

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 8 heures

Coefficient : 8

*RÉALISATION PRATIQUE
D'OPÉRATIONS DE GÉNIE
BIOLOGIQUE*

PREMIER JOUR

Durée : 6 h 45

Le sujet comporte 9 pages numérotées de 1/9 à 9/9

L'usage d'une calculatrice est autorisé.
Une feuille de papier millimétré est fournie aux candidats.

Étude moléculaire d'un gène participant à la synthèse des immunoglobulines

Toutes les valeurs expérimentales doivent être communiquées immédiatement aux examinateurs.

Des chercheurs ont créé des souris Knock-out déficientes en l'un des gènes indispensables à la synthèse des immunoglobulines et nommé *rag1*.

1. Dosage d'anticorps anti-SAB par technique Elisa indirecte (40 points)

Pour estimer l'importance du gène *rag1*, dans la synthèse des immunoglobulines, on compare la production d'anticorps après immunisation, entre un lot de souris Knock-out (souris KO) et un lot de souris témoin sans déficience (souris T).

La sérum albumine bovine (ou SAB) est choisie comme antigène : une injection de SAB provoque une activation puissante du système immunitaire et aboutit à la synthèse d'anticorps spécifiques anti-SAB.

Le dosage des anticorps anti-SAB présents dans les sérums des souris KO et T, 10 jours après l'injection, renseigne sur le niveau d'expression des immunoglobulines.

1.1 Matériels et Réactifs

- 1 microplaque 96 puits à fond plat et son couvercle, dont les puits A1 à A12 et B1 à B6 ont été sensibilisés par de la SAB,
- tubes à hémolyse,
- 1 chronomètre.

- 2 mL de tampon PBS (**PBS**),
- 40 mL de tampon PBS-tween 20 (**PBS-Tween**),
- 200 μ L de sérum anti-SAB de titre connu : 20 ng.mL^{-1} (**anti-SAB**)
- 200 μ L de sérum de souris KO et de sérum de souris T à doser (**KO**) et (**T**),
- 1 mL de conjugué (anticorps anti-globuline de lapin, complexés à une peroxydase) (**Conjugué**),
- 1 mL de substrat OPD (o-phénylène diamine en tampon citrate et en présence d' H_2O_2) (**Substrat**),

Le substrat n'est stable que pendant une heure : le demander à l'examineur au moment de son utilisation.

- 1 mL de solution d'arrêt (acide sulfurique à 2 mol.L^{-1} dans le sulfite de sodium à 0,5%) (H_2SO_4).

1.2 Mode opératoire

1.2.1 Sensibilisation des puits par la SAB

- Les cupules A1 à A12 et B1 à B6 de la microplaque ont été préalablement sensibilisées avec 200 μ L de solution de SAB et conservées à 4 °C.

1.2.2 Gamme étalon en anticorps anti-SAB

- À partir du sérum anti-SAB de titre connu, préparer une gamme de dilution géométrique de raison 1/2, allant de 1 à 512 en tampon PBS, sous un volume de 100 μ L.

1.2.3 Dosage des anticorps anti-SAB des sérums KO et T

Procéder à l'un des lavages en présence d'un examinateur

- Rejeter le contenu des cupules sensibilisées,
- Laver 3 fois par 200 μL de tampon **PBS-tween**.
- Déposer 50 μL de chacune des dilutions du sérum **anti-SAB** dans les puits A1 à A10,
- Déposer 50 μL de chacun des échantillons **KO et T**, et **en triple** exemplaire, dans les puits B1 à B6,
- Incuber 20 minutes à température ambiante et sur agitateur rotatif,
- Rejeter le contenu des cupules et laver 3 fois par 200 μL de tampon **PBS-tween**,
- Déposer dans chacune des cupules A1 à A11 et B1 à B6, 50 μL de **conjugué**,
- Incuber 20 minutes à température ambiante et sur agitateur rotatif,
- Rejeter le contenu des cupules et laver 3 fois par 200 μL de tampon **PBS-tween**,
- Déposer 50 μL du **substrat** dans les cupules A1 à A12 et B1 à B6,
- Dès l'apparition d'une coloration jaune (temps maximum de 5 minutes), ajouter 20 μL de solution d'arrêt **H₂SO₄** dans chacune des cupules,
- Lire rapidement les absorbances au lecteur de microplaques à 490 nm (le blanc est réalisé sur l'air en B12).

1.3 Compte-rendu

(les questions 1.3.2, 1.3.3 et 1.3.4 seront traitées par informatique en 20 minutes maximum)

- 1.3.1 Localiser les cupules témoins et préciser leurs rôles.
Interpréter les résultats obtenus.
- 1.3.2 Présenter les résultats sous la forme d'un tableau.
- 1.3.3 Tracer la courbe $A_{490\text{nm}}$ corrigée = f(concentration en anticorps anti-SAB en $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 1.3.4 Exploiter les résultats obtenus pour les témoins et les essais
- 1.3.5 Conclure.

Données : - Écart type de répétabilité S_r de la technique ELISA : 0,025 unité $A_{490\text{nm}}$
- Les résultats sont acceptables si $(A_{490\text{nm max}} - A_{490\text{nm min}}) \leq 3,3$ s.

2. Vérification par PCR sur colonie de la présence du gène *rag1* dans un vecteur (40 points)

Le gène *rag1* a été introduit dans un vecteur plasmidique. Ce dernier a été transféré dans une souche d'*E. coli* adaptée au clonage moléculaire. La présence du gène *rag1* est recherchée par PCR à l'aide d'amorces (A et B). La taille du fragment attendu est de _____

2.1 Souche, réactifs et matériel

- un isolement d'*E. coli* présenté en boîte de Petri (*E. Coli*) pour 2 candidats
- 500 μL d'eau de qualité biologie moléculaire (**eau BM**)
- 10 μL de tampon d'amplification 10x (**TA**)
- 10 μL de solution de dichlorure de magnésium à 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (**MgCl₂**)
- 5 μL de dNTP à 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (**dNTP**)
- 10 μL d'amorce A à 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (**amorce A**)
- 10 μL d'amorce B à 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (**amorce B**)

- 5 μL de solution de Taq polymérase à 1 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (**Taq**)
- 30 μL d'une solution de « Master » Mix 2x (**Master Mix**) : mélange réactionnel pré-élaboré qui contient l'ensemble des dNTP, du MgCl_2 , du tampon d'amplification et de la Taq polymérase.
- 10 μL de solution de tampon de charge 6x (**TC**)
- 2 tubes coniques de 0,2 mL
- 3 micro-tubes stériles de 1,5 mL
- cure-dents stériles ou pipettes Pasteur

2.2 Mode opératoire

2.2.1 Extraction de l'ADN nécessaire à l'amplification

- Prélever aseptiquement dans un micro tube de 1,5 mL, une colonie bactérienne porteuse du plasmide (*E. coli*) et la remettre en suspension dans 200 μL d'eau stérile (**eau BM**).
 - Placer la suspension à 100°C pendant 5 minutes.
 - Centrifuger à vitesse maximale pendant 5 minutes.
- Le surnageant sera utilisé pour réaliser la PCR.

2.2.2 Préparation des mélanges réactionnels

Deux amplifications seront réalisées en parallèle, l'une en ajoutant chaque réactif séparément (tube n° 1), l'autre en utilisant un « master mix » (tube n° 2)

- Identifier les deux tubes coniques de 0,2 mL.
- Déposer dans le tube n°1 :
 - V_1 μL d'eau de qualité biologie moléculaire (qsp 50 μL)
 - V_2 μL de tampon d'amplification 10x
 - 6 μL de solution de dichlorure de magnésium à 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
 - V_3 μL de dNTP à 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (30 nmoles)
 - 2 μL d'amorce A à 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 - 2 μL d'amorce B à 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 - 10 μL d'ADN matrice
 - V_4 μL de solution de Taq polymérase à 1 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (3U)

***Faire valider les volumes par un examinateur avant la réalisation de la manipulation
Réaliser l'addition de Taq polymérase en présence d'un examinateur.***

Conserver ce tube dans la glace jusqu'au démarrage de la PCR.

- Déposer dans le tube n°2 :
 - 11 μL d'eau de qualité biologie moléculaire, **eau BM** (qsp 50 μL)
 - 2 μL d'**amorce A** à 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 - 2 μL d'**amorce B** à 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 - 10 μL d'ADN matrice
 - 25 μL de solution de **Master Mix 2x**

Conserver ce tube dans la glace jusqu'au démarrage de la PCR.

2.2.3 Réalisation des PCR

Au moment imposé par les examinateurs, introduire les tubes identifiés dans le thermocycleur. L'amplification sera réalisée par les examinateurs.

Les deux tubes seront restitués au candidat après amplification.

2.2.4 Préparation des échantillons pour l'analyse sur gel d'électrophorèse

À l'issue de l'amplification :

- Centrifuger brièvement les micro-réacteurs.
- Pour chacune des amplifications, préparer un volume final compris entre 10 et 15 μL et contenant 3 μL de l'échantillon amplifié, V_5 μL de tampon de charge TC à la concentration finale de 1x, et V_6 μL d'eau de qualité biologie moléculaire, **eau BM**
- 6 μL de ce mélange seront déposés sur un gel d'agarose à 0,9%.

Les dépôts sur gel seront réalisés avant _____

Les dépôts des marqueurs de taille, la migration, la révélation et la photographie du gel seront réalisés par les examinateurs.

Signaler à l'examineur que les échantillons à déposer sont prêts et réaliser les dépôts en sa présence.

2.3 Compte-rendu

Indiquer et justifier la valeur des volumes calculés pour préparer : <ul style="list-style-type: none">- le mélange réactionnel (V_1 à V_4)- les dépôts sur gel (V_5 et V_6)

3. Vérification des outils du clonage (80 points)

Afin d'identifier l'équivalent humain du gène rag1 connu chez la souris, une banque d'ADN génomique doit être constituée à partir de l'ADN d'une lignée de cellules lymphocytaires.

Le vecteur utilisé est un vecteur phagique dérivé du phage lambda. Pour être fonctionnel, il doit conserver ses propriétés lytiques après insertion des fragments d'ADN dans le vecteur.

Ce vecteur vide porte également un gène codant une phosphatase alcaline PAL dont l'activité permet la sélection des clones transformés.

Avant de réaliser la banque de clones, il est nécessaire de vérifier que le vecteur utilisé (vide) est fonctionnel. Ses propriétés lytiques sont étudiées dans la partie 3.1. et on mesure l'activité d'un extrait réalisé à partir d'une souche transformée (cette souche ne possède pas de gène codant une phosphatase alcaline).

3.1 Propriétés lytiques du vecteur phagique (40 points)

On souhaite étudier :

- L'amplification du phage au contact d'une souche sensible par le titrage de la suspension phagique après 4 heures d'incubation.
- La lyse bactérienne induite par ce phage, en suivant l'évolution de la population bactérienne en présence et en absence du phage.

3.1.1 Réactifs, matériels et souche

- 1 tube de 5 mL de culture d'une souche bactérienne sensible au phage en bouillon LB (S)
- 1 tube à hémolyse contenant 2 mL de suspension de phages (PHAGES) dont le titre est : _____
- 1 tube à hémolyse contenant 5 mL de LB stérile (LB)
- 5 microcuves
- 2 flacons pour culture contenant exactement 8 mL de LB stérile (ESSAI) et (TÉMOIN)
- 4 boîtes de gélose coulées et sèches
- tubes de 9 mL d'eau stérile pour les dilutions
- 1 tube à hémolyse contenant 3 mL de gélose molle en surfusion.

3.1.2 Mode opératoire

3.1.2.1 Mise en contact des phages et des bactéries

On souhaite à l'instant $t = 0$, qui correspond à la mise en contact phages/bactéries, une multiplicité d'infection (MOI, « Multiplicity of infection ») voisine de 1 phage pour 5 bactéries, c'est-à-dire une concentration bactérienne (en UFC.mL⁻¹) environ 5 fois plus élevée que la concentration phagique (en UFP.mL⁻¹).

- Déterminer l' A_{600} de la culture de la souche S contre le milieu.
Effectuer l'ensemble de cette détermination en présence d'un examinateur.
Données :
 - $A_{600} = 1,00$ correspond à environ _____ UFC.mL⁻¹
 - Limite de linéarité : _____
- Calculer le volume de suspension bactérienne nécessaire pour obtenir $A_{600} = 0,10 \pm 10\%$ à l'instant $t=0$
Le volume de suspension de phages nécessaire pour obtenir la multiplicité d'infection souhaitée est de _____ μL .
- Calculer le volume de LB nécessaire pour compléter le flacon **ESSAI à 10 mL**.
- Établir la composition du flacon **TÉMOIN** sans phages sous le même volume final.
- Compléter le tableau de manipulation fourni en annexe.

Faire vérifier ce tableau par un examinateur avant de continuer les manipulations.

- Ajouter le volume de suspension bactérienne calculé ci-dessus dans les flacons.
- Ajouter alors rapidement les volumes de suspension de phages et/ou de bouillon LB calculés ci-dessus.
- Homogénéiser soigneusement, puis prélever 1 mL du flacon **TÉMOIN** et placer ce prélèvement dans un tube de 9 mL d'eau stérile, qui constitue donc la dilution 10^{-1} .
- Éliminer 1 mL du flacon **ESSAI** dans le désinfectant.
- Indiquer le n° de poste et confier les flacons à un examinateur qui les place sous agitation à $T=37^\circ\text{C}$.

Indiquer l'heure de début d'incubation à un examinateur.

3.1.2.2. Dénombrement des populations bactériennes par la technique des gouttes

Les dénombrements seront réalisés par la technique en gouttes avec des dépôts de 20 μL . Trois dilutions décimales successives seront testées en double essai de manière à compter 10 à 50 colonies par goutte.

a. Dénombrement de la population bactérienne initiale.

- Calculer les dilutions décimales successives à tester.
- Réaliser ces dilutions sous un volume de 10 mL d'eau physiologique
- Déposer 20 μL de chacune d'elle en double essai sur une boîte de gélose étiquetée **témoin 0**.

b. Dénombrement de la population bactérienne après incubation.

- Après 4 heures d'incubation, demander les flacons à un examinateur.
Indiquer l'heure de fin d'incubation à un examinateur.
- Observer l'aspect des flacons et mesurer A_{600} pour chaque culture, remplir la feuille de résultats et la joindre au compte rendu.
- Conserver les flacons dans la glace.
- Préparer des dilutions décimales sous un volume de 10 mL :
 - **jusqu'à 10^{-7}** à partir du flacon **TÉMOIN**
 - **jusqu'à 10^{-8}** à partir du flacon **ESSAI**
 (ces dilutions serviront également pour le titrage de la suspension phagique)
- Déposer 20 μL des dilutions en double essai :
 - **10^{-5} à 10^{-7}** pour le témoin, en boîte de gélose étiquetée **témoin 4**
 - **10^{-2} à 10^{-4}** pour l'essai, en boîte de gélose étiquetée **essai 4**

3.1.2.3. Titrage des phages obtenus après incubation par la technique des gouttes

- Ajouter 200 μL de suspension de souche **S** à 3 mL de gélose molle en surfusion.
- Couler rapidement ce mélange à la surface d'une boîte de gélose sèche étiquetée **phages 4**
- Attendre **10 min** la solidification de la couche de gélose molle et bien sécher la surface de la boîte.
- Déposer des gouttes de 20 μL en simple essai de chacune des dilutions 10^{-4} à 10^{-8} du flacon **ESSAI**.
- Retourner les boîtes lorsque les dépôts sont parfaitement secs et incuber les boîtes 18 à 24 h à 37°C.

3.1.3 Compte-rendu

3.1.3.1. Mise en contact des phages et des bactéries

- Justifier les calculs ayant permis de compléter le tableau fourni en annexe
- Justifier le volume de suspension phagique ajouté au flacon **ESSAI**

3.1.3.2. Dénombrement des populations bactériennes

- Justifier le choix des dilutions testées pour le dénombrement de la population bactérienne initiale.

3.2 Activité de l'extrait enzymatique (PAL) (40 points).**3.2.1 Réactifs et matériel**

- 2 mL de solution de **pNP** à 10^{-4} mol.L⁻¹
- 20 mL de solution de **pNPP** à 4.10^{-2} mol.L⁻¹
- 30 mL de solution **tampon** à pH 9,8
- 30 mL de **solution d'arrêt** (NaOH à 2 mol.L⁻¹ ; EDTA à 20 mmol.L⁻¹)
- 1 mL d'extrait enzymatique (**PAL**)
- tubes à hémolyse
- un chronomètre
- macro cuves

3.2.2 Manipulation**3.2.2.1 Détermination du coefficient d'absorption linéique molaire, $\epsilon_{\text{pNP}_{405\text{nm}}}$ dans les conditions opératoires**

- Préparer une gamme d'étalonnage selon le tableau ci-dessous :

Tubes N°	1	2	3	4	5
pNP (nmoles)	0	50	100	150	200
Eau (mL)	qsp 2 mL				
Tampon (mL)	2	2	2	2	2
Solution d'arrêt (mL)	2	2	2	2	2

- Lire les absorbances à 405 nm.

3.2.2.2 Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline de l'extrait

Cette détermination sera réalisée à 37°C en double essai (l'un des essais sera réalisé en présence d'un examinateur)

- Introduire dans un tube à essai 1,8 mL de **pNPP** et 2 mL de **tampon**. Préincuber 5 minutes.
- Déclencher la réaction en ajoutant 0,2 mL d'extrait enzymatique (**PAL**)
- Après 2 minutes, ajouter 2 mL de **solution d'arrêt**.
- Lire l'absorbance à 405 nm contre un témoin approprié.

3.2.3 Compte-rendu

- 3.2.3.1** Présenter les résultats sous forme de tableau
- 3.2.3.2** Tracer sur papier millimétré la courbe permettant de déterminer la valeur de $\epsilon_{\text{pNP}_{405\text{nm}}}$ (coefficient d'absorption linéique molaire à 405 nm en $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$).
- 3.2.3.3** Calculer la valeur de l' $\epsilon_{\text{pNP}_{405\text{nm}}}$ dans les conditions opératoires. Justifier ce calcul.
- 3.2.3.4** Expliquer la réalisation du tube témoin.
- 3.2.3.5** Vérifier la cohérence des essais (on prendra $cv = 5\%$).
- 3.2.3.6** Établir l'expression littérale permettant de calculer la concentration d'activité catalytique de l'extrait enzymatique étudié.
- 3.2.3.7** Calculer cette concentration d'activité catalytique, de **pNPP** hydrolysé ($\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$).
- 3.2.3.8** Préciser la condition expérimentale qui doit être assurée pour mesurer une concentration d'activité catalytique.
- 3.2.3.9** Conclure.

À la fin de l'épreuve, laisser le mode opératoire sur le poste de travail en y indiquant le numéro de ce poste.

ANNEXE

VÉRIFICATION DES OUTILS DU CLONAGE

3.1. Propriétés lytiques du vecteur phagique.

TABLEAU DE MANIPULATION

N° DE POSTE :

	TÉMOIN	ESSAI
Milieu LB (mL)	8 mL	8 mL
Culture bactérienne		
Suspension phagique		
Milieu LB		
Eau physiologique stérile		

Document à joindre à la copie

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 8 heures

Coefficient : 8

*RÉALISATION PRATIQUE
D'OPÉRATIONS DE GÉNIE
BIOLOGIQUE*

DEUXIÈME JOUR

Durée : 1 h 15

Le sujet comporte 2 pages numérotées de 1/2 à 2/2

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

Étude moléculaire d'un gène participant à la synthèse des immunoglobulines

2. Vérification par PCR sur colonie de la présence du gène *rag1* dans le vecteur (40 points)

Une photographie du résultat de l'électrophorèse est fournie.
(Question 2.2 traitée en utilisant l'outil informatique)

Compte rendu

- 2.1 Annoter l'électrophorégramme fourni et le rendre avec la copie.
- 2.2 Présenter les résultats dans un tableau et tracer le graphique permettant d'exploiter les résultats.
- 2.3 Déterminer la taille des amplicons obtenus.
- 2.4 Analyser les résultats obtenus pour les tubes 1 et 2.
- 2.5 Conclure.

Données :

3090, 2750, 2500, 2250, 2000, 1750, 1500, 1250, 1000, 750, 500, 250pb

3. Vérification des outils du clonage (80 points)

3.1 Propriétés lytiques du vecteur phagique (40 points)

Un nombre de 10 à 50 colonies ou plages de lyse pour un spot de 20 μ L peut être considéré comme exploitable.

- Effectuer le comptage des colonies bactériennes sur les boîtes **Témoin 0**, **Témoin 4**, **Essai 4**.
- Observer les résultats obtenus sur la boîte **phage 4**
 - Commenter les résultats obtenus selon les critères suivants :
 - Lyse totale
 - Lyse confluyente
 - Plages dénombrables
 - Compter les plages de lyse.

Compte-rendu :

- 3.1.1 Présenter les résultats sous la forme d'un tableau
- 3.1.2 Calculer ou estimer les concentrations bactériennes dans les flacons à $t=0$ et $t=4$ h.
- 3.1.3 Calculer ou estimer le titre phagique dans le flacon **ESSAI** à $t=4$ h.
- 3.1.4 Conclure quant à la conservation des propriétés lytiques. Justifier.