

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DES SCIENCES et TECHNIQUES
Année Universitaire 2008 - 2009 – 1^o session (Mai 2009)
LICENCE Sciences du Vivant 3^o année (L3 SV)

EXAMEN de TP de MICROBIOLOGIE

Durée: 25 minutes - Sans document - Calculatrice sans fonction alpha numérique autorisée.

1) Un mélange est isolé sur gélose TS, Chapman et Drigalski.

On trouve 3 types de colonies sur TS, 2 types sur Drigalski (une colonie jaune, une colonie bleue) et aucune pousse sur Chapman.

Une des souches du Drigalski possède une ciliature polaire et l'autre est immobile.

Que peut contenir le mélange ? (3 points)

2) Détermination de la CMI et de la CMB vis à vis de la streptomycine d'une souche A.

2-1) La souche A est un coque Gram+ catalase+.

Quelles espèces pourrez-vous identifier ? Quels tests allez-vous pratiquer ? (2 points)

2-2) CMI et CMB vis à vis de la streptomycine : Solution mère = 8g/L ; tube 1 = 1024 mg/L ; volume final tube 1 = 4 ml

a) Comment préparer le tube 1 ? (2 points)

b) Après culture on trouve une CMI de 32 mg/L et une CMB de 64 mg/L.
Le dénombrement du témoin donne 3 colonies dans 50 µL de dilution 10⁻⁴.

Combien y a t il de bactéries/ml de tube témoin ? (2 points)

c) Combien trouvera-t-on de bactéries/ml dans le tube contenant 64 mg/L de streptomycine ? (1 point)

d) Quelles conclusions sur la souche et l'antibiotique ?
(c=8mg/l et C= 16 mg/l) (2 points)

EXAMEN de TP de MICROBIOLOGIE -Immunologie

Durée: 20 minutes - Sans document - Calculatrice sans fonction alpha numérique autorisée.

L'objectif d'un travail pratique donné à des étudiants de licence est la mise en évidence de l'expression des molécules de classe II du CMH (CMHII) par les lymphocytes B. Ce travail est réalisé à partir de lymphocytes isolés de ganglions lymphatiques de souris. La technique employée est l'immuno-précipitation.

Le protocole proposé aux étudiants est le suivant :

- 1) Centrifuger la suspension cellulaire 10 minutes à 13000 g, à 4°C.
- 2) Reprendre le culot cellulaire dans 400 µl de Tampon I contenant du NaCl (150 mM), Tris-HCl pH=8 (20 mM), EDTA (5 mM), Triton X100 (1%), BSA (0,20%) et des inhibiteurs de protéases. Transférer l'ensemble dans un tube eppendorf.

- 3) Incuber 20 minutes dans la glace.
- 4) Centrifuger le tube 10 minutes à 13000 g, à 4°C.
- 5) Récupérer le surnageant et le transférer dans un autre tube eppendorf.
- 6) Ajouter dans le tube 50 µl de protéine A- Sépharose.
- 7) Placer sous agitation à 4°C pendant une heure.
- 8) Centrifuger 1 minute à 13000g.
- 9) Récupérer le surnageant et le transférer dans un nouveau tube eppendorf.
- 10) Séparer les échantillons en 2. Placer 200 µl de surnageant dans un second eppendorf noté **E** (pour essai) et 200 µl de surnageant dans un premier eppendorf noté **T** (pour témoin).
- 11) Ajouter dans chacun des tubes 200 µl de Tampon I contenant des inhibiteurs de protéases.
- 12) Ajouter dans le tube **E** : 5µg d'anticorps anti-CMHII (IgG2a) et dans le tube **T** : 5 µg d'anticorps « contrôle isotypique » (IgG2a)
- 13) Placer sous agitation à 4°C pendant une heure.
- 14) Ajouter dans les tubes **E** et **T** : 50 µl de protéine A- sépharose.
- 15) Placer sous agitation à 4°C pendant une heure.
- 16) Centrifuger 1 minute à 13000g.
- 17) Eliminer le surnageant.
- 18) Ajouter au culot de protéine A- sépharose : 1 ml de tampon II contenant du NaCl (150 mM), Tris-HCl pH=8 (20 mM), EDTA (5 mM) et du Triton X100 (0,1%). Mélanger brièvement au vortex. Centrifuger 1 minute à 13000g. Eliminer le surnageant.
- 19) Répéter cinq fois cette étape.
- 20) Ajouter au culot de protéine A - sépharose : 1 ml de tampon III contenant du Tris-HCl pH=8 (50 mM). Mélanger brièvement au vortex. Centrifuger 1 minute à 13000g. Eliminer le surnageant.
- 21) Répéter deux fois cette étape.
- 22) Ajouter au culot de protéine A – sépharose : 20 µl d'eau
- 23) Ajouter dans chaque tube 10 µl de tampon de charge (3x concentré contenant du Tris-HCl 1M pH=6,8 (150mM), glycérol (30 %), SDS (6 %), bleu de bromophénol (0,5 %).
- 24) Faire bouillir les échantillons 5 minutes.
- 25) Centrifuger les tubes 1 minute à 13000g.
- 26) Récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette chargée d'un embout fin.
- 27) Charger un gel d'acrylamide avec vos échantillons.
- 28) Déposer 15 µl de « marqueurs de poids moléculaire », préalablement bouillis pendant 5 minutes.
- 29) Soumettre les échantillons à la migration (40 mA pour 2 gels).
- 30) Colorer le gel au bleu de Coomassie.

Justifier brièvement :

- a- la présence de Triton X100 dans le tampon I (étape 2)
- b- la présence d'inhibiteurs de protéases dans le tampon I (étape 2)
- c- l'intérêt de réaliser l'expérience avec des anticorps « contrôle isotypique » en plus de l'anticorps d'intérêt (étapes 10-12)
- d- l'intérêt de l'utilisation de protéine A-sépharose dans les expériences d'immunoprécipitation (étape 14)
- e- la présence de SDS dans le tampon de charge (étape 23)
- f- l'utilisation de marqueurs de poids moléculaire lors de la séparation électrophorétique des protéines (étape 28)