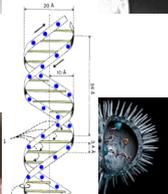
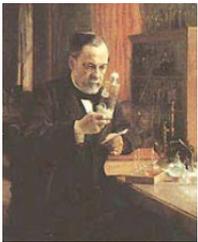


# INTRODUCTION À LA MICROBIOLOGIE

## 1. QUELQUES REPÈRES HISTORIQUES



Années	Investigateur(s)	Découverte
1684	Antoni van Leeuwenhoek	Découverte des bactéries
1798	Edward Jenner	Vaccination contre la variole
1857	Louis Pasteur	Microbiologie de la fermentation de l'acide lactique
1860	Louis Pasteur	Rôle des levures dans la fermentation alcoolique
1864	Louis Pasteur	Controverse de la génération spontanée
1867	Robert Lister	Principes antiseptiques en chirurgie
1876	Ferdinand Cohn	Découverte des endospores
1881	Robert Koch	Méthodes d'études des bactéries en culture pure
1882	Robert Koch	Découverte de la cause de la tuberculose
1882	Élie Metchnikoff	Phagocytose
1884	Robert Koch	Postulats de Koch
1884	Christian Gram	Méthode de la coloration de Gram
1885	Louis Pasteur	Vaccins contre la rage
1889	Sergueï Winogradsky	Concept de chimolithotrophie
1889	Martinus Beijerinck	Concept de virus
1890	Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato	Antitoxine de la diphtérie
1890	Sergueï Winogradsky	Croissance autotrophe des chimolithotrophes
1901	Martinus Beijerinck	Méthode de culture d'enrichissement
1901	Karl Landsteiner	Groupes sanguins humains
1908	Paul Ehrlich	Agents de chimiothérapie
1911	Francis Rous	Premier virus du cancer
1915/1917	Frederick Twort/Félix d'Hérelle	Découverte des virus bactériens (bactériophages)
1928	Frederick Griffith	Découverte de la transformation des pneumocoques
1929	Alexander Fleming	Découverte de la pénicilline
1931	Cornelius Van Niel	H <sub>2</sub> S (hydrogène sulfuré) comme donneur d'électron dans la photosynthèse anoxygénique
1935	Gerhard Domagk	Sulfonamides (agents antimicrobiens)
1935	Wendell Stanley	Cristallisation du virus de la mosaïque du tabac
1941	George Beadle et Edward Tatum	Hypothèse d'un gène-une enzyme
1943	Max Delbruck et Salvador Luria	Transmission des caractères génétiques chez les bactéries
1944	Oswald Avery, Colin Macleod, Maclyn McCarty	Explications des travaux de Griffith – l'ADN est du matériel génétique
1944	Selman Waksman et Albert Schatz	Découverte de la streptomycine
1946	Edward Tatum et Joshua Lederberg	Conjugaison bactérienne
1951	Barbara McClintock	Découverte des éléments transposables
1952	Joshua Lederberg et Norton Zinder	Transduction bactérienne
1953	James Watson, Francis Crick, Rosalind Franklin	Structure de l'ADN
1959	Arthur Pardee, François Jacob, Jacques Monod	Régulation des gènes par une protéine répresseur
1959	Rodney Porter	Structure de l'immunoglobuline
1959	Frank Macfarlane Burnet	Théorie de la sélection clonale
1960	François Jacob, David Perrin, Carmon Sanchez, Jacques Monod	Concept de l'opéron
1960	Rosalyn Yalow et Solomon Berson	Développement des radio-immuno essais (RIA)
1961	Sydney Brenner, François Jacob et Matthew Meselson	ARN messager et ribosomes : site de la synthèse protéique
1966	Marshall Nirenberg et Har Gobind Khorana	Découverte du code génétique
1967	Thomas Brock	Découverte des bactéries des sources d'eau chaude
1969	Howard Temin, David Baltimore, Renato Dulbecco	Découverte des rétrovirus/transcriptase inverse
1969	Thomas Brock et Hudson Freeze	Isolement de <i>Thermus aquaticus</i> , source de Taq ADN polymérase
1970	Hamilton Smith	Spécificité d'action des enzymes de restriction
1973	Stanley Cohen, Annie Chang, Robert Helling et Herbert Boyer	ADN recombinant
1975	Georges Kohler, Cesar Milstein	Anticorps monoclonaux
1976	Susumu Tonegawa	Réarrangement des gènes de l'immunoglobuline
1977	Carl Woese et George Fox	Découverte des Archaea
1977	Fred Sanger, Steven Niklen, Alan Coulson	Méthodes de séquençage de l'ADN
1981	Stanley Prusiner	Caractérisation des prions
1982	Karl Stetter	Isolement du premier procaryote avec une température optimale supérieure à 100 °C
1983	Luc Montagnier	Découverte du VIH, cause du SIDA
1985	Kary Mullis	Invention de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)
1986	Norman Pace	Écologie moléculaire microbienne
1995	Craig Venter et Hamilton Smith	Séquence complète d'un génome bactérien
1999	The Institute for Genomic Research (TIGR) et autres	Plus de cent génomes microbiens séquencés ou en cours
2000	Edward Delong	Découverte des Archaea marines, protéorhodopsine, et d'autres aspects de la vie marine procaryotique
2004	Craig Venter et autres	Premier grand génome environnemental : mer des Sargasses
2012	Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna	Système CRISPR-Cas9 chez <i>Streptococcus pyogenes</i>

## 2. ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE DU VIVANT

Pour cela, elle repose sur deux règles fondamentales, stipulant que tous les êtres vivants:

- .....
- .....

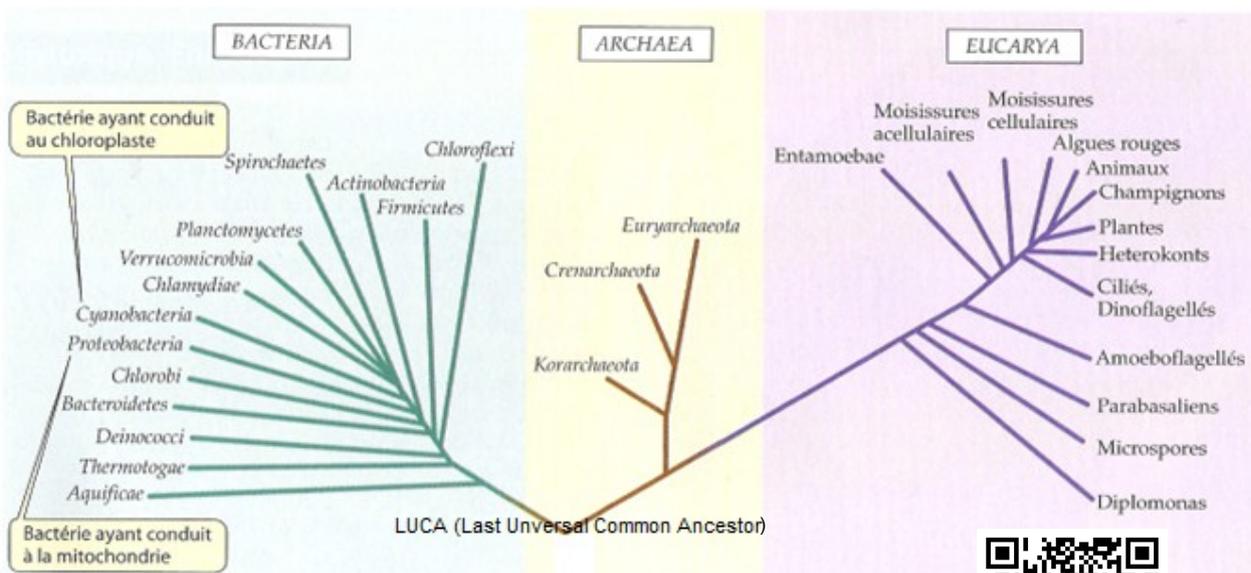
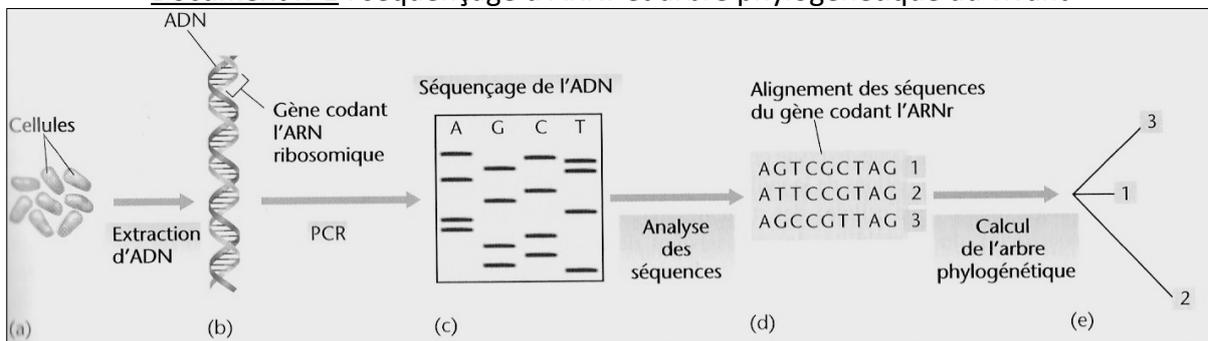
Ce sont des arbres schématiques qui montrent uniquement les relations entre les entités vivantes. Chacun des nœuds de l'arbre représente l'ancêtre commun hypothétique d'un groupe donné.

L'ARN de la petite sous-unité du ribosome, l'ARNr 16S chez les procaryotes ou l'ARNr 18S chez les eucaryotes, est considérée comme un marqueur de référence en phylogénie moléculaire.

En effet, ce marqueur :

- .....
- .....

Document n°1 : séquençage d'ARNr et arbre phylogénétique du vivant



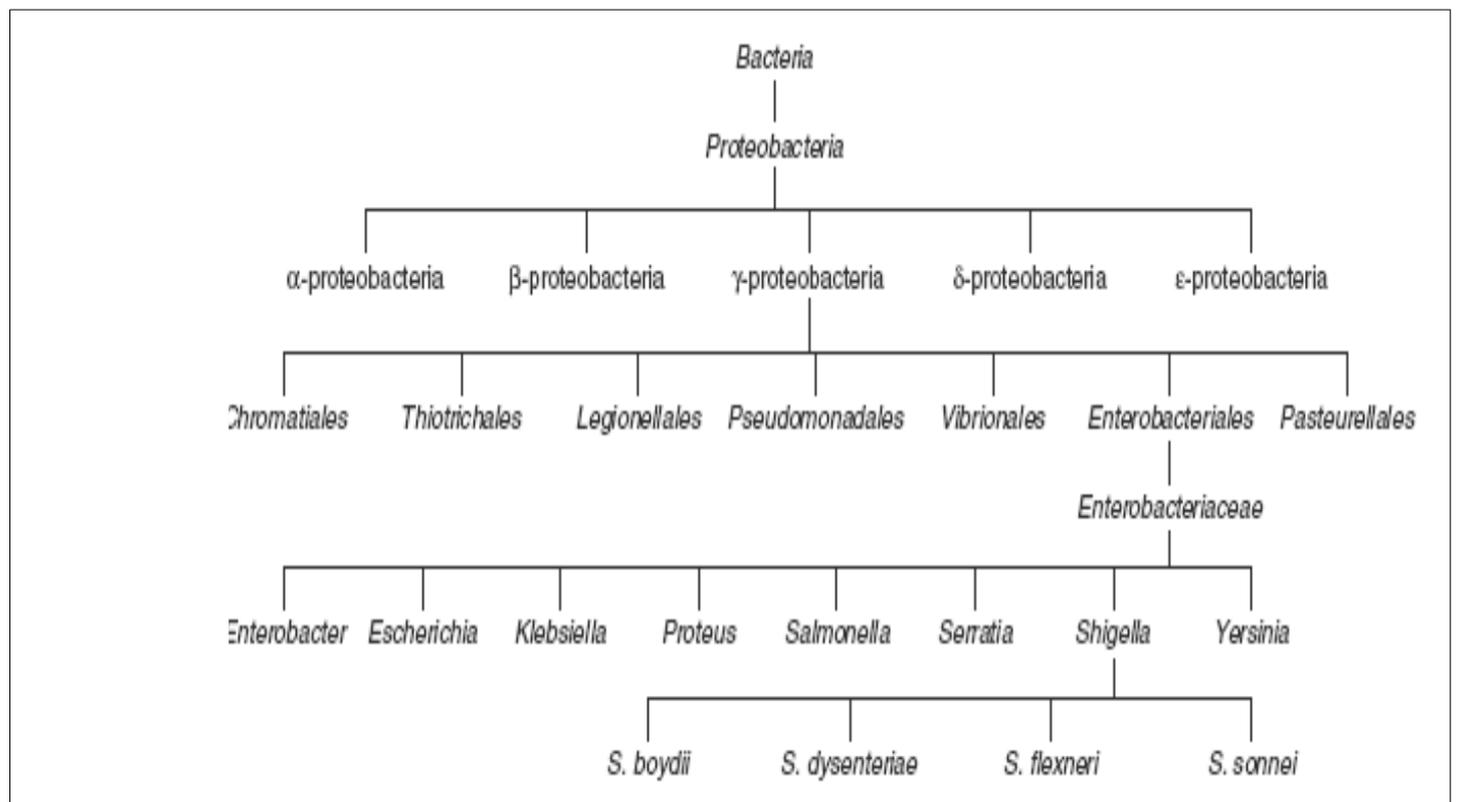
<http://lifemap.univ-lyon1.fr/explore.html#>



Document n°2 : tableau comparatif entre les trois domaines du vivant

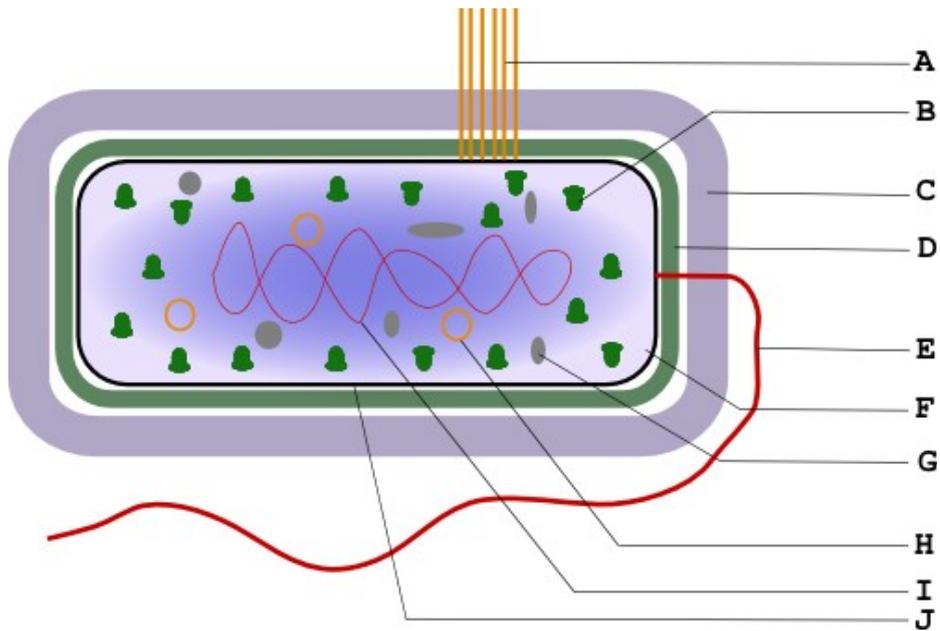
	<i>Procaryotes</i>		<i>Eucaryotes</i>
	<i>Bacteries</i>	<i>Archées</i>	
Enveloppe nucléaire			
Organite			
Paroi cellulaire en peptidoglycane			
Lipide membranaire			
Taille des ribosomes			

Document n°3 : les différents niveaux d'organisation de la classification phylogénétique



### 3. ULTRASTRUCTURE DES MICRO-ORGANISMES PROCARYOTES ET EUCARYOTES

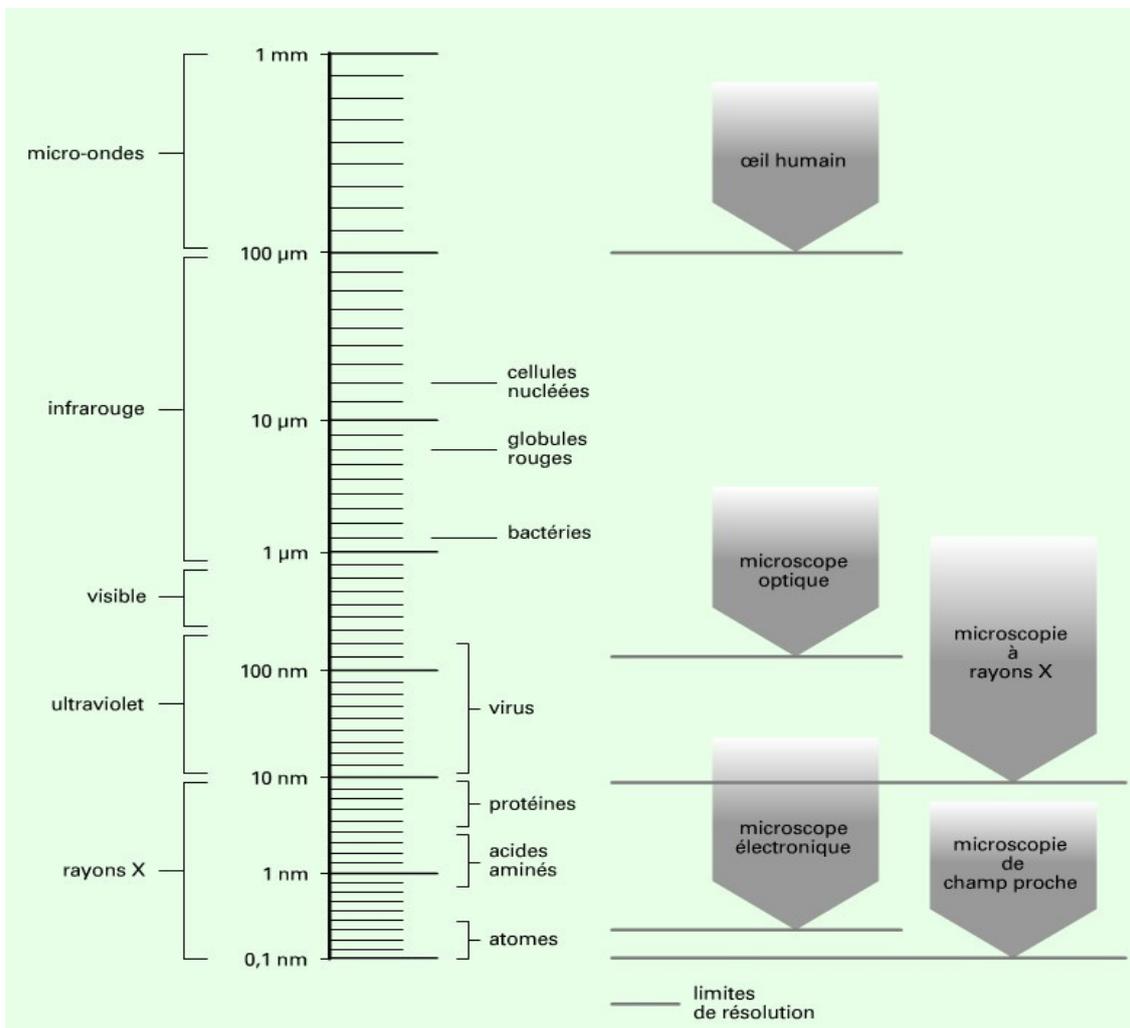
Document n°4 : ultrastructure simplifiée d'un micro-organisme procaryote (bacille)



Document n°5 : Ultrastructure simplifiée d'une cellule eucaryote (levure)

## 4. TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

Document n°6 : échelle de taille et microscopie



### 4.1. MICROSCOPIE OPTIQUE, OU PHOTONIQUE

#### 4.1.1. PRINCIPE GÉNÉRAL

.....

.....

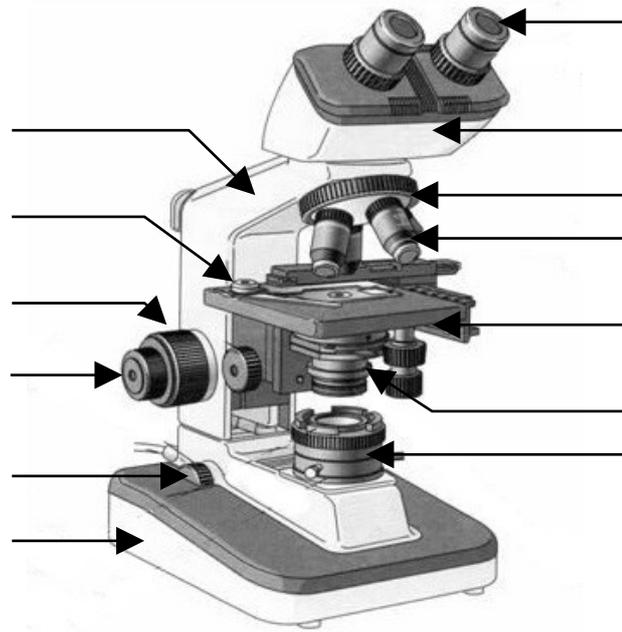
.....

.....

.....

.....

.....

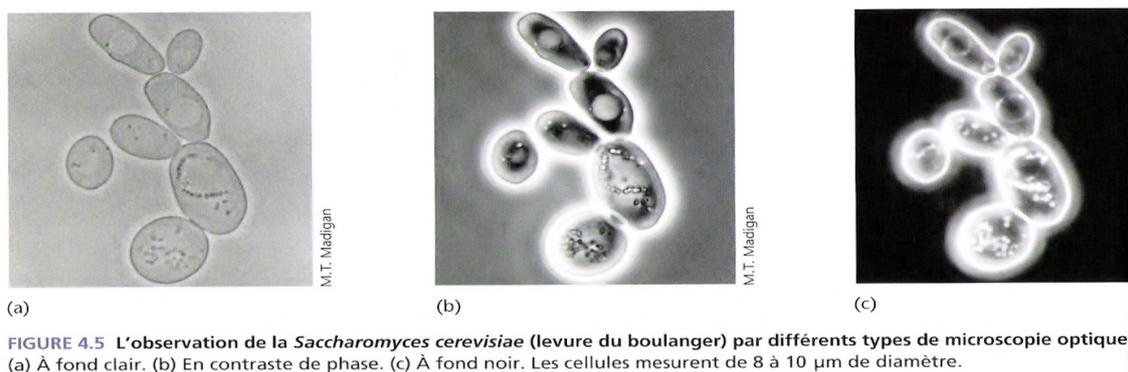
Document n°7 : schéma d'un microscope photonique

#### 4.1.2. MICROSCOPIE À CONTRASTE DE PHASE, À FOND NOIR ET À ÉPIFLUORESCENCE

Ces techniques n'augmentent pas le pouvoir séparateur mais la **visibilité** des éléments :

- Il existe une différence entre l'indice de réfraction des cellules et celle du milieu aqueux. Le microscope à **contraste de phase** amplifie cette différence et la convertit en différence de contraste. Le résultat est un **objet réfringent (lumineux) sur un fond foncé**.
- Dans la **microscopie à fond noir**, le spécimen est **éclairé uniquement par les côtés**. Les seuls rayons qui atteignent l'objectif sont ceux ayant été diffusés par l'échantillon, lequel apparaît **lumineux sur fond noir**.
- Le **microscope à épifluorescence** permet l'observation de spécimen émettant un rayonnement lumineux (fluorescent) après excitation lumineuse avec une lumière de longueur d'onde inférieure. Il est utilisé pour observation de substances naturellement fluorescentes (**autofluorescence**) telle la chlorophylle, ou de cellules traitées par un **fluorochrome**.

#### Document n°8 : Observation de *Saccharomyces cerevisiae* par différents types de microscopie optiques



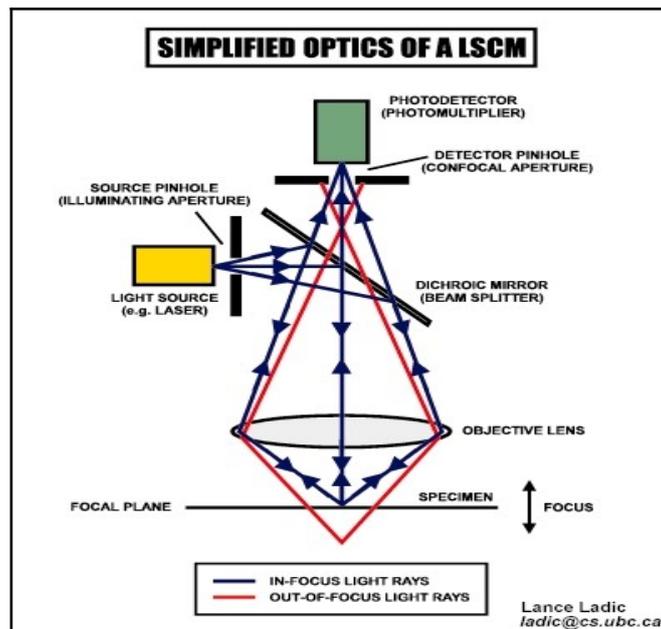
**FIGURE 4.5** L'observation de la *Saccharomyces cerevisiae* (levure du boulanger) par différents types de microscopie optique. (a) À fond clair. (b) En contraste de phase. (c) À fond noir. Les cellules mesurent de 8 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre.

### 4.1.3. MICROSCOPIE CONFOCALE À BALAYAGE LASER

La microscopie confocale est une technique de microscopie numérique où une **source laser** est couplée à un microscope optique.

Elle génère des images en **trois dimensions** après reconstruction par un ordinateur. Son principe est de pratiquer des **coupes optiques virtuelles** dans l'objet observé.

Document n°9 : Principe du microscope confocal à balayage LASER



Un rayon laser est dirigé grâce à un miroir vers l'échantillon.

Grâce à un diaphragme (pinhole) le plan focal de ce rayon laser est ajusté à un niveau de profondeur donné de l'échantillon.

Par ailleurs, un second diaphragme permet d'éliminer la lumière provenant des autres plans focaux. On peut ainsi observer l'échantillon à **différents niveaux de coupe**.

On utilise fréquemment des **fluorochromes** pour marquer l'échantillon.

La microscopie confocale est très utilisée en **écologie microbienne** (exploration des biofilms, identification des bactéries présentes dans un habitat donné).

Document n°10 : observations d'un grain de pollen en microscopie confocale à balayage LASER

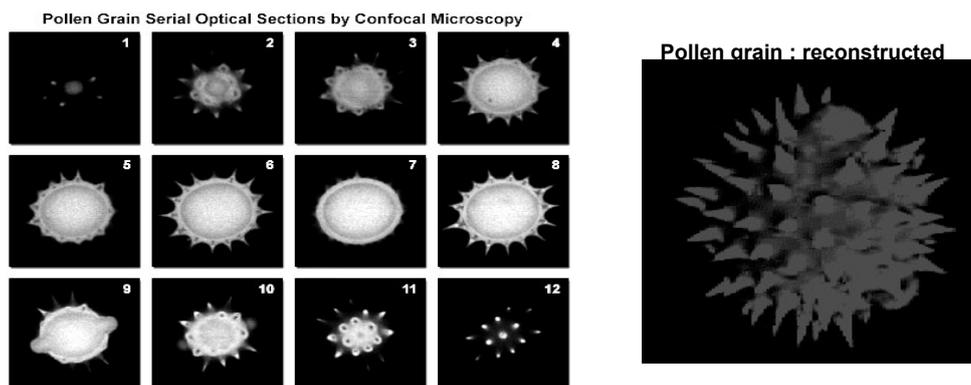
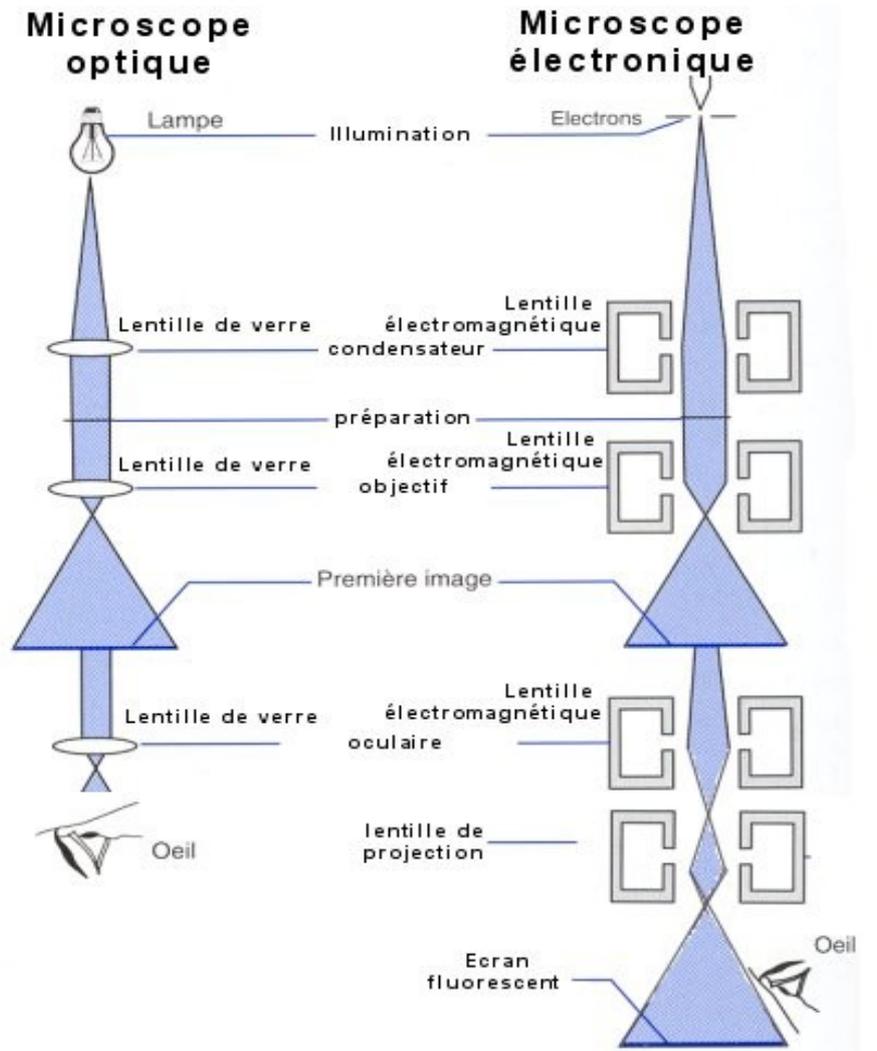


Figure 6

## 4.2. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION (MET)

Document n°11 : comparaison entre microscope optique et microscope électronique à transmission



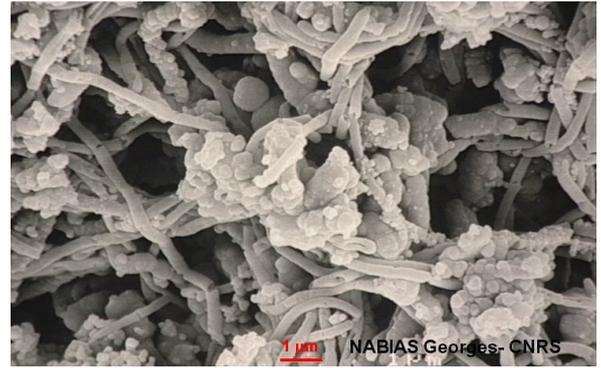
Le remplacement des photons par les électrons permet de **gagner en résolution** car la longueur d'onde d'un faisceau d'électrons est beaucoup plus petite que celle de la lumière.

Les électrons ayant un faible pouvoir de pénétration, on doit donc pratiquer des **coupes extrêmement fines** ( $0,2 \mu\text{m}$ ), ce qui impose d'**inclure les échantillons dans des résines**.

De plus, un faisceau d'électron ne se propage pas dans l'air : le dispositif doit donc **fonctionner sous vide**, ce qui implique qu'on ne peut observer que des **préparations non vivantes**.

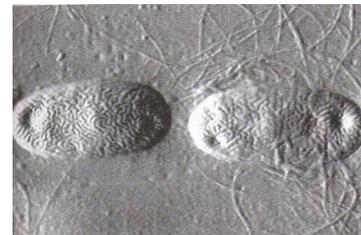
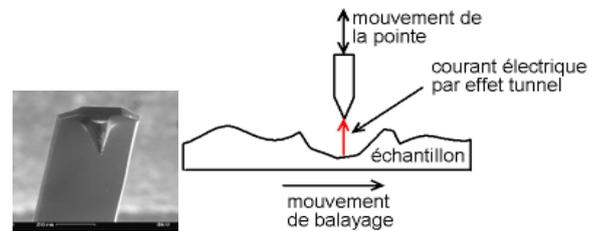
### 4.3. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE (MEB)

Un faisceau d'électrons balaye la surface de l'objet à examiner. Ce dernier est, recouvert d'un fin dépôt métallique, pour le rendre opaque aux électrons. Dans le cas du MEB par réflexion, ce sont les électrons renvoyés par l'objet qui sont analysés, par des cellules sensibles reliées à un système de visualisation. On obtient alors une image tridimensionnelle sur l'écran. Le microscope électronique à balayage permet un grossissement moins important que le MET : 300 000 fois au maximum, mais il apporte l'exploration tridimensionnelle de la surface.



### 4.4. MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE

Elle utilise une sonde métallique ultra pointue qui est positionnée très proche de l'échantillon. Des forces d'interaction atomiques s'établissent entre la pointe et l'échantillon ; elles dépendent de la distance qui les sépare. La sonde réalise un balayage de l'échantillon tel que les forces d'interaction soient maintenues constantes. On enregistre en continu la distance sonde - échantillon. Un traitement par ordinateur permet de reconstruire l'image tridimensionnelle de la surface du spécimen. Elle présente l'avantage de n'employer aucun enduit ou fixateur : elle permet l'observation de spécimen à l'état frais, ce qui est impossible en microscopie électronique.



## 5. LES COLORATIONS : UN MOYEN D'AUGMENTER LE CONTRASTE

### 5.1. L'OBSERVATION VITALE

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ces colorants sont peu toxiques mais finissent par tuer la cellule si le temps d'exposition est prolongé. De même, le flux lumineux du microscope provoque un échauffement de la préparation, donc l'observation est limitée dans le temps.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## 5.2. L'OBSERVATION DE CELLULES FIXÉES

.....

Les **colorants** sont des **composés organiques** présentant une affinité particulière pour certains constituants cellulaires.

Ceux qu'on utilise en microbiologie sont le plus souvent des **colorants basiques** (chargés positivement) qui s'associent aux constituants cellulaires chargés négativement (acides nucléiques, acides polysaccharidiques).

Exemples : cristal violet, safranine, fuschine.

.....

.....

.....

Exemple n°1 : Coloration de Gram

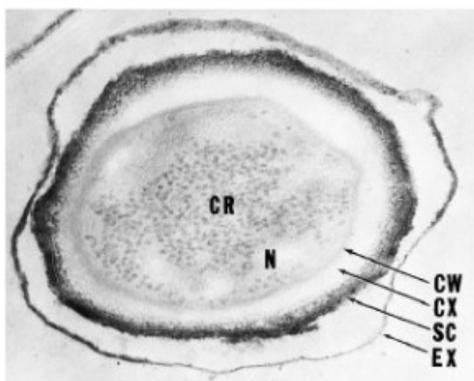
1. **Coloration primaire** : recouvrir la lame de violet gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet.
2. **Mordantage** : recouvrir de lugol. Permet de renforcer la coloration primaire.
3. **Différenciation** : à l'alcool pendant quelques secondes à l'alcool. Les bactéries Gram + restent violettes, les bactéries Gram – sont décolorées.
4. **Contre-coloration** : recouvrir la lame de fuschine ou safranine. Les bactéries Gram + restent violettes, les bactéries Gram – deviennent roses.

Document n°12 : Étapes de la coloration de Gram

Bactéries Gram + :	Bactéries Gram – :

Exemple n°2 : Coloration de spores

1. Recouvrir la lame de vert de malachite et chauffer pendant 10 minutes.
2. Rincer à l'eau.
3. Recouvrir la lame de fuschine pendant 1 minute.



**Figure 3.41 Endospore Structure.** *Bacillus anthracis* endospore ( $\times 151,000$ ). Note the following structures: exosporium, EX; spore coat, SC; cortex, CX; core wall, CW; and the protoplast or core with its nucleoid, N, and ribosomes, CR.

Document n°13 : Tableau récapitulatif de la microscopie

	Microscopie photonique (fond clair, contraste de phase, fond noir)	Microscopie électronique (MET, MEB)
Source du faisceau		
Grossissement		
Pouvoir séparateur		
Épaisseur de la préparation		
Observation de cellules vivantes		
Observation de cellules mortes		
Coloration		