

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR**BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 8 h 00

Coef. : 8

SESSION 2000**RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE**

*Aucun pipetage à la bouche n'est autorisé et le port de lunettes de sécurité est recommandé.
4 feuilles de papier millimétré par candidat*

OPERATIONS DE CONTRÔLES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES**PREMIER JOUR**

Durée : 6 heures 30 plus 1 heure de repas pris sur place

Ce sujet comprend 4 opérations susceptibles d'être mises en œuvre en biotechnologie. Elles constituent des manipulations indépendantes et peuvent être réalisées dans un ordre différent de celui de leur présentation.

***Remarque :** chaque rubrique du sujet est précédée d'un paragraphe « Matériel et réactifs » où ne figurent que les éléments particuliers exigés par la manipulation. Le matériel usuel du laboratoire, cependant nécessaire, n'est pas mentionné mais est à la disposition des candidats. Toutes les valeurs expérimentales seront communiquées immédiatement aux examinateurs.*

PREMIÈRE PARTIE : (20 points)**CONTRÔLE D'UNE SOUCHE HAPLOÏDE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Un laboratoire souhaite contrôler des souches de levures destinées à des expériences d'amélioration par génétique classique, en particulier leur type sexuel a ou α .

1.1. Détermination du type sexuel de la levure

Le contact de deux souches haploïdes de signe sexuel opposé, peut entraîner leur fusion ou conjugaison en un zygote. Celui-ci présente au début une forme caractéristique en haltère, puis une taille supérieure à celle des cellules haploïdes initiales.

1.1.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 2 petites boîtes de Pétri et une grande de milieu gélosé stérile YPD
- 1 souche haploïde de *Saccharomyces cerevisiae* de type sexuel a (Mat a), cultivée sur milieu YPD
- 1 souche haploïde de *Saccharomyces cerevisiae* de type sexuel α (Mat α), cultivée sur milieu YPD
- la souche H haploïde, à étudier, sur milieu YPD
- 4 anses à usage unique stériles

BOGEN

1.1.2. Mode opératoire

- Au centre de chaque petite boîte de milieu YPD, déposer successivement en touche, à l'aide d'une anse stérile, la souche H et l'une des souches de type sexuel connu, puis mélanger intimement.
- Incuber à 28°C pendant 5 heures.
- Observer à l'objectif 40, à l'état frais, en eau physiologique, des prélèvements du mélange, au temps 3, 4 et 5 heures.

1.1.3. Résultats

- Montrer un état frais présentant des zygotes à l'examineur.
- Dessiner l'ensemble des morphologies particulières observées.
- Conclure sur le type sexuel de la souche H.

1.2. Contrôle de pureté de la souche H

- Isoler la souche H sur milieu YPD et incuber 24 h à 28°C.

DEUXIEME PARTIE : (20 points)

CONTRÔLE DE LA VIABILITE D'UNE SOUCHE BACTERIENNE NECESSAIRE A L'AMPLIFICATION D'UN VECTEUR NAVETTE

Une souche d'*Escherichia coli* est rendue compétente par un nouveau traitement au chlorure de calcium – chlorure de manganèse.

La suspension initiale est une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance à 0,4 d'absorbance (600 nm). Un volume de 20 mL de culture est centrifugé, puis le culot bactérien est repris dans 2 mL de solution de traitement.

On évalue la viabilité des cellules après traitement par dénombrement sur milieu gélosé, par la technique des « spots ».

2.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 2 mL de suspension de bactéries traitées.
- 1 flacon d'eau physiologique stérile.
- Tubes à hémolyse stériles
- 2 géloses nutritives coulées en boîtes de Pétri.

2.2. Mode opératoire

- Sachant qu'une unité d'absorbance correspond à $5 \cdot 10^8$ cellules par mL, réaliser une gamme de 6 dilutions successives, judicieusement choisies.
- Un spot donne un résultat lisible s'il apparaît entre 10 et 20 colonies.
- Déposer 10 μ L de chaque dilution, en spot sur la gélose. Réaliser les essais en double.
- Laisser sécher les dépôts avant incubation, 18 h à 37°C.

2.3. Compte-rendu

- Justifier le choix des dilutionsensemencées.

TROISIEME PARTIE : (70 points)**DETERMINATION DU POURCENTAGE DE GC D'UN ADN EUCARYOTE**

On dispose d'une solution d'ADN que l'on se propose de doser, de concentrer, et dont on souhaite déterminer le pourcentage en GC.

3.1. Matériel et réactifs

On dispose de :

- 10 mL de solution d'ADN à doser en tampon SSC
- 20 mL de tampon SSC (Sodium saline citrate)
tampon citrate de sodium 0,015 moles par litre, pH 7, NaCl 0,15 moles par litre.
- 10 mL de solution étalon d'ADN de thymus de veau à 400 µg/mL
- Réactif à la diphénylamine en flacon distributeur
- 12 mL d'acide trichloracétique (ATCA)
- 20 mL de formamide
- 5 mL d'éthanol à 95%

3.2. Dosage absorptiométrique de l'ADN dans l'U.V.

- Préparer en tube à hémolyse 2,1 mL de dilution au 1/21^{ème} de la solution d'ADN, en tampon SSC.
Opérer en présence d'un examinateur
Mesurer les absorbances à 260 nm et à 280 nm de cette dilution contre du tampon SSC, en utilisant des cuves quartz.

Compte-rendu :

- Déterminer le rapport $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$; que peut-on en déduire quant à la pureté de cet ADN ?
- Sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond en moyenne à 50 µg d'ADN par mL, déterminer la concentration en ADN de la solution.

3.3. Dosage colorimétrique de l'ADN

Il est basé sur la réaction spécifique des 2-désoxyribose avec la diphénylamine, en milieu acide à chaud.

- On dispose d'une solution étalon d'ADN de thymus de veau à 400 mg/L.
A l'aide de cette solution, réaliser une gamme d'étalonnage en tubes à essai selon le protocole ci-dessous :

Quantité en µg d'ADN par tube	0	200	400	600	800
ATCA	Qsp 2 mL				
Diphénylamine (mL)	4	4	4	4	4

- Mélanger au vortex puis boucher les tubes avec du papier d'aluminium.
- Chauffer 10 minutes à 100°C puis refroidir rapidement sous un courant d'eau froide.
- Lire l'absorbance à 595 nm contre le tube 0.
- Doser la solution d'ADN inconnue en opérant selon le même protocole que pour la gamme d'étalonnage ; réaliser 2 essais. La prise d'essai à utiliser sera déduite du résultat obtenu en 3.2.

Compte-rendu :

- Tracer la courbe d'étalonnage et déterminer la concentration de la solution d'ADN de mammifère.
- Comparer le résultat obtenu avec celui trouvé en 3.2., puis discuter.

3.4. Concentration de l'ADN

A partir de la solution fournie, on souhaite préparer 250 μL de solution d'ADN à 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour cela, un volume adéquat, à déterminer, de la solution fournie d'ADN est précipité par l'éthanol. Le précipité d'ADN est, après séchage, redissout et concentré dans 250 μL de tampon SSC.

- A partir de la valeur d'absorbance à 260 nm déterminée en 3.2., calculer le volume de solution d'ADN fournie à précipiter.
- Déposer ce volume dans un microtube. Ajouter 2,5 volumes d'éthanol à 95%. Laisser 15 minutes à 4°C. Centrifuger 15 minutes à vitesse maximale.
- Eliminer le surnageant et sécher le précipité obtenu pendant 15 minutes autour du bec. Le montrer à un examinateur.
- Ajouter 250 μL de tampon SSC.
Remettre ce tube à l'examinateur ; la redissolution se fera pendant la nuit.

Compte-rendu :

- Indiquer le calcul du volume de solution précipitée.

3.5. Etude de la fusion thermique de l'ADN en présence de formamide

- Préparer un "mix" en petit erlen en mélangeant :

15 mL	de formamide
10 mL	de tampon SSC
5 mL	de solution d'ADN inconnu

Ajouter les réactifs dans l'ordre et opérer dans la glace.

Attention : la formamide est toxique : éviter tout contact avec la peau.

- Déposer 2 mL de ce « mix » par tube dans 10 tubes à hémolyse marqués respectivement 0°C - 100°C - 30°C - 35°C - 40°C - 45°C - 50°C - 55°C - 60°C - 65°C
- Stocker ces tubes dans la glace, après les avoir bouchés hermétiquement avec du papier d'aluminium et du parafilm.
- Pour les tubes autres que 0°C et 100°C, opérer de la manière suivante :
 - Incuber chaque tube pendant 15 minutes, à la température correspondante (35° pour le tube 35° C,.....).
 - Le placer alors immédiatement dans la glace et l'y laisser 5 minutes.
 - Lire alors l'absorbance à 275 nm, en cuves spectrophotométriques UV semi-micro à usage unique, contre un blanc constitué de 1 mL de formamide et de 1 mL de tampon SSC.
- Laisser le tube dans la glace si le(s) spectrophotomètre(s) UV n'est pas disponible.

Remarque : l'absorbance est lue à 275 nm et non à 260 nm car la formamide absorbe très fortement à cette dernière longueur d'onde, ainsi que la cuve UV à usage unique.

- Le tube 0°C est laissé dans la glace jusqu'au moment de la lecture de l'absorbance à 275 nm.
- Le tube 100°C est placé 5 minutes dans un bain-marie bouillant puis refroidi immédiatement 5 minutes dans la glace avant la lecture de l'absorbance à 275 nm.

Compte-rendu :

- Tracer la courbe $A_{275 \text{ nm}} = f(\text{température d'exposition})$.
Décrire et interpréter son allure. Quel est le rôle des tubes 0°C et 100°C ?
Déterminer graphiquement la T_m (température moyenne de fusion) de l'ADN eucaryote dans les conditions de l'expérience.

- En déduire le pourcentage en GC de cet ADN en utilisant la formule :

$$T_m = 81,5 + (16,6 \times \log [\text{Na}^+]) + (0,41 \times \% \text{GC}) - (0,65 \times \% \text{F}).$$

Tampon citrate NaCl, pH7, 0,15 moles par litre.

QUATRIEME PARTIE : (50 points)

CONTRÔLE D'UN CARACTERE GÉNÉTIQUE D'UNE LIGNEE CELLULAIRE.

L'une des méthodes d'évaluation du pouvoir mutagène de substance génotoxique consiste à rechercher à partir de cellules en culture et après exposition à la substance à tester l'apparition de mutation au locus HGPRT.

Les cellules HGPRT(-) deviennent sensibles à l'action cytotoxique de l'aminoptérine même en présence d'hypoxanthine et de thymidine (mélange HAT).

On se propose, à l'aide d'une méthode colorimétrique d'évaluation de la viabilité d'une population cellulaire : méthode au MTT (Bromure de diméthyl-thiazoldiphényl tétrazolium), de déterminer la sensibilité au mélange HAT des cellules d'une lignée cellulaire ayant été soumise à l'action d'une substance mutagène.

4.1. Quantification colorimétrique des cellules

4.1.1 Matériel et réactifs

On dispose de :

- 1,5 mL d'une suspension de cellules à étudier cultivant en monocouche.
- 10 mL de milieu de culture complet
- 0,5 mL de solution bleu Trypan à 0,4%
- Hématimètre et compteur de cellules
- Plaque de culture de 96 puits
- 0,3 mL d'une solution de MTT à 10 mg par mL (distribuée à la demande)
- 5 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Solution de tampon phosphate salin (PBS)

4.1.2 Numération et ajustage de la suspension cellulaire

- Réaliser une numération de la suspension cellulaire en présence de bleu Trypan à 0,1 % final.
La numération sera montrée à un examinateur.
- Préparer 1 500 µL de suspension à $5 \cdot 10^5$ cellules par mL en milieu de culture complet .
Utiliser rapidement cette suspension cellulaire pour les deux manipulations suivantes.

4.1.3 Mesure de la réduction du MTT

Les cellules vivantes sont capables de réduire le MTT jaune et hydrosoluble en un dérivé insoluble violet. L'intensité de la réduction révélée par l'intensité de la coloration est fonction du nombre de cellules vivantes.

- A partir d'une suspension préparée, distribuer dans la plaque de culture en double essai les quantités de cellules suivantes par puits : 10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 et 60 000 sous un volume final de milieu de culture de 120 µL. Réaliser en A1 et B1 les tests témoins pouvant servir de blanc optique.
- Placer les cellules 2,5 heures à 37 °C dans l'étuve à CO₂ à 5 %.
- Distribuer 10 µL de solution de MTT.
- Incuber les cellules 1 heure à 37 °C dans l'étuve à CO₂ à 5 %.
- Après ce délai, éliminer le milieu dans le bac de Javel.
- Ajouter 100 µL de DMSO et agiter 10 minutes.
- Remettre la plaque clairement identifiée à un membre du jury qui se chargera de la lecture de l'absorbance à 570 nm par référence aux témoins en A1 et B1.

BOGEN

4.1.4 Résultats

- Déterminer la concentration cellulaire .
- Présenter le protocole suivi, tracer la courbe représentative de la variation d'absorbance à 570 nm en fonction du nombre de cellules par puits et l'analyser.

4.2 Etude de la sensibilité de la lignée au réactif HAT

4.2.1 Matériel et réactifs

On dispose de :

- 250 μ L de solution stock de mélange HAT (H : 10 mmol/L, A : 40 μ mol/L, T : 1,6 mmol/L) en milieu de culture
- Plaque de culture utilisée en 4.1
- Barrettes de cupules

4.2.2 Mode opératoire

- Distribuer 60 μ L de la suspension ajustée à 5.10^5 cellules par mL dans 12 cupules de la plaque.
- Laisser sédimenter les cellules 2 heures à 37 °C dans l'étuve à CO₂.
- A partir de la solution du mélange HAT concentré disponible, réaliser une série de dilutions successives de raison 1/3, en milieu de culture complet sous un volume de 100 μ L, de 1/3 à (1/3)¹⁰. Utiliser les barrettes de cupules pour ces dilutions.
- Incuber à 37 °C en présence de 5 % de CO₂ jusqu'au lendemain.

4.2.3 Résultats

Donner sous forme de tableau les dilutions réalisées et la composition des différentes cupules.
Quel résultat caractériserait une lignée HGPRT (-) ?

A LA FIN DE L'EPREUVE REMETTRE CE SUJET AVEC LA COPIE.

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée : 8 h 00

Coef. : 8

SESSION 2000

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE

Aucun pipetage à la bouche n'est autorisé et le port de lunettes de sécurité est recommandé.

DEUXIEME JOUR

Durée : 1 heure 30 minutes (L'épreuve débutera à 10 h 30)

PREMIERE PARTIE

Contrôle de pureté de la souche H

Lire le résultat de l'isolement et conclure.

DEUXIEME PARTIE

Contrôle de la viabilité de la souche d'*Escherichia coli*

- Lire les dénombrements et présenter les résultats.
- A partir de ces résultats et des données du premier jour, calculer le % de survivants dans la culture après traitement. Conclure sachant qu'un traitement habituel au chlorure de calcium permet d'obtenir au maximum 10% de survivants.

TROISIEME PARTIE

Concentration de l'ADN

- Préparer en tube à hémolyse 2,1 mL de dilution au 1/21^{ème} de la solution d'ADN concentré, en tampon SSC. Mesurer l'absorbance à 260 nm de cette dilution contre du tampon SSC, en utilisant des cuves en quartz.
Cette mesure d'absorbance doit être effectuée en présence de l'examineur.
- Déterminer la concentration en ADN de la solution concentrée .
- Conclure par rapport à l'objectif visé de 600 µg/mL.

QUATRIEME PARTIE (SUITE)

Contrôle du caractère HGPRT(-) d'une lignée cellulaire.

- Pour visualiser l'action du réactif HAT sur la lignée étudiée, le MTT a été distribué dans les cupules ensemencées la veille. Après dissolution par apport de solvant, la lecture des absorbances a été réalisée.
- A partir des absorbances mesurées :
 - tracer la courbe représentative de la variation d'absorbance à 570 nm en fonction du logarithme décimal de l'inverse de la dilution finale du réactif HAT
 - en déduire la concentration finale du réactif à utiliser dans le cas où l'on voudrait sélectionner des cellules HGPRT (+) mélangées aux cellules de la lignée étudiée.