

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

Introduction à la microbiologie

Microbiologie fondamentale et appliquée

2^e ÉDITION

DUNOD



Ressources numériques. Comment y accéder ?

Pour aller plus loin et mettre toutes les chances de votre côté pour réussir l'examen, des compléments sont disponibles sur le site www.dunod.com/EAN/9782100856060.

Connectez-vous à la page de l'ouvrage (grâce aux menus déroulants, ou en saisissant le titre, l'auteur ou l'ISBN dans le champ de recherche de la page d'accueil). Sur la page de l'ouvrage, cliquez sur le logo « Les + en ligne ».



NOUS NOUS ENGAGEONS EN FAVEUR DE L'ENVIRONNEMENT :



Nos livres sont imprimés sur des papiers certifiés pour réduire notre impact sur l'environnement.



Le format de nos ouvrages est pensé afin d'optimiser l'utilisation du papier.



Depuis plus de 30 ans, nous imprimons 70% de nos livres en France et 25% en Europe et nous mettons tout en œuvre pour augmenter cet engagement auprès des imprimeurs français.



Nous limitons l'utilisation du plastique sur nos ouvrages (film sur les couvertures et les livres).

À la nouvelle génération : Emma, Jacopo et Elisabetta

À Sarah

Les auteurs

Ouvrage réalisé sous la direction de :

Luciano Paolozzi, professeur honoraire (université Tor Vergata, Rome), qui enseignait la génétique bactérienne et la microbiologie (Chapitres 1, 2, 4, 5, 6 et 8).

Jean-Claude Liebart, professeur honoraire (UPMC, Paris), qui enseignait la génétique bactérienne et la microbiologie (Chapitres 1, 2, 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 3).

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 Procédures d'identification	6
2.3 Classification	9
2.4 Les micro-organismes dans l'arbre universel du vivant	11
3. La cellule procaryote	14
3.1 L'enveloppe	14
3.2 Structure intracellulaire	21
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	27
5.1 Des protozoaires	27
5.2 Des micro-algues	33
5.3 Les champignons	36
Entraînez-vous	41
2 Physiologie microbienne : métabolisme, croissance, division	42
1. Les systèmes d'échanges cellule/milieu	42
1.1 Les familles de transporteurs	43
1.2 Les systèmes d'exportation des protéines	44

2. Métabolisme énergétique	45
2.1 La chimio-organotrophie	47
2.2 La chimio-lithotrophie	48
2.3 La phototrophie	48
3. Croissance d'une population microbienne – Le modèle <i>E. coli</i>	48
3.1 La croissance, reflet de l'état physiologique	50
3.2 Effets des facteurs externes	52
4. La reproduction, ou division, ou cytokinèse	53
4.1 Division binaire symétrique : <i>Escherichia coli</i>	54
4.2 Division asymétrique et différenciation	57
4.3 Divisions multiples	60
4.4 Les systèmes de division des Archées	61
4.5 Division sans FtsZ	61
Entraînez-vous	64
3 Microbiologie environnementale	65
1. Les écosystèmes naturels	65
1.1 Périodes de carence, stress et survie	66
1.2 Stratégies trophiques : oligotrophie vs copiotrophie	67
1.3 Organisation des fonctions trophiques en réseaux	67
2. Fluctuations des communautés microbiennes	70
2.1 Les facteurs abiotiques	70
2.2 Les interactions biotiques	73
2.3 Résistance et résilience	75
2.4 Formation de biofilms	76
3. Comprendre la diversité microbienne	77
4. Quelques écosystèmes – Applications	80
4.1 Symbioses nutritionnelles dans les tubes digestifs	80
4.2 Écosystèmes du sol – Cycles biogéochimiques	82
4.3 Communautés microbiennes et dépollution	85
4.4 Antibiotiques et résistances	87
Entraînez-vous	91
4 Génomes : structure et réplication chez les procaryotes	92
1. Le nucléoïde : structure physique et topologie	92
1.1 Propriétés mécaniques de l'ADN	93
1.2 Structure et malléabilité spatio-temporelle du chromosome	94

1.3 Les protéines SMC et NAP, des « architectes »	95
1.4 Organisation des génomes	96
2. L'ADN accessoire : son rôle adaptatif	99
2.1 Les plasmides	99
2.2 Les éléments génétiques mobiles (EGM)	101
2.3 Autres ADN accessoires	103
3. Réplication	104
3.1 Les étapes de la réplication	105
3.2 Modèles particuliers de réplication	110
Entraînez-vous	114

5 Variabilité génétique : potentialités et limites 115

1. Mutations et mutants	115
1.1 Les mutations spontanées	116
1.2 Les mutations induites	121
1.3 Apparition/détection des mutations	122
2. TGH chez les procaryotes	123
2.1 La transformation naturelle	123
2.2 La transduction	125
2.3 La conjugaison	125
2.4 Autres systèmes de transfert de gènes	127
3. Réparation de l'ADN	127
3.1 Les principaux systèmes de réparation	128
3.2 Blocage des fourches de réplication et recombinaison	130
4. Variabilité/anti-variabilité	131
4.1 Les systèmes anti-variabilité	131
4.2 Les stratégies anti-barrières	133
Entraînez-vous	135

6 Expression génique et adaptation chez les procaryotes 136

1. Expression génique	136
1.1 La transcription chez les Bactéries	136
1.2 La traduction chez les Bactéries	140
1.3 Transcription et traduction chez les Archées	142
2. Régulation de l'expression génique	143
2.1 Régulation du démarrage de la transcription	144

2.2	Autres niveaux de régulation	148
2.3	Le contrôle épigénétique	150
3.	Régulation via des transmetteurs de signal	151
3.1	Détection et transmission du signal	151
3.2	Le chimiotactisme chez <i>E. coli</i> et <i>Salmonella typhimurium</i>	153
3.3	La sporulation chez <i>Bacillus subtilis</i>	155
4.	Communications intercellulaires	156
4.1	Quorum sensing	156
4.2	Les biofilms : conditions de mise en place	160
	Entraînez-vous	162
7	Interactions Bactéries/hôtes	163
1.	Le mutualisme	163
1.1	Mutualisme et nutrition	163
1.2	Mutualismes non trophiques	169
2.	Le commensalisme	171
2.1	Le microbiote humain	172
2.2	Le microbiote végétal	175
2.3	Algues rouges, makis et évolution du microbiote humain	176
3.	Le parasitisme	177
3.1	Les épidémies – Conséquences sociétales et étiologie	177
3.2	Réservoirs, transmission et cycles infectieux	179
3.3	Adhérence/entrée dans les cellules hôtes	184
3.4	Contournement des défenses	185
3.5	Évolution du pouvoir pathogène	191
	Entraînez-vous	194
8	Notions de virologie	195
1.	Présentation et classification	195
2.	Structure	197
2.1	Les capsides	197
2.2	Génomomes	201
3.	Phases du développement	203
3.1	Adsorption	203
3.2	Phase endocellulaire (dite d'éclipse)	204
4.	Quelques virus typiques	206

4.1 Groupe I	206
4.2 Groupe II - Les phages Φ X174 et M13	212
4.3 Groupe III - Le phage Φ 6	213
4.4 Groupe IV - Les phages MS2 et Q β	214
4.5 Les phytovirus	214
Encart : Covid-19 et les leçons d'une pandémie	217
Entraînez-vous	223

9

Biotechnologies microbiennes 224

1. Des procédés classiques à l'ingénierie 224

1.1 Ingénierie génétique : production d'acides aminés	225
1.2 Ingénierie métabolique : crise énergétique et biocarburants	228

2. Santé humaine et ingénierie métabolique 234

2.1 Vers de nouveaux antibiotiques : iChip et métagénomique	235
2.2 Oligosaccharides, un challenge d'ingénierie	237
2.3 Le mévalonate/DMAPP, un précurseur à large spectre	239
2.4 De l'hydrocortisone grâce à la levure	243
2.5 Production d'opiacés : collaboration <i>E. coli</i> - <i>S. cerevisiæ</i>	245

3. Des approches innovantes 248

Entraînez-vous	253
----------------	-----

10

Microbiologiste comme métier : présent et futur 254

1. La Microbiologie des maladies infectieuses 255

2. Vie de notre biosphère : le monde microbien dans la biodiversité 255

3. Vie de notre biosphère : Microbiologie des environnements extrêmes 256

4. Microbiologie moléculaire : les sciences « omiques » 257

5. Microbiologie systémique 258

6. Microbiologie de cellules virtuelles 259

7. Non seulement des boîtes de Petri, mais aussi l'écran d'un ordinateur et une pluridisciplinarité enrichissante 259

Bibliographie (ouvrages didactiques et articles à caractère non spécialisé)	261
--	-----

Index	263
--------------	-----

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 à l'équilibre de l'ensemble des écosystèmes. Ils comprennent deux grandes catégories : les protistes (eucaryotes ayant une 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 Jammet (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 ;
- M^{me} Vanessa Beunèche, pour son agréable et efficace collaboration éditoriale ;
- 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 de scientifique et d'enseignante de microbiologie et génétique, qui s'est traduite en riches suggestions, analyses critiques et remaniements des textes, suivis de méticuleuses révisions.

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 : Colonies microbiennes

Fiche 2.2 : La protéine FtsZ

Fiche 2.3 : Les Bactéries non cultivables

Fiche 2.4 : BALO, un monde à exploiter

Fiche 2.5 : Les Streptomycètes, une mine d'applications

Fiche 2.6 : À la recherche d'un mécanisme primitif de prolifération cellulaire

Chapitre 3

Fiche 3.1 : Les micro-organismes rares

Fiche 3.2 : Expressions mathématiques de la diversité microbienne

Fiche 3.3 : Fractionnement des parois végétales et bioraffinerie

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

Et pour en savoir plus... Les + en ligne

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 2

Vi 2.1 : Isolement de cultures pures

Vi 2.2 : Détermination de la concentration cellulaire

Vi 2.3 : La technique des répliques

Chapitre 8

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

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, des cellules procaryotes et eucaryotes, et leurs différences

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 sur le plan tant morphologique que physiologique. Ces derniers présentent cependant une unité, qui est leur nature majoritairement unicellulaire. Le monde des micro-organismes peut être défini en deux ensembles : les **protistes**, appartenant au domaine

des **Eucaryotes** et subdivisés en plusieurs sous-ensembles (pour simplifier : les 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 3). 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 2) 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 (O₂) 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 (des protistes, des plantes ou des animaux) (voir Chapitres 3, 6 et 7). L'association est très souvent bénéfique, sinon indispensable, pour l'hôte (tel le microbiote pour 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 2021 de 241 millions de cas, dont 619 000 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 3, 7 et 9). Le nombre d'espèces répertoriées représente une minorité par rapport à celui estimé : 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 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** sont très diversifiées : elles 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 des morphologies propres (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 2). 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 2 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 huit ordres de grandeur ($< 0,01$ à $2 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$) ; pour comparaison ces valeurs sont de 30-40 μm^3 pour le protiste *Saccharomyces cerevisiae*, 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 2), 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 3, 6 et 7).

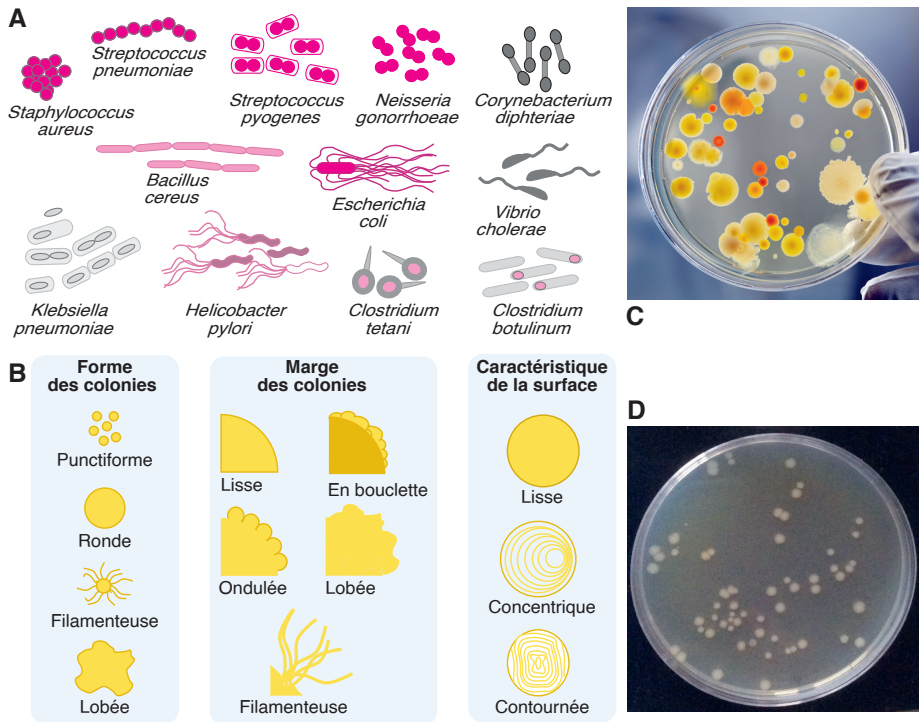


Figure 1.1 – Morphologies de cellules et de colonies de Bactéries

A. Schémas de cellules, agrandies environ 10^4 fois (les couleurs sont arbitraires). 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), *Thermotdiscus* (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 un milieu nutritif solide (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. Actuellement l'ensemble des organismes sont classés en trois domaines (que nous spécifierons par une majuscule) : Archées, Bactéries (ces deux domaines couvrant tous les procaryotes) et Eucaryotes.

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 : (i) 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 2 et 5) ; (ii) Leur structure unicellulaire limite l'utilisation des critères morphologiques ; (iii) 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 de séquence (la capacité d'hybridation ADN-ADN) de leur ADN total ou, par défaut, de leurs gènes ribosomiaux. Une espèce sera le regroupement de souches présentant un degré de similarité d'au moins 70 % pour leur ADN, ou 97 % pour les gènes ribosomiaux, 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'Archéobactéries). 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).

2.2 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^s (voir Chapitre 2), pour

obtenir le matériel 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 multitestés (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 les méthodes de classification moléculaire fondées 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 (§ 2.4). 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 %.

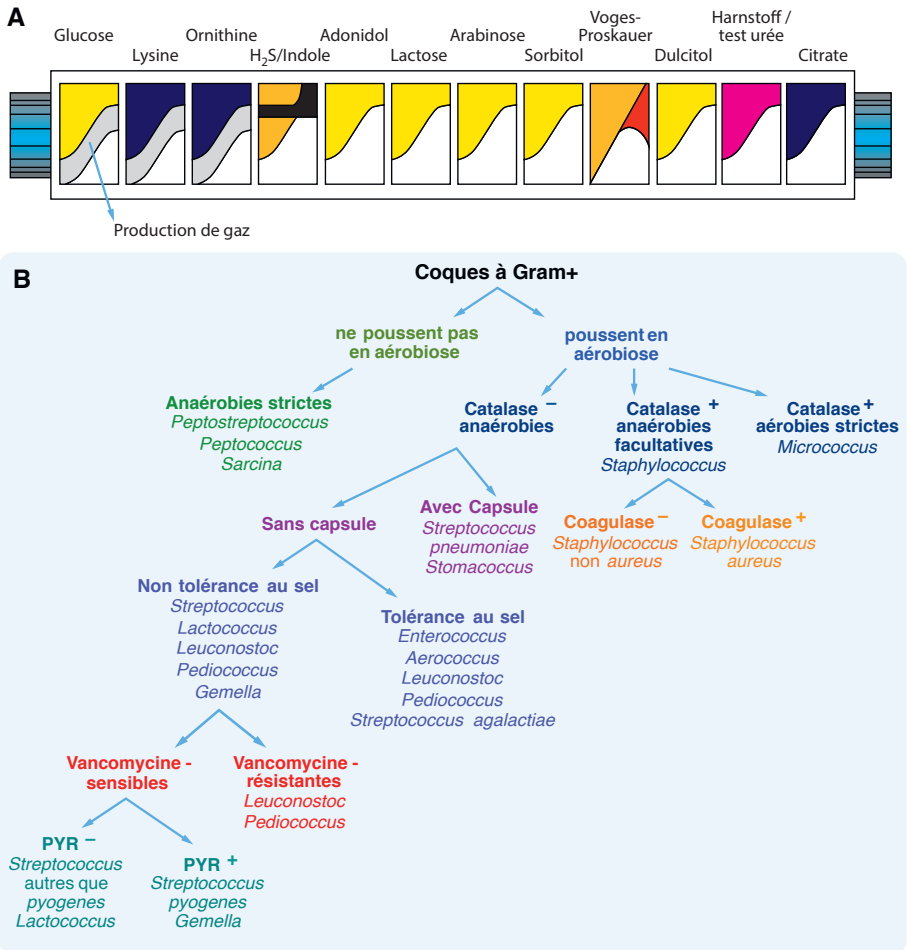


Figure 1.2 – Procédures d’identification

A. Un système miniaturisé de tests enzymatiques ; exemple d’un Entérotube « multitest ». 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.

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 moins 70 %, ainsi que la stabilité thermique à 5 °C des hybrides ADN-ADN des gènes correspondants.

Il est possible de déterminer le **profil de migration électrophorétique** de l'ADN, spécifique de chaque souche (technique AFLP), la **séquence de gènes** (5 à 7) codant des **fonctions conservées** (technique MLSA), ou la **séquence du génome complet** (technique ANI). La résolution des deux premières méthodes permet de discriminer des souches au sein d'une espèce, la troisième de discriminer deux génomes ne différant que de quelques nucléotides. Des méthodes fondées sur les **profils protéiques**, en particulier les protéines ribosomales (**spectrométrie de masse MALDI-TOF**), analysés par comparaison avec des bases de données, sont actuellement très utilisées en diagnostic clinique.

2.3 Classification

a. Classification phénétique

La **classification phénétique** regroupe en principe les organismes sur la base de ressemblances anatomiques ; dans le cas des procaryotes ce sont des caractères phénotypiques tels que définis ci-dessus (§ 2.3). Malgré les points critiques qu'elle présente par rapport aux classifications phylogénétiques moléculaires actuelles, cette approche conserve un intérêt pratique en microbiologie médicale, agricole et industrielle. Des progrès énormes ont été accomplis dès qu'il a été possible de disposer d'outils (ordinateurs et programmes) permettant de confronter de nombreux caractères et de déterminer des degrés de similarité entre souches. Développé vers la fin des années 1950 par R. Sokal et P. Sneath, ce système s'inspire de la classification des plantes fondée sur un ensemble de caractères ayant chacun la même « valeur ». Les résultats sont présentés sous forme de matrices de similarité réalisées en calculant un indice par paires de souches (par exemple, l'indice de Jaccard). Ces matrices sont traduites en dendrogrammes construits grâce à un algorithme regroupant les souches en fonction de leurs caractères communs. Des phénons sont ainsi définis, des groupes homogènes dont les individus présentent environ 80 % de similitude ; dans le cas des procaryotes les phénons sont souvent équivalents aux espèces définies selon les autres modes de classification.

Cette classification est critiquable à plusieurs niveaux :

- Le choix des caractères analysés ainsi que leurs poids relatifs sont subjectifs.
- Il n'est pas tenu compte du nombre de gènes impliqués dans l'expression de chacun de ces caractères ; ainsi l'ensemble des gènes correspondant à la totalité des caractères examinés ne représente souvent qu'une petite fraction du génome. Les similarités phénotypiques prises en compte ne reflètent donc pas l'histoire évolutive des espèces.
- Non moins important est le fait que la méthode ne s'applique qu'à la minorité des organismes cultivables.

b. Classification phylogénétique

Cette classification, établie sur des bases moléculaires, regroupe les organismes en fonction de leur lien de parenté, et permet d'aborder leur histoire évolutive. Il s'agit donc d'une classification naturelle. Les premières phylogénies moléculaires ont eu pour support l'analyse de séquences protéiques. C'est sur cette base que L. Pauling et E. Zuckerkandl (1965) ont proposé l'hypothèse que les gènes répondent au concept d'**horloge moléculaire** : un gène évoluerait à vitesse fixe au cours du temps, c'est-à-dire qu'il accumulerait le même nombre de mutations (en majorité neutres vis-à-vis de la sélection naturelle) par unité de temps. La réalité de l'horloge moléculaire présente l'avantage de permettre de dater des divergences entre lignées, après calibration à l'aide d'organismes fossiles dont l'âge est interprétable. Les méthodes antérieures de phylogénie, éventuellement fondées sur des critères ne respectant pas l'horloge moléculaire, pouvaient conduire à une estimation faussée de l'histoire évolutive des organismes concernés. Cependant ce concept est rarement applicable pour les phylogénies anciennes du fait que les gènes évoluent souvent à des vitesses différentes selon les lignées évolutives. D'autres méthodes phylogénétiques sont disponibles, qui tiennent compte, au moins en partie, de ces variations.

La classification phylogénétique moléculaire exige de respecter **certaines contraintes**. Les séquences à analyser doivent répondre aux critères suivants : il doit s'agir de macromolécules universellement distribuées, couvrant des fonctions indispensables et maintenues telles au cours du temps (ADN ou ARN polymérase, ARN ribosomiaux). Le gène ou la molécule qui en dérivent doivent évoluer à une vitesse compatible avec la résolution taxinomique voulue : la séquence protéique du cytochrome c, très constante chez les animaux, est utilisable uniquement pour classer des organismes très éloignés phylogénétiquement. Inversement les hémoglobines ont une vitesse d'évolution rapide qui permet la comparaison d'organismes évolutivement proches. Les gènes utilisés ne doivent pas être sujets à des transferts génétiques horizontaux (voir Chapitre 5) fréquents. Cette propriété est particulièrement importante dans le cas des procaryotes, chez lesquels le processus est loin d'être négligeable. Plusieurs gènes répondent plus ou moins bien à l'ensemble de ces contraintes, les meilleurs candidats étant sans aucun doute les ARNr 16S (procaryotes) et 18S (Eucaryotes) (§ 2.5a).

La nature du (des) organisme(s) d'étude conditionne la collecte des séquences à comparer. Il peut s'agir soit de séquences déjà disponibles dans des banques de gènes (Genbank, EMBL), soit d'un séquençage à effectuer. Les séquences obtenues sont alignées, c'est-à-dire positionnées parallèlement en favorisant les zones d'identité, à l'aide d'algorithmes (tel celui du logiciel Clustal W). Seules les séquences bien alignées seront retenues.

La **construction de l'arbre phylogénétique** peut être réalisée selon plusieurs méthodes. Deux d'entre elles (méthode du maximum de vraisemblance et méthode bayésienne) sont probabilistes et considérées comme plus fiables, mais font appel à de nombreux paramètres, dont un modèle évolutif. En conséquence ce sont surtout deux autres méthodes qui sont utilisées couramment :

- La **méthode de parcimonie** consiste à rechercher parmi tous les arbres possibles celui ou ceux qui nécessitent le moins de changements évolutifs (*i.e.* de mutations). Sa fiabilité

repose sur le préalable que les séquences comparées aient évolué à la même vitesse, ce qui la rend très sensible à l'applicabilité du concept d'horloge moléculaire.

- **L'alignement des séquences** permet la construction d'une **matrice de distances** des organismes testés, qui peut être convertie en une matrice évolutive, puis en arbre phylogénétique grâce à des algorithmes tels que le *Neighbor joining*. Cette méthode est plus rapide que celle du maximum de vraisemblance et moins sensible au non-respect du concept d'horloge moléculaire. **L'enracinement de l'arbre** permet de l'orienter et de positionner l'ancêtre commun aux organismes étudiés. Un groupe d'organismes externes connus pour avoir divergé très tôt est ordinairement pris comme référence. La racine cherchée sera entre ce groupe et les séquences de l'arbre phylogénétique obtenu.

2.4 Les micro-organismes dans l'arbre universel du vivant

a. Carl Woese et la classification des procaryotes

Afin de positionner au sein d'un arbre phylogénétique des organismes jusque-là rangés dans le groupe « bactéries », C. Woese a choisi de comparer leurs séquences d'ARNr 16S, molécule qui répond aux contraintes à respecter pour en faire une séquence informative au niveau évolutif (§ 2.3) : elle est universelle, essentielle, et suffisamment stable pour être considérée comme une horloge moléculaire, et a une longueur (1 500 nucléotides) compatible avec la probabilité d'un nombre suffisant de mutations, variées et faciles à caractériser. Ce travail (initié en 1967) n'a pas pu bénéficier des méthodes de séquençage de l'ADN, datant de 1970. La procédure a consisté à analyser par des méthodes « classiques », chimiques et enzymatiques, des séquences issues de la digestion d'ARNr 16S longues d'au moins 6 nucléotides, en considérant que la probabilité d'avoir deux séquences de cette taille identiques par molécule d'ARNr est très faible.

L'analyse faite par C. Woese des « bactéries » méthanogènes a été déterminante dans sa décision de proposer une modification de l'arbre universel. Les méthanogènes sont des procaryotes anaérobies stricts, seuls producteurs de méthane du monde vivant (voir Chapitres 2 et 3). L'analyse de leur ARNr 16S a montré qu'ils constituaient un groupe singulier, aussi éloigné des « bactéries classiques » que des Eucaryotes. C. Woese et G. Fox ont alors proposé de remplacer la division Eucaryotes-Procaryotes par une division ternaire, Eubactéries-Archéobactéries-Eucaryotes, prédisant, à juste titre, l'existence d'autres Archéobactéries. L'identification de cette nouvelle catégorie s'est faite sur le profil de résistance aux antibiotiques caractéristique des méthanogènes, retrouvé chez deux autres groupes de « bactéries » aérobies non méthanogènes, des halophiles et des thermo-acidophiles. Des études moléculaires ultérieures ont mis en évidence une proximité évolutive inattendue entre Eucaryotes et Archéobactéries, par exemple la très grande analogie des ARN polymérase ADN-dépendantes de ces deux groupes (voir Chapitre 6). Ces données ont conduit C. Woese à favoriser un modèle d'arbre universel enraciné entre les Eubactéries et une