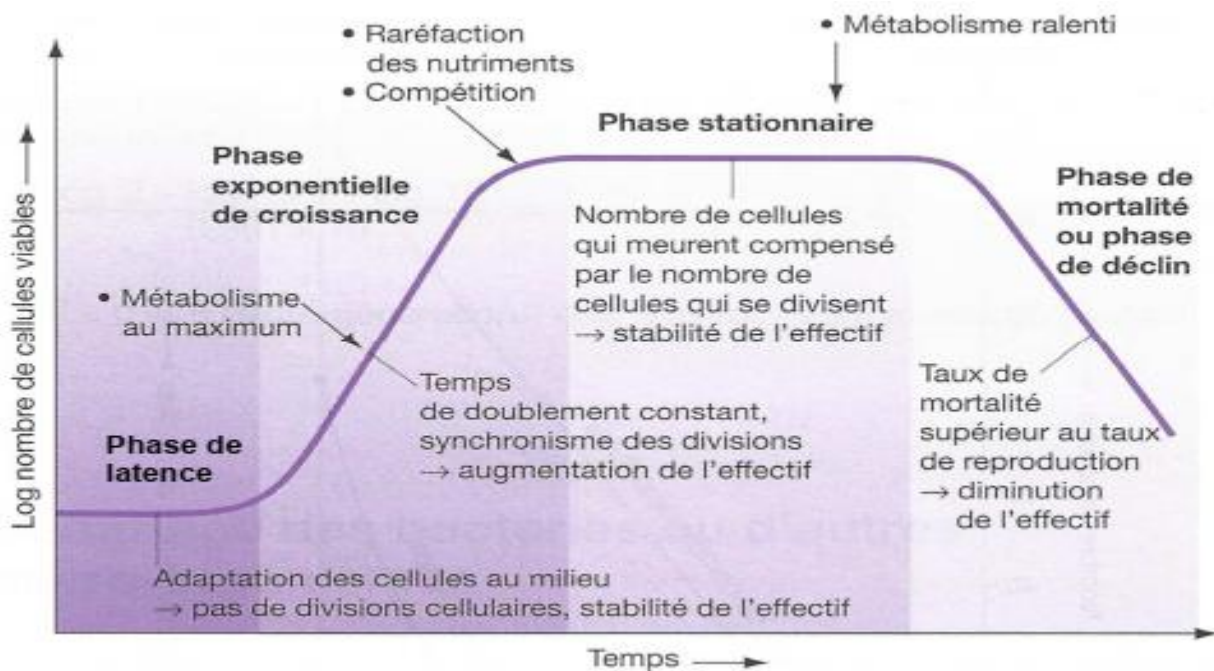


## CHAPITRE IV :

### DYNAMIQUE de la CROISSANCE BACTERIENNE et IMPLICATION dans le DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

#### 1. Dynamique de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne est un phénomène dynamique qui comporte six phases représentées schématiquement dans la figure 01. On étudie la dynamique de la croissance d'une population en analysant la courbe de croissance d'une culture microbienne. Lorsque des micro-organismes sont cultivés en milieu liquide, ils se développent habituellement dans **un système fermé**, culture en « **batch** » ou **discontinue** : ils sont incubés dans un flacon fermé contenant un seul lot de milieu. Comme il n'y a pas d'apport de milieu frais au cours de l'incubation, la quantité d'éléments nutritifs diminue et la concentration de déchets augmente.



**Figure 05:** Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide adapté non renouvelé  
(En abscisse figure le temps d'incubation et en ordonnée la valeur logarithmique du nombre de bactéries).

### **1.1. Phase de latence**

Quand des micro-organismes sont introduits dans un milieu de culture frais, il n'y a pas d'augmentation immédiate du nombre ou de la masse cellulaire, cette période est appelée **phase de latence**. Bien qu'il n'y ait pas de division cellulaire, ni d'augmentation de la masse, de nouveaux composants cellulaires commencent à être synthétisés. Une phase de latence avant le début de la division cellulaire est nécessaire pour différentes raisons. Les cellules peuvent être âgées et dépourvues d'ATP, de cofacteurs essentiels et de ribosomes. Ces différents constituants doivent être synthétisés avant que la croissance ne puisse débuter. Le milieu peut être différent de celui dans lequel les micro-organismes se développaient précédemment. Dans ce cas, les cellules pourraient avoir besoin de nouvelles enzymes pour utiliser d'autres nutriments. Les organismes peuvent avoir été endommagés et requérir un certain temps de réparation. Quelles soient les causes, les cellules se réorganisent, répliquent leur ADN, commencent à augmenter leur masse et finalement se divisent.

La durée de la phase de latence varie selon les micro-organismes et la nature du milieu. Cette phase peut être très longue si l'inoculum provient d'une culture âgée ou d'une culture refroidie. L'incubation d'une culture dans un milieu de composition différente donne aussi une longue phase de latence. D'autre part, quand une jeune culture en phase de croissance exponentielle est transférée dans un milieu frais de même composition, la phase de latence est courte ou absente.

### **1.2. Phase d'accélération**

C'est la phase pendant laquelle commence la division bactérienne qui s'accélère régulièrement, jusqu'à devenir maximale et constante.

### **1.3. Phase exponentielle**

Pendant la phase exponentielle ou logarithmique, les micro-organismes se développent et se divisent à la vitesse maximale possible étant donné leur potentiel génétique, la nature du milieu et les conditions de culture. La vitesse de croissance est constante pendant la phase exponentielle, les organismes se divisent en doublant leur nombre à intervalles de temps réguliers. Comme chaque organisme se divise à un moment légèrement différent, la courbe de croissance augmente doucement plutôt que par légers à-coups (Fig. 01). La population est presque uniforme en termes

de propriétés chimiques et physiologiques durant cette phase ; des cultures en phase exponentielle sont donc habituellement utilisées dans les études biochimiques et physiologiques.

La croissance exponentielle est une **croissance à l'équilibre**. Tous les constituants cellulaires sont synthétisés à des vitesses constantes les unes par rapport aux autres. Un changement des concentrations en nutriments ou des conditions de culture provoque **une croissance en équilibre instable** car les vitesses de synthèse des composants cellulaires varient les unes par rapport aux autres jusqu'à ce qu'un nouvel état d'équilibre soit atteint. Cette réponse est facilement observée dans une expérience de « **shift-up** » où les bactéries sont transférées d'un milieu de culture pauvre à un milieu riche. Les cellules synthétisent d'abord de nouveaux ribosomes pour augmenter leur capacité de synthèse protéique. Il y a ensuite augmentation de la synthèse des protéines et de l'ADN. Enfin, l'augmentation attendue de la vitesse de croissance se produit.

La croissance en équilibre instable résulte également du transfert de la population bactérienne d'un milieu riche à un milieu pauvre. Dans un milieu riche, les organismes disposent directement de nombreux composés cellulaires, mais le transfert vers un milieu inadéquat exige un certain temps pour fabriquer les enzymes nécessaires à la biosynthèse des nutriments non disponibles. Par conséquent, la division cellulaire et la réplication de l'ADN se poursuivent après un tel changement, mais la synthèse nette de protéines et d'ARN diminue. Les cellules deviennent plus petites et se réorganisent d'un point de vue métabolique jusqu'à ce qu'elles soient capables de se développer à nouveau. La croissance à l'équilibre est alors attendue.

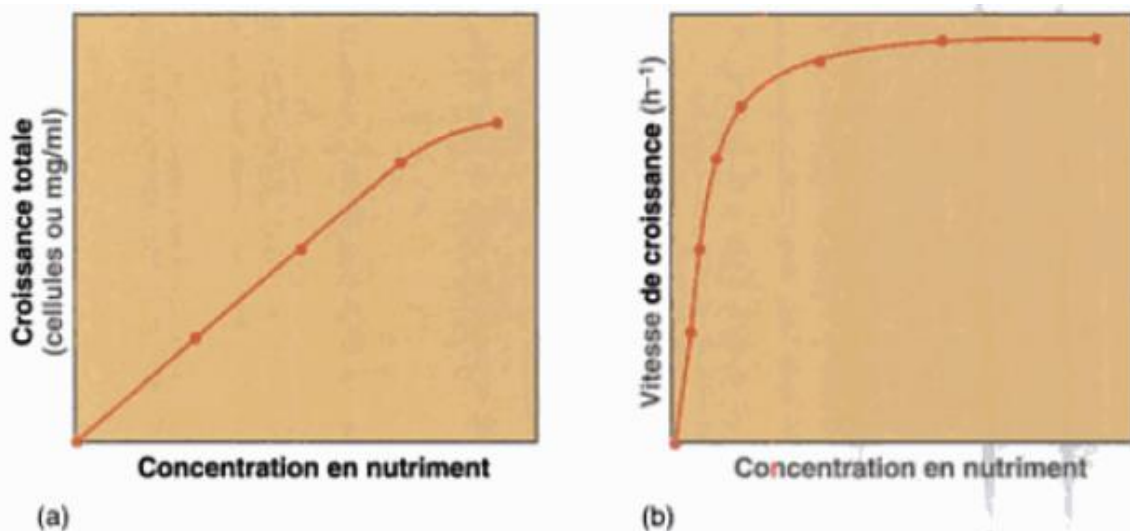
Les expériences de « **shift-up** » et « **shift down** » démontrent que la croissance microbienne est sous contrôle précis et coordonné. Elle répond rapidement à des modifications du milieu.

Quand la croissance microbienne est limitée par la faible concentration d'un élément nutritif essentiel, la croissance nette finale ou rendement en cellule, augmente avec la quantité initiale de nutriment limitant (Fig. 02a). C'est la base des dosages microbiologiques et vitamines et d'autres facteurs de croissance. La vitesse de croissance augmente aussi avec la concentration en facteurs nutritifs (Fig. 02b) mais d'une façon hyperbolique. La forme de la courbe semble traduire la vitesse d'absorption des nutriments par les protéines de transport microbiennes.

#### 1.4. Phase de ralentissement

Le taux de croissance diminue progressivement, entraînant parallèlement une augmentation de plus en plus réduite du nombre de cellule bactérienne. Biologiquement, ce phénomène correspond à l'effet limitant de l'évolution défavorable du milieu qui s'accroît jusqu'à sa limite maximale où toute croissance s'annule. Pendant cette phase de stress nutritionnel ou autre, survient souvent le processus de sporulation, ainsi que la libération des métabolites secondaire comme les antibiotiques ou les toxines (chez les organismes qui en sont capables).

En générale, les phases de croissance exponentielle, stationnaire et de décroissance sont significativement plus rapides chez les bactéries thermophiles, elles sont plus lentes chez les bactéries mésophiles et encore plus lentes chez les bactéries psychrophiles.



**Figure 02:** Concentration des nutriments et la croissance

(*a*: effet des modifications de concentration d'un nutriment limitant sur le rendement microbien total ; *b*: effet sur la vitesse de croissance).

#### 1.5. Phase stationnaire

La croissance de la population finit par s'arrêter et la courbe de croissance devient horizontale (Fig. 01). Cette phase stationnaire est habituellement atteinte par les bactéries à une concentration d'environ  $10^9$  cellules/ml. D'autres micro-organismes n'atteignent pas une telle densité de population, la concentration maximale est de  $10^6$  cellules/ml dans une culture de protozoaires et d'algues. La taille de la population dépend de la disponibilité en éléments nutritifs et d'autres facteurs aussi bien que du type de micro-organisme cultivé. Pendant la phase stationnaire, le

nombre total de micro-organismes viables reste constant. Ceci peut résulter d'un équilibre entre division et mort cellulaire, ou bien, la population peut simplement cesser de se diviser et rester métaboliquement active.

Les populations microbiennes entre en phase stationnaire pour plusieurs raisons. Un des facteurs les plus évidents est la limitation en éléments nutritifs (culture en absence d'O<sub>2</sub>). Si une substance essentielle est sévèrement réduite, la croissance de la population diminuera. L'accumulation de déchet toxique peut également arrêter la croissance d'une population bactérienne.

Comme nous l'avons vu, les bactéries en culture peuvent entrer en phase stationnaire en réponse au manque de nourriture. Ceci doit se produire fréquemment dans la nature car les niveaux de nutriments sont bas dans beaucoup d'environnements. La privation peut aussi être une expérience positive pour les bactéries. Beaucoup de bactéries ne répondent pas par des changements morphologiques évidents comme la formation d'endospores mais diminuent simplement la taille avec souvent un rétrécissement du protoplaste et une condensation du nucléoïde. *Les changements les plus importants concernent l'expression des gènes et la physiologie.* En effet, les bactéries privées de nourriture synthétisent une série de **protéines de manque** qui rendent la cellule beaucoup plus résistante aux dommages. Parmi les moyens mis en œuvre: elles augmentent les pontages du peptidoglycane donc la solidité de la paroi; des protéines se fixant à l'ADN des cellules en manque, protègent cet ADN ; les chaperons empêchent la dégradation protéique et renaturent les protéines endommagées. De ces mécanismes et de nombreux autres, il résulte que les cellules en manque deviennent beaucoup plus difficiles à tuer et plus résistantes à la privation elle-même, aux changements nocifs de température, aux dommages oxydatifs ou osmotiques et aux agents chimiques comme le chlore. Ces modifications sont si efficaces que certaines bactéries peuvent survivre au manque de nourriture pendant des années. Il y'a des preuves que *Salmonella typhimurium* et d'autres bactéries pathogènes deviennent plus virulentes lorsqu'elles sont privées de nourriture.

Exemple, les streptocoques sont capables de produire tellement d'acide lactique et d'autres acides organiques par fermentation des sucres, que leur milieu devient acide et que la croissance est inhibée. Mais les cultures de streptocoques entrent aussi en phase stationnaire par suite d'un épuisement des sucres. Ainsi, l'entrée dans la phase stationnaire peut être due à plusieurs facteurs agissant ensemble.

## 1.6. Phase de déclin

Un changement nuisible de l'environnement comme le carbone en nutriment et l'accumulation de déchets toxiques conduisent à la diminution du nombre de cellules viables, caractéristique de la phase de mortalité. La mort d'une population bactérienne, comme sa croissance durant la phase exponentielle, est habituellement logarithmique (une proportion constante de cellule meurt chaque heure). Ceci est valable même si le nombre total de cellules reste constant parce que les cellules ne sont pas lysées après leur mort. Souvent, la seule façon de déterminer si la cellule bactérienne est morte, est de l'incuber dans un milieu frais. On considère qu'elle est morte si elle ne se développe pas et ne se divise pas. Ainsi la mort est définie comme la perte irréversible de la capacité de se diviser. Bien que la population bactérienne meure de façon logarithmique, le taux de mortalité peut diminuer après une réduction drastique de la population. Ceci est due à la survie de cellule particulièrement résistantes. Pour cette raison et d'autres, la courbe de la phase de mortalité peut être complexe.

## 2. Implication dans le diagnostique bactériologique

### 2.1. Application au dénombrement bactérien

Le dénombrement des bactéries par unité de volume d'échantillon analysé se fait après culture et permet d'apprécier la quantité de bactéries viables. L'ensemencement d'un volume défini d'échantillon sur milieu de culture gélosé permettra, après dénombrement des colonies bactériennes obtenues après incubation, de calculer les bactéries présentes dans l'échantillon analysé. Le résultat est exprimé en **Unités Formant Colonie par millilitre (UFC/ml)**.

**Exemple :** la culture de 100 µl d'un liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) permet de dénombrer 70 colonies bactériennes après 48 heures d'incubation à 37°C, la numération bactérienne est donc de 700 UFC/ml de LBA (Le seuil à partir duquel la quantité de bactéries est considérée comme significative est de 10<sup>4</sup> UFC/ml de LBA).

De même, des systèmes appelés lames immergées ou Uricult® permettent la numération des bactéries présentes dans un échantillon d'urine au moment du prélèvement et permettront une estimation fiable de ce nombre ne tenant pas compte d'une multiplication bactérienne éventuelle durant le délai d'acheminement des échantillons au laboratoire.

Le dénombrement est d'une importance capitale dans la plupart des analyses bactériologiques puisque la quantité de bactéries présente dans l'échantillon conditionne la réalisation éventuelle d'un antibiogramme (voir ci-après) ainsi que l'instauration d'une antibiothérapie chez le patient. Par exemple, un dénombrement bactérien de  $10^3$  UFC/ml d'urine n'est pas considéré comme significatif d'une infection bactérienne.

## 2.2. Application à l'identification bactérienne

L'identification des bactéries repose sur l'étude de leur croissance en présence de divers substrats ou **étude du métabolisme bactérien** (Fig. 03), on peut ainsi étudier le métabolisme protéique ou le métabolisme glucidique des bactéries par exemple. La combinaison des différents résultats obtenus permet de définir le profil métabolique de la bactérie analysée ce qui permet de l'identifier. Nous donnons ci-après l'exemple de l'étude du métabolisme glucidique de deux bacilles à Gram négatif réalisée en galeries miniaturisées permettant l'étude simultanée d'un panel de plusieurs substrats.



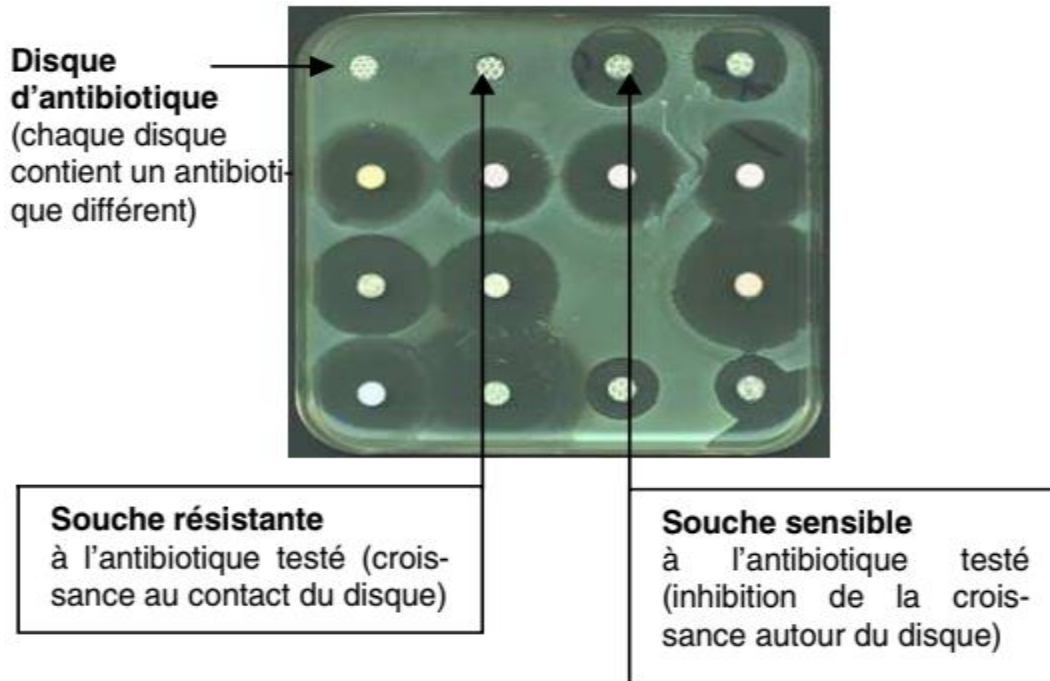
**Figure 03:** Etude du métabolisme glucidique de *Escherichia coli* (en haut) et de *Klebsiella pneumoniae* (en bas).

(Si la bactérie peut métaboliser le glucide présent, la cupule devient jaune ; si elle ne peut utiliser le sucre testé comme source de carbone, la cupule reste bleue (MAN : mannitol, INO : inositol, SOR : sorbitol, RHA : rhamnose, SAC : saccharose, MEL : melibiose, AMY : amygdaline, ARA : arabinose). Alors que *Klebsiella pneumoniae* est capable de métaboliser l'ensemble des huit glucides testés, *Escherichia coli* ne peut en utiliser que quatre).



### 2.3. Application à la détermination de la sensibilité / résistance bactérienne aux antibiotiques.

L'étude de la croissance bactérienne en présence de différents antibiotiques permet de définir pour chaque bactérie analysée un profil de sensibilité / résistance aux différentes molécules antibiotiques (Fig. 04).



**Figure 04:** Antibiogramme selon la méthode des disques ou de diffusion en milieu gélosé.

### 3. Conduite d'un examen cyto bactériologique

Le déroulement de l'examen cyto bactériologique d'un échantillon dépend donc de la physiologie bactérienne à chacune de ses étapes. On peut par exemple schématiser le déroulement d'un examen cyto bactériologique des urines comme dans la figure 05. La durée totale d'un tel examen est donc comprise entre 48 et 72 heures.

### 4. Conclusion

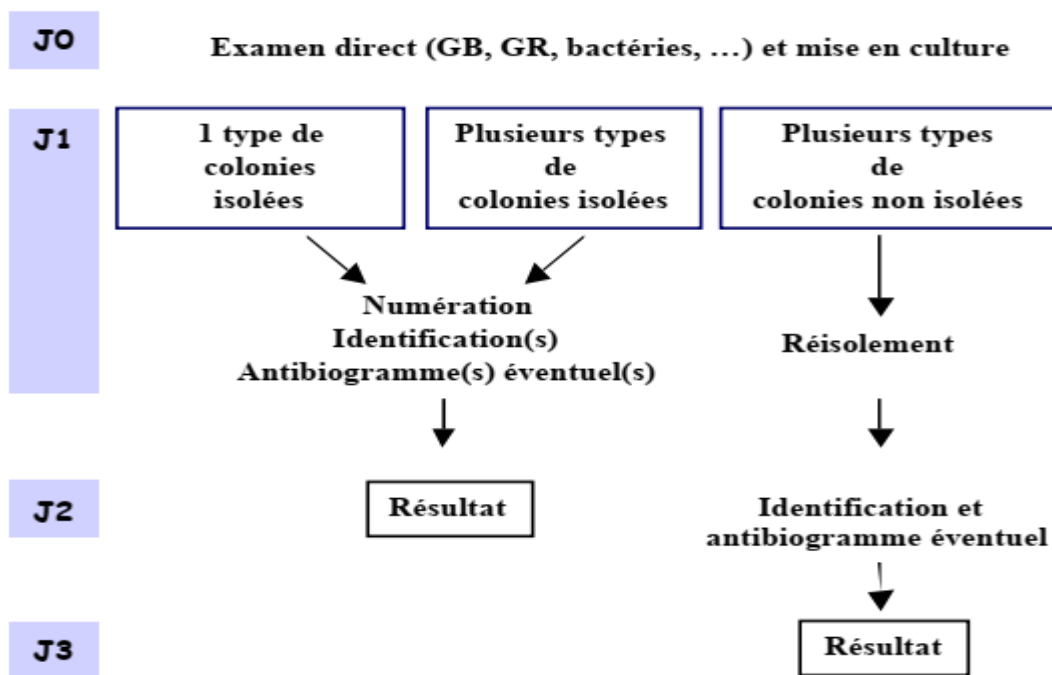
L'intérêt de l'étude de la croissance bactérienne est multiple :

- Lors d'une maladie infectieuse :
  - pour isoler, dénombrer et identifier la ou les bactéries en cause,
  - pour déterminer leur sensibilité aux antibiotiques,



- Lors de la réalisation de contrôles de stérilité ou de densité microbienne dans certains locaux (air des blocs opératoires, surfaces, ...)
- Lors du contrôle de la qualité microbiologique des aliments, des eaux, des médicaments, des produits cosmétiques, etc.

Connaître la physiologie bactérienne est donc indispensable pour la conduite raisonnée d'un examen cyto bactériologique puisqu'il convient de maîtriser les conditions de réalisation de la culture bactérienne (besoins nutritifs et conditions environnementales respectés).



**Figure 05 :** Etapes et les délais de réalisation d'un examen cyto bactériologique des urines.

(GB, globules blancs ; GR, globules rouges)