

## **Chapitre V: Croissance bactérienne**

La croissance bactérienne se traduit par une augmentation du nombre de cellules bactériennes. Un allongement de la taille et une augmentation du volume, sont visibles chez les bactéries. Ces dimensions, lorsqu'elles sont atteintes, déclenchent la **division cellulaire** par **scissiparité (fission binaire)** où une bactérie mère donne deux cellules filles. D'autres mécanismes de division existent chez des bactéries particulières, comme le bourgeonnement (observé chez les cyanobactéries) et la fragmentation (chez les bactéries filamenteuses). Le point de division est appelé septum qui va former la cloison qui séparera les deux cellules filles. Chaque cellule recevra une copie du chromosome et la moitié des composants cellulaires.

## I. Mesure de la croissance

Les techniques permettant la **mesure de la croissance** sont nombreuses. Sur un milieu solide, l'étude de la croissance est rendue difficile en raison notamment de l'agrégation des cellules les unes aux autres. En milieu liquide, les cellules sont dispersées (ou si elles sont agrégées, il est possible de les disperser par agitation) ce qui permet des prises d'échantillons. La croissance peut alors être appréciée en se basant sur le **nombre de cellules** ou sur la **masse bactérienne (biomasse)**.

Le but des techniques de **numération** (ou **dénombrement**) est de déterminer la concentration en bactéries contenues dans une préparation initiale. Elles nécessitent une ou plusieurs **dilutions** décimales. Elles peuvent se réaliser en **milieu solide**: en surface ou dans la masse et en **milieu liquide**.

### 1. Mesure directe de la croissance bactérienne

#### 1.1 Dénombrement directe des cellules microbiennes

A partir d'un volume connu d'une suspension bactérienne, on peut faire une numération totale des cellules au microscope. Un hématimètre (**lame de Malassez, lame de Thoma, lame de Helber**) est utilisé pour le comptage des bactéries de taille moyennes ou pour les levures. Alors qu'une lame spéciale appelée **chambre de comptage de Petroff-Hausser** est utilisée pour le dénombrement de bactéries de petites tailles.

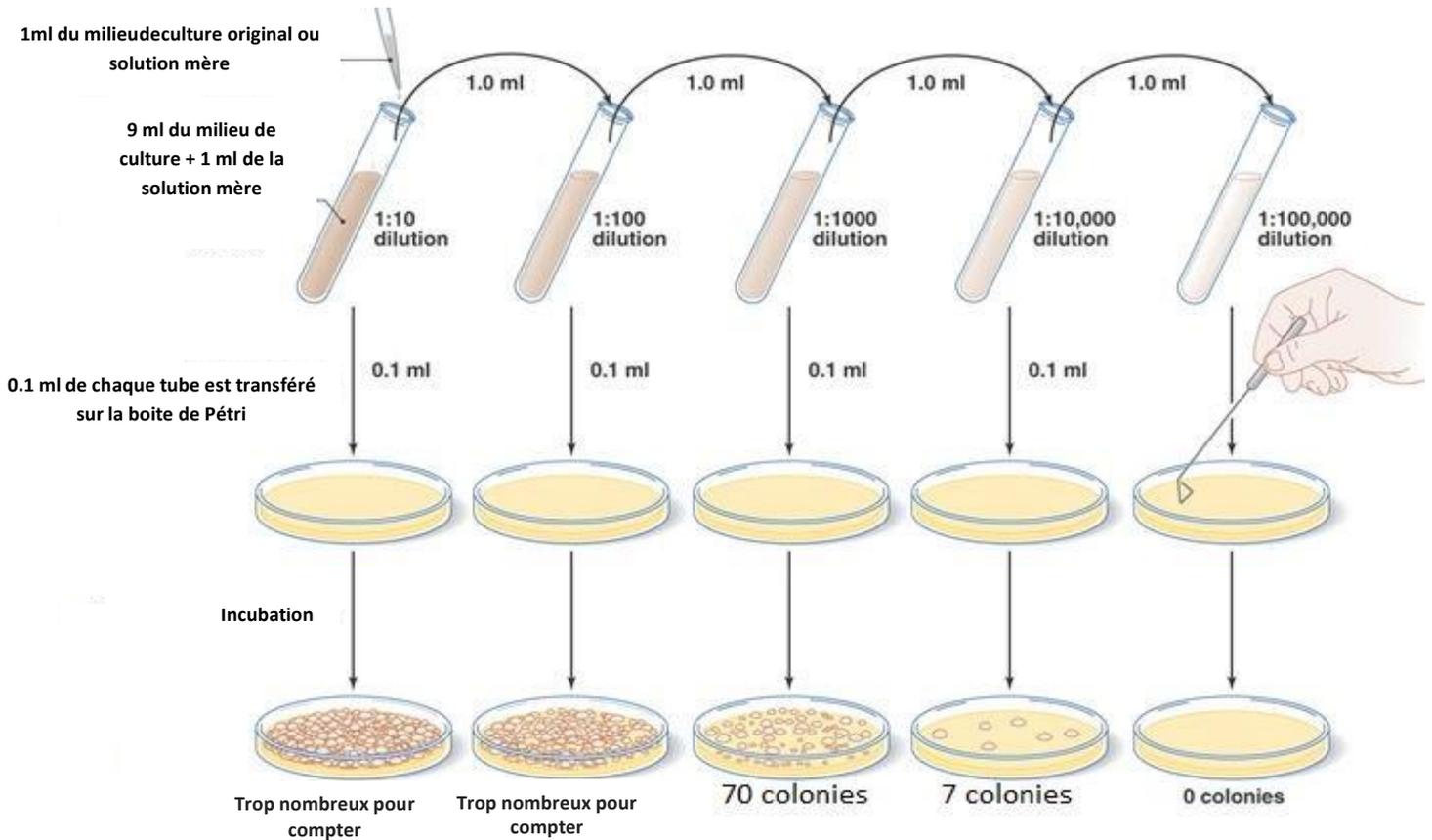
#### 1.2 Dénombrement des colonies bactériennes après culture

Le **dénombrement** (numération) des cellules viables après culture est une technique de référence et d'usage courant.

##### 1.2.1 Dénombrement sur milieu solide

Un volume fixe d'une **suspension bactérienne** parfaitement homogène et de **ses dilutions** est étalé sur un **milieu gélosé (milieu solide)** ou incorporé à un milieu gélosé en **surfusion** (dans la masse). Dans ces conditions, seules les cellules viables donnent une **colonie**. Après incubation réalisée dans des conditions convenables, un comptage des colonies bactériennes, apparues sur ou dans le milieu de culture, est réalisé.

L'analyse est réalisée en triple exemplaires et le comptage est effectué sur les boîtes **renfermant entre 30 et 300 colonies**. Cependant, ce n'est pas sûr qu'une colonie résulte du développement d'une seule bactérie. En effet, les amas ou les agglomérats bactériens donnent une seule colonie et plusieurs bactéries déposées par hasard à proximité les unes des autres, peuvent également donner naissance à une seule colonie. Soit donc plusieurs bactéries non dissociées. Ce qui induit un dénombrement par défaut, puisque plusieurs bactéries ne forment alors qu'une colonie. C'est pourquoi les résultats ne sont pas donnés en nombre de cellules mais en **Unités Formant une Colonie (UFC ou CFU pour Colony Forming Unit)** (Figure 39).



**Figure 39** : Technique de dénombrement des colonies sur milieu solide.

### 1.2.2 Dénombrement sur milieu liquide

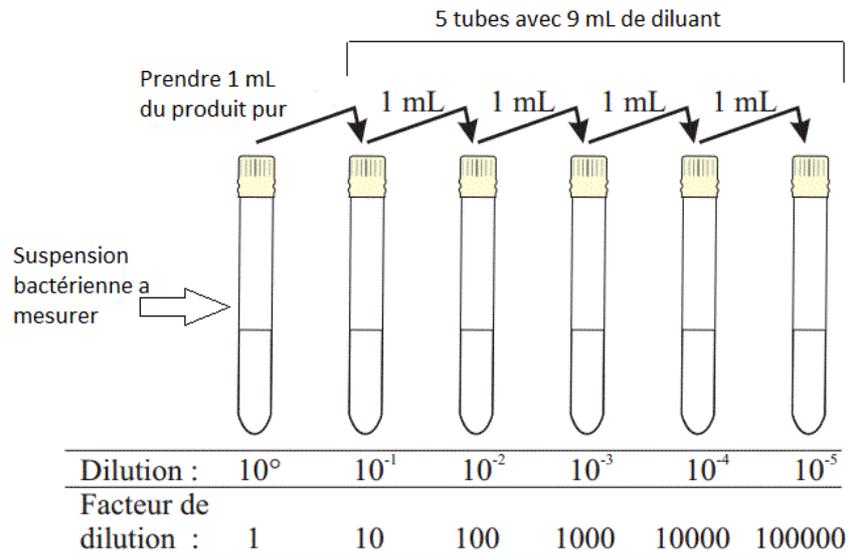
Les microorganismes sont incorporés dans un **milieu de culture liquide** conçu pour permettre leur croissance. La croissance se traduit par **l'apparition d'un trouble (voile) du milieu** et, éventuellement, une modification visible (virage d'un indicateur de pH coloré).

- **Méthode du nombre le plus probable NPP**

Cette méthode est une **estimation statistique** du nombre de microorganismes supposés distribués dans le milieu de manière parfaitement aléatoire. L'estimation de la densité bactérienne est obtenue par application du **principe de vraisemblance**, à partir de réponses positives. Ces dernières sont observées pour une ou plusieurs dilutions successives de la suspension bactérienne originelle, dans des milieux de cultures liquides. Il s'agit d'une **méthode quantique** et non pas énumératif. L'utilisation de cette méthode avec un tube par dilution entraîne une forte incertitude que des méthodes statistiques tentent de pallier par des essais multiples (2 ou 3 tubes par dilution). Le nombre de bactéries dénombrées est alors exprimé en **Nombre le plus Probable (NPP)** de bactéries viables, initialement présentes dans l'échantillon inoculé. Ce nombre est déterminé à partir de la considération des trois derniers séries de tubes positifs de la gamme des dilutions retenues, où l'on considère le nombre de tubes positifs par rapport au nombre de tubes inoculés. En se référant à la **table de Mac GRADY**, qui donne toutes les combinaisons possible et les interprétants en donnant le nombre de bactéries qui devrait statistiquement leur correspondre.

**Exemple:**

La dilution  $10^{-4}$  sera effectuée en prenant 1ml de la dilution  $10^{-3}$  préalablement homogénéisée qui sera introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant.



- **Observation des résultats**

La seule manière de savoir si un microorganisme est présent ou non dans l'inoculum par les techniques en milieu liquide sera de le mettre en évidence par un de ses caractères: trouble et production de gaz. Si l'un de ses caractères apparaît, le résultat sera positif. L'absence de l'un de ses caractères, le résultat sera négatif.

- **Exemple de résultat:**

Volume de l'inoculum: 1mL	Produit pur	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Résultat	+	+	+	+	-	-

Il y a au moins 1 microorganisme dans 1 ml de la dilution  $10^{-3}$  et moins d'un microorganisme dans 1mL de la dilution  $10^{-4}$  et donc on peut en déduire qu'il y a au moins  $10^3$  microorganismes mais moins de  $10^4$  microorganismes dans 1mL de produit pur.

**Résultat avec des essais multiples (3 tubes par dilution):**

Dilution	produit pur	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Résultats	+++	+++	+++	++-	+-	-
Chiffre égal à la somme des tubes positifs	3	3	3	2	1	0

- **Interprétation statistique (Table de Mac Grady)**

Dans la ligne "chiffre égal à la somme des tubes positifs", choisir le nombre à 3 chiffres le plus grand possible et inférieur à 330 (meilleur répartition dans les dilutions).

Se reporter à la table de **Mac Grady** pour 3 tubes de dilution afin de trouver le NPP correspondant au nombre 321: le **NPP est 15**. Cela signifie qu'il y a statistiquement quinze (15) bactéries dans l'inoculum de la dilution  $10^{-2}$  ml. D'après les limites de confiance données par

certaines tables, cette valeur numérique de 15 est en fait considérée comme comprise entre 3 et 38 avec une probabilité de 95 %, entre 2 et 52 avec une probabilité de 99 %.

**Tables NPP (d'après la norme ISO 7218 :1996(F))**

**Table NPP pour 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) et 3 x 0,01 g (ml).**

Nombre de résultats positifs			NPP	Catégorie lorsque le nombre d'essais de mesures est de 1 pour le lot considéré	Limites de confiance			
					>95%	>95%	>99%	>99%
0	0	0	<0,30		0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	0	0,30	3	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	0,4	3,6	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2	0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	3	36	2	44
3	1	3	16	0	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	3	40	2	56
3	2	3	29	3	9	99	5	152
3	3	0	24	1	44	99	3	152
3	3	1	46	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	20	400	10	570
3	3	3	>110					
autres valeurs			non cité dans la table ISO 7218 : 1996 (F)					

En déduire la concentration en microorganismes par ml de produit pur N.

NPP= nombre le plus probable obtenu par lecture de la table de Mac Grady

V inoculum= 1 ml

Fd= facteur de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique  $10^{-2}$ .

$$N = \text{NPP} / V \text{ inoculum} * Fd$$

$$15/0,01 = 15 \cdot 10^2 \text{ microorganismes par ml}$$

### 1.2.3 Mesure par filtration sur membrane

Dans certains produits liquides (eau, solutés pharmaceutiques buvables ou injectables...), les micro-organismes sont à une **concentration très faible**. Pour les dénombrer une filtration d'un grand volume (au moins 100ml) sur une **membrane** qui retient les microorganismes est appliquée. La **membrane filtrante** a des pores d'un diamètre de 0,45  $\mu\text{m}$  dont la disposition selon un réseau en trois dimensions permet de retenir à sa surface les bactéries. Les bactéries sont alors retenues à la surface de la membrane qui est directement introduite dans une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé adéquat. Les bactéries se développent et donnent des colonies qui seront dénombrées. En effet, le diamètre des pores du filtre est inférieur à celui des bactéries classiquement rencontrées. Il existe aussi des membranes de porosité de 0,22  $\mu\text{m}$  pour retenir les bactéries les plus petites, des bacilles très fins qui pourraient se faufiler dans le maillage de la membrane de 0,45  $\mu\text{m}$  (cas de *Pseudomonas aeruginosa*) ou encore des spores.

### 1.1.4 Technique d'epifluorescence

La technique d'**épifluorescence** permet en théorie de distinguer les **cellules vivantes des cellules mortes**. Elle utilise l'acridine orange ou d'autres **fluorochromes** qui se fixent sur l'ADN. Examinée en lumière ultraviolette (UV), la fixation de l'acridine orange sur un ADN bicaténaire donne une **fluorescence verte** alors que sa fixation sur un ADN monocaténaire donne une **fluorescence rouge**. Au microscope à lumière ultraviolette, les **bactéries au repos** apparaissent **vertes** alors que les **bactéries mortes** apparaissent **rouges**.

## 2. Mesure indirecte de la croissance bactérienne

- **Définition de la biomasse**

La **biomasse** est le terme qui désigne la **quantité (masse)** totale d'organismes vivants dans un biotope ou un lieu déterminé, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de champignons ou de microbes. Ainsi, la **biomasse** est la masse totale des organismes vivants mesurée dans une population.

De très nombreuses techniques permettent de mesurer la **biomasse bactérienne**: détermination du poids sec, mesure de la densité optique (DO), mesure d'un ou de plusieurs constituants cellulaires, mesure de la consommation d'un substrat, mesure des produits d'excrétion, mesure des variations physico-chimiques induites par la croissance, etc.

### 2.1 Mesure indirecte par spectrométrie

Cette méthode est réalisée par l'usage d'un **spectrophotomètre**. Il s'agit d'une **méthode optique** générale, basée sur la propriété que présente toute solution d'**absorber** une partie de l'intensité d'un faisceau de **lumière** qui la traverse en ligne droite (**opacimétrie** ou **densité optique (DO)**), de lumière transmise (**turbidimétrie**) ou de la lumière diffusée (**néphélométrie**). Chacun de ces paramètres peuvent être directement corrélés à la concentration bactérienne du milieu. Dans le cas de la mesure de l'**opacimétrie**, la longueur d'onde utilisée est d'environ 600 à 650nm. Plus il y a de microorganismes, plus la lumière est réfléchiée et plus l'intensité du faisceau restant est faible, plus la valeur d'absorbance est grande.

C'est la technique la plus employée car la plus simple, la plus rapide et la moins coûteuse. Son inconvénient majeur est sa sensibilité relativement modérée, il faut des concentrations d'au moins  $10^7$  bactéries / ml pour avoir des densités optiques mesurables.

## 2.2 Mesure indirecte de la biomasse sèche

La **détermination de la biomasse sèche** fournit l'une des mesures les plus satisfaisantes de la croissance des **organismes filamenteux**. Cette technique consiste à retirer le **mycète** du milieu de culture, à le **filtrer** pour éliminer les substances étrangères, à le placer dans un ballon puis à le **dessécher** dans un **dessiccateur** et enfin à le **pesé**. Presque la même méthode est appliquée sur les bactéries. La différence, c'est que les milieux de cultures des bactéries sont **centrifugés**. Après le séchage et la pesée du poids sec, l'**évaluation de la population bactérienne** est faite en considérant que 1 mg du poids sec correspond à quelques milliards de bactéries. La biomasse sèche totale de la population est souvent directement proportionnelle au nombre de cellules.

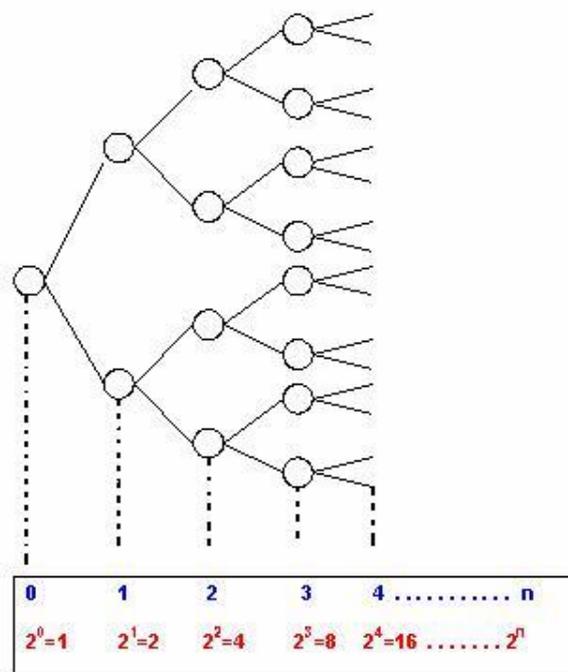
## 2.3 Mesure indirecte par la mesure de l'activité métabolique

Le nombre de bactéries d'une population peut être calculé indirectement en mesurant l'activité métabolique de celles-ci. Mesure du pH qui s'introduit par une acidification au cours de la croissance, la mesure du CO<sub>2</sub> libéré ou la mesure du taux d'oxygène(O<sub>2</sub>). Ainsi que la mesure de l'ATP par fluorescence.

# II. Paramètres de croissance, constantes de croissance

## 1. Aspects théoriques de la croissance

Théoriquement, une bactérie, placée dans un milieu convenable peut se multiplier indéfiniment, par fission binaire. La croissance se fait selon une progression géométrique: 1, 2, 4, 8, ... ou  $2^0, 2^1, 2^2, 2^3, \dots, 2^n$  (où **n** = **nombre de générations** qui est le nombre de dédoublement (divisions) subis par la bactérie mère. Il s'agit d'une croissance **exponentielle** (Figure 40).



**Figure 40** : Aspect théorique de la croissance bactérienne.

## 2. Constantes de croissance

### 2.1 Nombre de génération(n)

#### ➤ Calcul du nombre de génération (phase exponentielle)

Soit N= nombre de cellule en division au temps (t) et N<sub>0</sub> le nombre de bactérie initial. Après 1 (une) division:  $N_1 = 2^1 \cdot N_0$

Après 2 (deuxième) divisions:  $N_2 = 2^2 \cdot N_0$

Après n division:  $N_n = 2^n \cdot N_0$

$$\text{Donc } \log N = \log 2^n \cdot N_0 = n \log 2 + \log N_0$$

$$\Rightarrow n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

### 2.2 Temps de génération (Θ, G)

Le temps qui sépare deux divisions successives (ou temps nécessaire au doublement d'une population) est appelé **temps de génération θ** ou **G**.

$$\theta = t / n \quad \text{où}$$

t : Temps d'incubation

n : Nombre de génération

Ou encore :

$$G = \frac{t_n - t_0}{n}$$

Le **temps de génération** ou le temps nécessaire au doublement du nombre de cellules dépend de l'espèce, voire même de la souche et des conditions environnementales. Dans les conditions optimales de culture, le temps de génération est de 13 minutes pour *Vibrio parahaemolyticus*, de 20 minutes pour *Escherichia coli*, de 100 minutes pour *Lactobacillus acidophilus* et de 1000 minutes pour *Mycobacterium tuberculosis*.

Cependant, le nombre de divisions par unité de temps est égal à l'inverse du nombre de génération (1/G) ou (1/Θ). Pour les exemples donnés ci-dessus il est de 4,6 par heure



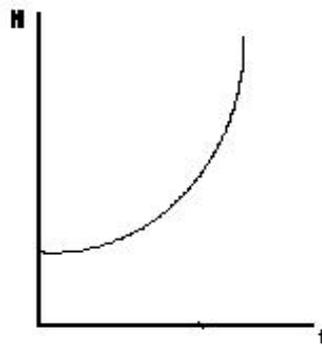
pour *Vibrio parahaemolyticus*, de 3 par heure pour *Escherichia coli*, de 0,6 par heure pour *Lactobacillus acidophilus* et de 0,06 par heure pour *Mycobacterium tuberculosis*.

### 2.3 Taux de croissance ( $\mu$ )

Le **taux de croissance** ( $\mu$ ) exprime la vitesse de multiplication des bactéries. C'est le nombre de divisions effectuées par unité de temps. Le taux de croissance est ainsi défini comme la variation du nombre de bactéries ou de leur biomasse par unité de volume ou de temps.

$$\mu = n / t \Rightarrow n = \mu t$$

Il s'agit d'une fonction exponentielle :



**Figure 41** : Représentation schématique du taux de génération.

Si on part d'une population initiale  $N_0$ , au bout de  $n$  divisions, on aura un nombre théorique de bactéries:

$$N = 2^n N_0 (1).$$

De plus:

$$\mu = n / t \Rightarrow n = \mu t (2).$$

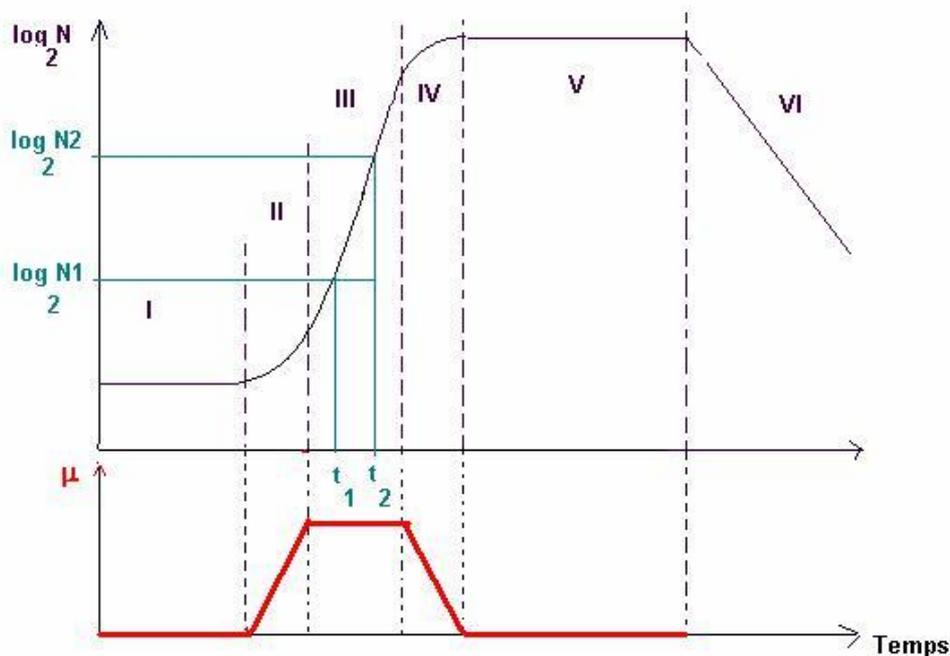
$$\text{De (1) et (2)} \Rightarrow N = 2^{\mu t} N_0.$$

### 3. Courbes de croissance, aspects expérimentaux de la croissance bactérienne

#### 3.1 Courbe expérimentale de croissance en milieu non renouvelé (Discontinue, système clos (batch))

Dans une population bactérienne, toutes les cellules ne se divisent pas de manière synchrone et la croissance s'effectue de façon continue. Dans un **milieu non renouvelé**, la croissance des bactéries est **limitée** par l'**épuisement** du milieu en nutriments. La cinétique de la croissance peut être établie expérimentalement en mesurant les variations de la masse bactérienne ( $\log N$ ) en fonction de temps ( $t$ ).

Expérimentalement, un milieu de culture liquide favorable est ensemencé. Les cultures peuvent être réalisées dans de simples flacons (tubes à essais, erlenmeyer) ou dans des équipements spécifiques (**bioréacteur** ou **fermenteur**), où les conditions convenables de culture sont régulés et maintenues à leurs optimums. Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé par des dénombrements bactériens à des intervalles de temps réguliers (Figure 42).



**Figure 42** : Courbe cinétique de croissance bactérienne en milieu non renouvelé (système clos (batch): croissance discontinue).

Selon la courbe de croissance (Figure 42), six(6) phases sont définies en s'appuyant sur le taux de croissance ( $\mu$ ): **phase de latence**, **phase d'accélération**, **phase de croissance exponentielle**, **phase de décélération**, **phase stationnaire** et **phase de déclin**.

#### ➤ Phase de latence,

Durant laquelle la masse reste identique à la masse bactérienne initiale, se caractérise par une valeur de  $\mu$  égale à zéro ( $\mu=0$ ). La durée de la phase de latence est très variable et elle dépend à la fois de la **nature du milieu** ainsi que de la **nature et de la taille de l'inoculum bactérien**. Un inoculum bactérien prélevé en phase exponentielle de croissance et ensemencé dans un milieu neuf identique, se multiplie sans aucune phase de latence. En revanche, si le même inoculum est placé dans un milieu différent, une phase de latence liée à l'**adaptation des bactéries** aux nouveaux

substrats est alors observée (période d'adaptation enzymatique durant laquelle les bactéries synthétisent de nouvelles enzymes, leur permettant d'utiliser de nouveaux nutriments).

L'ensemencement d'un inoculum important réduit la durée de la phase de latence par des mécanismes mal connus. Ainsi, l'**âge des bactéries** a une influence sur la durée de la latence, qui peut être très courte, lorsque des cellules jeunes sont introduites dans un milieu neuf. En effet, un inoculum âgé peut contenir de nombreuses cellules mortes et les quelques cellules viables devront se diviser de nombreuses fois, avant de donner une masse mesurable. De plus, dans un inoculum âgé, les bactéries sont dans un état physiologique peu favorable et il leur faut du temps pour restaurer leurs systèmes enzymatiques mis au repos.

#### ➤ Phase d'accélération

Cette phase se caractérise par une **augmentation de plus en plus rapide de la masse**. Le taux de croissance devient supérieur à zéro ( $\mu > 0$ ) et il augmente progressivement.

#### ➤ Phase de croissance exponentielle

La **phase exponentielle** ne dure que quelques heures. Durant cette phase, la masse augmente de façon **exponentielle** et le taux de croissance atteint une **valeur maximale et constante**. Les bactéries se multiplient sans entrave et elles libèrent des métabolites pouvant avoir un intérêt industriel comme des antibiotiques ou des toxines. La pente de la droite permet de mesurer la valeur de  $\mu$ . Cette dernière dépend des conditions d'environnement comme la température, le pH, la nature et la concentration des nutriments.

#### ➤ Phase de décélération ou Ralentissement

Au cours de la phase de décélération, l'augmentation de la **masse bactérienne ralentit** et le taux de croissance ( $\mu$ ) diminue progressivement.

#### ➤ Phase stationnaire

Cette phase peut durer de quelques heures à quelques jours. La **masse bactérienne est maximale et constante et  $\mu$  est égal à zéro ( $\mu=0$ )**. Les bactéries peuvent continuer à se diviser mais le **taux de division est alors égal au taux de mortalité**. Cette phase résulte d'un épuisement du milieu et de l'accumulation de déchets toxiques. Durant cette phase les bactéries en ayant la capacité, peuvent sporuler.

#### ➤ Phase de déclin ou de Décroissance

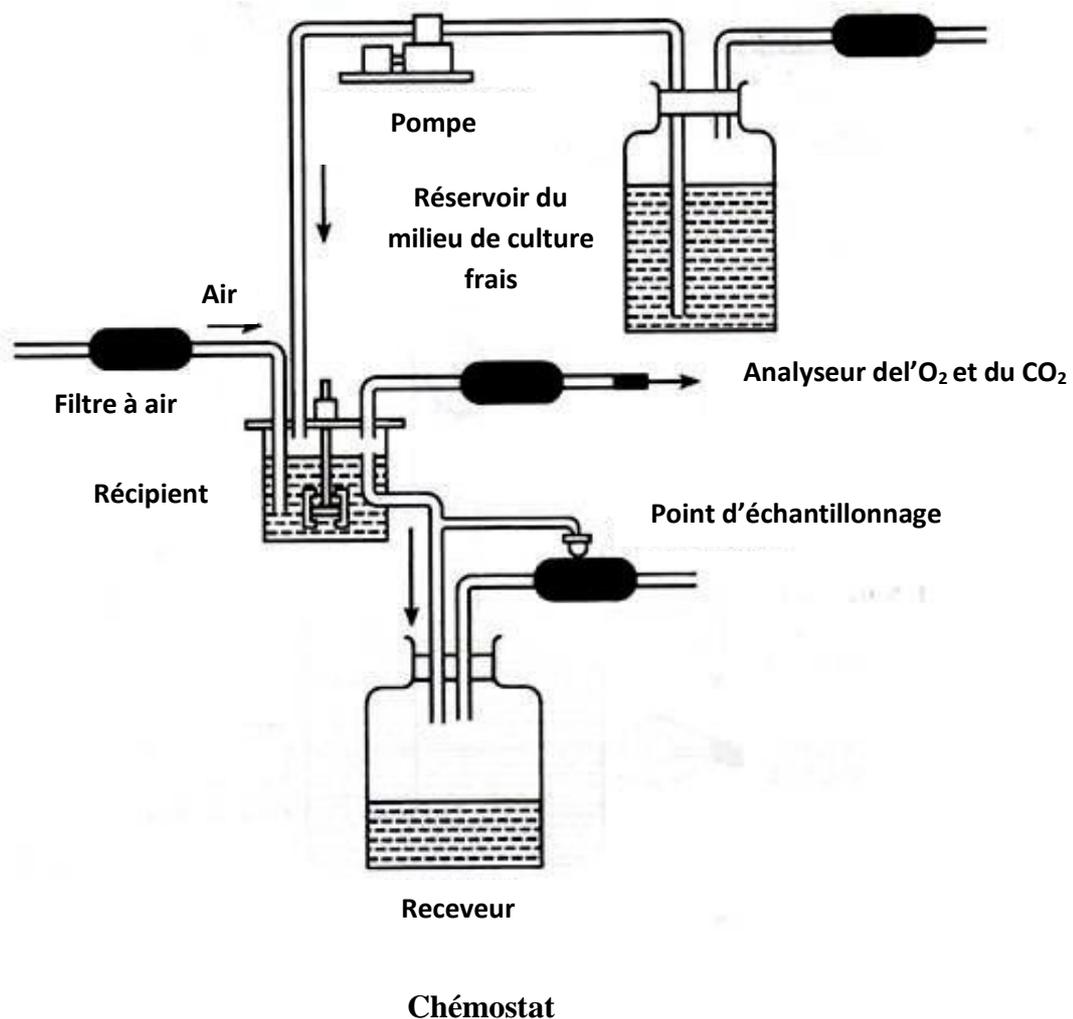
Au cours de la **phase de déclin** les bactéries **ne se divisent plus**, beaucoup d'entre elles meurent et sont détruites par des autolysine (lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes (autolyse)). Dans quelques cas, les bactéries survivantes peuvent amorcer une nouvelle phase de multiplication en utilisant les substances libérées par la lyse des cellules. On parle alors de croissance cryptique.

### 3.2 Croissance en milieu renouvelé: continue, système ouvert

Contrairement à la croissance discontinue où les conditions de croissance changent en permanence dans un système clos, du fait du développement bactérien, la **croissance continue** correspond à un **système ouvert** dans lequel la population bactérienne est maintenue dans un **état de croissance équilibré et optimale, en phase de croissance exponentielle**. Cette situation est stabilisée par le renouvellement permanent du milieu de culture assuré par un **apport régulier de milieu nutritif** qui est compensé par le retrait simultané du même volume de culture bactérienne. Par ce principe, deux dispositifs principaux sont utilisés permettant la croissance de ce type de culture:

### ➤ Chémostat

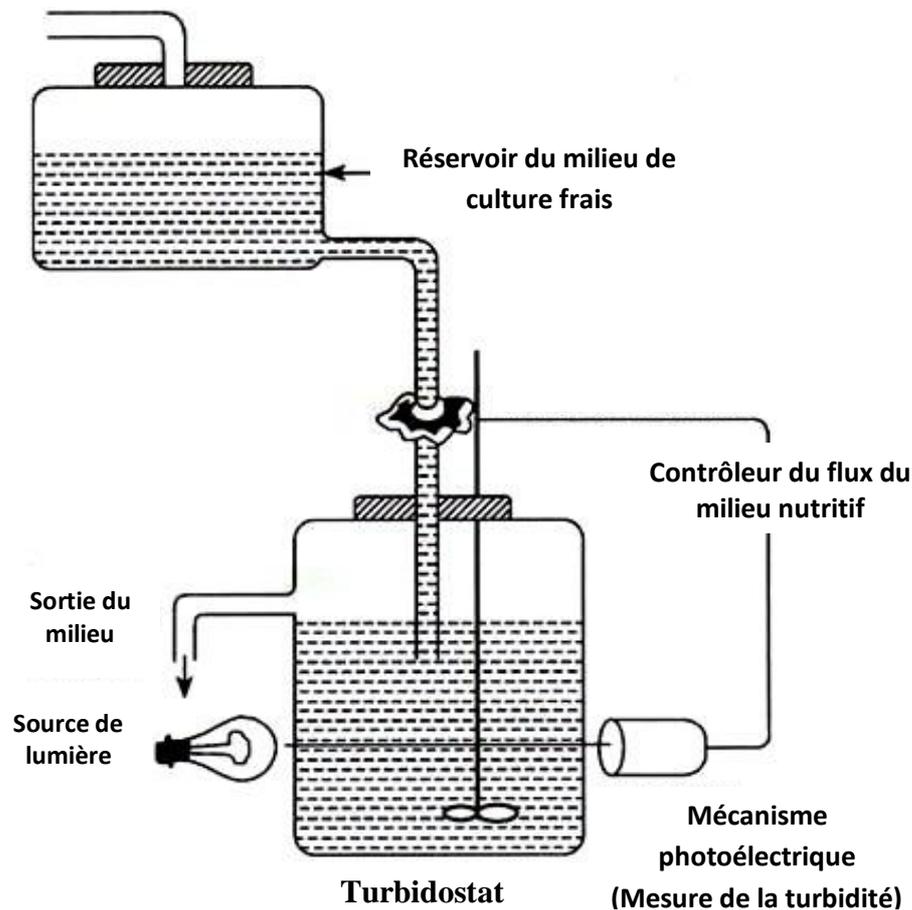
Ce dispositif consiste en un récipient de culture équipé d'un siphon de trop-plein et d'un mécanisme qui fait tomber la culture goutte à goutte, à taux régulier, dans un milieu frais provenant d'un réservoir. Le milieu dans le récipient de culture est fermé par un jet d'air stérile. Chaque goutte du milieu frais, qui entre, provoque le départ d'une goutte de culture par le siphon. Le milieu de culture est préparé de telle façon qu'un aliment limite le rendement de la croissance bactérienne. Le récipient est inoculé et les cellules se multiplient jusqu'à ce que l'aliment de limitation soit épuisé. A ce moment, le milieu frais est introduit à partir du réservoir à un taux tel que les cellules épuisent l'aliment de limitation aussi rapidement qu'il est fourni. Dans ces conditions, la concentration cellulaire reste constante et le taux de croissance ( $\mu$ ) est directement proportionnel au taux d'écoulement du milieu (Figure 43).



**Figure 43** : Représentation schématique du Chémostat.

### ➤ Turbidostat

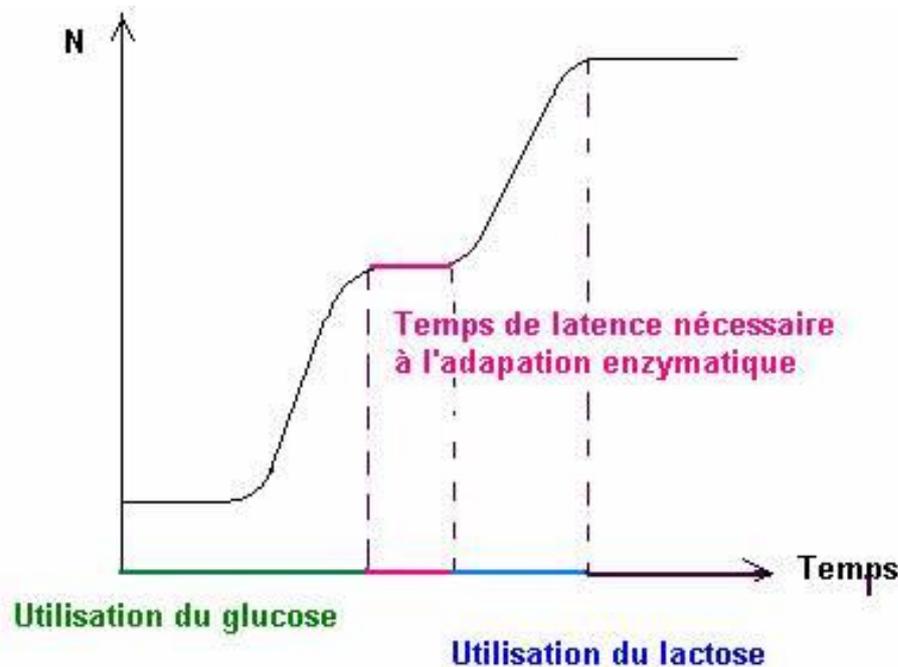
Ce dispositif ressemble au chémostat excepté que le flux du milieu nutritif est contrôlé par un mécanisme photoélectrique qui **mesure la turbidité (DO)** de la culture. Lorsque la turbidité dépasse le niveau choisi, du milieu frais est alors entré. Ainsi, les cellules peuvent croître à taux maximum à une concentration cellulaire constante. Seulement le taux de croissance est contrôlé dans le turbidostat (Figure 44).



**Figure 44** : Représentation schématique du Turbidostat.

### 3.3 Phénomène de diauxie

Le phénomène de **diauxie**, mis en évidence par MONOD, se traduit par une courbe de croissance **diphase**. Il est observé dans des **milieux synthétiques** contenant au moins **deux sources de carbone** et il est lié à un mécanisme de **répression catabolique**. Par exemple, dans un milieu contenant du glucose et du lactose, certaines espèces vont dans un premier temps utiliser le glucose grâce à des **enzymes constitutives**. La dégradation du lactose est sous la dépendance d'**enzymes inductibles** dont l'induction est réprimée en présence du glucose. Lorsque le glucose sera épuisé, les bactéries utiliseront le lactose et donneront une nouvelle phase de croissance exponentielle après un temps de latence intermédiaire (Figure 45).



**Figure 45** : Courbe cinétique de croissance d'une culture en diauxie.

Lorsque des bactéries sont cultivées en présence de glucose et de lactose, elles commencent par l'utilisation du glucose jusqu'à son épuisement. On observe ensuite un temps de latence, durant lequel les bactéries synthétisent les enzymes nécessaires à l'utilisation du lactose, avant la reprise de la multiplication bactérienne.

### 3.4 Croissance synchrone

Les bactéries en phase exponentielle de croissance se multiplient à la même vitesse, mais avec un **décalage dans le temps** dû à une inégalité de réserves initiales des bactéries. Cela se traduit par des temps de latence différents d'où l'**asynchronisme** de la croissance. Si toutes les cellules se divisent au même instant, la courbe de croissance donne des **paliers successifs** qui expriment le doublement de la population. La **synchronisation** de la croissance peut être obtenue par différents procédés comme la filtration sélective et le choc thermique.

### 3.5 Croissance sur milieu solide ou sur gélose

En plus des milieux liquides connus sous le nom de **bouillons de culture**, les bactéries peuvent être cultivées sur des **milieux solidifiés**, en forme de gel, par l'incorporation de substances gélifiantes (d'où le nom de **gélose**) à leur composition de base. La substance la plus utilisée est l'**agar** de nature polysaccharidique.

La croissance à la surface d'un milieu solide se traduit soit par une **nappe confluyente** lorsque les bactéries sont déposées en grand nombre soit par l'apparition de **colonies** lorsque les cellules sont déposées de manière isolée. Lors de la formation d'une **colonie**, la croissance conduit d'abord à l'apparition d'une couche monocellulaire et la structure de la microcolonie est bidimensionnelle. La prolifération des bactéries de la périphérie conduit à une extension radiale de la colonie alors que la prolifération des bactéries situées au centre de la colonie est à l'origine de la structure tridimensionnelle due à la poussée vers le haut des cellules résultant de la division bactérienne.

Le développement des colonies a des conséquences en ce qui concerne l'accès des bactéries à l'oxygène et aux nutriments. L'oxygène pénètre difficilement dans une colonie bien développée et sa concentration au centre de la colonie peut être faible. Les nutriments diffusent vers le haut à partir de la gélose pour créer un gradient de concentration inverse à celui de l'oxygène.

Pour une bactérie aérobie, toutes les cellules sont en croissance et en multiplication dans une colonie jeune, alors que dans une colonie âgée, seules les cellules proches de la surface continuent à se multiplier. En effet, l'absence d'oxygène au centre de la colonie inhibe la multiplication des bactéries qui s'y trouvent.

L'**aspect des colonies** est un critère important de l'identification d'une bactérie. Les colonies se caractérisent par leur vitesse d'apparition, leur taille, leur **aspect** (colonies lisses ou S pour smooth, colonies rugueuses ou R pour rough, colonies muqueuses ou M, colonies brillantes ou mates, colonies à bord régulier ou irrégulier, colonies plates ou surélevées ou ayant un aspect en œuf sur le plat, colonies pigmentées ou non pigmentées, etc.), leur **odeur** (odeur de seringa pour *Pseudomonas aeruginosa*, odeur de terre mouillée pour *Burkholderia pseudomallei*, etc.), leur **texture**, leur caractère hémolytique sur une gélose au sang, leur **adhérence** ou non à la gélose, etc.

### 3.6 Biofilms

Dans leur habitat naturel, les bactéries vivent le plus souvent attachées à des supports et leur mode vie est **sessile** (par opposition au mode de vie planctonique ou vie à l'état libre observée dans des milieux liquides). Les bactéries **sessiles** forment des colonies qui se recouvrent de polymères organiques et qui tendent à s'associer en communauté. Elles forment alors des **biofilms** quise trouvent dans les canalisations, à la surface des roches immergées d'une rivière, à la surface des muqueuses, sur les dents (plaque dentaire), sur les prothèses, sur divers matériels médicaux (cathéter, valve cardiaque), etc. Au sein des **biofilms**, les bactéries sont soumises à des phases d'abondance et de restriction nutritionnelles, mais elles sont protégées vis-à-vis des facteurs environnementaux défavorables (dessiccation, parasitisme par les bactériophages ou présence d'antibiotiques, présence d'antiseptiques ou de désinfectants).

## III. Milieux de culture

Les **milieux de cultures** sont des préparations nutritives de laboratoires destinées à la croissance des microorganismes. Ces milieux doivent satisfaire les **exigences nutritives** du microorganisme étudié. Cependant, ils couvrent les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, à la source de carbone et d'énergie, le pH optimal....Les milieux de culture peuvent être préparés sous forme de **milieux liquides** dont les bactéries se développent en formant des **voiles** ou **troubles** qui opacifient le milieu. Ou sous forme de **milieux solides (milieux gélosé)** obtenus par l'incorporation d'une **substance gélifiante (agar)** dans le milieu liquide. Ces milieux sont utilisés dans des récipients plats, les plus communs sont les **boîtes de PETRI**. Sur ces milieux les bactéries se développent en amas cellulaires ou en **colonies**. En effet, les microorganismes se développent parfaitement dans les milieux liquides mais l'isolement bactérien nécessite des milieux solides afin de séparer les différents germes présents dans un prélèvement.

### ➤ Milieu minimum

Un **milieu minimum** est un milieu comportant les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne, sous une forme utilisable par des bactéries n'ayant pas d'exigence particulière. Un milieu minimum se compose d'une source de carbone et d'énergie, d'une source de potassium et de phosphore, d'une source d'azote et de soufre, d'une source de micronutriment, d'une source d'oligo-éléments et d'une source d'eau (eau distillée stérile). En l'absence de l'un de ces composants, les bactéries ne se développent pas, car elles ne peuvent synthétiser ces produits.

### 1. Milieux synthétiques

Les **milieux synthétiques** sont des milieux de culture de composition exactement connue, qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont surtout utilisés pour l'étude des bactéries autotrophes ou pour étudier les besoins nutritifs d'un germe. Ils sont rarement utilisés en routine à l'exception de quelques-uns : Citrate de Simons, Citrate de Christensen, Urée-Tryptophane....

## 2. Milieux complexes ou empiriques

Ce sont des milieux de cultures de composition connue seulement avec approximation car dépendant des matières premières utilisées : extrait de viande ou de levure, peptones, sucres et éventuellement liquides biologiques (sérum, sang...), mais qui conviennent aux microorganismes étudiés. Ce sont les milieux les plus employés aujourd'hui. Exemple : LB, Columbia, Gassner, Tryptycase soja, Chocolat et autres.

## 3. Milieux sélectifs

Un **milieu sélectif** est un milieu qui permet de **sélectionner** le type de bactéries qui poussent sur celui-ci, alors que tous les autres microorganismes présents sont **inhibés**. Un milieu de culture est rendu sélectif pour une espèce microbienne, lorsque sont seules satisfaites les exigences nutritives et les conditions de développement particulières à cette espèce. Les principaux facteurs de sélection microbienne utilisés seuls ou en association sont les sels biliaires, le cristal violet, le vert brillant, l'azide de sodium et certains antibiotiques.

## 4. Milieux différentiels

Le milieu de culture dit **différentiel** ou **indicateur** permet de distinguer deux types de microorganismes se développant dans un même milieu. Ce type de milieu met en évidence certaines caractéristiques biochimiques des microorganismes (principalement l'aptitude à dégrader un substrat) en présence d'**indicateur(s)** de la réaction chimique : des indicateurs colorés de pH ou d'oxydo-réduction (tel que le rouge neutre, rouge de phénol, l'éosine ou le bleu de méthylène).

## 5. Milieux d'enrichissement

L'**enrichissement** est l'augmentation de la proportion (présence) d'un sous-groupe de microorganismes dans un ensemble plus vaste. Un milieu d'enrichissement réunit deux caractéristiques: il contient des **molécules à action sélective** inhibant totalement ou partiellement la culture des microorganismes non recherchés ou utilise une température d'incubation particulière, ou encore une atmosphère particulière. De plus, il est d'ordinaire **liquide** (bouillon) afin que son action sélective s'exerce sur une population importante et homogène.

## 6. Autres types de milieux

- **Milieux d'identification**

Ce sont des milieux de cultures utilisés pour mettre en évidence une ou plusieurs propriétés métaboliques spécifiques dans l'identification d'une souche bactérienne particulière.

- **Milieux d'isolement**

Ce sont des milieux gélosés utilisés pour la culture de nombreuses espèces bactériennes qui s'y développent en formant des colonies. Ces dernières sont prélevées et repiquées sur le même milieu, autant de fois que nécessaire et jusqu'à la certitude de leur purification. Le plus connu des milieux d'isolement est la **gélose nutritive**.

- **Milieux de conservation**

Ce sont des milieux pauvres aux seins des quel les bactéries survivent en état de vie ralentie.



### ✓ Bactéries viables mais non cultivables VNC ou VBNC

En dépit de l'existence de très nombreux milieux de culture, seule une infime proportion de bactéries peut être cultivée *in vitro*.

Plusieurs études montrent que des bactéries à Gram négatif ou à Gram positif, telles que *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* ou *Escherichia coli*, ont la possibilité d'entrer dans un état viable mais non cultivable. Ces bactéries restent vivantes, elles ont une activité métabolique réduite, leur taille est souvent réduite, elles ont souvent une forme ovoïde, elles présentent des modifications structurales de leur membrane cytoplasmique, elles synthétisent de nouvelles protéines et elles sont incapables de croître *in vitro*.

L'état viable mais non cultivable serait génétiquement programmé et permettrait à une bactérie de survivre dans des conditions qui lui sont hostiles. L'état VNC présente une importance majeure en clinique car les bactéries viables mais non cultivables sont capables de retrouver leur virulence après infection de l'homme ou de l'animal. Des bactéries VNC pourraient être responsables d'infections ou responsables de la résurgence d'infections observées chez des individus considérés comme guéris depuis plusieurs années. Ainsi, les otites moyennes chroniques résistantes aux antibiotiques ne semblent pas dues à une réponse inflammatoire comme on l'a longtemps cru mais elles seraient dues à la présence de VNC résistantes aux antibiotiques.

## IV. Agents antimicrobiens

Les **agents antimicrobiens** sont des substances qui tuent (**microbicide**) ou ralentissent (**microbiostatique**) la croissance des microorganismes tels : les bactéries (**activité antibactérienne**), les mycètes (**activité antifongique**), les virus (**activité antivirale**) et les parasites (**activité antiparasitaires**).

En médecine, un *agent antimicrobien* désigne une **substance chimique**, un **médicament**, utilisé pour le traitement d'une maladie causée par un microorganisme, (typiquement une bactérie), qui détruit l'agent pathogène sans endommager les tissus de l'organisme. L'agent antimicrobien est le plus souvent un antibiotique.

L'utilisation par l'homme des **agents antimicrobiens** permet de contrôler la présence et la croissance de microbes dans les milieux où ils sont indésirables. Elle permet aussi d'apporter des données précieuses sur leur mode d'action, sur les résistances développées à leur encontre, ainsi que sur le métabolisme microbien.

### 1. Définitions

- **Stérilisation**

Procédé par lequel toutes les cellules vivantes ainsi que leurs formes (spores), sont détruits (éliminés). Un objet stérile est totalement exempt de microorganismes, de spores, de virus, de viroïdes, ou d'autres agents infectieux viables. Un agent chimique permettant la stérilisation est appelé **agent stérilisant**.

- **Désinfection**

C'est la **destruction**, l'**inhibition** ou l'**élimination** des microorganismes potentiellement pathogènes. Elle réduit également, d'une manière substantielle, la population microbienne totale. La **désinfection ne stérilise pas**, car des formes de vie peuvent substituées (endospores bactériennes). C'est une opération permettant l'**élimination momentanée** de microorganismes et l'**inactivation des virus**, contrairement à la stérilisation. Les **agents désinfectants** sont des **agents généralement chimiques** appliqués sur des objets inertes pour sécuriser leur emploi, notamment en milieu hospitalier: instrument chirurgicaux, surfaces et salle de travail.... Les **désinfectants** se présentent

sous plusieurs formes : vapeurs (Formol (alcool)...), liquide (eau de Javel, phénols...), solides (chaux vive).

- **Asepsie**

C'est l'ensemble des mesures empêchant tout apport exogène de microorganismes (contamination). La stérilisation, la désinfection sont des moyens de réalisation de l'**asepsie**.

- **Septique**

Qualifié pour un milieu contenant des microorganismes. Cependant, un produit est dit **septique** (non stérile) s'il contient des microorganismes.

- **Antisepsie**

C'est le procédé d'**inhibition** ou **destruction** de microorganismes pathogènes au niveau de tissus vivants. En principe, on doit réserver le terme "désinfection" aux milieux inertes et "antisepsie" aux tissus vivants. Les **agents antiseptiques** sont moins toxiques que les désinfectants, car ils ne doivent pas détruire le tissu hôte. Leur utilisation reste externe, exemple: l'eau oxygénée.

- **Agents chimiothérapeutiques**

Ce sont des agents chimiques antimicrobiens, utilisés dans le traitement des maladies infectieuses: **antibiotiques**, **antiviraux** par exemple.

## 2. Action antimicrobienne

Le rôle des agents antimicrobiens est d'éliminer les microorganismes. De les détruire ou d'inhiber leur croissance. Les **substances destructrices** (traitement de destruction) sont désignées par le suffixe-**cide** (du latin *coedere*, qui signifie tuer). Un **germicide** détruit les germes mais pas nécessairement les endospores. Son action est létale. L'action antagoniste des germicides en fonction de la catégorie de microorganismes ciblés est désignée par les termes suivants:

- **Bactéricide** : agent qui tue les bactéries.
- **Sporicide** ou **sporulicide** : agent qui tue les spores bactériennes (endospores),
- **Fongicide** : agent qui tue les champignons (y compris leurs spores mais ces spores ne présentent pas les mêmes propriétés de résistance que celles des endospores bactériennes).
- **Algicide** : agent qui tue les algues.
- **Viricide** ou **virulicide** : agent qui inactive les virus.

D'autres **substances inhibent la croissance** et empêche le développement des microorganismes (traitement de stabilisation). Leurs noms se terminent par le suffixe **-statique** (du grec *statikos*, qui signifie arrêter) par exemple: **biostatique** (**bactériostatiques**, **fongistatiques**).

- **Bactériostatique** : agent qui inhibe la croissance bactérienne.
- **Fongistatique** : agent qui inhibe le développement mycélien. Certains agents présentent ces deux modes d'action en fonction des doses.

### 2.1 Spectre d'activité d'un agent antimicrobien

Il s'agit de la liste des espèces vis-à-vis desquelles un agent exerce son pouvoir bactéricide ou bactériostatique. Si les désinfectants et les antiseptiques ont un spectre très large, les antibiotiques ont un spectre beaucoup plus étroit. Par exemple la pénicilline G n'agit que sur les bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif.

## 2.2 Temps de réduction décimal (D)

C'est le temps nécessaire pour réduire d'une puissance de 10 le nombre de microorganismes. La contamination initiale est divisée par 10 chaque fois que l'opération de destruction en cours est prolongée d'un temps D.

## 2.3 Efficacité

Un agent antimicrobien est plus ou moins efficace selon l'**intensité** pour les agents physiques, la **concentration**, la stabilité chimique, la solubilité pour les **agents chimiques**. Ainsi que, le **temps de contact** et la **température** et autres.

## 3. Agents antimicrobiens physiques

### 3.1 Chaleur, Température

La plupart des germes bactériens sous leur forme végétative sont détruits dans l'eau bouillante. Cette technique reste encore la plus fiable pour obtenir de l'eau potable. Les procédés les plus classiques de stérilisation par la chaleur sont l'**autoclavage à 120°C (destruction des spores)**, la **tyndallisation (destruction des spores sans altération des produits fragiles)** et les **pasteurisations basse, haute et UHT**. Ce sont des procédés de **stérilisation à la chaleur humide**.

#### 3.1.1 Chaleur Humide

##### a) Autoclavage

Il est réalisé en **autoclave**, qui est un outil de **stérilisation par la chaleur humide sous pression**. L'autoclave est constitué d'une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle l'eau est chauffée sous pression (1 bar) pour faire agir de la vapeur d'eau saturée. La stérilisation est obtenue par dénaturation des protéines, après chauffage à 121°C pendant 15 à 20 minutes. La température utilisée est **inférieure** à celle utilisée en **chaleur sèche**. La saturation de l'atmosphère en eau permet la stérilisation de milieux liquides sans évaporation. Il est déconseillé de stériliser par autoclavages les liquides albumineux, le lait, les solutions concentrées de glucides, la gélatine et toute autre solution facilement hydrolysable.

##### b) Tyndallisation

C'est une opération décrite par TYNDALL, qui consiste à chauffer un milieu à 60-70°C pendant 30-60 minutes trois fois consécutives en laissant un intervalle de 24 heures entre chaque chauffage. Ainsi, certains milieux ne supportant pas l'autoclavage peuvent être stérilisés par tyndallisation. La dormance des spores thermorésistantes est levée au cours du premier chauffage, les cellules végétatives issues de la germination de ces spores sont détruites lors des traitements suivants. Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles contenant le sérum ou toute substance thermosensible de forte viscosité qui ne peut être stérilisée par autoclavage ou par filtration.

##### c) Pasteurisation

Il s'agit d'une méthode de conservation découverte par Pasteur dans les années 1860. Un chauffage modéré permet la destruction des germes pathogènes fréquemment présents dans le lait ou ses dérivés, les jus de fruits... La pasteurisation a l'avantage de laisser intactes les vitamines présentes dans le produit traité, qui conserve également ses caractères organoleptiques (couleur, odeur, saveur). On distingue plusieurs types de pasteurisation :

**Pasteurisation à basse température:** 60-70°C plusieurs minutes.

**Pasteurisation à haute température:** 90°C durant 30 secondes puis refroidissement à 10 °C.

**Pasteurisation à ultra-haute température (UHT):** 140°C pendant quelques secondes puis refroidissement brutal.

La pasteurisation est utilisée pour les milieux de cultures comme pour les aliments. En effet, il est important de choisir les conditions qui assurent une bonne destruction microbienne. Une destruction minimale des vitamines, et une production minimale de réactions défavorables comme les réactions de Maillard.

### 3.1.2 Chaleur sèche

Certains matériels ne peuvent pas être stérilisés par la chaleur humide. Ils sont alors stérilisés par la chaleur sèche.

#### a) Bec Bunsen, flambage

Cette méthode est utilisée pour la stérilisation extemporanée du matériel de manipulation (fils de platine, extérieurs et extrémités des pipettes Pasteur ou graduées, col des tubes à essais, des flacons et des fioles, ouverture de récipients, spatules, etc.). Ce procédé consiste à maintenir l'objet à stériliser dans la flamme chauffante du **bec Bunsen** (chaleur sèche). Il se produit à sa surface une destruction totale des matières organiques.

#### b) Four PASTEUR

Le four PASTEUR est utilisé pour la **stérilisation à sec** (par l'air chaude) de la verrerie vide, objets en porcelaine, les seringues métalliques, les aiguilles, les pièces de métal. Le matériel à stériliser, propre et parfaitement sec, bouché au coton et éventuellement emballé dans du papier solide (papier Kraft ou papier journal). La mort des microorganismes est obtenue par dénaturation des protéines, après un chauffage à 180 °C pendant 30 minutes (160°C / 2 heures). Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, ensuite stocké à l'abri des poussières.

#### c) Incinérateur

L'incinération est utilisée pour les objets non récupérables, combustibles à usage unique.

#### d) Stabilisation microbiologique par le froid

La conservation des denrées alimentaires est assurée par l'abaissement de la température, soit en la laissant positive (**réfrigération**) soit en la passant dans la zone négative (**congélation ou surgélation**). La **réfrigération** et la **congélation** doivent être appliquées à des aliments sains, de façon précoce et continue (la chaîne du froid ne doit pas être rompue).

#### ▪ Barème de stérilisation (D)

Le **barème de stérilisation D** est le temps nécessaire pour réduire d'une puissance de 10 le nombre de microorganismes. L'**inactivation thermique (z)** est l'accroissement de température nécessaire pour réduire D à 1/10. Afin d'obtenir une destruction satisfaisante des microorganismes, les conditions assurant l'élimination des spores les plus résistantes doivent être réalisées (valeurs de D et z optimales).

Par exemple, lors de l'action de la vapeur d'eau, *Bacillus stearothermophilus* est caractérisé par une valeur de D à 120°C de 1,5 mn et une valeur de z de 9,5°C. Un traitement stérilisant d'une minute et demie par la vapeur d'eau à 110,5°C sera donc 10 fois moins efficace qu'à 120°C. **Le couple température-durée est très important dans les barèmes de stérilisation.**

Les spores de *Clostridium botulinum* présentent un temps de réduction décimale D à 121 °C de 0,204 mn. Un traitement thermique suffisamment long pour réduire le nombre de spores de 10<sup>12</sup> à 10<sup>0</sup> (une spore) est égal à 12D, soit 2,5 mn. La valeur de z étant de 10°C pour ces spores, un changement de température de 10°C modifie la valeur D d'un facteur 10. Si le traitement devait être effectué à 111°C au lieu de 121°C, D serait égal à 2,04 mn et la valeur 12D égale à 24,5 minutes.

## 3.2 Radiations

### 3.2.1 Rayons Ultra-violet (UV)

Les rayonnements UV sont produits par un tube en quartz à vapeur de mercure. Les rayonnements ultraviolettes (UV) proches de 260 nm sont très létales mais ne pénètrent que très peu le verre ou l'eau. Les lampes germicides ou stérilampes sont utilisées pour la stérilisation des surfaces et de l'air ambiante dans des locaux ou des hottes servants de manipulation dans une atmosphère stérile (salles de chirurgie, hotte à flux laminaire, la décontamination de surfaces de travail...). Ces rayonnements provoquent des mutations au niveau du génome, inhibant ainsi les processus biochimiques.

### 3.2.2 Radiations ionisantes X et $\gamma$

Les rayonnements ionisants RX et R $\gamma$  pénètrent profondément la matière, leur pouvoir de pénétration est plus important. Ils sont utilisés pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri, des pipettes et des flacons en matières plastiques. Les radiations  $\gamma$  d'une source de cobalt 60 stérilisent à froid des antibiotiques, des hormones ou des objets plastiques à usage unique. Trois types de radiations ionisantes sont appliqués:

**Raddappertisation:** Destruction de tous les microorganismes vivants (20 à 50 kGy (kiloGray)).

**Radication:** Destruction de tous les microorganismes pathogènes non sporulants (10 kGy).

**Radurisation:** Réduction de la charge microbienne sans altération du produit.

## 3.3 Pression

Les **ultrapressions** sont capables de détruire les microorganismes. Le traitement d'aliments à 4000 bars permet de réduire sensiblement leur teneur en microorganismes. L'usage industriel est limité par l'importante dépense énergétique nécessaire. Des techniques de **pascalisation** associent l'action de la température à celle des **hautes pressions**. L'augmentation de la pression osmotique (et la diminution de la disponibilité de l'eau) est un procédé ancestral pour la conservation des aliments (exemple: salaisons).

## 3.4 Filtration

La **filtration** est une excellente méthode pour réduire la population microbienne de substances thermosensibles ou pour stériliser des solutions. Il existe des **filtres épais** et des **membranes filtrantes**.

Les filtres épais sont constitués de matière fibreuse ou granulaire. Ils sont caractérisés par une épaisse couche contenant des canaux tortueux, exemple: Chamberlain (porcelaine). Alors que les membranes filtrantes sont composées d'acétate de cellulose, de polycarbonates et autres. Elles sont poreuses avec des diamètres caractéristiques (0,22  $\mu\text{m}$  pour les bactéries de petites tailles par exemple).

## 3.5 Centrifugation

Dans un milieu liquide, les particules et les bactéries peuvent être éliminées, grâce à des appareils permettant une accélération de l'ordre de 5000g. Le procédé de **bactofugation** consiste à centrifuger le lait pour en éliminer la plus grande partie des microorganismes, il est utilisé en complément de la **pasteurisation**.

## 4. Agents antimicrobiens chimiques

Les agents chimiques décrits jusqu'aujourd'hui, ont une application sur des objets inertes, ce sont alors les **agents désinfectants**. S'ils ont une application sur les tissus vivants (peau, plaie), c'est les **agents antiseptiques**. Ce sont en général des substances chimiques dont l'action toxique sur les microorganismes ou les cellules des tissus s'exprime par la coagulation structurale et la dénaturation d'enzyme essentielles. Les **désinfectants** et les **antiseptiques** sont souvent un même composé, utilisé selon le cas à des concentrations différentes. Les solutions les plus diluées étant antiseptiques et les plus concentrées désinfectantes.

### 4.1 Oxydants

Les agents oxydants oxydent les groupements thiols (SH) libres des enzymes et les altèrent irréversiblement:

#### 4.1.1 Eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

C'est un désinfectant des plaies, mais sa décomposition rapide limite son efficacité.

#### 4.1.2 Chlore et dérivés

Le chlore, sous forme de gaz ou de diverses combinaisons chimiques (**hypochlorites** et **chloramines**), est le désinfectant de choix pour l'eau de distribution et les piscines, également employé dans les industries alimentaires. Son application produit de l'acide hypochloreux (HClO) entraînant une oxydation des constituants cellulaires. L'**eau de Javel** (hypochlorite de sodium : NaOCl) assure rapidement la destruction des bactéries et des champignons sur le sol ou les ustensiles. Seules les formes sporulées nécessitent des doses très élevées pour être éliminées. Il s'agit d'un désinfectant bon marché, efficace et facile d'utilisation.

#### 4.1.3 Iode

L'iode, peu soluble dans l'eau, est utilisé en solution dans l'alcool (**teintures d'iode**) ou sous forme d'iodure de sodium ou de potassium. Il permet la désinfection de la peau (antisepsie préopératoire) et des plaies superficielles mais peut entraîner des brûlures. Les **iodophores** comme la **Bétadine** sont des complexes organiques libérant progressivement l'iode, solubles dans l'eau, non irritants et non tâchant.

## 4.2 Savons et détergents synthétiques

Les **savons** sont des sels sodiques ou potassiques d'acide gras de poids moléculaire élevé. Leur action est mécanique, réduit les forces de tension superficielle et augmentent le pouvoir mouillant de l'eau, permettant ainsi l'emprisonnement des germes dans la mousse, puis leur élimination par rinçage.

Des composés à pouvoir mouillant, plus récemment synthétisés, sont également bactéricides : ce sont les **détergents** (ou **surfactants**), classés en trois catégories:

- Détergents anionique qui ont un groupement anionique actif.
- Détergents cationiques qui ont un groupement cationique actif.
- Détergents non ioniques qui n'ont pas d'activité antimicrobienne.

Les plus efficaces sont les sels d'ammonium quaternaires. Ils agissent par adsorption au niveau des surfaces cellulaires, détruisant la membrane plasmique et inactivant les enzymes respiratoires. Les détergents ne sont pas biodégradables, leur déversement dans les rivières perturbe fortement l'équilibre écologique de celles-ci.

### 4.3 Autres

#### ✓ Alcools

Ce sont des désinfectants et des antiseptiques largement utilisés comme bactéricides et fongicides. L'éthanol et l'isopropanol sont utilisés en solution (70%). Ils agissent par dénaturation des protéines.

#### ✓ Métaux lourds et leurs sels

Les ions de métaux lourds comme le mercure, l'argent, l'arsenic, le zinc et le cuivre inactivent les enzymes des bactéries et des cellules de l'hôte, ce qui explique leur toxicité.

#### ✓ Phénols

Les composés phénoliques inhibent les systèmes enzymatiques ou découplent les réactions énergétiques. Largement utilisés autrefois en raison de leur efficacité contre les bacilles tuberculeux, ils sont remplacés par des antiseptiques moins irritants.

#### ✓ Aldéhydes

Le formaldéhyde et le glutaraldéhyde détruisent les virus, les bactéries et les champignons par dénaturation des protéines et des acides nucléiques. Ce sont d'excellents désinfectants des surfaces, des instruments et appareils.

#### ✓ Gaz

La stérilisation par les gazs est un procédé de plus en plus courant pour les objets thermosensibles (seringues, boîtes de Pétri...) et les locaux (chambres des malades).Formaldéhyde (vapeur à pouvoir bactéricide pour les locaux, chambres d'hôpitaux...), oxyde d'éthylène pour les tissus, plastiques..., ozone pour la potabilisation de l'eau.

#### ✓ Colorants

Les colorants sont utilisés comme antiseptiques à usage local : vert malachite, vert brillant, violet de méthyle, violet de gentiane, acridine... Ils ont fréquemment une action sélective vis-à-vis des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif.

#### ✓ Conservateurs alimentaires

Un additif antimicrobien doit être bactéricide et doit agir également sur les champignons. Cependant, il doit conserver les caractères organoleptiques de l'aliment. Diverses méthodes sont utilisées depuis l'antiquité: salage, fumage, emploi de l'acide lactique, de l'acide acétique....Autres conservateurs: acide sulfureux, bisulfite de sodium, acide benzoïque, acide salicylique, huiles essentielles....

### 4.4 Spectre d'action des agents antimicrobiens chimiques

Les agents antimicrobiens chimiques doivent être actifs contre une large gamme d'agents infectieux (bactéries, BAAR (bacilles acido-alcool-résistants, champignons et virus), ceci en dilution élevée et en présence de matières organiques. Ainsi, ils doivent avoir un bon pouvoir pénétrant (soluble dans l'eau et les lipides). De plus, les agents chimiques doivent être non

toxiques pour les êtres vivants et non corrosif pour les objets inertes. Ils doivent être stables durant leur conservation.

## 5. Agents chimiothérapeutiques

Les **agents chimiothérapeutiques** sont des agents chimiques d'**origine microbienne ou de synthèse**, utilisés par l'homme pour lutter contre les microorganismes pathogènes: bactérie, champignons, protozoaires et virus, chez l'homme ou l'animal, afin d'inhiber leur croissance ou de les détruire. Leur usage interne est possible, grâce à leur **toxicité sélective**. En effet, ils ciblent le microorganisme sans endommager l'hôte. La chimiothérapie est l'usage des substances chimiques pour le traitement des maladies. Les agents chimiothérapeutiques sont utilisés dans le traitement des maladies infectieuses. Leur **spectre d'activité** peut être **étroit** ou **large**.

### 5.1 Antibiotiques

L'action **bactériostatique** de certains microorganismes envers d'autres avait été observée en 1877 par Louis Pasteur (1822 - 1895) et M. Joubert (à propos du bacille charbonneux), mais ce n'est qu'en 1929 qu'Alexander Fleming (1881 - 1955) constate que la culture en boîte de Petri de staphylocoques est inhibée par la présence de moisissures du genre *Penicillium*. Fleming proposa que le champignon sécrétait une substance chimique bactériostatique, utilisable en thérapeutique humaine. Un peu plus tard, la culture en masse permit de disposer de grandes quantités de cette substance: **la pénicilline**.

En dehors des microorganismes du genre *Penicillium*, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent de nombreux antibiotiques. Les bactéries du genre *Streptomyces* ont pour habitat naturel le sol où ils jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques, grâce à la synthèse de nombreuses enzymes (amylases, chitinases, cellulases, protéases).

Les *Streptomyces* produisent environ deux tiers de tous les antibiotiques connus. L'abondance et la diversité structurale des antibiotiques synthétisés par ces bactéries ne se retrouvent chez aucun autre genre bactérien. Presque toutes les classes d'antibiotiques sont synthétisées: les  **$\beta$ -lactamines** (ampicilline), les **synergistines** (pristinamycine), les antibiotiques **aminoglycosidiques** (streptomycine, kanamycine), les **macrolides** (érythromycine, spiramycine), les **cyclines** (tétracycline) et autres. Cependant, les principaux microorganismes producteurs d'antibiotiques sont des bactéries des genres: *Streptomyces* (Streptomycine, Néomycine, Erythromycine, Kanamycine...), *Bacillus* (Bacitracine, Polymyxines) et des moisissures (*Penicillium* (Pénicillines, Griséofulvine...)). Depuis les années soixante (60), de nombreux antibiotiques sont obtenus par synthèse ou semi-synthèse.

#### 5.1.1 Définition

Les antibiotiques sont des substances chimiques produites par des microorganismes ou par synthèse capables d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres microorganismes.

L'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certains êtres pluricellulaires.

#### 5.1.2 Classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon leur:

- **Origine** qui peut être élaborée par un microorganisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique).
- **Structure chimique** qui est très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a héli-synthèse.



- **Mode d'action** où ils agissent sur la paroi, sur la membrane cytoplasmique, sur la synthèse des protéines ou sur la synthèse des acides nucléiques.
- **Spectre d'activité** qui est la liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).

### 5.1.3 Familles d'antibiotiques (substances antibiotiques)

Il existe de nombreux antibiotiques, qui peuvent être classés en familles selon leurs modes d'action ou leur structure moléculaire :

#### a) Antibiotiques bactéricides

- **Béta-lactamines** (comme la **pénicilline**, **céphalosporine**, **céphamycine**) inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- **Aminosides** (comme la **streptomycine**, **gentamycine**, **tobramycine**, **kanamycine**, **néomycine**) interfèrent avec le ribosome et empêchent la traduction des ARN messagers en protéines.
- **Sulfamides** (sulfadiazine) qui bloquent les voies métaboliques de la synthèse des acides nucléiques.
- **Imidazoles**.
- **Macrolides** (comme l'**érythromycine**) bloquent la sous-unité 50S du ribosome procaryote en inhibant sa translocation ou la peptidyl-transférase.
- **Fosfomycines** inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- **Quinolones** (comme l'**acide nalidixique**, la **norfloxacine**) empêchent la réplication de l'ADN bactérien en bloquant l'ADN gyrase et la topoisomérase II.
- **Glycopeptides** inhibent la formation de la paroi bactérienne en bloquant la synthèse des peptidoglycanes.
- **Polypeptides** (comme la **gramicidine**, la **bacitracine**, **polymyxine**, **vancomycine**) dont le mode d'action est très variables.

#### b) Antibiotiques bactériostatiques

- **Phénicol** (comme le **chloramphénicol**) bloquent la peptidyl-transférase du ribosome bactérien.
- **Tétracyclines** inhibent la fixation des ARN de transfert sur le complexe ribosome-ARN messager, et perturbent la traduction (**tétracycline**, **chlortétracycline**, **oxytétracycline**).

### 5.1.4 Mécanisme d'action

Par définition, le mécanisme d'action des antibiotiques implique une ou plusieurs cibles moléculaires spécifiques :

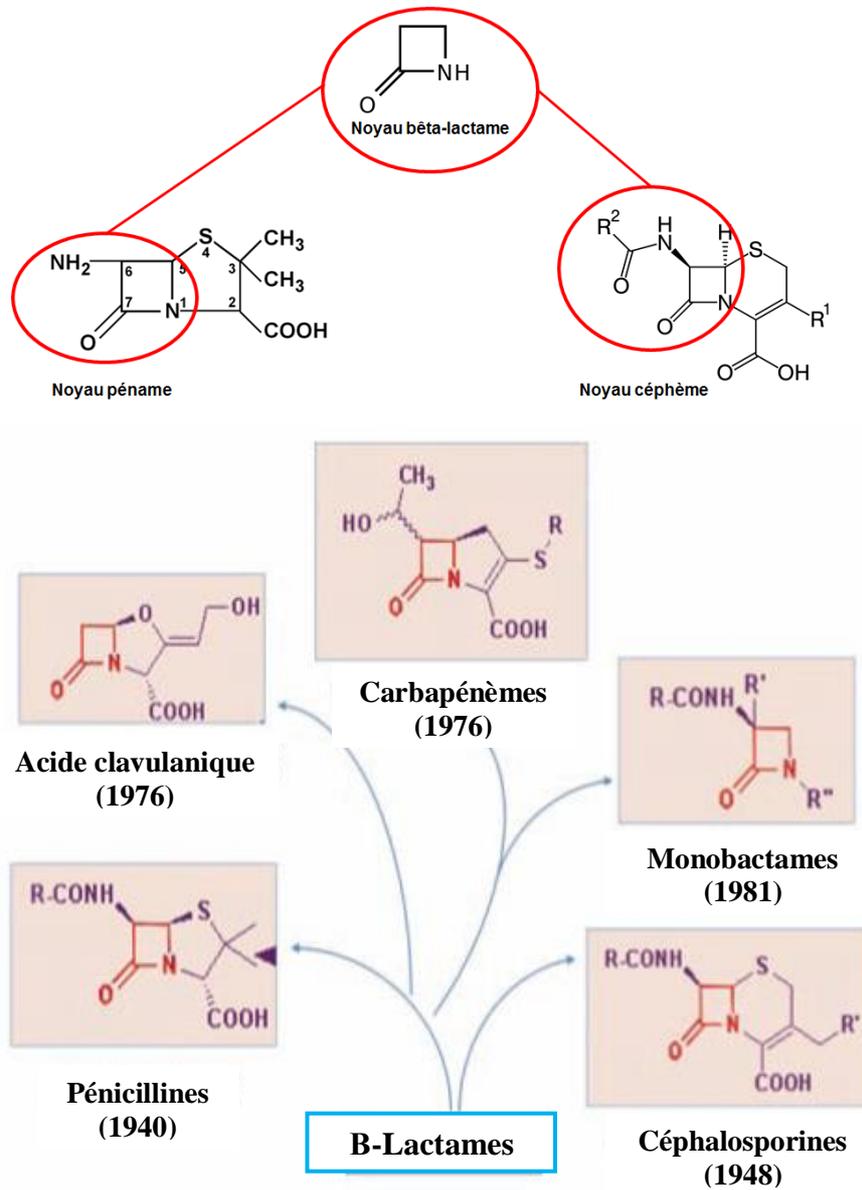
#### a) Paroi bactérienne

Les  **$\beta$ -lactamines**, les **glycopeptides**, le **fosfomycine**, la **cyclosérine**, la **bacitracine** perturbent la biosynthèse du peptidoglycane, induisant la perte et la mort cellulaire par lyse de la cellule bactérienne. L'**isoniazide**, l'**éthambutol** et le **pyrazinamide**, sont trois antituberculeux, agissent également sur des cibles de la paroi de *Mycobacterium tuberculosis* impliquant le métabolisme des acides mycoliques.

#### ➤ $\beta$ -Lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont caractérisées par un cycle  **$\beta$ -lactame** associé à un noyau thiazolidine formant l'acide 6-amino-pénicillinique (**pénicillines**) ou à un noyau dihydrothiazine formant l'acide 7-amino-céphalosporanique (**céphalosporines**). Ces antibiotiques, actifs lorsque les bactéries sont en phase de croissance exponentielle, **inhibent la synthèse de peptidoglycane**, et

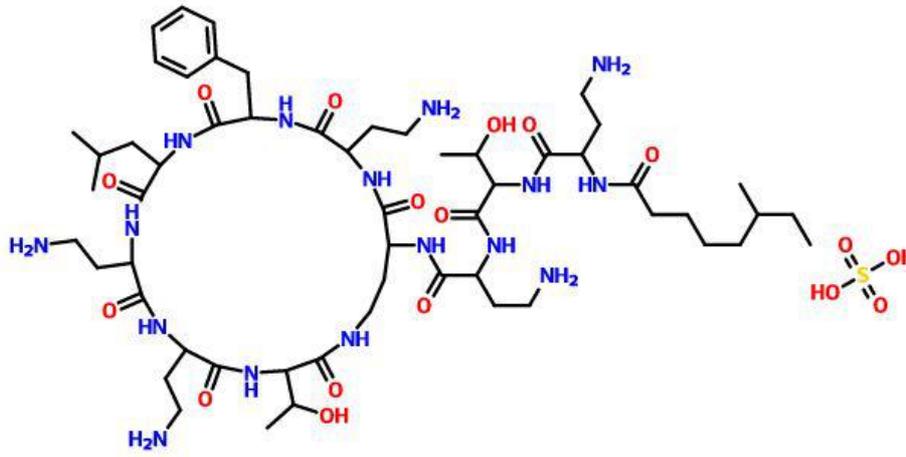
plus particulièrement la réaction de **transpeptidation**. Les  $\beta$ -lactamines se fixent sur des protéines liant la pénicilline (**PLP** ou **PBP**) : ce sont principalement des enzymes (carboxypeptidases) qui interviennent dans l'assemblage du peptidoglycane. Les  $\beta$ -lactamines activent également les **autolysines** bactériennes. Il s'agit d'une famille qui comprend cinq groupes majeurs : les **pénames**, les **pénèmes**, les **oxapénames**, les **céphèmes** et les **monobactames** (Figure 46).



**Figure 46** : Structure chimique des  $\beta$ -lactamines.

## d) Membrane interne

En dénaturant les phospholipides de la membrane interne, les agents **polycationiques** (**polymyxines, bacitracine**) ou **polyéniques** (**nystatine**) provoquent la fuite fatale de composés intracellulaires par rupture de la perméabilité cellulaire (Figure 47).



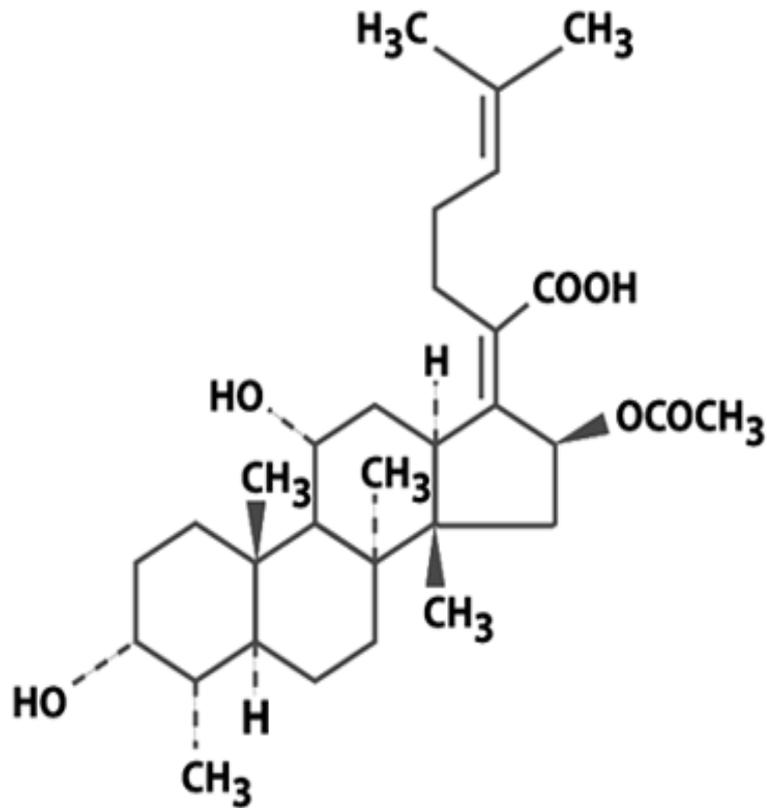
**Polymyxine B sulfate**

**Figure 47:** Structure chimique de la polymyxine B sulfate.

## c) Synthèse protéique

Le ribosome bactérien est la cible supramoléculaire de nombreux antibiotiques, provoquant l'arrêt plus ou moins brutal de la synthèse protéique.

- ✓ L'inhibition des liaisons peptidiques par les **phénicol**s (Chloramphénicol, Thiamphénicol).
- ✓ l'inhibition de l'élongation protéique par les **aminosides** (Streptomycine, Gentamicine...) et les **tétracyclines** (Oxytétracycline, Chlortétracycline...)
- ✓ l'inhibition de la **translocation** par les **macrolides** (Erythromycine, Oléandomycine, Roxithromycine...), et apparentés (**lincosamides, streptogramines ou synergistines, kétolides**), le linézolide et les everninomycines.
- ✓ L'inhibition des étapes post-translocation par l'**acide fusidique** (Figure 48).

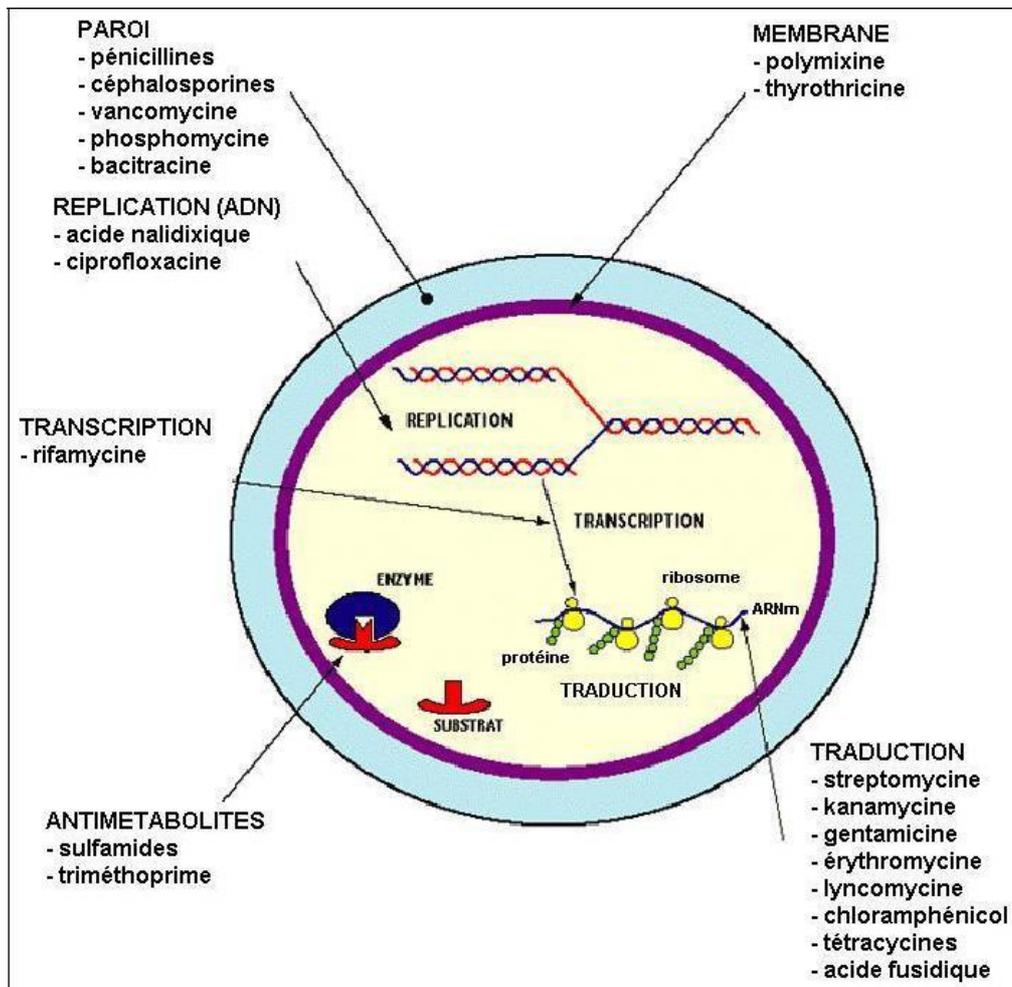
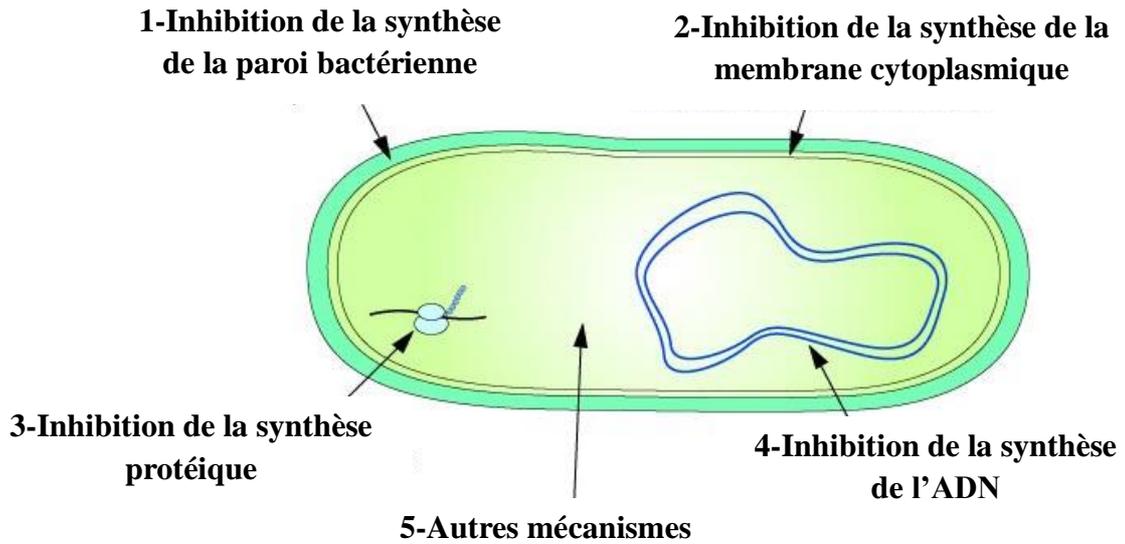


**Figure 48** : Structure chimique de l'acide fusidique.

#### d) Synthèse des acides nucléiques

De nombreuses erreurs dans la synthèse de l'ADN bactérien s'obtiennent par :

- ✓ L'inhibition de l'ARN-polymérase avec les **rifamycines**,
- ✓ L'inhibition de l'ADN-gyrase avec les **fluoroquinolones**,
- ✓ L'inhibition de la synthèse des purines par les **sulfamides** et le **cotrimoxazole**.
- ✓ Les **nitro-imidazolés** et les **nitrofuranes** agissent également sur le génome bactérien selon des mécanismes moins bien connus.



**Figure 49** : Représentation schématique du mécanisme d'action des antibiotiques.

## 5.2 Antifongiques

Les **antifongiques** (ou antifungiques) tirent leur nom du latin *fungus* qui signifie champignons. **Les antifongiques sont aux champignons ce que les antibiotiques sont aux bactéries.** Ce sont donc des agents chimiothérapeutiques **utilisés pour lutter contre les infections locales ou profondes à champignons microscopiques appelées mycoses.** Ces infections sont surtout fréquentes sur la peau, les cheveux, les ongles, les muqueuses et les organes génitaux.

### 5.2.1 Mécanisme d'action

A la différence des antibiotiques qui agissent en différents points des bactéries, les antifongiques agissent principalement au niveau de la membrane cellulaire des champignons. En la perforant, les antifongiques **rompent l'intégrité de la cellule et entraînent leur mort (action fongicide).** Soit en **bloquant la division cellulaire**, arrêtant ainsi la reproduction des champignons (**action fongistatique**).

### 5.2.2 Classification

Les antifongiques sont classés en quatre familles:

#### a) Echinocandines

La **casprofungine** est le premier représentant d'une nouvelle classe d'antifongiques des **échinocandines**. Son utilisation est actuellement limitée au traitement des aspergilloses sévères en cas d'échec ou d'intolérance aux autres antifongiques.

#### b) Amphotéricine B ou Fungizone

Cet antifongique est issu de la culture du champignon *Streptomyces nodosus*. Cette molécule de la famille des **polyènes** est active sur la plupart des **champignons pathogènes**. Elle est utilisée en injectable ou par voie orale pour traiter des **mycoses systémiques profondes** comme aspergillose et candidoses. Globalement, ce médicament est utilisé surtout pour les mycoses profondes.

#### c) Flucytosine

La **flucytosine** est un **antimétabolite** d'utilisation exceptionnelle du fait de l'émergence très rapide de résistances et de ses nombreux effets indésirables (troubles hématologiques, neuropsychiques, hépatiques). Par voie orale ou injectable, cet antifongique est utilisé pour traiter les mycoses profondes dues à des levures (candidoses, cryptococcoses, aspergilloses). Il est le plus souvent utilisée en association avec un autre antifongique (amphotéricine B ou azolés), car les cas de résistance sont nombreux.

#### d) Dérivés azolés

Les **antifongiques azolés** représentent une classe assez hétérogène, tant sur le plan de l'efficacité antifongique et des effets indésirables que sur la plan pharmacocinétique. Ce sont le **kétoconazole**, le **fluconazole**, l'**itraconazole** et le **voriconazole**. Selon les molécules, les dérivés azolés sont utilisés aussi bien dans les mycoses superficielles que profondes. Ainsi, le fluconazole est utilisé dans le traitement des cryptococcoses neuro-méningées et les candidoses systémiques, l'itraconazole dans le traitement l'aspergillose invasive et le voriconazole dans le traitement de première intention des aspergilloses invasives et les infections à mycoses rares.

### 5.3 Antiviraux

Les **agents antiviraux** sont des substances chimiques de synthèse, capable de lutter contre les virus de diverses manières. L'usage d'antiviraux est relativement récent. Durant longtemps, il a semblé peu probable de pouvoir toucher les virus avec des médicaments dans la mesure où ils sont des parasites intracellulaires. Les agents antiviraux se répartissent en **agent virucides** et en **agents virostatiques**. Cependant, il existe diverses substances antivirales qui agissent de différentes manières, elles sont classées selon leurs cibles au cours du cycle de multiplication des virus. Actuellement les antiviraux utilisés en médecine sont tous des **agents virostatiques**.

#### 5.3.1 Mécanisme d'action

Les molécules antivirales peuvent agir au niveau des étapes précoces, au niveau des étapes de réplication du génome (la majorité des molécules) et aussi au niveau des étapes tardives de maturation ou de libération. Cependant, l'action des antiviraux repose sur deux grands principes pharmacologiques :

- Soit l'**immunomodulation** qui module la réponse immunitaire de l'hôte.
- Soit l'**inhibition de la réplication virale** en bloquant une ou plusieurs étapes du cycle de réplication viral.

##### a. Agent Immunomodulateurs

Ce sont des agents antiviraux qui modulent la réponse immunitaire de l'hôte. C'est le cas des **interférons**, qui sont des petites protéines secrétées par l'hôte et qui sont capables d'inhiber la réplication des virus. Ce mécanisme d'action est uniquement utilisé dans la prise en charge des **hépatites virales chroniques**. Les **interférons** sont très utilisés dans le traitement des cancers viraux.

##### b. Agent qui inhibe la réplication du virus dans la cellule hôte

Ce sont pratiquement les médicaments antiviraux susceptibles d'être utilisés en médecine humaine. Ils agissent selon différentes manières:

###### - Inhibition de l'adhésion du virus à la cellule hôte

C'est le cas des **antigrippaux** tels que l'**amantadine** et la **rimantadine**. L'**Amantadine**, une amine cyclique, bloque la liaison entre le virus A de la grippe et la cellule cible.

###### - Les antiviraux inhibant la décapsidation des virus

Dans cette catégorie on trouve l'**Aciclovir** (traitement de l'herpès viral) et l'**AZT** (azidothymidine) qui fait partie des premiers virucides anti-VIH (SIDA).

###### - Inhibition de la réplication virale

Cette inhibition peut être compétitive (blocage du site actif de l'enzyme virale cible grâce à des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques) ou non compétitive (blocage de l'enzyme virale sur un site différent de celui de fixation des nucléotides naturels). Par exemple, en bloquant l'ADN polymérase ARN dépendante du VIH (la transcriptase inverse) par les inhibiteurs nucléosidiques ou non nucléosidiques, il y a alors formation d'un ADN proviral qui ne peut pas s'intégrer au génome cellulaire.

### - Inhibition de l'intégration du génome viral au génome cellulaire

Ce sont les **inhibiteurs de l'intégrase du VIH (Raltégravir, Elvitégravir, Dolutégravir)**. L'intégrase est l'enzyme qui assure l'intégration de l'ADN d'origine virale à l'ADN humain, étape nécessaire à la reproduction du virus.

### - Inhibition de la maturation des particules virales

Les molécules agissent en fin de cycle de réplication virale selon un mécanisme d'action commun. Elles se lient de manière compétitive au site actif de la protéase du VIH-1 et empêchent ainsi le clivage des précurseurs polypeptidiques gags et pol viraux en protéines de structure définitive. Les particules virales nouvellement formées sont alors immatures et non infectieuses.

### - Inhibition de la libération des particules virales

Ce sont les **antiviraux inhibant la Neuraminidase** (enzyme à la surface des virus d'influenza) et bloquent le processus de libération des virus par bourgeonnement de la membrane cellulaire, **Tamiflu** par exemple.

## 6. Résistance aux agents antimicrobiens

L'apparition, depuis moins d'une trentaine d'années, de nombreuses souches bactériennes devenues résistantes aux antibiotiques, a conduit à expliquer une autre forme **d'acquisition de cette résistance**. Cependant, certaines bactéries présentent **naturellement** une résistance (**résistance naturelle**) à certains antibiotiques. Cette résistance est codée sur les gènes du chromosome bactérien. Par contre, il a été découvert qu'une bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques. Soit à la suite de **mutations** au niveau de son chromosome, soit à la suite de l'acquisition de nouveaux gènes venant d'une autre bactérie (**transfert des plasmides**). La **résistance acquise** suite à des mutations est un phénomène qui se développe lentement, alors que celle résultant de l'acquisition de nouveaux gènes se produit plus rapidement et est donc un phénomène plus répandu. A l'heure actuelle, la plupart des antibiotiques font l'objet du développement d'une résistance.

Certaines bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*) ont développé une **multirésistance** à toutes sortes d'antibiotiques. Cette **multi-résistance** pose de sérieux problèmes, en particulier, dans le domaine de la prévention des maladies. En effet, deux raisons peuvent expliquer le phénomène de multi-résistance acquise: l'utilisation abusive d'antibiotiques en médecine, même lorsque une infection bactérienne n'est pas avérée. D'autre part, l'utilisation d'antibiotiques plus ou moins systémique dans l'alimentation animale. C'est le cas de la présence de *Salmonella sp*, *Shigella sp* et *E.coli* ETEC, multi-résistantes, de plus en plus fréquentes dans le tube digestif des bovins et des volailles. Ainsi, la multi-résistance aux antibiotiques développée par *Staphylococcus aureus* (et maintenant par *Clostridium difficile*) dans les services hospitaliers conduit à une fréquence accrue d'apparition d'infections récidivantes.