

# Technique de laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire

## **1. Test de viabilité**

0,5mL d'échantillon S est dilué dans 0,5 mL de bleu de méthylène tamponné à pH 4 (bleu de Funk). Le mélange est monté en cellule de Malassez et 400 cellules sont comptées. 14 cellules apparaissent bleues et 386 sont non colorées.

- 1.1. Quelle est la signification de la différence de coloration observée?
- 1.2. Donner le résultat du test de viabilité.
- 1.3. Calculer le nombre de cellules viables par mL de suspension S.

## **2. Mise en évidence des levures par immunofluorescence**

Pour les productions faisant appel à *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171, le laboratoire de microbiologie a mis au point une technique d'immunofluorescence permettant de vérifier que cette souche n'est pas contaminée par une autre levure.

Le document 6 présente les différentes étapes mises en œuvre pour la réalisation de cette technique.

2.1. Analyser les différentes étapes correspondant à la parue 3 du document 6 (préparation microscopique).

2.2. Préciser le nom de la technique d'immunofluorescence utilisée. Indiquer les intérêts de cette technique par rapport à d'autres techniques d'immunofluorescence.

2.3. La lecture des lames est réalisée grâce à un microscope à épifluorescence.

2.3.1. Présenter et commenter un schéma simplifié d'une microscope à épifluorescence. Expliquer brièvement son fonctionnement.

2.3.2. Comment apparaîtra :

- la levure de production (*S. cerevisiae* CBS 7777).
- une levure contaminante?

2.4. Quel est l'intérêt de procéder à un épuisement du sérum anti *S. cerevisiae* CBS 1171 (partie 2 doc. 6)?

2.5. Le document 7 montre les intensités de fluorescence obtenues pour différentes souches de levures de production et contaminantes.

2.5.1. Dans le cadre de la recherche de contaminants par des levures sauvages peut-on affirmer que cette méthode est fiable à 100%? Justifier la réponse.

2.5.2. La brasserie utilise couramment *S. cerevisiae* CBS 1171, *S. uvarum* CBS 395 et *S. cerevisiae* CBS 1395.

Ce test permet-il de s'assurer avec certitude que la souche CBS 1171 utilisée actuellement n'est pas contaminée par une autre souche de production.

2.5.3. Dans un avenir proche, la brasserie envisage d'utiliser *S. uvarum* CBS 382. La technique actuelle permettant de mettre en évidence *S. cerevisiae* CBS 1171 sera-t-elle remise en question? justifier la réponse.

En cas de réponse positive, proposer une modification du protocole (doc.6) visant à rendre les test opérationnel.

## Document 6 :

### Étapes nécessaires à la mise en œuvre de la technique de la d'immunofluorescence

Étape n°1 : Obtention du sérum anti *S.cerevisiae* CBS 1171

Celui-ci est obtenu par injection de cellules entières de cette souche de levure à un lapin. Le lapin reçoit chaque semaine environ  $10^6$  cellules en suspension dans 0,5 mL d adjuvant de Freund, par injection intra-musculaire.

Étape n°2 : Épuisement du sérum

On épuise le sérum anti *S.cerevisiae* CBS 1171 par une autre souche de production: *S. Uvarum* CBS 395. Le sérum est mis en contact avec une suspension de  $10^{10}$  cellules pendant quelques heures à 37°C, puis une nuit à 4°C. Les cellules sont alors séparées du sérum. L'opération est répétée 3 fois.

Étape n°3 : Préparation microscopique

Étalement du levain à examiner sur une lame de microscope, séchage du frottis et fixation à l'alcool.

Addition du sérum anti *S. cerevisiae* CBS 1171 dilué au 1/10 pendant 30 minutes en atmosphère humide.

Rinçage au P.B.S. (phosphate buffer saline).

Addition du sérum anti-immunoglobulines de lapin marqué à l'isothiocyanate de fluoresceine, dilué au 1/100 pendant 30 minutes.

Rinçage au P.B.S.

Action d'une solution de Bleu d'Evans diluée au 1/1000 pendant 30 minutes.

Rinçage rapide au P.B.S. puis séchage et montage de la préparation à l'aide de glycérine tamponnée pH 7.2.

*Le Bleu d'Evans, colorant qui pénètre dans les cellules, émet une fluorescence rouge.*

*L'isothiocyanate de fluorescéine émet une fluorescence verte.*

## Document 7 :

Fluorescence de diverses souches de levures avec le sérum anti *S. cerevisiae* CBS 1171 épuisé par *S. uvarum* CBS 395.

<b>Levures de production</b>	<b>Fluorescence</b>
<i>S. cerevisiae</i> CBS 1171	+++
<i>S. cerevisiae</i> CBS 1395	-
<i>S. cerevisiae</i> M 265	-
<i>S. uvarum</i> CBS 395	-
<i>S. uvarum</i> CBS 382	++
<i>S. uvarum</i> CBS 1513	-
<b>Levures sauvages</b>	<b>Fluorescence</b>
<i>S. diastaticus</i> CBS 1782	-
<i>S. bayanus</i> CBS 1538	-
<i>S. delbrucki</i> CBS 1146	-
<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 683	-
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i> CBS 6317	++
<i>Hansenula anomala</i> M 520	-
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i> CBS 371	-
<i>Candida guilliermondii</i> CBS 6316	-
<i>Candida tropicalis</i> CBS 94	-
<i>Pichia ohmeri</i> CBS 1950	-
<b>Intensité de fluorescence</b>	
+++	Fluorescence verte fortement positive
++	Fluorescence verte positive
+	Fluorescence verte faible
-	Absence de fluorescence verte