

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR**BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 8 h 00

Coef. : 8

SESSION 2001**RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE**

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

PRODUCTION D'UN IMMUNOCONJUGUÉ RECOMBINANT**PREMIER JOUR***Durée : 5 heures 30*

Toutes les valeurs expérimentales doivent être communiquées immédiatement aux examinateurs.

Le sujet comporte 4 parties indépendantes et qui peuvent être réalisées dans un ordre différent de leur présentation. Il est important que le candidat réfléchisse à l'organisation du travail dans le temps.

Ces manipulations s'inscrivent dans le cadre d'un projet de production chez *Escherichia coli* d'un immunoconjugué recombinant.

Cette molécule hybride bifonctionnelle est constituée du fragment F(ab)₂ d'un anticorps murin d'une part et de la phosphatase alcaline (PhoA) d'*E.coli* d'autre part.

La souche productrice d'*E.coli* a été obtenue en transformant une souche hôte par un vecteur plasmidique comportant la construction génétique adéquate.

PREMIÈRE PARTIE :**CROISSANCE DE LA SOUCHE RECOMBINANTE (25 points)**

On souhaite déterminer la vitesse spécifique de croissance de cette souche en milieu LB additionné d'ampicilline (à 200 µg/mL) à 37°C.

1.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 1 erlen contenant 50 mL de milieu LB + ampicilline préchauffé à 37°C
- 1 tube contenant environ 5 mL de préculture de la nuit en milieu LB + ampicilline de la souche
- 1 flacon contenant environ 10 mL de milieu LB

1.2. Mode opératoire

- Ensemencer l'erlen de milieu préchauffé avec 2,5 mL de la préculture fournie et le mettre à incuber dans le bain thermostaté à 37°C agité.
- Prélever 1 mL de culture dans une semi-microcuve au temps 0 puis toutes les 30 minutes pendant 3 heures.
- Lire immédiatement l'absorbance à 600 nm contre du milieu LB ; (placer la cuve dans la glace en cas d'attente).

L'absorbance limite de linéarité est de 0,6.

Les résultats des mesures doivent être fournis au fur et à mesure à l'examineur.

1.3. Résultats

- Consigner dans un tableau les temps de prélèvement et les valeurs d'absorbance.
- Tracer la courbe de croissance.
- Analyser cette courbe.
- Déterminer la vitesse spécifique de croissance maximale dans les conditions opératoires.

DEUXIÈME PARTIE :

CONSERVATION DE LA SOUCHE RECOMBINANTE (30 points)

La souche est conservée par congélation à -20°C en présence de glycérol. On souhaite déterminer le pourcentage de cellules viables après décongélation.

Une numération par culture sur milieu solide est effectuée sur la suspension après décongélation.

2.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 1 microtube contenant 1 mL de culture congelée fraîchement décongelée.
- 1 flacon d'eau physiologique stérile
- cônes stériles
- tubes à hémolyse stériles
- 6 boîtes de gélose LB + ampicilline
- billes de verre ou étaleur stériles

2.2. Mode opératoire

- Distribuer 900 μL d'eau physiologique stérile dans 5 tubes à hémolyse.
- Effectuer une série de dilutions en progression géométrique de raison 1/10 jusqu'à 10^{-6} .

Réaliser ces dilutions devant un examinateur

- Étaler 100 μL de chacune des dilutions 10^{-4} à 10^{-6} sur gélose LB, en réalisant 2 essais par dilution.
- Incuber à 37°C les boîtes clairement identifiées.

TROISIÈME PARTIE :

EXTRACTION DE L'IMMUNOCONJUGUÉ : COMPARAISON DE 2 PROTOCOLES (65 points)

La construction génétique est telle que l'immunoconjugué synthétisé est localisé dans le périplasme de la souche productrice, ce qui permet de l'extraire sans lyse cellulaire.

Pour cette extraction, deux protocoles différents seront comparés : le "choc osmotique" et le "choc lysozyme".

Un contrôle de l'affinité de l'enzyme conjuguée pour son substrat sera également effectué.

3.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 50 mL de **culture de la nuit** en milieu LB + ampicilline de la souche productrice d'*E.coli*
- 5 mL de tampon **TSE** = tampon Tris-HCl 0,1M pH 8,2 + saccharose à 200 g/L + EDTA 5mM
- 3 mL de **Thypo** = tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,2 + MgCl_2 0,5 mM
- 10 mL de **Tris-Mg-Zn** = tampon 200 mM pH 8,2 + MgCl_2 1 mM + ZnCl_2 0,1 mM
- 100 μL de **lysozyme** à 10 mg/mL
- 10 mL de **pNPP** 5mM en eau déminéralisée
- 10 mL de **NaOH** 2M
- 1 mL de **NaCl** à 9 g/L
- réactif de **Bradford** en distributeur
- 0,5 mL de **SAB** à 0,3 mg/mL
- 2 tubes de 50 mL à centrifuger
- 1 pipette de 10 mL à usage unique

3.2. Extraction par "choc osmotique"

Après séjour en milieu hyperosmotique, en présence d'EDTA qui fragilise la membrane externe, les cellules sont remises en suspension en milieu hypoosmotique. L'entrée d'eau consécutive provoque alors une expulsion des protéines périplasmiques. Réaliser à partir de la culture fournie une extraction selon le protocole ci-dessous.

Mode opératoire

- Centrifuger 15 mL de la culture fournie pendant 5 minutes à 3500 rpm (soit 2500 g), à 10°C. Eliminer le surnageant dans l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension dans 1 mL de tampon TSE et transférer en microtube. Laisser séjourner 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger 3 minutes. Eliminer le surnageant dans l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension rapidement dans 1 mL de tampon Thypho glacé. Vortexer immédiatement énergiquement puis effectuer quelques aspirations-refoulements.

Réaliser cette remise en suspension devant un examinateur

- Laisser séjourner 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger 3 minutes.
- Prélever le surnageant qui constitue l'extrait et le transférer dans un autre microtube. Le conserver dans la glace.

Remarques :

- Les centrifugations en microcentrifugeuse sont effectuées à vitesse maximale.
- Tout matériel contaminé sera déposé dans un bac contenant de l'eau de Javel.

3.3. Extraction par "choc lysozyme"

Le séjour en milieu hyperosmotique provoque une sortie d'eau qui entraîne une fuite des protéines périplasmiques à travers la membrane externe rendue poreuse par l'EDTA. Le lysozyme facilite cette fuite en s'attaquant au peptidoglycane.

Réaliser à partir de la culture fournie une extraction selon le protocole ci-dessous.

Mode opératoire

- Centrifuger 15 mL de la culture fournie pendant 5 minutes à 3500 rpm (soit 2500 g), à 10°C. Eliminer le surnageant dans l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension dans 1 mL de tampon TSE et transférer en microtube.
- Ajouter 15 µL de lysozyme et homogénéiser.
- Laisser séjourner 30 minutes dans la glace.
- Centrifuger 3 minutes.
- Prélever le surnageant qui constitue l'extrait et le transférer dans un autre microtube. Le conserver dans la glace.

3.4. Détermination des concentrations d'activité catalytique

La concentration d'activité catalytique (catc) de la PhoA dans les extraits préparés est déterminée à partir de la mesure de la vitesse initiale par la méthode en 2 points.

3.4.1. Mode opératoire

Mesurer les vitesses initiales pour chacun des 2 extraits selon le protocole ci-dessous.

Dans un tube à hémolyse, introduire :

950 µL de Tris-Mg-Zn
1 mL de pNPP 5 mM
50 µL d'extrait.

Incuber 2 minutes exactement à 30°C.

Arrêter la réaction en ajoutant 1 mL de solution de NaOH 2M.

Lire l'absorbance à 405 nm contre un témoin convenable.

L'une des 2 déterminations sera effectuée en présence d'un examinateur.

3.4.2. Résultats

- Préciser la composition des témoins.
- Calculer les concentrations d'activité catalytique (catc) de la PhoA dans chacun des extraits préparés en tenant compte des données ci-dessous.
- Une unité de PhoA est définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant une micromole de pNPP (4-nitrophényl phosphate) par minute dans les conditions opératoires proposées.
- Le coefficient spécifique d'absorbance molaire du pNP est de $17500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (soit $1750 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$) dans les conditions opératoires.

3.5. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées dans chacun des extraits par la méthode de Bradford.

3.5.1. Mode opératoire

- Protocole : en cuves pour spectrophotomètre, introduire :
x μL de solution protéique à compléter jusqu' à $50 \mu\text{L}$ avec NaCl à 9 g/L
 $2,5\text{mL}$ de réactif de Bradford
Lire l'absorbance à 595 nm après 10 minutes de séjour à l'obscurité contre le blanc de gamme.
- Gamme étalon : une gamme en 6 tubes , contenant de 0 à $15 \mu\text{g}$ de protéines par tube, sera réalisée à partir de la solution étalon de SAB fournie.
- Essais : les protéines des extraits enzymatiques seront dosées avec des prises d'essais de $50 \mu\text{L}$ à priori, volumes à adapter si nécessaire. Effectuer 2 essais pour chaque extrait.

3.5.2. Résultats

- Présenter un tableau de réalisation de la gamme étalon.
- Tracer la courbe étalon.
- Déterminer graphiquement les masses de protéines dans les prises d'essai de chacun des extraits.
- En déduire les concentrations en protéines de chacun des 2 extraits préparés.

3.6. Comparaison des activités spécifiques

- Résultats
- Déterminer les activités spécifiques (exprimées en U/mg) des 2 extraits .
- Les comparer. Conclure.

QUATRIÈME PARTIE :

UTILISATION DE L'IMMUNOCONJUGUÉ PRODUIT (40 points)

On étudiera l'immunoconjugué recombinant produit le deuxième jour.

Pour des raisons techniques, certaines opérations doivent être réalisées immédiatement.

4.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 1 plaque de microtitration
- 5 mL de réactif "4J1-A"
- 50 mL de solution tampon phosphate salin (PBS)
- 10 mL de réactif "4J1-B"

4.2. Mode opératoire

- Distribuer 200 μL de réactif "4J1-A" dans chacun des puits A1 à A10 et B1 à B11.
- Incuber la plaque recouverte de son film autoadhésif à l'étuve à 37°C pendant 4 heures.
- Rejeter le contenu des puits et les rincer en tampon PBS.
- Distribuer 250 μL de réactif "4J1-B" dans tous les puits (A1 à A12 et B1 à B12).
- Recouvrir la plaque (clairement identifiée par le numéro de poste) de son film autoadhésif et la laisser sur le plan de travail.

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR**BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 8 h 00

Coef. : 8

SESSION 2001

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE

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

PRODUCTION D'UN IMMUNOCONJUGUÉ RECOMBINANT**DEUXIÈME JOUR***Durée : 2 heures 30 minutes***DEUXIÈME PARTIE :****CONSERVATION DE LA SOUCHE RECOMBINANTE (30 points)****2.2. Mode opératoire**

- Compter les colonies.

2.3. Résultats

- Présenter les résultats sous forme d'un tableau.
- Analyser ces résultats et en déduire la concentration en cellules viables dans la suspension après décongélation.
- La suspension congelée avait été préparée en mélangeant 700 μL de culture à $7 \cdot 10^8$ cellules par mL et 300 μL de glycérol à 50%. En déduire le pourcentage de viabilité après décongélation.

QUATRIÈME PARTIE :**UTILISATION DE L'IMMUNOCONJUGUÉ PRODUIT (40 points)**

On se propose de s'assurer que la molécule hybride recombinante produite est utilisable dans un dosage immunoenzymatique en phase hétérogène.

Dans ce but, une gamme étalon sera réalisée en double essai.

La partie anticorps de l'immunoconjugué est dirigée contre une hormone humaine hH.

Le réactif "4J1-A" déposé dans les puits le premier jour était une solution de l'hormone hH.

Le réactif "4J1-B" déposé dans les puits le premier jour était une solution de SAB à 2%.

4.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- la plaque de microtitration traitée la veille
- 50 mL de tampon PBS
- 50 mL de tampon PBS-Tween
- 0,5 mL d'hormone hH à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS
- 2,5 mL d'immunoconjugué recombinant
- 5 mL de solution tamponnée de substrat pNPP
- 2 mL de NaOH 2M

4.2. Mode opératoire

La veille, les puits A1 à A10 et B1 à B12 ont été sensibilisés avec 200 μL de solution de d'hormone hH à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; tous les puits ont ensuite été traités par de la SAB à 2%.

- Rejeter le contenu des puits ; laver 3 fois en tampon PBS-Tween et rincer 2 fois en tampon PBS.
- A partir de la solution étalon d'hormone hH fournie à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, réaliser 10 dilutions en série de progression géométrique de raison 1/2, sous un volume de 125 μL , jusqu'à la dilution $(1/2)^{10}$, en utilisant comme diluant du tampon PBS.
Réaliser en double la série de dilutions.
Utiliser pour ces dilutions des cupules vides de la plaque.
- Distribuer 100 μL de chacune de ces dilutions dans les puits A1 à A10 d'une part, B1 à B10 d'autre part.
- Déposer 100 μL d'hormone hH à 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans la cupule B12.
- Distribuer 100 μL de la solution d'immunoconjugué fournie dans les puits A1 à A11 et B1 à B12.
- En A12 : distribuer 200 μL de tampon PBS.
- En A11, B11 et B12 : ajouter 100 μL de tampon PBS.

Le schéma ci-dessous visualise la disposition des puits.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$\frac{1}{2}$									$(\frac{1}{2})^{10}$		
B	$\frac{1}{2}$									$(\frac{1}{2})^{10}$		

Le puits A12 constituera le zéro optique.

- Placer la plaque pendant 2 minutes sur agitateur rotatif.
- L'incuber, recouverte de son film autoadhésif, à l'étuve à 37°C pendant 45 minutes.
- Laver 3 fois en tampon PBS-Tween et rincer 2 fois en tampon PBS.
- Distribuer dans tous les puits 150 μL de solution substrat pNPP. Recouvrir du film autoadhésif et incuber 15 minutes à l'étuve à 37°C.
- Distribuer dans tous les puits 50 μL de solution de NaOH.
- Placer la plaque pendant 2 minutes sur agitateur rotatif puis lire les absorbances de chaque puits à 405 nm contre le puits A12 dans un lecteur de microplaques à lecture automatique avec imprimante. La feuille d'impression des résultats après identification sera jointe au compte-rendu.

Les lectures seront réalisées en présence d'un examinateur.

4.3. Résultats

- Présenter sous forme de tableaux les dilutions effectuées et la composition des témoins.
- Calculer et présenter dans un tableau les quantités d'hormone hH exprimées en ng déposées dans les puits le deuxième jour pour chacune des dilutions.
- Tracer sur un même graphe les 2 courbes représentant la variation d'absorbance à 405 nm obtenue en fonction du logarithme décimal de la quantité d'hormone ajoutée le deuxième jour.
- Commenter l'allure de la courbe obtenue en précisant sous forme d'un schéma légendé le principe du dosage réalisé.
- Préciser le rôle du puits A11, B11 et B12 ; discuter les résultats obtenus pour ces puits.
- On utilise la courbe étalon pour doser deux solutions de hH dont les concentrations sont estimées à 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
Comment opérer pour déterminer ces concentrations à l'aide de la courbe étalon obtenue ? Justifier.