

Cours: Physiologie de la cellule bactérienne

Contenu de la matière

Chapitre I : Les membranes bactériennes : les systèmes de sécrétion chez les bactéries

Chapitre II : Influence de l'environnement sur la croissance :

- Stress thermique : chaud, froid
- Stress osmotique,
- Stress acide et Stress oxydatif

Chapitre III : Réponse au stress nutritionnel chez les bactéries

- Carence en azote, phosphate fer et carbone,
- La réponse stringente (les alarmones cellulaires, ppGpp...),
- Chimiotactisme.
- Notion de modulant et régulateur (Le Quorum sensing)
- Réponse au stress thermiques (protéines Heat Choc ...)
- Structure et différenciation cellulaire chez les bactéries: Deux exemples :
 - ✓ Formation de la spore chez: *Bacillus*,
 - ✓ Formation de mycélium aérien chez *Streptomyces*

Tavaux dirigés

Analyses d'articles scientifiques liés à l'étude des différents types de stress et à la structure moléculaire de la cellule bactérienne.

Travaux pratiques

Test de survie au stress acide

Etude de la tolérance et de l'adaptation au milieu acide.

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 moyenne 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:

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 (bactéries **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.

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'acides 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

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 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 pressions en O₂ 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 pression en O₂ 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*).

III- Métabolisme Bactérien

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.

L'étude au laboratoire du type de métabolisme énergétique qu'utilise la bactérie est une étape importante de l'identification d'une 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 2 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 Bactérienne

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

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 T0 et un temps Tx > T0**.

La mesure de la DO se fait à une longueur d'onde allant de 450 à 650nm. 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

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 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.

4-Les milieux de cultures

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

- **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*.

Chapitre I : Les membranes bactériennes : les systèmes de sécrétion chez les bactéries

I.1. Les enveloppes bactériennes

Ensemble de structures qui délimite et protège l'extérieur des bactéries. Ces enveloppes peuvent donc présenter des structures variées et ceci en fonction des milieux de vie. Structure minimale:

Membrane cytoplasmique,

Seconde structure: paroi G(+) et G(-),

Troisième structure: couche externe, notamment capsule, couche protéique et exopolymère.

I.1.1. La membrane cytoplasmique

La membrane plasmique des bactéries est semblable à celle des cellules eucaryotes et joue le même rôle : limiter le cytoplasme. Elle est identique pour l'ensemble des eubactéries. Sa structure est familière : une double couche (8 nm) de lipides (30 à 40 %) avec insertion de protéines (60 à 70 %) tournées soit vers la face interne, soit vers la face externe, ou présentes dans l'entièreté de son épaisseur.

Les phospholipides qui la composent représentent 75 % de la teneur cellulaire totale en lipides. Elle contient aussi plusieurs centaines de types différents de protéines qui représentent 6 à 9 % de la teneur cellulaire totale en protéines. Les protéines membranaires interviennent dans de nombreux processus de la vie de la cellule bactérienne : réactions enzymatiques, transports actifs, relais d'hormones et de toxines qui ne peuvent la franchir. Certains antibiotiques (les polymyxines), divers antiseptiques et des toxines bactériennes (colocines, bactériocines) ont pour lieu d'action la membrane plasmique.

Son rôle essentiel est d'être une barrière hydrophobe et osmotique. L'eau et certaines petites molécules hydrophiles diffusent librement, tandis que les plus grosses molécules hydrophiles la franchissent par l'intermédiaire de transporteurs protéiques (perméases). Si cette imperméabilité fonctionnelle est perturbée (polymyxines, colicines) par création de pores, les grosses molécules diffuseront librement et la mort cellulaire s'ensuivra. Inversement, les protéines sécrétées doivent la traverser pour atteindre le périplasma et le milieu extérieur.

Divers composants de la chaîne respiratoire qui assurent le transport d'électrons et les phosphorylations oxydatives sont aussi localisés dans la membrane cytoplasmique. Les enzymes de synthèse du peptidoglycan y sont aussi localisés.

I.1.2. La paroi bactérienne

L'enveloppe bactérienne externe à la membrane plasmique s'appelle la paroi bactérienne. Ses rôles principaux consistent à donner une forme à la bactérie, à la protéger des agents extérieurs et à maintenir une pression osmotique intracellulaire très élevée. Ces rôles sont surtout dévolus à une substance complexe qui est le peptidoglycan.

Sur la base de la composition et de la structure de la paroi, deux groupes de bactéries sont décrits, les Gram+ et les Gram-, donnant ainsi une base et une explication moléculaires à une observation empirique vieille de près d'un siècle (coloration de Gram). Les bactéries à structure de paroi Gram+ ont reçu le nom de FIRMICUTES (firmus = fort ; cutis = peau); celles à structure de paroi Gram- le nom de GRACILICUTES (gracilis = mince ; cutis = peau).

L'espace situé entre la membrane plasmique et la paroi s'appelle le périplasme. Dans certaines espèces de bactéries Gram+, une couche de protéines ou de polysaccharides recouvre la paroi (= couche S ; glycocalyx ; capsule ; zoogléée).

La paroi des bactéries Gram- est plus fine et plus complexe. La couche de peptidoglycan ne dépasse pas 5 nm. Elle est entourée d'une membrane externe similaire à la membrane plasmique dans laquelle se trouvent ancrés divers antigènes, dont l'antigène somatique de nature lipopolysaccharidique.

Lorsque la paroi cellulaire, et en particulier le péptidoglycane, est amoindrie, ou lorsque sa synthèse est bloquée, et lorsque cette bactérie est placée dans un milieu hypotonique, la membrane cytoplasmique éclate et la cellule meurt. Cependant, la cellule peut aussi se transformer sous certaines conditions favorables. Elle donne alors naissance à des sphéroplastes, ou des protoplastes.

Dans le cas où le milieu extérieur a une pression osmotique plus élevée (milieu hypertonique), la plasmolyse se produit et le protoplaste se ramasse sur lui-même à l'intérieur de la paroi.

I.1.3. La membrane externe

La membrane externe est une structure particulière aux bactéries Gram négatives. Comme son nom l'indique, elle est localisée à l'extérieur de la molécule de peptidoglycane. Au microscope électronique, elle apparaît constituée de deux couches comme la membrane cytoplasmique, à laquelle elle est aussi apparentée par une composition chimique semblable. Elle est reliée à la membrane plasmique par des jonctions appelées "ponts de Bayer", jonctions à hauteur desquelles les couches lipidiques des deux membranes fusionnent. La structure des enveloppes d'une bactérie Gram- est donc : membrane plasmique (7,5 nm) –

périplasme interne (4 nm) – PDG (2 nm) – périplasme externe (1,5 nm) – membrane externe (7,5 nm).

La fonction générale de la membrane externe est d'assurer un contact avec l'environnement et de protéger la bactérie contre des influences néfastes : protection contre la phagocytose par la présence dans le LPS et ailleurs de chaînes polysaccharidiques chargées négativement, exclusion de composés hydrophobes et de composés de haut poids moléculaire, protection contre des changements brutaux de pression osmotique dans le milieu extérieur, variation dans le système antigénique qui est perçue par le système immunitaire de l'hôte, ancrage des adhésines, fimbriae et capsules ... Une partie de ces fonctions, avec celles de l'espace périplasmique, permet de pallier à la minceur relative de la couche de peptidoglycane chez les bactéries Gram négatives.

I.1.4. Eléments extérieurs à la paroi

a- La couche S

La couche S consiste en une couche de quelques nm d'épaisseur formée d'un ou de deux types de polypeptides, parfois liés à des hydrates de carbone, arrangés en réseau d'aspect cristallin carré, hexagonal ou oblique.

Cette couche est résistante aux détergents et aux protéases. Chez les bactéries Gram+, la couche S se retrouve à l'extérieur du peptidoglycan auquel elle n'est pas liée de manière covalente, tandis que chez les bactéries Gram-, elle se retrouve à l'extérieur de la membrane externe. Le lipopolysaccharide (LPS) joue un rôle dans l'ancrage de la couche S. La couche S sert, pense-t-on, de filtre excluant aussi bien l'entrée que la sortie des molécules trop grosses, mais pourrait aussi posséder des fonctions antiphagocytaires (*Aeromonas salmonicida*) et antibactériophage. Une des raisons de ces rôles de défense serait que la couche S masque les charges électriques négatives de la cellule bactérienne, lui conférant des propriétés hydrophobes. Sa formation se ferait par auto-assemblage des protéines qui la composent.

b- Le glycocalyx

Le glycocalyx est une couche de matériel gélatineux constitué de polysaccharides fibrillaires et qui entoure la paroi cellulaire. Il s'agit d'un constituant universel du monde bactérien, non visible au microscope électronique, perdu rapidement après passage en culture *in vitro*. Le glycocalyx constitue pour les bactéries un élément qui leur permet d'adhérer entre elles et de former des microcolonies à la surface des muqueuses ou de matériel inerte (cathéters, chirurgie orthopédique...).

c- La capsule

En contact direct avec la paroi et visible au microscope optique. Sa composition varie selon les bactéries : composée de polysaccharides complexes (une ou plusieurs sortes) auxquels sont adjointes des protéines (*Streptococcus pneumoniae*) ou d'acide D-glutamique sous forme de polypeptides (*Bacillus anthracis*). La capsule n'existe en fait que chez des bactéries pathogènes (*Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*). La capsule est développée dans l'organisme vivant, mais sa production se perd après cultures répétées sur milieux inertes. Sa production est donc fonction de l'environnement dans lequel la bactérie croît. Sa fonction essentielle in vivo est en effet une protection contre la phagocytose et sa production est donc liée au pouvoir virulent (antigène K1 de souches neuropathogènes d'*E. coli* ; capsule de *Streptococcus pneumoniae*).

d- La zooglée

La zooglée est une formation plus ou moins volumineuse, parfois macroscopique, d'aspect glaireux, constituée d'amas de bactéries englobées dans une sorte de gelée due au développement énorme et à la fusion de leurs couches gélatineuses (ou glycocalyx) respectives. D'autres microorganismes peuvent y être associés. Ces structures macroscopiques peuvent jouer un rôle dans certaines pathologies (= botryomycose du cheval). Elle représente aussi une défense vis-à-vis des antibiotiques qui ne diffusent pas ou très peu à l'intérieur de la formation. Des exemples sont le grain de botryomycose = zooglée de *Staphylococcus aureus* ; le grain de Kéfir (lait fermenté du Caucase) = zooglée de *Lactobacillus caucasicus* ; la gomme de sucreries = zooglée de *Leuconostoc mesenteroides*.