

BACTÉRIES
ET
ENVIRONNEMENT
ADAPTATIONS PHYSIOLOGIQUES

Jean PELMONT

Presses Universitaires de Grenoble – 1993

La Collection Grenoble Sciences

La Collection Grenoble Sciences fut créée à l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1 - avec un triple objectif :

- permettre d'offrir aux étudiants et usagers des ouvrages à des prix convenables,
- constituer une mémoire pour d'excellents documents qui restent souvent chez leurs auteurs,
- réaliser des ouvrages correspondant vraiment à un objectif clair, en contrepoint des ouvrages réalisés par rapport à tel ou tel programme plus ou moins officiel.

Les documents sont, pour la plupart, publiés dans le seul cadre de l'Université Joseph Fourier. Ceux qui sont destinés à un plus vaste public sont sélectionnés, critiqués par un comité de lecture et édités dans cette collection spécifique des Presses Universitaires de Grenoble.

Directeur de la Collection Grenoble Sciences

Jean BORNAREL, Professeur à l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1

Comité de lecture de Bactéries et Environnement

Jean GUILLAUME, Directeur honoraire de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Lille
Paulette VIGNAIS, Directeur de recherche au Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble

Déjà parus :

L'ergomotricité. Corps, travail et santé - M. Gendrier
Chimie. Le minimum vital - J. Le Coarer
Enzymes - J. Pelmont
Mathématiques pour les sciences de la nature et de la vie - F. et J.P. Bertrandias
Endocrinologie. Fondements physiologiques - S. Idelman
Minimum Competence in Scientific English - J. Upjohn, S. Blattes et V. Jans
Analyse numérique et équations différentielles - J.P. Demailly
Introduction à la mécanique statistique - E. Belorizky et W. Gorecki
Exercices corrigés d'analyse (tomes 1 et 2) - D. Alibert

A paraître :

La plongée sous-marine à l'air. L'adaptation de l'organisme et ses limites - P. Foster
Electrochimie des solides - C. Déportes *et al.*
La symétrie en mathématiques, physique et chimie - J. Sivardière

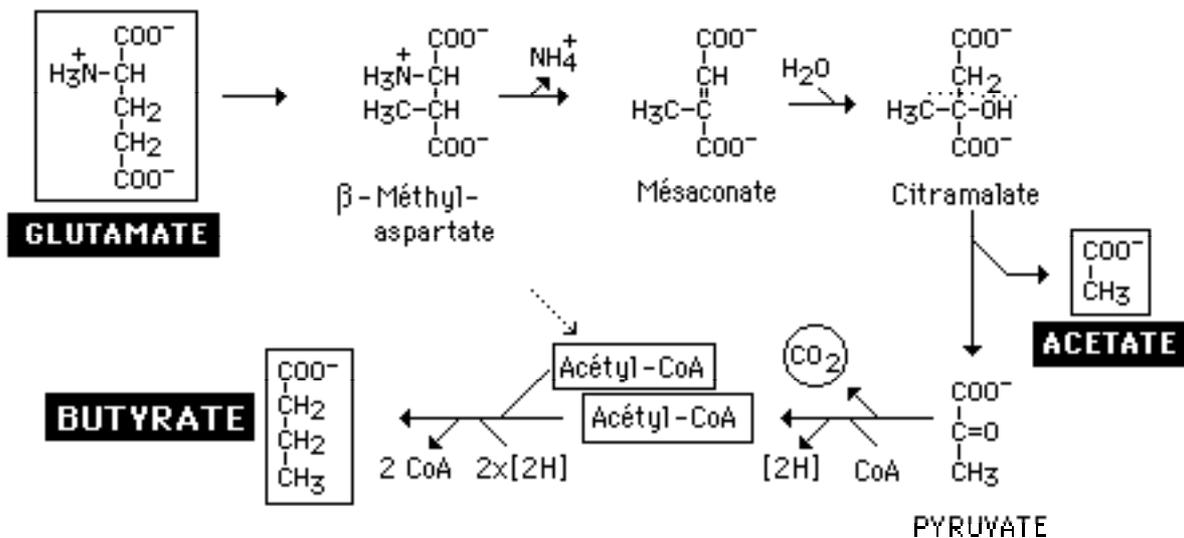
EXTRAITS

FERMENTATIONS TOUS AZIMUTS

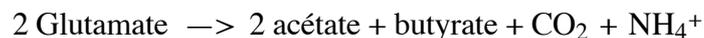
La palme d'or des fermentations revient à coup sûr aux clostridies. A voir le nombre de composés fermentés par ces organismes on se dit que l'imagination de la nature dans ce domaine est presque sans limite. Il faut garder à l'esprit que cette énorme "cuisine" chimique, strictement anaérobie, joue nécessairement un rôle immense dans l'environnement et participe au recyclage d'une partie de la matière carbonée qui se dépose dans le sol et dans les sédiments. C'est une mine possible de biotechnologies, et les possibilités sont probablement loin d'avoir été toutes répertoriées.

La fermentation d'un acide aminé est assez commune. Voici un exemple portant sur le glutamate, le substrat préféré de *Clostridium tetanomorphum*. Cette question a une importance historique car elle a permis la découverte de la première enzyme à corrinoïde, la glutamate mutase¹. Nous avons déjà rencontré une enzyme à corrinoïde dans le cas de la fermentation propionique et nous savons qu'il s'agit d'un cofacteur apparenté à la vitamine B12. Le produit de la glutamate mutase est le 2-méthyl-aspartate, qui est transformé en mésaconate puis en citramalate comme indiqué par ce plan :

Fermentation du glutamate en butyrate



La conversion est donc :



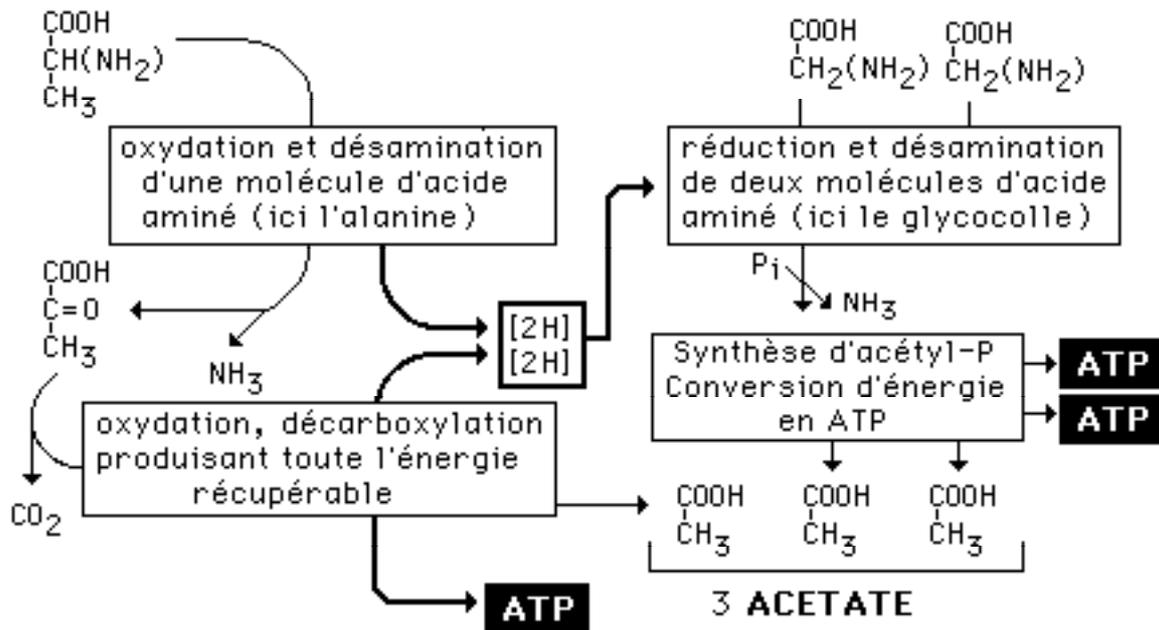
Ce mode de fermentation du glutamate n'est pas général. *Peptococcus aerogenes* donne les mêmes produits par une voie entièrement différente. Il existe une grande variété de modes portant sur les divers aminoacides, mais le procédé le plus curieux est sans doute celui de la réaction de **Stickland**². La fermentation porte sur une paire d'acides aminés, dont l'un est oxydé, alors que l'autre est réduit. On la trouve chez divers *Clostridium* : *C. sporogenes*, *C. sticklandii*, *C. histolyticum*, *C. botulinum*. Le diagramme suivant est établi à l'aide de l'alanine et du glycolle.

¹ H.A. Barker (1972) dans The Enzymes vol.6 (P.D. Boyer ed.) Academic Press, N.Y. 509-537.

² Découverte par Stickland en 1934.

Observez la synthèse d'ATP en rapport avec cette oxydo-réduction :

Réaction de Stickland (Clostridium)



L'étape la plus compliquée est la réduction de l'acide aminé accepteur. Dans le cas du glycolle (ou glycine) le système enzymatique est lié à la membrane et comporte une protéine renfermant du sélénium associé à deux autres facteurs. Quels sont les acides aminés donneurs et accepteurs ? Ce petit tableau en donne une idée :

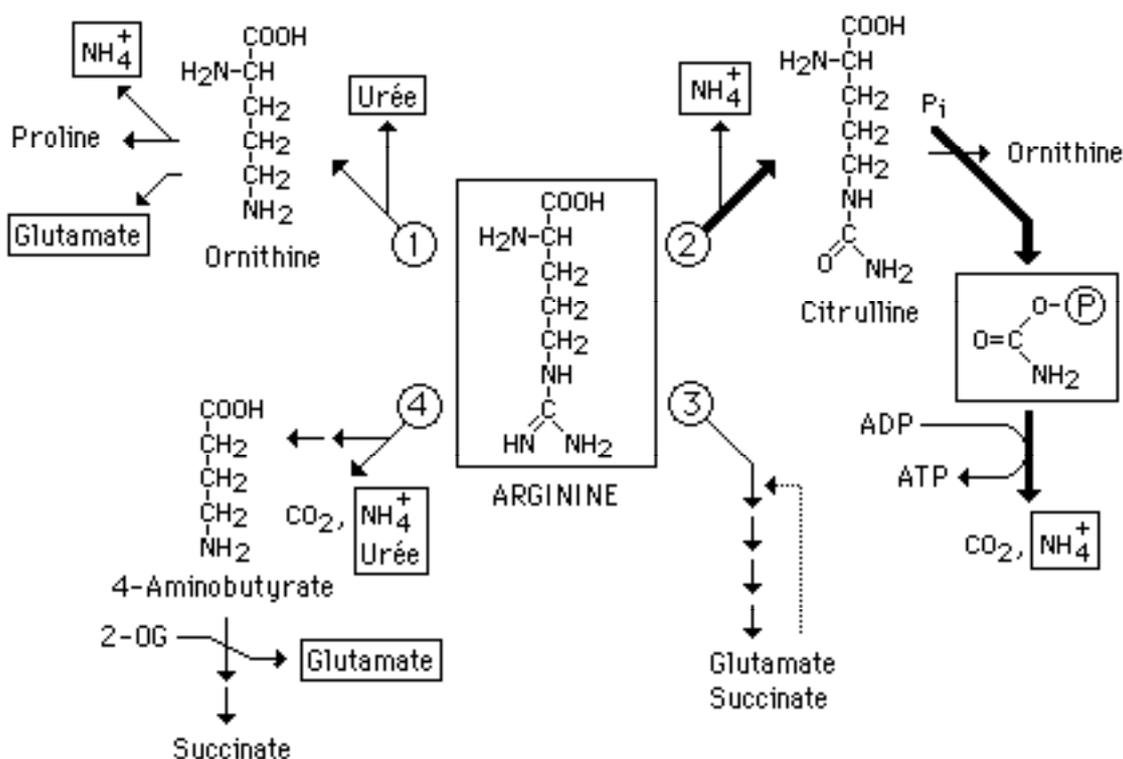
Acides aminés donneurs	Acides aminés accepteurs
Alanine	Arginine
Histidine	Glycolle
Isoleucine	Histidine
Leucine	Hydroxyproline
Valine	Ornithine
	Tryptophane

Il n'y a pas de cloison étanche entre le catabolisme des acides aminés et les réactions fermentatives. L'utilisation des acides aminés comme source de carbone et d'azote s'opère simultanément avec des réactions fermentatives productrices d'ATP. Le métabolisme de l'**arginine** en est l'illustration. Les procaryotes utilisent des voies variées pour dégrader cet acide aminé qui fonctionne comme une excellente source d'azote organique dans les milieux riches en matières organiques. La figure suivante a pour but d'en donner une idée succincte en citant quatre modes différents par lesquels l'arginine est dégradée :

- 1 - Voie de l'arginase
- 2 - Voie de l'arginine désiminase
- 3 - Cycle de la succinylarginine
- 4 - Voie des décarboxylases et oxydases

Les voies n° 1, 3 et 4 ne sont pas à proprement parler des voies de fermentation. La voie n° 1 dite de l'**arginase** est la plus connue chez les êtres vivants et fonctionne un peu partout dans le monde microbien. Les voies n° 3 et 4 sont plus inégalement réparties. Le cycle de la succinyl-

arginine est une voie particulière de l'entrée de l'azote organique¹. Décarboxylases et oxydases sont communes (*Escherichia coli*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, cyanobactéries, *Pseudomonas putida*, etc.). La littérature concernée est assez compliquée (une quarantaine d'enzymes au moins sont employées par le monde bactérien pour le seul catabolisme de l'arginine ! L'article de Cunin et coll. (cité p. 350) est une excellente documentation de base sur ce sujet.



Nous devons attirer l'attention ici sur la voie n° 2, dite de l'**arginine désiminase**, soulignée par des flèches épaissies. Cette enzyme transforme l'arginine en citrulline avec libération d'ammonium. L'étape suivante est catalysée par l'ornithine transcarbamylyase. La dernière étape est la plus originale puisqu'elle libère CO₂ et NH₄⁺ (bicarbonate d'ammonium) en produisant de l'ATP. L'arginine est donc propice comme substrat de croissance là où elle est abondante, en fournissant à la fois carbone, azote et énergie ! Que devient l'**ornithine** ? Le tableau suggère qu'elle est facilement récupérée comme source de composés carbonés facilement assimilables : glutamate, succinate, etc. En fait l'ornithine comme produit de fermentation de l'arginine apparaît en grand excès par rapport aux besoins carbonés et azotés des bactéries qui l'excrètent dans le milieu. C'est sans doute la raison pour laquelle *Pseudomonas aeruginosa*, qui utilise ce système en anaérobiose (en absence de nitrate) possède un **antiporteur arginine/ornithine** : une molécule d'ornithine qui sort pour chaque molécule d'arginine qui entre. La fermentation de l'arginine par désimination est assez répandue chez les bactéries : bactéries lactiques, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Treponema*, cyanobactéries². Certaines espèces utilisent l'arginine comme seule source d'énergie ; c'est le cas notamment de *Streptococcus faecalis*³. Des mécanismes régulateurs permettent éventuellement aux bactéries de changer de voie de dégradation en fonction des conditions. Exemple : *Aeromonas formicans*. Cette espèce

¹ Nous le retrouverons dans un chapitre consacré au métabolisme azoté.

² K. Broman & coll. (1978) J. Bacteriol. 134, 920-927 ; P.S. Weathers & coll. 1978) Arch. Microbiol. 118, 1-6 ; R.P. Blackmore & E. Canale-Parola (1976) J. Bacteriol. 128, 616-622 ; V. Stalon & A. Mercenier (1984 J. Gen. Microbiol. 130, 69-76.

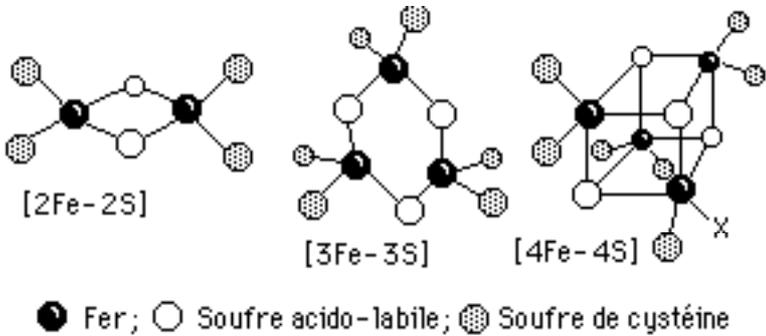
³ J.P. Simon & coll. (1982) J. Bacteriol. 150, 1085-1090.

n'utilise la fermentation de l'arginine qu'en anaérobiose. Le passage à l'aérobiose provoque la mise en veilleuse de ce dispositif et l'arginine est alors métabolisée par le cycle de la succinylarginine (voie n°3). Un compte-rendu très détaillé sur le métabolisme de l'arginine a été publié il y a quelques années par Cunin et coll.¹.

DOXINES, DOXINES

Ferrédoxines, flavodoxines : des petites protéines solubles au service des fermentations. Nous les retrouverons dans des transports d'électrons variés : acétogénèse, photosynthèse ... Leur domaine de prédilection est l'échange d'électrons entre protéines opérant à bas potentiel, et les organismes anaérobies en font donc automatiquement un grand usage. Cette section sera un court survol biochimique sur ces petites protéines. Les fermentations sont loin d'avoir l'exclusivité de leur emploi, mais sont un bon prétexte pour tenter d'en avoir un aperçu général.

D'abord les **ferrédoxines**. Leur masse moléculaire est de l'ordre de 6 à 15 kDa, rarement plus. Elles contiennent du fer et du soufre comme seuls éléments prosthétiques, disposés dans un ou deux "centres fer-soufre". La plupart ont un potentiel d'oxydo-réduction très bas et assez proche de celui de l'hydrogène². Sous forme réduite ce sont donc des réducteurs efficaces qu'on trouve un peu partout dans les cas difficiles : réduction de N₂, CO₂, etc. Le principe est à peu près toujours le même. L'importance des ferrédoxines dans la biosphère est telle qu'il convient d'en résumer les caractères essentiels³ :

Fonction:	Transferts d'électrons, généralement entre protéines
Éléments caractéristiques:	Fer non hémunique et soufre acido-labile en égales proportions
Masse moléculaire:	Couramment entre 6 et 15 kDa
Composition:	Prépondérance des acides aminés acides sur les basiques.
Potentiel:	Généralement bas, inférieur à -350 mV
Spectre:	Modification caractéristique de spectre d'absorption par réduction
Signal RPE:	Signal caractéristique, dépend du type de centre Fe / S.
Centres:	<p>Trois types de centre</p>  <p>● Fer ; ○ Soufre acido-labile ; ⊞ Soufre de cystéine</p>

¹ R. Cunin & coll. (1986) Microbiol. Reviews 50, 314-352.

² soit - 430 mV à pH 7, donc plus bas que le potentiel standard du NAD⁺/NADH (- 320 mV).

³ M. Bruschi & F. Guerlesquin (1988) FEMS Microbiol. Reviews 54, 155-176 ; H. Beinert (1990) FASEB J. 4, 2483-2491

enzymatique au cours du temps. Ses propriétés enzymatiques du moment sont fluctuantes en fonction de son histoire récente, les cellules conservant quelque temps une "mémoire" des conditions antérieures. Certaines adaptations sont rapides (quelques minutes), d'autres se déclarent après un temps assez long, par exemple après une durée suffisante pour que les cellules aient eu le temps de se diviser une ou plusieurs fois. Cette constatation n'est pas sans répercussion dans la pratique. L'identification précise des germes met à contribution des tests métaboliques standards, tels que le pouvoir de se développer sur certains sucres, ou de présenter une activité enzymatique typique (uréase, glucosidase, phosphatase alcaline, etc.). La plupart des tests biologiques sont conçus pour que les germes soient placés dans des conditions où leurs potentialités ont le temps de se révéler correctement. D'autres tests, en particulier ceux qui sont basés sur l'intensité d'une propriété enzymatique, peuvent s'avérer sensibles à l'historique récente des cellules soumises à la détermination. Par exemple vous n'obtiendrez pas du tout les mêmes résultats si vos bactéries ont été cultivées sur un milieu riche contenant peptones et extrait de levure, ou si elles se sont multipliées sur un milieu synthétique du genre de celui qui a été décrit plus haut. D'où l'obtention fréquente de résultats ambigus qui ne peuvent être utilisés qu'avec vigilance.

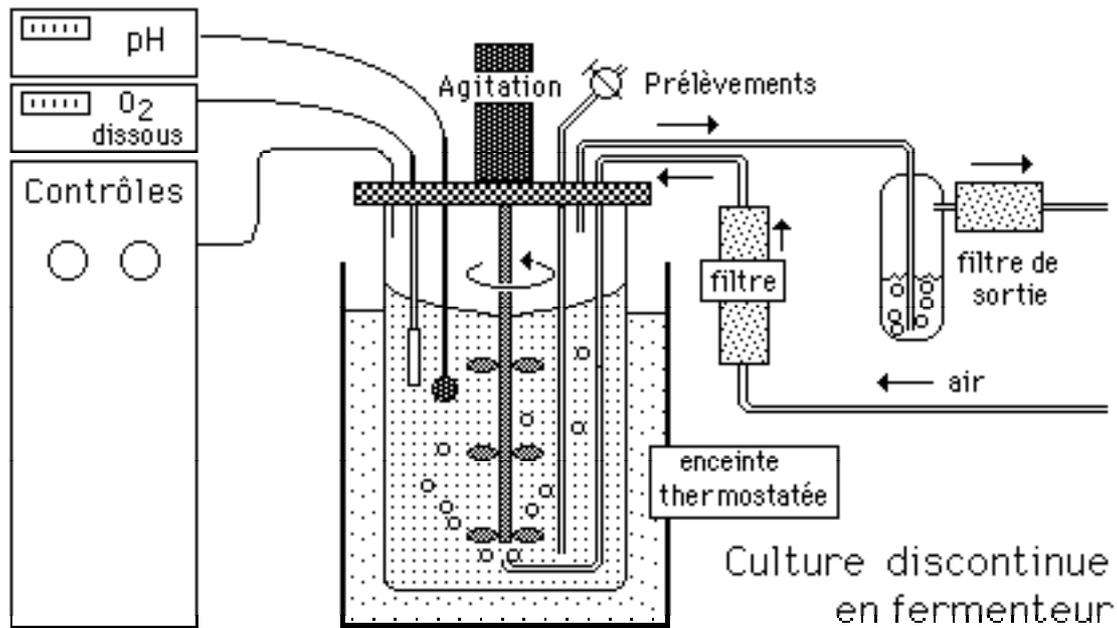
CROISSANCE EN DISCONTINU

Tout le monde sait que le moyen le plus simple de faire une culture bactérienne est d'ensemencer un certain volume de milieu, de l'incuber dans les conditions choisies (température, agitation, etc.) et de laisser la population s'accroître jusqu'au niveau désiré. C'est le principe des cultures en discontinu ou en lot (cultures en "batch"). Les germes sont récupérés par centrifugation, par floculation, ou mieux par un procédé de plus en plus utilisé : la **filtration tangentielle**¹.

De la simple fiole agitée aux matériels les plus sophistiqués il y a tous les intermédiaires en fonction du nombre de paramètres contrôlés et corrigés automatiquement : pH et addition d'acide ou de base, concentration de l'oxygène dissous et débit d'aération, vitesse d'agitation, température, addition d'anti-mousse, etc. Notre but est de nous cantonner aux principes généraux qui régissent les cultures microbiennes, non pas les détails des réalisations techniques. Nous supposons provisoirement que nous effectuons des cultures de germes aérobies.

Comment mesurer la concentration bactérienne dans la culture ? Il existe plusieurs méthodes pour compter les bactéries dans un milieu. On ne les décrira pas en détail. Au laboratoire le plus pratique (et expéditif) est de faire des mesures de turbidimétrie, c'est-à-dire de **densité optique**. On choisit en général une longueur d'onde dans le visible, soit 600 nm. La densité optique de la solution croît linéairement avec le nombre de bactéries.

¹ Dans une filtration ordinaire sur une membrane ad hoc, la collecte d'une culture n'est généralement pas possible car le filtre se colmate aussitôt. Dans la filtration tangentielle, on injecte la suspension parallèlement à la membrane, de façon à laisser percoler le liquide sans colmatage du filtre car les bactéries sont entraînées par le courant. Pour avoir une concentration efficace de la suspension bactérienne, on augmente la surface de filtre en utilisant des cassettes spéciales constituées de nombreuses membranes superposées ; la suspension en cours de concentration est recyclée en continu à travers la cassette et s'épaissit, au fur et à mesure que le filtrat s'élimine. Bien réglée, une filtration tangentielle peut concentrer une culture de 15 litres à un volume de 200-500 ml en moins de 50 minutes. L'opération se termine par une centrifugation sur un petit volume.



Cette méthode n'est utilisable que dans des cas favorables, heureusement très courants :

- 1 La suspension doit être suffisamment diluée de telle façon que la densité optique n'excède pas une valeur de l'ordre de 1 (donc quand la lumière transmise est supérieure à 10% de la lumière incidente).
- 2 Les bactéries doivent être libres en solution et ne pas former d'agréats importants. Nous réalisons du même coup qu'une suspension très hétérogène, ou contenant des cellules filamenteuses (actinomycètes) rendra la méthode inapplicable avec précision¹.

Le comptage de cellules homogènes en suspension peut se faire électroniquement avec un compteur de particules appelé **compteur de Coulter**. Une évaluation précise de la biomasse s'effectue après lyophilisation d'une quantité connue de la suspension et pesée précise du résidu. Un étalonnage séparé permet de relier la densité optique au nombre réel de bactéries. Exemple : pour *Escherichia coli*, la densité optique de 8×10^8 cellules par ml est sensiblement égale à 1, ce qui correspond en poids sec à 0,25 mg de biomasse par ml.

Ensemençons maintenant notre fermenteur et suivons la croissance au cours du temps : On appellera **B** le poids de la biomasse en matière sèche, **t** le temps en heures. **B₀** représente la biomasse au temps $t = 0$ et μ est une constante.

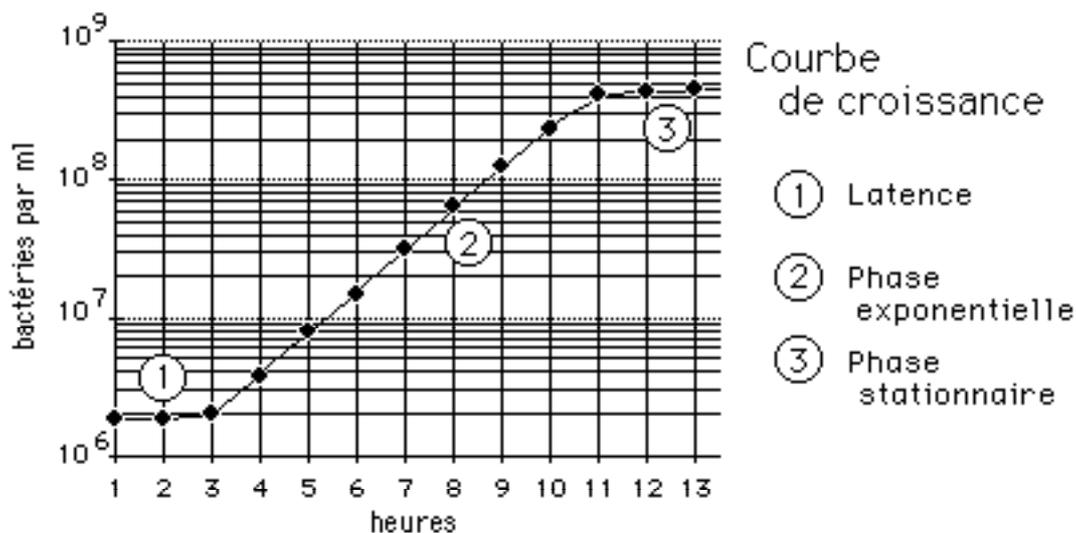
$$\frac{dB}{dt} = \mu \cdot B \quad \text{ou} \quad \frac{dB}{B} = \mu \cdot dt \quad \text{ou encore} \quad \text{Log} \frac{B}{B_0} = \mu \cdot t$$

μ est une constante du premier ordre qu'on appelle **taux de croissance instantané**. Si l'unité de temps est l'heure, μ a la dimension de l'inverse d'un temps et on le mesure en heures⁻¹. Les microbiologistes utilisent souvent l'inverse de μ , qu'on note τ . La grandeur qu'on utilise le plus communément est le **temps de génération** T_D . C'est le temps nécessaire pour le doublement de la biomasse, c'est-à-dire pour $B/B_0 = 2$. Il est donné par :

$$T_D = \frac{1}{\mu} \cdot \text{Log} 2 \quad \text{ou} \quad T_D = \frac{0,69}{\mu}$$

¹ Le problème serait évidemment encore pire avec des cellules dont une partie seraient fixées sur les parois du fermenteur ou d'autres supports.

Voici le résultat d'une culture imaginaire où les bactéries se seraient divisées toutes les heures au cours de leur phase de croissance .



Le temps de génération peut s'abaisser à 20 minutes pour *Escherichia coli* en milieu riche à 37° sous aération vigoureuse. Le record absolu semble appartenir à une bactérie marine : 12 minutes environ. Il est de 30 à 40 minutes pour des *Pseudomonas* sur des milieux variés, 100 minutes pour un *Lactobacillus* ..., et peut même se compter en jours ou en mois. Bien souvent la croissance ne se maintient à un taux régulier que pendant quelques divisions, et la croissance exponentielle peut n'avoir qu'une existence théorique¹.

Calculons pour amusement le temps qu'il faudrait à un seul colibacille (5×10^{-13} g) se divisant en moyenne toutes les demi-heures (une vitesse très raisonnable) pour avoir une descendance de 1 kg de bactéries. La masse bactérienne doit s'accroître d'un facteur de multiplication de $K = 2 \times 10^{15}$. Le nombre n des divisions nécessaires est donné par $\log K = n \log 2$, ce qui donne $n = 50$ environ. Un rythme d'enfer : le résultat serait obtenu en 25 heures, donc du jour au lendemain. Une situation toute théorique. En effet la phase de croissance est précédée d'une latence, en général d'autant plus longue que le milieu neuf a étéensemencé avec une population bactérienne plus faible. En démarrant une culture avec une seule bactérie on risquerait de provoquer un grand allongement du temps de latence à plusieurs heures, voire à plusieurs jours. L'origine du phénomène n'est pas toujours facile à expliquer. Tout se passe comme si les cellules avaient besoin de s'habituer à leur nouvel espace. Cette adaptation est plus rapide dans une population nombreuse, peut-être par l'échange de certains facteurs entre les cellules. Aussi l'ensemencement d'une culture de grand volume est-il habituellement réalisé par une suspension bactérienne obtenue à partir d'une culture de petit volume, dite culture de démarrage ou **culture "starter"**.

La phase de croissance est suivie d'un plateau ou **phase stationnaire**. Ce changement est introduit par la raréfaction de certains substrats et d'une compétition cellulaire accrue, notamment si l'oxygène devient limitant. L'entrée en phase stationnaire est aussi provoquée par des signaux régulateurs mal connus liés au surpeuplement. On pense parfois qu'elle correspond à un arrêt total des divisions. C'est une erreur, au moins au début de la phase stationnaire. Les cellules continuent à se diviser plus lentement, mais la dégénérescence d'une partie de la population

¹ Dans des cas particuliers la croissance exponentielle n'existe pas, et se voit remplacée par une phase de croissance linéaire (le nombre de bactéries augmente linéairement en fonction du temps) ou selon une autre cinétique.

compense toute augmentation du nombre des cellules. La lyse bactérienne libère dans le milieu des matières organiques réutilisées par les cellules saines. Les conséquences physiologiques sont éventuellement importantes. Ce "cannibalisme" modifie la nutrition des bactéries et change le taux de synthèse de diverses enzymes. Les bactéries en phase stationnaire n'ont donc plus tout à fait les mêmes propriétés que les cellules en multiplication rapide, et ce phénomène est bien connu des expérimentateurs qui sont amenés à préciser les conditions dans lesquelles les bactéries ont été collectées. Nous retrouverons certains caractères physiologiques liés à la phase stationnaire à la fin du Chapitre 26.

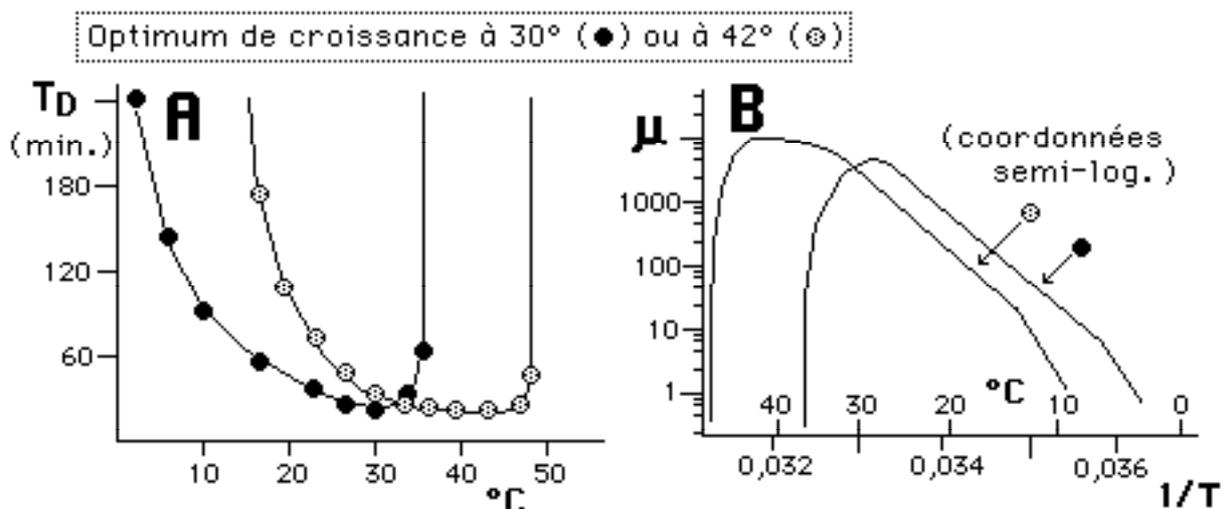
Revenons à la phase exponentielle de croissance. La constante μ dépend entre autres de la température, du pH et de la composition du milieu. En ce qui concerne la température, on emploie les termes de **psychrophiles** (ne se divisant pas au delà de 25 à 30°), de **mésophiles** (l'optimum est compris entre 25 et 40°), les **thermophiles** (dont l'optimum est généralement supérieur à 50°). Les thermophiles extrêmes se développent à des températures de l'ordre de 80° et plus. Cette terminologie reste approximative (comme le sont il faut bien le dire de nombreux critères de la microbiologie descriptive traditionnelle) : il n'y a pas de limite tranchée entre ces catégories.

Les deux graphiques ci-dessous donnent une idée de ce qu'on observe généralement comme effet de la température :

A sur le temps de génération ;

B sur la constante μ .

On a supposé que l'expérience a porté sur deux espèces différentes n'ayant pas le même optimum de température. A gauche on voit que le temps de génération passe clairement par un minimum, qui correspond à la plage de températures préférée par l'espèce considérée. A droite on a considéré μ comme une constante de vitesse réactionnelle du premier ordre¹, et le graphique correspond au **graphique d'Arrhenius** : le logarithme de μ est porté en fonction de l'inverse de la température absolue (en degrés Kelvin). Le graphique d'Arrhenius d'une vitesse réactionnelle donne habituellement une droite. Ici $\log \mu$ ne donne une droite que dans une zone limitée de température. On observe en particulier qu'en dépassant une température limite, on inhibe assez brusquement la croissance.



¹ Avec comme dimension, rappelons-le, l'inverse d'un temps.

On tire de ces courbes l'impression que l'effet de la température est beaucoup plus abrupt du côté de l'élévation de température que du refroidissement. Ceci peut donc avoir des répercussions écologiques sur la flore des sols et des eaux : c'est ce qui vous explique en particulier les effets sur la microflore que peut avoir une augmentation relativement faible de la température du milieu ambiant¹. Néanmoins ce phénomène concerne la croissance, et non pas la résistance du germe à la température. Une bactérie peut survivre éventuellement pendant très longtemps à des températures situées largement en dehors de la gamme où elle peut se développer normalement. Le cas extrême est évidemment représenté par les **spores**.

Enfin le taux de croissance μ dépend de la concentration des substrats utilisés pour la croissance. Si l'un des composés nécessaires à la nutrition des bactéries se trouve en apport limitant, sa concentration règle la vitesse des synthèses cellulaires et le rythme des divisions. Soit S la concentration d'un tel substrat. La valeur de μ est donnée en fonction de S , de sa valeur maximale, μ_{\max} , et d'une constante K_s :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{I}) \quad \mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} - K_2 \quad (\text{II})$$

La relation (I) est connue sous le nom de **loi de Monod**. Elle n'est pas sans rappeler la loi de Michaelis sur la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration d'un substrat limitant. La constante K_s (constante de Monod) a la dimension d'une concentration : elle correspond à la valeur pour laquelle le taux de croissance μ est égal à la moitié de μ_{\max} . C'est le modèle le plus simple, souvent valable en première approximation. D'autres formulations telles que complètent cette expression en ajoutant divers termes correctifs. Dans la formule (II) dite **loi de Herbert**, le terme K_2 tient compte de la dégénérescence d'une partie des cellules, des effets toxiques de substances du milieu et autres paramètres secondaires. D'autres formulations ont été proposées pour tenir compte de cas particuliers. Voici par exemple la formule de Yang et Okos² adaptée à la méthanogénèse sur acétate avec *Methanosarcina mazei* : le substrat devient inhibiteur à forte concentration :

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

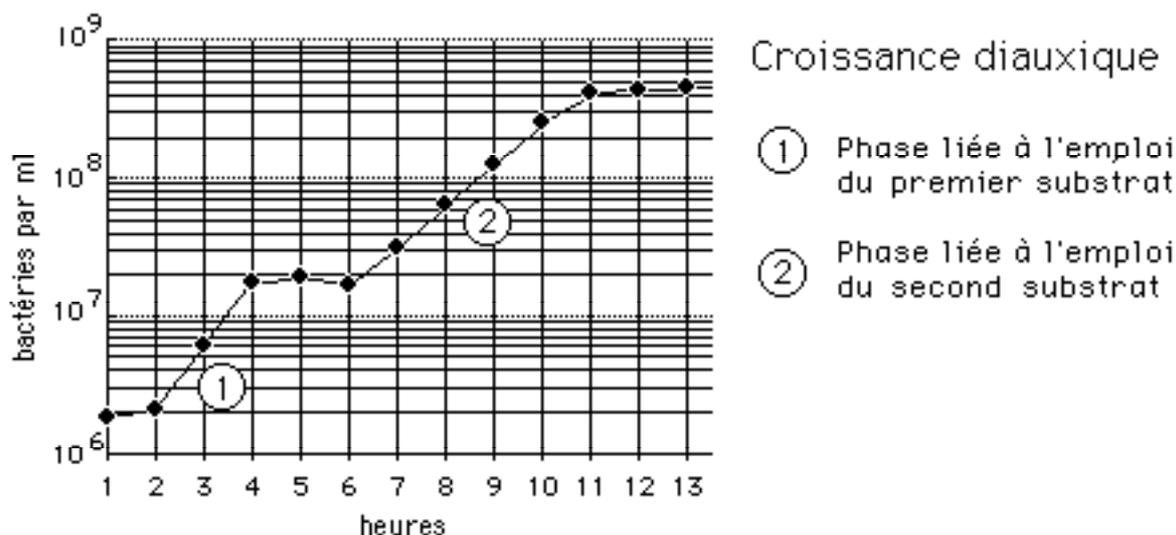
Tous les modèles proposés dans la littérature conservent une valeur plus ou moins empirique destinée à représenter au mieux le comportement réel du système. Nous utiliserons la formule de Monod dans la section consacrée plus loin aux cultures continues.

Que se passe-t-il lorsque le milieu de culture contient deux substrats de croissance différents ? Sont-ils utilisés simultanément ? L'expérience montre que dans certains cas il n'en est rien

Supposons que le milieu contienne un substrat de croissance facilement assimilable, comme le glucose, et un deuxième substrat a priori nettement moins savoureux, par exemple le phénol dont il a été question plus haut. Dans ce genre de situation s'observe fréquemment une courbe de croissance en deux temps, comme indiqué ci-dessous. Cette forme de croissance, appelée **diauxique**, correspond à l'utilisation successive, et non pas simultanée, des deux sources de carbone : ici le glucose d'abord, puis le phénol. Tout se passe comme si les germes mangeaient leur tartine de confiture en commençant par lécher la confiture, sucrée et appétissante, se réservant la tranche de pain pour plus tard !

¹ Par exemple dans le cas des rejets d'eau chaude venant des tours de refroidissement des centrales thermiques.

² S.T. Yang & M.R. Okos (1987) *Biotechnol. Bioeng.* 30, 661-667. Ici $\mu_m = 0,029 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 17 \text{ mM}$, $K_i = 0,81 \text{ M}$.



Ce phénomène ou **diauxie** est très fréquent, mais n'est pas général. Il correspond au fait que les enzymes nécessaires à la consommation de la deuxième source carbonée sont inductibles, mais que leur induction n'est possible que lorsque la première source est épuisée. L'exemple à l'origine le plus classique vient des observations faites par Monod en 1941 sur la croissance de *Escherichia coli* dans un milieu contenant à la fois du glucose et du lactose. Ce dernier est scindé en glucose + galactose par l'enzyme β -galactosidase, dont la synthèse est induite en présence de lactose ou de divers β -galactosides. Or l'induction de cette enzyme est inhibée par la présence d'un excès de glucose ; son processus n'est entamé que lorsque celui-ci se fait rare, et la croissance ne peut reprendre que lorsque le lactose est hydrolysé à un rythme suffisant. Cet effet s'explique fort simplement par l'effet glucose, dont nous avons étudié les effets antérieurement. Nous savons que la cause responsable de l'inhibition exercée sur l'induction est la diminution du taux d'AMP cyclique intracellulaire, consécutif à une inhibition de l'adényl cyclase.

Le glucose n'est pas toujours la source préférée dégradée au cours de la première phase de croissance. Par exemple *Azotobacter vinelandii* cultivé sur un mélange d'acétate et de glucose commence par l'acétate¹. Sans compter l'existence de bactéries qui ont décidé de ne pas se développer du tout sur glucose. Des *Pseudomonas* et *Alcaligenes eutrophus* sont dans ce cas.

La croissance diauxique est courante dans la nature et joue un grand rôle sur le plan de la compétition vitale. Ici la souche potentiellement capable de dégrader le phénol place ses pions en se dépêchant de profiter de la source carbonée qu'attaquent aussi les concurrents ("ah ! mais c'est toujours cela qu'ils n'auront pas !"), sans perdre de temps et d'énergie à synthétiser les enzymes qui attaquent la deuxième source. Celle-ci sera tranquillement consommée en toute sécurité un peu plus tard. Ces questions peuvent prendre des aspects complexes. Par exemple il arrive qu'une souche métabolise en grande quantité une source carbonée en excréant en abondance dans le milieu des métabolites intermédiaires qui ne seront pas récupérés (un gâchis de matière première ?). Une telle surconsommation peut :

- 1 correspondre à une nécessité dans le cas de fermentations, pour des raisons de métabolisme énergétique ;
- 2 correspondre à la détoxification d'urgence d'un composé dangereux pour la cellule, transformé en produit inoffensif même s'il est inutile (ouf, on a eu chaud !)

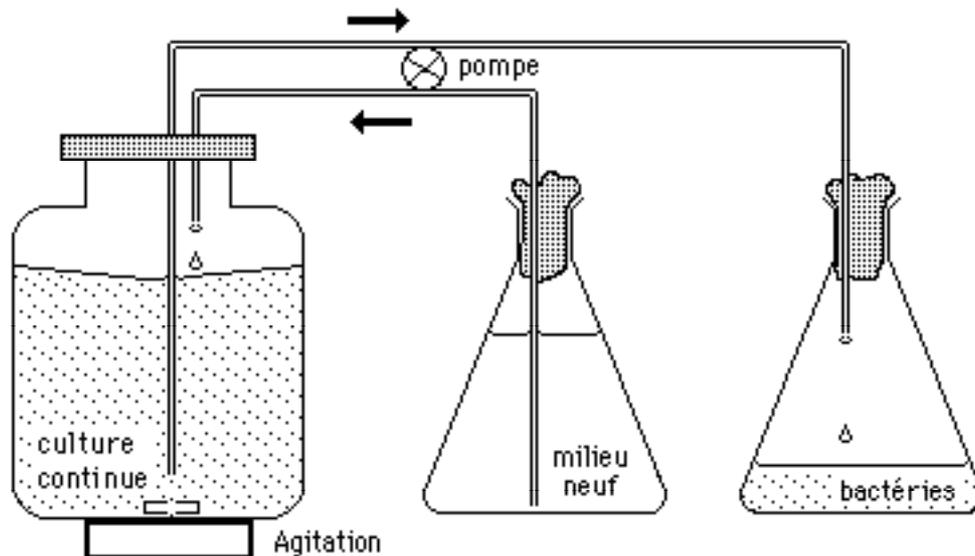
¹ K. Tauchert, A. Jahn & J. Oelze (1990) J. Bacteriol. 172, 6447-6451.

- 3 servir à détruire des matières alimentaires qui pourraient profiter aux concurrents (l'égoïsme cynique) ;
- 4 permettre de produire un composé dont l'accumulation nuit à d'autres espèces (la franche malveillance) ; etc.

Les **bactéries lactiques** effectuent une fermentation du lait au cours de la fabrication des fromages et yaourts et produisent de grandes quantités d'acide lactique à partir du lactose. Elles ne peuvent faire autrement que d'abandonner cet acide, mais cette production leur est en même temps utile car elle conduit à un abaissement du pH qui leur est favorable alors que la croissance d'autres germes est inhibée.

CULTURES CONTINUES, CHÉMOSTAT

Les cultures en continu faites au laboratoire permettent de faire croître des germes dans des conditions qui restent constantes au cours du temps. C'est la technique du **chémostat**. On approvisionne la culture en continu par du milieu neuf stérile, et on soutire en même temps un volume équivalent de la suspension microbienne. Le volume total de la culture reste donc constant, et au bout d'un certain temps la concentration des bactéries s'ajuste d'elle-même à une valeur constante. On dit que la culture est parvenue à un **état stationnaire**.



Attention ! Il est très important de ne pas confondre cet état stationnaire avec la phase de croissance stationnaire indiquée plus haut. Il s'agit ici d'un équilibre dynamique où tout ce qui se consomme est remplacé par une quantité équivalente, ce qui fait que tous les paramètres restent constants (volume, concentrations, pH, etc.)¹. Au cours de cet état stationnaire les bactéries sont nécessairement en train de se diviser, sinon leur nombre diminuerait rapidement par dilution. A la "phase stationnaire" des cultures discontinues, elles ont au contraire pratiquement cessé de se multiplier.

¹ Une rivière qui coule avec un débit régulier reproduit un état stationnaire. Si vous prenez une première photo, puis une deuxième quelques minutes plus tard, vous avez deux images identiques, mais qui ne montrent pas la même eau.

ADAPTATION À LA LUMIÈRE

Les impératifs du métabolisme azoté ne sont pas les seuls dont les cyanobactéries tiennent compte pour revoir leur stock de phycobilisomes. Un autre paramètre important est la lumière. Les cellules sont capables d'ajuster le fonctionnement de leur appareil photosynthétique en fonction de l'éclairement. Les cyanobactéries doivent faire face à des conditions lumineuses très changeantes en quantité et en qualité, qui dépendent de la latitude, du cycle diurne, des saisons et de la climatologie. Autant de facteurs dont on connaît l'importance en agronomie et qui ont donné lieu à de très nombreuses études¹. Le milieu aquatique introduit de nouveaux paramètres tels que :

- 1 la transparence du milieu ;
- 2 l'effet de filtre des matières en suspension ou en solution ;
- 3 l'inclinaison des radiations incidentes : le tiers de la lumière solaire directe est perdu par réflexion quand elle est inclinée à 10° au-dessus de l'horizon.

Rappelons quelques données physiques simples². L'eau pure est très transparente aux radiations de longueur d'onde inférieure à 550 nm. Son absorption sous 1 mètre d'épaisseur est de 35% environ à 680 nm ; elle croît avec la longueur d'onde dans cette région du spectre et dans l'infra-rouge proche. Les sels dissous (milieu marin) ainsi que les particules minérales ou organiques en suspension diminuent la transparence de l'eau par dispersion de la lumière. Cet effet est d'autant plus important que la longueur d'onde est plus faible, avec comme conséquence une diminution dans le bleu. L'opacification est très marquée dans les eaux littorales, les estuaires, ou les lacs de montagne alimentés par l'eau des glaciers. C'est donc la partie verte du spectre vers 500-575 nm qui est la moins arrêtée par les eaux troubles, avec un maximum dont la longueur d'onde tend vers une limite : 574 nm.

L'effet de l'**intensité lumineuse** sur la croissance des cyanobactéries a été étudiée maintes fois en laboratoire. Le taux de croissance maximum (μ_{\max}) augmente avec l'intensité de la lumière jusqu'à un palier de saturation qui se trouve couramment vers 50-60 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en lumière blanche³. Certaines espèces supportent sans inconvénient un éclairage beaucoup plus fort, qui est par contre délétère pour d'autres. Parmi les espèces très sensibles à une "**photo-inhibition**" : *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria rubescens*. Ce phénomène, qui est assez fréquent (y compris chez les plantes), est imparfaitement expliqué. On admet cependant qu'il s'agit de la formation d'entités radicalaires nocives au niveau du PS2. Certaines espèces planctoniques préfèrent donc un éclairage faible ou modéré, et se répartissent en majorité à une certaine distance de la surface allant de 1 mètre à plusieurs dizaines de mètres.

Le graphique suivant est tiré de Wyman et Fay⁴, et montre le taux de croissance moyen de quatre espèces d'eau douce sous un éclairage constant de 12 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en fonction de la qualité spectrale.

Une augmentation importante du taux de croissance en lumière rouge s'observe pour deux espèces à flux énergétique égal. La vitesse de croissance est proportionnelle à la quantité d'énergie que la cellule peut convertir en ATP ; c'est donc ici une mesure de l'efficacité de la

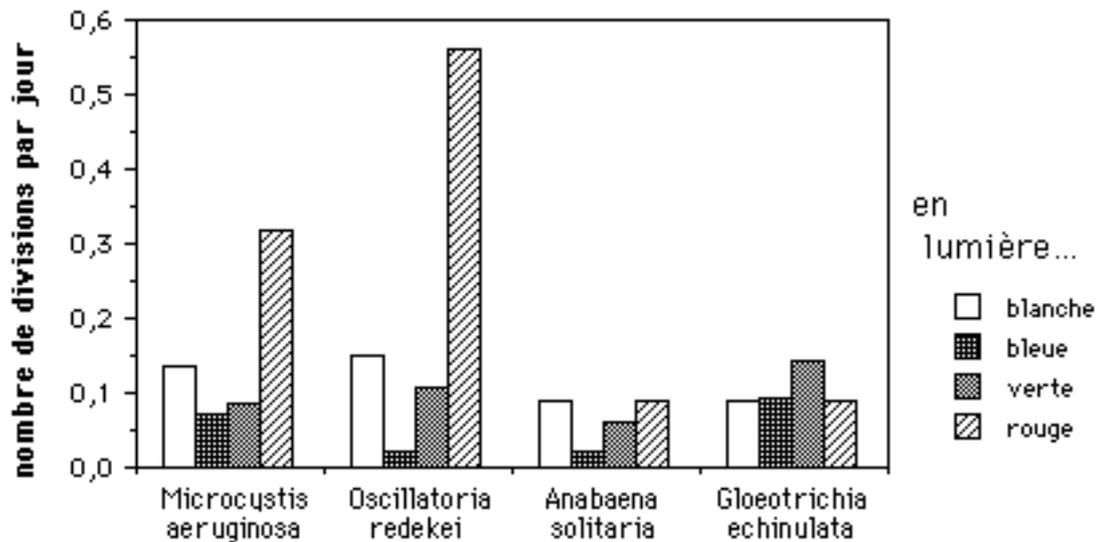
¹ H. Smith (1982) Annu. Rev. Plant Physiol. 33, 481-518 ; J.T.O. Kirk (1983) Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems, Cambridge University Press, Cambridge.

² N.G. Jerlov (1976) Marine Optics, Elsevier.

³ C.E. Gibson & R.H. Foy (1983) Br. Phycol. J. 18, 39-45. (mesures faites chez *Oscillatoria*)

⁴ M. Wyman & P. Fay (1986) Proc. Roy. Soc. Lond. B, 227, 381-393.

photosynthèse. Celle-ci dépend entre autres facteurs de l'équipement des thylakoïdes en pigments assimilateurs et notamment en phycobilines. Une croissance efficace en lumière rouge est aidée par les phycocyanines, une stimulation en lumière verte dénote la présence de phycoérythrine (*Gloeotrichia*). En dehors de la corrélation qui existe entre la nature des pigments et la croissance sous tel ou tel éclairage, les interprétations sont généralement assez compliquées et pas toujours convaincantes.



Diverses espèces sont capables de modifier le contenu de leurs phycobilisomes en protéines en fonction de la qualité de la lumière incidente. Ce phénomène s'appelle **adaptation chromatique**¹, s'observe dans un groupe de cyanobactéries dont fait partie *Calothrix*. Ces germes ont en commun de fabriquer de la phycoérythrine, une biliprotéine qui absorbe en lumière verte (soit en-dessous de 570 nm : voir le tableau plus haut), alors que les autres absorbent plutôt dans le jaune-orangé. L'adaptation chromatique peut consister à augmenter la taille des phycobilisomes en ajoutant des unités de phycoérythrine à l'extrémité des bâtonnets. Dans d'autres cas les phycobilisomes conservent la même taille mais remplacent de la phycocyanine par de la phycoérythrine ou vice versa en fonction des conditions, ce qui revient à changer aussi la sensibilité spectrale de l'appareil photosynthétique. En fonction d'une remarque faite plus haut, il est clair que l'adaptation à la lumière verte peut être une adaptation à la croissance en milieu trouble, par exemple dans un lac fortement eutrophisé. Ce pouvoir d'adaptation n'est absolument pas général. Il est rare dans les cyanobactéries unicellulaires. L'immensité des océans contient des masses énormes de certains *Synechococcus* dans lesquels aucune adaptation chromatique n'a été décelée.

Quand il existe, ce phénomène d'adaptation reste néanmoins très intéressant et commence à être de mieux en mieux connu sur le plan de l'expression génétique et des séquences. Une cyanobactérie filamenteuse, *Fremyella diplosiphon*, renferme trois opérons codant pour des polypeptides de phycocyanines². L'un d'eux (*cpc1*) code pour les chaînes α et β qui sont exprimées constitutivement en lumière rouge ou verte. L'opéron *cpc2* code pour d'autres chaînes α et β mais ne fonctionne qu'en lumière rouge, déterminant l'induction d'une phycocyanine inductible et de linkers qu'on suppose installés en bout de bâtonnet dans les phycobilisomes. Le troisième opéron détermine une synthèse de phycocyanine et linkers qui remplacent les

¹ N. Tandeau de Marsac (1983) Bull. Inst. Pasteur 81, 201-254).

² T.L. Lomax (1987) J. Bacteriol. 169, 2675-2684.

précédents au cours d'une carence en soufre¹. La production des chaînes β et α de la phycoérythrine chez *F. diplosiphon* ne dépend que d'un seul opéron (*cpeBA*). Les linkers associés à la phycoérythrine sont codés par un opéron distinct, *cpeCD*. Les deux opérons *cpeBA* et *cpeCD* ont été séquencés² ; ils sont régulés en même temps et induits par la lumière verte. La souche est donc capable de fabriquer alternativement, soit de la phycocyanine dans le rouge, soit de la phycoérythrine dans le vert³.

Cet exemple illustre la signification de l'adaptation chromatique et vous montre la remarquable versatilité dont nos petites "algues" font preuve en fonction de l'éclairement. Il révèle en outre l'emploi grandissant de l'outil génétique pour démêler les circuits perfectionnés des cyanobactéries⁴. Nous savons donc que les cellules peuvent faire varier le développement de leurs pigments antennaires et leur composition en fonction de l'éclairement. Diverses espèces disposent d'un autre moyen : le contrôle de l'éclairement par **vacuole à gaz**.

De nombreux procaryotes aquatiques ont des vacuoles à gaz, des inclusions de forme cylindrique et entassées sous forme d'un réseau hexagonal. Leur enveloppe est constituée d'une seule couche protéique perméable aux gaz mais imperméable à l'eau, constituée par l'assemblage de sous-unités identiques auxquelles peuvent s'associer extérieurement d'autres constituants pour former des structures souples et résistantes que Walsby a comparé à du nylon⁵. Ce dispositif permet à la cellule de changer sa densité et d'effectuer des déplacements verticaux dans la masse du liquide. Un éclairement faible tend à faire remonter les cyanobactéries à la surface. Un fort éclairement les incite inversement à vider leurs ballasts. Comment ? Un premier mécanisme vu chez *Anabaena flos-aquae* est lié aux changements de turgescence cellulaire en fonction de l'éclairement, conduisant à un écrasement des vacuoles à gaz sous une forte intensité lumineuse⁶. Autre procédé chez *Mycrocystis* : l'accumulation de réserves glucidiques denses tend à faire couler les cellules en pleine lumière. Un troisième mécanisme régulateur se situe au niveau génétique et a été démontré à l'Institut Pasteur par le groupe de Tandeau de Marsac⁷.

La protéine structurale majeure des vacuoles à gaz de *Pseudanabaena* PCC 6901 est codée par le gène *gvpA*. Il n'y a pas ici d'autre gène codant pour les vacuoles à gaz contrairement à d'autres espèces. Le gène *gvpA* a été cloné et séquencé, et sa transcription dépend de l'éclairement, étant d'autant ralentie que celui-ci est plus fort. Il y a donc une régulation de la synthèse des vacuoles à gaz par la lumière par un procédé dont on ignore encore les détails. On ne sait pas si d'autres espèces, où existent plusieurs gènes *gvp*. Rappelons-nous que le principe des vacuoles à gaz n'est pas réservé aux cyanobactéries puisqu'on le rencontre chez des bactéries photosynthétiques et des bactéries halophiles comme *Halobacterium halobium*.

¹ D. Mazel & P. Marliere (1989) Nature 341, 245-248. Ce phénomène n'est pas propre aux cyanobactéries et se retrouve chez divers micro-organismes qui ont la possibilité d'économiser le soufre en synthétisant des protéines dont la séquence est appauvrie en cystéine et méthionine. Une adaptation qui concerne en particulier les protéines qui sont synthétisées en grande abondance dans la cellule.

² N.A. Federspiel & A.R. Grossman (1990) J. Bacteriol. 172, 4072-4081.

³ Et à l'orange elle fait comme nous, elle hésite ?

⁴ N. Tandeau de Marsac & J. Houmard (1987) dans The Cyanobacteria (Fay & Van Baalen eds.) Elsevier, 251-302 : une revue très importante sur le sujet.

⁵ A.E. Walsby & P.K. Hayes (1989) Biochem. J. 264, 313-322 ; A.E. Walsby (1991) J. Gen. Microbiol. 137, 2401-2408.

⁶ E.M. Allison & A.E. Walsby (1981) J. Exp. Botany 32, 241-249 ; R. Kinsman & coll. (1991) J. Gen. Microbiol. 137, 1171-1178.

⁷ T. Damerval & coll. (1991) Molec. Microbiol. 5, 657-664.