

Andrew Tolonen (atolonen@gmail.com)
13 février 2013

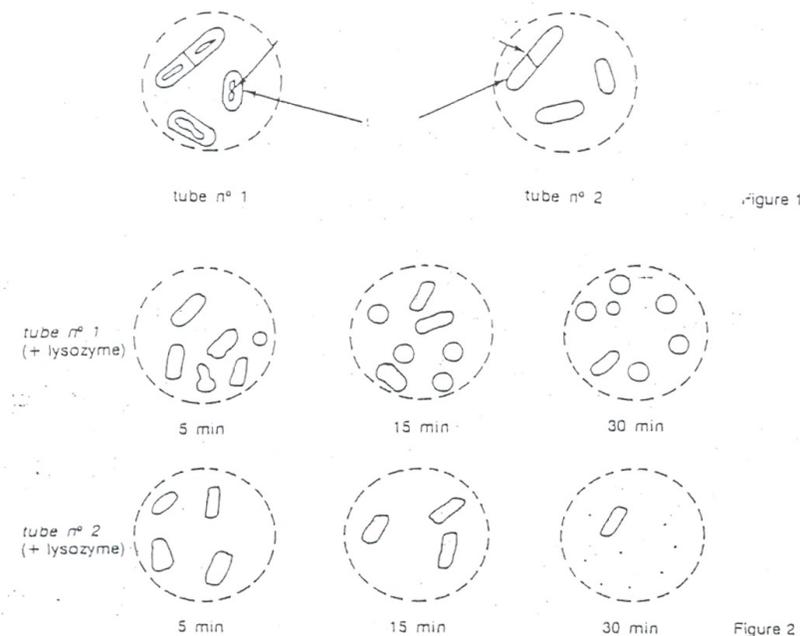
L2 Microbiologie TD3

Exercice 1

On centrifuge 25-ml d'une culture de *Bacillus megaterium* prélevée en fin de phase exponentielle de croissance. Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 20 ml de tampon phosphate 0,04 M (mol l^{-1}) pH 7,2 de façon à laver les cellules bactériennes. Après avoir de nouveau centrifugé, décanté et recommencé deux fois le lavage, on remet le culot de cellules bactériennes en suspension dans 2,5 ml de tampon phosphate pH 7,2. Après avoir lavé les cellulose, on impose un choc osmotique:

- A 1 ml de la suspension cellulaire, on ajoute 1 ml de solution de 2M saccharose (1 M concentration finale) à tube n° 1.

- A 1 ml de la suspension cellulaire, on ajoute 1 ml d'eau distillée à tube n° 2.
Après homogénéisation, les deux tubes sont mis à incuber pendant 2mn à 37°C. Les états frais réalisés sur les deux tubes sont schématisés sur la figure 1.



a- Comparer les résultats des deux observations microscopiques.

Tube 1: Dans la presense d'une forte concentration du sucre, voit la rétraction de la membrane à cause de la fuite de l'eau. La cellule devient déshydraté.

Tube 2: Dans une solution hypotonique, on voit l'expansion de la membrane contre la paroi.

b- Les justifier par les conditions expérimentales.

On ajoute dans les deux suspensions précédentes (tubes n° 1 et 2) 0,2ml de lysozyme. On examine au microscope optique avec l'objectif à immersion les deux suspensions après 5, 15 et 30 mn d'incubation à 37°C.

Les observations microscopiques sont schématisées dans la Figure 2

a- Que deviennent les cellules bactériennes dans les tubes n° 1 et n° 2

Tube 1: Après la destruction de la paroi, on voit la formation des protoplasts sphérique.

Tube 2: Sans le soutien de la paroi, on voit l'explosion des cellules.

b- Préciser le rôle du lysozyme:

Le lysozyme attaque les peptidoglycanes constituant la paroi des bactéries. En effet, le lysozyme hydrolyse les liaisons ($\beta 1 \rightarrow 4$ glucosidique) entre l'acide N-acétyl-muramique et le N-acétyl-glucosamine.

c- Les mycoplasmes ne sont pas sensibles au lysozyme. Pourquoi ?

Les mycoplasmes sont un genre des petites bactéries qui manquent un paroi de peptidoglycane. Par conséquent, ils ne sont pas affectés par des antibiotiques bêta-lactamines et lysozyme qui ciblent la peptidoglycane.

Exercice 2

Haemophilus influenzae, petit bacille à Gram-, et *Streptococcus pneumoniae*, diplocoque à Gram+, présentent quelques analogies et différences de structure. Ces deux espèces possèdent fréquemment une capsule.

1. La capsule

a- En donner la définition et la situer dans la cellule bactérienne. Préciser la nature chimique de la capsule de *Streptococcus pneumoniae*

La capsule bactérienne est une couche de polysaccharide à l'extérieur de la cellule.

b- Pour chacune des deux espèces on peut définir plusieurs sérotypes. Pourquoi?

Un sérotype est un groupe de microorganismes qui sont reconnu par les meme antigens. Il existe plusieurs serotypes à cause des différences dans la structure de la capsule.

c- Les bactéries capsulées sont très virulentes. Pourquoi ?

La capsule est un type de camouflage qui permet la cellule d'éviter la phagocytose.

d- Les capsules sont visualisées par :

e- Coloration de Gram

- f- Coloration de Ziehl-Neelsen
- g- Bleu de Méthylène
- h- Coloration négative**

Capsules bactériennes sont non ioniques. Donc, ni les colorants basique ni ceux acide adhèrent à leur surface. La meilleure façon de les visualiser est de colorer le fond à l'aide d'un colorant acide et à colorer la cellule elle-même en utilisant un colorant basique..

2. La paroi

a- La couche S: Diverses bactéries (gram positif et gram négatif) sont couverts par une couche S, composé d'une seule type de protéine. La couche S est la zone d'interaction avec leur environnement extérieur et elle stabilise la cellule. Une cellule sphérique d'une diamètre de 1 micromter pourrait etre couvert d'une couche S de 100 nm de diamètre. Dans cet exemple, quel est le pourcentage du volume de la cellule occupée par la couche S?

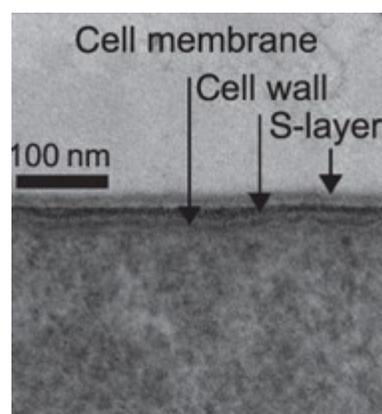
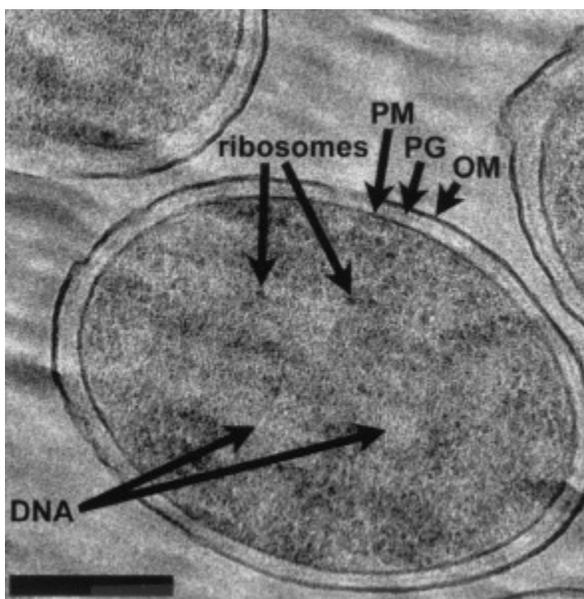
Le volume d'une sphère: $\frac{4}{3} \cdot r^3$

$$\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 0.5^3 = 0.52$$

$$\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 400^3 = 0.26$$

la souche S représente 500% du volume de la cellule!

b- Les photos de la paroi de chacune de ces bactéries prises au microscope électronique sont reproduites.



I. A quelles bactéries (gram négatif ou gram positif) attribuer ces deux photos ?

Exercice 3

Lequel des énoncés suivants est vrai concernant la paroi des bactéries à Gram-négatif

- a- Ce type de bactéries est moins sensible à la pénicilline
- b- Elle contient des acides teichoïques
- c- Elle contient une épaisse couche de peptidoglycane
- d- Toutes ces réponses

Exercice 4

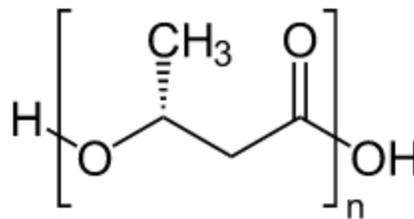
Nommez quatre inclusions intra-cytoplasmiques retrouvées chez les procaryotes. Expliquez dans quelles conditions elles sont formées ? (A moins qu'ils aient un caractère permanent) sous quelle forme on les retrouve, et le rôle qu'elles semblent jouer dans la cellule.

Polyphosphates : inclusion de type inorganique. Forment des granules qu'on peut colorer avec du bleu de méthylène ou de toluidine. Réserve de phosphore.

Granules de soufre: Certaines bactéries (bactéries vertes de soufre) emmagasinent du S comme source des électrons.

Glycogène (polymère de glucose alpha-1-4 et des chaînes latérales fixées par des liaisons alpha-1-6) qu'on peut colorer avec une solution d'iode. Réserve de carbone et d'énergie pour les biosynthèse et la production d'énergie.

Les Poly-hydroxybutyrates: Polymère linéaire de hydroxybutyrate servant de réserves de carbone et d'énergie chez de nombreuses bactéries.



Le carboxysome : Formes d'inclusions de Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase: forme polyédrique, d'environ 100nm de diamètre. Ils peuvent servir à la fixation du CO₂. Se rencontrent chez les cyanobactéries, les bactéries nitrifiantes et les thiobacilles.

Exercice 5

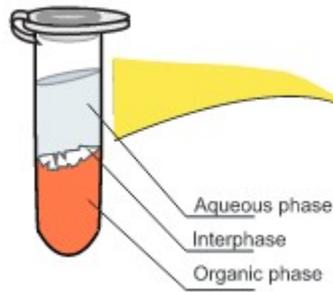
Décrivez les différentes étapes à suivre pour isoler les ARN à partir d'une culture fraîche de *E. coli*?

1 La difficulté de travailler avec l'ARN est que les enzymes qui dégradent l'ARN (les ARNase) sont omniprésents, même sur les doigts.

2 Lyse des cellules (traitement lysozyme, sonication, billes).

3 Phenol-chloroform extraction: les acides nucléiques (ARN, ADN) partitions dans la phase

aqueuse, tandis que les partitions de protéines dans la phase organique.



4 Traitement ADNase

Exercice 6

Quelle est la principale différence entre l'endospore d'une bactérie et la spore d'un mycète?

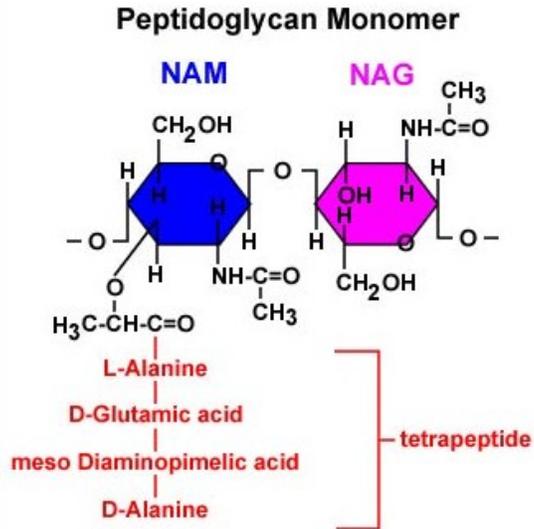
Le but principal de spores bactériennes est de protéger les cellules afin qu'ils puissent survivre dans les conditions difficiles.

Les spores d'un mycète permettent la reproduction sexuelle. La levure (*Saccharomyces cerevisiae*) existe dans 2 formes: haploïde et diploïde. Les cellules haploïdes divisent par la mitose. Les cellules diploïdes divisent aussi par la mitose, mais dans les conditions de stress peuvent sporuler, entrer la méiose, et produire 4 spores haploïdes, qui peuvent se reproduire sexuellement. Cela crée la diversité génétique par la recombinaison.

#####

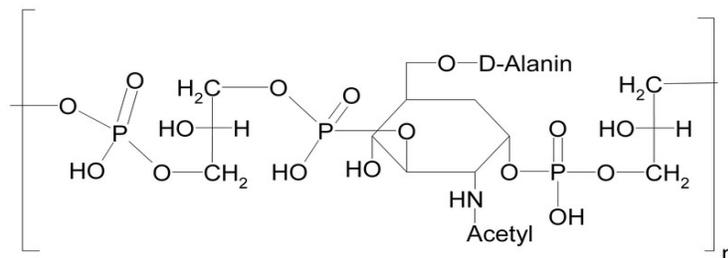
Les Informations Générales

La structure de la peptidoglycane: La paroi bactérienne se compose de la peptidoglycane, un polymère des chaînes de N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM) avec les courtes sous-chaînes d'acides aminés qui relient les chaînes dans une lattice.



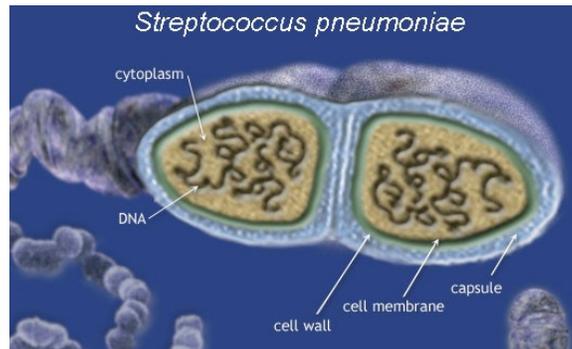
Le lysozyme: une enzyme qui hydrolyse les peptidoglycanes constituant la paroi des bactéries. En effet, le lysozyme hydrolyse les liaisons covalentes ($\beta 1 \rightarrow 4$ glucosidique) entre l'acide N-acétyl-muramique (NAM) et le N-acétyl-glucosamine (NAG).

Les acides teichoïques: Un composé de phosphate de glycérol et un sucre pentose avec une liaison phosphodiester. Acides téchoïques se trouvent à l'intérieur de la paroi cellulaire des bactéries gram-positives. La fonction principale des acides téchoïques est de donner de la rigidité à la paroi cellulaire, en attirant des cations tels que le magnésium et le sodium.

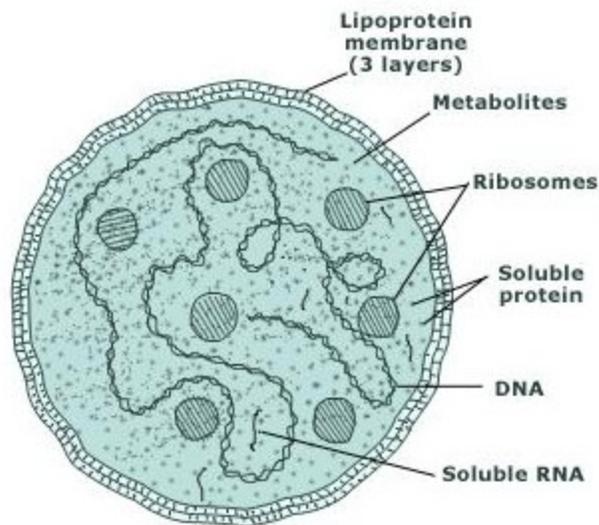


La capsule bactérienne: une couche de polysaccharide à l'extérieur de la cellule. La

capsule protège la cellule de l'engloutissement par les macrophages et de la dessiccation. La capsule exclut également les virus bactériens et les plus hydrophobes des matériaux toxiques tels que les détergents.

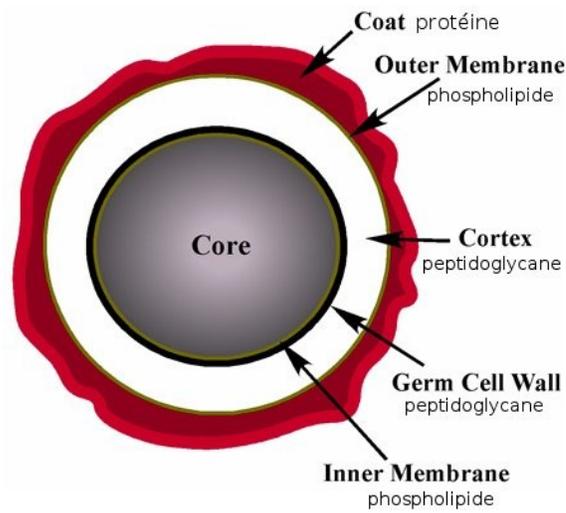


Mycoplasma: la plus petite cellule connue (0,1 micron), elle manque un paroi de peptidoglycane



Les endospores bactériennes: une structure qui se forme lorsque les conditions

environnementales sont défavorables. Ils survivent sans nutriments et sont résistants aux rayons ultraviolets, la dessiccation, à haute température, et désinfectants chimiques.



micro.cornell.edu

Cycle de vie de la levure: La levure (*Saccharomyces cerevisiae*) existe dans 2 formes: haploïde et diploïde. Les cellules haploïdes divisent par la mitose. Les cellules diploïdes divisent aussi par la mitose, mais dans les conditions de stress peuvent sporuler, entrer la méiose, et produire 4 spores haploïdes, qui peuvent se reproduire sexuellement. Cela crée la diversité génétique par la recombinaison.

