

**KHADIR ABDELMOUNAIM
BENDAHOU MOURAD**

**BENBELAID FETHI
SENOUCI BEREKSI MOHAMED
ABDELOUAHID DJAMEL EDDINE**

TRAVAUX DIRIGÉS DE MICROBIOLOGIE



KHADIR ABDELMOUNAIM

BENBELAID FETHI

BENDAHOU MOURAD

SENOUCI BEREKSI MOHAMED

ABDELOUAHID DJAMEL EDDINE

TRAVAUX DIRIGÉS DE MICROBIOLOGIE



OFFICE DES PUBLICATIONS UNIVERSITAIRES

©Office des Publications Universitaires:

EDITION: 1.04.5901

I.S.B.N: 978. 9961.0.2160.6

Dépôt légal : 2^{eme} semestre 2018

Préface

L'enseignement des travaux dirigés est un support qui permet aux étudiants de faire des applications sur des connaissances acquises lors des cours et faciliter la compréhension de certaines informations qui, parfois, semblent difficiles à assimiler.

En effet, l'enseignement en classe est axé sur une pédagogie concrète, élaborée à partir de situations pratiques et professionnelles. De ce fait, les cours de travaux dirigés s'appuient le plus souvent sur des exercices et des études de cas à résoudre, ayant pour objectif de développer les compétences d'analyse et de réflexion des étudiants, ce qui facilite la compréhension du sujet.

La microbiologie est par elle-même une science d'application avec tous les aspects pratiques dans différents domaines. Elle est en interrelation forte avec d'autres disciplines telles que la médecine, la pharmacie, les sciences agroalimentaires, vétérinaires, cosmétiques, etc. De ce fait, il est nécessaire d'améliorer la qualité de l'enseignement de microbiologie par des documents de référence, adaptés aux pré-requis des étudiants qui facilitent leur recherche et stimule leur travail personnel.

C'est ce qui vient d'être fait avec cet ouvrage de travaux dirigés de microbiologie. Très enrichi et très diversifié en exercices, il adopte le plan des différents chapitres du programme de microbiologie générale et appliquée, et d'articles de revues scientifiques sous forme d'exercices originaux avec leurs solutions.

Cet ouvrage est destiné aux étudiants des universités suivant un parcours en sciences biologiques, étudiants des licences et masters en microbiologie, en sciences des aliments, en industries agroalimentaires et en industries pharmaceutiques ; ainsi qu'aux étudiants de médecine et de

pharmacie. Cet ouvrage est un outil précieux leur permettant de tester leurs connaissances en microbiologie fondamentale, alimentaire, environnementale, aux agents antimicrobiens et résistance aux antibiotiques, en génétique bactérienne et en biologie moléculaire.

Enfin, les problèmes et questions de ce livre concernent également les enseignants lors de préparations des sujets d'examens, ou désireux de perfectionner leurs connaissances en microbiologie et donc leur enseignement.

Note :

Dans ce livre tous les schémas et illustrations sont originaux dessinés à l'aide d'Adobe Illustrator version 10, Microsoft Paint ainsi que Microsoft Excel 2010

Chapitre 1 :

Microbiologie générale

Exercice N° 01 : Croissance et nutrition microbienne

Lors d'un isolement de certaines bactéries, un microbiologiste a préparé un milieu de culture en mélangeant plusieurs ingrédients : peptones, extraits de viande, extraits de levures et Agar. Ensuite, il a rajouté plusieurs vitamines à ce milieu.

1)

a. A quel groupe fait partie ce milieu d'isolement ?

b. Comment appelle-t-on les bactéries qui poussent sur ce milieu ?

2) Combien doit-il ajouté d'Agar par litre pour obtenir un milieu semi-solide ?

3) Avec quelles procédures peut-on avoir les peptones et les extraits de levures dans l'industrie des milieux de culture ?

Exercice N° 02 : Paramètres influençant la croissance « Température »

Selon la température optimale de la croissance (figure ci-dessous),

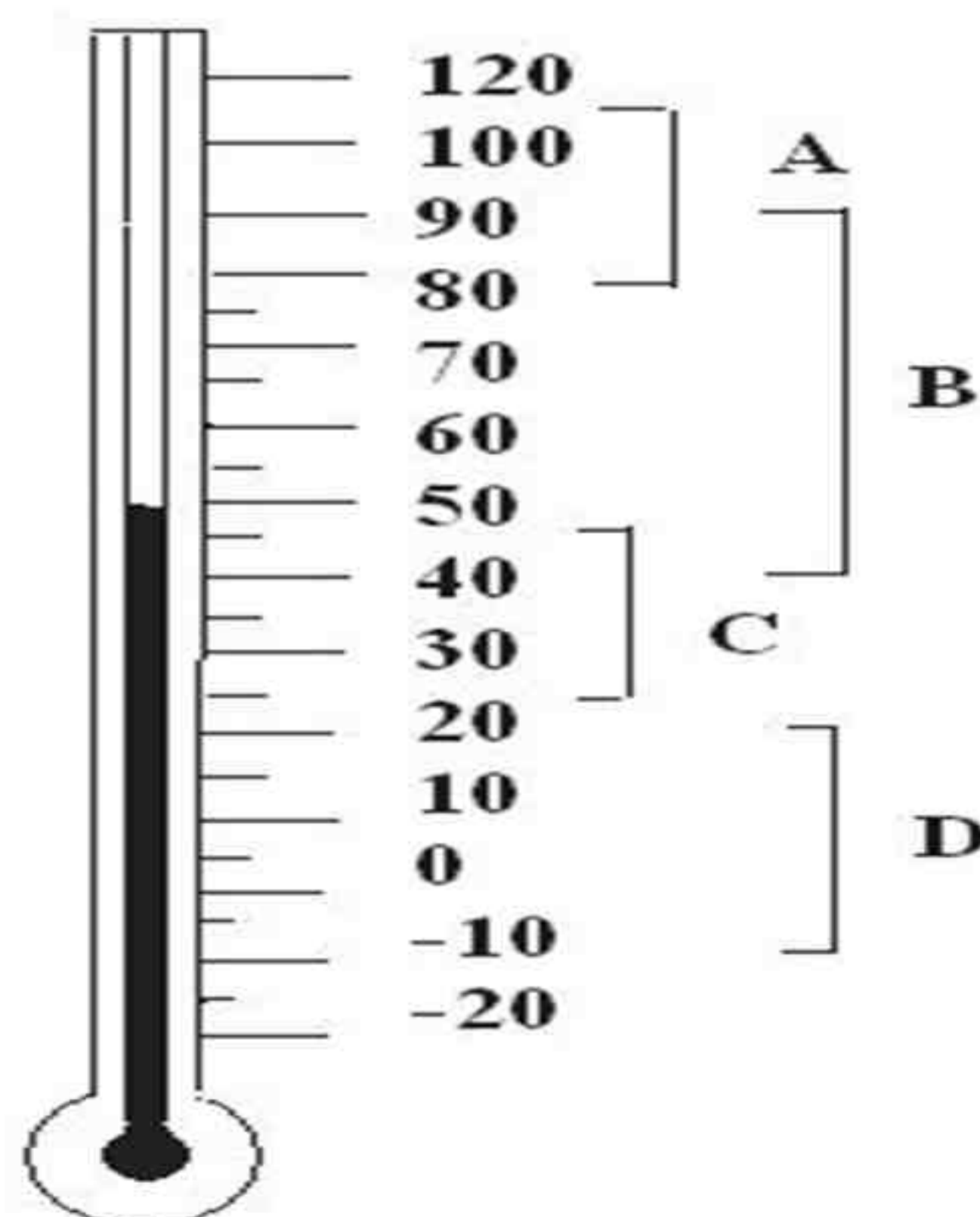


Figure 01 : Températures optimales de la croissance des différents groupes microbiens

- 1) Indiquez les groupes microbiens qui peuvent croître dans les intervalles A, B, C et D.
- 2) Les groupes A et B croissent à des températures élevées. De point de vue physiologique :
 - a- Expliquez comment ces souches arrivent-elles à vivre dans ces conditions ?
 - b- Donnez deux exemples, en expliquant leur intérêt en biotechnologie ?

Exercice N° 03 : Paramètres influençant la croissance « Température »

Ci-dessous un schéma qui montre des courbes de croissance de quatre espèces bactériennes différentes en fonction de la température :

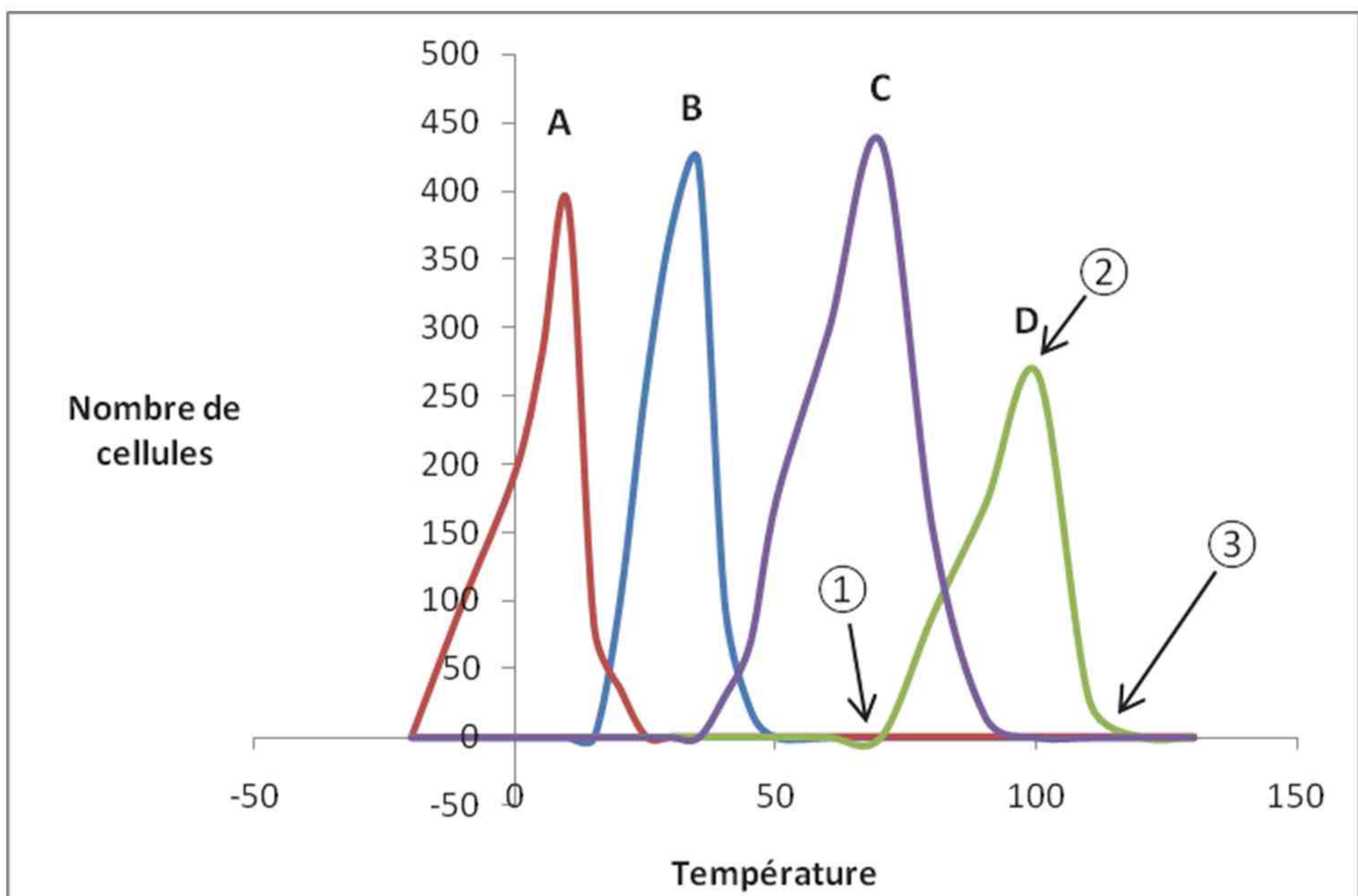


Figure 02 : courbes de croissance de quatre espèces bactériennes différentes en fonction de la température

- 1) Classifier les quatre espèces selon leurs croissances en fonction de la température

- 2) Donnez le nom de ①, ② et ③
- 3) Par quoi ② est caractérisé ? et pourquoi ?
- 4) Les espèces donnant les courbes A et D peuvent être classé avec un groupe de bactéries spécifiques, quelles sont ces bactéries ?
- 5) Quel est l'intérêt biotechnologique des espèces D, donnez un exemple connu.
- 6) Les espèces A peuvent constituer un danger pour la santé humaine, quel est ce danger ?

Exercice N° 04 : Paramètres influençant la croissance « pH, NaCl, pression »

Un laboratoire de contrôle des aliments a reçu des prélèvements de quelques microorganismes différents : des champignons qui attaquent le raisin, du genre *Plasmopara* connu sous le nom de mildiou provoquant la pourriture des raisins à des pH très bas, des *vibrio* qui colonisent des poissons à pH = 9 et qui supportent également des concentrations élevées en NaCl et des souches d'*Erwinia* qui affectent des plantes à des pH voisins de 7.

- 1) Comment peut-on appeler ces microorganismes selon le pH de l'environnement dans lequel ils ont été prélevés ?
- 2) Par rapport à la croissance en présence de NaCl à fortes concentrations, comment peut-on appeler les espèces de *vibrio* prélevées de la mère ?
- 3) D'autres espèces prélevées de la mère sont polyextrêmophiles et supportent des pressions élevées et des concentrations élevées de NaCl, comment peut-on appeler ces souches ?
- 4) En quelques lignes, définir les microorganismes extrêmophiles.

Exercice N° 05 : Paramètres influençant la croissance « courbe de croissance »

Dans une industrie de ferments lactiques, les chercheurs ont étudié la croissance des bactéries par rapport au temps. La croissance de ces bactéries est caractérisée par des phases différentes, après chaque durée de temps une nouvelle phase de croissance commence. Le schéma

ci-dessous représente les différentes phases de croissance par rapport au temps.

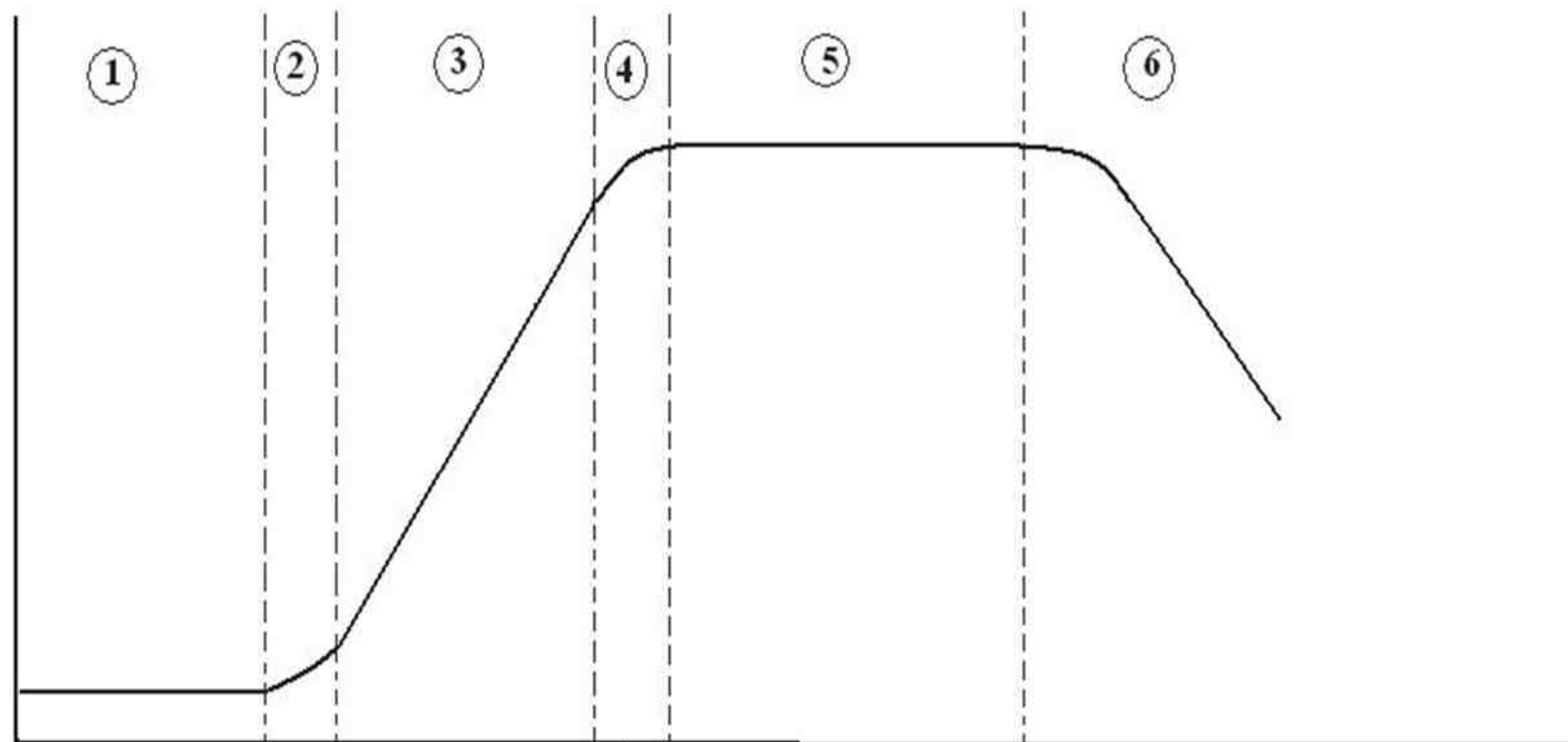


Figure 03 : Les différentes phases de croissance bactérienne par rapport au temps

- 1) Donnez les noms des phases de croissances numérotées
- 2) Que signifient un taux de croissance et un temps de génération ?
- 3) Pourquoi l'augmentation de la croissance ③ ne commence pas directement et nécessite une phase préliminaire ① ?
- 4) Par quoi est caractérisée la phase ③ ? et pourquoi dans plusieurs expérimentations microbiologiques on utilise les bactéries lorsqu'elles sont dans cette phase de croissance ?
- 5) Pourquoi dans la phase ⑤ y a une stabilité du nombre des bactéries malgré l'avancement du temps ?

6) Ces chercheurs souhaitent avoir une culture spécifique en éliminant les phases ⑤ et ⑥. Comment appelle-t-on cette culture ? comment peuvent-ils la réaliser ? et quel est l'intérêt scientifique et économique de ce type de culture ?

Exercice N° 06 : Dilutions

Un chercheur veut étudier les microorganismes dans un aliment. Pour cela, il prépare une solution mère avec une charge microbienne de 10^8 UFC/ml, il veut diluer cette préparation jusqu'à 10^6 UFC/ml.

- 1) quel est la procédure simple à faire ?
- 2) Afin de faire la dilution d'une manière plus rapide et avec une moindre utilisation de verrerie, donnez une méthode de dilution en utilisant une seule étape de dilution.

Exercice N° 07 : Dilutions

Lors de deux dénombrements microbiens, une solution mère a été préparée. La technique de dénombrement est réalisé comme suit ;

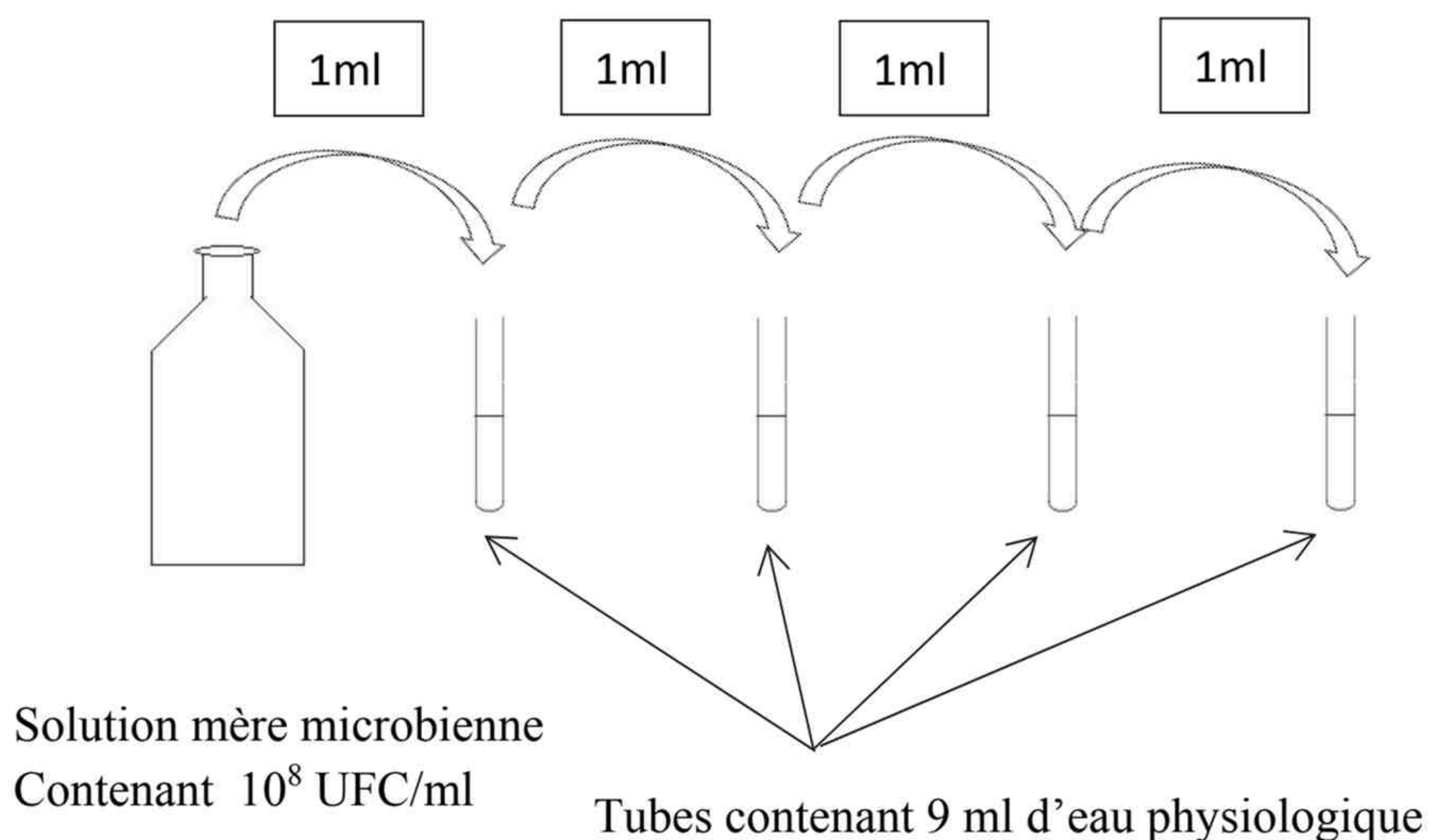


Figure 04 : Les déluions de la solution mère avant dénombrement

- 1) Quelle est la charge microbienne dans le quatrième tube ?
- 2) Combien doit-on faire de dilutions à partir de la solution mère pour avoir une charge microbienne dénombrable c'est-à-dire entre 30 et 300 colonies ?
- 3) En cas où il n'y a pas assez de tubes dans le laboratoire, alors que le manipulateur veut faire une dilution de 10^5 UFC/ml à partir de la solution mère en utilisant un seul tube seulement. Quel est le volume à prendre à partir de la solution mère ; et quel est le volume d'eau physiologique qui doit être mis dans le tube ?

Exercice N° 08 : Dilutions

Le schéma ci-dessous montre la procédure de six dilutions successives lors d'une analyse microbiologique.

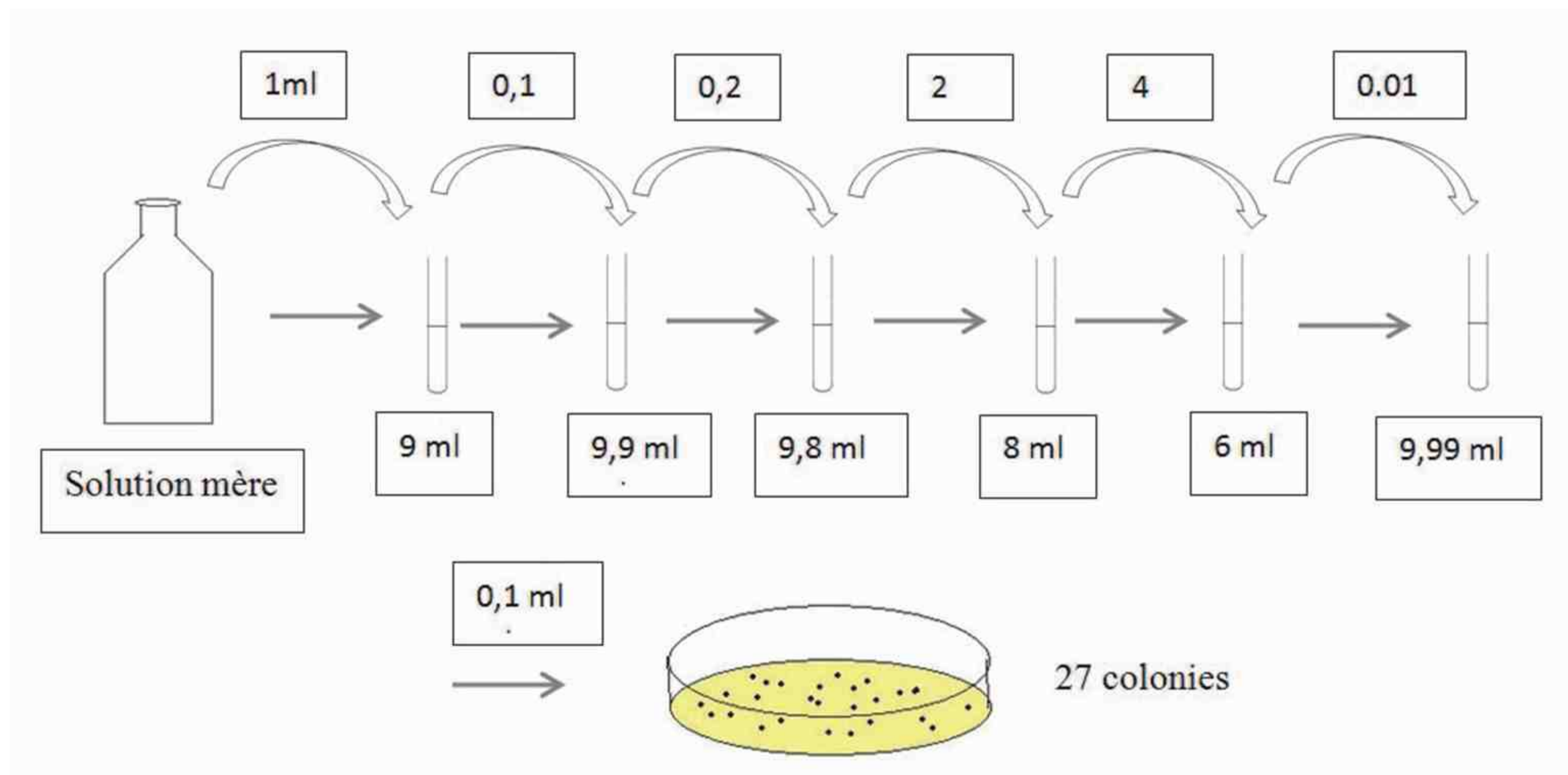


Figure 05 : Les différentes dilutions effectuées pour la solution mère

- 1) Déterminer chaque dilution par un rapport de division ;
 - a- Par rapport à la solution mère.
 - b- Par rapport à la dilution précédente.
- 2) Déterminez la concentration bactérienne dans la solution mère (UFC/ml).

3) Sachant que le volume de la solution mère est de 100 ml, quel est le nombre total d'UFC dans cette solution ?

Exercice N° 09 : Dilutions et dénombrement

Un microbiologiste a fait une série de dilutions dans l'eau physiologique stérile à partir d'une culture de *Pseudomonas aeruginosa* présente dans un tube de bouillon de trypticase soja. Les dilutions sont : 1/10, 1/5, 3/5, 1/60, 3/70, 1/3. A la fin, il a ensemencé un inoculum de 0,1 ml sur une boîte de gélose nutritive, l'inoculum est pris de la dernière dilution, le résultat était 17 colonies. Ensuite il a utilisé une autre méthode de dénombrement en mettant 10 µl de la dernière dilution sur une lame et la dénombrer sous le microscope. Le résultat était 5 bactéries.

- 1) Quels sont les volumes utilisés pour chaque dilution ?
- 2) Sachant que le bouillon initial a un volume de 10 ml, calculez pour chacune des 2 méthodes le nombre de bactéries présentes en UFC dans un millilitre et le nombre de bactéries présentes dans le bouillon initial.
- 3) Est-ce que les deux méthodes donnent le même résultat ?

Exercice N° 10 : Dilutions et dénombrement

Un patient était atteint d'une septicémie, pour cela le médecin a recommandé des analyses sanguines avec un dénombrement des cellules bactériennes. Le Tableau ci-dessous représente le résultat du dénombrement bactérien après hémoculture de plusieurs dilutions, sachant que l'on a ensemencé 0,1 ml de chaque dilution par boîte de milieu de culture :

Tableau 01 : résultats du dénombrement bactérien après hémoculture de différentes dilutions

Dilution	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴
Essai 1	indénombrable	520	106	13
Essai 2	indénombrable	507	114	2
Essai 3	indénombrable	477	92	3

- 1)
 - a. Pourquoi des dilutions ont été réalisées ?
 - b. Quelle dilution doit-on utiliser pour réaliser le dénombrement ?
 - c. Pourquoi doit-on utiliser cette dilution ? Expliquez.
- 2) Déterminez le nombre de bactéries par ml de sang (UFC/ml).
- 3) Pourquoi utilise-t-on l'unité UFC/ml et non pas bactérie/ml ?
- 4) Une deuxième méthode de dénombrement a été utilisée pour confirmer les résultats, c'est le dénombrement direct sous microscope, le résultat était 17×10^5 bactéries /ml. Comparer et interpréter les deux résultats.

Exercice N° 11 : Stérilisations

Un microbiologiste veut stériliser des instruments et des produits de laboratoire de microbiologie :

- Un flacon de 250 ml de milieu de culture.
- Des pipettes graduées en verre.
- 10 tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique.
- Une solution d'enzyme.

Indiquez pour chaque instrument ou produit le moyen de stérilisation adéquat.

Exercice N° 12 : Stérilisations

La stérilisation est parmi les pratiques courantes dans un laboratoire de microbiologie

- 1) La stérilisation a deux buts principaux, lesquels ?
- 2) Donner un exemple de stérilisation par chaleur humide et de stérilisation par chaleur sèche.
- 3) Pourquoi le microbiologiste doit travailler dans la zone de stérilité entre deux becs Bunsen ? dessinez un schéma de cette zone avec une légende.
- 4) Un fabricant de matériel de microbiologie veut stériliser des boîtes de Pétri en plastique, proposer un moyen adéquat qui permet de les stériliser sans les détruire.
- 5) Dans une expérimentation en microbiologie, un chercheur veut faire une stérilisation partielle d'une solution protéique, son objectif est d'éliminer tous les microorganismes de taille supérieure à 0,2 micromètre. Quelle est la méthode la plus adéquate pour stériliser cette solution ?

Exercice N° 13 : Pasteurisation

Le tableau ci-dessous montre les résultats du traitement d'un échantillon de lait par trois traitements thermiques pendant des durées différentes :

Tableau 02 : Nombre de microorganismes après exposition du lait par trois traitements thermiques différents

Traitements thermiques	(1) 65°C / 30 min	(2) 71,6°C/15 s	(3) 140°C /3 s
Nombre de microorganismes/ ml	4500	2700	00

Min : minutes ; s : secondes

- 1) Donnez le nom et la définition des trois traitements appliqués sur l'échantillon du lait.
- 2) Quels sont parmi ces traitements qui nécessitent une réfrigération du produit ? Et quelle est la durée de conservation du produit pour chaque traitement ?
- 3) Quelle est la différence entre ces traitements et la tyndallisation ? Donnez la définition de cette dernière.
- 4) Quels sont les germes pathogènes les plus dangereux qui contaminent le lait cru ainsi que les maladies qu'ils causent ?

Exercice N° 14 : Etude macroscopique et coloration de Gram

En étudiant deux bactéries différentes par microscopie électronique, un chercheur a remarqué que la première (**A**) a une forme sphérique et une paroi épaisse, alors que la deuxième (**B**) a une forme allongée en bâtonnet et une paroi mince avec une membrane externe.

- 1) Après coloration de Gram, quelle est la bactérie à Gram positif et quelle est la bactérie à Gram négatif ?
- 2) Comment appelle-t-on la forme sphérique et la forme allongée ?

Après ensemencement, la bactérie (A) a donné des colonies bombées et jaunes dorées sur un milieu de base tandis que la bactérie (B) a donné des colonies envahissantes pigmentées en vert sur un milieu différentiel,

3) Comment appelle-t-on cette étude ?

4) Est-ce que les pigmentations sont vraies pour les deux bactéries ? Et pourquoi ?

Exercice N° 15 : Différences structureaux entre Gram positifs et Gram négatifs

Le schéma ci-dessous représente deux bactéries de structure externe différente.

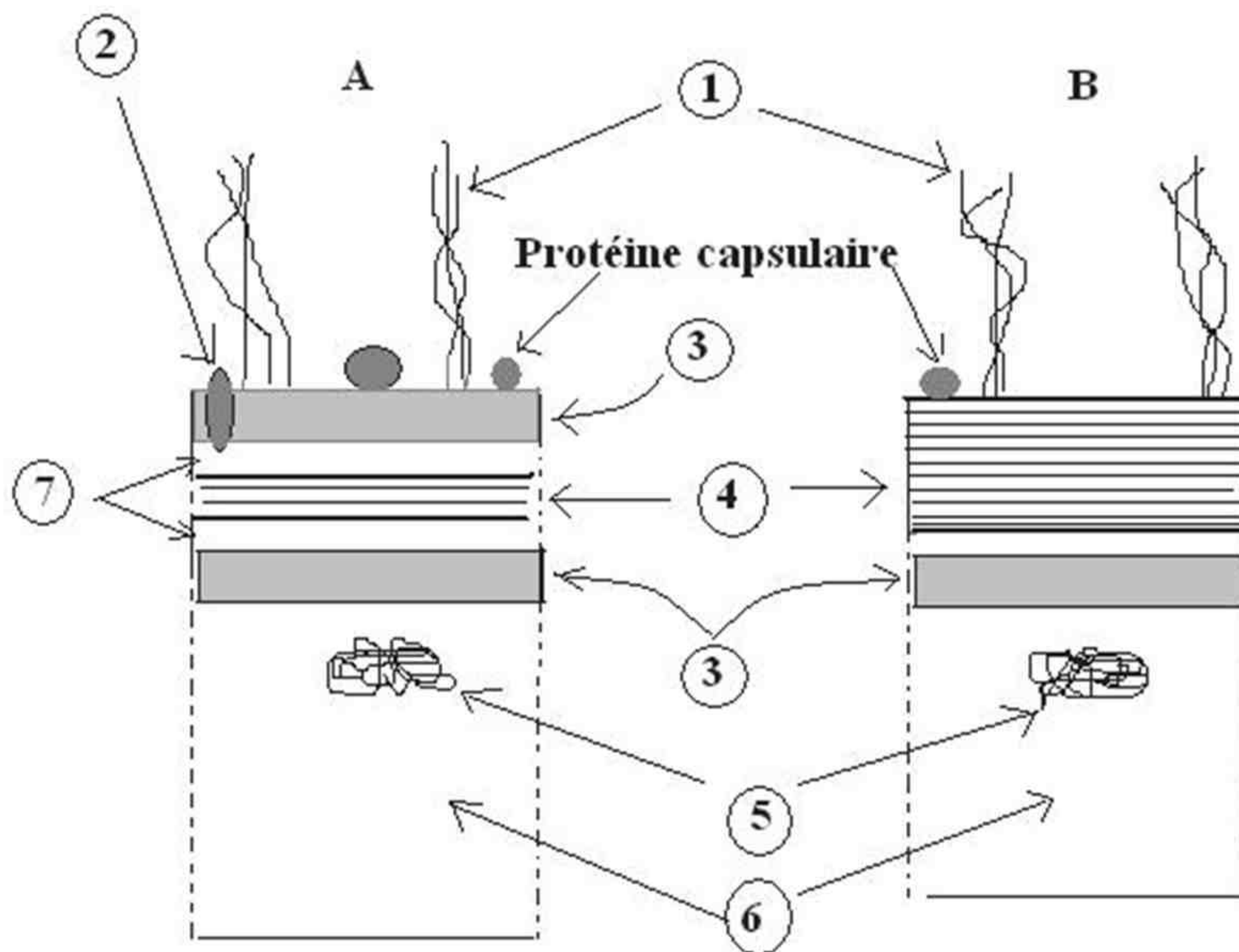


Figure 06 : Comparaison de la structure externe de deux types de bactéries différentes

1) Donnez le nom des éléments numérotés ?

2) Donnez le nom des structures A et B.

- 3) Quelles sont les fonctions principales de L'élément ③
- 4) L'élément ③ présente des différences de structure entre les procaryotes et les eucaryotes, quelles sont ces différences ?
- 5) Quels sont les agents antimicrobiens qui altèrent L'élément ③ ?
- 6) L'élément ④ joue un rôle important dans le maintien de la physiologie cellulaire de la bactérie :
 - a. De quoi est-il constitué ?
 - b. Dessinez un schéma de L'élément ④
 - c. Quel est son rôle ?
 - d. Comment appelle-t-on les bactéries dépourvues de l'élément ④ ?
 - e. Est-ce que les bactéries dépourvues de cet élément peuvent se multiplier ?

Exercice N° 16 : Milieux de culture

Un microbiologiste veut faire un antibiogramme, pour cela il a besoin de préparer une gélose dite de Müller-Hinton. Cependant, dans son laboratoire il n'a que le bouillon de Müller-Hinton. Un de ses collègues lui proposa d'ajouter un ingrédient qui lui permettra d'obtenir une gélose à partir de ce bouillon.

- 1) Quel est cet ingrédient ?
- 2) Combien de grammes doit-il ajouter pour la préparation d'un litre de cette gélose ?
- 3) Parmi les constituants des milieux de culture, les extraits de levures et les peptones ;
 - a. Comment peut-on obtenir ces composés ?
 - b. De quoi sont-ils constitués ?

Exercice N° 17 : Milieux de culture

Un bactériologiste veut préparer un milieu qui s'appelle « mannitol-mobilité », qui contient une quantité de (5 à 7,5 g.L⁻¹) d'agar-agar,

- 1) A quoi sert ce milieu de culture ?
- 2) Quelle est la consistance de ce milieu ?
- 3) Ce milieu contient un indicateur coloré, lequel, et comment il change de couleur ?

Exercice N° 18 : Terminologie

En microbiologie, plusieurs termes spécifiques sont utilisés.

- 1) Définir les termes suivants : Ensemencement, Inoculum, Incubation, Culture pure ?
- 2) Quelle est la différence entre une espèce bactérienne et une souche bactérienne ?
- 3) Quel est l'intérêt de l'isolement des microorganismes ?

Exercice N° 19 : Techniques d'ensemencement et de dénombrement

On veut faire le dénombrement bactérien dans un aliment solide. Pour cela, on a préparé une dilution initiale à partir de cet aliment.

- 1) Quel est la méthode d'ensemencement adéquate pour faire le dénombrement des bactéries dans cette dilution initiale ? expliquez.
- 2) Après ensemencement et incubation, on a obtenu une culture très dense (trop chargée). Quelle est la méthode à faire à la dilution initiale pour avoir une culture moins dense dans un deuxième ensemencement ?
- 3) Quel est le nombre de bactéries recommandé pour faire le dénombrement ?

Exercice N° 20 : Dénombrement par la cellule de Thoma

L'analyse urinaire d'un patient atteint d'une infection a permis de dénombrer les cellules bactériennes. Le résultat du dénombrement était 10^4 cellules vivantes par ml d'urine. Le patient a subi un traitement avec l'imipenème pendant deux jours ensuite une nouvelle analyse urinaire a été faite avec un dénombrement des cellules en mettant un volume de 0,01 ml à la surface d'une cellule de Thoma. Après un temps de 30 minutes, la lame est examinée au microscope, au fort grossissement.

- 1) Donnez la définition de la cellule de Thoma.
- 2) Pourquoi faut-il attendre un temps de 30 minutes avant le comptage sur microscope ?
- 3) Calculer la concentration des cellules par ml d'urine sachant qu'on a compté 200 cellules dans 10 petits carrés dans la solution.
- 4) Après le comptage des cellules les laborantins ont fait une coloration au bleu de méthylène des cellules, 70% ont été coloré en bleu. Quel est la signification de ce résultat ?

Exercice N° 21 : Dénombrement NPP

Lors d'une analyse d'eau de rivière, un dénombrement bactérien a eu lieu, des quantités d'eau ont été prélevées et transportées d'une manière aseptique de trois rivières. Des séries de dilutions de 10^{-2} à 10^{-7} ont été préparées dans l'eau physiologique à partir de chaque échantillon. Ensuite, 1 ml de chaque dilution préparée (10^{-1} à 10^{-7}) a étéensemencé dans le milieu BLBVB à raison de trois répétitions pour chaque dilution. Après incubation à 37°C , les tubes positifs sont détectés par la présence d'un trouble, et parfois de présence aussi du gaz dans la cloche de Durham. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous :

Tableau 03 : Résultats d'ensemencement du milieu BLBVB de l'eau de trois rivières avec des dilutions différentes

Dilution	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷
Rivière 1	+++	+++	++ -	+ - -	---	---	---
Rivière 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Rivière 3	+++	+++	+++	+++	+--	---	---

- 1) Quel est l'intérêt de l'utilisation de ce milieu lors des analyses bactériologiques ?
- 2) Quels sont les significations de la présence du trouble et la présence du trouble + gaz ?
- 3) Donnez la définition de la méthode de dénombrement NPP.
- 4) En utilisant le tableau de Mac Crady, calculez pour chaque type de rivière, le nombre de germes par millilitre d'eau.

Exercice N° 22 : Densité optique et dénombrement

Afin de réaliser un dénombrement bactérien, un microbiologiste a fait des mesures de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde rouge (630 nm). Pour cela, il a fait d'abord une série de dilutions de la suspension initiale (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) (tableau 4).

Tableau 04 : les volumes et les facteurs de dilutions effectués

Volume de la suspension mère (ml)	Volume d'eau physiologique (ml)	Dilutions
3	0	0
		1/2
		1/4
		1/8
		1/16

1) Complétez le tableau 04 en calculant les volumes nécessaires pour faire chaque dilution.

Le manipulateur a fait un dénombrement en comptant les colonies sur boîtes. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 05 :

Tableau 05 : Nombre de bactéries par rapport à la densité optique

Absorbance	Nombre de cellules par $\mu\text{l} \times 1000$
0,11	0,7
0,22	1,4
0,46	2,8
0,81	5,5

2) Construire le graphique **Absorbance = f [cellules]**

3) La DO mesuré d'un échantillon est égale à 0,54. Déterminer à partir de la courbe d'étalonnage le nombre de cellules.

4) Est-ce qu'il y a d'autres méthodes simples qui permettent de dénombrer les cellules bactériennes pour vérifier ces résultats ?

Exercice N° 23 : Microorganismes eucaryotes et procaryotes

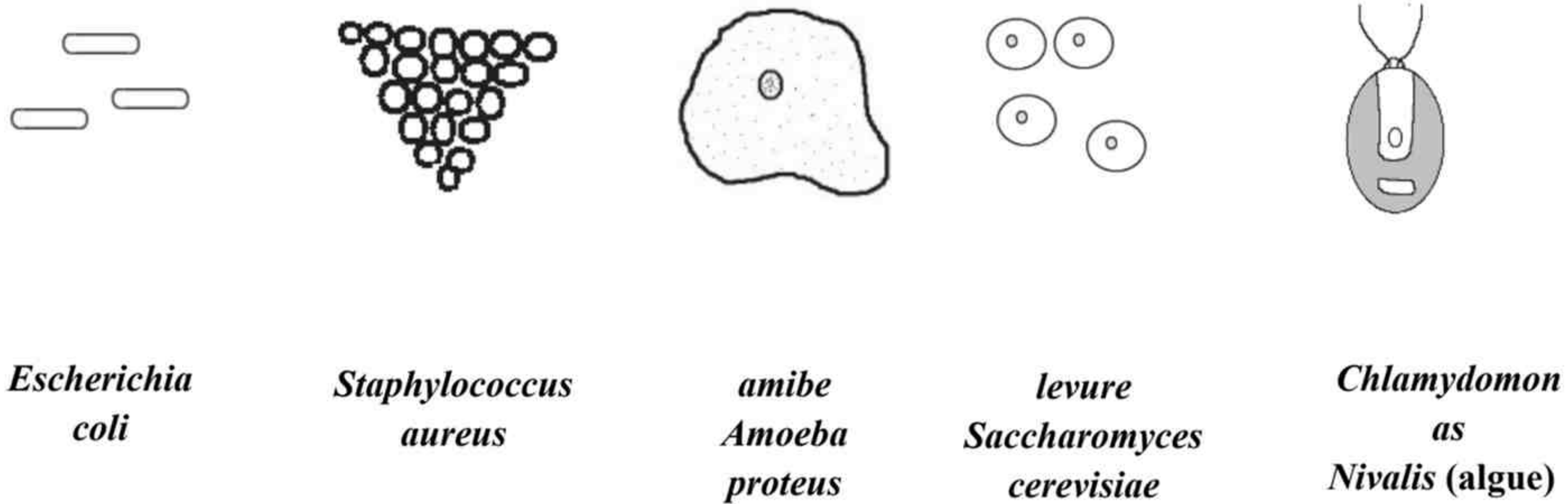


Figure 07 : Quelques types de microorganismes unicellulaires

Le schéma ci-dessus regroupe plusieurs types de microorganismes unicellulaires ;

- 1) Dans un tableau, mentionnez les caractéristiques générales de chaque microorganisme, en décrivant la présence ou l'absence de paroi, type de microorganisme eucaryote ou procaryote, type de Gram, présence ou absence de l'enveloppe nucléaire.
- 2) Quelle est la signification des termes procaryotes et eucaryotes.

Exercice N° 24 : Structure bactérienne

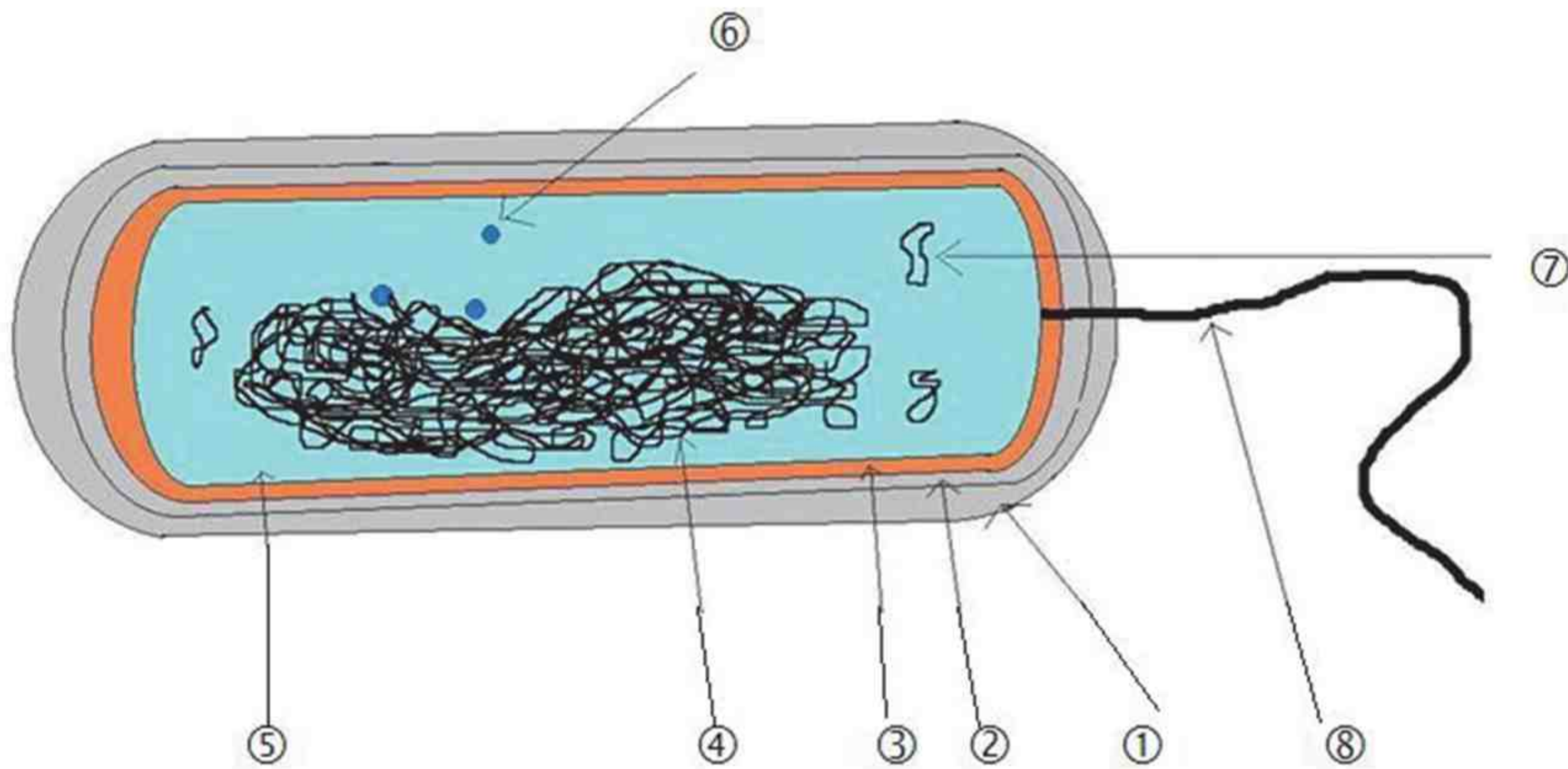


Figure 08 : schéma représentant la structure d'une bactérie

Ci-dessus, un schéma d'une bactérie, sachant que ① est une enveloppe qui permet à la bactérie de se défendre contre la phagocytose, alors que ② est un élément important qui permet de classer la bactérie lors de coloration de Gram, tandis que ⑥ est un complexe ribonucléoprotéique qui permet de synthétiser les protéines en décodant l'information contenue dans l'ARN messager. A partir du schéma ci-dessus ;

- 1) Donnez le nom de chaque élément numéroté.
- 2) Comment peut-on détecter la présence de ① au laboratoire ?
- 3) Définir, et donner le rôle de ⑦ ?
- 4)
 - a. Quel est la fonction de ⑧ ?
 - b. Quelle est sa structure ?
 - c. Comment peut-on le détecter au laboratoire ?
 - d. Quel sont les différentes dispositions de ⑧ ? (dans un tableau, préciser le nom de chacune des dispositions avec schéma).

5)

a. Quel est le composant principal de l'élément ② ?

b. De quoi il est constitué ce composant ?

c. Comment peut-il différentier les bactéries en deux groupes lors de coloration de Gram, expliquez ?

Exercice N° 25 : Différentes formes et modes de regroupement des bactéries

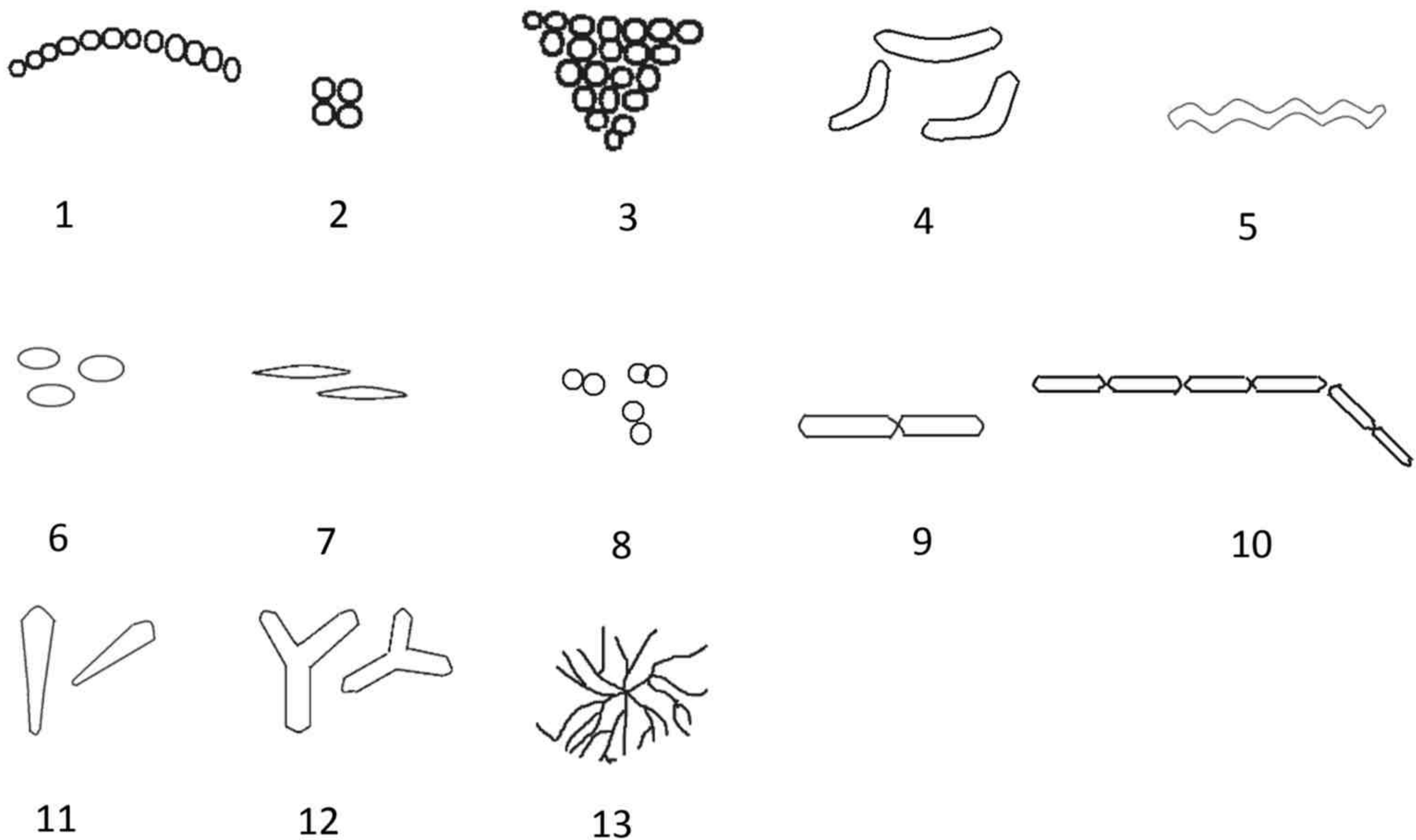


Figure 09 : Les différentes formes des bactéries

La figure ci-dessus (figure 09) montre les différentes formes des bactéries.

1) Donnez le nom de chaque forme numérotée avec une définition.

2) Que veut dire un mode de regroupement des bactéries ?

3) Compléter le tableau suivant en indiquant le numéro de la forme pour chaque espèce selon la figure 09.

Tableau 06 : morphologies correspondantes de chaque espèce bactérien de la figure 09

Bactérie	forme
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Yersinia pestis</i>	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	
<i>Fusobacterium fusiforme</i>	
<i>Treponema pallidum</i>	
<i>Streptococcus spp.</i>	
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	
<i>Micrococcus spp.</i>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	
<i>Vibrio cholerae</i>	
<i>Streptomyces spp</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

Exercice N° 26 : Temps de génération

Un volume de 10 µl contenant 100 bactéries d'une espèce X (comptées au microscope optique), a étéensemencé dans deux tubes contenant le milieu de Trypticase Soja. Ensuite, les deux tubes ont été incubés à des températures différentes, le premier à 37°C tandis que le second à 15°C.

Après 2 heures d'incubation et en utilisant le dénombrement microscopique des bactéries, on obtient les résultats suivants :

Tube 1 : 400 bactéries dans 5 μ l

Tube 2 : 800 bactéries dans 1 μ l

- 1) Donner la définition du temps de génération d'une bactérie.
- 2) Calculez le temps de génération à 37°C et 15°C. Expliquez.
- 3) D'après les résultats, comment qualifie-t-on ces bactéries, expliquez ?

Exercice N° 27 : Type respiratoire

Quatre espèces bactériennes différentes ont été ensemencées par piqure centrale dans le milieu Viande-Foie. Après incubation les espèces ont poussé dans des endroits différents. Le résultat est présenté par la figure suivante (figure 10).

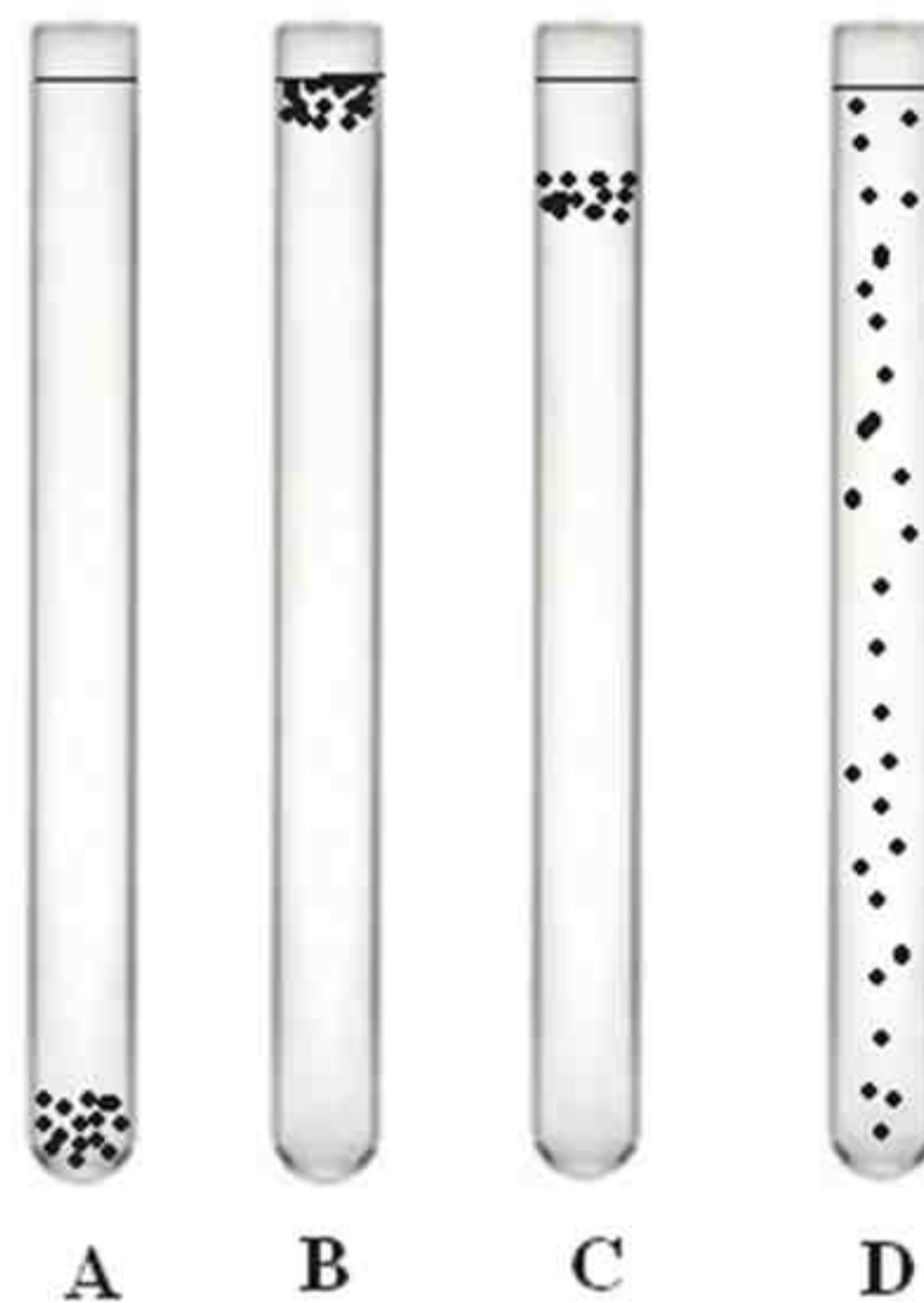


Figure 10 : résultat d'ensemencement du milieu Viande-Foie

- 1) Quel est le but principal de l'utilisation de cette gélose ?
- 2) Quelle est la consistance de cette gélose ?
- 3) Que constatez-vous de la croissance des espèces A, B, C et D ?

Exercice N° 28 : Sporulation

Le schéma ci-dessus est une spore bactérienne à l'état libre ;

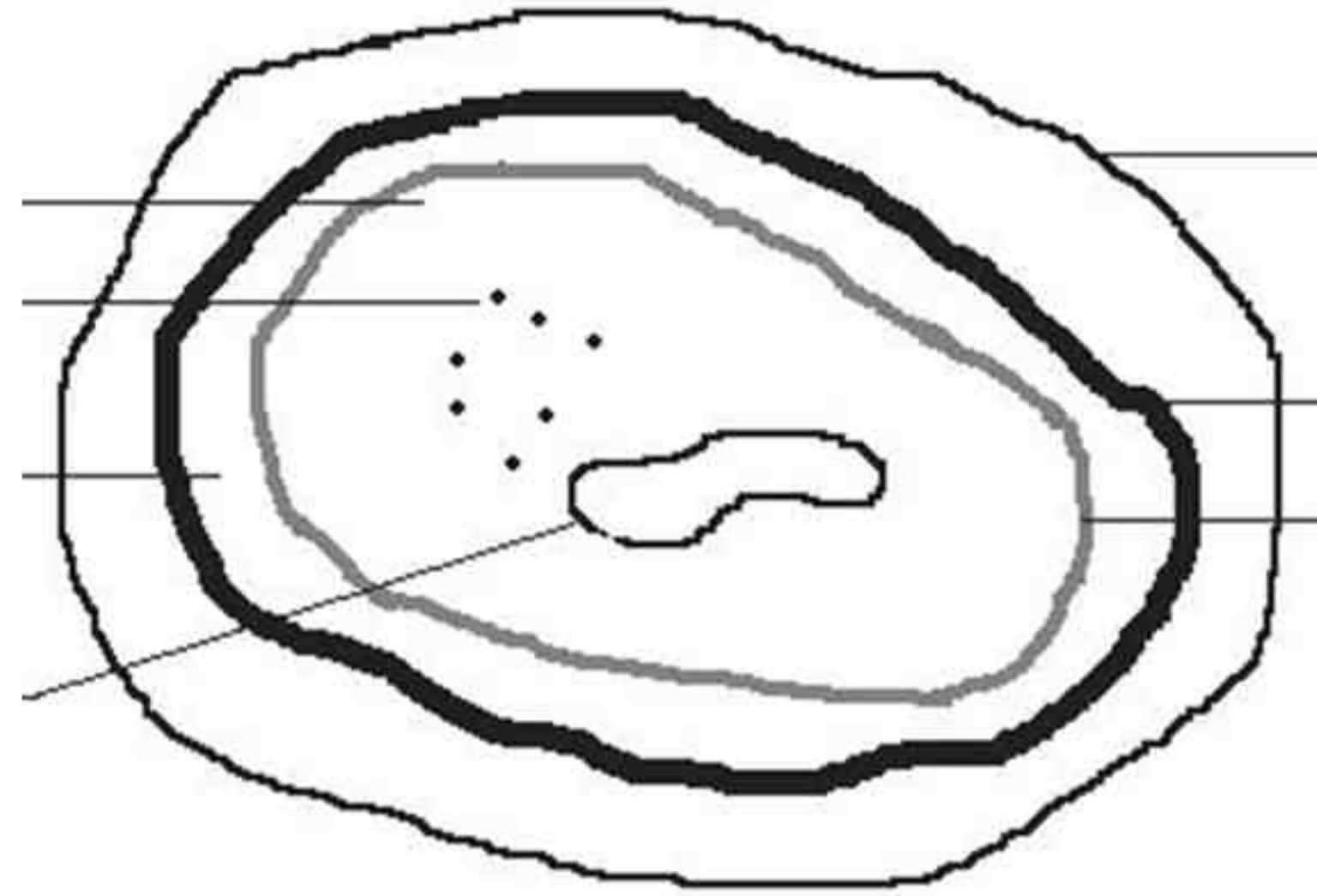


Figure 11 : Schéma d'une endospore

- 1) Complétez la légende du schéma.
- 2) Quelles sont les différentes formes et positions de spores ? (réponse avec dessin)
- 3) Dessinez le cycle de sporulation de *Bacillus subtilis*.
- 4) Quel est la raison pour laquelle une bactérie sporule ? Est-ce que ce phénomène est commun chez toutes les espèces bactériennes ?
- 5) Donnez deux exemples de bactéries sporulées à intérêt médical et alimentaire avec une courte définition.
- 6) Décrivez une technique permettant de mettre en évidence les spores sous microscope optique ?

Exercice N° 29 : Biofilm

Le schéma ci-dessous représente deux états de vie différents des bactéries, l'état B est un rassemblement d'un grand nombre de bactéries, formé d'au moins trois espèces différentes, collées avec une substance qui les adhèrent les unes aux autres et les couvre de l'extérieur. L'état A est formé de quelques bactéries à l'état libre.

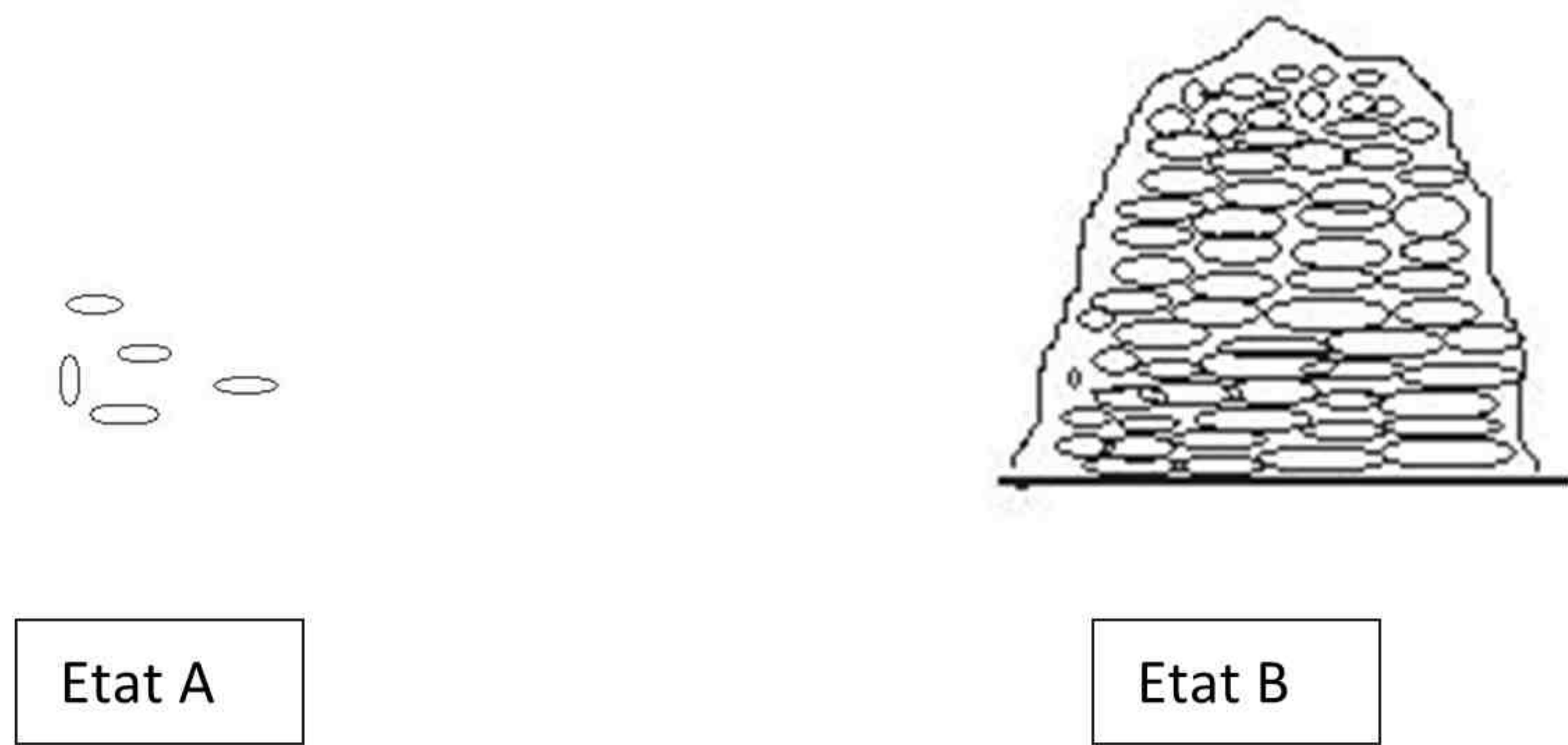


Figure 12 : Les deux principaux états de vie des bactéries dans l'environnement

- 1) Donnez le nom de l'état B, de quoi est-il caractérisé ?
- 2) Donnez le synonyme de l'état A qui est l'état libre des bactéries, de quoi est-il caractérisé ?
- 3) Quel est le nom de la substance qui colle les bactéries les unes aux autres et les couvre de l'extérieur ? De quoi est-elle composée ? et quel est son rôle ?
- 4) Quel est le rôle de l'état B dans la survie de la bactérie ? donnez des exemples.
- 5) Donnez les étapes de formation de l'état B.

Exercice N° 30 : Les bactéries pathogènes

Le tableau ci-dessous montre des bactéries pathogènes à intérêt médical :

Tableau 07 : les maladies infectieuses principales et leurs agents microbiens causals

Bactéries	Savants	Année	Maladies
<i>Bacillus anthracis</i>	Koch	1876	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Neisser	1879	
<i>Salmonella typhi</i>	Eberth	1880	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Koch	1882	
<i>Vibrio cholerae</i>	Koch	1883	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Klebs/Loeffler	1883	
<i>Clostridium tetani</i>	Nicolaier	1885	
<i>Escherichia coli</i>	Escherich	1885	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Fraenkel	1886	
<i>Neisseria meningitidis</i>	Weischselbaum	1887	
<i>Brucella sp.</i>	Bruce	1887	
<i>Clostridium perfringens</i>	Welch et Nuttal	1892	
<i>Yersinia pestis</i>	Yersin/Kitasato	1894	
<i>Clostridium botulinum</i>	Van Ermengem	1896	
<i>Shigella dysenteriae</i>	Shiga	1898	
<i>Treponema pallidum</i>	Schaudin/Hoffmann	1905	
<i>Bordetella pertussis</i>	Bordet et Gengou	1906	
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Ricketts	1909	
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Henrique da Rocha Lima	1916	

- 1) Indiquez pour chaque espèce la maladie correspondante.
- 2) Parmi ces espèces du tableau 07, trois ont causé des pandémies et des ravages ; mais à un certain moment, ils ont presque disparu.
 - a. Quel est la signification du terme pandémie ?
 - b. Tirez ces trois espèces depuis le tableau.
 - c. Pourquoi il y a eu cette disparition ?
 - d. Comment s'appelle la science qui s'intéresse à la microbiologique des maladies infectieuses anciennes ?

Exercice N° 31 : Virologie

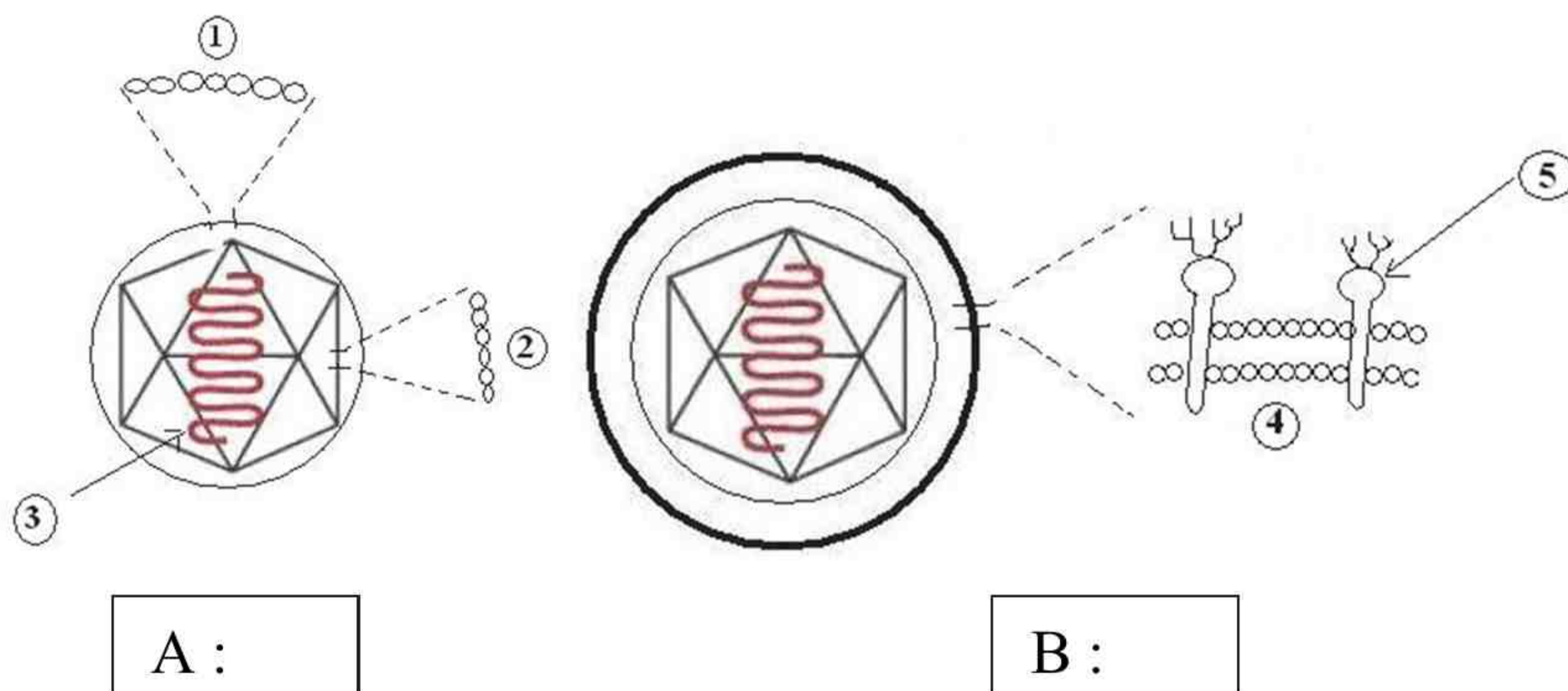


Figure 13 :

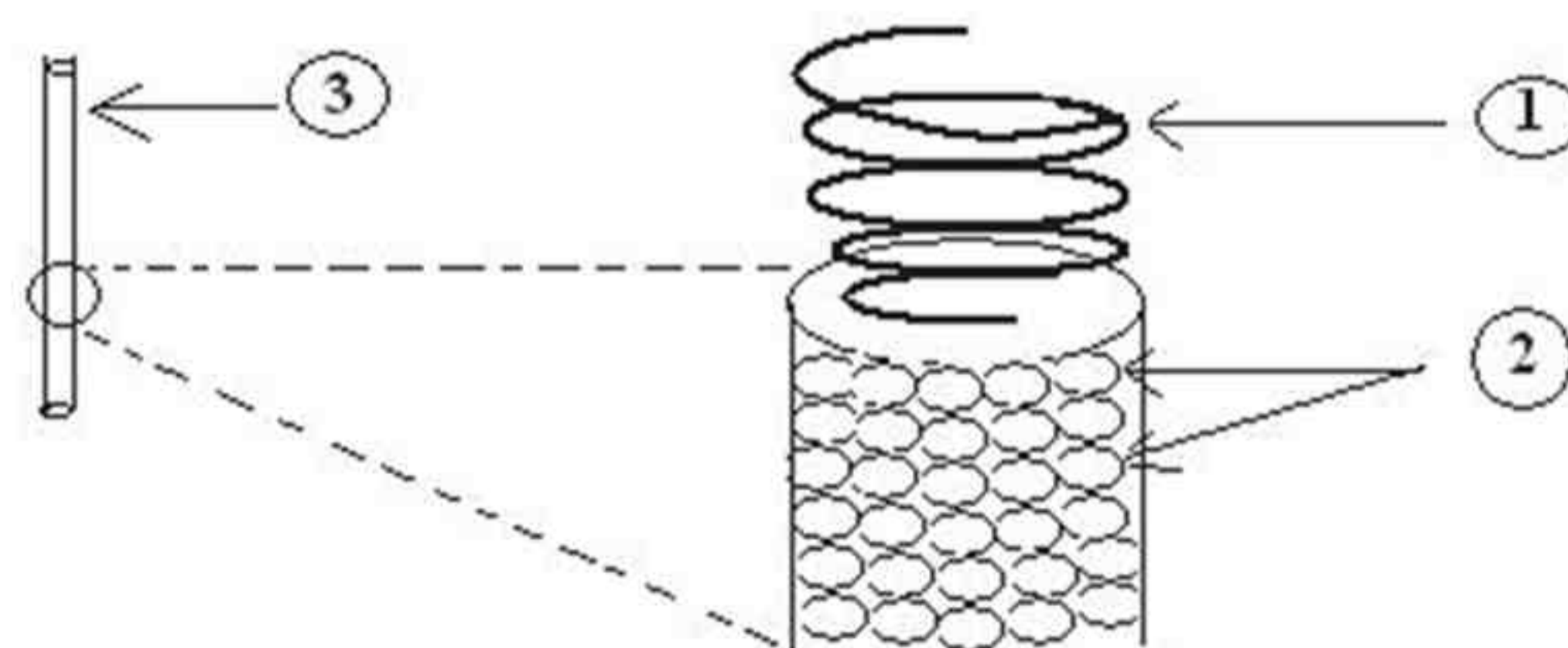


Figure 14 :

Les figures ci-dessus 13 et 14 représentent les structures générales des virus.

- 1) Donnez le nom des éléments numérotés ainsi que les titres des figures
- 2) L'élément ④ est présent chez certains virus :
 - a. Quel est l'origine de cet élément ?
 - b. Quel est son rôle lors de l'infection ?
 - c. Quel est son impact sur la résistance aux facteurs environnementaux ?
- 3) Quelles sont les phases de la reproduction virale ?

Exercice N° 32 : Mycologie

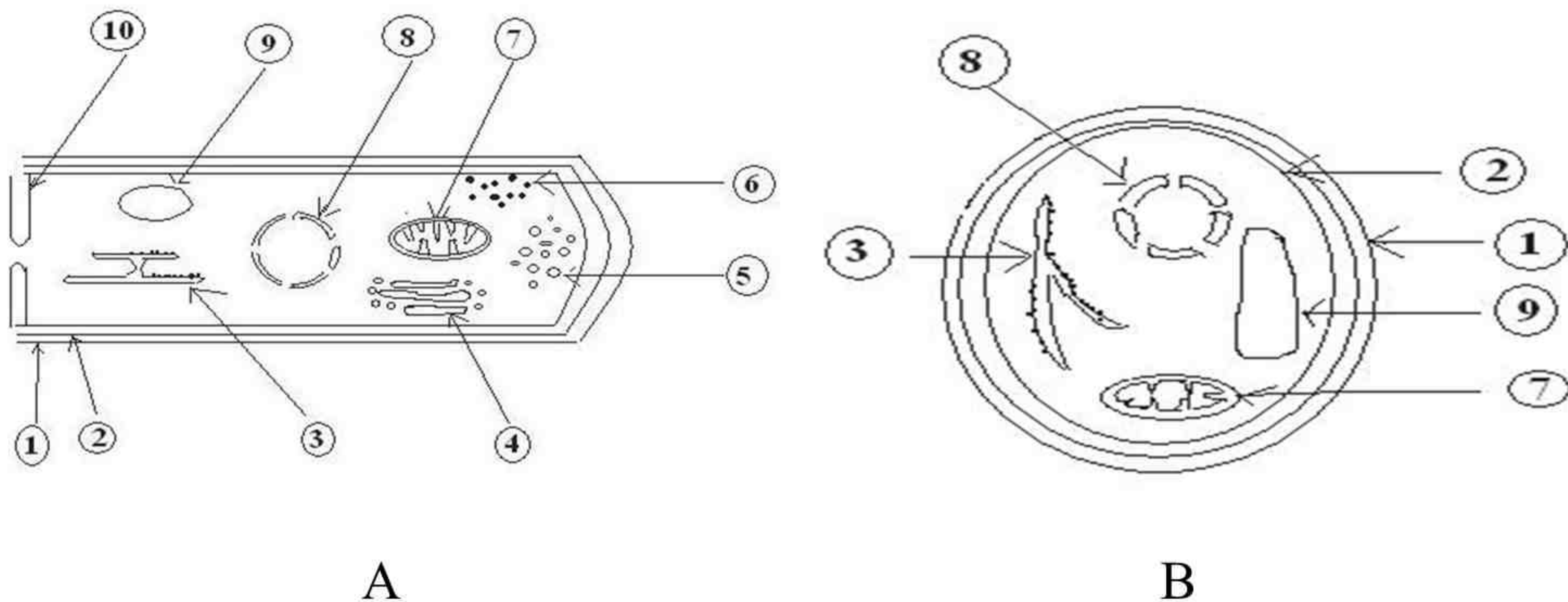


Figure 15 : structure de mycètes

La figure 15 représente des schémas de structure de mycètes:

- 1) Donnez le nom des éléments numérotés.
- 2) Quelle est la différence entre la structure « A » et « B ».
- 3) Donnez deux exemples pour chaque structure
- 4) La multiplication de la structure « A », a donné une masse emmêlée,
 - a. Comment appelle-t-on cette masse ?

- b. Expliquez comment se fait la croissance des hyphes en donnant les différentes étapes.
- 5) La taxonomie des mycètes est constituée de deux groupes, mycètes inférieurs et mycètes supérieurs,
- a. Quel est la différence structurale entre les hyphes produits par ces deux groupes ?
- b. Donnez les différents embranchements appartenant à ces deux groupes.
- 6) Déterminer le mode de reproduction de chaque embranchement.

Chapitre 2 :

Agents antimicrobiens

Exercice N° 01 : Concentration minimale inhibitrice

Un microbiologiste veut étudier la sensibilité d'une bactérie envers un antibiotique. Pour cela il a utilisé la méthode de l'antibiogramme sur milieu liquide pour rechercher la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). Cette technique est basée sur l'utilisation d'un gradient de concentrations en $\mu\text{g/ml}$ de l'antibiotique. Le résultat est l'apparition d'une croissance dans certains tubes et l'absence de la croissance dans d'autres. Le résultat est présenté dans la figure suivante :

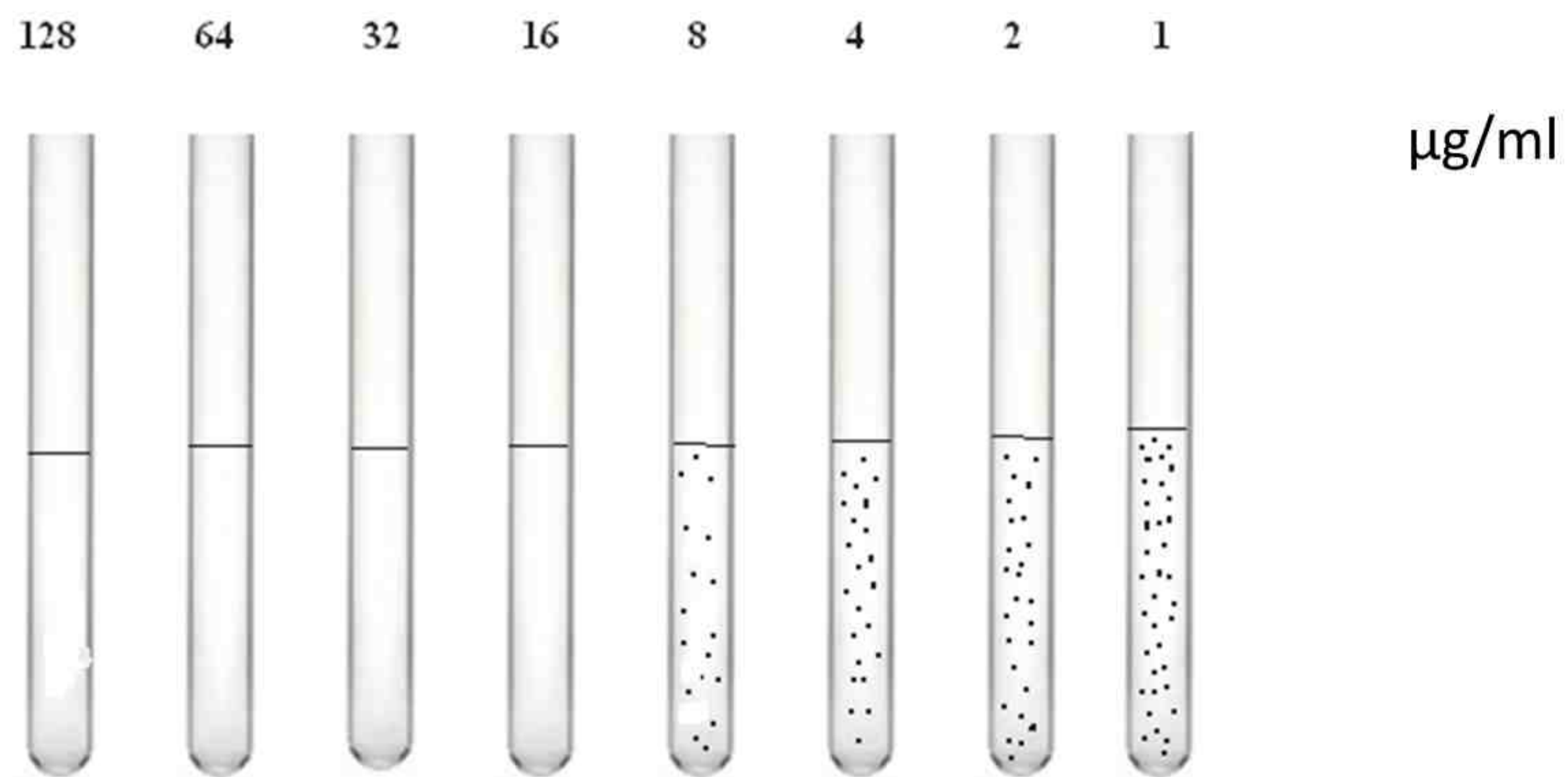


Figure 16 : Résultat de la recherche de la concentration Minimale Inhibitrice

- 1) Que signifie la concentration minimale inhibitrice.
- 2) À partir de la figure 16, déterminer la CMI.
- 3) Sachant que l'ensemencement à partir de la concentration 128 et 64 $\mu\text{g/ml}$ n'a donné aucune culture, proposer les concentrations qui peuvent être considérées comme CMI.

Exercice N° 02 : Préparation d'une concentration d'un antibiotique

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI de l'antibiotique gentamycine. On prépare une solution mère à partir d'un flacon de gentamycine qui contient une solution concentrée 80 mg/2ml.

- 1) Quel est le volume à prendre de la solution mère pour préparer 4ml avec une concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$?
- 2) Combien de fois on a dilué (facteur de dilution) la solution mère concentrée pour la préparation de 4ml avec une concentration 500 $\mu\text{g/ml}$?

Exercice N° 03 : Préparation d'une concentration d'un antibiotique

Afin de préparer 100 ml d'une solution d'antibiotique de pénicilline à une concentration de 512 $\mu\text{g/ml}$, nous disposons d'un flacon de 1g en poudre et de l'eau distillée stérile.

- 1) Quelle est la quantité en grammes de l'antibiotique à solubiliser dans 100 ml d'eau distillée stérile ?
- 2) Donner la définition de la pénicilline et quel est le chercheur qui a découvert cette molécule ?
- 3) Quel est le mécanisme d'action de la pénicilline ?

Exercice N° 04 : Principes de l'antibiogramme

Un laboratoire d'analyses médicales effectue la technique de l'antibiogramme pour étudier la sensibilité aux antibiotiques de différentes souches bactériennes isolées de différents prélèvements cliniques reçus. Pour cela, les laborantins utilisent une gamme de différents antibiotiques : gentamicine, téicoplanine, oxacilline, céfoxitine, chloramphénicol,

vancomycine, amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, imipenème, colistine, érythromycine, acide nalidixique, Bacitracine et ciprofloxacine.

- 1) Dans un tableau, indiquez la famille de chacun de ces antibiotiques ainsi que leur cible.
- 2) Indiquez les classes de la céfoxitine, et l'imipenème ainsi que le groupe de l'oxacilline et de l'amoxicilline-acide clavulanique.
- 3) Certains de ces antibiotiques ont une action bactéricide tandis que d'autres sont dits bactériostatiques. Donner la définition de ces deux actions.
- 4) Parmi ces antibiotiques, donnez un antibiotique naturel, un antibiotique semi-synthétique et un autre synthétique.
- 5) Que signifie la toxicité sélective d'un antibiotique ?
- 6) Afin d'obtenir de bons résultats, les laborantins contrôlent la qualité de leurs antibiogrammes. Quel est l'intérêt de ce contrôle ?
- 7) Lors du contrôle de qualité, les laborantins utilisent des souches de références. Que veut dire une souche de référence et pourquoi sont-elles utilisées ? Donnez un exemple.

8)

Exercice N° 05 : Les cibles des antibiotiques

Le tableau ci-dessous présente des constituants de l'appareil nucléaire bactérien et les antibiotiques correspondants :

Tableau 08 : les constituants de l'appareil nucléaire bactérien et les antibiotiques correspondants :

Enzymes / acides nucléique	Rôle	Antibiotique
ADN		
ADN polymérase		
ADN gyrase		
ARN polymérase		
ARNr (sous-unité 30S, sous-unité 50S et 16S)		
Acide folique		

1)

a. Donnez le rôle de chaque constituant.

b. Voici quelques familles d'antibiotiques : Aminosides, Quinolones, Triméthoprim, Ac. fusidique, Nitroimidazolés, oxazolidinones, Sulfamides, Cyclines et Phénicolés. Placez chaque famille d'antibiotiques dans la case du tableau qui correspond au constituant de l'appareil nucléaire qui constitue la cible de cette famille d'antibiotique.

2) Parmi ces constituants de l'appareil nucléaire, certains sont issus de gènes dits universels.

a. Que signifie un gène universel ?

b. Quelle est l'utilité du gène universel dans la recherche scientifique et le diagnostic bactériologique ?

c. Citez un élément issu d'un gène universel.

d. Donnez des exemples d'autres gènes universels.

Chapitre 3 :

**Biochimie microbienne et
identification**

Exercice N° 01 : Type trophique

Dans un lac d'eau se trouve des espèces de cyanobactéries qui utilisent la lumière du soleil pour produire leur énergie et des sources chimiques pour obtenir du carbone. Alors que le donneur d'électron qui permet de réaliser différentes réactions métaboliques est d'origine inorganique. D'autre part, d'autres espèces de bactéries vivant autour du lac utilisent des composés chimiques pour avoir leur énergie, et certains composés organiques pour obtenir du carbone, mais aussi comme donneur d'électron. Toutefois certaines espèces de champignons tirent leur énergie de l'hôte qu'ils parasitent.

- 1) Donnez la définition du type trophique.
- 2) Comment peut-on déterminer le type trophique ?
- 3) Selon les caractères des cyanobactéries, des bactéries et des champignons qui vivent dans et autour de ce lac, déterminer leurs types trophiques.

Exercice N° 02 : Étude de la Voie de dégradation de glucose « MEVAG »

Afin de connaître le type du métabolisme du glucose, oxydatif ou fermentatif, de certaines bactéries, des tubes contenant un milieu spécifique ont été préparés. Après régénération du milieu, le sucre en question qui est le glucose a été additionné à une concentration de 1%, ensuite les deux tubes ont étéensemencés par les bactéries à tester et un de ces tubes a été additionné d'une couche de vaseline.

- 1) Quel est le nom de ce milieu et pourquoi est-il utilisé ?

Trois types de bactéries ont étéensemencées chacune dans deux tubes avec et sans vaseline, après incubation à 30°C les résultats sont :

Bactérie A : virage au jaune du tube avec vaseline

Bactérie B : virage au jaune du tube sans vaseline

Bactérie C : virage au jaune des tubes avec et sans vaseline.

2) Quel est le métabolisme de chaque type de bactérie ?

3) Sachant que ce milieu contient un indicateur coloré qui est le bleu de bromothymol, quel est l'origine du virage de l'indicateur coloré au jaune ?

Exercice N° 03 : Test d'oxydase, de catalase et identification API

Afin d'identifier une bactérie, un microbiologiste a réalisé deux tests. Le premier est basé sur la mise en contact de la bactérie avec un dérivé méthylé du paraphénylène diamine qui est incolore. Après 30 secondes ce composé a donné une autre forme oxydée semi-quinonique de couleur rose violacé. Tandis que le deuxième test est basé sur la mise en contact d'une colonie bactérienne avec l'eau oxygénée H_2O_2 .

1) Comment appelle-t-on le premier test ? et quelle est l'enzyme recherchée ?

2) Donnez la réaction catalysée par cette enzyme.

3) Donnez la procédure expérimentale de ce test au laboratoire.

4) Certains résultats sont faussement positifs ou faussement négatifs, pourquoi ?

5) Comment appelle-t-on le deuxième test, quelle est l'enzyme recherchée ?

6) Quel est le rôle de cette enzyme pour la vitalité de la bactérie ? Donnez la réaction.

7) Les deux tests sont importants pour l'identification bactérienne par la galerie biochimique API. Par des schémas, monter l'importance de ces

tests pour les bactéries à Gram positif et à Gram négatif en ajoutant d'autres tests nécessaires.

Exercice N° 04 : Milieux TSI et Kligler

Afin d'identifier des espèces appartenant au groupe des entérobactéries, un microbiologiste utilise le milieu TSI. Pour cela il aensemencé trois souches différentes A, B et C. Après incubation à 37°C pendant 24 h, le manipulateur a obtenu les résultats suivants :

Tableau 09 : Résultats d'ensemencement du milieu TSI avec les souches A, B et C

Souche	Résultat
A	Pente rouge et culot jaune avec des bulles d'air
B	Pente jaune et culot jaune
C	Pente rouge et culot rouge avec un noircissement

- 7) Donnez une définition du milieu TSI, et qu'elle est la différence entre ce milieu et le milieu de Kligler ?
- 8) Expliquer les résultats obtenus avec les souches A, B et C.
- 9) Pourquoi le jaunissement du culot signifie une fermentation du glucose ?

Exercice N° 05 : Milieu Kligler

Le tableau 10 donne quelques caractères biochimiques de cinq espèces bactériennes observés après ensemencement sur milieu Kligler (composition voir tableau 11).

Tableau 10 : Caractères biochimiques d'espèces bactériennes ensemencées sur milieu Kligler.

Especies	Lactose	Glucose	Gaz	H₂S
<i>Salmonella typhi</i>				
<i>Shigella flexneri</i>	-	+	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-

Tableau 11 : Composition en grammes par litre d'eau distillée du milieu Kligler.

Extrait de viande de bœuf	3g
Extrait de levure	3g
Peptone (riche en lysine)	20g
NaCl	5g
Citrate ferrique	0,3g
Thiosulfate de sodium	0,3g
Lactose	10g
Glucose	1g
Rouge de phénol (solution à 1%)	5mL
Agar	12g
Eau distillée (q.s.p)	1L

- 1) Montrez la méthode d'ensemencement du milieu Kligler
- 2) Pour chaque espèce, donnez les résultats sur tubes de milieu Kligler après 24h d'incubation.
- 3) Est-il possible d'avoir comme résultat un culot rouge et une pente jaune ? et pourquoi ?
- 4) Pour l'espèce *Salmonella typhi* et après six heures d'incubation, il y a eu un jaunissement de la pente ensuite elle s'est transformée en couleur rouge après 24 h d'incubation, expliquez ces observations.
- 5) Est-ce que un résultat de type pente rouge et culot rouge après 24 h d'incubation signifie que la bactérie n'utilise jamais le glucose ?

Exercice N° 06 : Métabolisme d'esculine

Afin d'isoler des souches d'*Enterococcus faecalis*, un chercheur a utilisé un milieu sélectif qui s'appelle *Bile Esculine Agar* du fait que *Enterococcus faecalis* dégrade l'esculine.

- 1) Décrivez L'esculine et son utilisation en bactériologie, en donnant la réaction de sa dégradation.
- 2) L'esculétine produite lors de l'hydrolyse de l'esculine forme un précipité noir en présence de fer III. Pourquoi ?
- 3) Ce milieu contient la bile et éventuellement l'azide de sodium. Quel est le rôle de ces deux composés ?

Exercice N° 07 : IMVIC (Indole/ Méthyle rouge/ Voges Proskauer/Citrate)

Dans une analyse de l'eau et pour le but de rechercher des coliformes, spécifiquement *Escherichia coli*, des laborantins ont utilisé la technique IMVIC (Indole/ Méthyle rouge/ Voges Proskauer/Citrate).

- 1) Définir le groupe des coliformes et pourquoi sont-ils recherchés dans l'eau ?
- 2) Comment peut-on rechercher la production de l'idole ? et sur quel milieu ?
- 3) Quel est le substrat permettant aux bactéries de produire l'indole ? Écrivez la réaction en précisant l'enzyme.
- 4) Dans une étape des tests IMVIC, les laborantins ont utilisé le milieu Clark et Lubs. Quel est le but de l'utilisation de ce milieu ?

Après ensemencement de quatre tubes du milieu Clark et Lubs par deux souches différentes A et B, et incubation pendant 18h puis l'ajout des réactifs, les laborantins ont eu les résultats suivants :

Tableau 12 : Résultats du test RM et VP sur les souches A et B

Souche	Réactif	Résultat
A	RM	+
	VP 1/VP2	-
B	RM	-
	VP 1/VP2	+

- 5) De quoi sont-ils composés les réactifs VP1 et VP2 ?

- 6) Quel est le but du test VP (Voges-Proskauer) ? Écrivez la réaction de l'interaction du produit résultant de la dégradation du glucose qui interagit avec les réactif VP1 et VP2.
- 7) Quel est l'intérêt du test RM et sur quoi est-il basé ?
- 8) Existe-il des souches VP+ et RM+ au même temps ?
- 9) Une gélose inclinée de citrate de Simmons a étéensemencée pour la mise en évidence de l'utilisation de citrate. Quel est l'indicateur coloré présent dans ce milieu ? et comment change-t-il de couleur ?
- 10) Donnez les étapes de dégradation du citrate jusqu'au changement de couleur du milieu.

Exercice N° 08 : Métabolisme de l'urée et des acides aminés

Parmi les milieux utilisés couramment dans l'identification bactérienne par la galerie biochimique classique, l'Urée-Tryptophane. Des souches bactériennes ont étéensemencées dans des tubes contenant ce milieu, et après 24h d'incubation et l'ajout de quelques réactifs, nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau 13 : Résultats de l'ensemencement du milieu Urée-Tryptophane par les souches : A, B, C et D.

Souche	Réactif	Résultat
A	Aucun	Couleur jaune du milieu
B	Aucun	Couleur rouge du milieu
C	2 gouttes de FeCl ₃	Précipité marron
D	3 gouttes de réactif de Kovacs	apparition d'une couleur rouge

- 1) Quel sont les tests pour lesquels on utilise ce milieu ? et quelles sont les enzymes recherchées ?
- 2) Pour chaque souche et en se basant sur le résultat mentionné dans le tableau 13, montrez le test effectué.
- 3) Écrivez la réaction catalysée par la souche B qui a entraîné le changement de couleur du milieu.
- 4) Écrivez la réaction catalysée par la souche C. Avec quel composé interagit le FeCl_3 ?

Exercice N° 09 : Métabolisme des nitrates

Afin de rechercher la présence ou absence d'une enzyme spécifique, nous avons utilisé le bouillon nitraté. Pour cela, trois souches A, B et C ont été ensemencés.

Tableau 14 : Résultats de l'ensemencement du bouillon nitraté par les souches A, B, et C

Souche	Réactif 1	Résultat 1	Réactif 2	Résultat 2
A	Griess	Couleur rouge	Aucun	Couleur rouge
B	Griess	Pas de changement	Poudre de zinc	Pas de changement
C	Griess	Pas de changement	Poudre de zinc	Couleur rouge

- 1) Quel est le test effectué dans cette expérimentation ? Écrivez la réaction générale.
- 2) De quoi sont constitués les réactifs de Griess ? et que révèlent-ils ?
- 3) Expliquez les résultats obtenus pour chaque souche.
- 4) Dans quel cas ajoute-t-on la poudre de zinc ?

5) Écrivez la réaction catalysée dans le tube de la souche B.

Exercice N° 10 : β -galactosidase ou « test ONPG »

Lors d'une identification en bactériologie, nous avons effectué le test ONPG. Ce test permet la recherche d'une enzyme spécifique. Trois souches ont été ensemencées A, B et C sur une gélose Kligler, ensuite les souches ont subi un test ONPG. Les résultats obtenus sont dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Résultats du test ONPG des souches A, B et C

Souche	Résultat sur Kligler	Résultat du Test ONPG
A	Lactose (+)	(+)
B	Lactose (-)	(+)
C	Lactose (-)	(-)

- 1) Donnez la définition de l'enzyme recherchée.
- 2) Donnez la définition de l'ONPG ainsi que la réaction catalysée.
- 3) Expliquez les résultats obtenus.
- 4) En détaillant votre réponse, pourquoi la souche B est Lactose (-) alors qu'elle est ONPG (+) ?

Exercice N° 11 : Métabolisme protéique « milieu Moeller »

L'identification d'une souche bactérienne a nécessité la recherche de certains enzymes du métabolisme protéique. Pour cela, cette souche a été ensemencée dans quatre tubes de milieu Moeller. Le premier tube constitue le témoin. Il contient essentiellement du glucose en petite quantité et du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH. Les trois autres tubes contiennent en plus du milieu témoin, un des trois acides aminés suivants

successivement : Arginine, Lysine ou Ornithine. Après ensemencement, 1ml de vaseline stérile est ajouté dans chaque tube et le tout a été incubé à 30°C pendant 24 à 48h. Après incubation les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 16 : Résultat de l'ensemencement du milieu Moeller par une souche bactérienne en présence d'Arginine, Lysine ou Ornithine

Tube	Résultat
témoin	Couleur jaune
1	Couleur violette + A
2	Couleur violette+ B
3	Couleur violette+ C

A, B et C sont de nouvelles substances apparues dans le milieu

- 1)Quels sont les enzymes recherchés par ce milieu ?
- 2)Écrivez la réaction générale de dégradation des substrats dégradés par ces enzymes.
- 3)Expliquez les résultats obtenus dans le tableau 16.
- 4)En écrivant la réaction de dégradation de chaque acide aminée, quels sont les composés A, B et C ?
- 5)Pourquoi le milieu de Falkow contient du glucose ?
- 6)Pourquoi ajoute-t-on 1 ml de vaseline stérile dans chaque tube après les avoir ensemencés ?

Exercice N° 12 : Oxydoréduction et transport membranaire

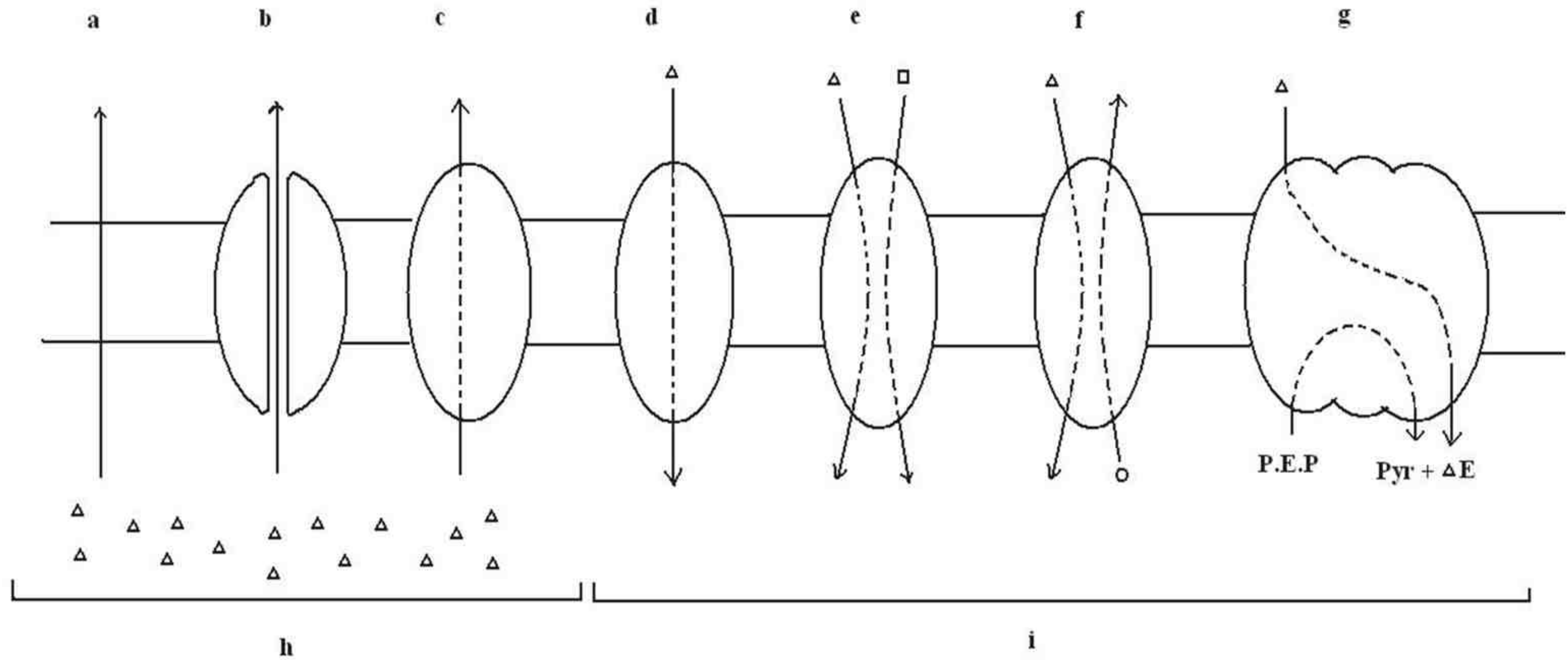
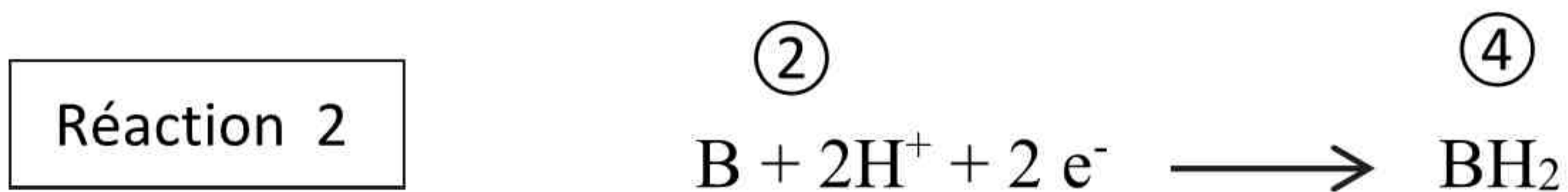
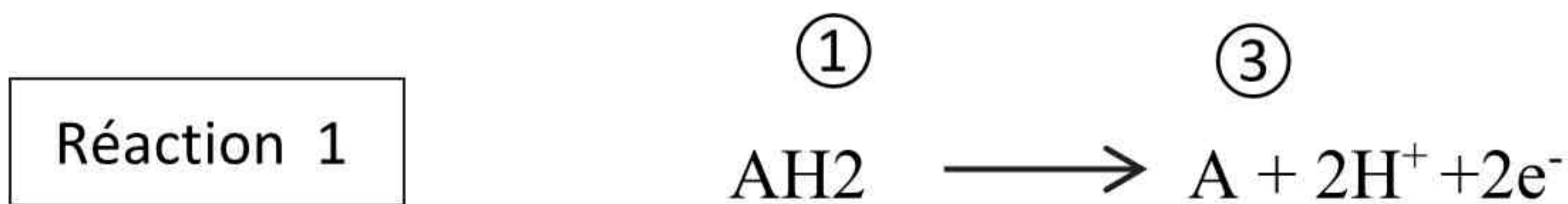


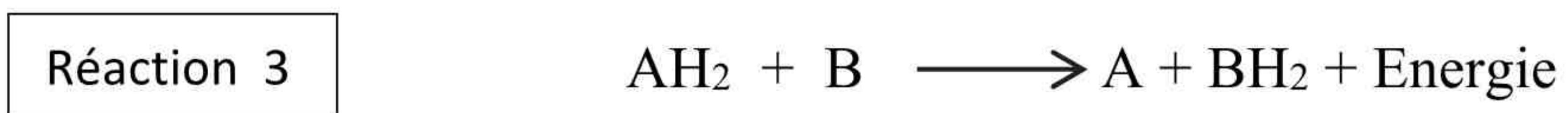
Figure 17 : Les différents types de transports membranaires bactériens

Ci-dessus (figure 17) un schéma montrant différents types de transports membranaires

- 1) Donnez un titre à la figure 17.
- 2) Donnez les noms des lettres de (a) jusqu'à (i).
- 3) Les réactions ci-dessous se déroulent au sein de la membrane bactérienne ;



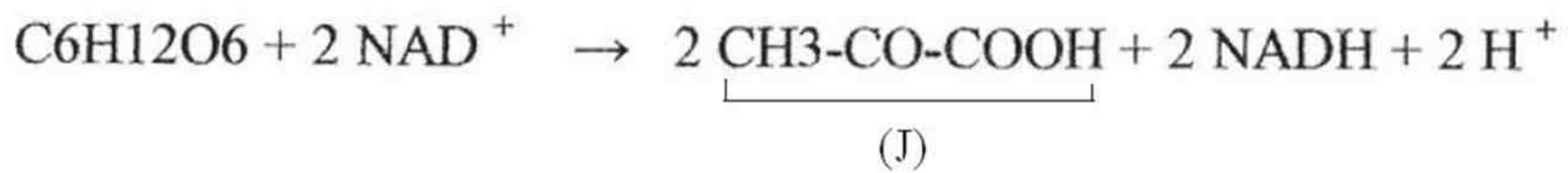
Somme :



A partir de ces réactions, montrez les éléments suivants : oxydant, réducteur, produit oxydé, produit réduit, réaction d'oxydation, réaction de réduction, oxydoréduction.

4) En dessinant un schéma du catabolisme bactérien, montrez la relation entre l'oxydation du substrat, le transfert des électrons et la production d'ATP.

5) Lors de la première partie des réactions cataboliques qui se déroulent dans le cytoplasme, le glucose est oxydé selon la réaction suivante;



Quel est le nom du composé (J) ?

6) Quelles sont les voies métaboliques permettant l'obtention du composé (J) ?

7) Le $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ peut être dégradé par une voie spécifique qui ne permet pas l'obtention du composé (J), mais elle produit le $\text{NADPH} + \text{H}^+$ et des sucres (4C et 5C), quel est cette voie ?

Exercice N° 13 : Fermentations

La figure 18 ci-dessous montre plusieurs types de fermentations exercés par certains microorganismes chimioorganotrophes.

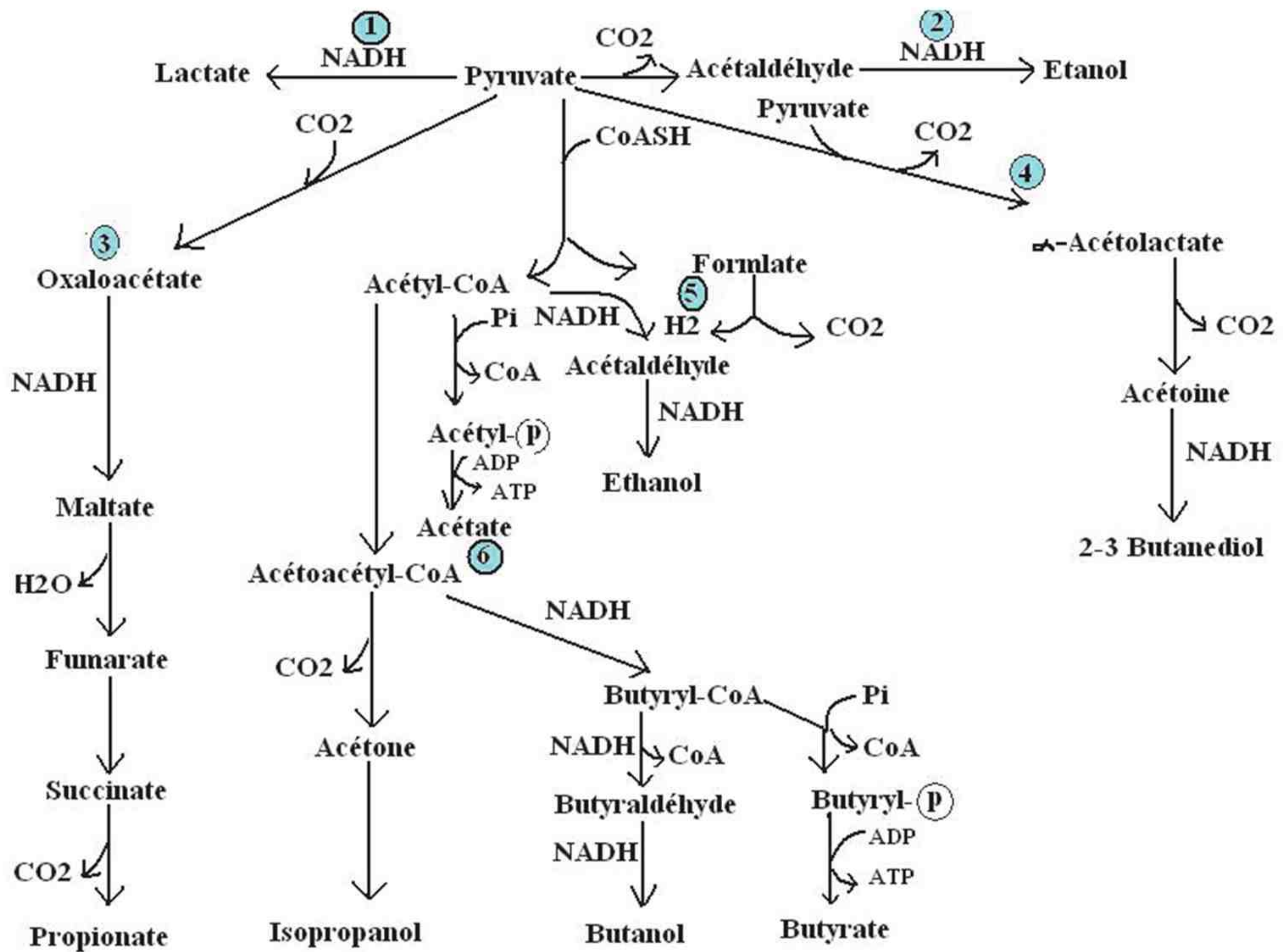


Figure 18 :Les différents type de fermentations exercées par certains microorganismes chimioorganotrophes

- 8) Donnez le nom des fermentations : ①, ②, ③, ④, ⑤, ⑥.
- 9) Définir les deux sous type de la fermentation ①.
- 10) À partir du produit final de la fermentation ② (Ethanol), une autre fermentation peut avoir lieu grâce à une bactérie appelée Acetobacter. Comment appelle-t-on cette fermentation ? Et quel est le produit intéressant résultant ? Comment appelle-t-on l'amas constitué de cette bactérie qui est utilisé en industrie ?
- 11) Donnez des exemples de genres bactériens qui utilisent les voies de fermentations ①, ②, ③, ④, ⑤, ⑥.
- 12) Quel est la différence entre, fermentation, respiration aérobie, et respiration anaérobie ?

13) Contrairement aux fermentations mentionnées dans le schéma ci-dessus et qui utilisent le pyruvate, un autre type de fermentation utilise les acides aminés.

a. Comment appelle-t-on ce type de fermentation ?

b. Quel est l'accepteur d'électron dans ce genre de fermentation ?

Exercice N° 14 : Galerie classique, API, automates et utilisation des programmes

Les Tableaux 17 et 18 représentent les résultats d'identification sur API Staph et les résultats de la galerie classique d'une souche X. Cette souche a une forme sphérique, aéro-anaérobie facultative et se colore en violet lors de coloration de Gram.

Tableau 17 : Résultat d'identification sur API Staph

Test	Composant	résultat
GLU	D-glucose	+
FRU	D-fructose	+
MNE	D-mannose	+
MAL	D-maltose	+
LAC	D-lactose	+
TRE	D-tréhalose	+
MAN	D-mannitol	-
XLT	D-xylitol	-
MEL	D-mélibiose	-
NIT	Nitrate de potassium	-
PAL	B-naphtyl phosphate	+
VP	Sodium pyruvate	+

RAF	D-raffinose	-
XYL	D-xylose	-
SAC	D-saccharose	+
MDG	Méthyl- α D-glucopyranoside	-
NAG	N-acétyl-glucosamine	+
ADH	L-arginine	-
URE	Urée	+

Tableau 18 : Résultats d'identification en galerie classique (interprétés par le logiciel PIBWIN)

Blanch e/c	Jaune/o	Violet/r	Catalase	oxydase	coagulas	phosphatas	DNAase	ONPG	arginine	Lysine d	Ornithine d
+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Citrate	Hydrogen	Urease	tryptoph	Indole	Voges-P	Glycerol-E	Nitrate r	Glycer	Erythrit	D-arabin	L(+)arabin
-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Ribose	D(+)xylo	L(-)xylo	Adonito	Meth xy	Gal	D(+) Glu	D(+)Fru	D(+)man	L(-)Sor	Rhamnose	Dulcitol
+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Inositol	Mannitol	Sorbitol	Methma	Meth glu	AceylGlu	Amygdalin	Arbutin	Aesculin	Salicin	D(+)cellob	Maltose
-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Lactose	D(+)Melib	Sucrose	Trehalos	Inulin	D(+)Melez	D(+)Raffin	Dextrin	Amylose	Strach	Glycogen	Gelatin lequ
+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+

- 1) Quelle est la différence entre galerie classique et la galerie API?
- 2)
 - a. Selon ces résultats, quelles sont les méthodes qui nous permettent d'identifier l'espèce?
 - b. Parmi ces méthodes, quelle est la plus simple ?
 - c. Identifiez la souche à l'aide de la méthode qui vous convient.
 - d. Quel est le pourcentage de l'identification ?

e. Identifiez les tests qui empêchent d'avoir une identification excellente avec explication.

3) D'après les résultats d'identification en galerie classique de la souche X (tableau 18)

a. Identifiez l'espèce en utilisant le logiciel permettant la lecture de ces résultats.

b. Donnez la définition de ce logiciel.

c. Quelle est la matrice qui doit être utilisée pour la souche X ?

d. Identifiez les tests qui empêchent d'avoir une identification excellente.

4) Le tableau 19 représente une comparaison de plusieurs techniques d'identification microbienne

Tableau 19 : comparaison de plusieurs techniques d'identification microbienne

Appareils	Précision d'identification	Coût de l'appareil	Coût de l'identification	Rapidité de l'identification
API				
VITEK 2 [®]				
MALDI-TOF-MS				
Phonix [®]				

a. Classez de A jusqu'à D la Précision de l'identification.

b. Classez de 1 jusqu'à 4 le coût de l'appareil.

c. Classez de 1 jusqu'à 4 le coût de l'identification.

- 3) Quel est le rôle de la matrice et de quoi est-elle constituée ?
- 4) Par un schéma, décrivez les étapes de l'analyse de l'échantillon par l'appareil.
- 5) Décrire les différentes méthodes de dépôt de l'échantillon et de la matrice sur la cible. Quel est le mode le plus utilisé et le plus simple ?
- 6) A quel niveau aboutit l'identification par cette méthode ?
- 7) Après l'acquisition de plusieurs résultats du même type de celui représenté dans la figure 19 et qui représente plusieurs souches, l'appareil a tracé un schéma représenté par la figure 20 grâce à un logiciel spécifique. Comment appelle-t-on ce schéma ? Et quel est l'intérêt de le tracer ?
- 8) Quel est l'avantage de l'utilisation de MALDI-TOF par rapport à l'identification biochimique ?

Chapitre 04 :

**Génétique bactérienne et
biologie moléculaire**

Exercice N° 01 : La transformation

En 1928, Frederick Griffith a réalisé une expérience, en testant deux types de souches de pneumocoques sur des souris par injection sous-cutanée ; une souche « R » rugueuse et non virulente, et une souche « S » lisse et virulente. Les résultats sont représentés dans la figure ci-dessous (figure 21).

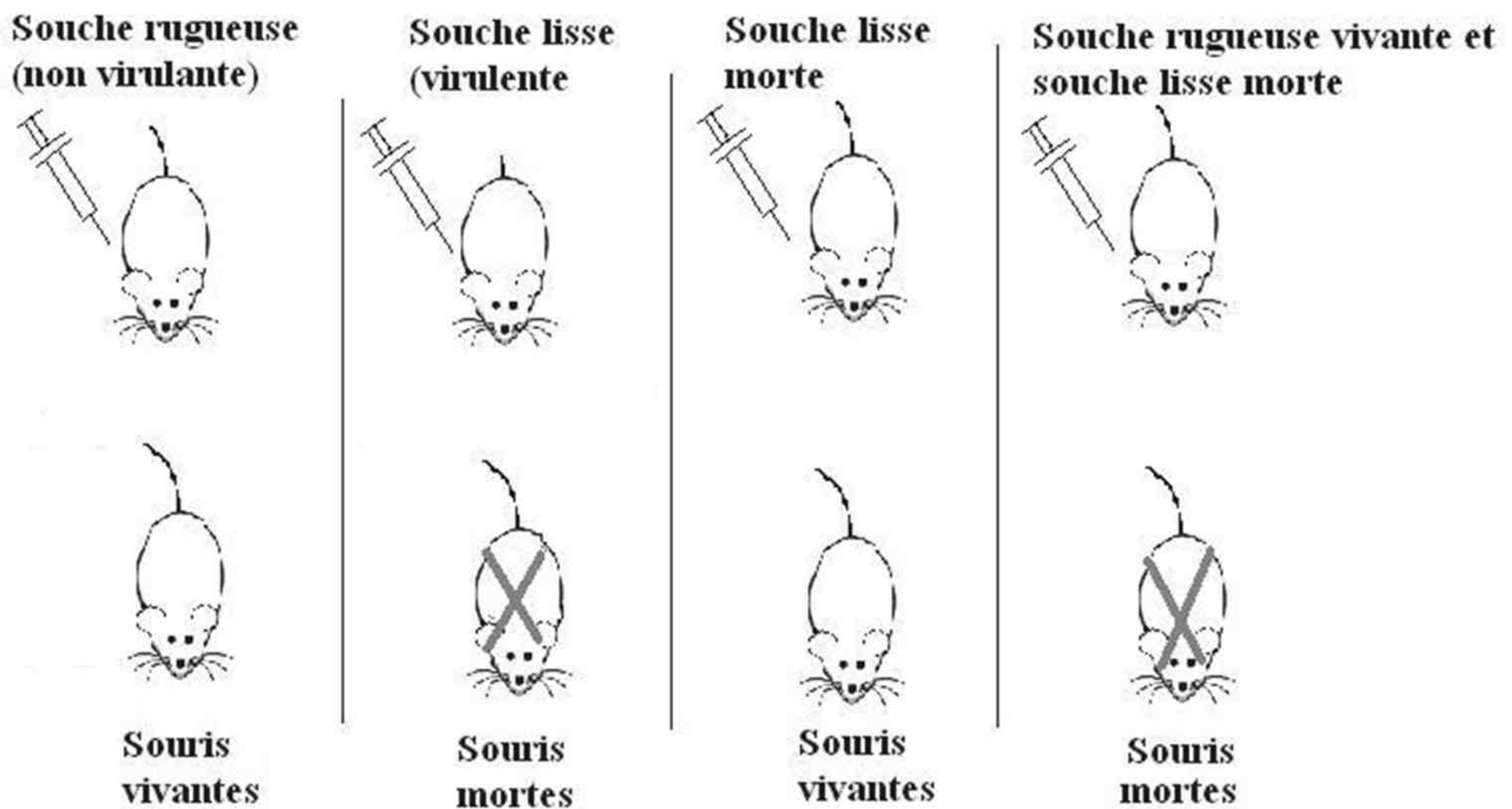


Figure 21 : Expérience de Griffith (1928).

- 1) Quel est le phénomène biologique étudié par Griffith ? Donnez une définition.
- 2) A quoi sont dus les deux phénotypes de pneumocoques « R » et « S » ?
- 3) Analyser et expliquer les résultats obtenus.
- 4) En 1944, Avery, MacLeod et McCarty ont confirmé les résultats de Griffith. Quels sont les tests qui ont permis cette confirmation ?
- 5) En quel état physiologique doivent être les cellules bactériennes pour que ce phénomène ait lieu ? Et quelles sont ces cellules bactériennes ?

6) Sachent que ce phénomène peut être provoqué au laboratoire, mais parfois les bactéries sont dépourvues de l'état physiologique nécessaire, quel sont les techniques permettant de rendre les bactéries dans l'état physiologique favorable ?

Exercice N° 02 : La conjugaison

En 1946, Lederberg et Tatum ont effectué des recherches sur les recombinaisons génétiques chez les bactéries. Pour cela, ils ont fait l'expérience suivante : deux types de mutants auxotrophes d'*E.coli* ont été mélangés dans un milieu de culture liquide, d'une part des mutants exigeants seulement en thréonine (T-) et en leucine (L-) et, d'autre part, des mutants exigeants seulement en méthionine (M-) et en biotine (B-). Après plusieurs heures de contact entre les mutants T- L- M+ B+ et les mutants T+ L+ M- B-, Lederberg et Tatum ont isolé des *E.coli* T+ L+ M+ B+ avec une fréquence 10^{-6} bactéries.

1) Quel est le phénomène biologique découvert par Lederberg et Tatum ?

Donnez en une définition.

2) Pourquoi y a-t-il une faible fréquence de ce phénomène ?

3) Est-ce que ce phénomène peut se produire chez des espèces différentes ?

4) La figure 22 est un schéma qui explique ce phénomène, donnez le nom des éléments numérotés.

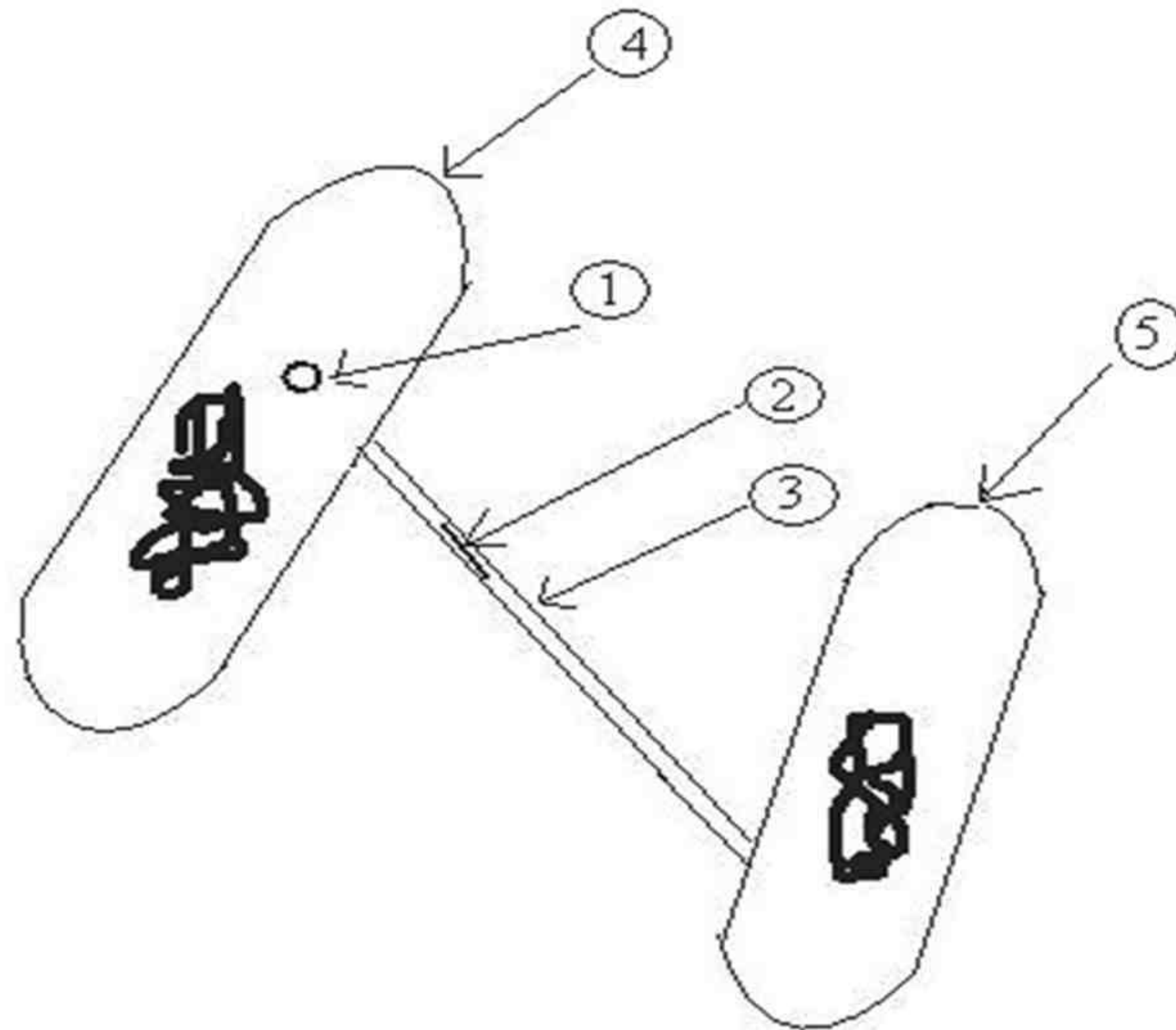


Figure 22 : schéma expliquant du phénomène décrit par Lederberg et Tatum

- 5) L'élément ① joue un rôle majeur dans ce phénomène, quel est son rôle ?
Et quelle est la différence entre les bactéries pourvues et dépourvues de cet élément ?
- 6) Comment ce fait le transfert et quel sont les caractères du matériel transféré ?
- 7) Quels sont les rôles biologiques de ce phénomène découvert par Lederberg et Tatum ?

Exercice N° 03 : Les mutations

En 1943, Luria et Delbruck ont fait des recherches sur les mutations affectant *E. coli*. Pour cela, ils ont étudié la résistance d'*E. coli* à un bactériophage. Ils ont cultivé une souche d'*E. Coli*, puis ils ont répartie environ 2000 bactéries dans deux tubes de bouillon (1000 bactéries par 10

ml). La première partie est gardée telle quelle dans un flacon alors que la deuxième partie est divisée sur 50 tubes (0,2 ml pour chaque tube). Après incubation à 37°C, chaque tube estensemencé sur des géloses recouvertes de bactériophages. Après incubation à 37°C, les chercheurs ont noté les observations suivantes : la plupart des géloses contiennent un nombre de colonies entre 03 et 07 colonies. Toutefois, certaines géloses ne contiennent pas de colonies alors que d'autres boîtes contiennent des centaines.

- 1) Donnez la définition d'une mutation
- 2) Est-ce- que les bactériophages ont induit l'apparition des mutants résistants ? Pourquoi ?
- 3) Comment Luria et Delbruck ont expliqué le nombre variable des colonies sur les géloses ?
- 4) Les chercheurs ont ensuiteensemencé des géloses, une boîte à partir du premier flacon et 50 boîtes à partir des 50 cultures gélosées qui contiennent des cultures ; après incubation, ils ont comparé le nombre des colonies. D'après vous, comment sera le nombre de colonies du premier flacon en comparent avec le nombre obtenu à partir de chacune des 50 cultures gélosées ? et pourquoi ?
- 5) En 1952, Lederberg et Lederberg ont fait des tests appelés la culture par réplique. En quelques lignes, expliquer leurs expériences et leurs résultats.

Exercice N° 04 : Les mutations

Le tableau ci-dessous représente des mutations affectant le génome bactérien.

Tableau 20 : Les différentes mutations affectant le génome bactérien

Séquence des gènes d'origine	Changement	Nom de la mutation										
<table border="1" style="margin: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">B</td> <td style="padding: 5px;">C</td> <td style="padding: 5px;">D</td> <td style="padding: 5px;">E</td> </tr> </table>	A	B	C	D	E	<table style="margin: auto;"> <tr> <td>A</td> <td>B</td> <td>C</td> <td>D</td> <td>E</td> </tr> </table>	A	B	C	D	E	①
	A	B	C	D	E							
	A	B	C	D	E							
	<table style="margin: auto;"> <tr> <td>A</td> <td>B</td> <td>D</td> <td>E</td> </tr> </table>	A	B	D	E	②						
	A	B	D	E								
<table style="margin: auto;"> <tr> <td>A</td> <td>B</td> <td>C</td> <td>X</td> <td>D</td> <td>E</td> </tr> </table>	A	B	C	X	D	E	③					
A	B	C	X	D	E							
<table style="margin: auto;"> <tr> <td>A</td> <td>B</td> <td>D</td> <td>C</td> <td>E</td> </tr> </table>	A	B	D	C	E	④						
A	B	D	C	E								
<table style="margin: auto;"> <tr> <td>A</td> <td>B</td> <td>C</td> <td>B</td> <td>C</td> <td>D</td> <td>E</td> </tr> </table>	A	B	C	B	C	D	E	⑤				
A	B	C	B	C	D	E						

1) Donnez le nom de chaque mutation.

2) La mutation ① est subdivisée en plusieurs types, donnez le nom de ces derniers ?

3) Le gène (C) est constitué de la séquence suivante :

5'-AUG CCU UCA AGA UGU GGG CAA-3'

Après exposition de cette séquence à un agent mutagène, on a obtenu les séquences modifiées représentées ci-dessous, les changements sont soulignés :

1. 5'-AUG CUU UCA AGA UGU GGACAA-3'

2. 5'-AUG CUU UCA GGGA UGU GGG CAA-3'

3. 5'-AUG CCU UCA AGA UGA GGG CAA-3'

4. 5'-AUG CCU UCA AGU GUG GGC AA-3'

A l'aide du code génétique, déterminer la séquence en acides aminés de chaque séquence et donner le nom de chaque mutation.

4) Que signifie un agent mutagène ? donner quelques exemples ?

Exercice N° 05 : Les transposons et les intégrons

En étudiant les recombinaisons génétiques chez les bactéries, les chercheurs ont remarqué des séquences d'ADN qui sautent d'un endroit à un autre sur le même brin d'ADN, mais aussi sur des brins d'ADN différents.

- 1) Comment appelle-t-on ces gènes sauteurs ? (donnez une définition)
- 2) Les principaux gènes sauteurs sont décrits dans le tableau 21 avec leurs caractéristiques. Donnez le nom de ces trois gènes sauteurs (A, B et C).

Tableau 21 : Caractéristiques des gènes sauteurs

Gènes sauteurs	Mise en évidence	Caractéristiques
A	En 1968, à partir de l'opéron gal de <i>E. coli</i> par l'équipe de Jordan [1].	Séquences simples et courtes flanqués de deux séquences inversées répétées (IR) plus ou moins parfaites, indispensables à la transposition
B	En 1970, par Sykes et Richmond [2] : Etude de transfert de gènes de résistance entre <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> .	Ces séquences contiennent outre des IR, un site de recombinaison et des gènes tels que ceux de résolvas, de transposases ou des gènes de résistance
C	Décrit en 1999, par Rowe-Magnus et Mazel [3].	Construits par insertion aléatoire de séquences simples (A) de part et d'autre de n'importe quel gène, ou groupe de gènes de résistance

3) Malgré que les gènes sauteurs (B et C) décrits dans le tableau 21 peuvent présenter des gènes de résistance, ces gènes ne dépassent pas le nombre de deux au maximum. Tandis que l'analyse de séquences présentant des gènes sauteurs qui contiennent plusieurs gènes de résistance a montré une séquence présentée dans la figure : 23.

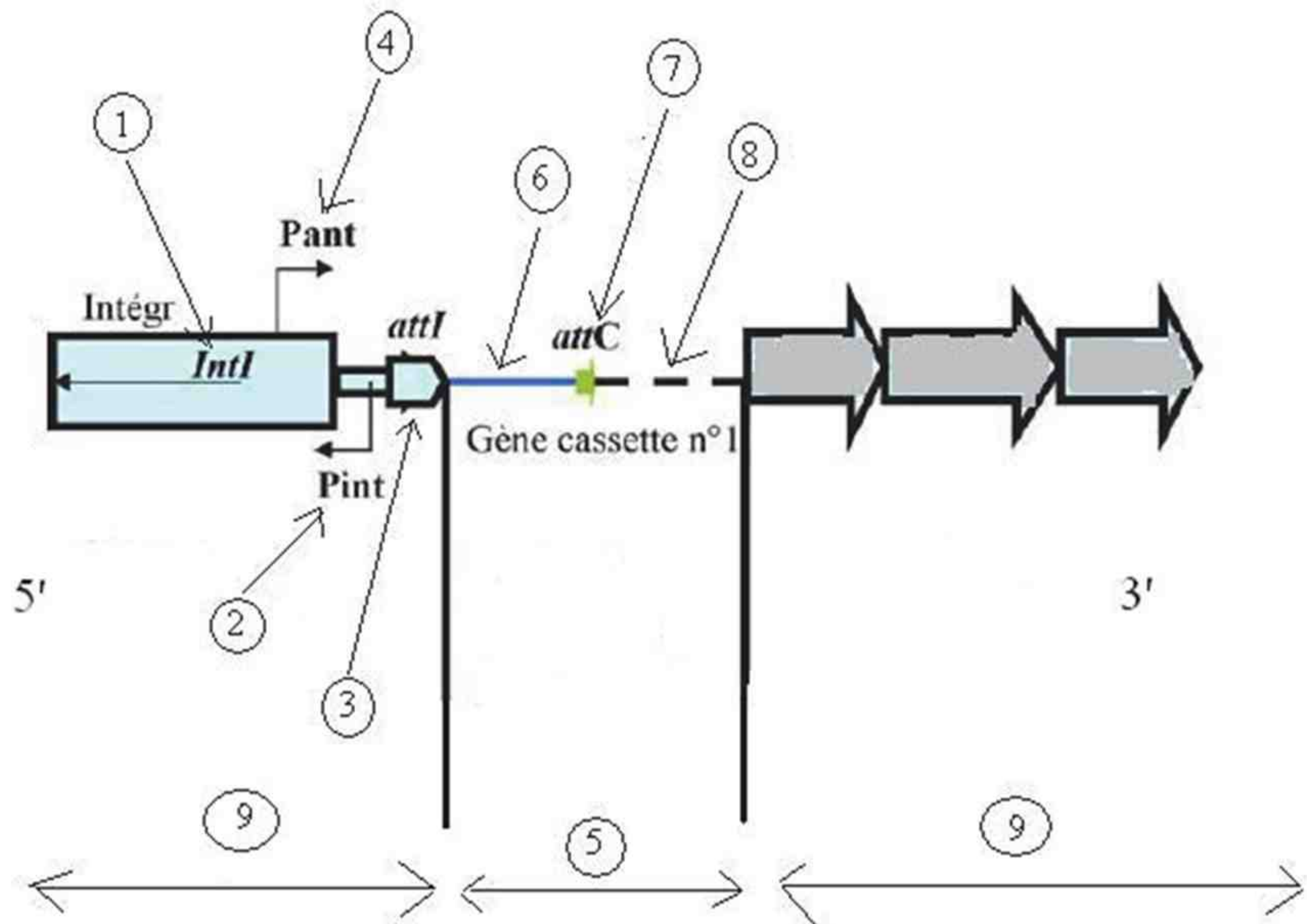


Figure 23 : Structure d'une séquence spécifique présentant des gènes sauteurs

- Quel est le nom de cette séquence ?
- Donner la définition de cette séquence (celle de Hall et Collis).
- Donner le nom des éléments numérotés.
- Chez les staphylocoques, un type de l'élément (6) leur confère une résistance à la méticilline, quel est ce type ?

Exercice N° 06 : La composition en bases Guanine et Cytosine (CG%)

La figure 24 montre des courbes de dénaturation des ADN de trois microorganismes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Bacillus subtilis* basées sur la mesure d'absorbance à l'aide de spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm. Tandis que la figure 25 représente le pourcentage de (C+G) en fonction des températures dénaturantes.

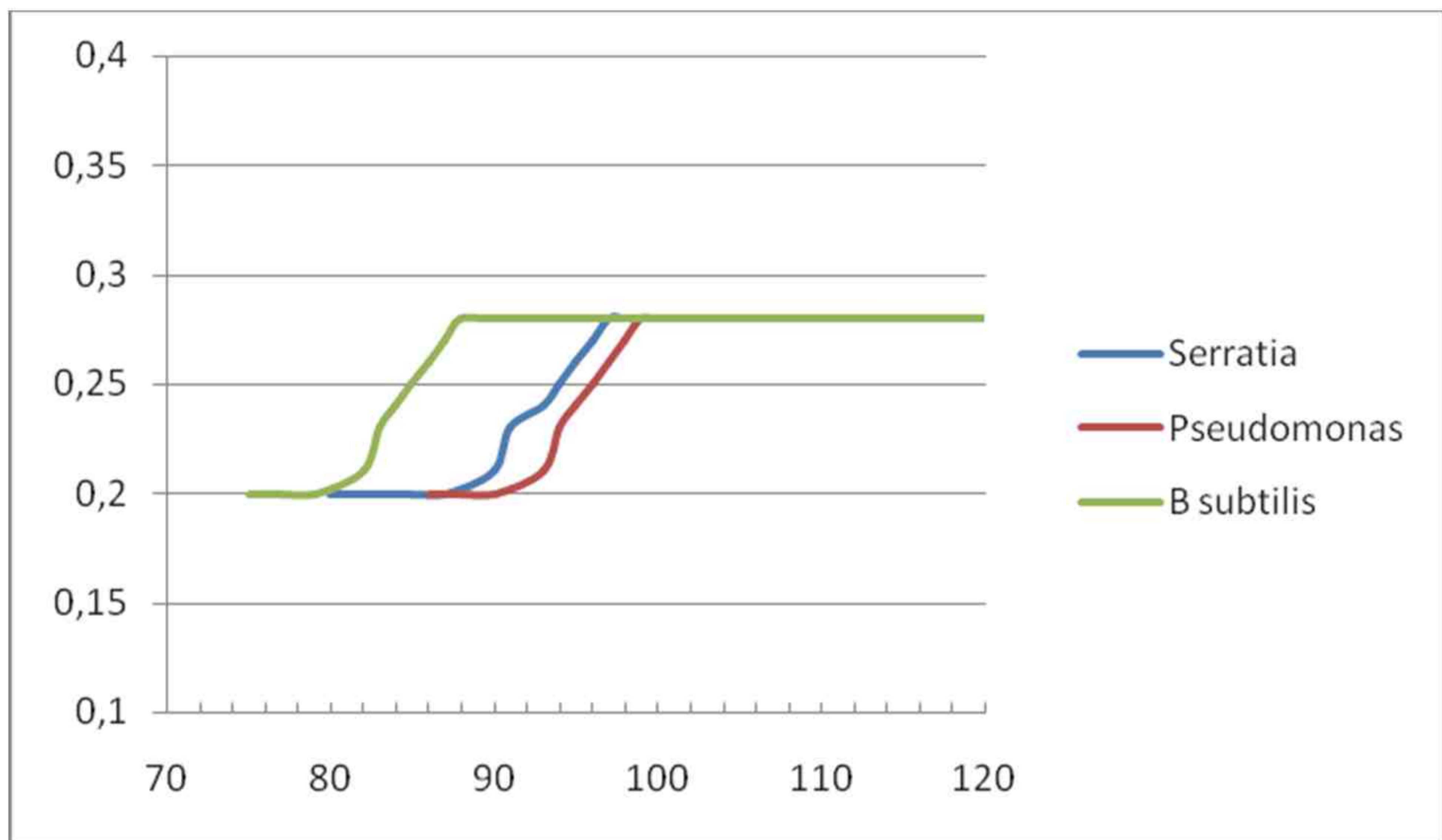


Figure 24 : courbes de dénaturation des ADN de *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *B. subtilis*

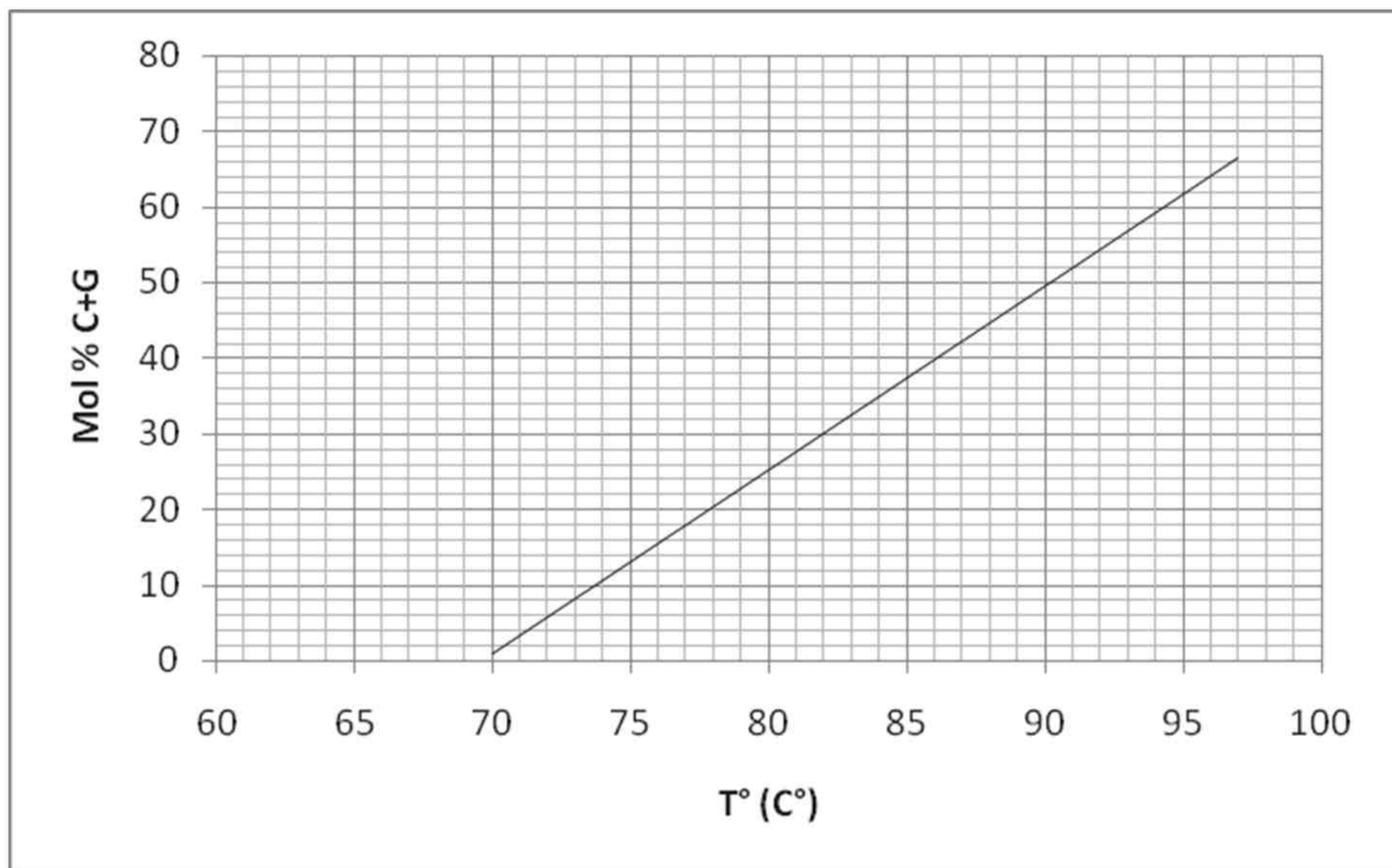


Figure 25 : pourcentage de (C+G) en fonction des températures dénaturantes

- 1) Quel est l'intérêt de détermination de la composition en bases Guanine et cytosine (CG%)
- 2) En expliquant la méthode, déterminer le CG% de chaque espèce à l'aide des figures 24 et 25.
- 3) En comparant les CG% entre les trois espèces, que remarquez-vous?
- 4) Pourquoi les températures de dénaturation de *Serratia* et de *Pseudomonas* sont-elles élevées ? expliquer.
- 5) Après refroidissement par (méthode « 1 ») l'absorbance mesurée pour l'ADN de l'espèce *Serratia marcescens* a significativement diminué, alors que l'absorbance mesurée pour l'ADN de l'espèce *Bacillus subtilis* n'a pas diminué après l'utilisation d'une autre méthode de refroidissement (méthode « 2 »). Expliquez ces observations en montrant ces méthodes de refroidissement.

Exercice N° 07 : Bactériophages et transduction

Les figures 26 et 27 représentent un schéma d'une particule virale et un autre schéma d'un cycle viral respectivement.

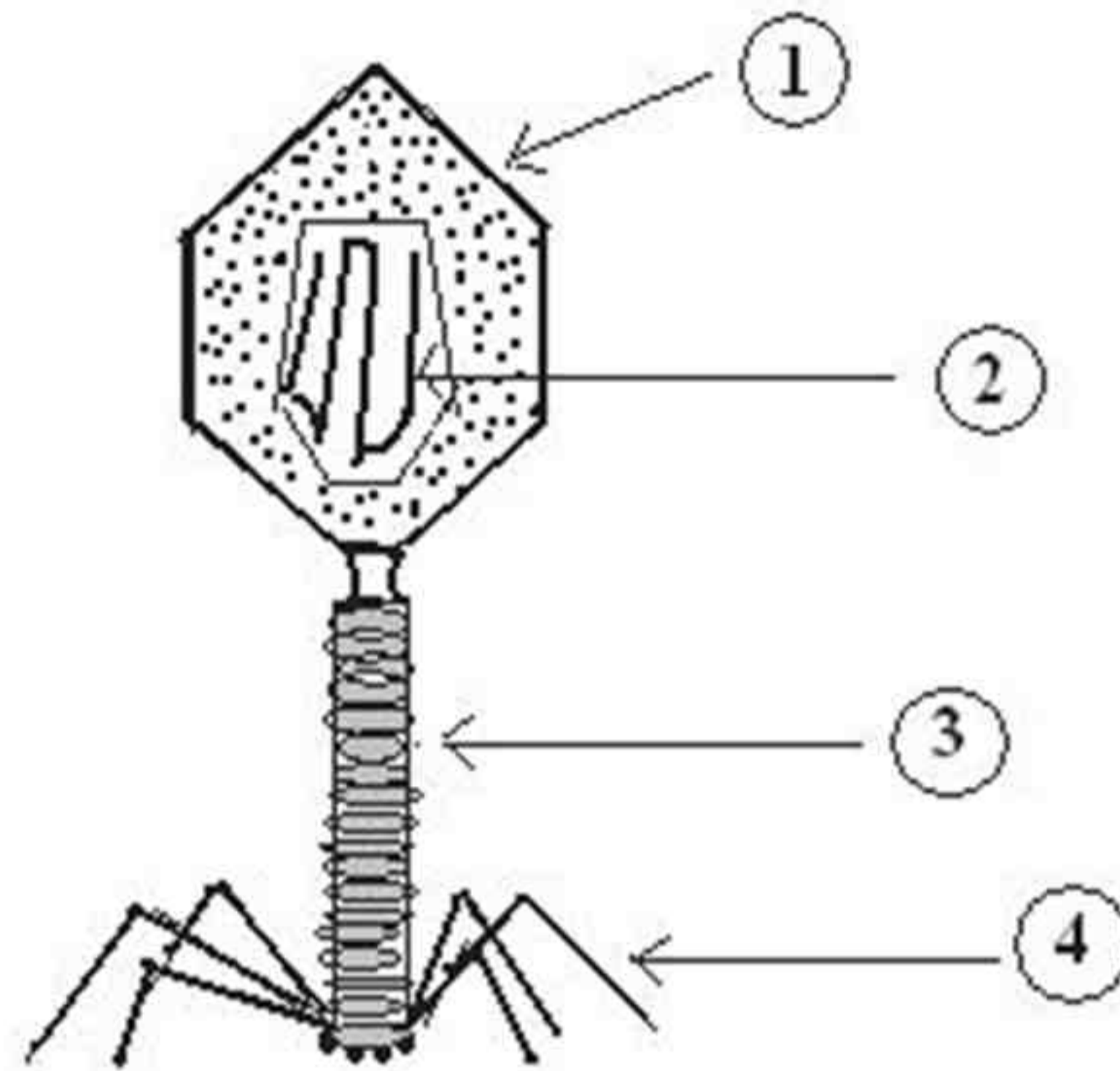


Figure 26 : ?

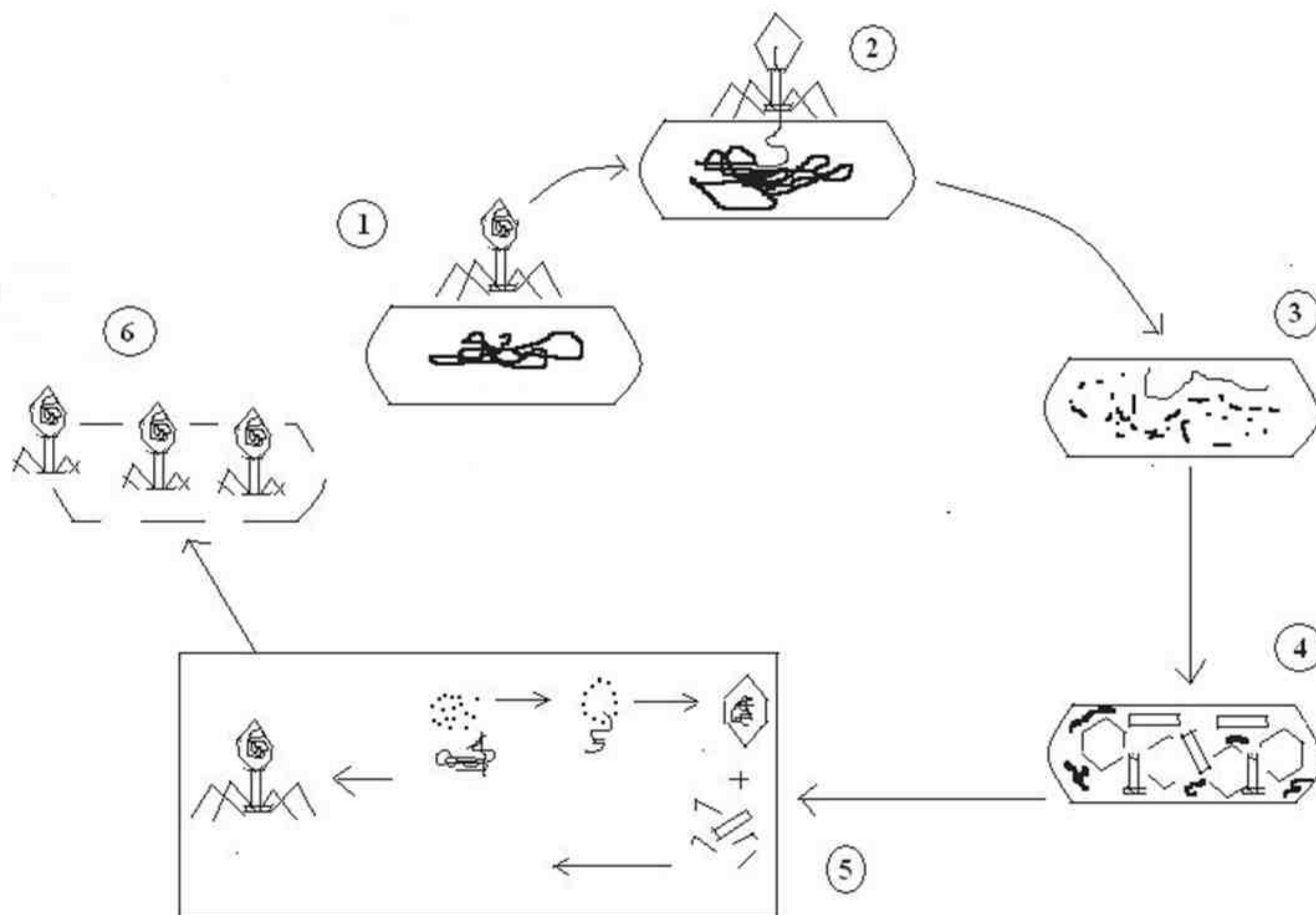


Figure 27 : ?

6) Donnez le nom des éléments numérotés ainsi que les titres des figures 26 et 27.

- 7) Le cycle viral illustré dans la figure 27 a permis un transfert d'information génétique d'une bactérie 01 qui a subi une lyse à une bactérie 02 qui n'a pas subi de lyse. Comment appelle-t-on ce phénomène de transfert de gènes ? Et quel est le type de ce transfert ?
- 8) Dans un autre cas, la particule virale a infecté une bactérie sans causer une lyse, le génome viral s'est intégré au niveau du chromosome bactérien et il s'est répliqué au même temps que lui pendant quelques générations.
1. Comment appelle-t-on ce cycle ?
 2. Comment appelle-t-on la bactérie et le virus dans ce cas ?
 3. A un moment donné, après quelques générations de multiplication bactérienne, le génome viral est devenu pathogène pour la bactérie et a commencé à se multiplier. Cependant, lors des excisions des ADN viraux à partir du génome bactérien, des gènes de résistance aux antibiotiques ont été transférés avec le génome viral. Ensuite les nouvelles particules virales ont transmis ces gènes à d'autres bactéries. Comment appelle-t-on ce type de transfert ?

Exercice N° 08 : Régulation « Opéron lactose »

En 1961, Jacob et Monod (prix Nobel de médecine et de physiologie en 1965) décrivent pour la première fois la régulation coordonnée des gènes adjacents impliqués dans le métabolisme du lactose par des séquences d'ADN codant pour des produits agissant en « trans » ou en « cis » localisées à proximité de ces gènes(Figures28).

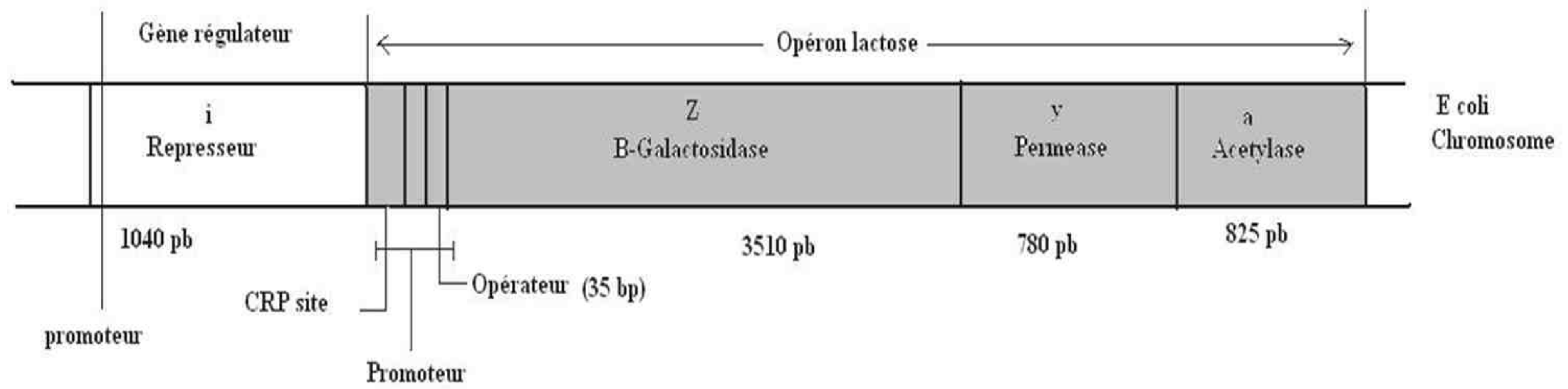


Figure 28 : Structure des gènes adjacents impliqués dans le métabolisme du lactose

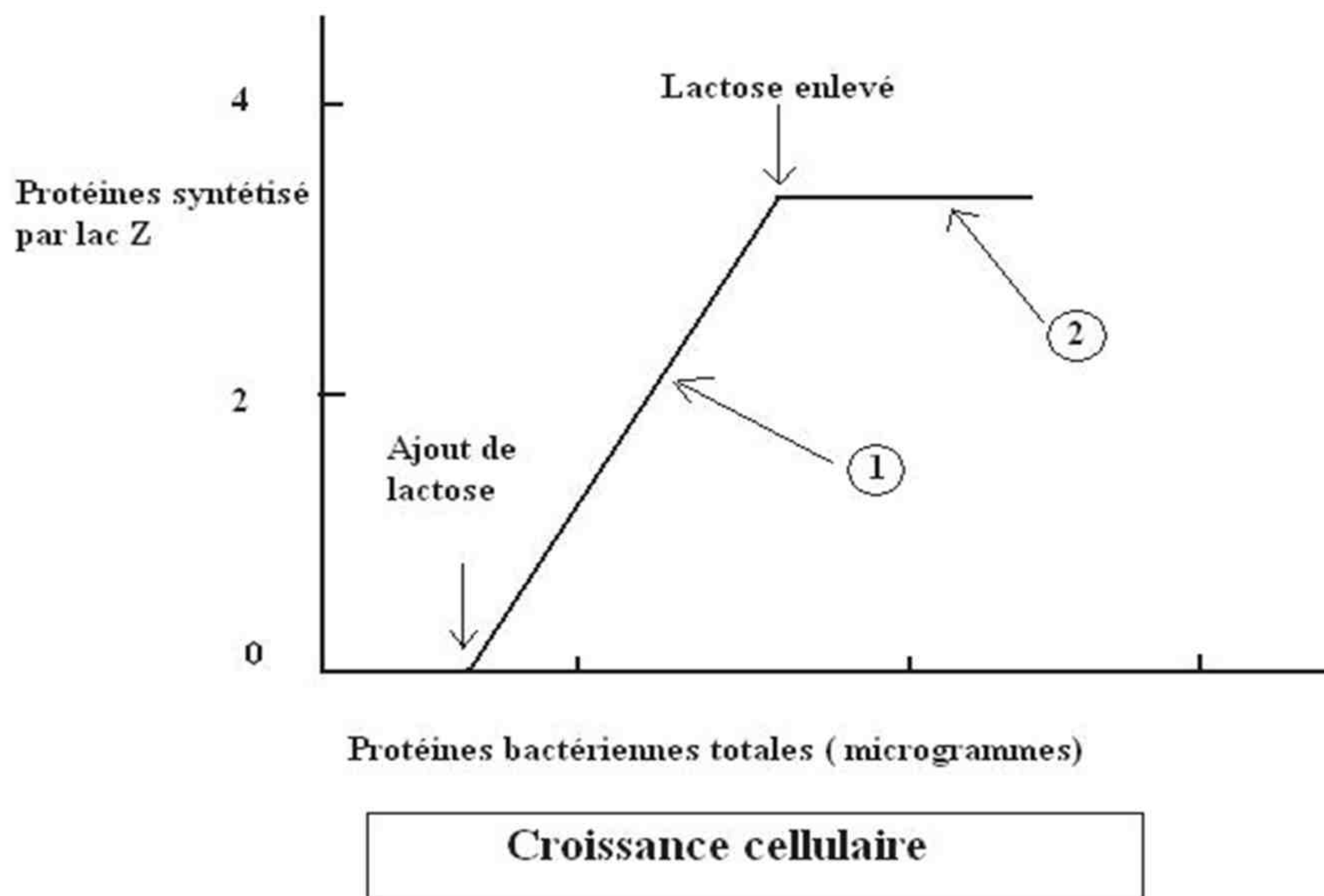


Figure 29 :

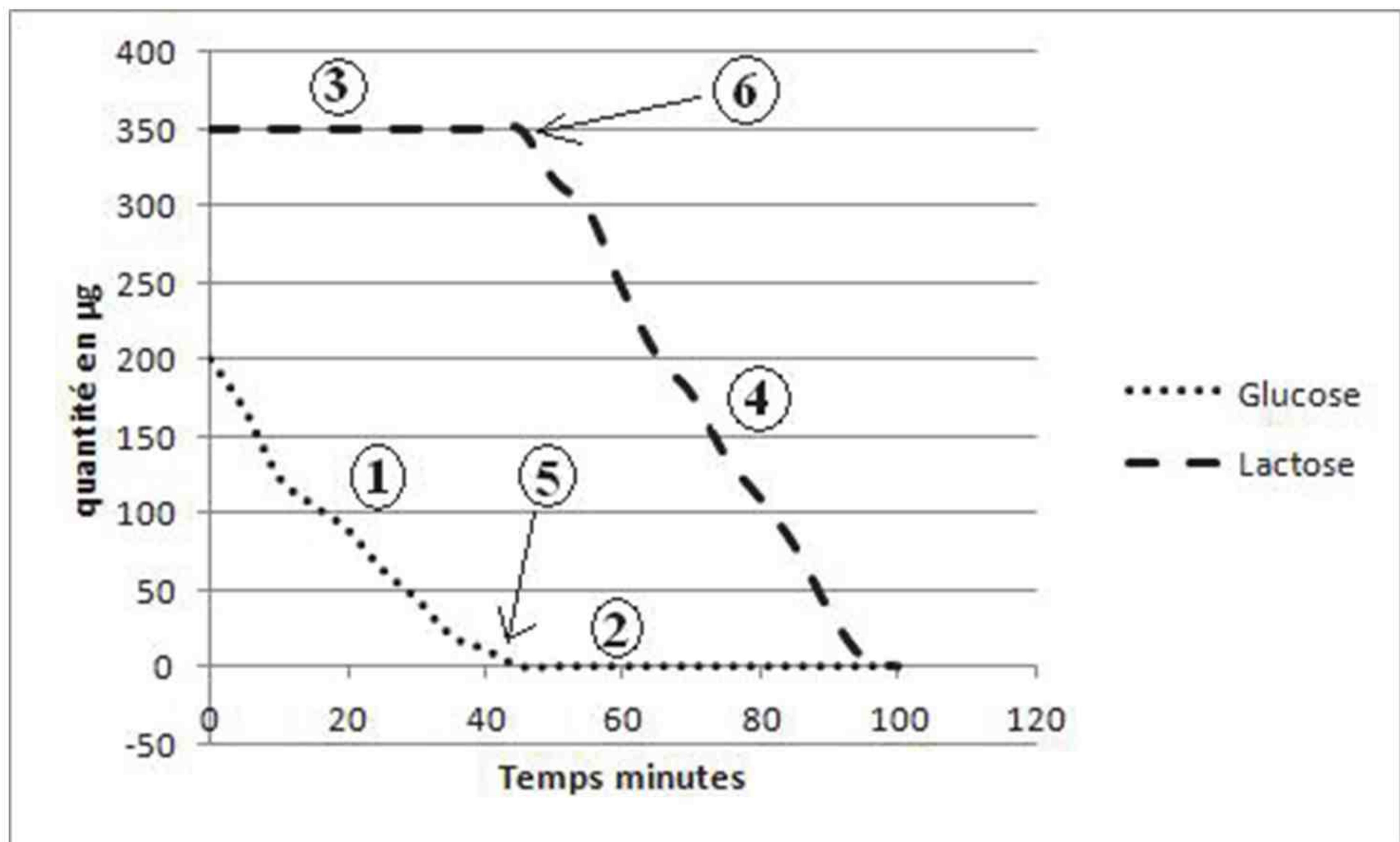


Figure 30 :

- 1) Quel est le nom attribué à la structure génétique représenté par la figure 28? Donnez sa définition.
- 2) Quel est le rôle des gènes *lacZ*, *lacY*, *lacA* et *lacI* ?
- 3) Ces gènes sont-ils exprimés continuellement ?
- 4) Quelle est la réaction catalysée par la protéine synthétisée par *lacZ* ?
- 5) La figure 29 représente la quantité de la protéine synthétisée par le gène *lacZ* en fonction de la présence du lactose.
 - a. Donnez le nom des éléments numérotés ainsi que le titre de la figure 29.
 - b. Expliquez ces résultats en montrant comment se fait la régulation.
- 6) Dessinez un schéma simple qui explique ce mode de régulation.
- 7) Quel est le type de régulation établie par cette structure génétique ? Pourquoi ?
- 8) La figure 30 montre l'utilisation de deux sucres en même temps, le glucose et le lactose par *E. coli*.

- a. Donnez le nom des éléments numérotés ainsi que le titre de la figure.
- b. Expliquez ces résultats en montrant le comportement de la structure génétique représenté par la figure 28.

Exercice N° 09 : PCR

Afin de rechercher un gène de résistance aux antibiotiques, des chercheurs ont utilisé une technique d'amplification PCR. Pour cela, ils ont désigné des amorces spécifiques et ont préparé un mixte qui contient une enzyme appelée Taq polymérase.

- 1) Donnez la définition de cette technique.
- 2) Quel est le rôle des amorces ? Et comment peut-on les désigner ?
- 3) Pourquoi ces chercheurs n'ont pas utilisé une ADN polymérase normale ?
- 4) La figure 31 est un schéma qui montre la procédure de l'amplification PCR. Donnez les noms des éléments numérotés ainsi que le titre de la figure 31.

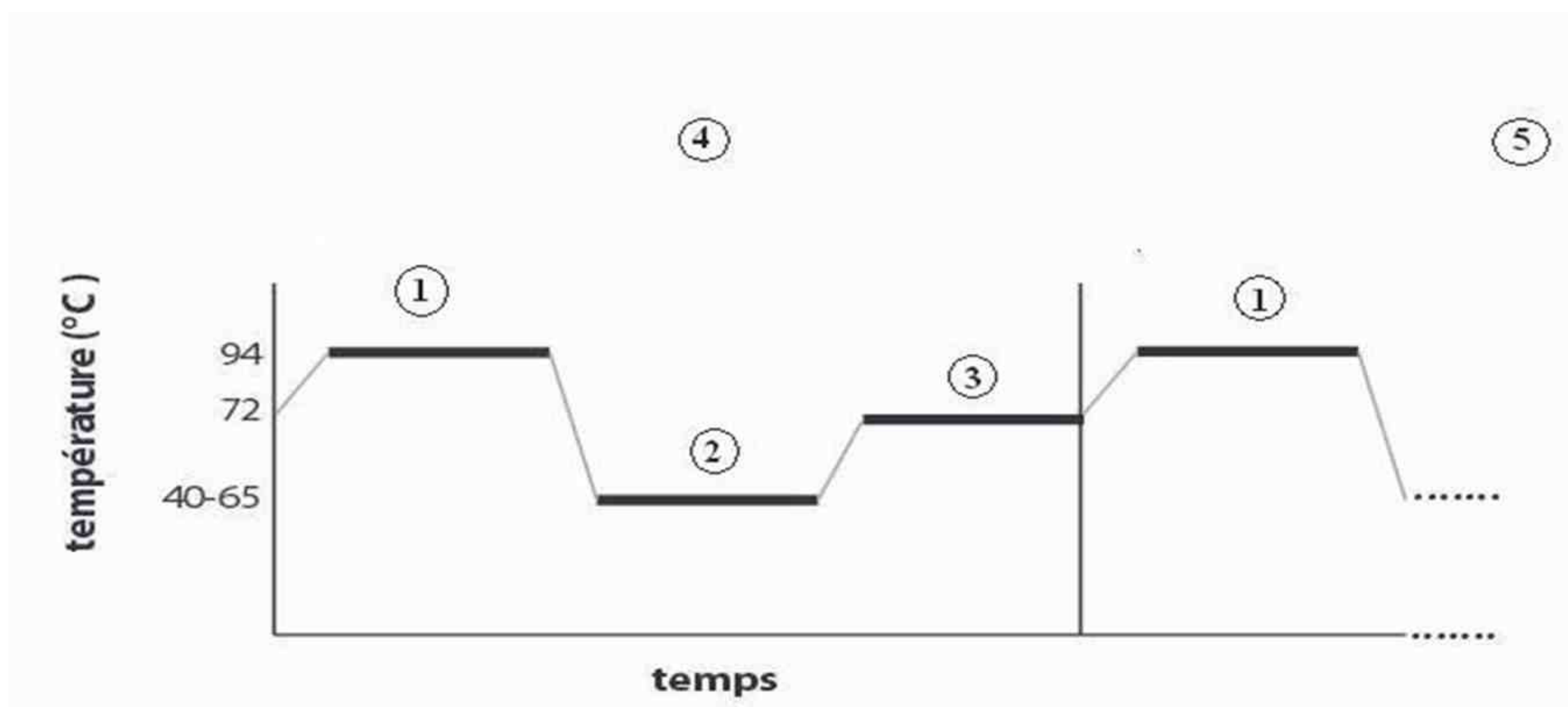


Figure 31 :

- 5) De quoi est constitué le mixte d'une PCR ?
- 6) Quelles sont les différences entre une PCR standard et une PCR en temps réel ?

7) De quoi sont caractérisées les techniques de PCR multiplexe et RT-PCR ?

Exercice N° 10 : Techniques moléculaires pour la comparaison des souches

Plusieurs techniques sont utilisées afin de comparer génotypiquement plusieurs souches au sein d'une même espèce.

1) Quel est l'intérêt de la comparaison génotypique des souches ?

2) Dans un tableau récapitulatif, comparer les techniques suivantes : PFGE, RFLP, MLVA ou VNTR, SNP, MLST, et MALDI-TOF-MS. La comparaison doit prendre en considération l'appareil, le principe, les enzymes (cas échéant), les réactifs (cas échéant), l'interprétation, les avantages, les inconvénients, le temps d'analyse, le coût d'analyse et coût de l'appareil.

Réponses aux exercices

Chapitre 1 : Microbiologie générale

Exercice N° 01 : Croissance et nutrition microbienne

1)

a) Ce milieu fait partie des **milieux non sélectifs enrichis**.

b) Les bactéries qui vont avoir la possibilité de pousser sur ce milieu sont appelées exigeantes.

2) Pour obtenir un milieu semi-solide on doit ajouter une quantité de 5-7,5 g.L⁻¹ d'Agar-Agar.

3) Les **peptones** sont le résultat d'action d'enzymes protéolytiques (pancréatine, pepsine, trypsine, papaine) sur des matières protéiques (viande, caséine, soja, gélatine...).

Les extraits de levures sont obtenus à partir de levures de boulangerie ou de brasserie par autolyses ou hydrolyse.

Exercice N° 02 : Paramètres influençant la croissance « Température »

1) A : Hyperthermophiles ; B : Thermophiles ; C : Mésophiles ; D : Psychrophiles

2)

A) Les groupes A et B qui sont les hyperthermophiles et thermophiles. Ils sont capables de vivre à ces températures élevées grâce à leurs protéines et enzymes thermostables.

B) Exemples d'intérêts biotechnologiques :

- La Taq polymérase, enzyme extraite de *Thermus aquaticus* utilisée pour la PCR et qui est active à des températures arrivant jusqu'à 90°C.

- Les enzymes de lessives exerçant leur action à l'eau froide [4].

Exercice N° 03 : Paramètres influençant la croissance « Température »

1) A : Psychrophiles

B: Mesophiles

C: Thermophiles

D: Hyperthermophiles.

2) ①: Température minimale

②: Température optimale

③: Température maximale.

3) ② est caractérisé par une croissance maximale parce que c'est la température préférable (idéale) pour la bactérie ce qui permet à cette dernière de se multiplier avec une vitesse maximale.

4) Les espèces donnant les courbes A et D peuvent être classé avec le groupe des extrémophiles.

5) l'intérêt biotechnologique des espèces D c'est qu'ils possèdent des enzymes thermorésistants et donc un intérêt biotechnologique qui permet d'utiliser ces enzymes pour réaliser des réactions catalytiques même dans des températures élevées [4].

6) Ce danger est la prolifération bactérienne au cours des conservations réfrigérées.

Exercice N° 04 : Paramètres influençant la croissance « pH, NaCl, pression »

1) Les champignons qui attaquent le raisin à des pH très bas : microorganismes **acidophiles**.

Les *vibrio* qui colonisent des poissons à pH =9 : microorganismes **basophiles**.

Les souches d'*Erwinia* qui affectent des plantes à des pH voisins de 7 : microorganismes **neutrophiles**.

2) Les espèces de *vibrio* prélevées de la mère peuvent être appelés **halophiles**

3) Ces souches sont dites « **barophiles** » ou « **piézophiles** », mais aussi **halophiles**

4) Un organisme est dit extrémophile, ou extrémophile, lorsque ses conditions de vie normales sont mortelles pour la plupart des autres organismes : températures proches ou supérieures à 100 °C (hyperthermophiles) ou inférieures à 0 °C (psychrophiles), pressions exceptionnelles (barophiles des grands fonds marins), milieux très chargés en sel (halophiles), milieux très acides (acidophiles) ou hyper-alcalins (alcalophiles), milieux radioactifs (Radiorésistant) ou anoxiques (sans dioxygène) ou non éclairés comme les endolithes (cyanobactéries marines) [5].

Exercice N° 05 : Paramètres influençant la croissance « courbe de croissance »

1) ① Phase de latence ② phase d'accélération ③ phase exponentielle ④ phase de ralentissement ⑤ phase stationnaire ⑥ phase de déclin.

- 2) Le taux de croissance représente l'augmentation du nombre de microorganismes par unité de temps ; tandis que le temps de génération est le temps nécessaire pour qu'une population double en nombre.
- 3) La phase exponentielle ③ ne commence pas sans la phase de latence ① car les bactéries durant cette première phase synthétisent les enzymes nécessaires à dégrader le substrat pour croître (c'est une phase d'adaptation).
- 4) La phase ③ est caractérisée par une ligne droite sur le graph donc un taux de croissance qui atteint un maximum ($\mu = \mu_{\max}$), le nombre de cellules augmente à un taux constant.
- 5) Dans la phase ⑤ y a une stabilité du nombre des bactéries malgré l'avancement du temps, car le milieu devient plus pauvre en nutriments et les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.
- 6) On appelle cette culture, la culture continue. Ils peuvent la réaliser en remplaçant le milieu épuisé par un autre neuf et en éliminant les métabolites en même temps.

La valeur μ (taux de croissance) est maximale et constante, donc ils vont maintenir les bactéries en phase exponentielle. Cette culture peut être réalisée dans un chémostat ou dans un turbidostat. L'intérêt scientifique de cette culture est d'étudier la physiologie de croissance des cellules bactériennes. L'intérêt économique est de gagner le temps de plusieurs phases de croissance et leurs répétitions pour chaque génération et donc diminuer le coût de la production de biomasse [6].

Exercice N° 06 : Dilutions

- 1) Il prépare deux tubes contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Il prend 1ml à partir de la solution mère et le met dans le premier tube pour obtenir 10^7 , puis à partir de ce tube de 10^7 il prend 1ml et le met dans le deuxième tube pour obtenir 10^6 UFC/ml.
- 2) Il prend 0,1 ml à partir de la solution mère qu'il met dans un tube contenant 9,9 ml d'eau physiologique stérile, soit une dilution de 1/100. Il obtient ainsi une concentration bactérienne de 10^6 UFC/ml.

Exercice N° 07 : Dilutions

- 1) La charge microbienne dans le quatrième tube est de 10^4 UFC/ml.
- 2) Pour avoir une culture dénombrable, on doit faire six dilutions décimales à partir de la solution mère de 10^8 UFC/ml jusqu'à 10^2 UFC/ml.
- 3) On peut faire une dilution de 10^5 UFC/ml à partir de la solution mère en mettant 10 μ l dans 10 ml d'eau physiologique ce qui correspond approximativement à une dilution 1/1000.

Exercice N° 08 : Dilutions

- 1)
 - a) Par rapport à la solution mère, les dilutions sont : 1/10, 1/1000, 1/50000, 1/250000, 1/625000, 1/625x 10^6
 - b) Par rapport à la dilution précédente les Dilutions sont : 1/10, 1/100, 1/50, 1/5, 2/5, 1/1000

2) La concentration bactérienne dans la solution mère est :

27 colonies \times l'inverse de la dilution (rapport à la solution mère) :
 $27 \times 10 \times 100 \times 50 \times 5 \times 5 / 2 \times 1000 \times 10$ (inverse du volume de l'inoculum) =
 16875×10^7 UFC/ml.

Le nombre d'UFC dans la solution mère est de $= 16875 \times 10^7 \times 100 = =$
 $16875 \times 10^7 \times 10^9$ UFC [7].

Exercice N° 09 : Dilutions et dénombrement

1) Pour trouver les volumes on applique la relation suivante ;

Volume de suspension + volume de diluant = volume final (10 ml)

La dilution = Volume de suspension / le volume final.

Tableau 22 : les volumes d'eau physiologique et de suspensions bactériennes correspondantes pour chaque dilution.

La dilution	Volume de suspension	Volume d'eau physiologique
1/10	1 ml	9 ml
1/5	2 ml	8 ml
3/5	6 ml	4 ml
1/60	0,167 ml	9,833 ml
3/70	0,43 ml	9,57 ml
1/3	3,33 ml	6,66 ml

2) Pour calculer la concentration des bactéries on applique la relation suivante :

Nombre des colonies * l'inverse de la dilution

$$17 * 10 * 5 * 5/3 * 60 * 70/3 * 3 = 595 * 10^4.$$

$$595 * 10^4 \text{ pour } 0,1 \text{ ml, pour } 1 \text{ m } \quad \mathbf{595 * 10^5 \text{ UFC/ml}}$$

Pour calculer le nombre de bactéries dans le tube initial, dans ce cas il faut prendre en considération le volume qui est de 10 ml.

$$\text{Donc on a } 595 * 10^5 * 10 = \mathbf{595 * 10^6 \text{ bactéries}}$$

Pour la deuxième méthode ; on calcule d'abord le nombre de bactéries présentes pour 1 ml.

$$5 \text{ bactéries} \quad \longrightarrow \quad 10 \mu\text{l}$$

$$x \quad \longrightarrow \quad 1000 \mu\text{l (1ml)} \quad \Rightarrow \quad x = 500 \text{ bactéries}$$

Ensuite on multiplie fois l'inverse des différents dilutions :

$$5 * 10^2 * 10 * 5 * 5/3 * 60 * 70/3 * 3 = \mathbf{175 * 10^6 \text{ UFC/ml}}$$

Pour 10 ml on multiplie par 10 donc on a $175 \times 10^7 \times 10 = \mathbf{175 \times 10^7}$ **bactéries**

3) Les deux méthodes n'ont pas donné le même résultat et on a trouvé un nombre presque trois fois moins dans la méthode de dénombrement que dans la méthode de comptage sur microscope.

Les deux méthodes ne donnent pas les mêmes résultats pour plusieurs raisons ;

- Des erreurs dans l'ensemencement
- Prélèvement de 0,1 ml sans homogénéisation du tube

- Les bactéries sont parfois mortes ou stressées et ne forment pas des colonies qui seront comptées.

Exercice N° 10 : Dilutions et dénombrement

1)

a. Les laborantins ont réalisé des dilutions pour pouvoir compter aisément les colonies du fait que généralement la solution mère et parfois les premières dilutions donnent des résultats avec des boîtes trop chargées et indénombrables.

b. La dilution qu'on doit utiliser pour dénombrer est 10^{-3} .

c. On doit utiliser cette dilution, parce que c'est la dilution qui contient un nombre de colonies entre 30 et 300 colonies ; car si le nombre est inférieur à 30, il n'est pas statistiquement significatif, mais aussi si le nombre est supérieur à 300, on risque de sous-estimer le nombre de bactéries. En effet, lorsque le nombre de bactéries est important, il peut y avoir une compétition des bactéries pour les éléments nutritifs et pour l'espace de croissance, le résultat est l'inhibition de la croissance d'une bonne proportion de cellules au niveau de la boîte.

2) Le nombre de bactéries = Moyenne des 3 essais \times 1/volumeensemencé \times facteur de dilution.

$$N = 104 \times 10 \times 10^3$$

$$N = 10,4 \times 10^5 \text{ UFC /ml de sang.}$$

3) On doit utiliser l'unité (U.F.C.) pour « Unité Formant Colonie », car c'est une unité plus précise que l'unité bactéries/ml. En effet, les chaînettes, les amas ou les agglomérats ne donnent qu'une seule colonie.

4) D'après le résultat obtenu lors du comptage par microscope optique, le nombre des bactéries par ml de sang est un peu plus important 17×10^5 alors qu'on a trouvé avec le comptage sur boîte $10,4 \times 10^5$ UFC /ml de sang. Cette différence est due généralement au fait que lors du comptage direct sous microscope on compte même les bactéries mortes. Ces dernières ne donnent pas de colonies sur boîte et donc on obtient cette différence de nombre.

Exercice N° 11 : Stérilisations

- Un flacon de 250 ml de milieu de culture : à autoclave.
- Les pipettes graduées en verre : au four Pasteur.
- 10 tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique : à autoclave.
- La solution d'enzyme : par filtration.

Exercice N° 12 : Stérilisations

1) Le but de la stérilisation est d'une part de maîtriser les micro-organismes introduits dans le milieu d'étude, et d'autre part d'éviter la contamination du milieu extérieur et des personnes [8].

2) Chaleur humide : l'Autoclavage

Chaleur sèche : Flambage / four Pasteur

3) Le microbiologiste travaille dans la zone de stérilité pour éviter la contamination de la manipulation par les microorganismes de l'environnement et pour éviter sa propre contamination par les microorganismes manipulés.

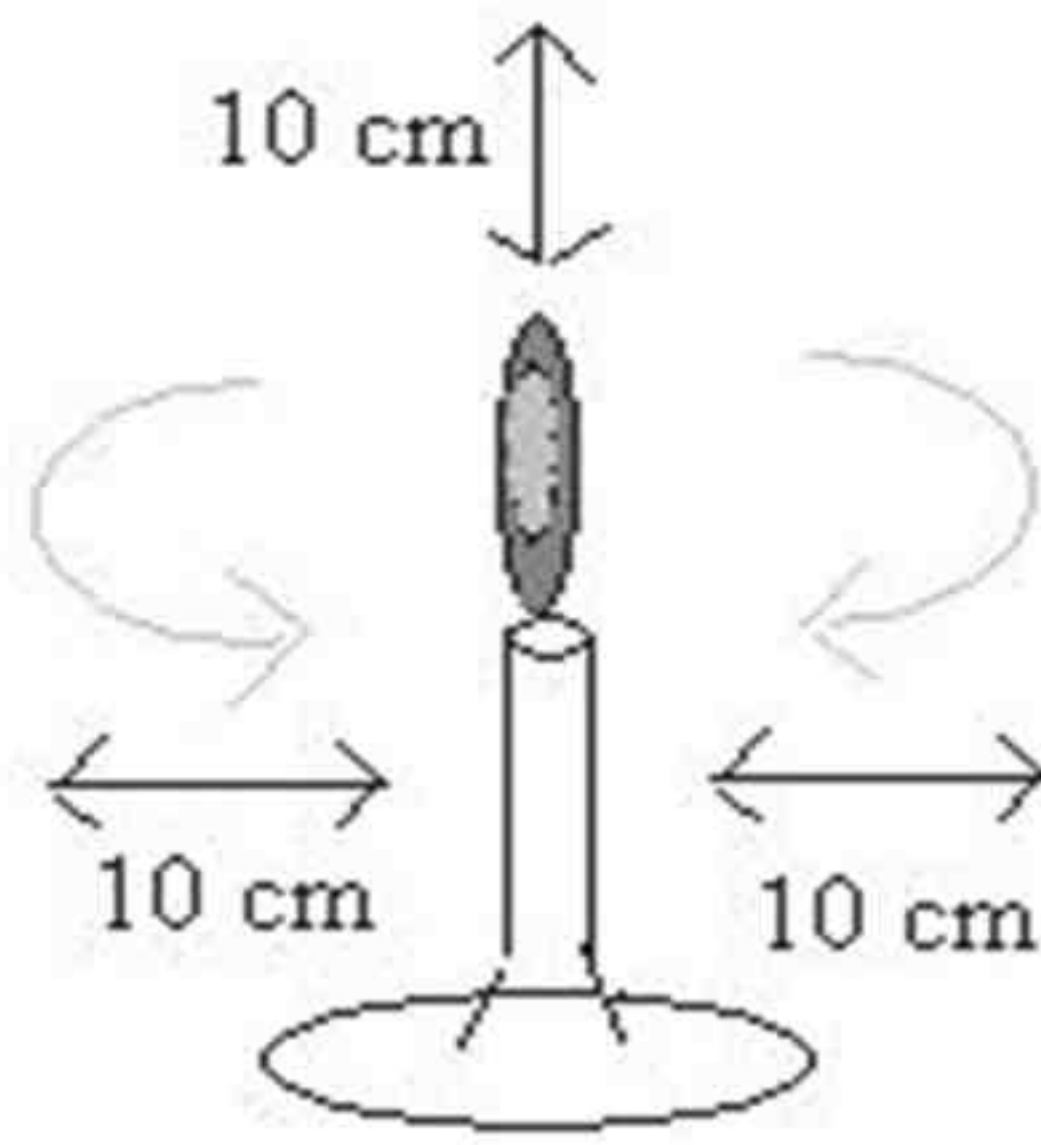


Figure 32 : schéma d'un bec bunsen

- 4) La stérilisation par radiations, exemple UV, X etc.
- 5) la filtration.

Exercice N° 13 : Pasteurisation

1) Le traitement (1) : pasteurisation. C'est un traitement employant un chauffage modéré et qui réduit la population microbienne, mais ne stérilise pas, cette méthode a été inventée par Louis Pasteur pour contrôler les altérations de vin. Cette méthode permet de tuer de 79 à 99% des microorganismes présents dans le lait.

Le traitement (2) : pasteurisation haute ou pasteurisation flash. C'est la méthode de pasteurisation la plus utilisée actuellement du fait de sa rapidité et son efficacité par rapport à la méthode ancienne.

Le traitement (2) : stérilisation UHT, pour «Ultra Haute Température». C'est une technique de stérilisation où le lait est porté à une température très élevée (entre 140 et 150°C) pendant un temps très court (2 à 5 secondes), Le lait UHT ne contient plus de germes.

- 2) Le lait pasteurisé doit être gardé au réfrigérateur, car il contient toujours des microorganismes et sa durée de conservation est de quelques jours. Le lait pasteurisé par la méthode flash doit être gardé également au réfrigérateur, mais sa durée de conservation est un peu plus longue que la méthode ancienne. Le lait UHT se garde 8 à 12 semaines dans son emballage fermé sans avoir besoin d'être refroidi. Mais une fois ouvert, l'emballage de lait UHT doit être gardé au réfrigérateur.
- 3) La différence entre ces traitements de pasteurisation et la tyndallisation, c'est que ces trois procédés sont basés sur un seul traitement thermique, alors que la tyndallisation est basée sur plusieurs traitements thermiques [9]. La tyndallisation est un procédé de stérilisation modérée qui permet d'éliminer du milieu traité, les formes de résistance des bactéries qui sont les spores. Pour cela le milieu est soumis à un chauffage discontinu à température modérée pendant quelques minutes (environ une trentaine) toutes les 24 heures, en ne dépassant pas les 60°C. Le chauffage suffit à éliminer toutes les formes végétatives, et provoquant ainsi un choc thermique qui est un facteur déclenchant pour qu'une forme de résistance (spore) entre en germination, et donne ainsi des formes végétatives. Les intervalles laissés entre les chauffages (24h) permettent donc aux spores de donner des bactéries, qui sont éliminées lors de l'augmentation de température suivante. De cette façon, on élimine progressivement toutes les spores du milieu, ce qui contribue à stériliser le produit.
- 4) Les germes pathogènes les plus dangereux qui contaminent le lait cru sont *Mycobacterium tuberculosis* l'agent de la tuberculose ainsi que *Brucella abortus* l'agent de brucellose [10].

Exercice N° 14 : Etude macroscopique et coloration de Gram

1) Bactérie A : à Gram positif

Bactérie B : à Gram négatif.

2) La forme sphérique est appelée cocci tandis que la forme allongée est appelée bacille.

3) L'étude s'appelle étude macroscopique.

4) La pigmentation de A est vraie, car le milieu est dit un milieu de base tandis que pour B la pigmentation n'est pas due à la bactérie elle-même, car les milieux d'isolements peuvent contenir parfois des indicateurs colorés [11].

Exercice N° 15 : Différences structurales entre Gram positifs et Gram négatifs

1) ① Polysaccharides capsulaires

② Porine

③ Bicouche lipidique (membrane cytoplasmique)

④ Peptidoglycane

⑤ Chromosome

⑥ Cytoplasme

⑦ Espace périplasmique

2) A : bactérie à Gram négatif

B : bactérie à Gram positif

- 3) Les fonctions principales de la membrane cytoplasmique sont les suivantes :
- Perméabilité sélective et transport de substances solubles à l'intérieur de la bactérie : la membrane est à la fois une barrière osmotique et un lieu de transport actif grâce à des perméases ;
 - Fonction respiratoire par transport d'électrons et phosphorylation oxydative pour les espèces bactériennes aérobies (rôle équivalent à celui des mitochondries des eucaryotes) ;
 - Excrétion d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les polymères en sous-unités suffisamment petites pour pouvoir traverser la membrane cytoplasmique et être importés dans la bactérie ;
 - Support d'enzymes et de transporteurs de molécules impliqués dans la biosynthèse de l'ADN, des polymères de la paroi et des lipides membranaires.
 - Certaines protéines constituant la membrane jouent un rôle dans la synthèse du peptidoglycane et sont appelées protéines de liaison aux pénicillines (PLP) ou penicillin-binding-proteins (PBP), car elles sont également la cible d'action des bêta-lactamines, famille d'antibiotiques à laquelle appartient la pénicilline [12].
- 4) La membrane cytoplasmique des bactéries est différente de celle des cellules eucaryotes par l'absence de stérols. Elle est caractérisée aussi par son extrême fluidité du fait du déplacement et de la rotation des groupements lipidiques [13].
- 5) La membrane plasmique s'altère par les détergents, car ces derniers possèdent des groupements lipophiles et hydrophiles ce qui détruit la membrane cytoplasmique bactérienne entraînant ainsi la mort de la

bactérie. Quelques antibiotiques agissent de la même manière que les détergents et détruisent la membrane plasmique. Plusieurs types d'huiles essentielles issues de plantes aromatiques détruisent les membranes plasmiques bactériennes, car ils contiennent des phénols et des composés oxygénés [14, 15].

a. Le peptidoglycane appelé aussi « muréine » qui constitue la paroi bactérienne est constitué d'une partie glucidique (= polysaccharide) et d'une partie peptidique.

Le polysaccharide est un polymère de glycosaminopeptide où la N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (NAM) sont liés par des liaisons osidiques. La partie glucidique est constituée d'une chaîne alternée de molécules NAM et NAG. Le NAM est un composé spécifique des parois bactériennes. Les deux polysaccharides sont liés par des ponts de chaînes latérales peptidiques identiques au niveau du NAM, formés par différents acides aminés : D-alanine, L-alanine, acide glutamique, L-lysine ou l'acide diaminopimélique (analogue de la lysine). Les acides aminés D sont spécifiques de la paroi bactérienne, on ne les retrouve jamais ailleurs [16].

b. Ci-dessous le schéma du peptidoglycane :

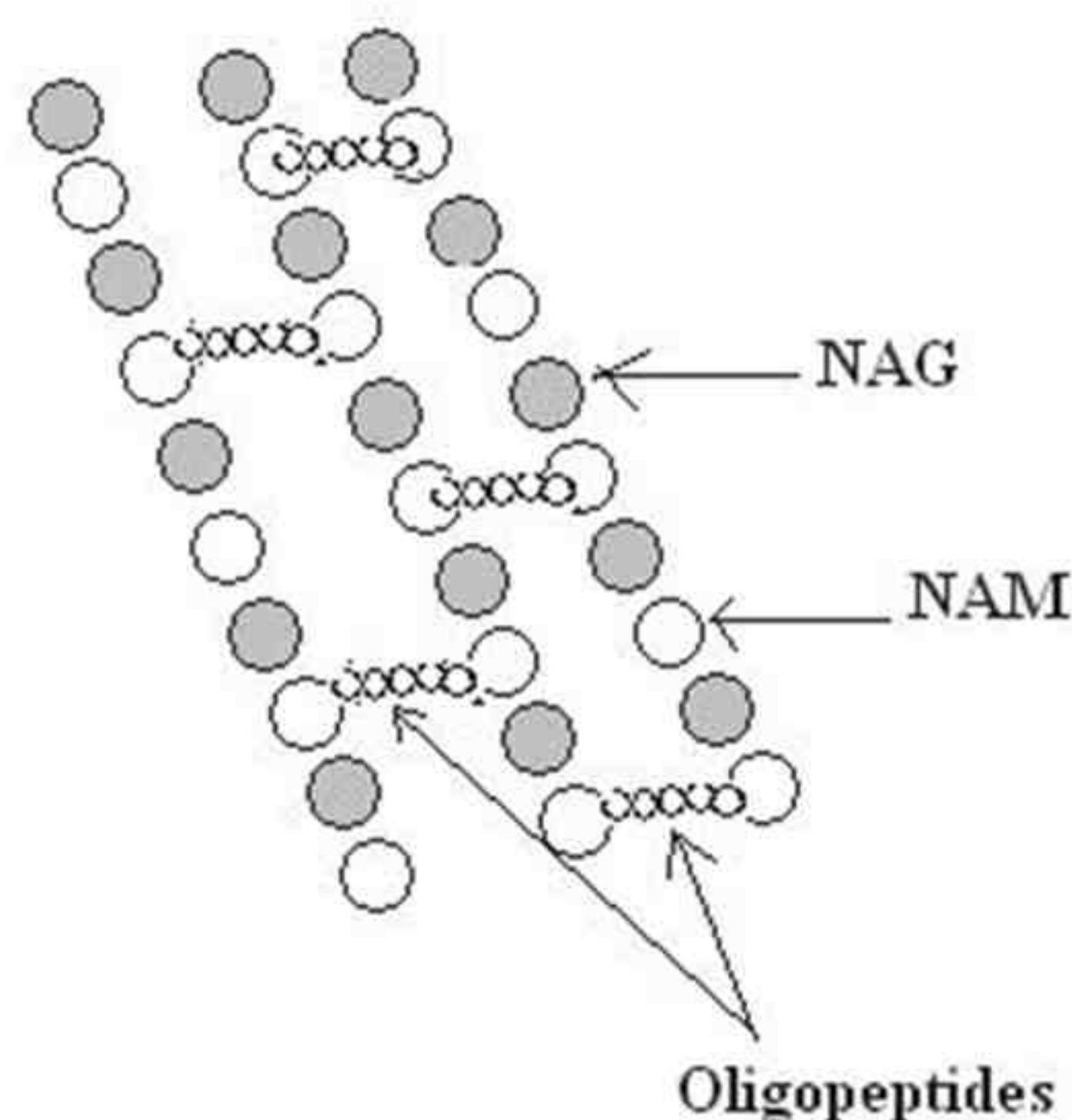


Figure 33 : Les constituants du peptidoglycane (muréine)

c. Le rôle du peptidoglycane est :

- Il donne la structure rigide de la paroi ainsi que la forme de la bactérie.
- Il joue un rôle déterminant dans la coloration de Gram et dans la spécificité antigénique des bactéries.
- C'est un support de l'action de certains enzymes exogènes (lysozyme) ou endogènes (autolysines) et de certains antibiotiques.
- Il est à l'origine d'activation du complément lorsqu'il contient le LPS [17].

d. Les bactéries dépourvues de peptidoglycane sont appelées *protoplastes* s'il s'agit d'une bactérie à Gram positif, ou *sphéroplastes* s'il s'agit d'une bactérie à Gram négatif [18].

e. Les bactéries dépourvues de peptidoglycane peuvent survivre et même se multiplier (on les appelle dans ce cas la forme « L ») à condition d'être placées dans un milieu isotonique dont la pression osmotique est équilibrée [19].

Exercice N° 16 : Milieux de culture

1) L'ingrédient qui lui permet d'obtenir une gélose est **l'agar-agar**

2) Il doit ajouter une quantité de (15-20 g.L⁻¹).

3)

a. Les Extraits de levure sont obtenus par autolyse ou hydrolyse, Les peptones sont le résultat d'action d'enzymes protéolytiques (pancréatine, pepsine, trypsine, papaïne) sur des matières protéiques (viande, caséine, soja, gélatine...).

b. Les extraits de levures constituent une source d'acides aminés et vitamines hydrosolubles (vitamines B). Les peptones sont une source d'acides aminés et des oligopeptides [20].

Exercice N° 17 : Milieux de culture

- 1) Ce milieu sert à étudier la dégradation du mannitol et la mobilité des bactéries.
- 2) C'est un milieu semi-solide.
- 3) Il contient le rouge de phénol comme indicateur coloré ; sa forme acide est jaune et sa forme basique est rouge [6].

Exercice N° 18 : Terminologie

1)

Inoculation ou **ensemencement** en microbiologie : introduire un inoculum bactérien dans un milieu de culture stérile (bouillon ou gélose, etc.), à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une anse de platine, etc.

Inoculum : Échantillon ou bien quantité de microorganismes prélevés à partir d'une culture mère, destinée à ensemencer (inoculé) au sein d'un milieu de culture favorable à sa multiplication.

Incubation : c'est d'exposer un milieu de culture inoculé par des microorganismes à une température idéale (optimale) pour la croissance de ces microorganismes pendant un temps bien déterminé.

Culture pure : est une culture qui contient une seule souche microbienne.

2) **La différence entre « Espèce » et « souche » bactérienne** : Une « Espèce » bactérienne est un ensemble de souches qui partagent de

nombreuses propriétés stables et identifiables et différent de façon significative des autres groupes de souches. Une « souche » est constituée des descendants d'une seule culture bactérienne pure [21].

3) L'isolement consiste à des ensemencements sur des milieux de culture dans un but de séparation de façon à obtenir des colonies bien distinctes. On isole une bactérie pour l'obtenir en culture pure.

Exercice N° 19 : Techniques d'ensemencement et de dénombrement

1) La technique d'ensemencement adéquate est l'ensemencement dans la masse. Dans cette méthode la dilution de l'aliment est mélangée avec le milieu gélosé avant solidification de ce dernier, lorsqu'il est dans un état de surfusion (Température 45-48°C). Cette méthode est utilisée pour le dénombrement bactérien [22].

2) Pour avoir une culture moins dense dans un deuxième ensemencement, il est nécessaire de faire des dilutions successives.

3) La boîte de Pétri doit contenir un nombre approximatif entre 30 et 300 colonies.

Exercice N° 20 : Dénombrement par la cellule de Thoma

1) La cellule de Thoma est une lame creuse au centre avec un quadrillage de 400 petits carrés. Chaque petit carré a une surface de $1/400 \text{ mm}^2$. La distance entre la grille et la lamelle est de $1/10 \text{ mm}$ [23].

2) Le comptage sur cellules de Thomas se fait après 30 minutes de repos pour permettre une décantation des cellules.

3) Volume d'un petit carré = surface x hauteur.

$$V = 1/400 \times 1/10 = 1/4000 \text{ mm}^3 = 0,25 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3 = 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ (ml)}$$

$$= 1/400 \times 1/10 = 1/4000 \text{ mm}^3$$

Ensuite on fait la conversion en cm^3

$$= 0,25 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3 = 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ (ml)}$$

Le volume de 10 petits carrés = $0,25 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^3$.

Nous avons 200 cellules dans 10 petits carrés.

Le nombre total = 200 divisé par $0,25 \cdot 10^{-5}$

8×10^5 cellules / ml de l'échantillon analysé.

4) La coloration en bleu de méthylène n'est pas une coloration vitale, elle ne colore que les cellules mortes, à cet effet l'antibiotique utilisé en traitement pendant deux jours a réduit la population bactérienne vivante avec 70%.

Exercice N° 21 : Dénombrement NPP

1) Le bouillon lactosé bilié au vert brillant + cloche de Durham (BLBVB) est utilisé pour la recherche et le dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants et d'*Escherichia coli* dans le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires, les eaux d'alimentation et les eaux résiduaires [20].

2) La présence du trouble sans apparition du gaz signifie qu'il y a moins d'un coliforme dans 1 ml de la dilution testée, alors que si y a présence du

trouble et apparition de gaz, cela veut dire que il y au moins 1 coliforme dans 1 ml de la dilution testée.

3) La méthode NPP (Nombre le Plus Probable) en Anglais MPN (Most Probable Number) est une méthode de dénombrement utilisée dans le cas où on n'a pas la possibilité d'utiliser le milieu de culture solide pour dénombrer. Elle est basée donc sur l'ensemencement des milieux de culture liquides, comme le milieu BLBVB pour la recherche des coliformes dans l'eau et les denrées alimentaires.

Après ensemencement et incubation des tubes du milieu de culture liquide, on compte les tubes positifs obtenus dans cette analyse. Le nombre de tubes positifs obtenus nous permet de trouver un nombre caractéristique NC. Le NC est un nombre formé de trois chiffres, le premier chiffre correspond 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 [24].

4) Selon la table de Mac Grady, à chaque nombre caractéristique correspond un nombre plus probable de germes par volumeensemencé de la dilution considérée.

(Voir table de Mac Grady dans la partie annexe).

Tableau 23 : Le nombre caractéristique de la rivière N° 01 :

Dilution	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷
Rivière 1	+++	+++	++ -	+ - -	- - -	---	---
Nombre caractéristique	3	3	2	1	0	0	0

Le nombre caractéristique est donc 321. Le nombre le plus probable qui lui correspond dans la table de Mac Grady est 15.

Le nombre de bactéries est donc égal à : 15×10^2 UFC/ml (10^2 est déterminée du fait que la dilution 10^{-2} est la plus grande dilution ayant donné trois tubes positifs).

Tableau 24 : Le nombre caractéristique de la rivière N° 02 :

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

D'après le résultat obtenu, on peut constater que les dilutions réalisées n'étaient pas suffisantes, Il faut diluer davantage l'échantillon jusqu'à ce qu'on trouve des tubes négatifs.

Toutefois ce résultat peut être utilisé pour estimer le NPP ;

300 à la dilution 10^{-7} , le MPN = $2,5 \times 10^7$ germes/1ml d'eau de rivière.

330 à la dilution 10^{-6} , le MPN= 25×10^6 germes/ml= $2,5 \times 10^7$ germes /1ml d'eau de rivière.

ou 333 à la dilution 10^{-5} , le MPN= 140×10^5 germes/ml= $1,4 \times 10^7$ germes/1ml d'eau de rivière.

Ces résultats d'estimations sont valables pour utilisation, car ils sont assez proches donc on peut utiliser une parmi ces estimations.

Tableau 25 : Le nombre caractéristique de la rivière N° 03 :

Dilution	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷
Rivière 3	+++	+++	+++	+++	+ - -	---	---
Nombre caractéristique	3	3	3	3	1	0	0

Le nombre caractéristique est 310. Le nombre le plus probable qui lui correspond dans la table de Mac Grady est 4,5. Donc le nombre de cellules est $4,5 \times 10^4$ UFC/ml.

Exercice N° 22 : Densité optique et dénombrement

1) **Tableau 26 : les volumes et les facteurs de dilutions effectués**

Volume de la suspension mère (ml)	Volume d'eau physiologique (ml)	Dilutions
3	0	0
1,5	1,5	1/2
0,75	2,25	1/4
0,375	2,625	1/8
0,187	2,813	1/16

2)

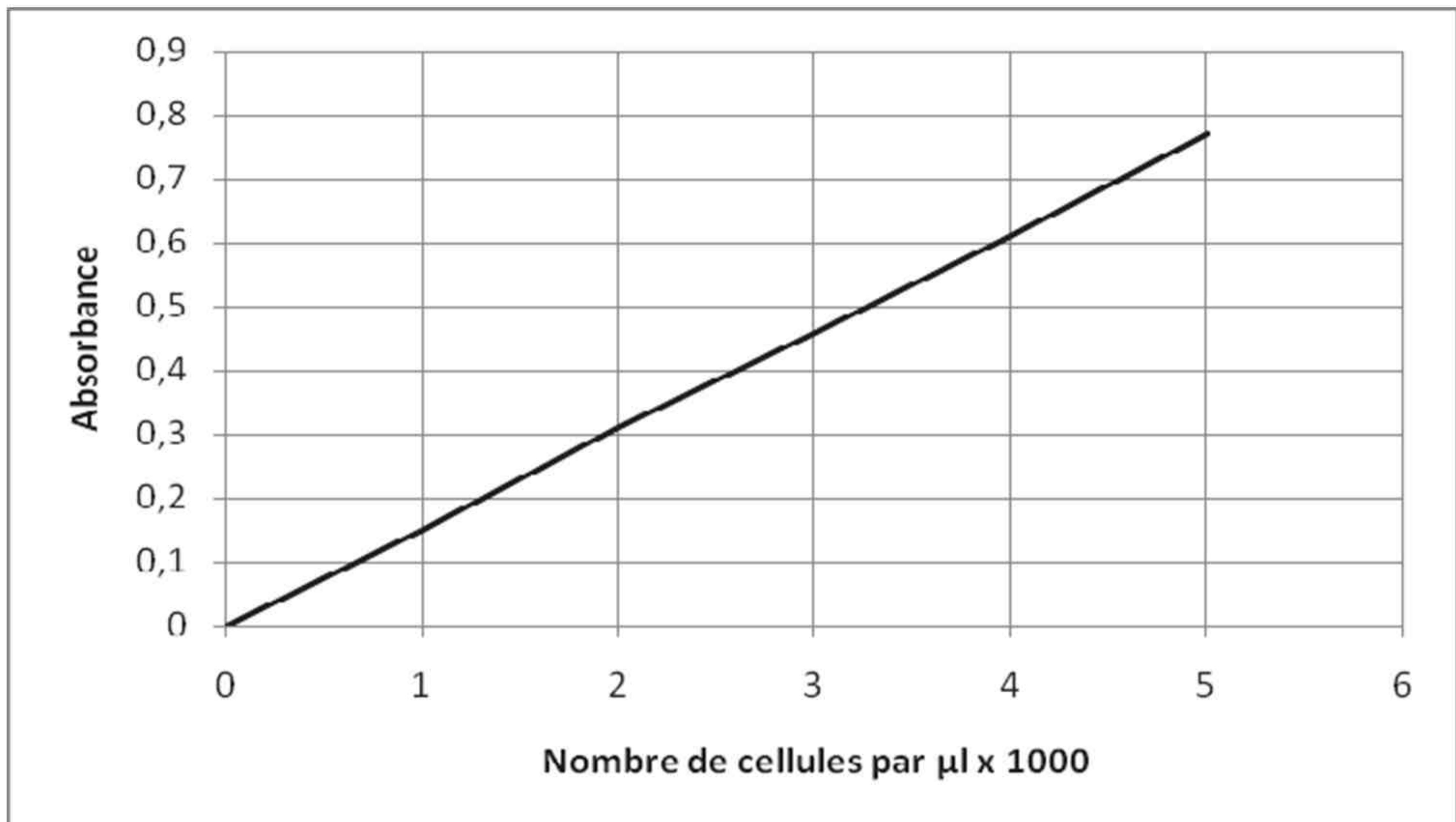


Figure 34 : Droite d'étalonnage : Absorbance = f [cellules]

3)

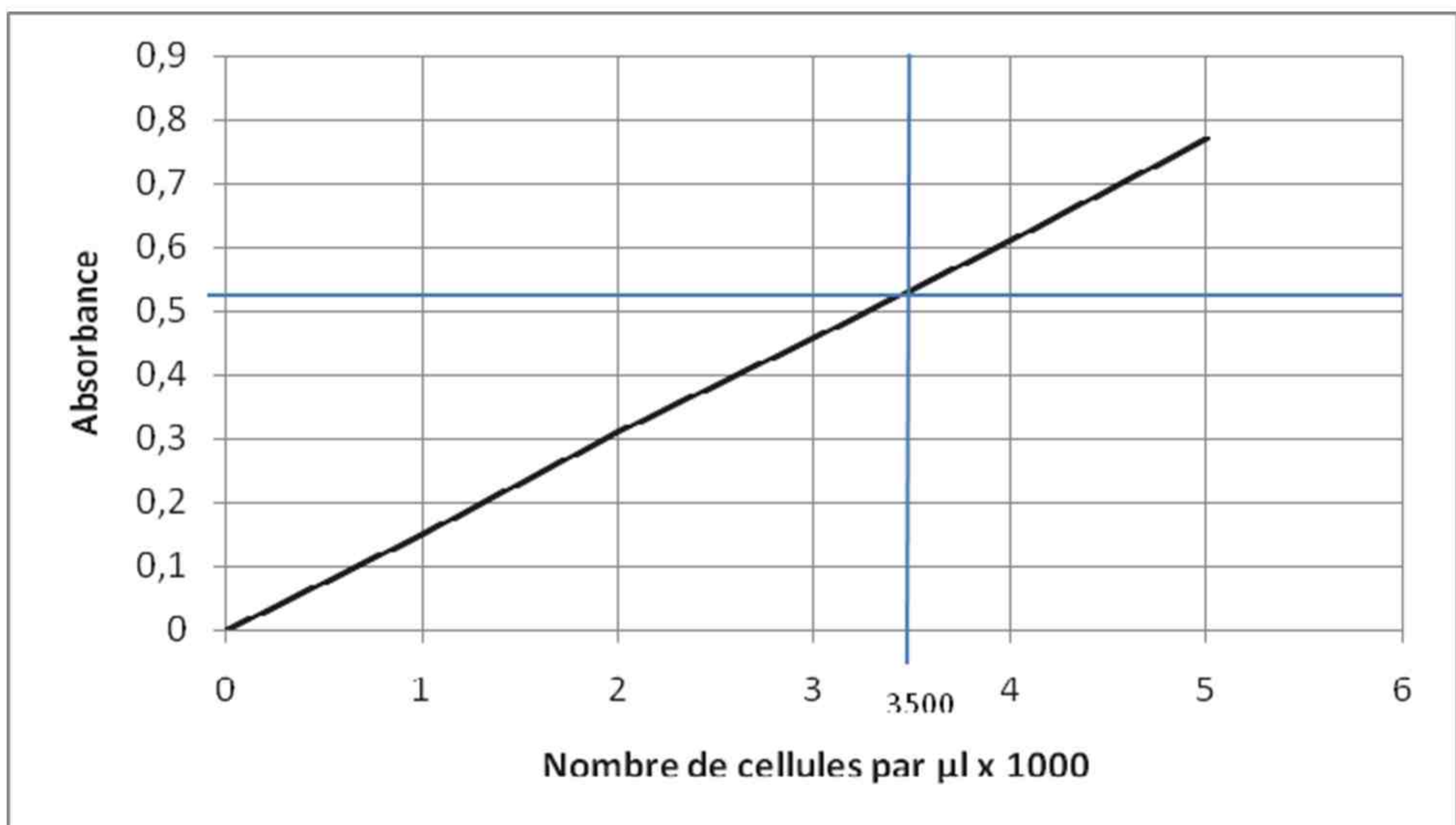


Figure 35 : Détermination graphique de la concentration

Valeur lue : absorbance = 0,54 correspondant à 3 500 cellules par microlitre

4) Ils existent d'autres méthodes simples qui permettent de dénombrer les cellules bactériennes telle que le dénombrement par la cellule de Thoma à l'aide du microscope optique

Exercice N° 23 : Microorganismes eucaryotes et procaryotes

1) **Tableau 27** : les caractéristiques générales de chaque microorganisme

Microorganismes	Type	Gram	Enveloppe nucléaire	Paroi
<i>Escherichia coli</i>	procaryote	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	procaryote	+	-	+
<i>Amoeba proteusc</i> (amibe)	eucaryote	/	+	-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	eucaryote	/	+	+
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	eucaryote	/	+	-

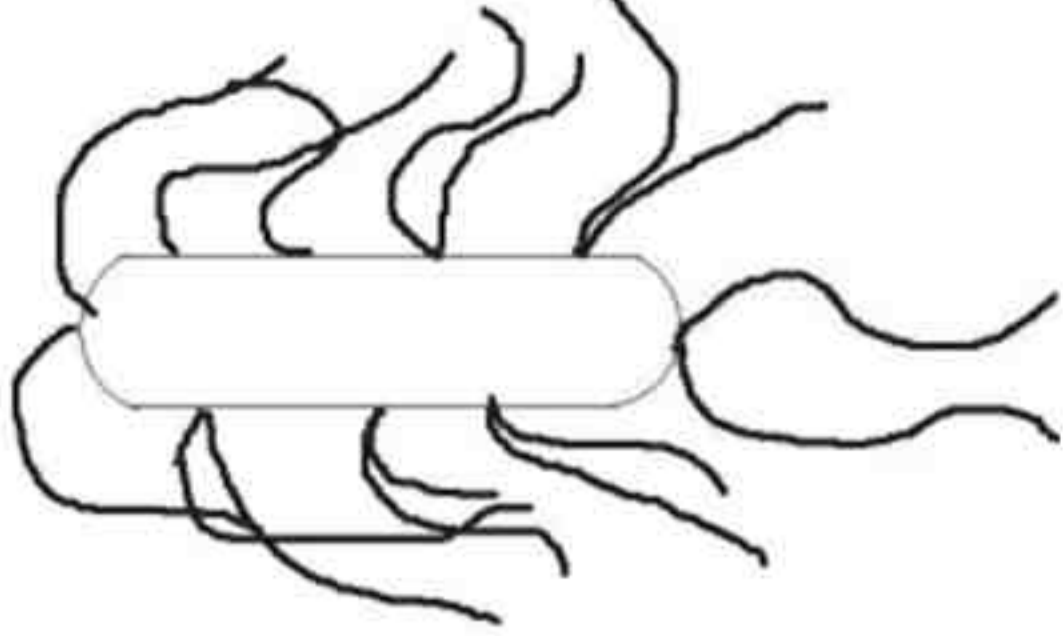



2) La signification du terme procaryote en grec « avant noyau », les microorganismes procaryotes sont généralement les bactéries. Tandis que la signification du terme eucaryote signifie en grec « bon noyau ». les microorganismes eucaryotes sont généralement les levures, algues et protozoaires [10].

Exercice N° 24 : Structure bactérienne

1) ① Capsule ② Paroi ③ membrane plasmique ④ chromosome bactérien ⑤ cytoplasme ⑥ ribosome ⑦ Plasmide ⑧ flagelle.

- 2) On peut détecter la présence de la capsule au laboratoire en faisant un état frais à l'encre de Chine.
- 3) Le plasmide est une molécule d'ADN, le plus souvent circulaire constituée d'ADN double brin (bicaténaire) extra-chromosomique, capable de réplication autonome et non essentiel à la survie de la cellule.
- 4)
- a. L'élément ⑧ « flagelle » confère la mobilité à la bactérie.
 - b. Les flagelles sont des structures rigides, car ils ne se plient pas. Cependant ils tournent dans le sens inverse des aiguilles d'une montre conférant à la bactérie un mouvement. Ils sont constitués d'une structure longue, libres à une extrémité et attachés à la cellule bactérienne. Ils sont composés de sous unités protéiques notamment la flagelline, la partie enfouie dans la membrane plasmique est entourée par deux paires d'anneaux (corps basal).
 - c. Au laboratoire, il y a plusieurs méthodes pour détecter la mobilité d'une bactérie, parmi les méthodes les plus simples c'est la préparation et l'observation d'un état frais sur une lame. On peut également les observer sous microscope optique en réalisant une coloration par la méthode de Rhodes (épaississement des flagelles); on peut aussiensemencer le milieu mannitol-mobilité qui permet de détecter la mobilité, et enfin la microscopie électronique permet de voir les flagelles, s'ils sont présents chez la bactérie, d'une manière claire.
 - d. Les différentes dispositions de ⑧ sont : **polaires**, c'est-à-dire flagelles localisés à un ou deux pôles de la bactérie, **péritriches** c'est-à-dire flagelles répartis sur toute la surface de la bactérie.

Tableau 28 : Les différentes dispositions des flagelles

Flagelles péritriches	Flagelles polaires	
 <p data-bbox="314 817 810 964">Ex : <i>Salmonella typhi</i>, <i>Escherichia coli</i></p>		<p data-bbox="1459 364 1874 511">Flagelles polaires monotriches</p> <p data-bbox="1459 552 1874 708">Ex : <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
		<p data-bbox="1459 752 1874 899">Flagelles polaires lophotriches</p> <p data-bbox="1459 940 1874 1096">Ex : <i>Pseudomonas fluorescens</i></p>
		<p data-bbox="1459 1143 1847 1378">Flagelles amphitriches et multitriches</p> <p data-bbox="1459 1420 1864 1575">Ex : <i>Plesiomonas</i>, <i>Helicobacter</i></p>

5)

- a . Le constituant principal de l'élément ② est le peptidoglycane.
- b. Le peptidoglycane est constitué d'une longue chaîne polysaccharidique de deux dérivés sucrés N-acétyl muramique « NAM » et de N-acétyl glucosamine « NAG » avec des chaînes latérales de quatre acides L-aminés liés au NAM.
- c. Le peptidoglycane constitue la paroi bactérienne. Lors de coloration de Gram, le colorant violet de gentiane ou le cristal violet pénètre dans la cellule bactérienne quel que soit l'épaisseur de la paroi. Mais à l'étape décoloration rapide avec l'alcool, les bactéries à Gram négatif se décolorent rapidement, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycane (donc plus fine) qui va laisser passer l'alcool

(molécule hydrophile) ou le mélange alcool-acétone ; tandis que les bactéries à Gram positif ne se décolorent pas, car la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool, puisqu'elle est composée d'une « couche » de peptidoglycane plus importante, donc plus épaisse. Ce qui empêche l'alcool à pénétrer au cytosol bactérien et faire sortir le colorant [25].

Exercice N° 25 : Différentes formes et modes de regroupement des bactéries

- 1) Le mode de regroupement des bactéries est la façon avec laquelle plusieurs cellules bactériennes se rassemblent en donnant une forme caractéristique.
- 2) Les noms des formes de la figure 09 :
 - a. Cocci en chaînette : Un coccus est une bactérie de forme sphérique, les cocci en chaînettes sont une succession de ces bactéries sphériques formant ainsi une chaîne.
 - b. Cocci en tétrade ou tétracoques : c'est un regroupement de plusieurs cocci en groupe de quatre.
 - c. Cocci en grappe : c'est un regroupement de plusieurs cocci en forme d'amas (grappe de raisin).
 - d. Bacille incurvé : c'est un bâtonnet incurvé.
 - e. Spirille : cellules sous forme hélicoïdale.
 - f. Coccobacille : Leur nom est dû au fait qu'il s'agit d'une forme intermédiaire entre un cocci (rond) et un bacille (bâtonnet).
 - g. Bacille fusiforme : son nom est attribué à sa morphologie fusiforme.
 - h. Diplocoques : c'est un regroupement de deux cocci en paire formant parfois un aspect de grain de café.

- i. Diplobacille : c'est un regroupement de deux bacilles en paire.
- j. Streptobacilles : c'est un regroupement de plusieurs bacilles en chaînette.
- k. Bacille en forme de massue : C'est un bâtonnet à extrémités souvent renflées.
- l. Bacille en forme ramifiée : c'est un bâtonnet avec une morphologie généralement sous forme « Y ».
- m. Bacille filamenteux : c'est un bâtonnet de forme irrégulière formant ainsi des filaments ramifiés en hyphe.

3) La morphologie des espèces bactériennes :

Tableau 29 : Les morphologies des espèces bactériennes schématisé dans la figure 09

Bactérie	forme
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
<i>Yersinia pestis</i>	6
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	11
<i>Fusobacterium fusiforme</i>	7
<i>Treponema pallidum</i>	5
<i>Streptococcus spp.</i>	1
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	10
<i>Micrococcus spp.</i>	2
<i>Neisseria meningitidis</i>	8
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	12
<i>Vibrio cholerae</i>	4
<i>Streptomyces spp</i>	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	3

Exercice N° 26 : Temps de génération

1) Par définition, le temps de génération ou de doublement (G) est le temps requis pour le doublement de tous les constituants bactériens. L'augmentation du nombre de cellules durant la phase exponentielle représente une progression géométrique du nombre 2. Une cellule qui se divise en deux est exprimée comme suit: $2^0 \rightarrow 2^1$. Deux cellules qui se divisent en quatre est exprimé comme allant de $2^1 \rightarrow 2^2$ et ainsi de suite. Donc la relation mathématique entre les cellules présentes initialement et après un temps donné en phase exponentielle est: $N = N_0 2^n$ [26].

Où N représente le nombre théorique final de cellules, N_0 le nombre initial et n le nombre de générations.

2) On a $N = N_0 2^n$, pour pouvoir calculer n , la formule peut être réécrite comme suit:

$$n = (\log_{10} N - \log_{10} N_0) / \log_{10} 2 [10].$$

Tube 1 : $N = 400$ bactéries dans un volume de $5 \mu\text{l}$, donc $400 \times 2 = 800$ bactéries dans $10 \mu\text{l}$

$N_0 = 100$ bactéries dans $10 \mu\text{l}$.

$$n = (\log_{10} 800 - \log_{10} 100) / \log_{10} 2 = 3 \text{ générations}$$

Le temps d'incubation était 120 min , donc on a $120/3 = 40 \text{ min}$.

Donc le temps de génération pour cette bactérie à 37° est de **40 min**

Explication : cette bactérie a un temps de dédoublement égal à 40 minutes, donc au début on a l'inoculum initial contient 100 bactéries. Après $1,40 \text{ min}$, le nombre a augmenté jusqu'à 200 bactéries c'est la génération

ensuite après 80 min le nombre a augmenté jusqu'à 400 bactéries, ensuite après 120 min le nombre a augmenté jusqu'à 800 bactéries.

Tube 2 : $N = 800$ bactéries dans un volume de $1 \mu\text{l}$, donc $800 \times 10 = 8000$ bactéries dans $10 \mu\text{l}$

$N_0 = 100$ bactéries dans $10 \mu\text{l}$

$n = (\log_{10} 8000 - \log_{10} 100) / \log_{10} 2 = 6,3$ générations

Le temps d'incubation était 120 min donc on a $120/6,3 = 19,04$ min

Donc le temps de génération pour cette bactérie à **15°C** est de **$19,04$ min.**

3) D'après les résultats obtenus ces bactéries sont psychrophiles.

Explication : La bactérie étudiée a un temps de génération beaucoup plus court lorsque la température est basse à 15° alors que le temps de génération est plus long à une température plus élevée à 37° , ce qui indique que cette bactérie a une croissance optimale à des températures froides donc elle est psychrophile.

Exercice N° 27 : Type respiratoire

1) Le but principal de l'utilisation de cette gélose est l'étude du type respiratoire.

2) La consistance du milieu Viande-Foie est semi-solide.

3) A : bactérie anaérobie stricte, B : bactérie aérobie stricte, C : bactérie micro-aérophile, D : bactérie aéro-anaérobie facultative [27].

Exercice N° 28 : Sporulation

1)

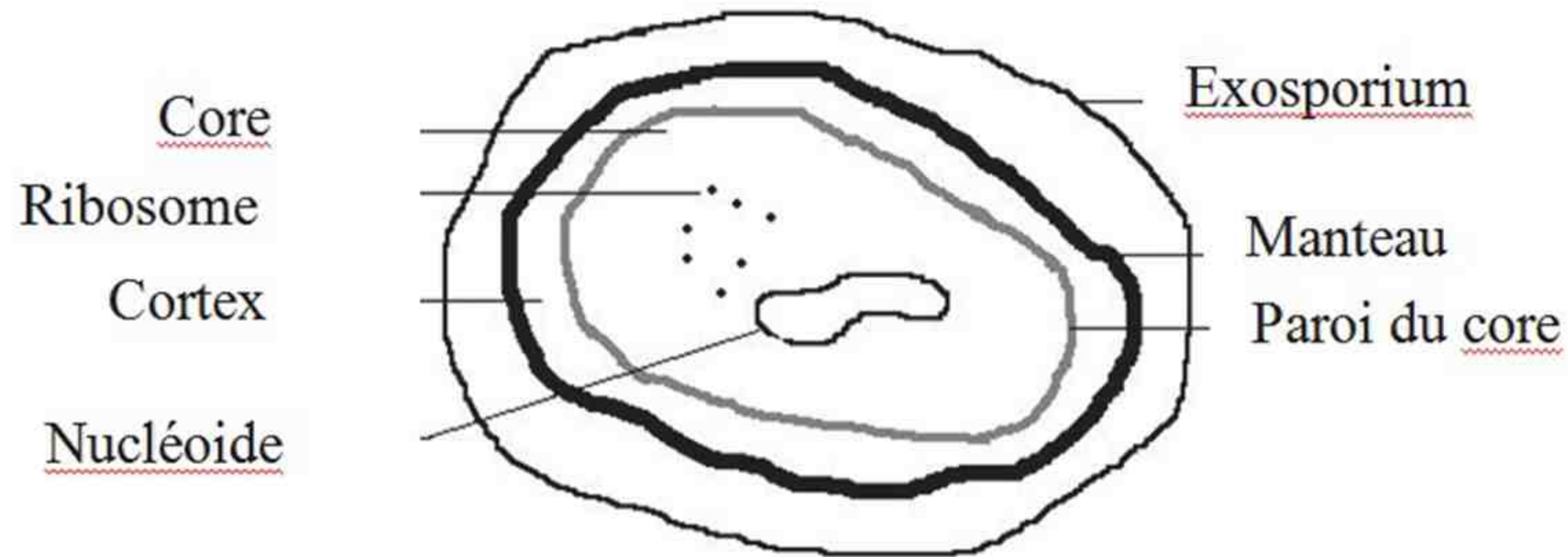
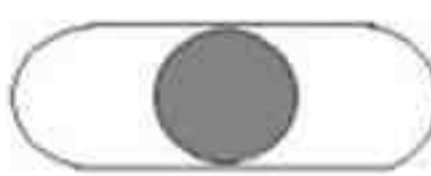
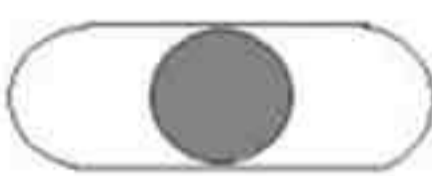
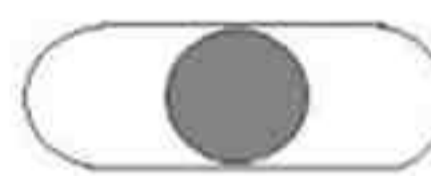







Figure 36 : Schéma d'une endospore

2)

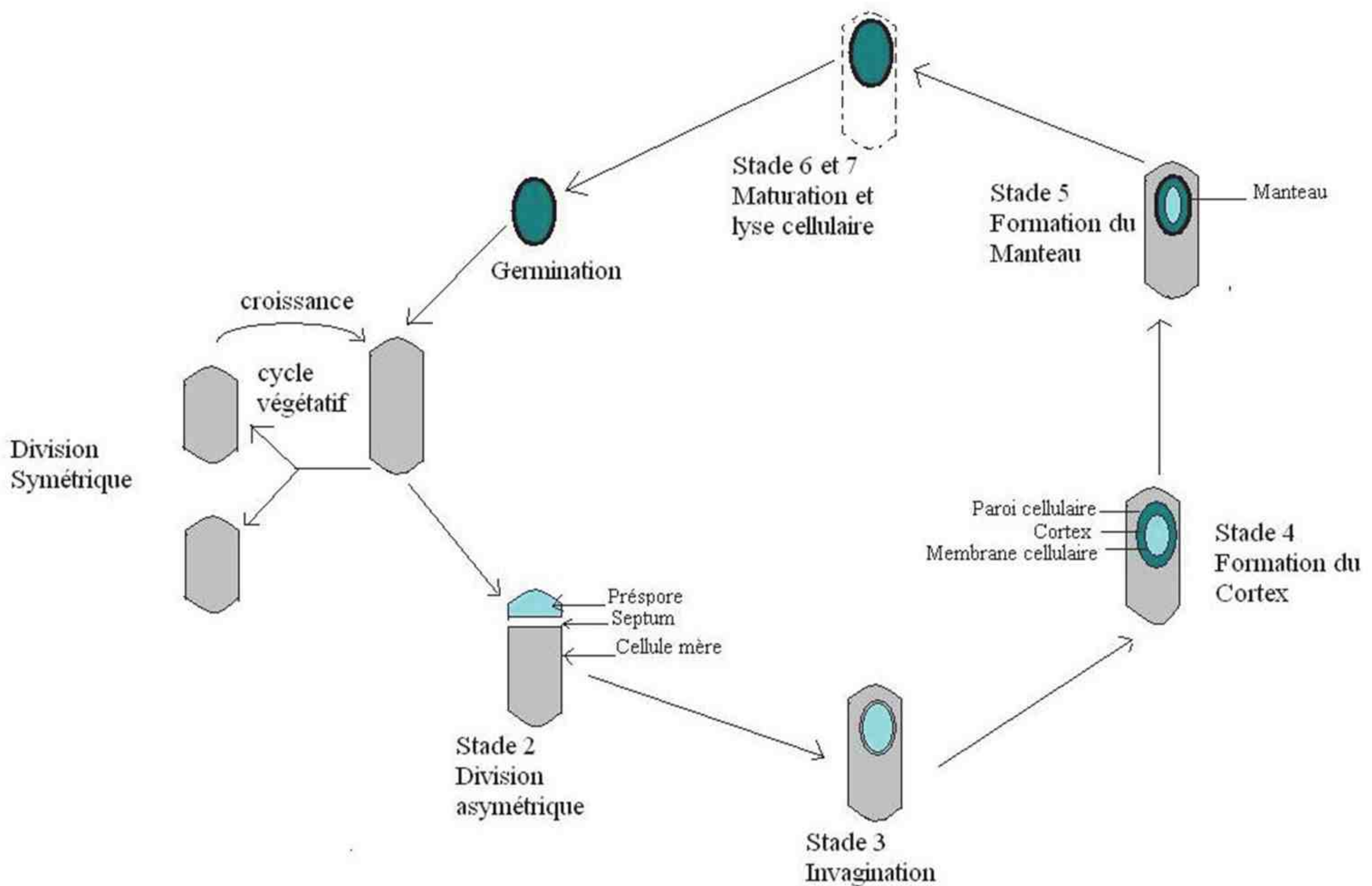
Les différentes formes et positions de spores sont résumées dans le tableau suivant ;

Tableau 30 : Les différentes formes et positions des spores

Spore		
Selon la forme	Selon la position	Selon la déformation de la bactérie par la spore
Spore sphérique 	spore centrale 	spore non déformante 
spore cylindrique 	spore subterminale 	spore déformante 
spore ovoïde 	spore terminale 	

3) Cycle de sporulation de *Bacillus subtilis* [28]

Figure 37 : Cycle de sporulation de *Bacillus subtilis*



4) La bactérie sporule afin de résister aux conditions environnementales sévères (défavorables) telles que les agents physiques (température, dessiccation, radiations UV, etc.) et aux agents chimiques (solvants, alcool, etc.) [29].

Le phénomène de la sporulation n'est pas commun chez toutes les espèces bactériennes, il est réservé à certaines espèces qui ont la capacité de sporulation.

5) Exemple 1 : *Clostridium tetani* : c'est un bacille anaérobie, à Gram positif, appartenant au genre *Clostridium*, responsable du tétanos chez l'homme du fait qu'il sécrète une toxine neurotoxique [30].

Exemple 2 : *Bacillus cereus* : c'est un bacille aéro-anaérobie facultatif, à Gram positif, appartenant au genre *Bacillus* responsable d'intoxications alimentaires puisque ce pathogène produit des entérotoxines [26].

6) Parmi les techniques les plus utilisés qui permettent de visualiser les spores sous microscopie optique est la coloration en vert de malachite. Cette méthode nécessite une préparation d'un frottis suivie par une coloration en utilisant le vert de malachite (à froid ou à chaud) ensuite un rinçage et une deuxième coloration par la fuschine. Les spores apparaissent vertes dans des corps bactériens roses [18].

Exercice N° 29 : Biofilm

- 1) L'état B s'appelle état de biofilm ou sessile, les bactéries sont alors attachées entre elles et à une surface et vivent en communauté dans ce biofilm.
- 2) Le synonyme de l'état A est l'état planctonique, les bactéries sont isolées et flottent dans le milieu.
- 3) Le nom de la substance qui colle les bactéries les unes aux autres est la matrice. Elle est composée de substances polymériques extracellulaires (EPS pour « extracellular polymeric substance »). En termes de poids et de volume, ils constituent l'élément structural majeur du biofilm et ils peuvent représenter 85% de la masse totale. Les EPS jouent un rôle important dans la relation des microorganismes entre eux et avec la surface. Parfois les EPS sont constituées d'exopolysaccharides tels que les alginates.

La matrice est constituée également de débris cellulaires (protéines, acides nucléiques, etc.) et de déchets du métabolisme cellulaire, exemple : les acides organiques. Enfin, parmi les constituants de la matrice, les débris

issus de matière d'attachement, exemple : produits alimentaires, muqueuses des êtres vivants, etc.

La matrice exerce différents rôles : elle assure la cohésion de chaque microcolonie, les protège par exemple contre les agents antimicrobiens (antibiotiques et désinfectants), absorbe l'eau et piège les petites particules circulantes, elle fournit également des nutriments dissous et élimine leurs déchets [31].

Les étapes de formation du biofilm sont : **1**-Fixation ou Attachement initial. **2**-attachement irréversible. **3**-Formation de microcolonies (maturation initiale). **4**-Formation de macrocolonies et développement de la structure tridimensionnelle (maturation complète du biofilm). **5**- dispersion du biofilm [32, 33].

Exercice N° 30 : Les bactéries pathogènes

1) **Tableau 31** : les maladies infectieuses principales et leurs agents microbiens causals

Bactéries	Savants	Année	Maladies
<i>Bacillus anthracis</i>	Koch	1876	Charbon
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Neisser	1879	Gonococcie (ou gonorrhée, ou encore blennorragie)
<i>Salmonella typhi</i>	Eberth	1880	Fièvre typhoïde
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Koch	1882	Tuberculose

<i>Vibrio cholerae</i>	Koch	1883	Choléra
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Klebs/Loeffler	1883	Diphthérie
<i>Clostridium tetani</i>	Nicolaier	1885	Tétanos
<i>Escherichia coli</i>	Escherich	1885	Diarrhée
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Fraenkel	1886	Pneumonie
<i>Neisseria meningitidis</i>	Weischselbaum	1887	Méningite
<i>Brucella sp.</i>	Bruce	1887	Fièvre ondulante
<i>Clostridium perfringens</i>	Welch et Nuttal	1892	Gangrène gazeuse
<i>Yersinia pestis</i>	Yersin/Kitasato	1894	Peste
<i>Clostridium botulinum</i>	Van Ermengem	1896	Botulisme
<i>Shigella dysenteriae</i>	Shiga	1898	Dysenterie
<i>Treponema pallidum</i>	Schaudin/Hoffmann	1905	Syphilis
<i>Bordetella pertussis</i>	Bordet et Gengou	1906	Coqueluche
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Ricketts	1909	Méningite
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Henrique da Rocha Lima	1916	Typhus

[34, 35]

2)

a. Les trois espèces sont : *Vibrio cholerae* agent du choléra, *Yersinia pestis* agent de la peste, *Rickettsia prowazekii* agent du typhus.

b. La disparition de ces pandémies est due à la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1929 et des sulfamides par Gerhard Domagk en 1935.

c. la science qui s'intéresse à la microbiologie des maladies infectieuses anciennes s'appelle la paléomicrobiologie [36].

Exercice N° 31: Virologie

1) Figure 13

① : Protéines du manteau

② : Protéines de la capsid (capsomères)

③ : Acide nucléique

④ : Enveloppe membranaire

⑤ : Protéine spécifique virale de l'enveloppe

A : virion non enveloppé

B : virion enveloppé

Figure 13 : Schéma d'un virion à capsid icosaédrique.

Figure 14 :

① : Acide nucléique

② : Capsomères

③ : Capsid

Figure 14 : Schéma d'un virion à capsid hélicoïdale [37].

2)

a. L'origine de l'enveloppe membranaire des virus enveloppés est la cellule hôte. Ce genre de virus procure son enveloppe lipidique en traversant la membrane cellulaire ou nucléaire de la cellule hôte.

- b. Le rôle de l'enveloppe virale lors de l'infection est le phénomène de camouflage moléculaire, c'est-à-dire l'imitation de protéines de l'hôte par des protéines d'enveloppe, si bien qu'elles ne sont plus reconnues comme étrangères par le système immunitaire. Les protéines d'enveloppe virale peuvent imiter aussi les propriétés de liaison des protéines de l'hôte pour se camoufler [38].
- c. La présence de l'enveloppe virale est indispensable pour les virus enveloppés, sa perte ou une élimination des composantes lipidiques de l'enveloppe empêchent le virus enveloppé d'infecter la cellule hôte. Cette circonstance est utilisée pour inactiver les virus enveloppés, pour maîtriser la diffusion du virus [39].
- 3) Il y a quatre phases distinctes dans la reproduction virale : l'attachement ou fixation, pénétration, réplication du génome et finalement assemblage et libération des virions.

Exercice N° 32 : Mycologie

- 1) ① : Paroi
② : Membrane
③ : Réticulum endoplasmique
④ : Dictyosomes
⑤ : vésicules
⑥ : Ribosomes
⑦ : Mitochondrie
⑧ : Noyau
⑨ : Vacuole
⑩ : Septum

A: Structure d'un hyphe.

B: Structure d'une levure. [40].

2) La différence principale entre la structure « A » et « B » est que l'hyphe est une structure des champignons pluricellulaires tandis que la levure est un organisme unicellulaire.

3) Levures : *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*.

Mycètes possédant la structure de l'hyphe : *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*

4)

a. La masse emmêlée due à la multiplication de « A » s'appelle mycélium.

b. La croissance d'une extrémité d'un hyphe permet au mycète de s'étendre dans de nouvelles régions à partir du point d'inoculum, les parties anciennes des hyphes sont habituellement vidées de leur contenu, puisque le cytoplasme se déplace en avant dans l'extrémité en croissance selon les étapes suivantes :

- Des vésicules migrent vers les régions apicales de l'hyphe
- Les enzymes lysant la paroi cassent les fibres contenues dans celles-ci, la pression de turgescence pousse cette paroi à se propager.
- Les polymères et les précurseurs de la paroi amorphe passent à travers la couche fibrillaire.
- Les enzymes synthétisent la paroi reconstituent les fibres de celle-ci [41].

5)

a. La différence structurale entre les hyphes produits par les mycètes inférieurs et les mycètes supérieurs est que les mycètes inférieurs produisent un mycélium végétatif qui n'est pas septé (cloisonné). Alors

que les mycètes supérieurs possèdent des mycéliums complexes avec des septums (cloisons) perforés [42].

c. Les Zygomycota (Zygomycètes) et les Chytridiomycota (Chytridiomycètes) constituent le groupe des mycètes inférieurs tandis que les Ascomycota (Ascomycètes), les Basidiomycota (Basidiomycètes) et les Deuteromycota (Deuteromycètes) constituent les mycètes supérieurs.

6) Les Zygomycota et les Chytridiomycota ont soit une reproduction asexuée se caractérise par la production de sporange ou bien une reproduction sexuée caractérisée par des zygospores. Les Ascomycota produisent des conidiospores asexuées et des ascospores sexuées dans des cellules sacciformes appelées asques. Les Basidiomycota produisent rarement des spores asexuées et leurs spores sexuées naissent à partir de basides en forme de massue. Les Deuteromycota n'ont pas de reproduction sexuée [40].

Chapitre 2 : Agents antimicrobiens

Exercice N° 01 : Concentration minimale inhibitrice

- 1) C'est la plus petite concentration d'un antibiotique qui permet d'inhiber totalement la croissance visible à l'œil nu d'un microorganisme.
- 2) D'après la figure 16, la CMI est de 16 µg/ml.
- 3) Les concentrations qui peuvent être considérées comme CMB sont 32 et 16 µg/ml

Exercice N° 02 : Préparation d'une concentration d'un antibiotique

1) $C_1 : 80 \text{ mg}/2\text{ml} = 40\text{mg/ml} = 40000 \text{ µg/ml}$

V1: ?

C2: 500µg/ml

V2: 4000 µl

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad V_1 = C_2 \times V_2 / C_1 = 50 \text{ µl}$$

Donc on prend 50µl de solution concentrée de gentamycine et compléter jusqu'à 4000µl [40].

2) pour la préparation de 4ml avec une concentration 500 µg/ml on doit ajouter :

$$50 \text{ µl (solution mère)} + 3950 \text{ µl (eau distillée stérile)} = 4000 \text{ donc}$$

$$50/4000 = 1/80$$

Donc on a dilué 80 fois.

Exercice N° 03 : Préparation d'une concentration d'un antibiotique

$$\begin{array}{l} 1) \quad 512 \mu\text{g} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ \quad \quad X \quad \quad \quad \longrightarrow 1000 \text{ ml} \quad \quad x = 512000 \mu\text{g} = 512 \text{ mg/L} \end{array}$$

Nous voulons préparer un volume de 100 ml donc ;

$$\begin{array}{l} 512 \text{ mg} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\ X \quad \quad \quad \longrightarrow 100 \text{ ml} \end{array}$$

$X = 51,2 \text{ mg}$ à solubiliser dans 100 ml d'eau distillée stérile.

2) La pénicilline est un antibiotique d'origine naturelle, produit par un champignon du genre *Penicillium*. Les pénicillines sont les premières substances antibiotiques à avoir été découvertes en 1928 par Alexander Fleming lorsqu'il étudia des cultures de staphylocoques dorés [44].

3) Le mécanisme d'action de la pénicilline est l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne en se liant avec des protéines de la membrane qui s'appellent les PLP (protéines liant pénicilline) [14].

Exercice N° 04 : Principes de l'antibiogramme

1)

Tableau 32: Familles d'antibiotiques et leur cible.

Antibiotique	Famille	Cible
Gentamicine	Aminosides	l'ARN de la petite sous-unité du ribosome
Téicoplanine	Glycopeptides	Peptidoglycane
Oxacilline	Beta-lactamines	synthèse de la paroi cellulaire.
Cefoxitine	Beta-lactamines	synthèse de la paroi cellulaire.
Chloramphénicol	Phenicoles	Attachement à la sous-unité 50S (au site A) empêchant l'attachement des Amino-acylRNA au site A du ribosome
Vancomycine	Glycopeptides	Peptidoglycane
Amoxicilline	Beta-lactamines	synthèse de la paroi cellulaire.
Amoxicilline-acide clavulanique	Beta-lactamines	synthèse de la paroi cellulaire.
Imipenème	Beta-lactamines	synthèse de la paroi cellulaire.
Colistine	Polymyxines	membrane des bacilles à Gram négatif
Erythromycine	Macrolides	partie 50S du ribosome et en empêchant la translocation peptidique
L'acide nalidixique	Quinolones	ADN gyrase
Bacitracine	Polypeptides	Peptidoglycane
Ciprofloxacine	Fluoroquinolones	la topo-isomérase de type II (ADN-gyrase)

[14]

2) La céfoxitine : classe des céphalosporines

L'imipenème : classe des carbapénèmes

L'oxacilline : pénicillines du groupe M.

L'amoxicilline-acide clavulanique : aminopénicillines [14].

3) Les antibiotiques bactéricides sont des molécules qui tuent et détruisent les bactéries tandis que les antibiotiques bactériostatiques sont des molécules qui arrêtent la croissance bactérienne et stabilisent leur nombre, ce qui permet au système immunitaire d'agir et de neutraliser les bactéries.

4) Antibiotique naturel : Bacitracine

Antibiotique semi-synthétique : Amoxicilline

Antibiotique synthétique : Ciprofloxacine.

5) Une toxicité sélective est une propriété très recherchée pour un agent antimicrobien. Ainsi, l'agent éliminera un microorganisme infectieux sans entraîner des effets indésirables significatifs sur l'hôte traité par cet antibiotique.

6) L'intérêt du contrôle de la qualité de l'antibiogramme est de vérifier la reproductibilité des résultats en utilisant des souches de références, en suivant les recommandations internationales comme celles de EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) et du CLSI (Clinical and laboratory standards institute), et par conséquent s'assurer de la qualité des disques d'antibiotiques et des milieux de culture utilisés ainsi que la charge de l'inoculum et de la manipulation en général.

7) Une souche de référence est une souche d'origine sauvage qui a été étudiée et typée de point de vue phénotypique et génotypique ensuite a subi une conservation dans des banques de souches.

Les souches de référence sont utilisées comme des témoins dans les différentes expérimentations de microbiologie et aussi pour comparer leurs caractères avec ceux des souches sauvages et pour contrôler la qualité de la manipulation telle que l'antibiogramme. Exemple : les souches de référence ATCC (American Type Culture Collection).

Exercice N° 05 : Les cibles des antibiotiques

1) **Tableau 33** : les constituants de l'appareil nucléaire bactérien et les antibiotiques correspondants

Enzymes / acides nucléique	Rôle	Antibiotique
ADN	Support de l'information génétique	Nitroimidazolés
ADN polymérase	Copient les doubles brins d'ADN	-
ADN gyrase	Déroule l'ADN permettant ainsi l'action de l'ADN polymérase	Quinolones
ARN polymérase	Synthèse d'ARN	Rifamycines
ARNr (sous-unité 30S, sous-unité 50S et 16S)	Traduction de l'information génétique codée sur un ARN messager (ARNm)	Aminosides, Phénicolés, Cyclines, Ac fusidique, oxazolidinones

[14, 45]

2)

- a. Un gène universel est un gène présent chez toutes les espèces bactériennes alors que les autres gènes sont caractéristiques pour un embranchement, d'une famille, d'un genre ou d'une espèce bactérienne [46].
- b. L'utilité des gènes universels est la détection et l'identification bactérienne du fait qu'ils sont très conservés. La désignation d'amorces est la même pour toutes les espèces bactériennes et donc les amorces sont appelées amorces universelles. Le séquençage de ces gènes universels montre des différences minimales entre les espèces, ces différences sont utilisées comme un moyen de différenciation et d'identification en bactériologie [27].
- c. L'ARNr 16 S est un ARN ribosomique issu d'un gène universel très utilisé dans l'identification en bactériologie. Cependant, il existe certains cas où ce gène présente des limites, pour cela d'autres gènes universels seront utilisés [47].
- d. Parmi les gènes universels utilisés en identification bactériologique, le gène *RPOB* [48], le gène *hsp 65*[49], le gène *rec A* [50], et le gène *sod* [51].

Chapitre 03 : Biochimie microbienne et identification

Exercice N° 01 : Type trophique

1) Le type trophique d'un microorganisme traduit les sources d'énergie, de carbone et d'électron nécessaires à son métabolisme (l'anabolisme et le catabolisme) [52].

2) le type trophique peut être déterminé par une terminologie constituée respectivement de :

a : La nature de la source d'énergie qui sera emmagasinée dans les molécules organiques synthétisées (photo-, chimio-), ou consommée par les cellules pour leur fonctionnement.

b : La nature organique (-organo-) ou inorganique (-litho-) du donneur d'électrons.

c : La nature de la source de carbone (-auto-, -hétéro-)

3) Les cyanobactéries sont des photo-litho-autotrophes

Les autres bactéries sont chimio-organo-hétérotrophes

Les champignons parasites sont dits paratrophes.

Exercice N° 02 : Étude de la Voie de dégradation de glucose « MEVAG »

1) Le milieu utilisé dans l'expérience est le milieu MEVAG « Milieu d'Étude de la Voie d'Attaque des Glucides ».

Un glucide peut être catabolisé par voie respiratoire ou par voie fermentative. Le milieu MEVAG permet de distinguer entre les deux processus ; Lors des respirations, le glucide est oxydé en CO₂, par le dioxygène (ou un autre oxydant minéral) ; tandis que lors des fermentations le glucide est oxydé en acides, alcools etc. [27].

2) Les métabolismes des bactéries testées :

Bactérie A : Bactéries fermentatives.

Bactérie B : Bactéries oxydatives.

Bactérie C : Bactéries oxydatives-fermentatives.

3) L'origine du virage de l'indicateur coloré au jaune est due au changement de pH, car la dégradation d'un glucide s'accompagne généralement d'une acidification du milieu.

Exercice N° 03 : Test d'oxydase, de catalase et identification API

1) Le premier test est appelé test d'oxydase. L'enzyme recherchée est le cytochrome oxydase.

2) L'enzyme **cytochrome oxydase** est une **enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne** qui catalyse des réactions d'oxydation du type:



3) Concernant la procédure de la mise en évidence au laboratoire, elle se fait soit en déposant, sur une lame de verre, un carré de papier filtre et l'imbiber d'une solution fraîchement préparée de réactif, soit sous la forme d'un disque pré-imprégné par le réactif. Dans les deux cas, écraser avec une effilure de pipette Pasteur une colonie de germes à étudier sur ce papier (instrument n'oxydant pas le réactif).

Lecture : Si la colonie prend une teinte rose - violette, le germe possède une oxydase : le test est positif. Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif [32].

4) Les résultats peuvent être faussement positifs ou faussement négatifs pour les raisons suivantes :

- Oxydase faussement négative:

- Réactif périmé (faire un témoin oxydase +)

- Quantité trop importante de réactif ou humidification trop importante du disque.

- Quantité insuffisante de bactéries.

- Test réalisé avec une pipette trop chaude.

- Réalisation du test à partir d'un milieu glucidique (une fermentation peut "cacher" une respiration) ou d'un milieu sélectif.

- Oxydase faussement positive:

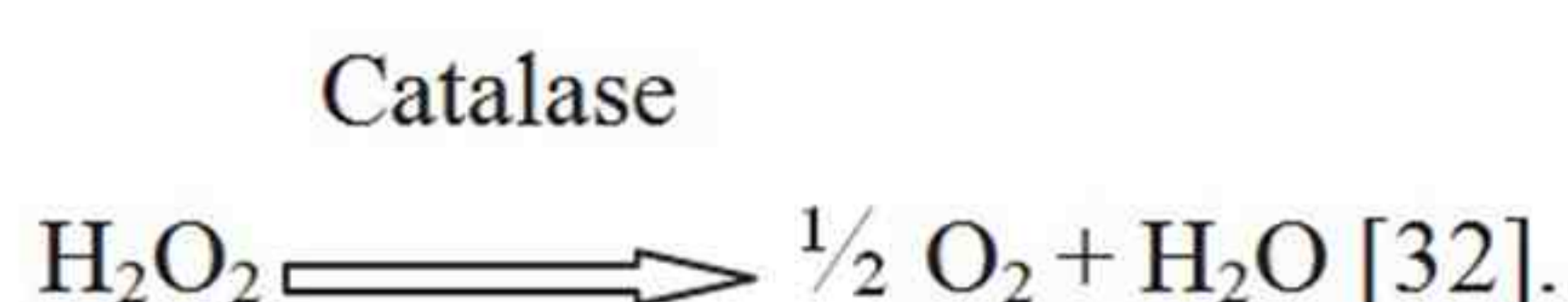
c. Test réalisé avec un instrument métallique chargé d'oxydes.

d. Lecture trop tardive.

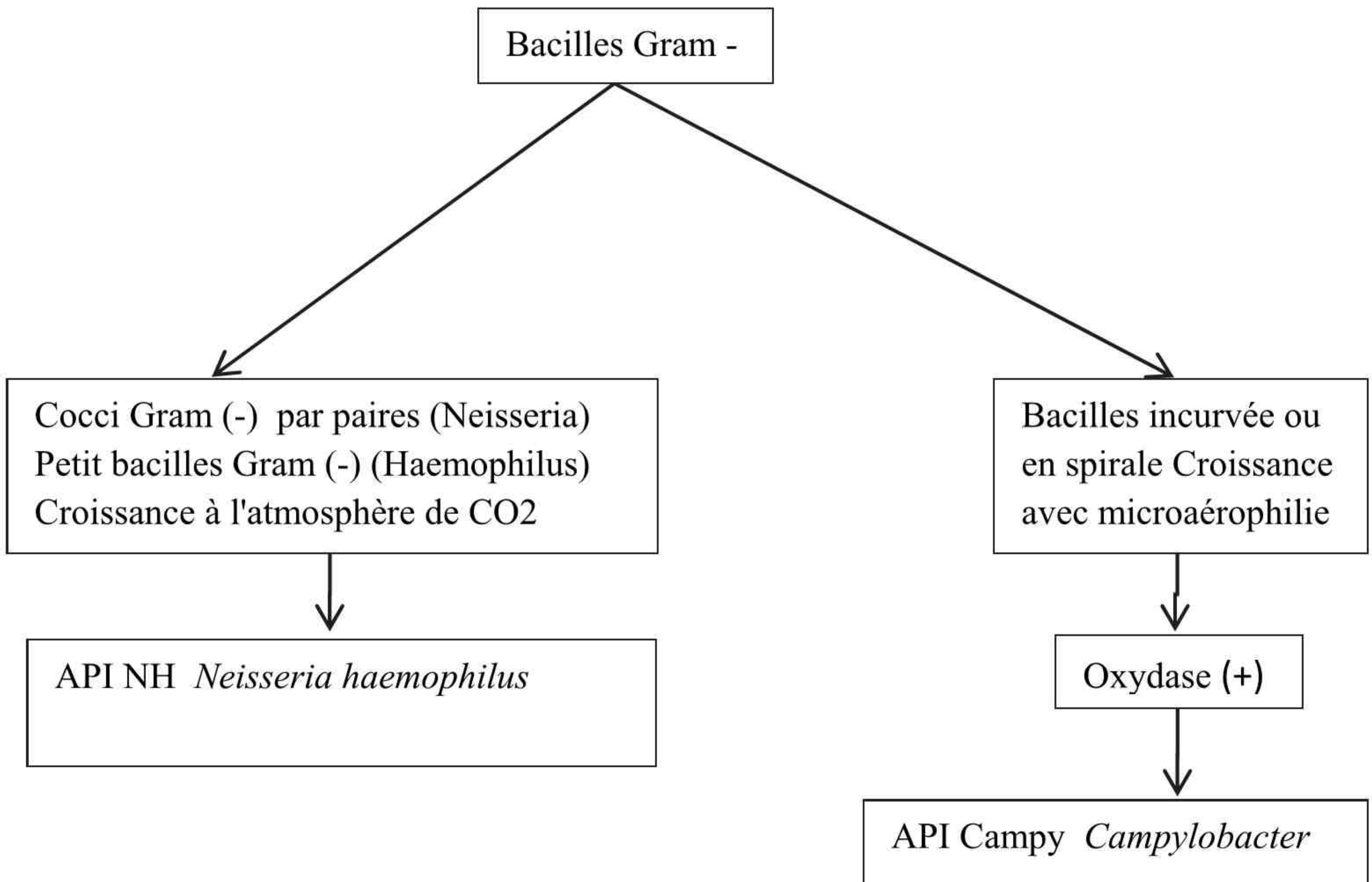
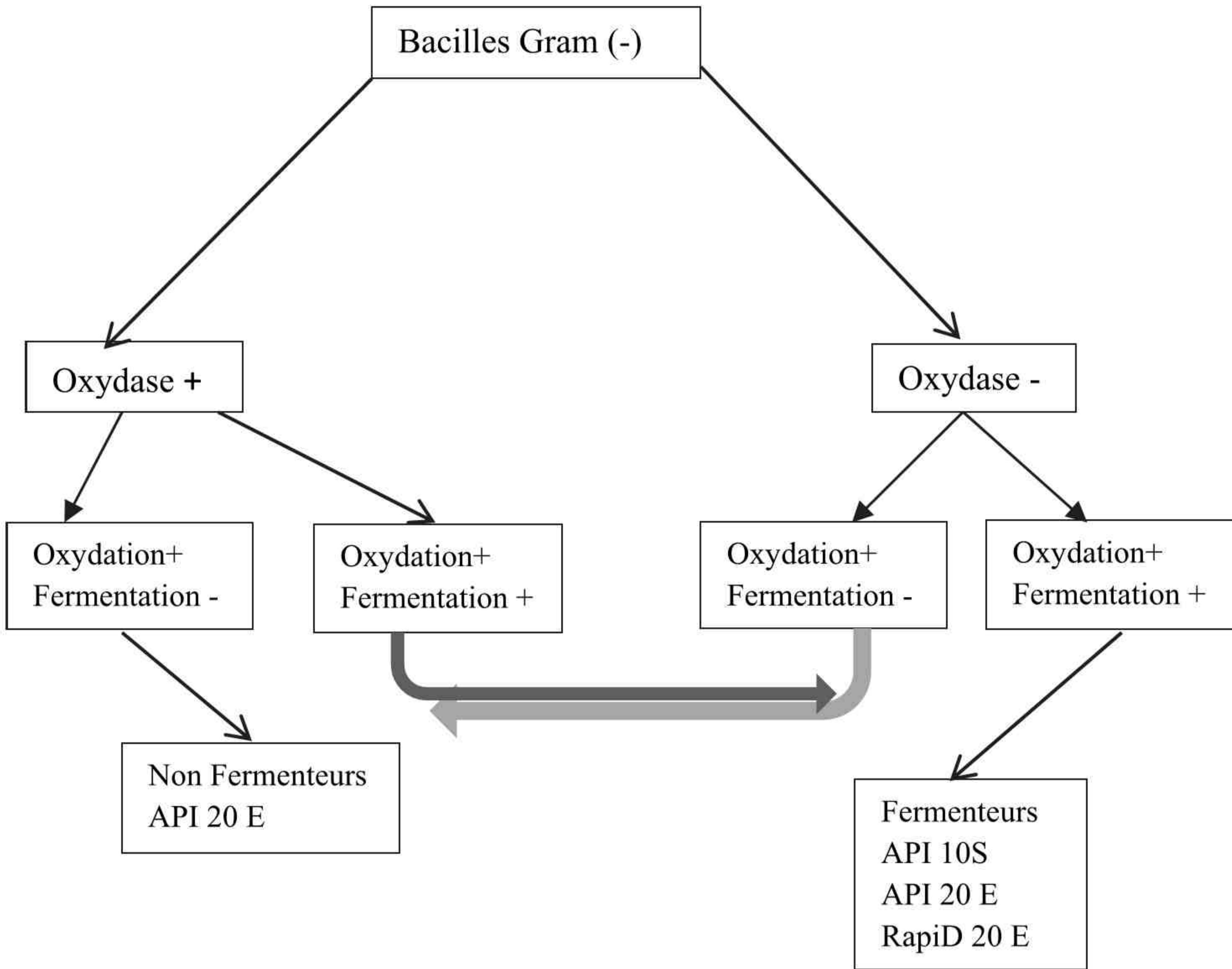
e. Réalisation du test à partir de colonies colorées, du fait du milieu de culture ou du fait d'une pigmentation.

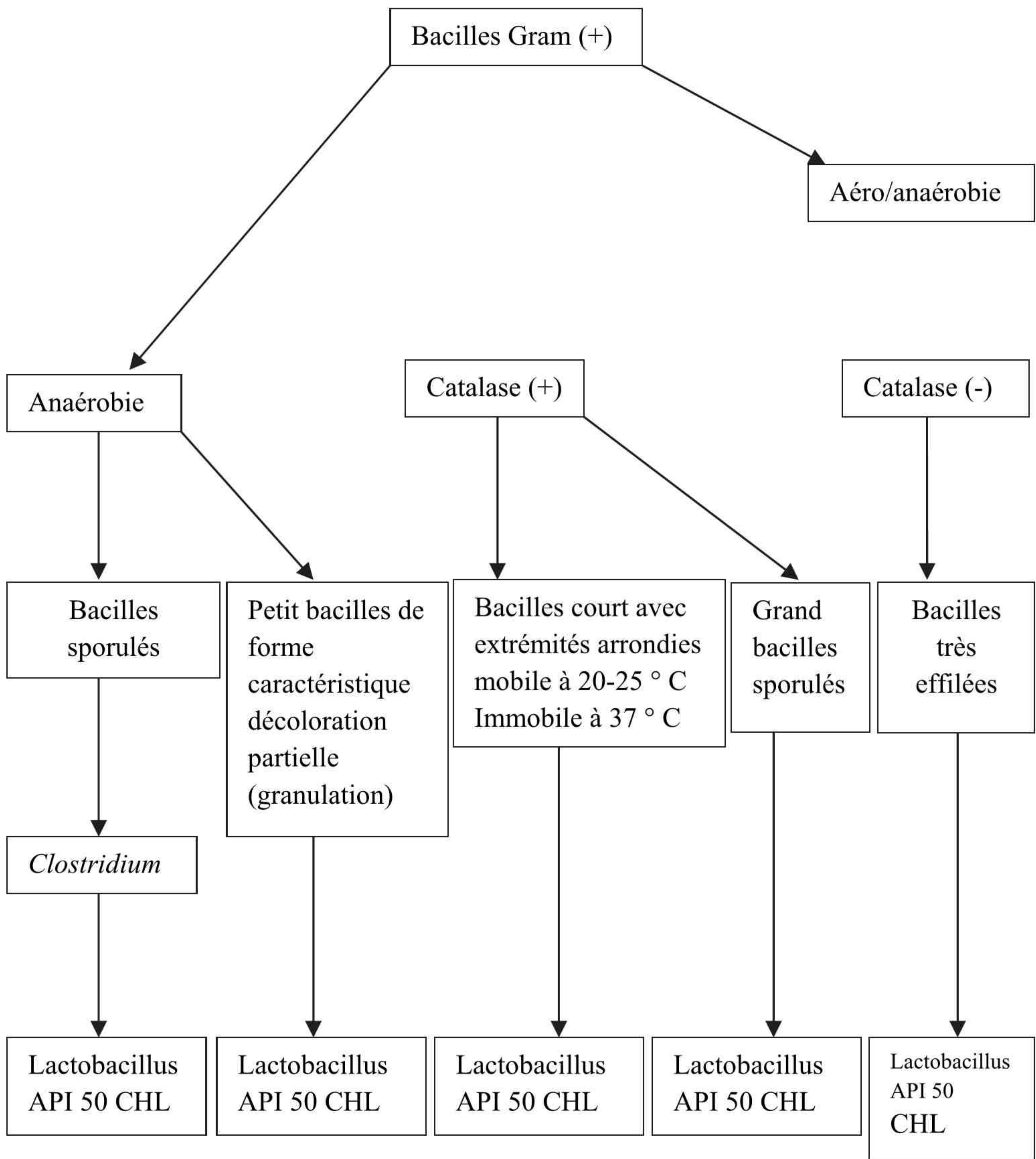
5) Le deuxième test est appelé test de catalase. L'enzyme recherché est la catalase.

6) La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé comme sous-produit de processus métaboliques. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon la réaction :



7)





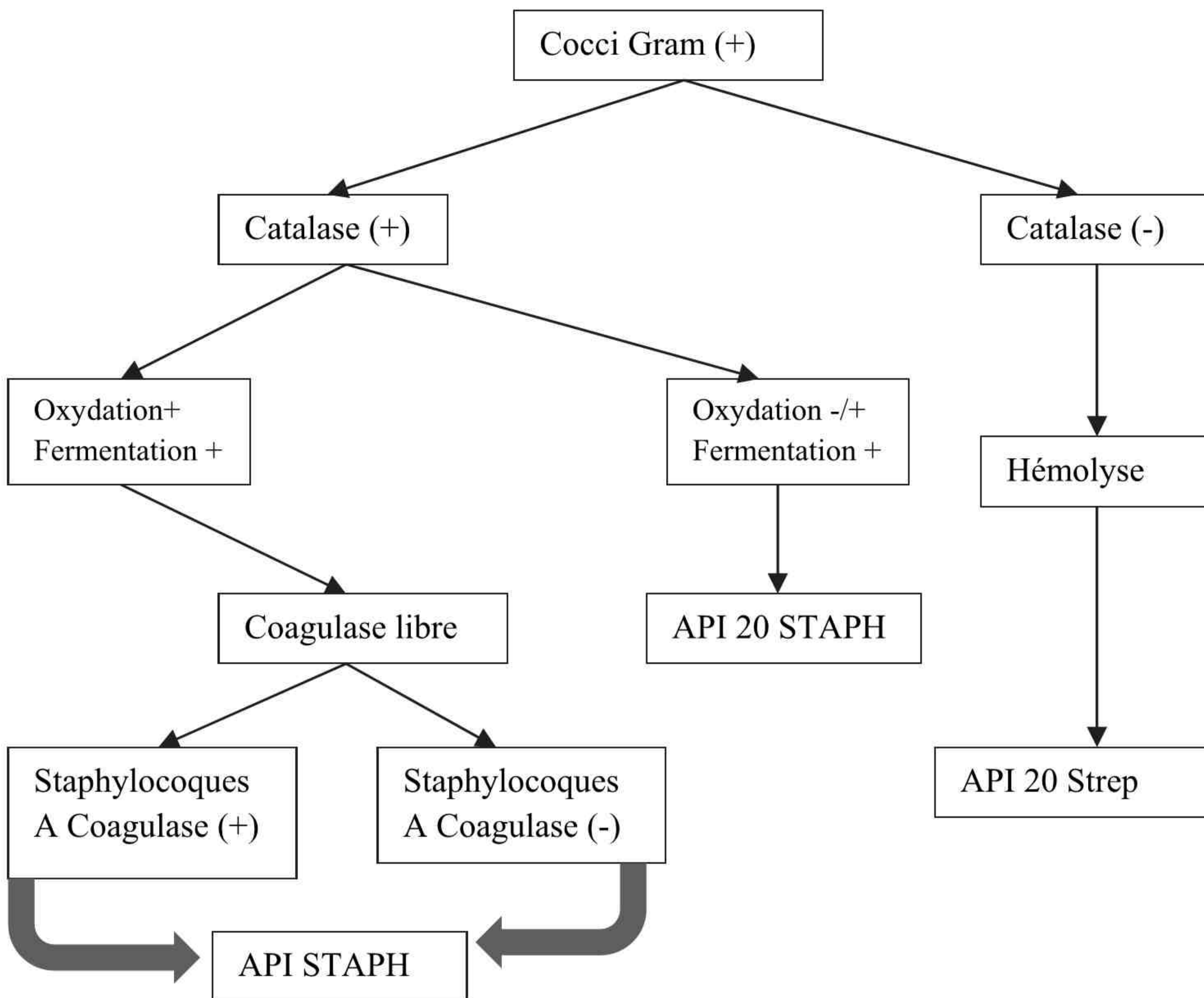


Figure 38: Les tests préliminaires permettant l'orientation pour le choix de la galerie API adéquate pour l'identification des différents types de bactéries Gram positives et Gram négatives.

Exercice N° 04 : Milieux TSI et Kligler

1) Le milieu TSI « Triple Sugar Iron » est un milieu utilisé pour l'identification des entérobactéries, il est basé sur la détection de la fermentation et l'utilisation de trois sucres qui sont : le glucose, le lactose et le saccharose. La dégradation du sucre est accompagnée d'une production d'acides. Celle-ci est détectée par l'indicateur de pH, le rouge de phénol qui, en milieu basique est rouge et en milieu acide est jaune orange. Le thiosulfate est réduit en sulfures d'hydrogènes par certaines

bactéries. Le H₂S réagit avec un sel de Fer pour donner un précipité noir [23].

La différence entre le milieu TSI et Kligler est que ce dernier permet de détecter l'utilisation de seulement deux sucres : le glucose et le lactose, tandis que le TSI permet de détecter l'utilisation de trois sucres. En effet, le milieu Kligler-Hajna est à l'origine du milieu TSI qui est presque le même et qui ne diffère que par l'addition du saccharose.

2) La souche A, fermente le glucose et produit du gaz qui est le CO₂ résultant de la fermentation.

La souche B, fermente le glucose ainsi qu'elle utilise probablement le lactose et le saccharose.

La souche C, elle n'utilise ni le glucose ni le lactose et le saccharose mais elle produit le H₂S.

3) Le jaunissement du culot signifie une fermentation du glucose, car la concentration de ce sucre a été abaissée au 1/10^{ème} de celle du lactose ou du saccharose, de telle façon que la faible quantité d'acide produite sur la pente pendant la fermentation s'oxyde rapidement, ce qui entraîne un retour rapide à la coloration rouge ou bien à une réalcalinisation plus prononcée. Par contre, la réaction acide (couleur jaune) est maintenue en profondeur dans le culot du tube.

Exercice N° 05 : Milieu Kligler

1) La méthode d'ensemencement du milieu Kligler est la suivante ; ensemencement abondant de la surface par des stries serrées ou par inondation, puis le culot par simple piqûre, à l'aide de la même pipette boutonnée. Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement la

capsule afin de permettre les échanges gazeux, et enfin mettre à l'étuve 24 h à 37°C [27].

2)

Tableau 34 : les résultats d'ensemencement des tubes de milieu Kligler pour chaque espèce bactérien

Espèce	Résultat sur milieu Kligler
<i>Salmonella typhi</i>	Pente rouge et culot jaune avec un noircissement
<i>Shigella flexneri</i>	Pente rouge et culot jaune
<i>Proteus mirabilis</i>	Pente rouge et culot jaune avec un noircissement et des bulles d'air
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pente rouge et culot rouge
<i>Enterobacter cloacae</i>	Pente jaune et culot jaune avec des bulles d'air

3) Non ce n'est pas possible d'avoir comme résultat un culot rouge et une pente jaune, car une bactérie glucose (-) est toujours lactose (-), le catabolisme du lactose est lié avec celui du glucose.

4) L'utilisation des glucides par une bactérie suit toujours la loi de la diauxie : quand une bactérie est capable de cataboliser deux glucides, dont le glucose, elle utilise dans un premier temps le glucose (effet glucose).

Dans le présent cas, le glucose est oxydé et l'utilisation de cette source de carbone est aérobie (si la capsule est correctement dévissée), le principal produit acide est le dioxyde de carbone (CO₂), cela a entraîné la couleur jaune de la pente et donc cette couleur persiste jusqu'à l'épuisement du glucose dans le milieu du fait qu'il est en faible concentration (voir la

composition Tableau 11). Ensuite la bactérie utilisera une autre source de carbone, par exemple un deuxième glucide, et du fait que dans la pente il n'y a que le lactose et la bactérie est lactose (-), donc elle utilise les peptones, ce qui conduit à une alcalinisation du milieu et un retour à la couleur rouge après 24h [31].

5) Non, cela signifie que la bactérie ne fermente pas le glucose, mais possible qu'elle l'utilise en aérobie, et pour le savoir il faut voir les tubes après quelques heures d'incubation.

Exercice N° 06 : Métabolisme d'esculine

1) L'esculine est un **hétéroside**, à base de glucose présent naturellement dans le marronnier commun, le pavier de Californie, et la résine du bois. C'est un composant courant entrant dans la composition des milieux d'identifications des micro-organismes, en particulier des Enterococci. Elle est utilisée en présence de citrate de fer. La dégradation de l'esculine en glucose et esculetine est détectée par l'observation d'un complexe noir formé entre esculetine et le citrate de fer.

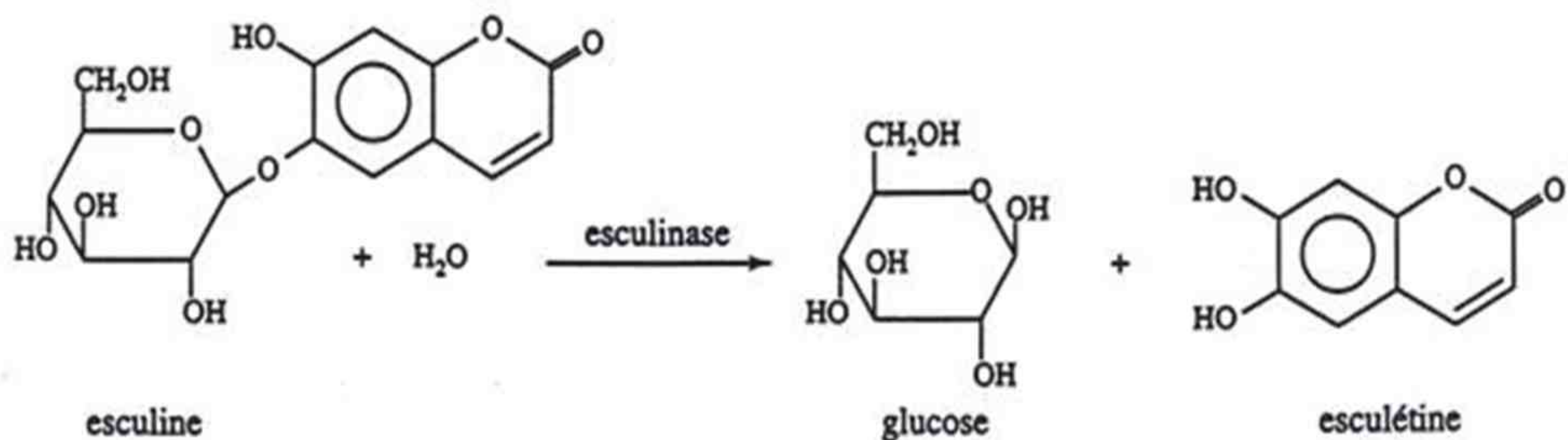


Figure 39 : La réaction de dégradation de l'esculine.

2) La coloration noire est due à l'interaction entre le fer et l'esculétine.

3) Le rôle de la bile et l'azide de sodium est d'augmenter la sélectivité du milieu afin de sélectionner un groupe particulier de bactéries. La bile inhibe les bactéries à Gram positif autres que les streptocoques du groupe D et les *Enterococcus* alors que l'azide de sodium éventuellement présent inhibe les bactéries à Gram négatif [20].

Exercice N° 07: IMVIC (Indole/ Méthyle rouge/ Voges Proskauer/Citrate)

1) Les coliformes sont un groupe de bactéries qui font partie des entérobactéries. Il en existe deux types de coliformes ; les coliformes totaux et les coliformes fécaux. Le groupe des coliformes totaux comprend toutes les bactéries aérobies et anaérobies facultatives à Gram négatif, non sporulées, cytochrome oxydase négatives, en forme de bâtonnet, qui fermentent le lactose avec dégagement du gaz en moins de 48h à 35°C.

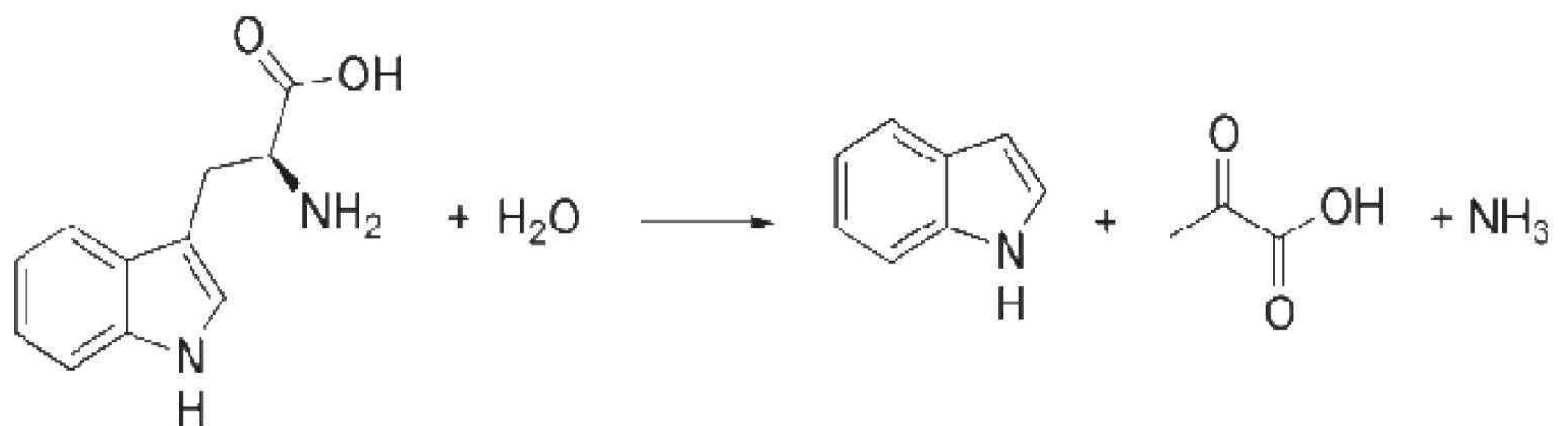
Le groupe des coliformes fécaux comprend les coliformes pouvant former des gaz en moins de 24h à 44,5°C [50]. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (*E.coli*) et dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* [54].

2) Les coliformes sont recherchés dans l'eau et les aliments, car ce sont de bons marqueurs de l'hygiène des manipulations de ces aliments. En effet, analyser une eau pour tous les pathogènes connus est un procédé compliqué et coûteux, pour cela les analyses de l'eau de routine cherchent

la présence des coliformes fécaux qui témoigne habituellement d'une contamination d'origine fécale [23].

On recherche la production de l'indole par ensemencement et incubation pendant 24h à 37°C d'une suspension bactérienne dans un milieu Urée Tryptophane (Milieu de **Chubert**) ensuite l'ajout de 0.5 ml de réactif de Kovacs. L'apparition d'une couleur rouge dans la phase alcoolique du réactif témoigne de la production d'indole [7].

3)Le substrat qui permet aux bactéries de produire l'indole est le tryptophane qui est catalysé par l'enzyme tryptophanase selon la réaction suivante :



tryptophanase

Tryptophane + eau \longrightarrow indole + acide pyruvique +
Ammoniaque

[55].

Figure 40 : Hydrolyse du Tryptophane en indole

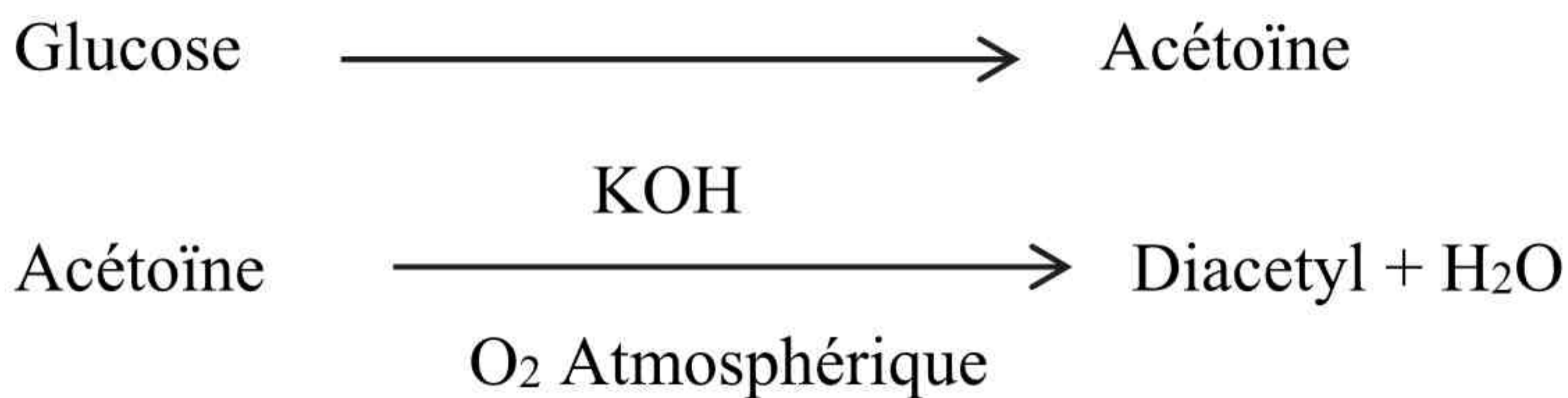
4)Le bouillon Clark et Lubsest un milieu permettant la recherche des voies fermentaires des entérobactéries et de différencier la fermentation des acides mixtes et la fermentation butane-diolique chez les entérobactéries [23].

5) (VP1) est le KOH tandis que le VP2 est l'Alpha-Naphtol.

6) La réaction de Voges Proskauer (VP) consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée, le butanediol et l'acétoïne. Cette fermentation est pratiquée par les *Serratia*, les *Enterobacter* et les *Klebsiella*, mais aussi certains vibrions, quelques souches de *Proteus mirabilis* et certains streptocoques.

Acétoïne + base forte + alpha naphthol + O₂ —————> Couleur rouge

Détails de la réactions ci-dessus :



Diacetyl + Guanidine (composé de peptone) $\xrightarrow{\hspace{10em}} \text{Alpha-naphthol}$ Couleur rouge

7) L'intérêt du test RM est de mettre en évidence la voie fermentaire des acides mixtes, cette dernière conduit à la production de nombreux acides organiques plus ou moins forts (acide succinique, malique, oxalique, éthanoïque (acétique), butanoïque (butyrique), méthanoïque (formique) etc.

Le test du RM consiste à apprécier le pH du milieu après 48 heures de culture :

- Soit le pH est supérieur à 7 : le test est dit négatif : il y a eu une faible alcalinisation ou une réalcalinisation.
- Soit le pH est inférieur à 4,5 : le test est dit positif : il y a eu une forte acidification qui s'est maintenue.

- Les bactéries RM + sont des bactéries produisant des acides organiques (éthanoïque...) par la voie des acides mixtes.
- Les bactéries RM - sont des bactéries produisant des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO₂ par la voie butane-diolique (voir VP) [18].

8) Non, ce n'est pas possible qu'une souche soit au même temps VP+ et RM+ car toujours une souche VP+ et RM- ou bien VP- et RM+.

9) Le milieu citrate de Simmons est constitué de Bleu de Bromotymol. Cet indicateur coloré change de couleur en fonction du pH (jaune = acidification et bleu = basification). Ce milieu est constitué également de citrate qui permet d'indiquer son utilisation dans le métabolisme bactérien. Une basification du milieu entraînera une teinte bleue témoignant de la dégradation du citrate par la bactérie [27].

10) Les étapes de dégradation de citrate et changement de couleur du milieu.



Le carbonate de sodium obtenu rend le pH basique et entraîne un changement de la couleur du milieu vers la couleur bleue [27].

Exercice N° 08 : Métabolisme de l'urée et des acides aminés

1) Le milieu Urée-Tryptophane est un milieu qui permet de faire trois tests : le test d'uréase, de la TDA et de la production d'indole. Ces tests

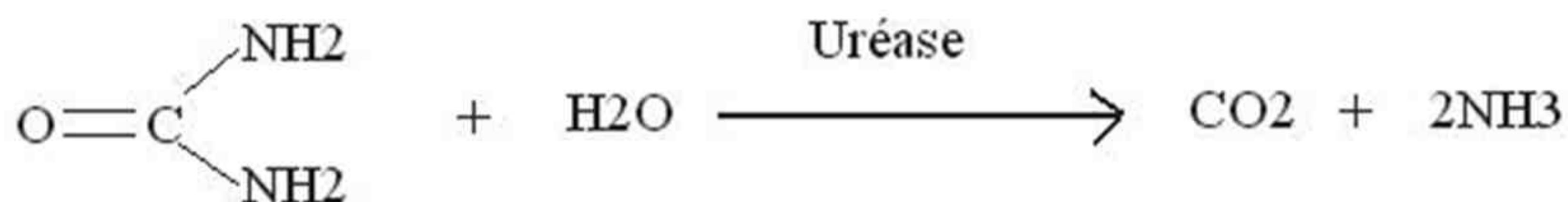
permettent donc la recherche de trois enzymes qui sont : uréase, tryptophane désaminase et tryptophanase.

2)

Tableau 35 : les tests effectués pour les souches A, B, C et D

Souche	Test effectué
A	Uréase
B	Uréase
C	Tryptophane désaminase
D	Production d'indole (fait partie des tests IMVIC)

3) La réaction catalysée par la souche B et qui a entraîné le changement de couleur du milieu Urée-Tryptophane est la dégradation d'urée et la formation de carbonate d'ammonium.



Le CO₂ et le NH₃ se combinent ensuite pour donner du carbonate d'ammonium selon la réaction :



Sous l'action d'une uréase, il y a donc alcalinisation du milieu par le carbonate d'ammonium, ce qui entraîne le virage de l'indicateur coloré qui est le rouge de phénol vers une couleur rouge [31].

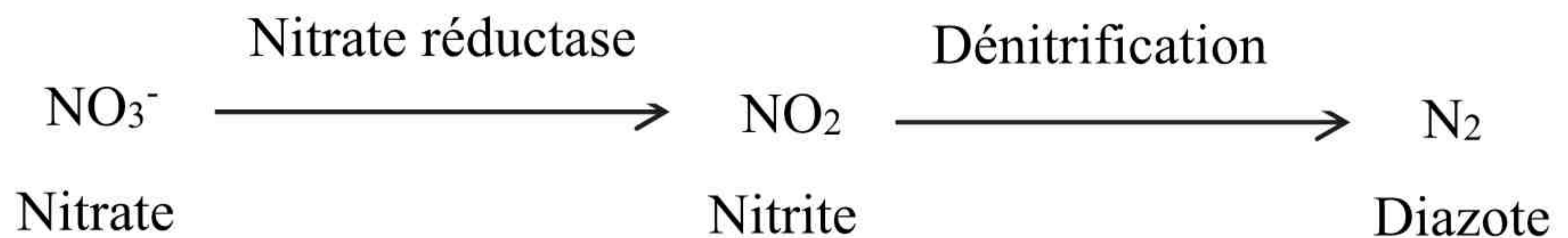
4) Sous l'action de la Tryptophane désaminase, le tryptophane est dégradé selon la réaction :



L'addition de chlorure de fer III (perchlorure de fer) réagit avec l'acide indol-pyruvique en donnant un précipité de couleur marron [32].

Exercice N° 09 : Métabolisme des nitrates

1) Le test effectué dans cette expérimentation est la recherche de l'enzyme nitrate réductase.



2) Les réactifs de Griess sont constitués de deux réactifs : Nitrate 1 (acide parasulfanilique) et Nitrate 2 (α -naphtylamine). Ces deux réactifs révèlent la présence des nitrites [55].

3) La souche A : après l'ajout des réactifs de Griess, il y a apparition de la couleur rouge qui témoigne de la présence des nitrites et donc la souche est nitrate réductase (+).

La souche B : après l'ajout des réactifs de Griess, il n'y a pas de changement, donc absence des nitrites ; et après l'ajout de la poudre de zinc, il n'y a pas de changement toujours. Cela signifie qu'éventuellement toute la quantité de nitrates a été retransformée en azote N_2 (bactérie possédant une nitrate réductase très active).

La souche C : après l'ajout des réactifs de Griess, il n'y a pas de changement, donc absence des nitrites ; tandis qu'après l'ajout de la poudre de zinc, il y a apparition de la couleur rouge qui témoigne de la présence des nitrites et donc la souche est nitrate réductase (-).

4) Le rôle de la poudre de zinc est de jouer le rôle de l'enzyme nitrate réductase (épreuve de Zo-Bell) en transformant le nitrate en nitrite dans le cas où il y a absence de l'enzyme, le résultat et la formation des nitrites révélés par les réactifs de Griess déjà présent dans le milieu. Tandis que dans le cas où la bactérie est nitrate réductase positive, mais a donné une réaction négative avec les réactifs de Griess, cela signifie que le stade nitrite a été dépassé (les bactéries possèdent une nitrate réductase très active), et donc le résultat sera négatif [56].

Exercice N° 10 : β -galactosidase ou « test ONPG »

1) L'enzyme recherchée est la β -galactosidase, c'est une hydrolase dont le rôle est d'hydrolyser des β -galactosides en monosaccharides. Ses substrats de prédilection peuvent être le ganglioside, les lactosylcéramides, le lactose, ainsi que plusieurs glycoprotéines. Elle est composée de quatre sous unités semblables deux à deux [57].

2) L'orthonitrophényl- β -galactoside (ou 2-nitrophényl- β -D-galactopyrannoside, ONPG) est un hétéroside de type galactoside, dont l'aglycone est l'orthonitrophénol (ONP) et la partie glucidique est constituée par un galactose. L'ONPG est incolore, son hydrolyse par une β -galactosidase libère du galactose et de l'orthonitrophénol (ONP), composé de couleur jaune en milieu alcalin.

L'orthonitrophényl- β -galactoside **ONPG** $\xrightarrow{\beta\text{-gal}}$ l'orthonitrophénol (ONP) + galactose [58].

3) La souche A, a dégradé le lactose sur milieu Kligler et elle est ONPG (+), cela veut dire qu'elle a dégradé le β -galactoside qui est l'ONPG donc elle est β -galactosidase (+).

La souche B, n'a pas dégradé le lactose sur milieu Kligler mais elle est ONPG (+) ça veut dire qu'elle a dégradé le β -galactoside qui est l'ONPG donc elle est β -galactosidase (+) mais elle n'a pas dégradé le lactose sur milieu Kiliger du fait de l'absence d'une enzyme qui est la β -galactoside-perméase. Donc cette souche est β -galactosidase (+), β -galactoside-perméase (-).

La souche C, n'a pas dégradé le lactose sur milieu Kligler et elle est ONPG (-) donc elle est β -galactosidase (-).

4) Pour pouvoir utiliser le lactose, une bactérie doit posséder deux enzymes (schéma ci-dessous) :

- Une β -galactoside perméase (1) ;
- Une β -galactosidase (2).

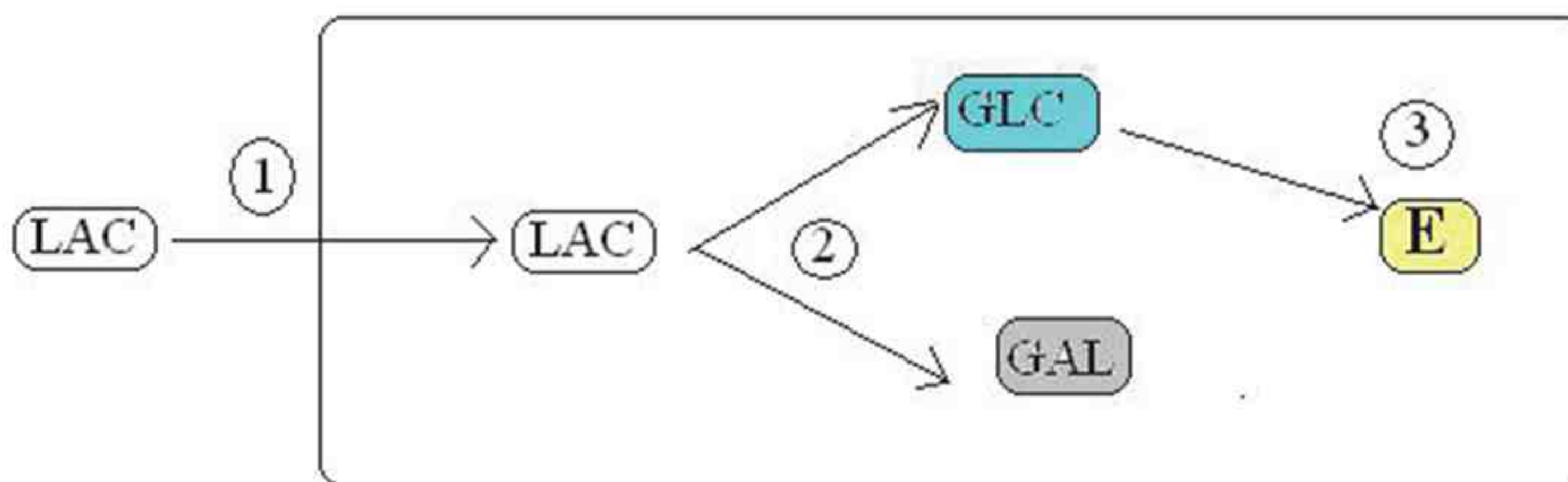


Figure 41 : schéma montrant les enzymes bactérien permettant la dégradation du lactose

Il s'ensuit une série de réactions de dégradation du glucose (3) conduisant à la production d'énergie E.

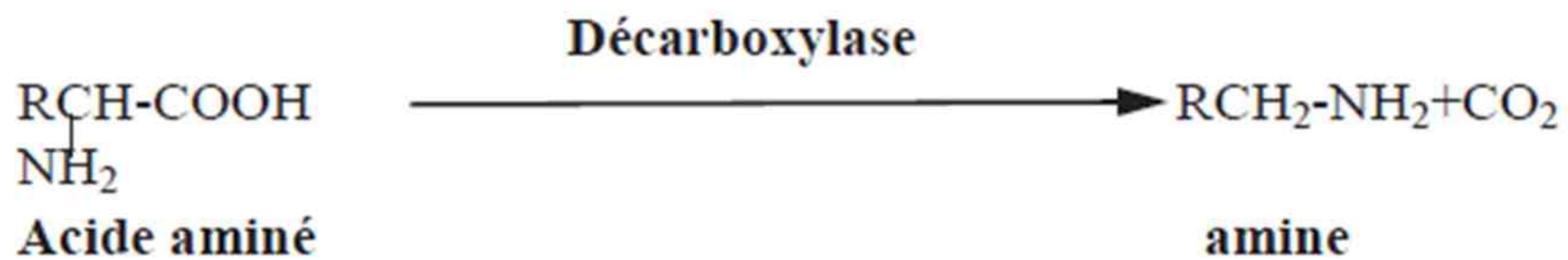
La souche B est Lactose (-) alors qu'elle est ONPG (+) car la bactérie possède les enzymes qui permettent la dégradation du lactose (β -galactosidase), mais elle ne possède pas une protéine membranaire qui

permet au lactose de pénétrer spécifiquement dans la cellule bactérienne : la β -galactoside-perméase.

Exercice N° 11 : Métabolisme protéique « milieu Moeller »

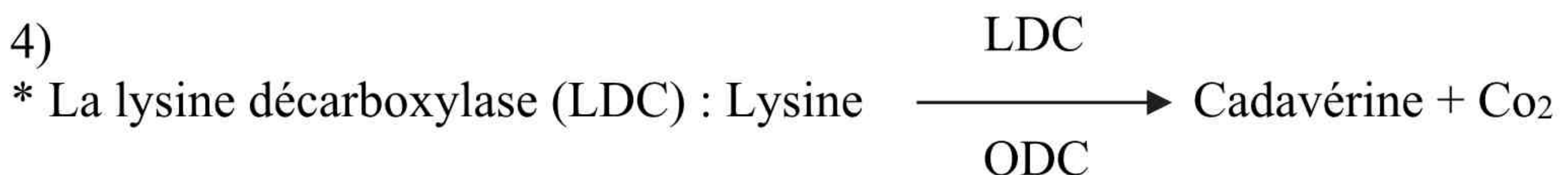
1) Le milieu de Moeller est un milieu spécifique pour la recherche des décarboxylases. Selon l'acide aminé introduit dans le milieu, on recherchera la lysine décarboxylase (LDC), l'arginine décarboxylase (ADC) ou l'ornithine décarboxylase (ODC)[59].

2) Les décarboxylases ou carboxylases, scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO_2 suivant la réaction :[60].



3) Le Tube témoin, il y a un changement de la couleur du milieu du violet vers le jaune à cause de l'acidification du milieu due à la dégradation du glucose.

- Le Tube 1, couleur violette due à l'alcalinisation du milieu suite à la dégradation de l'arginine.
- Le Tube 2, couleur violette due à l'alcalinisation du milieu suite à la dégradation de la Lysine.
- Le Tube 3, couleur violette due à l'alcalinisation du milieu suite à la dégradation de L'ornithine.



* L'ornithine décarboxylase (ODC) : Ornithine \longrightarrow Putricine + Co₂

* L'argénine décarboxylase (ADC) : Argénine $\xrightarrow{\text{ADC}}$ Agmatine + Co₂ [61].

5) Le glucose est ajouté au milieu Falkow afin d'obtenir un pH acide, car les carboxylases sont induites par un pH acide. Dans un premier temps les bactéries fermentent le glucose et libèrent des composés acides ce qui entraîne la diminution du pH. Une fois le glucose épuisé la bactérie dégrade l'acide aminé présent dans le milieu ce qui provoque l'alcalinisation du milieu par les dérivés issus de cette dégradation.

6) Nous avons ajouté 1 ml de vaseline stérile dans chaque tube après les avoirensemencés, car les décarboxylases sont des enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide et des conditions d'anaérobiose. L'abaissement du pH du milieu dû à la fermentation du glucose en conditions d'anaérobiose oriente le métabolisme vers la synthèse des décarboxylases et donc la dégradation des acides aminés.

Exercice N° 12 : Oxydoréduction et transport membranaire

1) Titre de la figure 17 : Les différents modes de pénétration des substances à travers la membrane plasmique (Le transport membranaire).

2)a : diffusion passive transmembranaire

b : diffusion passive par canal spécifique ou non spécifique

c : diffusion facilitée par protéine poreuse

d : transport actif primaire (uniport)

e : cotransport actif (symport)

f : cotransport actif (antiport)

g : transport par translocation du groupe

h : Diffusion

i : Transport actif

3) ① : réducteur (donneur d'électron)

② : Oxydant (accepteur)

③ : produit oxydé

④ : produit réduit

Réaction 1 : oxydation

Réaction 2 : réduction

Réaction 3 : oxydoréduction

4)

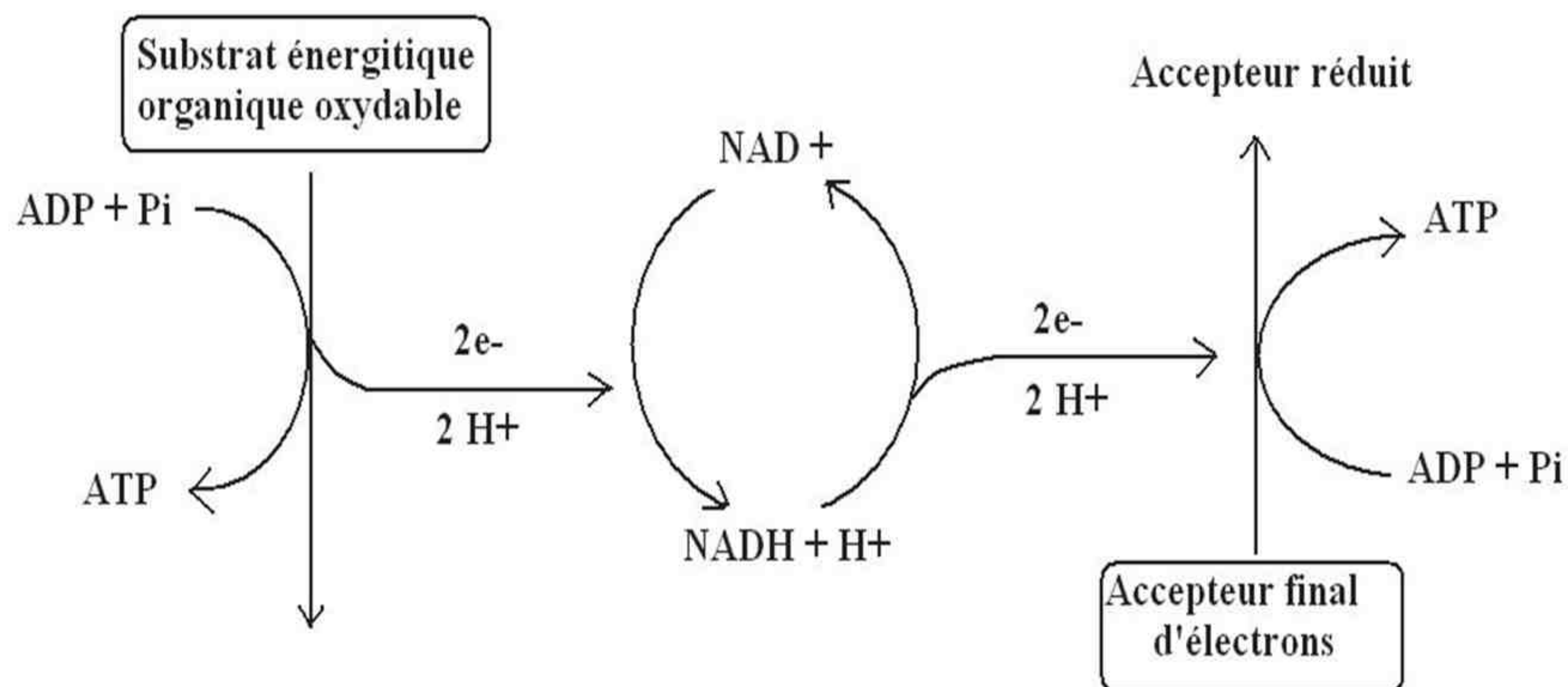


Figure 42 : schéma montrant le métabolisme énergétique ou catabolisme ; relation entre l'oxydation du substrat, le transfert des électrons et la production d'ATP.

ADP : adénosine-diphosphate ; ATP : adénosine-triphosphate ; e^- : électron ; H^+ : proton ; NAD, NADH : nicotinamide-adénine-dinucléotide, à l'état oxydé et réduit ; Pi : phosphate inorganique [62].

5) le composé (J) est le pyruvate.

6) Le pyruvate est un élément important dans le métabolisme des bactéries, il peut être obtenu par trois voies importantes :

- Voie des hexoses-diphosphates ou bien voie d'Embden-Meyerhof.
- Voie des hexoses-monophosphates ou cycle de Dickens-Horecker.
- Voie du 2-céto-3 désoxy-gluconate ou voie d'Entner-doudoroff [63].

7) La voie qui ne permet pas l'obtention du composé (J), mais elle produit le $\text{NADPH} + \text{H}^+$ et des sucres (4C et 5C) est la voie des pentoses phosphates [62].

Exercice N° 13 : Fermentations

1) ① : Fermentation lactique.

② : Fermentation alcoolique.

③ : Fermentation propionique.

④ : Fermentation butanediolique.

⑤ : Fermentation acides mixtes.

⑥ : Fermentation butyrique. [18].

2) Les deux sous-types de la fermentation ① sont :

a) Fermentation homolactique : dans cette fermentation, les microorganismes utilisent la voie d'Embden-Meyerhof en réduisant directement presque tout leur pyruvate en lactate, à l'aide du lactate déshydrogénase.

b) Fermentation hétérolactique : dans cette fermentation, les microorganismes produisent des quantités importantes de substances autres que le lactate tel que l'éthanol, l'acide éthanoïque, dioxyde de carbone [64].

3) La fermentation s'appelle fermentation acétique. Tandis que le produit intéressant de cette fermentation est le vinaigre. L'amas constitué par cette bactérie qui est utilisé dans l'industrie du vinaigre est la mère de vinaigre, cependant cette fermentation peut avoir lieu d'une manière naturelle par de petites mouches qui sont fortement attirées par le vin placé à l'air libre et qu'on appelle mouches du vinaigre (drosophiles) véhiculent l'Acétobacter[65].

4) Les genres bactériens sont :

① : Bactéries lactiques (*Streptococcus, Lactobacillus* etc.)

② : Levures (*Saccharomyces cerevisiae*)

③ : Bactérie propionique (*Propionibacterium*)

④ : *Enterobacter, Serratia*

⑤ : Entérobactéries : (*Escherichia, Proteus*).

⑥ : *Clostridium*. [10].

5) La fermentation : l'accepteur final d'électrons est organique, par exemple : pyruvate ou ses dérivés.

La respiration aérobie : l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire.

La respiration anaérobie : l'accepteur final des électrons est un composé inorganique oxygéné (nitrate, sulfate, carbonate etc.) [63].

6)

a. Ce type de fermentation est appelé la réaction de Stickland [10].

b. Dans ce genre de fermentation, l'accepteur d'électrons est un second acide aminé qui réagit comme accepteur d'électrons [62].

Exercice N° 14 : Galerie classique, API, automates et utilisation de programmes

1) La galerie classique est une méthode d'identification bactérienne basée sur des tests biochimiques effectués sur tubes à essai contenant des substrats susceptibles d'être dégradés par les bactéries grâce à leurs enzymes, alors que la galerie API est basée sur le même principe, mais avec des tests miniaturisés et standardisés et rassemblés en une seule plaque en plastique, fournie avec un catalogue de lecture [20].

2)

a. Pour faire la lecture des résultats :

La lecture peut se faire de manière classique en utilisant le catalogue qui accompagne les plaques API. Les résultats des tests sont comparés à ceux du tableau des pourcentages des réactions, mais la lecture est difficile dans certains cas, lorsqu'on soupçonne une espèce alors que un ou deux, voire trois tests ne correspondent pas avec le tableau [20].

La lecture peut s'effectuer aussi en introduisant les résultats directement dans le logiciel en ligne « APIweb », cela nous permet une lecture sûre, car ce logiciel a été conçu par le même fabricant. Toutefois, la lecture en ligne n'est pas gratuite, il faut donc payer pour pouvoir accéder au logiciel de lecture [66].

Enfin, on peut réaliser la lecture des résultats gratuitement grâce à une feuille Excel programmée sous forme d'un logiciel de lecture API (feuille Excel conçue par Joffin) [67].

La méthode la plus simple est la lecture en utilisant la feuille Excel de Joffin, car cette feuille nous permet de faire une lecture gratuite et précise des différents systèmes API.

b. Identification de la souche :

Ci-dessous l'identification à l'aide de la feuille Excel de Joffin

API 20 Staph v4.1		Proba	typicité	Incompa.	Test sur proba	Test sur typicité
1	Staphylococcus aureus	0,584	0,35	1	TB Id	Bonne typicité
2	Staphylococcus hominis	0,193	0,46	1	mauvaise indentific	Bonne typicité
3	Staphylococcus lugdunensis	0,082	0,21	1	mauvaise indentific	mauvaise typicité
4	Staphylococcus xylosus	0,068	0,29	1	mauvaise indentific	Bonne typicité
5	Staphylococcus cohnii spp urealyticum	0,037	0,09	2	mauvaise indentific	mauvaise typicité

API 20 Staph v4.1	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR	classement	P(taxon/ profil)	P(taxon/ profil)	P(plus typique)	T
profil	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+					#####

Figure 43 : Résultat d'identification de la souche à l'aide de la feuille Excel de Joffin.

Nous remarquons que l'espèce identifiée N°01 est *Staphylococcus aureus*.

c. Le pourcentage d'identification est = la probabilité $\times 100 = 0,58 \times 100 = 58\%$.

d. En utilisant le catalogue API Staph, ou bien à l'aide de la feuille Excel (en dessous du tableau d'identification on trouve les pourcentages des réactions) d'API Staph des différentes espèces, on peut déduire les tests qui ont empêché d'avoir une identification excellente et qui sont : MAN (D-mannitol), NIT (Nitrate de potassium) ADH (L-arginine). Ces tests sont normalement positifs, alors que nous avons obtenu des résultats négatifs. Si on n'utilise que le catalogue, on tombe dans un problème

d'identification, mais grâce à cette feuille Excel qui est basée sur le calcul des probabilités, elle peut nous renseigner sur l'espèce la plus proche de celle ayant les caractères biochimiques obtenus.

3)

a. Identification de la souche :

Ci-dessous l'identification à l'aide du logiciel Pibwin.

Identification threshold 0,99900 reached

	Taxa	ID Score	ID Modal Score
1	Staphylococcus aureus	1,00000	0,23377

The following 3 tests gave unexpected results for the most likely taxon (ID Score >= 0,05)

Taxa	Test	Result	Matrix Entry
Staphylococcus aureus	ONPG	-	55
Staphylococcus aureus	Citrate	+	40
Staphylococcus aureus	Methyl glucoside	+	30

Figure 44 : Résultat d'identification de la souche à l'aide du logiciel Pibwin.

Nous remarquons que l'espèce identifiée N°01 est *Staphylococcus aureus*.

b. PIBWIN, est un logiciel d'identification anglais, sa dernière version date de 2004. Ce logiciel est gratuit et facilement téléchargeable depuis son site web : <http://www.som.soton.ac.uk/staff/tnb/pibwin/>.

Ce logiciel peut être utilisé en routine pour l'identification des bactéries [68]. Le programme possède trois fonctions principales : l'identification d'un isolat inconnu, la sélection des tests supplémentaires qui n'ont pas permis la distinction entre les souches lors d'identification et

l'utilisation de matrices spécifiques sous format Excel pour chaque groupe bactérien.

c. La matrice qui doit être utilisée pour la souche X, est « Gram + aerobic cocci », cela veut dire cocci Gram positif aérobie.

d. Les tests qui ont empêché d'avoir une identification excellente sont affichés directement par le logiciel, ce sont : ONPG, Citrate et méthyl glucoside.

e.

Tableau 36 : comparaison de plusieurs techniques d'identification microbienne

Appareils	Précision d'identification	Cout de l'appareil	Cout de l'identification	Rapidité de l'identification
API	C	3	2	24 h
VITEK 2 [®]	B	2	1	2 à 6 h
MALDI-TOF-MS	A	1	1	1 minute
Phonix [®]	B	2	3	2 à 6 h

Le « D » n'est pas inclus, car VITEK 2[®] et Phonix[®] ont presque la même précision d'identification.

f. Définition de chaque méthode :

API : (Appareillage et Procédé d'Identification, BioMérieux, France) sont des galeries biochimiques miniaturisées comportant différents tests dans une plaque en plastique constituée de dix, vingt ou cinquante microtubes comportant chacun un substrat spécifique pour permettre une identification standard de certaines espèces microbiennes [69].

VITEK 2® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) et Phonix® (Becton Dickinson, Diagnostics Systèmes, France) sont des automates d'origine française, équipés d'étuves intégrées ce qui permet des incubations plus courtes (2 à 6 h) par rapport à la galerie API. Ces automates comparent le profil biochimique obtenu de la souche inconnue avec ceux de leur banque de données. Certains de ces systèmes peuvent avoir une autre option qui est la réalisation simultanée de l'antibiogramme [70].

MALDI-TOF-MS : (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) est une technique récente d'identification en microbiologie basée sur l'identification des espèces microbiennes par le biais de leur phénotype protéique en utilisant la spectrométrie de masse [71].

Exercice N° 15 : MALDI-TOF MS

1) La méthode d'identification de type MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). C'est une technique récente d'identification en microbiologie, basée sur l'identification des espèces microbiennes par le biais de leur phénotype protéique en utilisant la spectrométrie de masse. Elle consiste à mélanger une solution organique saturée de cristaux appelée matrice avec un échantillon microbien, le mélange étant ensuite déposé sur plaque de métal appelée cible, cette dernière est introduite dans l'appareil qui va l'analyser. Le résultat est un spectre de masse, ce dernier est analysé par un logiciel qui compare les spectres obtenus avec ceux des bases de données et par la suite il vous affiche le nom de l'espèce identifiée sur un support informatique [71].

2) Le schéma de la figure 19 représente une empreinte protéomique de la bactérie à identifier, cette empreinte est l'ensemble des protéines de la bactérie [72].

3) La matrice est essentielle pour l'ionisation de l'échantillon, en effet l'absorption d'énergie du laser par les molécules de la matrice entraîne le passage en phase gazeuse des ions du mélange matrice-échantillon.

Une matrice est composée de petites molécules d'acide possédant un fort pouvoir d'absorption dans la gamme de longueurs d'onde du laser. Les laboratoires de recherche utilisent souvent plusieurs matrices pour étudier différentes molécules. La matrice HCCA (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) est parmi les matrices les plus utilisées pour la détection des composés protéiques microbiens [72].

4)
Les étapes de l'analyse de l'appareil sont : [73]

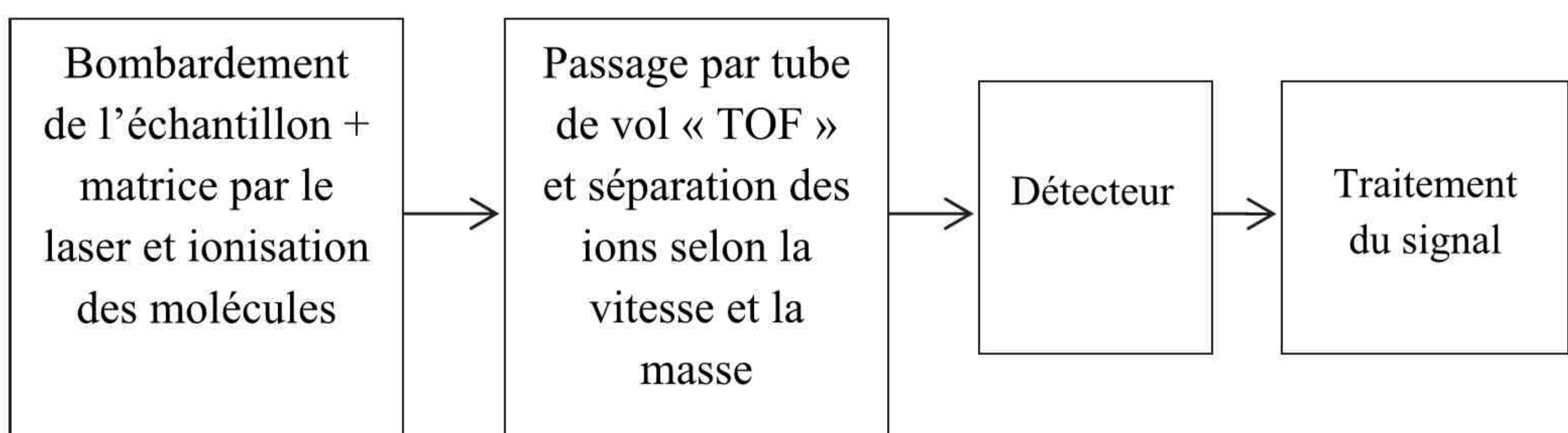


Figure 45 : Etapes de l'analyse d'un échantillon effectués par l'appareil MALDI-TOF-MS

5) Il y a plusieurs modes de dépôt de l'échantillon et de la matrice sur la cible :

- «Couche mince » consiste à déposer en premier la bactérie puis la matrice sur la plaque.
- « Goutte sèche », consiste à déposer en une fois le mélange matrice-échantillon.
- « Sandwich », l'échantillon est placé entre deux couches de matrice.

Le mode de dépôt en « couche mince » est simple et donne les résultats les plus reproductibles. Cette technique est la plus utilisée en microbiologie [74].

6) L'identification en utilisant la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS aboutit à l'identification du genre, de l'espèce mais aussi de la souche [72].

7) Ce schéma s'appelle de dendrogramme, et l'intérêt de tracer ce schéma est d'étudier la similarité entre les souches, ainsi qu'en épidémiologie pour voir si c'est les mêmes souches qui circulent ou des souches différentes.

Les avantages de l'utilisation de cette technique pour identifier en microbiologie sont :

- C'est une technique très rapide qui permet d'identifier une espèce dans une minute. Cette rapidité est très importante lorsqu'il s'agit d'un diagnostic d'une pathologie infectieuse.
- L'identification ne dépend d'aucun test préliminaire tel que la coloration de Gram ou des tests biochimiques tel que la catalase, l'oxydase, la coagulase ou l'observation microscopique. N'importe quelle colonie peut être déposée directement sur la cible, ajouter la matrice et la placer dans l'appareil pour l'identification.

- Technique simple par rapport aux techniques moléculaires tels que le séquençage de l'ARN 16S ou le séquençage du gène RPOB qui donnent de bons résultats, mais qui prennent beaucoup de temps.
- Elle permet d'étudier la similarité des souches directement et elle est plus rapide que l'électrophorèse en champ pulsé qui nécessite au moins trois jours pour le faire.
- Cette méthode ne nécessite pas d'extractions ou de purifications préalables puisque chaque colonie pourra être identifiée en la déposant sur la cible.
- Le coût de l'identification est beaucoup plus faible en comparant avec les techniques classiques telles que le système API puisque la même matrice HCCA (Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) est utilisée pour tous les microorganismes [75].

Chapitre 04 : Génétique bactérienne et biologie moléculaire

Exercice N° 01 : La transformation

1) le phénomène biologique étudié par Griffith est la transformation.

C'est un transfert passif d'un fragment d'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice. Cet ADN s'intègre au matériel génétique de la bactérie réceptrice. Le transfert est partiel et limité à quelques espèces bactériennes. L'intégration peut engendrer une modification des caractères génotypiques et phénotypiques de l'organisme receveur. Ainsi, les caractères acquis peuvent devenir héréditaires [76].

2) Chez les pneumocoques et beaucoup d'espèces capsulées, des mutations peuvent affecter la production de la capsule: les bactéries sauvages capsulées donnent des colonies lisses (S pour « Smooth ») ou muqueuses, tandis que les bactéries mutantes non capsulées donnent des colonies rugueuses (R pour « Rough »).

3) Analyse et explication des résultats :

- La première injection de la souche (R) n'a pas influencé sur la souris, car elle n'est pas virulente et donc la souris est restée vivante.
- La deuxième injection d'une souche virulente qui porte une capsule a causé la mort de la souris.
- La troisième injection de la souche virulente, mais tuée par la chaleur n'a pas causé la mort de la souris, car cette souche était inefficace après sa mort.
- La quatrième injection de la souche « R » vivante avec la souche « S » morte a causé la mort de la souris.

Explication : lors de la quatrième injection, la souche S était une souche morte, mais le matériel génétique était toujours présent, ce matériel génétique contenait l'information génétique qui code pour la pathogénicité de la souche, donc ce matériel génétique a été transféré à la souche R la transformant ainsi en une souche S, ce qui a causé la mort de la souris.

4) Les tests d'Avery, MacLeod et McCarty ont consisté en un mélange d'une souche R vivante avec seulement l'ADN de la souche S. Le résultat était la mort de la souris. En plus, les chercheurs ont déduit que la propriété causant la transformation est perdue en présence de désoxyribonucléase. Les résultats obtenus ont confirmé les conclusions de Griffith [77].

5) Les cellules bactériennes doivent être en état de compétence pour que la transformation ait lieu. L'état de compétence n'apparaît qu'à certains stades de la division cellulaire et seulement chez une fraction de la population bactérienne. Les cellules bactériennes réceptrices du matériel génétique sont celles concernées par la compétence [78].

6) Les techniques in vitro permettant de rendre les bactéries compétentes sont :

- La mise en contact avec CaCl_2 + choc thermique
- L'électroporation [79].

Exercice N° 02 : La conjugaison

1) Le phénomène biologique découvert par Lederberg et Tatum est la conjugaison. C'est un transfert d'ADN entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice à l'aide de pili sexuels et qui nécessite le contact et l'appariement entre les bactéries [20].

- 2) La faible fréquence de la conjugaison est due à l'exigence de contact entre les deux types de mutants auxotrophes [18].
- 3) Concernant la spécificité d'espèces, la conjugaison de l'ADN chromosomique ne se fait que pour des souches de la même espèce, alors que la conjugaison de l'ADN extra-chromosomique est répondeuse entre les espèces bactériennes et elle est moins spécifique que la conjugaison de l'ADN chromosomique [31].
- 4) ① : Facteur de fertilité « F »
② : ADN transféré
③ : Pili sexuel
④ : Bactérie donatrice
⑤ : Bactérie réceptrice
- 5) Le facteur (F) est le premier plasmide connu, son rôle dans la conjugaison est de conférer la polarité ou le caractère mâle (F⁺) à la bactérie donatrice. De plus, il contient l'information génétique qui code pour la biosynthèse de pili sexuels, pour son insertion possible dans le chromosome bactérien et pour la mobilisation (le transfert) de ce dernier vers des bactéries réceptrices (F⁻) [80].
- 6) Le transfert d'ADN n'aura lieu qu'après contact ou appariement du couple de bactéries donatrice et réceptrice suite à l'intervention des pili sexuels (2 à 3 par bactérie F⁺) reconnaissant ainsi par leurs extrémités les zones de contact à la surface des bactéries F⁻. Après, elles se fixent et se rétractent en rapprochant les deux types de bactéries. Il s'ensuit la formation d'un pont cytoplasmique qui permet de créer la liaison entre les

deux cytoplasmes des deux bactéries. En termes de ces étapes, le transfert peut débuter.

L'ADN transféré est sous forme d'un seul brin pour permettre la restauration du gène transféré par le processus de réplication asymétrique. Le transfert du brin d'ADN est à sens unique et dure une centaine de minutes à 37°C [81].

7) Les rôles biologiques de la conjugaison sont :

- L'évolution du patrimoine génétique bactérien.
- L'adaptation des bactéries aux attaques d'antibiotiques et antiseptiques.
- L'adaptation des souches exigeantes au manque de nutriments [82].

Exercice N° 03 : Les mutations

1) La mutation est un changement dans la séquence nucléotidique de l'ADN, son origine et soit spontanée ou causée par un agent mutagène. Le changement peut se voir par une modification du phénotype, mais peut être silencieux. Certaines mutations qui affectent des gènes essentiels comme ceux nécessaires à la réplication d'ADN peuvent être létales et donc ne permettent pas d'isoler des mutants [83].

2) Les bactériophages n'ont pas induits la mutation, car si les bactériophages induisaient la mutation après que les bactéries aient été mises en contact avec les bactériophages, toutes les géloses devraient donner le même nombre de colonies résistantes aux bactériophages [84].

3) Les chercheurs ont expliqué le nombre variable des colonies sur les gélosesensemencées et qui contenaient des bactériophages par le fait que la mutation qui rend les bactéries résistantes se fait au hasard ; et donc si

elle se fait dans les premières heures de culture, il y aura beaucoup de divisions cellulaires et donc beaucoup de descendants, et le résultat des centaines de colonies sur boîtes. Alors que, dans le cas où la mutation se fait dans les derniers moments de division cellulaire, il y aura moins de cellules mutantes et donc beaucoup moins de colonies. Enfin, si la mutation ne se produit, pas il n'y aura aucune cellule bactérienne mutante et donc aucune colonie [85].

4) Le nombre de colonies du premier flacon sera beaucoup moins que le nombre de colonies obtenues de n'importe quel inoculum prélevé des 50 cultures gélosées. Car ces dernières contiennent des colonies constituées de bactéries mutantes, et puisque les mutations sont transmises d'une manière verticale vers la descendance, les bactéries obtenues sont presque toutes résistantes. De ce fait, elles donnent un nombre beaucoup plus élevé que le flacon d'origine, ce dernier va donner des résultats semblables à une culture parmi les 50 premières cultures.

5) La culture par réplique faite par Lederberg et Lederberg en 1952 est basée sur l'utilisation d'un morceau de velours attaché à un cylindre. Lorsque cet instrument est appliqué sur une gélose contenant des colonies, il prend l'empreinte de chaque colonie. Ensuite ce morceau de velours sera repiqué sur une gélose vierge pour voir la possibilité des empreintes de donner de nouvelles colonies.

Les chercheurs ont utilisé cette technique pour étudier les mutations, pour cela ils ont étalé un grand nombre de cellules d'*E.coli* sur une gélose sans antibiotique. Après incubation, ils ont fait une repique à l'aide de cet instrument sur une gélose contenant un antibiotique. Ils ont remarqué l'apparition de quelques colonies mutantes occupant des positions identiques sur chaque boîte.

Un morceau de velours a été coupé contenant une colonie et a étéensemencé dans un tube de bouillon, et après culture il a étéensemencé sur une gélose. Après culture des colonies, l'instrument a servi pour transférer les mêmes colonies sur une gélose contenant un antibiotique. Le résultat était un nombre beaucoup plus élevé. Ensuite, après répétition de cette dernière étape, ils ont remarqué que le nombre est très élevé. Les chercheurs ont conclu que sans contact avec l'antibiotique les mutants ont augmenté en nombre donc l'antibiotique ne joue que le rôle de sélecteur, mais il n'est pas un inducteur, cela confirme les résultats de Luria et Delbruck [86].

Exercice N° 04 : Les mutations

1) ① mutation ponctuelle

② Délétion (perte de l'ADN)

③ Insertion

④ Inversion

⑤ Duplication [87].

2)

- La mutation ponctuelle est appelée **Transition** dans le cas où une base purine est changée par une autre purine ($A \leftrightarrow G$) ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine ($C \leftrightarrow T$).
- Elle est appelée **Transversion** dans le cas où il y a changement de base purine par une pyrimidine ou le contraire.
- La mutation silencieuse résulte d'un changement dans les nucléotides mais qui donne toujours le même acide aminé du fait de la redondance du code génétique et donc le phénotype ne change pas.

- La mutation faux-sens résulte d'un changement dans les nucléotides qui entraîne la synthèse d'un acide aminé différent. En fonction de l'emplacement des nucléotides, s'ils sont essentiels ou non. Dans le premier cas, la fonction de la protéine peut être altérée ou perdue, dans le deuxième cas, pas de changement du phénotype [88].

3)

Séquence d'origine :

5'-AUG CUU UCA AGA UGU GGG CAA-3'

Met Pro Ser Arg Cys Gly Gln

1. 5'-AUG CUU UCA AGA UGU GGCAA-3'

Met Pro Ser Arg Cys Gly Gln

C'est une mutation **silencieuse** car le changement du GGG en GGA a donné le même acide aminé qui est la Glycine.

2. 5'-AUG CUU UCA GGA UGU GGG CAA-3'

Met Pro Ser **Gly** Cys Gly Gln

C'est une mutation faux-sens car la mutation a entraîné la formation d'un acide aminé différent.

3. 5'-AUG CCU UCA AGA UGA GGG CAA-3'

Met Pro Ser Arg Stop

C'est une mutation non-sens car la mutation à créer un codon stop et dans ce cas la synthèse protéique est interrompue.

4. 5'-AUG CCU UCA AGU GUG GGC AA-3'

Met Pro Ser Ser Val Gly

C'est une mutation par décalage causé par une délétion. Cette mutation a entraîné la formation de trois acides aminés différents plus la perte d'un acide aminé.

4) Les agents mutagènes sont des agents chimiques et physiques qui agissent sur l'ADN et augmentent la fréquence de mutations (induisent l'apparition de mutations). Parmi les agents chimiques, il y a les analogues de bases (5-bromouracile), les agents intercalants (Bromure d'éthidium), les agents alkylants (hypoxanthine). Parmi les agents physiques, les rayons ultraviolets en sont un exemple édifiant [81].

Exercice N° 05 : Les transposons et les intégrons

1) Ces gènes sauteurs sont appelés transposons. Les transposons sont des fragments d'ADN qui peuvent être mobilisés d'un site à un autre sur un même brin d'ADN, ou sur un autre brin. Ce sont habituellement les transposons eux-mêmes qui codent leurs protéines de transposition (transposases et intégrases) [89].

2) Les noms des trois types de gènes sauteurs sont :

- a. les séquences d'insertions (SI).
- b. Les transposons non-composites.
- c. Les transposons composites [90].

3)

- a. La séquence représentée par la figure 23 est une représentation schématique d'un intégron.
- b. Un intégron est une unité génétique qui inclut un site spécifique de recombinaison, capable de capturer et mobiliser des gènes contenus dans des éléments mobiles appelés gènes cassettes et un promoteur pour l'expression des gènes cassettes. Il agit comme un système naturel de clonage et comme un vecteur d'expression [91].

c.

- ① : Le gène *int* encodant une intégrase est le constituant principal de l'intégron.
- ② : promoteur du gène *intI*.
- ③ : Site de spécifique recombinaison adjacent au gène *int*.
- ④ : promoteur d'éventuelles cassettes.
- ⑤ : Région variable.
- ⑥ : Un gène cassette.
- ⑦ : Site spécifique recombinaison à l'extrémité des gènes cassettes.
- ⑧ : Endroit de l'emplacement d'éventuelles autres cassettes.
- ⑨ : Séquences conservées [92].

Chez les staphylocoques, la cassette *SCCmec* pour (S : staphylococcal, C : cassette, C : chromosome, mec). Le gène (mec) est responsable de la production d'une unique protéine PLP de faible affinité avec les pénicillines, pour cela elle est appelée PLP2a ou PLP2'. Cette cassette *SCCmec* est véhiculée par des intégrons ce qui a permis une dissémination mondiale de ce gène de résistance aux β -lactamines.

Exercice N° 06 : La composition en bases Guanine et Cytosine (CG%)

- 1) l'intérêt de la détermination de la composition en bases Guanine et cytosine (GC%) est l'analyse de la parenté entre les microorganismes. Ainsi, les microorganismes ayant des GC % proches sont généralement proches de point de vue taxonomique [93].
- 2) Détermination des GC% de chaque espèce :

A l'aide du graphique de la figure 24 on détermine le point médian de la courbe de dénaturation. Ensuite, on fait la projection sur l'axe des abscisses pour déterminer la température de demi-fusion appelée aussi « Tm » [10]. Le résultat est représenté par la figure 46

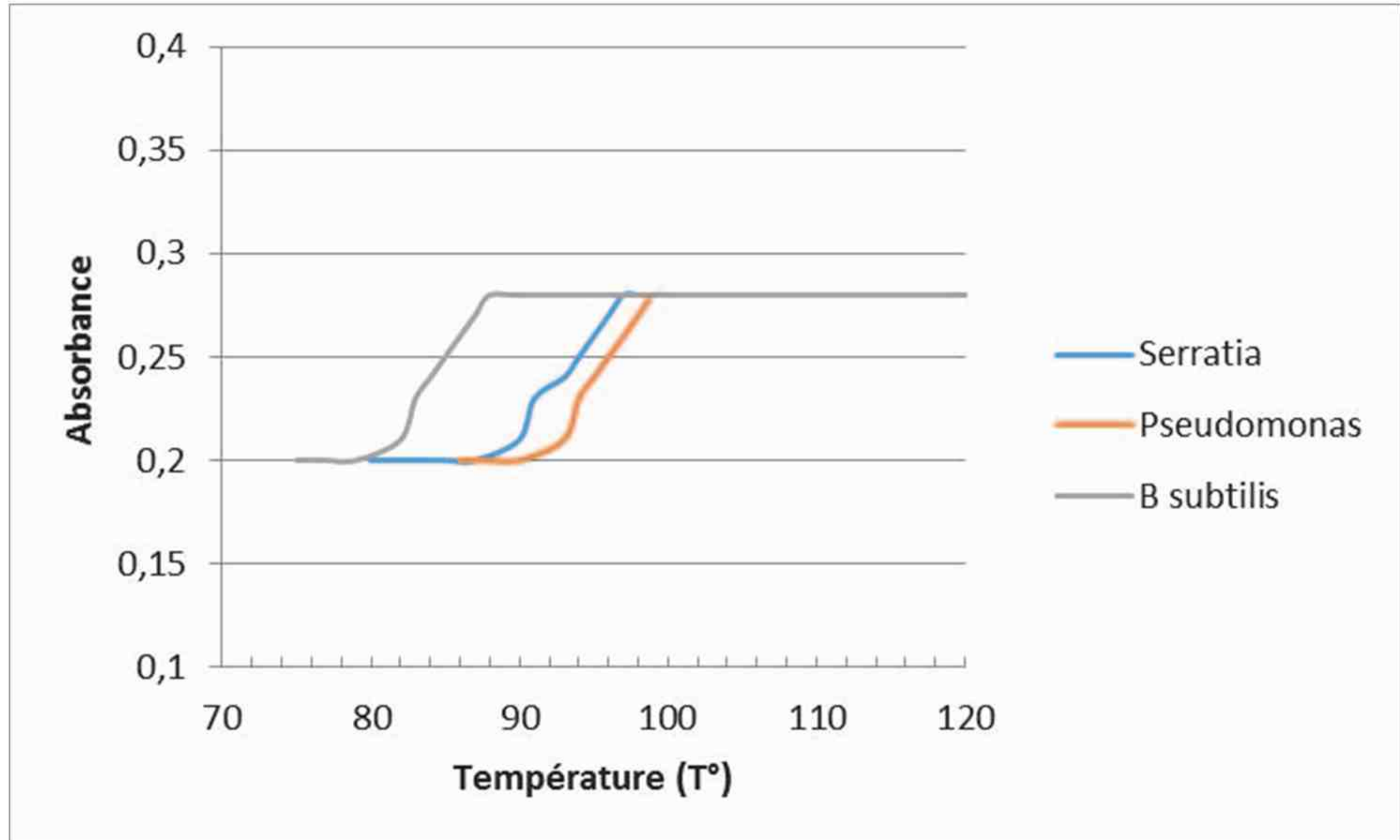


Figure 46 : Courbes de dénaturation des ADN de *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *B. subtilis*

- *Bacillus subtilis*: 84,5 C°
- *Serratia marcescens*: 93,5 C°
- *Pseudomonas aeruginosa*: 94,5.

Après la détermination des Tm de chaque espèce, la lecture de GC% se fait directement sur la courbe de la figure 25. Le résultat est représenté par la figure 47

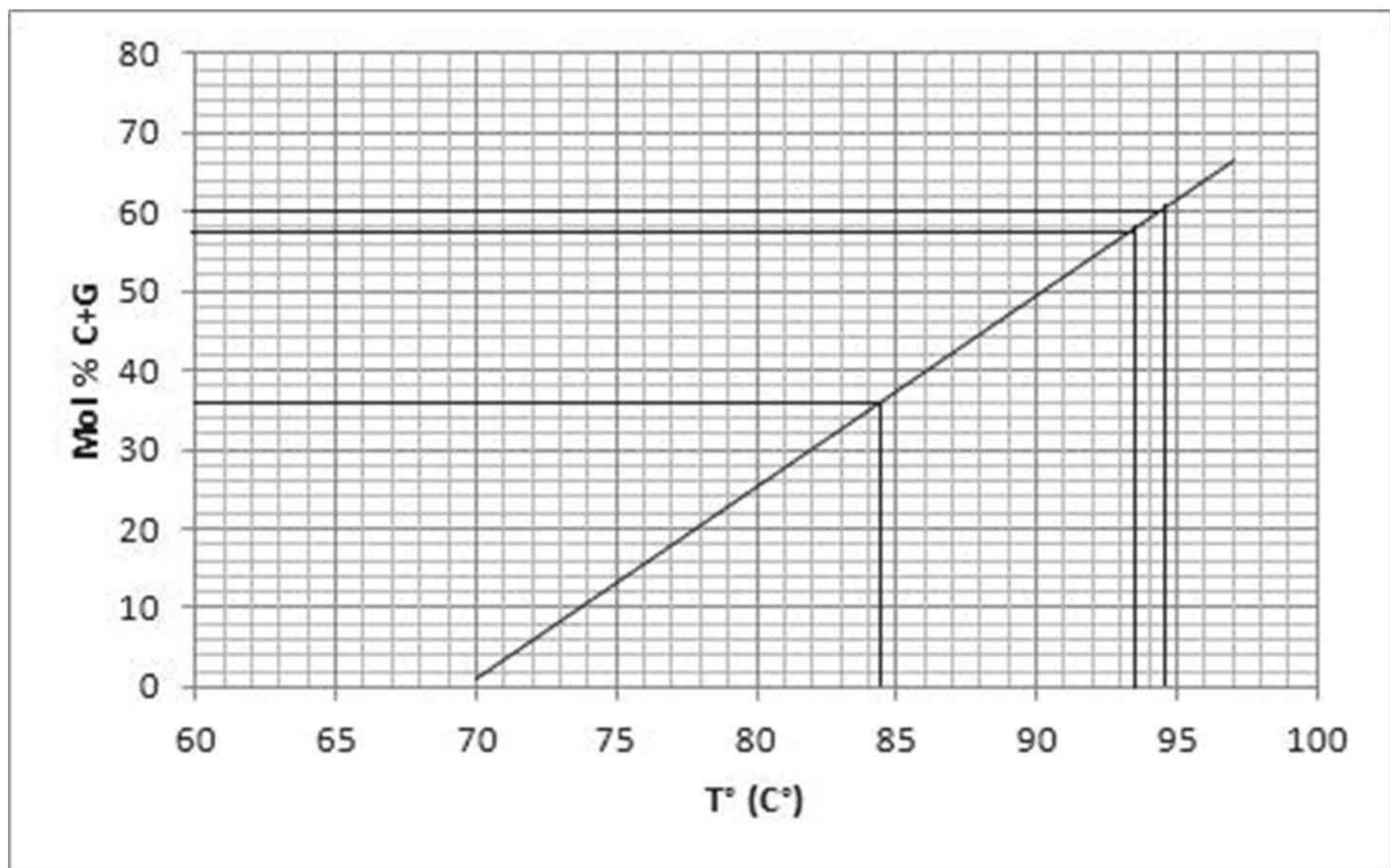


Figure 47 : Pourcentage de (C+G) en fonction des températures dénaturantes

- *Bacillus subtilis*: 34%
- *Serratia marcescens*: 58%
- *Pseudomonas aeruginosa*: 60%

3) Lorsqu'on compare le GC% des trois espèces, on remarque que ceux de *Serratia marcescens* et de *Pseudomonas aeruginosa* sont proches (58%, 60%), tandis que celui de *Bacillus subtilis* est plus différent. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que *P. aeruginosa* et *S. marcescens* sont des bactéries à Gram négatif alors que *B. subtilis* est une bactérie à Gram positif.

4) Les températures de dénaturation de *S. marcescens* et de *P. aeruginosa* sont élevées, car ces deux espèces sont riches en GC% (58%, 60%), alors que *B. subtilis* est plus ou moins pauvre en GC%. Les liaisons hydrogène entre les paires de bases CG (trois liaisons) sont plus résistants à la

température par rapport aux liaisons hydrogène entre les paires de bases AT (deux liaisons). Il faut donc une température plus élevée pour dénaturer l'ADN riche en GC.

5) La diminution de l'absorbance pour l'espèce *S. marcescens* signifie une diminution de la quantité de l'ADN simple brin, cela est dû à la renaturation des brins d'ADN car la méthode de refroidissement est un refroidissement lent. Alors que la stabilité de l'absorbance pour l'espèce *B. subtilis* signifie la persistance de l'ADN de cette espèce en état monocaténaire, car la méthode de refroidissement utilisé est un refroidissement rapide. Une fois l'ADN dénaturé, il se réassociera si la température est abaissée lentement ; alors que si la solution est refroidie brusquement, il ne se formera pas d'hybride et les molécules d'ADN demeureront en simple brin [18].

Exercice N° 07 : Bactériophages et transduction

1) Figure 26 : Schéma d'un bactériophage

- ① : Tête ou capsid
- ② : ADN
- ③ : Queue
- ④ : Fibres [94].

Figure 27 : Schéma d'un cycle de bactériophage

- ① : Fixation
- ② : Transfert de l'ADN
- ③ : Destruction d'ADN bactérien
- ④ : Multiplication

⑤ : Assemblage

⑥ : Libération [95].

2) Ce phénomène de transfert de gènes est appelé Transduction, et le type de transduction est une transduction généralisée.

3)

a. Ce cycle est appelé un cycle lysogénique.

b. La bactérie est appelée bactérie lysogène et le phage est appelé prophage (phage tempéré).

c. Ce transfert est appelé une transduction spécialisée [96].

Exercice N° 08 : Régulation « Opéron lactose »

1) La structure génétique représentée par la figure 28 est un Opéron. C'est un groupe de gènes de structure liés fonctionnellement, adjacents sur le chromosome et dont les expressions sont sous la dépendance des mêmes gènes régulateurs [81].

2) Rôle des gènes ;

LacZ : code pour la β -galactosidase qui décompose le lactose.

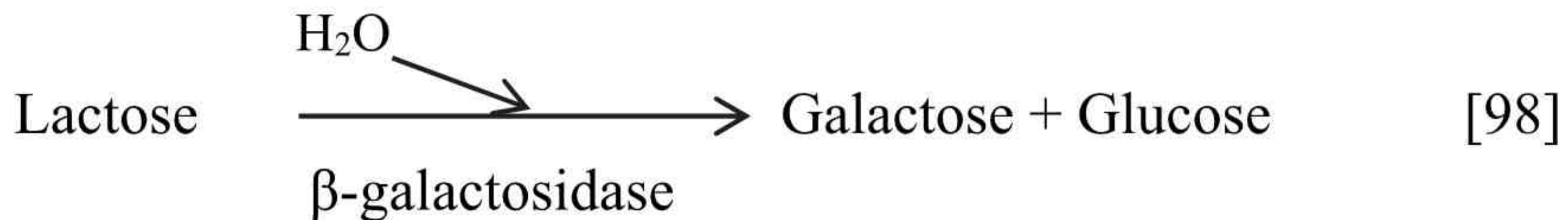
LacY : code pour une galactosideperméase, une protéine de transport pour le lactose.

LacA : code pour une thiogalactoside acetyltransferase.

lacI : code pour le répresseur qui bloque la transcription de l'opéron lactose [81].

3) Les gènes de l'opéron lactose sont exprimés continuellement mais à très faible taux. Toutefois ces gènes sont induits environ 1000 fois quand le lactose est présent [97].

4) la β -galactosidase catalyse l'hydrolyse du lactose en galactose et glucose.



5)

a.

① : Augmentation de la synthèse de la β -galactosidase jusqu'à 6% de la synthèse protéique totale.

② : Arrêt de la synthèse de la β -galactosidase.

Titre de la figure 29 : Cinétique d'induction de l'activité de la β -galactosidase chez *E. coli*.

b. La figure 29, montre comment le lactose induit la synthèse de la β -galactosidase après son ajout dans le milieu et qui a entraîné la multiplication cellulaire, alors que son absence a arrêté la synthèse de la β -galactosidase. En effet, le gène *lacI* synthétise un répresseur qui se lie à l'ADN empêchant ainsi la fixation de l'ARN polymérase et donc il n'y a pas de synthèse de l'ARNm. Il en résulte un opéron éteint et par la suite le lactose ne sera pas dégradé, car il n'y a pas de synthèse de la β -galactosidase.

Tandis qu'en présence de lactose, ce dernier se fixe au répresseur sur un site de fixation, il en résulte un changement de la conformation du répresseur empêchant ainsi sa fixation sur l'ADN et la fixation de l'ARN

polymérase est favorisée. Le résultat est le fonctionnement des gènes de l'opéron et la synthèse de la β -galactosidase.

6)

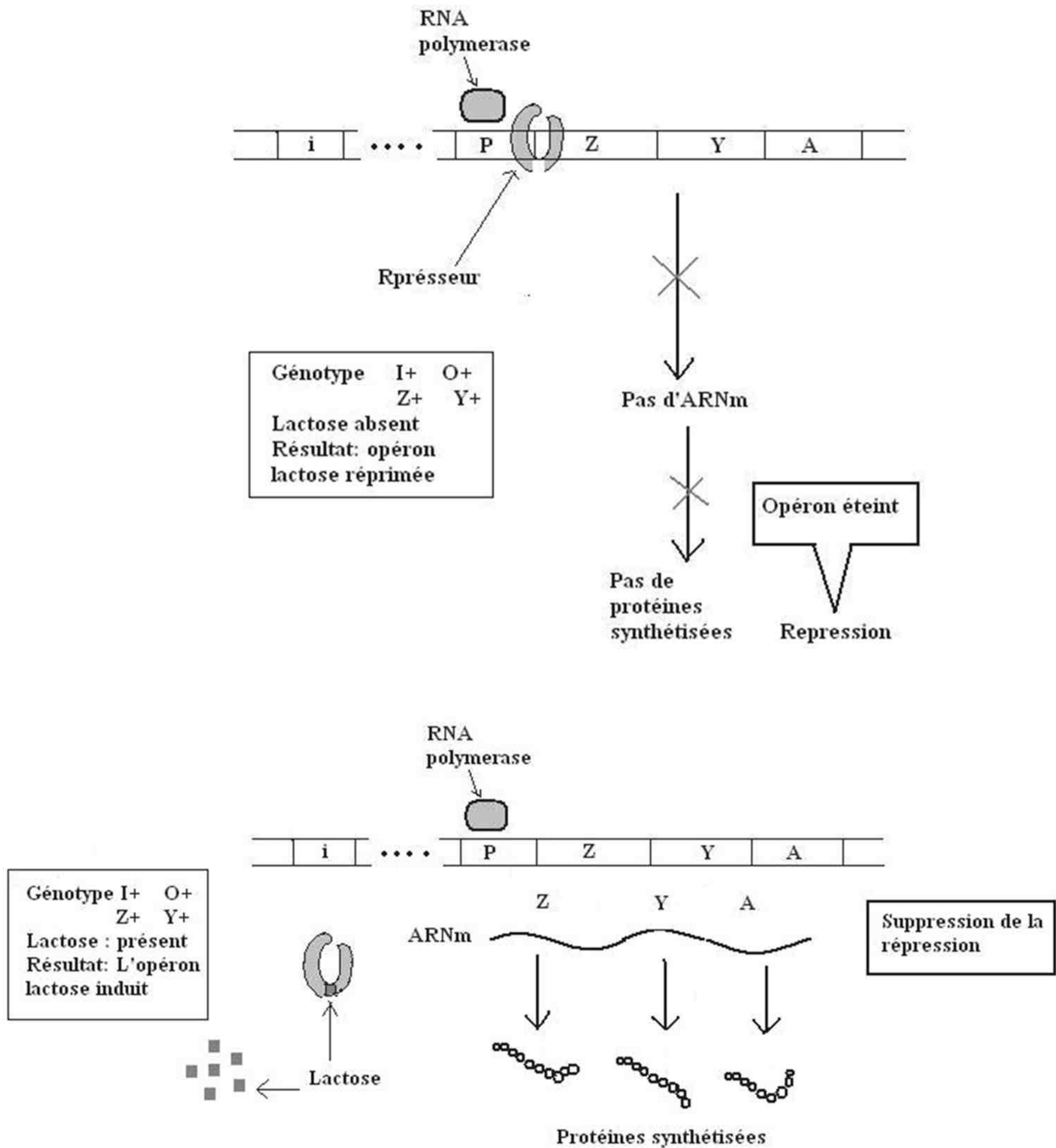


Figure 48 : mode de régulation de l'opéron lactose

7) La régulation établie par l'opéron lactose est une régulation de type négative, car la protéine répresseur se fixe à l'opérateur, l'ARN

polymérase ne peut plus initier la transcription ce qui empêche l'expression du gène [99].

8)

a.

① : Utilisation du glucose par la bactérie.

② : Pas de glucose dans le milieu.

③ : Stabilité de la quantité du lactose.

④ : Diminution de la quantité du lactose.

⑤ : Epuisement du glucose et la bactérie commence à s'adapter pour utiliser un autre sucre.

⑥ : La bactérie commence à utiliser le lactose.

Titre de la figure 30 : métabolisme glucidique d'*E. Coli* en présence de deux sucres, glucose et lactose.

La figure 30 montre l'utilisation préférentielle du glucose par *E.coli* en présence d'un autre sucre qui est le lactose. Dans ce cas-là, et malgré que le lactose induit la synthèse de β -galactosidase, la bactérie ne le synthétise pas, car elle exerce la répression catabolique et fait intervenir une régulation positive au niveau du promoteur. Le glucose entraîne une répression catabolique en diminuant la concentration de l'AMPc, ce qui va entraîner la désactivation de la CAP (catabolite activator protein). Cette dernière joue un rôle indispensable pour l'activation de la transcription de l'ARNm, la CAP se lie avec l'AMPc pour former un facteur de contrôle positif en interrompant les voies métaboliques alternatives lorsqu'elles sont rendues superflues par la présence du glucose [100].

Exercice N° 09 : PCR

- 1) La PCR « Polymerase Chain Reaction » ou (Amplification en chaîne par polymérase), est une technique de biologie moléculaire d'amplification d'ADN *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique (séquence spécifique d'ADN ou Amplicon) et d'amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides. Cette technique a été mise en évidence par l'équipe de Saiki, en 1988 [101, 102].
- 2) Les amorces appelées autrement « primers » sont des oligonucléotides synthétiques formés d'une vingtaine de nucléotides capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases. Les deux amorces sont positionnées de part et d'autre de la région que l'on souhaite amplifier. L'une des amorces est complémentaire d'une région d'un brin d'ADN, l'autre est complémentaire de la région du brin opposé [88].
- 3) La technique de PCR est basée sur la dénaturation de l'ADN grâce à la température, ensuite la renaturation se fait par le refroidissement dans un appareil appelée thermocycleur. Pour cela, il faut une ADN polymérase thermostable car une ADN polymérase normale va se dénaturer par des températures de 90°C et perd son activité. A cet effet, les chercheurs utilisent actuellement la Taq polymérase, une polymérase thermostable, qui prend son nom de *Thermus aquaticus*, une bactérie thermophile à partir de laquelle cette enzyme a été isolée pour la première fois en 1969 [76].

4)

① : Dénaturation

② : Hybridation

③ : Elongation

④ : Premier cycle

⑤ : Deuxième cycle

Figure 31 : Les étapes des cycles d'amplification par PCR

5) Un mixte de PCR est constitué de l'ADN matrice, le couple d'amorces, les quatre désoxyribonucléotides DNTP (DATP, DCTP, DGTP et DTTP) la Taq polymérase, le tampon de réaction, Mg^{+2} et l'eau (H_2O) [103].

6) Lors d'une PCR standard, on réalise une amplification, ensuite on fait une révélation sur gel d'agarose. On attend un certain temps pour la migration et on utilise des agents intercalants tels que le bromure d'éthidium pour visualiser les bandes.

Alors que lors d'une PCR en temps réel, on ne perd pas le temps car le résultat est visualisé directement grâce à l'utilisation de la fluorescence [104].

7) La PCR multiplexe est une PCR autorisant l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs segments d'ADN distincts. Les couples d'amorces correspondant aux différents locus à analyser sont introduits dans le même tube réactionnel [105].

LA RT-PCR signifie « Reverse Transcriptase PCR », soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). Il s'agit d'une PCR "classique" réalisée sur un

ADN complémentaire (ou ADNc), qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse [106].

Exercice N° 10 : Techniques moléculaires pour la comparaison des souches

1) la comparaison génotypique des souches permet la gestion des épidémies hospitalières en étudiant et en comparant les profils génétiques des souches et donc savoir si une ou plusieurs souches sont responsables d'épidémies ultérieures. Ainsi ces études permettent également de distinguer chez un même patient s'il a eu une réinfection avec une nouvelle souche ou une rechute [47].

Tableau 37 : Comparaison entre les différentes techniques permettant la comparaison génotypique

Techniques	Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction RFLP	Amplification aléatoire RAPD	Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés PCR-RFLP	Polymorphisme de la variation du nombre de motifs dans des répétitions en tandem MLVA ou VNTR	polymorphisme pour un nucléotide SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	Typage génomique multilocus MLST (Multi-Locus Sequence Typing)	Typage MALDI-TOF-MS
Appareil	Cuve d'électrophorèse en champs pulse + accessoires	Cuve d'électrophorèse ordinaire	PCR	PCR Cuve d'électrophorèse Ordinaire	PCR(s) multiplex	Puces à ADN	PCR + séquenceur	Appareil d'analyse MALDI-TOF-MS
Principe	Digestion enzymatiques des fragments dans des sites rars suivie par migration sur gel en champ pulsé	Digestion enzymatiques des fragments dans des sites fréquents suivie par migration sur gel	amplification d'une ou plusieurs séquences génomique par PCR d'une manière aléatoire avec des températures basses d'hybridation est	l'amplification par PCR de fragments obtenus après digestion totale de l'ADN par deux enzymes de restriction dans des sites fréquents	polymorphisme de plusieurs loci comprenant un nombre variable de régions répétées en tandem. amplification avec une ou plusieurs PCR(s) multiplex ces régions répétées	identifier des centaines voire des milliers de SNPs à l'intérieur d'une espèce bactérienne, par hybridation C'est un type de polymorphisme	séquençage direct de gènes « conservés » ou « gènes de ménage ». Ces gènes sont dits « conservés » car les seules variations possibles sont	Comparaison des pics reproductibles par analyses de logiciels spécifique

			donc l'accrochage non stringent des amorces			de l'ADN dans lequel deux chromosomes diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases.	dues à des mutations ponctuelles ou des recombinaisons neutres	
Enzymes	Enzyme de restriction	endonucléases de restriction	Taq polymérase	endonucléases de restriction Taq polymérase	Taq polymérase	Pas d'enzymes	Taq polymérase ADN polymérase	Pas d'enzymes
Réactifs	Bromure d'éthidium + tampon + Agarose	Bromure d'éthidium + tampon + Agarose + membrane de Southernblot	Amorces aléatoires	Bromure d'éthidium + tampon + gel d'acrylamide + amorces	Bromure d'éthidium + tampon + Agarose	Pas de réactifs	Bromure d'éthidium + tampon + Agarose	Matrice HCCA
Interprétation	Comparaison entre les profils de restriction le nombre de fragments discordants	Comparaison entre les profils de restriction	Comparaison des profils d'amplification	Comparaison des profils d'amplification des fragments de restriction	L'analyse de la taille des différents VTRN permet l'assignation à un profil allélique ou à un code numérique MLVA	Les résultats de type binaire sont représentés par un signal d'hybridation positif ou	L'analyse du polymorphisme de six à dix gènes de ménage définit une séquence type (ST). Les différents ST	Lecture du dendrogramme tracé par le logiciel

						négatif avec chaque sonde	peuvent être regroupés en complexes clonaux (CC)	
Avantages	fort pouvoir discriminant	Plus rapide que la PFGE	simple et rapide	grand pouvoir de résolution et une bonne reproductibilité	L'analyse est très discriminante pour les bactéries possédant un génome très conservé comme <i>M. tuberculosis</i> ou <i>B. anthracis</i>	très reproductible, aisément lisible et échangeable	Très reproductible, elle permet la détection gène de résistance	fort pouvoir discriminant
inconvénients	personnel très qualifié	personnel très qualifié le nombre de fragments générés est très élevé et l'interprétation est délicate.	Peu reproductible inter et intra laboratoires	personnel très qualifié le nombre de fragments générés est très élevé et l'interprétation est délicate.	personnel très qualifié	personnel qualifié	MLST n'est pas applicable aux espèces génétiquement homogènes.	Une optimisation et une standardisation de tous les paramètres s'avèrent indispensables
Temps	Entre trois et six jours	Entre deux et quatre jours	Entre 1 et 2 jours	Entre deux et quatre jours	Entre deux et quatre jours	Entre 1 et 2 jours	Entre deux et quatre jours	Quelques heures
Coût d'analyse	coûteux	coûteux	abordable	Coûteux	coûteux	Très coûteux	Très coûteux	abordable
Coût d'appareil	coûteux	abordable	abordable	Abordable	abordable	coûteux	Très coûteux	Très coûteux

Références :

1. Jordan, E., H. Saedler, and P. Starlinger, 1968. *Oo and strong-polar mutations in the gal operon and insertions*. Molecular and General Genetics MGG, 102(4): p. 353-363.
2. Richmond, M., J. Gray, and C. Stine, 1981. *Beta-galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization*. Journal of Dairy Science, 64(9): p. 1759-1771.
3. Rowe-Magnus, D.A. and D. Mazel, 1999. *Resistance gene capture*. Current opinion in microbiology, 2(5): p. 483-488.
4. Anitori, R.P., 2012. *Extremophiles: microbiology and biotechnology*: Horizon Scientific Press.
5. Guezennec, J., 2014. *Bactéries marines et biotechnologies*: Editions Quae.
6. Branger, A., M. Richer, and S. Roustel, 2012. *Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques*. Educagri Editions. (978-2-84444-616-9).
7. Delarras, C., 2006. *Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux*. Réglementation-Prélèvements-Analyses. Ed. Lavoisier, Paris.
8. Meunier, O., 2006. *Mémo hygiène*: Wolters Kluwer France.
9. Baudry, C. and H. Brézellec, 2006. *Microbiologie, immunologie*: Wolters Kluwer France.
10. Branger, A., 2012. *Microbiochimie et alimentation*: Educagri Editions.
11. Marchal, N., J.-L. Bourdon, and C. Richard, 1982. *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*.
12. Hardy, S., 2003. *Human microbiology*: Crc Press.
13. Gaudy, C., J. Buxeraud, and L. Mereghetti, 2005. *Antibiotiques (pharmacologie et thérapeutique)*. Collection pharma,.

14. Remaut, H. and R. Fronzes, 2014. *Bacterial membranes: structural and molecular biology*: Horizon Scientific Press.
15. Seltmann, G. and O. Holst, 2013. *The bacterial cell wall*: Springer Science & Business Media.
16. Moat, A.G., J.W. Foster, and M.P. Spector, 2003. *Microbial physiology*: John Wiley & Sons.
17. Black, J.G., 2008. *Microbiology: principles and explorations*: John Wiley & Sons.
18. Perry, J.J., J.T. Staley, and S. Lory, 2004. *Microbiologie: cours et questions de révision*: Dunod.
19. Bazin, H., 2011. *Vaccination: a history from Lady Montagu to genetic engineering*: John Libbey Eurotext.
20. Delarras, C., 2014. *Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-1565-7.
21. Drobniowski, F.A., 1993. *Bacillus cereus and related species*. Clinical microbiology reviews, **6**(4): p. 324-338.
22. Branger, A., R. Marie-Madeleine, and R. Sébastien, 2009. *Alimentation, processus technologiques et contrôles*. Educagri Editions. 978-2-84444-720-3.
23. Guillet, F., et al., 2002. *Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires*: Wolters Kluwer France.
24. Csuros, M., 1999. *Microbiological examination of water and wastewater*: CRC Press.
25. Voet, D. and J.G. Voet, 1998. *Biochimie. Deuxième édition, par John Wiley et Sons*. Inc, version française, De boeck Université sa,.
26. Prescott, L., et al., 2003. *Microbiologie. 2e éd.* De Boeck Université, Bruxelles,: p. 1164.

27. Denis, F., M.-C. Ploy, and É. Bingen, 2011. *Bactériologie médicale: techniques usuelles*: Elsevier Health Sciences.
28. Errington, J., 2003. *Regulation of endospore formation in Bacillus subtilis*. Nature Reviews Microbiology, 1(2): p. 117-126.
29. Russell, A., 1990. *Bacterial spores and chemical sporicidal agents*. Clinical microbiology reviews, 3(2): p. 99-119.
30. Aronoff, D.M., 2013. *Clostridium novyi, sordellii, and tetani: Mechanisms of disease*. Anaerobe, 24: p. 98-101.
31. Monds, R.D. and G.A. O'Toole, 2009. *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review*. Trends in microbiology. 17(2): p. 73-87.
32. Hart, T. and P. Shears, 1999. *Atlas de poche de microbiologie*. Médecine-Sciences Flammarion, ISBN : 2-257-10125-1.
33. Codex alimentarius 2008. *Codex alimentarius: production animale*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISN:1020-2560.
34. Berche, P., 2007. *Une histoire des microbes*: John Libbey Eurotext.
35. Simons, L.M., 2002. *Weapons of mass destruction*. National Geographic, 202(5): p. 2-35.
36. Raoult, D. and M. Drancourt, 2008. *Paleomicrobiology*: Springer.
37. Carter, J. and V.A. Saunders, 2007. *Virology: principles and applications*: John Wiley & Sons.
38. Becker, Y., 2012. *Molecular virology: molecular and medical aspects of disease-causing viruses of man and animals*: Springer Science & Business Media.
39. Mammette, A., 2002. *Virologie médicale*: Presses Universitaires Lyon.
40. Bouchet, P., J.-L. Guignard, and Y.-F. Pouchus, 2005. *Les champignons: mycologie fondamentale et appliquée*: Elsevier Masson.

41. Pouchus, Y.-F., 2012. *Guide de poche de mycologie officinale: Médecine Sciences publications, Lavoisier.*
42. Rai, M. and P.D. Bridge,2009. *Applied mycology: CABI.*
43. Schwalbe, R., L. Steele-Moore, and A.C. Goodwin, 2007. *Antimicrobial susceptibility testing protocols: Crc Press.*
44. Stora, D., 2010. *Pharmacologie BP: Wolters Kluwer France.*
45. Davey, P., et al., 2015. *Antimicrobial chemotherapy: Oxford University Press.*
46. Ford, M., 2014. *Medical microbiology: Oxford University Press.*
47. Liu, D., 2011. *Molecular detection of human bacterial pathogens: CRC press.*
48. Mollet, C., M. Drancourt, and D. Raoult, 1997. *rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Molecular microbiology, 26(5): p. 1005-1011.*
49. McNabb, A., et al.,2004. *Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of Mycobacterium species isolated from clinical sources. Journal of clinical microbiology, 42(7): p. 3000-3011.*
50. Blackwood, K.S., et al., 2000. *Evaluation of recA sequences for identification of Mycobacterium species. Journal of clinical microbiology, 38(8): p. 2846-2852.*
51. Poyart, C., et al.,2001.*Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the sodA gene as a target. Journal of clinical microbiology, 39(12) : p. 4296-4301.*
52. Leyral, G. and E. Vierling,2007.*Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires: Wolters Kluwer France.*
53. Desjardins, R.,1997.*Le traitement des eaux: Presses inter Polytechnique.*

54. Edberg, S., et al., 2000. *Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection*. Journal of Applied Microbiology,. 88(S1): p. 106S-116S.
55. Karp, G., 2010. *Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments*: De Boeck Supérieur.
56. Leyral, G. and E. Vierling,1997. *Microbiologie et toxicologie des aliments*.Editions Doin,. 54: p. 55-81.
57. Oliveira, C., P.M. Guimarães, and L. Domingues,2011. *Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications*. Biotechnology advances,. 29(6): p. 600-609.
58. Washington, J.A., 2012. *Laboratory procedures in clinical microbiology*: Springer Science & Business Media.
59. Grimont, F. and P.A. Grimont, 2006. *The genus Enterobacter*, in *The prokaryotes*, Springer. p. 197-214.
60. Hegeman, A.D., 2007. *Enzymatic Reaction Mechanisms*: Oxford University Press, USA.
61. Dromigny, E., 2011. *Les critères microbiologiques des denrées alimentaires*: Lavoisier.
62. Kim, B.H. and G.M. Gadd,2008. *Bacterial physiology and metabolism*: Cambridge university press.
63. Cohen, G.N., 2011. *Microbial biochemistry*: Springer.
64. Kulp, K. and K. Lorenz,2003. *Handbook of dough fermentations*. Vol. 127 : CRC Press.
65. Solieri, L. and P. Giudici, 2009. *Vinegars of the World*: Springer.
66. Apiweb,
<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>, 2015.

67. JOFFIN, J.-N., *Identification informatique*.
<http://www.techmicrobio.eu/index.php/microbio/taxonomie-orientation/identification-informatique>, 2013.
68. Bryant, T., 2004. *PIBWin--software for probabilistic identification*. *Journal of Applied Microbiology*, (97): p. 1326-7.
69. METADJER, N., 2014. *Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatifs isolées dans le service de chirurgie A du CHU de Tlemcen*.
70. Gavin, P., et al., 2002. *Evaluation of the Vitek 2 system for rapid identification of clinical isolates of gram-negative bacilli and members of the family Streptococcaceae*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*,. 21(12): p. 869-874.
71. Wilkins, C.L. and J.O. Lay, 2005. *Identification of microorganisms by mass spectrometry*. Vol. 169 : John Wiley & Sons.
72. Sandrin, T.R., J.E. Goldstein, and S. Schumaker, 2013. *MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review*. *Mass spectrometry reviews*,. 32(3): p. 188-217.
73. Sauer, S. and M. Kliem, 2010. *Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria*. *Nature Reviews Microbiology*. 8(1): p. 74-82.
74. Vaidyanathan, S., et al., 2002. *Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (> 20 kDa) proteins*. *Rapid communications in mass spectrometry* . 16(13): p. 1276-1286.
75. Alanio, A., 2013. *La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mycologie clinique: avantages réels, écueils potentiels*. *Journal des Anti-infectieux*. 15(2): p. 71-82.

76. Chien, A., D.B. Edgar, and J.M. Trela, 1976. *Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus*. *Journal of bacteriology*,. 127(3): p. 1550-1557.
77. Kratz, R.F.,2005.*Microbiology the Easy Way*: Barron's Educational Series.
78. Primrose, S.B. and R. Twyman, 2013. *Principles of gene manipulation and genomics*: John Wiley & Sons.
79. TeBeest, D., 2012. *Microbial control of weeds*: Springer Science & Business Media.
80. Barocchi, M.A. and J.L. Telford, 2014. *Bacterial Pili: Structure, Synthesis and Role in Disease*. Vol. 27.: CABI.
81. Griffiths, A.J., 2006. *Introduction à l'analyse génétique*: De Boeck Supérieur.
82. Hensel, M. and H. Schmidt, 2008. *Horizontal gene transfer in the evolution of pathogenesis*. Vol. 16.: Cambridge University Press.
83. Trun, N. and J. Trempy, 2009. *Fundamental bacterial genetics*: John Wiley & Sons.
84. Pinedo, H.M., G. Giaccone, and K. Sikora, 2007. *Drug resistance in the treatment of cancer*: Cambridge University Press.
85. Werkman, C.H. and P.W. Wilson,2013.*Bacterial physiology*: Elsevier.
86. Choffnes, E.R., et al.,2009.*Microbial Evolution and Co-Adaptation:: A Tribute to the Life and Scientific Legacies of Joshua Lederberg*: National Academies Press.
87. Ameziane, N., et al.,2005.*Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Campus référence,.
88. Read, A. and D. Donnai, 2008. *Génétique médicale: de la biologie à la pratique clinique*: De Boeck Supérieur.

89. Capy, P., 2012. *Evolution and impact of transposable elements*. Vol. 6.: Springer Science & Business Media.
90. Clark, D.P. and N.J. Pazdernik, 2013. *Molecular Biology*. Elsevier,.2nd Edition(ISBN-13: 978-0123785947).
91. Mazel, D., 2006. *Integrans: agents of bacterial evolution*. Nature Reviews Microbiology,. 4(8): p. 608-620.
92. Skurnik, D., 2009. *Les intégrons : structure et épidémiologie*.Antibiotiques,. 11(2): p. 116-129.
93. Chan, V., *Microbial Genomes*, in *Bacterial Genomes and Infectious Diseases*, V. Chan, P. Sherman, and B. Bourke, 2006. Editors., Humana Press. p. 1-19.
94. Kutter, E. and A. Sulakvelidze, 2004. *Bacteriophages: biology and applications*: CRC Press.
95. Mc Grath, S. and D. van Sinderen, 2007. *Bacteriophage: genetics and molecular biology*: Horizon Scientific Press.
96. Abedon, S.T., 2008. *Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*. Vol. 15.: Cambridge University Press.
97. Brown, T., 2011. *Introduction to genetics: a molecular approach*: Garland Science.
98. Bauer, W.J., R. Badoud, and J. Löliger, 2010. *Science et technologie des aliments: principes de chimie des constituants et de technologie des procédés*: PPUR Presses polytechniques.
99. Ha, C.-E. and N. Bhagavan, 2011. *Essentials of Medical Biochemistry: With Clinical Cases*: Academic Press.
100. Clark, D.P. and N.J. Pazdernik, 2015. *Biotechnology: applying the genetic revolution*: Newnes.

101. Innis, M.A., et al., 2012. *PCR protocols: a guide to methods and applications*: Academic press.
102. Saiki, R., et al., 1988. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*,. 239(4839): p. 487-491.
103. van Pelt-Verkuil, E., A. Van Belkum, and J.P. Hays, 2008. *Principles and technical aspects of PCR amplification*: Springer Science & Business Media.
104. Mackay, I.M., 2007. *Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization*: Horizon Scientific Press.
105. Rao, J.R., C.C. Fleming, and J.E. 2006. Moore, *Molecular diagnostics: current technology and applications*: Horizon Scientific Press.
106. O'Connell, J., 2002. *Rt-PCR Protocols*. Vol. 193 : Springer Science & Business Media.

Annexes

Le code génétique

1 ^{re} base	2 ^e base								3 ^e base
	<u>U</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>U</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	
<u>U</u>	UUU	<u>F Phe</u>	UCU	<u>S Ser</u>	UAU	<u>Y Tyr</u>	UGU	<u>C Cys</u>	<u>U</u>
	UUC	<u>F Phe</u>	UCC	<u>S Ser</u>	UAC	<u>Y Tyr</u>	UGC	<u>C Cys</u>	<u>C</u>
	UUA	<u>L Leu</u>	UCA	<u>S Ser</u>	UAA	<u>Stopocre</u>	UGA	<u>Stopopale / U Sec / W Trp</u>	<u>A</u>
	UUG	<u>L Leu/ initiation</u>	UCG	<u>S Ser</u>	UAG	<u>Stopambre / O Pyl</u>	UGG	<u>W Trp</u>	<u>G</u>
<u>C</u>	CUU	<u>L Leu</u>	CCU	<u>P Pro</u>	CAU	<u>H His</u>	CGU	<u>R Arg</u>	<u>U</u>
	CUC	<u>L Leu</u>	CCC	<u>P Pro</u>	CAC	<u>H His</u>	CGC	<u>R Arg</u>	<u>C</u>
	CUA	<u>L Leu</u>	CCA	<u>P Pro</u>	CAA	<u>Q Gln</u>	CGA	<u>R Arg</u>	<u>A</u>
	CUG	<u>L Leu/ initiation</u>	CCG	<u>P Pro</u>	CAG	<u>Q Gln</u>	CGG	<u>R Arg</u>	<u>G</u>
<u>A</u>	AUU	<u>I Ile</u>	ACU	<u>T Thr</u>	AAU	<u>N Asn</u>	AGU	<u>S Ser</u>	<u>U</u>
	AUC	<u>I Ile</u>	ACC	<u>T Thr</u>	AAC	<u>N Asn</u>	AGC	<u>S Ser</u>	<u>C</u>
	AUA	<u>I Ile</u>	ACA	<u>T Thr</u>	AAA	<u>K Lys</u>	AGA	<u>R Arg</u>	<u>A</u>
	AUG	<u>M Met&initiation</u>	ACG	<u>T Thr</u>	AAG	<u>K Lys</u>	AGG	<u>R Arg</u>	<u>G</u>
<u>G</u>	GUU	<u>V Val</u>	GCU	<u>A Ala</u>	GAU	<u>D Asp</u>	GGU	<u>G Gly</u>	<u>U</u>
	GUC	<u>V Val</u>	GCC	<u>A Ala</u>	GAC	<u>D Asp</u>	GGC	<u>G Gly</u>	<u>C</u>
	GUA	<u>V Val</u>	GCA	<u>A Ala</u>	GAA	<u>E Glu</u>	GGA	<u>G Gly</u>	<u>A</u>
	GUG	<u>V Val</u>	GCG	<u>A Ala</u>	GAG	<u>E Glu</u>	GGG	<u>G Gly</u>	<u>G</u>

Tables de Mac Grady

<i>2 tubes par dilution</i>				<i>3 tubes par dilution</i>			
Nombre caractéristique	NPP	Nombre caractéristique	NPP	Nombre caractéristique	NPP	Nombre caractéristique	NPP
000	0.0	000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.5	001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.5	010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.9	011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.9	020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.6	100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	1.2	101	0.7	221	3.0	321	15.0
110	1.3	102	1.1	222	3.5	322	20.0
111	2.0	110	0.7	223	4.0	323	30.0
120	2.0	111	1.1	230	3.0	330	25.0
121	3.0	120	1.1	231	3.5	331	45.0
200	2.5	121	1.5	232	4.0	332	110.0
201	5.0	130	1.6	300	2.5	333	140.0
210	6.0	200	0.9	301	4.0		
211	13.0						
212	20.0						
220	25.0						
221	70.0						
222	110.0						

Sommaire

Chapitre 1 : Microbiologie générale		Pages	
Exercice N°	Sujets des exercices	Q	R
Exercice N° 01	Croissance et nutrition microbienne	07	81
Exercice N° 02	Paramètres influant la croissance « Température »	07	81
Exercice N° 03	Paramètres influant la croissance « Température »	08	82
Exercice N° 04	Paramètres influant la croissance « pH, NaCl, pression »	09	83
Exercice N° 05	Paramètres influant la croissance « courbe de la croissance »	10	83
Exercice N° 06	Dilutions	11	85
Exercice N° 07	Dilutions	11	85
Exercice N° 08	Dilutions	12	85
Exercice N° 09	Dilutions et dénombrement	13	86
Exercice N° 10	Dilutions et dénombrement	13	88
Exercice N° 11	Stérilisations	14	89
Exercice N° 12	Stérilisations	15	89
Exercice N° 13	Pasteurisation	15	90
Exercice N° 14	Etude macroscopique et coloration de Gram	16	92
Exercice N° 15	Différences structuraux entre Gram positifs et Gram négatifs	17	92
Exercice N° 16	Milieux de culture	18	95
Exercice N° 17	Milieux de culture	19	96
Exercice N° 18	Terminologie	19	96
Exercice N° 19	Techniques d'ensemencement et de dénombrement	19	97
Exercice N° 20	Dénombrement par la cellule de Thoma	20	97
Exercice N° 21	Dénombrement NPP	20	98
Exercice N° 22	Densité optique et dénombrement	21	101
Exercice N° 23	Microorganismes eucaryotes et procaryotes	23	103
Exercice N° 24	Structure bactérienne	24	103
Exercice N° 25	Différents formes et modes de regroupement des bactéries	25	106
Exercice N° 26	Temps de génération	26	108
Exercice N° 27	Type respiratoire	27	109
Exercice N° 28	Sporulation	28	110
Exercice N° 29	Biofilm	28	112
Exercice N° 30	Les bactéries pathogènes à intérêt médicale	29	113
Exercice N° 31	Virologie	31	115
Exercice N° 32	Mycologie	32	116
Chapitre 2 : Agents antimicrobiens			
Exercice N° 01	Concentration minimale inhibitrice	37	119
Exercice N° 02	Préparation d'une concentration d'un antibiotique	38	119
Exercice N° 03	Préparation d'une concentration d'un antibiotique	38	120

Exercice N° 04	Principes de l'antibiogramme	38	121
Exercice N° 05	Les cibles des antibiotiques	39	123
Chapitre 3 : Biochimie microbienne et identification			
Exercice N° 01	type trophique	43	125
Exercice N° 02	L'étude de la Voie de dégradation de glucose « MEVAG »	43	125
Exercice N° 03	test d'oxydase, de catalase et identification API	44	126
Exercice N° 04	Milieux TSI et Kligler	45	130
Exercice N° 05	Milieu Kligler	45	131
Exercice N° 06	Métabolisme d'esculine	47	133
Exercice N° 07	IMVIC (Indode/ Méthyle rouge/ Voges Proskauer/Citrate)	48	134
Exercice N° 08	Métabolisme de l'urée et des acides aminés	49	137
Exercice N° 09	Métabolisme des nitrates	50	139
Exercice N° 10	β -galactosidase « test ONPG »	51	140
Exercice N° 11	Métabolisme protéique « milieu Moeller ou FALKOW »	51	142
Exercice N° 12	Oxydoréduction et transport membranaire	53	143
Exercice N° 13	Fermentations	54	145
Exercice N° 14	Galerie classique, API, automates et utilisation de programmes	56	147
Exercice N° 15	MALDI-TOF MS	59	151
Chapitre 04 : Génétique bactérienne et biologie moléculaire			
Exercice N° 01	la transformation	63	155
Exercice N° 02	la conjugaison	64	156
Exercice N° 03	Les mutations	65	158
Exercice N° 04	Les mutations	66	160
Exercice N° 05	Les transposons et les intégrons	68	162
Exercice N° 06	La composition en bases Guanine et cytosine (CG%)	70	163
Exercice N° 07	Bactériophages et transduction	72	166
Exercice N° 08	Régulation « Opéron lactose »	73	167
Exercice N° 09	PCR	76	171
Exercice N° 10	Techniques moléculaires pour la comparaison des souches	77	173
Q : Questions ; R : Réponses			
Référence :			177
Annexes :			187
Sommaire :			191

Achevé d'imprimer sur les presses de

<p>L'OFFICE DES PUBLICATIONS UNIVERSITAIRES 1, Place centrale- Ben Aknoun- ALGER</p>
