

Chapitre 4 : 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).

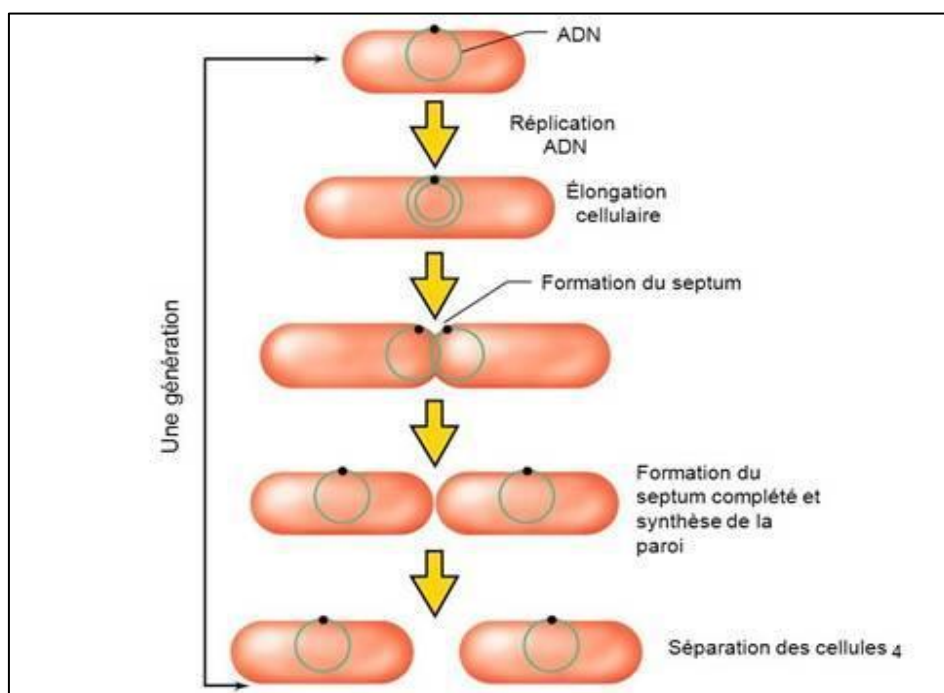


Figure 1 : Division cellulaire par scissiparité.

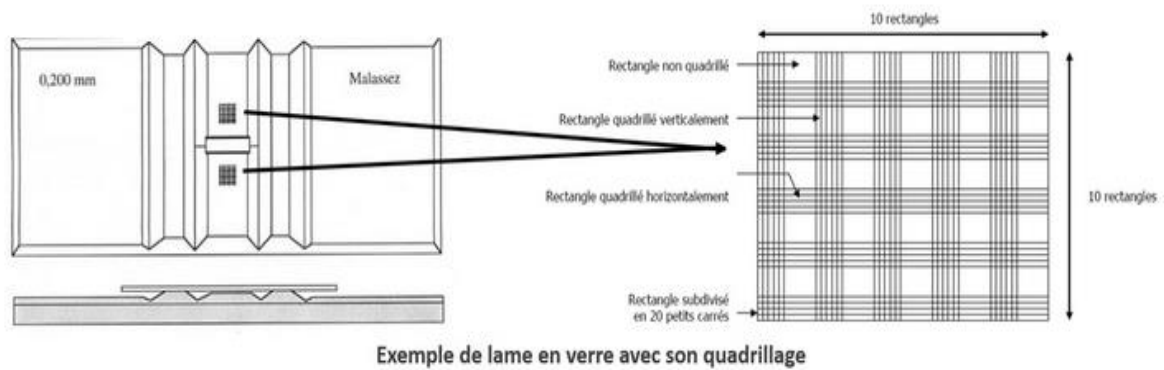
1. Mesure de la croissance

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.

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.



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**).

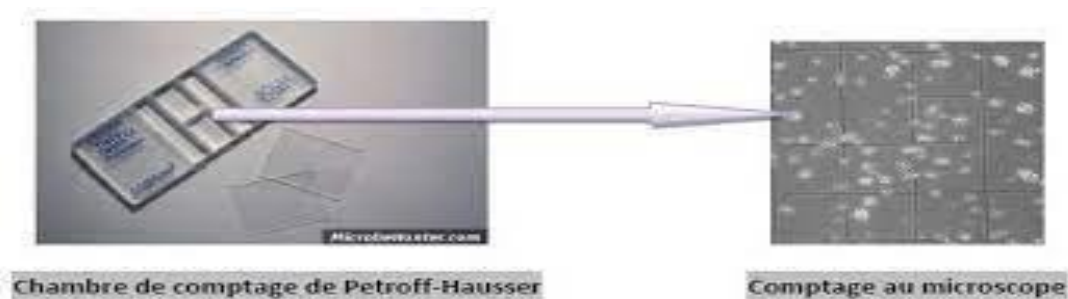
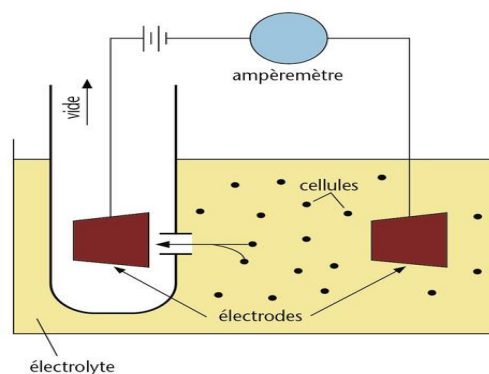


Figure 2 : Cellule Petroff-Hausser.

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. Partant du principe que chaque cellule microbienne donne naissance à une colonie, l'étalement puis l'incubation d'un volume précis d'une suspension microbienne ou de sa dilution à la surface d'une gélose donne des colonies visibles à l'œil nu et facilement dénombrables. Cependant, le résultat est exprimé en Unités Formants Colonies (UFC) /ml (**Fig.3**).

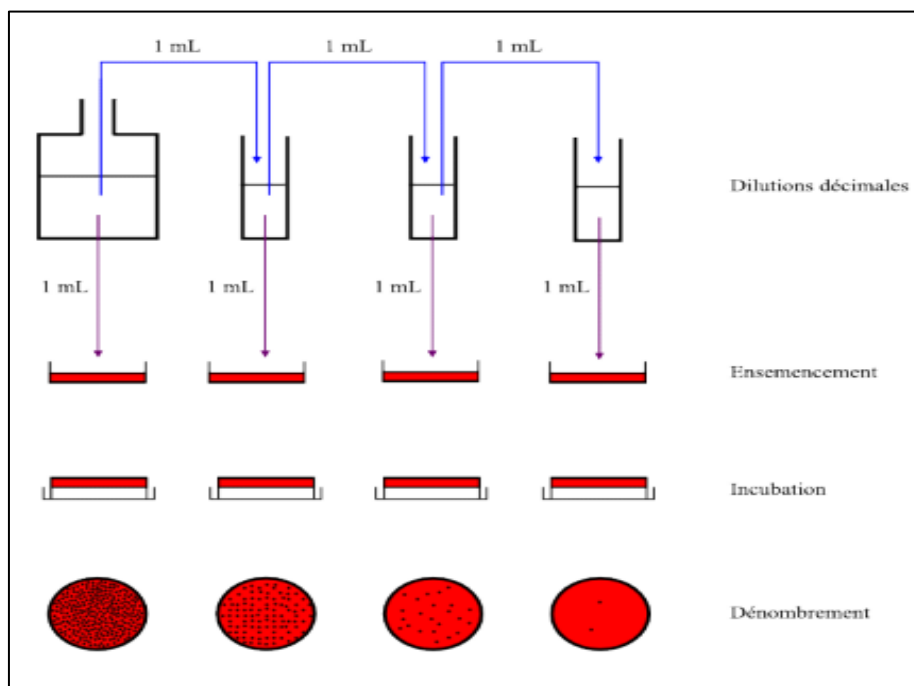


Figure 3 : Dénombrement des bactéries par la technique des dilutions.

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 CO₂.
- 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

La croissance d'une bactérie est définie par deux paramètres :

- **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.4).

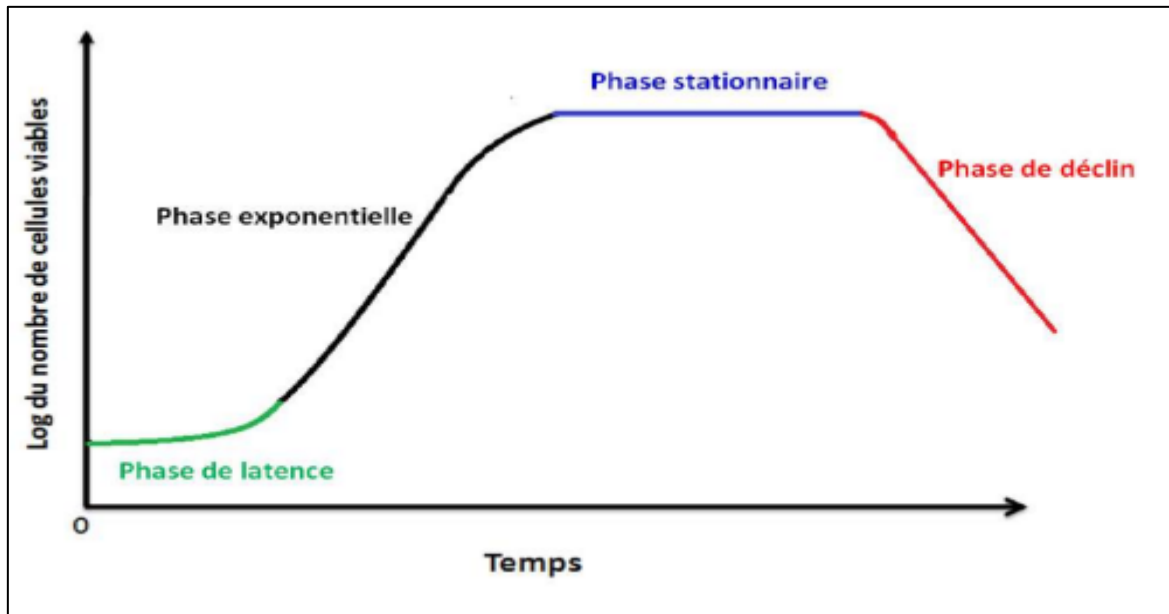


Figure 4 : Courbe de croissance en milieu non renouvelé.

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 (μ) 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 (μ) 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 (μ) **néгатif**. 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. 5**). Les bactéries préfèrent utiliser le glucose d'abord, mais quand celui-ci est épuisé du milieu de culture, elles utilisent le lactose.

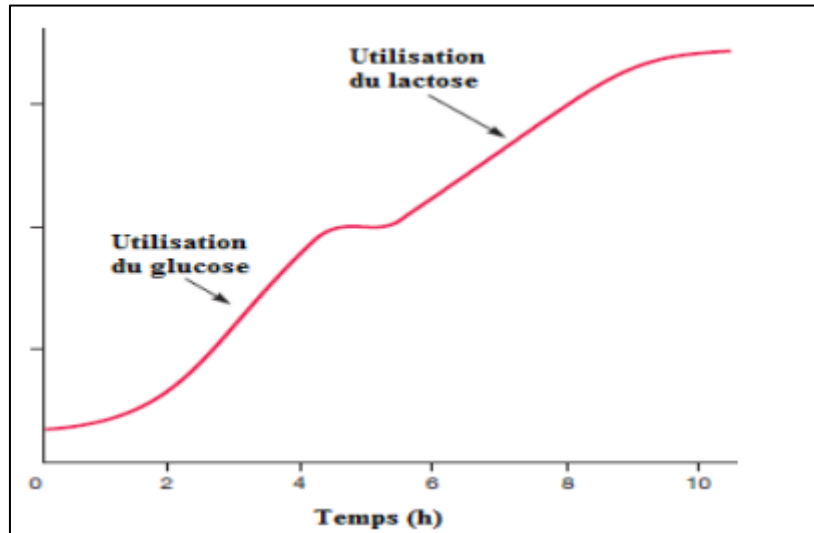


Figure 5 : Phénomène de diauxie chez les bactéries cultivées en présence du glucose et du lactose comme source de carbone.

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. 6**) et les chémostats.

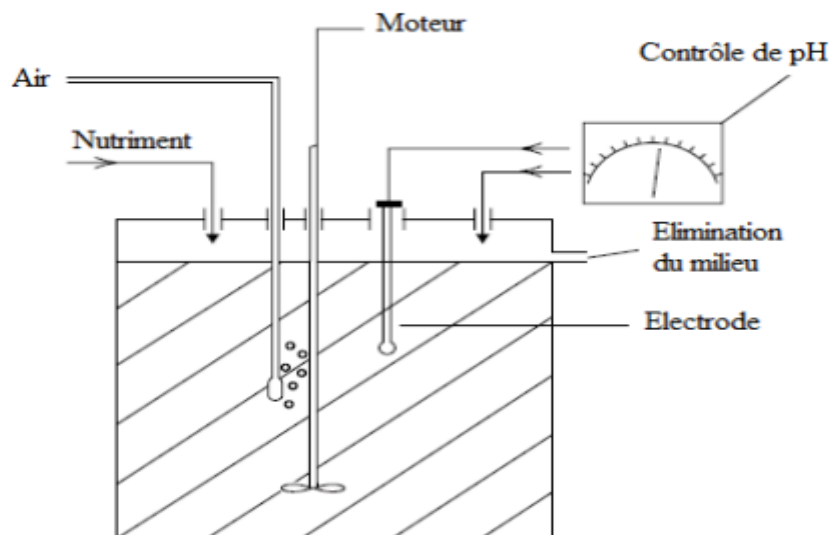


Figure 6 : Schéma du turbidostat.

5. Les agents antimicrobiens

La croissance bactérienne doit être contrôlée pour mieux diriger son usage à des fins expérimentales ou industrielles. De multiples agents physiques et chimiques sont utilisés pour inhiber ou tuer les microorganismes selon plusieurs procédés.

5.1. La stérilisation

La stérilisation est l'opération qui consiste à éliminer les micro-organismes d'un objet, et ce de manière durable. Il existe deux grands moyens de Stérilisation : La chaleur et la filtration.

5.1.1. La stérilisation par la chaleur

Chaleur détruit les bactéries et les spores. On distingue les procédés à chaleur « sèche ou humide ».

A) Chaleur sèche : Elle est utilisée par un chauffage direct :

- **Flambage :** Le passage dans la flamme (bec Bunsen) de la surface de matériel non inflammable afin de détruire toute matière organique, les matériel utilisés sont : l'anse de platine, les pipettes Pasteur, pince et lame.
- **Four Pasteur :** C'est un four-étuve à air chaud et sec. Il est utilisé à 180°C pendant 90 minutes. Cet appareil n'est utilisé que pour la stérilisation de la verrerie préalablement nettoyée et séchée ou de matériel métalliques (instruments de dissection) pouvant tolérer de très hautes températures : les tubes, flacons, bécher, Heerlen.

b) Chaleur humide : La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités : la stérilisation à l'autoclave, la Pasteurisation et la Tyndallisation.

- **Autoclave :** c'est la méthode de stérilisation la plus efficace. Elle est réalisée dans un appareil appelé : Autoclave. Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 120°C pendant 15-20min. Ce procédé tue toutes les cellules végétatives et les endospores.
- **Pasteurisation :** La pasteurisation est un traitement thermique léger des liquides alimentaires (lait, jus,...) en détruire partiellement les germes pathogènes pour préserver la qualité. Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C. La pasteurisation doit être suivie par un refroidissement rapide à 4-6°C ce qui ralentit la multiplication bactérienne.
- **Tyndallisation :** La tyndallisation est une série de 3 chauffages brefs à des températures de 70-100°C pendant 30min-1h à intervalles réguliers de 24h entre chaque chauffage, ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant. La Tyndallisation est destinée aux substances thermolabiles par exemple la destruction des pathogènes du lait se fait par un cycle de 63°C pendant 30 minutes suivie de 73°C pendant 15 minutes.

5.1.2. La filtration : La filtration est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 µm. Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre. Cette technique est intéressante lors d'utilisation de produits thermolabiles comme certains acides aminés aromatiques, vitamines, hormones de croissance, acides nucléiques et une bonne partie des antibiotiques.

5.2. 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 boites de Pétri en matière plastique et de produit pharmaceutiques.

5.3. Les désinfectants (agents chimiques)

Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué dans le laboratoire pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.

5.4. Les 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 chimiothérapeutiques sont dépourvus de toxicité.

5.4.1. 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, algicides et virucides.
- 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 +/-

5.4.2. 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. 7).

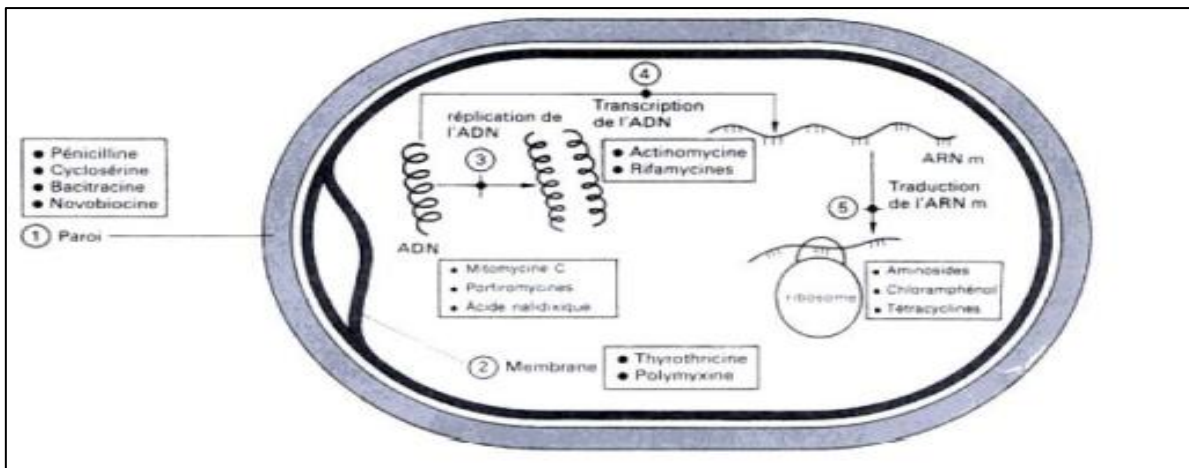


Figure 7 : Schéma des sites d'action des antibiotiques.

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, triméthoprim
- 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.

5.4.3. 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 (**Fig. 8**).

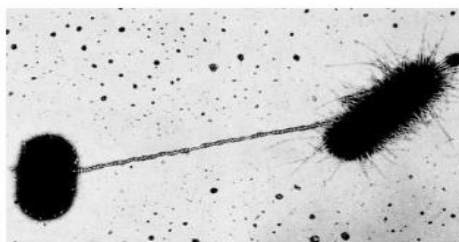


Figure 8 : phénomène de conjugaison entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice de matériel génétique.