

**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. $\mu\text{L}^{-1}$ , notée « X »
- solution d'ADN source Y à 25 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ , notée « Y »
- solution de plasmide P à 40 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ , notée « P »
- endonucléase de restriction E1 à 10 U. $\mu\text{L}^{-1}$ , notée « E1 »
- endonucléase de restriction E2 à 10 U. $\mu\text{L}^{-1}$ , 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  $\mu\text{L}$
- 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  $\mu\text{L}$

### 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  $\mu\text{L}$  de la solution tampon de charge dans chacun des trois tubes. Centrifuger quelques secondes et conserver les tubes dans la glace.

*Signaler à l'examineur 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<sup>ème</sup> 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<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>).

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 CaCl<sub>2</sub> à 1 mol.L<sup>-1</sup>

##### 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>.*

### 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  $\mu$ L de solution de  $\text{CaCl}_2$

#### *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<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup>    0,4 g.L<sup>-1</sup>    0,6 g.L<sup>-1</sup>    0,8 g.L<sup>-1</sup>    1 g.L<sup>-1</sup>

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

### 3.4. Dépôts sur gel

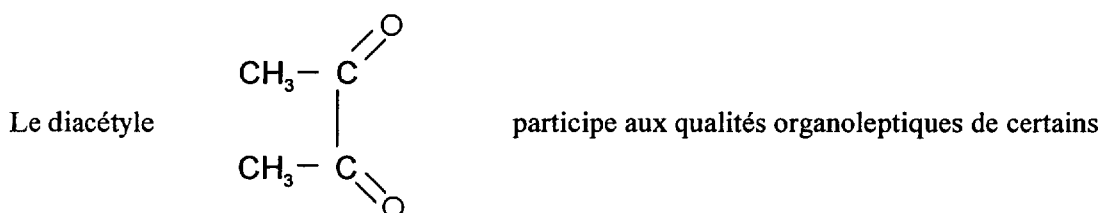
- Indiquer un repère sur la boîte et effectuer judicieusement les dépôts, à raison de 7 µL par dépôt : 5 puits pour la gamme étalon de protéine « *TIG* » et 2 puits pour l'échantillon.  
*L'un des dépôts sera effectué en présence d'un examinateur.*
- Laisser diffuser 24 h à température ambiante en chambre 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  $6 \text{ mol.L}^{-1}$ , noté «  $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 6 \text{ mol.L}^{-1}$  »
- 4 mL de solution fraîchement préparée de diaminobenzidine à  $5 \text{ g.L}^{-1}$ , 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  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 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  $\text{g.L}^{-1}$  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 <sup>-1</sup>	4 µL			
ADN Y à 25 ng.µL <sup>-1</sup>		4 µL		
plasmide P à 40 ng.µL <sup>-1</sup>			2,5 µL	2,5 µL
enzyme à 10 U.µL <sup>-1</sup>	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 bicaténares 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<sup>-1</sup>.
- 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<sup>-1</sup>.

#### **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<sup>-1</sup>.

## 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<sup>-1</sup> de protéine « TIG » .