



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de  
La Recherche Scientifique  
Université « Abbas Laghrou » Khenchela  
Faculté des Sciences et Technologies  
Département des Sciences de la Matière



N° de série : .....

## Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master (LMD)

**Filière:** Chimie

**Spécialité:** Chimie Analytique

**Intitulé**

**Bactéries à Gram positif et à Gram  
négatif : Défférences et Principe de la  
coloration de Gram**

**Réalisé par:**

✚ BOUNEZRA Wiam.

✚ HAMI dounia.

**Dirigé par:**

**Dr. DJEBAILI Kenza.**

**Membres de jury:**

**Dr. LACHKHEB Massouda**

Présidente

Université Abbas Laghrou Khenchela

**Dr. GERRAB Fahima**

Examinatrice

Université Abbas Laghrou Khenchela

Année universitaire: **2021/2022**

# Remerciements

*Ce travail a été réalisé dans le complexe des laboratoires pédagogiques de el Hamma (laboratoire n°4) à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Abbas Lagour à Khenchela.*

*Avant toute chose, je remercie « Allah » qui m'a donné la patience, le courage et la volonté de mener à terme ce modeste travail.*

*Paix et salut sur notre premier éducateur « محمد صلى الله عليه و سلم » le prophète .Pour ce qu'il a donné à l'humanité.*

*Ce travail n'a pu être mené à bien qu'avec le soutien de plusieurs personnes que je voudrais, à travers ces quelques lignes, remercier du fond du cœur.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude à notre directrice de mémoire, Dr. DJEBAILI kenza, pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger ce travail.*

*Merci à tous*

# *Dédicace*

*Que dieu la garde et me donne la force de la rendre au moins le peu de ce que  
me donne*

*Je tiens à dédier ce modeste travail à mes très chère mère **Islah** et père **Bennani**,  
qui me donne toujours du tender et sacrifice sa jeunesse, sa sante sa vie pour nous.*

*A la mémoire de ma sœur **Rania** que dieu est pitié de son âme et l'accueil dans  
son vaste paradis.*

*A mes beaux-frères **Brahim, Samir, Soufiane, Sohaib, Iskander, Abd allah** et  
mes belles sœurs **Malak, Soundouce, Douaa**.*

*Mes dédicaces s'adressent également à toutes mes chères amies **Nouha,**  
**Rabebe, Soulef, Aya** et à ma binôme **Dounia**.*

*Wiam*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes parents*

*Qui ont tout sacrifié pour mon bien et qui ont éclairé mon chemin par leur compréhension, leur sacrifices consentis et leurs précieux conseils. Merci pour les valeurs nobles, l'amour, l'éducation et le soutien permanent venus de vous, j'espère que vous êtes fiers de moi. Je vous en serai éternellement reconnaissante.*

*A mon mari Housseem et Mon fils Djawed*

*Qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de courage et de soutien.*

*A Mon frère Abbes et Mes sœur*

*A ma chère copine Wiam*

*A tous mes collègues de promotion Master 2 Chimie analytique*

*Dounia*

# Table des matières

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Liste des abréviations      |   |
| Liste des figures           |   |
| Liste des tableaux          |   |
| Introduction générale ..... | 2 |

## CHAPITRE I: Le monde microbien

|   |    |
|---|----|
| I.1. Introduction.....  | 5  |
| I.2. Historique.....  | 5  |
| I.3. Place des microorganismes dans le monde vivant.....                              | 9  |
| I.3.1. Classification de Haeckel En 1866.....   | 9  |
| I.3.2. Distinction entre cellules eucaryotes et procaryotes selon Edward Chatton..... | 10 |
| I.3.3. Classification selon Murray.....   | 10 |
| I.3.4. Classification à cinq règnes.....  | 10 |
| I.3.5. Classification génomique selon Woese.....                                      | 10 |
| I.3.6. Classification selon Cavalier-Smith.....                                       | 11 |
| I.4. Les protistes.....   | 11 |
| I.4.1. Définition.....  | 11 |
| I.4.2. Propriétés générales.....  | 12 |
| I.4.2.1. Structure et fonction.....   | 12 |

## Table des matières

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I.4.2.2.</b> Reproduction.....  | 12        |
| <b>I.4.2.3.</b> Métabolisme.....   | 12        |
| <b>I.4.2.4.</b> Ecologie.....  | 12        |
| <b>I.5. Organisation biologique des protistes.....</b>                             | <b>13</b> |
| <b>I.5.1.</b> Protistes unicellulaires.....  | 13        |
| <b>I.5.2.</b> Protistes pluricellulaires.....                                      | 13        |
| <b>I.5.3.</b> Protistes coenocytiques.....   | 14        |
| <b>I.6. Caractéristiques générales des cellules procaryotes et eucaryotes.....</b> | <b>15</b> |
| <b>I.6.1.</b> Différence entre cellules procaryote et eucaryote.....               | 17        |
| <b>I.7. Classification des bactéries.....</b>                                      | <b>19</b> |
| <b>I.7.1.</b> Bactéries à Gram négatif.....  | 19        |
| <b>I.7.1.1.</b> Les bacilles à Gram négatif.....                                   | 19        |
| <b>I.7.1.2.</b> Les cocci à Gram négatif.....                                      | 19        |
| <b>I.7.1.3.</b> Spirochètes.....   | 20        |
| <b>I.7.1.4.</b> Chlamydies.....  | 20        |
| <b>I.7.1.5.</b> Cyanobactéries.....  | 21        |
| <b>I.7.2.</b> Bactéries à Gram positif.....  | 21        |
| <b>I.7.2.1.</b> Les bacilles à Gram positif.....                                   | 21        |
| <b>I.7.2.1.1.</b> Bacillus cereus.....   | 22        |
| <b>I.7.2.1.2.</b> Clostridium.....   | 22        |
| <b>I.7.2.1.2.1.</b> Clostridium botulinum.....                                     | 22        |
| <b>I.7.2.1.2.2.</b> Clostridium perfringens.....                                   | 23        |
| <b>I.7.2.1.2.3.</b> Clostridium tetani .....                                       | 23        |

## Table des matières

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I.7.2.2. Les cocci à Gram positif.....</b> | <b>23</b> |
| <b>I.7.2.2.1. Streptocoque.....</b>           | <b>24</b> |
| <b>I.7.2.2.2. Staphylococcus.....</b>         | <b>24</b> |
| <b>I.7.2.3. Les actinomycètes.....</b>        | <b>25</b> |
| <b>I.8. Les Mycoplasmes.....</b>              | <b>25</b> |
| <b>I.9. Archaeobactéries.....</b>             | <b>27</b> |
| <b>I.9.1. Les halophiles extrêmes.....</b>    | <b>27</b> |
| <b>I.9.2. Les Thermophiles extrêmes.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>I.9.3. Les Méthanogènes.....</b>           | <b>28</b> |
| <b>I.10. Conclusion.....</b>                  | <b>29</b> |

## **CHAPITRE II: La cellule bactérienne**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>II.1. Introduction.....</b>                                       | <b>31</b> |
| <b>II.2. Techniques d'observation de la cellule bactérienne.....</b> | <b>31</b> |
| <b>II.2.1. Observation à l'état frais.....</b>                       | <b>32</b> |
| <b>II.2.2. Observation de frottis séchés, fixés et colorés.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>II.2.3. Méthodes immuno-cytochimiques.....</b>                    | <b>33</b> |
| <b>II.2.4. Séparation des constituants cellulaires.....</b>          | <b>34</b> |
| <b>II.3. La morphologie cellulaire.....</b>                          | <b>34</b> |
| <b>II.3.1. Forme.....</b>  | <b>34</b> |

## Table des matières

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>II.3.2.</b> Taille.....  | <b>35</b> |
| <b>II.3.3.</b> Associations cellulaires.....                                      | <b>35</b> |
| <b>II.3.4.</b> Eléments constants et inconstants de la structure bactérienne..... | <b>36</b> |
| <b>II.4. Éléments constants des bactéries.....</b>                                | <b>37</b> |
| <b>II.4.1.</b> Paroi bactérienne.....   | <b>37</b> |
| <b>II.4.1.1.</b> Composition chimique.....  | <b>37</b> |
| <b>II.4.1.2.</b> Paroi des bactéries Gram positives.....                          | <b>40</b> |
| <b>II.4.1.3.</b> Paroi des bactéries Gram négatives.....                          | <b>41</b> |
| <b>II.4.1.4.</b> L'espace péri plasmique.....                                     | <b>43</b> |
| <b>II.4.1.5.</b> Fonction de paroi bactérienne.....                               | <b>43</b> |
| <b>II.4.2.</b> Membrane plasmique.....  | <b>44</b> |
| <b>II.4.2.1.</b> Structure.....   | <b>44</b> |
| <b>II.4.2.2.</b> Composition chimique.....  | <b>44</b> |
| <b>II.4.2.3.</b> Fonction de la membrane plasmique.....                           | <b>45</b> |
| <b>II.4.3.</b> Le cytoplasme.....   | <b>47</b> |
| <b>II.4.4.</b> Le Chromosome.....   | <b>50</b> |
| <b>II.4.4.1.</b> Composition chimique.....  | <b>50</b> |
| <b>II.5. Éléments non constants des bactéries.....</b>                            | <b>51</b> |
| <b>II.5.1.</b> Les Plasmides.....   | <b>51</b> |
| <b>II.5.1.1.</b> Structure des plasmides.....                                     | <b>52</b> |
| <b>II.5.1.2.</b> Rôles et fonction des plasmides.....                             | <b>53</b> |
| <b>II.5.2.</b> Pili.....  | <b>53</b> |

## Table des matières

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>II.5.2.1.</b> Structure.....                           | <b>53</b> |
| <b>II.5.2.2.</b> Type.....                                | <b>54</b> |
| <b>II.5.3.</b> La capsule.....                            | <b>55</b> |
| <b>II.5.3.1.</b> Mise en évidence.....                    | <b>55</b> |
| <b>II.5.3.2.</b> Morphologie.....                         | <b>56</b> |
| <b>II.5.3.3.</b> Composition chimique.....                | <b>57</b> |
| <b>II.5.3.4.</b> Fonctions de la capsule.....             | <b>57</b> |
| <b>II.5.4.</b> Le flagelle.....                           | <b>57</b> |
| <b>II.5.4.1.</b> Mise en évidence.....                    | <b>58</b> |
| <b>II.5.4.2.</b> Composition et structure.....            | <b>58</b> |
| <b>II.5.4.3.</b> Flagelle et mobilité.....                | <b>59</b> |
| <b>II.5.4.4.</b> Mécanisme du mouvement flagellaire ..... | <b>59</b> |
| <b>II.5.4.5.</b> Fonctions.....                           | <b>60</b> |
| <b>II.5.5.</b> La spore.....                              | <b>61</b> |
| <b>II.5.5.1.</b> Mise en évidence.....                    | <b>61</b> |
| <b>II.5.5.2.</b> Morphologie.....                         | <b>62</b> |
| <b>II.5.5.3.</b> Structure de la spore.....               | <b>62</b> |
| <b>II.5.5.4.</b> Phénomène de sporulation.....            | <b>63</b> |
| <b>II.5.5.5.</b> Germination.....                         | <b>65</b> |
| <b>II.5.5.6.</b> Propriétés et fonction de la spore.....  | <b>66</b> |
| <b>II.6. Conclusion.....</b>                              | <b>66</b> |

## **CHAPITRE III: Partie expérimental**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>III.1. Introduction.....</b>                                    | <b>68</b> |
| <b>III.2. Coloration de Gram.....</b>                              | <b>68</b> |
| <b>III.2.1. Définition.....</b>                                    | <b>68</b> |
| <b>III.2.2. Principe.....</b>                                      | <b>68</b> |
| <b>III.2.3. Composition et préparation des colorants.....</b>      | <b>69</b> |
| <b>III.2.4. Matériel utilisé.....</b>                              | <b>71</b> |
| <b>III.2.5. Etapes et procédures de la coloration de Gram.....</b> | <b>73</b> |
| <b>III.2.6. Observation au microscope.....</b>                     | <b>83</b> |
| <b>III.2.7. Interprétation des résultats .....</b>                 | <b>84</b> |
| <b>III.2.8. Risques d'erreurs.....</b>                             | <b>85</b> |
| <b>III.3. Conclusion.....</b>                                      | <b>86</b> |
| <b>Conclusion générale .....</b>                                   | <b>88</b> |

**Annexes**

**Références bibliographique**

## Liste des abréviations

| <b>Abréviation</b>      | <b>Signification</b>          |
|-------------------------|-------------------------------|
| <b>B. cereus</b>        | Bacillus cereus.              |
| <b>C. perfringens</b>   | Clostridium perfringens.      |
| <b>C. tetani</b>        | Clostridium tetani.           |
| <b>S. aureus</b>        | Staphylococcus aureus.        |
| <b>S. epidermidis</b>   | Staphylococcus epidermidis.   |
| <b>S. saprophyticus</b> | Staphylococcus saprophyticus. |
| <b>M. genitalium</b>    | Mycoplasmes genitalium.       |
| <b>M. hominis</b>       | Mycoplasmes hominis.          |
| <b>U. urealyticum</b>   | Ureaplasma urealyticum.       |
| <b>U. parvum</b>        | Ureaplasma parvum.            |
| <b>pH</b>               | Potentiel hydrogène.          |
| <b>NAG</b>              | N-acétyl glucosamine.         |
| <b>ANAM</b>             | Acide N -acétyl –muramique.   |
| <b>DAP</b>              | Diaminopimélique.             |
| <b>LPS</b>              | Lipopolysaccharides.          |
| <b>G (+)</b>            | Gram positives.               |
| <b>G (-)</b>            | Gram négatives.               |

## Liste des abréviations

---

|             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| <b>PE</b>   | Phosphatidyl-éthanolamine.       |
| <b>PG</b>   | Phosphatidyl-glycérol.           |
| <b>ADN</b>  | Acide Désoxyribo Nucléique.      |
| <b>ARNr</b> | Acide RiboNucléique ribosomique. |
| <b>A</b>    | Adénine.                         |
| <b>G</b>    | Guanine.                         |
| <b>C</b>    | Cytosine.                        |
| <b>T</b>    | Thymine.                         |
| <b>UV</b>   | Ultra violet.                    |

# Liste des figures

## CHAPITRE I: Le monde microbien

| <b>Figures</b>     | <b>Titre</b>  | <b>Page</b> |
|--------------------|---|-------------|
| <b>Figure I.1</b>  | (A) Le microscope d'Antony Van Leeuwenhoek. (B) Bactéries dessinées par van Leeuwenhoek.      | <b>6</b>    |
| <b>Figure I.2</b>  | Les expériences de John Nedham (A) et de Lazzaro Spallanzani (B) sur la génération spontanée. | <b>7</b>    |
| <b>Figure I.3</b>  | Expérience de Pasteur qui acheva la théorie de la génération spontanée.                       | <b>8</b>    |
| <b>Figure I.4</b>  | Arbre phylogénétique universel.   | <b>10</b>   |
| <b>Figure I.5</b>  | Protistes unicellulaire.  | <b>13</b>   |
| <b>Figure I.6</b>  | Protistes pluricellulaire.  | <b>14</b>   |
| <b>Figure I.7</b>  | Protistes coenocytiques.  | <b>14</b>   |
| <b>Figure I.8</b>  | La structure d'une cellule eucaryote.   | <b>16</b>   |
| <b>Figure I.9</b>  | La structure d'une bactérie (procaryote).   | <b>17</b>   |
| <b>Figure I.10</b> | Salmonella thyphimurium.  | <b>19</b>   |
| <b>Figure I.11</b> | Neisseria gonorrhoeae.  | <b>20</b>   |
| <b>Figure I.12</b> | Leptospira.   | <b>20</b>   |
| <b>Figure I.13</b> | Chlamydia trachomatis.  | <b>21</b>   |
| <b>Figure I.14</b> | Bacillus cereus.  | <b>22</b>   |

## Liste des figures

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| <b>Figure I.15</b>                                | Clostridium tetani.   | <b>23</b> |
| <b>Figure I.16</b>                                | Streptocoque.   | <b>24</b> |
| <b>Figure I.17</b>                                | Staphylococcus aureus.  | <b>25</b> |
| <b>Figure I.18</b>                                | Les actinomycètes.  | <b>25</b> |
| <b>Figure I.19</b>                                | Les Mycoplasmes.  | <b>26</b> |
| <b>Figure I.20</b>                                | Halobacterium.  | <b>27</b> |
| <b>Figure I.21</b>                                | (A) Sulfolobus sp. (B) Pyridictium occultum.                                      | <b>28</b> |
| <b>Figure I.22</b>                                | Méthanobactérium.   | <b>28</b> |
| <b>Figure I.23</b>                                | Archaeobactéries.   | <b>29</b> |
| <b><u>CHAPITRE II: La cellule bactérienne</u></b> |   |           |
| <b>Figure II.1</b>                                | Observation de la cellule bactérienne.  | <b>32</b> |
| <b>Figure II.2</b>                                | (A) Microscope optique. (B) Microscope électronique.                              | <b>33</b> |
| <b>Figure II.3</b>                                | Immunocytochimie directe et indirecte.  | <b>33</b> |
| <b>Figure II.4</b>                                | Les différentes formes et associations bactériennes.                              | <b>35</b> |
| <b>Figure II.5</b>                                | Organisation de la cellule procaryote.  | <b>36</b> |
| <b>Figure II.6</b>                                | Structure de Peptidoglycane.  | <b>38</b> |
| <b>Figure II.7</b>                                | Structure chimique N-acétyl glucosamine et l'acide N-acétyl muramique.            | <b>38</b> |
| <b>Figure II.8</b>                                | Représentation du pont peptidique entre deux molécules de peptidoglycane.         | <b>39</b> |
| <b>Figure II.9</b>                                | Structure d'un acide teichoïques: Phosphate + glycérol + R (Alanine, Glucose...). | <b>39</b> |

## Liste des figures

|                     |  |           |
|---------------------|--|-----------|
| <b>Figure II.10</b> | Paroi des bactéries Gram-positives.  | <b>41</b> |
| <b>FigureII.11</b>  | Parois des bactéries Grain négatif.  | <b>42</b> |
| <b>Figure II.12</b> | La structure des lipopolysaccharides.  | <b>42</b> |
| <b>Figure II.13</b> | Modèle de la mosaïque fluide de la structure de la membrane plasmique d'une cellule bactérienne. | <b>45</b> |
| <b>Figure II.14</b> | Les différents types de transport à travers la membrane plasmique.                               | <b>47</b> |
| <b>Figure II.15</b> | Structure de ribosome.   | <b>48</b> |
| <b>Figure II.16</b> | Inclusions cytoplasmique.  | <b>49</b> |
| <b>Figure II.17</b> | Vacuoles à gaz au microscope électronique.   | <b>50</b> |
| <b>Figure II.18</b> | Représentation schématique de la double hélice d'ADN.  | <b>51</b> |
| <b>Figure II.19</b> | Représentation schématique d'un plasmide commercial.   | <b>52</b> |
| <b>Figure II.20</b> | Pili communs chez Escherichia coli.  | <b>54</b> |
| <b>Figure II.21</b> | Pili sexuel.   | <b>55</b> |
| <b>FigureII.22</b>  | Mise en évidence de structure bactérienne.   | <b>56</b> |
| <b>Figure II.23</b> | Structure et attachement du flagelle chez les bactéries Gram+ et les Gram-.                      | <b>58</b> |
| <b>Figure II.24</b> | Types flagellaires et modes d'insertion.   | <b>59</b> |
| <b>Figure II.25</b> | Sens de rotation des flagelles et mouvements des bactéries.                                      | <b>60</b> |
| <b>Figure II.26</b> | Coloration au vert de malachite.   | <b>61</b> |
| <b>Figure II.27</b> | Différents types de spores selon la forme, la position et la déformation de la cellule.          | <b>62</b> |
| <b>Figure II.28</b> | Structure de la spore.   | <b>63</b> |
| <b>Figure II.29</b> | Représentation schématique de la formation de la spore.  | <b>64</b> |
| <b>FigureII.30</b>  | Cycle de sporulation et germination.   | <b>65</b> |

## **CHAPITRE III: Partie expérimental**

|                     |  |           |
|---------------------|--|-----------|
| <b>Figure III.1</b> | Principe de la coloration.                                   | <b>69</b> |
| <b>Figure III.2</b> | Les colorants.   | <b>70</b> |
| <b>Figure III.3</b> | Fiche sécurité.  | <b>71</b> |
| <b>Figure III.4</b> | Matériel utilisé.  | <b>72</b> |
| <b>Figure III.5</b> | Staphylococcus aureus au microscope.                         | <b>84</b> |
| <b>Figure III.6</b> | Escherichia coli au microscope.                              | <b>84</b> |
| <b>Figure III.7</b> | Image récapitulatif sur les étapes de la coloration de Gram. | <b>86</b> |

# Liste des tableaux

|   |  |           |
|---|--|-----------|
| <b><u>CHAPITRE I: Le monde microbien</u></b>      |  |           |
| <b>Tableau I.1</b>                                | Classification les microorganismes dans le monde vivant.             | <b>11</b> |
| <b>Tableau I.2</b>                                | Caractère de différenciation entre cellules procaryote et eucaryote. | <b>18</b> |
| <b><u>CHAPITRE II: La cellule bactérienne</u></b> |  |           |
| <b>Tableau II.1</b>                               | Eléments constants et non constants des bactéries.                   | <b>37</b> |
| <b>Tableau II.2</b>                               | Composition chimique de la paroi gram positif et négatif.            | <b>40</b> |

# Introduction Générale

### Introduction générale

Les formes de vie sur Terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Jusqu'au 20ème siècle, on pensait que la vie n'était possible que dans un environnement «normal», c'est-à-dire là où les conditions sont compatibles avec la vie de l'homme. Puis, les chercheurs ont commencé à découvrir des organismes qui survivent dans des conditions hors de ces normes, dans des milieux caractérisés par des conditions physiques et/ou chimiques extrêmes.

[1]

Les micro-organismes ont été les seuls êtres vivants sur notre planète pendant près de deux milliards d'années. Ils représentent, aujourd'hui, une biomasse totale de 1030 bactéries. Ils assurent les cycles biogéochimiques de l'oxygène, du carbone, de l'azote et d'autres éléments essentiels à la vie. Ils créent et assurent l'équilibre de l'atmosphère, la purification des eaux et la fertilisation des sols, ce qui les rend indispensables à la survie des populations humaines. Ils ont une importance cruciale dans la digestion et l'absorption des aliments que nous ingérons, et dans le développement de notre système immunitaire. Sans leur présence, la vie cesserait d'exister sur notre planète. [2]

La microbiologie est définie comme l'ensemble des disciplines biologiques qui traitent des organismes microscopiques qu'ils appartiennent au règne végétal (bactéries, algues, champignons) ou au règnes animal et qui sont invisibles à l'œil nu .Elle est aujourd'hui divisée de multiples branches : **bactériologie, mycologie, parasitologie et virologie**. Cette discipline comprend la recherche fondamentale sur la biochimie, la physiologie, la biologie et les aspects cliniques des micro-organismes. [3]

L'objectif principal de ce travail est centré sur la technique de coloration de Gram, qui permet de déterminer si les bactéries colorées ont une paroi de type Gram + ou Gram -, d'identifier le type de bactérie infectante et de sélectionner un traitement approprié.

Le manuscrit est composé de trois parties. Le premier chapitre débute par une compilation bibliographique des travaux de nombreux chercheurs sur le monde microbien ; la place des micro-organismes dans le monde vivant, les protistes (définition, structure, fonction, reproduction, métabolisme, écologie) et leur organisation biologique, les caractéristiques

## **Introduction générale**

---

générales de les cellules procaryotes et eucaryotes et la différence entre elles, et la classification des bactéries. Le deuxième chapitre donne une description détaillée de la cellule bactérienne et de ses éléments constants et variables. Le troisième chapitre recueille toutes les informations relatives à la technique de coloration de Gram. Enfin, une conclusion et un rappel pour conclure notre travail.

# CHAPITRE I

## Le monde microbien



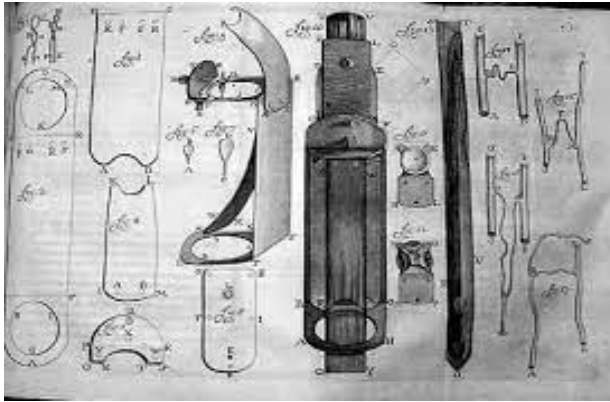
## I.1. Introduction

La microbiologie a été classiquement définie comme étant l'étude d'organismes trop petits pour être vus à l'œil nu. La microbiologie est principalement concernée par des organismes d'un diamètre inférieur à un millimètre, qui sont invisibles et doivent être examinés au microscope. Une variété extraordinaire d'organismes notamment **les virus, les bactéries**, beaucoup **d'algues, de mycètes et les protozoaires** sont dans cette catégorie. Cependant, d'autres organismes quoique visibles à l'œil nu, sont étudiées par des microbiologistes en particulier des algues et des mycètes. Les difficultés d'établir des limites à la microbiologie conduisirent Roger Stanier (1916-1982) à définir la microbiologie non seulement en termes de taille, mais encore en termes de techniques utilisées. Un microbiologiste isole d'abord un micro-organisme spécifique d'une population et le cultive. Donc, la microbiologie utilise des techniques telles que la stérilisation et l'emploi de milieux de culture nécessaires à l'isolement et à la croissance des microorganismes. [4]

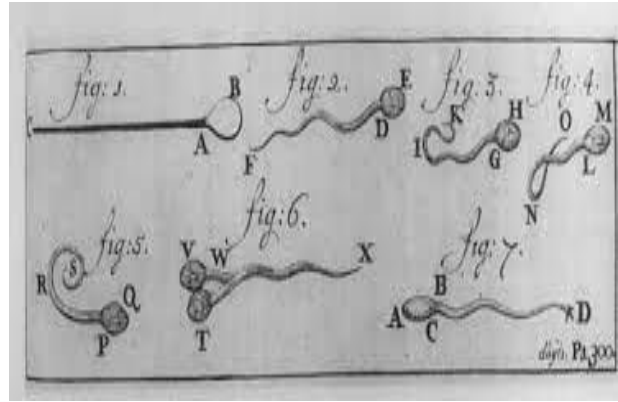
## I.2. Historique

Depuis la plus haute antiquité, les microorganismes ont été utilisés empiriquement pour produire et conserver les aliments. De même, la fabrication des laits fermentés et des fromages a été pratiquée depuis des millénaires dans les différentes régions du globe et la découverte des micro-organismes nécessitait la fabrication d'un outil : c'est le Hollandais **Antony Van Leeuwenhoek** (1632-1723) qui conçut le **microscope le plus simple**. Ainsi, il révéla au monde scientifique la prodigieuse diversité des microorganismes et l'incroyable richesse des milieux naturels, comme l'eau en protozoaires, algues, levures et bactéries. [5]





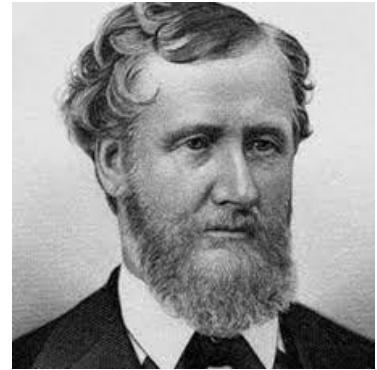
(A)



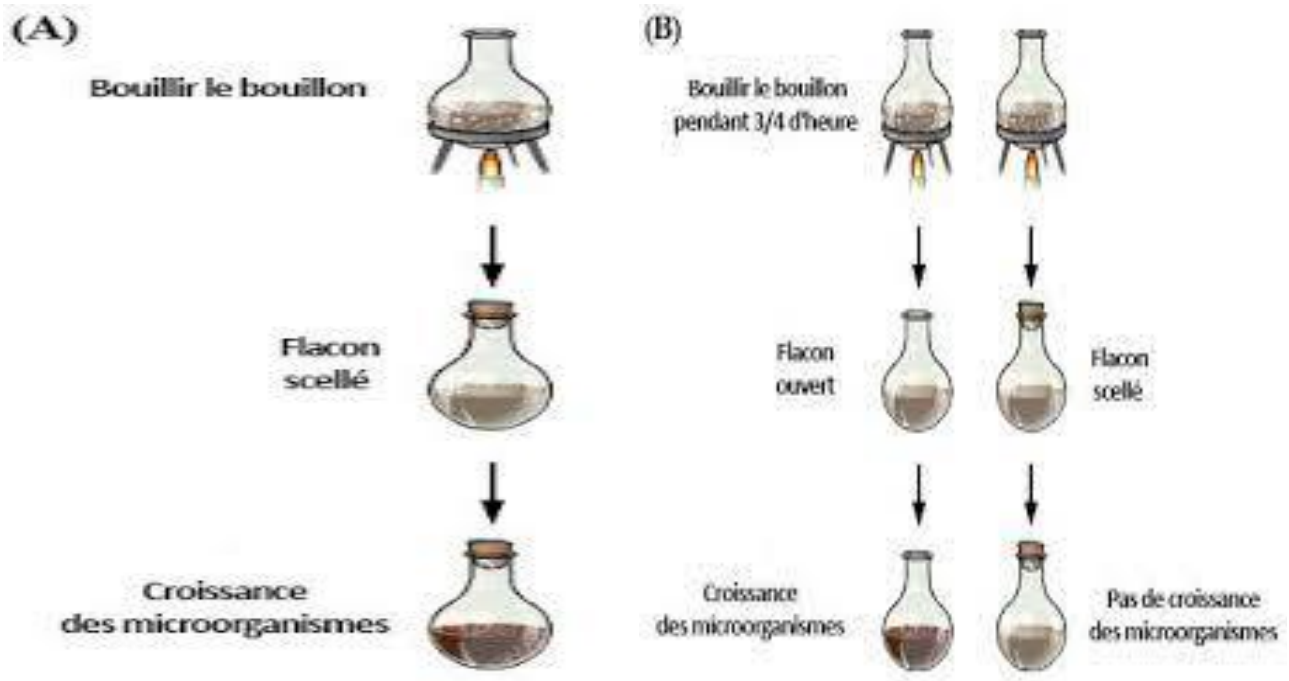
(B)

**Figure I.1 : (A) Le microscope d'Antony Van Leeuwenhoek. (B) Bactéries dessinées par van Leeuwenhoek.**

Le concept ou théorie de la **génération spontanée** existe depuis plusieurs dizaines de siècles. Le philosophe Aristote défendait cette théorie. On croyait que les organismes vivants naissaient de végétaux et d'animaux en décomposition grâce à une mystérieuse force vitale. Après la découverte des animalcules par **Van Leeuwenhoek**, cette théorie se confirma, notamment par les expériences de **John Nedham**, en 1745, qui démontra la croissance des micro-organismes dans des flacons contenant des bouillons de viande ou de maïs.



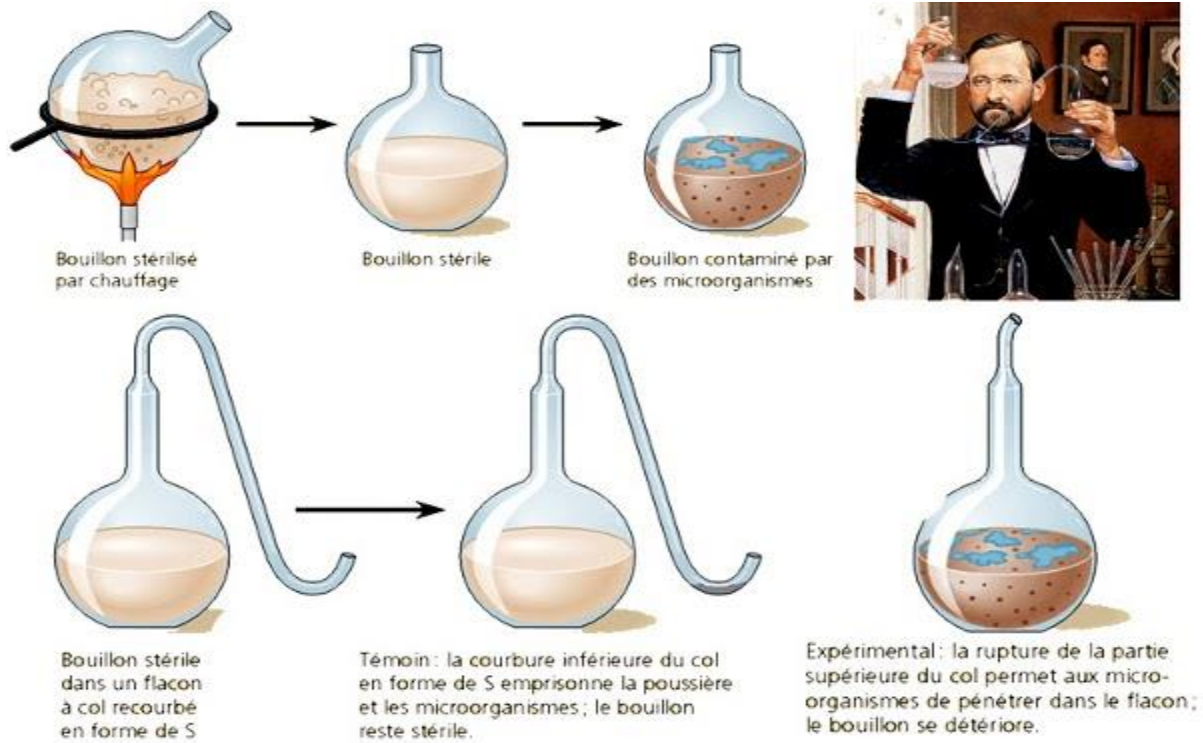
Ces bouillons furent chauffés avant d'être enfermés dans des flacons. Puis, **Lazzaro Spallanzani** démontra que les flacons de **Nedham** n'étaient pas étanches. Il ferma les flacons avant le chauffage et aucune croissance ne fut observée. Donc, les micro-organismes proviennent de l'air. Ses travaux furent critiqués par Nedham (les bouchons ont empêché l'entrée de la force vitale !) et par Lavoisier (La fermeture des flacons empêche l'entrée de l'oxygène, nécessaire à la vie !). [6]



*Figure I.2 : Les expériences de John Nedham (A) et de Lazzaro Spallanzani (B) sur la génération spontanée.*

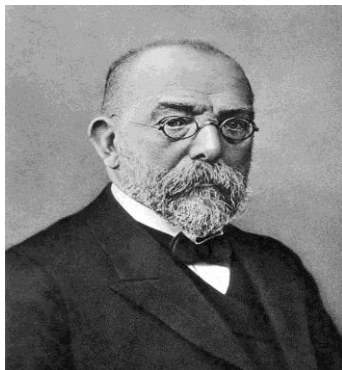
L'idée de la **génération spontanée** sera donc encore très ancrée dans les esprits jusqu'au début du XIXe. Jusqu'en 1830 précisément. Car à cette date, on découvre des êtres vivants encore plus minuscules, les "microbes" (levures et bactéries). D'où viennent-ils ? Cet événement relance le débat. Devant les querelles des scientifiques, l'Académie de sciences leur demande de trancher et d'en finir une bonne fois pour toutes.

Le chimiste Louis Pasteur prit en charge cette question. A l'aide d'un protocole très rigoureux, il montre qu'aucune culture ne se développe dans un ballon fermé et stérilisé contenant de la matière organique. Bref, que la génération spontanée n'existe pas. Cette prouesse lui vaudra le prix de l'Académie des sciences en 1862. [7]



*Figure I.3: Expérience de Pasteur qui acheva la théorie de la génération spontanée.*

La microbiologie est devenue une science à part entière, lorsqu'on a réussi à obtenir des **cultures pures**, grâce au développement des **milieux de culture gélosés** (solides) et **les boîtes de Petri**. Aussi, grâce à **la fabrication de microscopes** plus puissants que les premières loupes et l'élaboration de **colorations spécifiques**...



La relation directe entre une bactérie et une maladie a été démontrée par le **médecin allemand Robert Koch (1843-1910)** en étudiant la **tuberculose** et son agent *Mycobactérie tubercules*. Pour affirmer cette causalité, il faut vérifier plusieurs critères rassemblés sous le nom de « **Postulats de Koch** ».

**1-Le micro-organisme doit être présent chez tous les sujets malades, et absents chez les sujets sains.**

2-Le micro-organisme doit être isolé et cultivé en culture pure

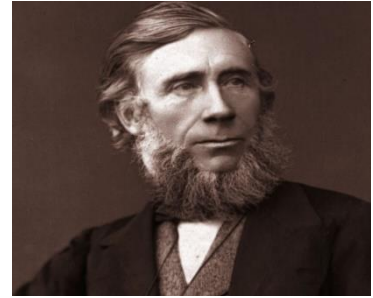
3-A partir de ces cultures pures on doit être en mesure de provoquer la maladie par inoculation expérimentale

4-Le même micro-organisme doit être de nouveau isolé des malades expérimentaux.

En même temps et par la suite d'autres scientifiques célèbres :

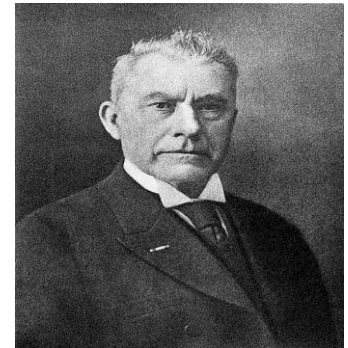
**Tyndall 1877** : découverte des spores, leur thermorésistance et il mit au point la **tyndallisation**.

La **tyndallisation** est un procédé de stérilisation modérée qui permet d'éliminer du milieu les formes de résistance des bactéries que sont les spores très pratiqué au début du XX<sup>e</sup> siècle. Elle tire son nom du scientifique irlandais **John Tyndall** et est encore pratiquée, souvent sous le nom de « traitements thermiques à basses températures ». [8]



**Winogradsky 1856-1953** : Travaux sur les bactéries nitrifiantes, les bactéries fixatrices de l'azote, sulfureuses et la décomposition bactériennes de la cellulose dans les sols.

**Beijerinck 1851-1931** : les bactéries fixatrices de l'azote, symbiotiques. [3]



### I.3. Place des microorganismes dans le monde vivant

Depuis leur mise en évidence à la fin du XVII<sup>e</sup> siècle par Anthony van Leeuwenhoek, la place des bactéries dans le monde vivant a beaucoup varié. [7]

#### I.3.1. Classification de Haeckel En 1866

Haeckel divise le monde vivant en trois règnes, le règne animal, le règne végétal et le règne des protistes qui rassemble les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries.

### I.3.2. Distinction entre cellules eucaryotes et procaryotes selon Edward Chatton

En 1937 et grâce à l'invention du microscope électronique, **Edward Chatton** mis en opposition deux types de cellules, la cellule eucaryote la cellule procaryote.

### I.3.3. Classification selon Murray

En 1968, **Murray**, dans la continuité du travail **D'E .Chatton**, divise le monde vivant en deux règnes, celui des "Eucaryote" et celui des "Procaryote".

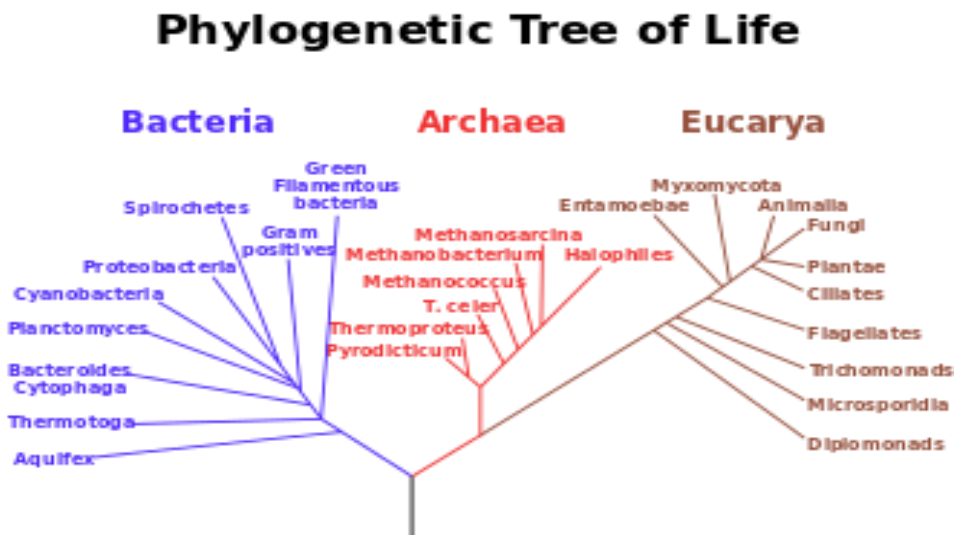
### I.3.4. Classification à cinq règnes

En 1969, **Whittaker** décrit une classification à cinq règnes. Quatre règnes eucaryotes (Animal, Végétal, Champignons et Protistes). Les procaryotes se regroupent dans un règne à part.

### I.3.5. Classification Génomique selon Woese (1978)

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de diviser les organismes vivants en trois domaines. Le domaine des Bactérie ou Eubactérie, le domaine des Archaea et le domaine des Eucarya (animaux, plantes, les mycètes et les protistes). [9]

C'est le même **Woese** qui en 1990 posera les bases du système actuel découpant le vivant en trois domaines : Eucaryotes, Archéobactéries et Eubactéries (ces deux derniers étant regroupés sous le terme de Procaryotes).



*Figure I.4 : Arbre phylogénétique universel.*

### I.3.6. Classification selon Cavalier-Smith

Ainsi en **2004 Cavalier-Smith** a proposé un regroupement en deux empires (eu et procaryotes) et six règnes : Animal, Champignon, Végétal, Chromistes, Protozoaires et Bactéries. [10]

| <b>Haeckel (1894)</b><br>Trois règnes | <b>Whittaker (1969)</b><br>Cinq règnes | <b>Woese (1977)</b><br>Six règnes | <b>Woese (1990)</b><br>Trois domaines |            | <b>Cavalier-Smith (2004)</b><br>Deux empires<br>Et six règnes |             |
|---------------------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------------|------------|---|-------------|
| <b>Animal</b>                         | Animal                                 | Animal                            | Eucaryote                             |            | Eucaryote   | Animal      |
| <b>Végétale</b>                       | Champignon                             | Champignon                        |                                       |            |   | Champignon  |
|                                       | Végétale                               | Végétale                          |                                       |            |   | Végétale    |
|                                       | Protiste                               | Protiste                          |                                       |            |   | Chromiste   |
|                                       |  |                                   |                                       |            |   | Protozoaire |
| <b>Protozoaire</b>                    | Monère                                 | Archée                            | Procaryote                            | Archée     | Procaryote  | Bactérie    |
|                                       |  | Eubactérie                        |                                       | Eubactérie |   |             |

*Tableau I.1 : Classification les microorganismes dans le monde vivant.*

## I.4. Les protistes

### I.4.1. Définition

Les protistes sont définis par des propriétés communes et spécifiques. Ils sont caractérisés avant tout par une organisation biologique rudimentaire (une taille microscopique). Unicellulaires ou pluricellulaires, ils présentent toujours le même type de cellule indifférenciée (aucune différence morphologique, physiologique ou fonctionnelle). Les protistes se distinguent des animaux et des végétaux par leur structure, leur physiologie et leur écologie. [11]

## I.4.2. Propriétés générales

### I.4.2.1. Structure et fonction

Une taille de loin plus réduites que celles des cellules animales et végétales. Les cellules animales et végétales sont incapables d'exister indépendamment de leur organisme.

La taille réduite des protistes confère des avantages physiologiques. Un rapport surface /volume supérieur à celui de tous les autres organismes vivants. Ce qui permet des échanges et des interactions remarquables avec le milieu. Sans oublier une dissémination et une distribution dans la nature unique et impressionnante.

### I.4.2.2. Reproduction

Les protistes et en particulier les bactéries ont des modes de reproduction simple, spécifique et rapide (temps de génération courts).

Les bactéries, *Escherichia coli* par exemple se reproduit par simple division binaire en 20 minutes. Cela se produit bien sûr en conditions optimales de culture en laboratoire. Ces taux de croissance exceptionnels induisent des rendements de croissances incomparables. [7]

### I.4.2.2. Métabolisme

Les protistes, et surtout les bactéries, ont une diversité métabolique extrême largement supérieure à celle des animaux et des végétaux. Chaque microorganisme est adopté à métaboliser un nombre limité de substrats alors que dans leur ensemble, ils sont capables de métaboliser quasiment toutes les substances organiques naturelles ou synthétiques. Certains protistes sont capables de synthétiser et de libérer certaines de leurs enzymes hydrolytiques uniquement en présence de leurs substrats spécifiques et seulement en absence d'autres composés métaboliques plus bénéfiques dans leur milieu, c'est les enzymes inductibles.

### I.4.2.2. Ecologie

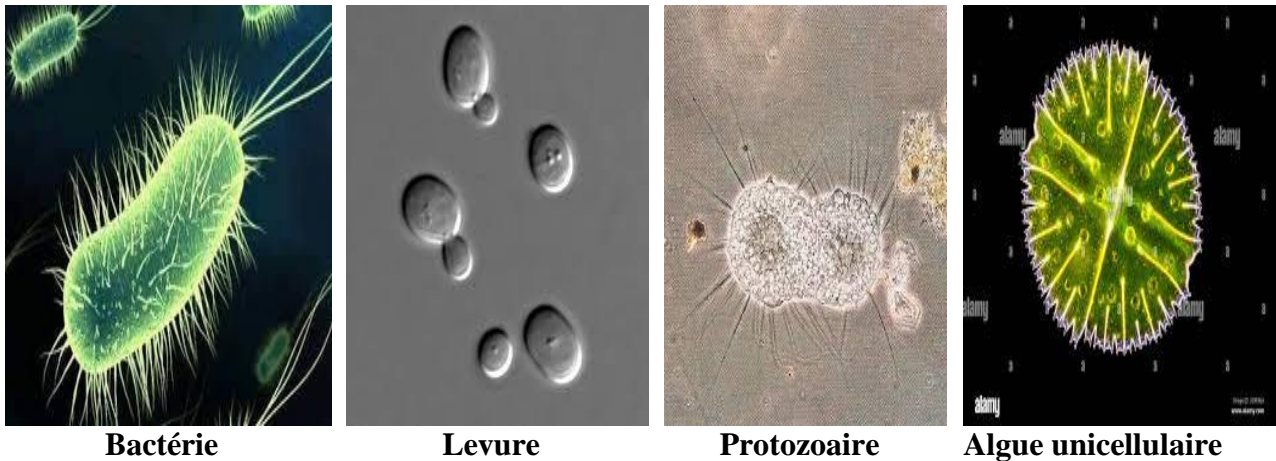
Les protistes sont présents dans tous les écosystèmes (ubiquitaires). Dans les milieux aquatiques (mers et les océans), ils constituent la biomasse qui nourrit l'ensemble de la faune marine. Dans le sol, ils jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique, la fourniture de l'azote assimilable aux plantes et la minéralisation de la matière organique. Ainsi, ils participent activement aux équilibres gazeux de l'atmosphère, en étant à la fois producteurs et consommateurs, d'O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>. [11]

## I.5. Organisation biologique des protistes

La diversité structurale et morphologique des protistes s'exprime par une organisation biologique et cellulaire différente de celles des autres organismes vivants. Les protistes se présentent selon trois types différents d'organisation biologique de l'individu.

### I.5.1. Protistes unicellulaires

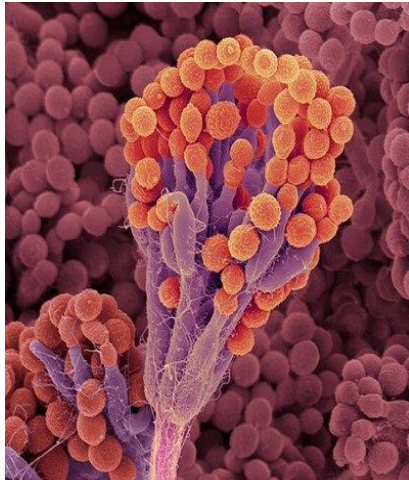
C'est le cas de la plupart des protistes, dont **les bactéries**, **les protozoaires**, **les levures** et de **nombreuses algues**. Chaque individu est constitué d'une cellule unique qui se suffit à elle-même et constitue un organisme complet et autonome, donc doué de toutes les fonctions de la vie.



*Figure I.5 : Protistes unicellulaire.*

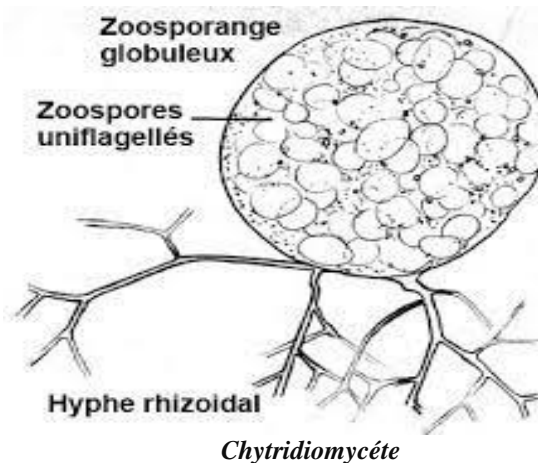
### I.5.2. Protistes pluricellulaires

Ce sont principalement **les champignons** certaines **algues** et quelques **bactéries** qui sont des organismes formés de plusieurs cellules (pluricellulaires ou multicellulaire). Mais dans un même organisme, leurs cellules sont équivalentes et ne montrent pas de différenciation fonctionnelle ou morphologique significative.

*penicillium camembertii**penicillium notatum**algue bleu**Figure I.6 : Protistes pluricellulaire.*

### I.5.3. Protistes coenocytiques

Ces organismes qui peuvent être de grande taille, se composent d'une masse **cytoplasmique** importante où baignent en même temps plusieurs **noyaux**, sans cloisonnement entre eux. C'est principalement le cas **des champignons inférieurs** et de quelques **algues**. Sur la base de la spécificité de la structure cellulaire qui est différentes, les protistes sont subdivisés en deux grands groupes : Les protistes eucaryotes (protistes supérieurs) et les protistes procaryotes (protistes inférieurs). [12]

*Figure I.7 : Protistes coenocytiques.*

## I.6. Caractéristiques générales des cellules procaryotes et eucaryotes

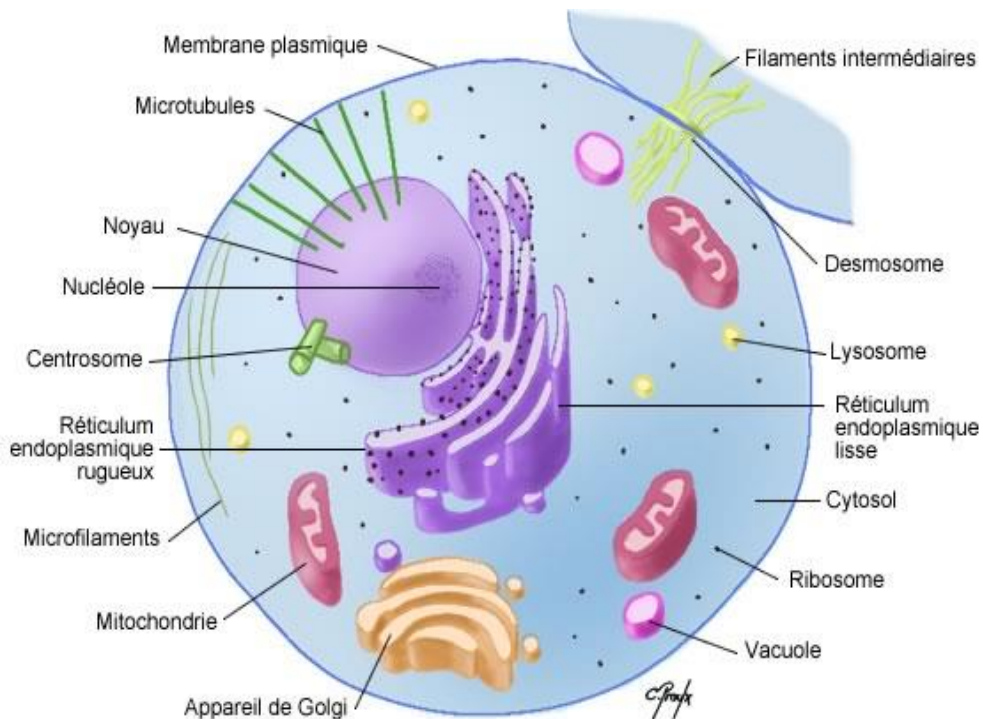
Les divers groupes d'organismes vivants doivent être étudiés par rapport à leur unité de structure, la cellule.

On distingue en effet, la cellule eucaryote caractéristique des plantes et des animaux, des protistes supérieurs et la cellule procaryote caractéristique des protistes inférieurs et en particulier des bactéries.

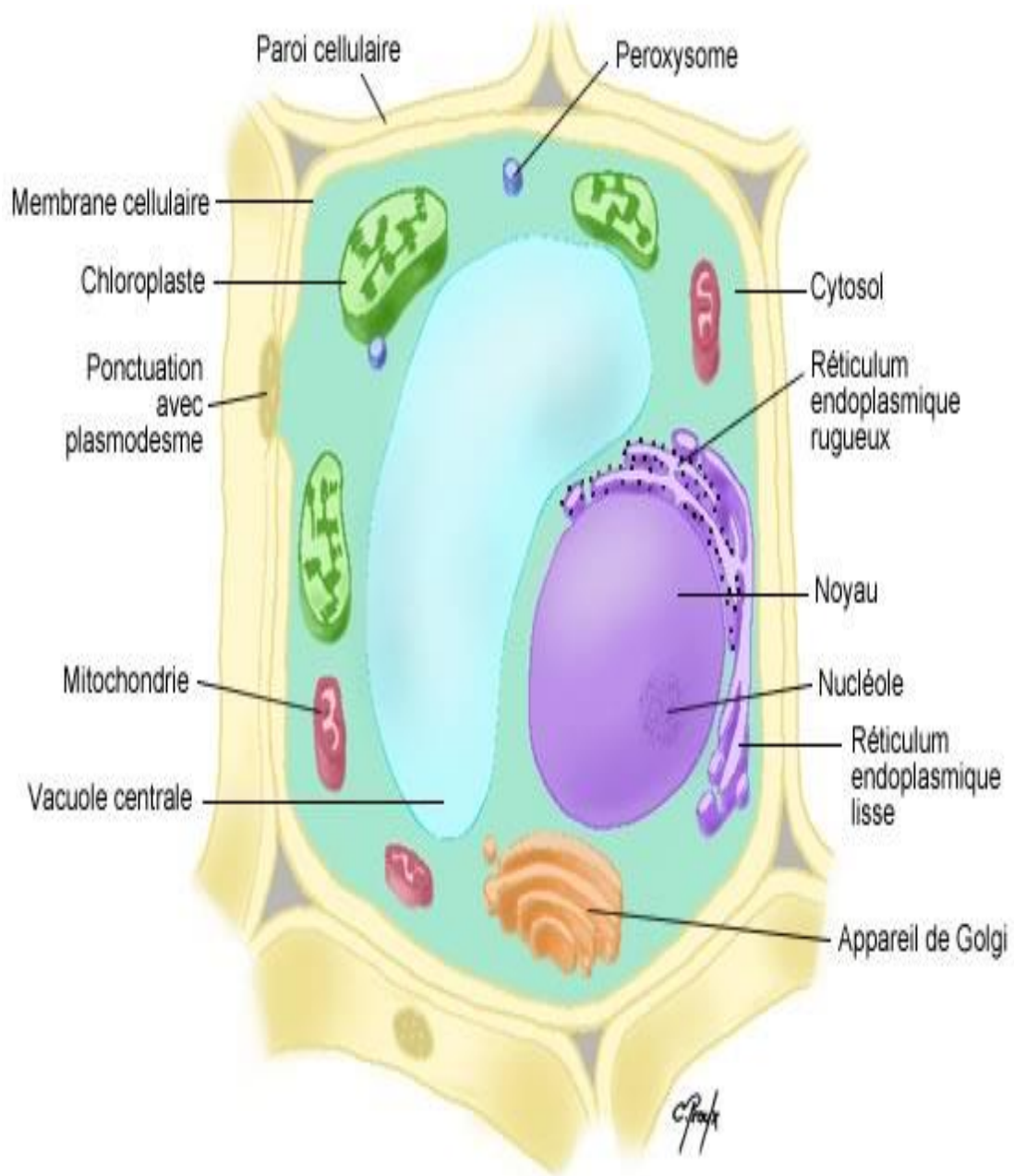
- **La cellule eucaryote** comprend un « vrai » noyau entouré d'une enveloppe nucléaire, contenant deux jeux semblables de chromosomes (homologues) : elle est diploïde.
- **La cellule procaryote** ne possède pas un « vrai » noyau mais un appareil nucléaire diffus, non isolé par une membrane, avec un seul chromosome, porteur de la grande majorité des informations génétiques de la cellule : elle est haploïde. [13]

Parmi les **cellules eucaryotes** on distingue deux types de cellules:

- ✓ Les cellules animales.
- ✓ Les cellules végétales.

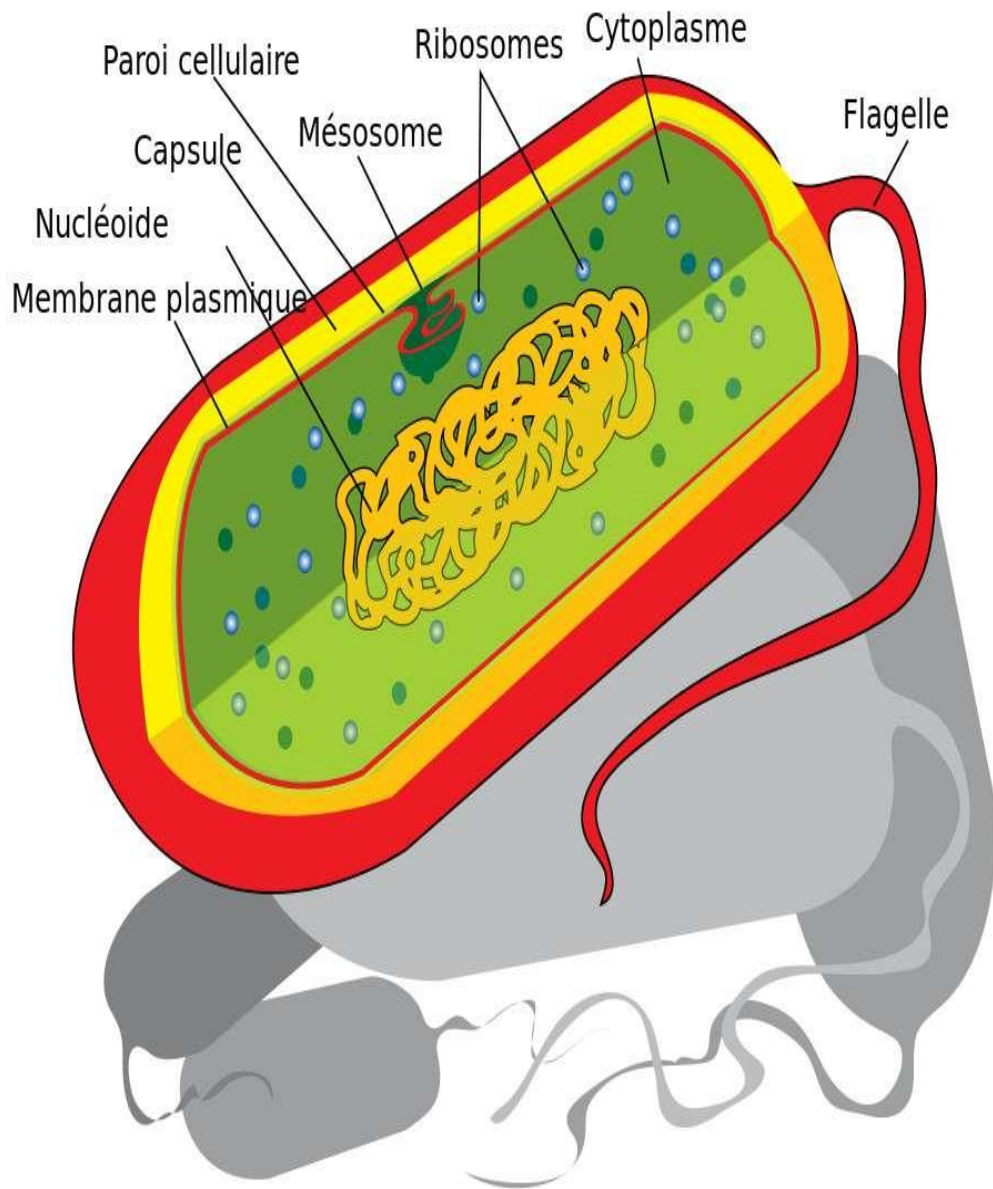


*Organisation de la cellule animale.*



*Organisation de la cellule végétale*

*Figure I.8 : La structure d'une cellule eucaryote.*



*Figure I.9 : La structure d'une bactérie (procaryote).*

### **I.6.1. Différence entre cellules procaryote et eucaryote**

Les principales différences entre les cellules eucaryotes et procaryotes sont retrouvées dans le tableau suivant : [14]

|                        | CELLULE EUCARYOTE  |                               | CELLULE PROCARYOTE                             |
|------------------------|--|-------------------------------|--|
|                        | Cellule animale  | Cellule végétale              | Bactérie                                       |
| Taille                 | Entre 20 et 50 $\mu\text{m}$                             | Entre 50 et 100 $\mu\text{m}$ | De l'ordre du $\mu\text{m}$                    |
| 1. Paroi               | Absente  | Paroi cellulosique            | Paroi bactérienne                              |
| 2. Membrane plasmique  | Présente   |                               |  |
| 3. Enveloppe nucléaire | Noyau vrai délimité par une enveloppe                    |                               | Pas de noyau vrai                              |
| 4. Matériel génétique  |  |                               |  |
| 5. Cytosol             | Composé d'eau, d'ions et de molécules organiques         |                               |  |
| Organites :            | Organites délimitant des compartiments internes          |                               | Pas d'organites, pas de compartiments internes |
| 6. R. E                |  |                               |  |
| 7. Corps de Golgi      | • Reticulum endoplasmique, corps de Golgi, mitochondries |                               |  |
| 8. Mitochondries       |  |                               |  |
| 9. Chloroplastes       | • Pas de chloroplastes                                   | • chloroplastes               | Présence possible de chlorophylle              |
| 10. Vacuoles           | • Pas de vacuole   | • vacuole                     |  |
| Métabolisme            | hétérotrophe   | autotrophe si chloroplastes   | autotrophe si chlorophylle                     |

Tableau I.2 : Caractère de différenciation entre cellules procaryote et eucaryote.

## I.7. Classification des bactéries

La classification de Bergey sépare les bactéries en 4 divisions, selon la présence ou non d'une paroi et selon la nature de cette paroi :

### I.7.1. Bactéries à Gram négatif

Ils représentent plus de 2/3 des bactéries répertoriées dans la classification de Bergey. Elles possèdent une paroi formée de deux éléments : une fine couche de peptidoglycane (un composé exclusif des bactéries) surmontée par une membrane externe. Selon leur morphologie, on distingue plusieurs groupes :

#### I.7.1.1. Les bacilles à Gram négatif

En forme de bâtonnet ou cylindre, c'est un groupe très hétérogène où l'on trouve des bactéries de l'environnement (**Rhizobium**, **Nitrobacter** et **Thiobacillus**), des agents pathogène pour l'homme (**Yersinia pestis** : agent de la peste ; **Shigella dysenterea** : agent de la dysenterie ; **Salmonella thyphimurium** : agent de la typhoïde, et surtout **Escherichia coli** (la plus connue et la plus étudiée) ou même des bactéries **saprophytes** du tubes digestif des mammifères.

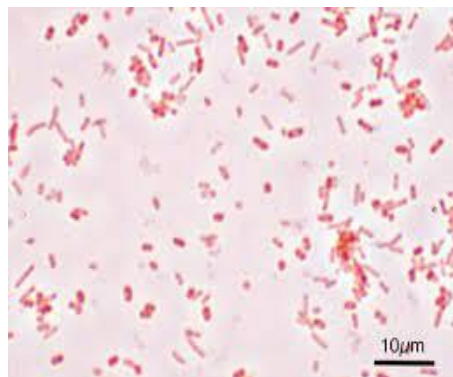


Figure I.10 : *Salmonella thyphimurium*.

#### I.7.1.2. Les cocci à Gram négatif

De forme sphérique ou arrondie, ils vivent souvent associés en groupes. Les plus pathogènes pour l'homme sont le gonocoque (**Neisseria gonorrhoeae**), un agent responsable de la gonorrhée (maladie sexuellement transmissible). [11]



*Figure I.11 : Neisseria gonorrhoeae.*

### I.7.1.3. Spirochètes

Elles ont des formes hélicoïdales et possèdent un appareil locomoteur complexe, composé de filaments axiaux associés en flagelles internes. Elles sont très répandues dans les eaux douces et trois genres sont pathogènes pour l'homme : **Leptospira**, **Borrelia** et **Treponema**. [11]



*Figure I.12 : Leptospira.*

### I.7.1.4. Chlamydies

Elles sont aussi des parasites intracellulaires obligatoires, mais ils sont incapables de produire seuls la moindre énergie. Ils dépendent entièrement de la cellule hôte. L'agent infectieux le plus connu chez l'homme est **Chlamydia trachomatis** (agent du Trachome : une inflammation des conjonctives de l'œil pouvant entraîner une cécité partielle ou totale. [11]



*Figure I.13 : Chlamydia trachomatis.*

### I.7.1.5. Cyanobactéries

Ce sont des bactéries **photoautotrophes** obligatoires mais certaines peuvent utiliser des substrats carbonés. Elles possèdent la chlorophylle « a » ou des pigments appelés **phycobilines**. Elles sont immobiles ou mobiles par glissement ou grâce à leurs « vacuoles à gaz » qui leurs permettent un mouvement vertical en milieu aqueux. [11]

### I.7.2. Bactéries à Gram positif

Sont caractérisées par une enveloppe comportant une seule membrane limitante : la membrane cytoplasmique, doublée d'une épaisse couche de peptidoglycane, composé ici d'un nombre important de feuilletts superposés et organisés en un édifice tridimensionnel covalent très résistant. Ce dernier est traversé dans son épaisseur par des molécules spécifiques, appelées acides teichoïques (polymères d'alcool-phosphates). [15]

#### I.7.2.1. Les bacilles à Gram positif

Lorsque les bactéries à Gram positif ont la forme de bâtonnets, elles sont appelées bacilles. La plupart de ces bactéries se trouvent généralement sur la peau, mais certaines peuvent causer de graves problèmes de santé.

Les bacilles à Gram positif sont en outre classés en fonction de leur capacité à produire des spores. [16]

### I.7.2.1.1. *Bacillus cereus*

*B. cereus* est une bactérie sporulée qui se trouve dans le sol et dans certains aliments. Il est le plus souvent associé à une maladie due à la consommation de riz insuffisamment cuit ou réchauffé. *B. cereus* causes:

- ✓ la diarrhée
- ✓ la nausée
- ✓ infections des plaies
- ✓ infections respiratoires
- ✓ endophtalmie. [16]



*Figure I.14 : Bacillus cereus.*

### I.7.2.1.2. *Clostridium*

On les trouve dans le sol, dans la vase, dans les intestins des animaux et des hommes et sont très pathogènes. La plus part mobiles, Gram (+), les vieilles cultures peuvent être Gram (-).

La majorité sont anaérobies strictes, certains peuvent tolérer une faible quantité d'oxygène. Catalase (-). La formation de spore est inhibée par l'oxygène. Les plus rencontrés en microbiologie médicale sont : [6]

#### I.7.2.1.2.1. *Clostridium botulinum*

Les spores de *Clostridium botulinum* produisent la toxine botulique, la toxine la plus dangereuse pour l'homme. Cela conduit au botulisme, notamment:

- ✓ botulisme d'origine alimentaire (le plus courant).
- ✓ botulisme infantile.
- ✓ botulisme des plaies.
- ✓ botulisme par inhalation. [16]

#### **I.7.2.1.2.2. Clostridium perfringens**

C. perfringens est généralement associée à la production et à la transformation de la viande. Si un humain mange de la viande contaminée, il peut avoir une intoxication alimentaire. Les symptômes comprennent la diarrhée et des crampes abdominales qui durent moins de 24 heures.

#### **I.7.2.1.2.3. Clostridium tetani**

C. tetani les spores produisent la toxine tétanique, une substance neurotoxique. Les spores peuvent être trouvées dans le sol, les cendres et sur les outils rouillés.

Si la toxine provoque une infection, on parle de tétanos. C'est une grave urgence médicale. [16]



*Figure I.15 : Clostridium tetani.*

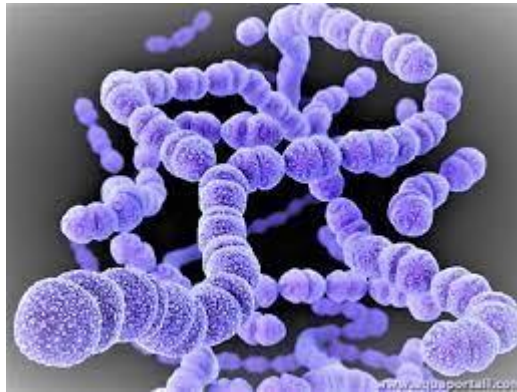
#### **I.7.2.2. Les cocci à Gram positif**

Les cocci à Gram positif sont de forme circulaire ou ovale. Le terme «cocci», qui signifie sphère, indique que les bactéries sont généralement rondes.

Les types suivants sont des cocci à Gram positif:

### I.7.2.2.1. Streptocoque

Les bactéries streptocoques sont également des bactéries pathogènes courantes. Les organismes suivants sont les plus répandus. En général, d'autres groupes de streptocoques peuvent provoquer des maladies d'origine alimentaire accompagnées d'un mal de gorge. [16]

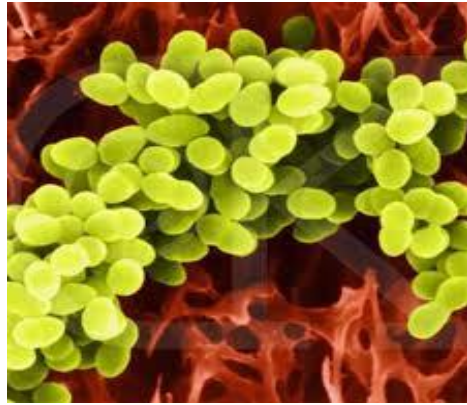


*Figure I.16 : Streptocoque.*

### I.7.2.2.2. Staphylococcus

Trois espèces de staphylocoques sont d'importants pathogènes humains : **S. aureus**, **S. epidermidis** et **S. saprophyticus**. Parmi ces trois, *S. aureus* est de loin le plus courant et provoque les infections les plus graves [17], notamment:

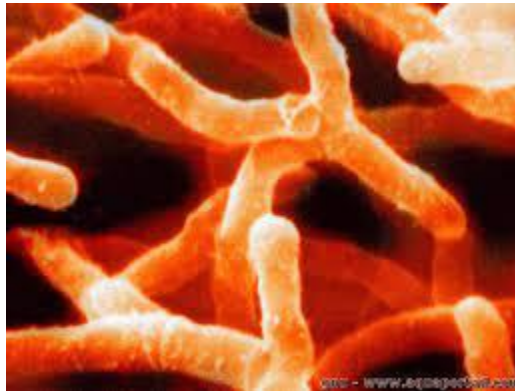
- ✓ infections cutanées, comme la cellulite et la folliculite.
- ✓ arthrite septique.
- ✓ pneumonie bactérienne.
- ✓ intoxication alimentaire. [16]



*Figure I.17 : Staphylococcus aureus.*

### I.7.2.3. Les actinomycètes

Les actinomycètes sont des procaryotes dont la croissance (prothallus) consiste en des fils ramifiés et des tiges, et donne parfois naissance à un mycélium typique, qui est unicellulaire, au cours des premiers stades de croissance. Les hyphes, qui ne sont généralement pas cloisonnées, ont tendance à devenir cloisonnées dans des conditions particulières, comme lors de la croissance dans des milieux de culture solides pendant une longue période. [18]



*Figure I.18 : Les actinomycètes.*

### I.8. Les Mycoplasmes

Ce sont des bactéries ubiquitaires, dépourvues de paroi, difficiles à cultiver. Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme, **Mycoplasma pneumoniae** agent d'infections

respiratoires, **Mycoplasmes génitaux** *M. genitalium*, *M. hominis* et **Ureaplasma spp.** (regroupant deux espèces: *U. urealyticum* et *U. parvum*), responsables d'infections génitales. D'autres espèces sont commensales des voies respiratoires et des voies génitales.

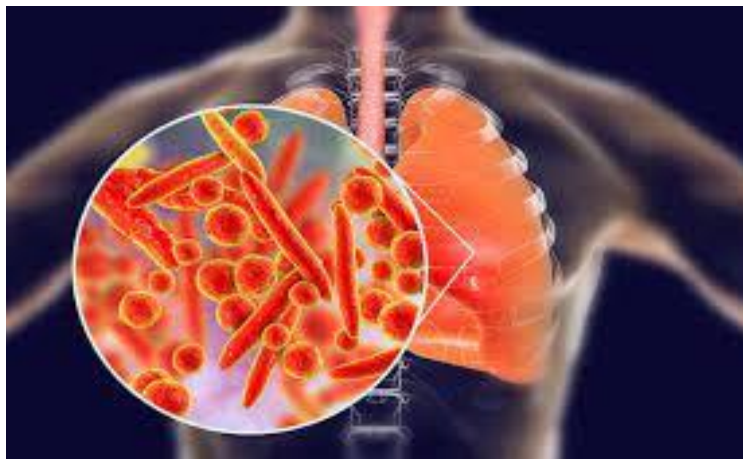
Des espèces différentes sont commensales ou pathogènes strictes de certaines espèces animales. Enfin les mycoplasmes contaminent fréquemment les cultures cellulaires. [19]



*Mycoplasma pneumoniae*



*Mycoplasmes génitaux*



*Bactérie de Mycoplasma pneumoniae dans les poumons humains*

*Figure I.19 : Les Mycoplasmes.*

## I.9. Archaeobactéries

Ce sont des bactéries adaptées à la vie dans des conditions extrêmes (forte salinité, haute température, faible pH, sans oxygène). Leur paroi ne contient pas de peptidoglycane contrairement aux Eubactéries. Leur membrane cellulaire est aussi distincte des eubactéries et des eucaryotes. Leur énergie est généralement obtenue par chimiosynthèse en utilisant des sources d'électrons inorganiques et la plupart ne requièrent pas d'oxygène. On distingue 3 grands groupes :

### I.9.1. Les halophiles extrêmes

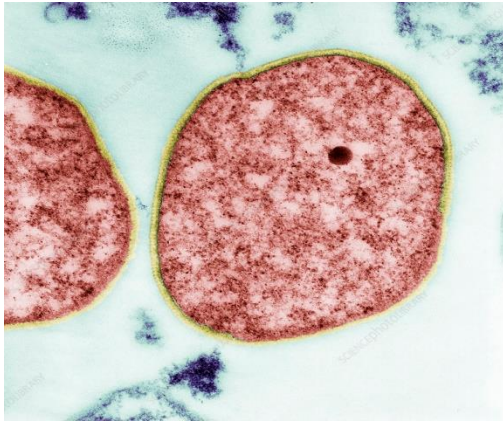
Ce sont des bactéries qui nécessitent une présence de sel à 9% minimum. Ils tolèrent des pH basiques de l'ordre de 11.5. On les trouve dans les lacs salés, les marais salants et saumures (eau très salée). Ce sont les seules Archaeobactéries capables de photosynthèses grâce à des pigments caroténoïdes, qui leur confèrent une couleur rose. Le genre *Halobacterium* en est l'exemple type.



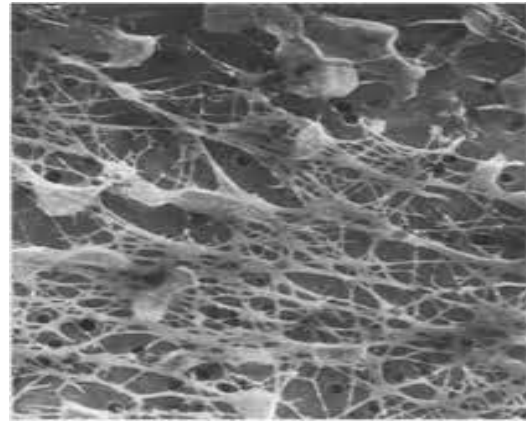
*Figure I.20 : Halobacterium.*

### I.9.2. Les Thermophiles extrêmes

Elles nécessitent des températures élevées. La température optimale de croissance est de l'ordre de 80°C et même plus (contrairement aux Eubactéries : 20–40°C). Anaérobies et résistants aux pH acides extrêmes. Elles sont thermoacidophiles. *Pyridictium occultum* : 105°C ; *Sulfolobus* sp : 87°C à 90°C et un pH=1.



(A)



(B)

*Figure I.21 : (A) Sulfolobus sp. (B) Pyridictium occultum.*

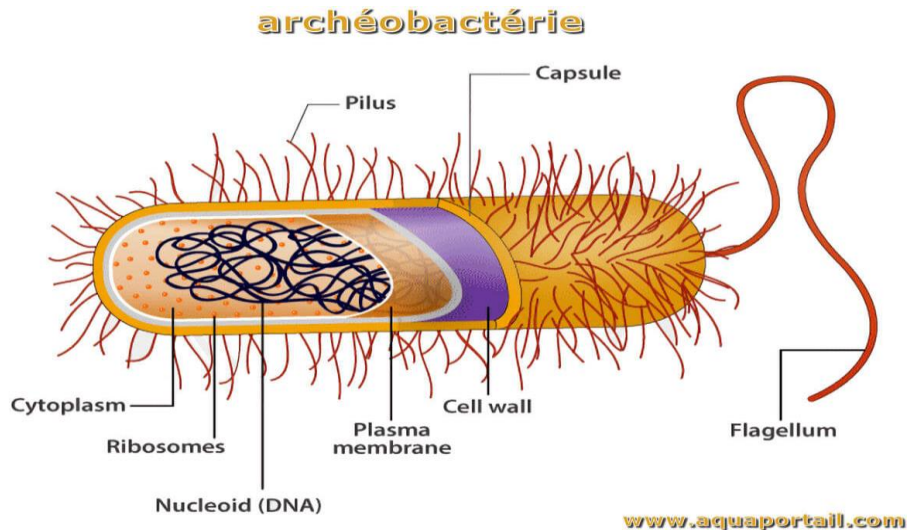
### I.9.3. Les Méthanogènes

Elles sont capables comme Méthanobactérium de produire le méthane ( $\text{CH}_4$ ) à partir de gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ). Généralement saprophytes du tube digestif des ruminants. On les trouve également dans les sédiments des eaux de sources, sources thermales et les stations d'épuration.

[14]



*Figure I.22 : Méthanobactérium.*



*Figure I.23 : Archaeobactéries.*

## I.10. Conclusion

Les micro-organismes sont représentés par diverses formes de vie parmi lesquelles les bactéries, certains champignons microscopiques, les archéobactéries, les protistes ; des algues vertes microscopiques, des animaux du plancton, les planaires, les amibes... Certains microbiologistes y ajoutent les virus alors que d'autres ne les considèrent pas comme des êtres vivants à part entière, puisqu'ils ne peuvent métaboliser ni se répliquer de manière autonome, hors d'une cellule-hôte... Quoi qu'il en soit, le monde vivant est essentiellement microbien.

Dans ce chapitre, nous sommes allés étudier ces micro-organismes et leur place dans ce monde vivant, à travers un aperçu historique de quelques chercheurs dans ce domaine, où ces organismes ont été classés en plusieurs règnes différents, parmi lesquels nous mentionnons La classification de Bergey qui sépare les bactéries en 4 divisions, selon la présence ou non d'une paroi et selon la nature de cette paroi.

# CHAPITRE II

## La cellule bactérienne



## II.1. Introduction

Les bactéries typiques sont des organismes unicellulaires procaryotes. Elles n'ont pas de noyau et leur génome est le plus petit des cellules vivantes. Les bactéries se divisent en eubactéries et en archaebactéries.

**Archaebactéries:** sont adaptées à la vie dans des conditions de vie extrêmes (forte salinité, haute température, faible pH, sans oxygène).

**Eubactéries:** sont des "vraie" bactérie, Les eubactéries représentent le domaine réunissant tous les procaryotes à l'exception des Archées.

Ces deux groupes des bactéries englobent nombreuses types tell que :

- ✓ **Bactéries ubiquitaires :** faisant preuve d'une extraordinaire diversité, les bactéries ont colonisé tous les milieux (air, eau, sol et être vivant...). Certaines peuvent même vivre dans des conditions extrêmes.
- ✓ **Bactéries commensale :** On appelle flore commensale un ensemble de bactéries qui vivent sur ou dans un organisme sans lui porte préjudice. Elle contribue soit à sa défense, soit à son fonctionnement, soit au bon état de ses muqueuses. La flore commensale est principalement sur les muqueuses : peau, tube digestif, arbre respiratoire, appareils génitaux.
- ✓ **Bactéries pathogènes :** ce sont des bactéries qui provoquent un ensemble de troubles spécifiques plus ou moins sévères chez un hôte infecté.
- ✓ **Bactéries opportunistes:** C'est une bactérie commensale normalement présente dans l'organisme sans l'affecter, mais qui peut provoquer une maladie à la suite d'une diminution des défenses de l'organisme (chez les immunodéprimés ou les malades du SIDA...). [9]

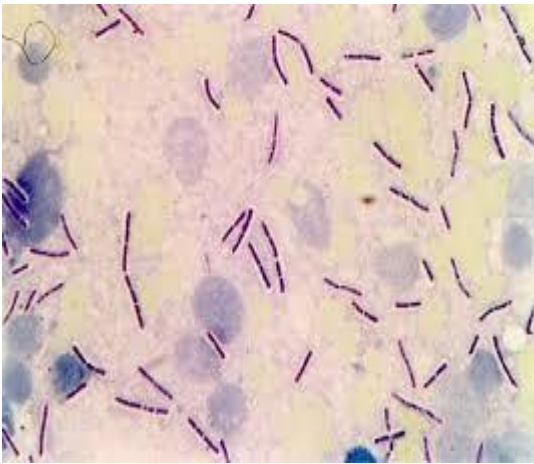
## II.2. Techniques d'observation de la cellule bactérienne

La mise au point du premier microscope par **Antony Van Leeuwenhoek** au cours du **XVII<sup>ème</sup>** siècle marque le point de départ de la microbiologie. L'appareil utilisé, constamment amélioré depuis, permet avec des grossissements pouvant aller jusqu'à 2500 (1000 étant

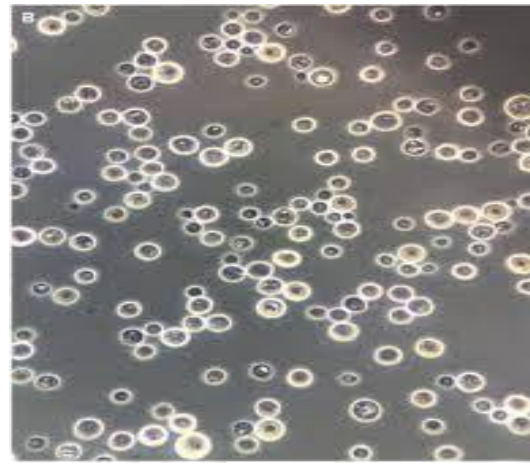
l'utilisation courante) d'observer des structures dont la taille est de l'ordre de  $1\mu\text{m}$ , Divers procédés peuvent être utilisés :

### II.2.1. Observation à l'état frais

Entre **lame** et **lamelle**, des bactéries en milieu liquide et sa variante, **la coloration à l'encre de Chine** pour la mise en évidence de la capsule qui apparaissent sous forme d'un **halo clair** entourant les corps bactériens en noir. [20]



*Observation à l'état frais*

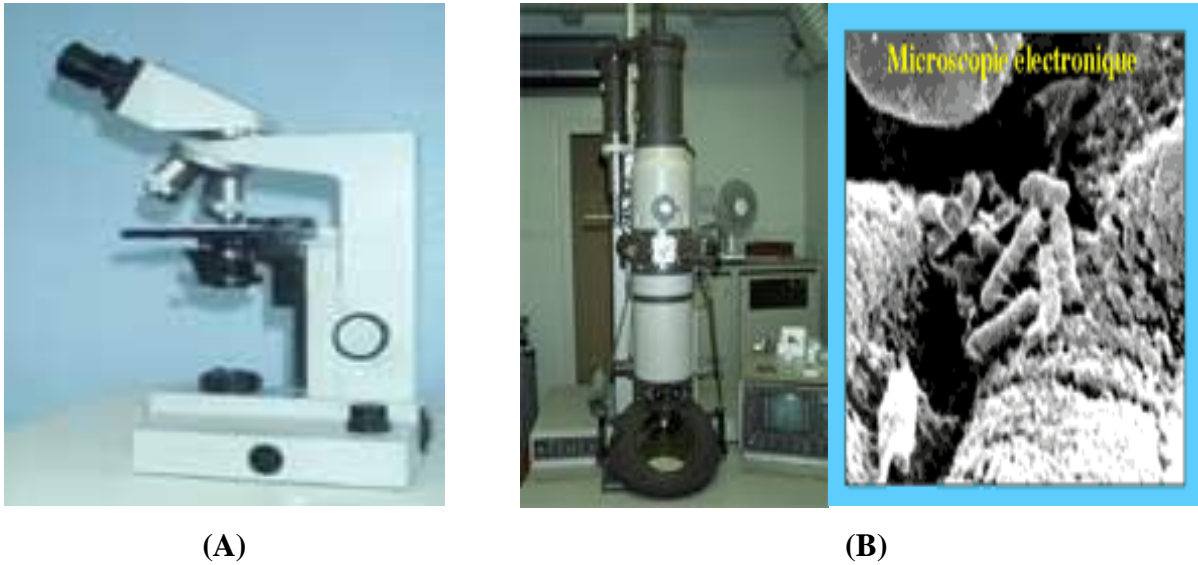


*Coloration à l'encre de chine*

*Figure II.1 : Observation de la cellule bactérienne.*

### II.2.2. Observation de frottis séchés, fixés et colorés

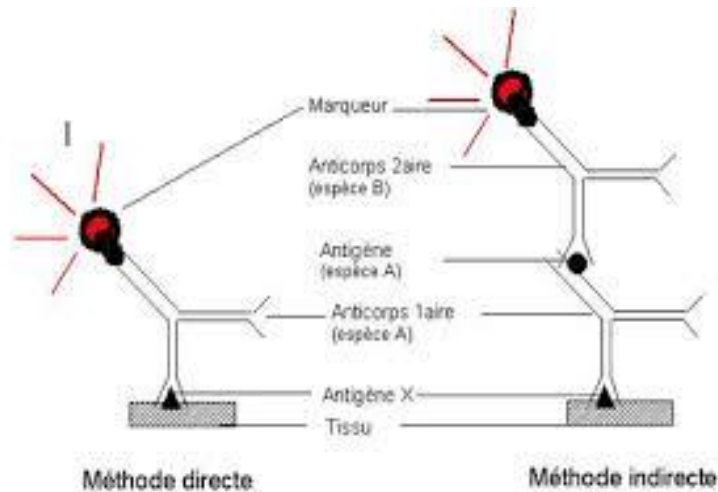
(Coloration de Gram et de **Ziehl Nielsen**). Les frottis sont examinés à l'immersion en plaçant une goutte d'huile spéciale entre la lentille de l'objectif et la préparation, afin d'obtenir une image plus nette. Tout cela concerne **la microscopie photonique** où on utilise le rayonnement lumineux. Pour observer des structures de l'ordre de 5 nm à 10 nm, **on utilise la microscopie électronique**. Certaines structures peuvent retenir ou laisser passer les électrons. Cette approche nécessite ou non la fixation de l'échantillon. **La microscopie électronique à balayage** permet d'obtenir des images en relief de la cellule bactérienne.



**Figure II.2 :** (A) *Microscope optique.* (B) *Microscope électronique.*

### II.2.3. Méthodes immuno-cytochimiques

Permettent de localiser dans la cellule des molécules bactériennes. On utilise des anticorps marqués par la peroxydase, la biotine (vitamine B8) ou des molécules fluorescentes comme la fluorescéine. La formation d'un complexe stable antigène-anticorps permet de repérer la présence d'une molécule dans la cellule. [20]



**Figure II.3 :** *Immunocytochimie directe et indirecte.*

### II.2.4. Séparation des constituants cellulaires

On utilise l'**ultracentrifugation** ou la **centrifugation** sur gradient de densité (gradient de Saccharose), pour séparer les différents organites cellulaires. Pour cela il faut ouvrir les différentes enveloppes membranes, paroi. Plusieurs méthodes pour le faire :

-**Les ultrasons**

-**Les enzymes**, tel que le lysozyme qui détruit la paroi bactérienne.

-**La pression osmotique**, après traitement au lysozyme, les bactéries sont placées en milieu hypotonique, gonflent et éclatent.

-**La pression mécanique**, ou broyage par des billes en verre pour casser la paroi et la membrane.

-**Le froid** par plusieurs cycles de congélation/décongélation successives. [21]

### II.3. La morphologie cellulaire

Les bactéries se présentent sous des formes et des tailles diverses, génétiquement déterminées et caractéristiques de l'espèce (*Figure II.4*).

#### II.3.1. Forme

Les bactéries sont des organismes unicellulaires de formes variées.

- ✓ **Sphérique ou cocci** : isolées, en chaînette ou en amas (nombre variable de cellules) : **Staphylocoques, Streptocoques ...**
- ✓ **Bâtonnet ou bacille** : isolée, en chaînette ou en amas, de longueur et de diamètre variables : **E.coli, Salmonella, Bacillus.**
- ✓ **Spiralée** : spirilles, spirochètes, comme **Treponema.**
- ✓ **Filamenteuse** : ayant une organisation biologique de champignons (mycélium) : **les Actinomycètes.**

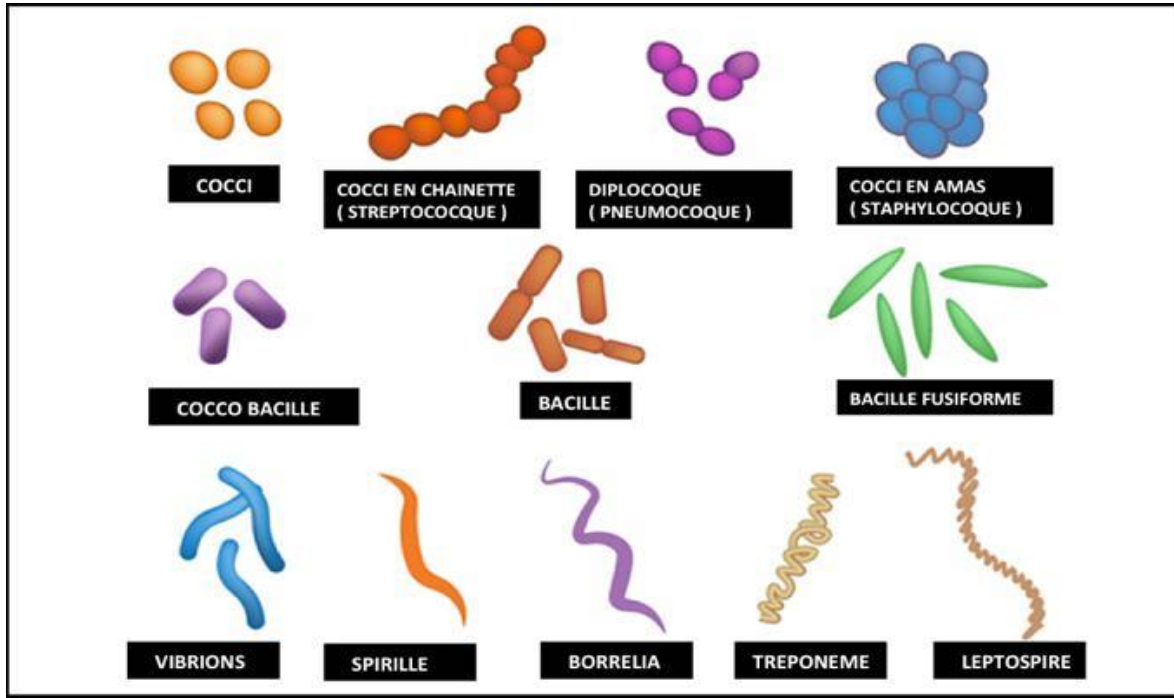


Figure II.4 : Les différentes formes et associations bactériennes.

### II.3.2. Taille

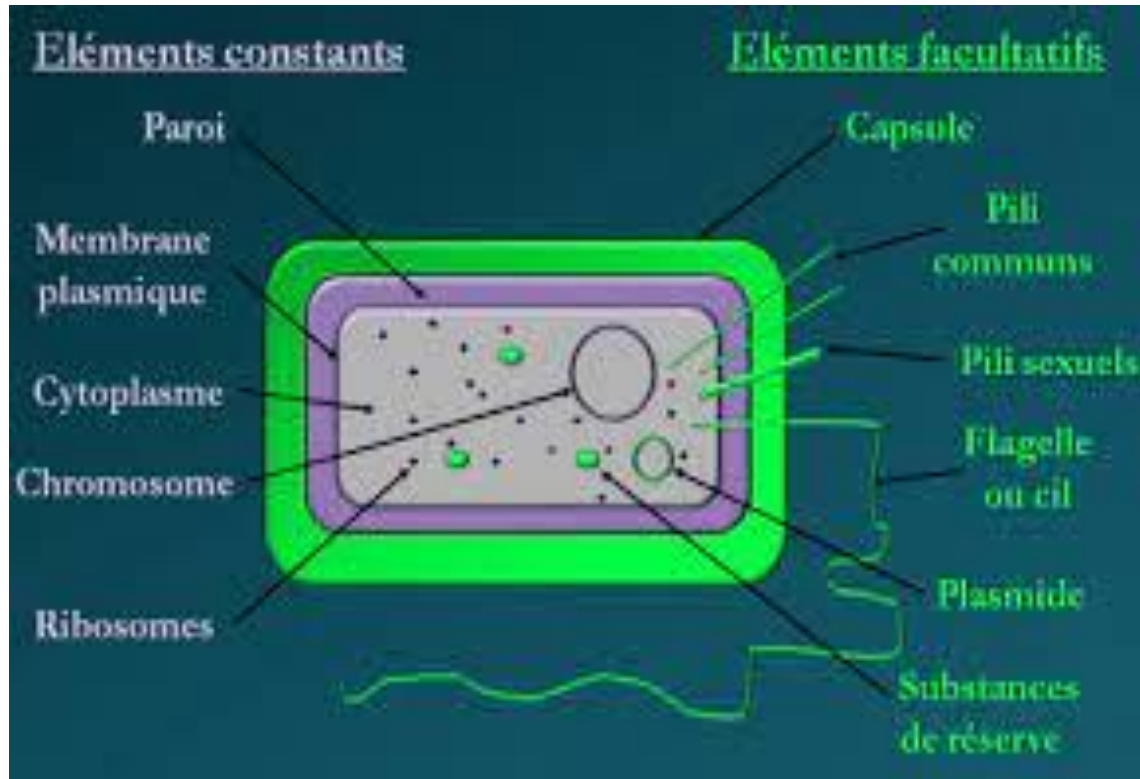
Les bactéries sont les plus petits des microorganismes : 0.1 à 2 $\mu$ m de diamètre pour 0.5 à 5 $\mu$ m de long. Les plus grandes des bactéries (certains Spirochètes peuvent atteindre 250  $\mu$ m de long.) atteignent la taille d'une algue, les plus petites ont des dimensions analogue ou même inférieur à celles de certains gros virus (une taille d'environ 0,2  $\mu$ m des Chlamydia). En moyenne la taille se situe entre 1 et 10  $\mu$ m.

### II.3.3. Associations cellulaires

Une espèce bactérienne peut apparaître sous forme de cellules isolées séparées ou en groupements caractéristiques variables selon les espèces : **association** par **paires**, en **amas réguliers**, en **chaînette**, par **quatre** (tétrades). [22]

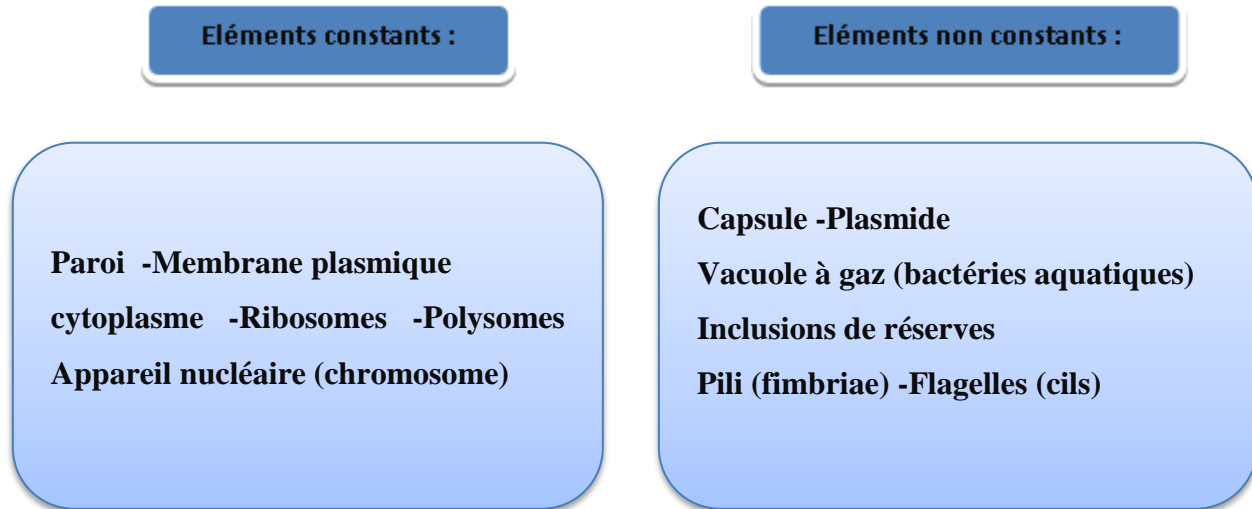
### II.3.4. Éléments constants et inconstants de la structure bactérienne

Certaines structures sont présentes chez toutes les bactéries, ce sont les éléments « **constants** » ou « **obligatoire** » d'autres sont retrouvés seulement chez certaines bactéries : ce sont les éléments « **inconstants** » ou « **facultatifs** ». [9]



*Figure II.5 : Organisation de la cellule procaryote.*

Les cellules bactériennes possèdent, selon les espèces, des éléments constants et des éléments non constants (*Tableau II.1*). [12]



*Tableau II.1 : Éléments constants et non constants des bactéries.*

## II.4. Éléments constants des bactéries

### II.4.1. Paroi bactérienne

La paroi est une structure rigide et résistante qui protège la bactérie et lui donne sa forme. Sa nature variable est à l'origine de la coloration de Gram qui permet de distinguer deux grands groupes bactériens, les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Malgré ces différences structurales, la paroi des Eubactéries est constituée d'un polymère complexe constant, le peptidoglycane ou muréine. Il est formé d'oses aminés (glucosamine et acide muramique, reliés par des liaisons  $\beta$  (1-4) et d'acides aminés constituant des ponts peptidiques entre les chaînes glucidiques. [23]

#### II.4.1.1. Composition chimique

Principaux constituants chimiques présents dans la paroi des bactéries Gram positives et Gram négatives :

##### ✓ Peptidoglycane

C'est un composé macromoléculaire de composition chimique complexe et de structure régulière. Il est formé d'une partie glucidique (polysaccharide) et d'une partie peptidique. [12]

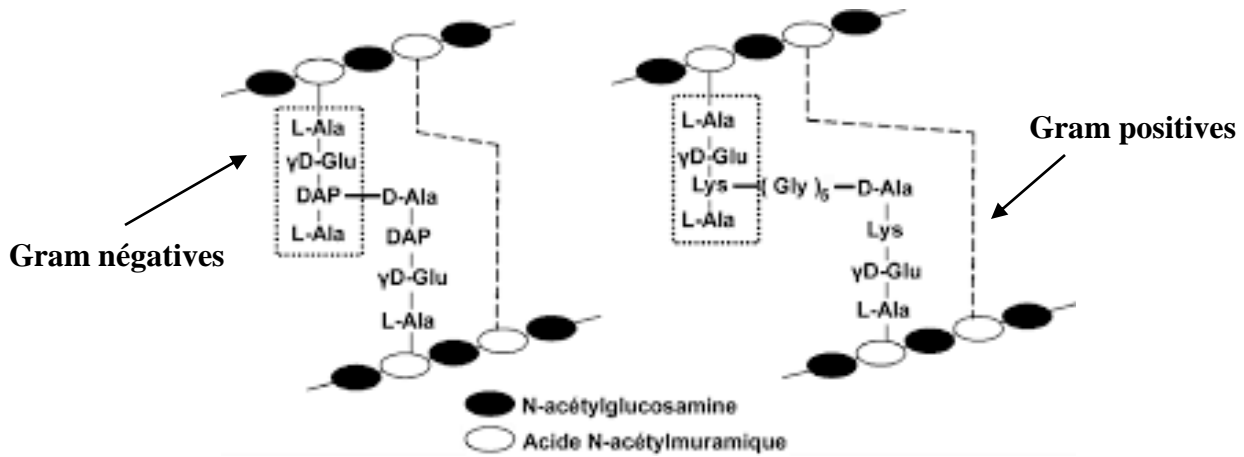


Figure II.6 : Structure de Peptidoglycane.

✓ Os amines

(NAG) N-acétyl glucosamine, spécifique des parois bactériennes, et (NAM) Acide N-acétyl -muramique. De ce fait, (NAG) et (NAM) sont liés par des liaisons osidiques β (1-4). Cette liaison peut être hydrolysée par le lysozyme (Figure II.7). [9]

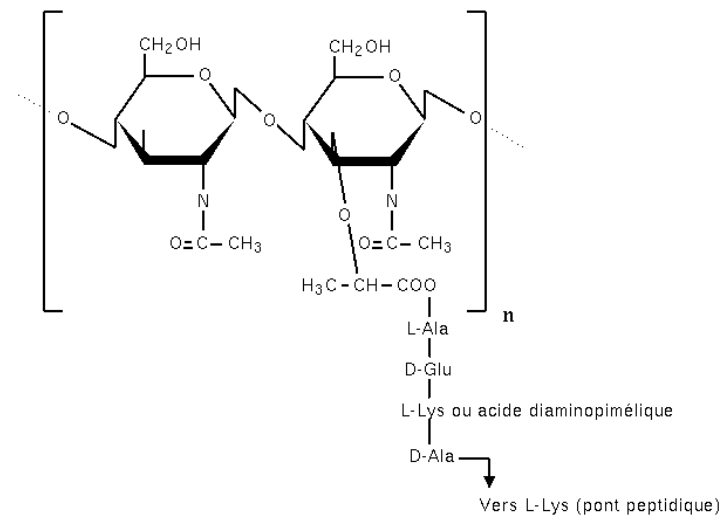
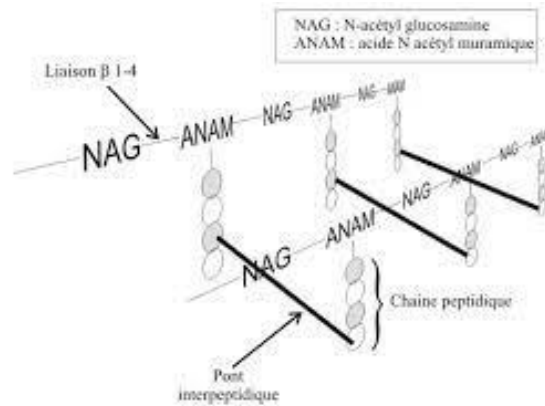


Figure II.7 : Structure chimique N-acétyl glucosamine et l'acide N-acétyl muramique.

✓ **Acides aminés**

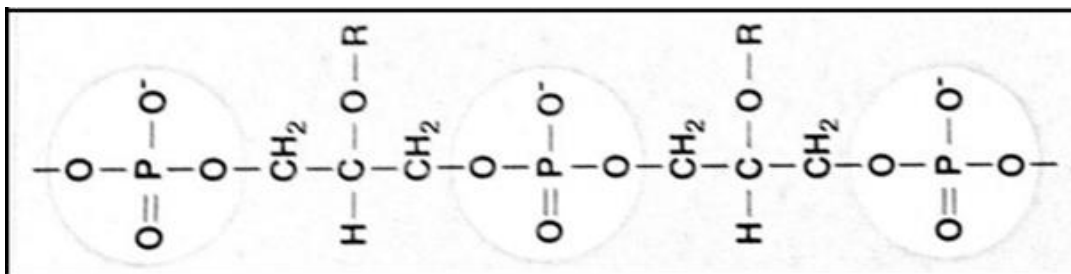
4 acides aminés majeurs «D-alanine, L-alanine, acide glutamique, L-lysine, acide diaminopimélique (DAP)» forment des ponts térapeptides reliant les NAM entre eux (**Figure II.8**). [12]



*Figure II.8 : Représentation du pont peptidique entre deux molécules de peptidoglycane.*

✓ **Acides teïchoïques et lipoteïchoïques (polymères de polyribitol phosphate ou polyglycérol phosphate)**

Les acides teïchoïques sont des fibres situées dans la couche externe de la paroi cellulaire gram-positive et s'étendent à partir de celle-ci. Ils sont composés de polymères de phosphate de glycérol sont liés de manière covalente au lipide dans la membrane cytoplasmique, auquel cas ils sont appelés acide lipoteïchoïque. [17]



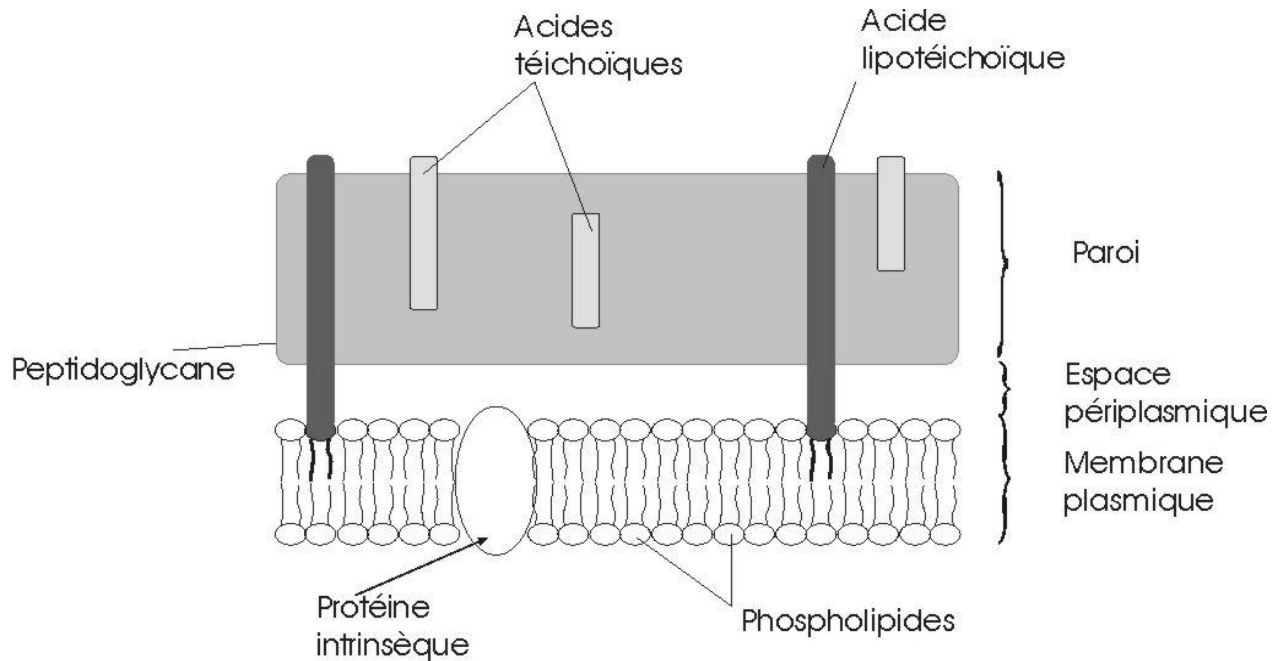
*Figure II.9 : Structure d'un acide teïchoïques: Phosphate + glycérol + R (Alanine, Glucose...).*

| Gram positive   | Gram négative   |
|---|---|
| Très peu de lipides (1 à 2 %).  | Lipides en grande quantité (10 à 20 %, Membrane).     |
| Acides teïchoïques et lipoteïchoïques.  | Il n y a pas d'acides teïchoïques ou lipoteïchoïques. |
| 4 Acides aminés majeurs : Ala (D et L) D-Glu, L-Lys, acide diaminopomélique (DAP) | Mêmes acides aminés Beaucoup moins de DAP et de LLys. |
| <b>Osamines</b><br>N-acétyl glucosamine (NAG) et Acide N-acétyl muramique (ANAM). |   |

*Tableau II.2: Composition chimique de la paroi gram positif et négatif.*

#### II.4.1.2. Paroi des bactéries Gram positives

Les parois épaisses des **bactéries Gram-positives** sont constituées principalement de **peptidoglycane** qui contient souvent un **pont interpeptidique** (*Figure II.8*). Ces parois contiennent généralement en plus une grande quantité d'acides teichoïques. Les acides teichoïques sont fixés covalentiellement soit au peptidoglycane lui-même, soit aux lipides de la membrane cytoplasmique (lipoteichoïques). Les bactéries Gram-positives n'ont pas d'espace périplasmique évident, mais elles peuvent avoir un périplasme, qui contient relativement peu de protéines. Ex : **les staphylocoques**. [4]



*Figure II.10 : Paroi des bactéries Gram-positives.*

### II.4.1.3. Paroi des bactéries Gram négatives

Chez les bactéries à Gram négatif le peptidoglycane forme une couche mince située entre la membrane plasmique et une deuxième membrane externe. Cette dernière est liée au peptidoglycane par la lipoprotéine de Braun (*Figure II.10*). [24]

La membrane externe est liée à la cellule de deux manières. La première est la lipoprotéine de Braun. Le second mécanisme de liaison fait intervenir de nombreux sites d'adhésion unissant la membrane externe et la membrane cytoplasmique. Les éléments les plus particuliers de la membrane externe sont les lipopolysaccharides (LPS), qui sont formées de trois parties : le lipide A, le polysaccharide central et la chaîne latérale O (*Figure II.11*). Ex : **Escherichia-coli**. [4]

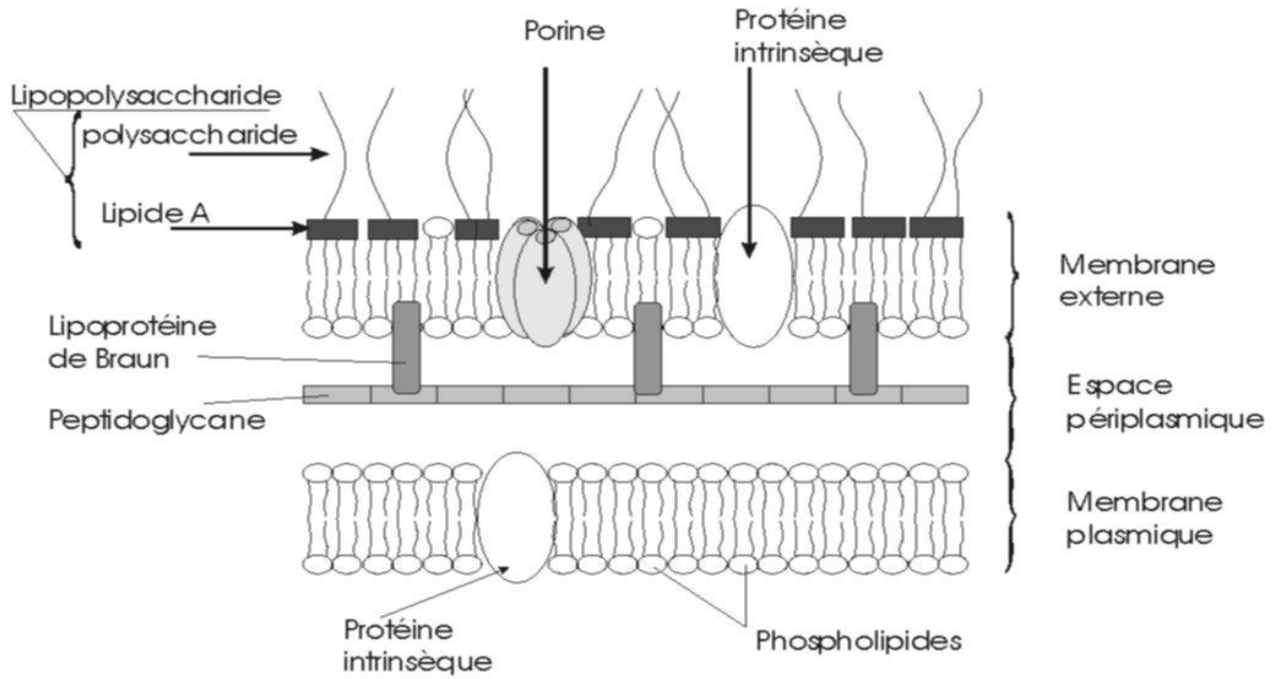


Figure II.11 : Parois des bactéries Gram négatif.

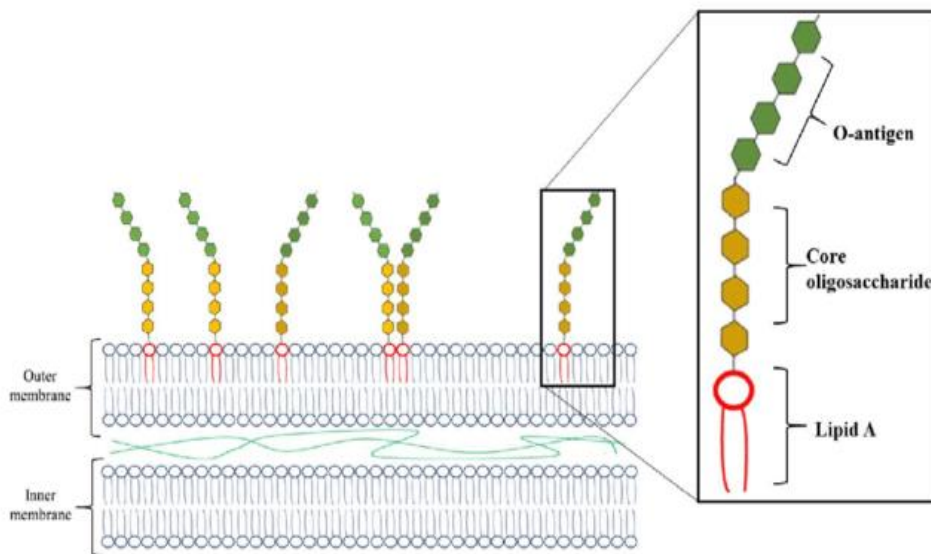


Figure II.12 : La structure des lipopolysaccharides.

#### II.4.1.4. L'espace péri plasmique

C'est l'espace hydrophile situé entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique chez les bactéries à GRAM négatif et entre la paroi et la membrane plasmique chez les bactéries à GRAM positif. Contient des enzymes qui participent à la nutrition (hydrolases) et des protéines qui sont impliquées dans le transport de molécules à l'intérieur de la cellule. Les bactéries G (+) excrètent plutôt les enzymes hors de la cellule (exoenzymes). Celles des G (-) sont retenues entre les membranes interne et externe. [22]

#### II.4.1.5. Fonction de paroi bactérienne

Afin d'étudier les rôles de la paroi, on utilise un **enzyme, le lysozyme**. Le lysozyme coupe les liaisons 1-4 glycosidiques entre le NAG et l'ANAM. Il en résulte une destruction totale du peptidoglycane chez les bactéries Gram(+), et une fragmentation de celui-ci chez les Gram(-) car le peptidoglycane est moins accessible à cause de la membrane externe.

#### Expérience

- 1- On place une souche de **Bacillus subtilis** (bacille Gram+) **en milieu hypotonique** : la bactérie se comporte normalement.
- 2- Si on ajoute **du lysozyme** à cette suspension, les bactéries **gonflent et éclatent**.
- 3- On fait la même expérience en **milieu isotonique**, les bactéries n'éclatent pas en présence de lysozyme, mais elles prennent une forme **sphérique** appelée : **PROTOPLASTE**. Les protoplastes ne possèdent plus les propriétés antigéniques de la bactérie, ne se divisent plus, ne fixent plus les bactériophages et sont incapables de mobilité.
- 4- On fait la même expérience avec *Escherichia coli* (bacille Gram-) : **en milieu isotonique + lysozyme**, les bactéries prennent une forme **sphérique** appelée : **SPHEROPLASTE**. Les sphéroplastes conservent toutes les propriétés initiales de la bactérie. [21]

**Rôle 1** : assurer le maintien de la forme de la bactérie.

**Rôle 2** : assurer une protection contre la pression osmotique intracellulaire.

**Rôle 3** : propriétés antigéniques.

**Rôle 4** : permettre la fixation des bactériophages. Ils reconnaissent des récepteurs localisés sur le Peptidoglycane des Gram(+) ou la membrane externe des Gram(-).

**Rôle 5** : participer à la mobilité. En effet, les flagelles sont implantés dans la membrane cytoplasmique mais ne peuvent pas fonctionner en absence de peptidoglycane.

**Rôle 6 :** la toxicité. Chez les Gram(-), le LPS est une endotoxine.

**Rôle 7 :** la perméabilité. La paroi laisse passer de petites molécules comme l'eau, les sels minéraux ou des métabolites simples. [22]

## II.4.2. Membrane plasmique

### II.4.2.1. Structure

Deux techniques sont largement utilisées pour l'étude des membranes plasmiques, l'expérience de **plasmolyse en milieu hypertonique** et l'**observation en microscope électronique**. La membrane plasmique des bactéries est une structure flexible et dynamique. Elle est organisée en bicouche asymétrique, avec un côté polaire hydrophile et un autre non polaire hydrophobe ce qui lui confère un caractère **amphipatique**.

La membrane plasmique possède le même type de structure que celle d'une cellule eucaryote (bicouche phospholipidique) mais avec moins de glucides et dépourvue de stérols, comme le cholestérol, à l'exception des Mycoplasmes. [25]

### II.4.2.2. Composition chimique

#### ✓ Les lipides (30 à 40 %)

Ce sont des molécules amphiphiles, composées d'une :

- Partie hydrophile.
- Partie hydrophobe.

A cause de leurs propriétés, ils s'organisent spontanément en bicouche avec deux surfaces hydrophiles externes séparées par une zone centrale hydrophobe. Les lipides de la membrane plasmique sont essentiellement des phospholipides de type phosphatidyl-éthanolamine (PE) chez les bactéries à Gram - et phosphatidyl-glycérol (PG) chez les bactéries à Gram +.

#### ✓ Les protéines (60 à 70 %)

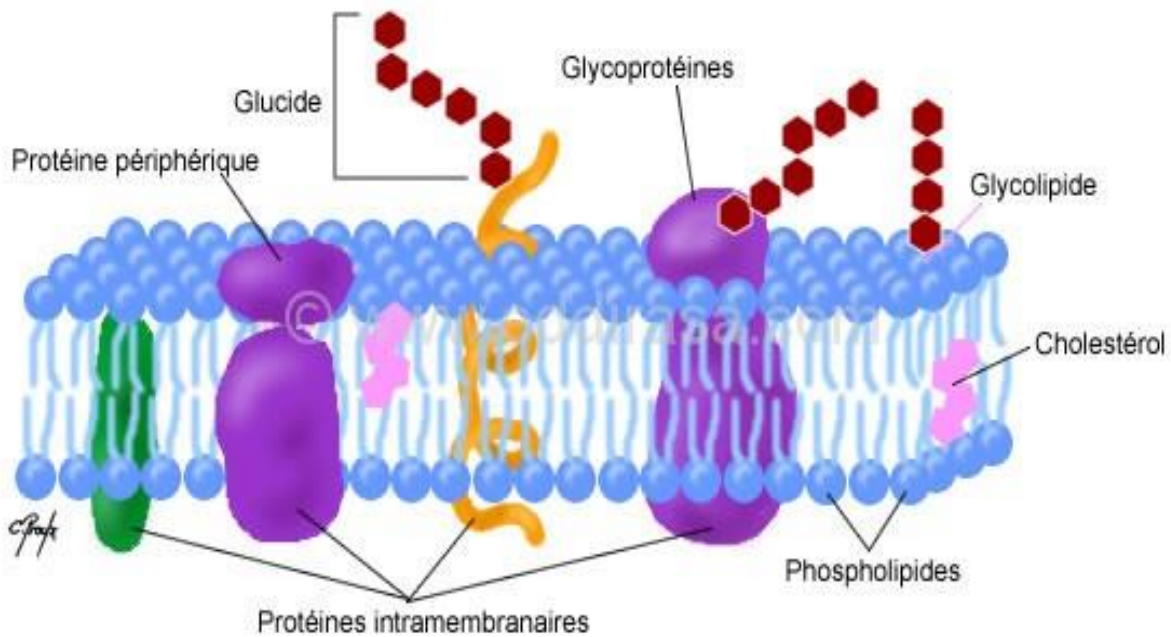
On distingue deux classes de protéines :

- **Intrinsèques**

Ce sont des protéines transmembranaires. Elles sont globalement hydrophobes et s'associent en un complexe stable avec les phospholipides. En effet, les régions les plus hydrophobes de la protéine sont au niveau de la couche hydrophobe lipidique, alors que la partie hydrophile est au contact de l'espace péri-plasmique ou du cytoplasme.

- **Extrinsèques**

Riche en acide aminés hydrophiles et peuvent être soit péri-plasmique, soit cytoplasmique à proximité de la membrane. [26]



*Figure II.13 : Modèle de la mosaïque fluide de la structure de la membrane plasmique d'une cellule bactérienne.*

### II.4.2.3. Fonction de la membrane plasmique

La membrane plasmique assure plusieurs rôles dans la cellule bactérienne :

-**Maintien le cytoplasme et le sépare du milieu extérieur.**

-**Sert de barrière perméable sélective** (barrière semi-perméable) permettant le passage de molécules lipophiles et empêche le passage des molécules hydrophiles.

-Possède des systèmes de transport de beaucoup d'éléments incapables de traverser seuls la membrane (nutrition, rejet de déchets, sécrétion). On distingue 2 grands types de transport :

✓ **Le transport passif** : se fait dans le sens du gradient de concentration sans exigence d'énergie. Il peut se faire sous forme de diffusion ou d'osmose. [12]

- **La diffusion simple**

Ce type de passage n'est possible que si la molécule est « soluble » dans la membrane phospholipidique, c'est-à-dire qu'elle peut traverser directement la bicouche de phospholipides.

La molécule doit donc être hydrophobe (apolaire) ou, si elle est hydrophile (polaire), être suffisamment petite (en pratique : éthanol).

Les substances non polaires comme l'oxygène, les déchets comme le dioxyde de carbone et l'urée, les graisses, diffusent à travers la membrane plasmique en se liant à ses composés phospholipidiques. [23]

- **La diffusion facilitée**

Comme la diffusion libre, la différence de concentration est le moteur du transport. Cependant, la molécule ne traverse pas directement la membrane, elle doit utiliser une protéine porteuses ou des protéines de canal (canaux ioniques). [23]

✓ **Le transport actif** : ils permettent de faire passer des molécules ou des ions dans le sens contraire de leur gradient électrochimique (contre les forces de diffusion), en utilisant donc une source d'énergie. [27]

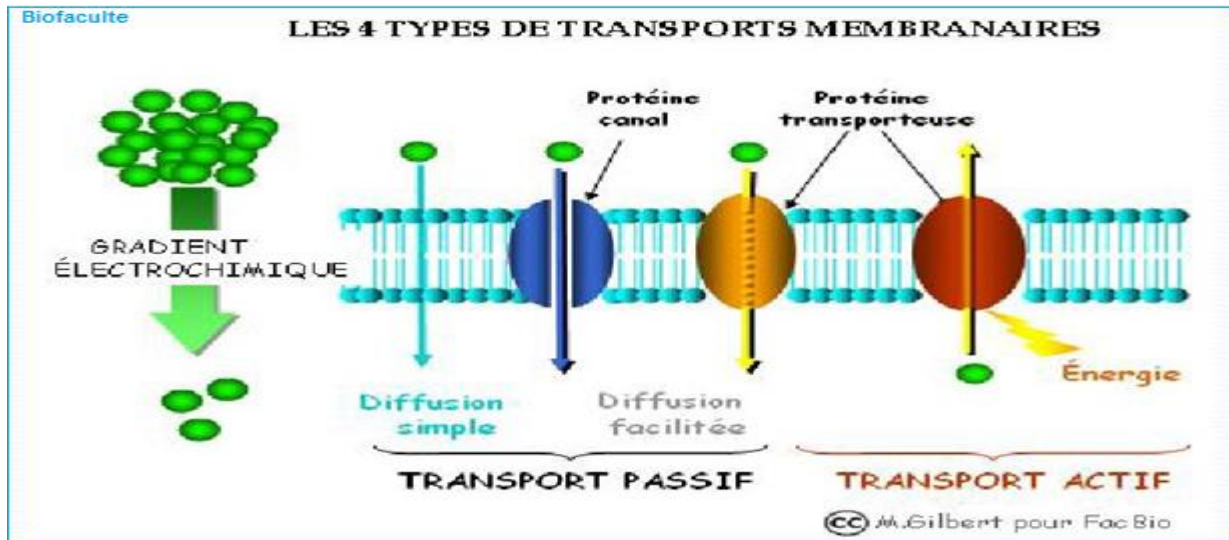


Figure II.14 : Les différents types de transport à travers la membrane plasmique.

- Site de beaucoup de processus métaboliques (respiration, photosynthèse, synthèse lipidique et constituants de la paroi...).
- La membrane plasmique possède des protéines membranaires ayant pour rôles :
  - **Enzymes** responsables de la biosynthèse et de l'excrétion dans l'espace péri plasmique de molécules nécessaires à la synthèse de la paroi
  - **Enzymes** de la chaîne respiratoire permettant la synthèse d'ATP
  - **Transporteurs de diverses molécules** (ions, sucres, ...) dans les deux sens de part et d'autre de la membrane plasmique.
- Contient des molécules réceptrices des substances de l'environnement.
- Site de fixation des flagelles. [12]

### II.4.3. Le cytoplasme

Le cytoplasme a deux zones distinctes lorsqu'il est vu au microscope électronique :

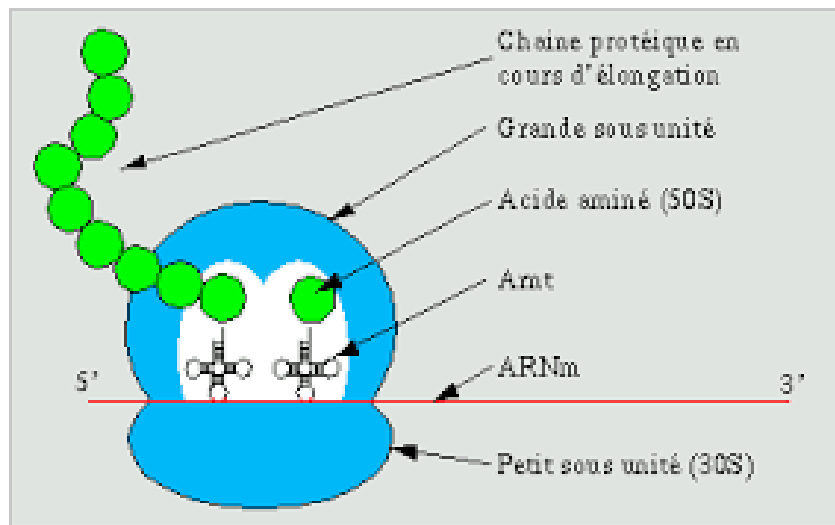
- Une phase dispersante composée de protéines et de sels minéraux.
- Et une phase dispersée formée de ribosomes et de diverses inclusions. [20]

- ✓ **Les ribosomes** sont de petites granulations sphériques de 20 à 30 nm de diamètre, contenant environ 66% d'ADN ribosomal (ARNr) et 33% de protéines. Les ribosomes bactériens (constante de sédimentation 70S) se dissocient en deux sous-unités :

-la **petite sous unité** de CS 30S (constituée par de l'ARN 16S et par 21 protéines).

-la **grande sous unité**, de constante de sédimentation 50S (constituée par de l'ARNr 23S, de l'ARNr 5S et 21 protéines).

Les ribosomes sont le lieu de traduction du message génétique en protéines. [28]



*Figure II.15 : Structure de ribosome.*

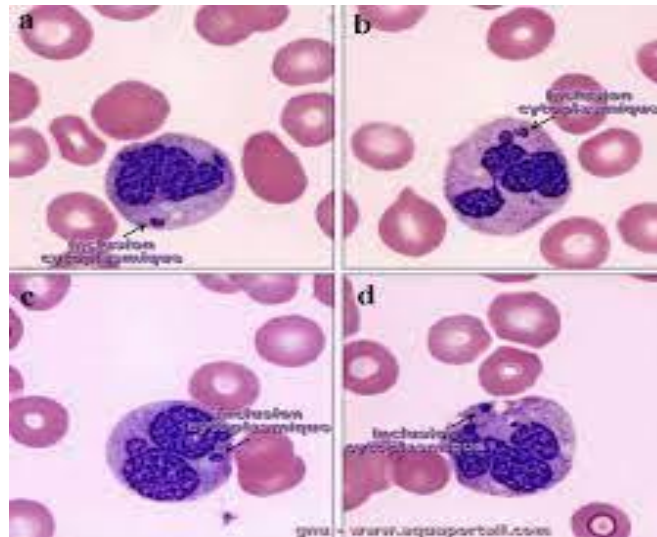
- ✓ **Les inclusions** dans le cytoplasme des cellules procaryotes se trouvent plusieurs types de dépôts de réserve, appelés inclusions. [29]

**Les substances de réserve** de nature polysaccharidique (amidon ou glycogène) se forment dans les milieux riches en sucre et pauvres en protéines. On trouve de telles inclusion dans les genres Acetobacter, Neisseria, Bacillus, Micrococcus, chez quelques clostridies et chez de nombreuses entérobactéries.

**Des lipides neutres et des esters d'acides gras** à longues chaînes sont stockés dans des vacuoles chez les mycobactéries. [28]

**Les granules métachromatiques** sont de grosses inclusions qui tirent leur nom du fait qu'elles se colorent parfois en rouge avec certains colorants bleus comme le bleu de méthylène. Collectivement, ils sont connus sous le nom de volutines. [29]

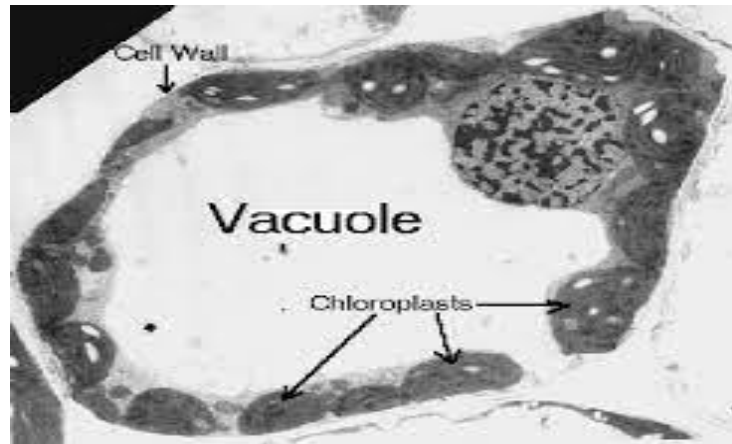
**Le soufre**, accumulé sous forme de globules, représente une source d'énergie chez les bactéries qui oxydent les composés résidus du soufre. [28]



*Figure II.16 : inclusions cytoplasmique.*

**Remarques** : certaines espèces microbiennes contiennent dans leur cytoplasme des organites spécialisés

- **chromatophores** qui ont un rôle dans la biosynthèse chez les algues.
- **les vacuoles à gaz** permettant à certains groupes d'habitat aquatique de flotter à la surface de l'eau. [28]



*Figure II.17 : Vacuoles à gaz au microscope électronique.*

#### II.4.4. Le Chromosome

Le chromosome bactérien est constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN) dont les caractéristiques structurales sont bien connues. L'ADN bactérien est circulaire (nucléotide) Contient entre 1 000 000 et 4 500 000 paires de bases, 800 et 4300 gènes 0.1% du génome humain ; il peut exister sous trois formes (super-enroulée, relâchée, linéaire) objectivées par plusieurs techniques telle l'ultracentrifugation, la microscopie électronique. [30]

##### II.4.4.1. Composition chimique

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est un polymère de PM élevé, composé d'unités appelées nucléotides.

-**Nucléotide** : « Groupement phosphoré + sucre à 5 atomes + une base purique ou pyrimidique ».

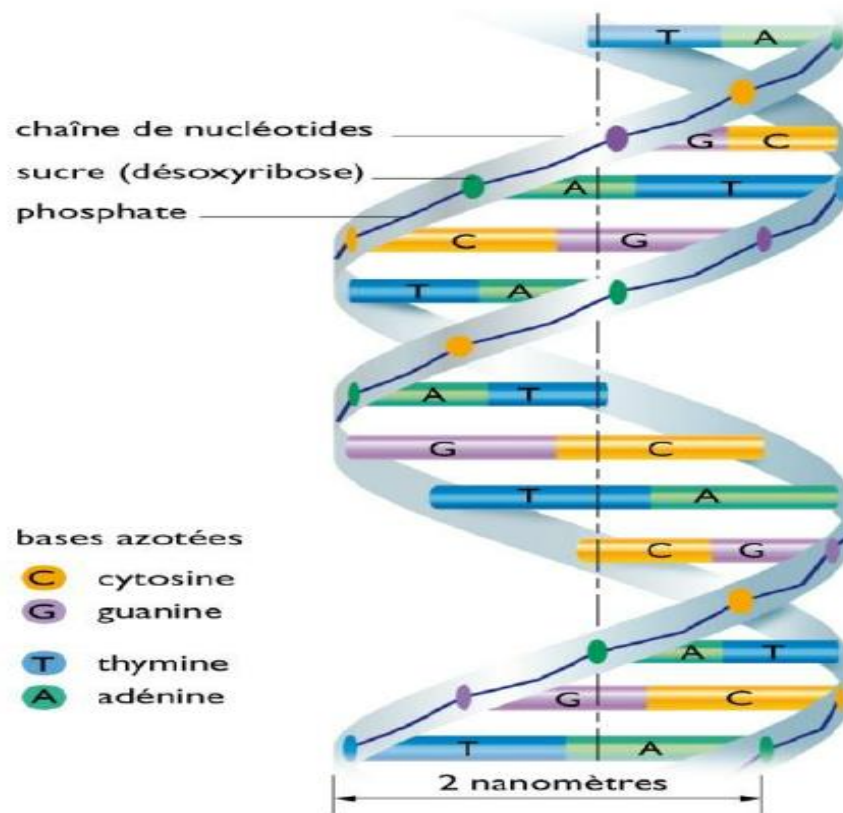
-**Bases puriques** : Adénine A et Guanine G.

-**Bases pyrimidiques** : Cytosine C et Thymine T.

-**Le sucre** : Désoxyribose.

-**Le groupement phosphoré** : est un phosphate diester en 3' et 5' du désoxyribose.

Il y a autant de « A que de T » et autant de « C que G » par contre le rapport (A+T)/G+C) mieux connu sous le nom de coefficient de Chargaff varie selon les espèces. On l'exprime en GC%. 50% chez E.coli 60% chez Pseudomonas, 25 à 45% chez Clostridium. (*Figure II.16*). [6]



*Figure II.18 : Représentation schématique de la double hélice d'ADN.*

## II.5. Éléments non constants des bactéries

### II.5.1. Les Plasmides

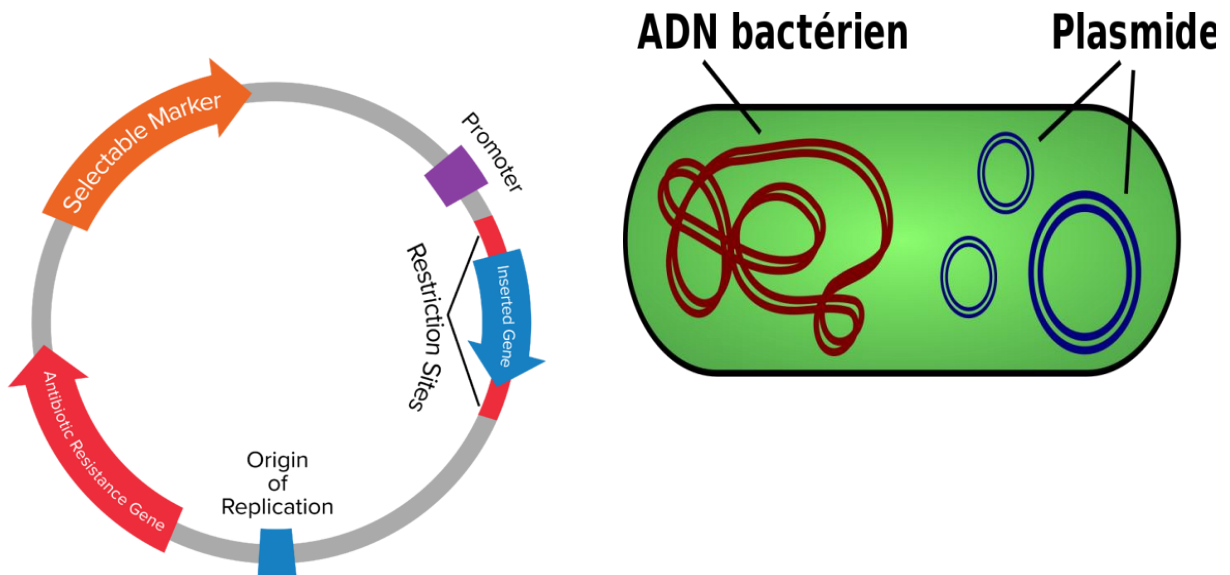
À leur niveau le plus élémentaire, les plasmides sont de petits morceaux circulaires d'ADN qui se répliquent indépendamment de l'ADN chromosomique de l'hôte. Ils se trouvent principalement dans les bactéries, mais existent également naturellement dans les archées et les eucaryotes tels que les levures et les plantes. Dans la nature, les plasmides fournissent un ou plusieurs avantages fonctionnels à l'hôte tels que la résistance aux antibiotiques, les fonctions de dégradation et/ou la virulence. Tous les plasmides naturels contiennent une origine de répllication

(qui contrôle la gamme d'hôtes et le nombre de copies du plasmide) et incluent généralement un gène avantageux pour la survie, tel qu'un gène de résistance aux antibiotiques. [31]

### II.5.1.1. Structure des plasmides

Ce sont des molécules d'ADN bicaténares. Le plus souvent ces molécules sont circulaires, dits « surenroulés ». Ils sont d'une taille inférieure au 1/20ème d'un chromosome bactérien (pour *E. coli*: 5.106 p b). Il existe en tout plus de 1 000 plasmides différents (Pour *E. coli* il en existe 300 différents connus). Il existe des plasmides qui peuvent faire plus de 1 000 p b, il existe également des plasmides linéaires. On en trouve chez toutes les bactéries.

On peut les observer en **microscopie électronique**, mais on peut aussi les séparer des cellules par centrifugation, également par électrophorèse en gel d'agarose. [32]



*Figure II.19 : Représentation schématique d'un plasmide commercial.*

De nombreux plasmides possèdent des gènes variés qui confèrent de nouvelles propriétés à la cellule hôte. On distingue des grandes familles de plasmides en fonction des propriétés qu'ils portent:

- **Plasmides de résistance** : les plasmides de résistance portent des gènes codant pour des enzymes capables d'inactiver ou de modifier certains antibiotiques et

confèrent donc une résistance aux antibiotiques chez les bactéries qui les contiennent.

- **Plasmides de virulence** : les plasmides de virulence portent des gènes codant pour des toxines ou autres substances dangereuses, rendant les bactéries plus pathogènes.
- **Plasmides métaboliques** : les plasmides métaboliques portent des gènes d'enzymes qui métabolisent divers substances telles que des sucres, des pesticides, etc. Certains plasmides peuvent se transmettre d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse grâce à la conjugaison bactérienne par l'intermédiaire de pili sexuels. [33]

### II.5.1.2. Rôles et fonction des plasmides

Les principales fonctions codées par les plasmides sont les suivantes :

- Résistance aux antibiotiques (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol).
- Résistance aux métaux lourds comme (mercure, sels de cadmium, de plomb).
- Intervention dans la production des substances à rôle pathogène.
- Intervention dans la production de bactériocines.
- Intervention dans la dégradation de certains composés aromatiques. [33]

### II.5.2. Pili

Les pili (singulier pilus) sont des évaginations de la membrane plasmique se situant à la surface de la paroi de nombreuses bactéries. Ils sont fréquents chez les bactéries Gram négatif et rares chez les Gram positif. [21]

#### II.5.2.1. Structure

Les pili (poils) sont des structures externes de nature protéique ou bien polymère d'un protéine spécifique (piline), plus courtes, plus minces et plus rigides que les flagelles et n'ont aucune fonction locomotrice. Il est existé de nombreux types, aux fonctions spécifiques et pour la plus part mal connues. [34]

### II.5.2.2. Type

Deux principaux types:

#### ✓ Les pili communs (ou fimbriae)

Courts et cassants, très nombreux (parfois quelques centaines par bactérie), de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de long, disposés régulièrement à la surface de la bactérie (figure 13). Ils jouent un rôle dans l'agglutination des bactéries et leur attachement aux muqueuses par exemple. [25]

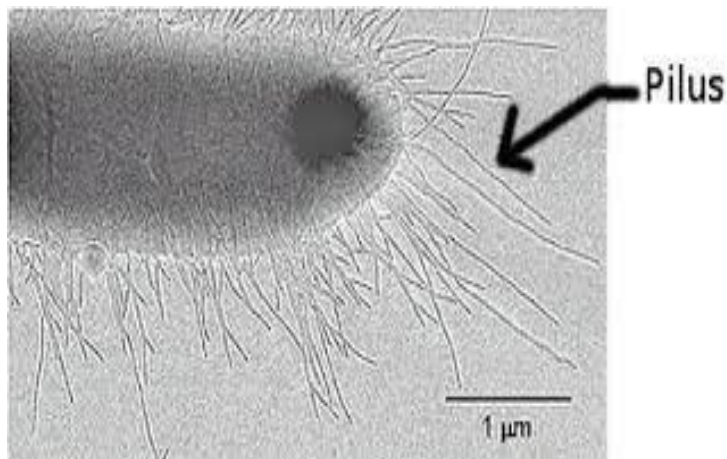


Figure II.20 : Pili communs chez *Escherichia coli*.

#### • Fonction

- **Adhésion** des bactéries à divers supports.
- **Responsables de la tendance** des bactéries, en formant une pellicule visqueuse ou film bactérien à la surface des milieux liquides. [34]

#### ✓ Les pili sexuels

Plus longs que les pili communs (jusqu'à 20  $\mu\text{m}$ ) mais en nombre plus restreint (1 à 4). Ils sont codés par des gènes plasmidiques (le prototype = facteur F). Ils existent uniquement chez les bactéries mâles (donatrices). Ils jouent un rôle essentiel dans l'attachement des bactéries entre elles au cours de la conjugaison. Ils peuvent aussi servir de support de fixation pour certains bactériophages. [25]



*Figure II.21 : Pili sexuel.*

- **Fonction**

- **Relient deux bactéries** (reconnaissance mâle, femelle)
- Voies d'échanges de **matériel génétique**
- **Fixation** : bactérie, phage. [34]

### **II.5.3. La capsule**

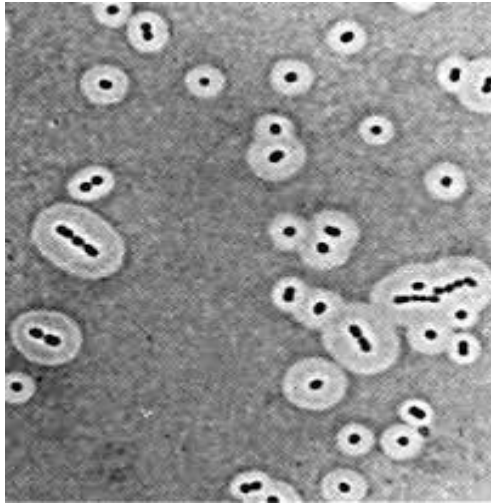
C'est la structure la plus externe. Couches de nature polysaccharidiques ou de matériel protéino-aqueux, appelée couche fine si elle est diffuse et facilement destructible ou capsule si elle est bien organisée. Elles assurent la protection et/ou l'adhésion des procaryotes à des surfaces. [35]

#### **II.5.3.1. Mise en évidence**

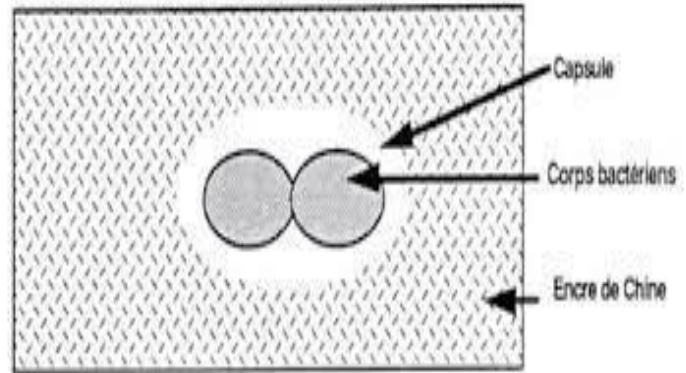
**Etat frais à l'encre de chine** : les bactéries apparaissent sur fond sombre avec un halo clair autour du corps bactérien qui correspond à la capsule.

**Microscopie électronique.**

**Techniques immunochimiques** : des Ac anti-capsulaires se fixent sur les Ag capsulaires. Le complexe Ag-Ac précipite et augmente l'épaisseur de la capsule qui devient visible au microscope. Cette réaction est appelée : **Réaction de gonflement de la capsule de NEUFELD.** [36]



*Coloration à l'encre de chine*



*Structure bactérienne*

*Figure II.22 : Mise en évidence de structure bactérienne.*

### II.5.3.2. Morphologie

Certaines bactéries possèdent des structures entourant la paroi. On distingue en réalité 3 types de couches, **la capsule, les couches mucoïde et la couche S** selon les bactéries.

**-La capsule**, est bien organisée, bien définie et elle est difficilement détachable de la bactérie.

**-La couche mucoïde**, retrouvée chez les bactéries aquatiques est moins bien organisée, diffuse, elle est facilement détachable de la bactérie.

**-La couche S**, plus rigide, très structurée. C'est une couche de surface mise en évidence que par microscopie électronique. Elle est constituée de sous unités protéiques organisées de façon. [7]

### II.5.3.3. Composition chimique

-**La capsule et les couches mucoïde** peuvent être regroupées sous le terme de **glycocalyx**. Le **glycocalyx** est un réseau de polysaccharides. *Bacillus anthracis* agent de la maladie du charbon, possède une capsule de nature protéique.

-**La couche mucoïde** est fréquente chez les bactéries aquatiques et particulièrement importante chez les bactéries du genre *Zooglea* qui produisent des masses gluantes. Certains polysides produits par des bactéries ont un intérêt industriel et sont produits comme gélifiant notamment en industries alimentaires : *Leuconostoc mesenteroides* produit des dextrans, *Xanthomonas* des xanthanes ...

-**La couche S** est composé de protéines et de glycoprotéines, organisés en pavement. [21]

### II.5.3.4. Fonctions de la capsule

- ✓ Support de **propriétés** physiopathologiques et immunologiques.
- ✓ **véritables facteurs** de virulence.
- ✓ **protège** la bactérie contre la phagocytose.
- ✓ support d'**antigénicité** :

La nature des polyholosides constitutifs leur enchaînement, déterminent la spécificité 70 types sérologiques sont actuellement reconnus chez les pneumocoques.

- ✓ Dans environnement, **la capsule protège** la bactérie contre:
  - la dessiccation.
  - Le pouvoir agressif des agents chimiques et physiques.
  - Empêche la fixation des bactériophages sur la bactérie. [32]

### II.5.4. Le flagelle

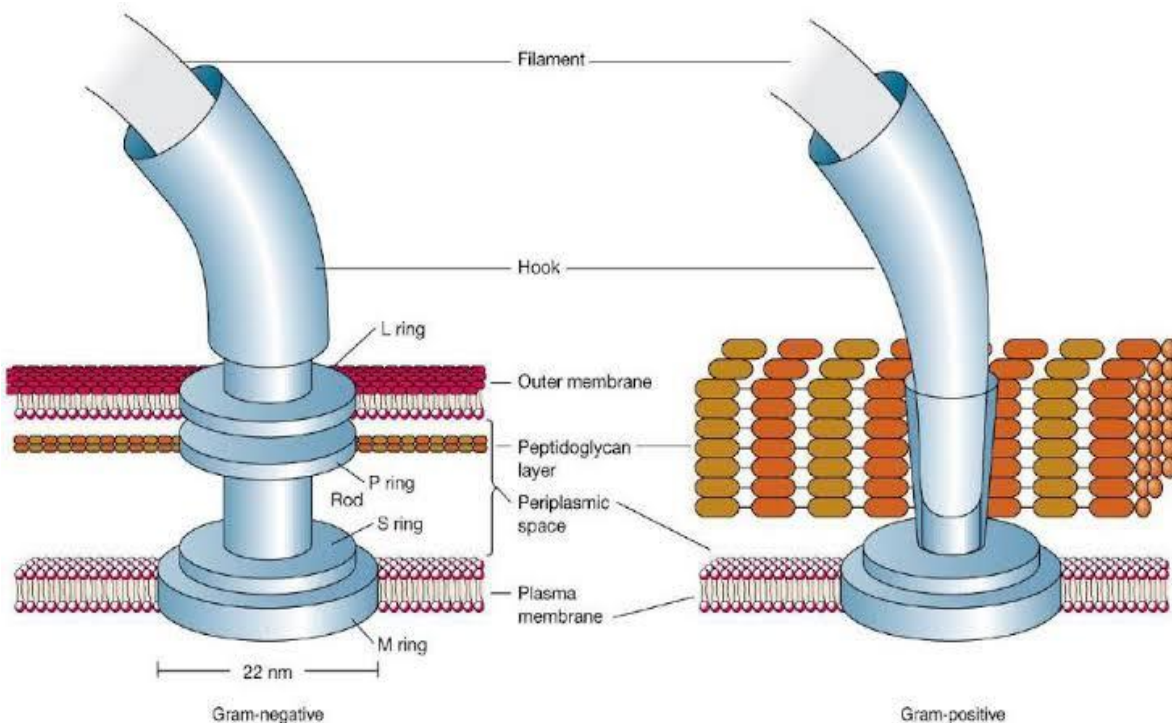
Les flagelles, encore appelés cils, sont des structures bactériennes facultatives. Ce sont des organes filamenteux, permettant la locomotion des bactéries. Chez les entérobactéries ils permettent une vitesse de déplacement de 10 à 20 micromètres par seconde; à l'échelle humaine, cette vitesse correspondrait à environ une soixantaine de km / h. [25]

### II.5.4.1. Mise en évidence

- ✓ **Indirecte** : état frais (bactéries en mouvement) ou en milieu semi-gélosé (MM).
- ✓ **Directe** : en microscopie optique après avoir épaissi les flagelles par des colorations spéciales (Rhodes, Leifson : fuschine basique) ; ou en microscopie électronique. [36]

### II.5.4.2. Composition et structure

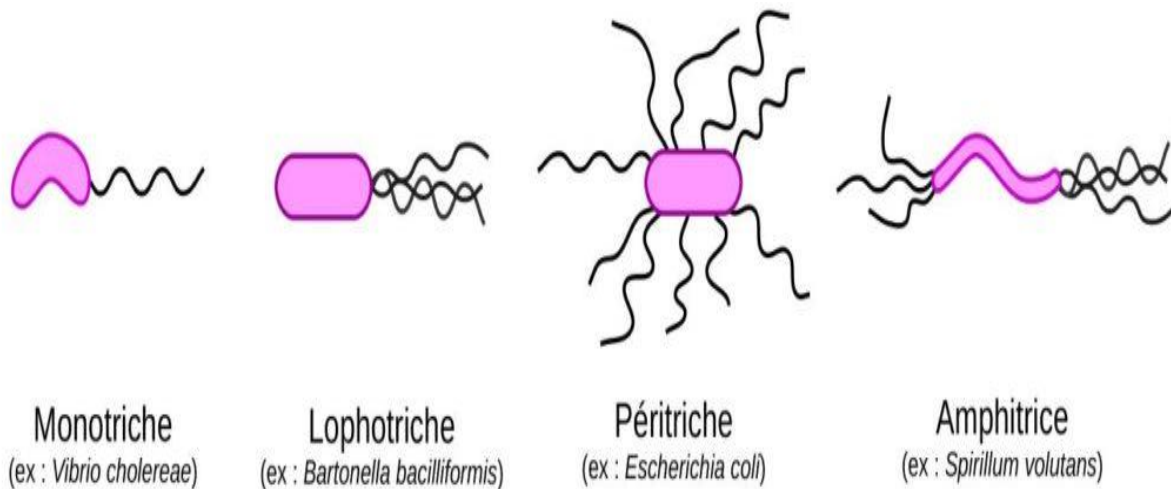
Les flagelles possèdent une structure hélicoïdale. Le filament d'un flagelle bactérien est composé de sous unité d'une protéine appelée **flagelline**. La structure élémentaire des flagelles varie sensiblement selon les espèces bactériennes. Un flagelle est formé de plusieurs parties et fonctionne par rotation, de manière comparable à l'hélice d'un bateau. La base du flagelle et le filament ont une structure différente. La structure plus large, située à la base du flagelle, liant le **filament** au **corps basal**, est appelé **crochet**. Le **crochet** est constitué de d'un seul type de protéine et sert de jonction entre le filament et le moteur cellulaire. [37]



*Figure II.23 : Structure et attachement du flagelle chez les bactéries Gram+ et les Gram-.*

### II.5.4.3. Flagelle et mobilité

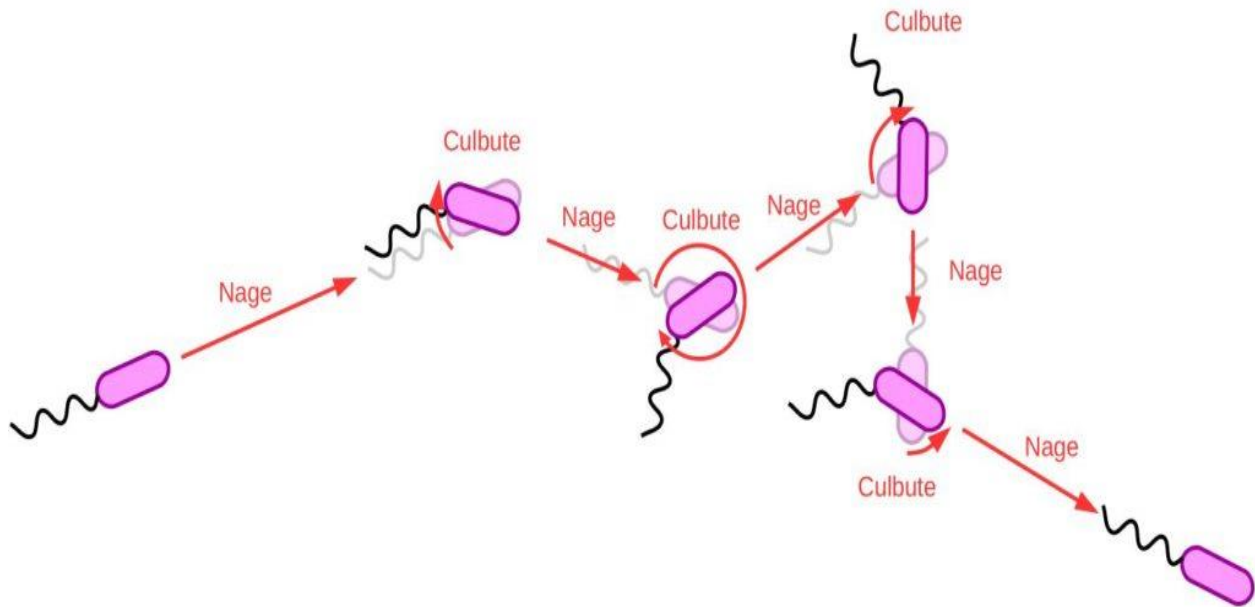
Les espèces bactériennes se distinguent souvent par le mode de distribution des flagelles. **Les bactéries monotriches** ont un seul flagelle, s'il est situé à une extrémité, il est dit polaire. **Les bactéries amphitriches** ont à chaque extrémité, un seul flagelle. Au contraire, **les bactéries lophotriches** ont une touffe de flagelles à l'une ou aux deux extrémités. Les flagelles sont distribués sur toute la surface **des bactéries péritriches**. La distribution des flagelles est très utile à l'identification des bactéries. [26]



*Figure II.24 : Types flagellaires et modes d'insertion.*

### II.5.4.4. Mécanisme du mouvement flagellaire

Le filament des flagelles est en forme d'hélice rigide et la bactérie se déplace quand l'hélice tourne. La direction de la rotation du flagelle détermine le type de mouvement de la bactérie. Les flagelles **monotriches** polaires tournent dans le sens **antihorlogique**, ce qui propulse la cellule vers l'avant. Les bactéries **monotriches** s'arrêtent et culbutent au hasard lors de l'inversion du sens de rotation du flagelle. Les bactéries **péritriches** se déplacent d'une manière similaire. Pour avancer, les flagelles tournent dans le sens antihorlogique. Se faisant, ils plient à leur crochet pour former un faisceau rotatoire qui propulse la cellule vers l'avant. La rotation des flagelles dans le sens **horlogique** détruit ce faisceau et la cellule culbute sur elle-même (*Figure II.27*). [4]



*Figure II.25 : Sens de rotation des flagelles et mouvements des bactéries.*

#### II.5.4.5. Fonctions

**-La locomotion ou la mobilité :** mises en évidence sur des milieux semi-gélosés (diffusion dans la gélose) ou sur milieu solide (envahissement de la surface de la boîte. Ex : Proteus). Elle est assurée par la rotation du crochet flagellaire qui anime le filament pour un mouvement hélicoïdal. Le sens du mouvement est en réponse à un stimulus du milieu permettant aux bactéries de nager dans des sens définis. [22]

**-Les antigènes flagellaires (Ag H):** déterminent différents sérotypes (exemple : sérotypage des Salmonella). En présence de l'anticorps correspondant à leur Ag H, les bactéries agglutinent et les bactéries s'immobilisent. La spécificité antigénique repose sur le nombre et la séquence des acides aminés de la flagelline. [21]

**-Chimiotactisme (chimiotaxie) :** En présence d'un gradient de concentration de substrats nutritifs, des bactéries se dirigent sélectivement vers la zone aux concentrations les plus favorables. Le chimiotactisme s'exerce aussi par répulsion en présence de substances toxiques dans le milieu. [37]

-**Fixation des bactériophages** : les flagelles sont le lieu de fixation de certains bactériophages. [22]

### II.5.5. La spore

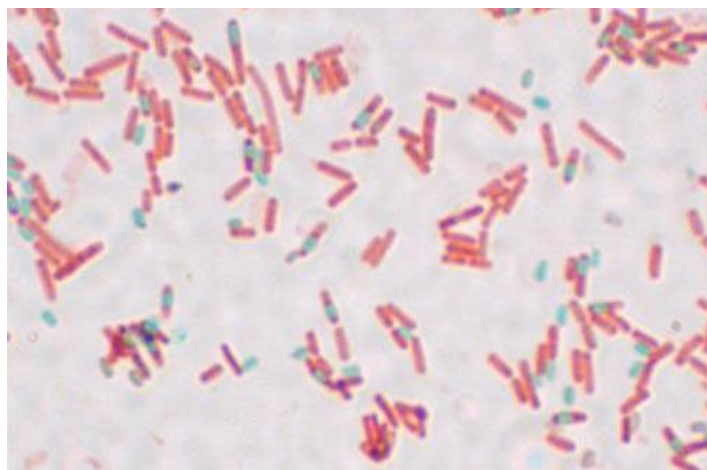
Un certain nombre de bactéries Gram-positives acquièrent une structure spéciale, résistante, dormante, **appelée endospore**. Les endospores se développent dans les cellules végétatives de quelques genres bactériens : **Bacillus** et **Clostridium** (bâtonnets), **Sporosarcina** (coques) et d'autres. Ces structures sont extraordinairement **résistante** aux conditions sévères de l'environnement comme la chaleur, les radiations ultraviolettes, les radiations gamma, les désinfectants chimiques et la dessiccation. [4]

#### II.5.5.1. Mise en évidence

Cette mise en évidence peut se faire de deux manières :

- **une méthode rapide** : la coloration au **vert de malachite**.
- **Une méthode lente** : on prélève un échantillon de culture pure (environ 1 mL) et le fait chauffer pendant 10 minutes à 80 °C. On dépose ensuite un peu de cette préparation sur un milieu nutritif que l'on place à incuber dans les conditions optimales de culture de la souche étudiée. Si on observe un développement de la culture, la souche est sporogène.

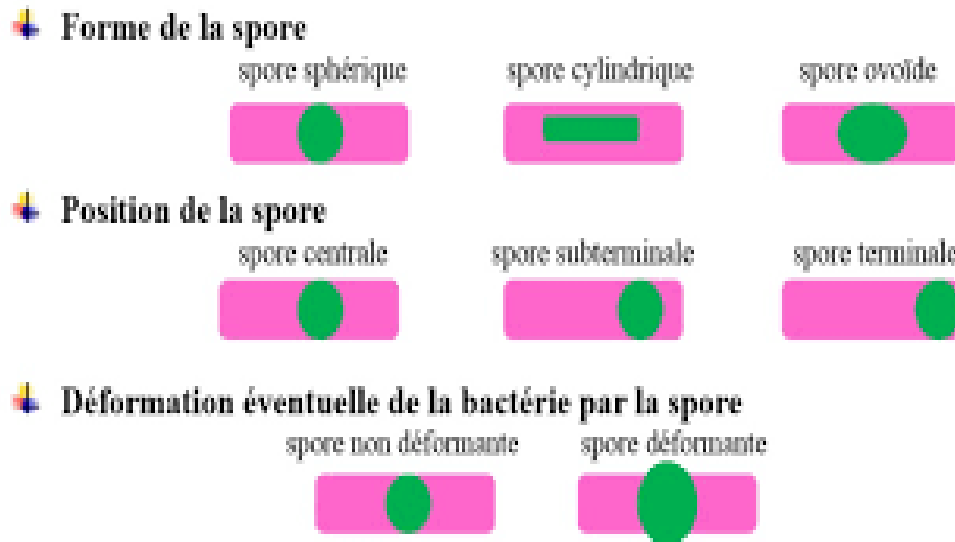
[38]



*Figure II.26 : Coloration au vert de malachite.*

### II.5.5.2. Morphologie

Les spores sont de petites unités **ovales ou sphériques ou cylindrique**. Elles peuvent **déformer ou non** le corps bactérien. Leur **position** dans la cellule est variable : **centrale, terminale, subterminale**. La spore peut-être **libre ou non**. La recherche de tous ces caractères se fait dans un **but taxonomique**. [36]



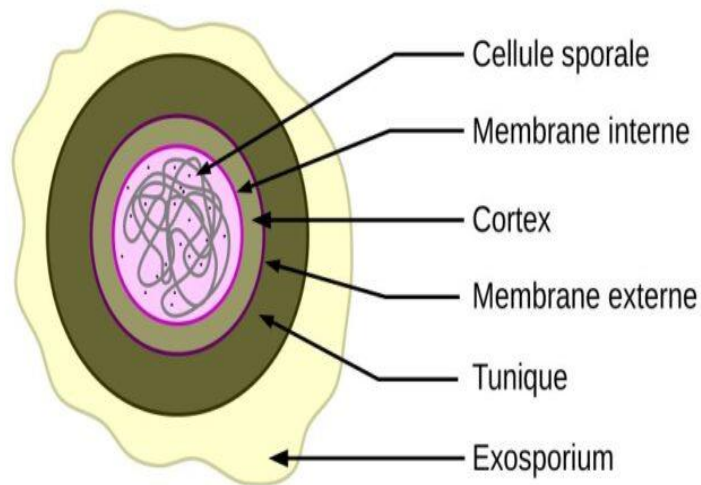
*Figure II.27 : Différents types de spores selon la forme, la position et la déformation de la cellule.*

### II.5.5.3. Structure de la spore

Les enveloppes constituées autour de la membrane sporale ont des structures et des compositions variées. On distingue :

- **La paroi sporale**, contenant le peptidoglycane normal qui deviendra, après germination de la spore, la paroi de la cellule végétative.
- **Le cortex**, qui représente 10 à 20% de l'ensemble et qui est une couche épaisse, formé d'un peptidoglycane inhabituel (contient une forte proportion de dipicolinate de calcium, son autolyse constitue une étape déterminante de la germination).

- Les **tuniques (internes et externes)**, représentent 20 à 35% de l'ensemble ; elles sont composées d'une protéine de type kératine riche en liaisons disulfures ; imperméables, elles sont responsables de la résistance aux agents chimiques.
- L'**exosporium**, la couche la plus externe, qui est une membrane lipoprotéique contenant 20% de sucres ; pas essentiel à la survie de la spore. [39]



*Figure II.28 : Structure de la spore.*

#### II.5.5.4. Phénomène de sporulation

La sporulation intervient lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance (carence en nutriments, en sels minéraux, manque d'eau). Le processus de sporulation débute à la fin de la phase de croissance exponentielle et il se déroule en plusieurs étapes: [40.25]

- Au **stade I** : l'ADN s'est dupliqué et se condense en formant un filament axial.
- Au **stade II** : il y a formation d'un septum qui individualise deux compartiments de tailles inégales. Le filament axial d'ADN s'est fragmenté pour donner 2 molécules.

- Au **stade III** : le septum de sporulation va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie, et se détache de la membrane cytoplasmique pour donner une préspore ovoïde entourée d'une double membrane : la membrane cytoplasmique et la membrane sporale. [22]
- Au **stade IV** : la cellule mère produit des composants proches du peptidoglycane qui viennent s'accumuler entre les 2 membranes pour former le cortex. Chez certaines espèces, une autre couche protéique plus externe est synthétisée, c'est l'exosporium (structure facultative). [40]
- Au **stades V et VI** : les tuniques sont élaborées et, après maturation, la cellule mère se lyse et libère la spore mature. La forme et la situation de la spore dans la cellule sont caractéristiques de l'espèce. Elle permet l'orientation de l'identification des bactéries sporulantes. Elle peut être sphérique ou ovale, centrale, terminale ou subterminale, déformante (diamètre > diamètre de la bactérie) ou non déformante (figure 19). Sauf exception (*Clostridium disporicum*), on ne trouve qu'une seule spore par cellule. Les spores peuvent être la cause de certaines contaminations d'origine tellurique (tétanos par exemple) ou de toxi-infections (botulisme). [25]

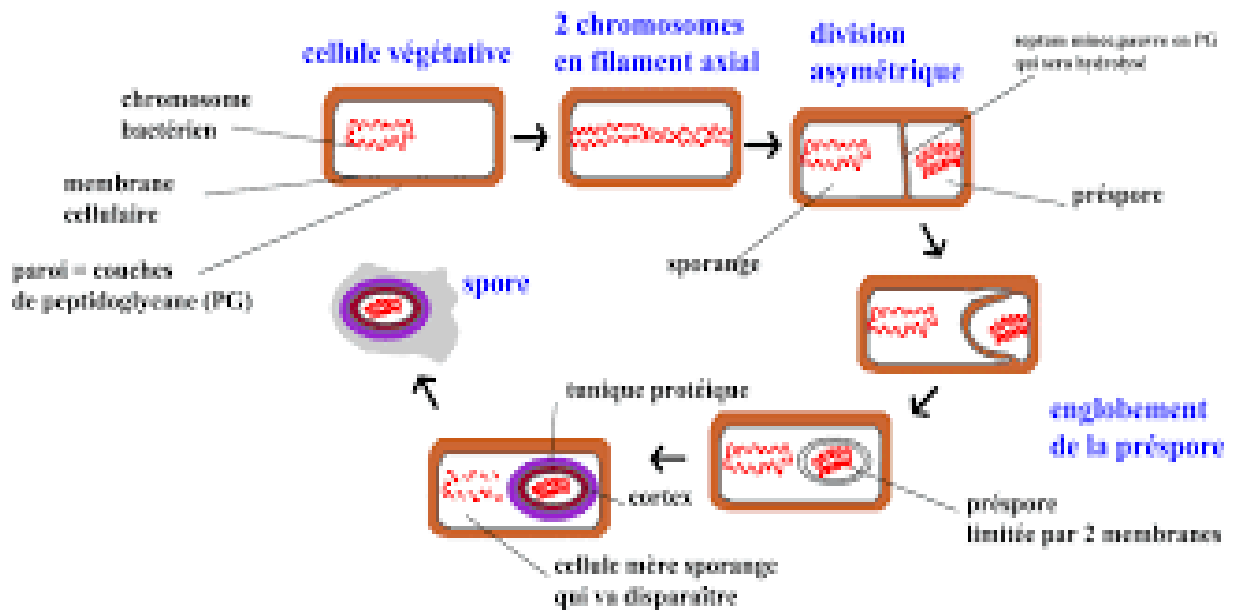


Figure II.29 : Représentation schématique de la formation de la spore.

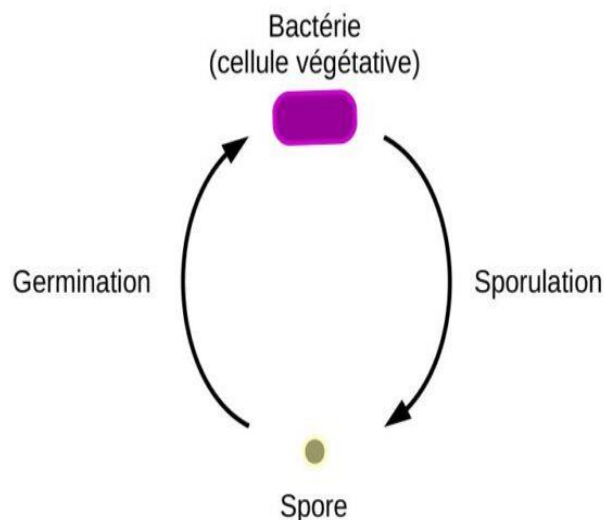
### II.5.5.5. Germination

Après une période de dormance plus ou moins longue, l'endospore peut retourner rapidement à son état initial de cellule végétative. Cette transformation se déroule en trois phases :

**-Activation** : elle survient seulement dans des conditions favorables de milieu et la suite d'une activation exercée soit par des chocs physiques, soit par des chocs mécaniques ou chimiques. L'activation résulte donc principalement d'une lésion des tuniques sporales qui peut aussi résulter d'un chauffage de quelques minutes à température élevée mais sub-létale ou d'un stockage de plusieurs semaines à température ambiante. [37]

**-Initiation** : les spores déjà activées peuvent germer en présence de nutriments spécifiques et dans des conditions d'hydratation favorable. Cette phase implique pour la spore la perte de sa résistance, la libération du dipicolinate de calcium et l'autolyse du cortex et des tuniques sporales. [22]

**-L'émergence** de la nouvelle cellule végétative : grâce à l'altération des enveloppes. [36]



*Figure II.30 : Cycle de sporulation et germination.*

### II.5.5.6. Propriétés et fonction de la spore

La spore possède de nouvelles propriétés par rapport à la cellule végétative : [36]

**-La thermo résistance :** La spore résiste en général à des températures de 70-80°C pendant 10 minutes, parfois plus. Cette propriété est due à la présence de l'acide dipicolinique, la déshydratation de la spore et aux protéines « SASP » (petites protéines acides et solubles pouvant se fixer à l'ADN. [21]

**-Résistance aux agents physiques et chimiques :**La spore résiste aux rayons UV, X, ultrasons, antiseptiques, désinfectants, ATB (un ATB bactéricide pour une bactérie peut s'avérer simplement sporostatique pour les spores de la même bactérie). Cela pose également des problèmes dans les hôpitaux. [36]

**-Résistance à la dessiccation et au vieillissement :** Ces phénomènes semblent dus à la faible teneur en eau et au métabolisme ralenti : on parle d'état de dormance. [36]

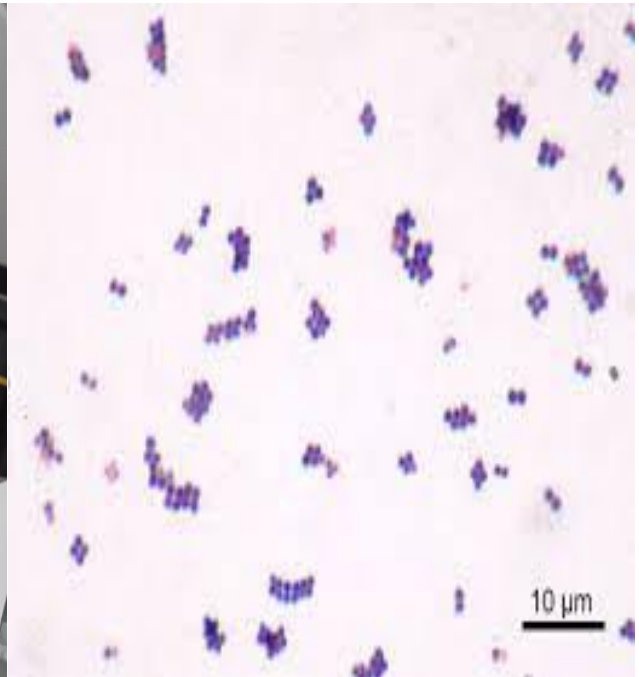
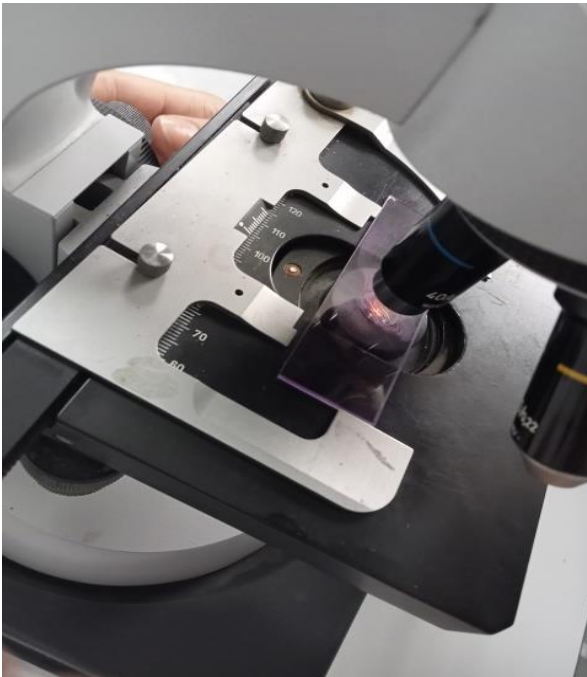
**-Synthèse d'antibiotiques :** Certaines bactéries synthétisent des antibiotiques au début de la phase de sporulation. **Exemple :** Bacillus licheniformis synthétise ainsi la **Bacitracine** ; Bacillus polymyxa le **polymyxine**. Mais aussi **des toxines** (entérotoxine de Clostridium perfringens) ou des substances à activité biopesticide (toxines qui tue des insectes), **le corps parasporal** de Bacillus thuringiensis et de Bacillus sphaericus. C'est un cristal protéique, lorsqu'il est ingéré par les insectes, il se dissout dans l'intestin et détruit l'épithélium. Les peptides clivés par les protéases passent dans le sang et provoquent la paralysie, suivie de la mort de l'insecte. [7]

## II.6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié la cellule bactérienne et ses différents composants. La cellule bactérienne contient des éléments fixes et basiques présents dans tous les types de bactéries, appelés éléments fixes, et elle contient également des éléments facultatifs présents dans un type sans l'autre, qui sont appelés éléments instables. Nous avons également étudié chacun de ces éléments séparément en termes de structure, de composition chimique, de fonction et de rôle au sein de la cellule bactérienne.

# CHAPITRE III

## Partie Expérimental



### III.1. Introduction

La plupart des bactéries n'ont pas de couleur, donc elles génèrent peu de contraste dans le champ du microscope. Par conséquent, pour voir les bactéries au microscope, il est nécessaire d'appliquer de la couleur en utilisant un réactif de coloration. Une fois colorées, les bactéries peuvent être observées et étudiées par rapport à **leur forme, leur taille et leur disposition**.

Un **frottis** bactérien est une fine couche de bactéries placée sur une lame de verre et « fixées » par la chaleur ou autres, en partie pour s'assurer qu'elles restent attachées au verre, pour la coloration. Il peut être préparé à partir d'un milieu solide ou de bouillon. Ensuite, **une coloration est appliquée**. La surface et le cytoplasme des cellules bactériennes, l'ADN, l'ARN, les protéines et la chromatine sont **chargés négativement (acide)** pour les colorer un colorant **chargé positivement (basique)** est appliqué (bleu de méthylène, fuchsine basique, cristal violet, safranine, vert de malachite....). [41]

### III.2. Coloration de Gram

#### III.2.1. Définition

**La coloration de Gram** est la coloration différentielle microbiologique la plus importante et la plus largement utilisée, publiée par Hans Christian Gram en 1884, elle permet de différencier les bactéries selon 2 critères principaux : leur forme et leur affinité pour les colorants

- **Forme** : Paires, Tétrades, Groupes, Chaînes, Lancettes...
- **Affinité pour les colorants** : Gram positif ou Gram négatif. [42]

#### III.2.2. Principe

Les bactéries sont imprégnées par une première solution colorante, le violet de gentiane, puis elles sont fixées par un mordant, la solution de Lugol (solution d'iode dans l'iodure de potassium).

On fait ensuite agir un décolorant (alcool le plus souvent), suivant la composition de leur paroi : certaines bactéries résistent à cette décoloration et apparaissent colorées en violet elles sont dites Gram positif.

D'autres bactéries ne résistent pas et ne sont plus visibles. On doit donc utiliser un deuxième colorant de teinte contrastante (fuchsine, ou safranine, colorants rouges), ces bactéries

apparaissent alors colorées en rose, elles sont dites Gram négatif. [43]

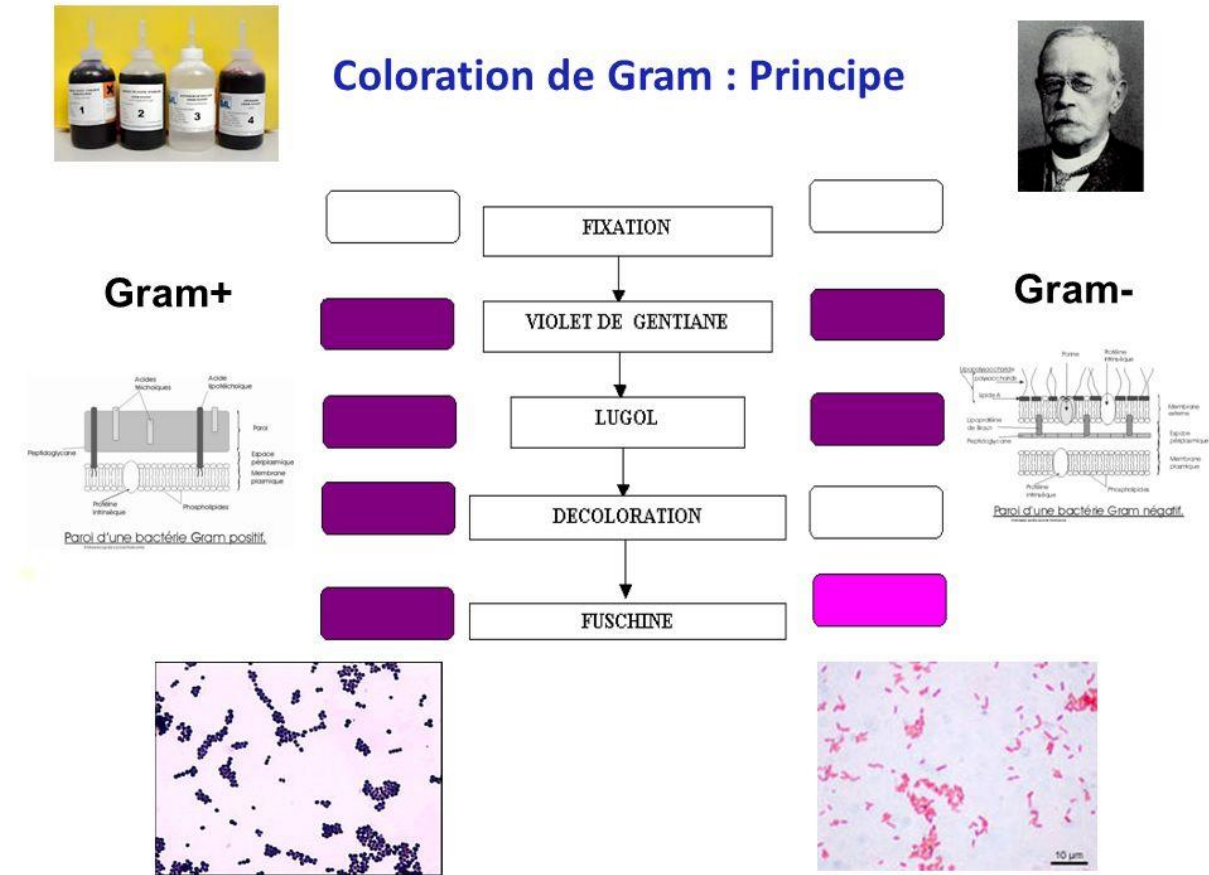


Figure III.1 : Principe de la coloration.

### III.2.3. Composition et préparation des colorants

- **Globalement**

- ✓ **Violet de gentiane phéniqué :**

- violet de gentiane : .....10 g.
    - phénol : .....20 g.
    - éthanol (95 °GL) : ..... 100 ml.
    - eau distillée : .....01 l.

- ✓ **Solution iodée de Gram ou lugol :**

- Iodure de potassium : ..... 20 g.
    - Iode métalloïde I2 : ..... 10 g.
    - eau ..... 1 l.

✓ **Solution de safranine :**

- safranine O : .....25 g.
  - éthanol à 95 °GL : ..... 100 ml.
  - solution aqueuse d'oxalate d'ammonium à 25 g/l : .....800 ml.
- ou **fuchsine** pour Gram : fuchsine de Ziehl = fuchsine basique : ..... 10 g.
- phénol : .....50 g
  - éthanol : ..... 100 ml.
  - eau distillée : 1 l. Diluer au 1/10° pour la fuchsine pour GRAM.

✓ **Décolorant alcool acétone :**

- éthanol (alcool) "absolu" .....5 volumes.
- acétone : ..... 1 volume.




• **Conservation**

- En flacon hermétique, à l'abri de la lumière, de préférence au frais : plus de 3 ans sauf pour la fuchsine diluée.

- **Attention** : filtrer lorsque l'on remplit les flacons pour l'utilisation quotidienne à partir des flacons de réserve. [42]



*Figure III.2 : Les colorants.*

| Produit                             | Pictogramme de danger  | Mentions de danger      | Conseils de prudence             |
|-------------------------------------|--|-------------------------|----------------------------------|
| <b>Cristal violet (concentré)</b>   | <br>GHS02 GHS05 GHS07 | H226- H312-H314         | P280-P260-<br>P305 + P351 + P338 |
| <b>Lugol (dilué)</b>                |  | H412                    | P273                             |
| <b>Éthanol à 70 %</b>               | <br>GHS02             | H225                    | P210                             |
| <b>Fuchsine contenant du phénol</b> | <br>GHS07 GHS08       | H315-H319-H351-<br>H335 | P261-P281-<br>P305 + P351 + P338 |

*Figure III.3 : Fiche sécurité.*

### III.2.4. Matériel utilisé

-Microscope biologique avec immersion.

-Culture bactérienne :

- Souche Escherichia coli.
- Souche Staphylococcus aureus.

-Lames de verre.

-Pince à lame.

-Bec Bunsen.

-Anse de platine.

-Pissette d'eau.

-Chronomètre.



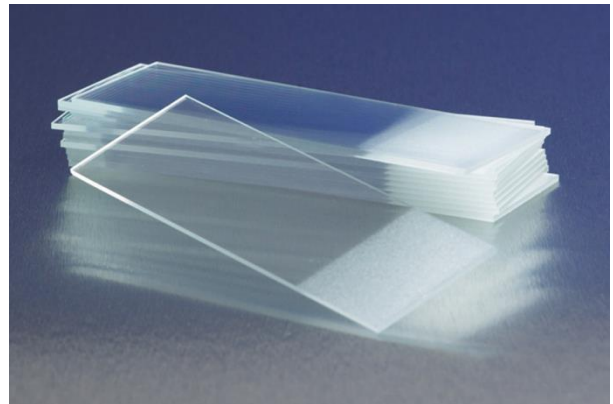
*Anse de platine*



*Microscope biologique*



*Bec Bunsen*



*Lames de verre*



*Culture bactérienne*



*Chronomètre*

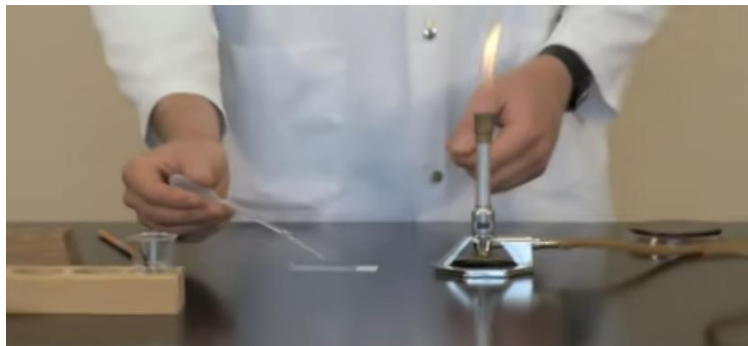
*Figure III.4 : Matériel utilisé.*

### III.2.5. Etapes et procédures de la coloration de Gram

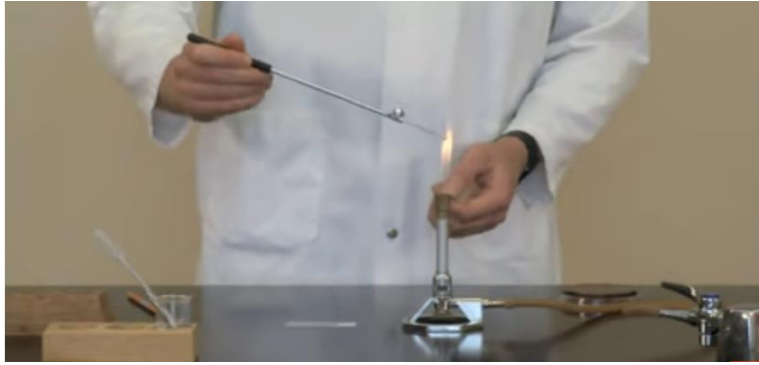
- Pour faire la coloration de Gram, identifier d'abord une lame de microscope en utilisant un crayon de plomb.



- Evitez d'utiliser un crayon à l'encre puisque de l'alcool sera utilisé pendant l'expérience et cela effacerait votre identification.
- Déposer ensuite une goutte d'eau en plein centre de la lame.



- Faites attention de ne pas y déposer une goutte trop grosse puisque cela allongerait considérablement le temps pour faire la fixation de la lame.
- Prenez votre (fil à boucle) ou bien anse de platine et stérilisez le dans la flamme.



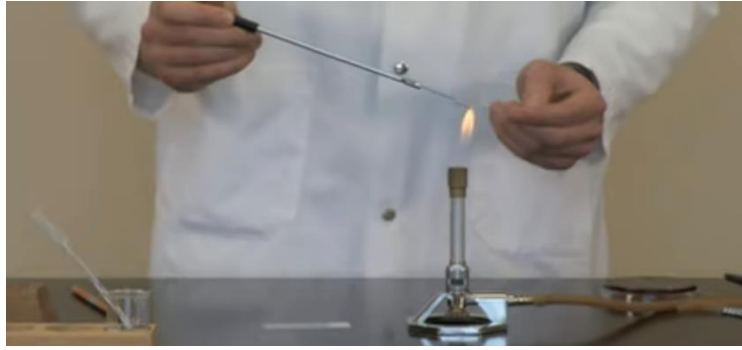
- Une fois qu'il devient rouge, patientez 5 secondes puis retirez-le de la flamme pour qu'il refroidisse dans le champ stérile.
- Une fois le fil refroidit, prenez votre culture bactérienne et sélectionnez idéalement une colonie isolée.
- Déposez les bactéries prélevées dans la goutte d'eau sur la lame de microscope.



- Étendez la goutte sur la plus grande surface possible de la lame.
- Pour éviter que la lame ne bouge trop, maintenez-la en place avec un doigt.



- Une fois l'étalement termine, flambez le fil à boucle jusqu'à ce qu'il devienne rouge.



- Attendez 5 secondes, puis déposez-le dans le support de bois.



- Fixez ensuite la lame à la chaleur.
- Pour ce faire, passez la lame à quelques reprises dans la flamme en faisant bien attention qu'elle ne devienne pas trop chaude.



- La chaleur de la lame doit être supportable à la surface de la peau, autrement la composition des bactéries sera altérée et la coloration de Gram ne sera plus possible.
- Répétez le flambage jusqu'à ce que la lame soit sèche.

- Une autre méthode pour fixer la lame consiste à la chauffer au-dessus de la flamme sans la mettre dans celle-ci que vous utilisez cette méthode ou la précédente, faites la fixation à la chaleur jusqu'à ce que la lame soit complètement sèche en évitant de la surchauffer, cela peut prendre plusieurs minutes.
- En séchant, la lame prend un aspect blanchâtre.
- Lorsqu'elle est complètement sèche, vous serez prêt à passer à l'étape suivante.
- Lorsque la lame est fixée, dirigez-vous au lavabo pour réaliser la coloration proprement dite.



- Pour faire la coloration de Gram, vous aurez besoin de 4 solutions :
- ✓ **Le premier colorant** utilisé sera **le cristal violet** : il permet de colorer toutes les bactéries en violet qu'elle soit Gram + ou Gram- .



- ✓ **Le second colorant** est **l'iode**, il s'agit en fait d'un mordant qui permet d'intensifier la coloration préalablement donnée par le cristal violet.

- ✓ **La troisième solution** est un mélange **d'alcool et d'acétone**. Cela agit comme un décolorant chez les bactéries Gram- .



**En effet**, l'alcool détruit la membrane externe des Gram- et provoque la sortie de la coloration violette de ces bactéries, les bactéries Gram- deviennent donc incolores après cette étape alors que **les Gram + demeurent violettes**.

**Finalement**, le dernier colorant utilisé est **la safranine**. Ce colorant permet de donner une coloration rouge aux **bactéries Gram- .**

- Lorsque vous êtes prêts à faire la coloration enfiler un gant puis fixez la lame à l'aide d'une épingle à linge.



- Déposez le tout sur le support de verre ou dessus du lavabo.
- Faites couler un fin jet d'eau qui servira à lever la lame entre les différentes étapes de coloration.



✓ **Première étape** prenez le **crystal violet** et inondez complètement la lame.



- Laissez le colorant réagir pendant une minute.



- Pour mesurer le temps, servez-vous d'un chronomètre.

- Après une minute, rincer la lame en évitant de diriger le jet d'eau directement sur le centre de celle-ci.



Cela aurait comme conséquence de décoller les bactéries de la lame.

- Rincez également le dessous de la lame.

✓ **Deuxième étape** prenez **l'iode** et inonder complètement la lame.



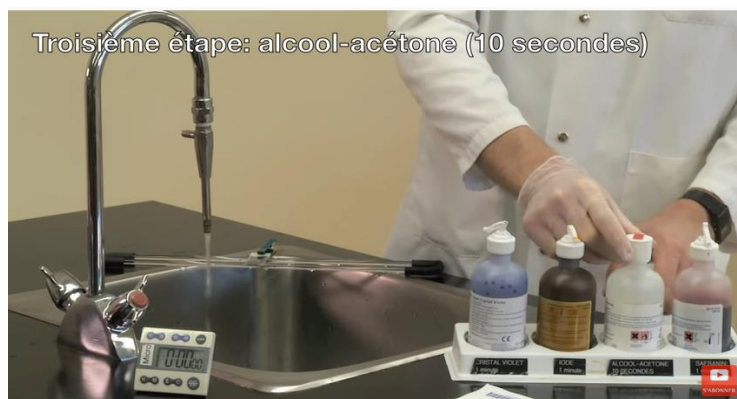
- laissez réagir pendant une minute.



- surveillez bien le temps sur votre chronomètre.
- Après une minute, rincer la lame.



- ✓ Pour la troisième étape avec la solution d'alcool - acétone, il est très important de respecter le temps de contact de 10 seconde.



- surveillez donc de prêt votre temps à l'aide du chronomètre.
- couvrez la lame de la solution d'alcool- acétone et vérifiez de près le temps.



- Après 10 secondes précisément, rincez la lame.



✓ **Dernière étape**, prenez la **safranine** et inondez complètement la lame.



-Laissez réagir pendant une minute



• Après une minute rincer la lame.



- Prenez le calepin de papier buvard et détachez une feuille.



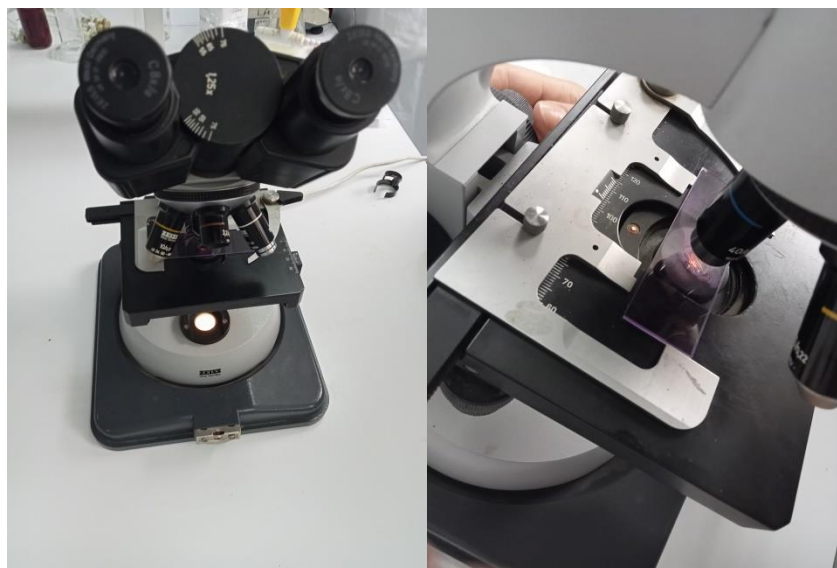
- Déposez votre lame sur le papier buvard puis, épongez-la à plusieurs reprises pour enlever l'excédent d'eau.



- il est important d'épongez la lame plutôt que de la frotter avec papier buvard afin de ne pas décoller les bactéries qui s'y trouvent.



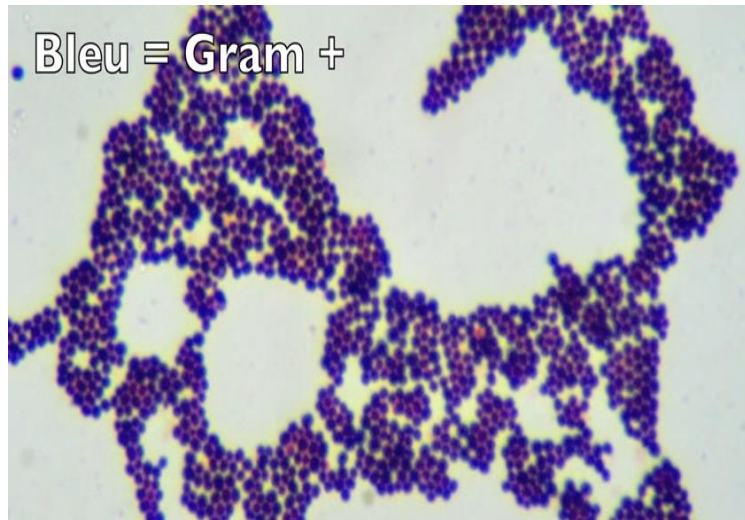
- il ne reste plus qu'à observer la lame au microscope à un grossissement de 100x.



-Une fois vos observation terminée, rangez convenablement votre microscope et jetez votre lame dans la poubelle de décontamination rouge.

### III.2.6. Observation au microscope

- ✓ On observe que la bactérie **Staphylococcus aureus** est de couleur **bleue** ou **violette**. C'est qu'elle est **Gram+**.



*Figure III.5 : Staphylococcus aureus au microscope.*

- ✓ On observe que la bactérie **Escherichia coli** est de couleur **rouge** ou **rose**. C'est qu'elle est **Gram-** .



*Figure III.6 : Escherichia coli au microscope.*

### III.2.7. Interprétation des résultats

La coloration par le cristal violet oxalate colore en violet le contenu de la bactérie. Le cristal violet se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet

de fixer cette coloration interne. La décoloration rapide sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram négatives ». En effet, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycanes - donc plus fine - qui va laisser passer le différentiateur à base d'alcool (molécule hydrophile), et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le cristal violet. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram positif » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une « couche » de peptidoglycanes plus importante, donc de ce fait plus épaisse. Elles resteront alors de couleur violette. La coloration à la fuschine est une contre-coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à Gram positif restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre-coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme. [44]

### III.2.8. Risques d'erreurs

-**Attention**, une mauvaise coloration peut conduire à des erreurs d'identification bactérienne ou à une mauvaise orientation de diagnostic. [42]

#### Faux positif

- étalement trop épais (mauvaise décoloration des bactéries en profondeur).
- dépôt de colorant dans le flacon de **violet de gentiane** : filtrer le colorant pour y remédier.
- solution **iodée** mal égouttée.
- décolorant laissé trop peu de temps.
- utilisation de la fuchsine avec certains germes : les Neisseria et les **Acinetobacter**, en particulier, sont "avidés" en fuchsine et la concentrent jusqu'à un rouge sombre difficile à distinguer du violet.

#### Faux négatif

- Dans toute population de **Gram +** on voit des **Gram -** (parfois très nombreux) : ce sont des cadavres de bactéries **Gram +**.
- colorants de mauvaise qualité ou trop dilués.
- solution de **lugol** laissée trop peu de temps.
- décolorant laissé trop longtemps ou mal rincé.

### III.3. Conclusion

D'après ce chapitre, on voit que la technique de coloration de Gram passe par quatre étapes fondamentales, que l'on peut résumer comme suit :

#### Étape 1 : Coloration par le cristal violet

- Coloration primaire ajouté au frottis de suspension bactérienne.

#### Étape 2 : Mordantage au lugol

- Le lugol (solution iodo-iodurée) permet de fixer la couleur violette.

#### Étape 3 : Décoloration à l'alcool

- L'alcool décolore les bactéries Gram (-).

#### Étape 4 : Coloration à la safranine

- Recoloration des bactéries Gram (-) à la fuchine ou à la safranine.

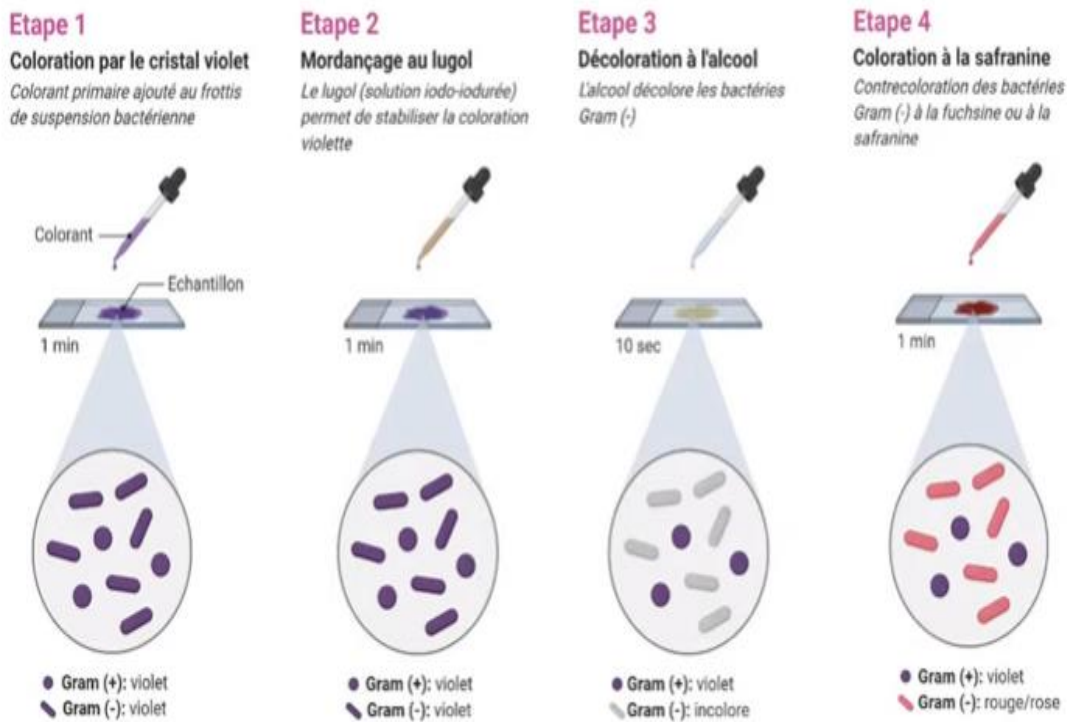


Figure III.7 : Image récapitulatif sur les étapes de la coloration de Gram.

Conclusion

Générale

### Conclusion générale

Ce travail de recherche réalisé au niveau du laboratoire nous a permis de mener une étude claire et efficace sur la technique de coloration de Gram

La **coloration de Gram** doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mit au point le protocole en 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classer les bactéries. Son avantage est de donner une information rapide, facile et bon marché sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu, tant sur le type que sur la forme.

Ainsi, les scientifiques peuvent distinguer les bactéries à Gram positif - on dit aussi « Gram positives » - dotées d'une simple paroi avec une grande quantité de peptidoglycane, des bactéries à Gram négatif, composées de moins de peptidoglycane mais pourvues d'une membrane externe supplémentaire [45]. Ce type de classification n'est pas sans conséquence dans le domaine médical (la résistance des bactéries et l'efficacité d'antibiotiques dépendant du type de bactérie).

La coloration de Gram est fréquemment utilisée en microbiologie pour mettre en évidence les bactéries Gram positif ou négatif. Cela permet de différencier et de classer les différentes populations de micro-organismes. Par exemple, lorsqu'il y a suspicion d'infection de l'organisme dans une biopsie, on pourra utiliser cette coloration suivie d'une analyse histopathologique pour émettre un diagnostic. Cette méthode a l'avantage d'être plus rapide qu'une culture classique [46].

Les bactéries détectées sont classées en deux catégories. À titre d'exemples :

- Les staphylocoques et les streptocoques, bactéries à Gram +, apparaissent en violet.
- Escherichia coli, entérobactérie à Gram -, apparaît sous forme de bacille rose/rouge (en fonction de la contre-coloration fuchsine ou safranine).

# Annexes

## Annexes



# Guide pratique des bactéries pathogènes

Edition 2017

## **E. coli**

Bacille à Gram négatif de la famille des entérobactéries.

Il existe quatre groupes principaux de souches d'E. coli responsables de diarrhées :

- E. coli entéro-pathogènes EPEC : responsables de gastro-entérites infantiles
- E. coli entéro-invasifs EIEC : syndromes dysentériques (diarrhées mucopurulentes et sanglantes)
- E. coli entéro-toxinogènes ETEC : responsables de diarrhées liquidiennes cholériques (diarrhée du voyageur ou turista)
- E. coli entéro-hémorragiques EHEC : syndrome entéro-hémorragique responsable chez les enfants (1 mois à 3 ans) du syndrome hémolytique et urémique.

### **Habitat**

Hôte normal du tube digestif.

### **Pouvoir pathogène**

Infections entéro-coliques, infections urinaires, toxi-infections alimentaires, infections intra-abdominales (cholécystites, péritonites...), septicémies, infections néonatales (méningites).

### **Diagnostic bactériologique**

- **Prélèvements** : urines, sang (hémocultures), LCR, pus, selles...
- **Diagnostic bactériologique direct** : repose sur l'isolement et l'identification de la bactérie.
- Recherche d'antigènes solubles (E. coli K1).
- Recherche des entérotoxines.

### **Résistance aux antibiotiques**

**E. coli** est sensible de façon naturelle à toutes les  $\beta$ -lactamines malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique qui est exprimée à très bas niveau. La résistance acquise est surtout de type enzymatique par sécrétion d'une pénicillinase, d'une céphalosporinase augmentée ou hyperproduite ou enfin une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu.

La résistance aux aminosides fait surtout intervenir l'inactivation enzymatique, essentiellement de type phosphotransférase (3') (APH') d'intérêt clinique limité actuellement en raison de la faible prescription de kanamycine ou de néomycine.

La résistance acquise aux quinolones est chromosomique (mutation) et deux principaux mécanismes pouvant éventuellement s'associer sont individualisés (diminution d'affinité de l'ADN gyrase ou imperméabilité par porines modifiées) ; néanmoins, plusieurs déterminants génétiques sont actuellement caractérisés.

Les E. coli sont sensibles aux phénicolés et aux sulfamides. Elles sont habituellement résistantes aux macrolides, lincosamides et synergistines.

### **Epidémiologie Nationale**

Escherichia coli, représente en moyenne 10% de l'ensemble des isolats, et occupe, ainsi, une place importante en pathologie infectieuse communautaire et nosocomiale au Maroc. L'étude de l'évolution du nombre d'isolats d'E.coli entre 2010 et 2015 a permis de constater une nette augmentation de la fréquence d'isolement à l'échelle nationale.

Cette bactérie a été isolée principalement des infections urinaires (61%), des infections intra abdominales (24%) et des bactériémies (13%) touchant tous les secteurs d'activité pédiatriques. Par ailleurs, la résistance à l'Amoxicilline est en moyenne de 68 %. Elle est de 53 % pour l'association amoxicilline acide clavulanique. La résistance aux C3G par production de Bétalactamases à spectre étendu (BLSE) est en moyenne de 20%. Les souches de sensibilité diminuée aux carbapénèmes, ayant émergé à partir de 2013 au Maroc, ont représenté en moyenne 4% des isolats BLSE. La résistance à la Ciprofloxacine est en moyenne de 17 %. Elle est de 20 % pour la Gentamicine et 2 % pour l'Amikacine. Pour le cotrimoxazole, elle atteint 51%. L'évolution de la résistance aux C3G par production de BLSE chez E.coli a été marquée par une augmentation de la résistance au niveau des différents CHU à l'échelle nationale pendant les 6 dernières années. En effet, cette résistance est passée de 11% en 2010 à 25% en 2015. Ce constat alarmant incite à revoir les options thérapeutiques en fonction de l'évolution de la résistance et des situations cliniques.

## **Propositions thérapeutiques**

En présence d'une infection à E. coli, Il faut faire le choix d'un antibiotique en fonction de l'antibiogramme et de la localisation de l'infection.

### **Antibiotiques conseillés:**

- Amoxicilline + A. clavulanique.
  - Cotrimoxazole en cas d'infection entérocolique.
  - Céphalosporines 3ème génération ± aminoside (en cas de sepsis ou de pyélonéphrite)
- Alternatives: quinolones, imipénème.

## Staphylococcus

Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif très résistants dans le milieu extérieur.

Le genre Staphylococcus comporte deux espèces :

- **Staphylococcus aureus** (le staphylocoque à coagulase positive) qui possède un potentiel de pathogénicité important, impliqué dans les infections communautaires et nosocomiales.
- **Staphylocoques à coagulase négative** : pathogènes opportunistes impliqués dans les infections nosocomiales.

### Habitat

L'Homme en est le principal réservoir, qu'il soit malade ou porteur sain hébergeant des staphylocoques au niveau des fosses nasales, de l'intestin, de la peau ou de ses annexes glandulaires (aisselle, périnée). Les staphylocoques contaminent également les surfaces, l'air et l'eau. La transmission est avant tout interhumaine directe et manu portée.

### Caractères bactériologiques

Ce sont des Cocci à Gram positif, immobiles, regroupés en amas (grappe de raisin +++), en tétrade ou en diplocoques.

Les staphylocoques sont des germes peu exigeants et peuvent être isolés en bouillon ou sur des milieux solides simples tels que géloses ordinaires ou gélose au sang ou géloses sélectives. Ils sont aéro anaérobie facultatifs, Fermentent le glucose et le glycérol et possédant la catalase.

### Pouvoir pathogène

**Infections suppuratives superficielles ou profondes** : peau, tissu mou, muscle, os, tractus respiratoire, valves cardiaque, tractus urinaire, infection sur matériel étranger.

**Toxi infection** : dues à la synthèse de différentes toxines par certaines souches. TSST-1 (toxine du choc toxique staphylococcique)

**Exfoliatines** : responsable du syndrome de la peau ébouillantée

**Entérotoxines** ; responsables des toxi infections alimentaires ou d'entérocrites après sélection d'une souche productrices d'entérotoxines par l'antibiothérapie.

La LPV (leucocidine de Panton et Valentine) : Les souches productrices de la LPV sont impliquées dans les infections cutanées nécrosantes et dans certaines infections graves (pneumonie nécrosante, ostéomyélite).

La virulence des *S.aureus* explique en partie la gravité des infections invasives même lorsque la souche est sensible à tous les antibiotiques.

Il faut distinguer les infections à *S.aureus* rapidement évolutive, des infections à SCN, moins virulentes, le plus souvent en cause lors d'infections sur matériel étranger.

### **Diagnostic bactériologique**

**Prélèvements** : Hémoculture, LCR, Pus , pulmonaire (LBA, liquide pleurésie, PDP...), Urines, muqueuses , cutanées. Ce germe étant résistant, le transport est assuré dans des conditions normales.

**Diagnostic direct** : isolement et identification de la bactérie au site de l'infection : l'examen direct a une valeur essentiellement pour les collections purulentes. Il permet la mise en évidence de cocci à Gram positif en amas. Cet aspect est fortement évocateur du Staphylocoque. La culture est facile sur milieux ordinaires.

L'espèce *S.aureus*, considérée le plus fréquemment comme pathogène pour l'homme, doit être identifiée et différenciée des SCN. En pratique différents tests peuvent être utilisés pour le diagnostic différentiel entre *S.aureus* et les autres espèces. (Coagulase-Dnase-Agglutination, milieux chromogènes, toxines)

### **Résistances aux antibiotiques**

#### **Résistance aux bêtalactamines :**

- Résistance enzymatique par production de pénicillinase extra-cellulaire, inductibles et codées par des plasmides. Elle inactive les pénicillines G et V, les aminopénicillines, les carboxypénicilline et les uréidopénicillines. Elle est inhibée par l'acide clavulanique.
- Résistance par modification de la cible par production de PLP 2-a qui est codée par le gène Mec-A, responsable d'une résistance à la méticilline et d'une résistance croisée à toutes les bêtalactamines.

**Resistance aux fluoroquinolones :** S.aureus est naturellement résistant à l'acide nalidixique .

La résistance acquise aux fluoroquinolones se fait principalement par modification de la cible (ADN gyrase). C'est une résistance croisée à l'ensemble des fluoroquinolones, souvent associée à la méticillino résistance.

Résistance aux aminosides : S.aureus est naturellement sensible aux aminosides. La résistance acquise est principalement enzymatique faisant intervenir 3 types d'enzymes :

- ANT = aminosides nucléotidyltransférase
- AAC = aminosides acétyltransférase
- APH = aminosides phosphotransférase

La résistance à la gentamicine implique la résistance à tous les aminosides.

## **Epidémiologie nationale**

L'incidence des SARM à l'échelle nationale a beaucoup régressé sur les dernières années. La résistance à la méticilline représente moins de 10 % en 2016. La résistance aux Fluoroquinolones est de 35% et de 11% à la Gentamicine. Les souches isolées ont gardé une sensibilité aux glycopeptides. Ces souches ont été isolées principalement à partir des bactériémies et des infections liées aux cathéters.

## **Propositions thérapeutiques**

La sensibilité des Staphylocoques est en constante évolution, notamment celles des souches d'origine hospitalière. La prescription d'un anti staphylococcique doit tenir compte de l'antibiogramme. La Pénicilline M est le traitement de référence des staphylocoques sensibles à la Méticilline, qui sont le plus souvent sensibles aux autres anti-staphylococciques. La cloxacilline est à préférer à l'oxacilline pour un traitement oral en raison de sa meilleure biodisponibilité (absorption digestive), elle reste cependant réservée aux infections cutanées peu sévères. Les pénicillines du groupe M par voie parentérale sont les antibiotiques les plus efficaces dans le traitement des infections à staphylocoque méti sensible.

Références

Bibliographiques

## Références bibliographiques

---

- [1] **Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R. (2006).** Milieux extrêmes : Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques : **9**.
  
- [2] **Dauga, C., Doré, J., & Sghir, A. (2005).** La diversité insoupçonnée du monde microbien. Médecine/sciences, 21(3), 290–96.  
doi:10.1051/medsci/2005213290 10.1051/medsci/2005213290.
  
- [3] [https://www.actuenvironnement.com/ae/dictionnaire\\_environnement/definition/microbiologie.php](https://www.actuenvironnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/microbiologie.php).
  
- [4] **Salah Eddine SAMRI** , cours de microbiologie générale ,Université Mohammed Premier.
  
- [5] **Chapitre-1.-Le-monde-microbien.pdf** file:///C:/Users/joker/Downloads/Documents/.
  
- [6] **Dr Yahiaoui Bilal (2014-2015)**, Cours de Microbiologie générale.
  
- [7] **Dr Bilal Yahiaoui (2014-2015)** , Unité d’enseignement fondamentale II , Microbiologie Générale, semestre II FSNV UFA Sétif 1.
  
- [8] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Tyndallisation>.
  
- [9] **Dr. ZAATOUT Nawel , Dr. BOUAZIZ Amira (2020-2021)**, Microbiologie Générale Chapitre 1 Université de Batna 2.
  
- [10] <https://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Classification/Historique>.
  
- [11] **Hamames M.** Chapitre 1 : Le monde microbien.
  
- [12] **Abdelkrim MEBARKIA (2019-2020)**, Cours de Microbiologie Générale Université Ferhat Abbas Sétif 1.

## Références bibliographiques

---

- [13] [https://elearn.univtlemcen.dz/pluginfile.php/116590/mod\\_resource/content/1/Chapitre-1.-Le-monde-microbien.pdf](https://elearn.univtlemcen.dz/pluginfile.php/116590/mod_resource/content/1/Chapitre-1.-Le-monde-microbien.pdf).
- [14] **M. MALIOU Djamil (2019-2020)**, Cours de microbiologie générale ,Université de Bouira Mohand Akli Ouhladj.
- [15] **Jean-Claude Callen Avec la collaboration de Roland Perasso**, BIOLOGIE CELLULAIRE Des molécules aux organismes 2 e édition, Cours, questions de révision et QROC, Licence SV • PCEM • PCEP • Classes préparatoires, SCIENCES SUP.
- [16] <https://fr.ncmhcsso.org/gram-positive-7217>.
- [17] **Senior Author: Warren Levinson, MD, PhD;**  
**Authors: Peter Chin-Hong, MD; Elizabeth A. Joyce, PhD; Jesse Nussbaum, MD**  
**Brian Schwartz, MD**, Medical Microbiology & Immunology, A Guide to Clinical Infectious Diseases, Fifteenth Edition.
- [18] **Girish Mahajan and Lakshmi Balachandran (2014)**, Biodiversity in Production of Antibiotics and Other Bioactive Compounds, Adv Biochem Eng Biotechnol, DOI: 10.1007/10\_2014\_268, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [19] **Cours de Bactériologie Médicale** <http://www.microbes-edu.org> › étudiant ›Mycoplasma.
- [20] **Dr. SI MOHAMMED (2019/2020)**, Abdesselem Cours de Microbiologie , Universitaire Ahmed Zabana de Relizane.
- [21] **Dr Rahmani Soraya (2019)**, Polycopié de cours de Microbiologie Générale, Université Hassiba Ben Bouali Chleff.
- [22] **Mme Dr LEGHLIMI. H. (2019/2020)**, Cours de Microbiologie Générale.

## Références bibliographiques

---

- [23] **Daniel Richard, Nathalie Giraud, Fabienne Pradere, Patrick Chevalet et Thierry Soubaya (2010)**, BIOLOGIE Licence tout le cours en fiche, IUFM Midi-Pyrénées (Toulouse).
- [24] **Histoire de la résistance bactérienne aux antibiotiques, Amine El Boujnoui**, Pour l'Obtention du Diplôme de docteur en pharmacie, Université Mohammed v de rabat Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat du Maroc.
- [25] **Mme LADAIMIA**, Cours de Microbiologie générale Chapitre I : le monde microbien Réalisé L2 Ecologie et environnement - Hydrobiologie marine et continentale.
- [26] **M. SARDATLN (2020-2019)**, Cours de Microbiologie générale Université Mohamed El Bachir el Ibrahimy -BBA-.
- [27] **Jean-Claude Callen (2009)**, Biologie cellulaire en 30 fiches Dunod, Paris.
- [28] <file:///C:/Users/joker/Downloads/Chapitre-2--La-cellule-bactérienne.pdf>.
- [29] **Gerard J. Tortora. Berdell R. Funke. Christine L. Case**, Micro biology an introduction. Thirteenth edition.
- [30] **S. Mézaache-aichour (2016-2017)**, Génétique Microbienne, Université de Sétif.
- [31] <https://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid>.
- [32] <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/microbiologie/chapitre4/Plasmides.pdf>.
- [33] **El Bekkay BERRAHO (2009)**, Cours de Microbiologie Générale Par Université Mohammed V Agdal Faculté des Sciences Rabat.
- [34] **Docteur MOUSSI Abdelhamid (2013/2014)**, Chapitre 2 : la cellule bactérienne, Université Mohamed Khider de Biskra.

## Références bibliographiques

---

- [35] **Cours illustré de Biologie Cellulaire ; L1 / SNV (FSB / USTHB) Révisé en Juillet (2016).**
- [36] **D. Bouzid. (2019-2020),** Cours de Microbiologie générale.
- [37] **Enseignant : Hamames M,** Chapitre 2 : La cellule bactérienne.
- [38] <http://www.microbiologiemedicale.fr/examenmicroscopique/structurebacterienneparticuliere.htm>
- [39] **SOUAGUI .Y,** Cours de Microbiologie générale, 2ème année SNV/ Sci. Biologiques - Sci. Alimentaires.
- [40] **Leclerc, Gaillard, Simonet; Brock; Pelmont ;** Microbiologie générale.
- [41] <https://microbiologie-clinique.com/Realiser-Frottis-bacteriens.html>.
- [42] <https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Gram.html>.
- [43] **élaboration de la flore du microbiote digestif de valaille et identification de souches de lactobacilles par l'ADNr 16S, KOUADRI BOUDJELTHIA NACIMA,** Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie, Option : Biologie moléculaire et Génétique des microorganismes, **Soutenu le 05/03/2014,** Université d'Oran.
- [44] **Kit de coloration rapide Gram Hucker Réf. COLGRAM SORDALAB | PARC SUDESSOR - 15 Avenue des Grenots - 91150 ETAMPES – France.**
- [45] **David H. Bergey, John G. Holt, Noel R. Krieg et Peter H.A. Sneath,** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore/Philadelphia/Hong Kong etc., Lippincott Williams & Wilkins, **1994, 9th éd.,** 787 p. (ISBN 0-683-00603-7).
- [46] « Gram - Histalim » [archive], sur Histalim (consulté le 29 avril 2016).

## Résumé

Les travaux de recherche menés au cours de cette thèse portent sur le principe de la coloration de Gram. La coloration de Gram est très utilisée en bactériologie médicale, elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -). Les bactéries peuvent donc être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram.

**Mots-clés** : Coloration de Gram, Bactéries Gram positif, Bactéries Gram négatif, Cellule bactérienne, E. Coli, Staphylococcus aureus.

## Abstract

The research work carried out during this thesis focuses on the principle of Gram staining. Gram staining is widely used in medical bacteriology, it makes it possible to stain bacteria and to distinguish them by their ability to fix gentian violet (Gram +) or fuschine (Gram -). Bacteria can therefore be grouped into 2 categories according to the Gram staining method.

**Keywords:** Gram stain, Gram positive bacteria, Gram negative bacteria, Bacterial cell, E. coli, Staphylococcus aureus.

## ملخص

يركز العمل البحثي الذي تم إجراؤه خلال هذه الرسالة على مبدأ تلوين الجرام. يستخدم تلوين غرام على نطاق واسع في علم الجراثيم الطبي ، فهو يجعل من الممكن تلوين البكتيريا وتمييزها من خلال قدرتها على تثبيت صبغة الجنتيانا (موجبة الجرام) أو الفوشسين (سالبة الجرام). لذلك يمكن تصنيف البكتيريا إلى فئتين وفقاً لطريقة تلوين الجرام.

**الكلمات المفتاحية:** صبغة جرام ، بكتيريا موجبة الجرام ، بكتيريا سالبة الجرام ، خلية بكتيرية ، بكتريا المكورات العنقودية الذهبية، الإشريكية القولونية.