: CHIMIOThERAPIE ANTIVIRALE

La chimiothérapie antivirale consiste à introduire des produits artificiels (chimiques) dans l'organisme infecté par un virus pour y limiter l'infection virale. Les maladies virales ayant pour mécanisme l'infection de cellules de l'organisme par des virus, l'application d'une chimiothérapie antivirale «**virulicide**», c'est – à – dire à base de produits qui dénatureraient les structures virales à l'intérieur de l'organisme sans dénaturer les structures cellulaires, serait efficace pour lutter contre les infections virales. A défaut d'être virulicides, les agents antiviraux utilisés actuellement chez l'homme sont «**virostatiques**», inhibant la multiplication des virus. Le développement actuel de la chimiothérapie antivirale vient d'une meilleure connaissance du cycle de multiplication des virus.

2.1. Inhibition de la pénétration et de la libération des virus

- 1° - AMANTADINE (MANTADIX^R) : 1 – adamantanamine hydrochloride
- RIMANTADINE (ROFLUAL^R) : dérivé méthyl d'amantadine

Ce sont des amines primaires qui inhibent la pénétration du virus en augmentant le pH de la vacuole d'endocytose. Elles agissent sur la protéine M2 de matrice de l'enveloppe virale : altération possible de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la vacuole lors de la pénétration et la décapsidation et interférence avec l'assemblage et la libération des particules virales bourgeonnantes à la surface de la cellule infectée. Les mutations localisées dans le domaine transmembranaire du gène viral de M2 rendent le virus résistant à ces produits.

Indications : traitement et prophylaxie de la grippe à Influenzavirus A.

- 2° METHISAZONE : 1 – méthylisaten-3-thio-semicarbazone.

Il prévient la maturation virale : l'assemblage des protéines virales autour de l'acide nucléique.

Action : * Virus à DNA : Poxvirus, Herpesvirus

* Virus à RNA : Influenzavirus A et B, Arbovirus, Picornavirus

Indications : prévention de la variole et traitement des complications de la Vaccine.

- 3° ZANAMIVIR (RELENZA^R, poudre pour inhalation) : inhibiteur de la neuraminidase; est utilisé contre la grippe A et B humaine et aviaire.

- 4° OSELTAMVIR (TAMIFLU^R) : inhibiteur de la neuraminidase ; est utilisé contre la grippe A et B humaine et aviaire.

2.2. Inhibition de la réplication virale

2.2.1. Analogues des nucléosides inhibiteurs de la DNA-polymérase virale DNA-dépendante

1° ACYCLOVIR ou ACYCLOGUANOSINE (ZOVIRAX^R) : 9-(2-hydroxy-éthoxyméthyl) guanine est aussi le métabolite actif de VALACYCLOVIR (VALTREX^R, valyl-ester d'acyclovir) : tous les 2 agissent sous leurs formes triphosphate : ils sont phosphorylés par une thymidine kinase (TK) spécifique du virus en leurs formes monophosphates qui sont subséquemment phosphorylés en triphosphate par des enzymes cellulaires. Acyclovir triphosphate agit par compétition avec le substrat naturel dGTP pour la DNA polymérase virale. Acyclovir triphosphate, ayant une

affinité plus élevée que DGPT pour cette enzyme virale, est préférentiellement incorporée dans le nouveau DNA viral.

Résistance : mutations

Indications : Infections localisées et systémiques à HSV et VZV.

2° FAMCICLOVIR (FAMVIR^R) : 2-[2-(2-amino-9H-purin-9-yl) éthyl]- 1, 3-propanediol diacetate est un dérivé synthétique acyclique de guanine. C'est une prodrogue du composé antiviral PENCICLOVIR (Denavir^R) qui est structuralement analogue à l'Acyclovir.

Résistance : idem cfr acyclovir.

Indications : infections labiales et génitales récurrentes à HSV et zona chez les adultes (VZV).

3° CIDOFOVIR (VISTIDE^R) : [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylméthoxypropyl) cytosine, HPMPG] a un large spectre d'activité contre adenovirus, herpesvirus, papovavirus et poxvirus.

Résistance : mutations dans le gène *DNA pol*.

Indications : il est utilisé dans la rétinite à CMV chez les patients avec SIDA et dans des cas de HSV et de Polyomavirus.

4° GANCICLOVIR (CYTOVENE^R, CYMEVAN^R) : [9-1, 3-dihydroxy-2-propoxy) méthylguanine ; DHPG] a une structure similaire à celle d'acyclovir, mais est plus toxique. Il est activé en sa forme monophosphate par la TK spécifique des HSV et par la phosphotransférase de CMV. Cette forme est subséquemment transformée en triphosphate par des kinases cellulaires.

Résistance : mutations dans les gènes du segment long et ceux UL97 (phosphotransférase) et UL59 pol du DNA viral CMV.

Indications : traitement des infections à CMV comme gastro-entérites, pneumonites et rétinite ; prophylaxie de rétinite à CMV et d'infections à CMV chez les patients transplantés (greffés) et ceux infectés par HIV.

5° VIDARABINE ou ARA-A (VIRA-A^R) : Adénine-Arabinoside triphosphate (9-β-D-arabinofuranosyl adénine) agit sur la DNA polymérase des HSV, du VZV et du virus de l'hépatite B (HBV) ; c'est un inhibiteur compétitif des DNA polymérases virales et cellulaires.

Indications : traitement systémique d'encéphalite à HSV et infections néonatales à HSV (activation comme Acyclovir)

6° CYTARABINE (ARA-C^R) : Cytosine-Arabinoside (1-β-D-Arabinofuranosyl cytosine) : plus active que l'IdU. Elle agit par inhibition des enzymes nucléoside réductases et DNA polymérase.

Indications : kératite et encéphalites herpétiques. Elle ne s'incorpore pas dans la molécule de DNA viral comme l'IdU.

7° IDOXURIDINE ou IdU (IDUVIRAN^R) : 5-iodo-2'-déoxyuridine est un agent topique uniquement. Le mécanisme d'action exacte n'est pas complètement défini, mais sa forme triphosphate inhibe la synthèse du DNA viral.

Résistance : mutations dans le gène de TK.

Indications : traitement de la kératite à HSV.

8° TRIFLURIDINE (VIROPTIC^R) : trifluorothymidine : agent topique uniquement dont la forme triphosphate est un inhibiteur compétitif des DNA polymérases virales.

Mécanisme de résistance : inconnu.

Indications : traitement de la kératite à HSV (Herpes simplex virus) et des infections à CMV et Vaccinia virus. Activité cytotoxique à cause de son incorporation dans la DNA polymérase cellulaires. D'où son utilisation locale uniquement.

L'idoxuridine et la trifluridine sont incorporées par les DNA polymérase virales et cellulaires à la place de la thymidine. Ce qui conduit à des erreurs de lectures dues à cette substitution.

2.2.2. Analogues de nucléosides inhibiteurs des processus multiples de la réplication virale

1° RIBAVIRINE (VIRAZOLE^R) : 1-β-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-trizole-3-carboxamide : est un analogue synthétique de guanosine et d'inosine. Le mécanisme d'action exact n'est pas connu :

- (1) Ribavirine monophosphate inhibe l'activité de l'inosine monophosphate IMP cellulaire, réduisant ainsi la teneur de GTP ;
- (2) Ribavirine triphosphate inhibe la translation des transcrits viraux en interférant (empêchant) avec la mise en place de la coiffe en 5' des RNA messagers viraux (effets secondaires : anémie et neutropénie) ;
- (3) Ribavirine triphosphate inhibe l'activité de la RNA polymérase RNA-dépendante d'Influenzavirus.

Indications : traitement par aérosol des infections respiratoires sévères (bronchiolites) à RSV (virus respiratoire syncytial) et à morbillivirus chez les nourrissons et jeunes enfants hospitalisés, de la grippe A et B, et par voie IV de la fièvre hémorragique de Lassa (Arenavirus) ; per os contre l'hépatite C en association avec l'interféron.

2° ENTECAVIR : inhibiteur de la reverse transcriptase virale (la DNA polymérase RNA-dépendante).

Indication : utilisé contre les infections à HBV.

2.2.3. Inhibiteurs des protéases virales

1° OLYSIO (Johnson & Johnson) et 2° SOFOSBUVIR (Sovdi^R, Gilead Science) bloquent la réplication de HCV ; sont utilisés en monothérapie.

3° TELAPREVIR (Incivek, TVR) is a prescription medicine approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of chronic hepatitis C virus (HCV) genotype 1 infection. Telaprevir is always used in combination with the medicines peginterferon and ribavirin.

4° BOCEPREVIR (BOC, Victrelis) is a prescription medicine approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of chronic hepatitis C virus (HCV) genotype 1 infection. The drug is approved for use in adults whose liver is damaged but still functioning and who have not been treated yet or who did not respond to previous treatment with the medicines interferon and ribavirin. Boceprevir is always used in combination with the two medicines peginterferon alfa and ribavirin.

2.2.4. Analogues (Dérivés) de pyrophosphate inhibiteurs de la DNA - polymérase virale

1° FOSCARNET (FOSCAVIR^R) : trisodium phosphonosformate ou PFA : acide phosphonoformique : agit in vitro par inhibition non compétitive des DNA polymérase des tous les herpes virus (HSV, CMV,...), de HBV et sur la reverse transcriptase de HIV-1. Effet indésirable : toxicité rénale.

Résistance : mutations dans le gène viral *DNA pol*.

Indications : prophylaxie et traitement des rétinites à CMV chez les patients avec SIDA et traitement des infections à HSV et VZV résistantes à l'acyclovir (Herpesvirus), à HIV-1 et à HBV.

2.2.5. Interférons inhibiteurs de la réplication virale en stimulant une variété de réponses cellulaires

Les interférons (IFN_s α, β et γ) sont un groupe de cytokines avec des activités antivirales, immunomodulatrices et antiprolifératives complexes. Ce sont des protéines produites par des cellules eucaryotes en réponse à différents inducteurs incluant des virus. Ils agissent sur des cellules non infectées pour les rendre résistantes à l'infection virale. Ils ne sont pas en soi antiviraux, mais induisent les synthèses des protéines dans des cellules exposées qui inhibent des fonctions virales spécifiques : la pénétration, la décapsidation, la synthèse des mRNA viraux et des protéines virales, l'assemblage et la libération des virus néoformés. Ce sont des IFN α et γ qui sont les plus utilisés.

1° IFNα_{2a} : traitement de l'infection chronique à virus de l'hépatite C et du sarcome de Kaposi chez des adultes avec SIDA.

2° IFNα_{2b} (recombinant) : traitement de condylome acuminé externe, des infections chroniques à virus de l'hépatite B (HBV) et de l'hépatite C et du sarcome de Kaposi chez les adultes avec AIDS : Peginterferon alfa-2a (PEG-interferon alfa-2a, Pegasys, pegIFN alfa-2a, pegylated-interferon alfa 2a).

3° IFN-α_{n3} : traitement intralésion de condylome acuminé externe de Papillomavirus réfractaire ou récurrent chez des adultes.

2.3. **Agents antirétroviraux (ARV) utilisés contre les Infections à HIV**

2.3.1. Analogues de nucléosides inhibiteurs de la reverse transcriptase virale (DNA polymérase RNA-dépendante) (NRTIs)

- ddI ou DIDANOSINE (VIDEX[®]) : 2', 3'- dideoxyinosine : comprimés à 25, 50, 100 et 150 mg ; poudres à 100, 250 mg: HIV-1, HIV-2.
- 3TC ou LAMIVUDINE (EPIVIR[®]) : 2', 3'-dideoxy, 3'-thiacytidine : comprimés à 150 mg ; est utilisée en combinaison avec AZT: HIV-1, HIV-2 et HBV.
- d4T ou STAVUDINE (ZERIT[®]) : 2', 3'-didéhydro-2'-deoxythymidine : gélules à 15, 20, 30, 40 mg ; est utilisée après thérapie avec AZT : HIV-1, HIV-2.
- ddC ou ZALCITABINE (HIVID[®]) : 2', 3'-dideoxycytidine : comprimés à 0,375 et 0,75 mg ; est utilisée en association avec AZT ou avec des inhibiteurs des protéases (chez des patients intolérants) contre HIV-1, HIV-2 et HBV
- AZT / ZDV ou AZIDOTHYIMIDINE ou ZIDOVUDINE (RETROVIR[®]) 3'-azido-3'-deoxythymidine : gélules à 100 mg ; comprimés à 300 mg ; vials pour I.V. à 10 mg/ml ; est utilisée en association avec d'autres NRTIs (3TC, ddC, Abacavir) et antiprotéases (Indinavir, Nelfinavir) contre HIV-1, HIV-2, HTLV-1.
- ABACAVIR (ZIAGEN[®])
- TENOFOVIR (VIREAD[®]) : est un nucléotide

- ENTECAVIR : utilisé contre HBV
- EMTRICITABINE (EMTRIVA^R)
- COMBIVIR^R : AZT (300 mg) + 3TC (150 mg)
- TRIZIVIR^R : AZT + 3TC + ABACAVIR
- HYDROXYUREE (HYDREA^R) : pour renforcer l'efficacité de ddl ou de d4T.

Les analogues nucléosidiques sont phosphorylés par des enzymes cellulaires en forme de 5' triphosphates qui agissent comme inhibiteurs compétitifs de la réserve transcriptase de HIV. L'incorporation des formes triphosphates conduit à l'arrêt de la synthèse de la chaîne de DNA, parce que les NRTI_s manquent un groupement 3'hydroxyl libre pour former une liaison phosphodiester avec le nouveau nucléotide. L'émergence rapide des souches HIV résistants aux NRTI_s chez les patients traités avec un produit fait que ces analogues nucléosidiques soient utilisés en association entre eux, avec des analogues nonnucléosides et avec des inhibiteurs des protéases virales.

Résistance : mutations au niveau du gène de la réserve transcriptase virale

2.3.2. Nonnucléosides inhibiteurs de la réverse transcriptase virale (NNRTI_s)

- DIPYRIDODIAZEPINONE :
 - * NEVIRAPINE (VIRAMUNE^R) : comprimés à 200 mg : HIV-1.
 - * DELAVIRDINE (RESCRIPTOR^R) : comprimés à 100 mg
 - EFAVIRENZ (SUSTIVA^R) : 1 comprimé/prise (au lieu de 3 gélules)
 - ETRAVIRINE (TMC-114 et TMC-125)
 - A L'ETUDE : * DPC-083 (cousin de Sustiva^R)
- Associations :
 - * TRIOMUNE^R – 30 (ou 40) (CIPLA / INDE): STAVUDINE (30/40 mg) + LAMIVUDINE (150 mg) + NEVIRAPINE (200 mg)
 - * ATRIPLA^R (Bristol) : EMTRICITABINE + TENOFOVIR + EFAVIRENZ.

Les nonnucléosides se fixent sur un site de non fixation du substrat de la réverse transcriptase qui est localisé dans le voisinage (à proximité) du site de fixation de substrat. Ce qui cause une perturbation du site catalytique de l'enzyme. Ces produits entraînent l'émergence des souches résistantes lorsqu'ils sont administrés en monothérapie. Ils doivent toujours être associés à des antirétroviraux ayant un autre mécanisme d'action (NRTI_s)

Résistance : mutations dans le gène de la réverse transcriptase virale.

2.3.3. Inhibiteurs des protéases virales (Pis : antiprotéases)

- INDINAVIR (CRIXIVAN^R) : gélules à 200 et 400 mg : HIV-1, HIV-2.
- SAQUINAVIR (INVIRASE^R ou FORTONASE^R) : gélules à 200 mg : HIV-1, HIV-2.
- NELFINAVIR (VIRACEPT^R) : gélules à 250 mg ; poudre orale : 50 mg/g
- RITONAVIR (NORVIR^R) : gélules à 100 mg ; solution p o 600 mg/7.5 ml : HIV-1, HIV-2
- AMPRENAVIR (AGENERASE^R) : 2 comprimés d'une nouvelle forme remplacent 8 gélules.
- FOSAMPRENAVIR
- ATAZANAVIR

- TIPRANAVIR : actif sur les souches HIV résistantes aux antiprotéases. Pour une meilleure efficacité, il est nécessaire de l'associer au Ritonavir.
 - LOPINAVIR : HIV-1.
 - KALETRA^R : LOPINAVIR + RITONAVIR
 - DARUNAVIR + RITONAVIR
- Ajouter Ritonavir à certaines antiprotéases permet d'améliorer la concentration de ces dernières dans le sang :
 - Ritonavir + Indinavir
 - Ritonavir + Saquinavir
 - Ritonavir + Amprénavir + Kalétra^R

2.3.4. Inhibiteurs de l'intégrase

1° DOLUTEGRAVIR ou TIVICAY^R, DTG (GlaxoSmithKlein) : à utiliser en association avec d'autres médicaments ARV contre les infections à HIV-1. Dolutegravir is a prescription medicine approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of HIV infection in adults and children 12 years of age and older and weighing at least 88 pounds (40 kilograms). Dolutegravir is always used in combination with other anti-HIV medicines. Dolutegravir is a type of anti-HIV medicine called an integrase inhibitor. Dolutegravir works by blocking integrase, an HIV enzyme. This prevents HIV from replicating and lowers the amount of HIV in the blood.

2° RALTEGRAVIR ou ISENTRESS (RAL, raltegravir potassium) is a prescription medicine approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of HIV infection in adults and children 4 weeks of age and older. Raltegravir is always used in combination with other HIV medicines. Raltegravir belongs to a class (group) of HIV drugs called integrase inhibitors. Integrase inhibitors block an HIV enzyme called integrase. (An enzyme is a protein that starts or increases the speed of a chemical reaction.) By blocking integrase, integrase inhibitors prevent HIV from multiplying and can reduce the amount of HIV in the body.

2.3.5. Entry and Fusion Inhibitors

1° ENFUVIRTIDE ou Fuzeon, T-20: HIV fusion inhibitor (blocks viral entry) / HIV-1
<http://aidsinfo.nih.gov/drugs/306/enfuvirtide/0/patient/>

2° MARAVIROC ou **Selzentry**, **MVC**: Entry inhibitor (blocks binding to CCR5) / HIV-1
<http://aidsinfo.nih.gov/drugs/408/maraviroc/0/patient/>

2.3.6. Thérapie génique

Prélever des cellules immunitaires des patients vivant avec le VIH dans lesquelles on introduit des virus de la même « famille » que le VIH : on observe une stabilisation et/ou une diminution de la charge virale des patients (Dr. Carl June de l'Université de Pennsylvanie, 2006).

CHAPITRE XIII: MECANISMES BIOCHIMIQUES DE RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES

4.1. Définition de la résistance

Le fait que les microbes puissent devenir résistants à un agent chimiothérapeutique durant le traitement a été découvert chez les protozoaires par EHRLICH. Pour chaque antibiotique, est défini son spectre d'activité, c'est-à-dire l'éventail des espèces bactériennes sensibles, susceptibles d'être inhiber par des concentrations de cet antibiotique atteintes in vivo. Toute bactérie qui n'entre pas dans le spectre d'activité d'un antibiotique donné est **résistante** à cet antibiotique.

Une bactérie est **naturellement résistante** à un antibiotique donné, lorsque toutes les souches (tous les individus) appartenant à la même espèce bactérienne sont résistantes à cet antibiotique.

Une souche bactérienne **est ou devient résistante** (résistance acquise) à un antibiotique donné, lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration de l'antibiotique égale ou supérieure (plus élevée) à la concentration qui inhibe les souches normales, sensibles, de l'espèce.

La résistance peut être naturelle ou acquise.

- **Résistance naturelle** : une espèce bactérienne (toutes les souches sauvages) est non sensible, de part sa constitution génétique naturelle, à un antibiotique donné; elle n'entre pas dans le spectre d'activité de l'antibiotique; elle fait partie du patrimoine génétique (chromosome) de l'espèce. Ex., *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter diversus* et *Citrobacter amalonaticus* sont résistantes aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines par production d'une pénicillinase β 1 à large spectre d'origine chromosomique. *Proteus* indologènes, *Providencia*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Citrobacter freundii* sont résistantes aux aminopénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération et à certaines de 2^e génération par production d'une céphalosporinase inductible d'origine chromosomique.

- **Résistance acquise** : elle se réfère ordinairement aux changements (modifications) génotypiques acquis par certaines espèces ou souches bactériennes qui persistent pendant la culture en l'absence du médicament. L'antibiotique joue seulement un rôle d'agent sélecteur. Ces modifications ont un support chromosomique ou extrachromosomique. C'est-à-dire, la résistance peut être acquise par :

(1) mutation chromosomique (ex, fosfomycine, aminoglycosides, rifamycines, quinolones);

(2) transfert de gènes R de résistance par les plasmides et les transposons d'une bactérie résistante à une bactérie sensible (ex., acquisition de bêtalactamases plasmidiques à large spectre). Ce qui conduit le plus souvent à une multirésistance et à une épidémie de résistance aux antibiotiques.

4.2. Mécanismes de résistance

Il existe en principe trois mécanismes généraux de résistance d'un micro-organisme à un antibiotique qui font qu'un agent antimicrobien ne puisse inhiber la croissance d'un microbe isolé d'un patient.

4.2.1. Imperméabilité cellulaire totale ou partielle par la diminution ou la suppression de la perméabilité pariétale ou membranaire : l'antibiotique est incapable d'atteindre son site-cible potentiel (sa cible moléculaire, son récepteur) dans la bactérie. Ceci peut se faire par :

- (1) la formation des barrières de pénétration (absence de pénétration : imperméabilité) qui gardent l'antibiotique loin de son point d'attaque, donc de sa cible moléculaire (aminoglycosides, glycopeptides, quinolones, chloramphénicol..);
- (2) l'altération du système de transport membranaire de l'antibiotique, comme les porines (β -lactamines chez les bacilles à Gram négatif, sulfamides et triméthoprim, tétracyclines).

4.2.2. Possession par la bactérie d'un mécanisme ou d'une structure biochimique (ex, une enzyme) qui réduit ou élimine le potentiel (pouvoir) toxique de l'antibiotique :

- (1) inactivation enzymatique : synthèse par la bactérie des enzymes codées par des gènes plasmidiques qui inactivent, modifient ou détruisent l'antibiotique: bêtalactamases (pénicillinasés et céphalosporinasés), acylasés, acétyltransférases, phosphorylasés (β -lactamines, macrolides, aminoglycosides, chloramphénicol, lincosamines);
- (2) substitution, duplication ou disparition de la cible moléculaire habituelle (sulfamides, triméthoprim);
- (3) réduction de l'activation cellulaire de l'antibiotique: l'antibiotique reste sous sa forme inactive par répression des processus métaboliques bactériens qui l'activent (tétracyclines). Les deux derniers mécanismes conduisent à **l'efflux de l'antibiotique**, c'est-à-dire à une élimination excessive de l'antibiotique hors de la bactérie et, ainsi, à une concentration insuffisante pour exercer son action (*E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*). La bactérie produit, à cet effet, une **pompe refoulante**, qui est une protéine membranaire cytoplasmique (chloramphénicol, bêtalactamines, quinolones, cotrimoxazole).

4.2.3. Évolution biochimique de la bactérie de telle façon que le récepteur bactérien (le site-cible) pour l'antibiotique ne s'accommode plus avec le médicament et, ainsi, aucune interaction toxique ne se produit.

- (1) Modification ou altération du récepteur bactérien (de la cible moléculaire) par mutation chromosomique : cette cible devient ainsi insensible à l'antibiotique, mais continue à fonctionner physiologiquement; il y a **baisse (diminution) de l'affinité** du site-cible pour l'antibiotique: quinolones pour la DNA-gyrase (*Staphylococcus*, *Streptococcus*), β -lactamines pour les PBP (*Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*), rifamycines pour la sous-unité β de la RNA-polymérase, aminoglycosides pour la sous-unité ribosomale 30S, macrolides pour la sous-unité ribosomale 50S, sulfamides et triméthoprim pour les enzymes de la synthèse des folates,...);
- (2) Réduction de l'importance (du rôle) physiologique de la structure-cible qui n'est presque plus utilisée par la bactérie pour son fonctionnement normal. Ceci se traduit par le phénomène de **tolérance** de bactéries vis-à-vis de certains antibiotiques (β -lactamines : tolérance des pneumocoques vis-à-vis de la pénicilline G).

Le développement permanent de nouveaux agents antimicrobiens actifs se fonde sur le fait que les micro-organismes sont extraordinairement **inventifs** dans le développement de la résistance envers un grand nombre d'antibiotiques.

CHAPITRE XIV : DESINFECTION ET STERILISATION

1. DEFINITIONS

Les techniques de désinfection / stérilisation des matériels pour les débarrasser des germes viables et contaminants ont été d'abord développées pour la préparation des cultures pures dans les laboratoires. Elles ont été alors adaptées en médecine, en chirurgie et en santé publique pour prévenir la propagation des maladies infectieuses. Il est ainsi indispensable de contrôler le développement des micro-organismes (pathogènes) pour éviter leurs effets nuisibles sur l'homme, les animaux et les plantes ou sur les produits de l'activité humaine (altération des aliments, dégradations diverses).

1.1. Désinfection

Désinfecter signifie débarrasser un objet ou une surface des micro-organismes pathogènes par des moyens mécaniques (lavage, nettoyage,...) ou chimiques (désinfectants comme l'alcool, le phénol,...). La désinfection consiste à tuer ou à réduire le nombre des germes pathogènes ainsi qu'à éliminer leur infectivité (réduire le danger d'infection). Ceci ne nécessite pas l'élimination de tous les microbes viables (ex. : antiseptie des plaies), car elle n'est qu'une destruction incomplète des germes. Ainsi, une désinfection n'est pas suffisante pour une intervention chirurgicale, par exemple. Les désinfectants doivent être efficaces contre toutes sortes de microbes et n'ont pas besoin d'être inoffensifs pour les cellules de l'organisme hôte. Ils sont surtout utilisés pour des applications superficielles des objets inertes.

1.2. Stérilisation

Stériliser signifie tuer (perte irréversible de toutes les fonctions vitales et de reproduction ou éliminer tous les micro-organismes viables (formes végétatives, spores) d'un matériel / objet par les agents physiques (chaleur,...) ou chimiques. Les micro-organismes ainsi détruits peuvent encore y être présents, mais ne sont plus jamais capables d'infecter (infectivité nulle). La stérilisation aboutit à la destruction totale des germes. La stérilité est l'état de l'absence totale de germes viables, revivifiables ou capables de se développer. Une décontamination ou une réduction de la flore microbienne s'impose avant la stérilisation ou la désinfection lorsque les zones concernées sont très contaminées. «On décontamine sur du sale et on désinfecte ou stérilise sur du propre».

1.3. Antiseptie

Elle se réfère aux applications extérieures (de surface) des agents chimiques (des antiseptiques) pour éliminer, tuer ou inhiber les micro-organismes pathogènes (ou inactiver les virus) au niveau des tissus vivants ou pour prévenir une infection par l'entrée des germes (ex. : antiseptie des plaies par des antiseptiques).

1.4. Asepsie (septikos du grec = putréfaction)

C'est l'état de l'absence totale des germes dû aux mesures rigoureuses requises pour empêcher une infection ou une contamination par des micro-organismes en

milieu hospitalier (bloc opératoire en chirurgie, salles de réanimation, pour prématurés...) ou dans les locaux de préparation des médicaments par la mise au point du flux laminaire, par la désinfection des mains, du champ opératoire et des salles de travail, par le port de mouchoir à la tête ou à la bouche, la filtration de l'air,...

1.5. Sanitation (Sanitizing)

Elle consiste à une réduction des germes par un nettoyage intensif avec des produits inhibiteurs ou germicides des objets ou ustensiles (utilisés surtout pour les aliments) et des surfaces, sans nécessairement les stériliser ou les désinfecter. On peut aussi prendre en considération les mesures empêchant toute propagation (transport) ou colonisation (établissement) des germes.

1.6. Critères de viabilité

Contrairement aux agents chimiothérapeutiques qui sont soit bactériostatiques, soit bactéricides, un désinfectant effectif (efficace) doit être germicide, c'est-à-dire il doit détruire la capacité du micro-organisme de se multiplier (se vérifier) si celui-ci est replacé dans un environnement convenable.

L'utilisation des colorants non pénétrants peut servir de critère indirect de la mort par la chaleur ou par d'autres méthodes qui désorganisent la barrière cellulaire qui règle la perméabilité. Mais ces tests ne sont pas utiles pour des méthodes tels que les rayons UV qui endommagent le DNA.

Des tests de viabilité de cellules détruites peuvent donner différentes numérations des cellules dans des milieux différents; car la reprise de vie ou la revivification (« la résurrection ») des cellules microbiennes endommagées dépend de plusieurs facteurs incluant la tonicité osmotique et la richesse nutritionnelle (l'environnement). Le problème de la définition de la viabilité est d'une importance pratique dans la préparation des vaccins qui subissent une stérilisation (inactivation) aussi douce que possible pour retenir le maximum d'antigénicité. La mort des micro-organismes est ordinairement testée dans des milieux de culture, mais il est nécessaire de s'assurer si les organismes ont aussi perdu leur capacité à initier une infection chez l'hôte (perte de leur infectivité).

Il est à souligner que la stérilisation n'est pas identique à la destruction des micro-organismes ou de leurs produits, car il n'est pas seulement nécessaire d'assurer la stérilité, mais de minimiser d'abord une contamination microbienne. Ainsi, l'eau et les réactifs utilisés dans la préparation des produits biologiques doivent satisfaire à des critères de pureté autres que ceux requis pour les travaux de chimie analytique.

1.6.1. Susceptibilité différentielle

La susceptibilité des cellules microbiennes aux désinfectants ou à la chaleur varie en fonction de leur état physiologique et de leur environnement physico-chimique (milieu aqueux ou sec). Les cellules d'une culture jeune ainsi que les formes végétatives sont plus sensibles (susceptibles) que celles d'une culture en phase stationnaire ou les formes sporulées.

La stérilisation des bactéries présente la cinétique d'une réaction de 1er ordre, dans laquelle le logarithme du nombre de survivants décroît comme une fonction linéaire du temps d'exposition.

2. AGENTS PHYSIQUES

2.1. Température

L'action de la température dépend de l'environnement, de l'état physico-chimique des cellules microbiennes ainsi que de leur nombre.

2.1.1. Chaleur

La chaleur est généralement préférée pour stériliser des matériels/objets, à l'exception de ceux pouvant être altérés (thermosensibles). Le procédé est rapide, car tous les organismes (champignons, virus, formes végétatives des bactéries pathogènes) sont susceptibles à la chaleur. Celle-ci peut aussi atteindre des surfaces pouvant être protégées d'un désinfectant chimique.

La sensibilité d'un micro-organisme à la chaleur est souvent exprimée en termes pratiques comme le point de mort thermique et le temps d'inactivation thermique.

Le point de mort thermique est la plus basse température à laquelle une exposition de 10 minutes d'un volume donné d'un milieu de culture (bouillon) résulte à la stérilisation. Il est de 55°C pour *E.coli*, de 60°C pour *M. tuberculosis* et de 120°C pour la plupart des spores. Etant donné que la susceptibilité des micro-organismes à la chaleur dépend de leur nature et de leur état physiologique, de l'homogénéité/hétérogénéité de la population exposée ainsi que de l'environnement physico-chimique, il paraît plus utile et instructif de définir pour chaque germe la relation entre la température et la durée de stérilisation exprimée en temps d'inactivation thermique pour ainsi apprécier le degré de résistance des germes à la chaleur. Le temps d'inactivation thermique est le temps nécessaire à l'inactivation d'une suspension bactérienne à une température donnée. Ainsi, par ex., 55°C suffisent pour tuer en 1-2 min une population de *S. Typhi*. Si on réduit la température de 10°C, il faudra un temps d'exposition 100 fois plus long.

Mécanisme d'action de la chaleur : la stérilisation par la chaleur implique la dénaturation des protéines ainsi que la fonte des lipides membranaires. Dans un milieu sec (déshydraté), la température de stérilisation est élevée ($\pm 180^\circ\text{C}$), car les bactéries deviennent thermorésistantes à cause de la haute résistance des protéines à la chaleur à l'état sec. La température de la stérilisation dépend du contenu en eau des objets / micro-organismes à stériliser.

2.1.1.1. Chaleur sèche

2.1.1.1. a) Flambage

C'est l'exposition à la flamme (ex. : bec de gaz) des objets / matériels à stériliser : oses de platine, pipettes Pasteur, couvertures, habits, livres, incinération des cadavres ou des matières infectieuses,... Le flambage permet d'obtenir une température variant autour de 1500°C.

2.1.1.1. b) Appareils à circulation d'air chaud

Ils assurent une stérilisation convenable des matériels ou objets qu'il n'est pas souhaitable de mettre au contact de la chaleur humide à partir d'une température de 160°C pendant un temps d'exposition supérieure à une heure (160°C/2 h, 180°C/1 h). Les appareils/instruments métalliques (matériel chirurgical, par ex.), les verreries, les poudres ou les huiles peuvent être ainsi stérilisés dans un stérilisateur à circulation d'air chaud et non les textiles, les objets en papier, en caoutchouc ou en plastique. Les principaux stérilisateurs à air chaud sont

- le four Pasteur : chauffage par la flamme (le gaz),
- le four Poupinel (étuve) : chauffage électrique.

2.1.1.2. Chaleur humide

2.1.1.2. a) Degrés de résistance des micro-organismes à la chaleur humide

Les micro-organismes résistent de façons différentes à la chaleur humide. On peut ainsi les ranger dans les différents degrés suivants de thermorésistance :

- Degré de résistance 1 : les bactéries non sporulées et les formes végétatives des sporulées, les champignons et la plupart des virus sont tués par de la vapeur d'eau à 100°C en un temps court (5 - 10 min);
- Degré de résistance 2 : les spores qui sont tuées en 10 - 20 min dans un courant de vapeur d'eau de 100 à 105°C;
- Degré de résistance 3 : les spores naturelles du sol (spores natives), qui résistent plus de 20 h au courant de vapeur d'eau, sont tuées en 5 - 20 min à 121°C par un courant de vapeur saturée et pressurisée (condensée);
- Degré de résistance 4 : les spores hautement résistantes des bacilles thermophiles. Elles ne peuvent pas être tuées par le courant de vapeur; leur mort ne survient qu'à 134°C pendant 30 minutes.

Tous les micro-organismes de degrés de résistance 1 à 3 doivent être tués (ou inactivés) lors de la stérilisation. Ceux de résistance du 4e degré ne sont en général pas pris en compte, car ils sont non pathogènes et ne représentent aucun intérêt dans le domaine médical.

2.1.2.2. b) Mode de stérilisation par la chaleur humide

2.1.2.2. b.1°) Cuisson ou ébullition

La plupart des germes pathogènes se laissent tuer dans de l'eau bouillante (ex. : cuisson des aliments) pendant quelques minutes. Bouillir dans de l'eau contenant 0.5 % de NaOH pendant 15 minutes est effectif contre les germes des degrés de résistance 1 à 3. On peut ainsi désinfecter les seringues, les aiguilles, les instruments de la petite chirurgie. Cuire ne constitue qu'une désinfection et jamais une stérilisation (bien que le maximum de germes soient détruits), car les spores des germes sporulés restent insensibles et peuvent résister à une cuisson d'une durée de 24 heures.

2.1.2.2. b.2°) Courant de vapeur

L'eau est chauffée dans un récipient hermétiquement fermé de telle façon que la vapeur d'eau formée a une température de 100°C. On utilise pour ce fait le vase ou la marmite à vapeur de Koch. L'avantage à la cuisson simple vient du fait que la vapeur pénètre profondément dans le matériel/objet à désinfecter et, ainsi, un plus

haut et plus sûr effet désinfectant / stérilisant est atteint. Les germes des degrés de résistance 1 et 2 sont tués.

2.1.2.2. b.3°) Autoclavage

C'est la stérilisation par la vapeur surchauffée, saturée et condensée (sous pression) dans un stérilisateur à vapeur dit **autoclave**. Celui-ci est un appareil fournissant de la chaleur humide et constitué d'une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle on chauffe de l'eau sous pression. La stérilisation est obtenue à une température de 120 - 121°C après 15 - 20 min. d'exposition. Tous les germes des degrés de résistance 1 à 3 sont tués.

2.1.2.2. b.4°) Stérilisation fractionnée et tyndallisation

Ces méthodes, qui comprennent un certain facteur d'insécurité, s'appliquent dans la stérilisation des solutions des produits chimiques ou biologiques ou des matériels ne devant pas être chauffés à plus de 100°C. Il est alors admis que les spores thermorésistantes non tuées lors du premier chauffage vont germer pendant l'intervalle de temps entre deux chauffages, et les formes végétatives y résultant seront détruites par les chauffages ultérieurs.

- La stérilisation fractionnée consiste à chauffer trois fois successives du matériel ou milieu à 100°C pendant 30 min. en respectant un intervalle de temps de 16 - 24 h entre les chauffages. Durant cette période, le matériel est conservé à une température de 15 à 25°C.

- La tyndallisation (de Tyndall, 1882) consiste à chauffer du matériel ou milieu 2 à 4 fois consécutives entre 60 - 80°C pendant 30 - 60 min., tout en aménageant un intervalle de 16 - 24 h entre les chauffages.

2.1.2.2. b.5°) Pasteurisation

Elle consiste au chauffage entre les plaques d'une épaisseur mince des produits liquides (lait, bière, vin, jus de fruits,...) à de différents degrés de température pendant un temps court suivi d'un refroidissement brusque et rapide à 10°C. Elle constitue une désinfection partielle (inactivation) et ne peut être considérée comme une stérilisation. La problématique de la pasteurisation consiste à débarrasser les matériels ou produits à stériliser des germes pathogènes (ex. : *M. tuberculosis*, *S. Typhi*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Brucella*,...) tout en conservant (sans altérer) leurs caractères (propriétés) organoleptiques. Les vitamines A, B et C ne sont pas détruites.

Les différents procédés de la pasteurisation sont les suivants :

- le procédé long ou la pasteurisation basse : chauffage à 56 - 62°C pendant 30 min (vin, bière, lait,...);
- le procédé court : chauffage à 71 - 74°C pendant 40 secondes (lait);
- le procédé très court ou la pasteurisation haute : chauffage élevé à 85 - 90°C pendant 10 - 15 secondes (jusqu'à 30 sec);
- le procédé ultracourt ou la pasteurisation UHT (ultra-haute-température) : chauffage très élevé à 135-150°C pendant quelques fractions de secondes qui conduit ainsi à une stérilité presque parfaite et seules quelques spores thermophiles peuvent rester viables.

2.1.2. Froid : Congélation

La congélation d'une suspension bactérienne conduit à la cristallisation de l'eau qui résulte dans la formation des poches minces de solutions concentrées de sels. Celles-ci causent des dommages aux cellules bactériennes qui peuvent ainsi être tuées par une suite des congélations et décongélations répétitives.

La conservation : les cellules congelées peuvent retenir indéfiniment leur viabilité si la température est maintenue en dessous de points eutectiques de différents sels présents (glace sèche du CO₂ : - 78°C; N₂ liquide : - 180°C). Il est utile d'ajouter du glycérol, du diméthylsulfoxyde ou des protéines à une concentration assez élevée lors de la conservation par congélation des bactéries, des virus ou des cellules animales. Ces agents favorisent une solidification amorphe et vitreuse au lieu d'une cristallisation, évitant ainsi la formation de grandes concentrations localisées de sels. On ajoute, par conséquent, des substances riches en protéines (lait, sérum) à des suspensions des bactéries lors de la conservation par lyophilisation (dessiccation à partir de l'état congelé).

2.2. Filtration

Cette technique mécanique s'applique pour la stérilisation des solutions ne devant pas être chauffées ou dont le chauffage à une haute température modifierait la composition chimique (substances thermolabiles). Cette méthode de décontamination est souvent employée dans la préparation des médicaments et des vaccins. Pour arrêter les virus, on utilise des ultrafiltres (filtres ultrastériles) de porosité très fine.

La filtration est aussi utilisée pour les gaz : par exemple, les filtres pour l'air des climatiseurs pour les salles d'opération, de soins intensifs, pour prématurés ou de fabrication des médicaments.

On utilise comme matériaux ou (ou couches) filtrants de la porcelaine non vernissée (bougie filtrante de Chamberland, la plus ancienne), des filtres de verre fritté, des membranes colloïdales ou membranes filtrantes d'acétate de cellulose (filtres moléculaires, très utilisés), des filtres d'amiante (agglomération très fine de fibres d'amiante, filtres Seitz), de la céramique et de la silice (bougies de Kieselgur comme les filtres de diatomées de Berkefeld) avec de pores à diamètres différents selon les besoins (porosité graduée : ex., de 10 µm à 0,1 µm).

2.3. Radiations

2.3.1. Radiations ultraviolettes (U.V.)

Les rayons U.V. sont des ondes électromagnétiques d'une longueur d'ondes entre 13,6 et 400 nm. Ils sont présents dans la lumière solaire (300-400 nm) et peuvent être produits dans des tubes cathodiques, spécialement dans des lampes à vapeurs de mercure. Leur activité antibactérienne avait été découverte en 1877 par DOWNS et BLUNT.

Le pouvoir pénétrant des radiations devient élevé en diminuant la longueur d'onde. Ainsi, la stérilisation des bactéries devient appréciable à partir de 330 nm.

A cause de leur faible pouvoir de pénétration (quelques mm), les rayons U.V ne tuent que les germes se trouvant à la surface des corps solides ou liquides. La bande d'onde la plus efficace est celle de 254 nm à laquelle se produit une dimérisation de la thymine, de l'uracile et de l'uridine avec formation d'un noyau cyclobutane.

Les rayons UV (radiations électromagnétiques), qui sont absorbés par les purines et les pyrimidines des acides nucléiques (max. : 260 nm) ainsi que par les noyaux aromatiques du tryptophane, de la tyrosine et de la phénylalanine des protéines (max. : 280 nm), causent une série d'altérations du DNA conduisant ainsi à une désorganisation de la synthèse des protéines et enfin à la mort de la cellule.

Les rayons UV (lampes UV émettant à 254 nm ou entre 260-270 nm) sont appliqués à la désinfection (réduction des germes) de l'air, des solutions ou des surfaces des salles d'opérations chirurgicales, des enceintes de laboratoire, des tables de travail (paillasse,...) ou de l'eau potable (efficacité limitée). Il est à noter qu'une exposition excessive aux rayons UV provoque une irritation des yeux et de la peau. En outre, les micro-organismes irradiés à l'UV peuvent être réactivés, car les altérations causées peuvent être réparées (photoréactivation à des longueurs d'ondes entre 340-500 nm par élimination des dimères formés et la néoformation des bases pyrimidiques d'origine). Le psoralène augmente considérablement la sensibilité des micro-organismes aux rayons UV en formant des liaisons croisées entre les deux brins du DNA.

2.3.2. Radiations ionisantes

A cause de leurs longueurs d'onde très courtes, elles libèrent une énergie plus importante et pénètrent aussi plus profondément dans la matière. C'est la raison pour laquelle on a voulu les considérer comme un moyen idéal de stérilisation à « froid » des denrées alimentaires (conserves). Malheureusement, ces radiations ionisantes ont un effet direct, non pas seulement sur les micro-organismes, mais aussi sur les substances (organiques) environnantes, et les installations permettant leur production sont coûteuses.

L'énergie produite par les rayons ionisants est suffisante pour ioniser des molécules des micro-organismes à stériliser. Les cellules végétatives (contenant de l'eau) sont tuées par des réactions secondaires des radicaux hydroxyls (extrêmement réactionnels) produits par l'irradiation. D'autres molécules, surtout dans les spores et les virus qui sont pauvres en eau, sont ionisées par des réactions avec d'autres composants cellulaires qui les rendent ainsi en structures non fonctionnelles et par conséquent inactivent ainsi les cellules.

On utilise pour la stérilisation :

- les rayons X (Röntgen) : rayons électromagnétiques de longueurs d'onde très courtes (0.1-10 nm) émis lors de la collision des rayons cathodiques avec un obstacle métallique ;
- les rayons gamma γ ($\lambda = 0.001 - 0.1$ nm) : rayons électromagnétiques émis par des éléments radioactifs naturels (source : cobalt 60) ou artificiels. Ils correspondent aux rayons X. On utilise les rayons X et γ souvent pour la stérilisation, car ils ont l'avantage d'avoir un pouvoir pénétrant élevé et efficient ;
- les rayons alpha α : noyaux d'hélium produits par désintégration de l'uranium, par exemple;
- les rayons bêta β : électrons rapides émis par des éléments radioactifs ou par une cathode.

Comme facteurs de stérilisation par les radiations ionisantes, on peut citer :

- la demi-valeur de l'épaisseur qui constitue l'épaisseur d'une couche qui laisse encore passer 50 % des rayons;

ex. : rayons β : 0.5 mm d'aluminium

rayons γ : 50.0 mm d'aluminium

- la dose létale pour les micro-organismes

On utilise les rayonnements pour la stérilisation des matériels hospitaliers surtout à usage unique (gants, aiguilles et seringues en plastic, cathéter, boîte de Pétri en plastic) ainsi que des médicaments et des produits alimentaires (U.S.A.).

2.3.3. Ondes soniques

Les ultrasons (ondes dans les champs supersoniques) à une fréquence de 15000 à plusieurs centaines de milliers d'Hertz/sec dénaturent les protéines, dispersent beaucoup de matériels et désintègrent les micro-organismes. Cet effet n'a été, jusqu'à présent, d'aucune valeur pratique dans la stérilisation. On utilise les ultrasons (la sonication) surtout pour ouvrir les cellules (bactériennes), recueillir le contenu intracellulaire et préparer les parois et les membranes cellulaires.

3. AGENTS CHIMIQUES

Parmi les nombreux produits chimiques ayant une activité bactériostatique (inhibition réversible des fonctions vitales) ou bactéricide (inactivation irréversible des fonctions vitales), le terme désinfectant est réservé à ceux qui sont rapidement bactéricides ou germicides à faible concentration.

Les désinfectants sont des agents à toxicité élevée et qui sont utilisés pour désinfecter / stériliser les locaux, les surfaces et les objets inanimés tels que les matériels chirurgicaux ou de laboratoire.

Les antiseptiques sont par contre des agents à toxicité moyenne et qui sont utilisés pour désinfecter les plaies, la peau ou les muqueuses, car n'altérant pas les cellules organiques vivantes.

Modes d'action

A l'encontre de la plupart des agents chimiothérapeutiques qui réagissent avec différents systèmes métaboliques, beaucoup de désinfectants agissent

- (1) soit en perturbant la perméabilité membranaire en dissolvant les lipides de la membrane cellulaire (savons, détergents, solvants organiques, composés phénoliques),
- (2) soit en altérant les protéines par coagulation et oxydation (oxydants, halogénés) ou
- (3) en dénaturant les acides nucléiques (colorants, oxydants, alkylants, agents mutagènes).

Le taux de mortalité des germes par des désinfectants augmente avec la concentration et la température. Les composés anioniques sont plus actifs à un pH bas alors que les composés cationiques le sont à un pH élevé. Cet effet résulte de la grande pénétration de la forme non dissociée de l'inhibiteur dans la cellule et possiblement aussi de l'augmentation en charges contraires (opposées) dans des constituants cellulaires.

3.1. Acides, bases et leurs sels

Les acides et les bases sont très bactéricides. Cependant, les mycobactéries y résistent. Les bactéries gram-négatives sont plus sensibles aux bases que les bactéries gram-positives. L'activité provient du groupement hydroxyl (présence des ions Ca^{2+} dans la paroi des bactéries gram-négatives).

NaOH et KOH ont un effet germicide à une haute concentration. Ils sont surtout utilisés pour nettoyer les récipients (surtout pour leur propriété dissolvante).

Le lait de chaux, préparé à partir de la chaux vive (CaO) ou de la chaux éteinte [$\text{Ca}(\text{OH})_2$], est utilisé pour la désinfection des matières fécales (durée : 6 h, solution préparée fraîchement).

Les acides organiques faibles exercent un grand effet pouvant être expliqué par le pH. L'acide lactique est le conservateur naturel de plusieurs produits de fermentation (yaourt, choucroute) et l'acide acétique (vinaigre) est utilisé dans la conservation des fruits et des légumes; les sels d'acide propionique ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) sont souvent ajoutés au pain et à d'autres aliments pour retarder la croissance des moisissures. D'autres acides organiques (acides benzoïque, salicylique, sorbique ou ascorbique) ou leurs esters sont aussi utilisés comme agents de conservation.

Le NaCl est utilisé depuis plusieurs siècles pour conserver des aliments périssables et des poissons (salaisons). Les solutions aqueuses d'acide sulfureux ou de bisulfite de sodium sont d'excellents conservateurs des denrées alimentaires (jus de fruits) au cours de leur préparation. L'anhydride sulfureux est utilisé pour la conservation des vins.

Le Na_2CO_3 a une faible activité désinfectante. Il est recommandé à une concentration de 0,5 % dans l'eau lorsqu'on bout les instruments. Il agit aussi comme agent de gonflement pour les impuretés organiques.

3.2. Alcools et autres solvants organiques

L'alcool est utilisé comme agent de conservation à partir de 15 %. L'action désinfectante des alcools aliphatiques augmente avec la longueur de la chaîne jusqu'à 8 - 10 atomes de carbone. Au-delà, leur solubilité dans l'eau devient très faible.

L'éthanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) est le plus utilisé, mais l'alcool isopropylique (isopropanol : $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$), moins volatil, est légèrement plus puissant (actif) et actuellement plus préféré.

L'action désinfectante des alcools, comme leur effet dénaturant des protéines et dissolvant des protéines membranaires, implique la participation de l'eau. L'éthanol est très actif (bactéricide) entre 50 - 70 % (80°) en solution aqueuse. L'alcool absolu (99,5 - 100 % v/v) est un faible désinfectant. L'alcool, inactif sur les spores, mais actif sur le bacille tuberculeux, est utilisé comme antiseptique dans la désinfection des mains, de la peau, des muqueuses, des crachats et des surfaces. Pour les opérations chirurgicales, on ne doit utiliser que de l'alcool débarrassé des spores par filtration. L'alcool enlève les couches des lipides de la peau qui la protègent des autres désinfectants (appliquer la glycérine à 2 %).

Pour les besoins médicaux et techniques, on utilise de l'alcool dénaturé contenant une substance difficilement extractible comme le camphre (0.5 %), la benzine de pétrole (1 %), l'éther, le phénol, le chloroforme ou le méthyl éthyl cétone. Il est à noter que l'alcool à brûler, qui est dénaturé par l'esprit de bois (méthanol impur) et les bases pyridiques (pyridines), dans le rapport de 9:1, n'est pas convenable pour la désinfection.

L'alcool méthylique (CH_3OH) est moins actif, mais est aussi nocif pour les yeux (il cause la cécité après absorption).

D'autres solvants organiques, comme l'éther, le benzène, le toluène, l'acétone ou le chloroforme, tuent aussi les bactéries mais ne sont pas des désinfectants sûrs et recommandables. Cependant, l'addition de quelques gouttes de toluène ou de chloroforme qui se dissolvent légèrement dans des solutions aqueuses, peut empêcher la croissance des champignons ou des bactéries. Le glycérol est bactériostatique à une concentration supérieure à 50 % et est utilisé comme conservateur pour les vaccins et autres produits biologiques, car il est non irritant pour les tissus.

3.3. Oxydants

Ils agissent par oxydation des protéines structurales de la cellule, mais surtout des enzymes, en se combinant aux groupements sulfhydryls-SH.

3.3.1. Ozone (O_3)

Il est un gaz très réactif obtenu par décharges électriques de l'oxygène. L'ozone pur est très explosif et toxique pour l'homme. Il est utilisé avec efficacité dans la désinfection de l'eau potable (détruire les substances génératrices de mauvais goût) et des piscines (détruire les substances qui colorent l'eau), mais il ne convient pas pour la désinfection des salles. Utilisé à une concentration de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, l'ozone tue en quelques minutes la plupart des germes ainsi que les spores.

3.3.2. Permanganate de potassium KMnO_4

Utilisé jadis pour le lavage des plaies, le KMnO_4 est souvent remplacé aujourd'hui par d'autres produits à cause de son faible effet désinfectant. Il est utilisé comme antiseptique urétral à une concentration de 1:1000. [0,1 % - 0,01 %].

3.3.3. Eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Elle agit en inhibant certaines enzymes de la croissance fermentative. En solution aqueuse à 3 %, l'eau oxygénée est un désinfectant efficace utilisé surtout comme antiseptique dans les lavages des plaies ou de la bouche. Mais son efficacité se trouve limitée par sa décomposition rapide au contact des tissus. Cependant, certaines bactéries possédant la catalase sont peut susceptibles à l'action de H_2O_2 ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Instable, elle ne peut pas être utilisée pour la désinfection des surfaces, mais elle est employée dans l'industrie alimentaire et dans le nettoyage des conduites d'eau à la place des produits chlorés, parce que sans odeur et inoffensive. Les perborates et les persulfates alcalins sont des composés susceptibles de donner naissance à de l'eau oxygénée.

3.3.4. Acide peracétique

Il est un oxydant plus fort que l'eau oxygénée. Il est utilisé sous forme de vapeur pour la stérilisation des locaux pour animaux stériles (sans germes) ou en solutions

de 0.5 - 2 % dans la désinfection des mains, de petites surfaces et des instruments. Il est microbicide et agit sur les bactéries, les virus et sous certaines conditions sur les spores.

3.4. Halogénés

Ils constituent aussi un groupe d'oxydants.

3.4.1. Chlore et ses composés

Le chlore est utilisé comme gaz ou comme composés organiques et inorganiques à cause de son activité germicide envers les bactéries (bactéricide), les virus (virucide) et les champignons (fongicide). Le chlore est très utilisé dans la désinfection de l'eau potable et des piscines, des locaux et des objets et dans le traitement des eaux polluées. Il a un effet sûr et rapide pour du matériel propre, mais est moins satisfaisant pour du matériel contenant des substances organiques qui se lient au chlore.

Le chlore se combine à l'eau pour former de l'acide hypochloreux (HOCl) qui est un oxydant fort (pouvoir oxydant intense de l'oxygène naissant). La plupart des micro-organismes sont tués instantanément, sauf les formes sporulées.



Les hypochlorites de calcium, de potassium ou de sodium (eau de Javel) sont des oxydants forts qui sont utilisés (200 ppm Cl_2) pour désinfecter des surfaces propres dans les industries alimentaires et laitières et dans les restaurants ainsi que la bouche et des bouteilles pour nourrissons. En thérapeutique, on utilise des solutions d'hypochlorites plus diluées comme la liqueur de Labarraque ou le soluté de Dakin comme antiseptique

Les chloramines (composés organiques : organochlorés) ont l'avantage de libérer lentement et constamment l'acide hypochloreux et le chlore (activité plus prolongée, mais moins efficace). Elles conviennent ainsi particulièrement pour la désinfection des moins, des vêtements et des surfaces.

3.4.2. Iode I_2

L'iode, qui est un oxydant qui se combine irréversiblement avec les protéines (ex. : résidus tyrosine), est utilisé depuis très longtemps en médecine comme antiseptiques désinfectant de la peau (ex. : champs opératoires) ou des plaies superficielles (solution à 0.5-1 % d'iode dans l'alcool : alcool iodé). Il est un germicide à large spectre d'action (bactéries, champignons et aussi virus). Il est plus soluble dans l'eau en présence de KI ou de NaI. Les solutions alcooliques iodo-iodurées comme les teintures d'iode (à 2 - 7 % d'iode dans l'alcool aqueux contenant KI) sont des bactéricides actifs recommandés comme antiseptiques de la peau et des plaies.

La teinture d'iode a un effet douloureux et destructif sur les tissus exposés (caustique et toxique), d'où l'utilisation des organo-iodés qui permettent de limiter cet inconvénient.

L'iode forme spontanément avec des détergents des complexes dits iodophores qui constituent un réservoir d'iode fixe en équilibre avec l'iode libre à une concentration effective mais non irritante. Les iodophores sont de plus en plus utilisés dans

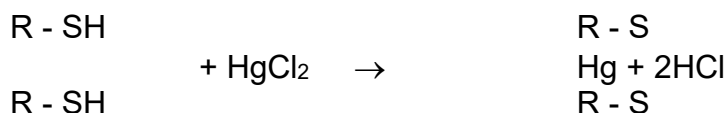
l'hygiène vétérinaire pour la désinfection des étables, des couveuses et dans l'industrie alimentaire.

3.4.3. Brome Br₂

Le brome est, comme le chlore et l'iode, un désinfectant fort, mais ayant une action irritante. La solution alcoolique à 8,7 % de brome est utilisée à la place de l'iode pour éviter l'allergie due à l'iode. Le brome est employé dans la préparation et la désinfection de l'eau potable et de l'eau de bain. Cependant, on doit faire attention à la formation du bromoforme dans l'eau et à sa concentration dans l'air des salles de bain.

3.5. Métaux lourds et leurs sels

Les ions métalliques, qui entrent en solutions aqueuses, peuvent développer une activité microbicide à de très faibles concentrations : activité (pouvoir) oligodynamique (oligo = peu, trace). Ces ions réagissent comme les oxydants en se liant aux groupements sulfhydryls ou autres des enzymes ou en précipitant ces dernières.



Ils sont ainsi effectifs à moins de 1 ppm (million). Mais leur action antimicrobienne peut être inversée par des composés sulfhydryls.

Le plus actif est le cadmium, suivent ensuite l'argent, le bronze (laiton ou cuivre jaune), le cuivre, le mercure, le zinc et même l'or.

L'argent est principalement employé pour la désinfection. Il peut être utilisé dans la préparation de l'eau potable. Les feuilles d'argent sont utilisées dans le traitement de grandes plaies telles que les brûlures. Le nitrate d'argent (très corrosif) est utilisé comme pierre infernale (philosophale) dans le traitement des plaies et en gouttes oculaires (1 %) pour la prophylaxie de la gonorrhoe chez les nouveau-nés.

Le mercure est utilisé sous forme sublimée (HgCl₂ à une dilution de 1 : 1000) comme antiseptique. Les sels inorganiques (HgCl₂, Hg(CN)₂, HgO, HgI₂) sont très toxiques, tandis que ses sels organiques (organomercuriels) le sont moins et sont susceptibles pour la peau (ex. : mercurochrome, merthiolate, métaphène, mercurobutol = Mercryl^R). Ils sont utilisés comme antiseptiques non irritants et comme conservateurs biologiques pour les sérums et les vaccins.

Le cuivre ou ses sels (CuSO₄) agissent comme fongicides puissants et sont très utilisés en agriculture (et non plus en médecine) et aussi dans la lutte contre les algues dans les piscines.

Les anions inorganiques sont moins toxiques que certains cations. L'acide borique est ainsi largement utilisé comme antiseptique doux (ex. : borate de phénylmercure).

3.6. Phénol et ses dérivés

Le phénol (C₆H₅OH), un acide faible, est un dénaturant effectif des protéines et aussi un détergent. Son action bactéricide et fongicide implique la lyse cellulaire : il réagit

avec les protéines et le protoplasme et attaque aussi la paroi cellulaire. Il est bactéricide ou bactériostatique selon la concentration, mais il est peu actif sur les formes sporulées. Il est utilisé pour la désinfection des locaux, des matériels de laboratoire ou chirurgicaux et des produits pathologiques, mais il est actuellement remplacé par ses dérivés moins caustiques. Son action, favorisée en présence de sels de sodium ou de potassium, est inhibée en présence de soude et est considérablement atténuée par les matières organiques.

L'activité antimicrobienne du phénol augmente en substituant un atome d'hydrogène sur le noyau phénolique par un halogène ou un groupement alkyl qui augmentent la polarité du groupement phénolique -OH et rendent le reste de la molécule plus hydrophobe. La molécule devient ainsi plus tensioactive (ex. : les crésols). L'allongement de la chaîne alkyl jusqu'à heptyl (C₇H₁₅) augmente l'action désinfectante. Les crésols (ortho, meta, ou para), peu solubles dans l'eau, forment des émulsions avec des savons (ex. : le lysol) et sont ainsi utilisés en solutions savonneuses (savons de crésol ou de lysol) comme désinfectants des vêtements, des instruments et des locaux, même en présence de matières organiques. Le phénol et ses dérivés de crésol sont ainsi utilisés avec du savon dans la désinfection des linges (solutions à 0.5 - 5 % pendant 2 heures). Une mixture de tricrésol (o-, m-, p- méthylphénol) et du savon est largement utilisée comme désinfectant des matériels bactériologiques abandonnés. Son action n'est pas affaiblie (réduite) par les matières organiques.

La substitution par plusieurs atomes d'halogène et par des groupements aliphatiques ou aromatiques supplémentaires augmente l'activité désinfectante. Ces composés sont utilisés comme antiseptiques de la peau, des mains, des cavités naturelles ou des surfaces (ex. : le thymol, l'hexachlorophène).

3.7. Agents tensioactifs ou surfactants

Les substances tensio-actives (savons et détergents synthétiques) sont des molécules qui contiennent un groupement hydrophile (partie polaire) et un groupement hydrophobe (souvent une longue chaîne hydrocarbonée) et qui, en solution aqueuse, forment des micelles (larges agrégats) dans lesquelles la partie hydrophile est en contact avec l'eau.

Ces composés agissent comme humectants (mouillants), émulsionnants ou détergents et forment en solution de la mousse par agitation. Ils peuvent extraire les lipides ou les protéines des membranes et les solubiliser dans l'eau sous forme des micelles (les mycobactéries et les pseudomonades y sont résistantes).

3.7.1. Savons et détergents anioniques

La partie polaire des savons est un sel sodique ou potassique d'un acide organique de poids moléculaire élevé (ex. : acide oléique, linoléique,...), tandis que, dans les détergents, elle est un sel alcalin des sulfates et sulfonates organiques.

L'action des savons (et aussi des détergents) est mécanique : ils réduisent les forces de tension superficielle et augmentent le pouvoir mouillant de l'eau; les germes sont emprisonnés dans la mousse, puis éliminés par le rinçage.

Les savons n'ont pour la plupart aucune propriété désinfectante, mais facilitent, en tant qu'humectants et émulsionnants, le processus de désinfection. Leur combinaison avec les phénols augmente l'activité bactéricide de ces derniers et

convient à la désinfection des surfaces. Certains savons (ex. : ricinoléate de sodium) ont des propriétés antiseptiques et sont utilisés en hygiène buccopharyngée.

Les détergents anioniques, chez lesquels le groupement anionique est actif, sont faiblement bactéricides, peut être parce qu'ils sont repoussés par la charge négative nette de la surface bactérienne (ex. : laurylsulfate de Na). Ils sont utilisés surtout pour renforcer l'action d'autres antiseptiques en favorisant leur dissolution et leur pénétration (ex : Mercryl Laurylé^R = mélange mercurobutol + laurylsulfate de Na). Les détergents non ioniques ne sont pas antimicrobiens et servent même d'aliments aux micro-organismes (ex. : tween 80).

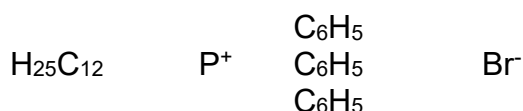
3.7.2. Détergents cationiques

Les détergents cationiques ont un groupement hydrophile positif : le groupement cationique actif avec pouvoir mouillant et émulsionnant. Ils sont actifs contre toutes sortes de bactéries (activité bactériostatique) et n'agissent comme bactéricides que si l'un des radicaux possède une chaîne de 8-18 C atomes. L'allongement de la chaîne (8-18 C atomes) augmente leur action bactéricide, mais diminue leur solubilité.

Les plus effectifs comme désinfectants sont les sels d'ammonium quaternaire qui sont utilisés largement comme antiseptiques de la peau et dans la désinfection des ustensiles pour aliments. Ils agissent surtout sur les bactéries gram-positives (pas sur les mycobactéries et certains virus) à de faibles concentrations (1 pp mille à 1 pp millions). Ils désorganisent la membrane cellulaire et causent ainsi la libération des métabolites. Leur action détergente dissout les films des lipides protégeant les bactéries. Leur pouvoir désinfectant est fortement réduit par des composés protéiques (ex. : sérum, lait), tandis que les savons, les phospholipides et les détergents anioniques les rendent inactifs (précipitation).

Les composés quaternaires sont utilisés dans la désinfection des mains et des surfaces, dans le nettoyage des linges, dans la conservation et dans la lutte contre les algues dans les piscines.

- Chlorure de benzalkonium (Sterlane^R, Zéphiro^R)
- Bromure de céthexomium (Biocidan^R)
- Bromure de cétrimonium (Cetavlon^R)
- Le myxal est un composé phosphonium (et non ammonium) : c'est le bromure de dodécyl-triphényl-phosphonium.



3.7.3. Tensides ou composés amphotères

Comme les acides aminés, ils forment des cations, des anions et des zwitterions dans l'eau (R-NH-CH₂-COOH). Ils ne supportent pas les savons et les détergents. Ils sont actifs sur les bactéries (même les mycobactéries) et les champignons et non sur les virus. Ils sont utilisés dans la désinfection des mains, des linges et des services alimentaires (ex. : Gercid^R, Tego^R103 G ou S).

3.8. Agents alkylants

Ce sont des désinfectants surtout gazeux (formaldéhyde, oxyde d'éthylène,...) qui agissent en remplaçant (en alkylant) l'atome labile d'hydrogène sur les groupements -NH₂, -OH, COOH et -SH présents dans les protéines, les acides nucléiques et d'autres composants cellulaires. Le formaldéhyde conduit à des réactions réversibles, alors que la liaison époxyde à haute énergie de l'oxyde d'éthylène cause des réactions irréversibles.

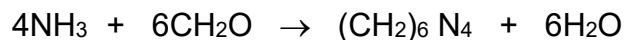
Figure : Réactions du formaldéhyde et de l'oxyde d'éthylène avec les groupements amino. Des liaisons peuvent être formées entre les groupements d'une même molécule ou des molécules différentes.

L'activité bactéricide des agents alkylants est effective aussi bien sur les formes végétatives que sur les spores (durée d'action : 6 h), ceci parce qu'ils pénètrent facilement les cellules sans avoir besoin d'eau pour leur action. On les utilise pour stériliser les objets et les produits instables à la chaleur (boîtes de Pétri, tubes à essai, poudres) ou pour désinfecter les locaux (ex. : chambres des malades).

3.8.1. Formaldéhyde

Il se trouve sur le marché en solution aqueuse de formol (formalin) contenant 37 % de formaldéhyde. Il est utilisé à 0.1 % dans la préparation des vaccins pour inactiver les bactéries, les virus ou les exotoxines bactériennes sans pour autant détruire leur antigénicité.

La forme gazeuse (vapeurs ou fumigations) obtenue par chauffage du formol avec de l'alcool à brûler dans un appareil spécial est utilisée pour la désinfection des surfaces sèches et des locaux. Pour désinfecter 1 m³ d'air, il faut 5 g de formaldéhyde et 15 ml d'alcool à brûler (laisser agir pendant 6 h). L'odeur et le pouvoir irritant (toxique) du formaldéhyde sont éliminés par la suite par l'ammoniaque gazeux (1 h d'action) avec lequel il forme un composé peu nocif et inodore (une hexamine) :



Hexaméthylène tetramine (Urotropine^R)

Des préparations à base d'aldéhydes (formaldéhyde, glutaraldéhyde à 2 %) sont aussi utilisées dans la stérilisation des linges d'hôpital, des surfaces, du matériel chirurgical ainsi que d'autres objets et produits ne supportant pas la chaleur (objets en plastique ou en caoutchouc, produits chimiques en poudre,...).

3.8.2. Oxyde d'éthylène

C'est un gaz très explosif et inflammable (à partir de 3 % V/V), microbicide et toxique pour les hommes et les animaux (100-200 mg/l : irritation des voies respiratoires et de la peau, nécrose, mort). Il est utilisé sous forme d'une mixture avec 10 % ou 85-90 % de CO₂ ou de fluorocarbone (Fréon). La concentration maximale utilitaire est de 10 ppm = 18 mg/m³.

L'oxyde d'éthylène, qui agit comme bactéricide, sporicide et virucide (surtout à basse température), est largement utilisé pour stériliser les objets thermosensibles : objets en plastique ou en caoutchouc, tissus, équipement chirurgical, linges d'hôpital, livres et articles des malades.

3.8.3. Triéthylène glycol OH - C₂H₄ - O - C₂H₄ - O - C₂H₄ - OH

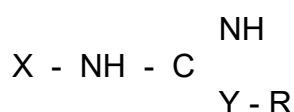
Il peut être utilisé pour désinfecter les locaux, car non toxique, inodore et sans goût. La vaporisation du triéthylène glycol liquide tue les germes jusqu'à une concentration de 1:250.000.000. Les spores y sont résistantes.

3.8.4. β -propiolactone

Il est un produit liquide qui émet des vapeurs bactéricides, sporicides, virucides et fongicides à la température ordinaire. Plus actif que les précédents alkylants, il est utilisé pour la stérilisation des matériels, des locaux et même des milieux de culture, pour l'inactivation des cultures, la préparation des vaccins et la conservation des produits biologiques.

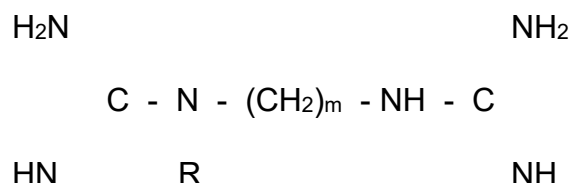
3.9. Guanidines et biguanidines

3.9.1. Guanidines



Ce sont des composés dans lesquels X est un atome d'hydrogène ou un reste guanil, Y un oxygène, un soufre ou un groupement $-\text{NH}_2$ et R une chaîne aliphatique de 10 - 16 C- atomes. Elles ont un spectre d'action antimicrobienne large.

3.9.2. Biguanidines



Ces composés conviennent lors de l'utilisation de l'eau très dure. Leur spectre d'action sur les bactéries et les champignons est large (ex. : chlorhexidine, Incidin^R perfect, Teta-actif^R, Teta-S^R, Biguasan^R, Lysoformin^R spécial,...).

3.10. Détermination du pouvoir désinfectant des agents chimiques

Les buts poursuivis sont :

- établir l'activité désinfectante (germicide) théorique d'un agent chimique par rapport à d'autres; on utilise pour ce fait la méthode du coefficient phénol et celle du porte-germes ;
- rechercher l'efficacité d'un agent chimique après la désinfection d'un objet / matériel ou d'une surface; on emploie les méthodes de dénombrement : méthodes des empreintes (ruban adhésif) ou de l'écouvillonnage et l'épreuve de rinçage (utilisant des godets).

3.10.1. Méthode du coefficient phénol

C'est une méthode ancienne qui utilise le phénol comme désinfectant standard et le bacille typhique comme germe test. Le coefficient phénol d'un produit désinfectant est le rapport entre la concentration stérilisante minimale du phénol et celle du désinfectant à étudier:

$$\text{Coefficient phénol} = \frac{\text{dilution du phénol}}{\text{dilution du désinfectant}}$$

La technique consiste à comparer dans des conditions identiques l'action d'une série de dilutions de la substance à tester sur la croissance de *Salmonella Typhi* par rapport à celle d'une série de dilutions du phénol. Dans le test américain, une culture de *S. Typhi* ou de *Staphylococcus aureus* est diluée 1:10 avec différentes concentrations du désinfectant à tester et du phénol. Prélever dans chacun des tubes une goutte du mélange et incubé pendant 48 h à 37°C sur un milieu neuf. Noter la dilution la plus élevée du désinfectant et celle du phénol qui ont tué les germes après 10 min (7 min 30 sec) d'incubation à 20°C.

Cette méthode est critiquable, d'une part parce que l'action du phénol sur les micro-organismes n'est pas obligatoirement comparable à celle du désinfectant à étudier et, d'autre part, parce que la sensibilité de *S. Typhi* choisi comme souche standard n'est pas nécessairement la même que celle d'une autre espèce bactérienne.

3.10.2. Méthode des porte-germes

Les germes sont fixés sur des substances inertes dites porte-germes puis mis au contact du désinfectant à étudier ou de ses dilutions durant un temps donné. On recherche par culture en milieux neufs si les micro-organismes ont résisté ou survécu à l'agent antimicrobien. Ces porte-germes sont des bandelettes de papier filtre de qualité standard que l'on immerge dans une culture de 24 heures en bouillon d'une bactérie-test. Ils sont utilisés tels quels à l'état humide ou après dessiccation durant 24 h à 37°C. Le germe-test est un germe qui, en culture en bouillon, résiste 5 min. à une température de 20°C à une solution de phénol diluée à 1/80.

3.10.3. Méthodes de dénombrement

L'action d'un agent désinfectant sur les équipements des industries alimentaires (chaînes de préparation, tables de coupe, couteaux,...) ou des laboratoires est appréciée par un dénombrement des germes à l'aide d'un des procédés ci-après.

3.10.3.1. Méthode des empreintes

On applique un ruban adhésif sur la surface mesurée sur le matériel désinfecté à examiner. On le détache et on l'applique à la surface d'un milieu gélosé sec durant quelques dizaines de secondes. Après incubation à la température optimale pendant 24 h, on dénombre les colonies développées. Les germes recherchés sont surtout les *Salmonella* (Typhi), les *Staphylococci*, les *Streptococci* (D), les *Enterococci* et les *Enterobacteriaceae*.

3.10.3.2. Méthode de l'écouvillonnage

Elle consiste à examiner des surfaces irrégulières à l'aide des écouvillons de coton hydrophile ou d'alginate de sodium. On mouille préalablement les zones à explorer. Dans ces conditions, on arrive à récupérer 50 % des micro-organismes.

3.10.3.3. Épreuve de rinçage

Elle permet de rechercher l'action des ammoniums quaternaires sur des surfaces contaminées. On remplit des godets (petits gobelets) avec du lait écrémé stérile auquel on ajoute un mélange de *S. aureus* et d'*E. coli*. Après 15 min de contact, le godet est vidé, rempli avec de la solution d'ammonium quaternaire, puis vidé à nouveau. On dénombre les germes ayant survécu à l'action du désinfectant après écouvillonnage des parois internes du godet et culture. Les résultats sont comparés à ceux d'un godet-témoin sans antiseptique.

4. INACTIVATION DES VIRUS

L'inactivation des particules virales consiste en une perte permanente de leur infectivité. Les agents inactivants ont souvent une activité sélective : ils ont une action plus prononcée sur certains constituants du virus que sur d'autres. Cependant, les résultats varient selon la composition du virus. Les différents agents inactivants (physiques et chimiques) sont ainsi groupés selon leur principal site d'action.

4.1. Agents nucléotropes

Ce sont des agents qui affectent exclusivement les acides nucléiques des virus contenant 50 % d'acide nucléique et aussi d'autres constituants des virus ayant un contenu en acide nucléique de 1 %. Ce sont la lumière UV à 260 nm, le formaldéhyde (acide nucléique monocaténaire et groupement amino), l'acide nitreux, l'hydroxylamine (action mutagène).

4.2. Agents protéotropes

Ce sont des agents qui dénaturent les protéines de la capside : la chaleur, la lumière UV à 235 nm, les enzymes protéolytiques (trypsine, pronase), le pH acide faible, les composés sulfhydryls ou à réaction sulfhydryle, les détergents et les concentrations élevées d'urée ou de guanidines.

4.3. Agents lipolytiques

Ce sont des agents qui dissolvent les lipides des enveloppes virales : les enzymes lipolytiques (phospholipases A et C), les solvants des lipides (éther à 20 %).

4.4. Agents universels

Ce sont des agents non sélectifs : les rayons X (production des composés chimiques hautement réactionnels qui interagissent avec des composants viraux), les agents alkylants (oxyde d'éthylène, acide nitreux, hydroxylamine), l'action photodynamique (oxydation par la lumière visible : photooxydation en présence de certains colorants : orange d'acridine, proflavine, bleu de méthylène, rouge-neutre, riboflavine, porphyrines).

CHAPITRE XIV : MICROSCOPIE

1. INTRODUCTION

Les cellules sont très petites et complexes. Il est de ce fait difficile d'observer leur structure, de découvrir leur composition moléculaire et plus difficile encore de savoir comment fonctionnent leurs constituants. Ainsi, des techniques expérimentales, parmi lesquelles la microscopie, ont été développées pour étudier les cellules, leurs structures et leur fonctionnement.

1.1. La Microscopie

Elle est la science de l'emploi interprétatif et des applications des microscopes. L'histoire du développement de la microscopie est étroitement liée au début de la microbiologie. Des descriptions des protozoaires (1674) et des bactéries (1683) ont été rapportées pour la première fois par ANTONY VAN LEEUWENHOEK qui utilisa de simples petites lentilles biconvexes, maintenues entre deux plaques de métal avec un assemblage ingénieux permettant de déplacer l'objet et de faire une mise au point. Ce premier microscope avait une résolution de 1,4 μm et un grossissement de 270 x (200 - 300 x).

1.2. Le Pouvoir de résolution

Le pouvoir de résolution d'une lentille est défini comme la capacité de distinguer un détail sur un objet au moyen des yeux, du microscope, de la caméra ou de l'appareil photographique.

1.3. La Limite de résolution

La limite de résolution est la distance minimale entre deux points se trouvant sur un objet qui permet de les distinguer comme deux points séparés ou différents sur cet objet sous observation. ABBE a dérivé de la loi de diffraction la formule suivante :

$$D = 0,61 \times \lambda / NA$$

NA (ouverture numérique) = $n \times \sin \alpha$

NA pour objectifs à immersion = 1,2 - 1,4

n = index de réfraction du milieu ($n < 1,40$)

α = le demi-angle de l'ouverture ($\sin \alpha < 1,0$)

λ = longueur d'onde de la lumière

pour le blanc : $\lambda = 550 \text{ nm}$; $d = 250 \text{ nm}$

pour le violet monochromatique : $\lambda = 400 \text{ nm}$; $d = 170 \text{ nm}$.

NA : numerical aperture : c'est la propriété d'une lentille qui décrit la quantité de lumière qu'elle peut prendre (absorber).

1.4. Le Contraste

Le contraste est basé sur l'absorption différentielle de la lumière entre l'échantillon sous observation et son fond. Il contribue à la clarté de l'image.

2. MICROSCOPIE OPTIQUE

La microscopie optique (de lumière) est la microscopie dite « photonique » où l'on utilise les rayonnements lumineux ou photons.

2.1. Microscope simple : la loupe

Le microscope simple est composé d'une seule lentille agrandissante ayant un champ large et produisant des images justes et verticales ainsi que d'une source lumineuse. Son usage est limité par une faible ouverture numérique. Il a une limite de résolution de $\pm 10 \mu\text{m}$. Il est utile pour les dissertations et la mesure et l'examen des réactions d'agglutination. Le compteur des colonies bactériennes est un microscope simple modifié.

2.2. Microscope optique monoculaire / binoculaire

Il comprend deux systèmes de lentilles :

- les lentilles objectives (ou objectifs), se trouvent tout près de l'objet à observer, sont très petites et reçoivent de la lumière ;
- les lentilles oculaires (ou oculaires), se trouvant tout près des yeux de l'observateur.

Le pouvoir de résolution du microscope optique dépend de la longueur d'ondes de la lumière qui se situe entre 0,4 μm et 0,7 μm . En pratique, les bactéries et les mitochondries ($\approx 500 \text{ nm}$) sont les plus petits objets pouvant être vus au microscope optique, car des détails encore plus petits que ceux-là sont obscurcis par les effets de diffraction optique.

La diffraction optique est due à l'interférence entre les ondes qui ont parcouru des trajectoires légèrement différentes à travers un champ optique. Aucun raffinement des lentilles ne peut surmonter cette limitation imposée par la nature ondulée de la lumière. Ainsi, sous certaines conditions, le microscope optique (pour la lumière visible) a une limite de résolution de 0,2 μm et des grossissements jusqu'à 1000 X (avec lampe à filament de tungstène et condensateur pour centrer et focaliser la lumière sur l'objet).

2.3. Microscope à fluorescence

Certains composés appelés fluorochromes ont l'habilité d'absorber la lumière à une longueur d'onde donnée et de l'émettre à une autre longueur d'onde plus longue (ex. : vitamines, stéroïdes, porphyrines, acides nucléiques, rhodamine, auramine, acridine et fluorescéine).

Le microscope à fluorescence est basé sur le principe de la suppression de la lumière incidente par absorption sélective, et de la transmission de la lumière absorbée par le spécimen qui est réémise à une longueur d'onde modifiée.

La source de lumière (ex. : lampe halogène-quartz, arcs de mercure haute pression et arcs de xénon) doit produire un faisceau lumineux à une longueur d'onde appropriée. Un filtre d'excitation supprime les longueurs d'ondes non effectives pour l'excitation du fluorochrome utilisé. Le faisceau incident est ainsi réduit à un champ limité des longueurs d'ondes. La lumière, fluorescente par l'échantillon recouvert du fluorochrome, est transmise à travers un filtre-barrière qui supprime la longueur d'onde incidente du faisceau. Ainsi, seule la lumière (les rayons lumineux) qui a interagit avec le spécimen avec un changement de longueur d'onde contribue à l'intensité dans le plan de l'image (usage en immunochimie).

2.4. Autres types de microscopes optiques

- Microscopes à contraste de phase et à contraste différentielle d'interférence ;
- Microscope à champ noir ;
- Microscope à polarisation.

3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

3.1. Principe

La limite de résolution imposée par la longueur d'onde de la lumière visible peut être réduite en utilisant des électrons à la place de la lumière. Car les électrons ont une longueur d'onde assez courte. Plus la longueur d'onde est courte, plus le pouvoir pénétrant est élevé.

Le microscope électronique utilise la propriété de différentes structures de la matière de retenir ou de laisser passer un faisceau d'électrons. Vers la fin des années 1940, les premiers microscopes électroniques furent construits. L'utilisation des faisceaux d'électrons ayant une longueur d'onde de l'ordre de 10^4 à 10^5 plus courte que celle de la lumière U.V. réduisit ainsi la résolution de $0,2\ \mu\text{m}$ du microscope optique à $0.0005\ \mu\text{m}$ ($0.5\ \text{nm}$).

Le principe de base du microscope électronique implique l'émission d'un faisceau d'électrons à partir d'une cathode, son accélération dans un tube à vide et sa focalisation sur le spécimen à observer. L'image est créée en utilisant les différences de densité en électrons du spécimen.

Il existe deux types de microscopes électroniques : microscope électronique à transmission (TEM) et microscope électronique à balayage (SEM).

3.2. Microscope électronique à transmission (TEM : Transmission Electron Microscop))

La source d'illumination du microscope électronique est un filament de tungstène ou cathode qui est placé au sommet d'une colonne cylindrique d'environ 2 mètres de haut et dans laquelle on a créé le vide. Lorsque ce filament de tungstène est chauffé, il émet un faisceau d'électrons qui sont accélérés, capturés, condensés dans le vide entre 25-125 KV et focalisés sur l'échantillon au bas de la colonne par une première série d'anneaux magnétiques (comme des lentilles condensatrices électromagnétiques: anodes) se trouvant près du filament de tungstène. Le faisceau d'électrons ainsi focalisé traverse le spécimen (comme la lumière) selon la densité locale de la matière à observer : des régions denses du spécimen absorbent et retardent (ou dispersent) le faisceau d'électrons, tandis que des régions moins denses permettent le passage du faisceau sans le modifier. Ainsi, les régions denses de l'échantillon se présenteront comme des surfaces à flux d'électrons réduit, car les électrons dispersés ou absorbés sont perdus pour l'image.

Après le passage à travers l'échantillon, le faisceau d'électrons est refocalisé à travers une seconde série d'anneaux magnétiques (servant de lentilles objectives électromagnétiques). Enfin, le faisceau refocalisé est agrandi par une troisième série d'anneaux magnétiques (anneaux projecteurs) et dirigé sur un écran phosphorescent pour visualiser l'image (fluorescence de matériel phosphorescent de l'écran au contact avec les électrons) ou transféré sur une plaque (film) photographique.

La microscopie électronique à transmission utilise un faisceau d'électrons traversant directement l'échantillon à observer, résultant à une image bidimensionnelle de l'échantillon sous observation.

La longueur d'onde d'un électron décroît si l'électron se déplace plus vite ; ce qui augmente son pouvoir pénétrant. Ainsi, dans un microscope électronique avec un voltage accélérant de 100.000 volts, la longueur d'onde d'un électron est de 0.004 nm. En théorie, la résolution d'un tel microscope devrait être d'environ 0.002 nm. Cependant, puisque des aberrations des lentilles d'électrons sont plus grandes que celles de lentilles de verre, la limite de résolution pratique de la plupart de microscopes électroniques modernes est de 0.1 nm (1\AA) avec un grossissement d'environ 100.000 x.

L'épaisseur (profondeur) de l'échantillon qui peut être examiné dépend du pouvoir pénétrant des électrons ainsi que de leur énergie. Pour cette raison, des microscopes électroniques à haut voltage ont été construits pour accélérer le faisceau d'électrons à 1.000.000 V au lieu de 100.000 V. Ces appareils géants permettent l'examen des sections (coupes) d'échantillons aussi épaisses que 1 - 2 μm (au lieu de sections minces habituelles de 20 - 80 nm).

3.3. Microscope électronique à balayage (SEM : Scanning Electron Microscop)

Le microscope électronique à balayage utilise un faisceau d'électron modifié qui est rapidement dirigé sur la surface de l'échantillon et reflété par celle-ci. Comme le faisceau heurte le spécimen enrobé sur du métal, des électrons secondaires sont émis de la surface métallique enrobant le spécimen, détectés et convertis en une image sur l'écran téléviseur ou enregistrés sur un film photographique. Le faisceau d'électrons modifiés utilisé dans le SEM permet de créer une image tridimensionnelle (« en relief ») du spécimen. La résolution atteinte avec le SEM est limitée à environ 10 nm avec un grossissement de 20.000 X. Cette technique trouve son application entre les cellules uniques intactes et les petits organismes.

3.4. Préparation de l'échantillon pour la microscopie électronique

Les échantillons biologiques à examiner au M.E. nécessitent une préparation préalable spéciale comprenant les procédures ci-dessous.

1° La fixation : pour éviter une distorsion due au séchage (nécessaire à cause du vide), l'échantillon humide doit être fixé par des agents comme

- les aldéhydes (formaldéhyde, glutaraldéhyde) qui couplent les molécules des protéines par covalence ;
- le tétraoxyde d'osmium (OsO_4) qui se lie aux doubles couches lipidiques et aux protéines des tissus et les stabilise.

2° La déshydratation dans une série des solutions d'éthanol à concentrations croissantes.

3° L'inclusion (le noyage ou l'enrobage) dans de la résine polymérisante (époxy comme Quetol^R-812 ou Epon^R-812; LR White; Lowicryl;...) ou dans de l'agar de l'échantillon sectionnés en coupes ultrafines pouvant être observées au microscope électronique.

4° La section : l'échantillon est sectionné en coupes minces (thin sections) ou coupes ultrafines de 20 - 100 nm d'épaisseur dans un ultramicrotome à l'aide d'un couteau de verre ou de diamant. Ceci pour permettre aux électrons de passer au travers de l'échantillon (pouvoir pénétrant limité des électrons).

5° La coloration par certains produits chimiques pour créer le contraste (ou l'amélioration pour certains constituants cellulaires) et rendre ainsi le spécimen visible en accentuant les différences en densité en électrons entre l'échantillon et le fond (background).

- La coloration négative : le fond (background) est coloré par un métal lourd (sels d'uranium ou d'or) ou par l'acide phosphotungstique qui est appliqué sur le film-support de l'échantillon (formvar ou carbone), en laissant l'échantillon exempt du colorant : le spécimen, complètement entouré par un colorant impénétrable aux électrons, apparaît brillant sur un fond noir. Cette technique est largement appliquée dans l'étude des macromolécules, des virus, des bactériophages et des organites bactériens dans un système sans cellules. Elle ne nécessite pas une fixation préalable de l'échantillon à observer.

- La coloration positive des sections minces (après fixation et inclusion) : les coupes ultrafines peuvent être traitées avec un sel d'un métal lourd (acétate d'uranium ou citrate de plomb) pour augmenter le contraste entre les régions denses et moins denses.

6° Le marquage spécifique de certaines macromolécules de la cellule :

* par leurs anticorps homologues spécifiques couplés à des molécules électrocompactes (ou électrodenses) comme la ferritine, la peroxydase ou à un atome lourd comme l'or (immunochimie ou immunomicroscopie électronique) ou

* par l'incorporation d'un précurseur radioactif (autoradiographie microscopique), facilite leur localisation cellulaire ou subcellulaire ou celle de leurs sites de synthèse.

7° Autres techniques plus récentes de préparation des échantillons comme la cryomicrotomie, la freeze-fracture (cryodécapage), la freeze-etching (cryoombrage ou cryogravure) ou la freeze-substitution, qui utilisent une congélation rapide, n'exigent pas les étapes de fixation et d'inclusion et évitent toutes les altérations et les artefacts inhérents aux méthodes précédentes.

4. Rôles de la microscopie

La microscopie optique renseigne sur la morphologie et la mobilité des micro-organismes.

La microscopie électronique à transmission renseigne sur la forme, les structures superficielles et fines ou internes (ultrastructure) ainsi que sur l'organisation interne de cellules microbiennes en donnant des images bidimensionnelles.

La microscopie électronique à balayage visualise exactement la forme et les structures externes des micro-organismes en donnant des images tridimensionnelles (de leur interactions physiques des microbes entre eux ou lors de contact avec les surfaces solides ou vivantes d'autre nature (ex. : adhérence à la surface des cellules eucaryotes).

REFERENCES

1. Allgemeine Mikrobiologie, 6. Auflage. 1985.
Hans. G. Schlegel – Georg Thieme Verlag Stuttgart - New-York.
2. Bactériologie Médicale. 1990.
B. Couture. Décarie Editeur inc. Montréal / Editions Vigot – Paris.
3. Bactériologie Médicale – 15^e Édition. 1994.
A. Ferron. Editions C. et R.
4. The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases. 3rd Edition. 1985
G.P. Youmans, P.Y. Paterson, H.M. Sommers, W.B. Sanders Company.
Philadelphia – London- Toronto - Mexico City – Rio de Janeiro – Sydney – Tokyo
– Hong Kong.
5. Cours de Microbiologie Générale. 1988.
Meyer, J. Deiana, H. Leclerc. Dain Editeurs – Paris.
6. Encyclopedia of Microbiology. Vol. 1 – 4. 1992.
J. Lederberg, Editor. Academic Press, Inc. San Diego – New-York – Boston-
London – Sydney – Tokyo – Toronto.
7. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie 5. Auflage – 1984.
H. Brandis & H.J. Otte . Gustav Fischer Verlag Stuttgart – New-York.
8. Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology 3rd Edition 1989
J.G. Collee, J.P. Duguid, A.G. Fraser, B.P. Marmion Editors.
Churchill Livingstone – Edinburgh – London – Melbourne & New-York.
9. Manual of Antibiotics and Infectious Diseases. 6th Edition 1988.
J.E. Conte, JR., S.L. Barriere. Lea & Febiger, Philadelphia.
10. Manual of Clinical Microbiology – 4th Edition. 1985.
E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausser JR., H.J. Shadony, Editors.
American Society for Microbiology – Washington, D.C.
11. Manual of Clinical Microbiology – 5th Edition. 1991
Balows, W.J. Hausser JR., K.L. Hermann, H.D. Isenberg, H.J. Shadony
American Society for Microbiology – Washington, D.C.
12. Medical Microbiology – 8th Edition. 1989.
E. Jawetz, J.L. Melnick, E.A. Adelberg, G.F. Brooks, J.S. Butel, L.N. Ornston.
Appleton & LANGE Prentice – Hall International Inc.
13. Medical Microbiology – International Student Edition. 1990.
P.R. Murray, W.L. Drew, G.S. Kobayashi, J.H. Thompson
The C.V. Mosby Company – Wolfe Publishing LTD – USA.
14. Microbiology – 3rd Edition. 1980.
B.D. Davis, R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg. Harper International
Edition.

15. TAKAISI KIKUNI. 1990.
Produktion, Intrazelluläre Lokalisation und Sekretion des CAMP – Faktors bei *Streptococcus agalactiae*.
Dissertation – Fachbereich Pharmazie – Freie Universität Berlin.
16. Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. 1991
J.E. Alouf & J.H. Freer Editors. Academic Press, Ltd – London – San Diego – New-York – Boston – Sydney – Tokyo – Toronto.
17. Virologie Médicale – 14^e Edition. 1992.
A. Ferron. Éditions C. et R.
18. Atlas, R.M. 1997.
Principles of Microbiology. Second Edition. WCB Publishers, Dubuque, Iowa, p. 1118- 1133.
19. Bartlett, J.G. 1998.
Pocket Book of Infectious Disease Therapy. 9th Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 143-154.
20. Pharmaceutical Microbiology. 6th Edition. 1998.
Edited by W.B.HUGO and A.D.RUSSELL. Blackwell
21. Isada, C.M. et al. 2003.
Infections Diseases Handbook. 5th Edition. LEXI-COMP'S American. Pharmaceutical Association, Hudson, Ohio.
22. Myers, R.S.
Immunizing and Antimicrobial Agents. Spring. 2006.
23. Tortora, Gerard J., Funke, Berdell R., Case, Christine L.
Microbiology. An Introduction. 10th Edition. 2009.
Benjamin Cummings, San Francisco Boston New York Cape Town Hong Kong London Madrid Mexico City Montreal Munich Paris Singapore Sydney Tokyo Toronto.
24. Talaro, Kathleen Park & Chess, Barry.
Foundations In Microbiology, 8th Edition. 2012
Published by McGraw-Hill, a business unit of The McGraw-Hill Companies, Inc, New York, NY 10020.