

TD 02

Cellule procaryote et Stérilisation

CELLULE PROCARYOTE (Paroi bactérienne)

- Les protistes procaryotes se divisent en deux grand groupes phylogénétiques distincts les **bactéries** et les **archaebactéries**,
- L'organisation cellulaire des procaryote est **fondamentalement similaire**, mais elle est diffère complètement de celle des autre organismes : Absence de noyau individualisé, elles n'ont pas d'organites intracellulaire spécialisés

1.1 Composition et structure

- L'analyse chimique globale des bactéries montre une composition en eau de **70-90%**,
- Plus de 95% du matériel cellulaire est sous forme de **macromolécules**, dont la **moitié** au moins sont des protéines.
- La teneur en ARN des bactéries est aussi remarquablement élevée.
- L'extrait sec bactérien est formé d'éléments chimiques élémentaires et moléculaires variés

Tab. Composition brute moyenne d'un culot de culture bactérienne (%poids sec)

Macromolécules principales	poids sec (%)	Éléments atomiques	poids sec (%)
Protéines	50	Carbone (C)	50
Polysaccharides	5-16	Oxygène (O)	20
Lipides	10	Azote (N)	14
ARN	10-20	Hydrogène (H)	8
ADN	3-4	Phosphore (P)	3
		Potassium (K)	2
		Soufre (S)	1
		Calcium (Ca)	0.5
		Magnésium (Mg)	0.4
		Fer (Fe)	0.2

N.B : Ce tableau est une moyenne représentative, les proportions indiquées peuvent varier relativement et de manière significative, en fonction des bactéries, des conditions de croissance et du milieu.

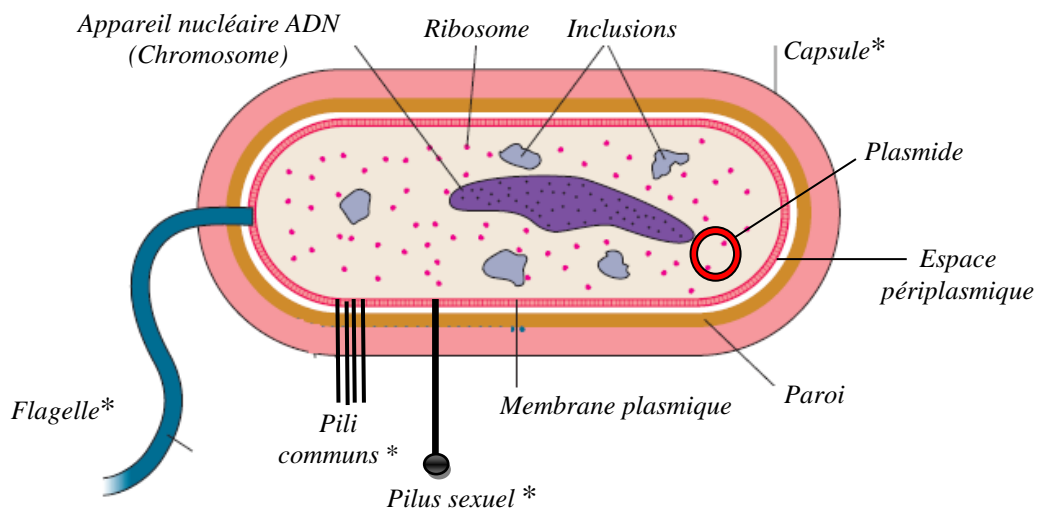


Fig. Structure schématique d'une cellule bactérienne. (*) Structures facultatives.

1.2. Bactéries à Gram positif et à Gram négatif

C'est **1884**, le bactériologiste danois Hans Christian Gram a mis au point un protocole de coloration différentielle

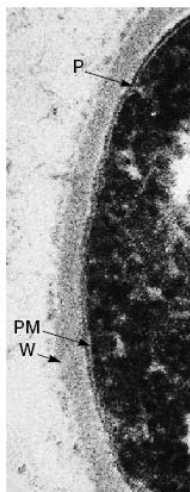
- Permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne,
- Utiliser ces propriétés pour distinguer et classifier les bactéries en Gram positive et Gram négative.
- Les B (G+) apparaissent **violettes** au microscope photonique, colorées par le complexe violet de gentiane – lugol ; tandis que les B G(-) apparaissent **roses**
- La paroi est une enveloppe **rigide** assure l'intégrité de la cellule et donne sa **forme**.

Structure et composition de la paroi

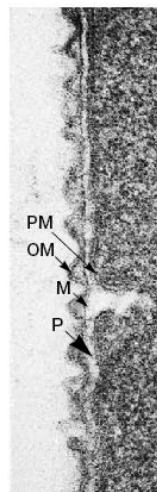
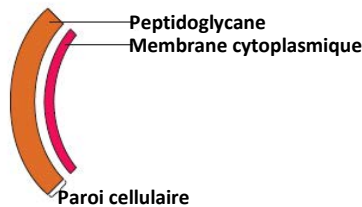
- Le constituant majeur de la paroi est le peptidoglycane (Mureine, mucopeptide),
- Mureine est un **heteropolymère** complexe formé de **ose-amines** et **polypeptides**
- Les oses amines sont l'unité de base (n-acétyl muramique **NAM**, n-acétyl glucosamine **NAG**).
- Le polypeptide est composé de (D et L-alanine, L-lysine/diaminopénilique, D-glutamine)
- Le NAM et NAG sont liés par une liaison osidique type **β (1, 4)**.

Tab. Comparaison de la paroi des bacteries à Gram positif et à Gram négatif

Caractéristiques	Paroi de bactéries Gram +	Paroi de bactéries Gram -
Épaisseur	20-80nm	10-15nm
Aspect sous microscope électronique	Couche épaisse (limitée)	Mince (rugueuse)
Membrane externe	Absence	Présence
Espace periplasmique	Faible	Large
Peptidoglycane (Muréine)	+++	+
Acide teichoïque	+	-
Ose amines	+++++	++
Acide aminées	++++	++
Lipide	1-2.5%	10-30%
Lipopolysaccharide (LPS)	-	+
Protéines majeurs (Braun)	-	+



Paroi d'une cellule à GRAM positif



Paroi d'une cellule à GRAM négatif

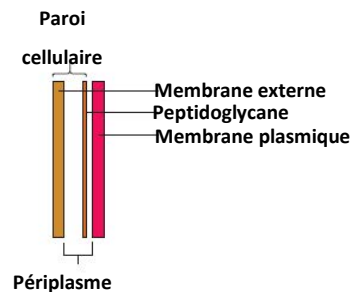


Fig. La paroi des bactéries Gram positive et Gram négative au microscope électronique.

M : peptidoglycane, **OM** : membrane externe, **PM** : membrane plasmique ;

P : espace périplasmique, **W** : peptidoglycane chez G+.

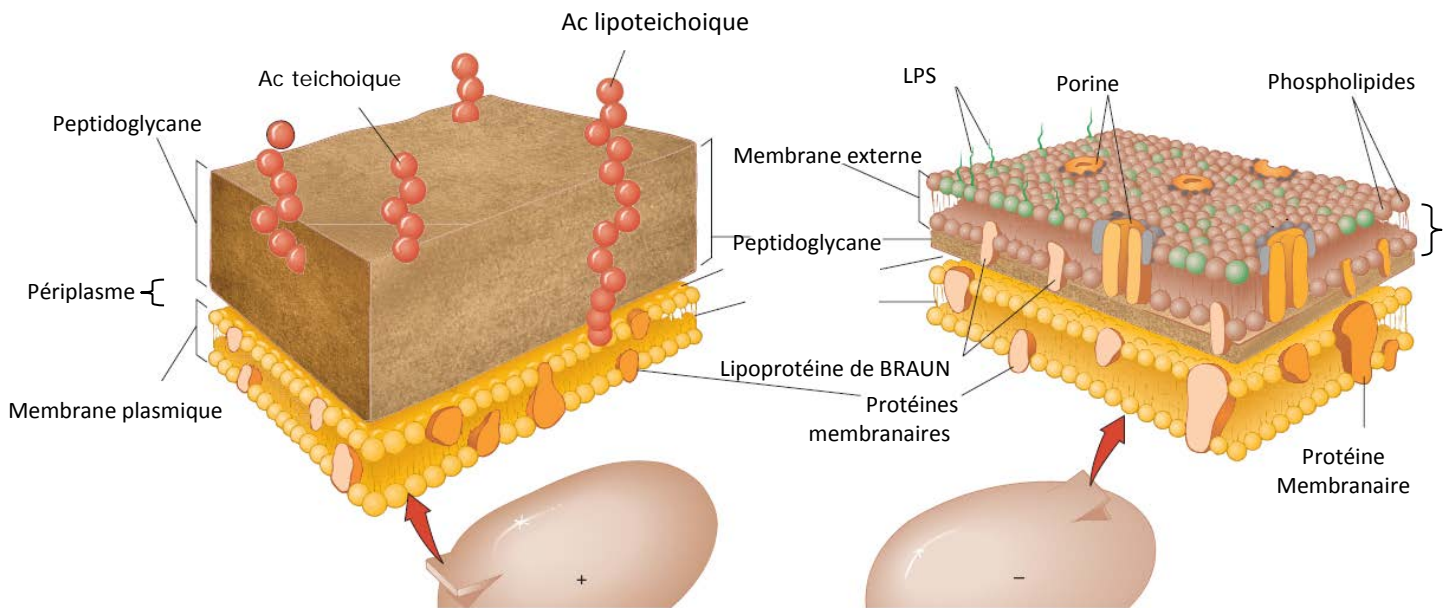


Fig. Structure schématique de la paroi des bactéries à GRAM positif (à gauche) et à GRAM négatif (à droite).

Action du lysozyme sur la paroi bactérienne

- Le lysozyme est une **enzyme antibactérienne** particulière présente dans le blanc d’œuf, la salive, même a été isolée chez certaines espèces bactériennes et virales.
- Ajouté à une culture bactérienne liquide, il provoque la **destruction** des cellules (éclatement) par la dissolution complète de leurs parois et entraîne la clarification du milieu **dans un milieu hypotonique**.
- Le lysozyme rompt les liaisons **β (1-4)** des chaînes poly-osidiques du peptidoglycane.
- Au microscope électronique dans un milieu isotonique, les bactéries à GRAM positif apparaissent en sphères limitée par leur seule membrane cytoplasmique, elles sont appelées **protoplastes**.
- Les bactéries à GRAM négatif constituent des sphères bordées par leur membrane externe. Elles sont qualifiées de **sphéroplastes**.
- Les *protoplastes* et les *sphéroplastes* peuvent être stabilisés en milieu isotonique ou légèrement hypertonique.
- L’absence de la paroi n’affecte pas le métabolisme général et les activités vitales de la cellule.

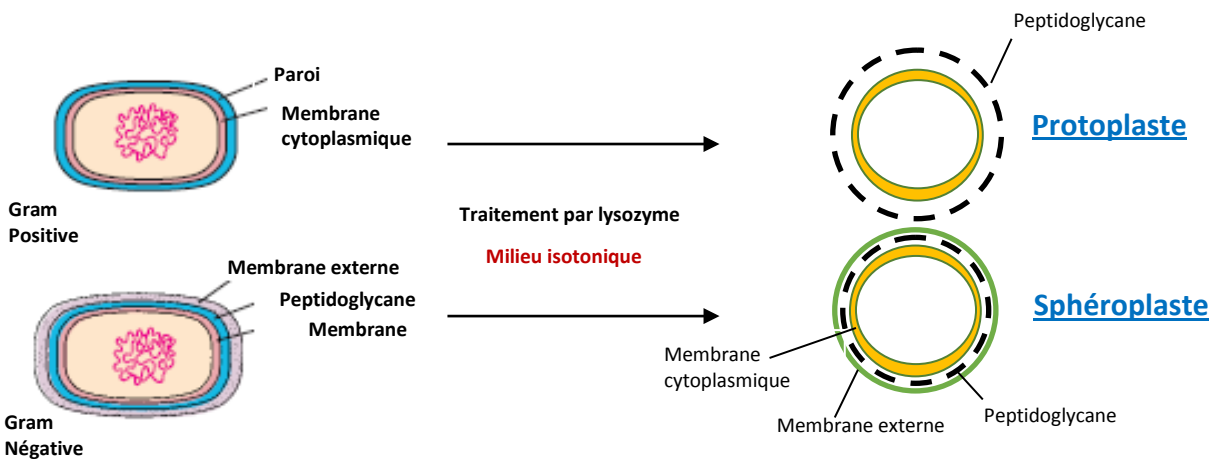


Fig. Structure schématique des sphéroplaste et des protoplastes.

STÉRILISATION

La **stérilisation** est une technique destinée à **détruire (éliminer)** tout germe microbien (y compris les formes végétatives et sporulées) d'une préparation ou d'une surface.

- Elle a été inventée par Nicolas Appert, à la fin du XVIII^e siècle
- L'explication scientifique a été fournie, soixante ans après, par Louis Pasteur au XIX^e siècle.

On distingue :

- La stérilisation par **moyen physique**
 - ✓ Traitements thermiques : à la **chaleur sèche**, à la **vapeur d'eau** (chaleur humide) dite **autoclavage**
 - ✓ Traitement par des rayonnements **UV (non ionisant)**, par **rayonnements ionisants (X, gamma, ...)**
- La stérilisation par **moyen chimique** (traitement à basse température)
 - ✓ Traitement chimique souvent avec l'**oxyde d'éthylène (oxydation) ...**
- La stérilisation par filtration (**moyen mécanique**) et autres.

Il n'existe pas de technique de stérilisation universelle. Il faut choisir entre les différentes techniques en prenant en compte **les propriétés des objets à stériliser** (fragile ou non), la **nature de l'agent stérilisant**, et même le **rôle de l'environnement** (pH, la turbidité, la viscosité, charge microbienne...)

Étude d'exemple**I. Stérilisation par traitement thermique**

- L'utilisation de la chaleur est un procédé très efficace de destruction des microorganismes. Très utilisé au labo pour les milieux de culture, et le matériel.
- L'effet létal de la chaleur s'exerce principalement par la **dénaturation irréversible** des structures cellulaires (**principalement les protéines et lipides**) (**coagulation et fusion**).
- La chaleur peut être utilisée selon la nature du milieu sous forme sèche ou humide.
- La sensibilité des micro-organismes à une stérilisation par la chaleur est fonction de
 - ✓ l'espèce microbienne, forme microbienne, l'état végétatif et sporulé, la durée du traitement, la contamination initiale, la température et le milieu dans lequel se trouvent les germe.

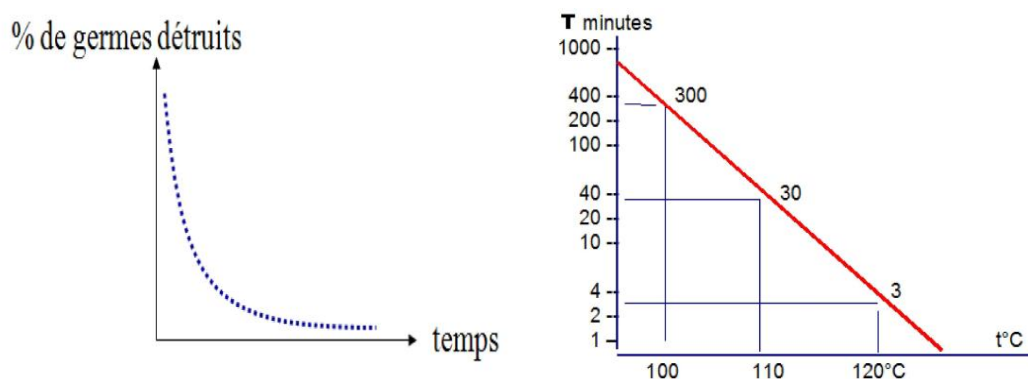


Fig. Relation temps-température de stérilisation

I.1 Stérilisation par chaleur sèche

- ✓ Elle est produite au laboratoire par des fours électriques de stérilisation, thermostaté appelés aussi **fours PASTEUR (four poupinel)**.
- ✓ Sur le plan pratique, différentes combinaisons usuelles de **température** et de **temps** peuvent être appliquées (120min/160°C, 90min/170°C)

Tab. Exemples de couplés (T°C/Temps) utilisés pour une stérilisation au four Pasteur

T°C	140°C	150°C	160°C	170°C	180°C
Temps	3h	2h30	2h	1h30	30-45min

- ✓ Cette technique est utilisée pour la stérilisation de matériel relativement résistant aux températures élevés ou inadaptés a la stérilisation à la vapeur d'eau, tels que, matériaux oxydables, verreries, instruments métalliques, ...
- ✓ Le flambage au bec bunsen est considéré comme une stérilisation à la chaleur sèche, appliquée pour le petit matériel (anse de platine, tube a essai, pipettes..) et au traitement des surfaces accessibles à la flamme.

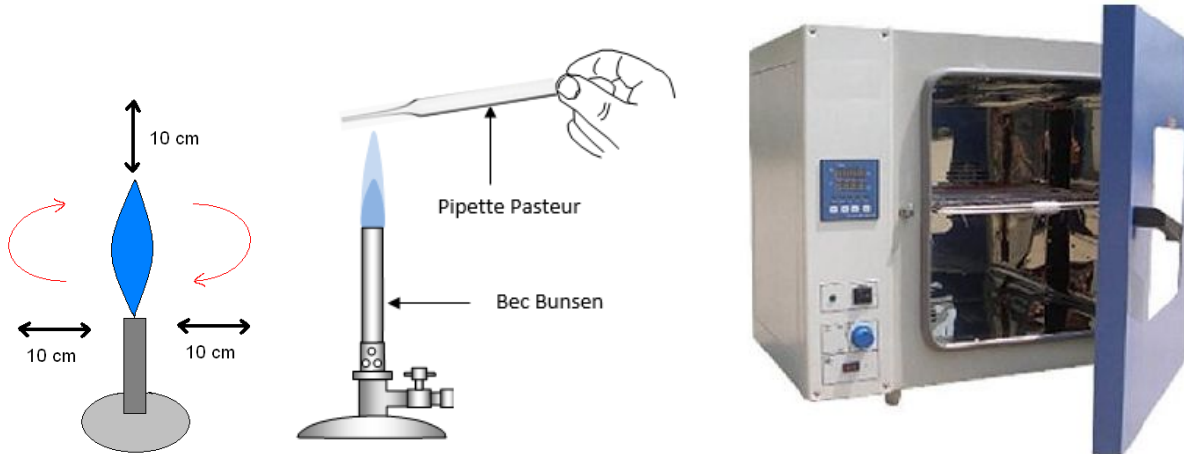


Fig. flambage d'une pipette et four Pasteur.

I.2 Stérilisation par chaleur humide

- ✓ Elle est produite sous forme de vapeur d'eau chaude sous pression dans des enceintes spéciales appelées **autoclave**.
- ✓ Sur le plan pratique, différentes combinaisons usuelles de **température**, de **temps** et de **pression** peuvent être appliquées.
- ✓ La stérilisation des milieux de cultures, des autres solutions et matériels sensibles à la chaleur sèche se fait en général selon un cycle standard de **15 à 20min à 121°C** dans une atmosphère **saturée en vapeur**, ce qui assure une destruction totale de toute forme de vie (végétative, et même sporulée)

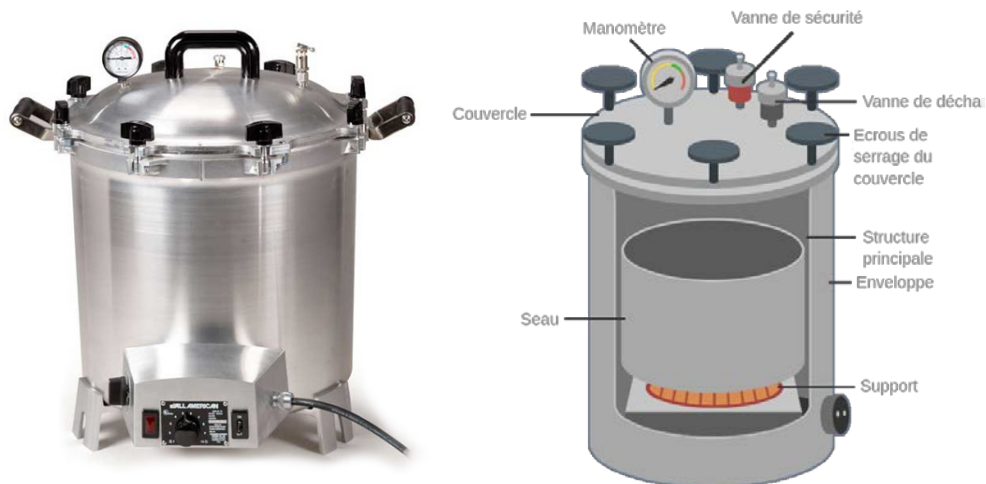


Fig. Schéma d'un autoclave

I.3 Autres méthodes de stérilisation thermiques

Il existe d'autres méthodes de stérilisation par chaleur humide moins répandues, spécifiques de situation ou de milieux particuliers.

1.1. La pasteurisation

La pasteurisation est un traitement thermique à des températures comprises entre **60 et 100°C** ayant pour but de détruire la totalité des **micro-organismes pathogènes non sporulés** et de réduire significativement la flore végétative présente dans un produit et conserver ces caractéristiques organoleptiques.

La pasteurisation est un procédé consistant à chauffer des produits alimentaires liquides tels que le lait, les jus, les boissons pendant quelques minutes ou secondes à une température la plus basse possible, puis à le refroidir de 4 à 14°C. On distingue :

- ✓ Basse pasteurisation (63°C/20min)
- ✓ Pasteurisation haute (80°C/2min)
- ✓ Pasterustain HUT (ultra haute température) (100°C/qq seconde)

1.2. La tyndalisation (du nom Tyndal son inventeur)

- ✓ Est une technique de stérilisation à la chaleur humide, appliquée à des produits **thermosensible**, pour éliminer les formes **végétatives et spores** sans l'emploi de températures excessives.
- ✓ En pratique, son application est fractionnée en un cycle de **trois phases** de chauffage (70-90°C), suivi de deux temps d'incubation de 24h, dans leur ensemble réparti en **trois jours**.

II. Stérilisation par filtration

- ✓ La filtration est généralement réalisée au moyen de dispositifs spéciaux de différentes capacités volumique.
- ✓ Elle est basée sur la rétention des micro-organismes et particules par un réseau filtrant.
- ✓ L'opération est généralement réaliser sur des membranes filtres de 0.22- 0.45µm de porosité.
- ✓ Cette méthodes est applicable produits liquides thermolabiles (vitamines, acides nucléiques...)

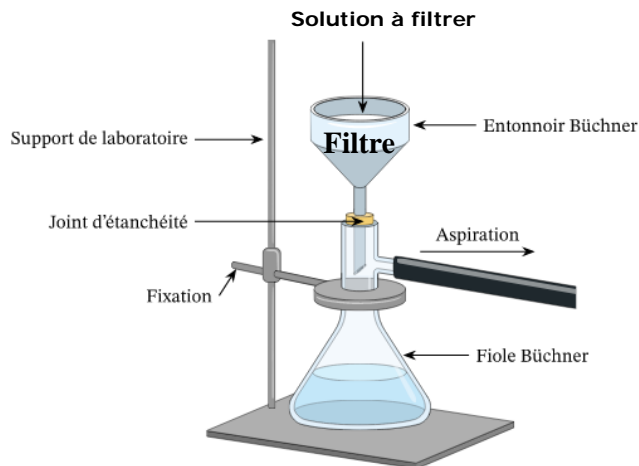


Fig. Dispositif simple de filtration stérilisante.