

Croissance des bactéries

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène

2014

Table des matières

Préambule.....	3
1. Division bactérienne.....	3
2. Dynamique de la croissance.....	3
2.1. Courbe de croissance	3
2.2. Croissance in vitro (milieux liquide et solide).....	4
2.3. Croissance in vivo.....	4
2.4. Croissance en culture continue.....	4
2.5. Croissance en culture synchrone.....	4
2.6. Croissance en biofilm.....	5
2.7. Effets de carence et de stress.....	5
3. Conditions favorables à la croissance.....	5
3.1. Sources d'énergie.....	5
3.2. Sources de carbone.....	6
3.3. Sources d'azote et besoins en soufre.....	6
3.4. Besoins inorganiques.....	6
3.5. Autres éléments.....	6
3.6. Perception du quorum (quorum sensing ou auto-induction).....	6
4. Conditions psycho-chimiques de la croissance.....	7
4.1. Effet de l'oxygène.....	7
4.2. Effet de la température.....	7
4.3. Effet du pH.....	7
4.4. Effet de la pression osmotique.....	8
4.5. Effet de l'eau libre.....	8
4.6. Métabolisme énergétique.....	8
5. Absorption des nutriments.....	9
5.1. Diffusion passive et facilitée.....	9
5.2. Transport actif.....	9
5.3. Translocation de groupe.....	10
5.4. Capture du fer.....	10
6. Applications.....	12
6.1. Milieux de culture.....	12
6.2. Apparence des colonies.....	12
6.3. Recherche des caractères biochimiques.....	13

Préambule

Loi de Shelford : il y a des limites dans les facteurs environnementaux au-dessous ou au-dessus desquelles un organisme ne peut pas survivre et se développer, quel que soit l'apport en nutriments.

1. Division bactérienne

La bactérie se multiplie par fission binaire : la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à la division cellulaire.

2. Dynamique de la croissance

La croissance bactérienne est l'**accroissement ordonné** de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries.

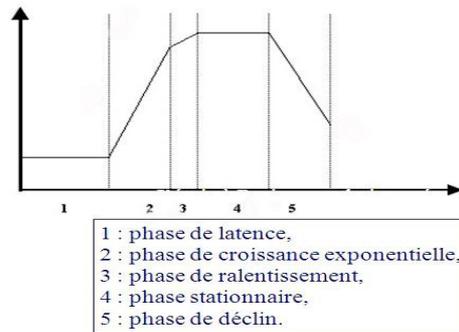
Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide.

2.1. Courbe de croissance

La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide. Il existe 6 phases dont l'ensemble constitue la **courbe de croissance**.

- Phase de latence : le **taux de croissance** nul ($\mu = 0$). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (pas de phase de latence si repiquage sur milieu identique au précédent).
- Phase d'accélération : il se produit une augmentation de la vitesse de croissance.
- **Croissance exponentielle** : le taux de croissance atteint un maximum ($\mu = \max$). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).
- **Phase de ralentissement** : la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.
- **Phase maximale stationnaire** : le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent. Il se produit une modification de l'expression des gènes. Les bactéries en état de déprivation synthétisent des protéines de manque qui rendent la cellule plus résistante aux dommages : augmentation du pontage du peptidoglycane, fixation des protéines à l'ADN des cellules de manque, chaperones qui empêchent la dégradation protéique et renaturent les protéines endommagées ;
- **Phase de déclin** : le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (**croissance cryptique**). La mort cellulaire est caractérisée par l'absence de réplication irréversible.

Figure 1 : Courbe de croissance



2.2. Croissance in vitro (milieux liquide et solide)

Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquide, solide et semi-liquide. Les milieux liquides sont utilisés pour la culture de bactéries pures. Les milieux solides ou semi-solides, à base d'agar, sont utilisés pour l'isolement de bactéries. Dans ces milieux, ont été ajoutés des nutriments favorisant la croissance des bactéries étudiées.

2.3. Croissance in vivo

In vivo, la croissance bactérienne n'est pas similaire à celle observée *in vitro*. Elle est beaucoup plus ralentie. La phase de latence est beaucoup plus longue. Les bactéries n'ont pas toujours tous les nutriments à leur disposition pour leur croissance. *In vivo*, les bactéries peuvent être phagocytées par les macrophages et les polynucléaires et être inhibées par les produits antibactériens comme le lysozyme ou le complément.

Temps de génération in vitro et in vivo de quelques bactéries

Bactéries	TG in vitro (min)	TG in vivo (h)
<i>Escherichia coli</i>	20-40	5
Salmonella Typhimurium	20-40	3-5
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	3-5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	4
<i>Vibrio cholerae</i>	20	2-5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	120-240	24-48

2.4. Croissance en culture continue

Il y a maintien d'une **croissance exponentielle continue** lorsque le milieu de culture est renouvelé régulièrement et que les métabolites sont éliminés en même temps. La valeur μ est maximale et constante.

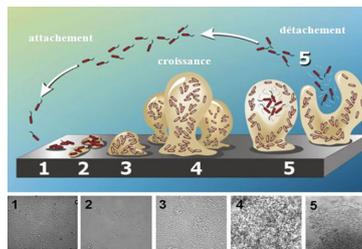
2.5. Croissance en culture synchrone

Les bactéries se multiplient toutes au même moment. La courbe de croissance montre des paliers successifs. Ce type de culture permet d'étudier la division cellulaire indépendamment de la croissance.

2.6. Croissance en biofilm

Les bactéries peuvent s'attacher aux surfaces, s'associer entre elles et s'entourer d'un polymère organique pour constituer un biofilm. Leur organisation et leur métabolisme dépendent de la nature de la surface et de l'environnement physico-chimique. Les biofilms intéressent tous les domaines de la microbiologie et de la médecine (matériels d'exploration, matériels implantés, muqueuses lésées). Les biofilms sont caractérisés par une **hétérogénéité spatiale** : il existe des variations métaboliques importantes à l'intérieur du biofilm et à l'interface milieu liquide/milieu solide.

Figure 2 : Croissance en biofilm



2.7. Effets de carence et de stress

En situation de carence ou de stress, la bactérie peut adopter deux types de stratégie pour sa survie :

1 - la bactérie se différencie vers une forme de résistance métaboliquement inactive C'est le cas des *Bacillus* qui produisent une spore.

2 - la bactérie développe des systèmes de régulation pour contrôler cette période de carence en adaptant son métabolisme pour faire un maximum d'économie. C'est le cas d'*Escherichia coli*.

Dans ce type de situation, la bactérie présente les adaptations suivantes :

- Dégradation de l'ARN cellulaire total, libérant des nucléotides utilisables pour la synthèse de nouveaux ARN ou comme source d'énergie.
- Dégradation des protéines : libération d'acides aminés réutilisés ou dégradés pour la production d'énergie
- Mise en œuvre de systèmes de transport et d'assimilation comme substituts aux éléments manquants qui sont essentiellement les composés azotés, phosphorés, carbonés et le fer.
- Synthèse de **protéines de stress** qui protègent la bactérie de la privation de nutriments et d'autres stress (existence de gènes impliqués dans les phénomènes de carence ou de stress).

3. Conditions favorables à la croissance

3.1. Sources d'énergie

Les bactéries doivent trouver dans leur environnement les substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires.

Les **bactéries phototrophes** utilisent l'énergie lumineuse pour la photosynthèse (synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique).

Les **bactéries chimiotrophes** puisent leur énergie à partir de composés minéraux ou organiques. Elles utilisent des donneurs et des accepteurs d'électrons (élément minéral : **bactérie chimiolithotrophe** ; élément organique : **bactérie chimioorganotrophe**).

La grande majorité des bactéries d'intérêt médical sont **chimioorganotrophes**.

3.2. Sources de carbone

Le carbone est l'un des éléments les plus abondants de la bactérie. Le plus simple des composés est l'anhydride carbonique ou CO₂. Celui-ci peut être utilisé par la bactérie pour la synthèse de certains métabolites essentiels qui ferait intervenir une réaction de carboxylation.

Le CO₂ est la seule source de carbone pour les **bactéries autotrophes**.

Les **bactéries hétérotrophes** utilisent facultativement le CO₂. Les bactéries hétérotrophes dégradent une grande quantité de substances hydrocarbonées (alcool, acide acétique, acide lactique, polysaccharides, sucres divers).

3.3. Sources d'azote et besoins en soufre

Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. La provenance de cet azote peut se faire par fixation directe de l'azote atmosphérique ou par incorporation de composés azotés (réactions de désamination, de transamination).

Le soufre est incorporé par les bactéries sous forme de sulfate ou de composés soufrés organiques.

3.4. Besoins inorganiques

Le phosphore est présent dans les acides nucléiques et est utilisé dans de nombreuses réactions enzymatiques. Il permet la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la bactérie. Il est incorporé sous forme de phosphate inorganique.

3.5. Autres éléments

D'autres éléments jouent un rôle dans le métabolisme bactérien (sodium, potassium, magnésium, chlore) et dans les réactions enzymatiques (calcium, fer, magnésium, manganèse, nickel, sélénium, cuivre, cobalt, vitamines).

3.6. Perception du quorum (quorum sensing ou auto-induction)

Les bactéries communiquent entre elles et ont un comportement coopératif. Les bactéries contrôlent leur propre densité de population en percevant le niveau de **molécules signals** ou **auto-inducteurs**.

Par exemple, grâce à la perception du quorum, les bactéries atteignent une haute densité de population avant de libérer leurs enzymes.

Exemples :

Synthèse et libération de facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*

Stimulation de la sporulation chez *Bacillus*

Production de toxines et de facteurs de virulence chez *S. aureus*

Maturation du biofilm chez *P. aeruginosa*

4. Conditions psycho-chimiques de la croissance

4.1. Effet de l'oxygène

Il existe plusieurs classes de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène.

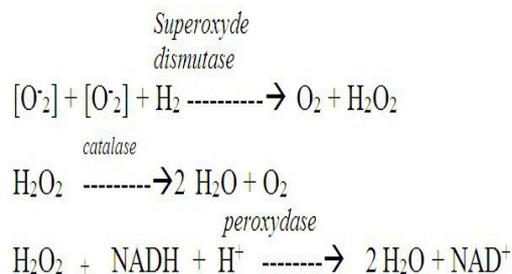
Les bactéries **aérobies strictes** ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. L'oxygène moléculaire, ultime accepteur d'électron, est réduit en eau (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*).

Les bactéries **microaérophiles** se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air (*Campylobacter*, *Mycobacteriaceae*).

Les bactéries **aéro-anaérobies** facultatives se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale : les entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*), les streptocoques, les staphylocoques. L'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire.

Les bactéries **anaérobies strictes** ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique. Ces bactéries doivent se cultiver sous atmosphère réductrice. La totalité de l'énergie est produite par **fermentation**. C'est le cas des bactéries intestinales (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*) et de nombreuses bactéries présentes dans les flores normales de l'organisme. La production d'énergie se fait grâce aux cytochromes membranaires couplés à des phosphorylations oxydatives mais en l'absence d'oxygène moléculaire. La toxicité de l'oxygène s'explique par la production de radicaux superoxydes que les bactéries anaérobies ne peuvent pas détruire (**absence de superoxyde dismutase**) et/ou par l'absence d'une activité enzymatique à type de catalases et de peroxydases.

Action de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la peroxydase



4.2. Effet de la température

Les bactéries peuvent être classées selon leur température optimale de croissance.

- Bactéries **mésophiles** (Ex. : *Escherichia coli*) : température de croissance proche de celle du corps humain (37°C)
- Bactéries **thermophiles** (Ex. : *Thermus aquaticus*) : températures de croissance comprises entre 45°C et 70°C
- Bactéries **hyperthermophiles** (Ex. : *Archaea*) : températures de croissance supérieures à 80°C
- Bactéries **psychrophiles** (Ex. : *Pseudomonas*) : Températures proches de 0°C (optimum à 10-15°C)
- Bactéries **psychrotrophes** (Ex. : *Pseudomonas*) : températures de croissance proches de 0°C avec optimum de croissance proche des bactéries mésophiles

4.3. Effet du pH

Le pH (concentration en ion hydrogène [H⁺]) de l'environnement varie entre 0,5 (sols acides) et 10,5 (eaux alcalines des lacs).

Les bactéries pathogènes ou liées à l'écosystème humain se développent le plus souvent dans des milieux neutres ou légèrement alcalins.

On distingue :

- Les bactéries **neutrophiles** se développent pour des pH sont compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7.
- Les bactéries **alcalophiles** préfèrent les pH alcalins: cas de *Pseudomonas* et *Vibrio*.
- Les bactéries **acidophiles** se multiplient mieux dans des milieux acides : cas des *Lactobacillus*.

Pour garder un pH interne neutre, le mécanisme de résistance des bactéries est :

- Membrane cytoplasmique devient imperméable aux protons,
- Bactéries neutrophiles : échange de potassium contre des protons,
- Bactéries alcalophiles : échange d'ions sodium contre des protons,
- Production de déchets métaboliques acides ou alcalins.

4.4. Effet de la pression osmotique

Les bactéries sont assez tolérantes aux variations des concentrations ioniques. Certaines espèces sont **osmotolérantes** (staphylocoques, *Vibrio cholerae*).

4.5. Effet de l'eau libre

La disponibilité de l'eau présente dans l'atmosphère ou dans une substance intervient dans la croissance bactérienne. **L'activité de l'eau** (A_w) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau.

- Présence de sels
 - Les **bactéries halophiles** nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles jusque 15-30% pour les bactéries halophiles extrêmes (*Halobacterium*). Dans ce cas, la bactérie accumule des quantités importantes de potassium pour rester hypertonique par rapport à son environnement.
 - Les **bactéries halotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : *Staphylococcus aureus*).
- Présence de sucres
 - Les **bactéries osmophiles** nécessitent des sucres pour leur croissance.
 - Les **bactéries osmotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance.
 - Les **bactéries xérophiles** peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

4.6. Métabolisme énergétique

On peut opposer les bactéries ayant un **métabolisme fermentatif** et celles ayant un métabolisme de type respiratoire.

Pour les bactéries à métabolisme fermentatif, la dégradation du glucose est incomplète et aboutit à la formation de divers composés organiques (acides organiques).

Pour les bactéries ayant un **métabolisme de type respiratoire**, la dégradation se fait par le cycle de Krebs. L'accepteur final d'électron est l'oxygène. Chez les bactéries le système de transport d'électrons est situé dans la membrane cytoplasmique.

5. Absorption des nutriments

5.1. Diffusion passive et facilitée

Il s'agit d'une **diffusion passive à travers la membrane plasmique**. Il y a passage d'une concentration élevée à une concentration plus faible.

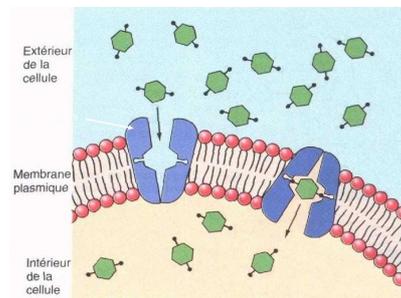
C'est le cas des petites molécules comme le CO_2 , H_2O , O_2 , le glycérol.

La vitesse de diffusion peut être augmentée grâce à la présence de perméases présentes au niveau de la membrane cytoplasmique. La concentration en nutriments peut atteindre un plateau en raison de la saturation du transporteur.

Le transporteur est vraisemblablement une protéine transmembranaire. Le mécanisme est réversible.

La diffusion passive et facilitée est peu fréquente chez les bactéries.

Figure 3 : Modèle de diffusion facilitée



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

5.2. Transport actif

Il s'agit d'un transport de molécules contre un **gradient de concentration** qui utilise de l'énergie métabolique.

Les perméases ont une grande spécificité vis-à-vis des molécules.

Il peut y avoir aussi une saturation du transporteur.

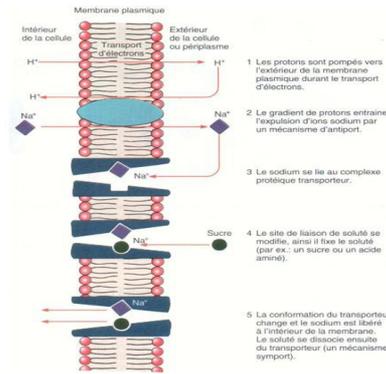
Le système de transport « **ABC transporter** » est présent chez les bactéries (ATP binding cassette transporters) : il s'agit d'un transporteur avec **deux domaines trans-membranaires** hydrophobes associés du côté cytoplasmique à deux domaines de liaison de nucléotide.

Les domaines transmembranaires forment un pore et les domaines de liaison de nucléotide fixent et hydrolysent l'ATP pour entraîner le transport.

Les protéines fixatrices sont dans le périplasma des bactéries à Gram négatif ou attachées aux lipides membranaires de la face externe de la membrane plasmique des bactéries à Gram positif.

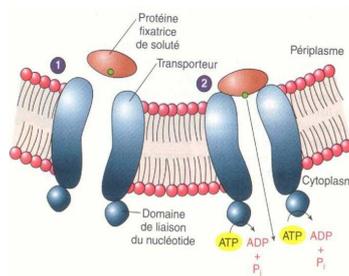
Les bactéries utilisent aussi la force proton-motrice sous la forme d'un gradient de protéines généré durant le transport d'électrons.

Figure 4 : Mécanisme du transport actif



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

Figure 5 : Transporteur ABC



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

5.3. Translocation de groupe

Il s'agit d'un transport de molécules qui sont chimiquement modifiées. Le système le plus connu est celui de la phosphotransférase des sucres dépendant du phosphoénolpyruvate. Les sucres sont phosphorylés par le PEP.



5.4. Capture du fer

Nécessité d'utiliser le fer pour les cytochromes et les enzymes.

Capture difficile en raison de l'insolubilité des ions ferriques.

Synthèse de **sidérophores** de nature hydroxamates (aérobactine, pyoverdine, mycobactine) ou phénolates (entérochéline, pyochéline, vibriobactine). Leurs poids moléculaires sont compris entre 300 et 1000 Da. Forte affinité pour le fer trivalent : 10^{-38} M.

Transport du complexe fer-sidérophore par un système ABC-Transporter. D'autres voies de captation du fer par la bactérie existent : hème, haptoglobine-hémoglobine, hémopexine, transferrine, lactoferrine.

Figure 6 : Capture du fer

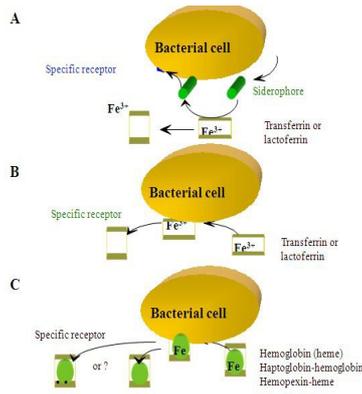


Figure 7 : Capture du fer

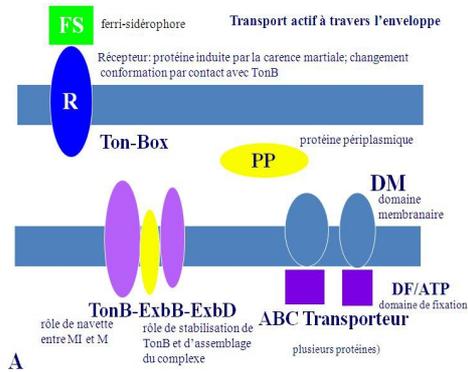


Figure 8 : Capture du fer

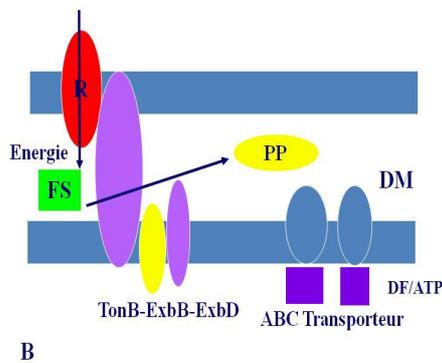
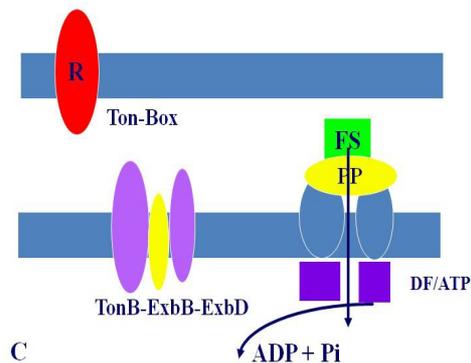


Figure 9 : Capture du fer



6. Applications

6.1. Milieux de culture

Un **milieu de culture** est composé d'un mélange de substrats nutritifs (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres, etc), d'un système tampon pour éviter les variations importantes du pH, de sels minéraux et de vitamines. Il est possible d'ajouter d'autres facteurs de croissance (sang, protéines, hémoglobine, vitamines). Ils sont de nature solide, semi-solide ou liquide.

Parmi les milieux de culture, on distingue :

- Les milieux d'isolement qui sont le plus souvent solides et de composition simples pour permettre le développement de plusieurs espèces bactériennes.
- Les milieux sélectifs qui favorisent artificiellement la croissance d'une espèce au détriment des autres.
- Les milieux d'identification permettent de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés d'une bactérie pour l'identifier.

6.2. Apparence des colonies

L'aspect des colonies est le caractère primaire utilisé pour orienter le diagnostic effectué par le bactériologiste.

La forme des colonies dépend de :

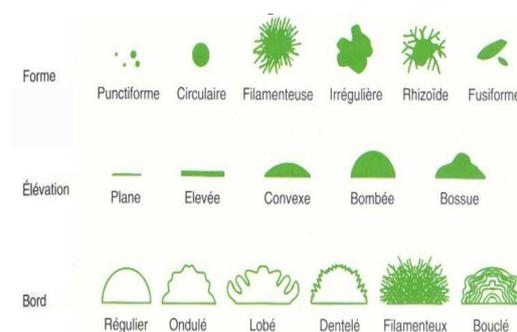
A) facteurs intrinsèques à la bactérie :

- **mobilité**
- **morphologie** : taille, forme, contour, relief, surface
- production d'une **capsule**
- production de matériel extracellulaire
- pigmentation
- présence de **fimbriae**

B) facteurs extrinsèques :

- gradients de solutés créés autour de la colonie
- présence de colorants dans le milieu de culture

Figure 10 : Morphologies des colonies bactériennes



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

6.3. Recherche des caractères biochimiques

L'identification des bactéries est effectuée en utilisant des milieux de culture dont la composition permet de mettre en évidence une activité physiologique (ex : fermentation) ou enzymatique (ex : recherche de la présence d'une uréase).

Par exemple, un milieu type pour fermentation contient un sucre, un indicateur coloré des changements de pH. La fermentation du sucre entraîne un abaissement de pH et donc un changement de couleur de l'indicateur coloré.