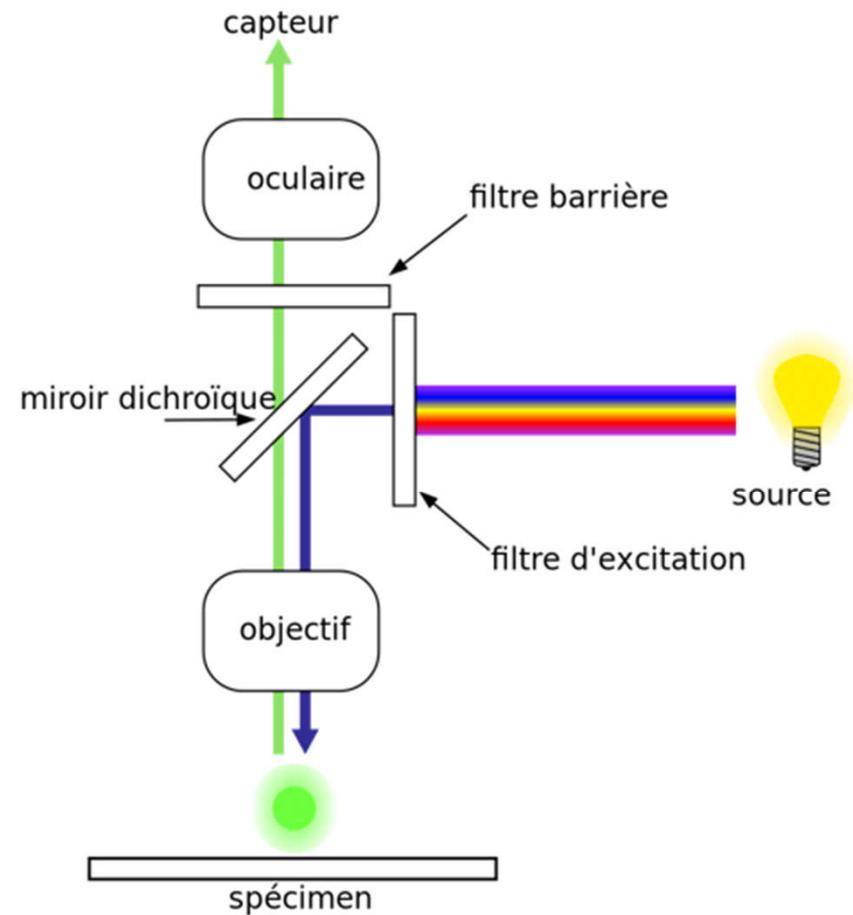
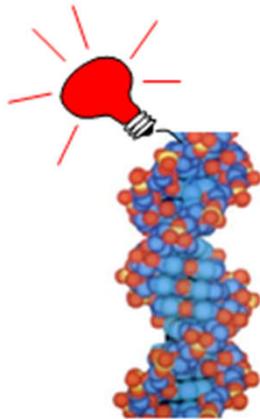


## Dénombrement avec le microscope à épifluorescence

- 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-phénylindole)
- **SYBR™ 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

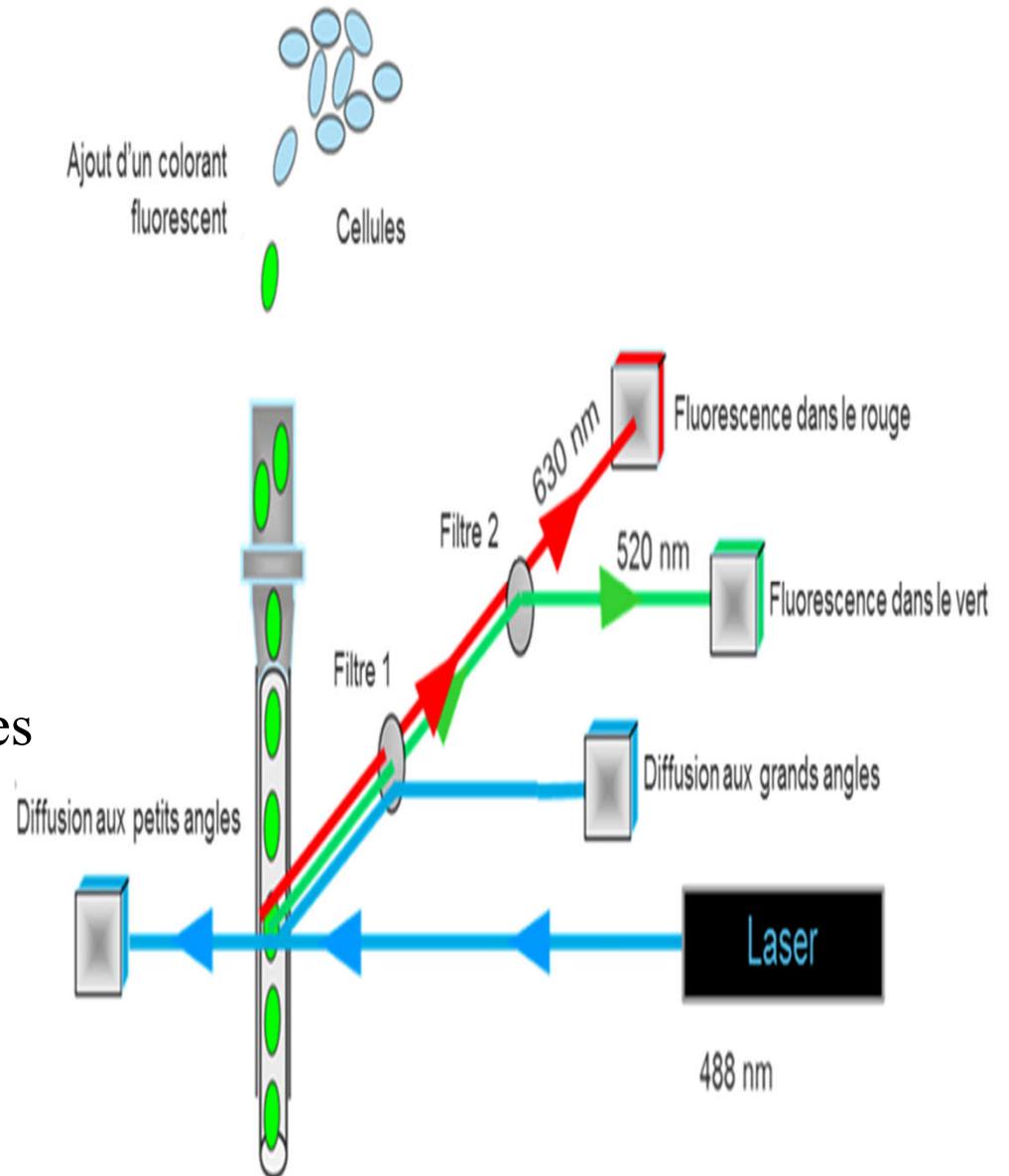
### Cytométrie en flux :

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.**

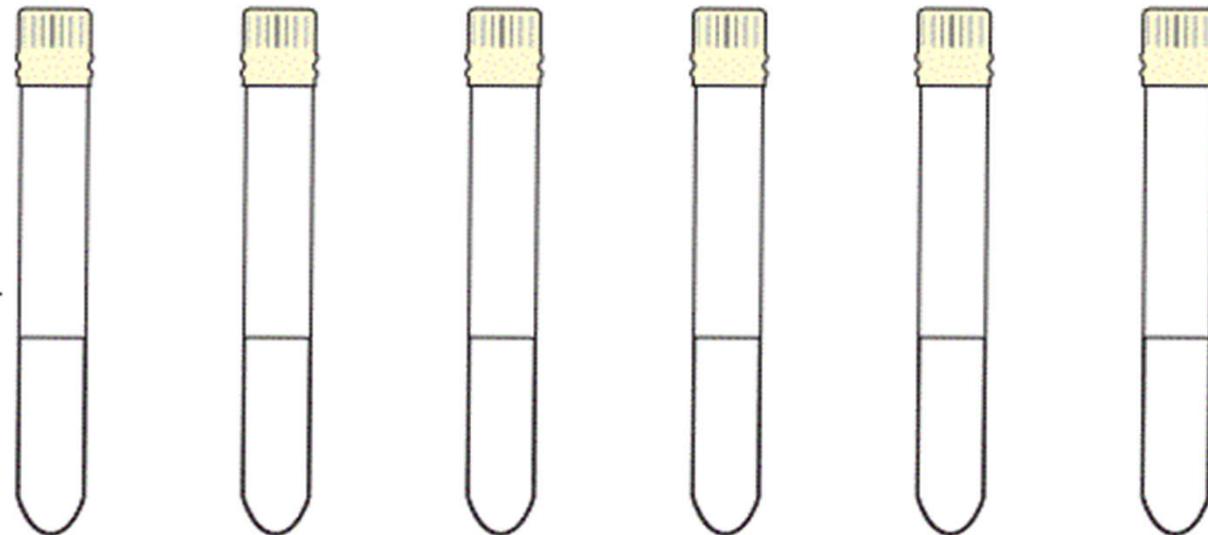
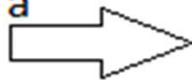
### La technique :

Prendre 1 mL  
du produit pur

5 tubes avec 9 mL de diluant

1 mL 1 mL 1 mL 1 mL

Suspension  
bactérienne à  
mesurer



Dilution :	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Facteur de dilution :	1	10	100	1000	10000	100000

### *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