

TD1 corrigé : Nutrition bactérienne et les différents types de milieu de culture

Exercice 1 (Révision) :

1.

A : cellule bactérienne

B : Paroi des bactéries Gram +

C : Paroi des bactéries Gram –

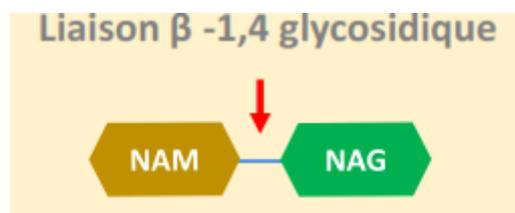
2.

Figure A : 1 : Ribosome, 2 : Mésosome, 3 : membrane plasmique, 4 : Paroi, 5 : Capsule, 6 : Plasmide, 7 : Flagelle, 8 : Fimbriae, 9 : Nucléotide.

Figure B : a : Acide lipotéichoïque, b : Acide téichoïque, c : peptidoglycane, d : espace périplasmique, e : membrane plasmique

Figure C : a : Porine, b : Lipopolysaccharide, c : Membrane externe, d : Espace périplasmique et peptidoglycane, e : Lipoprotéine f : Membrane plasmique.

3.1. **Le lysozyme est une enzyme qui rompt les liaisons β -1,4 des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane.** (Le lysozyme ou muramidase est une protéine globulaire longue d'une centaine d'acides aminés qui est impliquée dans la défense contre les infections bactériennes. Elle est présente chez de nombreuses espèces d'animaux. On le trouve en particulier dans un certain nombre de sécrétions et dans le blanc d'œuf.)



3.2. Les bactéries Gram+ traitées au lysozyme perdent leur paroi. Dans l'eau distillée, elles s'éclatent. En effet, quand ces cellules sont placées dans l'eau distillée (milieu hypotonique) l'eau pénètre dans la cellule (milieu intracellulaire plus concentré) par osmose ce qui conduit à la lyse osmotique des cellules.

3.3. Dans un milieu isotonique, il y a un équilibre osmotique entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. L'eau ne pénètre pas dans la cellule bactérienne et malgré la disparition de la paroi les cellules n'éclatent pas. Elles perdent leur forme bacillaire et deviennent sphériques. **On les appelle des protoplastes.**

3.4. Les deux expériences réalisées sur les cellules de *Lactobacillus bulgaricus* permettent de déduire le rôle de la paroi bactérienne dans le maintien de la forme des cellules bactériennes et dans la résistance à la pression osmotique interne.

Exercice 2 :

A : Fausse : auxotrophie est l'incapacité d'un organisme vivant de synthétiser un composé organique nécessaire à son développement.

B : Fausse : le facteur de croissance est une **substance organique, indispensable à la croissance bactérienne et dont les microorganismes sont incapables de les synthétiser**). On dit qu'ils sont auxotrophes.

C : Vrai.

Exercice 3:

1-

- ❖ **Éléments majeurs** : C (glucose), N (Nitrate de potassium), P (Hydrogénophosphate de potassium), S (Sulfate de magnésium)
- ❖ **Sels** : Calcium, Sodium

2-

- **Souche A** : Prototrophe vis à vis des minéraux et hétérotrophe vis à vis du carbone (glucose).
- **Souche B** : auxotrophe vis à vis des acides aminés.
- **Souche C** : auxotrophe vis à vis des acides aminés et vitamines apportés par l'extrait de levure.

Exercice 4 :

a- Milieu A : milieu de base, aucune source de carbone

b- Ces bactéries sont autotrophes qui fixent le CO₂ en matière organique.

c- La souche I cultivée sur milieu type A plus le citrate trisodique qui lui apporte le carbone organique. C'est une souche hétérotrophe vis à vis du carbone. C'est une souche prototrophe vis à vis des autres composés (tous les minéraux) et chimiotrophe.

d-

Milieu A : Phosphate d'ammonium

Milieu B : Phosphate d'ammonium

Milieu C : Phosphate d'ammonium et acides aminés

e- Le glucose est une source de carbone et d'énergie.

f- Chimioorganotrophe et hétérotrophe.

g- les oligoéléments sont les éléments minéraux présents en faible quantité et qui apportent les éléments minéraux nécessaires pour les cofacteurs des enzymes : Mn, Zn, Co, Cu, Ni.

h- les acides aminés (construction des protéines) et les vitamines sont les cofacteurs enzymatiques.

Exercice 5 :

- a) Pas de noyau, pas de mitochondrie, donc Procaryote (Archaea ou bactérie)
- b) CO₂
- c) Oxydation des composés minéraux comme le Fer

TD 2 Corrigé : Croissance bactérienne et Techniques de numération bactérienne

Exercice 1 :

1)

Données :

Cellule de Malassez : 25 carrés couvrant une surface de 1 mm^2 et une profondeur de $0,02 \text{ mm}$

Solution :

Le nombre total de bactéries dans 1 mm^2 de la chambre est égale au Nombre de bactéries/carré x 25.

Volume = surface x hauteur

Volume d'un rectangle utilisé est $1 \text{ mm}^2 \times 0,02 \text{ mm} = 0,02 \text{ mm}^3$

Donc le nombre de bactéries/ $0,02 \text{ mm}^3$ = Nombre de bactéries/carré x 25

Ainsi, le nombre de bactéries/ mm^3 = $\frac{\text{Nombre de bactéries/carré} \times 25}{0,02}$ =
nbr/carré x 25 x 50.

Le nombre dans 1ml est 10^3 cette valeur.

Pour l'urine analysée, le nombre moyen de cellules/carré est 20 cellules bactériennes donc le nombre de bactéries dans 1 ml = $20 \times 25 \times 50 \times 10^3$ bactéries/ml = $2,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml de l'échantillon analysé.

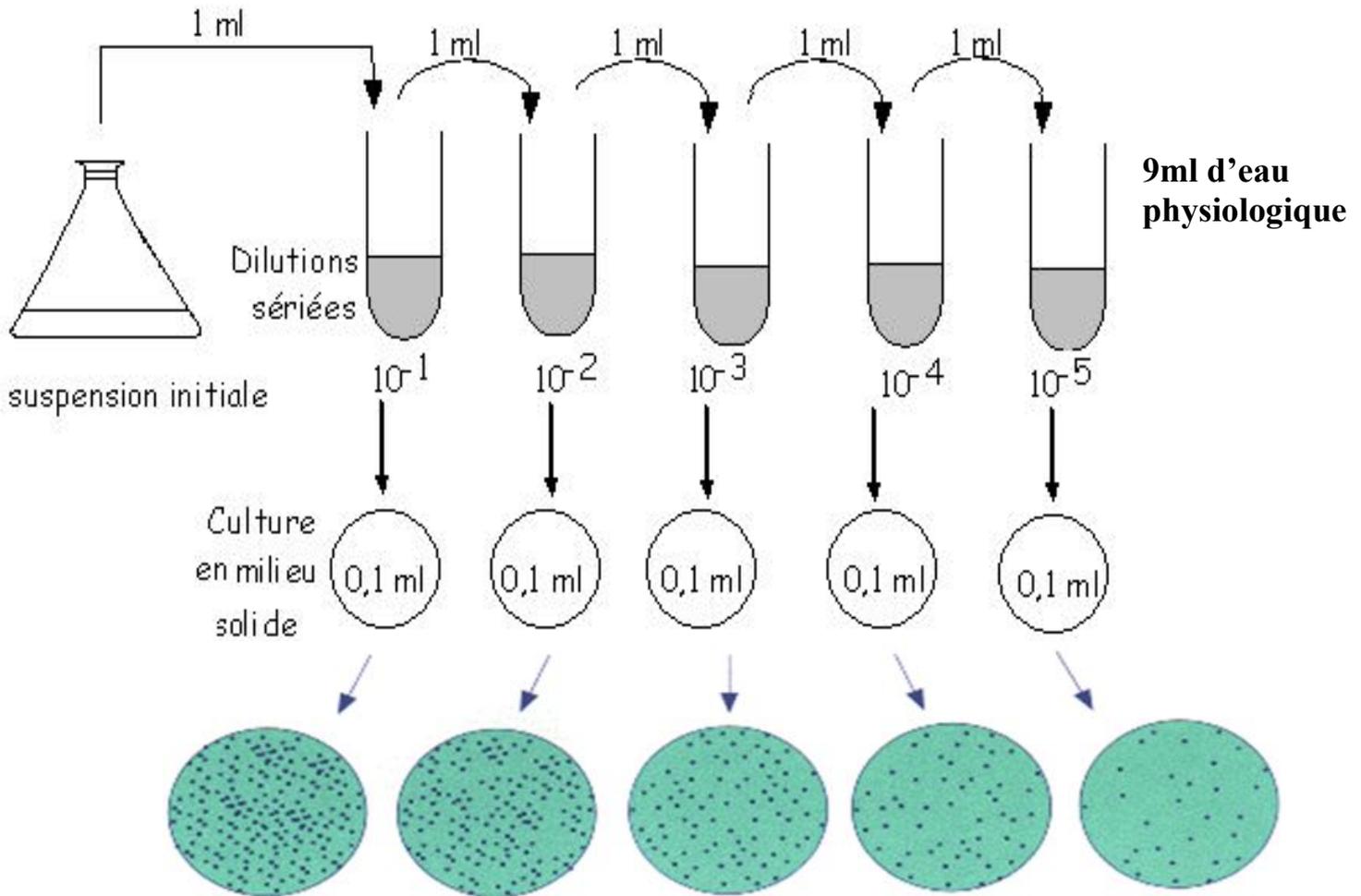
2)

Le même raisonnement. Cette fois ci, le nombre moyen de cellules/carré est

$$\frac{20 + 20 + 24 + 28 + 28}{5} = 24 \text{ cellules/carré}$$

Exercice 2

- 1) une colonie est un ensemble de cellule qui provient de la division d'une même cellule mère
- 2)



3)

Si on ensemence un volume connu sur une boite de gélose nutritive, le nombre de colonies obtenu sur cette boite après incubation à une température optimale, correspond au nombre de bactéries ensemencé au départ. Si on peut aisément compter le nombre de colonies, on peut déduire le nombre initial de bactéries, connaissant le volume ensemencé.

Comme le nombre de bactéries à compter n'est pas connu au départ, et pour avoir au moins une boite où on peut aisément compter le nombre de colonies, on procède généralement à une dilution de l'échantillon avant de l'ensemencer dans le milieu de culture.

Une série de dilution de 10 en 10 est généralement préparée. Et chaque dilution est ensemencée au niveau d'une boite de gélose nutritive. Après incubation, on ne considère que les boites de GN où on peut compter facilement le nombre de colonies apparues. Pour une même dilution, on refait plusieurs essais, pour avoir un nombre moyen et augmenter la précision du dénombrement.

Parmi les boites comptables on ne consid rera que la boite qui a donné un nombre de colonies compris entre 30 et 300 colonies.

Si le nombre est inférieur à 30, il n'est pas statistiquement significatif.

Si le nombre est supérieur à 300, on risque de sous estimer le nombre de bactéries du fait qu'il peut y avoir une compétition entre ce grand nombre de bactéries vis à vis des éléments nutritifs

disponibles et vis-à-vis de l'espace et par la suite une inhibition d'une bonne proportion de cellules au niveau de la boîte. Dans notre exemple, la dilution choisie est la dilution 10^{-3} .

On à la formule générale de calcule est $N = \frac{\sum C}{V \times (n1 + 0,1 n2) \times d}$

Donc notre exemple : $n1 = 1$ et $n2 = 0$ donc $N = \frac{\sum C}{v \times d}$

Le nombre moyen de $\sum C = 180$ colonies donc $N = 180 \times 10 \times 1000$ UFC/ml du Jus = $1,8 \cdot 10^6$ UFC/ml du Jus.

L'unité utilisée est l'Unité Formant Colonie (U.F.C.) : c'est une unité plus précise que l'unité bactéries/ml dans ce cas. Car on compte le nombre d'unités qui forment des colonies, quelque fois, plusieurs bactéries côte à côte pouvant donner une même colonie. Il est donc plus exact de parler du nombre d'unités formant colonies que de nombre de bactéries.

- 4) La différence entre les deux méthodes vient du fait que la méthode directe au microscope compte aussi bien les cellules vivantes et les cellules mortes.

Exercice 3 :

La méthode de dénombrement par NPP sur milieu de culture liquide est utilisée dans le cas où on n'a pas la possibilité d'utiliser le milieu de culture solide.

Trois milieux de culture sont ensemencés par dilution et on considère la présence ou l'absence des bactéries recherchées mises en évidence par des tests spécifiques.

Dans le cas d'échantillons solides, comme le sol, on doit passer par une étape de préparation de l'échantillon (ici broyage de 1g de sol et sa dissolution dans 10 ml d'eau physiologique stérile) avant de passer aux dilutions. Cette étape est à considérer lors des calculs pour ramener au gramme de sol. Cette étape correspond à une sorte de dilution au 1/10 de l'échantillon de sol.

Pour la méthode de Most Probable Number (le nombre le plus probable), on se base sur des tables statistiques qui donnent le nombre le plus probable de germes dans un milieu tenant compte du nombre de tubes positifs obtenus dans cette expérience. Le nombre de tubes positifs relevés nous permet de calculer un nombre caractéristique NC. Le NC est un nombre formé de trois chiffres. Le premier chiffre correspond à celui relevé à la plus grande dilution qui donne le maximum de tubes positifs. Cette dilution sera prise en considération pour les calculs. Les deux autres chiffres correspondent aux nombres respectifs de tubes positifs dans les deux dilutions qui suivent.

Selon la table de Mac Grady, à chaque nombre caractéristique correspond un nombre plus probable de germes par le volume ensemencé de la dilution considérée.

EX : le sol 1 : Le nombre caractéristique est 321 à la dilution 10^{-4} .

| Dilution | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sol 1 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++- | +-- | --- |
| Nombre caractéristique | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 |

Le nombre le plus probable qui lui correspond dans la table de Mac Grady est : 15

Donc le nombre de bactéries = 15×10^4 (Dilution ayant donné 3+) germes/ml

Pour exprimer le résultat par gramme de sol, on considère que la préparation de la suspension initiale (1g dans 10 ml) est équivalente à une dilution au 1/10 du sol étudié. Ainsi le nombre trouvé ci-dessus sera multiplié par 10.

Donc Nombre de germes = 15×10^5 germes/g de sol.

Pour le sol 2 : NC = 320 à la dilution 10^{-2}

| Dilution | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sol 2 | +++ | +++ | ++- | --- | --- | --- | --- |
| Nombre caractéristique | 3 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Le nombre le plus probable qui lui correspond dans la table de Mac Grady est : 9,5

Donc le nombre de germes = $9,5 \cdot 10^3$ germes/g du sol

Pour le sol 3 :

| Dilution | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sol 3 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Nombre caractéristique | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Ce résultat montre que la dilution n'était pas suffisante. Il a fallu diluer davantage l'échantillon jusqu'à ce qu'on trouve des tubes négatifs. Cependant, on peut utiliser ce résultat et considérer que le nombre caractéristique peut être estimé selon trois possibilités :

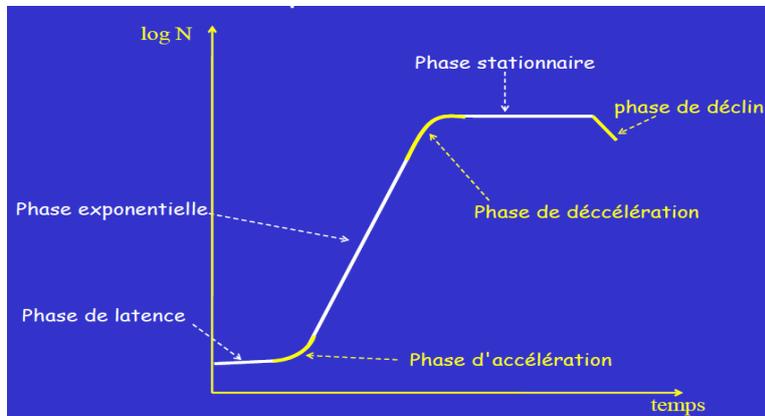
- 300 à la dilution 10^{-7} , le NPP = $2,5 \cdot 10^8$ germes/g de sol
- 330 à la dilution 10^{-6} , le NPP = $2,5 \cdot 10^8$ germes/g de sol
- 333 à la dilution 10^{-5} , le NPP = $140 \cdot 10^5 = 1,4 \cdot 10^8$ germes/g de sol

Ainsi les trois chiffres sont considérés valables, et l'on peut utiliser l'une ou l'autre des estimations, les résultats sont assez proches. Mais il faut faire attention à la dilution considérée.

2) Si le volume ensemencé était de 0,1ml au lieu de 1ml, le nombre trouvé doit être multiplié par 10.

Exercice 4 :

a)



b)

Phase I : Phase de latence :

- Adaptation au nouveau milieu. Préparation de la machinerie enzymatique nécessaire à la dégradation des substrats.
- Pas de division bactérienne ($\mu = \text{zéro}$).

Phase II : Phase d'accélération :

- Phase intermédiaire entre la phase de latence et la phase exponentielle.
- Il y a accélération du rythme de division bactérienne (μ passe de zéro et tend vers μ max). Début de croissance, le nombre bactérien augmente, $\mu > 0$.

Phase III : Phase exponentielle :

- C'est la seule phase de la courbe expérimentale dont l'évolution correspond à la théorie $\text{Log } N_n = \mu t \log 2 + \log N_0$ est une courbe du type $y = ax + b$. C.à.d une droite de pente μ).
- Les bactéries sont dans leur état physiologique et métabolique optimum. D'où un maximum de synthèses surtout d'ADN et par conséquent un maximum de divisions bactérienne. Le taux de croissance est maximum ($\mu = \mu_{\text{max}}$). Ce paramètre qui permet de caractériser la croissance doit être calculé au niveau de cette phase (pente de la courbe).

Phase IV : Phase de ralentissement :

- Phase intermédiaire entre la phase exponentielle et la phases stationnaire (μ passe de μ_{max} et tend vers zéro).
- - Il y a ralentissement du rythme de division bactérienne. Ce qui correspond à un début d'épuisement du milieu de culture et à un début d'accumulation de déchets toxiques.

Phase V : Phase stationnaire :

- Le nombre de cellules atteint son maximum et le taux de croissance diminue et tend à s'annuler ($\mu = 0$).

‘‘Arrêt’’ de croissance. ‘‘Arrêt’’ de divisions bactérienne ($\mu = \text{zéro}$).

- Les conditions de culture commencent à devenir défavorables.

Phase VI : Phase de déclin :

- Les conditions de culture sérieusement défavorables.
- Il y a mort des bactéries ($\mu < \text{zéro}$). Les cellules ne se divisent plus, le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$) et le taux de mortalité augmente.
- Toutes les ressources nutritives sont épuisées.

c)

- **Formule :** $\mu = \frac{\log N_n - \log N_0}{\log 2 \times (t_n - t_0)}$

- **Données (tableau et texte)**

- $\text{Log } N_n = 4,4$
- $\log N_0 = 3,5$
- $t_n - t_0 = t_{6h} - t_{5h} = 1H$
- $\log 2 = 0,30$

- **Application numérique :**

- $\mu = (5,3 - 4,4) / [0,30 \times (7 - 6)] = 0,9 / 0,3 = 3/h$

- Temps de génération : c'est le temps qui sépare deux divisions successives.

$$G = 1 / \mu$$

- $\mu = 3 \rightarrow$ (3 divisions par une heure soit 60 min.)
- $G = 1 / 3 \rightarrow 60 \text{ mn} / 3 = 20 \text{ mn}$

Exercice 5 :

2)

Les trois paramètres nécessaires et suffisants pour caractériser la croissance sont :

Le taux de croissance maximum (μ max), Temps (T) (min) et la croissance totale ($N_s - N_0$).

- μ max est calculé au niveau de la phase exponentielle (Figure 1) par projection sur les axes du graphe. μ max = $\log_2 N_2 - \log_2 N_1 / t_2 - t_1$. Sa valeur numérique est environ 2h.
- G (min) = $1 / \mu$ max = $1 / 2 = 0,5$ heure ou 30 minutes.

$N_s - N_0$: Se calcule à partir des valeurs sur la Figure 1. N_s = nombre de bactéries en phase stationnaire et N_0 = nombre de bactéries initiales. Sachant que si $\log_2 N = x$ donc $N = 2^x$

$$N_0 = 2^{21} = 2 \cdot 10^6 \text{ u.f.c / ml}$$

$$N_s = 2^{25,5} = 47,45 \cdot 10^6 \text{ u.f.c / ml}$$

$$N_s - N_0 = (47,45 - 2) \cdot 10^6$$

3) La phase de latence dépend :

- De la nature et la richesse du milieu. Pour un milieu riche (naturel) cette phase est courte ou inexistante alors que pour un milieu pauvre (synthétique) elle est longue.

Dans le cas de l'exercice la phase de latence est justifiée par le passage d'un milieu riche et naturel (gélose nutritive) à un milieu plus pauvre et synthétique (milieu M).

4) La phase stationnaire est conditionnée par :

- L'épuisement du milieu en nutriments tels que la source de carbone (ex : Glucose dans ce cas).

- L'accumulation de produits toxiques qui ne sont pas nécessairement des déchets mais peuvent être tout simplement des produits métaboliques (ex : éthanol pour la fermentation alcoolique) qui deviennent inhibiteurs à partir d'une certaine concentration.

- Le développement d'un équilibre physico-chimique défavorable. Ex : variation du pH du milieu, variation de l'oxygénation du milieu ...etc.

- Le remplissage du volume du récipient disponible (il n'y a plus d'espace pour les bactéries).

Exercice 6 :

A- **800 colonies**

B- **4 mL contiendrait 8000X4 = 32,000 bactéries**

C- **Résistance à l'ampicilline**

D- **32,000/500 = 64 bactéries/ml**

E- **$N_0 = 64$ cellules par ml**

F- **$N_t = ?$**

$$G = t/n \quad t = 600 \text{ min} \quad n = t/G \quad n = 600/30 \quad n =$$

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

Soit : **67, 108,864 cellules/ml**

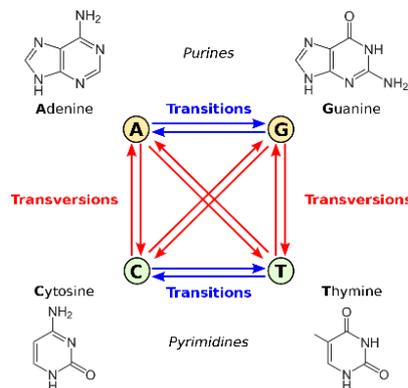
TD 3 : Génétique bactérienne -corrigé

Exercice 1

1. **Faux ; il exprime la probabilité d'apparition d'une mutation dans un intervalle de temps correspondant à une génération.**

Le taux de mutation spontanée est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} . Le taux de mutation ne doit pas être confondu avec la **fréquence des mutants**, qui est la proportion de mutants trouvés dans une culture à un moment donné.

2. **Faux ; la transversion concerne le remplacement d'une base purique par une base pyrimidique ou l'inverse. Le remplacement purine-purine ou pyrimidine-pyrimidine s'appelle transition.**



3. **Vrai. La transformation est le transfert passif d'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice, dite en état de compétence. Ce transfert s'effectue sans contact direct entre la bactérie donatrice et la réceptrice. L'ADN peut provenir d'une cellule de la même espèce ou de cellules d'autres espèces.**
4. **Faux ; il doit être bicaténaire, bien que lors de la phase de pénétration un des deux brins soit dégradé**

Exercice 2 :

A)

1.

- **Mutation** : est une modification brusque et rare qui touche le génome (ADN) d'une cellule.
- **Mutation ponctuelle** : est une mutation qui n'affecte qu'une seule paire de bases en un endroit donné.
- **Taux de mutation** : est la probabilité pour une bactérie de muter pendant le temps d'une génération. Le taux de **mutation spontanée** est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} .

2.

- 1) Spontanéité (hasard) ou induction.
- 2) Discontinuité.
- 3) Stabilité (héréditaire)
- 4) Rareté
- 5) Spécificité et indépendance

3.

- Il faut d'abord déterminer la concentration bactérienne de la culture d'*E. coli* (C).
- $C = 10 \text{ colonies} \times 10^8 \text{ (facteur de dilution)} = 10^9 \text{ UFC} / 0,1 \text{ ml} = 10^{10} \text{ UFC/ml}$.
- $\mu_1 = \text{Nombre de mutants} / \text{nombre total des individus composant la population analysée}$
- $\mu_1 = 5 \text{ UFC} / 10^9 \text{ UFC}$
- Donc le taux de mutation 'spontanée' à la tétracycline est : $\mu_1 = 5 / 10^9 = 5 \cdot 10^{-9}$

B)

- $\mu_2 = 500 / 10^9$; $\mu_2 = 5 \cdot 10^{-7}$
- On remarque que : $\mu_2 > \mu_1$
- Au niveau de la dernière expérience, nous avons en plus des mutants spontanés, d'autres mutants « induits » par l'agent mutagène (rayons UV) qui a augmenté la probabilité des modifications de l'ADN et par conséquent le nombre de bactéries devenues résistantes à la tétracycline.

Exercice 3 :

1. Quelles sont les caractéristiques de la phase exponentielle de croissance des bactéries dans un milieu liquide non renouvelé ?

Les bactéries se développent et se divisent à une vitesse constante et maximale et le taux de croissance atteint son maximum ($\mu = \mu_{\max}$, temps de génération (G) est minimal). Les cellules se divisent et doublent leur nombre à intervalles de temps réguliers. Durant cette phase, la population est presque uniforme en termes de propriétés chimiques et physiologiques.

2. Calculer les valeurs de dénombrement (exprimées en UFC/ml) pour les deux souches (WT et MβL) après 24h de traitement à la pénicilline

- $N_{WT} = (98+89/0,5 \times 2) \times 10^6 = 1,9 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$
- $N_{M\beta L} = (73+64/0,5 \times 2) \times 10^3 = 1,4 \times 10^5 \text{ UFC/ml}$

3. Calculer le pourcentage de survie (%) du type sauvage et son mutant MBL

$$\begin{array}{l} WT = 4,5 \cdot 10^8 \text{ UFC/ml} \quad \longrightarrow \quad 100\% \\ 1,9 \cdot 10^8 \text{ UFC/ml} \quad \longrightarrow \quad X \\ X = 1,9 \cdot 10^8 \cdot 100 / 4,5 \cdot 10^8 \\ X = 42,22\% \end{array}$$

$$\begin{array}{l} M\beta L = 4,1 \cdot 10^8 \text{ UFC/ml} \quad \longrightarrow \quad 100\% \\ 1,4 \cdot 10^5 \text{ UFC/ml} \quad \longrightarrow \quad Y \\ Y = 1,4 \cdot 10^5 \cdot 100 / 4,1 \times 10^8 \\ Y = 0,034\% \end{array}$$

4. La β-lactamase permet la résistance 'partielle' chez la souche sauvage (WT) à l'action de l'ATB (La souche mutée (dépourvue de la β-lactamase) est sensible à l'action de l'ATB).

Exercice 4 :

1. Cotransduction pur+ et nad+ : 10 colonies nad+ avec pdx- et 3 colonies nad+ avec pdx+. Soit 13 colonies cotransductantes pur+ nad+ sur les 50 colonies testées (**26%**).
2. Cotransduction pur+ et pdx- : 10 colonies pdx- avec nad+ et 13 colonies pdx- avec nad-. Soit 23 colonies cotransductantes pur+ pdx- sur les 50 colonies testées (**46%**).
3. Comme il y a plus de cotransductants pur pdx par rapport à pur nad, c'est le locus pdx qui est le plus proche de pur.