

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 4 h 00

Coef. : 4

SESSION 2000

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.
Calculatrice autorisée.
1 feuille de papier millimétré.

EPREUVE : ÉTUDE DE PROJET**QUELQUES UTILISATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES BACTÉRIES LACTIQUES**

Les bactéries lactiques sont depuis très longtemps utilisées dans de nombreuses fermentations à cause de leurs qualités propres : caractère non pathogène, absence de toxicité, stabilité et bonne viabilité, résistance au pH

L'étude proposée ici, concerne certaines de leurs applications :

- les probiotiques
- la production d'acide lactique
- l'amélioration du pouvoir protéolytique par mutagenèse
- le clonage d'un gène impliqué dans la production d'arôme

1. Les probiotiques : influence des bactéries lactiques sur la production d'interféron (19 points)

On appelle probiotique, une préparation bactérienne, généralement à base de bactéries lactiques utilisées sous forme revivifiable, à des fins nutritionnelles et/ou thérapeutiques. Le yaourt peut être considéré lui même comme un probiotique.

Le système immunitaire peut être stimulé *in vivo* et *in vitro* par des agents alimentaires présents dans les produits de fermentation (yaourt).

On cherche à mettre en évidence l'effet des bactéries lactiques sur la production d'interféron *in vivo*.

Protocole : des groupes de 5 souris Swiss de 5 à 6 semaines ont été inoculées par voie intra - péritonéale avec différentes quantités de bactéries lactiques sous un volume de 0,5 mL de solution saline isotonique (SSI). Après prélèvement sanguin, les sérums de chaque groupe de souris sont rassemblés.

1.1. Première expérience.

On réalise un mélange de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* selon un rapport 1:1. Différentes quantités de ce mélange sont injectées aux souris. Les prélèvements sanguins sont effectués 2, 4, 6, 8 et 24 heures après l'injection et un dosage d'interféron sérique est pratiqué.

Analyser les résultats rapportés dans le document 1.

1.2. Deuxième expérience.

Lactobacillus bulgaricus et *Streptococcus thermophilus* sont injectés séparément, et en deux quantités différentes. Le document 2 présente les résultats obtenus.

Quelle est la bactérie lactique qui stimule la production d'interféron ? Justifier la réponse à l'aide des document 1 et 2.

BOPRO

1.3. Troisième expérience.

5.10^7 *Lactobacillus bulgaricus* vivants sont injectés et les sérums prélevés et rassemblés 6 heures plus tard. La caractérisation de l'interféron produit est réalisée par une technique de neutralisation : on mesure l'activité antivirale résiduelle des sérums de souris, après mise en contact avec des anticorps spécifiques anti INF α/β et anti INF γ .

En quoi la réaction employée est-elle une réaction de neutralisation ?

Analyser le document 3. Justifier les témoins.

Indiquer, en le justifiant, le type d'interféron présent dans l'échantillon de sérum de souris.

2. La production d'acide lactique (24 points)

2.1. Le document 4A présente les voies métaboliques de la production d'acide lactique.

2.1.1. D'après les voies métaboliques, quel type de bactéries lactiques choisir pour une telle production ? Argumenter la réponse.

2.1.2. En s'appuyant sur le document 4B, indiquer en quoi une production par procédé microbiologique est plus intéressante qu'une synthèse chimique.

2.2. D'après le document 5 :

2.2.1. Tracer sur la même feuille de papier millimétré les courbes

- courbe de croissance
- [acide L-lactique] = $f(t)$
- pH = $f(t)$

2.2.2. Expliquer la baisse du pH.

2.2.3. A quel type de métabolite appartient l'acide L-lactique ? Justifier la réponse .

2.2.4. Déterminer la productivité volumique horaire finale en acide lactique.

2.2.5. Estimer la productivité horaire finale par cellule.

2.2.6. Calculer la quantité de substrat restant à la fin de la fermentation, sachant que le rendement de production en acide L-lactique par rapport au glucose consommé est de 95 % (m/m).

3. L'amélioration du pouvoir protéolytique (18 points)

La transduction phagique et la mutagénèse chimique sont des procédés envisageables pour améliorer l'activité protéolytique de la souche.

3.1. Transduction

On purifie les phages par centrifugation en gradient de chlorure de césium (CsCl).

Des particules phagiques sont observées en microscopie électronique à transmission. (document 6).

Le document 6A présente les résultats de la centrifugation et le document 6B l'observation au microscope électronique à transmission des différentes bandes obtenues.

Quelle bande choisir pour réaliser la transduction ? Justifier la réponse.

3.2. Mutagénèse chimique

Plusieurs agents mutagènes sont testés sur *Lactobacillus delbrueckii*. Un criblage préalable est réalisé pour sélectionner les souches sauvages ayant naturellement une activité protéolytique.

3.2.1. D'après le document 7A comment réaliser l'étape de présélection du criblage (nature du milieu utilisé et lecture de ce milieu) ?

Quel intérêt présente la technique de mesure de l'activité protéolytique ?

3.2.2. Analyser les courbes du document 7B

BOPRO

3.2.3. Analyse du document 7C :

Calculer la moyenne (« average ») pondérée de l'activité protéolytique des mutants obtenus après action de l'EMS.

Quel est l'agent mutagène le plus intéressant ?

4. Clonage d'un gène de protéase de bactérie lactique (19 points)

Certaines bactéries lactiques synthétisent des protéases qui génèrent des peptides impliqués dans l'arôme du produit de fermentation. Aussi, afin de maîtriser les qualités organoleptiques de ce dernier, le gène, codant une protéase importante dans ce processus et porté par un plasmide naturel (4 kb), est cloné. Il sera alors possible de produire la protéine intéressante en quantité importante et d'en étudier les propriétés.

Ce clonage commence par une extraction et une purification de l'ADN d'intérêt, suivie d'une restriction double et d'une ligature avec un vecteur adapté.

4.1. Mini-préparation du plasmide naturel par lyse alcaline

4.1.1. Réalisation des mini-préparations

L'extraction/purification de ce plasmide naturel est réalisée par lyse alcaline adaptée à des bactéries Gram⁺. Trois essais sont réalisés suivant le protocole présenté dans le document 8.

Expliquer le rôle des réactifs soulignés dans le texte.

4.1.2. Résultats des mini-préparations

4.1.2.1. Quantification UV des extraits

Une quantification UV des mini-préparations est réalisée selon le protocole présenté dans le document 9. Les résultats de la mini-préparation N°3 sont les suivants :

$$A_{260\text{nm}} = 0,132 \quad A_{280\text{nm}} = 0,08$$

Sachant que 1 UA_{260nm} correspond à une concentration d'ADN double brin de 50 µg/mL, calculer la concentration en ADN plasmidique de la mini-préparation.

Calculer le rapport A_{260} / A_{280} de la mini-préparation.

Conclure sur la pureté de la préparation, justifier la réponse.

4.1.2.2. Electrophorèse de contrôle

Une électrophorèse de contrôle en gel immergé d'agarose à 1,2 % (m/v) des trois mini-préparations d'ADN plasmidique est réalisée. Une reproduction du gel est présentée dans le document 10.

Sachant que la taille du plasmide est de 4 kb, analyser et interpréter le résultat du N° 3 (aucun graphe ni calcul n'est demandé).

Comment expliquer l'aspect du résultat du N° 2 ?

4.2. Réalisation de la digestion double

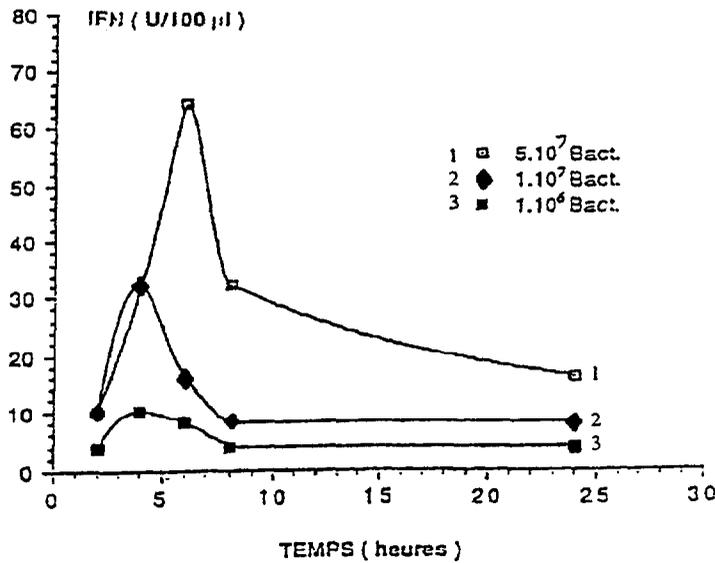
La digestion double de l'ADN d'intérêt est réalisée en utilisant *Bam* HI et *Not* I comme enzymes de restriction.

L'enzyme *Bam* HI fonctionne dans un milieu de concentration ionique moyenne ; l'enzyme *Not* I fonctionne à haute concentration ionique.

Expliquer pourquoi il est nécessaire de réaliser une digestion double successive en hydrolysant l'ADN par *Bam* HI puis par *Not* I.

Document 1

Cinétique de la production de l'interféron sous l'effet des bactéries lactiques administrées par voie intrapéritonéale.



Document 2

Induction de l'interféron par *L. bulgaricus* ou *S. thermophilus* (6h après injection intrapéritonéale).

Concentration des bactéries inoculées	5,0.10 ⁷ / 0,5 mL	2,5.10 ⁷ / 0,5 mL
	Interféron (U / 100 µL)	
<i>L. bulgaricus</i>	256	32
<i>S. thermophilus</i>	4	4
Témoin (SSI)	ND	ND

Note : - SSI : solution saline isotonique
 - ND = activité non détectable

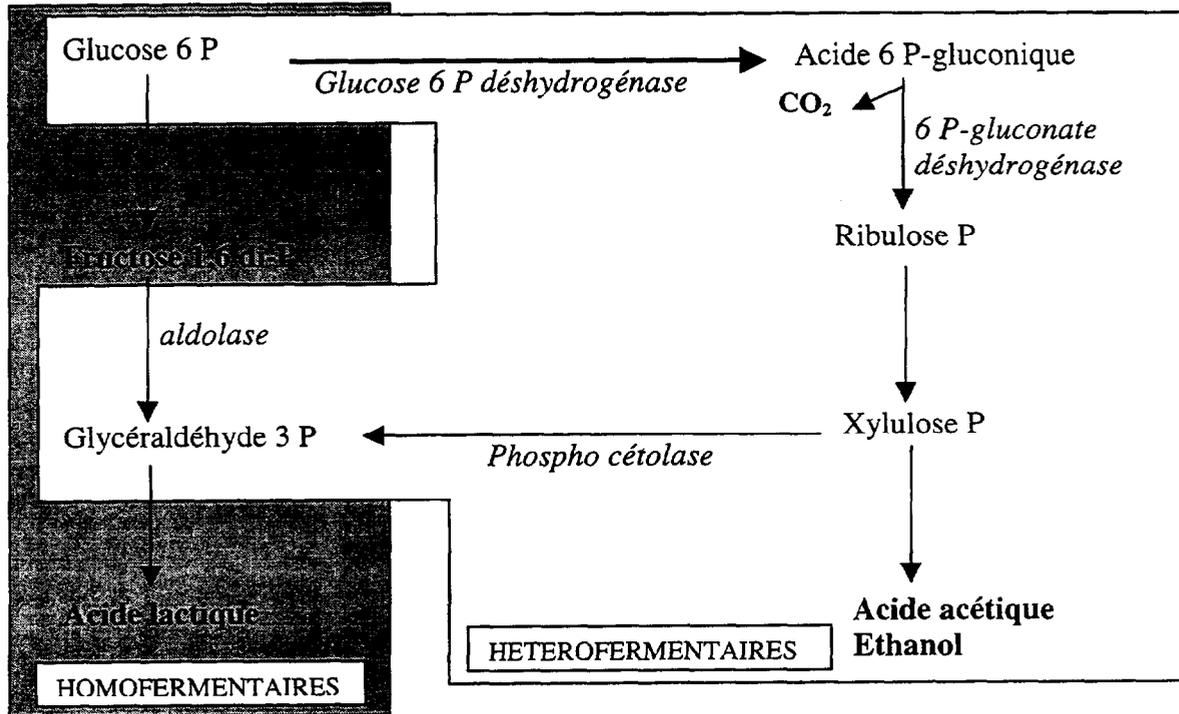
Document 3

Activité résiduelle d'INF (U/100 µL) après incubation du sérum positif (100 unités d'interféron) avec des anticorps anti α/β ou anti γ.

	Anticorps bloquants utilisés		
	Néant	Anti α/β	anti γ.
	Activité résiduelle U d'INF/ 100 µL		
Echantillon du sérum de souris	256	ND	256
INF α/β étalon	1 024	ND	1 024
INF γ étalon	2 048	2 048	ND

Document 4A

Les voies métaboliques de la production d'acide lactique

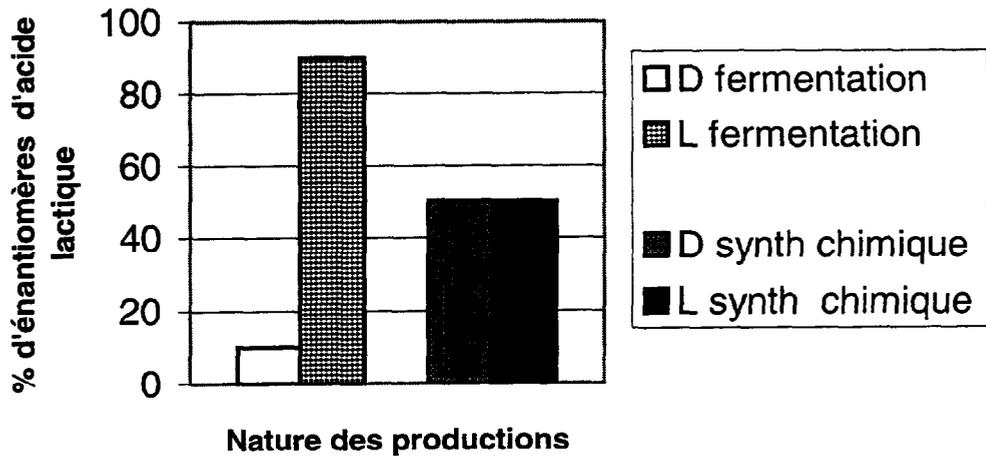


FERMENTATIONS LACTIQUES

- Homofermentaires obligatoires : absence de glucose 6 P-déshydrogénase
- Homofermentaires facultatifs : présence des 4 enzymes
- Hétérofermentaires obligatoires : absence d'aldolase

Document 4 B

Obtention d'acide lactique par deux procédés différents

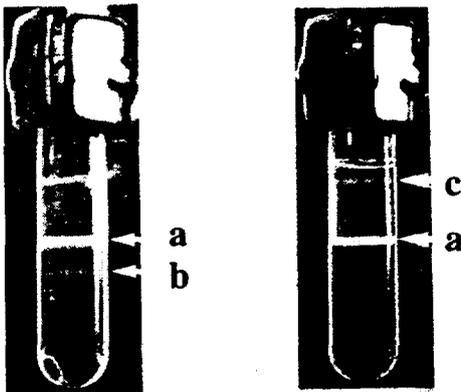


Document 5

Croissance de *Lactobacillus delbrueckii* libre en milieu non renouvelé
(glucose 4,8 % (m/v) ; fermenteur de 20L ; T : 43°C ; densité cellulaire finale : $1,5 \cdot 10^9$ cellules/mL)

Temps (heure)	Biomasse (A à 600 nm)	Acide L-lactique (g/L)	pH
0	0,100	0	6,5
2	0,200	0,8	6
4	0,500	2,5	5,3
6	1,300	4,8	5
8	1,600	7,6	4,7
10	2,000	9,4	4,5
12	2,400	10,2	4,35
14	2,600	11	4,25
16	2,700	11,8	4,1
20	2,875	12,1	4
30	2,950	12,1	3,8

Document 6A

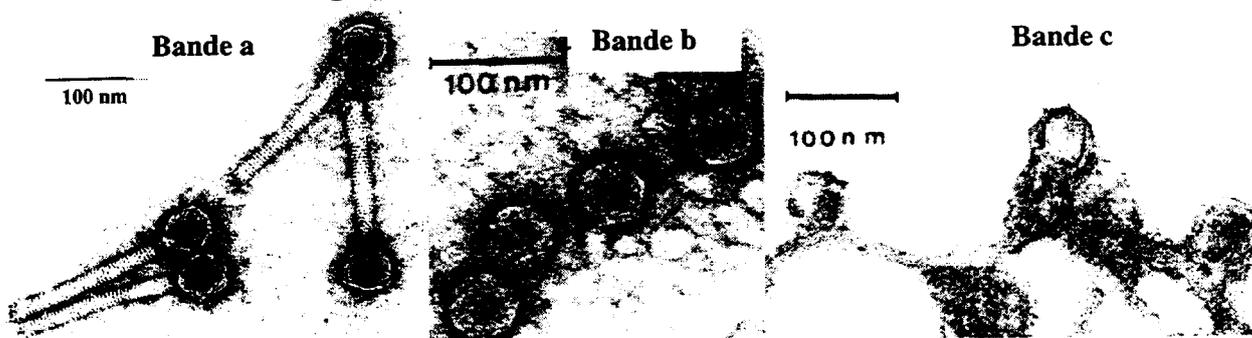


Centrifugation sur gradient de chlorure de césium
préformé de deux suspensions phagiques

Les bandes obtenues sont indiquées par des pointes de flèche (a,b,c), la principale (a) ayant une densité de 1,5 dans les deux cas.

Document 6B

Electromicrographies après coloration à l'acétate d'uranyle des éléments des différentes bandes.



Document 7

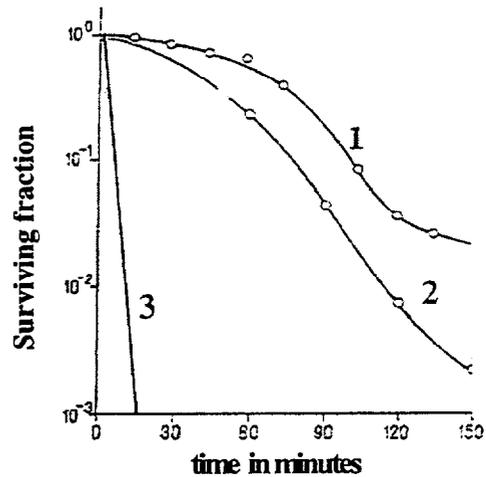
Document 7A : Correlation between clearance zones and proteolytic activity in the untrated parentculture of *Lactobacillus delbrueckii*

Diameter of clearance zones (in mm)	Number of colonies examined	Number of colonies showing proteolytic activity (mg of tyrosine liberated/g)		
		Range 0,00-0,23	Range 0,24-0,31	Range 0,32-0,40
8 - 10	50	10	28	12
5 - 7	50	35	12	8
0 - 4	50	42	8	0

Document 7 B

Survival curve of *Lactobacillus delbrueckii* after exposure to different chemical mutagens

- 1 : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)
- 2 : Ethylemine
- 3 : Ethyl-methane-sulfonate (EMS)



Document 7C : Proteolytic activity of *L. delbrueckii* recovered after different treatment

mg of tyrosine liberated/g		Number of survivors after :		
range	average	EMS	Ethylemine	NTG
0,250-0,450	0,350	Control		
0,250-0,300	0,275	5	8	-
0,300-0,350	0,325	8	18	-
0,350-0,400	0,375	12	34	-
0,400-0,450	0,425	25	25	-
0,450-0,500	0,475	-	12	50
0,500-0,550	0,525	-	3	24
0,550-0,600	0,575	-	-	16
0,600-0,650	0,625	-	-	10

Moyenne de l'activité protéolytique :

	0,387	0,518
--	-------	-------

BOPRO

Document 8

Mini-préparation d'ADN plasmidique de bactéries Gram + lyse alcaline

Centrifuger 1,5 mL de culture pendant 30 secondes à 12 000 g et éliminer le surnageant. Remettre en suspension les bactéries dans 140 μ L de tampon TEG complété avec 10 μ L de la solution de lysozyme à 10 mg/mL. Agiter doucement par retournement. Incuber 5 à 10 minutes à 37°C.

Ajouter 200 μ L de NaOH 0,2 M/SDS 1 % (m/v) et incuber 5 minutes dans la glace.

Ajouter 200 μ L de d'acétate de potassium 3M à pH 4,8. Incuber 5 minutes dans la glace et centrifuger à 12 000 g pendant 15 minutes. Récupérer le surnageant.

Poursuivre par un traitement au PCI (phenol/chloroforme, alcool isoamylique), une précipitation à l'alcool et l'action d'une RNase.

Composition TEG : Tris 10 mM à pH 8
 EDTA à 1 mM
 Glucose à 1 % (m/v)

Document 9

Quantification UV d'une partie aliquote de la mini-préparation

Placer 4 μ L d'une mini-préparation d'ADN dans un tube côneique contenant 996 μ L de tampon TE. Mélanger plusieurs fois par retournement.

Effectuer des mesures d'absorbance à 260 nm et 280 nm pour chacune des mini-préparations contre du TE.

Document 10

Electrophorégramme de trois mini-préparations

agarose 1,2 % (m/v),

80 V, 30 min,
coloration BEt

M = marqueur de taille

1,2,3 = mini-préparation

