

L2

***UE 3A - Gestes de base
en Biologie Appliquée***

1^{er} semestre 2024

Responsable : Jean-Christophe Marvaud

Préparation : Sandra Hoys.

Le cahier de laboratoire

Ce cahier de laboratoire comprend des pages de texte décrivant chaque manipulation, suivies d'espaces vierges sur lesquelles l'étudiant devra reporter ses notes personnelles ainsi que les informations complémentaires données par les enseignants, les résultats expérimentaux obtenus, une interprétation des résultats et une conclusion sur l'ensemble de la manipulation.

Ce cahier devra être conservé car il constitue un recueil des techniques et des manipulations de base qui seront utilisées lors des Travaux Pratiques de 3^{ème} année des études pharmaceutiques.

L'étudiant est invité à lire le descriptif des manipulations avant de se présenter aux Travaux Pratiques.

Objectifs des Travaux Pratiques

- Les cultures de microorganismes.
- Culture sur boîte de Pétri (bactéries, champignons levuriformes)
- Technique d'identification d'une bactérie : exemple de la détermination du type respiratoire d'une bactérie
- Sensibilité des bactéries aux antibiotiques : Détermination de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique
- Les techniques d'observation microscopique de deux types cellulaires
 - Les bactéries
 - Les champignons levuriformes

Notation des Travaux Pratiques

La note des Travaux Pratiques (représentant 50% de la note de contrôle continu de l'UE 3A) se basera sur la tenue du cahier de laboratoire, une note de manipulation et une note de comportement de l'étudiant durant les séances. Ces deux derniers critères prendront en particulier en compte le **respect des consignes de sécurité**.

Programme des Séances

Séance 1 (J1)

Introduction générale comprenant la présentation du matériel et des objectifs pédagogiques ainsi que des consignes générales de travail et de sécurité.

Bactériologie

- Ensemencement d'une souche bactérienne en milieu liquide (cf. p.5)
- Isolement d'une culture bactérienne sur milieu solide (cf. p.5)
- Prélèvement et ensemencement de microorganismes commensaux de l'homme sur milieu solide (cf. p.6)
- Détermination du métabolisme respiratoire d'une souche bactérienne (cf. p.7 et 8)
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique (CMI) pour une souche bactérienne (cf. p.9)

Parasitologie - Mycologie

- Isolement d'éléments fongiques à partir d'une suspension (cf. p.16)

Séance 2 (J2)

Aspect des colonies bactériennes et des levures, morphologie des bactéries.

Rappel sur les parois bactériennes et des levures et principe de la coloration de Gram

Bactériologie

- Vérification de la culture en milieu liquide
- Lecture des différents ensemencements et de l'isolement
- Lecture du test CMI
- Examens microscopiques :
 - Coloration de Gram (cf. p.10 à 15)
 - Réalisation d'un état frais (cf. p.10)

Parasitologie - Mycologie

- Lecture de l'isolement
- Examen microscopique :
 - Réalisation d'un état frais (cf. p.10)

MATERIEL NECESSAIRE ET INDISPENSABLE :

Blouse manche longue en coton, Feutres noirs fins ou moyens, Calculatrice et lunette de protection (les lunettes de vue peuvent les remplacer).

LES CONSIGNES DE SECURITE : veuillez les noter ci-dessous

BACTERIES UTILISEES AUX TRAVAUX PRATIQUES :

Escherichia coli (exemple : souche K12) est un bacille à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*, de type respiratoire aérobie-anaérobie facultatif qui est communément retrouvé dans les intestins des animaux à sang-chaud. La plupart des souches d'*E. coli* sont non pathogènes, mais quelques-unes peuvent provoquer des contaminations alimentaires sévères chez l'homme (gastro-entérite), des infections urinaires ou des méningites.

Staphylococcus epidermidis (exemple : souche CIP 53124) est un coque à Gram positif, de type respiratoire anaérobie facultatif, commensale de la peau chez l'Homme. C'est toutefois un pathogène opportuniste responsable d'infection nosocomiale chez les patients immunodéprimés notamment ceux portant des matériels médicaux type cathéters intra-vasculaires, prothèses ostéo-articulaires, etc...

Bacillus subtilis (exemple : souche ATCC 6633) est un bacille à Gram positif, de type respiratoire aérobie strict, naturellement trouvé dans le sol ou sur les végétaux. Ce n'est pas un pathogène pour l'homme et il a de nombreuses applications industrielles (production d'enzymes ou d'antibiotiques).

I. MISE EN CULTURE D'UN INOCULUM BACTERIEN ET D'UN PRELEVEMENT

Consiste à effectuer stérilement un prélèvement et à le mettre en culture sur ou dans un milieu stérile sans qu'il y ait apport de microorganismes étrangers.

On distingue l'ensemencement :

- en milieu liquide stérile où les bactéries sont introduites dans un tube contenant un milieu liquide nutritif appelé bouillon.
- sur un milieu solide où les bactéries sont déposées sur une gélose contenue dans une boîte de Pétri.

Buts de l'ensemencement :

- nécessaire à l'identification des bactéries.
- nécessaire à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.
- permet la mise en évidence de bactéries présentes en quantité très faible dans un prélèvement grâce à un milieu liquide approprié pour leur multiplication.
- permet la séparation des différentes espèces bactériennes présentes dans un prélèvement : technique appelée isolement.

J1

A. ENSEMENCEMENT DE BACTERIES EN MILIEU LIQUIDE

A partir d'une culture bactérienne distribuée en suspension liquide, prélever à l'aide d'un ensemenceur et l'introduire dans un bouillon stérile **Trypticase Soja (TSL)**.

Agiter au vortex et mettre 24 h à l'étuve à 37°C, bouchon légèrement dévissé.

B. ISOLEMENT DE BACTERIES EN CULTURE PURE SUR UN MILIEU SOLIDE

Le milieu de culture est une gélose **Trypticase Soja + Agar (TSA)**. Délimiter au crayon feutre 4 quadrants sur le fond extérieur de la boîte de Pétri. A l'aide de l'ensemenceur, prélever une goutte de votre suspension liquide et ensemer en quadrant la gélose en faisant des stries serrées. Laisser un « couloir » entre chaque quadrant.

Mettre la boîte 24 h à incuber à l'étuve à 37°C, couvercle en-dessous.

C. AUTOPRELEVEMENT SUR HUMAIN DE MICROORGANISMES ET ENSEMENCEMENT SUR MILIEU SOLIDE
A l'aide d'un écouvillon stérile, effectuer un autoprélèvement : ongle, oreille, front... Ensemencer un tube d'eau stérile. Vortexer, puis ensemer en quadrant la gélose **TSA** en faisant des stries serrées selon le même protocole que pour l'isolement de la bactérie en culture pure.

J2

I. ISOLEMENT DE BACTERIES EN CULTURE PURE SUR UN MILIEU SOLIDE

Notez l'aspect d'une colonie isolée (généralement dans le dernier quadrant) après 24 h d'incubation à 37°C.

II AUTOPRELEVEMENT SUR HUMAIN DE MICROORGANISMES ET ENSEMENCEMENT SUR MILIEU SOLIDE

Notez la présence et l'aspect des différents types de colonies observables après 24 h d'incubation à 37°C.

II. TECHNIQUE D'IDENTIFICATION BACTERIENNE : EXEMPLE DE L'ETUDE DU METABOLISME RESPIRATOIRE

La grande majorité des bactéries utilisent les composés organiques (glucides, protéines, lipides) comme source de carbone et d'énergie (bactéries dites hétérotrophes chimio-organotrophes). La dégradation de ces molécules se fait par oxydation dans des cycles enzymatiques, libérant dans la cellule bactérienne des coenzymes réduits : $\text{Oxydant} + \text{électrons} \longleftrightarrow \text{réducteur}$

Présents en quantité limitée et pour que les cycles métaboliques puissent se poursuivre, les coenzymes une fois réduits doivent être ré-oxydés grâce à un accepteur final des électrons :

- **Si l'accepteur final = O_2 : respiration aérobie**
- **Si l'accepteur final = composé inorganique $\neq O_2$: respiration anaérobie (ex : nitrates)**
- **Si l'accepteur final = composé organique : fermentation**

En fonction des enzymes et des systèmes métaboliques dont elles disposent, les bactéries ont un certain type respiratoire, c'est un caractère utilisé dans l'identification bactérienne.

On distingue 5 types respiratoires :

Les bactéries aérobies strictes. (Ex. les bactéries des genres *Pseudomonas* ou *Bacillus*)

- Elles sont capables :
 - d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons (chaînes cytochromiques de transfert des électrons)
 - d'utiliser certains systèmes de respiration anaérobie pouvant fonctionner en parallèle.

Les bactéries aérobies-anaérobies facultatives. (Ex. bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* ou du genre *Staphylococcus*)

- Elles sont capables :
 - d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons et d'utiliser des systèmes de fermentation.

Les bactéries anaérobies strictes. (Ex. bactéries du genre *Clostridium*)

- Elles possèdent seulement différents systèmes de fermentation et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons. De plus elles sont incapables de détoxifier les radicaux libres de l'oxygène.

Les bactéries anaérobies-aérotolérantes. (Ex. bactéries de la famille des *Streptococcaceae*)

- Elles sont capables :
 - d'utiliser des systèmes de fermentations
 - de se développer en présence d'oxygène, mais la croissance est plus faible.

Les bactéries microaérophiles. (Ex. bactéries du genre *Campylobacter* et *Helicobacter*)

- Elles sont capables :
 - d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons, et d'utiliser des systèmes de fermentation.
 - de se développer en présence d'oxygène à une concentration spécifique (inférieure à celle de l'air)

Vous allez utiliser un milieu particulier afin de déterminer le métabolisme respiratoire de votre bactérie : le **milieu Viande Foie (VF)**. C'est un milieu de culture composé pour 1 L : de base viande foie (30 g), du glucose (2 g), de l'agar (6 g). Il est coulé dans de longs tubes profonds de faible diamètre.

Protocole de l'ensemencement du milieu VF

J1

Incubez le milieu VF pendant 20 minutes au bain d'eau bouillante, avec bouchon débloqué. Le milieu est dit régénéré : l'oxygène a été chassé et un gradient de concentration en O₂ va s'établir le long du tube lors du temps d'incubation.

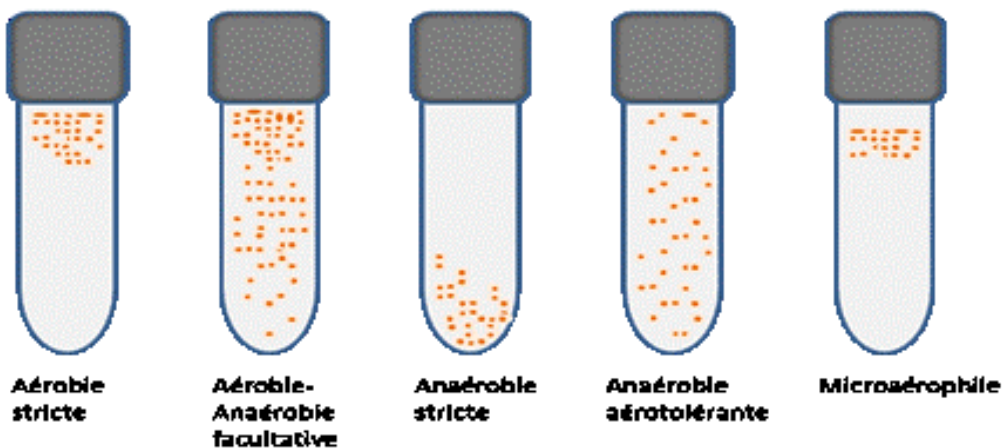
Refroidissez le tube en le maintenant en surfusion à 50°C au bain marie.

Réalisez l'ensemencement avec l'ensemencneur plastique chargé à partir de votre culture bactérienne distribuée.

Solidifiez le milieu ensemencé en le passant sous l'eau du robinet, puis mettez-le à l'étuve à 37 °C pendant 24 h.

J2

Lecture des tubes : la hauteur de la culture permet de déterminer le type respiratoire.

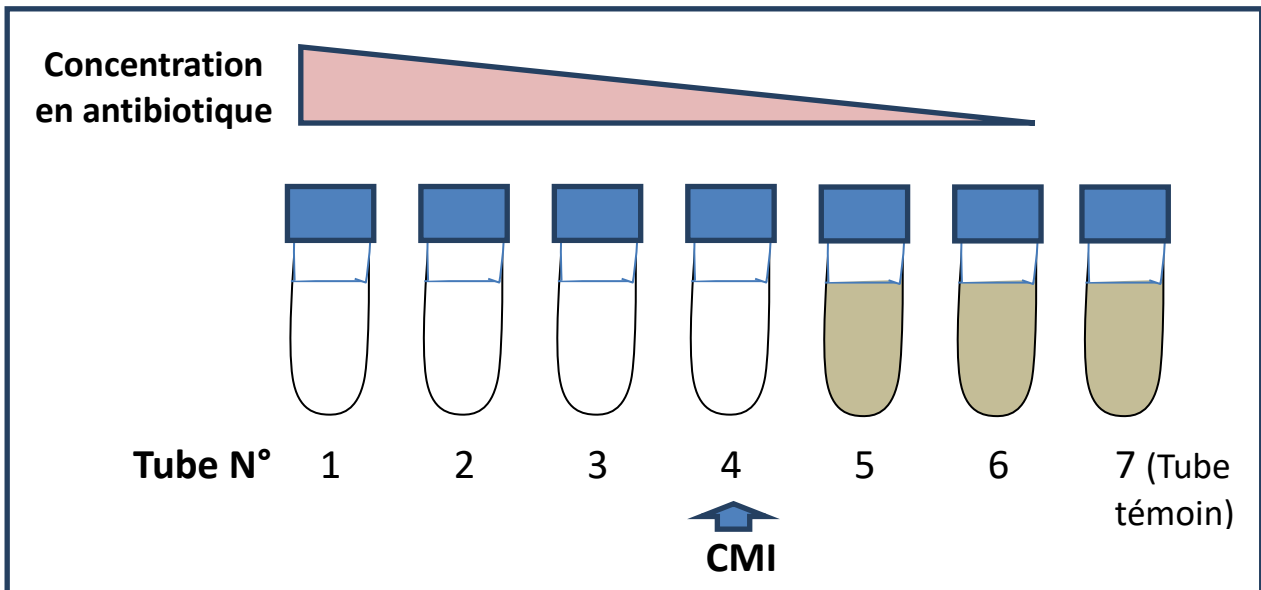


Interprétation

III. Détermination d'une Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Objectif : Déterminer la CMI de l'érythromycine pour votre bactérie.

Principe : La CMI est la plus petite concentration en antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance **visible** d'une bactérie. La méthode se fait par dilution successive en milieu liquide. On ajoute par dilution successive des quantités décroissantes d'antibiotique dans différents tubes puis chaque tube reçoit une même quantité de bactérie. Après 24 heures, le tube est soit trouble, la bactérie s'est multipliée, soit translucide, la bactérie ne s'est pas multipliée. Le premier tube translucide avant le tube dans lequel la bactérie a poussé permet de déterminer la CMI (en mg/L). Exemple :



L'antibiotique que vous allez utiliser est l'érythromycine en solution mère à 800 $\mu\text{g/ml}$ ou 8 $\mu\text{g/ml}$ suivant la souche bactérienne à étudier. C'est un antibiotique qui fait partie de la famille des macrolides.

Protocole :

J1

Répartissez 1 ml d'eau distillée stérile dans 7 tubes numérotés de 1 à 7.

Ajoutez 1 ml de la solution mère d'érythromycine dans le tube 1 et faite une dilution en série en prenant 1 ml du tube 1 que vous transférez dans le tube 2. Agiter. Opérer de même jusqu'au tube 6. Retirer 1 ml du contenu du tube 6.

Répartissez 1 ml d'un milieu de culture ensemencé avec la souche à étudier dans chacun des 7 tubes.

Mettez les tubes à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

J2 : Lecture des tubes. Interprétation.

IV. Examen microscopique direct

Il se réalise sur des lames propres, parfaitement dégraissées et nécessite l'utilisation du microscope (voir page 13-14)

A. Examen à l'état frais

1- Buts

C'est l'observation directe du prélèvement entre lame et lamelle. Il permet :

- de rechercher la présence de microorganismes dans le prélèvement.
- de rechercher la mobilité des bactéries.
- d'étudier la morphologie des bactéries (cocci ou bacilles), la morphologie des levures.

2- Technique

Cet examen doit être réalisé sur un prélèvement récent.

Pour une culture bactérienne (*réalisé par l'enseignant en J2*)

- déposer une goutte de culture en milieu liquide avec l'ensemenceur sur une lame.
- recouvrir d'une lamelle.
- observer rapidement à l'objectif à sec x40 (condenseur abaissé, diaphragme presque fermé).

Les bactéries mobiles se déplacent traversant le champ du microscope en tous sens. Une oscillation de la bactérie sur elle-même qui résulte d'un mouvement brownien n'est pas de la mobilité.

Pour les levures (*Un état frais sera réalisé en J2*)

- déposer une goutte de bleu lactique sur une lame de verre,
- prélever une ou deux colonies avec l'ensemenceur puis recouvrir la préparation d'une lamelle.

Le bleu lactique est un colorant vital qui pénètre les cellules vivantes, les colorant en bleu. La présence d'acide lactique dans ce mélange permet de tuer les levures.

- les observations seront à l'objectif à sec x40

B. Examen après coloration de Gram

1- Buts

La coloration de Gram permet :

- de distinguer deux types de paroi bactérienne : celle des bactéries à Gram positif qui prennent une coloration **violette** et celle des bactéries à Gram négatif qui prennent une coloration **rose** (voir schéma page 14).
- d'observer des modes de groupements particuliers chez certaines bactéries.

2- Technique

2-1. Réalisation du dépôt

- déposer une goutte de culture en milieu liquide avec l'ensemencement sur une lame.

2-2. Séchage du prélèvement

- réaliser la dessiccation du dépôt en mettant la lame sur une plaque chauffante.

2-3. Fixation de l'étalement

Verser quelques gouttes d'alcool sur le prélèvement et laisser sécher jusqu'à évaporation complète.

2-4. Coloration

Elle consiste à faire agir successivement 2 solutions colorantes (composition page 15) :

- recouvrir la lame de violet de gentiane, laisser agir 1 min.
- rejeter le colorant et recouvrir la préparation de lugol, laisser agir 2 min.
- laver à l'eau, bien égoutter.
- décolorer à l'alcool acétone (laisser couler sur la lame inclinée).
- laver rapidement à l'eau. Bien secouer la lame pour éliminer l'eau.
- recouvrir la lame de fuchsine, laisser agir 1 min.
- laver à l'eau, sécher en tamponnant avec du papier filtre.

3. Observation

- commencer l'étape de mise au point par l'objectif x40 afin de centrer la région à observer.
- à l'aide du révoluer, dégager l'objectif x40 et déposer une goutte d'huile à immersion,
- mettre en position l'objectif x100 et faire la mise au point uniquement avec la vis micrométrique.
- noter la morphologie et la coloration des bactéries.

LE MICROSCOPE

Le microscope est un outil de **grande précision** devant être utilisé **avec rigueur**, il comporte principalement :

Des oculaires : C'est le système optique proche des yeux. Les lentilles externes doivent être propres et régulièrement nettoyées avec un papier spécial.

Des objectifs : Ce sont les optiques au contact de la lame porte-objet et qui sont portés par un système pivotant appelé le **révolver**. Seul l'objectif x100 est dit à immersion, car il est nécessaire d'ajouter une goutte d'huile spéciale entre la lentille de l'objectif et la lame porte-objet pour effectuer les observations. Les autres objectifs (x4, x10, x20) sont dits « **à secs** » **et ne doivent en aucun cas être mis en contact avec l'huile à immersion.**

Une platine : ensemble mobile destiné à recevoir la lame porte-objet. Elle se déplace verticalement de manière rapide avec la **vis macrométrique**. L'affinage de la mise au point est réalisé avec la **vis micrométrique**.

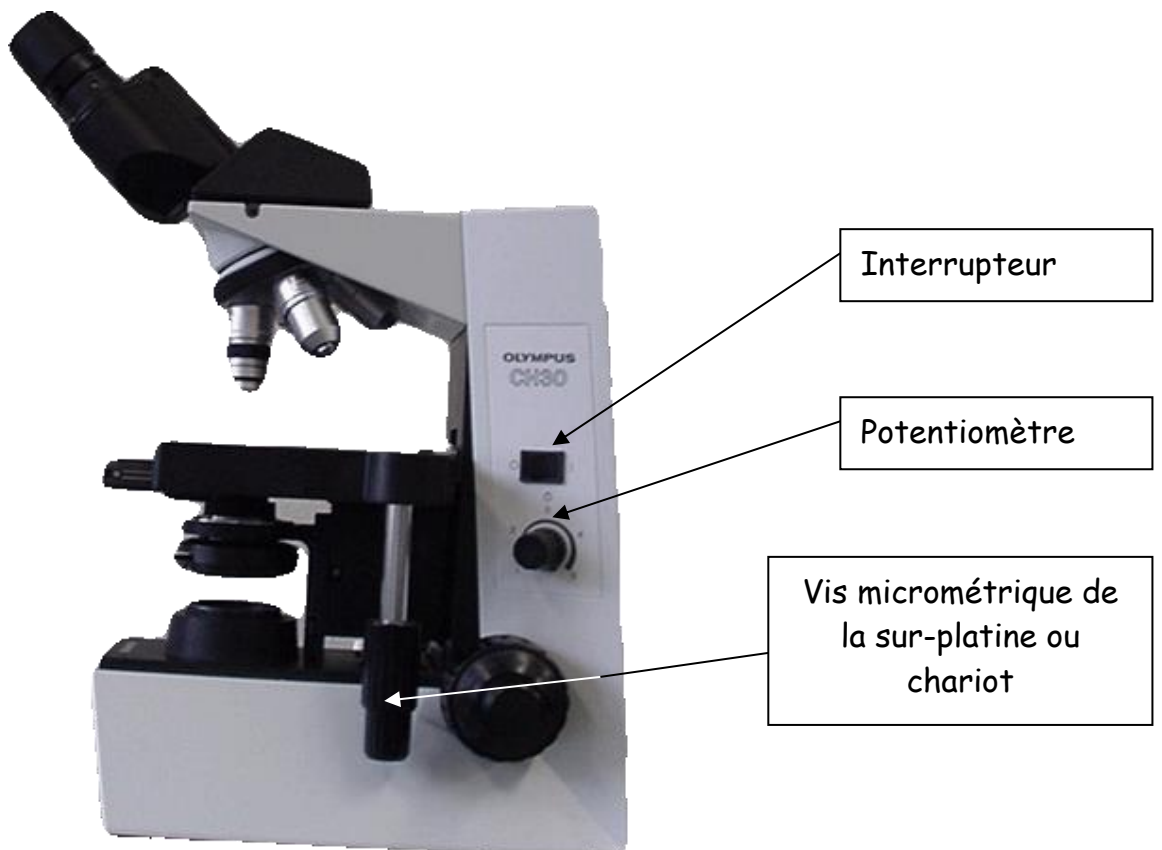
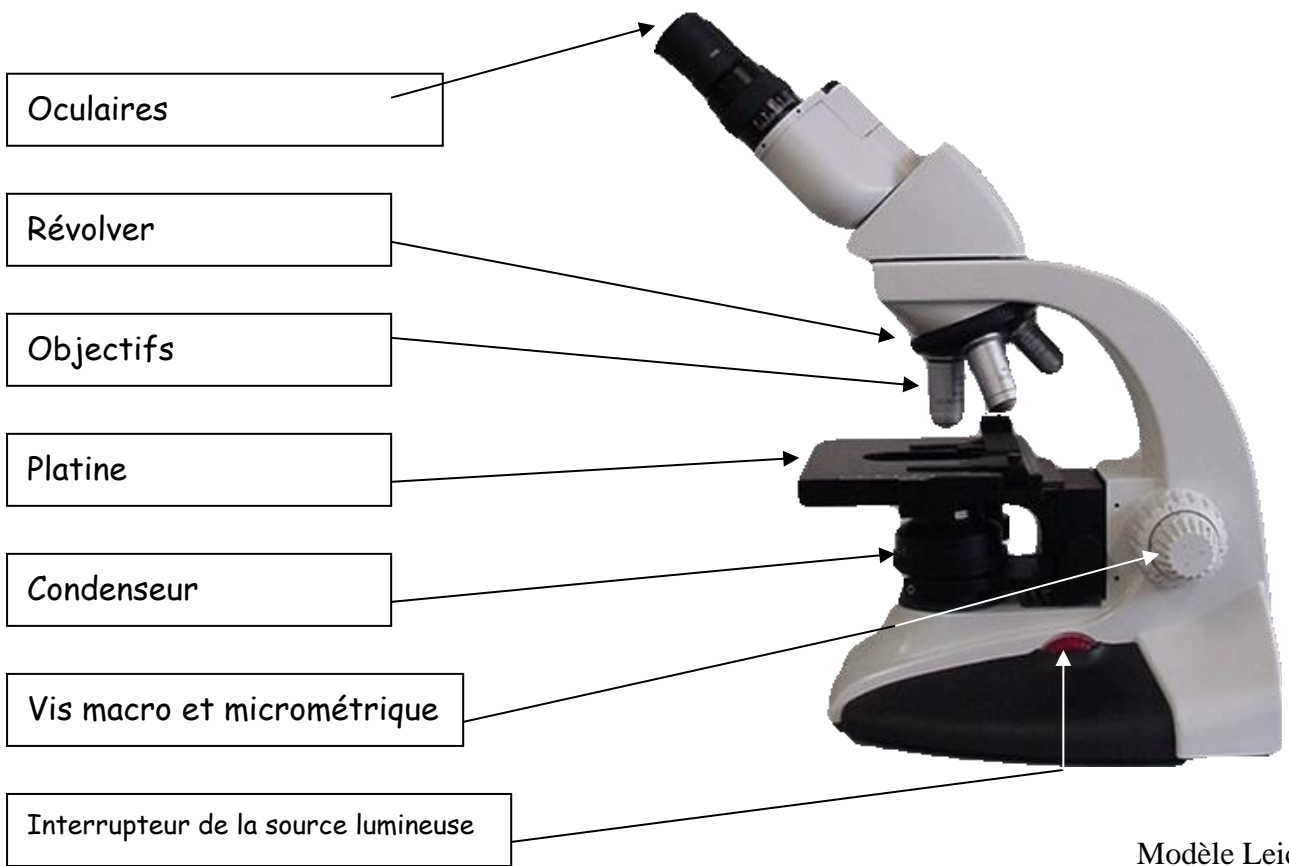
Un condenseur : système optique destiné à faire converger la lumière sur la préparation à examiner, il est situé sous la platine.

Une sur-platine ou chariot : c'est un ensemble mécanique permettant d'immobiliser la lame porte-objet et de la déplacer horizontalement dans les deux directions.

Une source lumineuse : constituée d'une ampoule de bas voltage 6-12 Volts.

Consignes particulières :

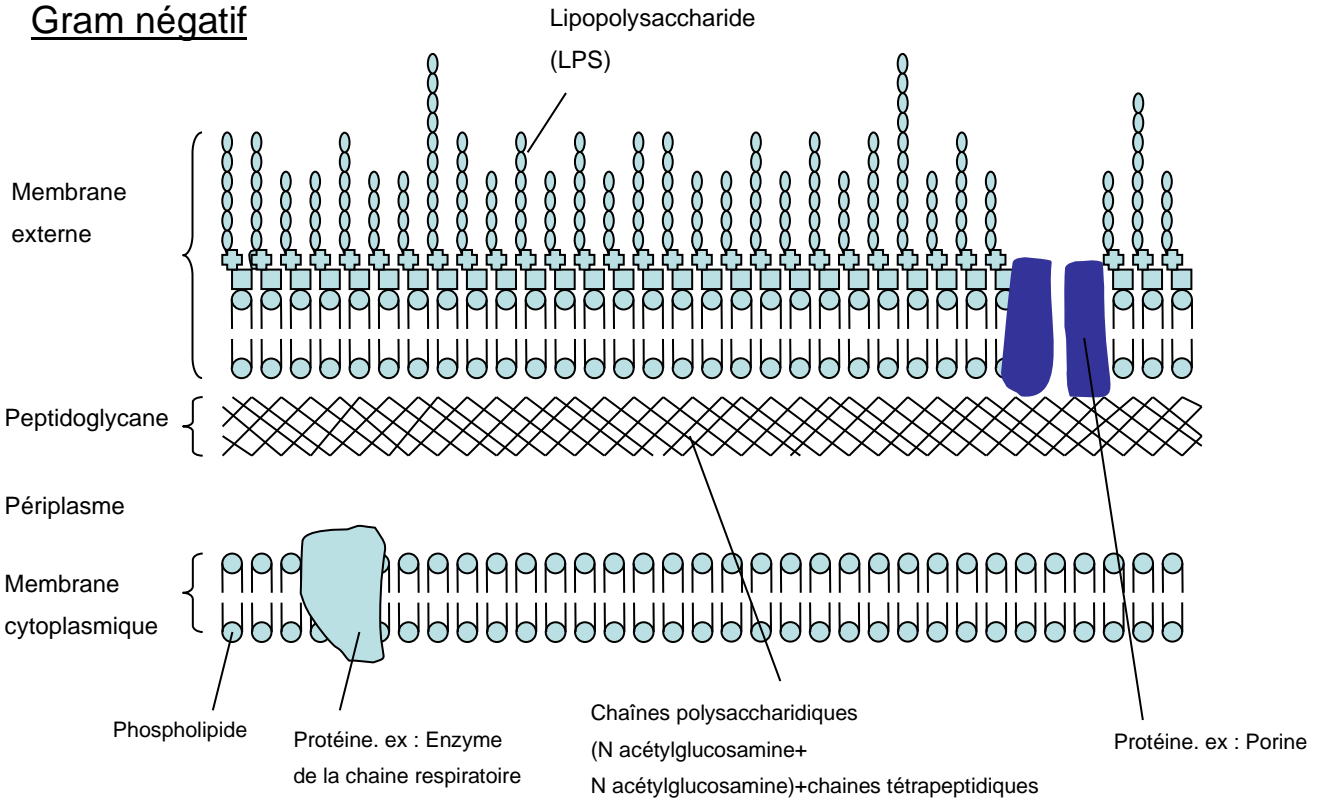
- Laisser le microscope allumé jusqu'à la fin des TPs, la lampe à halogène supportant mal des allumages/extinctions répétés.
- Apprendre à observer avec les deux oculaires pour obtenir un confort de vision.
- Avant l'observation, amener l'objectif au contact de la lame porte-objet. En observant dans les oculaires, éloigner lentement la platine avec la vis macrométrique jusqu'à l'observation d'une image. Terminer le réglage avec la vis micrométrique.
- Nettoyer l'objectif à immersion après chaque utilisation avec un essuyeur de précision (style Kimtech) pour éviter son encrassement.



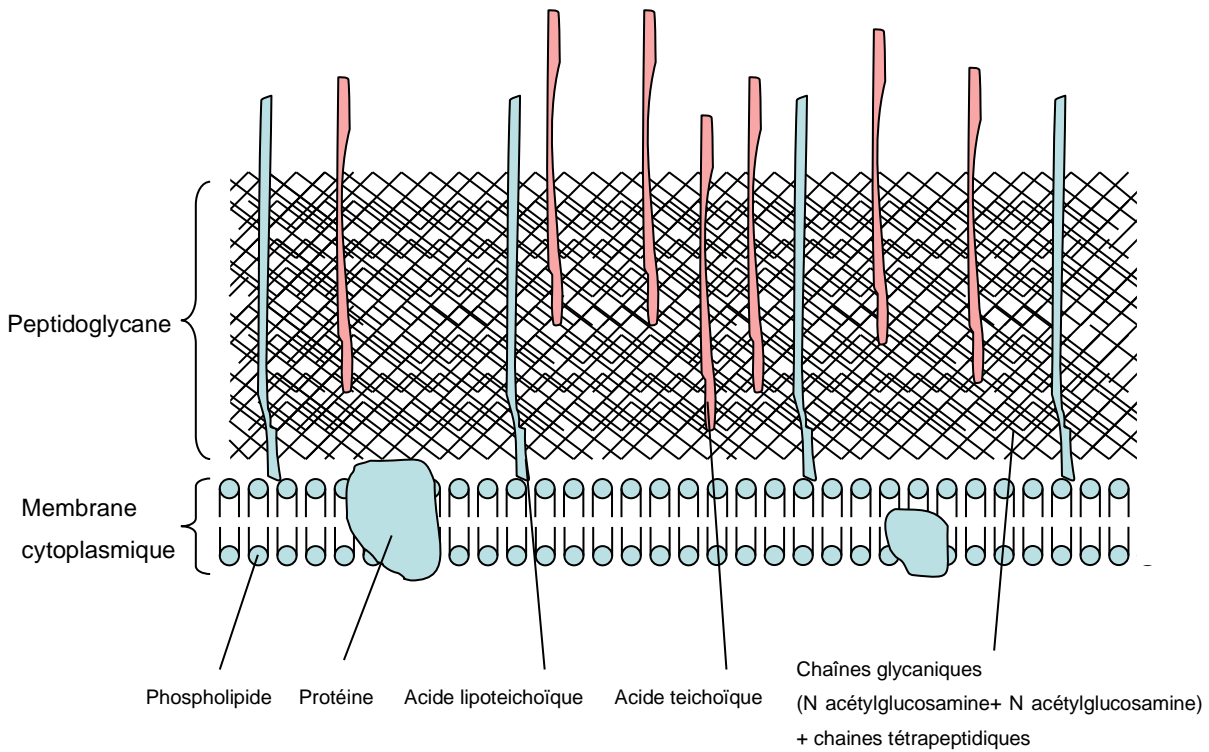
Modèle Olympus

Schéma des enveloppes bactériennes

Gram négatif



Gram positif

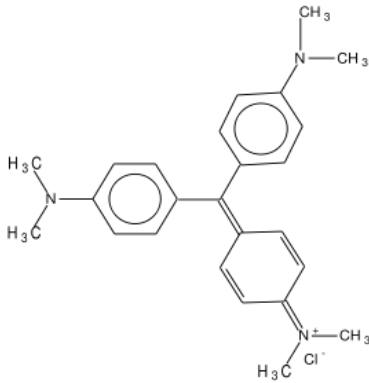


D'après Microbiologie générale et Santé, ed. ESKA.

Solutions utilisées pour la coloration de Gram

-Violet de gentiane

Le nom violet de gentiane est le nom commun donné au mélange de méthyle violets 2B, 6B et 10B selon que la molécule contient 4, 5 ou 6 groupements méthyle. On l'appelle parfois cristal violet ou violet de Paris.



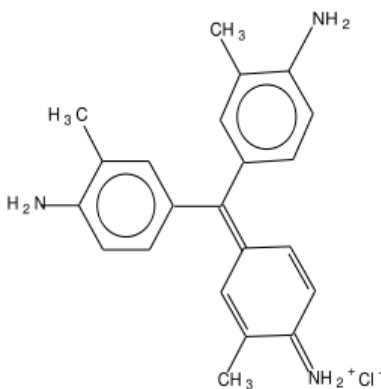
Structure chimique du méthyl violet 10B

- Lugol

Le lugol ou solution d'iodure de potassium iodée est une solution composée d'iode (I_2) et d'iodure de potassium (KI) en solution dans de l'eau qui doit son nom au médecin français J. G. A. Lugol.

- Fuchsine

La fuchsine est un colorant rouge violacé breveté par la société Renard Frères au milieu du XIX^{ème} siècle. Son nom est dérivé de Fuchs traduction de renard en allemand et évoquerait aussi la couleur des fleurs de fuchsia.



Structure chimique de la fuchsine

Isolement et identification d'éléments fongiques dans une suspension

Candida albicans (Robin) : Domaine des Eucaryotes, Règne des Eumycètes (champignon), Embranchement des Ascomycètes.

C'est une « levure », c'est-à-dire, un champignon unicellulaire se reproduisant par bourgeonnement (En : budding) ou par fission. Plus de 500 espèces sont connues et une trentaine sont habituellement retrouvées en pathologie humaine. *C. albicans* arrive en tête des isollements car c'est une levure saprophyte du tube digestif de l'Homme. Elle ne devient pathogène que sous l'influence de divers facteurs (âge, traumatismes, brûlures, diabète, immunodépression ...)

Sur milieux spéciaux, *C. albicans* donnent des spores appelées chlamydoconidies ou chlamydospores qui sont caractéristiques de cette espèce (Fig. 1).

Candida krusei est une autre espèce qui colonise les patients en Unité de Soins Intensifs/hématologie traités par du fluconazole (Triflucan®), un médicament antifongique car il est génétiquement résistant à cette molécule. Ces levures sont plus grosses et allongées.

La forme levure est la forme de dissémination du *Candida sp.*, la forme pseudomycélium se retrouve au niveau des lésions et c'est elle qui permet au champignon d'être pathogène en envahissant les tissus.

Vous pouvez avoir l'une des deux espèces dans la suspension, à vous d'essayer de faire le diagnostic car ces deux espèces sont différenciable par l'aspect au microscope et en culture sur milieu solide. En milieu hospitalier, en pratique journalière, le diagnostic d'espèce se fait sur milieu chromogène (Chromagar® en démonstration au TP) et/ou MALDI-TOF.

J1. MISE EN CULTURE

Vous trouverez devant vous une suspension fongique qui est soit une souche de *Candida albicans* soit une souche de *Candida krusei*. La suspension est à 0.5 McFarland ou 0.1 de DO à 625 nm, soit environ 10^6 levures/ml avec un N° _____.

La gélose à ensemercer est un milieu de Sabouraud (milieu pour culture fongique, levures et moisissures constitué d'agar, de peptone et de glucose à pH 6,5) additionné de chloramphénicol et de gentamycine (antibiotiques inhibant la culture des bactéries). Les bactéries ne cultivent pas sur ce milieu.

Inscrire votre nom, la date et le N° **sous** la boîte de Pétri. Mettre une petite goutte de suspension sur la gélose et avec un ensemeur, faire un isolement en quadrant. Mettre ensuite la boîte à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

J2. IDENTIFICATION DE LA LEVURE VIA SON ASPECT EN CULTURE ET AU MICROSCOPE

- Lecture de l'isolement

Noter l'aspect des culturesensemencées du Candida sp. :

Noter la présence, le diamètre et l'aspect des colonies (lisses ou fripées, sèches ou humides, plates ou bombées, la couleur) après 24 h d'incubation à 37°C.

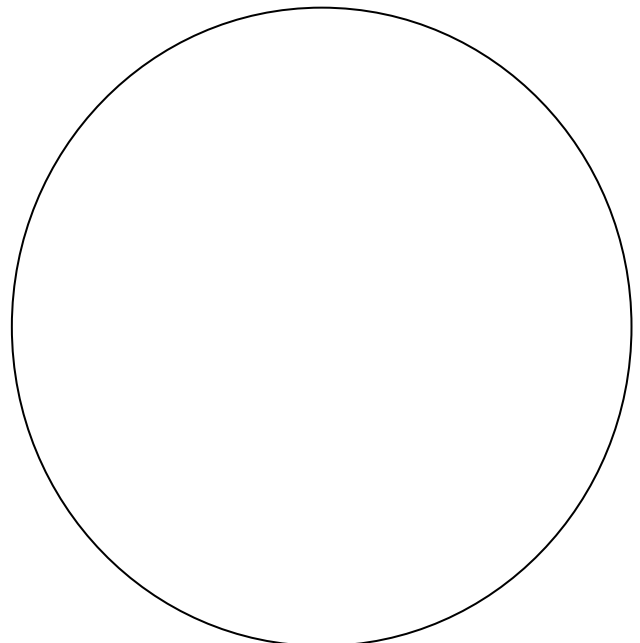
Bombée, brillante, muqueuse..... présomption de *C. albicans*

Mate, plate, sèche, parfois fripée..... présomption de *C. krusei*

- Examen microscopique

Faire un état frais d'après la technique page 10 ; noter la présence de levures bourgeonnantes (blastoconidies) (Fig. 1), la présence ou non de filament fait de levures successives (pseudomycélium ou pseudohyphe rudimentaire).

Faire un dessin léguendé avec 2 à 3 levures et filaments mycéliens en faisant ressortir l'épaisseur de la paroi. Noter le mode de bourgeonnement (bourgeonnement uni ou multipolaire).



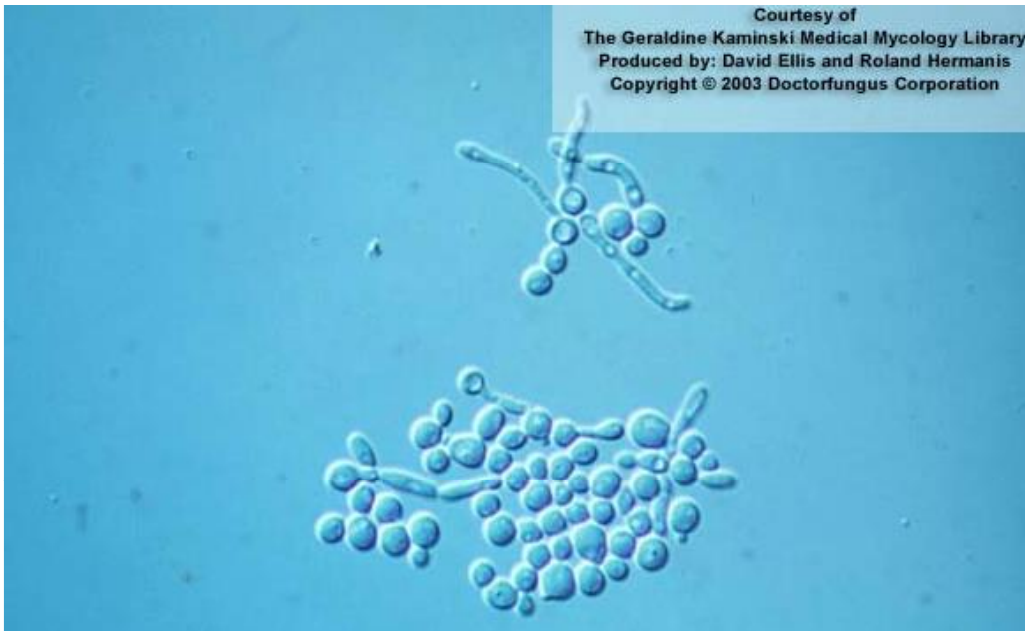


Fig. 1. Levures bourgeonnantes et pseudomycélium de *C. albicans*.

Pour information, la paroi est épaisse et riche en polysaccharides polymérisés α 1-4 (chitine) et β 1-3 et β 1-6 (glucanes) et **très différente par sa structure de la paroi des bactéries**, en raison de son épaisseur (Fig. 2).

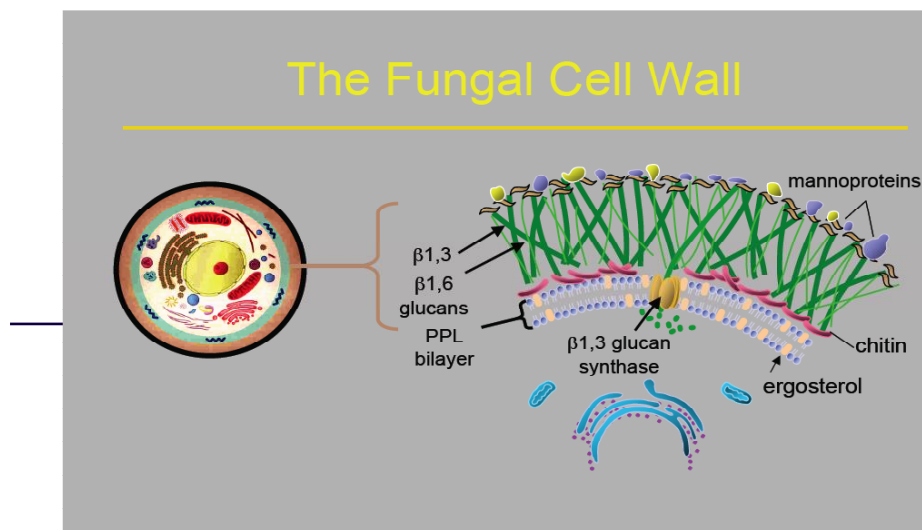


Fig. 2. La paroi fongique.

- Quel est le caractère quelquefois observé en culture qui permet à la levure du genre *Candida* d'être responsable d'infection fongique ?

- Conclusion : quelle est votre souche ?