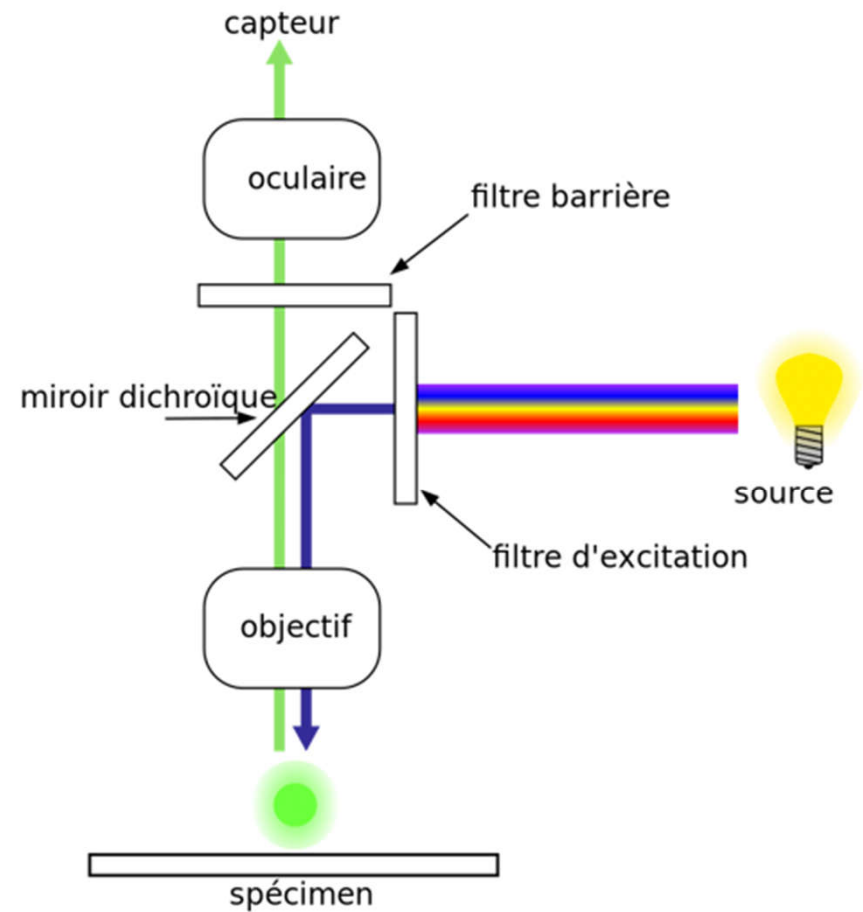
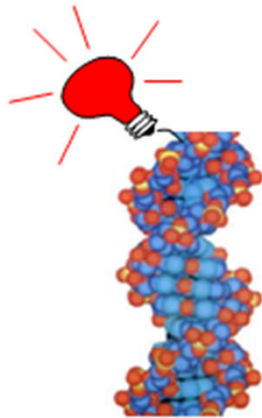


Dénombrement avec le microscope à épifluorescence

- C'est un comptage au microscope à fluorescence après marquages des cellules par un colorant de l'ADN (fluorochrome).

Exemple de colorants:

- **Acridine orange**,
- **DAPI** (4,6-diamidino-2-phenylindole
- **SYBRTM Green**,
- **Picogreen**.



3- Dénombrement au compteur à particules

- ▶ On met les microorganismes en suspension dans une solution unique et on fait passer la suspension à travers un orifice à la sortie duquel il y a deux électrodes qui se font face. Il y a une variation de conductivité quand la cellule passe entre ces deux électrodes.
- ▶ Chaque variation de conductivité est comptée comme une cellule ; toutes les cellules sont ainsi comptées.



2 compteurs de particules

- **Avantages:**

- ☐ Facile et rapide à utiliser.

- ☐ Utile pour des micro-organismes de grande taille ou des cellules sanguines.

- **Désavantages:**

- ☐ Ne peut pas distinguer entre des cellules vivantes ou mortes.

4- Dénombrement au cytométrie en flux

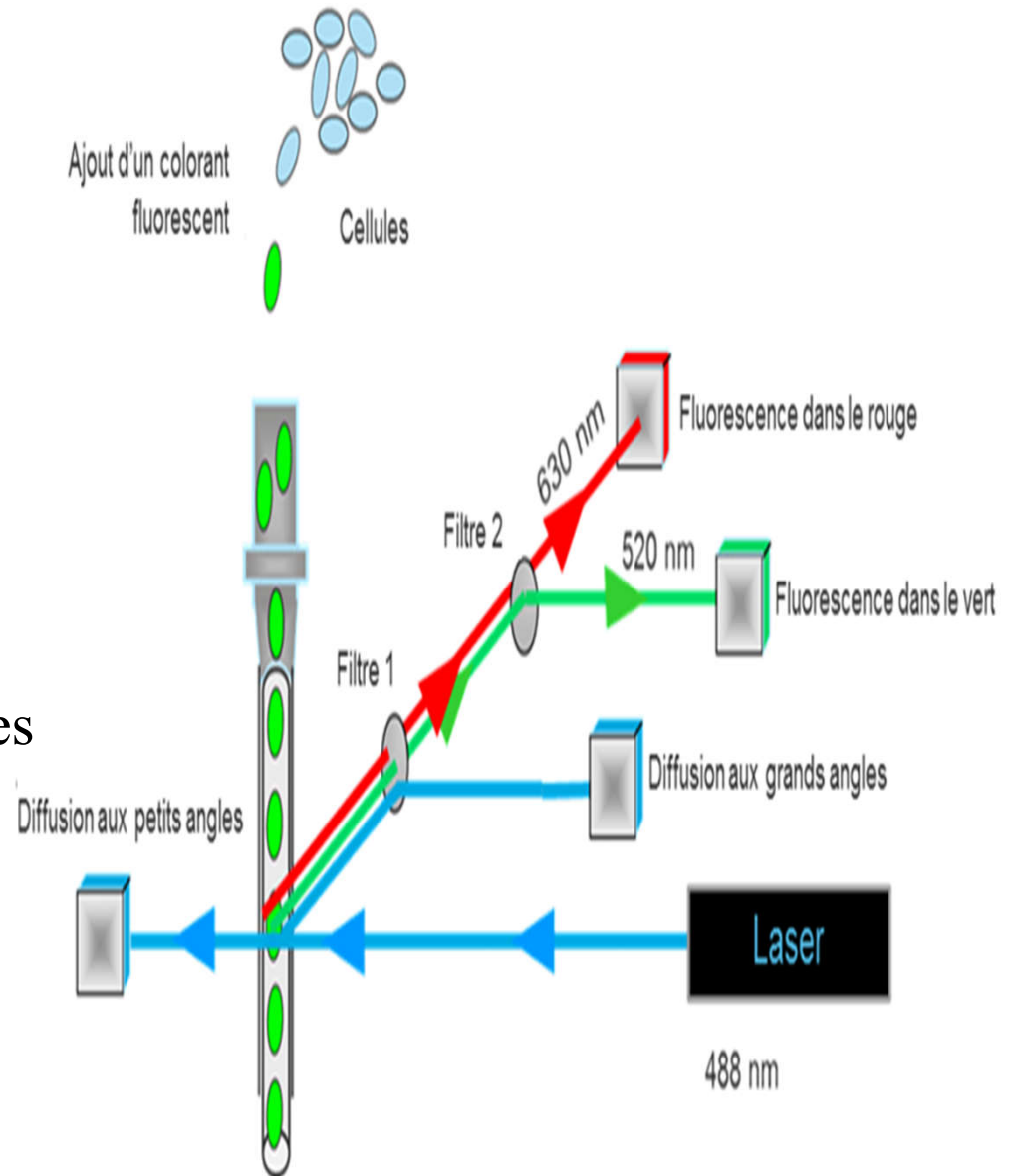
Cytométrie en flux :

même principe que le compteur à particule à la différence que le comptage est effectué lorsque les cellules passent devant un faisceau laser et qu'il y a réémission de lumière fluorescente ou diffraction créant une diffusion de la lumière reçue.

Méthode plutôt utilisée pour faire du tri cellulaire selon plusieurs critères.

Il y a plusieurs étapes :

- Incubation des cellules avec un marqueur ou un colorant
- Les cellules passent dans un faisceau laser.
- Elles diffractent la lumière et émettent une fluorescence.
- Les données lumineuses sont converties en données numériques et analysées par un ordinateur, Il permet de compter et même de trier les cellules.



- <https://www.youtube.com/watch?v=-HwG98CUpUc>
: microscope à fluorescence
- <https://www.youtube.com/watch?v=oaU1ZO41dpY> :
compteur à particules
- <https://www.youtube.com/watch?v=wtgIemnzUOA> :
cytométrie en flux

II- Dénombrement en milieu solide et liquide

1- En milieu liquide

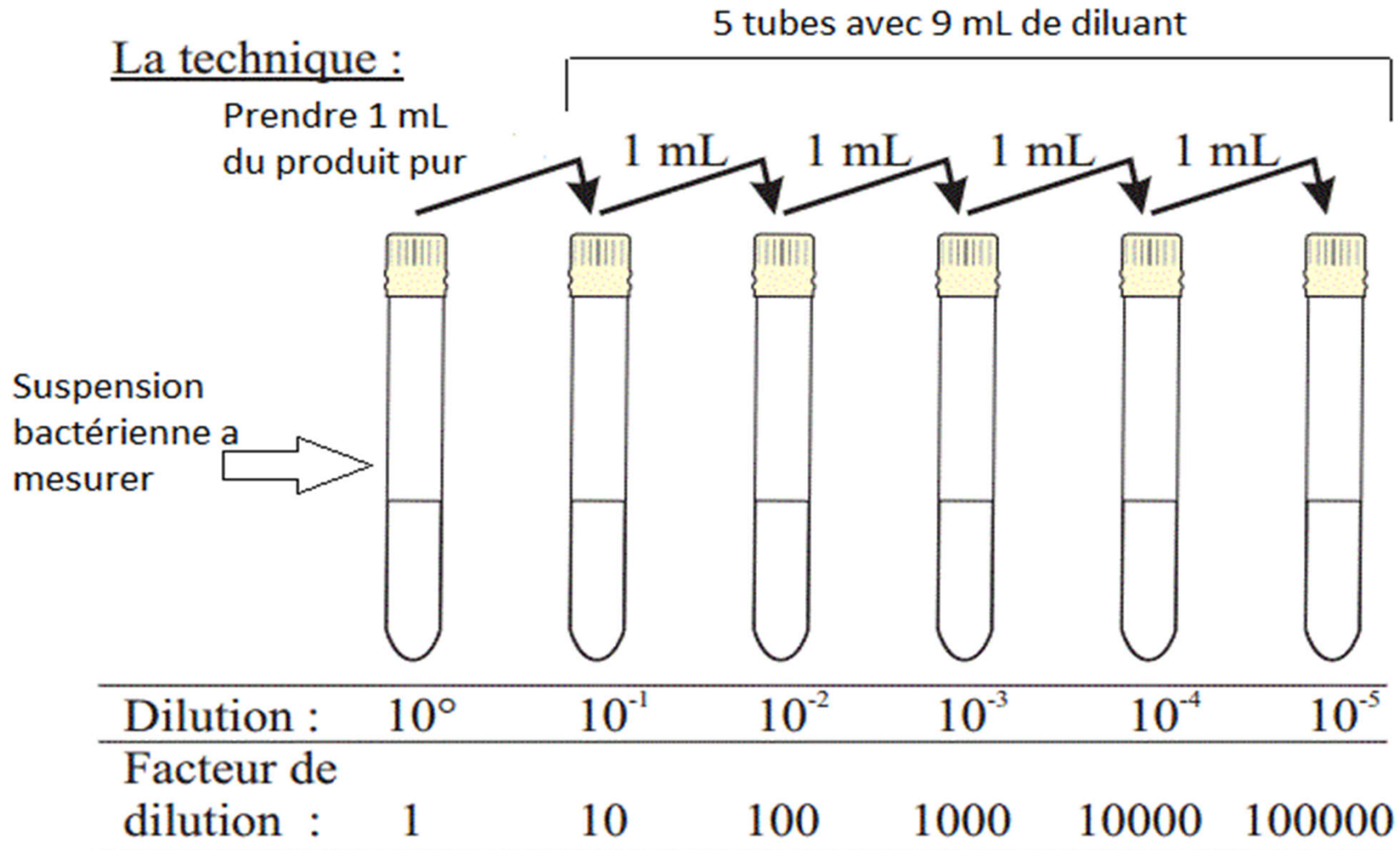
Principe général

- La seule manière de savoir si un micro-organisme est présent ou non dans l'inoculum par les techniques en milieu liquide sera de le mettre en évidence par un de ses caractères : trouble et production de gaz.
- Un tube stérile estensemencé par un volume d'inoculum (produit pur ou dilution).
- Si l'un de ses caractères apparaît, le résultat sera **positif**.
- L'absence de l'un de ses caractères, le résultat sera **négatif**.

Dilution de l'échantillon

1 mL est versé dans 9 mL ($d = 1/10$). La solution obtenue est à nouveau diluée au 1/10, etc.

La technique :



Résultat positif

Il y a au moins 1 micro-organisme recherché dans le volume initial d'inoculum (produit pur ou dilution).

Résultat négatif

Il y a moins de 1 micro-organisme recherché dans le volume initial d'inoculum (produit pur ou dilution).

Interprétation : cas d'un tube par dilution

Résultats positifs et négatifs observés

Volume de l'inoculum : 1 mL	Produit pur 10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Résultat	+	+	+	+	-	-	-

- Au moins 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution 10^{-3} .
Au moins 10^3 micro-organismes dans 1 mL de produit pur.
- Moins de 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution 10^{-4} .
Moins de 10^4 micro-organismes dans 1 mL de produit pur.

Conclusion :

Concentration en micro-organismes dans le produit pur comprise entre 10^3 et 10^4 microorganismes par mL.

$$10^3 < [N] < 10^4 \text{ micro-organismes par mL}$$

Que des résultats positifs observés

Volume de l'inoculum : 1 mL	Produit pur 10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Résultat	+	+	+	+	+	+	+

- Au moins 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution 10^{-6} .
- Au moins 10^6 micro-organismes dans 1 mL de produit pur

Conclusion :

$[N] \geq 10^6$ micro-organismes par mL

Que des résultats négatifs observés

Volume de l'inoculum : 1 mL	Produit pur 10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Résultat	-	-	-	-	-	-	-

- Moins de 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution 10^0 .
- Moins de 1 micro-organisme dans 1 mL de produit pur.

Conclusion :

$[N] < 1$ micro-organismes par mL