

<b>2019</b>	Séquence – B
<b>TP – 03</b>	<b>Compter des cellules</b>
<b>Jour 01</b>	

<p><b>Introduction</b></p> <p>Dans les processus biotechnologiques, le contrôle strict des conditions expérimentales est un gage essentiel de qualité pour le résultat à atteindre. Par exemple, lorsque l'on emploie des microorganismes, l'adéquation de la souche choisie avec l'objectif biotechnologique visé est primordiale. Mais également, la quantité de microorganismes qui sont impliqués dans le processus biotechnologique : il faut s'assurer qu'il y a suffisamment de cellules pour réaliser la tâche biotechnologique. Et que ces cellules sont en pleine forme. L'accumulation de tous ces « petits défauts » peut conduire à un échec du processus biotechnologique ou à l'altération du résultat.</p>	
<p><b>Problématique</b></p> <p><i>Comment compter des cellules ? Comment s'assurer que les cellules sont vivantes ?</i>  <i>Question subsidiaire : combien pèse une cellule ?</i></p>	
<p><b>Objectifs méthodologiques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisation d'une cellule de comptage ;</li> <li>• Réalisation de dilutions en cascades ;</li> <li>• Réalisation d'un ensemencement en surface ;</li> <li>• Travailler dans des conditions aseptiques ;</li> <li>• Gérer les déchets.</li> </ul>	<p><b>Connaissances</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La cellule de Malassez ;</li> <li>• La viabilité cellulaire ;</li> <li>• Les bases de métrologie.</li> </ul>
<p><b>Points de vigilance</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne pas respecter l'organisation du poste de microbiologie ;</li> <li>• Ne pas respecter l'asepsie ;</li> <li>• Ne pas respecter les protocoles fournis ;</li> <li>• Ne pas respecter la gestion des déchets ;</li> <li>• Difficulté de calculs.</li> </ul>	<p><b>Livrables – Evaluation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• J1 – Consigne 03</li> <li>• J4 – Consigne 01</li> </ul>
<p><b>Organisation du travail</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Travail individuel ;</li> <li>• Réaliser la totalité du travail dans le temps imparti.</li> </ul>	

## Consigne 1 – Challenge

1. **Proposer** une méthode permettant de déterminer la masse d'un grain de riz, sans utiliser d'appareil pour peser ;
2. A partir de la réponse obtenue à la question précédente, **proposer** une méthode permettant de déterminer la masse d'une cellule, une levure en l'occurrence ;
3. **Indiquer** quelle est la principale difficulté de la méthode ;

2

## Consigne 2 – Bases métrologiques pour le laboratoire

4. **Lire** le cours Met01 ;
5. **Faire** les exercices d'application du cours Met01 ;

## Consigne 3 – Détermination de la masse d'une cellule

*Une suspension de levure a été préparée de la façon suivante : 1 g de cellules ont été dilués dans 100 mL d'eau physiologique (eau avec du sel). Cette suspension a été diluée 1 000 000 de fois = on a mis cette solution dans un volume 1 million de fois plus grand.*

6. **Lire** la fiche technique FT02-DEN01 ;
7. **Indiquer** en quoi cette méthode permettra de déterminer la masse d'une cellule ;
8. **Etablir** l'équation aux grandeurs, unités et valeurs numériques permettant de déterminer la concentration massique en cellules dans la solution, en gramme par litre, **avant dilution** ;
9. **Etablir** l'équation aux grandeurs, unités et valeurs numériques permettant de déterminer la concentration massique en cellules dans la solution, en gramme par litre, **après dilution** ;
10. **Mettre** en œuvre la technique de dénombrement de cellules, sur la suspension de levures fournie, en s'aidant de la fiche technique FT02-DEN01 ;
11. **Présenter** le résultat de comptage sous une forme adéquate ;
12. **Déterminer** le nombre de cellules dans la suspension de levure non-diluée, exprimée en cellules par mL, en s'aidant de la fiche technique FT02-DEN01 ;
13. **Etablir** l'équation aux grandeurs, unités et valeurs numériques permettant de déterminer la masse d'une cellule.

<b>2019</b>	Séquence – B
<b>TP – 03</b>	<b>Compter des cellules</b>
Jour 02	

## Consigne 1 – Dilution d'une suspension de levure

3

1. **Lire** la fiche technique FT00-PREP03 ;
2. **Proposer** une méthode permettant de diluer 1 000 000 de fois une suspension de levure ;
3. **Lister** le matériel nécessaire (volume final souhaité de 5 mL) ;
4. **Réaliser** une dilution de la suspension de levure fournie, au 1 millionième, dans un volume final de 5 mL.

*Vous obtenez la solution Sdil ;*

5. **Réaliser** la coloration vitale sur la solution Sdil, selon les consignes indiquées dans la fiche technique FT02-DEN06 ;
6. **Réaliser** le comptage des levures mortes et vivantes ;
7. **Présenter** le résultat de comptage sous une forme adéquate ;
8. **Présenter** les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques permettant de déterminer le taux (pourcentage) de cellules vivantes dans la population de levures ;
9. **Présenter** les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques permettant de déterminer la concentration de cellules vivantes dans la solution initiale non-diluée de levure ;

## Consigne 2 – Evaluation de l'efficacité d'un désinfectant

10. **Réaliser** le protocole suivant :

- a. Prélever 1 mL de désinfectant dans un tube à hémolyse ;

*Paillasse côté-fenêtre = utiliser le désinfectant « A » ;*

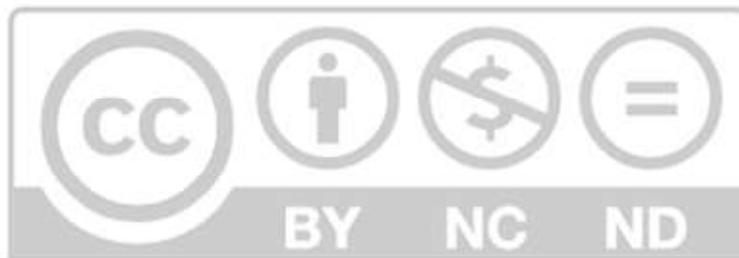
*Paillasse côté-couloir = utiliser le désinfectant « B ».*

- b. Ajouter 1 mL de la suspension Sdil fraîchement homogénéisée ;
- c. Laisser agir 5 minutes au minimum ;
- d. Réaliser une coloration vitale ;
- e. Réaliser un comptage des cellules mortes et vivantes

11. **Présenter** les résultats de comptage sous une forme adéquate ;
12. **Utiliser** les informations de la question 8 pour déterminer le taux de survie des levures après traitement par le désinfectant ;
13. **Mutualiser** les résultats au tableau ;
14. **Comparer** l'efficacité des traitements par les désinfectants.

Bertrand Faurie – 2020

*Bioscience.fun*



<b>2019</b>	Séquence – B
<b>TP – 03</b>	<b>Compter des cellules</b>
Jour 03	

### Consigne 1 – Estimation de la concentration en levure

1. **Réaliser** le comptage des cellules de levure (solution L) sur un hématimètre ;
2. **Présenter** le résultat de comptage sous une forme adéquate ;
3. **Déterminer** le nombre de cellules dans la suspension de levure, en s'aidant de la fiche technique FT02-DEN01. **Présenter** les équations aux grandeurs, unités et valeurs numériques ;
4. **Nettoyer** l'hématimètre au désinfectant ;

### Consigne 2 – Comptage sur boîte

5. **Diluer** la suspension de levure afin d'obtenir une concentration de 200 cellules par mL. Vous obtenez  $L_{dil}$  ;
6. **Réaliser** un ensemencement en surface de la solution  $L_{dil}$ , en s'aidant de la fiche technique FT02-DEN03 (partie C uniquement) ;

### Consigne 3 – Estimation de la concentration en bactérie

7. **Réaliser** le comptage des cellules de bactéries (solution B) sur un hématimètre ;
8. **Présenter** le résultat de comptage sous une forme adéquate ;
9. **Déterminer** le nombre de cellules dans la suspension de bactérie, en s'aidant de la fiche technique FT02-DEN01. **Présenter** les équations aux grandeurs, unités et valeurs numériques ;
10. **Commenter** le résultat obtenu ;

### Consigne 4 – Comptage sur boîte

11. **Réaliser** un ensemencement en surface de la solution B, en s'aidant de la fiche technique FT02-DEN03 (partie C uniquement).

<b>2019</b>	Séquence – B
<b>TP – 03</b>	<b>Compter des cellules</b>
Jour 04	

### Consigne 1 – Analyse des résultats du jour 03

1. **Réaliser** le comptage des cellules sur boîte ;
2. **Présenter** les résultats de façon adéquate ;
3. **Calculer** la concentration des suspensions B et L (non-diluée), en UFC par mL ;
4. **Comparer** les valeurs obtenues à celles déterminées par comptage sur hématimètre ;
5. **Conclure.**

Bertrand Faurie – 2020

*Bioscience.fun*

