

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR**BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 8 h 00

Coef. : 8

SESSION 2004

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE*Calculatrice autorisée. Une feuille de papier millimétré.***RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT DANS L'INDUSTRIE LAITIÈRE****PREMIER JOUR***Durée : 5 heures 30*

Le département « Recherche et Développement » d'une industrie fromagère est chargé de la mise au point de la fabrication d'une nouvelle variété de fromage « pur chèvre ».

Dans l'industrie laitière, les micro-organismes qui portent le plus atteinte aux processus fermentaires sont les phages de bactéries lactiques. Ces derniers sont responsables de 98 % des accidents de fabrication.

Les levains utilisés pour la fabrication des fromages étant susceptibles d'être contaminés par des phages, de nombreuses études sont réalisées pour trouver des méthodes de prévention.

À l'occasion de ces études, un gène de résistance aux phages du biovar *diacetylactis* de *Lactococcus lactis* sous-espèce *lactis* a été cloné puis transféré dans différentes souches de ferments lactiques utilisés industriellement.

Afin d'apprécier l'efficacité de ce transfert génétique, on cherche :

- à quantifier l'expression, par dosage immunologique, d'une protéine de résistance aux phages, nommée « TIG », codée par ce gène ;
- à évaluer l'impact de cette insertion d'ADN dans la qualité organoleptique du fromage fabriqué à l'aide de ce ferment.

PREMIÈRE PARTIE :**Contrôle de matériel génétique avant clonage (53 points)**

Une séquence de 1000 à 1300 paires de bases de l'ADN génomique de *Lactococcus lactis*, délimitée par deux sites de restriction de l'enzyme E1, confère une résistance aux phages.

Lors d'une manipulation antérieure, deux fragments d'ADN génomique de *Lactococcus lactis* ont été récupérés (fragment X et fragment Y). On se propose de vérifier la présence de la séquence de résistance dans ces deux ADN sources, en vue de leur insertion dans le plasmide P.

Le plasmide P ne possède pas de site de restriction pour l'enzyme E1 mais peut être linéarisé par l'enzyme E2 compatible avec E1.

BOGEN

1.1. Réactifs

- solution d'ADN source X à 25 ng. μL^{-1} , notée « X »
- solution d'ADN source Y à 25 ng. μL^{-1} , notée « Y »
- solution de plasmide P à 40 ng. μL^{-1} , notée « P »
- endonucléase de restriction E1 à 10 U. μL^{-1} , notée « E1 »
- endonucléase de restriction E2 à 10 U. μL^{-1} , notée « E2 »
- tampon d'hydrolyse Tp1 10X (10 fois concentré), noté « Tp1 »
- tampon d'hydrolyse Tp2 10X (10 fois concentré), noté « Tp2 »
- eau distillée, notée « eau BM »
- solution de marqueur de taille prêt à l'emploi en solution tampon de charge, notée « MT »
- solution de tampon de charge 6 X, notée « TCh »

1.2. Hydrolyse des ADN sources et du plasmide

1.2.1 Mise au point du protocole d'hydrolyse

Selon les indications du protocole suivant, construire un tableau de manipulation donnant la composition exacte des trois mélanges réactionnels correspondant aux trois digestions.

Soumettre ce tableau à un examinateur avant de manipuler.

Protocole :

- hydrolyse n°1 : 100 ng d'ADN source X
+ 10 U d'enzyme E1
+ tampon Tp1 1 X final
+ « eau BM » qsp 15 μL
- hydrolyse n°2 : idem avec ADN source Y
- hydrolyse n°3 : 100 ng de plasmide P
+ 10 U d'enzyme E2
+ tampon Tp2 1 X final
+ « eau BM » qsp 15 μL

1.2.2 Manipulation

- Réaliser les trois digestions dans des microtubes en suivant les indications du document 1. Ce document sera distribué après vérification par un examinateur du tableau de manipulation.

Montrer la réalisation d'une des digestions à un examinateur.

- Centrifuger les tubes quelques secondes puis les placer à 37°C pendant 1h.

1.3. Analyse sur gel d'agarose à 0,7 % (m/v)

- Ajouter 3 μL de la solution tampon de charge dans chacun des trois tubes. Centrifuger quelques secondes et conserver les tubes dans la glace.

Signaler à l'examinateur que les dépôts peuvent être réalisés.

- Déposer à la demande d'un examinateur les trois échantillons ainsi que le marqueur de taille, selon la feuille d'identification fournie. Le volume d'échantillons déposé sera indiqué par un examinateur.

Montrer la réalisation d'un dépôt à un examinateur.

- La migration et la révélation seront réalisées par un examinateur.

Compte rendu

- Les résultats obtenus seront communiqués et exploités le 2^{ème} jour.

DEUXIÈME PARTIE

Étude de la résistance aux phages d'une bactérie lactique recombinante (47 points)

Le plasmide recombiné a été transféré dans une souche de bactérie lactique *Lactobacillus bulgaricus* appelée « LbR1 ». Une étude de sa résistance effective aux phages est entreprise.

Lors d'un accident de fabrication, un lysat phagique S a été isolé du lactosérum.

A partir de ce lysat, on a préparé deux suspensions de titres différents.

- l'une, S1, est utilisée pour tester la résistance aux phages de la souche recombinante LbR1 ;
- l'autre, S2, pour étudier l'effet de la congélation sur la conservation de ces phages.

2.1. Étude de la résistance aux phages de la souche recombinante

La mesure de la sensibilité de la souche recombinante est réalisée à partir du lysat S1. Cette mesure consiste à évaluer le titre de S1 sur la souche LbR1 et à le comparer au titre connu de ce lysat (10^{10} UFP.mL⁻¹) déterminé sur une souche sensible.

La méthode des plages de lyse, technique des spots, est utilisée pour cette première étude.

2.1.1 Réactifs

- 1 mL de suspension phagique titrée et notée « S1 »
- 10 mL de suspension de souche LbR1 ajustée à 10^8 UFC.mL⁻¹ notée « LBR1 »
- 2 boîtes de gélose Mueller Hinton sèches

2.1.2 Protocole du titrage

- Sur 2 boîtes de gélose, réaliser un ensemencement en nappe par inondation de la souche LbR1 testée.
- Laisser sécher les boîtes à l'étuve.
- A partir du lysat S1, réaliser une gamme de dilution de raison 1/10, de 10^{-1} à 10^{-8} sous un volume de 1 mL.
- Déposer 10 µL de chaque dilution sur une nappe de LbR1, en spot. Réaliser l'essai en double.
- Laisser sécher les dépôts.
- Retourner les boîtes et les incuber 18 à 24 heures à 37°C.

2.2 Titrage du lysat décongelé S2

La qualité de la conservation est évaluée par comparaison des titres du lysat avant et après congélation. Le titre du lysat S2, avant congélation, a déjà été déterminé (10^7 UFP.mL⁻¹).

La méthode des plages de lyse, technique de la double couche, est utilisée pour cette seconde étude.

2.2.1 Réactifs

- 5 mL d'une suspension phagique notée « S2 »
- 5 mL d'une culture en bouillon de la souche sensible, notée « BS »
- 25 mL d'eau peptonée
- 8 gélose Mueller Hinton coulées en boîtes de Pétri
- 8 tubes de gélose molle maintenue en surfusion, notés " top agar "
- 5 mL de solution de CaCl₂ à 1 mol.L⁻¹

2.2.2 Manipulation

2.2.2.1 Ajustage de la suspension bactérienne « BS »

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de la préculture fournie.
- Ajuster la suspension à 10^8 bactéries.mL⁻¹ en eau peptonée.

*L'absorbance limite de linéarité du spectrophotomètre est de 0,6.
1 unité d'absorbance à 600 nm correspond à 5.10^8 bactéries.mL⁻¹.*

2.2.2.2 Titration de S2

Dilution de la suspension de phages

- Réaliser à partir de la suspension S2 une série de dilutions de raison 1/10 en eau peptonée, de 10^{-1} à 10^{-5} , dans des tubes à hémolyse, sous un volume de 1 mL.

Adsorption des phages sur les bactéries sensibles :

- Cette opération est effectuée avec les suspensions-dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} et en double essai.
- Dans des tubes à hémolyse stériles, mélanger 0,1 mL de suspensions-dilutions de phages et 0,1 mL de la culture de bactéries sensibles.
- Homogénéiser doucement et incubé les tubes 15 à 20 minutes à 37°C sans agiter.
- Supplémenter chaque tube « top agar » avec 50 µL de solution de CaCl_2

Étalement sur boîtes :

- Après incubation ajouter à chaque mélange phages – bactéries 5 mL de gélose « top agar », maintenue en surfusion.
- Homogénéiser doucement et verser rapidement le contenu de chaque tube sur une gélose Mueller-Hinton.
- Laisser solidifier, retourner les boîtes et incubé 18 à 24 heures à 37°C.

Compte rendu

- Présenter dans le compte-rendu la démarche expérimentale d'ajustage de la suspension bactérienne « BS » et les résultats des calculs.

TROISIÈME PARTIE

Le port de gants est obligatoire pour cette troisième partie.

Détermination du niveau d'expression de la protéine recombinante « TIG » (35 points)

La protéine recombinante « TIG » a été produite par fermentation en milieu optimisé, à partir d'une souche d'*Escherichia coli* recombinée lors d'un précédent clonage. Il a été possible :

- d'obtenir des anticorps spécifiques de cette molécule ;
- de disposer d'une solution de protéine recombinante concentrée, utilisée comme étalon.

On cherche à déterminer le niveau d'expression de cette protéine lors du procédé de fabrication du fromage, en utilisant la technique immunologique de Mancini, technique simple à mettre en œuvre.

3.1. Réactifs et matériels

- solution d'agarose à 1 % en tampon PBS maintenue en surfusion à 50°C
- immunsérum anti-TIG, noté « IS »
- solution étalon de protéine «TIG» à 1 g.L⁻¹, notée « TIG Et »
- échantillon de lactosérum à étudier, obtenu à l'issue de la fabrication du caillé, noté « Lacto n° »
- eau physiologique
- emporte-pièce de 3 mm de diamètre
- système d'aspiration pour gel

3.2. Préparation du gel

Préparation de la solution d'agarose contenant l'immunsérum

- Calculer le volume d'immunsérum nécessaire pour préparer 12 mL d'une solution d'agarose contenant 2,5 % (v/v) d'immunsérum anti-*TIG*.
- Réaliser le mélange agarose – immunsérum dans un tube ; mélanger par retournement.
- Couler le mélange dans une grande boîte de Pétri, **en présence d'un examinateur**.
- Laisser solidifier le gel à température ambiante puis 20 minutes au réfrigérateur.
- Creuser 7 puits à l'emporte-pièce.

3.3. Réalisation d'une gamme d'étalonnage de la protéine *TIG*

Réaliser en microtubes une gamme de cinq solutions étalons de protéine *TIG* à
 0,2 g.L⁻¹ 0,4 g.L⁻¹ 0,6 g.L⁻¹ 0,8 g.L⁻¹ 1 g.L⁻¹

Les dilutions seront réalisées en eau physiologique, sous un volume total de 100 µL.

3.4. Dépôts sur gel

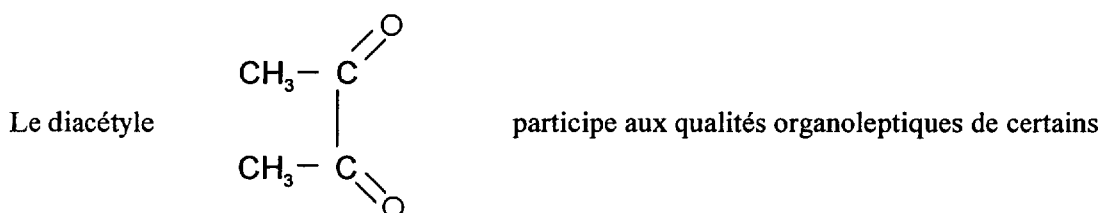
- Indiquer un repère sur la boîte et effectuer judicieusement les dépôts, à raison de 7 µL par dépôt : 5 puits pour la gamme étalon de protéine « *TIG* » et 2 puits pour l'échantillon.
L'un des dépôts sera effectué en présence d'un examinateur.
- Laisser diffuser 24 h à température ambiante en chambre humide.

Compte rendu

1. Expliciter le calcul du volume d'immunsérum nécessaire à la préparation du gel (partie 3.2.).
2. Donner dans un tableau la composition de la gamme d'étalonnage de protéine « *TIG* ».
3. Faire un schéma du gel précisant l'emplacement du repère et des différents dépôts.

QUATRIÈME PARTIE

Dosage du diacétyl (2, 3 butanediol) d'extrait de fromage de chèvre (25 points)



produits laitiers, ce qui justifie l'utilisation du biovar *diacetylactis* de *Lactococcus lactis* sous-espèce *lactis* dans le procédé industriel.

Le but de la manipulation est d'analyser l'influence du clonage sur les propriétés aromatisantes de la souche.

Le diacétyl (2, 3 butanediol) réagit avec la 3,3'-diaminobenzamidine pour donner un composé jaune mesurable par photométrie à 360 nm.

Le diacétyl (2, 3 butanediol) des fromages est extrait par l'éther diéthylique. Une fois l'éther évaporé, l'extrait est repris dans l'eau.

Le même protocole ayant été strictement appliqué à un échantillon de fromage fabriqué avec la souche de référence et à un échantillon de fromage fabriqué avec la souche modifiée, les deux extraits respectivement « extrait réf » et « extrait mod » sont directement comparables.

BOGEN

4.1. Réactifs

- 2 mL « extrait réf » en tube étanche, noté « extrait réf »
- 2 mL « extrait mod » en tube étanche, noté « extrait mod »
- 2 mL « diacétyle » solution étalon de diacétyle à $0,05 \text{ g.L}^{-1}$
- 30 mL de solution d'acide sulfurique 6 mol.L^{-1} , noté « $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 6 \text{ mol.L}^{-1}$ »
- 4 mL de solution fraîchement préparée de diaminobenzidine à 5 g.L^{-1} , noté « DBZ »

4.2. Manipulation

Réaliser l'étalonnage de la méthode sur la base suivante :

- préparer une série de 6 tubes à essai contenant de 0 à 0,5 mL de solution étalon de diacétyle à $0,05 \text{ g.L}^{-1}$
- compléter chaque tube avec de l'eau déminéralisée pour obtenir un volume final de 0,5 mL
- ajouter 0,2 mL de solution de diaminobenzidine (sous la hotte) ; boucher les tubes
- homogénéiser et attendre 1 minute à l'obscurité
- ajouter 1,8 mL de solution de H_2SO_4
- ajouter 6 mL d'eau déminéralisée
- homogénéiser et attendre 10 minutes à l'obscurité
- mesurer les absorbances à 360 nm

Sur la même base, réaliser en parallèle les dosages dans les extraits : prises d'essais de 0,2 et 0,4 mL (essais réalisés en double).

Compte rendu

1. Tracer la courbe d'étalonnage de la méthode.
2. En déduire la concentration en g.L^{-1} de diacétyle dans les extraits.
3. Comparer les 2 valeurs obtenues et conclure quant à l'impact de la modification de la souche sur ses capacités de production de diacétyle (2, 3 butanediol).

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR**BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 8 h 00

Coef. : 8

SESSION 2004

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE*Calculatrice autorisée.***DOCUMENT 1****Distribué après remise du compte-rendu 1.2.1**

N° tube	1	2	3	4
réactifs	X	Y	P	P témoin
eau bidistillée	8,5 µL	8,5 µL	10 µL	11 µL
tampon 10X	1,5 µL de Tp 1	1,5 µL de Tp 1	1,5 µL de Tp 2	1,5 µL de Tp 2
ADN X à 25 ng.µL ⁻¹	4 µL			
ADN Y à 25 ng.µL ⁻¹		4 µL		
plasmide P à 40 ng.µL ⁻¹			2,5 µL	2,5 µL
enzyme à 10 U.µL ⁻¹	1 µL de E1	1 µL de E1	1 µL de E2	

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée : 8 h 00

Coef. : 8

SESSION 2004

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE

Calculatrice autorisée. Une feuille de papier millimétré.

DEUXIÈME JOUR

Durée : 2 heures 30 minutes

PREMIÈRE PARTIE :

Contrôle de matériel génétique avant clonage

1.1. Joindre au compte-rendu l'électrophorégramme fourni. Schématiser les résultats obtenus en repérant clairement les différentes bandes.

1.2. Tracer, pour les bandes du marqueur, $\log(\text{taille}) = f(\text{distance de migration})$

Les tailles en kpb des fragments d'ADN linéaires bicaténaire composant le marqueur de taille MT sont fournies par les examinateurs.

1.3. À l'aide de cette courbe, déterminer la taille des fragments obtenus après hydrolyse des fragments X, Y et du plasmide P linéarisé.

1.4. La séquence de 1000 à 1300 pb recherchée est-elle présente dans les fragments X et Y ? Justifier votre réponse et proposer, à l'aide d'un schéma, une interprétation des profils électrophorétiques obtenus.

Données :

- les fragments X et Y sont linéaires
- la séquence d'intérêt est encadrée par des sites EI
- la gamme des tailles des fragments d'ADN double brin linéaires séparés dans un gel d'agarose à 0,7 % (m/v) en tampon TBE 1 x est comprise entre 0,8 kpb et 10 kpb

1.5. Quel sera la taille du plasmide recombinant ?

DEUXIÈME PARTIE :

Étude de la résistance aux phages d'une bactérie recombinée

2.1. Détermination du niveau de résistance de la souche LbR1

- 2.1.1 Lire et présenter les résultats du titrage de S1 sur LbR1. Evaluer le titre de la suspension S1 en UFP.mL⁻¹.
- 2.1.2 Calculer le taux d'amélioration de la résistance de la souche LbR1, défini selon l'expression suivante :

$$\frac{\text{Titre du lysat déterminé sur une souche sensible} - \text{Titre du lysat déterminé sur LbR1}}{\text{Titre du lysat déterminé sur une souche sensible}}$$

Rappel : le titre du lysat S1 déterminé sur une souche sensible est égal à 10^{10} UFP.mL⁻¹.

2.2. Contrôle des conditions de conservation d'un lysat

- 2.2.1 Effectuer le dénombrement des UFP obtenues pour la suspension S2. Consigner les résultats dans un tableau. Calculer la concentration en particules phagiques.
- 2.2.2 Conclure sur l'efficacité de conservation de suspensions phagiques par congélation, sachant que la suspension initiale S2 titrait 10^7 UFP.mL⁻¹.

TROISIÈME PARTIE :

Détermination du niveau d'expression de la protéine recombinante « TIG »

- 3.1. Mesurer le diamètre des anneaux de précipitation et présenter les résultats dans un tableau.
- 3.2. A l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe d'étalonnage de la méthode de Mancini.
- 3.3. Déterminer la concentration de la protéine « TIG » dans l'échantillon de lactosérum.
- 3.4. Indiquer comment préparer, à partir de ce lactosérum, 100 mL d'une solution contenant 0,2 g.L⁻¹ de protéine « TIG » .