

Physiologie bactérienne

Définitions :

La physiologie bactérienne consiste à étudier la nutrition, le métabolisme et la croissance des bactéries en fonction des variations (naturelles ou contrôlées) du milieu dans lequel elles vivent:

-La nutrition bactérienne: c'est l'étude des besoins élémentaires, spécifiques et énergétiques, permettant à la bactérie de se multiplier et croître.

-Le métabolisme bactérien: c'est l'étude de l'ensemble des mécanismes biochimiques, qu'utilise la bactérie pour dégrader ses nutriments.

-La croissance bactérienne: c'est l'augmentation du nombre de bactéries, issu du dédoublement de la population bactérienne, et non une augmentation de la taille comme chez les organismes supérieurs.

En définitive, une bactérie se forme, se développe, vit et se reproduit puis dépérit et meurt.

I/Nutrition bactérienne :

Pour assurer sa survie et sa croissance, une bactérie doit trouver dans son environnement (milieu de culture) les aliments nécessaires pour satisfaire ses besoins énergétiques, constitutifs et spécifiques.

Une bactérie a besoin de 3 types d'éléments nutritifs: énergétiques, élémentaires et spécifiques.

1. **Besoins énergétiques:** Couvrent les dépenses engagées dans les processus de biosynthèses.

➤ Source d'énergie:

- soit l'énergie lumineuse (bactéries "**Phototrophes**),

- soit l'énergie fournie par les processus d'oxydoréduction (bactéries **Chimiotrophes**).

• Les bactéries Phototrophes : Ce sont des bactéries qui produisent leur énergie en transformant l'énergie lumineuse en liaison ATP, elles 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". Si le donneur d'électron est un corps minéral -> **Chimiolithotrophe** . Si le composé est organique, la bactérie est dite **Chimioorganotrophe**.

| Fonction | Classe du besoin | Nature du besoin | Type trophique |
|-------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| Catabolisme | Substrat énergétique | Minéral | Lithotrophe |
| | | Organique | Organotrophe |
| | Source d'énergie | Lumière | Phototrophe |
| | | Oxydation biochimique | Chimiotrophe |

2. Les besoins élémentaires : Ce sont les éléments nécessaires à la bactérie pour fabriquer ses constituants:

- **L'eau:** besoin majeur, elle représente 80 à 90% du poids d'une bactérie. L'eau rentre dans la composition de tous les milieux de culture.

- **Ions minéraux:** ils ont un rôle dans l'équilibre physico-chimique

Certains doivent être apportés en quantité importante: phosphate, sulfate, chlorure, calcium et magnésium

Et d'autres métaux à l'état de trace (oligo-éléments): Cu, Zn, Mn

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.

Les milieux de culture : La culture bactérienne a donné un essor considérable à l'étude des bactéries : Pour cela, différents milieux de culture ont été mis au point

1. Définition:

Un milieu de culture est un milieu qui apporte à la bactérie, un mélange équilibré de tous les nutriments nécessaires, à des concentrations qui permettent une croissance optimale, c'est-à-dire:

- ni trop faible, sinon le milieu s'appauvrit vite et la bactérie cultive mal.
- ni trop forte sinon le milieu devient vite toxique

La composition du milieu de culture varie à l'infini

Elle est choisie en fonction du but à atteindre et des besoins requis par la bactérie.

Le milieu peut être solidifié par l'addition d'Agar: c'est une substance extraite d'algues marines et qui possède la propriété de fixer une grande quantité d'eau d'où gélification.

2. Classification: selon plusieurs critères:

a. Selon la composition chimique:

Naturels: à partir d'extraits de matière organique: Glucose, extrait de viande par macération, extraits de levure, peptones (obtenues par action d'enzymes protéolytiques sur des matières organiques), sources de sels minéraux, vitamines, protéines, acides aminés....

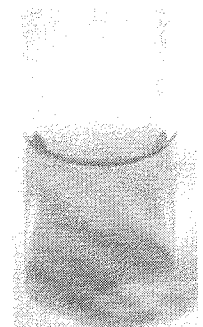
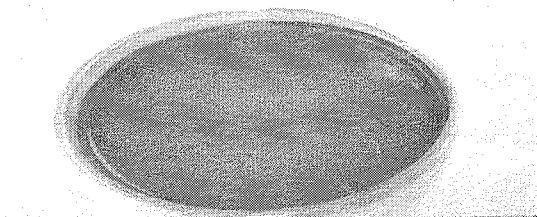
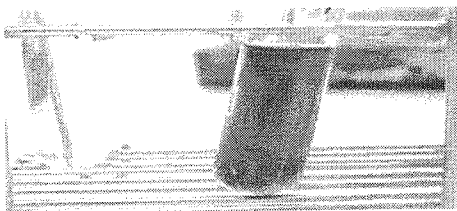
Semi synthétiques: milieu synthétiques auquel on rajoute de l'extrait de levure comme source de facteur de croissance.

Synthétiques: qui possède une composition chimique bien définie

b. Selon la consistance:

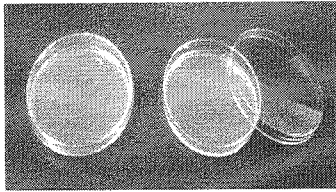
Distingue les milieux en 3 groupes, en fonction de la concentration en Agar du milieu:

- Milieu liquide: exemple un bouillon nutritif
- Milieu solide ou gélosé
- Milieu semi-liquide ou gélose molle

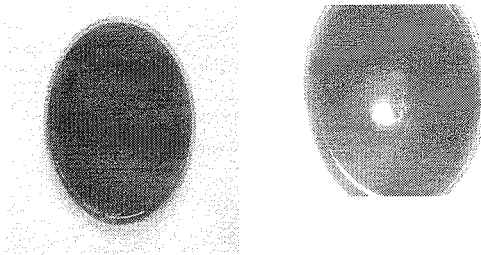


c. Selon l'utilisation:

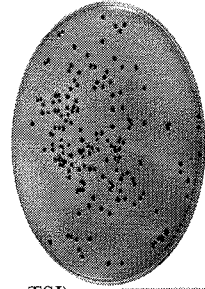
- Les milieux usuels ou de base (ex: gélose nutritive)



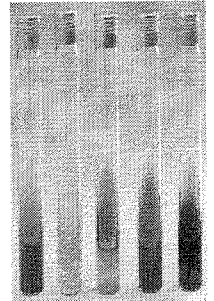
- Les milieux enrichis (ex: gélose au sang)



- Les milieux sélectifs (ex: gélose Hektoen)



- Les milieux d'identification (ex: TSI)



II/ Croissance bactérienne :

A. Définition:

Lorsqu'une bactérie est placée dans un milieu de culture convenable, elle va pouvoir assurer ses biosynthèses.

La croissance bactérienne correspond à l'accroissement de la masse cellulaire suite à une multiplication bactérienne.

Temps de génération (TG): c'est le temps nécessaire à une bactérie de doubler son nombre. Ce TG est variable Ex: *E.coli*: TG=20min, *M.tuberculosis*: TG=20h

Taux de croissance: c'est le nombre de divisions par unité de temps: Ex: *E.coli*: 3/heure.

B. 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).

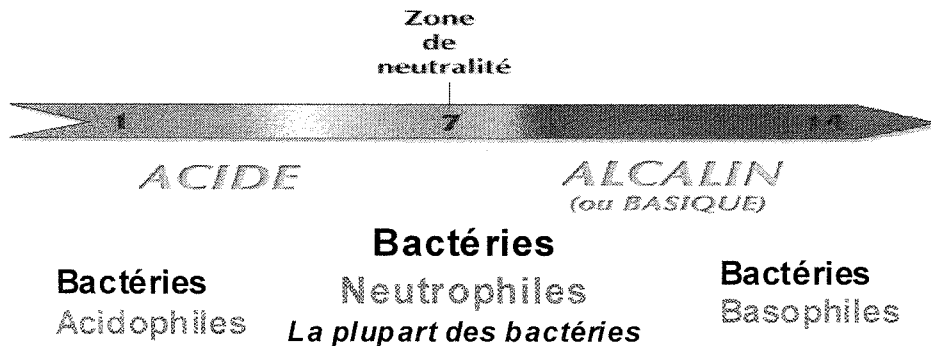
- Les bactéries **thermophiles** : la température optimale est ici de 40°C. Ce sont les bactéries des sources thermales.

- 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.

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*.
- **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 Clostridium tétani.
- **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 : le staphylocoque

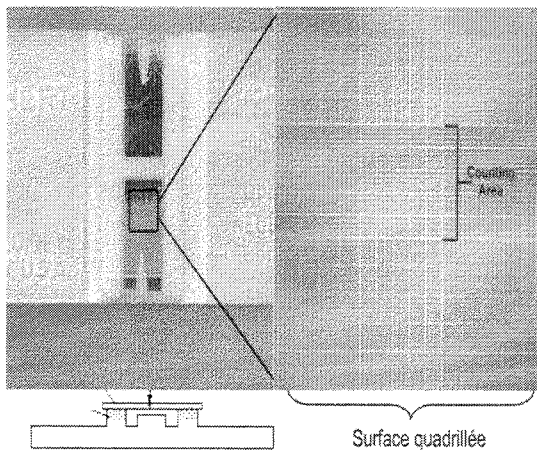
C. Moyens d'étude: Plusieurs techniques permettent d'évaluer la croissance.

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

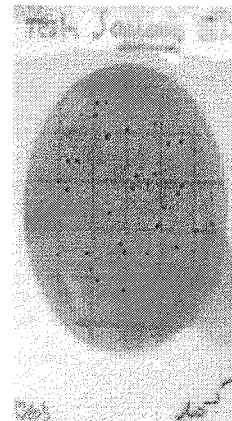
-**Evaluation de la densité optique:** en utilisant la loi de BEER LAMBERT qui définit les relations existant entre l'intensité d'un faisceau lumineux avant et après la traversée d'une culture bactérienne, on peut évaluer la croissance bactérienne en déterminant la Densité Optique (DO) de la culture bactérienne entre un temps T0 et un temps Tx > T0.

- **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;



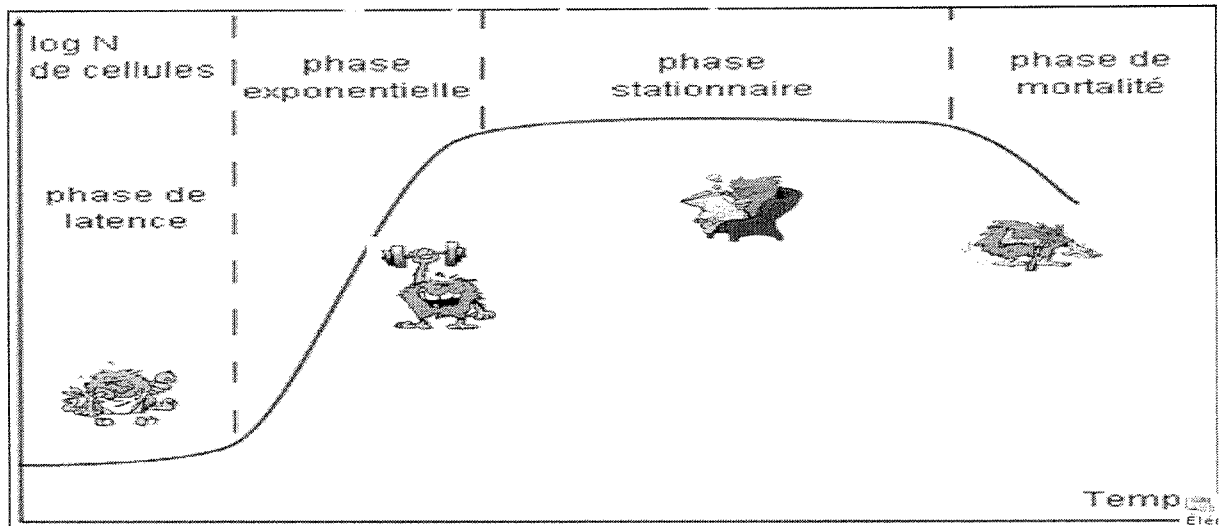
❖ Ne concerne que les cellules viables : on compte les bactéries vivantes par le nombre d'unités formant colonies (U.F.C.) ayant cultivé au sein d'une gélose dans laquelle a été au préalable ajoutée une dilution appropriée de la culture bactérienne à étudier.



D. 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 logs de la D.O du milieu de culture; En abscisse, le temps.

D1. Croissance bactérienne en milieu de culture liquide non renouvelé avec un seul substrat énergétique :



La courbe de croissance obtenue montre alors 4 phases (voir schéma)

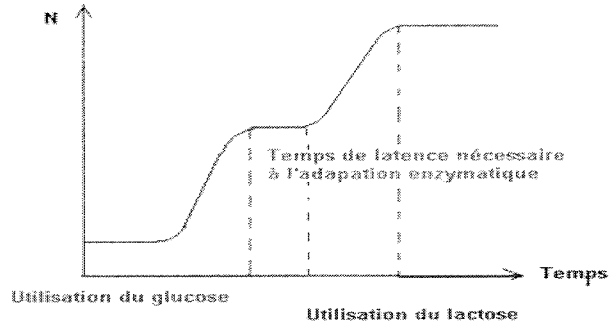
- **Phase A:** Phase de latence : C'est la phase d'adaptation des bactéries à leur milieu de culture, pas de multiplication bactérienne pendant cette phase la mise en route des systèmes enzymatiques de la bactérie.
- **Phase B:** Phase de croissance exponentielle : le taux de croissance atteint la valeur maximale. Il y a un dédoublement de la population à des intervalles de temps réguliers (toutes les 20 minutes / E.coli).
- **Phase C:** Phase stationnaire: la masse bactérienne est maximale. Les nouvelles générations équilibrent les vieilles bactéries qui se lysent.
- **Phase D:** 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.

D2. Croissance continue: Si l'on prélève à partir d'une culture des bactéries en phase exponentielle et qu'on les met dans un milieu « neuf » identique au premier, la culture est reconduite directement sans phase de latence, on parle alors de **culture continue**.

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.

Utilisation de deux substrats

- Dans un milieu synthétique à deux substrats carbonés, on assiste à deux types de cinétique:
- Une courbe de croissance similaire à celle observée avec un seul substrat, mais sans phase de déclin. En effet la phase stationnaire est suivie d'une deuxième phase exponentielle correspondant à l'utilisation du deuxième substrat: c'est le phénomène de Diauxie.



III / Métabolisme bactérien :

C'est l'ensemble des réactions biochimiques (de biosynthèse et de catabolisme) nécessaires à la synthèse des constituants bactériens et leur fonctionnement.

Grace à un équipement enzymatique très complet, toutes les réactions chimiques du métabolisme bactérien sont catalysées par des enzymes spécifiques.

L'étude du métabolisme bactérien permet de définir des caractères d'identification biochimique qui représentent des critères essentiels dans la classification (ou taxonomie) bactérienne.

En pratique, on identifie le métabolisme d'une bactérie à travers deux types de tests:

1. la bactérie est mise en présence d'une série de nutriments spécifiques et on détermine la gamme de produits qu'elle utilise (ex: étude des sucres que peut dégrader)
2. La bactérie est mise en présence d'un substrat déterminé. On détecte le(s) catabolite(s) accumulé(s) dans le milieu de culture à la suite de l'action de la bactérie sur le substrat. Ceci nous permet d'identifier la voie enzymatique empruntée par la bactérie.

Les techniques utilisés sont en général de type qualitatif puisqu'elles se limitent à confirmer ou informer l'attaque du substrat et à détecter les principaux catabolites libérés.

Elles fournissent cependant les principaux caractères d'identification biochimiques qui permettent de classer la bactérie étudiée dans une famille, un genre et une espèce définie.

Métabolisme énergétique et glucidique :

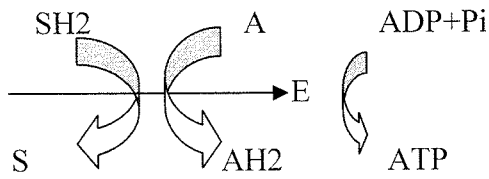
Ces deux métabolismes se rejoignent puisque les glucides représentent la principale source énergétique des bactéries chimio-organotrophes (cas des bactéries d'intérêt médical)

a. Les réactions énergétiques des bactéries:

L'énergie libérée par le catabolisme bactérien est emmagasinée de manière progressive au niveau d'une série de réactions de phosphorylation productrices d'ATP.

La phosphorylation se produit au cours d'une réaction d'oxydoréduction couplant l'oxydation d'un substrat énergétique SH2 à la réduction d'un composé A. L'énergie libérée est emmagasinée dans une molécule d'ATP. Ces réactions sont localisées à 02 niveaux de la cellule bactérienne

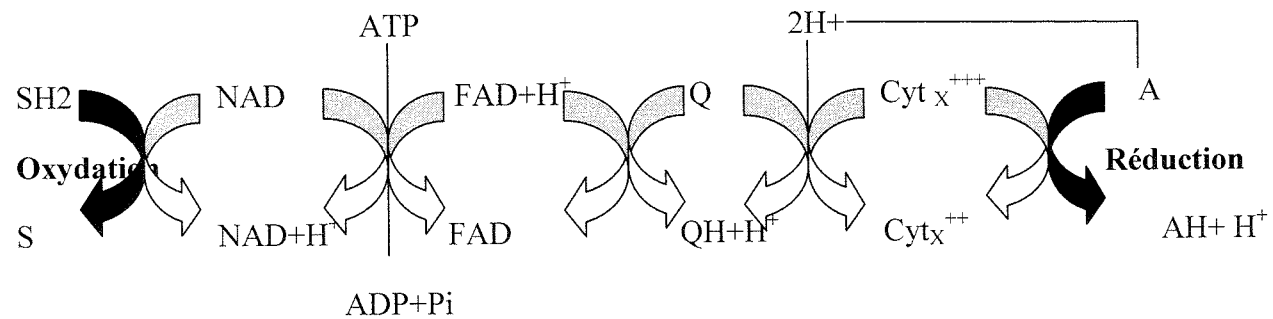
-**Au niveau du cytoplasme** : L'énergie est libérée directement au niveau du couple d'oxydoréduction.



-**Au niveau de la membrane cytoplasmique** : Ici par contre l'énergie est libérée par paliers à travers une succession de réaction REDOX. En effet, les électrons et les ions H+ provenant de la réaction initiale d'oxydation du substrat SH2, sont transférés via des « transporteurs d'électrons » qui passent d'une forme oxydée à une forme réduite.

A chaque réaction REDOX, l'énergie libérée est captée par une réaction de phosphorylation.

A la fin de la chaîne de transporteurs, un accepteur final d'électrons (A) boucle le processus énergétique.



b. les systèmes producteurs d'énergie : chez les bactéries on distingue 02 grands systèmes producteurs d'énergie : la fermentation et la respiration

b1. La fermentation bactérienne : c'est un processus énergétique utilisant des voies métaboliques dans lesquelles les composés organiques servent aussi bien de donneurs que d'accepteurs d'électrons.

Elle se déroule au niveau du cytoplasme bactérien

Il y a production d'énergie par phosphorylation au niveau du substrat. Le bilan énergétique est faible.

b2. La respiration: est une oxydation au cours de laquelle l'oxygène moléculaire (ou autre composé oxygéné) sont les accepteurs d'électrons.

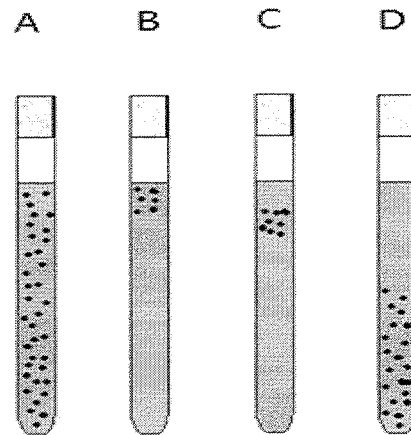
Elle a lieu au niveau de la membrane cytoplasmique, par phosphorylation dite oxydative: l'énergie libérée est en grande quantité et se fait par paliers via la chaîne de transporteurs d'électrons.

Quelques exemples d'étude du métabolisme:

Etude du type respiratoire:

La détermination du type respiratoire, se fait par ensemencement d'un milieu gélosé « viande foie », qui se présente en tube:

- A** Colonies dans tout le tube : bactéries aéro-anaérobies
- B** Colonies en haut du tube : bactéries aérobies strictes
- C** Colonies en haut du tube, légèrement sous la surface : bactéries micro-aérophiles
- D** Colonies en bas du tube : bactéries anaérobies strictes



Etude des enzymes respiratoires: Oxydase, Catalase

Test de l'oxydase

- Au cours de la respiration aérobie, l'accepteur final de la chaîne de transport d'électrons est une enzyme dite: cytochrome oxydase ou cytochrome aa₃
- La mise en évidence de celle-ci ne peut se faire que si la bactérie a un cytochrome c.

N,N-diméthyl-*p*-phenylenediamine (réactif réduit)

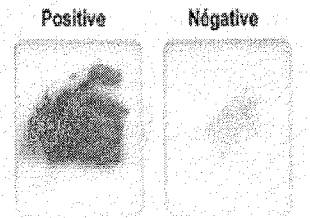
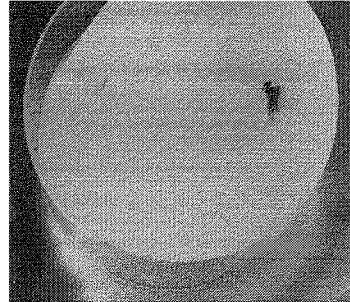
(cyt c + cyt aa₃)



Semi quinone (réactif oxydé): coloration rouge violacée:

=> test à l'oxydase positif

- Bactéries « oxydase positive » -> Aérobie strictes ou facultatives: elles possèdent les deux cytochromes c et aa₃
- Bactéries « oxydase négative » -> Aérobie facultatives, possédant le cytochrome aa₃ seul, ou bien anaérobies ne possédant aucun cytochrome

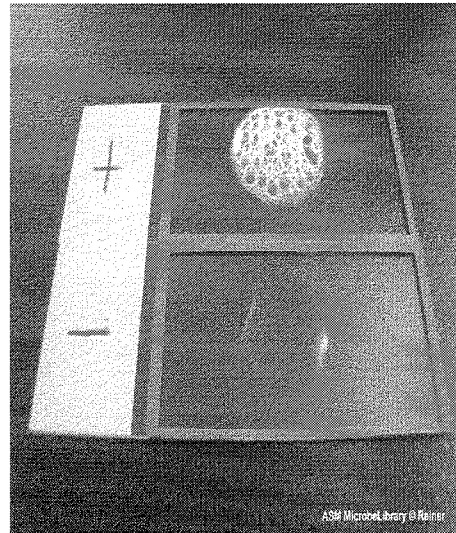


Test à la catalase:

- Au cours de la respiration aérobie, il y'a production de H₂O₂ qui est toxique pour la bactérie, celle-ci le dégrade grâce à une enzyme: la CATALASE



- Le test consiste à mettre en contact une colonie bactérienne avec une goutte d'eau oxygénée à 10V, le dégagement de bulle donne un test de catalase positif



IV/Applications de la physiologie bactérienne : Les domaines d'applications intéressent

1. **Diagnostic bactériologique:** la physiologie bactérienne intervient de façon primordiale dans le déroulement du diagnostic bactériologique

En effet, l'examen microscopique n'est qu'exceptionnellement suffisant pour identifier une espèce bactérienne et il ne représente habituellement qu'une étape d'orientation.

Le plus souvent il est indispensable d'ensemencer le produit pathologique sur des milieux de culture contenant des nutriments indispensables à la croissance.

L'identification bactérienne : En plus des caractères morphologiques, fait appel à l'étude des caractères cultureux (exigence, culture sur milieu sélectif, atmosphère de croissance, aspect des colonies.....) et biochimiques de la bactérie.

Le choix des milieux à étudier et des tests de métabolisme à effectuer, se fera selon les connaissances déjà acquises sur l'espèce bactérienne suspectée.

2/ L'Antibiothérapie:

L'étude de la modification de la courbe de croissance, permet d'apprécier l'activité des antibiotiques 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.