Sous la direction de Luciano Paolozzi et Jean-Claude Liébart
Matthieu Arlat, Michel Dion, Harivony Rakotoarivonina

Introduction à la microbiologie

Microbiologie fondamentale et appliquée

DUNOD

Illustration de couverture : © newannyart – istockphoto.com

Le pictogramme qui figure ci-contre mérite une explication. Son objet est d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, particulièrement dans le domaine de l'édition technique et universitaire, le développement massif du photocopillage.
Le Code de la propriété intellectuelle du 1er juillet 1992 interdit en effet expressément la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Or, cette pratique s'est généralisée dans les établissements d'enseignement supérieur, provoquant une baisse brutale des achats de livres et de revues, au point que la possibilité même pour les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.
Nous rappelons donc que toute reproduction, partielle ou totale, de la présente publication est interdite sans autorisation de l'auteur, de son éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC, 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris).

© Dunod, 2019
11, rue Paul Bert, 92240 Malakoff
www.dunod.com
ISBN 978-2-10-078172-0

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2° et 3° a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).
Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

À la nouvelle génération : Emma, Jacopo et Elisabetta

À Sarah

Les auteurs

Ouvrage réalisé sous la direction de :

Luciano Paolozzi, professeur honoraire de génétique (université Tor Vergata, Rome), qui enseignait la génétique bactérienne et la microbiologie (Chapitres 1, 3, 4, 5, 6 et 8).

Jean-Claude Liebart, professeur honoraire (UPMC, Paris), qui enseignait la génétique bactérienne et la microbiologie (Chapitres 1, 3, 4, 5, 6 et 8).

Avec la contribution, par ordre alphabétique, de :

Matthieu Arlat, professeur (université Paul-Sabatier, Toulouse), qui enseigne la microbiologie à la faculté des Sciences et Ingénierie (Chapitre 7).

Michel Dion, professeur (université de Nantes), qui enseigne la microbiologie à la faculté des Sciences et Techniques (Chapitre 9).

Harivony Rakotoarivonina, maître de conférences (université de Reims Champagne Ardennes), qui enseigne la microbiologie à la faculté des Sciences Exactes et Naturelles (Chapitre 2).

Relecteurs

Pascal Le Bourgeois, professeur, université Paul-Sabatier, Toulouse

Pascal Combemorel, professeur, ENS, Paris

Anne Decoster, professeur, université catholique de Lille

Audrey Esclatine, professeur, université Paris-Sud

Gilles Etienne, maître de conférences, IPBS, université Paul-Sabatier, Toulouse

Michel Fons, professeur, université d'Aix-Marseille

Claire Geslin, maître de conférences, université de Bretagne occidentale, Brest

Patrizia Ghelardini, responsable de recherche, IBMM-CNR, Rome

Amel Guyonvarch, professeur, université Paris-Sud

Jean-Marie Lacroix, professeur, université Lille 1

Gaétan Le Floch, professeur, IUT, université de Bretagne occidentale, Brest

Philippe Rousseau, maître de conférences, université Paul-Sabatier, Toulouse

Philippe Silar, professeur, université Paris-Diderot

Philippe Urban, chargé de recherche, LISPB-CNRS, Toulouse

Table des matières

Les auteurs IV

Avant-propos et guide d'emploi X

Remerciements XI

Et pour en savoir plus… Les + en ligne XII

1 Micro-organismes 1

1. Un monde à découvrir 1
1.1 Les micro-organismes et la vie sur Terre 1
1.2 Formes, dimensions, unicellularité, physiologie 2

2. Taxinomie des micro-organismes 4
2.1 Spécificité de la classification des micro-organismes 5
2.2 Critères d'identification 5
2.3 Procédures d'identification 6
2.4 Classification 9
2.5 Les micro-organismes dans l'arbre universel du vivant 11

3. La cellule procaryote 14
3.1 L'enveloppe 14
3.2 Structure intracellulaire 20
3.3 Quelques éléments de réflexion 22

4. La cellule des micro-organismes eucaryotes 23
4.1 Principales structures intracellulaires 23
4.2 Le génome et son expression 25

5. Quelques protistes modèles 26
5.1 Des protozoaires 27
5.2 Des micro-algues 33
5.3 Les champignons 36
Entraînez-vous 40

2 Microbiologie environnementale 41

1. Les écosystèmes naturels 41
1.1 Périodes de carence, stress et survie 42
1.2 Stratégies trophiques : oligotrophie *vs* copiotrophie 43
1.3 Organisation des fonctions trophiques en réseaux 43

© Dunod - Toute reproduction non autorisée est un délit.

2. Fluctuations des communautés microbiennes 46
2.1 Les facteurs abiotiques 46
2.2 Les interactions biotiques 49
2.3 Résistance et résilience 51
2.4 Formation de biofilms 52
3. Comprendre la diversité microbienne 53
4. Quelques écosystèmes – Applications 56
4.1 Symbioses nutritionnelles dans les tubes digestifs 56
4.2 Écosystèmes du sol – Cycles biogéochimiques 58
4.3 Communautés microbiennes et dépollution 61
4.4 Antibiotiques et résistances 63
Entraînez-vous 67

3 Physiologie microbienne : métabolisme, croissance, division 68
1. Les systèmes d'échanges cellule/milieu 68
1.1 Les familles de transporteurs 69
1.2 Les systèmes de sécrétion 70
2. Métabolisme énergétique 71
2.1 La chimio-organotrophie 73
2.2 La chimio-lithotrophie 73
2.3 La phototrophie 74
3. Croissance d'une population microbienne – Le modèle *E. coli* 74
3.1 La croissance, reflet de l'état physiologique 76
3.2 Effets des facteurs externes 78
4. La reproduction, ou division, ou cytokinèse 79
4.1 Division binaire symétrique : *Escherichia coli* 80
4.2 Division asymétrique et différenciation 83
4.3 Division multiple 86
4.4 Les systèmes de division des Archées 87
4.5 Division sans FtsZ 87
Entraînez-vous 90

4 Génomes : structure et réplication chez les procaryotes 91
1. Le nucléoïde : structure physique et topologie 91
1.1 Propriétés mécaniques de l'ADN 92

1.2 Structure et malléabilité spatio-temporelle du chromosome 94
1.3 Les protéines SMC et NAP, des « architectes » 94
1.4 Organisation des génomes 95

2. L'ADN accessoire : son rôle adaptatif 98
2.1 Les plasmides 98
2.2 Les éléments génétiques mobiles (EGM) 100
2.3 Autres ADN accessoires 102

3. Réplication 103
3.1 Les étapes de la réplication 104
3.2 Modèles particuliers de réplication 109
Entraînez-vous 112

5 Variabilité génétique : potentialités et limites 113

1. Mutations et mutants 113
1.1 Les mutations spontanées 114
1.2 Les mutations induites 119
1.3 Apparition/détection des mutations 120

2. TGH chez les procaryotes 121
2.1 La transformation naturelle 121
2.2 La transduction 123
2.3 La conjugaison 123
2.4 Autres systèmes de transfert de gènes 125

3. Réparation de l'ADN 125
3.1 Les principaux systèmes de réparation 126
3.2 Blocage des fourches de réplication et recombinaison 128

4. Variabilité/anti-variabilité 129
4.1 Les systèmes anti-variabilité 129
4.2 Les stratégies anti-barrières 131
Entraînez-vous 133

6 Expression génique et adaptation 134

1. Expression génique chez les procaryotes 134
1.1 La transcription chez les Bactéries 134
1.2 La traduction chez les Bactéries 138
1.3 Transcription et traduction chez les Archées 140

© Dunod - Toute reproduction non autorisée est un délit.

2. Régulation de l'expression génique 141
2.1 Régulation du démarrage de la transcription 141
2.2 Autres niveaux de régulation 145
2.3 Le contrôle épigénétique 147
3. Régulation *via* des transmetteurs de signal 149
3.1 Détection et transmission du signal 149
3.2 Le chimiotactisme chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* 151
3.3 La sporulation chez *Bacillus subtilis* 151
4. Communications intercellulaires 153
4.1 Quorum sensing 153
4.2 Les biofilms : conditions de mise en place 157
Entraînez-vous 160

7 Interactions Bactéries/hôtes 161
1. Le mutualisme 161
1.1 Mutualisme et nutrition 161
1.2 Mutualismes non trophiques 167
2. Le commensalisme 169
2.1 Le microbiote humain 170
2.2 Le microbiote végétal 173
2.3 Algues rouges, makis et évolution du microbiote humain 174
3. Le parasitisme 175
3.1 Les épidémies – Conséquences sociétales et étiologie 175
3.2 Réservoirs, transmission et cycles infectieux 177
3.3 Adhérence/entrée dans les cellules hôtes 182
3.4 Contournement des défenses 183
3.5 Évolution du pouvoir pathogène 189
Entraînez-vous 192

8 Notions de virologie 193
1. Présentation et classification 193
2. Structure 195
2.1 Les capsides 195
2.2 Génomes 199

3. Phases du développement 201
3.1 Adsorption 201
3.2 Phase endocellulaire (dite d'éclipse) 202

4. Quelques virus typiques 204
4.1 Groupe I 204
4.2 Groupe II - Les phages ΦX174 et M13 210
4.3 Groupe III - Le phage Φ6 211
4.4 Groupe IV - Les phages MS2 et Qβ 212
4.5 Les phytovirus 213
Entraînez-vous 216

9 Biotechnologies microbiennes 217

1. Des procédés classiques à l'ingénierie 217
1.1 Ingénierie génétique : production d'acides aminés 218
1.2 Ingénierie métabolique : crise énergétique et biocarburants 221

2. Santé humaine et ingénierie métabolique 227
2.1 Vers de nouveaux antibiotiques : iChip et métagénomique 228
2.2 Oligosaccharides, un challenge d'ingénierie 230
2.3 Le mévalonate/DMAPP, un précurseur à large spectre 232
2.4 De l'hydrocortisone grâce à la levure 236
2.5 Production d'opiacés : collaboration *E. coli* - *S. cerevisiæ* 238

3. Des approches innovantes 241
Entraînez-vous 246

Bibliographie (ouvrages didactiques et articles à caractère non spécialisé) 247

Index 249

© Dunod - Toute reproduction non autorisée est un délit.

Avant-propos et guide d'emploi

Cet ouvrage constitue une introduction à la microbiologie, l'étude des espèces généralement unicellulaires et microscopiques. L'univers microbien est un ensemble extrêmement hétérogène, encore plus diversifié que le monde qui nous est familier. Occupant toutes les niches écologiques de notre planète, les micro-organismes sont des agents indispensables de l'équilibre de l'ensemble des écosystèmes. Ils comprennent deux grandes catégories : les protistes, eucaryotes (structure cellulaire semblable à celle des organismes pluricellulaires), et les procaryotes (structure cellulaire plus simple). Leurs modes de vie sont très diversifiés, libres ou en association avec d'autres organismes, parfois néfastes s'il s'agit d'espèces pathogènes, et capables d'entretenir des « dialogues moléculaires » inter-organismes. Ce monde microbien est doublé du monde des virus, entités de tailles encore plus réduites et probablement au moins aussi nombreux, intermédiaires entre monde « vivant » et monde « chimique ». Parasites obligatoires d'organismes de toutes catégories, ils constituent un maillon important de la diversification et de l'évolution des organismes qu'ils infectent. C'est à l'étude des micro-organismes, qui n'a réellement commencé qu'il y a deux à trois siècles, que nous devons une grande partie des connaissances actuelles au niveau moléculaire en physiologie, génétique, etc. du monde vivant. Cela a permis, entre autres, la mise au point de méthodes de lutte contre des maladies infectieuses ou l'utilisation de micro-organismes dans des productions industrielles.

Nous vous conseillons, avant de vous plonger dans ce manuel, de commencer par la lecture de la fiche Introduction « Le monde inattendu des micro-organismes » (disponible sur le site web de l'ouvrage, voir plus loin), qui donne quelques clefs de l'histoire et du développement de la microbiologie.

En accord avec la nomenclature actuelle, les noms de genres sont écrits en italique avec une majuscule initiale, et les noms d'espèces en italique et tout en minuscules ; les noms des trois domaines actuellement reconnus, incluant chacun des micro-organismes, sont écrits avec une majuscule initiale : Bactéries, Archées et Eucaryotes. En revanche les termes « protiste » et « procaryote », qui désignent des regroupements pratiques mais non phylogénétiques, sont écrits tout en minuscules.

Le signe $ en exposant indique une incitation à consulter l'Annexe méthodologique (sur le site web de l'ouvrage).

Bonne lecture !

Remerciements

Cet ouvrage de microbiologie fondamentale et appliquée est le fruit d'une harmonieuse collaboration avec plusieurs partenaires et collègues, à qui nous tenons à exprimer toute notre gratitude :

- M^me^ Laetitia Hérin (Dunod), pour la confiance qu'elle nous a accordée en nous proposant de réaliser ce nouvel ouvrage et pour ses nombreux conseils, qui ont permis d'assurer l'adéquation des textes aux exigences des étudiants auxquels il s'adresse ;
- nos collègues co-auteurs, bien sûr ;
- nos collègues relecteurs, qui ont contribué à la clarté et à la rigueur scientifiques des textes ;
- M^me^ Françoise Joset, professeur honoraire, université d'Aix-Marseille, à qui nous adressons un remerciement particulier pour avoir mis à notre disposition son expérience d'enseignante et de scientifique, qui s'est traduite en riches suggestions, analyses critiques et remaniements des textes, suivis de méticuleuses révisions.

© Dunod - Toute reproduction non autorisée est un délit.

Et pour en savoir plus… Les + en ligne

Sur la page associée à l'ouvrage sur le site dunod.com, sont disponibles des fiches et vidéos formant des compléments à certains chapitres, essentiellement les chapitres à caractère général ; l'approfondissement des domaines plus spécifiques sera traité en master.

Fiches d'intérêt général

Fiche Introduction : Le monde inattendu des micro-organismes

Fiche A : Annexe méthodologique

Fiche B1 : Liste des organismes et virus cités dans les chapitres et les fiches

Fiche B2 : Principales Bactéries responsables de maladies infectieuses chez l'Homme et chez certaines plantes.

Fiches spécifiques

Chapitre 1

Fiche 1.1 : Distribution des procaryotes dans la nature

Fiche 1.2 : La classification des organismes vivants – Historique – Ses limites pour les procaryotes

Fiche 1.3 : La coloration de Gram

Fiche 1.4 : L'identification de Bactéries pathogènes humaines : à chacun sa méthode

Fiche 1.5 : Clé dichotomique d'identification – Cas d'une Bactérie coque à $Gram^+$

Fiche 1.6 : Le manuel Bergey, référence de la systématique des procaryotes

Fiche 1.7 : Structures péri- et trans-enveloppes des procaryotes – Leurs fonctions

Fiche 1.8 : Organites de procaryotes

Fiche 1.9 : L'avantage d'être petit – Rapport dimension/structure d'une cellule

Fiche 1.10 : Chromatine et transcription chez les cellules eucaryotes

Chapitre 2

Fiche 2.1 : Les micro-organismes rares

Fiche 2.2 : Expressions mathémathiques de la diversité microbienne

Fiche 2.3 : Fractionnement des parois végétales et bioraffinerie

Chapitre 3

Fiche 3.1 : Colonies microbiennes

Fiche 3.2 : La protéine FtsZ

Fiche 3.3 : Les Bactéries non cultivables

Fiche 3.4 : BALO, un monde à exploiter

Fiche 3.5 : Les Streptomycètes, une mine d'applications

Fiche 3.6 : À la recherche d'un mécanisme primitif de prolifération cellulaire

Chapitre 5

Fiche 5.1 : Transferts génétiques horizontaux en conditions naturelles

Fiche 5.2 : Découverte de la conjugaison

Fiche 5.3 : Fonctions et devenirs du plasmide F d'*E. coli*

Fiche 5.4 : Identification des protéines Uvr chez *E. coli*

Fiche 5.5 : Hémiméthylation et correction par MMR

Fiche 5.6 : CRISPR, immunité bactérienne acquise ; instrument de génomique ; ses applications

Chapitre 6

Fiche 6.1 : Nucléotides non canoniques des ARNt – Leurs rôles

Fiche 6.2 : Variation de phase chez la souche pathogène *E. coli* UPEC

Fiche 6.3 : Variabilité des fréquences d'initiation de transcription

Fiche 6.4 : Fonctionnement du mouvement flagellaire

Chapitre 7

Fiche 7.1 : Les systèmes de sécrétion de types IV et VI

Fiche 7.2 : Les adhésines des *Yersinia* pathogènes pour l'Homme

Fiche 7.3 : Quelques épidémies et pandémies en Europe depuis le Moyen Âge

Fiche 7.4 : Les toxines bactériennes

Chapitre 8

Fiche 8.1 : Décision lyse/lysogénie chez le bactériophage λ

Fiche 8.2 : Encapsidation de l'ADN du bactériophage T4

© Dunod - Toute reproduction non autorisée est un délit.

Fiche 8.3 : Injection et transcription séquentielles du génome chez le bactériophage T7

Fiche 8.4 : Le virus de l'hépatite B (VHB)

Fiche 8.5 : Les virus de la grippe

Vidéos

Chapitre 1

Vi 1.1 : L'antibiogramme

Chapitre 3

Vi 3.1 : Isolement de cultures pures

Vi 3.2 : Détermination de la concentration cellulaire

Vi 3.3 : La technique des répliques

Chapitre 8

V 8.1 : Le nombre d'unités virales formant plages de lyse

Chapitre 1 Micro-organismes

Introduction

La cellule, unité de base de tout organisme vivant, est constituée d'une structure (membrane et éventuellement enveloppe) contrôlant son interaction avec l'environnement et enserrant le cytoplasme, siège de l'ensemble des réactions nécessaires à la « vie ». Ce cytoplasme contient des milliers de constituants, dont des macromolécules (majoritairement protéines et acides ribonucléiques) organisées en structures fonctionnelles, et le génome, « tableau de commande » du fonctionnement et de la reproduction de la cellule. Cet archétype universel montre cependant des spécificités de contenus, structures et fonctions propres à la nature eucaryote ou procaryote et aux espèces des organismes.

Objectifs

- **Définir** les notions de procaryotes, eucaryotes, unicellularité
- **Connaître** la structure et l'organisation, les différences entre les cellules procaryotes et eucaryotes
- **Identifier** les principaux constituants cellulaires et leurs fonctions chez les Bactéries et les Archées
- **Expliquer** comment les micro-organismes ont développé leur capacité adaptative à une très large gamme d'environnements

Plan

1. Un monde à découvrir
2. Taxinomie des micro-organismes
3. La cellule procaryote
4. La cellule des micro-organismes eucaryotes
5. Quelques protistes modèles

1 Un monde à découvrir

1.1 Les micro-organismes et la vie sur Terre

Les cellules des millions d'espèces vivantes, tant multi- qu'unicellulaires, sont construites selon deux modèles : eucaryote et procaryote. À ces deux types correspondent les organismes que nous sommes habitués à côtoyer (plantes, animaux), mais aussi l'énorme et riche monde invisible des micro-organismes, un ensemble très hétérogène tant sur le plan morphologique que physiologique, dont l'unité est leur nature majoritairement unicellulaire. Il peut être défini en deux ensembles : les **protistes**, appartenant au domaine des **Eucaryotes** et subdivisés en plusieurs sous-ensembles (pour simplifier : les

© Dunod - Toute reproduction non autorisée est un délit.

protozoaires, les micro-algues et les champignons, voir § 5), et les procaryotes, incluant deux domaines : les **Bactéries** et les **Archées** (voir § 2). Le monde microbien colonise une énorme variété de niches écologiques (voir Chapitre 2). Cette présence ubiquitaire résulte d'une longue histoire évolutive qui lui a permis de s'adapter à une vaste gamme de conditions physiques (températures, pH, pression hydrostatique, jusque dans les profondeurs océaniques) et chimiques (nature des nutriments et des sources d'énergie) (voir Chapitre 3) et a contribué à sa diversification. Cette diversité est fondamentale pour la vie sur la planète, ces organismes assurant l'équilibre des cycles biogéochimiques, et ainsi le fonctionnement des écosystèmes. Ils constituent les premiers maillons de la chaîne alimentaire de l'écosystème marin. On estime qu'une molécule sur deux du dioxygène (O_2) que nous consommons par respiration est produite par des micro-algues marines. Les procaryotes et les champignons sont les principaux agents de recyclage de la matière organique morte.

Les modes de vie des micro-organismes sont soit sous forme libre, soit, assez fréquemment, en association – obligatoire ou non – avec d'autres organismes (inter-procaryotes ou avec des protistes, des plantes ou des animaux) (voir Chapitres 2, 6 et 7). L'association est très souvent bénéfique, sinon indispensable, pour l'hôte (tel le microbiote de l'Homme) ; elle peut inversement lui être néfaste, comme c'est le cas d'une centaine d'espèces pathogènes, qui ne représentent cependant qu'une minorité des Bactéries connues, aucune Archée, et quelques protistes dont une vingtaine infectant l'Homme (certaines Amibes, les Trypanosomes). La seule malaria, causée par le protozoaire *Plasmodium*, a été responsable en 2016 de 216 millions de cas, dont 429 000 décès (données de l'OMS).

Seul un très petit nombre d'espèces, voire de souches, a été étudié, tant protistes que procaryotes, en raison soit de caractéristiques plus favorables à leur étude en laboratoire (cultivabilité, vitesse de croissance, possibilités d'approche génétique), soit d'un intérêt médical et/ou appliqué (voir Chapitres 2, 7 et 9). Le nombre d'espèces répertoriées est une minorité par rapport à celles estimées : moins de 1 % pour les procaryotes et, parmi les protistes, moins de 10 % pour les seuls protozoaires (sans doute une surestimation pour l'ensemble des protistes).

1.2 Formes, dimensions, unicellularité, physiologie

La forme et la taille des cellules sont des caractéristiques génétiquement déterminées résultant d'un processus évolutif et adaptatif important. La forme dicte en effet les interactions entre la cellule et son environnement, les dimensions celles de sa structure interne. Tout comme chez les autres organismes, les caractéristiques morphologiques constituent des critères préliminaires pour l'identification des micro-organismes (§ 2). L'**unicellularité** est assez générale dans le monde microbien, mais de nombreuses espèces ont développé diverses formes allant de la simple association de cellules composant une colonie jusqu'à la pluricellularité.

Les **morphologies** des **protistes** peuvent être irrégulières (Amibe, voir Figure 1.7) ou présenter des formes géométriques simples – sphères, cubes, prismes, ovoïdes (*Saccharomyces*, voir Figure 1.4B) – ou complexes (Paramécie ou Trypanosome, voir Figures 1.8 et 1.9), avec parfois des appendices : cils (Paramécie), flagelles (Trypanosome, Euglène, voir Figures 1.9 et 1.11), etc. Les morphologies des procaryotes, **Bactéries** et **Archées**, sont généralement plus simples, quoique très variées (voir Figure 1.1A), les **Archées** ajoutant d'autres morphologies (cubes, lobes, tétraèdres, longs filaments non segmentés). Des structures de surface sont souvent présentes chez les membres des deux groupes (§ 3.1). Des changements de conditions physiques et/ou nutritionnelles, qui influent sur les capacités de croissance, sont souvent initiateurs de changements morphologiques. Ainsi la Bactérie *Escherichia coli* présente des cellules individuelles en bâtonnet en condition de croissance rapide, mais forme des filaments multicellulaires en conditions nutritionnelles limitatives ou inhibitrices de la division. Un dimorphisme lié au cycle de reproduction est observé chez quelques espèces (voir Chapitre 3). De nombreuses espèces se mettent en vie quiescente avec différenciation en spores, une forme de résistance, tant que persistent des conditions environnementales peu favorables à leur croissance (voir Chapitres 3 et 6). Chez certaines bactéries pathogènes intervient une cascade de variations morphologiques suivant les stades de l'infection, liée à leur capacité d'envahissement de l'hôte et/ou de résistance à sa contre-attaque (voir Chapitre 7). Les espèces cultivables en laboratoire, reproduites sur milieu nutritif solide (en boîte de Pétri[$]) forment des colonies consistant en amas de cellules (environ 10^8) d'un diamètre de l'ordre du millimètre (voir Figures 1.1B, C et D). Chaque colonie est une population clonale, issue d'une cellule unique, dont la forme, l'aspect, la pigmentation éventuelle sont aussi des caractères distinctifs (§ 2.3).

Les **dimensions** des micro-organismes se mesurent généralement en microns. Chez les protistes elles varient entre 10 et 100 µm (quelquefois plus) et sont très supérieures à celles des procaryotes (de 1 à 10 µm pour la plupart des Bactéries, et généralement inférieures au micron pour les Archées). Parmi les exceptions connues citons les Mégabactéries, ou Bactéries géantes, dont les dimensions varient entre 50 et 750 µm (telle *Epulopiscium fishelsoni*, de 80 µm de diamètre et 700 µm de long, visible à l'œil nu) et, à l'opposé, les Ultramicrobactéries, avec des diamètres inférieurs à 0,2-0,3 µm. Dans leur ensemble, les volumes des cellules procaryotes couvrent ainsi huit ordres de grandeur (< 0,01 à $2{,}10^6$ μm^3) ; pour comparaison ces valeurs sont de 30-40 μm^3 pour le protiste *Saccharomyces cerevisiæ*, et de 2 000-4 000 μm^3 pour une cellule de mammifère.

À la diversité morphologique des micro-organismes s'associe une diversité physiologique concernant les systèmes d'exploitation de l'énergie, la nature des nutriments (voir Chapitres 2 et 3), les modes de reproduction (voir Chapitre 3), tant sexuée que par multiplication végétative, ainsi que de nombreuses autres caractéristiques tels les modes de locomotion (voir Chapitre 6) et les relations intercellulaires (voir Chapitres 2, 6 et 7).

© Dunod - Toute reproduction non autorisée est un délit.

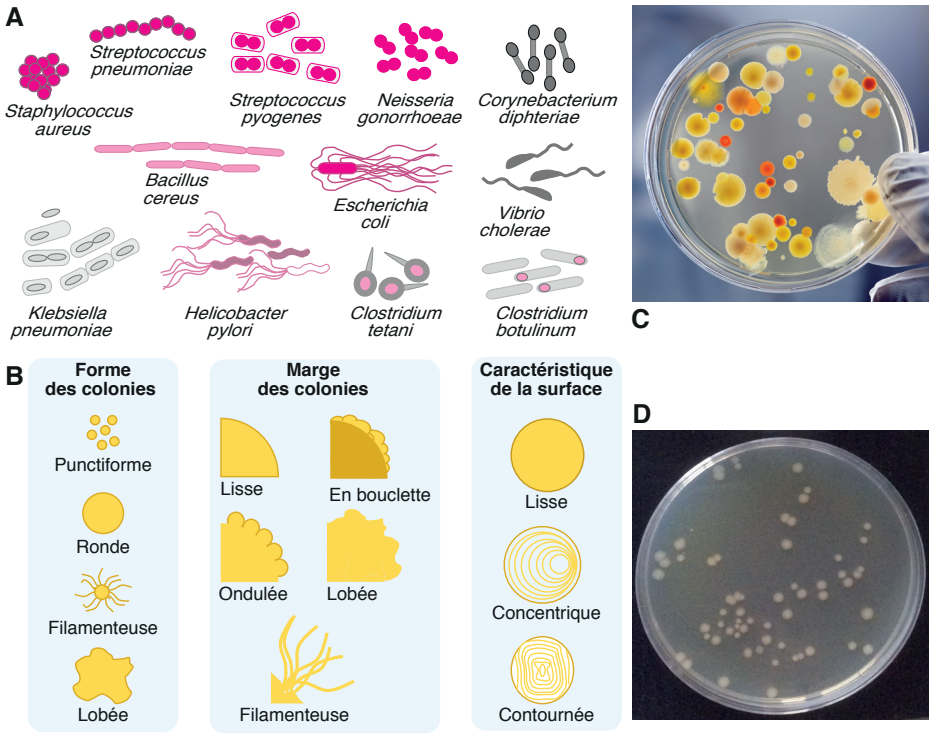

Figure 1.1 – Morphologies de cellules et de colonies de Bactéries

A. Schémas de cellules, agrandies environ 10^4 fois. Les noms peuvent renvoyer à la couleur (*aureus*, jaune or), ou à la forme des cellules : bacille (bâtonnet, régulier ou courbé), coque (sphère, plus ou moins régulière), strepto- (chapelet de sphères, *streptos* : surenroulée), *Sarcina* (en paquets), *Thermodiscus* (en disque), *Helicobacter* (en hélice), spirales, cônes, rectangles, étoiles, etc. Certaines cellules sont pédonculées, en filaments (ramifiés ou simples, plus ou moins longs), associées par paires (diplocoque, deux sphères associées) ou en petit nombre, formant des cubes réguliers, des grappes (*staphylo*). **B**. Détails de contours de colonies. **C**. Colonies bactériennes sur milieux nutritifs solides (réduction de moitié environ). **D**. Colonies d'*E. coli* (réduction de moitié environ).

2 Taxinomie des micro-organismes

La taxinomie a pour but de décrire et nommer les organismes, et la systématique de les classer et d'en rechercher les relations phylogénétiques. La taxinomie actuelle définit hiérarchiquement domaine, règne, division, classe, ordre, famille, genre et espèce. Pour les organismes dont on dispose de fossiles, les critères d'identification se fondent sur les données de la paléontologie et de la cladistique (ou cladisme), qui permettent d'établir

une chronologie de l'histoire évolutive et des relations de parenté entre organismes à partir d'un ancêtre commun. Cela conduit à la construction d'arbres. Ces classifications sont continuellement remaniées au fur et à mesure de l'acquisition de données liées au développement des technologies ou à la découverte de nouveaux organismes. La nomenclature est classiquement binominale pour les protistes et les procaryotes : *Genre* (Majuscule italique) *espèce* (minuscule italique) souche (plus libre) : *Trypanosoma brucei gambiense* ; *Escherichia coli* B.

2.1 Spécificité de la classification des micro-organismes

La nécessité d'une définition rationnelle et donc d'une classification des micro-organismes, outre son intérêt scientifique, a été liée aux découvertes du rôle de certains d'entre eux dans les maladies infectieuses et la détérioration des denrées alimentaires, et à leur utilisation dans la production d'aliments et boissons par fermentation de produits naturels. Jusque vers le début du XX^{e} siècle le monde vivant a été divisé en animaux et végétaux, les micro-organismes étant assignés à l'un ou l'autre groupe (protozoaires, protophytes). La première modification a consisté en la séparation des champignons en un groupe distinct, fondé sur les différences chimiques majeures de leur enveloppe cellulaire (§ 4 et 5). Les « bactéries » ont été également identifiées comme un groupe à part sur la base de leur très petite taille, de la spécificité de leur paroi ainsi que de l'absence de membrane nucléaire (§ 3). La classification du monde vivant reconnaissait alors cinq domaines : Animaux, Plantes, Champignons, Protistes et Bactéries (R.H. Wittaker, 1959). Rappelons que les Archées n'ont été identifiées comme telles que plus tardivement (1967) (§ 2 et 3). Ultérieurement, les observations en microscopies optique et électronique ont conduit à la définition de deux groupes cellulaires, Eucaryotes et Procaryotes, amenant à une classification binaire (R.Y. Stanier & C.B. Van Niel, 1962), positionnant les Procaryotes à la base de l'arbre universel sur le critère que ce sont eux qui auraient donné naissance aux Eucaryotes.

2.2 Critères d'identification

Si les principes théoriques de la taxinomie sont les mêmes que pour les autres êtres vivants, plusieurs difficultés apparaissent dans leur application aux micro-organismes en général, et plus particulièrement aux procaryotes. Il en est ainsi de la difficulté à définir la notion d'espèce chez ces organismes. En effet cette notion, définie comme une population dont les individus peuvent naturellement se croiser et produire une descendance fertile, n'est pas applicable chez des organismes à reproduction asexuée (voir Chapitres 3 et 5). Leur structure unicellulaire limite l'utilisation des critères morphologiques. Enfin, les caractères physiologiques sont peu discriminatifs. Certains peuvent en effet être partagés par des espèces phylogénétiquement distantes (par un mécanisme de convergence) ou au contraire absents chez des espèces proches (mécanisme de régression) (§ 2.5). L'identification d'un procaryote et son classement dans un taxon ont largement progressé grâce à la disponibilité de méthodes moléculaires$^{\$}$. Le concept d'espèce selon ces méthodes a dorénavant été défini par le niveau d'identité

© Dunod - Toute reproduction non autorisée est un délit.

de séquence (la capacité d'hybridation ADN-ADN) de leur ADN total ou, par défaut, de leurs gènes ribosomaux. Une espèce sera le regroupement de souches présentant un degré de similarité d'au moins 70 % pour leur ADN, ou 97 % pour les gènes ribosomaux, associé à un ensemble de propriétés physiologiques communes qui les différencient des souches d'une autre espèce. Il existe toutefois des exceptions à cette règle.

Jusqu'à la fin des années 1960 les Archées étaient considérées comme des Bactéries particulières (d'où le nom d'Archébactéries). Peu distinguables morphologiquement des Bactéries « vraies », ces organismes étaient groupés en considération de leur habitat ou d'une particularité métabolique : halophiles, thermophiles, méthanogènes. Ces déterminations, cependant, regroupaient aussi des procaryotes strictement définis comme des Bactéries. Ce ne sera que quelques années plus tard, grâce à l'approche moléculaire, qu'il deviendra possible, et nécessaire, de séparer ces organismes des Bactéries pour les classer dans un domaine propre (voir Figure 1.3).

2.3 Procédures d'identification

L'identification des micro-organismes procède selon les principes classiques de comparaison à d'autres organismes connus pour définir ressemblances et différences. Des clefs de classification définissent les caractères importants qu'il faut examiner dans ce but. Il existe essentiellement deux modalités d'identification, fondées pour la plus ancienne sur des critères phénotypiques et pour la plus récente sur des critères moléculaires. Cette dernière est actuellement prédominante, en particulier pour la détermination des pathogènes, et essentielle pour la majorité des organismes non cultivables ou extrêmement difficiles à cultiver dans les conditions de laboratoire. Le choix d'une méthode doit être considéré en fonction de l'utilisation prévue : pratique (bactériologie médicale, microbiologie industrielle) ou théorique (classification selon l'histoire évolutive).

a. La procédure d'identification phénotypique

La procédure d'**identification phénotypique** utilise un large éventail de caractères : aspect externe (morphologie, coloration de Gram ou autres, motilité, formation de spores, aspects des colonies), capacités culturales (aérobiose ou anaérobiose, températures et pH possibles et optimaux), capacités métaboliques (présence d'enzymes telles que catalase, oxydase, etc.), nature des antigènes de surface (sérogroupage), sensibilité à des bactériophages (lysotypie), profil moléculaire (composition en bases de l'ADN, profil protéique), etc.

Les procédures classiques d'identification phénotypique se déroulent en deux temps. L'échantillon à analyser provient généralement d'un prélèvement corporel (urine, sang, salive, fèces, etc.), du sol ou de produits destinés à la consommation, suivant qu'il s'agit de bactériologie médicale ou agroalimentaire. Il est généralement petit et complexe (impur). Il faut donc initialement réaliser une culture pure, c'est-à-dire dont les cellules sont issues d'une unique cellule mère de l'organisme à étudier[$] (voir Chapitre 3), pour obtenir le matériau nécessaire pour la suite des opérations. Les capacités métaboliques

(utilisation de divers substrats) peuvent être déterminées soit *via* des cultures en milieu liquide (délais de réponses minimaux de 24 à 48 heures), soit par des réactions biochimiques sur des aliquotes cellulaires au moyen de tests de natures turbidimétrique ou colorimétrique (délais de réponses inférieurs à 24 heures)[$]. Chaque résultat est représenté par un code-barres, et des logiciels d'interprétation fournissent l'identification de la souche. Cette méthode donne de bons résultats mais elle est laborieuse, coûteuse et parfois peu pratique car assez longue à mettre en œuvre. L'identification d'un pathogène nécessite très souvent une réponse rapide pour compléter un diagnostic et initier une thérapie ciblée. Des kits d'analyse de capacités enzymatiques, disponibles sous forme de tubes multitests (voir Figure 1.2A), spécifiques soit d'une famille bactérienne (par exemple Entérobactéries), soit d'un genre (par exemple *Salmonella*), permettent d'identifier rapidement et à coût moindre de nombreuses espèces, en particulier des pathogènes responsables de maladies gastro-intestinales. Des versions plus récentes de ces tests ont été développées sous forme de galeries miniaturisées, qui analysent simultanément jusqu'à 50 caractères biochimiques en les associant à un antibiogramme, permettant l'identification d'une souche en 24 à 48 heures.

b. Les clefs dichotomiques d'identification

Des **clefs dichotomiques d'identification** (analogues à celles utilisées en botanique ou en zoologie) permettent l'identification d'une souche par une série d'étapes conduisant aux différents niveaux d'une table d'identification, au fur et à mesure de la réponse à chacun des caractères analysés (voir Figure 1.2B).

c. Les méthodes d'identification moléculaire

De nombreuses méthodes d'**identification moléculaire**, fondées sur l'analyse de l'ADN ou des protéines[$], ont été développées pour contourner certaines limites de l'identification phénotypique, dont la non-cultivabilité en laboratoire. Nous discuterons seulement la méthode de classification moléculaire fondée sur **l'analyse de l'ADN**, qui consiste à séquencer un gène ou une portion de génome, et à comparer cette séquence avec celles d'une banque de référence. Chaque base de l'ADN peut être considérée comme un caractère en soi, ce qui rend très informative une séquence même de 1 000 paires de bases (taille moyenne d'un gène procaryote). Le **gène de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale** (codant l'ARNr 16S ou 18S chez les procaryotes et Eucaryotes, respectivement) (§ 3.2 ; 4.1), présent chez tous les organismes, a des caractéristiques qui en font un excellent marqueur d'identification des micro-organismes (§ 2.5). Il est admis que deux souches présentant des séquences de leur ARNr différant de plus de 3 % (c'est-à-dire que leur pourcentage d'identité est inférieur à 97 %) appartiennent très probablement à deux espèces différentes. La réciproque toutefois n'est pas vraie, puisque des souches d'espèces différentes peuvent avoir des séquences d'ARNr 16S ou 18S ayant un pourcentage d'identité supérieur à 97 %. Dans ce cas le comité chargé de la systématique des procaryotes recommande d'utiliser les pourcentages d'hybridation ADN-ADN, qui doivent être d'au

© Dunod - Toute reproduction non autorisée est un délit.

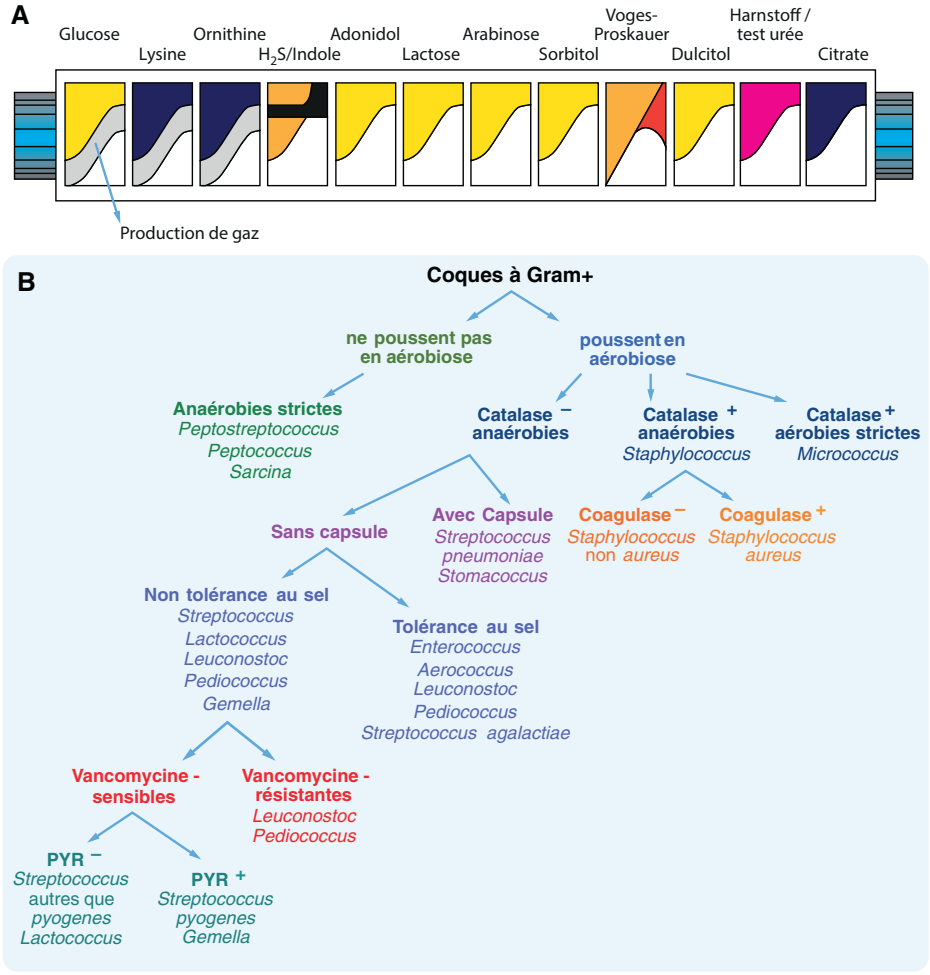

Figure 1.2 – Procédures d'identification

A. Un système miniaturisé de tests enzymatiques ; exemple d'un Entérotube « multitests ». Un tube en plastique est compartimenté en douze chambres contenant chacune un milieu de culture et un réactif spécifiques, destinés à tester les capacités de fermentation d'une série de substrats, celles-ci faisant virer la couleur du réactif. Un fil métallique traverse tout le tube et dépasse à chacune de ses extrémités. Utilisé pour l'ensemencement, il est chargé sur une colonie de la culture à tester, puis tiré à partir de l'extrémité opposée, permettant ainsi d'inoculer toutes les chambres du tube. Celui-ci est mis à incuber. Les résultats, exprimés sous forme d'un code-barres, sont interprétés par un ordinateur. **B.** Utilisation d'une clef dichotomique d'identification. Exemple d'application à un échantillon de Bactéries à Gram$^+$. La réponse positive à la coloration de Gram et la forme de la cellule ont conduit à positionner l'organisme étudié parmi trois grands groupes, bacilles à Gram$^+$, bacilles et coques à Gram$^-$, coques à Gram$^+$. Progressivement, la croissance de l'échantillon dans une série de conditions biochimiques et physiques, selon le schéma décrit, permet d'obtenir l'identification de l'espèce.