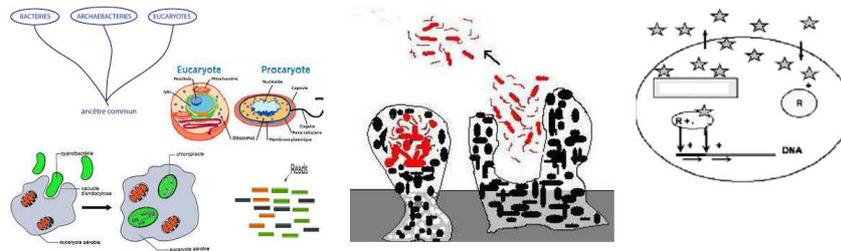


République Algérienne Démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة احمد بوقرة_ بومرداس
Université M'Hamed Bougara de Boumerdes
Faculté des Sciences
Département de Biologie



POLYCOPIE PEDAGOGIQUE



Cours de : Evolution et Biodiversité des Micro-organismes

Cours destiné aux étudiants Master 1
Biotechnologie Microbienne

Présenté par le Docteur : LAGHA-BENAMROUCHE SAMIRA

Année universitaire 2021/2022

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : CLASSIFICATION MODERNE DES MICRO-ORGANISMES	3
I. Classification du monde vivant	3
II. Classification de Bergey (classification des procaryotes)	3
III. Principaux phyla bactériens et archéens	7
III. 1. Phylum <i>Proteobacteria</i>	7
III.1.1. Classe des α - <i>Proteobacteria</i>	7
III.1.2. Classe des β - <i>Proteobacteria</i>	8
III.1.3. Classe des γ - <i>Proteobacteria</i>	10
III.1.4. Classe des δ - <i>Proteobacteria</i>	10
III.1.5. Classe des ε - <i>Proteobacteria</i>	10
III. 2. Phyla d' <i>Archaea</i>	11
III.2.1. <i>Crenarchaeota</i>	13
III.2.2. <i>Euryarchaeota</i>	13
III.2.3. <i>Nanoarchaeota</i> et <i>Korarchaeota</i>	15
III.2.4. <i>Thaumarchaeota</i>	15
IV. Structure cellulaire et évolution.....	16
IV.1. Cellules eucaryotes	16
IV.2. Cellules procaryotes.....	16
IV.3. Virus.....	17
V. Origine des mitochondries et chloroplastes	17
V.1. Arguments structuraux	18
V.2. Arguments fonctionnels	19
V.3. Arguments génétiques	19
VI. Endosymbiose primaire et secondaire	19
CHAPITRE II : ORIGINE DE LA VIE ET L'ARBRE UNIVERSEL DU VIVANT	22
I. LUCA et les trois domaines du vivant.....	22

II. LUCA et la racine de l'arbre du vivant	24
CHAPITRE III : ROLE DES VIRUS AU COURS DE L'EVOLUTION DES MICROORGANISMES (VIRUS DE PROCARYOTES)	28
I. Définition	28
II. Anatomie générale des particules virales	28
III. Origine des virus	29
III.1. Origine des virus à ADN.....	30
III.2. Origine des cellules à ADN	30
IV. Classification des virus procaryotes	31
V. Cycle de vie des bactériophages	33
VI. Spécificité d'hôte des virus.....	35
VII. Transferts génétiques.....	35
VIII. Intérêt d'étude des virus de procaryotes	35
VIII.1. Pour un enjeu en biodiversité.....	35
VIII.2. Pour un enjeu en biotechnologie moléculaire.....	35
VIII.3. Pour un enjeu en thérapeutique.....	37
CHAPITRE IV : ECOLOGIE MOLECULAIRE MICROBIENNE	39
I. Génomique et méta-génomique.....	39
II. Types d'analyse des données métagénomiques	41
III. Approches de la méta-génomique.....	41

III.1. Métagénomique ciblée	41
III.2. Métagénomique globale	44
IV. Limites de la métagénomique	46
CHAPITRE V : INTERACTION ENTRE LES MICROORGANISMES ET L'ENVIRONNEMENT	47
I. Différentes réponses au stress cellulaire	48
I.1. Chimiotactisme et mobilité	48
I.2. Sporulation	50
I.2.1. Différentes phases de sporulation	51
I.2.2. Germination des spores	53
I.2. 2. 1. Activation	53
I.2. 2. 2. Initiation	53
I.2. 2. 3. Emergence	53
I.2.3. Propriétés de la spore	53
I.3. Production des facteurs de virulence	53
I.3.1. Phénomène d'adhésion	53
I.3.2. La capsule	54
I.4. Biofilm	54
I.5. Etat de VNC	54
II. Quorum Sensing.....	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58

AVANT PROPOS

Le contenu de cette matière s'adresse aux étudiants de niveau master 1 Biotechnologie microbienne. Ce document permet aux étudiants d'acquérir des connaissances sur la révolution Woésienne, l'origine de la vie et l'arbre universel du vivant, le rôle des virus dans l'évolution des microorganismes et la diversité intra spécifique des microorganismes et des mécanismes impliqués dans leur évolution. Ce document permet aux étudiants également de comprendre les adaptations évolutives des microorganismes face aux changements environnementaux et le rôle de la génomique environnementale dans l'étude de la biodiversité microbienne. Des connaissances en microbiologie générale, en écologie microbienne et en biologie moléculaire est un préalable indispensable pour le discernement de la biodiversité microbienne.

INTRODUCTION

Le terme « biodiversité » ou « diversité biologique » comprend toute forme de vie sur terre et recouvre aussi tous les liens qui unissent les êtres vivants à leur milieu et entre eux et exprime ainsi la variété de la vie dans un écosystème.

L'histoire de la terre remonte à la nuit des temps. On ne sait pas dire avec certitude quand la vie est apparue sur terre ni où est comment. Les plus anciens micro-organismes fossiles sont datés d'au moins 3,5 à 3,8 milliards d'années. La publication de l'arbre universel du vivant par Woese à la fin des années soixante-dix a bouleversé notre vision du monde vivant par l'abolition de la dichotomie eucaryote/procaryote au profit d'une vision tripartite (Bacteria, Archaea, Eucarya) ou encore par la prise de conscience de la place importante occupée par les microorganismes. Elle a aussi ouvert un champ de recherche centré autour du dernier ancêtre commun à tous les organismes, appelé LUCA (Last Universal Common Ancestor). L'acronyme LUCA est l'organisme dont sont issus les trois lignées cellulaires, est donc, l'ensemble des espèces vivant actuellement sur terre. Les trois domaines pourraient avoir divergé d'un ancêtre commun ou d'une communauté d'organismes au début de l'apparition de la vie sur la Terre. Ceci implique que : tous les êtres vivants sont apparentés à des degrés plus ou moins variés. Les différences observées entre organismes actuels reflètent une évolution qui a suivi des chemins différents dans les différentes lignées.

Les virus ne sont pas simplement des pathogènes dangereux mais des acteurs essentiels de l'histoire du vivant. Ils auraient permis et accéléré l'évolution des organismes vivants. La plupart des évolutionnistes spécialistes des origines de la vie pensent que la complexité de l'ADN rend l'apparition spontanée de cette molécule hautement improbable. Il paraît plus probable que l'ADN soit apparu par l'évolution d'une molécule plus simple (ARN). Plusieurs scénarios ont été proposés, le plus convaincant est la coexistence dans une même cellule d'un génome à ARN ancestral et d'un plasmide à ADN d'origine viral. Ce dernier, a pris le contrôle de la cellule hôte et a permis la construction d'un chromosome cellulaire à ADN par rétro transcription de l'ancien génome cellulaire à ARN. De cette hypothèse, tous les êtres vivants cellulaires actuels seraient les descendants d'un ou de plusieurs virus à ADN qui auraient pris le contrôle des cellules à ARN

Les micro-organismes participent pour une très large part à l'équilibre biologique existant sur la surface de la terre. Ils colonisent en effet tous les écosystèmes (eau, air, sol, aliment...etc.) et sont à l'origine de transformations chimiques fondamentales lors des processus biogéochimiques responsables du cycle des éléments naturels. Ces communautés microbiennes sont généralement composées d'organismes cultivables qui représentent 1% et des organismes non cultivables, soit qu'ils ne sont pas ciblés par les conditions de culture car non connus, soit qu'ils résistent aux tentatives de culture. La génomique environnementale ou génomique des communautés ou métagénomique est une approche qui caractérise la diversité génétique par l'analyse en haut débit des ADN et renseigne sur la diversité et l'abondance relative des microorganismes présents.

Les contraintes environnementales rencontrées par les différentes populations d'une même espèce influencent la survie et/ou la reproduction des individus. Un micro-organisme survit et se développe lorsqu'il se trouve dans un état d'équilibre dynamique caractérisé par un cycle d'échanges avec le milieu extérieur. Une perturbation chimique ou physique survenant dans son environnement proche peut induire un éloignement de cet équilibre qui se traduit par un stress cellulaire. Les micro-organismes présentent des capacités d'adaptation remarquables à certains stress physico-chimiques rencontrés dans leur environnement. Le déclenchement de mécanismes cellulaires complexes génère une réponse adaptative de la bactérie qui aboutit à un état de tolérance et par conséquent à une survie dans des conditions qui sont normalement létales.

Ce document s'articule autour de cinq chapitres ; des notions de cours et de nombreux schémas : tout dont il est nécessaire pour comprendre l'évolution et la biodiversité microbienne. Le premier chapitre décrit les différents domaines (*Archaea*, *Bactérie*, *Eukarya*), les principaux phyla bactériens et archéens et l'évolution des cellules primitives. Le deuxième chapitre évoque des hypothèses sur l'origine de la vie et l'arbre universel du vivant. Le troisième chapitre traite le rôle des virus dans l'évolution des organismes vivants et l'origine des cellules à ADN. Le quatrième chapitre s'intéresse à l'écologie moléculaire microbienne, le problème des microorganismes non encore cultivés et l'intérêt de la génomique environnementale dans l'étude de la diversité et l'abondance relative des microorganismes dans l'environnement. Le dernier chapitre est consacré à l'interaction entre les microorganismes et l'environnement et les réponses adaptatives des bactéries pour résister au stress cellulaire.

Chapitre I : Classification moderne des micro-organismes

I. Classification du monde vivant

Le botaniste suédois **Carl van Linné (1735)**, élaborera une première classification des organismes vivants en deux règnes Végétal et Animal. En **1857**, **Karl van Nägeli** proposa de classer les bactéries et les champignons dans le règne des végétaux. En **1866**, **E. Haeckel** divise le monde vivant en trois règnes, le règne animal, le règne végétal et le règne des protistes (micro-organismes) qui rassemble les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries. En **1937** et grâce à l'invention du microscope électronique, **Edward Chatton** mis en opposition deux types de cellules, la cellule eucaryote et la cellule procaryote. En **1968**, **R.G.E. Murray**, dans la continuité du travail d'E. Chatton, divise le monde vivant en deux règnes, celui des "*Eucaryotae*" et celui des "*Procaryotae*" (ou "*Monera*"). En **1969**, **Robert H. Whittaker** décrit une classification à cinq règnes. Quatre règnes eucaryotes (Animal, Végétal, Champignons et Protistes). Les procaryotes se regroupent dans le règne des monères. **CR, Woese (1978)** grâce au développement des techniques de biologie moléculaire, il a divisé les organismes vivants en trois domaines. Le domaine des *Bacteria* ou Eubacteria, le domaine des *Archaea* et le domaine des *Eucarya* (animaux, plantes, les mycètes et les protistes) (Fig.1).

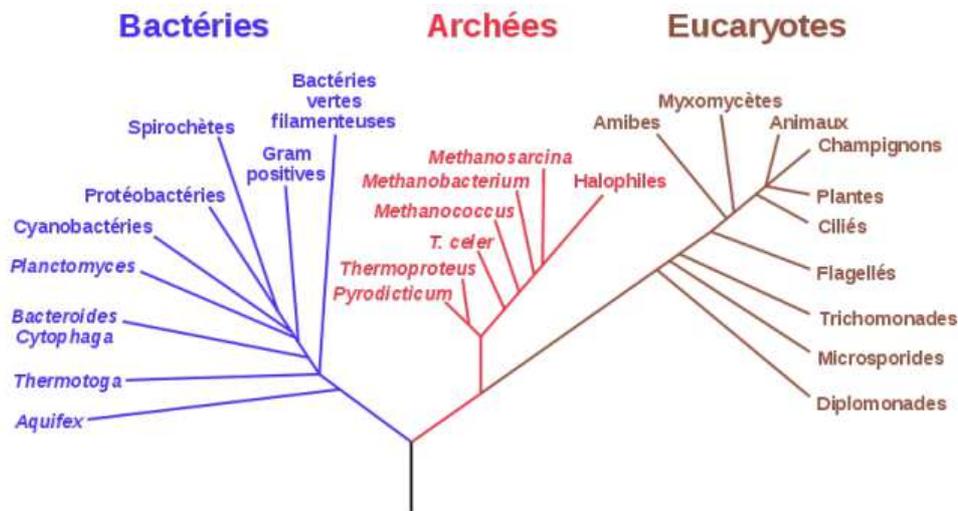


Fig.1 : classement des êtres vivants en trois domaines : Archae, Bacteria et Eucarya

II. Classification de Bergey (classification des procaryotes)

Dans ces premières éditions, en 1936, la classification de Bergey se basait sur l'étude : morphologies microscopique et macroscopique, mobilité, présence de spores, Gram,

température de croissance, type respiratoire, besoins nutritionnels et capacités à utiliser certaines sources de carbone ou d'azote. A cette période, les procaryotes étaient répartis en 4 divisions reconnues sur la base de l'existence ou non de la paroi : les *Gracilicutes*, les *Firmicutes*, les *Tenericutes* et les *Mondosicutes*

II.1. Division 1. Gracilicutes (Graciliscutis : peau fine) : ces bactéries ont une paroi de type Gram négatif comprenant une double membrane externe et interne, une fine couche de peptidoglycane et d'autres constituants situés au périphérique de la membrane externe ou dans l'espace périplasmique situés entre les deux membranes. La forme des cellules est très variée, sphérique, ovoïde, en bâtonnet droit ou incurvé, hélicoïdale ou filamenteuse, autres sont enfermées dans une gaine (ou trichome) ou enchâssées dans une capsule. Leur mode de reproduction habituelle est la scissiparité mais certaines se reproduisent par bourgeonnement et pour le groupe rare des *Pleurocapsales* par fission multiple ou éclatement. Des corps fructifiants et des mycospores sont produits par les *Myxobacterales*. Toutes ces bactéries peuvent être mobiles par nagé ou par glissement ou immobiles. Les membres de la division peuvent être phototrophes ou non. Les premiers rentrent dans les deux classes des *Anoxyphotobacteria* qui effectuent la photosynthèse en anaérobiose (bactéries phototrophes) et des *Oxyphotobacteria* qui effectuent la photosynthèse en aérobie. Les seconds constituent la classe des *Scotobacteria*. Les espèces peuvent être aérobies, anaérobies strictes ou anaérobies facultatives. Certains sont des parasites intracellulaires obligatoires.

II.2. Division 2. Firmicutes (Firmus : dure) : ce sont des procaryotes à paroi de type Gram positif. Les cellules peuvent être sphériques, bâtonnets ou filamenteuses, les formes filamenteuses et bacillaires portent quelque fois des ramifications vraies. La reproduction habituelle est la scissiparité. Ces bactéries sont chimiotrophes (chimioorganotrophes), aérobies strictes, anaérobies strictes ou facultatives ou microaérophiles. La division comprend des bactéries sporogènes (endospores ou spores sur hyphes) ou asporogènes, les Actinomycètes et les formes apparentées en font partie. Ces bactéries ne sont pas photosynthétiques.

II.3. Division 3. Tenericutes : ce sont des procaryotes sans paroi, incapable de synthétiser les précurseurs de peptidoglycane, ils sont entourés d'une membrane unitaire, la membrane cytoplasmique. On les appelle plus communément les Mycoplasmes. Les cellules sont très polymorphes, allant de la vésicule de grande taille, déformable, jusqu'à l'élément filtrant, très petit (0,2 μm), en passant par les formes filamenteuses et/ou par scissiparité. Elles sont immobiles ou rarement mobiles par glissement. Il n'existe pas de forme de repos. La coloration de Gram est négatif, ces bactéries exigent des milieux complexes pour leur

croissance et au cours de cette croissance, elles ont une tendance à pénétrer dans les milieux solides pour former des colonies caractéristiques dites en « œuf fris ». Les espèces peuvent être différenciées sur la base de leur exigence ou non en cholestérol et en acides gras à longue chaîne. Le contenu en G+C de l'ARN est de 43 à 48% c'est-à-dire plus bas que celui des Gracilicutes et des Firmicutes (50-54%). Le pourcentage de G+C de l'ADN est aussi très bas (23-46%). Tous les Mycoplasmes sont résistants aux β lactamines. Ils peuvent être saprophytes, parasites ou pathogènes.

II.4. Division 4. Mendosicutes (Mendosus : peau défectueuse) : ce sont des bactéries qui prédominent dans les environnements terrestres et aquatiques tels que les milieux anaérobies, hypersalins, les sources chaudes hydrothermales et géothermales, aussi, certaines vivent en symbiose dans le tractus intestinal des animaux. Elles peuvent être mésophiles ou thermophiles. Ces bactéries ont une origine phylogénétique lointaine, antérieure à celle des Gracilicutes et des Firmicutes, proche des formes ancestrales. La plupart ont une paroi inhabituelle sans acide muramique, dans certains cas celle-ci est uniquement protéique ou polysaccharidique, dans d'autres cas elle est totalement absente. Leur morphologie est variée, comprenant des cocci, des bâtonnets, des filaments et des éléments irréguliers proches des Mycoplasmes, certaines sont polymorphes. Ils sont Gram positif ou Gram négatif, des endospores ou des formes de repos n'ont jamais été observées. La plupart sont des anaérobies stricts mais quelques-unes sont aérobies. Certaines sont mobiles et portent des flagelles. Les représentants de cette division ont des habitats et des métabolismes très divers. Ils rassemblent les bactéries du méthane, les bactéries halophiles et les thermoacidophiles qui vivent dans des environnements extrêmes. Il n'existe qu'une seule classe celle des Archaéobacteria.

Dans l'édition récente, moderne avec l'utilisation de la classification polyphasique : les procaryotes sont divisés en deux domaines *Eubacteria* et *Archaeobacteria* qui comprennent 35 phylums. 30 pour *Eubacteria* et 5 pour *Archaeobacteria* (Tableaux I et II). Cette classification est la plus acceptée par tous les microbiologistes.

Tableau I: Division des procaryotes

Domaines	2	<i>Archaea</i>	<i>Eubacteria</i>
Phylums	35	5	30
Classes	57	9	48
Sous-Classes	6	0	6
Ordres	119	15	104
Sous-ordres	20	0	20
Familles	292	26	266
Genres	2100 environ	108	2000 environ
Espèces	7300 environ	250 environ	7000 environ
Sous-espèces	500 environ	0	500 environ

Tableau II: Les 35 phylums des procaryotes et quelques classes et sous classes

Domaine Archaea	Domaine Eubacteria (I-XIII)	Domaine Eubacteria (XIV-XXII)	Domaine Eubacteria (XXIII-XXX)
AI. Crenarchaeota	BI. Aquificae	BXIV. Firmicutes	BXXIII. Fusobacteria
AII. Euryarchaeota	BII. Thermotogae	CI. Clostridia	BXXIV. Verrucomicrobia
AIII. Korarchaeota	BIII. Thermodesulfobacteria	CII. Negativicutes	BXXV. Gemmatimonadetes
AIV. Nanoarchaeota	BIV. Deinococcus-Thermus	CIII. Bacilli	BXXVI. Lentisphaerae
AV. Thaumarchaeota	BV. Chrysiogenetes	CIV. Thermolithobacteria	BXXVII. Dictyoglomi
	BVI. Chloroflexi	CV. Erysipelotrichi	BXXVIII. Caldiseica
	BVII. Thermomicrobia	BXV. Tenericutes	BXXIX. Elusimicrobia
	BVIII. Nitrospirae	BXVI. Actinobacteria	BXXX. Armatimonadetes
	BIX. Deferribacteres	SCI. Acidimicrobiae	
	BX. Synergistetes	SCII. Rubrobacteridae	
	BXI. Cyanobacteria	SCIII. Coriobacteridae	
	BXII. Chlorobi	SCIV. Actinobacteridae	
	BXIII. Proteobacteria	SCV. Nitriliruptoridae	
	CI. Alpha-Proteobacteria	BXVII. Planctomycetes	
	CII. Beta-Proteobacteria	BXVIII. Chlamydiae	
	CIII. Gamma-Proteobacteria	BXIX. Spirochaetes	
	CIV. Delta-Proteobacteria	BXX. Fibrobacteres	
	CV. Epsilon-Proteobacteria	BXXI. Acidobacteria	
	CVI. Zeta-Proteobacteria	BXXII. Bacteroidetes	
		CI. Bacteroidetes	
		CII. Flavobacteria	
		CIII. Sphingobacteriia	
		CIV. Cytophagia	

III. Principaux phyla bactériens et archéens

III. 1. Phylum *Proteobacteria*

Très grand groupe qui contient 5 classes (α , β , γ , δ , ϵ), 45 ordres, et plus de 500 genres. Certaines bactéries associées à ce groupe sont également appelées bactéries pourpres. Ce sont des bactéries Gram-négatives, de morphologies variées : de bâtonnets et coques simples à des prosthèques, bourgeons et même des fructifications. Ils comprennent une grande variété d'agents pathogènes tels que *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Helicobacter*,...etc. et comprennent la plupart des bactéries responsables de la fixation de l'azote. La plupart des protéobactéries sont mobiles grâce à un flagelle, mais d'autres peuvent être immobiles ou se déplacer par glissement (exp. *Myxobacteria*). La plupart sont hétérotrophes mais certaines protéobactéries, les bactéries pourpres, sont autotrophes et photosynthétiques. On trouve les bactéries photosynthétiques pourpres dans les classes de protéobactéries α , β et γ .

III.1.1. Classe des α -*Proteobacteria* : contient deux groupes fonctionnels importants:

- Les bactéries pourpres non sulfureuses.
- Les bactéries nitrifiantes.

La classe des α -*Proteobacteria* inclue la plupart des protéobactéries oligotrophes (celles qui sont capable de croître avec peu de nourriture). Certaines ont un métabolisme inhabituel comme la méthylotrophie et la capacité de fixer l'azote. De nombreux genres se caractérisent par des caractères morphologiques distinctifs et inhabituels, comme les tiges et les bourgeons. Ils comprennent des bactéries importantes en agriculture capables d'induire la fixation d'azote en symbiose avec les plantes Exp. *Rhizobium*. Cette classe contient également plusieurs agents pathogènes, Exp. *Rickettsia typhi* (pathogènes pour les animaux domestiques) et *Agrobacterium tumefaciens* (maladie de la galle chez les plantes: transforme les cellules végétales en cellules tumorales).

III.1.1.1. Bactéries pourpres non sulfureuses

À l'exception de *Rhodocyclus* (**Classe β -*Proteobacteria***), les bactéries pourpres non sulfureuses sont placées parmi les α -*Proteobacteria*.

- Morphologiquement très diverses.
- Elles se développent de façon anaérobie comme des photoorganohétérotrophes.

□ En absence de lumière, la plupart peuvent se développer de façon aérobie comme des chimioorganohétérotrophes mais certaines utilisent la fermentation et se développent de façon anaérobie.

□ Ces bactéries prédominent dans la vase, l'eau des lacs et des étangs où la matière organique est abondante et le niveau en sulfure faible; il existe aussi des espèces marines.

Exp. Ordre des *Rickettsiales* : Bactéries bacilliformes, coccoïdes, habituellement sans flagelles (immobile). Aérobie et parasites obligatoires. Les formes parasites se développent chez les vertébrés et peuvent également vivre chez des arthropodes suceurs de sang, tels que des puces, tiques, mites ou poux.

Exp. Ordre de *Caulobacteriales* : Forme prosthèque : extension de la cellule incluant la membrane plasmique et la paroi cellulaire et mobile. Aérobie, hétérotrophe et oligotrophe.

Exp. Ordre de *Rhizobiales* : Bâtonnets mobiles, se transforment en bactéries symbiotiques fixatrices d'azote dans les cellules des nodules racinaires des légumineuses.

Exp. Ordre de *Rhodospirillum* : forme spirale et mobile, photo hétérotrophe, aérobie, anaérobie et micro aérophile

III.1.1.2. Bactéries nitrifiantes

□ Bactéries aérobie ne formant pas d'endospores.

□ Divisées en plusieurs taxons:

- Classe des **Alphaproteobacteria**; famille des Bradyrhizobiaceae ; **Exp.** genre *Nitrobacter*. (mobile, aérobie et chimioolithotrophe).
- Classe des **Betaproteobacteria**; famille des Nitrosomonadaceae ; **Exp.** genre *Nitrosomonas* et *Nitrospira*.
- Classe des **Gammaproteobacteria**; famille des Ectothiorhodospiraceae ; **Exp.** genre *Nitrococcus*, et famille des Chromatiaceae ; **Exp.** genre *Nitrosococcus*.

□ Nitrification : Conversion de l'ammoniac en nitrate par l'action combinée de deux genres: **Exp.** *Nitrosomonas* : ammoniac à nitrite. **Exp.** *Nitrobacter* : nitrite à nitrate. L'azote des nitrates est aisément utilisé par les plantes.

III.1.2. Classe des β -Proteobacteria

Cette classe a des modes communs avec les α -Proteobacteria, mais tendent souvent à utiliser des substances nutritives qui diffusent en dehors des zones de la décomposition anaérobie de la matière organique (de l'hydrogène gazeux, l'ammoniac, le méthane). Cette

classe se caractérise par une diversité métabolique considérable et elle contient plusieurs agents pathogènes pour l'homme. Cette classe comprend des bactéries chimiotrophes. On retrouve dans cette classe des bactéries **pourpre non sulfureuses** (genre *Rhodocyclus*), des bactéries **nitrifiantes** (Classe des **Betaproteobacteria**; famille des Nitrosomonadaceae ; **Exp.** genre *Nitrosomonas* et *Nitrosospira*) et des **bactéries sulfureuses incolores** (*Thiobacillus*).

Exp. Ordre des *Neisseriales* : Coques immobiles, aérobies, peuvent avoir des capsules et des fimbriae, chimio-organotrophes. Plusieurs espèces colonisent les muqueuses des

mammifères, certaines sont pathogènes pour l'humain: *Neisseria gonorrhoeae* provoque la gonorrhée et *Neisseria meningitidis* provoque la méningite.

Exp. Ordre de *Burkholderiales*, genre *Bordetella* : Coccibacilles, aérobies. Chimio-organotrophes, Métabolisme respiratoire. Requier du soufre organique et de l'azote (acides aminés) pour la croissance. Parasites des mammifères qui se multiplient dans les cellules de l'épithélium respiratoire. *Bordetella pertussis* cause la coqueluche.

Exp. Ordre de L'ordre des *Hydrogenophilales* Le genre *Thiobacillus*. Bactéries sulfureuses incolores. Chimiolithotrophes qui oxydent des composés soufrés. D'autres bactéries sulfureuses incolores sont classées parmi les **Gammaproteobacteria**. Retrouvées dans des habitats terrestres et aquatiques. Leur production d'acide sulfurique corrode les structures de bétons et les tuyaux. Peuvent accroître la fertilité des sols quand elles libèrent du soufre indisponible en l'oxydant en sulfate. Servent au traitement de minerais à faible teneur en métal, à cause de leur capacité d'extraire les métaux par lessivage des minerais.

III.1.3. Classe des γ -*Proteobacteria*

Les *Gammaproteobacteria* constituent le plus grand sous-groupe de *Proteobacteria*. On retrouve dans cette classe les bactéries **nitrifiantes** (famille des Ectothiorhodospiraceae ; **Exp.** genre *Nitrococcus*, et famille des Chromatiaceae ; **Exp.** genre *Nitrosococcus*), les **bactéries sulfureuses incolores**, les bactéries **pourpres sulfureuses** et d'autres bactéries : Enterobacterales, Pseudomonadales, Vibrionales ,...etc.

III.1.3.1. Bactéries pourpres sulfureuses

Placées dans l'ordre des *Chromatiales*. Divisées en deux familles, Chromatiaceae et Ectothiorhodospiraceae.

Anaérobies strictes, généralement photolithoautotrophes.

Elles oxydent le sulfure d'hydrogène en soufre et le dépose à l'intérieur de la cellule sous forme de granules de soufre.

- On les trouve dans les zones lacustres
- Peuvent former de vastes fleurs d'eau dans les marécages et les lagunes d'épuration.

III.1.3.2. Bactéries sulfureuses incolores

Parmi ces bactéries on retrouve l'ordre des *Thiotrichales*, Il :

- Contient plusieurs genres qui oxydent les composés soufrés
- D'un point de vue morphologique, on trouve des bâtonnets et des formes filamenteuses.
- Se développent dans des habitats riches en sulfure (Exp de sources sulfureuses, eau douce avec des plantes en décomposition, rivières, marais salants et sédiments marins.)

III.1.3.3. Ordre des *Vibrionales*

- Bâtonnets anaérobies facultatifs. Gram-
- € Mobiles, Oxydase+, Catalase+, Gaz-, indole -, H₂S-, Lactose-.
- La plupart sont aquatiques (eaux douces, mairies). On les retrouve également dans le ventre des mollusques, crabes et crustacés Exp. *V. parahaemolyticus*
- Certains sont des agents pathogènes importants. Exp. *Vibrio cholerae* : Cause le choléra.

III.1.3.4. Ordre des *Enterobacteriales*

- € Bâtonnets droits, mobiles à flagelles péritriches ou immobiles
- € Anaérobies facultatifs. Sont Oxydase-, Catalase+ à l'exception de *Shigella dysenteria*, Elles réduisent le nitrate en nitrite Exception pour *Erwinia*.
- € Absence de spores mais certaines peuvent présenter une capsule (Exp. *Klebsiella*)
- € Se développent aisément sur des milieux ordinaires
- € Chimio-organotrophes qui dégradent tous les sucres par la voie d'Embden-Meyerhof. Fermentent le glucose avec ou sans production de gaz. certaines sont lactose+ d'autres sont lactose -

III.1.4. Classe des *δ-Proteobacteria (deltaproteobacteria)*

- Chimio-organotrophes.
- Diversité morphologique (effilés hélicoïdale ou incurvée).
- € Ils sont aussi mobiles par flagelles et sont microaérophiles.

III.1.5. Classe des *ε-Proteobacteria (Epsilonproteobacteria)*

- € La plus petite classe de *Proteobacteria*.
- Bâtonnets minces qui peuvent être droits, incurvés ou hélicoïdaux.

Un exemple est *Helicobacter* qui a été identifié comme étant la cause la plus fréquente des ulcères peptiques chez l'homme et une cause de cancer de l'estomac.

III.2. Phyla d'Archaea

Les archaebactéries sont adaptées à la vie dans des conditions de vie extrêmes (forte salinité, haute température, faible pH, sans oxygène). Des conditions qui ressemblent à celles de la terre lors de l'apparition de la vie. On les retrouve fréquemment dans des habitats aquatiques et terrestres extrêmes (hypersalins, pH et/ou température élevés ou faibles). En fait, il existe beaucoup d'Archaea qui vivent dans des conditions plus «normales» tout autour de nous (les Archaea non cultivables du sol, des lacs et de l'océan), et même en nous (les méthanogènes de nos intestins). Leur température de croissance varie de psychrophiles à hyperthermophiles. Ils sont Gram positive ou négative. Ils sont de morphologies variées : forme sphérique, en bâtonnet, spiralee, lobée, cuboïde, triangulaire, aplatie, de forme irrégulière ou pléomorphe. Cellules isolées ou formant des agrégats. Ils sont aérobies, anaérobies facultatives ou anaérobies strictes. Leur type trophique varie de chimiolithoautotrophes à organotrophes mais certaines archéobactéries sont phototrophes.

On distingue 3 grands groupes :

- **Les halophiles extrêmes** : Ils nécessitent une présence de sel à 9%. Ils tolèrent des pH basiques de l'ordre de 11.5. On les trouve dans les lacs et les sols salés, le sable marin, les marais salants, saumures (eau très salée). Les halophiles ont été également isolées de poissons et autres aliments conservés par le sel. Se sont les seules Archæobactéries capables de photosynthèses grâce à des pigments caroténoïdes, qui leur confèrent une couleur rose. Le genre *Halobacterium* en est l'exemple type. Bien que la physiologie des haloarchæa soit différente de celle des autres groupes d'Archæa, certains traits sont communs à la plupart des Archaea.

- **Les Thermophiles extrêmes** : La température optimale de croissance est de l'ordre de 80°C et même plus. Anaérobies et résistants aux pH acides extrêmes. Ils sont thermoacidophiles. *Pyridictium occultum* : 105°C ; *Sulfolobus sp.* : 87°C à 90°C et un pH=1.

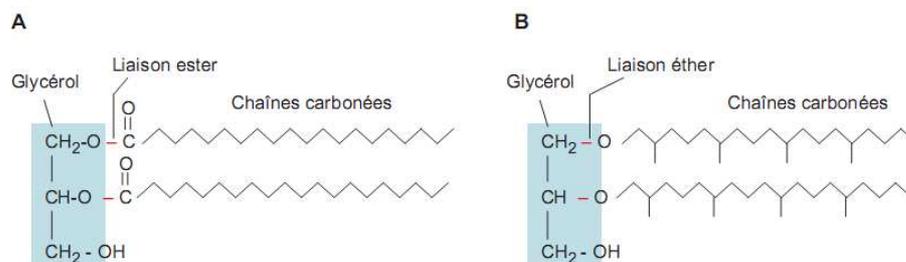
- **Les Méthanogènes** : Anaérobies stricts, comme *Méthanobactérium*, il est capable de produire le méthane (CH₄) à partir de gaz carbonique (CO₂). Saprophytes du tube digestif des ruminants, ils sont capables de libérer plus 1 à 2 milliards de tonnes de méthanes par an. Les ruminants et leur méthane contribuent dans l'effet de serre et le réchauffement de l'atmosphère. On les trouve également dans les sédiments des eaux de sources, sources thermales et les stations d'épuration.

Les *archaea* sont considérées comme non pathogènes. Ce qui les distingue de tous les autres organismes. Pour leur comparaison avec les eubactéries voir le tableau ci-dessous

La comparaison des deux domaines procaryotes est donnée dans le tableau III.

Tableau III : comparaison entre eubactéries et archaebactéries

	"Bacteria"	"Archaea"
Présence d'acide muramique dans la paroi (si la paroi est présente)	Oui	Non
Peptidoglycane	OUI	NON
Lipides membranaires	Acides gras aliphatiques liés au glycérol par des liaisons Ester	Chaînes hydrocarbonées liées au glycérol par des liaisons Ether
Premier acide aminé initiant la synthèse d'une chaîne polypeptidique	N-formylméthionine	Méthionine
Sensibilité aux bêta-lactamines	Variable	Non
Synthèse des protéines inhibée par l'anisomycline	Non	Oui
Synthèse des protéines inhibée par la streptomycine et le chloramphénicol	Oui	Non
Synthèse des protéines inhibée par la toxine diphthérique	Non	Oui
Présence d'introns dans les gènes codant pour les ARNt	Non	Oui
Inhibition de la RNA polymérase DNA dépendante par la rifampicine	Oui	Non



Les lipides membranaires

A : chez les Eubactéries et les Eucaryotes ; B : chez les Archées

De nombreuses classifications basées sur la comparaison de gènes (gène codant l'ARN 16S pour exemple) permettent de distinguer cinq phyla : *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota* et *Thaumarchaeota*)

III.2.1. *Crenarchaeota* : (ou Crenarchaeotes) On y regroupe des espèces

€ Thermophiles et hyperthermophiles, autotrophes et hétérotrophes, anaérobies strictes à microaérophiles. Plusieurs sont acidophiles.

□ Plusieurs sont dépendantes du soufre : utilisé soit comme accepteur d'électrons dans la respiration anaérobie ou utilisé soit comme source d'électrons par les lithotrophes.

□ Se développent dans l'eau chauffée géo thermiquement ou dans des sols contenant du soufre élémentaire.

III.2.1.1. Genre *Thermoproteus*

□ Gram négatif.

□ Archéobactéries en forme de bâtonnets longs et fins qui peuvent être courbés ou ramifiés.

□ Anaérobies strictes.

□ Thermoacidophiles : Optimum de température se situe à environ 70 - 97°C et Optimum de pH entre 2,5 et 6,5.

□ Retrouvées dans des milieux aquatiques chauds riches en sulfures.

□ Métabolisme: chimio-organotrophes ou chimiolithotrophes.

III.2.1. 2. Genre *Sulfolobus*

€ Gram négative.

€ Archéobactéries sphériques, irrégulièrement lobbées.

€ Aérobies (exception!).

€ Thermoacidophiles : optimum de température se situe à environ 70 - 80°C et optimum de pH entre 2 et 3.

€ Retrouvées dans des sources et sols acides chauds.

€ Métabolisme: chimio-organotrophes ou chimiolithotrophes.

€ L'oxygène est l'accepteur normal d'électrons mais le fer ferrique peut être utilisé.

III.2.2. *Euryarchaeota* : (ou Euryarchaeotes) ont une répartition écologique plus large que les *Crenarchaeota*. Elles regroupent des méthanogènes, des halophiles extrêmes et des thermophiles extrêmes, réductrices de sulfure ou encore réductrices de dioxyde de carbone. De part la disponibilité d'un grand nombre de génomes Les séquencés et annotés, ce

phylum est le mieux caractérisé. En particulier, les *Halobacteriales* comprennent des archées halophiles qui sont aisément cultivables en laboratoire telle que *Haloferax volcanii*.

III.2.2.1. Méthanogènes

- Archéobactéries en forme de bâtonnets ou de coques.
- Anaérobies strictes.
- Plus grand groupe d'archéobactéries et comprend 5 ordres (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* et *Methanopyrales*).
- Vivent dans des environnements anaérobiques et riches en matière organique.
- Peuvent produire une quantité importante de méthane.
- Combustible propre et excellente source d'énergie.
- Gaz a effet de serre car il absorbe les radiations infrarouges.

€ Peuvent oxyder le fer : contribuent de façon significative à la corrosion du fer.

III.2.2.2. Halobactéries (ou halophiles extrêmes)

Classe des Halobacteria; ordre des *Halobacteriales* et famille des *Halobacteriaceae*.

- Halophiles extrêmes : nécessite au moins 1.5 M NaCl : La paroi se désintègre si [NaCl] < 1.5 M., optimal de croissance à 3-4 M NaCl.
- Aérobie, métabolisme respiratoire, chimio-organotrophes.
- Généralement mésophiles.
- Se développent dans des marais salants et autres environnements aquatiques salés.
- Peuvent causer l'altération d'aliments salés (**Exp.** poissons salés).

III.2.2.3. Thermoplasmes

III.2.2.3.1. Classe des *Thermoplasmata*, ordre des *Thermoplasmatales*, familles des *Thermoplasmataceae*, *Picrophilaceae* et *Ferroplasmaceae*.

- Thermoacidophiles: Optimum de température se situe à environ 55 - 59°C. Optimum de pH entre 1 et 2.
 - Ananérobies facultatifs.
 - Chimio-organotrophes.
- € Se développent dans des rejets de mines de charbon.
- Morphologie et structure cellulaire: La forme change en fonction de la température : à 59°C - filament irrégulier. À des températures plus basses - sphérique.
 - Dépourvus de parois cellulaires.
 - Membrane plasmique renforcée par des tétraéthers de diglycérol, des lipopolysaccharides, et des glycoprotéines.

€ Les thermophiles extrêmes métabolisant le soufre

III.2.2.3.2. Classe des *Thermococci*, ordre des *Thermococcales*, famille des *Thermococcaceae*.

- Gram négative.
- Thermophiles obligatoires (70 - 110°C).
- Acidophiles ou neutrophiles.
- Habituellement anaérobies strictes.
- Peuvent réduire le soufre en sulfure.

A. Les réductrices de sulfates :

- Classe des Archaeoglobi, ordre des *Archaeoglobales*, famille des *Archaeoglobaceae*.
- Gram négative.
- Cellules sphériques irrégulières.
- Thermophiles extrêmes.
- Ananérobies.
- Métabolisme:
- Peuvent être autotrophes ou hétérotrophes.
- Formation de sulfure à partir de thiosulfate et de sulfate.

III.2. 3. *Nanoarchaeota* et *Korarchaeota* :

Nanoarchaeum equitans est l'unique représentant du phylum des *Nanoarchaeota* (ou Nanoarchaeotes). Cette archée est la plus petite cellule vivante connue à ce jour et possède le plus petit génome décrit (490 kb et environ 400 gènes). C'est un symbiote/parasite obligatoire du *Crenarchaeote hyperthermophile* et *Ignicoccus hospitalis*. Les *Nanoarchaeota* apparaissent comme une lignée ayant évolué plus rapidement que les autres, ceci étant une caractéristique typique des organismes parasitaires et symbiotiques. De même, les *Korarchaeota*, avec des données génomiques encore peu nombreuses, serait une lignée anciennement divergente des *Crenarchaeota*. Les *Korarchaeota* renferment les organismes isolés de sources chaudes mais aucune souche n'a été isolée en culture *pure*.

III.2.4. *Thaumarchaeota* (ou Thaumarchaeotes) : apparaissent comme la lignée la plus ancienne. Deux ordres sont retrouvés : les *Nitrosopumilales* et les *Cenarchaeales*. Ce phylum pourrait apporter des informations importantes sur un possible ancêtre commun entre les archées et les eucaryotes. En effet, ils apparaissent comme la seule lignée d'archées possédant une ADN topoisomérase de classe IB (Topo IB) qui apparaît très proche de celle des eucaryotes et n'avait pas encore été identifiée chez les archées. Cette caractéristique

commune Thaumarchaeota/eucaryotes évoque une apparition plus ancienne de ce phylum par rapport aux autres phyla.

IV. Structure cellulaire et évolution

IV.1. Cellules eucaryotes

Les cellules eucaryotes sont généralement de taille plus importante et de structure plus complexe que les procaryotes. Les micro-organismes eucaryotes comprennent les algues, les champignons et les protozoaires. Tous les végétaux et animaux multicellulaires sont composés de cellules eucaryotes. Une des principales particularités des cellules eucaryotes est la présence de structures membranaires appelées organelles qui comprennent avant tout le noyau, mais aussi les mitochondries et les chloroplastes (ces derniers n'étant présents que dans les cellules photosynthétiques). Le noyau possède l'information génétique de la cellule (ADN, « le génome ») et se trouve être le siège de la transcription dans les cellules eucaryotes. Les mitochondries et les chloroplastes interviennent de façon spécifique dans la production d'énergie, les premières par la respiration, les secondes par la photosynthèse.

L'ADN eucaryote est présent dans le noyau sous forme de molécules linéaires compactées et organisées en chromosomes. Le nombre de chromosomes varie selon les organismes. Par exemple, la levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*, possède 16 chromosomes organisés en 8 paires, alors que les cellules humaines en contiennent 46 (23 paires). Néanmoins, les chromosomes eucaryotes ne sont pas seulement composés d'ADN, ils possèdent aussi des protéines permettant l'enroulement et la compaction de l'ADN, ainsi que d'autres protéines nécessaires à l'expression génétique. Il existe une différence génétique majeure entre les procaryotes et les eucaryotes : ces derniers ont généralement deux copies de chaque gène et sont donc diploïdes. Au cours de la division des cellules eucaryotes, le noyau se divise (après le doublement du nombre de chromosomes) lors d'un processus appelé mitose. Il en résulte deux cellules filles identiques, possédant chacune un noyau avec une copie du génome. Le génome diploïde des cellules eucaryotes, dédoublé au cours du processus de méiose, forme des gamètes haploïdes pour la reproduction sexuée. La fusion de deux gamètes au cours de la formation du zygote rétablit l'état diploïde de la cellule

IV.2. Cellules procaryotes

À la différence des cellules eucaryotes, les cellules procaryotes ont une structure interne plus simple dépourvue d'organelles. Les procaryotes sont composés des Bacteria et des Archaea. Les cellules eucaryotes se caractérisent par une taille plus importante que les cellules procaryotes (10 à 100µm contre 1 à 10 µm). L'organisation des génomes des cellules

procaryotes et eucaryotes est différente. Dans une cellule procaryote, l'ADN se trouve sous la forme d'une grande molécule double brin appelée chromosome bactérien. Le chromosome est compacté sous une forme visible appelée nucléoïde. L'ADN est circulaire dans la plupart des procaryotes. La majorité d'entre eux n'a qu'un unique chromosome. Et, par conséquent, les procaryotes n'ont qu'une copie unique de chaque gène et sont donc haploïdes. Plusieurs possèdent aussi de petites quantités d'ADN circulaire extra-chromosomique, appelées plasmides. Ces plasmides possèdent généralement des gènes conférant à la cellule procaryote des propriétés spécifiques (telles que des propriétés métaboliques). À la différence, les gènes essentiels à la survie (gènes « de ménage ») sont localisés sur le chromosome.

IV.3. Virus

Les virus ne sont pas des cellules, mais constituent une classe majeure de micro-organismes. Ils sont dépourvus de nombreuses caractéristiques propres aux cellules, et en particulier ne sont pas des systèmes dynamiques, à l'opposé des cellules qui peuvent absorber des nutriments et rejeter des déchets. Au contraire, les particules virales sont des structures stables et statiques incapables de modifier ou de remplacer leurs constituants. C'est seulement au cours de l'infection d'une cellule que le virus acquiert la propriété clé d'un être vivant (la reproduction). À la différence des cellules, les virus n'ont pas de capacités métaboliques intrinsèques. Bien qu'ils possèdent leur propre génome, ils n'ont pas de ribosomes et, de ce fait, ils dépendent totalement du mécanisme cellulaire de synthèse protéique de leur hôte.

Les virus infectent tous les types cellulaires, y compris les cellules microbiennes. De nombreux virus provoquent des maladies chez les organismes qu'ils infectent. Les virus sont beaucoup plus petits que les cellules procaryotes, le plus petit étant d'un diamètre de 10 nm.

V. Origine des mitochondries et chloroplastes

Les chloroplastes sont des organites que l'on trouve dans les cellules végétales chlorophylliennes, permettant la photosynthèse et donc l'autotrophie (production de matière organique à partir de matière minérale)

Les mitochondries sont des organites présents chez les cellules eucaryotes animales, végétales, fongiques et protistes. Elles permettent la respiration aérobie qui fournit l'énergie à la cellule (Fig. 2 et 3).

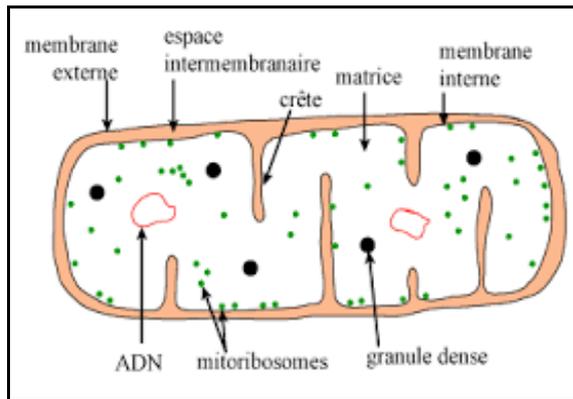


Fig. 2 : Structure d'une

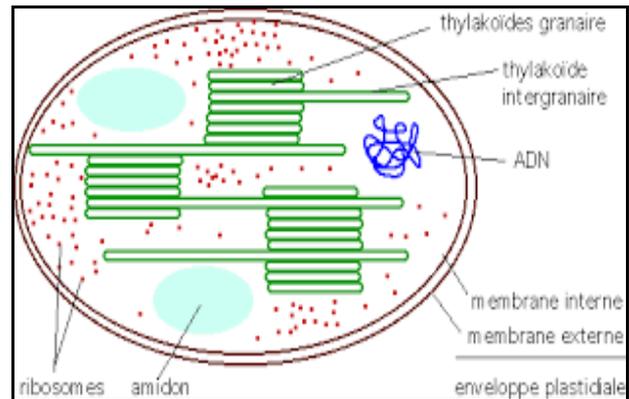


Fig. 3 : Structure d'un

Dès le début du XX^{ème} siècle les chercheurs ont pensé que les plastes et les mitochondries pouvaient provenir de bactéries. Celles-ci auraient été ingérées par des cellules primitives et vivaient à l'intérieur d'elles en symbiose : la mitochondrie dérive d'une bactérie ayant une "respiration" primitive au sulfate et le chloroplaste dérive des cyanobactéries. Cette théorie endosymbiotique de l'origine des plastes et des mitochondries est devenue parfaitement plausible lorsque l'on a découvert (1950-1960) que ces organites contenaient de l'ADN et des ribosomes. Des arguments divers sont mis en évidence en faveur de cette hypothèse :

V.1. Arguments structuraux

- € La taille des mitochondries et des chloroplastes est semblable à celle des bactéries ($\approx 1 \mu\text{m}$).
- Les mitochondries et les chloroplastes possèdent deux membranes. L'une d'entre elle pourrait être la membrane de la cellule hôte.
- Les lipides de la membrane interne des chloroplastes et des mitochondries semblent d'origine bactérienne. La cardiolipine est un lipide membranaire trouvé exclusivement dans la membrane interne des mitochondries et la membrane des bactéries. Chez les plantes supérieures, les deux membranes de l'enveloppe du chloroplaste sont différentes : la membrane interne ainsi que les membranes des thylakoïdes présentent des analogies (composition lipidique) avec les membranes bactériennes.
- Présence de ribosomes de type bactérien ; Une partie de la synthèse de protéines chloroplastiques s'effectue dans le chloroplaste, grâce à la présence de ribosomes qui présentent des analogies avec les ribosomes bactériens

V.2. Arguments fonctionnels

□ Les mitochondries et les chloroplastes se divisent de façon autonome. La division suit un rythme indépendant de la division du noyau : Les mitochondries proviennent toujours de mitochondries préexistantes. Tout plaste provient d'un plaste préexistant. Lorsque des cellules ne possèdent pas de plaste (certaines cellules blanches de feuilles panachées), les cellules filles ne possèdent pas de plaste

□ Les chloroplastes réalisent la photosynthèse comme les cyanobactéries (photosynthèse oxygénique).

V.3. Arguments génétiques

□ Présence dans les mitochondries et les chloroplastes d'un génome circulaire, non associé à des histones, non isolé dans un noyau, comme chez les bactéries. Cet ADN code pour une partie des protéines chloroplastiques.

VI. Endosymbiose primaire et secondaire

Les endosymbioses ont pu se réaliser à différents moments et de diverses façons, par absorption par une cellule primitive d'une autre cellule (Procaryote ou Eucaryote). On parle alors d'endosymbiose primaire ou secondaire.

VI.1. Endosymbiose primaire

Une cellule eucaryote primitive absorbe une α -protéobactérie : la protéobactérie devient une mitochondrie. Il en résulte une cellule eucaryote hétérotrophe. Cette cellule eucaryote hétérotrophe absorbe à son tour une cyanobactérie, organisme photosynthétique contenant un plaste : la cyanobactérie devient un chloroplaste. Il en résulte une cellule eucaryote autotrophe. La membrane interne du chloroplaste est d'origine cyanobactérienne et la membrane externe a pour origine la membrane plasmique de la cellule qui l'a absorbé (Fig. 4).

Exp: Plastes de Rhodophycées et des Chlorophycées

Il est probable que cette endosymbiose ait pu se réaliser de différentes manières. Chez les algues rouges (Rhodophycées), on constate que les thylakoïdes possèdent des pigments accessoires, les phycobilines, ce qui laisse penser que la bactérie symbiotique devait être une cyanobactérie qui possédait ces mêmes pigments. Pour expliquer l'origine des chloroplastes des algues vertes (chlorophycées) et des végétaux supérieurs qui contiennent des

chlorophylles a et b et pas de phycobilines, on peut envisager, soit que la cyanobactérie symbiote possédait un équipement pigmentaire différent lors de l'absorption, soit que l'évolution pigmentaire se soit réalisée ultérieurement.

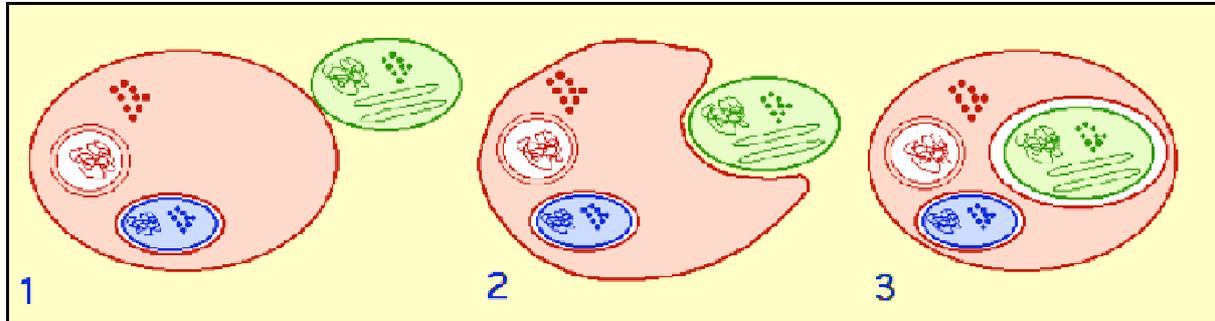


Fig. 4: Endosymbiose primaire : formation de chloroplaste

Réalisation d'une cellule eucaryote autotrophe par absorption d'une bactérie photosynthétique par une cellule eucaryote hétérotrophe. Cette bactérie devient un chloroplaste, ses membranes internes ont une origine bactérienne. La membrane externe de l'enveloppe a pour origine la membrane plasmique de la cellule elle-même.

VI.2. Endosymbiose secondaire

Une cellule eucaryote hétérotrophe absorbe une cellule eucaryote autotrophe contenant des chloroplastes : ceux-ci sont alors entourés de quatre membranes (2 membranes du chloroplaste + 1 membrane plasmique + 1 membrane de phagocytose). En général, le noyau et le cytoplasme de la cellule symbiote dégèrent, le chloroplaste est alors entouré de quatre membranes. Chez *Cryptomonas* (chromophyte, Cryptophycées), on trouve effectivement un reste de noyau entre la deuxième et la troisième membrane ainsi que des restes de cytoplasme contenant des ribosomes (Fig. 5a)

Exp. Plastes des Cryptophytes et des Chlorarachniophytes)

Une cellule eucaryote hétérotrophe absorbe une cellule de *Rhodophyta* (algues rouges) ou une cellule de *Chlorophyta* (algues vertes). Cette endosymbiose secondaire débouche sur 2 nouveaux groupes d'algues : les Cryptophytes et les Chlorarachniophytes. Ces organismes contiennent des mitochondries et des plastes mais aussi un organite appelé le nucléomorphe, réminiscence du noyau de l'algue. Exemple : *Guillardia theta* (Fig. 5b)

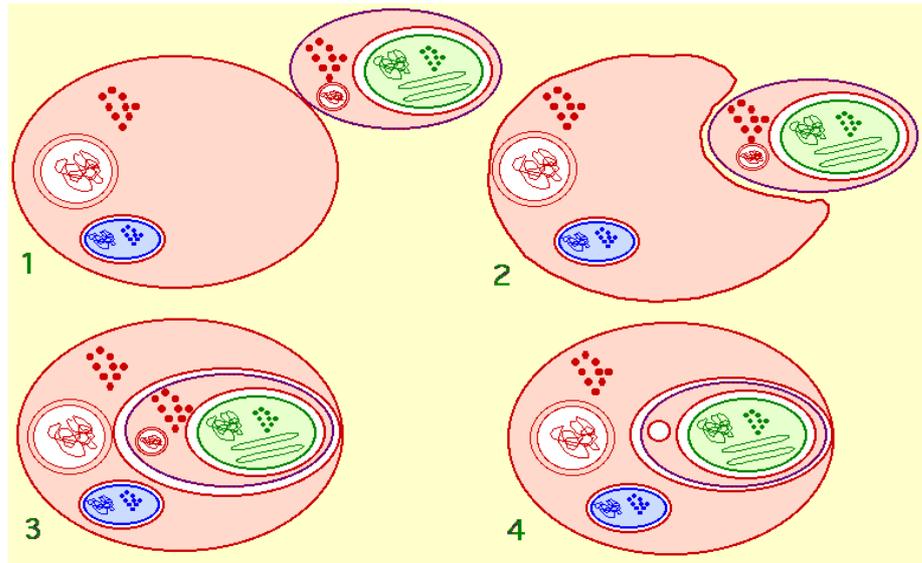


Fig. 5a: Endosymbiose secondaire (plastes des Chromophytes)

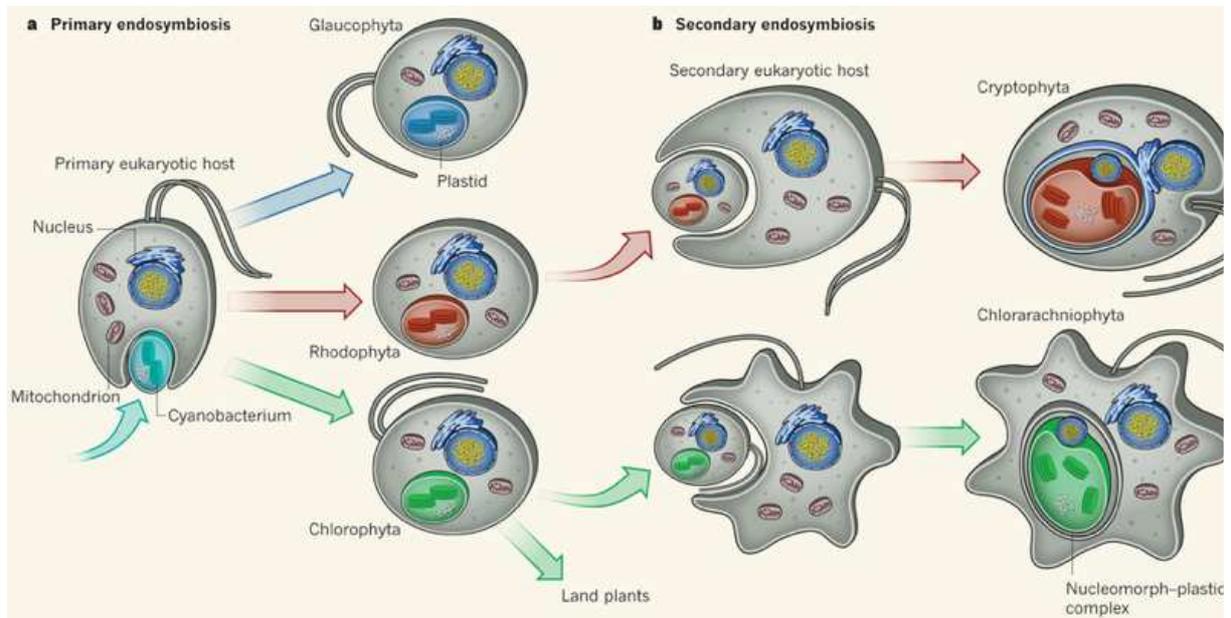


Fig. 5b : Endosymbiose secondaire : cas de Cryptophytes et de Chlorarachniophytes

Le même processus se poursuit, une endosymbiose tertiaire est à l'origine de la photosynthèse chez les dinobiontes (alvéolés) : chromalvéolés et cryptoalvéolés.

Chapitre II : Origine de la vie et l'arbre universel du vivant

L'**évolution** est le processus ayant mené à l'apparition et à la transformation de nouvelles espèces. L'étude de la formation et de l'évolution des organismes vivants se nomme la **phylogénie**.

I. LUCA et les trois domaines du vivant

Les origines de la vie sur terre demeurent incertaines. On ne sait pas dire avec certitude quand la vie est apparue sur terre ni où est comment. Les plus anciens micro-organismes fossiles sont datés d'au moins 3,5 à 3,8 milliards d'années.

La comparaison des trois domaines de la vie (*Bacteria*, *Archaea* et *Eukarya*) a montré des caractères homologues partagés entre les trois domaines (Tableau IV) ce qui suppose des relations de parentés entre ces organismes. Les gènes homologues sont hérités d'ancêtre commun. Selon la théorie qui dit que tous les êtres vivants partagent un ancêtre commun. L'acronyme LUCA (Last Universal Common Ancestor) ou DACU (Dernier Ancêtre Commun Universel) est l'organisme dont sont issus les trois lignées cellulaires, est donc, l'ensemble des espèces vivant actuellement sur terre. Les trois domaines pourraient avoir divergé d'un ancêtre commun ou d'une communauté d'organismes au début de l'apparition de la vie sur la Terre. Ceci implique que : tous les êtres vivants sont apparentés à des degrés plus ou moins variés ; les eucaryotes, les bactéries et les archées en dépit de grandes différences morphologiques et mode de vie, sont cousins. Les différences observées entre organismes actuels reflètent une évolution qui a suivi des chemins différents dans les différentes lignées.

LUCA ne doit pas être confondu avec le premier organisme vivant. LUCA est une entité théorique, un modèle abstrait, permettant de comprendre les phénomènes liés à l'origine de la vie et l'évolution des êtres vivants. Il ne correspond pas à une entité réelle et identifiée mais à un organisme dont certains caractères sont connus grâce à ceux partagés par ses descendants.

Ainsi, la période pré-LUCA doit intégrer des notions de biologie, de physique, de chimie et de mathématique pour comprendre le passage d'un monde pré-biotique à un monde biotique (ce qui revient à comprendre comment la vie est apparue à partir de non vivant : matière organique). Un grand nombre d'hypothèses ont été émises de puis les années 1950 concernant l'émergence de la vie sur terre.

Tableau IV : Les caractéristiques des trois domaines (Bacteria, Archaea et Eukarya).

Propriétés	<i>Bacteria</i>	<i>Eucarya</i>	<i>Archaea</i>
ADN séparé du cytoplasme par une membrane	Non (sauf chez les Planctomycétales)	Oui (membrane nucléaire)	Non
Présence d'organelles intracellulaires	Non	Oui (mitochondries, chloroplastes)	Non
Présence d'une paroi autour des cellules	Oui (sauf rares exceptions), composée de peptidoglycane contenant de l'acide muramique	Chez certains eucaryotes (plantes, champignons, etc), mais ne contient jamais d'acide muramique	Oui (sauf rares exceptions), la composition varie selon les groupes, mais il n'y a jamais d'acide muramique
Types de lipides présents dans la membrane cytoplasmique	Chaînes d'acides gras reliés à un glycérol-3-phosphate par des liaisons ester	Chaînes d'acides gras reliés à un glycérol-3-phosphate par des liaisons ester	Chaînes aliphatiques branchées reliés à un glycérol-1-phosphate par des liaisons ether
Formation de vésicules de gaz	Oui	Non	Oui
ARNt initiateur de la traduction	N-formylméthionine	Méthionine	Méthionine
ARNm polycistroniques	Oui+ Mono	Non	Oui+Mono
Maturation des ARNm (épissage des introns, mise en place d'une coiffe et d'une queue poly-A)	Non	Oui	Non
Type de ribosome	70S/16S	80S/18S	70S/16S
Réaction du facteur d'élongation 2 avec la toxine de la diphtérie	Non	Oui	Oui
Sensibilité du ribosome au chloramphénicol et à la kanamycine	Oui	Non	Non
Sensibilité du	Non	Oui	Oui

ribosome à l'anisomycine			
Nombre de types d'ARN polymérases	1	3	1
Nombre de sous-unités	6	12-14	8-12 (très similaire à celle des eucaryotes)
Sensibilité de l'ARN polymérase à la rifampicine	Oui	Non	Non
Promoteurs de type II pour l'ARN polymérase	Absents	Présents	Présents
Type d'ATPase	A	B	B
Capacité à produire du méthane (méthanogènes)	Non	Non	Oui, dans certaines lignées
Capacité à fixer l'azote	Oui	Non	Oui
Photosynthèse basée sur la chlorophylle	Oui	Oui (via les chloroplastes qui sont des bactéries)	Non
Capacité à réaliser la chimiolithotrophie	Oui	Non	Oui

II. LUCA et la racine l'arbre du vivant

L'existence de trois domaines pose tout naturellement la question des relations de parenté qui les unissent, c'est-à-dire de la position de la racine de l'arbre universel du vivant. alors il existe trois hypothèses possibles sur la nature de LUCA et sur la manière dont s'est faite l'évolution dans chacun des trois domaines (Fig. 6).

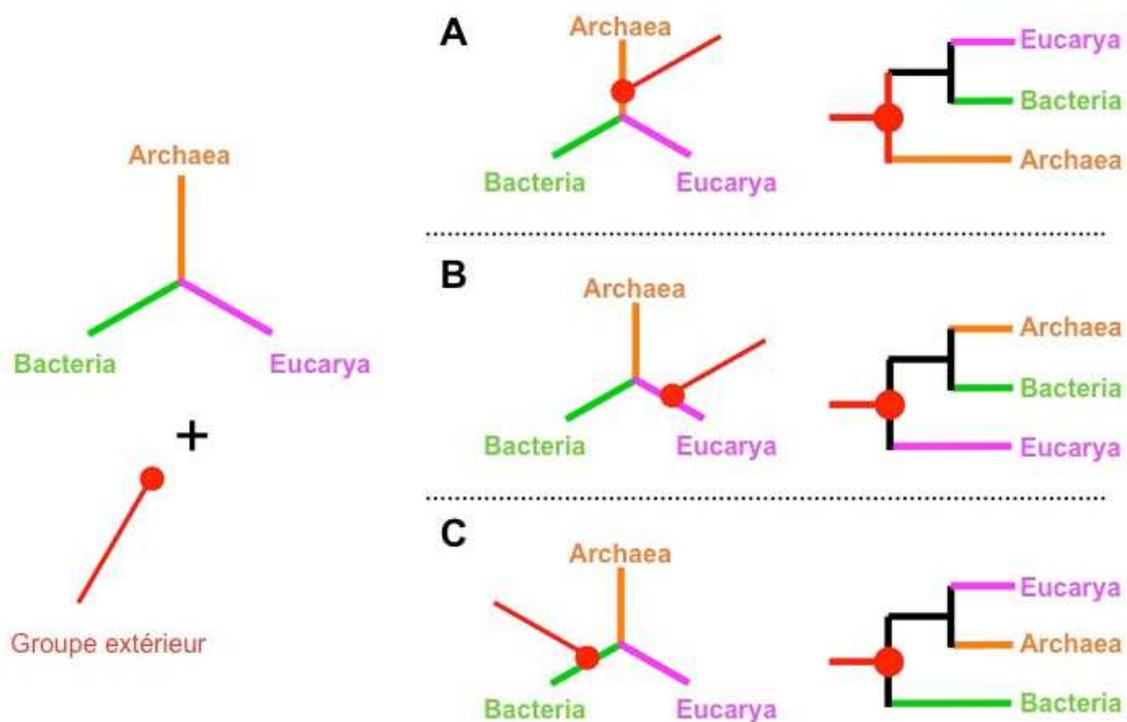


Fig. 6 : Les trois enracinements possibles pour l’arbre universel du vivant. Le rond représente LUCA.

Tous les caractères présents dans les trois domaines sont supposés avoir été présents chez LUCA ; certains auront été perdus secondairement.

- **Hypothèse 1 :** La racine est placée dans la branche des Archaea : les Eucarya et les Bacteria sont plus proches parents (Fig. 5A). Il n’est pas possible de dire si les caractères présents chez les eucaryotes et les bactéries, mais absents chez les archées étaient présents chez LUCA et il n’est pas possible de dire si les caractères présents chez les archées mais absents chez les eucaryotes et les bactéries étaient présents chez LUCA.

Cette hypothèse est la plus acceptée par les scientifiques ; en se basant sur le fait que les Archéobactéries colonisent surtout les milieux extrêmes (en particulier les environnements très chauds dont certains auteurs estiment qu’ils correspondaient aux conditions qui prévalaient sur la terre primitive) : le LUCA serait donc procaryote et hyperthermophile.

D’autre part, les Archaeobacteria, qui regroupent principalement les bactéries méthanogènes, représenteraient, selon Woese, le type procaryote ancestral du fait d’un métabolisme compatible avec l’atmosphère de la terre primitive (réduction anaérobie du dioxyde de carbone en méthane).

- **Hypothèse 2 :** La racine est placée dans la branche des eucaryotes : les Archaea sont phylogénétiquement plus proches des Eubacteria que des Eukarya (voir **Fig. 5.B**). Ainsi l'arbre universel du vivant aurait divergé de l'ancêtre commun dans deux directions : une à l'origine des eucaryotes et une deuxième, probablement, à l'origine des Archaea et des Bacteria.

- **Hypothèse 3 :** La racine est placée dans la branche des eubactéries : les Archaea sont phylogénétiquement plus proches des Eukarya que des Bacteria (voir **Fig. 5.C**). Ainsi l'arbre universel du vivant aurait divergé de l'ancêtre commun dans deux directions : une à l'origine des Bacteria et une deuxième, probablement, à l'origine des Archaea et des Eukarya.

- **Enfin**, il n'est pas possible de clore cette question sans évoquer un autre scénario, dans lequel LUCA donne naissance aux lignées bactérienne et archée. Les eucaryotes dérivants pour leur part d'une association entre une bactérie et une archée (Fig. 7).

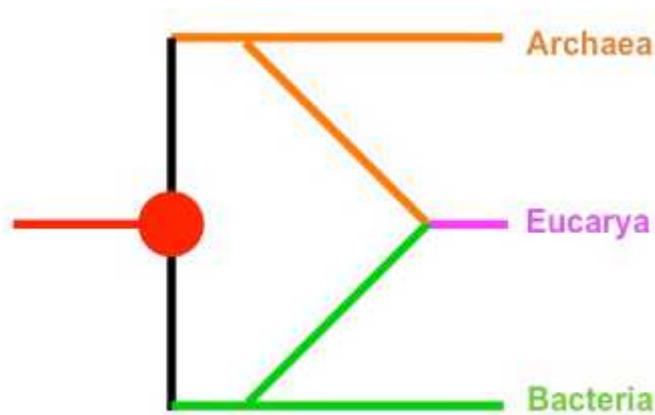


Fig. 7 : Origine chimérique des eucaryotes.

Des résultats de séquençages ainsi que d'autres indices ont permis d'établir que les cellules eucaryotes possèdent des gènes issus de cellules des deux autres domaines (voir Fig. 8). Deux hypothèses alternatives sont présentées :

A. Un scénario en deux étapes. Un eucaryote sans mitochondrie (Archezoan, mito⁻) est formé par la fusion d'une archéobactérie et d'une bactérie Gram négatif, l'acquisition d'une mitochondrie se fait plus tard via l'endosymbiose d'une α -protéobactérie.

B. Hypothèse de l'hydrogène. Ce scénario implique la création simultanée du noyau eucaryote et de la mitochondrie par la fusion d'une archéobactérie méthanogène, qui requiert de l'hydrogène (l'hôte), et d'une α -protéobactérie qui produit de l'hydrogène (l'endosymbiote).

Dans les deux scénarios, l'acquisition d'un chloroplaste se fait via l'endosymbiose d'une cyanobactérie dans une cellule eucaryote contenant des mitochondries.

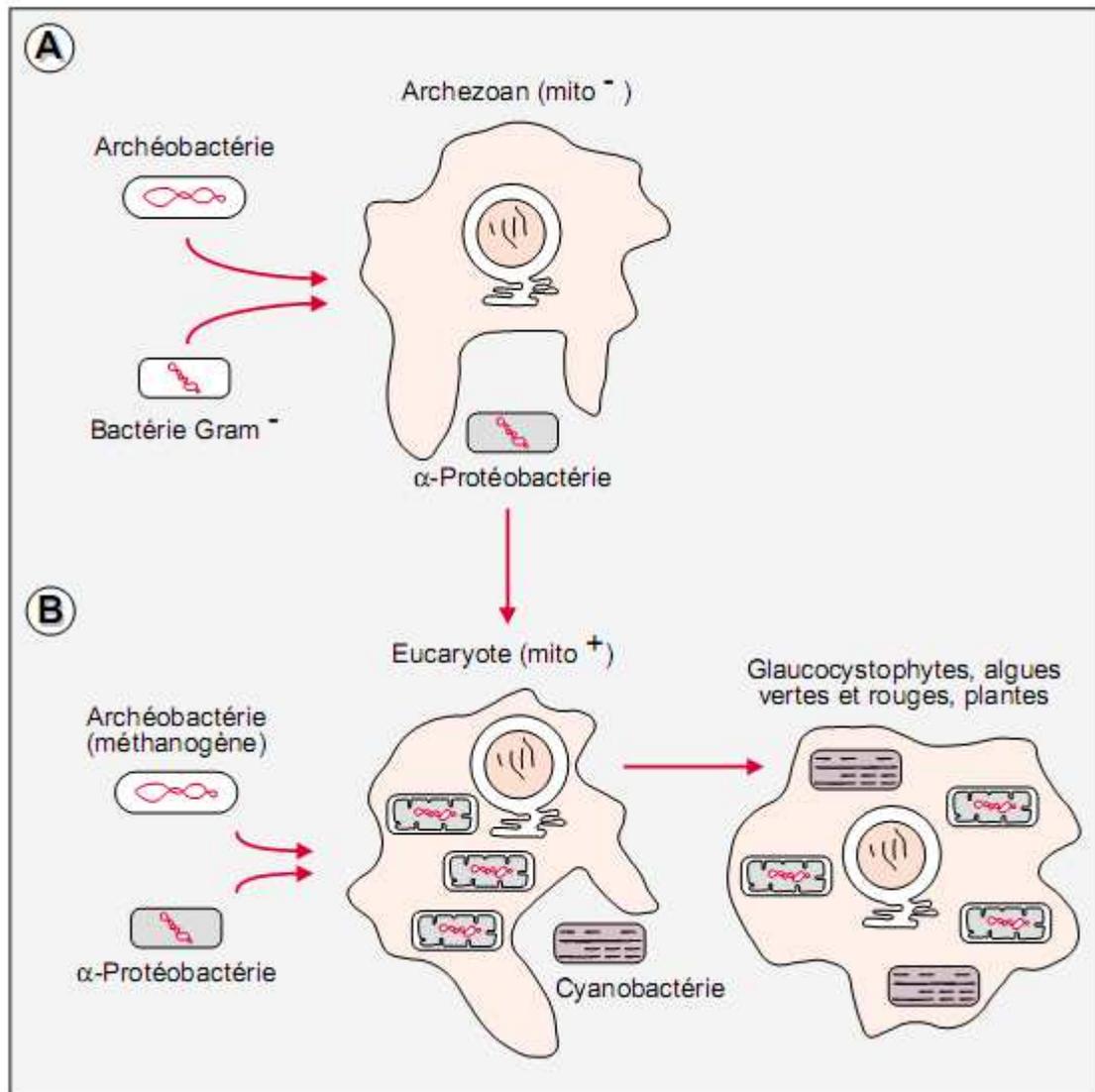


Fig. 8 : Origine de la cellule eucaryote

Chapitre III : Rôle des virus au cours de l'évolution des microorganismes (Virus de procaryotes)

I. Définition : Un virion a 4 caractères essentiels :

1- Le virion possède **un seul type d'acide nucléique** qui peut être soit de l'ADN, soit de l'ARN. Les deux molécules ne coexistent donc pas dans la particule virale, ce qui oppose les virus aux autres formes vivantes connues jusqu'à ce jour. L'acide nucléique viral porte l'intégralité de l'information génétique du virus et constitue ce que l'on appelle le génome viral.

2- Le virion **se reproduit uniquement à partir de son matériel génétique par réplication de son génome**. Il n'existe pas de scissiparité comme chez les bactéries et il n'y a pas de mitose comme dans les cellules eucaryotes.

3- Les virus sont doués d'un **parasitisme intracellulaire obligatoire**. Ils ne peuvent se reproduire qu'au sein d'une cellule hôte vivante. Du fait d'un parasitisme intracellulaire absolu le virus ne possède aucun système enzymatique ou énergétique lui permettant d'assurer sa propre auto-réplication. Il est donc amené à détourner et à utiliser pour sa propre biosynthèse l'ensemble des macromolécules de la cellule qu'il parasite (ribosome, tARN, activité enzymatique, système de régulation). Au cours de l'interaction entre la particule virale et sa cellule hôte, deux éventualités peuvent survenir :

a. La multiplication virale peut aboutir à la mort de la cellule : c'est ce que l'on appelle **la lyse cellulaire**.

b. Le virus interagit avec la cellule résultant en des lésions cellulaires non léthales : c'est ce qu'on appelle la **persistance virale**.

Les virus infectant les procaryotes sont répartis en deux catégories suivant la nature de leur hôte (bactérie ou archéobactérie). Les termes bactériophage et phage ont été initialement utilisés pour nommer les virus de bactéries. En ce qui concerne les archées, le mot archéophage existe mais il est peu usité. En effet, les scientifiques spécialistes du domaine parlent plutôt de virus d'archéobactéries pour souligner les différences existant vis-à-vis des bactériophages.

II. Anatomie générale des particules virales

Toute particule virale est constituée d'au moins **deux éléments constants et obligatoires** :

1- le **génom**e, de nature nucléotidique et composé d'acide nucléique (ADN ou ARN) monocaténaire ou bicaténaire. Exp. ADN double brin (phage T4, T7), ADN simple brin (Phi X174, M13), ARN simple brin (MS2), ARN double brin (Phi 6).

2- la **capside**, est une coque de nature protéique qui entoure le génome et est capable d'assurer sa protection et sa survie dans le milieu extérieur.

Les interactions entre acide nucléique et protéine de la capsid

e sont très étroites. Des structures protéiques se trouvent bien souvent incluses dans cet ensemble, ce sont les **protéines internes**. La structure nucléoprotéique, définie par l'acide nucléique et les protéines internes, prend le nom de **nucléotide** et l'ensemble nucléotide et capside constitue une unité fonctionnelle que l'on appelle la **nucléocapsid**e. Les virus limités à leur nucléocapside sont dits des **virus nus**. Dans certaines familles virales, la nucléocapside est entourée d'une structure périphérique facultative appelée **l'enveloppe**. Cette enveloppe, dont l'existence oppose les **virus enveloppés** aux virus nus, peut être de provenance et de nature diverse. Lorsque l'enveloppe dérive des systèmes membranaires de la cellule hôte, elle peut prendre le nom de **peplos**.

III. Origine des virus

Trois hypothèses sont proposées pour expliquer l'origine des virus. Dans la première de ces hypothèses, les virus seraient apparus avant même les cellules. Dans les deux autres ils sont d'origine cellulaire.

1. **Hypothèse 1** : Les virus sont apparus avant les cellules. Cette hypothèse est abandonnée il était admis que les virus n'avaient pas pu apparaître avant les cellules, puisqu'ils ont précisément besoin de ces dernières pour se reproduire (parasite obligatoire).

2. **Hypothèse 2** : Les virus peuvent correspondre à des anciennes cellules parasites qui auraient évolué vers la forme virale par la perte complète de leur autonomie (perte de ribosomes). Cet organisme aurait co-évolué avec la cellule hôte et n'aurait conservé que sa capacité à se répliquer et le mécanisme de transfert de cellule en cellule. Cette hypothèse est appuyée par l'existence des rickettsies : petites bactéries ayant régressées à un point qu'elles ne peuvent survivre que dans une cellule hôte.

3. **Hypothèse 3** : Les virus peuvent correspondre à des fragments de génomes qui auraient échappé au contrôle de la cellule en devenant infectieux.

La plupart des évolutionnistes spécialistes des origines de la vie pensent à un monde cellulaire à ARN. L'ADN est la molécule support de l'information génétique caractérisant

chaque être vivant sur terre. La complexité de l'ADN rend l'apparition spontanée de cette molécule hautement improbable. Il paraît plus probable que l'ADN soit apparu par l'évolution d'une molécule plus simple (ARN). L'ARN est légèrement plus simple chimiquement parlant. Il est composé des mêmes éléments que l'ADN, sauf que le désoxyribose est remplacé par le ribose et la thymine est remplacée par l'uridine. En effet, l'étape clé de la formation des liaisons peptidiques est réalisée grâce à l'ARN chez tous les êtres vivants actuels. On ne connaît pas de mécanisme de synthèse protéique uniquement réalisée par l'ADN, ce qui rend l'hypothèse d'un monde à ARN aujourd'hui la faveur des scientifiques.

Si les virus à ARN sont apparus les premiers, quelle est l'origine des virus à ADN ?

III.1. Origine des virus à ADN

Deux hypothèses ont été avancées :

1. Hypothèse 1 : Les virus à ADN descendent des virus à ARN. Cette hypothèse est appuyée avec l'existence des virus utilisant les deux types d'acides nucléiques dans leur cycle de réplication tels que les rétrovirus avec leur cycle ARN-ADN-ARN et les hépadnavirus avec leur cycle ADN-ARN-ADN. L'existence des virus qui passent alternativement d'une forme ARN à une forme ADN et vice versa suggère que les virus avaient joué un rôle important dans la transition ARN en ADN.

2. Hypothèse 2 : Les virus à ADN proviennent des cellules ancestrales à ADN. Cette hypothèse est appuyée surtout après la découverte du mimivirus avec son génome géant (1,2 Mpb) codant plus de 1200 protéines. Des parasites intracellulaires à ADN d'origine cellulaires auraient pu évoluer vers la forme virale en inventant de nouvelles capsides ou en empruntant celles des virus à ARN préexistants.

Si les génomes à ADN sont apparus dans le monde viral. Comment peut-on imaginer le transfert ultérieur de l'ADN des virus aux cellules ?

III.2. Origine des cellules à ADN

Plusieurs scénarios ont été proposés, le plus convaincant est la coexistence dans une même cellule d'un génome à ARN ancestral et d'un plasmide à ADN d'origine virale. Ce dernier, a pris le contrôle de la cellule hôte et a permis la construction d'un chromosome cellulaire à ADN par rétro transcription de l'ancien génome cellulaire à ARN. De cette hypothèse, tous les êtres vivants cellulaires actuels seraient les

descendants d'un ou de plusieurs virus à ADN qui auraient pris le contrôle des cellules à ARN (Fig. 9).

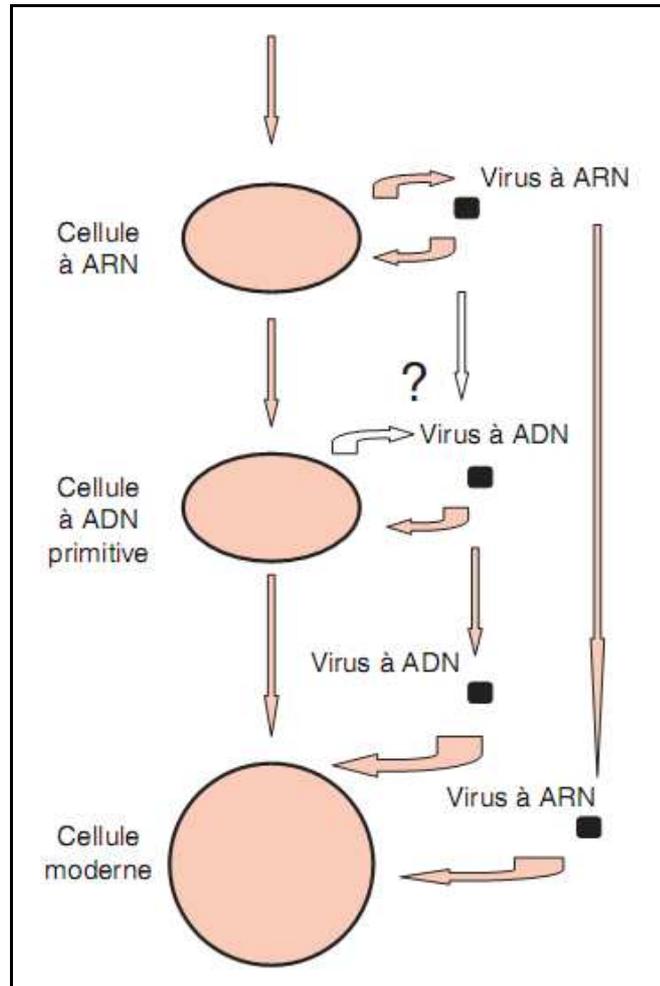


Fig. 9 : Origine des virus et des cellules à ADN

IV. Classification des virus procaryotes

La classification des virus se base sur des critères bien particuliers, à savoir la nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN) et sa structure (monocaténaire, bicaténaire, linéaire ou circulaire), la symétrie de la capsid (binaire, cubique ou hélicoïdale), la présence ou l'absence d'enveloppe et le mode de réplication. Sur le seul critère morphologique, quatre grands groupes peuvent être définis (Fig. 10) :

1. Les virus à symétrie binaire (ou virus caudés) : Ils ont comme caractéristique principale de posséder une queue permanente, contractile ou non suivant les cas. Celle-ci possède généralement des organelles de fixation sous forme de fibres ou de crampons terminaux. Leur capsid (ou tête) est à symétrie icosaédrique. Ces virus ne sont pas enveloppés et ont un génome à ADN bicaténaire linéaire. Cette catégorie concentre 96 % des

virus de procaryotes, répartis en trois grandes familles : les *Myoviridae*, les *Siphoviridae* et les *Podoviridae*. Ces dernières constituent l'ordre des *Caudovirales*, le seul ordre défini chez les virus de procaryotes.

2. Les virus à symétrie cubique : Ils ont une capsidie icosaédrique mais pas de queue. Certains possèdent une structure lipidique qui est le plus souvent sous forme d'enveloppe mais qui peut aussi être insérée dans le core. Ce groupe qui représente seulement 2 % des virus de procaryotes, correspond cependant à cinq familles : les *Microviridae* (ADN monocaténaire circulaire), les *Corticoviridae* (ADN bicaténaire circulaire), les *Tectiviridae* (ADN bicaténaire linéaire), les *Leviviridae* (ARN monocaténaire linéaire) et les *Cystoviridae* (ARN bicaténaire linéaire).

3. Les virus à symétrie hélicoïdale : Ils ont la forme de filaments de longueur variable qui sont soit flexueux soit rigides. Ils ne représentent que 1,7 % du nombre total de virus de procaryotes et regroupent trois familles : les *Inoviridae*, les *Lipothrixviridae* et les *Rudiviridae*. Les deux dernières regroupent uniquement des virus infectant les archéobactéries. Seules les *Lipothrixviridae* sont enveloppés. Les *Inoviridae* ont un génome à ADN monocaténaire circulaire alors que les *Lipothrixviridae* ainsi que les *Rudiviridae* ont un génome à ADN bicaténaire linéaire.

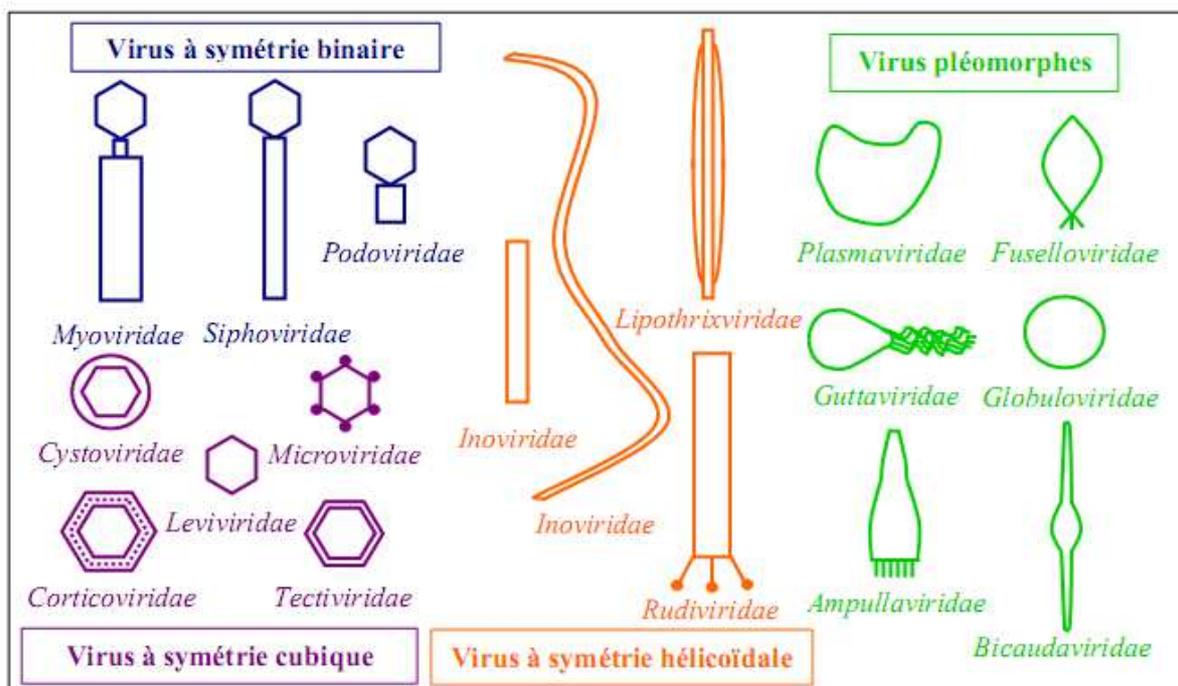


Fig. 10 : Morphologie des différentes familles de virus de procaryotes

4. Les virus dits pléomorphes : Ils ne possèdent pas de capsidie véritable mais une structure de type enveloppe. Cela ne concerne que 0,3 % des virus de procaryotes mais six

familles sont concernées : les *Plasmaviridae*, les *Fuselloviridae*, les *Guttaviridae*, les *Globuloviridae*, les *Ampullaviridae* et les *Bicaudaviridae*. Ces cinq dernières regroupent des virus qui infectent uniquement les archéobactéries. Les *Fuselloviridae* et les *Bicaudaviridae* ont une forme de fuseau alors que les *Guttaviridae* ont une morphologie de goutte d'eau avec une touffe de fins filaments au pôle le plus pointu. Les *Globuloviridae* sont sphériques et les *Ampullaviridae* ont une forme de bouteille.

V. Cycle de vie des bactériophages (bactériophages virulents et tempérés)

Les bactériophages se caractérisent par des cycles de vie en interaction directe avec les bactéries qu'ils infectent. Tous les bactériophages ont une phase d'adsorption à la cellule hôte, puis soit ils pénètrent entièrement dans la cellule, notamment s'ils sont enveloppés (ex : Phi6), soit ils injectent leur génome à travers la membrane bactérienne. Ensuite, selon qu'ils sont virulents ou tempérés, ils entrent dans une phase productive, ou dans une phase de latence (Fig. 11).

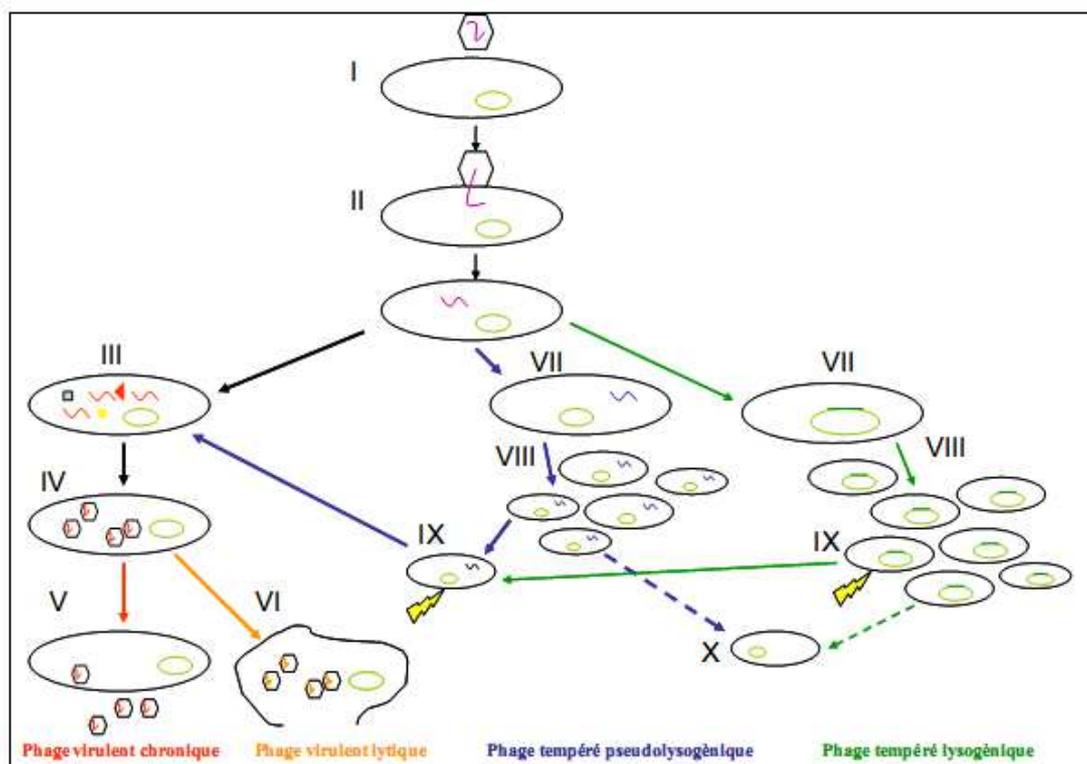


Fig. 11 : Cycles de vie des bactériophages.

I Adsorption ,II Injection du génome ,III Réplication, transcription, traduction virale , IV Assemblage des (pro)virions, V Sortie par bourgeonnement ou extrusion, VI Lyse, VII Génome viral « dormant », VIII Transmission verticale, IX Réactivation du virus (stress environnemental),X Perte du génome viral.

Les génomes des **bactériophages tempérés**, eux, sont intégrés (bactériophages lysogéniques, exp. λ) ou non (bactériophages pseudolysogéniques, exp. P1) au génome bactérien. Ils sont répliqués avec le génome hôte et transmis verticalement aux nouvelles générations bactériennes, ils sont dits « dormants » ou encore « prophages ». Le génome viral peut être perdu au cours d'une division cellulaire. Il peut aussi être réactivé, notamment en cas de stress environnemental (UVs, pauvreté du milieu extérieur) et entrer dans un cycle productif lytique. Les bactériophages tempérés lysogènes ou pseudolysogènes peuvent réprimer l'activation du cycle lytique, et assurer ainsi leur transmission verticale d'une génération bactérienne à l'autre. Ce faisant, ils empêchent les bactériophages tempérés du même type d'infecter la bactérie hôte, et lui apportent donc une certaine immunité contre ces bactériophages apparentés.

VI. Spécificité d'hôte des virus

Les études de la diversité des virus révèlent que la plupart des espèces peuvent être retrouvées dans des biomes différents. Cela suppose soit qu'il existe des hôtes identiques dans les différents biomes, soit que les virus ne sont pas spécifiques d'un hôte et peuvent s'attaquer aux hôtes qu'ils trouvent dans un biome donné, ou encore que ces deux conditions sont réunies. Or, on a longtemps considéré que les bactériophages avaient un spectre d'hôte étroit (une seule espèce bactérienne, ou même un seul sérotype), c'est-à-dire qu'ils n'infectent que des bactéries proches les unes des autres. Cela étant lié au fait que certains bactériophages ne reconnaissent que le récepteur très spécifique de leur hôte, et montrent peu (ou pas) d'affinité pour les récepteurs ayant une structure très légèrement différente. Cette stricte correspondance permet d'ailleurs d'utiliser certains bactériophages pour différencier leurs bactéries hôtes par lysotomie.

Cependant il a été montré que certains phages ont un spectre d'hôte étonnement étendu (plusieurs genres bactériens). Dans certaines conditions il peut y avoir adaptation d'un virus à un nouvel hôte, plus au moins proche de l'hôte ancestral, avec ou sans perte de la capacité de lyser cet hôte ancestral. Cette capacité qui permet aux phages d'étendre leur spectre d'hôte, n'est pas sans rappeler la capacité des virus à changer d'hôte, ce qui peut être à l'origine de nouvelles maladies virales humaines. Exp. VIH (virus du sida) : l'hôte d'origine est un chimpanzé, Coronavirus (virus du syndrome SRAS : syndrome respiratoire aigu sévère) : l'hôte d'origine est la chauve souris, H1N1 (virus de la grippe A) : peut être d'origine porcine ou aviaire.

VII. Transferts génétiques

Les bactériophages contribuent aux transferts horizontaux de gènes entre espèces bactériennes de façon indirecte (transduction). Lors de la lyse cellulaire, L'ADN génomique de la cellule hôte est morcelée, il arrive que des fragments d'ADN soient encapsidés accidentellement dans la capsid virale. On obtient donc un phage recombinant, qui s'il infecte une cellule, il ne créera pas de cycle viral. Ce mécanisme de transduction généralisé permet des échanges génétiques de fragments d'ADN pouvant aller jusqu'à 200kb. Enfin les bactériophages lysogènes peuvent aussi « capturer » dans leur génome des gènes bactériens d'intérêt (résistance aux antibiotiques, gènes de virulence...) qu'ils peuvent par la suite propager au sein des espèces.

VIII. Intérêt d'étude des virus de procaryotes

VIII.1. Pour un enjeu en biodiversité : les bactériophages participent à la diversification des espèces bactériennes par les transferts horizontaux. Exp. Dans l'espèce *E. coli* par exemple, seuls environ 2000 gènes sont conservés entre toutes les souches sur les 4000-5000 gènes constituant leur génome.

VIII.2. Pour un enjeu en biotechnologie moléculaire

VIII.2.1. En utilisant leur cycle lysogène : Le besoin de cloner des fragments d'ADN de plus en plus gros, a amené les scientifiques et les industriels à développer de nouveaux outils. Un des ces derniers, appelé fosmide. Un fosmide ou cosmide est un vecteur artificiel constitué d'un plasmide hybride contenant la séquence COS du phage λ (lamda) qui infecte *E. coli*. La séquence COS du phage λ est une séquence longue (200 pb) nécessaire pour l'empaquetage *in vitro* du plasmide (porteur d'un insert) dans la tête du phage λ . Un plasmide normal peut porter entre 1 à 20 Kpb alors qu'un cosmide peut apporter jusqu'à 45Kpb d'ADN. Les cosmides peuvent être encapsidés dans la capsid du bactériophage de façon à transférer uniquement les gènes d'intérêts dans des cellules bactériennes par transduction. La capsid du vecteur peut apporter uniquement le cosmide et non pas le matériel génétique du phage λ . La cellule hôte lysogène va alors assurer la multiplication de son génome mais aussi celle de l'ADN cloné dans le vecteur. Ce système permet donc de générer des banques de clones contenant des inserts de grande taille.

VIII.2.2. En utilisant leur acide nucléique : Etant donné leur relative petite taille, les acides nucléiques phagiques sont souvent utilisés, après digestion par des enzymes

de restriction adéquates, comme marqueurs de haut poids moléculaire. Les exemples les plus connus sont le phage λ et le phage ϕ X 174.

L'acide nucléique des phages peut également être employé comme matrice pour des tests d'activité de certaines enzymes. Par exemple, le phage ϕ X 174, qui possède un ADN simple brin circulaire, est utilisé pour des tests d'activité nickase (clivage d'un brin d'ADN) ou ADN polymérase (copie d'un brin d'ADN à partir d'une matrice simple brin circulaire). Le génome de certains virus de procaryotes peut également être un outil génétique. Le virus SSV1, qui infecte le genre archéen *Sulfolobus*, a servi à l'élaboration d'un vecteur navette entre *Sulfolobus solfataricus* et *Escherichia coli*. Ce dernier, appelé pKMSD48, est inductible aux rayons UV. De plus, il permet la production de particules virales infectieuses et morphologiquement similaires à celles de SSV1. Enfin, il est présent de façon stable dans la cellule sous deux formes : une forme double brin circulaire multicopie (20 à 40) et une forme intégrée au génome de l'hôte grâce à son intégrase. Ses caractéristiques en font le premier système efficace de transformation chez les archées.

VIII.2.3. En utilisant leurs enzymes : A l'heure actuelle, les enzymes issues de virus archéens sont relativement nombreuses. Aucune n'est cependant exploitée par les entreprises de biotechnologie moléculaire car leur activité demeure souvent indéterminée. Elles représentent malgré tout une piste importante pour les années futures, notamment parce qu'elles sont un réservoir potentiel de nouvelles fonctions biologiques pouvant parfois se présenter sous la forme d'enzymes multifonctionnelles, comme c'est le cas chez les plasmides archéens. Les premières enzymes à avoir été exploitées sont les polymérases (ARN polymérases et ADN polymérases). Une des ARN polymérase phagique les plus utilisées est l'ARN polymérase ADN dépendante du coliphage T7. C'est une protéine de 100 kDa qui reconnaît spécifiquement un promoteur de 17 pb. Aucun activateur ou cofacteur n'est requis pour l'initiation, la transcription processive ou la terminaison. Elle est surtout employée pour la synthèse de transcrits (ARNm et ARNi) et de sondes marquées.

En ce qui concerne les ADN polymérases, une des plus employées est celle du phage ϕ 29. Cette enzyme synthétise de l'ADN avec une exceptionnelle processivité doublée d'une extraordinaire activité de déplacement de brin. Ses applications sont diverses : amplification par cercle roulant pour les plasmides et génomes phagiques circulaires, amplification par déplacement multiple pour les ADN rares ou encore amplification de gros fragments par couplage avec d'autres protéines du phage ϕ 29. Les autres catégories d'enzymes phagiques très fréquentes en biologie moléculaire sont les ligases. La plus connue est l'ADN ligase ATP-dépendante du bactériophage T4. Elle lie de façon covalente des molécules d'ADN

double brin ayant soit des extrémités 5' et 3' phosphorylées, soit des extrémités cohésives obtenues grâce à une digestion par des enzymes de restriction. La principale application de cette enzyme réside dans le clonage où elle permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur. Il existe également des ARN ligases. Ainsi, très récemment, deux ARN ligases thermostables et homologues à la ligase 1 du phage T4 ont été isolées de virus infectant des bactéries des genres *Rhodothermus* et *Thermus*. Ces enzymes sont capables de ligaturer à haute température (optimum aux environs 60°) deux molécules d'ARN ou d'ADN simple brin.

VIII.3. Pour un enjeu en thérapeutique

VIII.3.1. En tant qu'« antibiotiques » : Les endolysines sont des enzymes codées par les bactériophages qui détruisent le peptidoglycane des bactéries lors de la phase terminale du cycle viral. Etant donné leur spécificité et leur grande activité, elles peuvent notamment être utilisées comme agent thérapeutique.

VIII.3.2. Pour la synthèse d'anticorps spécifiques : La technique du « phage display » correspond à une expression de protéines (y compris des anticorps) ou de peptides grâce à un bactériophage filamenteux. Les séquences d'ADN codant pour ces molécules sont intégrées dans le génome du virus de façon à ce que les protéines ou les peptides présentés à la surface du bactériophage soient fusionnés avec des molécules capsidiales du phage. Dans le cas du bactériophage M13, l'ADN codant pour la protéine ou le peptide d'intérêt est lié au gène pIII ou pVIII, qui codent respectivement pour les protéines de capsidie. Des sites multiples de clonage sont parfois utilisés de sorte que le gène soit au moins une fois transcrit correctement. L'hybride d'ADN constitué par le gène du phage et le gène d'intérêt est inséré dans *Escherichia coli*, de façon que le phage modifié soit produit par la bactérie (Fig. 12). Les phages recombinants sont sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible (Fig. 13). Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés et amplifiés par infection de bactéries. Les phages amplifiés sont sélectionnés à nouveau sur la même cible. Après 3 à 4 tours de sélection-amplification, les phages sélectionnés sont analysés et testés pour l'activité recherchée.

VIII.3.3. En tant que vecteurs pour la thérapie génique : La thérapie génique consiste principalement à injecter un gène « correcteur » dans une cellule pour remplacer le gène défectueux. Dans ce domaine, les virus sont les vecteurs les plus fréquemment utilisés.

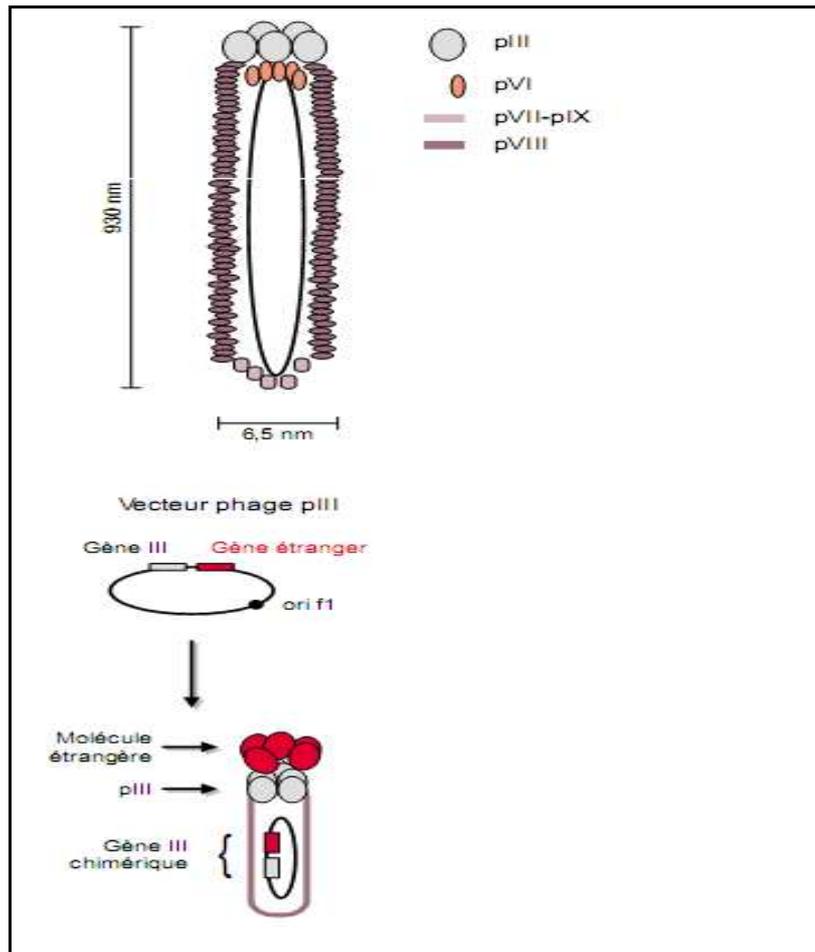


Fig. 12 : Représentation schématique du bactériophage filamenteux

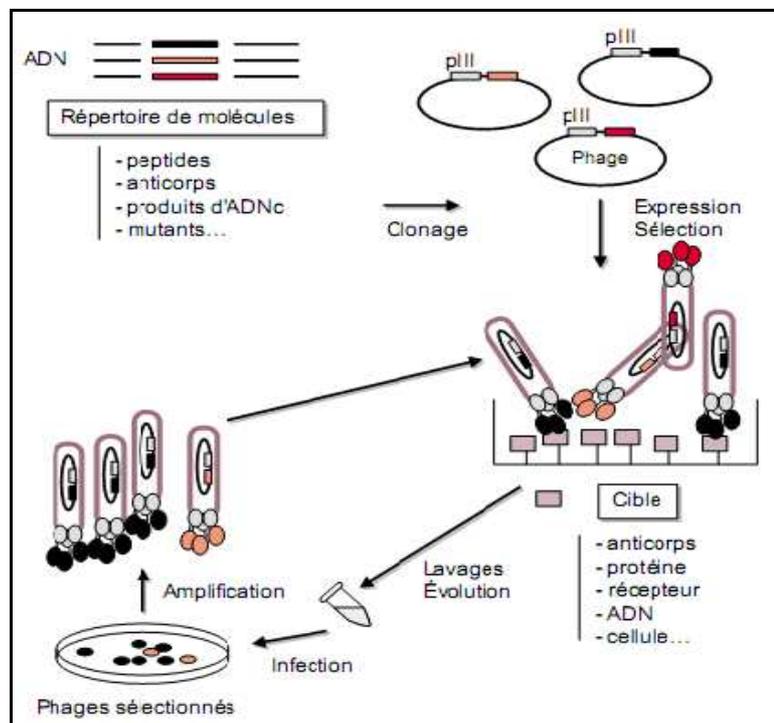


Fig. 13 : Sélection d'un répertoire de molécules exprimées à la surface du phage filamenteux pour leur liaison à une cible.

Chapitre IV : Ecologie moléculaire microbienne

Les bactéries, avec les autres micro-organismes participent pour une très large part à l'équilibre biologique existant sur la surface de la terre. Ils colonisent en effet tous les écosystèmes (eau, air, sol, aliment...etc.) et sont à l'origine de transformations chimiques fondamentales lors des processus biogéochimiques responsables du cycle des éléments naturels.

Pour comprendre comment les microorganismes interagissent avec leur environnement, les microbiologistes ont longtemps été limités à des approches dites « culturelles » pour étudier les activités et la diversité microbiologique des écosystèmes alors qu'on considère que seuls 1 % des bactéries sont cultivables. La découverte de l'amplification de gènes par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) et le développement des méthodes moléculaires à partir des années 80 ont permis de commencer à ouvrir la boîte noire que représentait la diversité microbienne. A partir des années 2000, ces avancées se sont poursuivies avec le développement puis la démocratisation de méthodes de séquençage dites de prochaine génération, en particulier, la métagénomique ciblée ou metabarcoding qui fait référence à l'étude des séquences d'un gène connu et amplifié.

I. Génomique et méta-génomique

La génomique bactérienne, permet l'étude des génomes bactériens, elle est principalement basée sur l'isolement et la culture d'une bactérie donnée. L'obtention d'une culture pure est une étape essentielle pour relier le phénotype particulier d'une souche bactérienne à son contenu en gènes, notamment pour étudier spécifiquement sa virulence, sa pathogénicité ou sa résistance. Néanmoins, la très grande majorité des bactéries (plus de 99%) sont non cultivables. Ainsi, afin d'étudier une communauté bactérienne dans son ensemble, il est aujourd'hui possible de séquencer l'ADN de toutes les bactéries présentes dans un milieu donné (sol, eau, tube digestif de l'homme et des animaux, échantillons cliniques...). Cette approche, nommée «méta-génomique», nous renseigne sur la diversité et l'abondance relative des microorganismes présents.

Le terme **méta-génomique**, ou encore **génomique environnementale** ou **génomique des communautés**, indique l'étude des méta-génomes, qui lui-même réfère à l'ensemble des séquences d'ADN extraites de communautés multi-espèces prélevées dans l'environnement.

Ces communautés sont généralement composées d'organismes non cultivables, soit qu'ils ne sont pas ciblés par les conditions de culture car non connus, soit qu'ils résistent aux tentatives de culture. A l'inverse de la génomique qui consiste à séquencer un unique génome, la méta-génomique séquence les génomes de plusieurs espèces différentes dans un milieu donné.

Le terme « omique » est la quantification ou caractérisation de molécules d'origine biologique pour détecter les fonctions, la structure, la physiologie et les mécanismes moléculaires d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes. Ce terme regroupe alors les différentes approches permettant de caractériser la diversité génétique et fonctionnelle des microorganismes dans leur ensemble sans a priori et par l'analyse en haut débit des ADN (métagénomique), ARN (métatranscriptomique), protéines (métaprotéomique) ou des métabolites (métabolomique).

L'ADN est la molécule ciblée en génomique environnementale et son étude permet d'accéder à la densité et à la diversité des communautés microbiennes, l'ARN reflète l'ADN transcrit et permet d'accéder à la quantification et l'identification de populations ou métabolismes actifs dans un environnement donné. La protéomique cible les protéines synthétisées à partir des ARN par les communautés microbiennes et permet d'accéder à la fonctionnalité à travers l'étude des enzymes produits et réellement responsables d'une activité dans un environnement donné. Enfin, l'étude des métabolites synthétisés par les communautés microbiennes permet l'identification de produits finaux ou intermédiaires de leur activité.

La métagénomique est une approche de plus en plus populaire dans plusieurs domaines dont l'écologie, la biologie médicale, la criminalistique, etc. Elle s'intéresse principalement à l'étude des microbiomes (les microbes qui font partie intégrante des organismes vivants), mais peut aussi s'appliquer à l'étude de populations où il y a présence d'eucaryotes (ex : zooplancton dans un lac). Pour les eucaryotes il n'y a pas de problème au séquençage, car ces organismes multicellulaires peuvent produire de grandes quantités d'ADN. Cependant, pour les procaryotes cela peut poser problème puisque ce sont des organismes unicellulaires possédant de petits génomes. Il faut donc soit faire des cultures pour dupliquer ces cellules, sachant que la majorité de ces organismes ne peuvent survivre en milieu contrôlé, ou utiliser la technique « Single Cell Sequencing ». Cependant, l'inconvénient de cette dernière est qu'il peut y avoir certaines régions du génome qui sont favorisées : seulement 40% du génome est couvert en moyenne à la suite de l'amplification par PCR des gènes.

II. Types d'analyse des données métagénomiques

L'analyse de données métagénomiques cible donc une communauté et cherche à caractériser cette communauté afin de pouvoir faire des analyses différentielles entre plusieurs conditions, par exemple, ou seulement d'en apprendre plus sur une communauté. Il existe ainsi quatre types d'analyse des données métagénomiques possibles :

1- L'analyse taxonomique : un inventaire des taxons ou espèces présentes dans le milieu et leurs abondances.

2- Assemblage des différents génomes : assemblage partiel ou global des génomes d'espèces présentes dans le milieu selon la technique de séquençage utilisée.

3- L'analyse fonctionnelle : permet de déterminer la fonction d'une communauté dans son ensemble ou de diviser cette communauté en sous-groupes fonctionnels interagissant ensembles. Peut mener à la cartographie des voies métaboliques présentes dans une communauté.

4- **L'analyse comparative : comparaison des données de plusieurs communautés provenant de différents milieux du même type (ex : microbiome racinaire d'une espèce d'arbre présente dans différents sols) ou conditions d'un même milieu (ex : microbiome buccal avec et sans maladie).**

III. Approches de la méta-génomique : Deux approches sont principalement utilisées

III.1. Métagénomique ciblée

Cette approche consiste à l'amplification puis au séquençage d'une région ou portion particulière du génome relativement petite en quelques centaines de paires de bases. Cette région est appelée marqueurs conservés, généralement on utilise les RNAs ribosomiaux comme marqueurs. Pour les bactéries, il s'agit de l'ADN ribosomal 16S, qui est un excellent marqueur phylogénétique et un taux de mutation relativement stable puisque sa fonction est essentielle à l'organisme (Fig.14).

Plusieurs autres marqueurs sont possibles dépendamment de l'ordre taxonomique observé. Ainsi pour les bactéries, on peut aussi utiliser ITS, CPN60 et RescA par exemple. Pour les eucaryotes, on utilise principalement l'ARN 18S qui est l'équivalent de l'ARN 16 des procaryotes et ITS. Pour les virus, on peut entre-autres utiliser Gp23 (bacteriophagesT4-like), RdRp (picornaviruses).

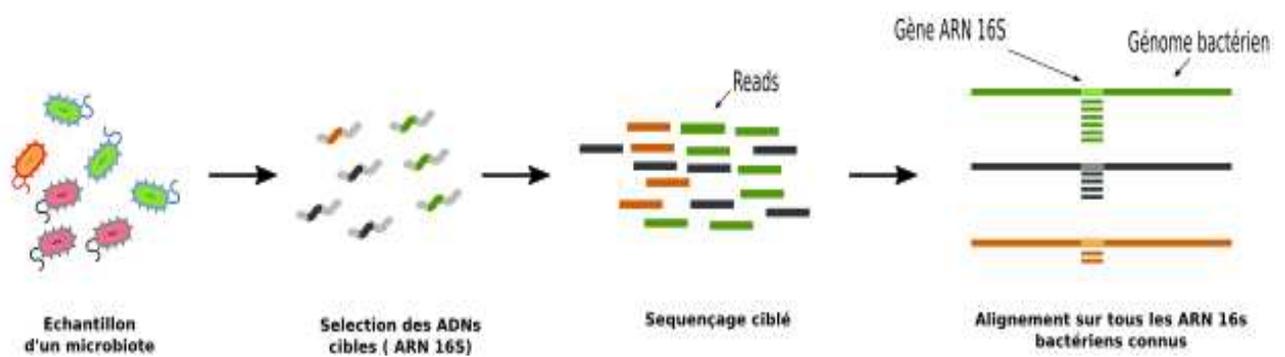
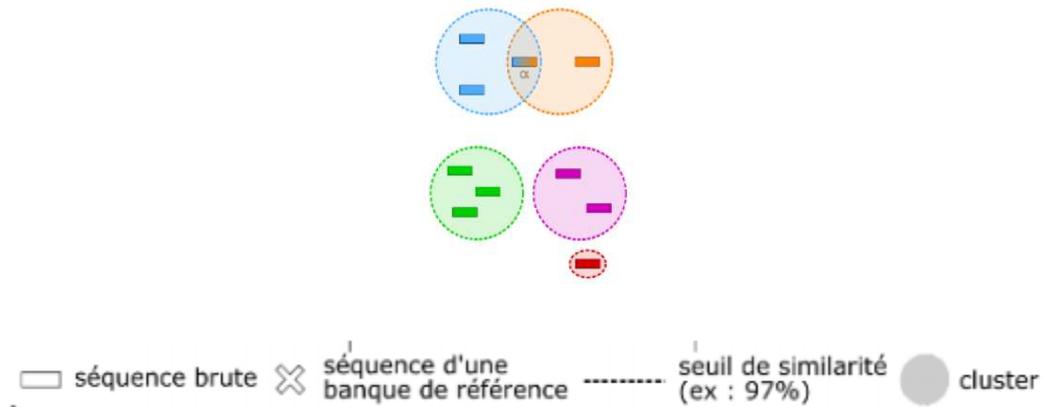


Fig. 14: Stratégie ciblé : Seuls les ADNs du gène cible sont séquencés. En bactériologie, le gène cible est l'ARN 16S.

À la suite d'un séquençage, les « reads » (une séquence d'un fragment d'ADN) appelés « Operational Taxonomic Units » (OTU) sont regroupés par similarité. Ainsi, on peut produire un graphique des groupes (« Clusters ») afin de les identifier à un taxon ou une fonction. Ces groupes peuvent être comparés ou non à une référence selon trois stratégies : *de novo* où on ne compare pas à une référence; *closed-reference* où on se base uniquement sur la comparaison à des séquences connues; *open-reference* où on allie les deux autres stratégies.

Il existe de nombreux logiciels dédiés à l'analyse de diversité de communautés échantillonnées. Plusieurs logiciels sont disponibles en libre accès, tels que MOTHUR et QIIME. MOTHUR qui est fréquemment utilisé dans l'analyse de l'ADN de microorganismes non cultivés. Il est capable de traiter les données générées par plusieurs méthodes de séquençage d'ADN, notamment la méthode de séquençage Sanger, les méthodes de nouvelle génération (pyroséquençage 454 et Illumina HiSeq) et de troisième génération (PacBio). QIIME quant à lui, est un outil plus complet et plus flexible, puisqu'il est 43 fois capable d'exécuter des analyses de diversité en utilisant aussi bien les gènes codant pour l'ARNr 16S, que les marqueurs non-ribosomiques. De plus, il est compatible avec les "reads" issus des technologies de Sanger et de pyroséquençage 454, et permet d'exécuter des analyses taxonomiques comparatives de métagénomés.

1. **Stratégie *de novo*** : basée uniquement sur les propriétés intrinsèques des séquences (similarité entre les séquences) et une comparaison 2 à 2 de toutes les séquences



Elle fait appel à deux types de méthodes :

a. Clustering hiérarchique : Comparaison 2 à 2 des reads. Au départ, chaque read est un cluster isolé. La matrice de distance va permettre de définir les clusters. Le clustering hiérarchique va regrouper les clusters les plus proches en un seul cluster, de manière itérative jusqu'à ce qu'il n'y ait plus qu'un seul cluster contenant tous les reads (Fig.14).

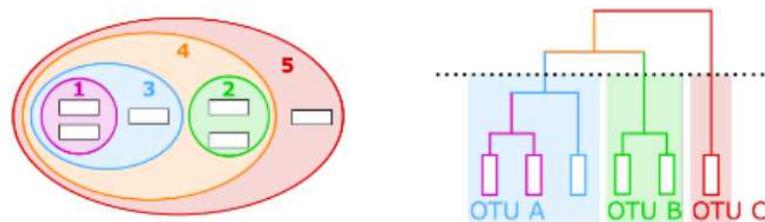


Fig. 14: Clustering hiérarchique

b. Clustering centroïdes: les reads sont d'abord triés par longueur et/ou par abondance décroissante, partant de l'hypothèse que les séquences les plus longues et les plus abondantes contiennent un signal biologique fort (Fig.15). Le premier read de la liste est considéré comme étant le centroïde du premier cluster. Le read suivant est comparé à ce centroïde, si leur identité est supérieure au seuil choisi pour définir un cluster (par exemple 97 %), alors le read est ajoutée au cluster existant. Sinon, il devient le centroïde d'un nouveau cluster.

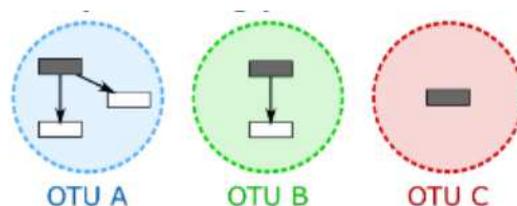


Fig.15 : Clustering centroïdes

Tous les reads sont ainsi comparés aux centroïdes définis au fur et à mesure => évite la comparaison de toutes les séquences entre elles.

2. **Closed-reference** : Similaire à l'approche *de novo* par centroïdes à l'inverse, on n'utilise pas des reads comme centroïdes, mais les séquences d'une banque de référence. Chaque read est ainsi comparée à toutes les séquences de la banque considérées comme centroïde, et est assignée au cluster dont le centroïde y est le plus similaire (Fig.16).

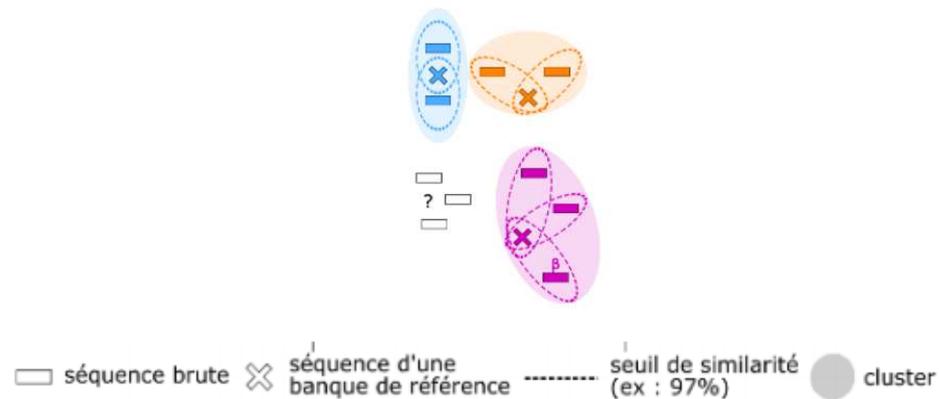


Fig. 16 : *Closed reference*

3. **Open-reference** : Mélange des deux approches précédentes ; d'abord une analyse *closed-reference*, puis une analyse *de novo* sur les séquences qui ne s'alignent pas avec la banque de référence (Fig.17).

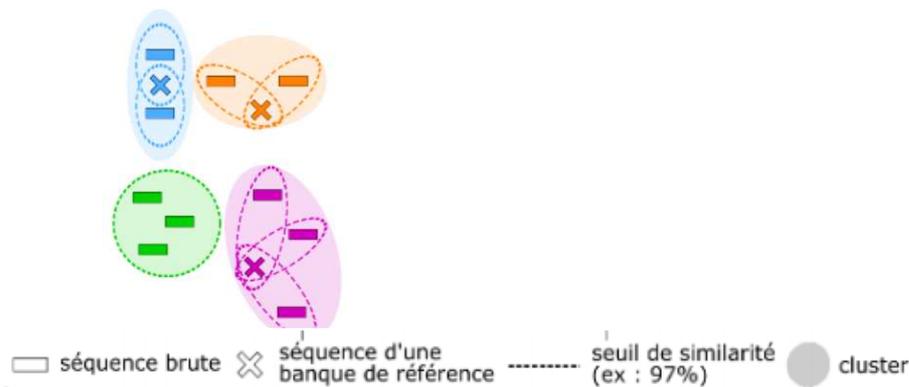


Fig.17 : *Open reference*

III.2. Métagénomique globale (stratégie WGS : *Whole-Genome Shotgun*)

Comme son nom l'indique, cette stratégie permet d'étudier la composition globale du microbiome de l'échantillon environnemental. De plus, cette technique est effectuée sans faire d'amplification préalable des génomes. L'ensemble des ADN du microbiote sont séquencés générant ainsi une importante quantité de fragments géniques de tous les organismes présents. Un assemblage des séquences obtenues en les comparants par

alignement sur des génomes référencés permettent d'identifier les espèces connues formant le microbiome. Les génomes inconnus assemblés *de novo* puis annotés et incorporés dans des bases de données (Fig.18)

Il existe deux approches à la stratégie WGS, la première est basée sur les « reads » et cherche à classifier les « reads » dans une optique de taxonomie et de fonction. L'alignement est donc fait avec des génomes de références dès le début et peut être pratique pour la détection d'organismes d'intérêt. La deuxième stratégie est basée sur l'assemblage, on y assemble tous les fragments *de novo* en groupements génomiques puis ils sont comparés à des génomes connus (« *binning* ») (triés). Cette deuxième stratégie permet la découverte de nouveaux génomes plus facilement

Cette approche demande plus de ressources de séquençage et est donc moins sensible que la précédente pour étudier la biodiversité. Il est toutefois probable que cette approche devienne la méthode de choix, en raison des multiples informations de fonctions géniques qu'elle seule peut apporter.

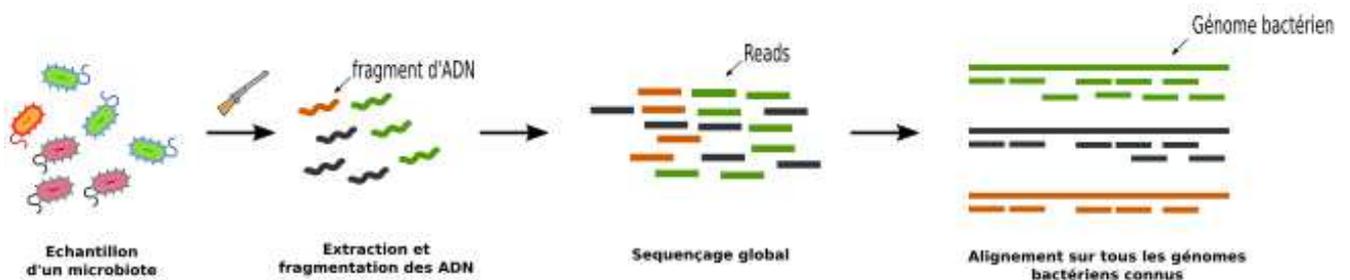


Fig.18 : Stratégie globale : L'ensemble des ADNs présents dans un échantillon de microbiote sont séquencés.

Chaque stratégie a son avantage. La métagénomique globale est plus précise dans le sens où elle séquence l'ensemble du génome d'une bactérie alors que la seconde ne s'intéresse qu'à un seul gène. Cette première stratégie permet par exemple de décrire le fonctionnement global du microbiote en séquençant l'ensemble des gènes présents.

La stratégie ciblée est quant à elle plus sélective. En effet, le gène de l'ARN 16S est présent uniquement chez les bactéries qui seules seront séquencées. La stratégie globale va séquencer tous les ADN présents dans le milieu sans discernement, qu'ils soient bactériens, viraux ou encore humains.

IV. Limites de la métagénomique

La métagénomique a plusieurs limites :

1. Approche descriptive : la métagénomique permet de décrire et identifier les espèces présentes dans le microbiote étudié. La compréhension du fonctionnement de la variation des microbiotes reste un enjeu à appréhender et l'intégration des métadonnées relative à l'écosystème devrait permettre d'orienter la métagénomique vers une direction explicative et prédictive.

2. Absence d'une méthode standard de référence et analyse des données générées : Tel que vu dans les outils, il existe de nombreux « *workflow* » pour l'analyse des données métagénomiques ce qui les rend difficile à comparer entre elles. De plus, il n'existe aucun consensus sur l'approche analytique à mener dans un contexte métagénomique malgré l'abondance de l'offre des logiciels d'analyses. Cela est dû au fait qu'il n'existe pas une méthode ou un processus de référence à suivre pour mener un projet métagénomique.

3. La sélection d'un locus cible suffisamment discriminant entre les organismes d'intérêt, fortement limitée par la courte taille des lectures de séquençage (< 500 nt). Au vu de cette quantité d'information restreinte, la métagénomique ne permet ainsi pas d'obtenir une image détaillée du microbiote d'intérêt, l'information contenue dans la littérature n'étant pas souvent suffisante pour discriminer les espèces entre elles. Le profilage phylogénétique pourrait être amélioré par l'utilisation des 40 gènes essentiels au lieu de se focaliser seulement sur le 16S puisque cela entraîne une diminution de la résolution des résultats.

Chapitre V : Interaction entre les microorganismes et l'environnement

Les changements des conditions de l'environnement conduisent à des réactions ou à des comportements inhabituels dans une communauté microbienne, on parle de **stress cellulaire**. Le **stress cellulaire** est défini comme tout changement dans l'expression du génome ou dans le protéome, qui imposent un taux de croissance réduit.

Les principaux facteurs provoquant le stress cellulaire et limitant l'activité biologiques des microorganismes sont :

1. Le déficit hydrique qui provoque la salinité et l'osmolarité ;
2. Variation de la température et pH ;
3. Variation de gradient d'O₂ ;
4. Carences en éléments nutritionnels.
5. Présence d'antibiotiques ou de toxines,...etc.

Face au stress, chaque espèce bactérienne possède ses propres voies de réponses. Les différentes réponses à l'échelle cellulaire les plus courantes chez les bactéries sont :

1. Fuir le stress (bactéries mobiles);
2. Former des spores de résistances (bactéries sporulantes) ;
3. Produire des facteurs de virulences telles que des toxines (cas des bactéries pathogènes lors de l'attaque invasive)
4. Se développer sous forme de biofilms ;
5. Eliminer le stress (dégradation de molécules toxiques telles que les antibiotiques) ;
6. Tolérer le stress (réparation des dommages intracellulaires et adaptation physiologique et moléculaire, production de protéines spécifiques face au stress thermique (ex : heat shock proteins), ...etc.).
7. Etat de VNC

Ces différentes réponses sont coordonnées par un processus de régulation appelé « Quorum Sensing ».

Pour qu'une bactérie réponde aux variations de l'environnement, il faut qu'elle reçoive un signal. Ces signaux sont des molécules qui diffèrent d'une bactérie à une autre. Ces molécules sont spécifiquement reconnues par des récepteurs spécifiques. Ces derniers sont exprimés soit à la face externe ou bien interne de la membrane périplasmique. Généralement

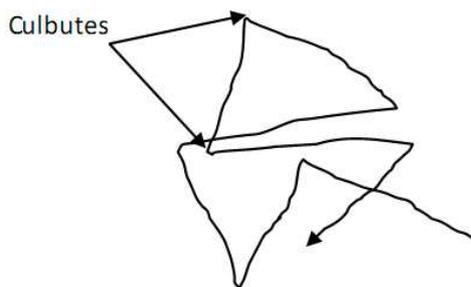
les molécules qui se fixent sur la surface sont des molécules hydrosolubles, et celles qui se fixent à l'intérieur sont lipophiles. Lorsque le complexe est formé (molécule /récepteur) l'activité biologique des microorganismes sera modifiée. La transduction du signal est l'étape commune pour toutes les réponses, elle désigne le mécanisme par lequel une cellule bactérienne répond à l'information qu'elle reçoit par des molécules spécifiques, ces dernières déclenchent une cascade de signaux secondaires internes à la cellule ou externe (action sur d'autres cellules).

I. Différentes réponses au stress cellulaire

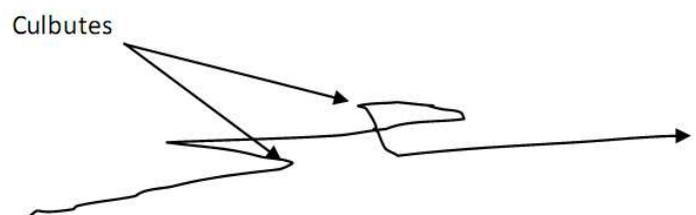
I.1. Chimiotactisme et mobilité

Le **chimiotactisme** se définit par l'effet d'attraction ou de répulsion qu'exerce une substance chimique sur une cellule vivante. Selon l'effet produit, on parle de chimiotactisme positif (attraction) ou négatif (répulsion). Le phénomène de **chimiotactisme** est détecté chez les bactéries mobiles, donc c'est la propriété de certains microorganismes d'être attirés ou repoussés par des substances chimiques. Ce sont généralement les bacilles qui possèdent une mobilité.

Les bactéries ont une nage aléatoire ce qui ne permet pas vraiment une orientation efficace de la bactérie; elle n'avance pas beaucoup. Les bactéries vont être sensibles aux gradients chimiques (variations de certains composés). Certaines substances attirent les bactéries mobiles, d'autres les repoussent. Selon la composition du milieu de culture, on distingue 2 types de trajectoires :



Les mouvements sont aléatoires. Il y a de nombreuses culbutes. Aucune direction claire ne se dégage, en absence de gradient, le milieu de culture est dit **neutre**.



Les **distances sont plus longues**, il y a moins de **culbutes**. Une **direction claire** apparaît en fonction d'un **gradient de substances attractives ou répulsives**.

La bactérie est capable de moduler la fréquence de ses changements de directions ; c'est à dire que quand elle se déplace vers des substances attractives, elle va changer moins vite de direction (sauf si elle se retrouve à contre sens (sens des aiguilles d'une montre)).

Exemple : *E. coli* se trouve dans un milieu hydrique, pauvre déficient en nutriments ou en présence de toxines ou antibiotiques, deux types de mouvements sont distingués :

- Une rotation dans le sens inverse aux aiguilles d'une montre c à d arrange les flagelles dans un seul faisceau synchrone : la natation « run »
- Une rotation dans le sens dse aiguilles d'une montre, les flagelles se désolidarisent (dissocient) les uns des autres, la bactérie tourne dans tous les sens mais ne peut pas se déplacer « tumble »

Donc les *E.coli* sont capables de diriger leur mouvement afin de trouver les lieux favorables ou s'enfuie d'une substance indésirable

- **Le mécanisme moléculaire**

En situation normale les protéines « FLI » qui activent l'inversion du sens de rotation des flagelles, sont stimulées par des molécules phosphorylées. Lorsque la concentration en chimio-attracteurs augmente, ces derniers se lient à leurs récepteurs qui sont alors méthylés. Cette méthylation inhibe la cascade de phosphorylation habituelle et empêche ainsi l'activation de FLI. La bactérie ne change donc pas le sens de sa nage. Il y a au niveau de la bactérie des chimiorécepteurs qui sont des molécules (jusqu'à 8 000 par cellules). Ces molécules sont aussi appelées MCP « Methyl accepting Chemotaxis Protein ». Lorsque les chimiorécepteurs reconnaissent les chimioeffecteurs, les récepteurs sont méthylés. Un chimiorécepteur est spécifique d'une ou deux molécules. Les protéines CheA et CheW se fixent au récepteur (Fig. 19).

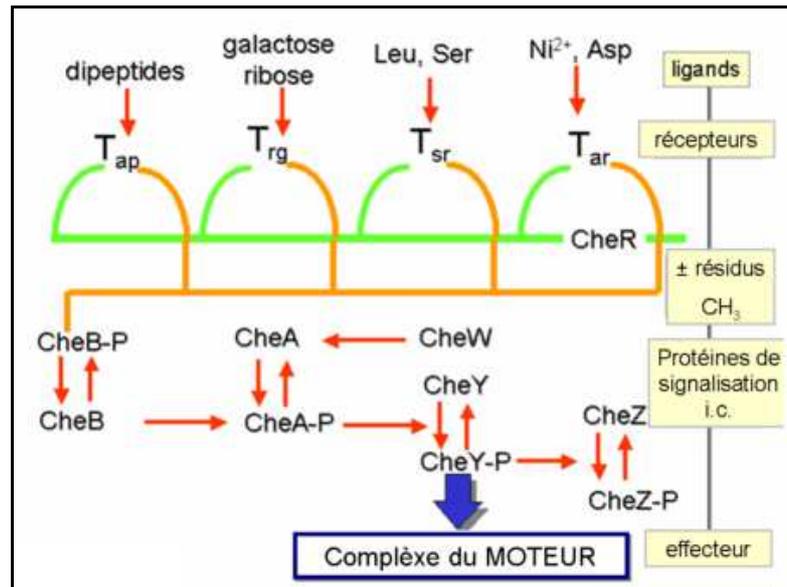


Fig. 19 : Voie de signalisation de *E. coli* (chimiotaxie).

L'activation du récepteur par un stimulus externe résulte l'auto-phosphorylation de l'histidine kinase (CheA). Puis, CheA transfère un groupe phosphoryl aux CheB et CheY. Une fois activée par CheA, CheB agit comme une méthyle estérase et enlève des groupes méthyles des résidus glutamates de la partie cytoplasmique du récepteur. Elle a un effet antagoniste par rapport à la méthyle transférase CheR qui méthyle les mêmes résidus de glutamates. CheY, en interagissant avec la protéine commutateur flagellaire, la protéine FliM, induit le changement du sens de rotation des flagelles du sens inverse des aiguilles d'une montre au sens des aiguilles d'une montre et ainsi induit le « tumbling ». La modification de l'état de rotation d'un seul flagelle peut perturber le faisceau entier et provoquer le « tumbling ».

I.2. Sporulation

Les spores bactériennes sont très différentes des spores de champignons :

- elles se forment à l'intérieur des cellules bactériennes, d'où le nom d'endospores,
- elles apparaissent lorsque la bactérie se trouve en conditions défavorables,
- ce ne sont pas des formes de dissémination mais des formes de résistance.

Il ne se forme qu'une seule spore par cellule végétative (centrale, terminale ou sub-terminale). Lorsque les conditions redeviennent favorables, la spore peut germer et donner

une nouvelle cellule végétative. 3 genres bactériens sont caractérisés par des endospores : *Bacillus*, *Clostridium* et *Sporosarcina* (Bact G+).

I.2.1. Les différentes phases de sporulation

La sporulation intervient lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance (carence en nutriments, en sels minéraux, manque d'eau). Les bactéries sporulantes entrent alors dans le stade 1.

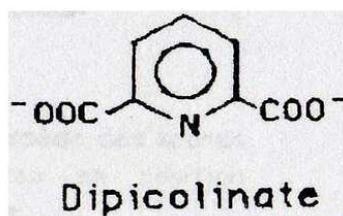
- **Stade 1** : l'ADN s'est dupliqué et se condense en formant un filament axial.

- **Stade 2** : 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.

- **Stade 3** : la membrane de la grosse cellule englobe la petite cellule qui est finalement endocytée. La petite cellule est appelée présore, elle est entourée d'une double membrane. L'ensemble est le sporange. A ce niveau, le processus de sporulation est devenu irréversible. Les stades 4, 5 et 6 correspondent à la maturation de la spore :

- **Stade 4** : 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).

- **Stade 5** : la formation du cortex et de l'exosporium se poursuit. On observe également l'accumulation d'acide dipicolinique (DPA) et de calcium dans le cytoplasme. Cette accumulation s'accompagne d'une déshydratation de la spore, et de la production de SASPs (Small Acid Soluble spore Proteins).



- **Stade 6** : la maturation de la spore s'achève par la synthèse de nouvelles enveloppes protéiques : les tuniques qui s'insèrent entre le cortex et l'exosporium. Les tuniques sont composées de protéines riches en cystéines (=> possibilité de formation de ponts di-sulfures qui stabilisent les structures).

- **Stade 7** : la cellule mère (ou sporange) est lysée sous l'effet des enzymes lytiques (Cle : Cortex lytic enzyme). Elle libère la spore mûre (Fig. 20).

L'ensemble du phénomène dure environ 7 à 10 heures (Fig. 15).

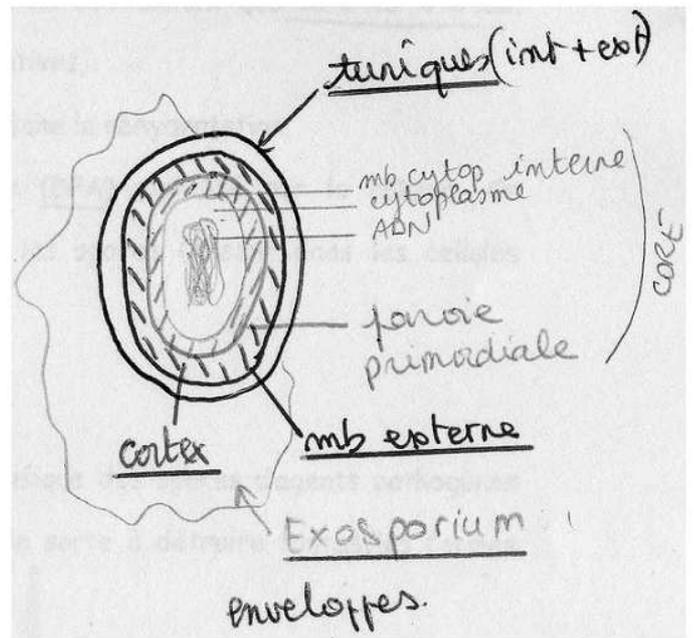
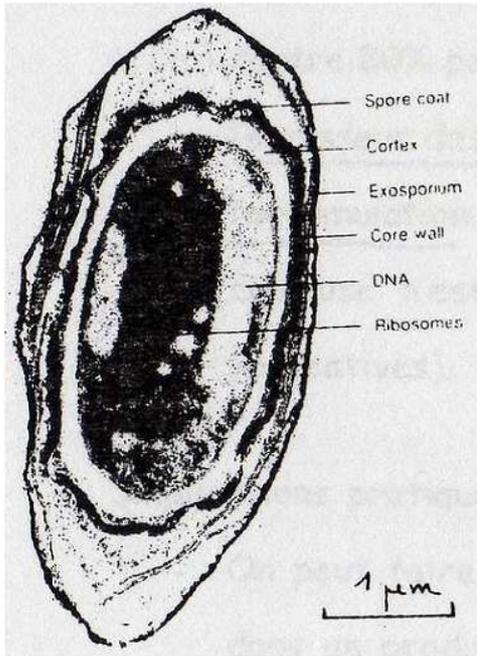


Fig. 20 : Spore bactérienne

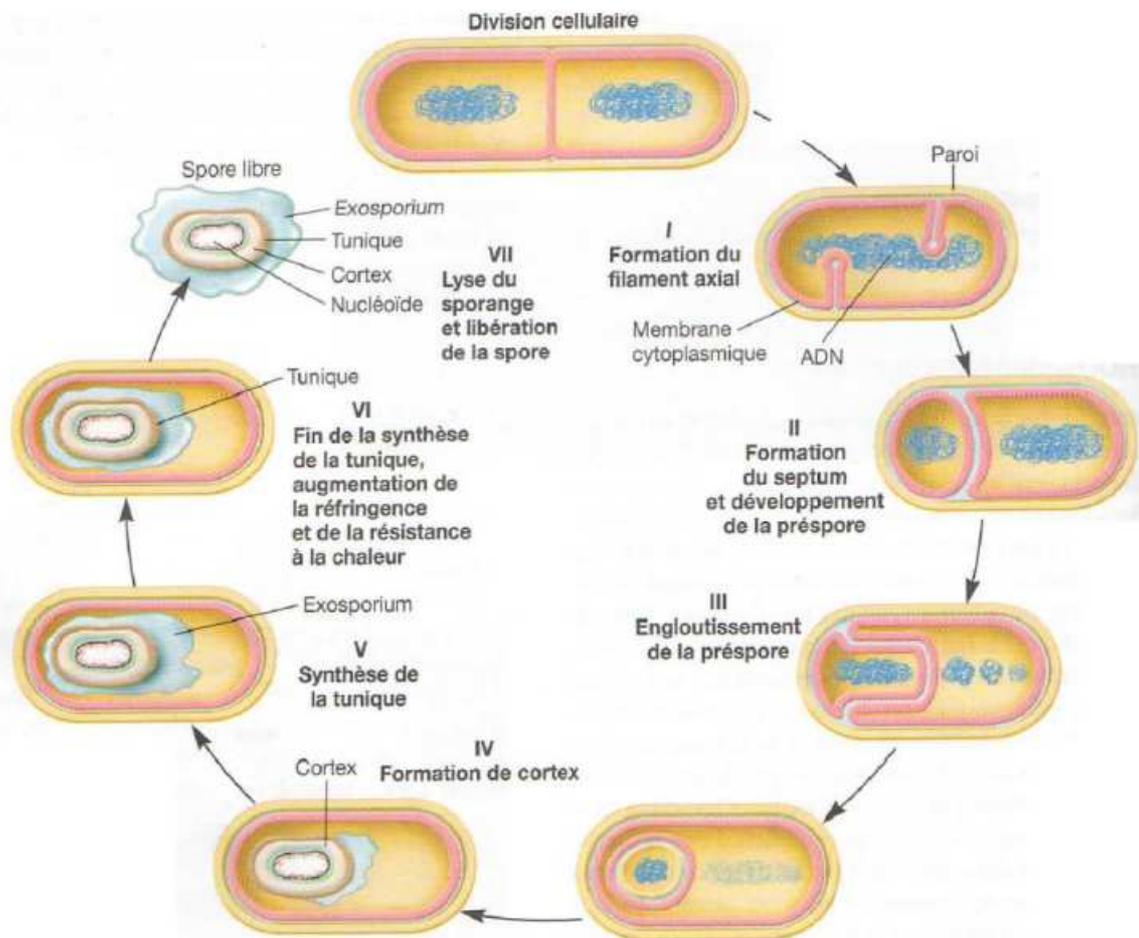


Fig. 21 : Cycle sporal

I.2.2. Germination des spores

Lorsque la spore est placée dans des conditions favorables de croissance, elle subit une série de transformations progressives et devient une nouvelle cellule végétative. Ce processus comprend 3 étapes : l'activation, l'initiation et l'émergence.

I.2.2.1 Activation

Pour pouvoir germer, la spore doit être activée par un agent capable de lyse des enveloppes sporale. Cet agent peut être de nature ou chimiques (acides), enzymatique (lysozyme), mécaniques (phénomène d'abrasion, choc), physiques (choc thermique : procédé de tyndallisation par exp.).

I.2.2.2. Initiation

L'initiation n'intervient qu'en conditions favorables : forte teneur en eau, milieu riche contenant des métabolites effecteurs (adénine, adénosine, Mg^{2+}). Ces éléments pénètrent à travers les enveloppes endommagées et déclenchent un processus autolytique avec dégradation du peptidoglycane du cortex et libération de l'acide dipicolinique. Alors la spore se gonfle d'eau et perd ses caractéristiques.

I.2.2.3. Emergence

Après sa réhydratation, la spore donne une nouvelle cellule végétative qui entre en phase active de biosynthèses : la synthèse de l'ADN reprend, la cellule double son volume, elle devient à nouveau capable de se multiplier.

I.2.3. Propriétés de la spore

1. Thermorésistance : la spore résiste à des températures allant de 70 à 80°C/ 10 min
2. Résistance aux agents physiques et chimiques (UV, X, antiseptiques, ANB,...).
3. Résiste à la dessiccation
4. Synthèse d'antibiotiques : certaines bactéries synthétisent des ANB au début de la phase de sporulation.

I.3. Production des facteurs de virulence

I.3.1. Phénomène d'adhésion : est dépendant, selon les germes, des pilis ou fimbriae (Exp. Enterobactéries hémagglutinantes), des adhésines codées par les plasmides (Exp. *E. coli* entéropathogènes) ou le glycocalix (longues fibres polysaccharidiques). Ces éléments de fixation permettent aux germes d'éviter l'expulsion par des phénomènes mécaniques tels que le flux urinaires, la toux, ou les mouvements péristaltiques de l'intestin.

I.3.2. La capsule : protège les micro-organismes contre les UV, dessiccation, les agents physiques et chimiques. Elle s'oppose à la phagocytose en diminuant l'adhésion des macrophages. Elle exerce un chimiotactisme négatif sur les leucocytes. Les cellules phagocytaires ne disposent pas des enzymes nécessaires à leur digestion. Les mycobactéries responsables de la tuberculose, par exemple, après avoir été phagocytées par des macrophages, sont transportées par ceux-ci jusqu'au sang où elles peuvent se multiplier.

I.4. Biofilm

Les biofilms bactériens sont des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique. Les bactéries peuvent aussi bien adhérer à une surface biotique (Exp. cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (Exp. plaques, équipements,...etc.).

Les biofilms résistent aux bactériophages, aux amibes, aux biocides (antibiotiques et désinfectants) et à la dessiccation. Ils permettent également aux bactéries pathogènes de résister aux réponses immunitaires de l'hôte. De plus, les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique.

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes selon un modèle bien établi (Fig. 22). Les bactéries s'adhèrent rapidement à une surface biotique ou abiotique.

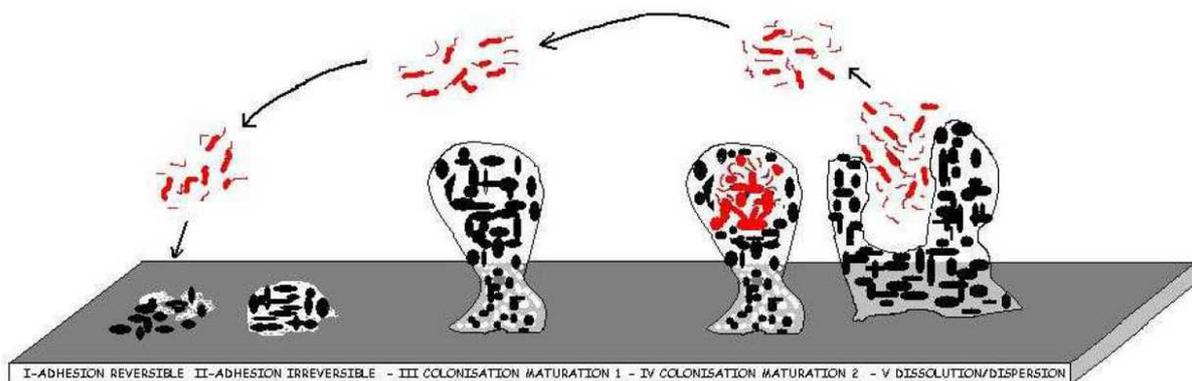


Fig. 22 : Etapes de formation de biofilms

Cette étape requiert généralement la présence de molécules ou de structures particulières à la surface de la bactérie (Exp. fimbriae, flagelle) puis l'adhésion devient lente à la suite des interactions physicochimiques des forces d'attraction (Vander waals) et de répulsion (électrostatique et acido basique). Puis les cellules bactériennes vont s'agglutiner, se

multiplier et former des microcolonies (colonisation et maturation). Lors de l'étape de maturation du biofilm, les bactéries synthétisent des polysides entrant dans la composition des polymères exocellulaires (EPS) du biofilm et d'autres constituants de la matrice polymérique. Cette dernière peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations. L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes. Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm. Le détachement et la dispersion de cellules bactériennes d'un biofilm jouent un rôle important dans la transmission de bactéries de réservoirs environnementaux à un hôte (animal ou humain), dans la transmission entre les hôtes et dans la propagation de l'infection chez un hôte.

I.5. Etat de VNC (Viable non cultivable)

Une bactérie à l'état de VNC est une bactérie dans un état de très faible activité métabolique, ne se divise pas mais elle est vivante et a la capacité de devenir cultivée (état de ressuscitation) une fois mise dans un milieu propice (Exp. Milieu riche en nutriment, augmentation de température, injection dans des souris, inoculation chez des lapins, contacte avec des hôtes spécifiques comme les protozoaires,...). Les bactéries en état de VNC ne peuvent croître sur des milieux standards et cet état peut durer une année ou plus.

L'état VNC a été observé chez certaines bactéries pathogènes parmi lesquelles *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae* ou *Campylobacter jejuni*,...etc. La carence en nutriments et la température d'incubation semble être les deux facteurs les plus déterminants dans l'entrée à l'état VNC.

Les cellules à l'état de VNC diffèrent des cellules cultivées par de nombreuses caractéristiques :

1. **La taille** : les cellules à l'état de VNC sont plus petites. Exp. *Vibrio cincinnatiensis* à l'état normal ont une forme spirale d'environ 1.8 μm à l'état de VNC deviennent coccoides d'environ 0,2 μm .
2. **La structure de la membrane** : la fluidité membranaire est modifiée lors d'un passage à l'état de VNC. La composition des acides gras de la membrane plasmique change, les acides gras ont tendance à être saturés qu'insaturés.
3. **La concentration en ATP augmente et la synthèse protéique change** (Production de certaines protéines absentes à l'état normal).

4. **Changement structuraux** : changement dans la structure de la paroi par augmentation des couches de peptidoglycane.

5. **Synthèse d'ARN et d'ADN réduite de plus de moitié**

La ressuscitation est le retour à l'état cultivable. Pour certains germes la ressuscitation nécessite des conditions particulières pour la levée de l'état de VNC. Exp. Température élevée, protéines RPF (Ressuscitation Promoting Factor) et SPS (Stationary Phase Survival). Ces deux protéines sont des peptidoglycanes hydrolases qui sont capables d'hydrolyser le peptidoglycane secrété à l'état de VNC. Elles ne sont pas secrétées en même temps chez une bactérie (les protéines PRF sont secrétées chez les Gram positifs à %CG élevé).

II. Quorum Sensing

Le quorum Sensing (QS) est un mécanisme de signalisation intercellulaire. Il permet aux bactéries de communiquer entre elles via des petites molécules médiatrices dites signal ou auto-inducteurs qui sont produites en phase de croissance bactérienne. Il permet aux bactéries de coordonner leurs réponses et d'agir comme un organisme pluricellulaire.

Les auto-inducteurs sont de petites molécules diffusables induisant en fonction de leur concentration qui reflète la concentration bactérienne l'expression de certains gènes. Chez les bactéries à Gram+, l'auto-inducteur est un dérivé de petits peptides. Chez les bactéries à Gram négatif, la majorité des molécules signal sont des N-acyl L-homoserine lactone ou homoserine lactone (HSL).

Le QS repose sur la densité de cellules bactérienne présentent dans la colonie et sur la quantité de molécules signales présentent dans l'environnement proche de ces bactéries. La quantité de molécules signal est directement liée au nombre de cellules bactériennes dans la colonie. Lorsque la densité bactérienne de la colonie augmente, la concentration de molécules signal augmente jusqu'à atteindre un certain seuil ou quorum, à partir duquel l'activité bactérienne en question est activée ou bien réprimée selon le cas. Lorsque les molécules signal sont en quantité suffisante, elles se lient à leur récepteur protéique intracellulaire et l'ensemble se comporte en facteur transcription, en se fixant à l'ADN pour réguler les gènes ciblés (Fig. 23).

Le QS coordonne et synchronise l'expression d'une multitude d'activités bactériennes au sein de la communauté comme par exemple : Processus génétiques fondamentaux : conjugaison et réplication, synthèse d'exo-enzymes, production de facteurs de virulence, production de biofilms, production d'antibiotiques et l'expression de facteurs de résistance aux antibiotiques, sporulation et bioluminescence.

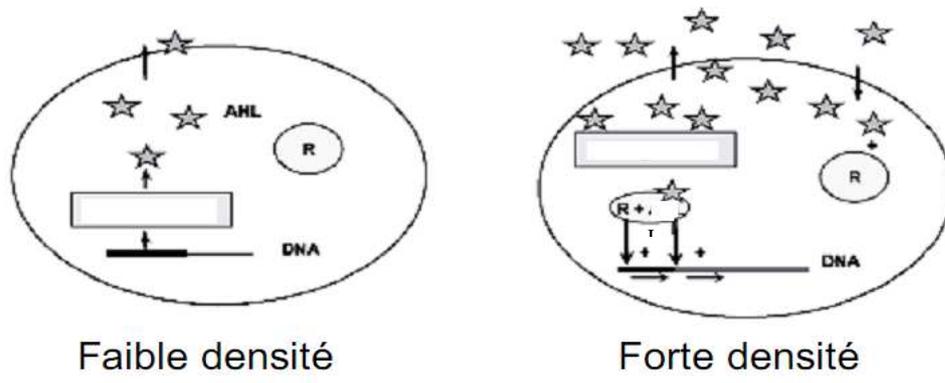


Fig.23 : Schéma général du mécanisme commun du QS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Alauzet, C. (2009). Taxonomie des bactéries anaérobies de la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes. Université Henri Poincaré, Nancy. Pp. 18-24. (<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748308>)
- [2]. Brochier, C. (2002). Phylogénie des Eubactéries et mise en évidence des transferts horizontaux de gènes. Thèse de Doctorat, Université de Paris-Sud, Orsay.
- [3]. Diene, S. M., Bertelli, C., Pillonel, T., Schrenzel, J. & Greub, G. (2014). Génomique et métagénomique bactériennes : applications cliniques et importance médicale *Revue Médicale Suisse* 10 : 2155-2161
- [4]. Forterre, P. (2005). The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells. *Biochimie* 87:793-803.
- [5]. Forterre, P., Gribaldo, S. & Brochier, C. (2005). Luca: the last universal common ancestor. *Medecine Sciences* 21:860-865.
- [6]. Forterre, P. (2007). Quand les évolutionnistes découvrent l'importance des virus. *Virologie* 11 : 5-12.
- [7]. Gould, S.B. (2012). Evolutionary genomics: Algae's complex origins. *Nature* 492: 46 – 48
- [8]. Lang, B.F., Paquin, B. & Burger, G. (2000). L'évolution moléculaire et la révolution génomique. *Medecine sciences* 16 : 212-8.
- [9]. Lebaron, P. (2016). Le quorum sensing bactérien dans l'environnement marin : diversité moléculaire et génétique des auto-inducteurs. Thèse de Doctorat de l'université Pierre et Marie curie, France. Pp. 23-36.
- [10]. Martin, W. & Muller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392: 37-41.
- [11]. Paolozzi, L. & Liebart, J.C. 2019. Introduction à la microbiologie : Microbiologie fondamentale et appliquée. Ed. DUNOD. Pp. 249 (ISBN 978-2-10-078172-0)
- [12]. Scott, J.K. & Smith, G.P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249: 386-90.
- [13]. Souriau, C., Duc, H., Lefranc, M.P. & Weill, M. (1998). Présentation à la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display. *Medecine Sciences* 14: 300-309.
- [14]. Sudarikov, K., Tyakht, A. & Alexeev, D. (2017). Methods for the Metagenomic Data Visualization and Analysis. *Current Issues in Molecular Biology* 2017:37-58.
- [15]. Taylor, F.J.R. (1976). Autogenous theories for the origin of eukaryotes. *Taxon* 25: 377 – 390 (<https://doi.org/10.2307/1220521>)
- [16]. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. & Hoogenboom, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annual Review Immunology* 12: 433-55.

REFERENCES ÉLECTRONIQUES (FIGURES)

<http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/microbiologie/chapitre5/Spores.pdf> (consulté le 19/3/22)

<file:///C:/Users/user/Downloads/1%20-%20Les%20biofilms.pdf> (consulté le 19/3/22)

https://www.researchgate.net/figure/A-Representation-schematique-du-bacteriophage-filamenteux-fd-Le-phage-presente-une_fig1_253159595 (consulté le 19/3/22)

https://www.google.com/search?q=mitochondrie+et+chloroplaste&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwif5_HV09H2AhXtzoUKHcQJA8oQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1280&bih=689&dpr=1 (consulté le 19/3/22)

https://www.cours-examens.org/images/Etudes_superieures/TC_biology/Complement/bio_diversite/LSVT_7-1.pdf (consulté le 19/3/22)