

PHYSIOLOGIE BACTÉRIENNE

Pr. D. TIOUIT

2011/2012

INTRODUCTION

-Physiologie bactérienne : étudie la nutrition, le métabolisme et la croissance des bactéries en fonction des variations (naturelles ou contrôlées) du milieu dans lequel elles vivent.

-Nutrition : c'est les besoins élémentaires et énergétiques nécessaires à la croissance de la bactérie, ainsi que des facteurs physico-chimiques susceptibles d'influencer cette croissance.

La cellule bactérienne, grâce à son système enzymatique très développé, va donner naissance en peu de temps (20 mn en moy pour la majorité des bactéries de l'environnement), à 2 bactéries filles: on parle de **croissance bactérienne**. (Différence avec les organismes supérieurs : homme, animal, plante).

Une bactérie se forme, se développe, vit et se reproduit puis dépérit et meurt:

(Nutrition , Métabolisme, Croissance bactérienne, Applications.)

I- NUTRITION:

Les besoins alimentaires ou nutriments :

1. Les besoins élémentaires : ce sont les éléments nécessaires à la bactérie pour fabriquer ses constituants :
 - C,H,O,N,P,S en quantité importante
 - Fe ,Ca ,Mg et K en quantité moindre.
 - et d'autres métaux à l'état de trace (oligo-éléments): Co, Cu, Zn, Mn.

2- Besoins énergétiques

Couvrent les dépenses engagées dans les processus de biosynthèses.

Source d'énergie:

- soit l'énergie lumineuse (bact "Phototrophes),
- soit l'énergie fournie par les processus d'oxydoréduction (bactéries **Chimiotrophes**).

Les bactéries **Phototrophes** font appel à des composés minéraux ou organiques comme sources d'électrons. Si le substrat oxydable est minéral, la bactérie est dite **Photolithotrophe** : elle est capable de se développer dans un milieu purement minéral

Si le substrat oxydable est organique, la bactérie est dite

Photoorganotrophe

Les bactéries **Chimiotrophes** utilisent des composés minéraux ou organiques comme "donneurs d'hydrogène ou d'électrons" ou "accepteurs d'électrons". Si le donneur d'électron est un corps minéral →

Chimiolithotrophe. Si le composé est organique, la bactérie est dite **Chimioorganotrophe**.

Bactéries pathogènes d'intérêt médical, de contamination alimentaire, d'usage industriel pour la synthèse d'antibiotique de vitamines...

3- Les besoins spécifiques :

L'apport de composés appelés "facteurs de croissance" dans les milieux de culture est indispensable à la croissance des bactéries "auxotrophes".

Les bactéries "prototrophes" par contre sont capables de synthétiser tous les constituants sans apport extérieur en "facteurs de croissance".

Les "facteurs de croissance" varient Selon les espèces bactériennes; il peut s'agir d'ac.aminés, de bases puriques ou pyrimidiques, de vitamines.

Les facteurs de croissance présentent des caractères communs:

- Ils sont actifs à concentration infime
- Ils sont étroitement spécifiques

Exemples: *E.coli* : bactérie prototrophe : n'exigeant aucun facteur de croissance, elle se multiplie sur milieu minimum.

-*Haemophilus influenzae*: bactérie auxotrophe. Elle ne peut cultiver dans un milieu minimum car il lui manque dans son système enzymatique les enzymes nécessaires à la synthèse du facteur V (coenzyme I et II) et du facteur X (Hémine) qu'il faudra donc lui fournir dans le milieu de culture.

II- Conditions physico-chimiques de la croissance.

1- La température:

Selon leur comportement vis à vis de la température, on distingue:

- **Les bactéries mésophiles** dont la température optimale de croissance se situe entre 20°C et 40°C. On retrouve dans ce groupe la majorité des bactéries de l'environnement et d'intérêt médical (ex: Entérobactéries) .

- **Les bactéries thermophiles** : la température optimale est ici de 40°C. Ce sont les bactéries des sources thermales, (ex.: *Pseudomonas*)

- **Les bactéries psychrophiles** : température optimale située entre 4°C et 20°C: Ces bactéries peuvent contaminer les produits alimentaires conservés au réfrigérateur (ex: *Listeria*).

- **Les bactéries cryophiles**: vivent à moins de 4°C, ce sont les bactéries des eaux de mer et des glaces.

Les températures trop élevées sont nuisibles pour les bactéries. Ainsi, la stérilisation par la chaleur se fait à une température de 180°C au poupinel (chaleur sèche) pendant 30 minutes ou à 120°C à l'autoclave (chaleur humide) pendant 20 minutes.

2- Le pH:

La plupart des bactéries se développent de préférence dans des milieux neutres ou légèrement alcalins.

Néanmoins, certaines espèces pathogènes, tel *Vibrio cholerae*, cultivent mieux en milieu nettement alcalin (pH:8,5).

A l'opposé, les Lactobacilles (flore vaginale de Doderlein) se développent à pH acide (6,3 à 6,5).

3- La pression osmotique:

D'une façon générale, les bactéries sont assez tolérantes vis à vis des variations de concentrations ioniques.

La protection contre les chocs osmotiques est assurée par la paroi qui constitue un véritable mur bactérien.

Certaines espèces bactériennes dites **halophiles** tolèrent plus que d'autres, de fortes concentrations salines. Ainsi, par exemple, le *Staphylocoque* tolère une forte concentration de chlorure de sodium. Ce caractère est utilisé pour sélectionner cette bactérie sur un milieu sélectif (Milieu de Chapman).

4- La pression partielle d'oxygène:

Selon leur comportement à l'égard de l'oxygène, les bactéries sont classées en 4 catégories:

- **Bactéries aérobies strictes** : elles ne peuvent vivre qu'en présence d'O₂ de l'air et tolèrent des PO₂ élevées, exemple: *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Sur un milieu de culture, elles se multiplieront uniquement à la surface de celui-ci.

- **Bactéries micro-aérophiles**: se développent sous une PO₂ réduite, inférieure à celle de l'air. Exemple: *Campylobacter*

- **Bactéries anaérobies strictes**: ne se développent qu'en absence d'oxygène. L'oxygène de l'air est toxique pour ces espèces. Exemple: le bacille tétanique.

- **Bactéries aéro-anaérobies facultatives** : se développent aussi bien en absence qu'en présence d'oxygène.

Leur richesse enzymatique leur permet d'utiliser l'oxygène de l'air comme accepteur d'électrons quand il est présent, ou d'utiliser la voie fermentaire quand l'oxygène est absent. Exemple des Entérobactéries (*Salmonelles*, *Shigelles*).

5-Facteurs inhibant la croissance :

- Radiations: les bactéries sont sensibles aux rayons X et UV (soleil), rayons Gamma
- Substances antibactériennes:

Les ATS et les ATB s'opposent à la croissance des bactéries et sont utilisés pour leur destruction .

Certaines substances sont des inhibiteurs sélectifs de certaines bactéries. Elles sont ajoutées dans les milieux pour favoriser sélectivement la multiplication des bactéries résistantes: c'est le principe des milieux sélectifs.

III- METABOLISME BACTERIEN:

Métabolisme bactérien : ensemble des transformations chimiques qui assurent l'élaboration des constituants cellulaires et leur fonctionnement.

Toutes les réactions chimiques ayant lieu dans les bactéries sont catalysées par des enzymes spécifiques Elles intéressent à la fois les glucides, les lipides, et les protides.

L'exploration ou l'étude de certaines étapes de ce métabolisme,
→ les caractères biochimiques d'une bactérie (identification de l'espèce bactérienne).

Dans ce processus, l'énergie produite est libérée par paliers à travers le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire.

Le bilan énergétique du processus respiratoire (ou oxydatif) est très important.

L'étude au laboratoire du type de métabolisme énergétique qu'utilise la bactérie est une étape importante de l'identification de cette bactérie.

Le test utilisé est l'épreuve de HUGH et LEIFSON et le milieu servant à ce test est le M.E.V.A.G (milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides).

Ce milieu se présente sous forme d'une gélose molle, additionnée de glucose à 1% et coulée en tube.

On ensemence une suspension riche du germe à étudier, par piqûre centrale de 02 tubes de M.E.V.A.G un tube est ensuite additionné d'une couche de vaseline, l'autre est laissé tel quel :

Après 18 H d'incubation à 37 ° , la lecture se fait comme suit:

Tube sans vaseline	Tube avec vaseline	Métabolisme
jaune	jaune	Fermentation
jaune	Rouge	Respiration
Rouge violet	Rouge	inactif

IV- CROISSANCE BACTERIENNE:

1- Définitions:

La croissance bactérienne : le dédoublement à intervalle régulier du nombre de cellules et de la masse cellulaire d'une culture bactérienne.

Le temps requis pour un dédoublement (ou une division cellulaire) est appelé **temps de génération**. Il varie d'une espèce à l'autre (ex. 20 minutes pour *Escherichia coli*, 20 heures pour *Mycobacterium tuberculosis*, plusieurs jours pour *M. leprae*).

Le Taux de croissance désigne le nombre de divisions par unité de temps (heure). Ainsi, *E.coli* se divise 3 fois en une heure, son taux de croissance est de 3.

2- Moyens d'étude:

Plusieurs techniques permettent d'évaluer la croissance.

Détermination du poids sec: les bactéries sont tuées, lavées, séchées au four à 105°C puis pesées avec précision.

Évaluation chimique : on dose les différents constituants chimiques des bactéries (protéines, DNA, RNA etc.).

Evaluation de la densité optique: En utilisant la loi de BEER-LAMBERT qui définit les relations existant entre l'intensité d'un faisceau lumineux avant et après la traversée d'une culture bactérienne, on peut évaluer la croissance bactérienne en déterminant la Densité Optique (DO) de la culture bactérienne entre **un temps T_0 et un temps $T_x > T_0$.**

La mesure de la DO. se fait à une longueur d'onde allant de 450 à 550nm . Les DO évoluent linéairement à la concentration cellulaire.

Numération cellulaire Elle peut être:

- Totale, par comptage de toutes les bactéries vivantes ou mortes présentes dans la culture bactérienne, en utilisant une cellule hématimétrique;
- Ne concerne que les cellules viables : on compte les bactéries vivantes par le nombre d'unités formant colonies (U.F.C.) ayant cultivé au sein d'une gélose dans laquelle a été au préalable ajoutée une dilution appropriée de la culture bactérienne à étudier.

3- Cinétique de la croissance :

L'étude de la croissance bactérienne dans le temps ou cinétique de la croissance peut être représentée sur un graphique en portant

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

La courbe de croissance obtenue montre alors 6 phases (voir schéma)

Phase A: Phase de latence :C'est la phase d'adaptation des bactéries à leur milieu de culture, pas de multiplication bactérienne pendant cette phase → la mise en route des systèmes enzymatiques de la bactérie.

Phase B : Phase d'accélération pendant laquelle le temps de génération se raccourcit pour atteindre la valeur caractéristique de l'espèce bactérienne étudiée.

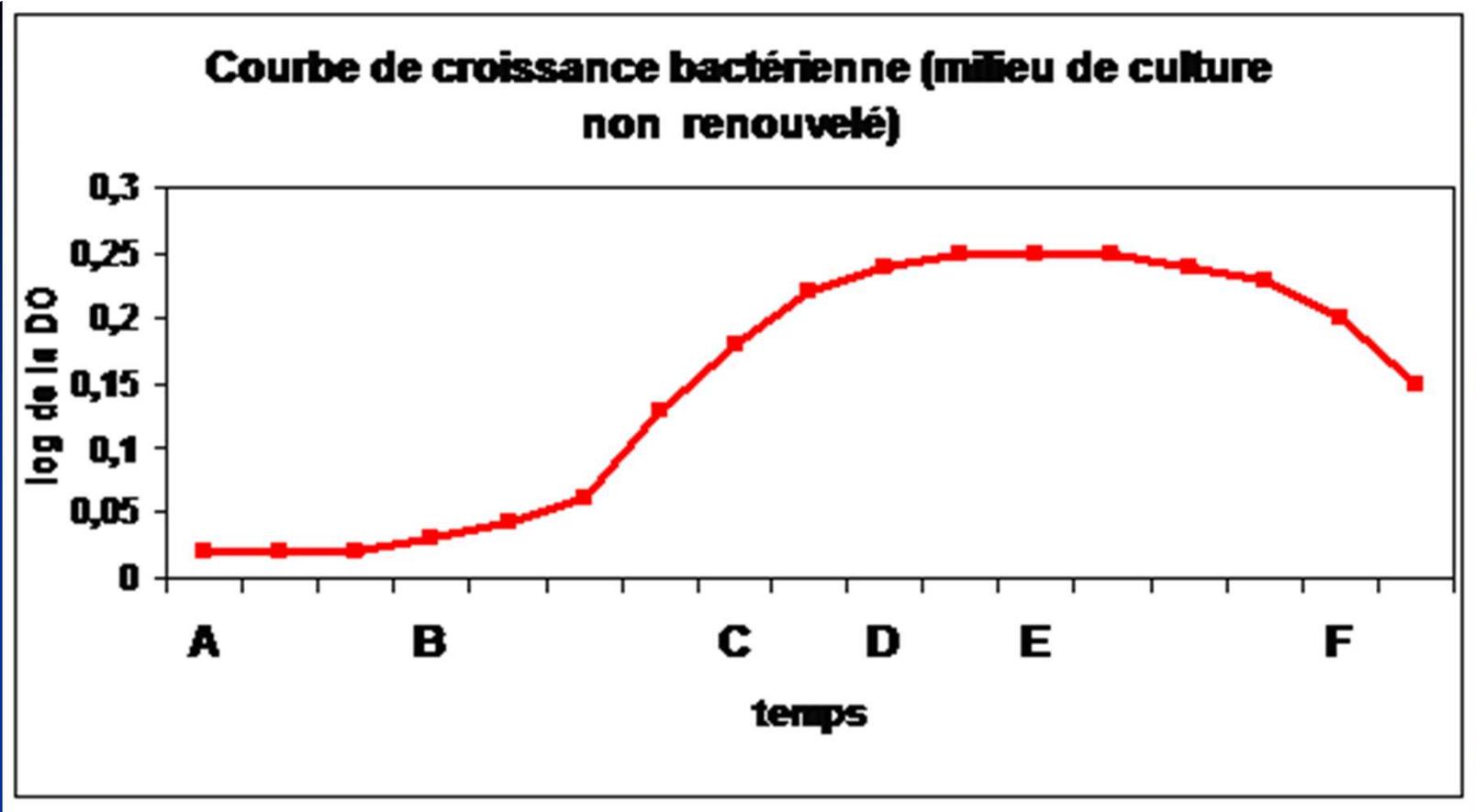
Phase C: Phase de croissance exponentielle : le taux de croissance atteint la valeur maximale. Il y a dédoublement de la population à des intervalles de temps réguliers (toutes les 20 minutes / *E.coli*).

Phase D: Phase de ralentissement :le taux de croissance baisse progressivement, le temps de génération s'allonge.

Phase E: Phase stationnaire: la masse bactérienne est maximale.

Les nouvelles générations équilibrent les vieilles bactéries qui se lysent.

Phase F: Phase de déclin: la masse bactérienne décroît du fait de la lyse accélérée des bactéries. Ceci est lié à un épuisement des nutriments, à une réduction de l'oxygène, à 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.



N.B. Cette courbe est celle obtenue pour une culture bactérienne en milieu non renouvelé. On peut avec des artifices, obtenir une culture bactérienne maintenue pendant très longtemps en phase de **croissance exponentielle** → **croissance continue**, obtenue par un apport régulier de milieu nutritif neuf et extraction d'une quantité équivalente de vieux milieu.

Ces procédés sont couramment utilisés dans l'industrie pour obtenir des corps bactériens de même âge (préparation de vaccins bactériens), ou des métabolites bactériens (vitamines), des toxines bactériennes (préparation d'anatoxines) en grande quantité.

V- APPLICATIONS:

Les domaines d'application intéressent:

1-Le diagnostic bactériologique:

-Examen microscopique (exceptionnellement suffisant pour identifier une espèce bactérienne , étape d'orientation).

-Nécessité d'ensemencer le produit pathologique sur des milieux de culture contenant des nutriments indispensables à la croissance.

Les notions de physiologie bactérienne interviennent alors dans le choix du (ou des) type(s) de milieux de culture pour les bactéries que l'on désire isoler et identifier.

On peut distinguer :

- **Des milieux d'isolement** : Ce sont des milieux solides simples ou complexes, sur lesquels de nombreuses espèces bactériennes peuvent se développer selon une technique d'ensemencement qui permet d'obtenir des colonies séparées facilement identifiables.
- **Des milieux d'identification** : Solides ou liquides, ils servent à mettre en évidence un ou plusieurs caractères métaboliques d'une souche bactérienne préalablement isolée et purifiée. (l'étude du métabolisme bactérien ne peut et ne doit se faire que sur une souche bactérienne pure).
- **Des milieux sélectifs** : Solides, ils permettent l'isolement d'une espèce bactérienne tout en inhibant les autres espèces éventuellement présentes dans un prélèvement.
Ex:- Milieu Hektoen pour les Salmonelles et les Shigelles
- **Des milieux d'enrichissement** : Liquides, ils contiennent des inhibiteurs spécifiques de certaines espèces bactériennes donc favorisent la multiplication d'espèces données.
Ex: le bouillon Sélénite pour les Salmonella.

2- L'antibiothérapie:

Les modifications de la courbe de croissance permettent de mesurer l'activité antibactérienne d'un nouvel ATB sur une bactérie donnée.

3- L'efficacité de la stérilisation:

L'étude de la courbe de croissance permet de vérifier la vitesse de destruction des bactéries par la chaleur, les UV, ou d'autres agents physiques ou chimiques.

4- L'industrie:

- Dosage microbiologique des vitamines et autres substances qui sont des facteurs de croissance pour les bactéries,
- Obtention de grandes quantités d'antibiotiques, d'enzymes et de vitamines grâce à la croissance en milieu de culture renouvelé,
- Obtention de grandes quantités de bactéries destinées à l'alimentation en particulier animale (génie génétique).