



Laboratoire SVT- Lycée de L'Elorn

**PROJET LEVURE – LABO SVT – LYCEE DE L'ELORN – JUIN 2016**

La levure est un champignon microscopique unicellulaire présent naturellement sur les grains de raisins, quotidiennement utilisés pour ses propriétés fermentaires en boulangeries et fréquemment utilisé dans les laboratoires de lycée et de recherche.

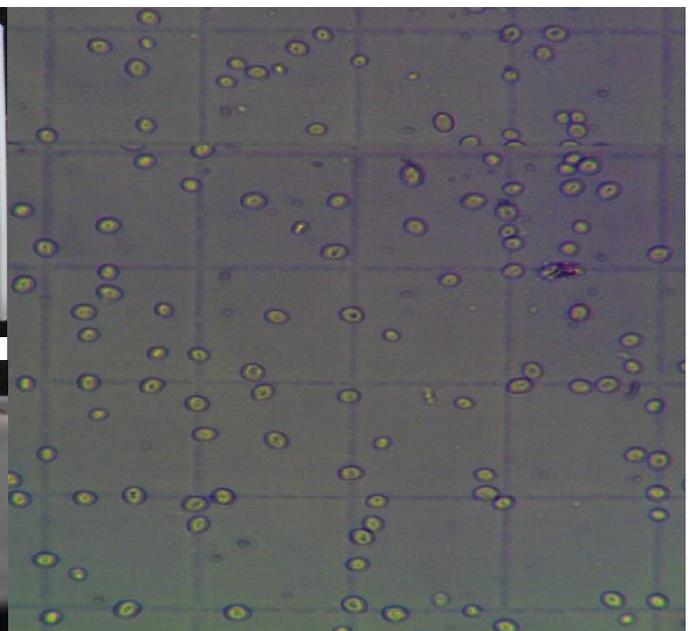
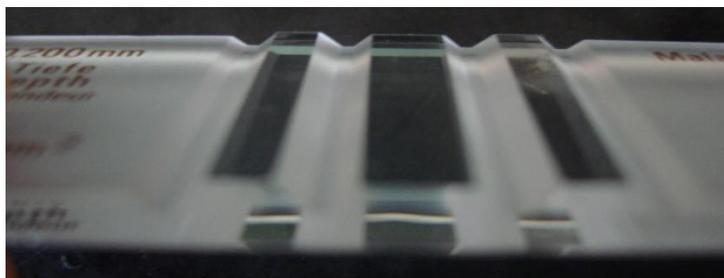
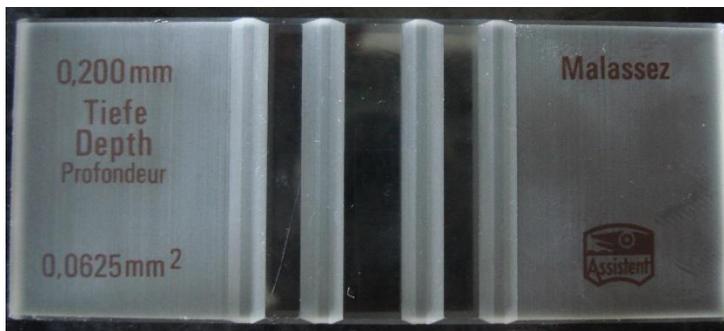
**On cherche à obtenir une gamme « type » de concentration de levures de référence à laquelle on pourra comparer d'autres suspensions expérimentales**

**OBJECTIF** : réaliser une gamme de concentration massique de levure, déterminer la concentration cellulaire des suspensions sur lame de Malassez et sous microscope puis déterminer la concentration cellulaire avec le cytomètre sous la direction de M. Christophe Lambert, Ingénieur Chercheur de l'IUEM de Brest

**1 – Détermination de la concentration de départ de la suspension mère**

**Lame de Malassez**

**Grande case de 20 petites cases**



**1<sup>ère</sup> suspension** à  $C=10 \text{ g.l}^{-1}$  trop concentrée, quadrillage pas visible  
 Décision de diluer au  $1/10^{\text{ème}}$   
 $\hookrightarrow C_m = 1 \text{ g.L}^{-1}$

**2<sup>ème</sup> suspension** à  $C_0 = 1 \text{ g.L}^{-1}$   
 Quadrillage visible, comptage possible  
 $\hookrightarrow C_m = 9,4 \times 10^6 \text{ levures.ml}^{-1}$   
 Concentration 2x supérieure au maximum du cytomètre

Décision de diluer  $C_m$  au  $1/2$  et de faire une gamme de dilution au  $1/2$

$\hookrightarrow C_0 = C_m/2$

**1<sup>ers</sup> comptage : trouver le quadrillage !**

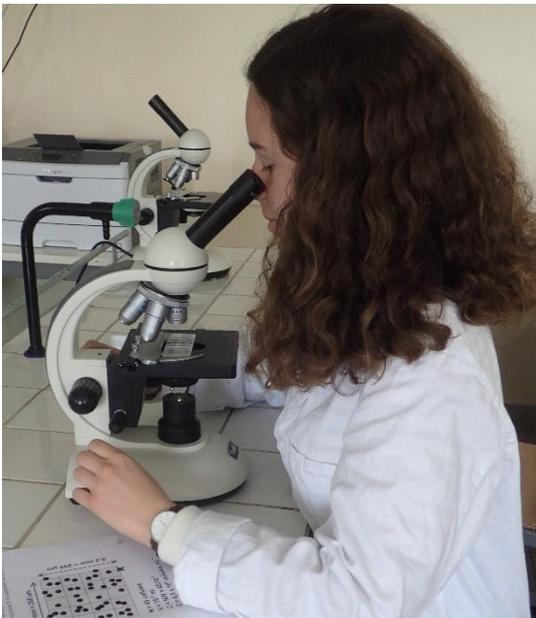
**Mlle Siobhan Tonnerre**



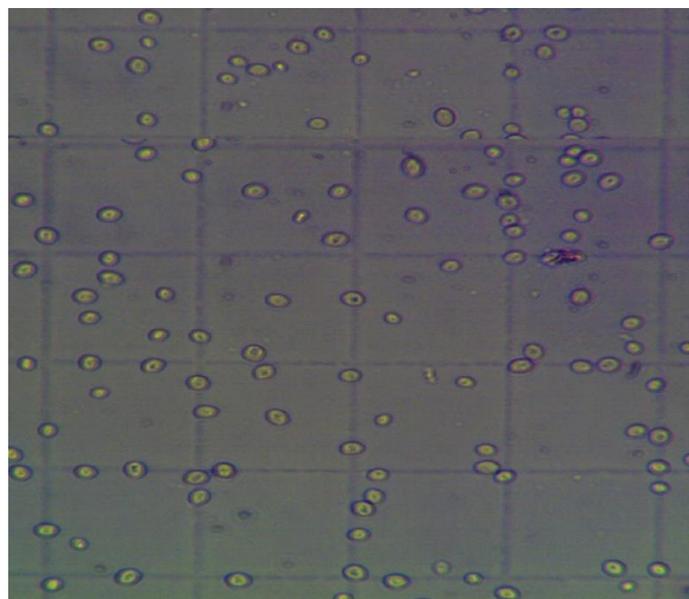
**Mlle Bleuwenn Dantec**



**Mlle Juilette Briant**

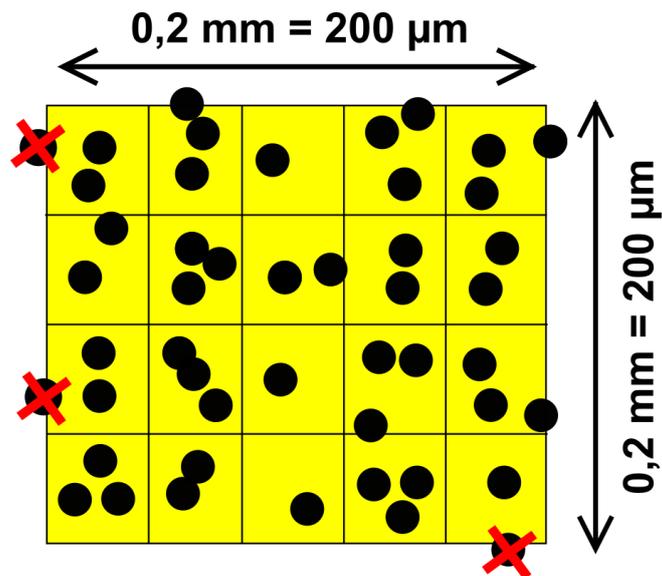


**Mlle Mathilde Merrien**



**Levures de la suspension mère  $C_m=1 \text{ g.L}^{-1}$**

► **Protocole de comptage** : ne pas compter les levures sur les bords extérieurs inférieurs et gauches des grandes cases et faire des copies écrans de chaque grande case pour comptage informatique avec Mesurim



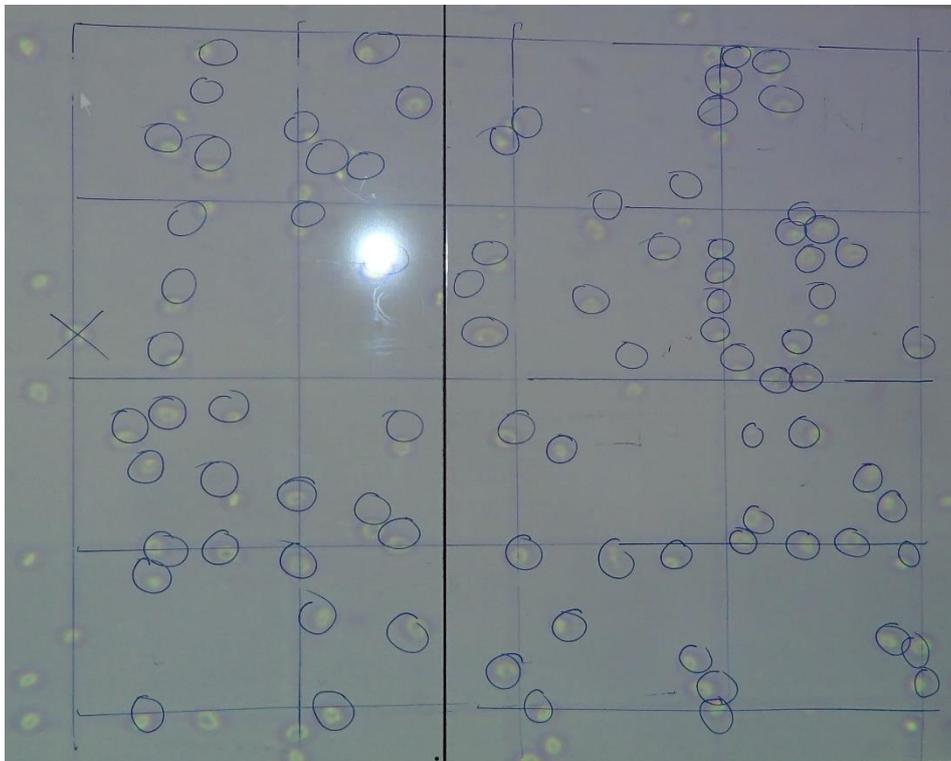
**N = 45 cellules**

**V =  $10^{-5}$  ml**

**C =  $N/V = 45/10^{-5}$**

**C =  $4,5 \times 10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>**

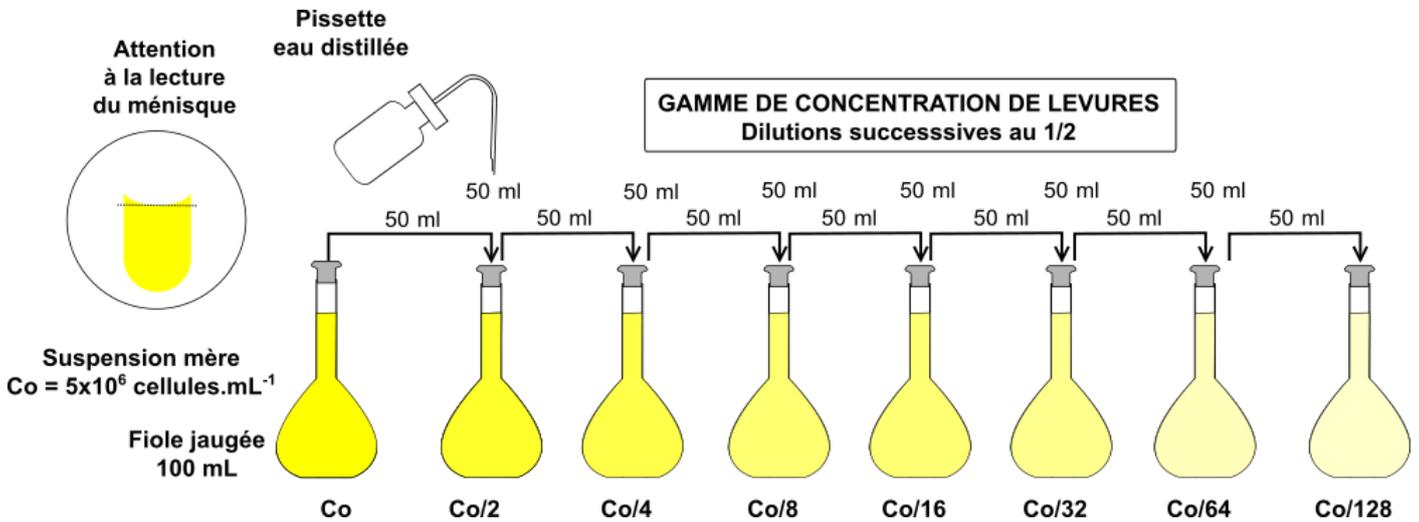
Suspension mère à  $C_m = 1 \text{ g.L}^{-1}$ , MO x 400, lame de Malassez  
94 levures par grandes cases soit 9,4 millions de levures par mL



► **Résultats du comptage de la suspension mère  $C_m = 1 \text{ g.L}^{-1}$  : 94 levures dans une grande case de  $10^{-5}$  ml soit  $9,4 \times 10^6$  levures.ml<sup>-1</sup>**

## 2 – Obtention de la gamme de dilution de levures

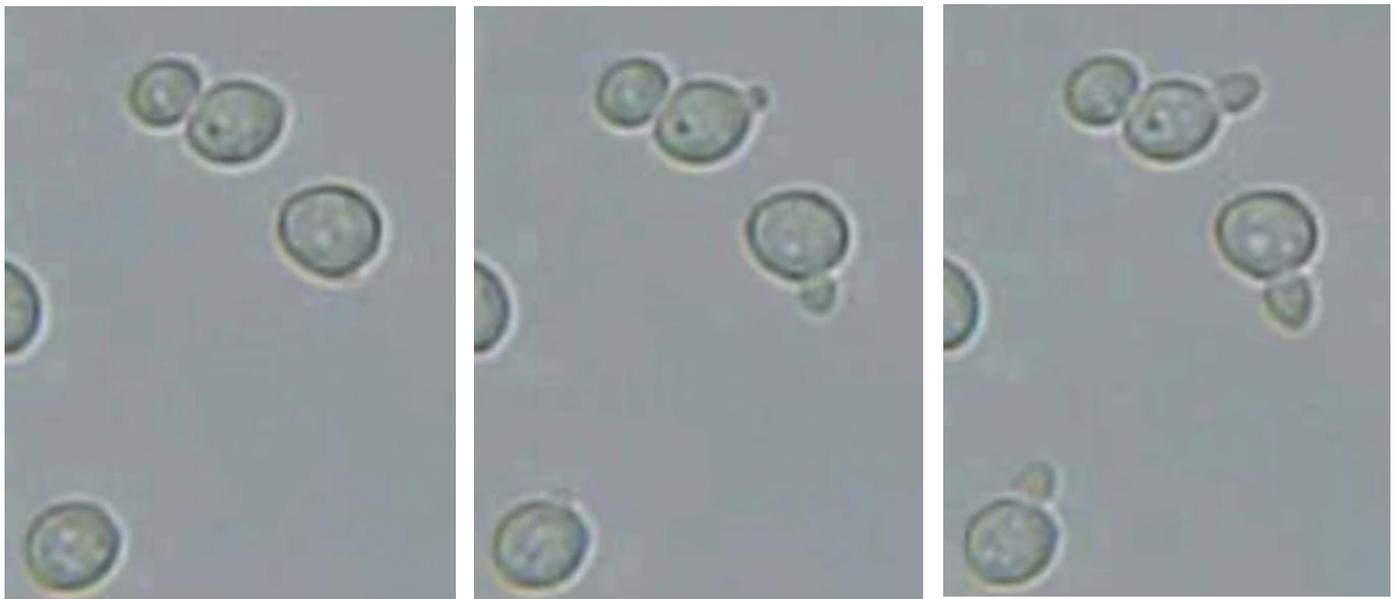
- ▶ **Objectif** : partir de la suspension mère à  $C_m=1 \text{ g.L}^{-1}$  puis faire des dilutions au  $\frac{1}{2}$   
→ Gamme de dilution :  $C_m/2 = C_o$ ,  $C_o/2$ ,  $C_o/4$ ,  $C_o/8$ ,  $C_o/16$ ,  $C_o/32$ ,  $C_o/64$  et  $C_o/128$
- ▶ **Matériel** : suspension mère, eau distillée, pipettes 50 mL, fiole jaugée 100 mL...
- ▶ **Protocole de dilution** : dilution au  $\frac{1}{2}$  ....



Bien manipuler, ne pas faire d'erreur (attention micropipette pour finir !!!)  
et bien voir le bas du ménisque



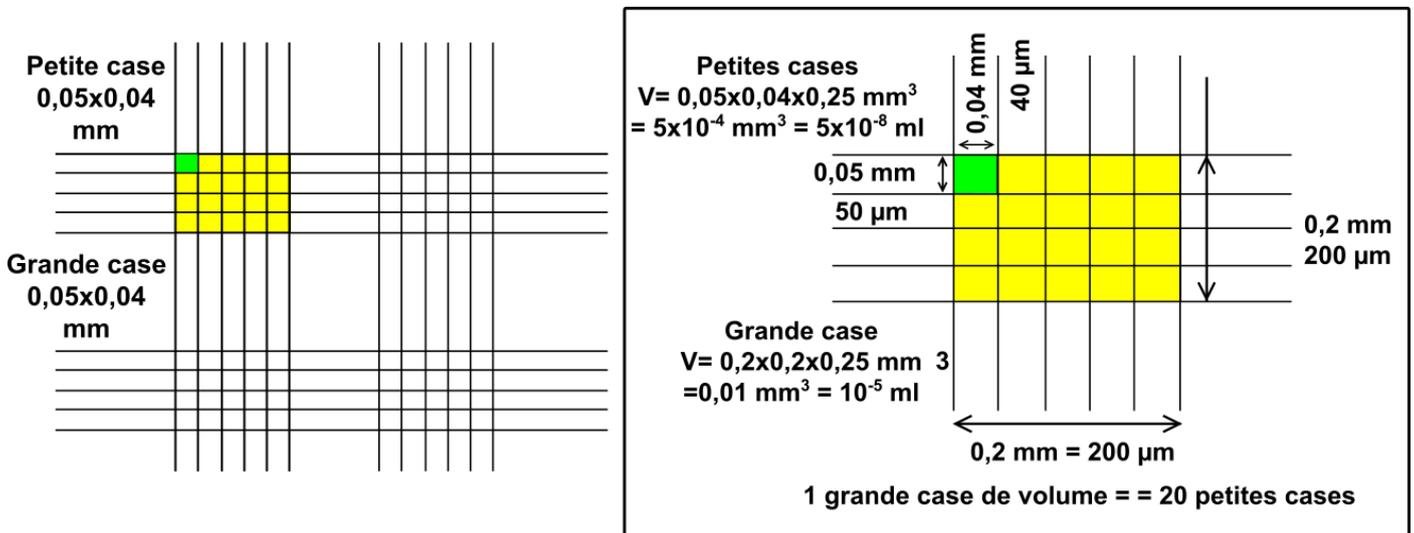
Gamme de concentration à mettre au froid (4°C)  
pour limiter la multiplication des levures par bourgeonnement comme ci-dessous



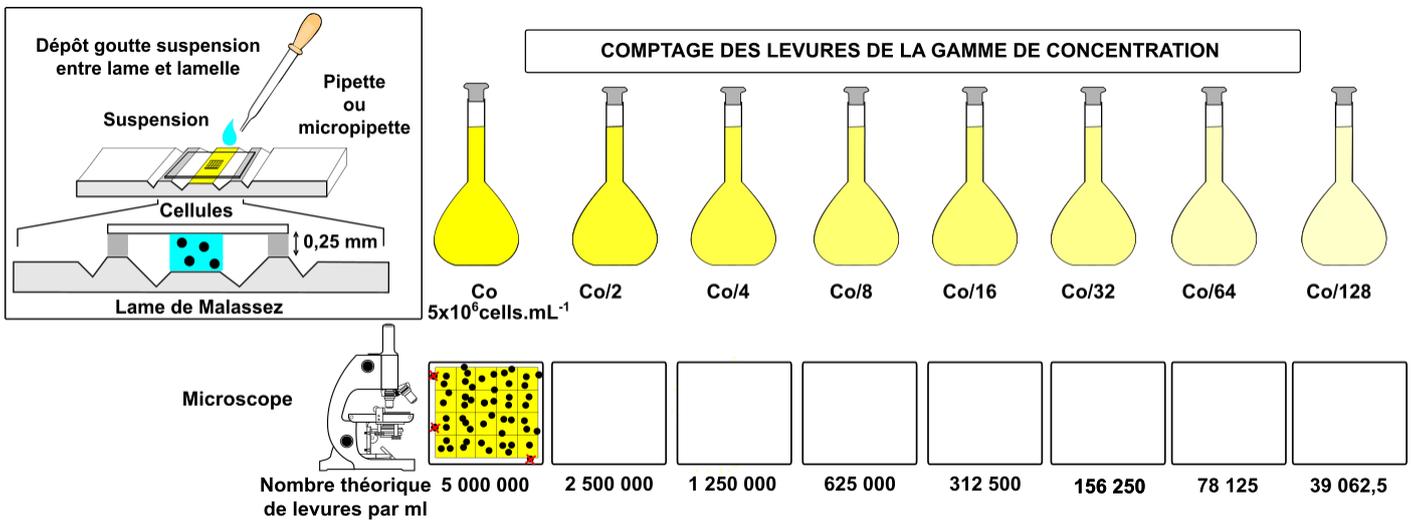
Cycle en 2 à 3h à 20°C – Images Labo SVT Elorn

### 3 – Comptage des levures de la gamme sur lame de Malassez et sous microscope

- ▶ **Objectif** : compter 5 grandes cases pour chaque suspension et par élève
- ▶ **Matériel** : gamme de concentration, microscope, lame de Malassez, lamelles, micropipette, cônes
- ▶ **Protocole de comptage** : ne pas compter les levures sur les bords extérieurs inférieurs et gauches des grandes cases et faire des copies écrans de chaque grande case pour comptage informatique avec Mesurim



Quadrillage de la lame de Malassez : grandes et petites cases

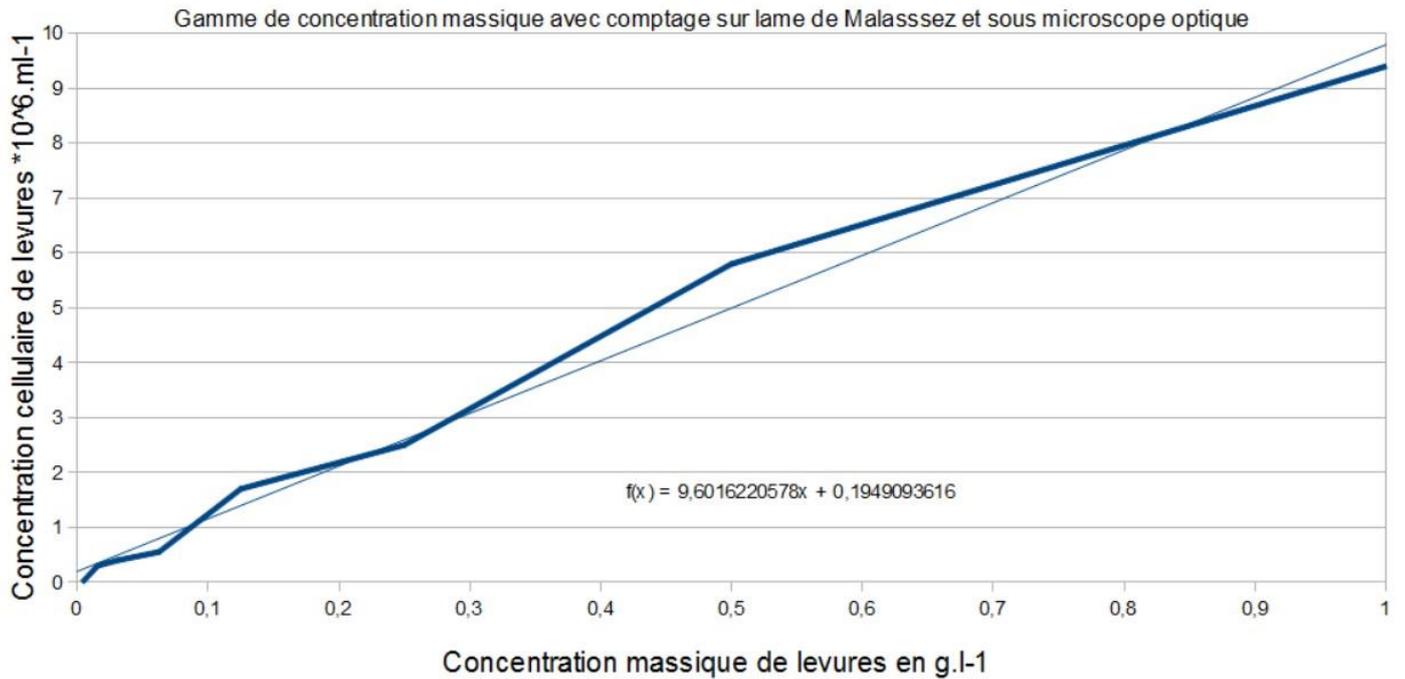


► **Résultats**

	Concentration massique en g.l <sup>-1</sup>	Nombre moyen de levures sur 5x4 grandes cases de 10 <sup>-5</sup> ml	Concentration moyenne de levures en millions par ml
Cm	1	94	9,4
Co	0,5	58	5,8
Co/2	0,25	25	2,5
Co/4	0,125	17	1,7
Co/8	0,0625	5,5	0,55
Co/16	0,03125	4	0,4
Co/32	0,015625	3	0,3
Co/64 <sup>(1)</sup>			
Co/128	0,00390625	0	0
ED	0	0	0

(1)- Suspension Co/64 perdue par les élèves donc aucune valeur

## Concentration cellulaire en fonction de la concentration massique de levures



► **Analyse des résultats** : régression linéaire attendue obtenue ...

## 4 – Détermination de la longueur d'onde maximale d'absorption de la suspension de levure

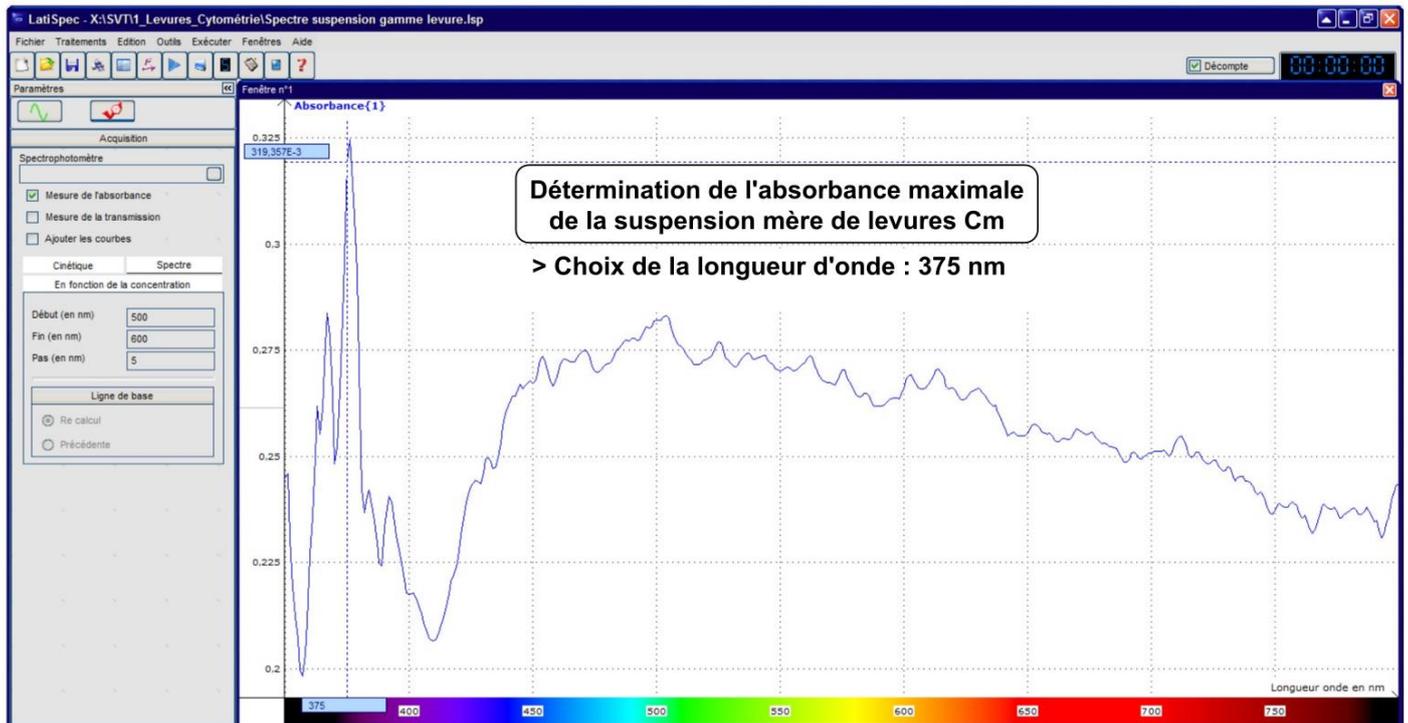
► **Objectif** : déterminer la longueur d'onde maximale d'absorption de la suspension de levure mère à Cm et vérifier avec d'autres suspension si le pic est conservé

► **Matériel** : spectrophotomètre à fibre optique balayant le spectre de la lumière blanche (350 à 800 nm) avec un pas de 1 nm

► **Protocole** : faire le blanc avec de l'eau distillée, sélectionner la fonction « spectre » et faire le spectre d'absorption de la suspension mère Cm, utiliser l'option « Réticule/Liée à la courbe » pour lire précisément la longueur d'onde du pic d'absorbance maximale



► **Résultats** : absorption maximale dans le violet sombre pour  $\lambda=375$  nm, longueur d'onde choisie pour mesurer l'absorbance de la gamme de concentration

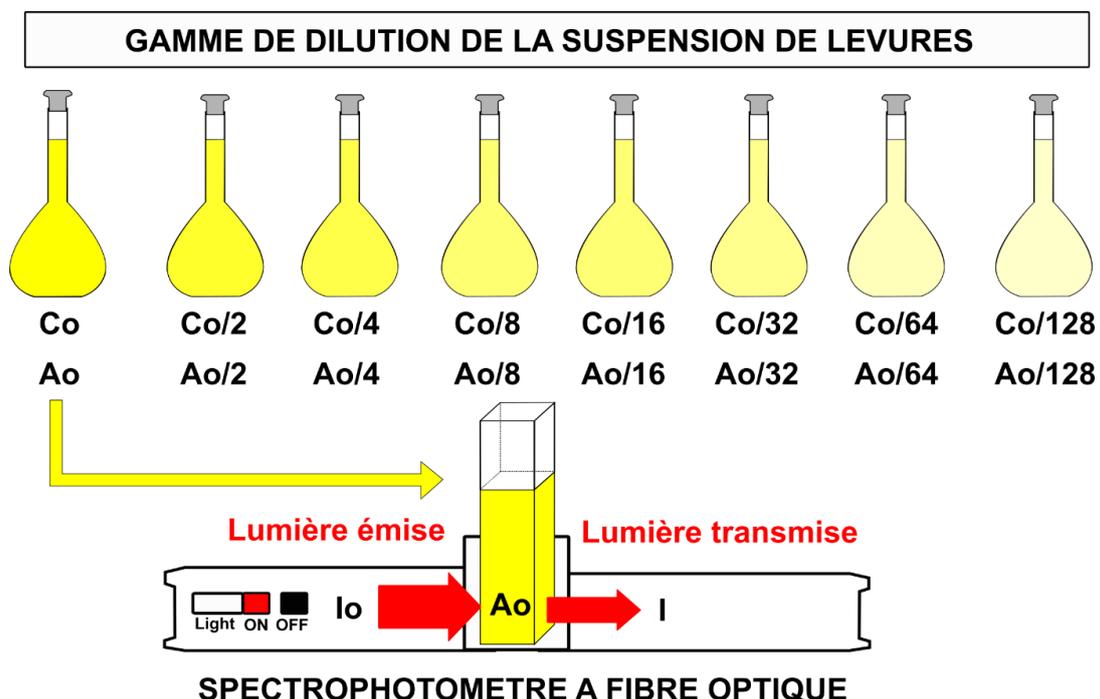


**5 – Mesurer l'absorbance de la gamme de concentration à  $\lambda=350$  nm et traitement des données**

► **Objectif** : déterminer l'absorbance de chaque suspension de la gamme de concentration à  $\lambda=350$  nm avec la fonction spectre

► **Matériel** : spectrophotomètre à fibre optique, gamme de concentration de levures, pipettes, cuves...

► **Protocole** : idem 4



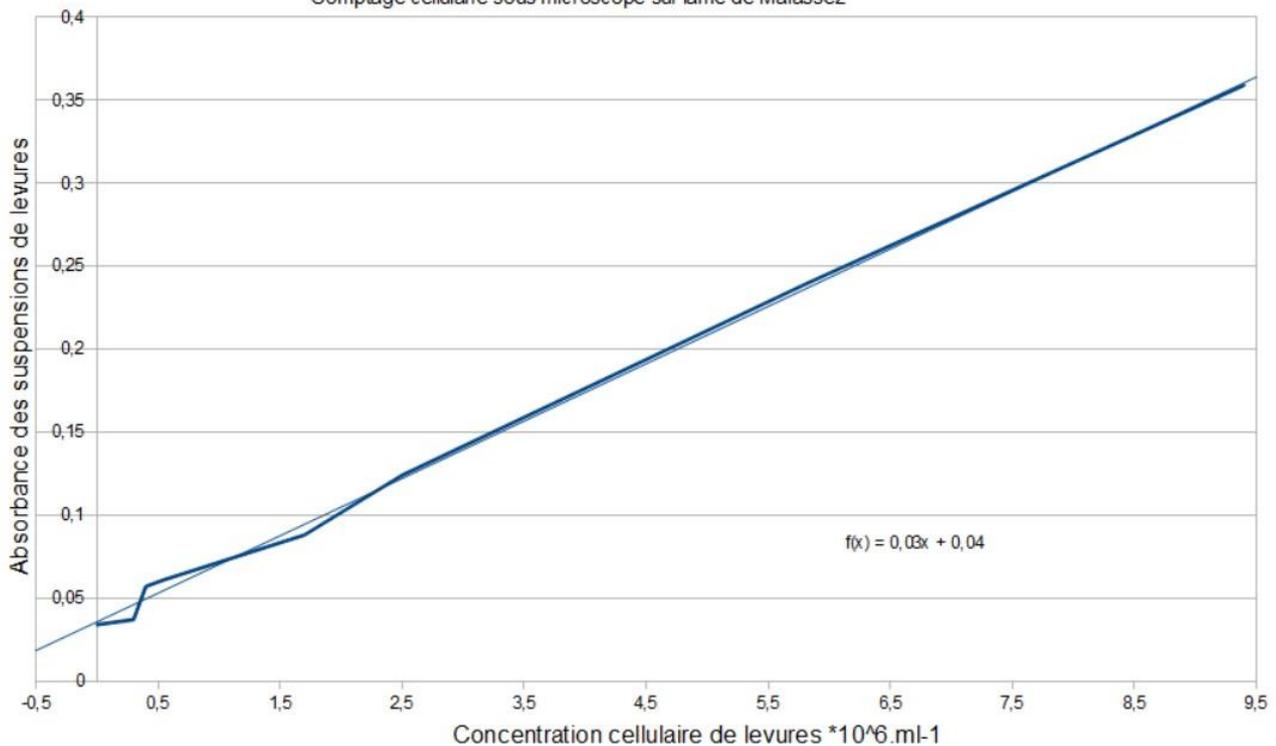
## ► Résultats :

- Présentation des données sous forme graphique
- Choix du type de graphique
- Recherche de la courbe de régression (linéaire) et de son équation :  $A=f(C)$
- Mise au réfrigérateur 4°C des suspensions sous parafilm après 2h à 20°C !!!

Concentration massique en g.l <sup>-1</sup>	Concentration cellulaire moyenne de levures en millions par ml	Absorbance à $\lambda=375$ nm
1	9,4	0,359
0,5	5,8	0,239
0,25	2,5	0,124
0,125	1,7	0,088
0,0625	0,55	0,061
0,03125	0,4	0,057
0,015625	0,3	0,037
0,00390625	0	0,034

Absorbance en fonction de la concentration cellulaire de levure

Comptage cellulaire sous microscope sur lame de Malassez



► **Analyse des résultats** : régression linéaire attendue obtenue sauf aux faibles concentrations pour lesquelles la droite d'étalonnage linéaire n'est pas utilisable

### ► Tester la droite d'étalonnage

- **Tester le modèle avec une suspension de levures**
- **Choix de la suspension à Co/64....** car perdue lors de la dilution et refaite à partir de Co restée à T ambiante pendant 2h

- **Analyse des résultats** : concentration Co/64 supérieure de 50% à la concentration attendue car suspension laissée à T ambiante durant 2h ce qui a permis la multiplication de certaines levures....
- **Conclusion** : modèle valable sauf aux faibles concentrations, nécessité de travailler rapidement et de mettre les suspensions au froid (4°C)...

## 6 – Cytométrie de flux de la gamme de concentration de levures)

► **Objectif** : déterminer la concentration cellulaire de la gamme de suspension par cytométrie de flux

► **Matériel** : cytomètre de flux, gamme de suspension préparée entre 8h et 9h + eau distillée de dilution, conservée à T=4°C puis transportée entourée de glace dans une glacière

► **Protocole** : réglage du cytomètre, marquage des levures au Sybr-green, fluorophore de l'ADN (ARN) excitable par laser bleu 488 nm...



Gamme de concentration de Cm à Co/128 préparée de 8h à 9h, conservée à 4°C, transportée dans de la glace et arrivée à 11h



Présentation et réglage du cytomètre par M. Lambert

## Marquage spécifique de l'ADN des levures au Sybr-green



## Agitation et homogénéisation de la suspension au Vortex



### ► Résultats cryométrie de la gamme de levures

#### Statistics

Sample ID (Tube\_005): C0/128

Sample ID (Tube\_006): C0/64

Sample ID (Tube\_007): C0/32

Sample ID (Tube\_008): C0/16

Sample ID (Tube\_009): C0/8

Sample ID (Tube\_010): C0/4

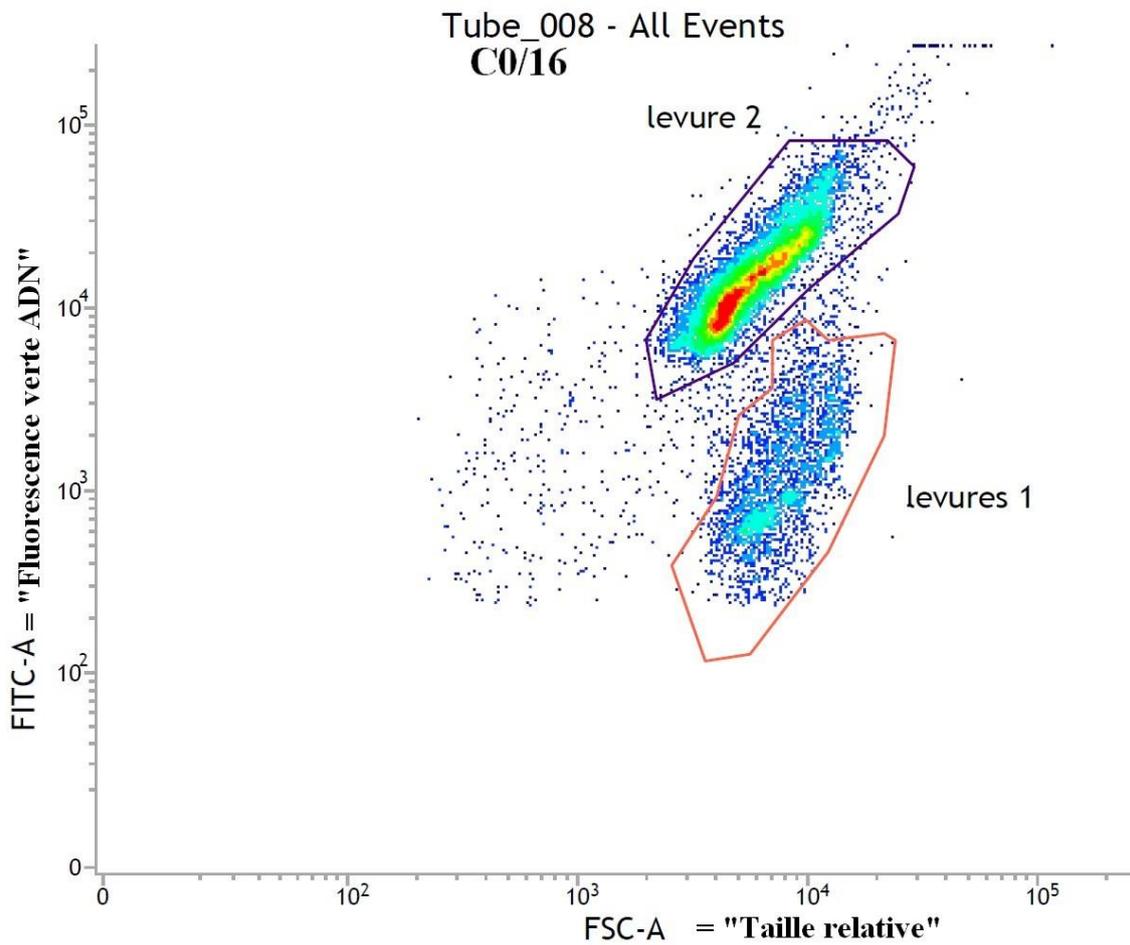
Sample ID (Tube\_011): C0/2

Sample ID (Tube\_012): C0

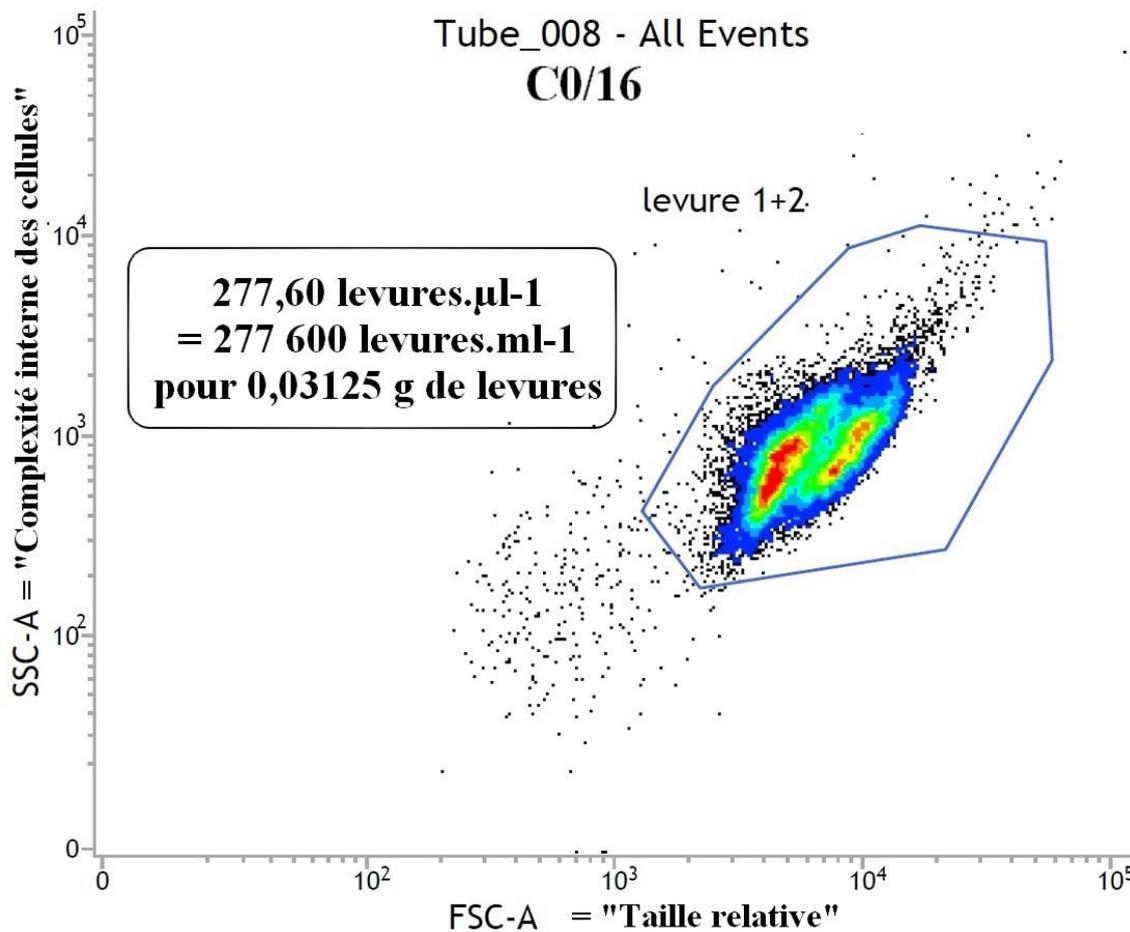
Sample ID (Tube\_014): ED

Acquisition Date (Tube\_001): 07-Jun-2016

Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total	Events/uL	FITC-A Geo Mean	FSC-A Geo Mean	SSC-A Geo Mean
Tube_005:levure 1+2	1,820	86.96	***	86.96	32.50	9,804	6,985	886
Tube_006:levure 1+2	4,349	94.03	***	94.03	76.30	11,873	7,749	907
Tube_007:levure 1+2	7,470	96.61	***	96.61	133.39	7,309	5,449	781
Tube_008:levure 1+2	15,823	98.03	***	98.03	277.60	8,944	6,424	799
Tube_009:levure 1+2	32,848	98.80	***	98.80	566.34	14,844	8,994	866
Tube_010:levure 1+2	79,834	99.16	***	99.16	1,376.45	15,735	10,023	939
Tube_011:levure 1+2	148,775	99.51	***	99.51	2,610.09	4,947	10,809	990
Tube_012:levure 1+2	244,210	99.45	***	99.45	4,210.52	2,810	10,656	981
Tube_014:levure 1+2	43	23.76	***	23.76	0.74	5,660	3,748	656

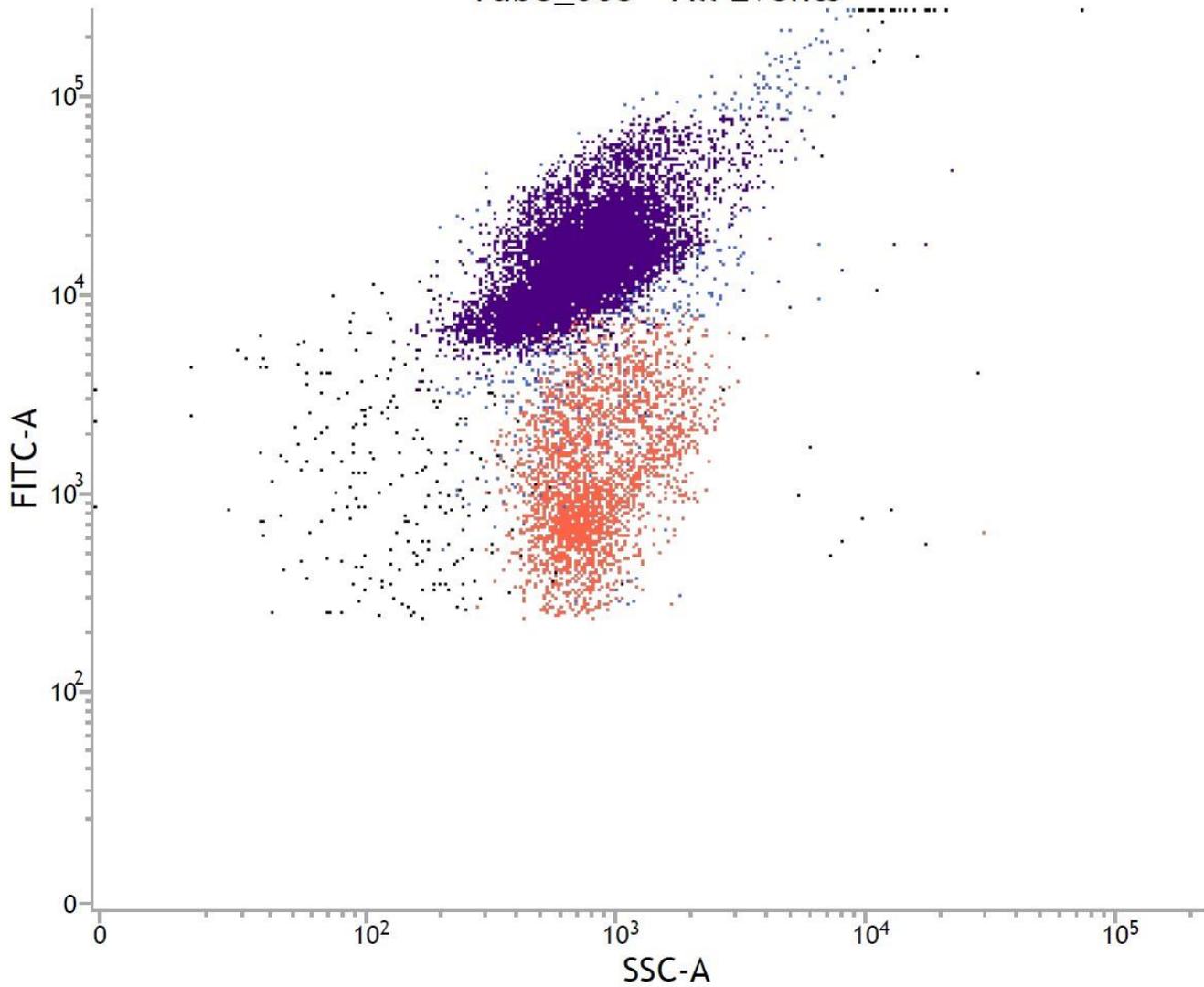


Fluorescence du marquage de l'ADN en fonction de la taille relative des levures (FSC)



Fluorescence du marquage de l'ADN en fonction de la taille relative des levures (FSC)

### Tube\_008 - All Events



**Fluorescence du marquage de l'ADN en fonction de la complexité interne des levures (SSC)**

	Concentration massique en g.l <sup>-1</sup>	Concentration cellulaire moyenne de levures en millions par ml (10 <sup>6</sup> .ml <sup>-1</sup> )	
		Comptage microscope sur lame de Malassez	Comptage par cytomètre
Cm <sup>(1)</sup>	1	9,4	-
Co	0,5	5,8	4,2
Co/2	0,25	2,5	2,6
Co/4	0,125	1,7	1,4
Co/8	0,0625	0,55	0,55
Co/16	0,03125	0,4	0,28
Co/32	0,015625	0,3	0,13
Co/64 <sup>(2)</sup>	0,0078125	-	0,07
Co/128	0,00390625	0	0,03
ED <sup>(3)</sup>	0	0	0,00074

(2)- Suspension Co/64 perdue par les élèves donc aucune valeur

(3)- Suspension Cm trop concentrée pour le cytomètre

(4) - L'eau distillée n'est pas pure et contient 740 « cellules » par ml probablement des microalgues vertes....

## ► Analyse des résultats



Analyse en 3 dimensions des résultats par M. Lambert

FSC = « taille relative », SSC = « complexité interne » et FITC –A (fluorescence verte)

### **Suspensions de levure hétérogènes composées de**

- **Petites particules** (macromolécules, débris divers...) écartées du traitement par selection de seuils
  - **Deux populations de particules marquées Sybr-green donc contenant de l'ADN (ARN) = cellules de levures** mais qui ont fixé différemment le fluorophore
  - **Deux populations de taille comparable** (même FSC) mais de complexité différente (SSC différent) : cellules en division vs cellules en interphase ???
- **Comme leur taille relative est les deux populations sont regroupées et le comptage a été fait sur l'ensemble des deux populations**

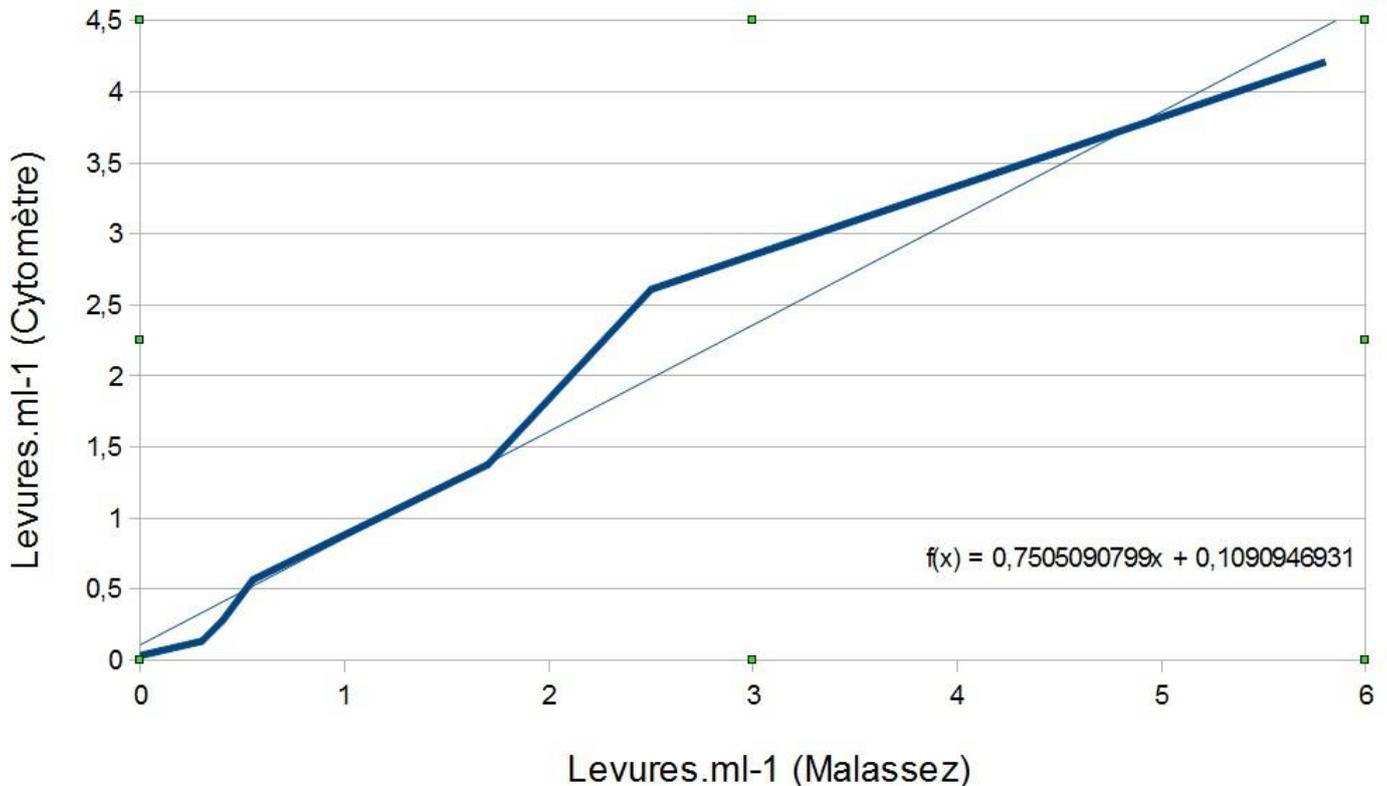
### **7 – Cinétique de croissance d'une suspension de levure avec et sans glucose..... : $A = f(C)$**

Le temps a manqué pour que les élèves testent l'effet de la concentration de glucose au cours du temps sur une suspension de levure par mesure horaire d'absorbance....

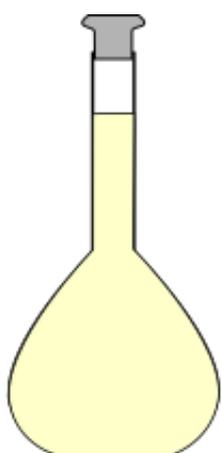
## 8 – SYNTHÈSE DU PROJET LEVURE

► **Analyse des résultats** : régression linéaire attendue obtenue ...reste à déterminer la variabilité des résultats....( $\sqrt{V2}$ ...) et la reproductibilité des résultats..

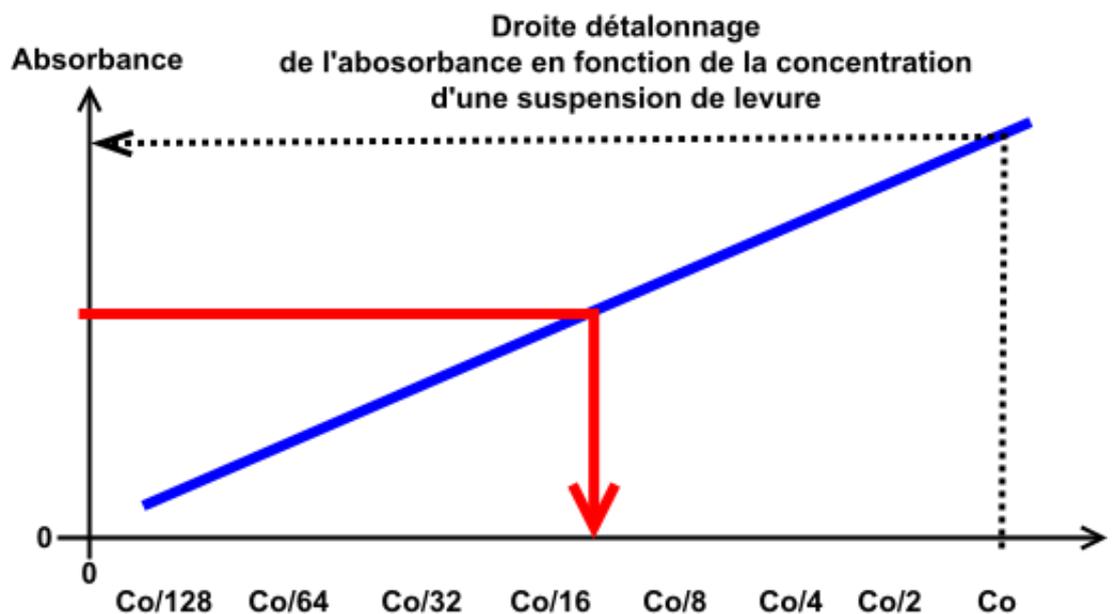
Lame de Malassez vs Cytomètre IUEM



► **Application** : possibilité d'estimer par la mesure rapide de l'absorbance, la concentration cellulaire d'une suspension de levure inconnue mais dans la gamme de concentration massique de  $Co = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$  à  $Co/128$ ....



Suspension X de levure de concentration inconnue



Mesurer son absorbance  
Estimer sa concentration

Concentration de levures  
Nombre levures par  $\text{mL}^{-1}$

Travail réalisé par 4 élèves volontaires et motivées de Seconde E. Les élèves ont travaillé le plus souvent en autonomie dans le laboratoire ou dans une salle de cours en dehors des heures de cours. Fin Mai/début Juin 2016

Elèves	Technicienne	Enseignants de SVT	Ingénieur Chercheur
Mlle Siobhan Tonnerre Mlle Bleuwenn Dantec Mlle Juilette Briant Mlle Mathilde Merrien	Mme Perrine Albericci	Mme Emilie Costa M. Hervé Kempf	M. Christophe Lambert I.U.E.M. (Brest)



**Labo SVT-Salle B14-Jeudi 09 juin – 14h30**

**Un grand merci à M. Christophe Lambert, Ingénieur Chercheur à l'I.U.E.M. de Brest  
(Institut Européen de la Mer)**

