

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR**BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 8 H 00

Coef. : 8

SESSION 2006

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE**RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATION DE GÉNIE BIOLOGIQUE***Calculatrice autorisée***PREMIER JOUR**

Durée : 5 heures 30 minutes + 30 minutes de repas

LES CONSERVATEURS

Les conservateurs sont des substances chimiques destinées à retarder ou empêcher une prolifération des microorganismes. La conservation par traitement chimique est souvent pratiquée lorsque les traitements physiques, notamment thermiques, ne sont pas possibles.

On se propose d'étudier quelques effets biologiques de certains conservateurs.

1. EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PRODUCTION DE NISINE PAR FERMENTATION (36 points)

La nisine est une bactériocine, peptide antimicrobien produit par des souches de bactéries lactiques. Elle est actuellement utilisée comme conservateur alimentaire.

Un milieu à base de lactosérum a été élaboré pour la production maximale de nisine par une souche de *Lactococcus lactis*. On se propose d'étudier l'effet de la température sur la production de nisine en milieu non renouvelé.

Dans cet objectif, deux fermentations sont conduites à des températures différentes 30°C et 37°C et des échantillons de moût de fermentation (« M₃₀ » et « M₃₇ ») sont prélevés afin de doser la nisine produite. Le dosage est effectué par voie microbiologique, par diffusion en milieu solide. La souche indicatrice utilisée, sensible à la nisine, est une souche de *Micrococcus luteus* ATCC 102-40.

1.1. Matériels et réactifs

- 60 mL de gélose Mueller Hinton maintenue en surfusion
- 2 mL de solution étalon mère de nisine à 10⁴ UI par mL, notée « S₁ »
- 10 mL d'eau distillée stérile, en flacon, noté « ED »

- 1 boîte de Pétri renfermant 20 disques non imprégnés stériles
- solution de Tween 20, notée « **Tween** »
- matériel nécessaire pour réaliser les dilutions
- culture de *Micrococcus luteus*, souche sensible, sur gélose Mueller Hinton inclinée, notée « *M luteus* »
- 1 tube de 5 mL de bouillon Mueller Hinton, noté « **MH** »
- 1 boîte de Pétri carrée
- 4 semi-microcuvettes spectrophotométriques
- 200 µL de moûts de fermentation « **M₃₀** » et « **M₃₇** »

1.2. Mode opératoire

1.2.1. Préparation de la gamme étalon de nisine

S₁ est la solution étalon mère de nisine à 10⁴ UI.mL⁻¹.

- Préparer une gamme de 5 solutions étalon S₂ à S₆ à partir de la solution S₁ par dilutions en série géométrique de raison 1/2 en eau distillée stérile sous un volume final de 0,5 mL.

1.2.2. Préparation de la boîte de dosage

- À partir de la culture sur gélose inclinée de *M. luteus*, préparer 5 mL d'une suspension à 0,5 d'absorbance mesurée à 620 nm, en bouillon Mueller Hinton (la limite de linéarité pour les mesures d'absorbance sera précisée par le centre d'examen).
- Incorporer 2 mL de cette suspension aux 60 mL de gélose Mueller Hinton en surfusion ainsi que du Tween 20 à raison de 1% v/v final (le Tween 20 facilite la diffusion de la nisine dans la gélose). Homogénéiser et couler dans la boîte de Pétri carrée.
- Laisser solidifier.
- Déposer 16 disques non imprégnés stériles à la surface de la gélose solide selon le gabarit fourni.

1.2.3. Réalisation du dosage

Montrer l'imprégnation de deux disques à un examinateur

En double essai :

- imprégner les disques à l'aide de 20 µL des différentes solutions étalon S₂ à S₆ ;
- imprégner les disques M₃₀ et M₃₇ avec 20 µL des échantillons de moûts correspondants ;
- réaliser le témoin négatif.
- Laisser diffuser à température ambiante pendant 30 minutes avant d'incuber 18 à 24 heures à 37°C.

1.3. Compte rendu

- a. Construire un tableau en indiquant :
- le mode opératoire de la réalisation de la gamme étalon ;
 - les concentrations en nisine des solutions réalisées.
- b. Préciser le protocole de réalisation de la suspension à 0,5 d'absorbance.
- c. Indiquer la composition du témoin négatif.

2. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES DE LA NISINASE (50 points)

Certains microorganismes sont particulièrement résistants aux différents conservateurs, et notamment à la nisine. Parmi d'autres facteurs, une enzyme hydrolytique (la nisinase) permet d'expliquer cette résistance à la nisine.

De manière à mieux connaître cette hydrolase, on se propose de déterminer ses paramètres cinétiques, K_m et V_{max} .

Le substrat utilisé est un peptide synthétique modifié utilisé pour le dosage d'activité protéasique. Ce peptide est couplé à un chromophore particulier : le pNA (para-nitroanilide) qui est libéré sous l'action de la protéase.

L'hydrolyse du peptide-pNA par la nisinase entraîne l'apparition d'un composé qui absorbe à 405 nm.

2.1. Matériels et réactifs

- 3 mL de solution de substrat peptide-pNA à 20 mmol.L^{-1} , noté « peptide-pNA »
- 2,5 mL de solution de nisinase, noté « nisinase » (à conserver dans la glace)
- 50 mL de solution de tampon phosphate à 100 mmol.L^{-1} pH 7,2, noté « Tp P »
- 25 mL de solution de réactif d'arrêt noté « arrêt »
- pipettes semi-automatiques de 5 mL, 1 mL, 200 μL , 100 μL et 20 μL
- 12 tubes à hémolyse
- 10 macrocuvettes standard
- chronomètre.

2.2. Conditions de vitesse initiale

2.2.1. Mode opératoire

Il s'agit de s'assurer que sur toute la durée de la réaction à 30°C , l'enzyme fonctionne bien en conditions de vitesse initiale (V_i).

Cette manipulation, à partir du déclenchement de la réaction, est à réaliser en présence d'un examinateur

- Introduire dans un tube à hémolyse 0,1 mL de solution de substrat « peptide-pNA » à 20 mmol.L^{-1} .
- Compléter à 2 mL avec du tampon « Tp P ».
- Préincuber au moins 5 minutes à 30°C .
- Déclencher la réaction par l'addition de 100 μL de solution de nisinase.
- Suivre la variation de l'absorbance pendant 4 minutes.

2.2.2. Compte rendu

- Représenter graphiquement l'évolution de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps.
- En déduire un intervalle de temps permettant de travailler en méthode deux points.
- Calculer la concentration d'activité catalytique en kat.L^{-1} de milieu réactionnel.

Données :

- Le coefficient d'absorbance spécifique du pNA à pH 7,2 est $2200 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- Le trajet optique des cuves pour photométrie est de 1 cm.

2.3. Détermination des paramètres cinétiques.

2.3.1. Mode opératoire

La méthode en deux points se fera sur une durée de **3 minutes** et à une température de **30°C**.

Le tableau suivant donne le volume de substrat « **peptide-pNA** » à prélever :

N° de tube	1	2	3	4	5	6	7
Volume de substrat peptide-pNA (μL)	20	50	75	100	150	200	300

- Compléter chaque tube à hémolyse à 2 mL à l'aide de tampon phosphate pH 7,2.
- Lancer la réaction par ajout de 100 μL de solution enzymatique.
- Arrêter la réaction par addition de 1 mL de réactif d'arrêt.

Composition du tube témoin :

- 2 mL de tampon phosphate pH 7,2 ;
- 1 mL de réactif d'arrêt ;
- 100 μL de solution enzymatique.

Le démarrage de la manipulation est à réaliser en présence d'un examinateur.

2.3.2. Compte rendu

- Calculer la concentration de substrat dans le milieu réactionnel pour chacun des tubes
- Présenter les résultats dans un tableau
- Déterminer K_m et V_{max} à l'aide d'un logiciel.
- Calculer la concentration d'activité catalytique de la solution d'enzyme fournie en kat.L^{-1} .

Données :

- 1 katal = quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une mole de substrat en une seconde ;
- coefficient d'absorbance spécifique du pNA au pH de mesure: $4500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

3. ÉTUDE DE LA CYTOTOXICITÉ DE CONSERVATEURS UTILISÉS EN COSMÉTOLOGIE (54 points)

On se propose d'étudier les effets de trois conservateurs X, Y et Z potentiellement utilisables dans des produits cosmétiques. Leur cytotoxicité peut être évaluée par des mesures de viabilité réalisées en plaque multipuits sur des cellules animales cultivées *in vitro*.

On détermine la viabilité cellulaire par un test colorimétrique utilisant le MTT (bromure de diméthylthiazol-diphényltétrazolium). Lorsque des cellules sont mises en présence d'une solution de MTT, les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes réduisent le MTT en formazan. Le formazan insoluble dans l'eau est ensuite solubilisé dans un solvant (ici le diméthylsulfoxyde DMSO). L'intensité de la coloration violette, mesurée par spectrophotométrie, est fonction du nombre de cellules vivantes.

Les différentes phases de la manipulation sont les suivantes :

- Réalisation d'une gamme de concentration en cellules en plaque ou barrettes multipuits.
- Action des conservateurs sur les cellules.
- Quantification de la viabilité cellulaire par mesure photométrique du formazan libéré.

3.1. Matériel et réactifs

- cellule de comptage du centre (fiche technique disponible)
- microplaque pour culture cellulaire avec couvercle
- 2 tubes à hémolyse
- 2,5 mL de suspension cellulaire « SC »
- 0,2 mL de solution de bleu de Funk, « Funk »
- 3 mL de milieu de culture « M »
- 0,2 mL de chacune des trois solutions de conservateurs « X », « Y » et « Z » en milieu de culture « M »
- 0,5 mL de solution « MTT »
- 2,5 mL de « DMSO »

3.2. Mode opératoire

3.2.1 Préparation d'une suspension cellulaire ajustée

- Réaliser une numération des cellules vivantes et des cellules mortes de la suspension « SC » en présence de bleu de Funk (colorant d'exclusion) : 150 μL de suspension « SC » + 50 μL de bleu de Funk.
- À partir de la suspension « SC », préparer 3 mL de suspension fille à $5 \cdot 10^5$ cellules vivantes par mL de milieu de culture « M ».

3.2.2. Réalisation d'une gamme de cellules en microplaque

- À partir de la suspension fille préparée ci-dessus, réaliser dans les lignes A et B de la microplaque (puits A1 à A6 et B1 à B6) la gamme suivante en double essai :

cellules vivantes par puits, sous un volume final de milieu de culture M de 160 μL :

10^4 2.10^4 4.10^4 6.10^4 7.10^4 8.10^4

- Dans les puits C1 à C6, introduire 8.10^4 cellules vivantes par puits.
- Couvrir la plaque et la placer 1h30 à 37°C, dans une étuve à 5 % de CO_2 .

3.2.3. Action des conservateurs

- Ajouter dans les puits:
 - A1 à A6 et B1 à B6 : 30 μL de milieu de culture « M »
 - C1 et C2 : 30 μL de conservateur « X »
 - C3 et C4 : 30 μL de conservateur « Y »
 - C5 et C6 : 30 μL de conservateur « Z »
- Couvrir la plaque et la placer 1h30 à 37°C, dans l'étuve à 5 % de CO_2 .

3.2.4. Quantification des cellules vivantes

- Distribuer dans tous les puits 20 μL de solution de « MTT ».
- Incuber 1h à 37°C, dans l'étuve à 5 % de CO_2 .
- Prélever et éliminer 200 μL dans chaque puits en évitant d'aspirer les cristaux de formazan.
- Distribuer dans tous les puits 100 μL de « DMSO ».
- Introduire 100 μL de « DMSO » dans le puits C8 qui servira de blanc de lecture.
- Agiter 10 minutes.
- Effectuer la lecture de l'absorbance à 570 nm.

3.3. Compte rendu

- Indiquer les résultats de la numération et calculer la concentration de la suspension cellulaire « SC » en cellules vivantes et en cellules totales par mL.
- Expliquer la préparation de la suspension à 5.10^5 cellules vivantes par mL.
- Rassembler dans un tableau la composition des puits de la microplaque.
- Légénder la feuille des mesures d'absorbance à 570 nm.
- Tracer la courbe d'étalonnage de la méthode (absorbance à 570 nm en fonction du nombre de cellules par puits).
- Reporter sur cette courbe les résultats de la ligne C et conclure.

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR**BIOTECHNOLOGIE****Durée : 8 h 00****Coef. : 8****SESSION 2006****ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE****RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATION DE GÉNIE BIOLOGIQUE*****Calculatrice autorisée*****DEUXIÈME JOUR****Durée : 2 heures 30 minutes****1. EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PRODUCTION DE NISINE PAR FERMENTATION**

- 1.1. Mesurer les diamètres des zones d'inhibition et consigner ces résultats dans un tableau.
- 1.2. Tracer la courbe d'étalonnage de la méthode : diamètre = f(log [nisine]) (outil informatique obligatoire).
- 1.3. Déterminer les concentrations respectives des moûts « M₃₀ » et « M₃₇ » en UI/mL de nisine.
- 1.4. Calculer la concentration des moûts en g/L de nisine pure.

Donnée :

La solution étalon mère à 10^4 UI.mL⁻¹ de nisine a été préparée par pesée de poudre commerciale dosée à 10^6 UI.g⁻¹. Cette poudre contient 2,5% m/m de nisine pure, 70 à 75 % m/m de NaCl et 20 % m/m de protéines de lait.

- 1.5. Conclure.

4. ÉTUDE PARTIELLE D'UN PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN BACTÉRIEN (20 points)

Le but de l'étude proposée est de tester l'influence du SDS sur l'activité de la protéinase K. En effet, on a constaté que l'extraction de l'ADN génomique de *Lactobacillus lactis* en vue du clonage du gène de la nisine donnait des résultats très décevants par les méthodes usuelles :

- faible quantité d'ADN génomique obtenue ;
- présence importante de protéines contaminantes.

Aussi, il a été décidé de réaliser la lyse de *Lactococcus lactis* à l'aide d'une solution de SDS (sodium dodécylsulfate) et de protéinase K (endopeptidase aspécifique).

Il s'agit de montrer que le SDS, aux concentrations utilisées ne perturbe pas l'activité de la protéinase K. Les peptides acido-solubles libérés par l'action de cette enzyme sur un substrat protéique sont dosés par le réactif de Folin, après arrêt de la réaction enzymatique par l'acide trichloracétique.

4.1. Matériel et réactifs

- 1 mL de tampon Tris HCl, CaCl₂, pH 7,5 noté « Tp 7,5 »
- 1 mL de protéinase K à 50 µg/mL noté « prK »
- 6 mL de serum albumine bovine à 20 mg/mL en eau physiologique noté « SAB »
- 1 mL de SDS à 10% m/v noté « SDS »
- 10 mL d'acide trichloracétique à 0,5 mol/L noté « ATCA »
- 20 mL de NaOH à 0,5 mol/L noté « NaOH »
- 2 mL de réactif de Folin non dilué noté « Folin »
- 12 microtubes de 1,5 mL
- 12 semi-microcuvettes standard

4.2. Mode opératoire

Le but est de déterminer l'activité de la protéinase K en présence des concentrations finales en SDS suivantes : 0 0,5 1 1,5 2% m/v.

Réaliser un témoin sans enzyme pour chaque pourcentage de « SDS » testé.

Pour chaque test :

- Introduire dans un microtube :
 - 300 µL de « SAB »
 - x µL de « SDS » à 10 % m/v
 - (150-x) µL d'eau distillée
 - 50 µL de tampon Tp7,5
- Préchauffer au moins 5 minutes à 42°C.
- Ajouter 50 µL de protéinase K.
- Incuber exactement 10 minutes à 42°C.
- Ajouter 0,5 mL de « ATCA ».
- Laisser au moins 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 2 minutes à vitesse maximale.

BOGEN

- Introduire dans une cuve de spectrophotomètre 400 μL du surnageant obtenu.
- Ajouter dans la cuve :
 - 800 μL de NaOH 0,5 mol/L
 - 80 μL de réactif de Folin.
- Laisser au moins 5 minutes à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance à 750 nm contre de l'eau.

Les lectures d'absorbance seront effectuées en présence d'un examinateur.

4.3. Compte rendu

- a. Construire un tableau indiquant la composition des différents milieux réactionnels (volumes x de SDS à 10% m/v et (150-x) d'eau).
- b. Calculer, pour chaque concentration finale en SDS (% m/v), l'absorbance corrigée de l'essai. Reporter l'ensemble des résultats (bruts et corrigés) dans le tableau précédent.
- c. Analyser les résultats et conclure.