

Le 26 octobre 2013

EPREUVE DE SPECIALITE :
Microbiologie Appliquée (2h00)

Répondez à ces questions en quinze lignes maximum chacune et si possible dans l'ordre.

THEMATIQUE DE RECHERCHE N° 1 (5 pts)

Quelles sont les problématiques développées autour des actinomycètes et du genre streptomyces dans la recherche de nouvelles molécules antibiotiques

THEMATIQUE DE RECHERCHE N° 2 (5 pts)

Proposer un arbre décisionnel pour l'interprétation des phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches d'entérobactéries.

THEMATIQUE DE RECHERCHE N° 3 (5 pts)

Vous avez isolé deux souches de bactéries lactiques que vous avez identifiées comme étant appartenant au genre *Lactobacillus*, l'une du lait et l'autre du tube digestif humain. Les bactéries lactiques sont connues de statut GRAS et sont convoitées pour leur utilisation en tant que :

- Probiotique
- Ferment fromager
- Bio-conservateur

Que signifie le terme GRAS ?

Parmi ces trois applications, quelles sont celles que vous préconisez pour chaque souche et quels sont les tests à mettre au point pour vérifier la faisabilité ?

THEMATIQUE DE RECHERCHE N° 4 (5 pts)

Les plantes infectées se défendent de plusieurs manières. Expliquez la réaction d'hypersensibilité et ses étapes.

Bonne chance

Le 26 Octobre 2013

EPREUVE :
Analyse d'article (2h00)

1. Donner un titre en Français et en Anglais (2 pts.)
2. Donner un résumé en anglais (10 pts.)
3. Donner 4 mots clés (2 pts.)

Questions de compréhension

1. En quoi ça vous renseigne ce terme complexe « non-producing plasmid cured isogenic variant » ? (2 pts.)
2. Dans cet article des rats ont été utilisés dans l'étude *in vivo*. Qu'est ce qu'ils ont de particulier ces rats ? Dans quel cas ce genre d'animaux est préconisé? A votre avis est ce que c'est un bon choix dans le cas de cette étude? (2 pts.)
3. Interpréter les résultats obtenus *in vitro* à pH 7 ? (2 pts.)

Bonne chance

1. Introduction

Bacteriocins and bacteriocin producing cultures of lactic acid bacteria (LAB) have been used for biopreservation. Numerous studies show that they restrict growth of *Listeria monocytogenes* in various types of foods (Rodriguez et al., 2001; Katla et al., 2002).

Bacteriocin producing LAB are present as part of the indigenous intestinal microflora and are assumed to help assert a set of vital roles with respect to host resistance (Rolfe, 1996). The hypothesis is that the presence of a conventional indigenous microflora prevents colonization of pathogenic bacteria in the gastrointestinal (GI) tract by occupation of epithelial adhesion sites, competition for essential metabolic

substrate, and by production of inhibitory compounds such as short-chain fatty acids and bacteriocins (Brassart and Schiffrin, 1997; Cebra, 1999; Moreau, 2000; Hof, 2001).

The experimental evaluation of the colonizing ability of a microorganism is influenced by the indigenous bacterial flora in the model used (Freter, 1955). However, germ-free animals and in vitro models of the intestinal system can be used when elimination of the influence of the indigenous flora is desired to obtain simpler interpretation of the observations. Many bacterial interactions can be easier addressed in continuous flow (CF) culture models, and such models have previously been used in studies, e.g. of the ability of *Escherichia coli* to persist in the GI tract under different conditions (Freter et al., 1983; Nielsen and Schlundt, 1992; Ruiz-Perez et al., 2004).

Conventional in vivo models provide information on the inter-bacterial interactions as well as on interaction of the bacteria with the host. Gnotobiotic animal models can be used, when interactions between specific bacterial species are

* Corresponding author. Tel.: +45 72347186; fax: +45 72346001.
E-mail address: trl@dfvf.dk (T.R. Licht).

investigated and the interference of the residual flora is unwanted. Such models have been used for investigation of, e.g. quorum sensing among bacteria in the GI tract (Jordan et al., 2005), and the ability of specific bacteria to prevent pathogenic bacteria from colonizing (Millar et al., 1993). In the present study we used two models; a two-stage CF system with pH values of 5 and 7, and a gnotobiotic rat model, to investigate the effect of bacteriocin producing *Lactobacillus plantarum* on *L. monocytogenes* in vitro and in vivo.

The purpose of the study was to examine whether a bacteriocin producing *L. plantarum* affected the ability of *L. monocytogenes* to persist and invade in the intestine. The results showed that the anti-listerial pediocin AcH inhibited *L. monocytogenes* in vitro but not in gnotobiotic rats, and that the presence of *L. plantarum* facilitated invasion of *L. monocytogenes* in gnotobiotic rats.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture media

L. monocytogenes EP2, originally isolated during an epidemic in Switzerland in 1985 (Piffaretti et al., 1989), was used in all experiments. Inocula of *L. monocytogenes* were incubated for 18 h at 37 °C in BHI broth (Oxoid, Basingstoke, England), washed and resuspended in sterile 0.9% NaCl.

The pediocin AcH producer *L. plantarum* DDEN 11007 and the plasmid cured bacteriocin-negative isogenic variant *L. plantarum* DDEN 12305 (originally constructed by L. Axelsson) were used to demonstrate bacteriocin-mediated anti-listerial activity in vivo and in vitro. Both strains were kindly provided for these experiments by Dr. Dieter Elsser (Danisco A/S, Niebüll, Germany).

Lactobacillus was selectively isolated on Rogosa agar (Oxoid, Hampshire, England), and *L. monocytogenes* on Palcam agar base containing Palcam selective supplement (Oxoid, Basingstoke, England). The Rogosa agar plates were incubated in a Mart Anoxymat System (Biolab, Risskov, Denmark) at the anaerobe cycle for 3 days, while the Palcam agar plates were incubated at the micro-aerophilic cycle for 2 days. The standard gas mixture used for the Anoxymat was 80% N₂, 5% CO₂ and 5% H₂. All plates were incubated at 37 °C.

2.2. Experiments using the two-stage continuous flow (CF) model

The construction, media and running conditions of the two-stage CF model were as previous described (Nielsen and Schlundt, 1992) with the exception that each fermentor (BIO-STAT B, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany) contained 1000 ml medium. Briefly, the two-stage CF system consisted of two connected fermentors containing sterile medium flowing with a dilution rate of 1/24 h⁻¹. The culture medium was previously described (Mallett et al., 1985), and was based on Reinforced Clostridial Medium (Oxoid, Basingstoke, England) supplemented with 5 mg/l hemine and 0.5 mg/l Vitamin

K. The cultures were stirred at 100 rpm and kept under anaerobic conditions. The temperature was 37 °C, and pH was 5 in the first fermentor and 7 in the second fermentor.

Three independent experiments were made in the two-stage CF model. Both fermentors were inoculated with either (i) 1 × 10⁸ CFU of a bacteriocin producing *L. plantarum* DDEN 11007, (ii) 5 × 10⁸ CFU non-bacteriocin producing *L. plantarum* DDEN 12305 or (iii) not inoculated. Seven days after the initial inoculation, both fermentors were inoculated with 1 × 10⁹ CFU *L. monocytogenes* EP2. Samples from the fermentors were taken six times during a 10-day period.

2.3. Animal experiments

A total of 24 germ-free Sprague–Dawley rats (aged 8 weeks) bred at the Danish Institute for Food and Veterinary Research from parental animals originally obtained from IFFA Credo, France were used. The animals were kept, fed and the germ-free status confirmed as previously described (Schlundt et al., 1994). The experiments were approved by the National Agency for Protection of Experimental Animals.

The rats were randomly placed into 3 groups each consisting of eight rats and were orally inoculated with either (i) phosphate-buffered saline, (ii) 1 × 10⁹ CFU of pediocin AcH producing *L. plantarum* DDEN 11007 or (iii) 1 × 10⁹ CFU of the isogenic non-producing *L. plantarum* DDEN 12305. Seven days after the initial inoculation all three groups of rats were inoculated with 3 × 10⁹ CFU of *L. monocytogenes* EP2.

Fecal samples from all rats were obtained directly from the rectum during a 3-week period. The rats were euthanized immediately after the last fecal sampling. The liver and spleen were aseptically removed and homogenized. The GI tracts were removed and contents from duodenum, ileum, caecum and colon were sampled. All samples were processed (i.e. diluted and plated on selective media) within 3 h.

2.4. Statistics

To calculate a group mean, the value of 100 CFU/g of feces (corresponding to the limit of detection) was assigned to animals from where no *L. monocytogenes* could be recovered. Statistical data analysis of colonization (*t*-tests and one-way analysis of variance) was performed using SAS (SAS Institute, Cary, NC). Invasiveness of *Listeria* into the liver and spleen were analyzed by binary logistic regression performed in SAS. A *p* value of <0.05 is considered significant in all statistic tests performed.

3. Results

3.1. Effects of pediocin AcH producing *L. plantarum* on *L. monocytogenes* in the in vitro continuous flow model

The pediocin AcH producing *L. plantarum* DDEN 11007 and the plasmid-cured isogenic non-producing DDEN 12305 both grew to a density of approx. 6 × 10⁷ CFU/ml in the first

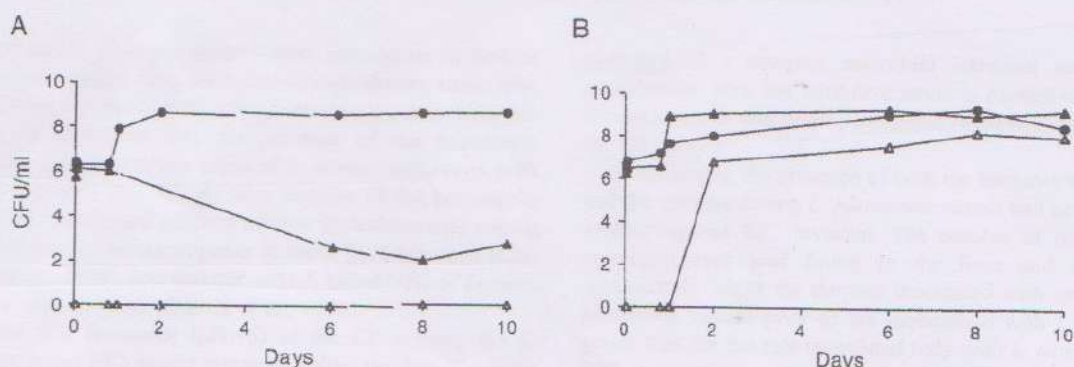


Fig. 1. Densities of *L. monocytogenes* EP2 in the first (A) and the second (B) fermentor of the CF culture system inoculated with either *L. monocytogenes* alone (bullets), pediocin producing *L. plantarum* and subsequently *L. monocytogenes* (open triangles), or non-bacteriocin producing *L. plantarum* and subsequently *L. monocytogenes* (closed triangles). pH values in the two fermentors were 5 and 7, respectively. Three identical experiments were carried out, all showing the same trends. One representative experiment is shown.

fermentor (pH 5.0) and this density did not change after inoculation with *L. monocytogenes* EP2 (data not shown). In the fermentor inoculated with the pediocin AcH producing *L. plantarum* DDE11007, *L. monocytogenes* EP2 was eliminated (<100 CFU/ml) already 15 min after inoculation at pH 5.0. The absence of *L. monocytogenes* was maintained throughout the experiment. When the isogenic non-producing *L. plantarum* DDE12305 was inoculated prior to *L. monocytogenes* EP2, the density of *L. monocytogenes* slowly decreased from the first to the eighth day at pH 5.0 (Fig. 1A).

The bacteriocin and the non-bacteriocin producing *L. plantarum* strains both grew to approx. 3×10^7 CFU/ml in the second fermentor (pH 7.0), and this density did not change after inoculation with *L. monocytogenes* EP2 (data not shown). In all samples taken from the second fermentors during the day of inoculation with *L. monocytogenes* EP2, the density of this organism was significantly lower (under the detection limit) ($p < 0.05$) in the fermentor inoculated with the pediocin AcH producing *L. plantarum* DDE11007, than in the fermentor inoculated with the isogenic non-producing *L. plantarum* DDE12305, where the density of *L. monocytogenes* increased to approx. 10^8 CFU/ml. However, *L. plantarum* DDE11007 kept the level of *L. monocytogenes* EP2 below the detection limit only during the day of the inoculation at pH 7.0, after which the density of *L. monocytogenes* rapidly increased to levels of approximately 10^7 CFU/ml (Fig. 1B).

3.2. Effects of pediocin AcH producing *L. plantarum* on colonization and invasion of *L. monocytogenes* in vivo

The average density in fecal samples from the germ-free rats of the pediocin AcH producing *L. plantarum* DDE11007 and the isogenic non-producing DDE12305 was approximately 1×10^7 CFU/g of feces in all animals inoculated with either of the two strains.

After inoculation of *L. monocytogenes* EP2, the counts for this bacterium in fecal samples and in the intestinal contents from (i) rats inoculated only with *L. monocytogenes* EP2, (ii) rats inoculated with the bacteriocin producing *L. plantarum* DDE11007 and *L. monocytogenes* EP2, and (iii) rats inoculated with the isogenic non-bacteriocin producing *L. plantarum* DDE12305 and *L. monocytogenes* EP2, were not significantly different. The counts remained around 10^8 CFU/g in feces from all animals (data not shown).

Comparison of the rats inoculated only with *L. monocytogenes* EP2 to the rats inoculated with either of the *L. plantarum* strains prior to inoculation with *L. monocytogenes* showed that the presence of the *Lactobacillus* strains resulted in a significant increase of the number of animals where *L. monocytogenes* EP2 had crossed the intestinal barrier (liver: $p = 0.04$ and spleen: $p = 0.02$) (Fig. 1B; Table 1).

4. Discussion

In vitro persistence of *L. monocytogenes* was inhibited in the two-stage CF model by the pediocin AcH producing *L. plantarum* DDE11007 at physical conditions (pH values, anaerobic conditions, temperature and flow-through) simulating the GI tract, clearly indicating a direct effect of bacteriocin production on *L. monocytogenes* EP2 survival. However, the isogenic non-producing *L. plantarum* DDE12305 also reduced the persistence of *L. monocytogenes* EP2, although not nearly as efficiently as its bacteriocin-producing counterpart, particularly for the first (pH=5) fermentor. This second effect may be due to a combination of competition for nutrients and production of organic acids. The immediate removal of *L.*

Table 1

Detection of *L. monocytogenes* in the spleen and liver of rats inoculated with *L. monocytogenes* EP2 only, and rats initially inoculated with *L. plantarum* (DDE11007 or DDE12305) and subsequently with *L. monocytogenes* EP2

<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Listeria monocytogenes</i>
Spleen	1*/8
Liver	1*/8

Number of animals where *L. monocytogenes* were detected/number of animals investigated.

*Same animal.

monocytogenes observed directly after inoculation in both of the fermentors containing the bacteriocin-producing strain (Fig. 1A and B) corresponds with other *L. monocytogenes* inhibition studies. It is known that the presence of the bacteriocin piscicolin 126 reduces the count of *L. monocytogenes* in milk by 4–5 log units immediately after addition of this bacteriocin (Wan et al., 1997), that addition of nisin instantaneously reduce the number of *L. monocytogenes* in broth by 4 log units (Chi-Zhang et al., 2004), and that curvacin A killed 90% of *Listeria innocua* cells in broth (Ganzle et al., 1999).

In the first fermentor (pH=5) of the CF system, the *L. monocytogenes* EP2 counts remained below the detection limit throughout the experiment when the pediocin AcH producing *L. plantarum* DDEN 11007 was present (Fig. 1A). This complete inhibition of *L. monocytogenes* may be a result of the combination of the presence of a high concentration of the bacteriocin at the point of adding *L. monocytogenes*, and an ongoing production of bacteriocin. Chi-Zhang et al. (2004) found that at pH 6.2, the combination of instantaneously added high concentration of nisin and a slow extra addition of nisin throughout the experiment completely inhibited growth of *Listeria* cells.

In the second fermentor (pH=7), the inhibition was only temporary and re-growth of *L. monocytogenes* occurred after approximately 1 day. Similar observations are published by Wan et al. (1997) and Chi-Zhang et al. (2004). An explanation for this re-growth may be the development of resistance of *Listeria* towards the added bacteriocin, which is reported for *L. monocytogenes* in several cases (Wan et al., 1997; Song and Richard, 1997; Bouttefroy and Milliere, 2000; Gravesen et al., 2002a,b; Chi-Zhang et al., 2004). However, the differences between the pediocin AcH mediated inhibition of *L. monocytogenes* observed in the different fermentors may also be due to a pH dependent production of bacteriocin. The pediocin AcH production by *L. plantarum* is known to be optimal and constant between pH=4.0 and pH=6.0 but to decrease at pH 6.5 (Ennahar et al., 1996), corresponding with our results, which show a more efficient inhibition at pH=5 than at pH=7. Alternatively, the combined inhibitory effect of the hurdles represented by a low pH and the presence of bacteriocin may account for the efficient inhibition of *Listeria* observed at pH=5.

Neither of the two *L. plantarum* strains were able to affect persistence of *L. monocytogenes* EP2 in the gut of germ-free rats, even though both of the *L. plantarum* strains colonized at densities of approximately 10^7 CFU/g feces. This result is in accordance with studies which unsuccessfully use *Lactobacillus rhamnosus* (Millar et al., 1993) or a combination of *Bifidobacterium* and *Clostridium* (Zachar and Savage, 1979) to prevent colonization of pathogenic bacteria in the GI tract of premature human infants or in the GI tract of gnotobiotic rats harboring a simple or no bacterial flora, respectively. However, in animals harboring a complex flora, the probiotic *Lactobacillus casei* is reported to reduce the number of *L. monocytogenes* in the stomach, cecum and feces of rats (de Waard et al., 2002) and of *Salmonella typhimurium* in fecal samples of conventional mice (Hudault et al., 1997). This suggests that the

presence of a complex microbial intestinal microflora in combination with the inhibitive strain is needed to prevent *L. monocytogenes* and other pathogenic bacteria from colonizing the GI tract.

Surprisingly, the presence of both the bacteriocin producing and the non-producing *L. plantarum* strains had an effect of *L. monocytogenes* EP2 invasion. The number of rats where *L. monocytogenes* was found in the liver and spleen was significantly larger for the rats inoculated with one of the *L. plantarum* strains prior to the inoculation with *L. monocytogenes* EP2. A putative explanation may be that the lower intestinal pH caused by the lactic acid production of *Lactobacillus* induced *Listeria* virulence genes. Acid-treated *L. monocytogenes* are shown to be more invasive than non-acid-adapted cells (O'Driscoll et al., 1996). However, it should be noted that germ-free rats completely lack the commensal bacteria, which are important for the development of a functional gut mucosal immune system (Pickard et al., 2004). Inoculating the germ-free rats with *L. plantarum* prior to *L. monocytogenes* will induce immune responses and may prime passive uptake mechanisms, which *L. monocytogenes* exploits to cross the epithelial barrier. Consistent with this, previous studies showed that the presence of other bacteria is a prerequisite for the development of colonic lesions in gnotobiotic pigs dosed with pathogenic bacteria (Whipp et al., 1979; McOrist et al., 1993). The observed effect is thus probably not related to specific properties of *L. plantarum*. Finally it should be emphasized that the immune system of gnotobiotics is not representative for that of humans and conventional animals, and that our observations should not be interpreted as an expected effect in non-gnotobiotic hosts.

Acknowledgements

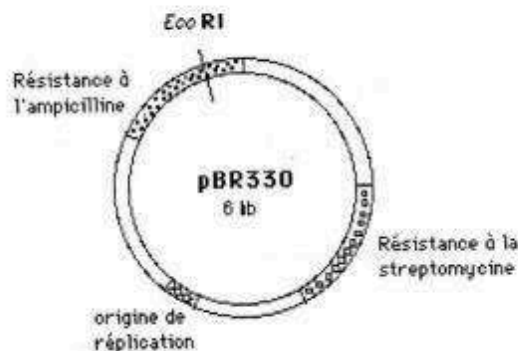
The technical assistance with the two-stage CF system of bachelor student Camilla Martinsen is gratefully acknowledged. This work was financially supported by the Danish FØTEK 3 program (93S-2444-Å99-00052) and the Danish Bacon and Meat Council. The work was conducted in collaboration with Chr. Hansen A/S, Danisco A/S, and the Danish Toxicology Center.

References

- Bouttefroy, A., Milliere, J.B., 2000. Nisin-curvacin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 65–75.
- Brassart, D., Schiffrin, E.J., 1997. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 321–326.
- Cebra, J.J., 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1046S–1051S.
- Chi-Zhang, Y., Yam, K.L., Chikindas, M.L., 2004. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 15–22.
- de Waard, R., Garssen, J., Bokken, G.C., Vos, J.G., 2002. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain shirota against gastrointestinal *Listeria monocytogenes* infection in rats. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 93–100.

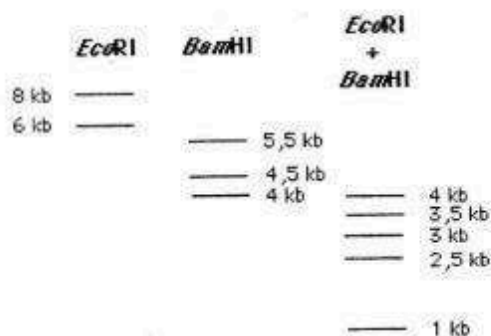
Epreuve de Génétique microbienne et Génie Génétique

- I. Quel avantage majeur fournit le clonage de gènes de mammifères dans un système procaryote, à partir d'ARNm ou de gènes synthétiques par rapport à l'amplification par PCR ou au clonage de gènes natifs ?
- II. Décrire les éléments d'un vecteur d'expression permettant d'avoir la transcription d'un gène cloné.
- III. On souhaite cloner un fragment d'ADN de *Drosophila melanogaster* dans le plasmide pBR330, dont la carte est donnée ci-après.



Les produits de ligation vont ensuite transformer une souche d'*E.coli*.

1. Proposez un protocole de clonage et indiquez comment vous sélectionnez les clones ayant incorporé un plasmide, ceux qui ont incorporé un plasmide recombinant. Comment expliquer la présence de colonies résistantes aux deux antibiotiques ?
2. Un des plasmides recombinants contenant l'insert est digéré par les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI. Après migration et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose, on obtient les profils de restriction suivants :



CONCOURS D'ACCÈS EN 1^{ère} ANNEE POST-GRADUATION MICROBIOLOGIE APPLIQUEE AUX SUBSTANCES ANTIMICRORIENNES

ÉPREUVE DE TECHNIQUES D'ANALYSES BIOLOGIQUES (DURÉE 1H30).

Les défensines constituent une famille de peptides antimicrobiens naturels largement impliqués dans l'immunité non spécifique, ou innée. Une nouvelle défensine (stable entre pH 4 et 8) a été identifiée dans des leucocytes bovins.

1. Afin d'extraire cette défensine, vous rapportez 20kg de rates de bœufs d'un abattoir. Pourquoi utilisez-vous des rates de bœufs et en si grande quantité?
2. Quelles sont les deux premières techniques à effectuer pour obtenir un extrait riche en défensine (ED)? Expliquer brièvement.
3. Sachant que vous devez utiliser du tampon phosphate salé (PBS) composé de 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 , quels seraient le pH et la concentration du PBS ? Comment le préparer ?
($\text{pK}_a : 6,5 / \text{Na} : 23 \text{ g.mol}^{-1} / \text{Cl} : 35,45 \text{ g.mol}^{-1} / \text{K} : 39 \text{ g.mol}^{-1} / \text{P} : 31 \text{ g.mol}^{-1}$)
4. Vous ajoutez à ED du sulfate d'ammonium à une concentration donnée. Vous centrifugez la solution, récupérez le surnageant et jetez le culot. Vous ajoutez plus de sulfate d'ammonium au surnageant. Vous centrifugez à nouveau l'échantillon mais cette fois-ci vous conservez le culot qui contient la molécule d'intérêt.
 - 4.1. Pourquoi faire deux étapes d'addition de sel?
5. Vous solubilisez le culot obtenu précédemment et vous le dialysez durant la nuit contre un grand volume de tampon.
 - 5.1. Pourquoi le sulfate d'ammonium n'est-il pas inclus dans le tampon de dialyse?
 - 5.2. Pourquoi utiliser un tampon plutôt que de l'eau?
 - 5.3. Quel doit être le pH de ce tampon ?
6. Vous injectez l'échantillon dialysé sur une colonne de Sephadex G-50 (1500-30000). Vous collectez la première fraction qui sort de la colonne et jetez les fractions suivantes sortant ultérieurement de la colonne.
 - 6.1. Quelle information vous apporte cette étape ?
7. Vous injectez la fraction collectée, resuspendue dans du tampon acétate pH3, sur une colonne de SP-Cellulose.
 - 7.1. De quel type de chromatographie s'agit-il ?
 - 7.2. L'élution est réalisée par un gradient linéaire de pH, comment doit être ce gradient ? Donnez une autre méthode d'élution.
 - 7.3. Les fractions récoltées ne présentent aucune activité antimicrobienne, pourquoi ?
 - 7.4. Que suggérez-vous afin que l'activité soit détectée ?

8. Vous utilisez un petit échantillon de votre fraction active, qui est maintenant très réduit en volume et clair, sur un gel d'isoélectrofocalisation. Après coloration, vous observez trois bandes étroites. Vous conservez la bande de pI 5.6. Mais vous décidez de réaliser une expérience supplémentaire pour vérifier la pureté de la molécule. Vous découpez la bande de pI 5.6 et faites migrer un échantillon sur une SDS-PAGE en présence de DTT, trois bandes sont observées.

8.1. Pourquoi n'étiez-vous pas convaincu de la pureté de la bande unique sur l'IEF?

8.2. Quel résultat vous apporte la SDS-PAGE?

8.3. Comment confirmer la pureté de la défensine ?

8.4. Pourquoi est-il important de faire la SDS-PAGE après l'IEF?

Bon courage.

Université A Mira de Béjaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Microbiologie

Béjaia le 31/10/2006

Concours de Magister en Microbiologie appliquée
Epreuve de Techniques d'analyses microbiologiques et biochimiques
Durée : 1h 30

- I- Vous avez à produire de la β galactosidase (destinée aux intolérants au lactose) à partir d'une culture d'*Escherichia coli*
- 1- Vous devez isoler *Escherichia coli* à partir d'un mélange de souches d'Entérobactéries. Comment procéder ?(2pts)
 - 2- Après tous les tests présomptifs d'identification (à détailler), vous disposez d'une CPG et d'une HPLC pour effectuer sur la paroi, des tests pouvant confirmer l'espèce *Escherichia coli*. Détailler ces deux méthodes en donnant l'interprétation des résultats. (6pts)
Une fois l'espèce identifiée, vous devez optimiser sa croissance pour une production maximale de la β galactosidase
 - 3- Développer la formule qui vous permet d'estimer l'optimisation de la croissance. (1pt)
 - 4- Proposer deux conditions d'optimisation pour lesquelles vous tracerez les courbes de croissance. (2pts)
 - 5- Vous avez à extraire et évaluer le poids moléculaire de la β galactosidase, comment allez vous procéder ?(3pts)

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Concours d'accès en première année de Doctorat LMD (nouveau système)
en Microbiologie

11 Octobre 2014

Epreuve de Microbiologie :

Question 1 :

La salinité ou la salinisation des terres agricoles cause d'énormes pertes économiques et agricoles. Par ailleurs, de nombreuses recherches sont orientées dans ce sens sur la base de la sélection de bactéries bénéfiques pour la croissance des plantes. Parmi elles, les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR/PGPB) qualifiées d'osmotolérantes occupent une grande place dans ce domaine de recherche, car elles sont dotées de métabolites secondaires intéressants.

- 1) D'après vous, que font ces bactéries pour résister contre la salinité élevée ? par quel moyen arrivent-elles à restaurer la croissance des plantes sur un sol salé (salin) ? citez une espèce.
- 2) Ces bactéries sont généralement dotées d'un équipement enzymatique d'intérêt agricole, citez quelques enzymes, et donnez la principale caractéristique qui leur permet d'être appliquées dans les sols salés.

Question 2 :

1. Définir la notion de métabolite secondaire :
2. Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères (citez les), mais la classification la plus utilisée en recherche fondamentale est celle basée sur : ?

En utilisant votre réponse, comme moyen de classement, pouvez-vous distinguer 5 grandes familles d'antibiotiques ?
3. Développez une stratégie de sélection de souches productrices d'antibiotiques et donnez les facteurs influençant.
4. Donnez un protocole de purification d'un antibiotique antifongique (non polyénique) produit par un actinomycète (sous forme de schéma). Justifiez le choix de la technique préconisée.

Université Hassiba Ben-Bouali de Chlef
Concours Doctorat LMD : Génomique Microbienne
29/10/2014
Epreuve de Microbiologie (sujet 2)

1. Quel milieu de culture utiliseriez-vous pour tester si une bactérie est capable d'utiliser un sucre particulier, par exemple le glucose? Pourquoi ? (1 point)
2. Citer deux espèces du genre *Yersinia* et indiquez si elles sont pathogéniques pour les humains, les animaux, ou les plantes. (2 points)
3. Décrire le mécanisme de sécrétion des protéines extracellulaires par le système de sécrétion de type II chez les bactéries. (3 points)
4. Citer les deux groupes majeurs de toxines produites par les bactéries et décrire leurs caractéristiques. (2 points)
5. Expliquer le fonctionnement général d'un système de régulation à deux composants. (3 points)
6. Décrire, à l'aide d'un schéma, les deux niveaux de régulation contrôlant l'expression de l'opéron codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse du tryptophane. (3 points)
7. Citer les postulats de Koch. Il existe des exceptions où il est impossible d'appliquer ces postulats, citer 2 de ces exceptions. (3 points)
8. Définir le terme "taux de prévalence" d'une maladie. (1 point)
9. Qu'appelle-t-on "une maladie pandémique". (1 point)
10. Qu'est ce qu'un "îlot de pathogénicité". (1 point)



Epreuve Microbiologie alimentaire (Variante 1)

Question 01 (10 points)

Pour de multiples raisons il est indispensable de contrôler le développement des micro-organismes, en général pour éviter les effets nuisibles de ceux-ci sur l'homme et les animaux (bactéries pathogènes par exemples) ou sur les produits de l'activité humaine (altération des aliments, dégradations diverses). Les moyens de lutte sont nombreux et variés. Ils doivent tenir compte du micro-organisme lui-même et de son environnement ainsi que de l'intensité de l'action souhaitée. Pour la conservation des aliments ou la destruction des microorganismes dans l'environnement dites quels sont les agents antimicrobiens utilisés et pourquoi?

Question 02 (3 points)

Quelle est la classification des microorganismes dans les industries agro – alimentaires ?

Question 03 (4 points)

Quelles sont les principales interactions susceptibles de se produire dans un système aliment/microorganisme/ consommateur ?

Question 04 (3 points)

Quelles sont les conditions de la multiplication des microorganismes dans les aliments ?

Bonne chance

Formation doctorale -LMD

Spécialité : Structure et dynamique des écosystèmes

(Epreuve : systématique microbienne (univ Larbi Ben M'hidi _Oum EL_Bouaghi 2012/2013

1Citer les différences entre Streptocoques , Pneumocoques et Staphylocoques

2Donner les caractéristiques des Rickettsies et expliquer les différences avec les Chlamydiae

3Donner la différence entre coagulase libre et coagulase liée

4Expliquer : streptolysine , clumping factor , corynéforme , flagella , bactériocine et ssp

5Expliquer l'unité taxonomique de base en bactériologie



Epreuve de : plasmide et technique de génie génétique

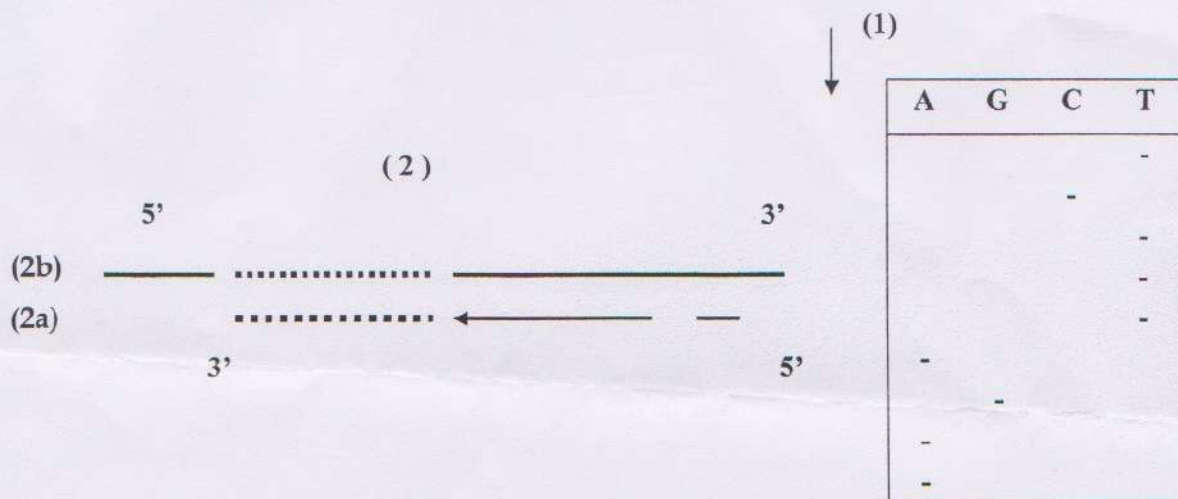
Question 1 (04pts):

Soit, représenté ci-dessous sur la ligne (2b), un segment d'ADN monobrin, inséré dans le virus M13. Son séquençage est effectué par la technique de Sanger, avec une amorce XY.

- En examinant le schéma (1) représentant une partie de l'autoradiogramme du gel de migration, écrire directement sur le schéma (2) à l'emplacement des points.

En (2a) : la séquence nucléotidique lue directement sur ce schéma du film.

En (2b) : la séquence réelle du segment de l'ADN monobrin correspondant.



Questions 2 (06 pts):

On souhaite étudier le gène de la souris homologue au gène M du bœuf qui a été cloné dans un autre laboratoire. Pour cela, on essaie de cloner au site *Eco* RI du vecteur plasmidique pBR330 (voir schéma) un fragment *Eco* RI-*Eco* RI d'ADN génomique de souris portant le gène homologue au gène M du bœuf.

a- Proposez un protocole de clonage et indiquez comment vous sélectionnez les clones recombinants.

b- Un des plasmides recombinants contenant le gène M (appelé pBM1) est digéré par les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI. Après migration et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium, on obtient les profils de restriction suivants:

- Donnez la carte de restriction du plasmide recombinant pBM1.

c- Un transfert sur membrane de nitrocellulose (Southern blot) est préparé à partir du morceau du gel de la question b correspondant à la double digestion *Eco* RI-*Bam* HI. La membrane est hybridée avec une sonde constituée du plasmide pBR330 marqué au ³²P. Parmi les 5 fragments générés lors de la double digestion *Eco* RI-*Bam* HI, à quel(s) fragment(s) s'hybridera la sonde?

Exercice 3 (10pts):

a- Un fragment d'ADN de 1kb a été fragmenté par 4 enzymes de restriction : *Bam*HI, *Pst* I, *Xho* I et *Mbo* I dont les sites reconnus sont : ***Bam*HI** : 5' G/GATCC 3' ; ***Pst* I** : 5' CTGCA/G 3' ; ***Xho* I** : 5' C/TCGAG 3' ; ***Mbo* I** : 5' /GATC 3'.

- Recopier la séquence de l'ADN et encadrer les sites de restriction des quatre enzymes en indiquant la position des coupures.
- Donner les fragments générés par chaque enzyme.

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'
 3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

- Choisir l'enzyme de ligation correspondante. Justifiez votre réponse.

b- Dans une expérience de biologie moléculaire, on est amené à insérer ce fragment de 1kb dans le plasmide pUC18. Après transfection dans une souche appropriée d'*E.coli* en présence d'ampicilline et de réactifs permettant de mettre en évidence la synthèse de β -galactosidase, on observe des colonies blanches et des colonies bleues.

- A quoi correspondent ces 2 types de colonies ?
- Pourquoi opère-on en présence d'ampicilline ?

c- Vous êtes en train de faire un transfert Southern. Vous vous êtes rendu à l'étape où vous devez mettre le gel dans une solution de NaOH avant de faire le transfert comme tel. Vous êtes très pressés et vous décidez de sauter cette étape de traitement du gel dans le NaOH et vous passez directement au transfert. Lorsque vous faites une hybridation de ce transfert Southern avec une sonde qui normalement devrait s'hybrider vous remarquez qu'il n'y a aucune hybridation. Que c'est il passé?

Sujet 3

- Donner la taxonomie des Actinomycètes?
- Enumérer les différences physiologique et morphologique des Actinomycètes?
- Comment se fait la division chez les Actinomycètes?
- Est-il possible d'étudier l'antibiogramme chez ces derniers ? si oui comment ?
- Quel est le problème associé aux antibiotiques ?
- Décrivez le test IMViC ?

