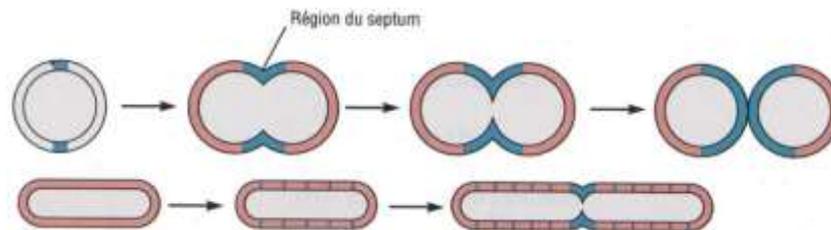


Chapitre V : Croissance bactérienne

Introduction

La croissance est l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme. Chez les organismes unicellulaires (bactéries, levures), elle aboutit à une augmentation du **nombre** d'individus. Une population bactérienne augmente donc au rythme des divisions cellulaires qui se font par **scissiparité** appelée aussi **fissiparité** ou **bipartition** : il se forme un septum transversal qui sépare progressivement les deux futures cellules filles, chacune d'entre-elles recevant une copie du chromosome de la cellule mère.



La séparation des cellules n'est pas toujours totale, ce qui aboutit à des chaînettes, des amas,..... La croissance bactérienne est fortement influencée par les conditions physicochimiques de l'environnement (présence de nutriments, d'agents antibactériens, température, pH, oxygène, ...).

1. Paramètres de la croissance bactérienne

La croissance des bactéries peut être étudiée en mesurant le nombre de cellules en fonction du temps ou encore la masse que représente la population bactérienne. Un cycle de division cellulaire (formation de deux cellules filles à partir d'une cellule mère) est appelé **génération**. Les paramètres de croissance sont alors : le temps de génération (**g**), le nombre des générations (**n**) et le taux de croissance (**v**).

1.1. Nombre de générations (n)

Les bactéries se multiplient par division binaire, leur accroissement s'effectue selon une progression géométrique de l'ordre 2 : $2^0, 2^1, 2^2, 2^3, \dots, 2^n$ ce qui correspond à 1, 2, 4, 8, 16 cellules.

Soit :

N_0 ; Nombre de cellules par unité de volume au temps (t_0)

N ; Nombre de cellules par unité de volume au temps (t)

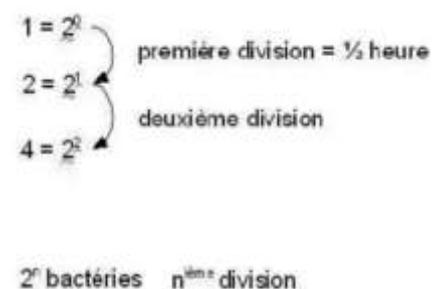
Au temps t : $N = N_0 \times 2^n$

$\log N = \log N_0 + n \log 2$

$\log N - \log N_0 = n \log 2$

Le nombre de divisions (génération) cellulaires (n) sera :

$$n = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

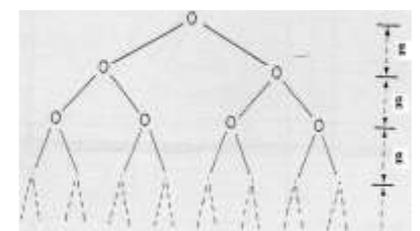


1.2. Temps de génération « g »

Le **temps de génération** est le temps nécessaire à une génération ou un **dédoublé**. Il est différent selon les espèces bactériennes ; Il est d'environ 20 min pour *E.coli*, et 800 min pour *Mycobacterium tuberculosis*.

$$\text{Le temps de génération } g = t/n$$

où t représente la durée de la croissance exponentielle et n représente le nombre de générations.



1.3. Taux de division ou taux de croissance (V)

C'est le nombre de divisions par unité de temps. Il est de 3 pour *E.coli*, de 0,75 pour *Lactobacillus acidophilus* et de 0,075 pour *Mycobacterium tuberculosis*.

Le nombre de divisions par heure $v=1/g$

$$V = \frac{n}{t} = \frac{\text{Log } N - \text{Log } N_0}{\text{Log } 2 (t_n - t_0)}$$

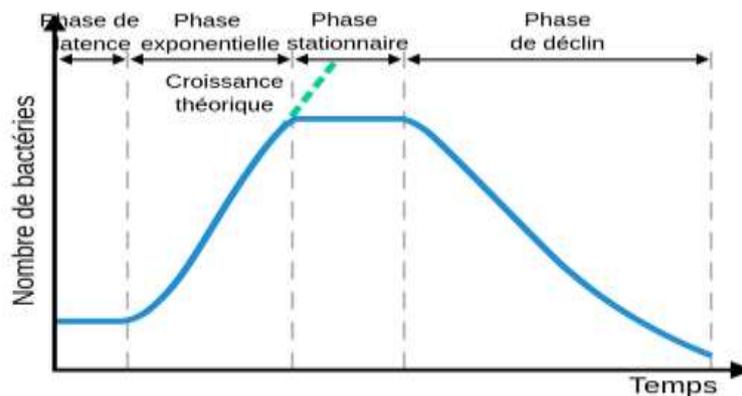
2. Courbe de croissance bactérienne

Dans une culture discontinue où le milieu de culture n'est pas renouvelé et par conséquent, les nutriments s'épuisent avec le temps, la croissance peut être représenté sur un graphique appelé courbe de croissance en portant :

- ✓ En ordonnée, les valeurs des logs de la D.O du milieu de culture ;
- ✓ En abscisse, le temps.

2.1. Les phases de croissance bactérienne

La courbe de croissance obtenue montre 4 phases :



- **Phase de latence** : C'est la phase d'adaptation des bactéries à leur milieu de culture. Le taux de croissance (nombre de divisions par unité de temps) est nul. La bactérie ne se divise pas mais elle s'adapte au milieu de culture par la mise en route de ses systèmes enzymatiques convenables aux nutriments du nouveau substrat de culture.

La durée de cette phase de latence varie en fonction de l'espèce bactérienne et de nombreux facteurs tels que la composition du milieu, la température, la taille de l'échantillon à inoculer, etc.

- **Phase de croissance exponentielle** : Elle débute par une phase d'**accélération** (fin de la phase de latence) durant laquelle les bactéries métabolisent les nutriments apportés par le milieu de culture et commencent à se diviser. Le temps de génération se raccourcit pour atteindre la valeur caractéristique de l'espèce bactérienne étudiée et le taux de croissance (V) atteint la valeur maximale.

- **Phase stationnaire** : La phase stationnaire débute par une période de **décélération** (ralentissement) pendant laquelle diminue la vitesse de division cellulaire. Dans un système fermé, tel qu'une boîte de Pétri, la croissance ne peut être maintenue indéfiniment, la population bactérienne manquera de ressources, d'espace ou produira une quantité excessive de produits toxiques. Les nouvelles générations compensent (équilibrent) les vieilles bactéries qui se lisent.

- **Phase de déclin** : Les bactéries sont gravement endommagées et perdent irréversiblement leur capacité à se reproduire et commencent à mourir à un rythme accéléré. Ceci est lié à un épuisement des nutriments et une accumulation des déchets. Le temps de génération est de plus en plus long, créant un déséquilibre entre les nouvelles générations de bactéries (de plus en plus rares) et les vieilles bactéries qui meurent en plus grand nombre.

2.2. Les modifications de la courbe de croissance

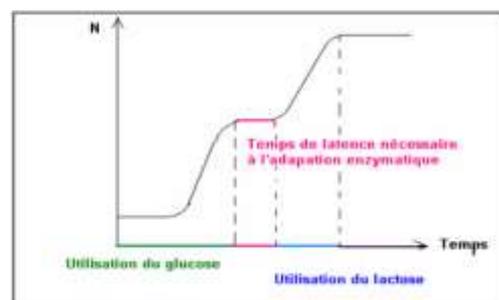
a- Croissance continue

Elle correspond à un système ouvert utilisé pour maintenir une population microbienne en croissance exponentielle continue. Cela nécessite un apport constant de nutriments et le retrait simultané du volume de culture afin de maintenir un milieu de culture renouvelé. Des équipements tels que des **chémostats** sont utilisés. Ce processus est couramment utilisé pour produire des corps bactériens de même âge pour la préparation de vaccins bactériens, ainsi que des métabolites bactériens : vitamines et toxines bactériennes (anatoxines).



b- La diauxie :

En milieu synthétique, lorsque l'on fournit à la bactérie 2 substrats carbonés, on peut observer une courbe **diphasique**, caractérisée par une 1^{ère} croissance exponentielle, suivie d'une phase de latence intermédiaire ensuite d'une 2^{ème} phase exponentielle. Ceci est expliqué par le fait que l'un des substrats est utilisé en 1^{er} jusqu'à épuisement avant que le 2^{ème} substrat ne soit assimilé à son tour.



3. Mesure de la croissance bactérienne

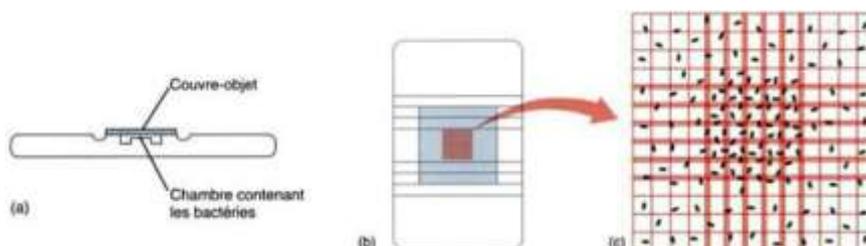
L'estimation de la croissance bactérienne peut être faite par des méthodes directes (dénombrement des cellules bactériennes) ou par des méthodes indirectes (mesure de la biomasse).

a- Méthodes directes : Dénombrement (mesure du nombre) des bactéries

a-1- Numération totale: on utilise pour cela :

- L'examen au microscope optique à l'aide d'une cellule quadrillée (hématimètre) : on compte toutes les bactéries présentes dans des suspensions liquides en utilisant des cellules de comptage telles que :
 - ✚ Cellule de Malassez (ou de Thoma) utilisée pour le dénombrement des cellules de grandes tailles.
 - ✚ Cellule de Petroff-Hausser est utilisée pour le dénombrement des petites cellules (ex: bactéries).

Inconvénient : Cette technique ne permet pas de distinguer les bactéries viables des bactéries mortes.



- La mesure automatisée avec un compteur de particules, des bactéries en suspension dans une solution d'électrolyte.

Inconvénients : On ne distingue pas les cellules mortes des cellules vivantes.

- La méthode d'épifluorescence : Les bactéries sont colorées par un fluorochrome comme par exemple l'acridine orange et observées au microscope à fluorescence.

a-2- Numération des cellules viables :

Le dénombrement est réalisé après culture cellulaire sur milieu gélosé ou sur milieu liquide. On distingue 3 méthodes (2 sur milieu solide et une sur milieu liquide) :

✚ **Numération sur milieu solide** : on dénombre les bactéries cultivables (viables) qui forment des colonies ou UFC (Unités Formant Colonie) sur un milieu de culture approprié dans les boîtes de Pétri.

Inconvénient : Plusieurs cellules agglomérées peuvent ne donner qu'une seule colonie. De nombreuses cellules isolées ne forment pas nécessairement de colonie

✓ **La filtration sur membrane**

Elle repose sur le passage de liquide à travers une membrane filtrante qui empêche le passage des cellules dont la dimension est supérieure à celle du filtre. Cette technique est souvent utilisée pour les analyses bactériologiques des eaux.

Inconvénient : elle ne permet pas d'analyser des volumes importants de liquides.



Le nombre de colonies présentes sur la membrane permet de calculer la concentration bactérienne **N** en nombre d'Unités Formant Colonie par ml (UFC/ml) selon la formule : $N = n/V$

Où n : nombre d'UFC sur la membrane, V : volume de produit filtré en ml

✓ **Le comptage (dénombrement) après dilution**

Un échantillon dilué de bactéries est réparti sur une surface solide, ou incorporé dans un milieu gélosé avant sa solidification. Chaque microorganisme ou groupe de microorganismes se développe en une colonie distincte lors de l'incubation à une température appropriée. Étant donné qu'il n'est pas certain que chaque colonie provienne d'une cellule isolée, les résultats sont souvent exprimés en termes d'unités formatrices de colonies (**UFC**) plutôt qu'en nombre absolu de microorganismes. Pour obtenir des résultats fiables, il est recommandé que les boîtes contiennent entre 15 et 300 colonies.

$$N \text{ (UFC/ml)} = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0.1 n_2) d}$$

N : nombre de microorganismes/ml de suspension

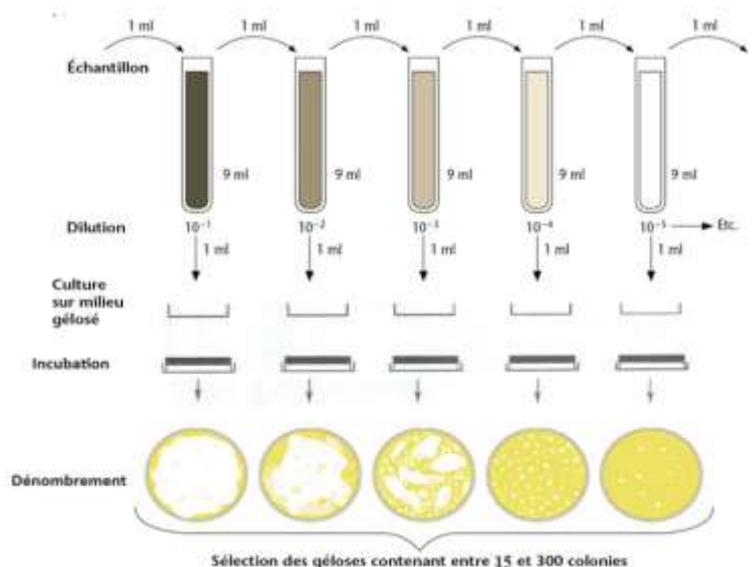
Σc: la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de **2** dilutions successives.

V : le volume de l'inoculum ensemencé dans chaque boîte en ml. (1 ml ou 0,1 ml)

n₁ : nombre de boîtes retenues à la 1^{ère} dilution

n₂ : nombre de boîtes retenues à la 2^{ème} dilution

d : la dilution correspondant à la 1^{ère} dilution retenue



Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs : si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédant n'est pas modifié ; si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédant est augmenté d'une unité. Le résultat est exprimé par un nombre compris entre **1,0** et **9,9** multiplié par la puissance appropriée de **10**.

Exemple :

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19\ 182$$

N = 19182 : En arrondissant le résultat tel que prescrit ci-dessus, le résultat est 19 000 ou $1,9 \times 10^4$ UFC/ml.

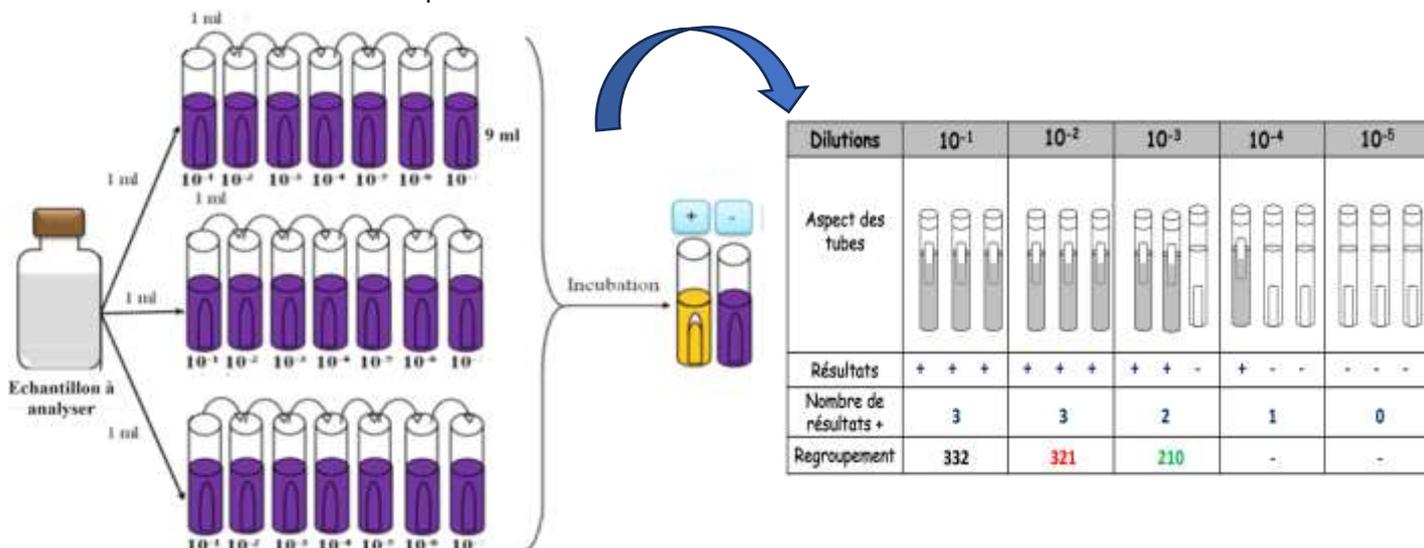
🔗 Numération sur milieu liquide : méthode du nombre le plus probable (N.P.P)

Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche). Un seul micro-organisme présent dans l'inoculum introduit dans un milieu liquide se développe en y créant un trouble. La lecture des tubes contenant est de type binaire :

- Résultat négatif si absence de trouble et/ou de modification du milieu.
- Résultat positif si présence de trouble et/ou de modification du milieu.

Le dénombrement repose sur une analyse statistique et fournit par calcul des nombres les plus probables (NPP). Il s'effectue en utilisant les tables de **Mac Grady**, le nombre caractéristique de la série réalisée est une combinaison de trois chiffres :

- Chaque chiffre correspond au nombre de tubes « positifs » pour une dilution donnée ;
- Les trois chiffres correspondent à trois dilutions successives ;



Interprétation statistique :

- Dans la ligne « chiffre égal à la somme des tubes positifs », choisir le nombre à 3 chiffres **le plus grand possible et inférieur à 330**.
- Se reporter à la table de Mac Grady afin de trouver le NPP correspondant au nombre 321 : le NPP est 15.
- Choix de la dilution : $d = 10^{-2}$
- Volumeensemencé : $V = 1$ ml

$$N = \frac{NPP}{V \times d}$$

$$N = \frac{15}{1} \times 10^2 = 150 = 1,5 \cdot 10^3 \text{ germes/mL}$$

Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP	Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP
0	0	0	< 0,3	2	2	1	2,8
0	0	1	0,3	2	3	0	2,9
0	1	0	0,3	3	0	0	2,3
0	2	0	0,6	3	0	1	4
1	0	0	0,4	3	0	2	6
1	0	1	0,7	3	1	0	4
1	1	0	0,7	3	1	1	7
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	2	0	9
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	3	0	1,6	3	2	2	21
2	0	0	0,9	3	2	3	29
2	0	1	1,4	3	3	0	20
2	1	0	1,5	3	3	1	50
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	2	0	2,1	3	3	3	> 110

b- Méthodes indirectes : mesure de la biomasse

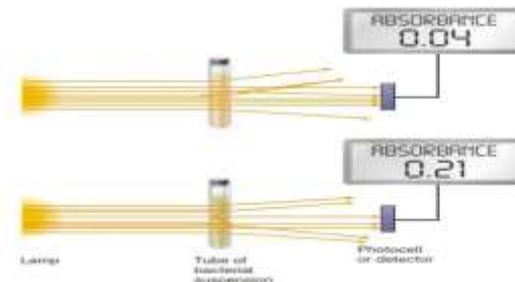
b-1- détermination du poids sec microbien:

Les cellules en croissance dans un milieu liquide sont centrifugées, lavées, séchées à l'étuve et pesées. C'est une technique particulièrement utile pour mesurer la croissance des champignons filamenteux.

- Inconvénient : toute la masse cellulaire est mesurée, de plus, c'est une technique longue et délicate.

b-2- Mesure de la Densité optique (DO)

On évalue la DO du milieu de croissance en fonction du temps, à une longueur d'onde donnée (généralement de 450 à 550nm) en utilisant la Loi de BEER-LAMBERT.



4. Agents antimicrobiens

4.1. Définition

Un agent antimicrobien désigne toute substance ou procédé qui inhibent ou tuent les micro-organismes selon plusieurs mécanismes.

4.2. Classification

4.2.1. Les agents physiques

a) La température

✚ Chaleur humide : (autoclave, pasteurisation, tyndallisation)

✚ Chaleur sèche : (poupinel, bec Bunsen, ..)

b) Les radiations : U.V, rayons X,

c) La Filtration

4.2.2. Les agents chimiques : oxydants, alcools, métaux lourds et leurs sels, savons et détergents, composés phénoliques et aldéhydes ;etc

4.2.3. Les agents chimio-thérapeutiques antimicrobiens (antibiotiques)

4.2.3.1. Définition des antibiotiques

Ce sont des substances chimiques d'origine naturelle ou synthétique, qui ont la capacité d'inhiber la croissance (ATBs bactériostatiques) ou de détruire les bactéries (ATBs bactéricides).

4.2.3.2. Classification des antibiotiques

Selon leurs actions antimicrobiennes :

▪ Les antibiotiques statiques : Agents qui inhibent la croissance, tels que : les bactériostatiques et fongistatiques.

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

Selon le spectre d'activité :

▪ Les antibiotiques à large spectre.

▪ Les antibiotiques à spectre étroit.

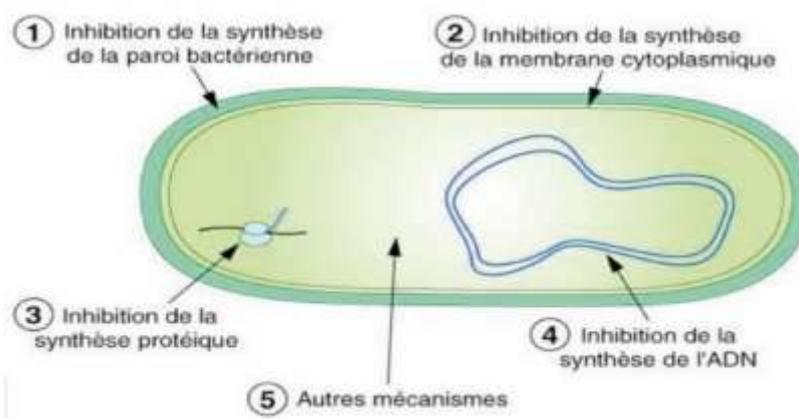
Selon sur la composition chimique : de chaque antibiotique : c'est la classification la plus souvent utilisée.

Tableau : Principales familles d'antibiotiques

Famille	Antibiotiques (DCI)
β-lactamines	Pénicillines : amoxicilline, oxacilline...
	Céphalosporines : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone...
Aminosides	Amikacine, gentamicine, nétilmicine, streptomycine, tobramycine
Macrolides	Érythromycine, spiramycine, azithromycine
Cyclines	Doxycycline, minocycline, métacycline...
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine, ofloxacine, péfloxacine, lévofloxacine
Glycopeptides	Vancomycine, teicoplanine
Nitro-5-imidazolés	Métronidazole
Phénicolés	Thiamphénicol

4.2.3.3. Mode d'action des antibiotiques

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



5.2.3.4. La résistance aux antibiotiques

Les bactéries ont un grand pouvoir d'adaptation qui leur permet d'acquérir de nouvelles propriétés leur permettant de résister aux antibiotiques. On distingue :

✚ **La résistance naturelle** : elle concerne toutes les souches d'une espèce bactérienne. Cette résistance est chromosomique et a un caractère permanent transmissible aux cellules filles lors de la réplication bactérienne.

✚ **La résistance acquise** ne concerne qu'une partie des souches d'une espèce bactérienne normalement sensible et apparaît à la suite de l'utilisation des antibiotiques. L'acquisition d'un nouveau mécanisme de résistance résulte :

- ✓ soit d'une mutation survenant sur le chromosome bactérien,
- ✓ soit de l'acquisition de plasmides provenant d'une bactérie déjà résistante.

5.2.3.4.1. Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques

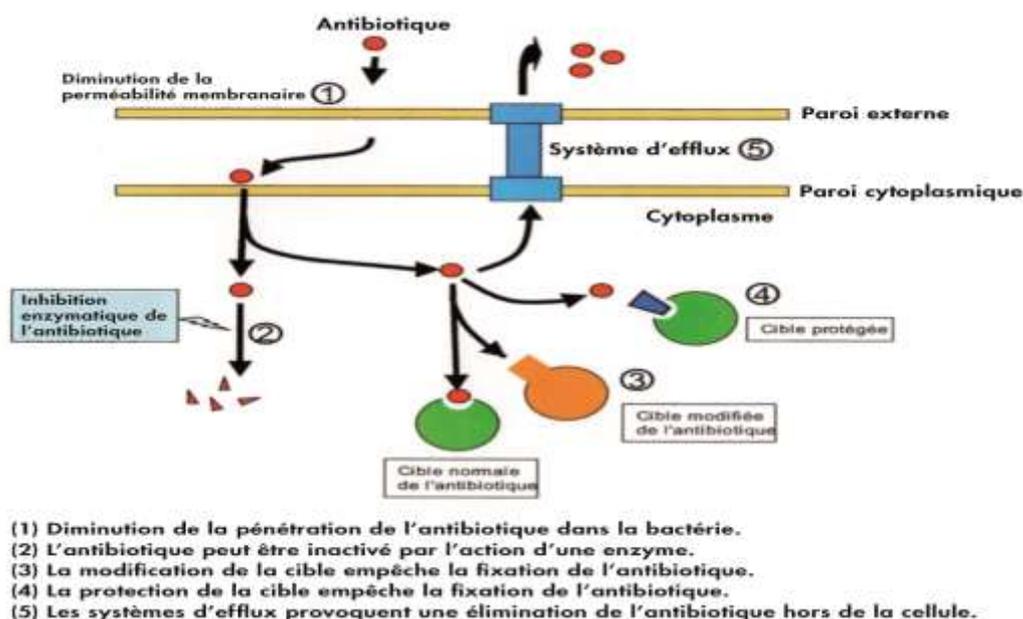
Trois principaux mécanismes de résistance sont actuellement connus :

1. **Inactivation de l'antibiotique** par une enzyme bactérienne
2. **Diminution de la quantité d'ATB atteignant la cible** : l'antibiotique n'est pas modifié, mais il ne peut pas accéder à sa cible au sein de la bactérie

- Soit parce qu'il ne peut plus y pénétrer en raison de la **baisse de la perméabilité membranaire**.
- Soit parce qu'il est **expulsé activement vers l'extérieur de la bactérie** par des protéines jouant le rôle de pompe (systèmes d'efflux).

3. Modification de la cible

- **Modifications quantitatives** : par exemple, l'absence de paroi chez les bactéries du genre *Mycoplasma* est responsable de leur résistance naturelle aux β -lactamines.
- **Modifications qualitatives** : la modification de la structure de la cible peut diminuer son affinité pour l'antibiotique. C'est un mécanisme fréquent de résistance acquise.
- **Protection de la cible** : c'est une protection réversible de la cible (par des protéines empêchant la fixation des quinolones, par exemple).



5.2.3.4. 2. L'antibiogramme

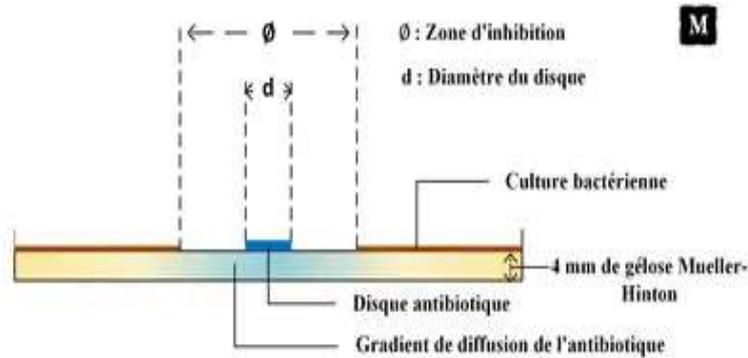
Également appelé **test de sensibilité aux antibiotiques**, est un test in vitro qui détermine la sensibilité ou la résistance des bactéries à des antibiotiques spécifiques.

Il est réalisé en exposant le micro-organisme à différents antibiotiques dans un environnement de laboratoire contrôlé pour évaluer leur efficacité à inhiber ou à tuer les bactéries. Les résultats de l'antibiogramme aident les cliniciens à choisir le ou les antibiotiques les plus efficaces pour traiter une infection bactérienne.

Méthodes de l'antibiogramme

Il existe plusieurs méthodes et techniques disponibles pour **évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques**, les plus utilisées sont :

- **Méthode de diffusion** : Un inoculum standardisé de bactéries (le plus souvent 0.5Mcf) est tamponné sur la surface d'une boîte de gélose Mueller-Hinton (MH). Des disques de papier filtre imprégnés d'agents antimicrobiens sont placés sur la gélose. Après une incubation de 16 à 18 h, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré autour de chaque disque et comparée à des critères d'interprétation.



- **Méthode de macro ou micro-dilution en bouillon** : des dilutions en série d'antibiotiques sont préparées dans des tubes ou des plaques de micro-titration. Une suspension bactérienne est ajoutée et la CMI est déterminée comme la concentration la plus faible inhibant la croissance visible.

