

## Chapitre IV : Croissance bactérienne.

Chez les organismes pluricellulaires, la croissance est définie par l'augmentation coordonnée des constituants cellulaires, se traduisant par une augmentation de la taille ou de masse.

Par contre chez les microorganismes unicellulaires, elle se manifeste par l'augmentation du nombre (multiplication suite à des divisions binaires ou scissiparité) (**Fig. 1**). Donc la croissance bactérienne correspond à l'accroissement du nombre de bactéries.

D'autres mécanismes de division existent chez des bactéries particulières, comme le bourgeonnement (chez les cyanobactéries) et la fragmentation (chez les bactéries filamenteuses).

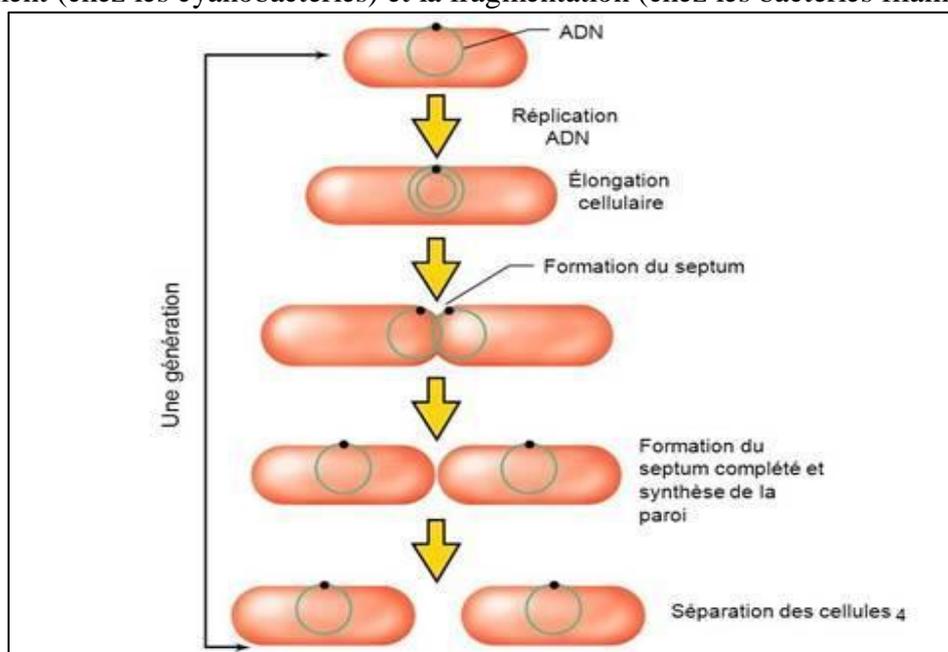


Figure 1 : Division cellulaire par scissiparité.

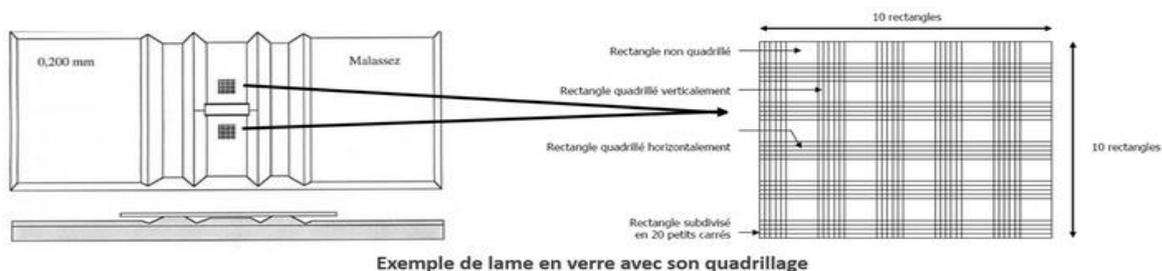
### 1. Mesure de la croissance

La mesure de la croissance bactérienne peut se faire grâce au dénombrement cellulaire ou à la mesure de la biomasse ; les deux valeurs, nombre et biomasse progressent de façon parallèle. On peut mesurer aussi l'activité cellulaire

#### 1.1. Mesure du nombre de cellule

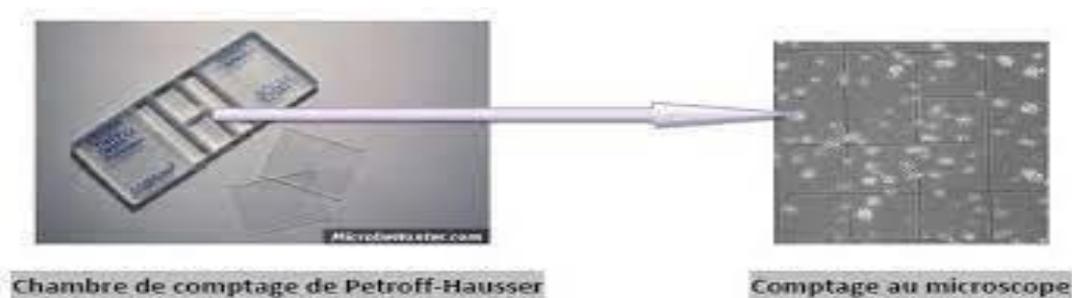
##### 1.1.1. Dénombrement direct de cellules sous microscope

Les cellules de taille grande peuvent être dénombrées au microscope grâce à un hématimètre (cellule de Thoma, Malassez, ...etc). C'est une lame porte-objet dont l'une des faces est creusée d'une cavité de profondeur connue (0,1-0,2 mm) et dont le fond porte des quadrillages. La suspension microbienne est placée dans cette cuvette puis recouverte d'une lamelle. Ensuite, les cellules sont comptées au microscope.



Exemple de lame en verre avec son quadrillage

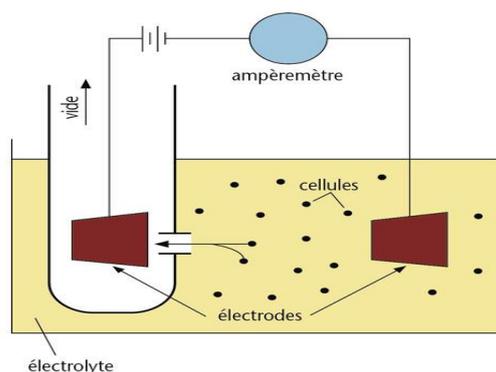
Pour les bactéries (petites tailles), le dénombrement peut se faire grâce à la cellule de Petroff-Hausser dont la profondeur de la cuvette est dix fois plus faible que l'hématimètre (**Fig.2**).



**Figure 2 : Cellule Petroff-Hausser.**

### 1.1.2. Compteur de particules

Cet appareil réalise automatiquement le dénombrement des particules ou cellules en suspension dans une solution, grâce aux modifications de résistances électriques qu'elles provoquent à leur passage à travers un orifice calibré. Lorsqu'une cellule traverse un micro-orifice, deux électrodes placées de part et d'autre de l'orifice et reliées à un générateur de courant électrique, enregistre une variation électronique qui est détectée par un compteur. Ce compteur présente l'inconvénient de compter les cellules ainsi que les autres particules inertes de même taille.



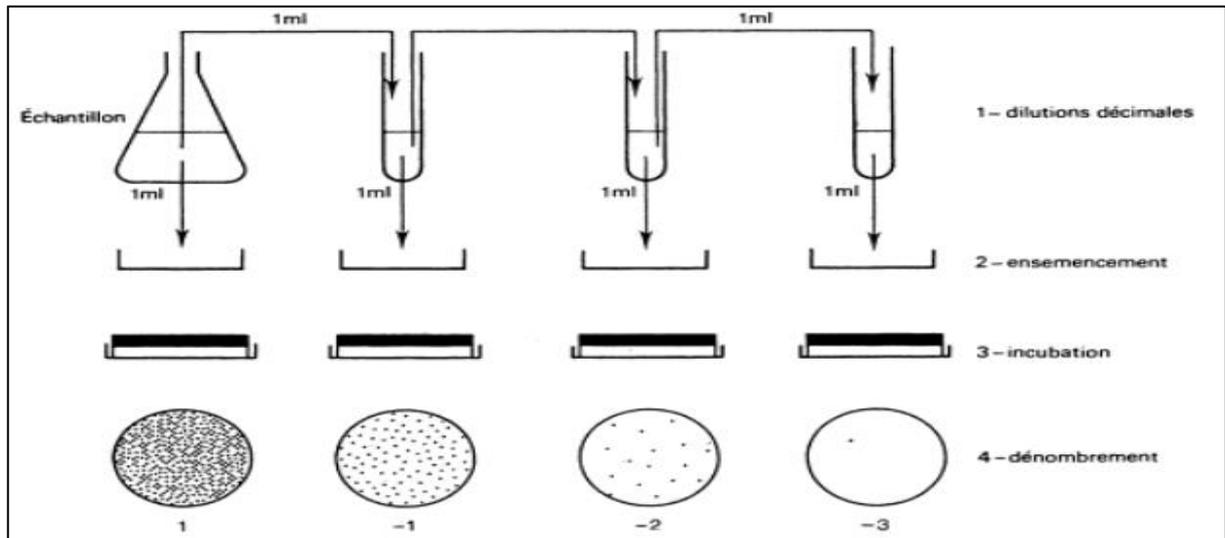
### 1.1.3. Épifluorescence

Cette méthode permet en théorie de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Elle utilise l'acridine orange ou d'autres **fluorochromes** qui se fixent sur l'ADN. Au microscope à lumière ultraviolette, la fixation de l'acridine orange sur un ADN bicaténaire donne une fluorescence verte (**les bactéries vivantes apparaissent en vert**), alors que sa fixation sur un ADN monocaténaire donne une fluorescence rouge (**les bactéries mortes en rouge**). Plusieurs inconvénients sont attribués à cette technique :

- Chez les bactéries vivantes en multiplication, l'ouverture de la double chaîne d'ADN lors de sa réplication induit une fluorescence rouge.
- Les populations inférieures à  $10^5$  cellules/ml pour les levures et  $10^6$  cellules/ml pour les bactéries ne peuvent être évaluées.
- Chez les bactéries formant des chainettes ou des mycéliums, ce procédé est inadéquat.

### 1.1.4. Dénombrement après culture

Plusieurs procédés sont suivis pour ce genre de dénombrement de cellules. Ces méthodes de culture ne comptent que les cellules vivantes et capables de se reproduire. Les deux techniques habituellement utilisées sont celle de **l'étalement en surface** et celle de **l'étalement en profondeur**. Dans les deux méthodes, un échantillon dilué de bactéries ou d'autres microorganismes est étalé sur une surface solide. Chaque micro-organisme ou groupe de micro-organismes se développe en une colonie distincte, et comme on n'est pas absolument certain que chaque colonie provienne d'une cellule isolée(**Fig.3**).



**Figure 3 :** Dénombrement des bactéries par ta méthode des dilutions.

Le nombre total de bactéries est calculé par le nombre d'UFC multiplié par le volume ensemencé et l'ensemble est divisé par la dilution dans laquelle le nombre d'UFC est calculé. Cependant, la rigueur oblige d'ensemencer deux boîtes par dilution et le nombre est calculé selon la formule de la moyenne pondérée.

$$N = \frac{\Sigma c}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

**N :** nombre de microorganismes/ml de suspension

**$\Sigma c$  :** la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de 2 dilutions successives (les boîtes retenues doivent avoir entre 15 et 300 CFU).

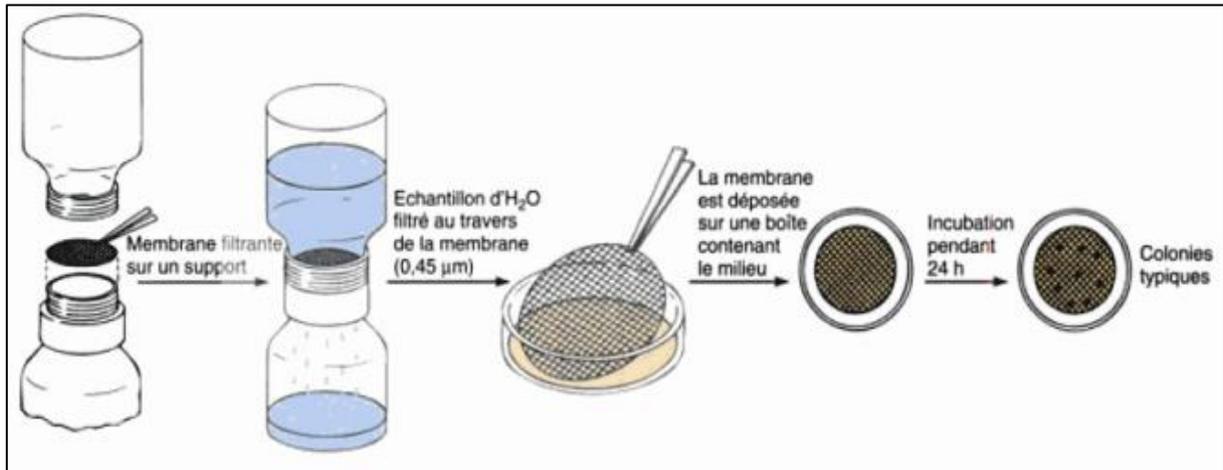
**V :** le volume de l'inoculum ensemencé en ml. (Généralement 1 ml)

**$n_1$  :** le nombre de boîtes retenues à la première dilution

**$n_2$  :** le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

**d :** la dilution correspondant à la première dilution retenue

**-Technique de filtration sur membrane :** cette méthode retient les bactéries d'échantillons aqueux sur une membrane filtrante. Le filtre est ensuite déposé sur un milieu gélosé ou sur un buvard imprégné de milieu liquide (**fig. 4**) et incubé jusqu'à ce que chaque cellule forme une colonie séparée. Le nombre de colonies comptées donne le nombre de micro-organismes dans l'échantillon filtré. Un milieu spécial permet de sélectionner des micro-organismes particuliers. Cette technique est particulièrement utile à l'analyse de la pureté de l'eau.



**Figure 4 :** Le procédé de filtration sur membrane.

### 1.2. Mesure de la biomasse

La biomasse peut être quantifiée en mesurant soit :

- **Le poids sec de la culture microbienne**, qui consiste à récolter les cellules par centrifugation puis au lavage à l'eau physiologique avant de les passer au séchage à 100-110°C. Le culot est ensuite pesé. Le résultat est exprimé en g de matières sèches par litre. Cette technique est délicate et particulièrement longue.
- **Le trouble de la suspension** : C'est une technique plus simple, elle est largement utilisée pour dénombrer les cellules microbiennes ; cette technique est basée sur la mesure l'absorbance de la lumière par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre.

### 1.3. Mesure indirecte de l'activité cellulaire

L'activité cellulaire peut être mesurée selon plusieurs procédés :

- Mesure de la consommation d'un substrat présent dans le milieu, comme l'oxygène, une source de carbone, d'azote ou d'un élément spécifique de croissance.
- Mesure des produits d'excrétions, notamment le dosage du CO<sub>2</sub>.
- Mesure des variations physico-chimiques, comme la variation du pH du milieu suite à son acidification, le potentiel d'oxydo- réduction qui peut être évalué grâce à des indicateurs redox colorés tel que le bleu de méthylène, la résazurine ou le tétrazolium.
- Mesure de la chaleur dégagée suite aux réactions de dégradation de substrats énergétiques.

## 2. Les paramètres de croissance

Ces paramètres sont appelés aussi constantes de la croissance. Il s'agit de : **temps de génération (G)**, **nombre de génération (n)** et **taux de croissance (μ)**.

A partir d'une unique cellule, le cycle cellulaire donne naissance à deux cellules filles qui vont chacune donner à leur tour deux autres cellules et ainsi de suite, selon une progression géométrique : 1 cellule ---> 2 cellules ---> 4 cellules ---> 8 cellules ---> 16 cellules ---> 32 cellules ...

➤ A partir d'une population initiale (nombre de bactéries initial) N<sub>0</sub>, au bout de n divisions, on aura un nombre théorique de bactéries:  $N = 2^n N_0$ . (N= nombre de cellule en division au temps (t))

**-Le temps de génération (G)** : correspond au temps nécessaire au doublement d'une population ou une division cellulaire. Il dépend de l'espèce, voire même des conditions environnementales (favorables ou défavorables). Dans les conditions optimales de culture, le temps de génération ou **G** est de 13 minutes pour *Vibrio parahaemolyticus*, de 20 minutes pour *Escherichia coli*.

$$G = t/n, t : \text{temps en minutes}, n : \text{le nombre de division.}$$

**-Taux de croissance (μ)** : désigne le nombre de division par unité de temps (heure). Par exemple *E. coli* se divise 3 fois en une heure, son taux de croissance est 3.

$$\mu = n/t, n = \mu/t, \text{ donc } \mu = 1/G$$

### 3. Courbe de croissance (culture discontinue)

La courbe de croissance est obtenue en traçant l'évolution du nombre de cellules ou de biomasse en fonction du temps. Cette évolution est la vitesse volumique de croissance par unité de temps,  $X = f(t)$  (Fig.5).

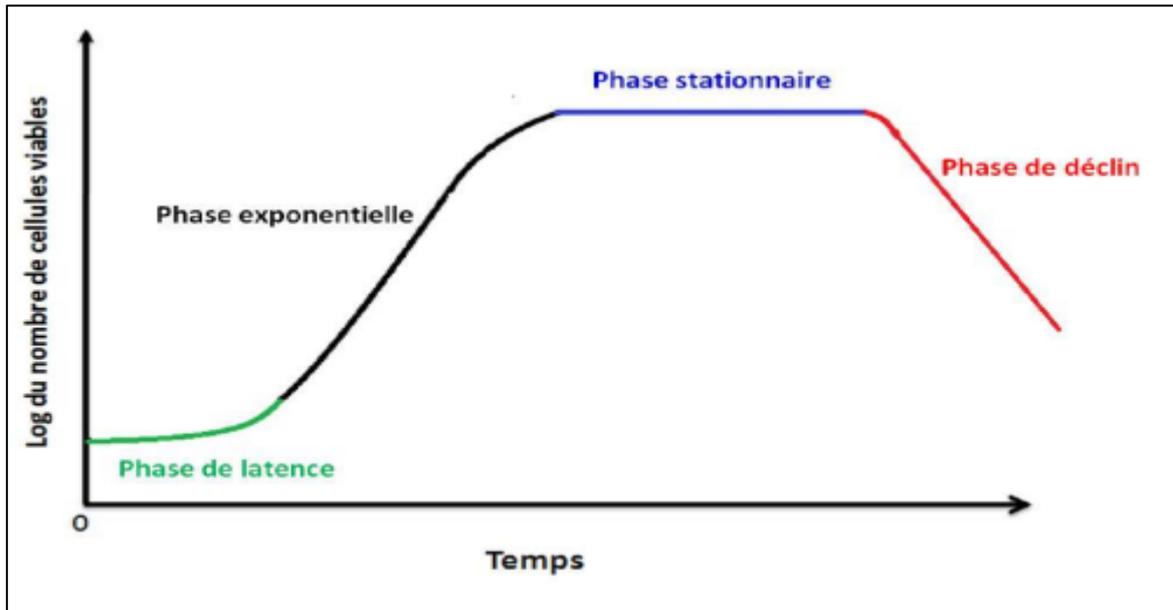


Figure 5 : Courbe de croissance en milieu non renouvelé.

Dans des conditions de culture discontinue (milieu liquide ou solide contenant une quantité définie en nutriments). La courbe résultante est constituée de 4 phases essentielles à savoir ;

- La phase de latence
- La phase exponentielle
- La phase stationnaire
- La phase de déclin

#### 3.1. Phase de latence

C'est une phase de courte durée, elle varie d'une espèce à l'autre. Durant cette phase, Les bactéries ne se divisent pas, mais s'adaptent aux conditions de leur milieu environnemental. Elles synthétisent les enzymes nécessaires et spécifiques des substrats (nutriments) présents. Le nombre de bactéries reste inchangé et égale au nombre initial. Ainsi, le taux de croissance ( $\mu$ ) est égal **zéro**. Cette phase est influencée par plusieurs facteurs. Plus la concentration de l'inoculum de départ est importante, moins la phase de latence est longue.

#### 3.2. La phase exponentielle

Elle débute par une phase d'accélération (fin de la phase de latence) durant laquelle le nombre de bactéries augmente. Elle est suivie par une période exponentielle de croissance qui se termine par un maximum à la fin de la phase. Le taux de croissance ( $\mu$ ) est **maximal**. Durant cette phase, certains métabolites primaires sont synthétisés, comme les antibiotiques et les toxines. Les paramètres physico-chimiques (l'activité d'eau «AW », pH, température, la nature et la concentration des aliments...etc.) influent sur l'allure de la phase exponentielle et la vitesse spécifique de croissance.

#### 3.3. La phase stationnaire

La phase stationnaire débute par une période de décélération (ralentissement) pendant laquelle diminue la vitesse de division cellulaire. Pendant cette phase. Le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ ).

La division cellulaire ne s'est pas arrêtée, mais le taux de mortalité cellulaire est égal au taux de cellules en division. Ce qui correspond à un équilibre entre le nombre de nouvelles cellules provenant d'une division cellulaire et le nombre de cellules qui disparaissent par autolyse.

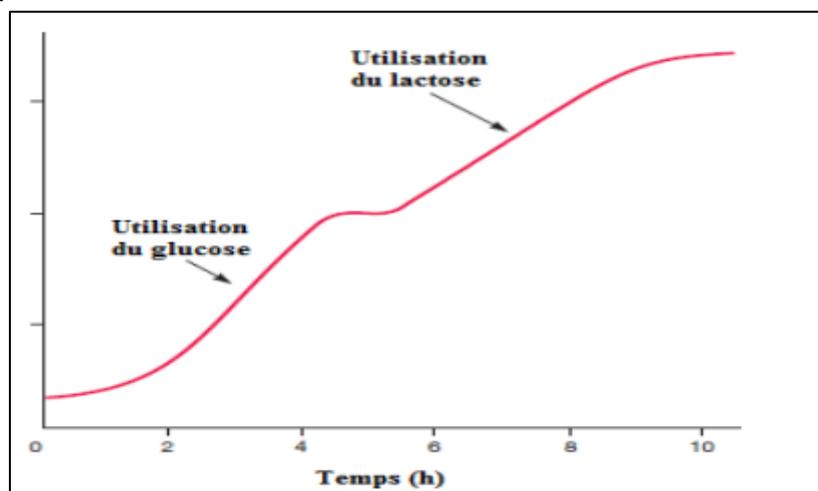
### 3.4. Phase de déclin

A ce stade de croissance, le taux de mortalité est plus important que la division cellulaire et le nombre de cellules diminue considérablement, induisant un taux de croissance ( $\mu$ ) **négatif**. Ceci est due en grande partie à l'épuisement des nutriments du milieu de culture et à l'accumulation des déchets parfois toxiques pour les microorganismes, de plus, le changement de pH peut être limitant.

## 4. Autres modes de croissance

### 4.1. Phénomène de diauxie

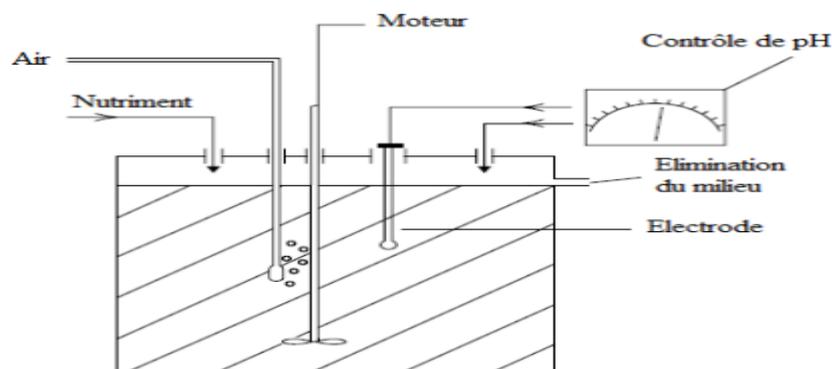
Dans un système de culture contenant une seule source de carbone, la croissance bactérienne s'achève par une phase de déclin qui se traduit par la lyse bactérienne et la réduction du nombre de bactéries. Cependant, dans un milieu de culture contenant deux sources de carbone différentes (Exemple : glucose et lactose), la phase stationnaire n'est pas achevée par une phase de déclin, mais elle est caractérisée par l'apparition d'une deuxième phase exponentielle (**Fig. 6**). Les bactéries préfèrent utiliser le glucose d'abord, mais quand celui-ci est épuisé du milieu de culture, elles utilisent le lactose.



**Figure 6 :** Phénomène de diauxie chez les bactéries cultivées en présence du glucose et du lactose comme source de carbone.

### 4.2. Croissance continue

Les quatre phases de croissance vues jusqu'ici (latence, exponentielle, stationnaire et déclin) sont obtenues dans un milieu fermé. Pour atteindre un but d'intérêt industriel (Ex : fermentation), il est plus pratique de maintenir les bactéries en phase exponentielle. Ceci est possible en renouvelant le milieu de culture et en éliminant les produits du métabolisme en utilisant les Turbidostats (**Fig. 7**) et les chémostats.



**Figure 7 :** Schéma du turbidostat

## 5. Les agents antimicrobiens

### 5.1. Définition

La croissance bactérienne doit être contrôlée pour mieux diriger son usage à des fins expérimentales ou industrielles. Donc les agents antimicrobiens désignent toutes substances ou procédés qui inhibent ou tuent les micro-organismes selon plusieurs procédés.

### 5.2. Classification

On distingue trois classes d'agents antimicrobiens : Les agents physiques, les agents chimiques et les agents chimio-thérapeutiques.

#### 5.2.1. Les agents physiques

##### a) La température

La température permet également de détruire les micro-organismes (stérilisation, appertisation). Son action dépend du milieu, de la physiologie et du nombre de cellules. Les destructions thermiques utilisent la chaleur humide ou la chaleur sèche.

**\*Chaleur humide :** Les formes végétatives bactériennes et fongiques et les virus sont détruits à la température de l'eau bouillante, mais ce n'est pas le cas des spores (surtout les endospores bactériennes).

**-L'autoclave :** est une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle on chauffe de l'eau sous pression (120°C à 1 atm) pour faire agir la vapeur d'eau pressurisé, pendant 15 à 20 minutes.

**-La pasteurisation :** Un chauffage pas très élevé (60°C) permet de détruire la flore pathogène (*Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*...) et ralentie la croissance des germes d'altération. Elle préserve les qualités nutritives de l'aliment (lait), l'équilibre chimique et les vitamines.

La pasteurisation ne peut être considérée comme une stérilisation, on l'applique à des produits pour préserver les caractères organoleptiques (gout, couleur, odeur, saveur) et en permettant leur conservation pendant une période.

**-La tyndallisation :** Il est possible d'arriver à stériliser les matières fragiles, très altérables par la chaleur, en leur faisant subir une série de chauffages à température moins élevée (60°C), séparés par des périodes de repos à la température ordinaire. C'est la tyndallisation. Elle est utilisée pour éliminer les endospores qui ont réactivées en cellules végétatives, éliminées à chaque cycle de chauffage.

**\*Chaleur sèche :** Elle est utilisée pour certains matériels, ou objets, qu'il n'est pas possible, ou souhaitable, de mettre en contact avec de la chaleur humide. Elle est fournie par des fours électriques, ou à gaz, à circulation d'air. La stérilisation sera effective en maintenant une température de 160 à 180 °C.

##### b) Les radiations

La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection. Le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. D'autres radiations (rayons X), peuvent servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri en matière plastique et de produit pharmaceutiques.

##### c) La Filtration

Utilisée pour stériliser des solutions renfermant des substances thermolabiles. Ce système est également appelé stérilisation à froid. Actuellement, les matériaux filtrants utilisés sont des membranes filtrantes d'acétate de cellulose. Ces derniers sont également utilisés pour le dénombrement des microbes dans un liquide.

#### 5.2.2. Les agents chimiques

Depuis longtemps, plusieurs agents chimiques étaient utilisés comme des antimicrobiens. Dans cette catégorie des agents se trouvent les oxydants, les alcools, les métaux lourds et leurs sels, les savons et détergents, les colorants et conservateurs, les composés phénoliques, les aldéhydes et les gaz stérilisants.

Les principaux oxydants utilisés sont l'eau oxygénée, le chlore et ses dérivés (hypochlorite de sodium ou eau de Javel), les halogénés (fluor, brome, iode).

Pour les alcools, les antiseptiques alcooliques les plus employés sont l'éthanol et l'iso-propanol.

Concernant les métaux lourds et leurs sels, les sels de mercure sont d'excellents antiseptiques, les sels d'argent sont surtout utilisés en ophtalmologie.

Les gaz stérilisants comme le formol et l'oxyde d'éthylène sont largement utilisés notamment dans les chambres chirurgicales des hôpitaux. Le gaz bêta-propiolactone est utilisé dans la stérilisation d'objets chirurgicaux et enfin l'ozone est exploité dans le procédé de potabilisation des eaux.

### 5.2.3. Les agents chimio-thérapeutiques antimicrobiens

**La chimiothérapie** c'est-à-dire l'utilisation d'agents chimiques en thérapeutique.

#### ➤ Définition des Antibiotiques

Les antibiotiques sont des agents antimicrobiens. Ce sont des produits chimiques, synthétiques ou naturels, utilisée à l'intérieur des tissus de l'hôte pour détruire ou inhiber les microorganismes pathogènes. Ces agents chimio-thérapeutiques sont dépourvus de toxicité.

#### ➤ Classification des antibiotiques

Selon leurs actions antimicrobiennes, deux catégories d'agents antimicrobiens sont rencontrées :

- **Les antibiotiques statiques** : Agents qui inhibent la croissance, tels que : Bactériostatique et fongistatique.

- **Les antibiotiques germicides** qui détruisent totalement les germes pathogènes mais pas nécessairement les endospores, tels que : Bactéricides, fongicides et algicides.

- La classification des antibiotiques peut être fondée aussi sur le spectre d'activité, deux groupes d'antibiotiques sont alors distingués ; **les antibiotiques à large spectre** et ceux **à spectre étroit**.

- La classification chimique est la plus souvent utilisée, elle repose sur la composition chimique de chaque antibiotique (**Tableau 1**).

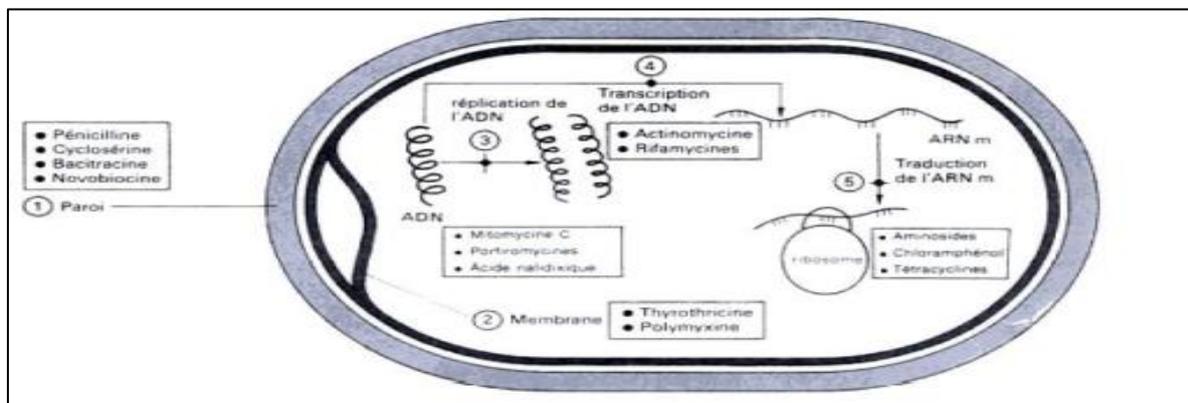
- D'autre part, le mode et le site d'action des antibiotiques permettent de classer les différents antibiotiques.

**Tableau 1** : Principales familles d'antibiotiques et leurs modes d'actions.

Familles	Mode d'action	Effets secondaires	Action sur bactéries à Gram + et/ou -
Les BETALACTAMINES	Action bactéricide	Diarrhée, allergie, toxicité digestive, rénal...	GRAM +/-
Les AMINOSIDES	Action bactéricide	Toxicité au niveau de l'audition et rénale.	GRAM +/-
Les MACROLIDES	Action bactériostatique	Allergie, troubles digestifs, toxicité hépatique...	GRAM +
Les LINCOSAMIDES	Action bactériostatique	Allergie, troubles digestifs, toxicité hépatique...	GRAM +/-
Les SYNERGISTINES	Action bactériostatique	Allergie, troubles digestifs, toxicité hépatique...	GRAM +/-
Les TETRACYCLINES	Action bactériostatique	Allergie, toxicité digestive, rénale, au niveau neuronal...	GRAM +/-
Les QUINOLONES	Action bactéricide	Réaction allergique, toxicité auditive, tendinite ...	GRAM -
Les SULFAMIDES	Action bactériostatique	Allergie, toxicité sanguine, rénale...	GRAM -
Les GLYCOPEPTIDES	Action bactéricide	Réaction allergique	GRAM +
Les CHLORAMPHENICOL	Action bactériostatique	Réaction allergique	GRAM +/-
Les IMIDAZOLES	Action bactéricide	Réaction allergique	GRAM +/-
Les POLYMYXINES	Action bactéricide	Réaction allergique	GRAM -
AUTRES	En fonction de l'antibiotique	Divers en fonction de l'antibiotique.	GRAM +/-

### ➤ Mode d'action

Les cibles habituellement visées par l'action des antibiotiques sont celles qui constituent un élément indispensable et constant pour la survie de la cellule bactérienne. La paroi bactérienne, la membrane, l'ADN et les ribosomes sont des sites d'action des antibiotiques (**Fig. 8**).



**Figure 8** : Schéma des sites d'action des antibiotiques.

#### a) L'Action des antibiotiques sur la paroi bactérienne comprend :

- La fixation sur des enzymes responsables de la synthèse de la paroi (B-lactamines, Ex : pénicilline)
- Le blocage de la synthèse du peptidoglycane en se fixant sur un précurseur (Glycopeptides)
- L'inhibition de la synthèse intracytoplasmique du peptidoglycane (Fosfomycine)

**b) Lésion de la membrane cytoplasmique** : Ex : Polymyxines qui est actif exclusivement sur les bactéries Gram négatives.

#### c) L'action sur l'ADN qui se traduit par :

- Inhibition de l'ADN topoisomérases dont l'ADN gyrase. Ex : Quinolones et fluoroquinolones
- Action sur l'hydrofolate réductase et inhiber la synthèse de purine. Ex : Sulfamides, triméthoprime
- Fragmentation de la double hélice d'ADN. Ex : Imidazolés
- Fixation à l'ARN polymérase ce qui bloque la transcription de l'ADN en ARN. Ex : Rifamycines

**d) Interruption de la synthèse des protéines** : Ex : Aminoside et tetracycline interviennent au niveau de la sous unité 30S du ribosome, l'acide fucidique et phénicol se fixent sur la sous unité 50S.

### ➤ Résistance aux antibiotiques

Une bactérie est dite résistante à un antibiotique, lorsqu'elle est capable de se développer en présence d'un taux d'antibiotique plus élevé que le taux habituel maximum utilisé en thérapeutique.

L'usage abusif des antibiotiques a permis l'apparition et l'évolution progressive de la résistance microbienne aux différents antibiotiques. Deux types de résistance aux antibiotiques sont connus, la résistance bactérienne naturelle et la résistance acquise.

#### a. Résistance naturelle

Les bactéries naturellement résistantes aux antibiotiques possèdent un arsenal génétique sur le chromosome bactérien. Suite aux divisions cellulaires, les gènes de résistance sont transmis d'une génération à l'autre. Donc, la résistance naturelle est présente chez tous les individus de la même espèce par exemple : les Entérobactéries et Pseudomonas résistent naturellement aux macrolides.

#### b. Résistance acquise

Pour les bactéries ayant des résistances acquises, l'information génétique est localisée dans le chromosome bactérien et/ou supportée par les plasmides de résistances. La transmission de ce type de résistance est assurée par trois mécanismes, la transduction qui nécessite l'intervention d'un vecteur viral (phage), la transformation d'ADN exogène nu et son incorporation au génome de la bactérie en phase de compétence et la conjugaison entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice.