

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 4

ÉTUDE DE PROJET

Le sujet comporte 13 pages numérotées de 1/13 à 13/13

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

Matériel nécessaire : une feuille de papier millimétré.

Production de l'antibiotique spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*

Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses du sol appartenant au groupe des Actinomycètes. Ces micro-organismes sont à Gram positifs, immobiles et aéroanaérobies facultatifs. Ils ont un très grand intérêt industriel, puisqu'ils produisent environ 60 % des antibiotiques utilisés en thérapeutique ainsi qu'un certain nombre de métabolites comme des vitamines, des enzymes et des inhibiteurs d'enzymes.

L'espèce *Streptomyces ambofaciens* a été sélectionnée pour sa production de spiramycine, antibiotique macrolide, utilisé dans le traitement des infections O.R.L..

La formule développée de la spiramycine est représentée dans le *document 1*. La molécule de spiramycine est constituée d'un cycle lactonique sur lequel sont greffés des résidus glucidiques.

I. Conditions de culture et de production de l'antibiotique (11 points)

La spiramycine est produite industriellement depuis plus de vingt ans. Le milieu de production est un milieu liquide complexe, utilisant quelques sous-produits de l'industrie agroalimentaire. Sa composition est détaillée dans le *document 2*. Dans ce milieu, *Streptomyces ambofaciens* forme soit un mycélium dense si les filaments restent libres, soit des pelotes dans le cas contraire.

I.1. Constituants du milieu de production

Analyser la composition de ce milieu en donnant le ou les intérêts des différents constituants.

I.2. Agitation en fermenteur

La production industrielle de spiramycine est réalisée en « batch » dans des fermenteurs de plusieurs dizaines de m³. Une agitation forte du milieu de fermentation de *Streptomyces ambofaciens* est essentielle pour obtenir une concentration en oxygène dissous suffisante pour la croissance et la production de l'antibiotique.

Le schéma du *document 3* présente deux types de mobiles d'agitation. Ces deux types se différencient, en plus de leur forme, par le régime d'écoulement du milieu de culture qu'ils imposent lors de leur rotation.

I.2.1. D'après le *document 3*, présenter dans un tableau les avantages et les inconvénients des deux types de mobiles d'agitation : A et B

I.2.2. Annoter le schéma du *document 3bis* (page 7/13) et le rendre avec la copie.

I.2.3. Quel type de mobile d'agitation doit-on choisir pour agiter un milieu de fermentation de *Streptomyces* ? Pourquoi ?

II. Métabolisme lipidique en relation avec la production de spiramycine (22 points)

La spiramycine comme la plupart des macrolides est synthétisée en deux étapes. La première étape comprend la synthèse du cycle lactonique ou partie aglycone. La deuxième étape fixe les résidus glucidiques sur ce cycle lactonique.

La synthèse du cycle lactonique passe par l'intervention d'un complexe enzymatique appelé polykétide synthase (polycétone synthase). Ce complexe enzymatique utilise des acides gras comme précurseurs de la partie aglycone de la spiramycine. Le processus d'élongation du cycle lactonique à partir d'un résidu activé d'acide gras possède de nombreuses similitudes avec celui de la synthèse des acides gras à longues chaînes. Les équipes de recherche ont essayé de mettre en relation la consommation de nutriments lipidiques contenus dans le milieu de production et la synthèse de spiramycine.

A partir d'une fermentation type en bioréacteur de 2 L, on a suivi l'évolution de quelques paramètres : la biomasse (X) en $g.L^{-1}$, l'amidon (S_A), les lipides totaux (S_L) et la spiramycine (P), en fonction du temps t .

Le **document 4** rapporte l'évolution de ces concentrations ainsi que les vitesses spécifiques correspondantes : Q_{SA} , Q_{SL} , Q_P .

- II.1. Tracer la courbe $\ln(X) = f(t)$. Déterminer la durée de la phase exponentielle, déterminer le temps de génération G et la vitesse spécifique de croissance pendant la phase exponentielle $Q_{x,expo}$.
- II.2. Tracer $P = f(t)$ sur le même graphique. En déduire le type de métabolite produit par la bactérie. Justifier la réponse.

Le **document 5** représente l'évolution en fonction du temps de la concentration des substrats glucidique et lipidique d'une part, et de la concentration des activités amylasique et lipolytique d'autre part.

- II.3. Analyser les courbes de consommation des substrats étudiés en utilisant en parallèle les données du **document 2** et la courbe de croissance tracée précédemment. Comparer les courbes montrant la consommation des substrats et l'évolution des concentrations d'activité enzymatique au cours des 72 premières heures de culture. Conclure.
- II.4. Proposer une explication au troisième pic d'activité lipolytique.
- II.5. Discuter la relation potentielle entre le substrat lipidique et la production de spiramycine

III. Dosage de la spiramycine par HPLC et par méthode immuno-enzymatique (20 points)

La spiramycine peut être dosée par différentes méthodes : spectrophotométrique, microbiologique, immuno-enzymatique et par HPLC.

III.1. Dosage par HPLC

Le **document 6** rapporte le protocole de dosage et un chromatogramme obtenu lors de la séparation des trois formes de spiramycine d'un échantillon de surnageant de culture. La colonne utilisée est une colonne en phase inverse.

À l'aide des **documents 1 et 6**, justifier l'ordre de séparation des trois formes de spiramycine sur ce type de colonne.

III.2. Dosage immuno-enzymatique

Le **document 7** présente le protocole de dosage de la spiramycine par méthode immuno-enzymatique.

- III.2.1 Discuter du caractère immunogène de la spiramycine.
- III.2.2 Les différentes étapes de ce dosage sont présentées dans le **document 7** ; les schématiser et préciser leurs rôles en complétant ce **document** (à rendre avec la copie).
- III.2.3 Quel type de technique ELISA est employée dans ce dosage ?

Le *document 8* présente les résultats d'un dosage de la spiramycine par la technique ELISA

- III.2.4 Commenter la courbe obtenue, puis déterminer la concentration en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de spiramycine produite par la souche de *Streptomyces*, sachant que l'absorbance de l'échantillon est de 0,352. Après avoir comparé ce résultat avec la concentration de spiramycine obtenue au temps $t = 190$ h (*document 4*), en déduire la dilution initiale effectuée sur l'échantillon.

IV. Construction d'un vecteur de clonage spécifique à *Streptomyces ambofaciens* (27 points)

L'amélioration de la production d'antibiotiques passe obligatoirement aujourd'hui par la manipulation génétique des souches. Un des outils génétiques est l'utilisation de vecteurs d'insertion des fragments d'ADN dans la cellule bactérienne. Certaines équipes recherchent des vecteurs phagiques spécifiques aux *Streptomyces*. Pour cela, il est nécessaire de mettre en évidence l'existence de ces ADN phagiques soit sous forme intégrée dans le chromosome bactérien, soit sous forme plasmidique, extrachromosomique, comme le plasmide pSAM.

IV.1. Analyse de l'ADN des souches de *Streptomyces*

Le génome de quatre souches de *Streptomyces ambofaciens* provenant d'origines géographiques différentes est analysé par PFGE (électrophorèse en gel pulsé). On cherche à démontrer la présence du plasmide phagique pSAM (80 Kpb) sous forme extra chromosomique. On estime la taille de l'ADN génomique des *Streptomyces* entre 6000 et 8000 Kpb.

Les caractéristiques des quatre souches testées sont consignées dans le tableau du *document 9*.

Les souches A et B servent respectivement de témoin positif et de témoin négatif.

On effectue une extraction douce de l'ADN des différentes souches (limite les cassures) puis les extraits sont analysés.

Le gel est révélé au bromure d'éthidium (BET). La photographie du gel correspond à la *figure 1 du document 10*.

- IV.1.1. Analyser la photographie du gel présenté en *figure 1 du document 10* et indiquer la nature des bandes obtenues.

Les résultats pour les pistes A et B sont-ils compatibles avec les données du *document 9* ?

- IV.1.2. À l'aide des *documents 10 et 11*, justifier l'utilisation de l'ADN du phage lambda comme marqueur de taille pour des fragments de taille inférieure à 1 000 kb.

IV.2. Mise en évidence du plasmide pSAM : forme intégrée ou forme extra-chromosomique

On réalise sur le plasmide pSAM un marquage à chaud par déplacement de coupure (Nick Translation).

À partir du gel on réalise un transfert sur membrane de nitrocellulose et une hybridation avec la sonde préparée à partir de pSAM. Le résultat est présenté dans le *document 10, figure 2*.

- IV.2.1. Quel est le nom de la technique utilisée ?

- IV.2.2. Peut-on valider les résultats de l'expérience à la lecture des pistes témoins A et B ? Justifier.

- IV.2.3. Conclure quant à la présence du plasmide pSAM dans les souches tests C et D.

IV.3. Construction d'un vecteur de transformation

La souche test A possède le plasmide pSAM sous forme libre et intégrée. Le plasmide pSAM s'intègre dans le chromosome par un mécanisme d'intégration site spécifique. La recombinaison a lieu entre deux séquences identiques de 58 bp présentes sur le plasmide (attP) et sur le chromosome (attB). Le vecteur pKC67, fabriqué à partir de pSAM, est détaillé dans le *document 12*.

- IV.3.1 Expliquer la construction du plasmide pKC67.

BOPRO

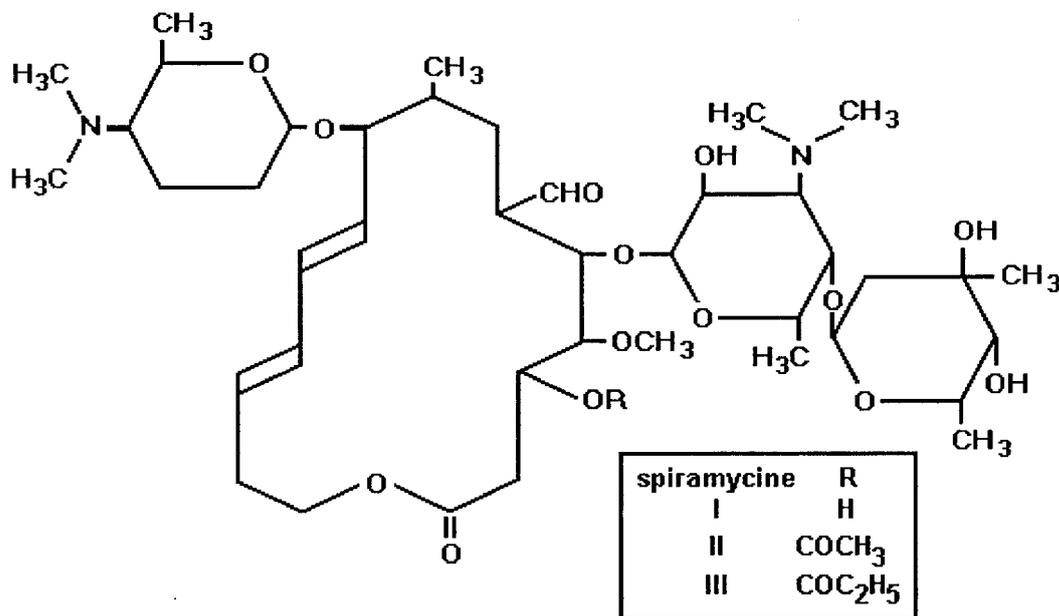
IV.3.2. Quel est l'intérêt de l'utilisation de deux enzymes de restriction différentes lors d'un clonage ?

IV.3.3. Expliquer le rôle du gène Am^R et du MCS.

IV.3.4. Il a été démontré que ces vecteurs, une fois intégrés, sont d'une très grande stabilité même en l'absence de pression de sélection. Expliquer l'avantage de ce système dans les bio-productions industrielles.

DOCUMENT 1

Formule développée de la spiramycine, avec ses trois formes possibles.



DOCUMENT 2

Composition du milieu de production pour *Streptomyces ambofaciens*.

Milieu de production

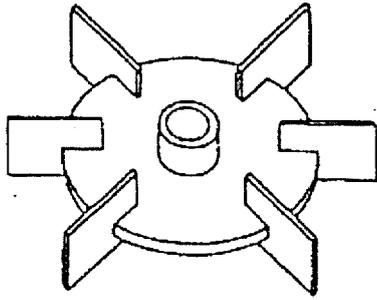
Corn steep*	20,0 g.L ⁻¹
Amidon soluble	50,0 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2,8 g.L ⁻¹
FeSO ₄	0,5 g.L ⁻¹
NaCl	10,0 g.L ⁻¹
	pH ajusté à 7,7
Huile de maïs	20,0 g.L ⁻¹

*Résidu de la transformation industrielle du maïs.

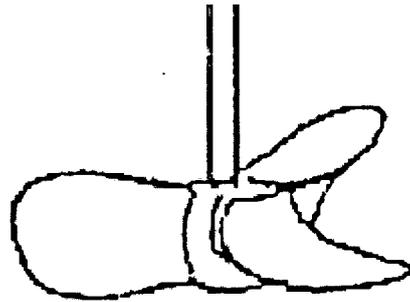
DOCUMENT 3

“Most of mixers used in stirred reactors have either a radial-flow, axial-flow or a combined flow pattern. Radial-flow impellers (like Rushton impeller) generate high shear potentially detrimental to some microbial cultures and animal cell cultures. This type of impellers can provide efficient but localized high gas-liquid mass transfer. Axial flow impellers in contrast generate less shear and can provide efficient gas-liquid-solid distribution (good bulk mixing) but relatively poor gas-liquid mass transfer.”

Schéma des deux mobiles d'agitation A et B.



A



B

DOCUMENT 4

Evolution des concentrations des différents paramètres de la fermentation étudiés, ainsi que les vitesses spécifiques correspondantes ; Q_{SA} , Q_{SL} , Q_P .

Temps (heure)	X (g.L ⁻¹)	S _A (g.L ⁻¹)	S _L (g.L ⁻¹)	P (mg.L ⁻¹)	Q _{SA} (h ⁻¹)	Q _{SL} (h ⁻¹)	Q _P (h ⁻¹)
0	3,05	47,64	20	0	0	0,124	0
6	3,2	47,1	15,8	0	0	0,085	0
12	4,35	45,92	15	0	0,086	0,038	0
17	6,15	41,4	14,9	0	0,118	0,012	0
24	8,8	16,2	14,6	0	0,113	0,005	0,007
36	15,15	4,9	12,3	9,9	0,067	0,013	0,261
52	18	3,12	3,35	94,5	0,016	0,013	0,346
66	18,2	2,6	1,8	156	0	0,009	0,236
72	18,2	2,35	1,2	182	0	0,005	0,120
88	18,2	2,18	0,7	227	0,003	0,002	0,083
100	18,2	1,9	0,4	255	0,001	0,000	0,150
114	16,9	1,8	0	280	0,001	0,000	0,189
138	14	1,65	0	297	0,001	0,000	0,176
144	13,3	1,5	0	298	0,001	0,000	0,142
162	11,5	1,23	0	306	0	0,000	0,065
190	10	3,66	0	300	0	0,000	0

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIE

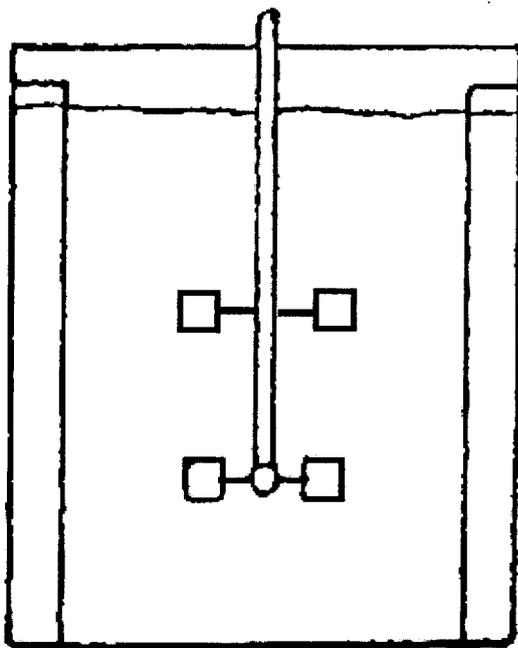
ÉPREUVE : ÉTUDE DE PROJET

Durée : 4 h
Coefficient : 4

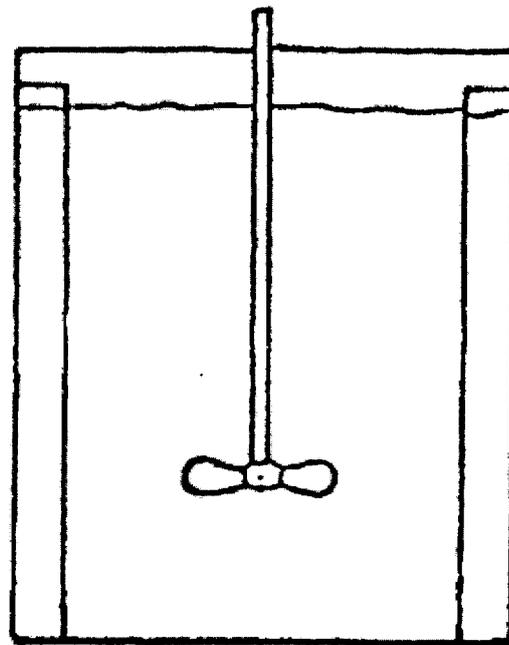
Session 2005

DOCUMENT 3bis À ANNOTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

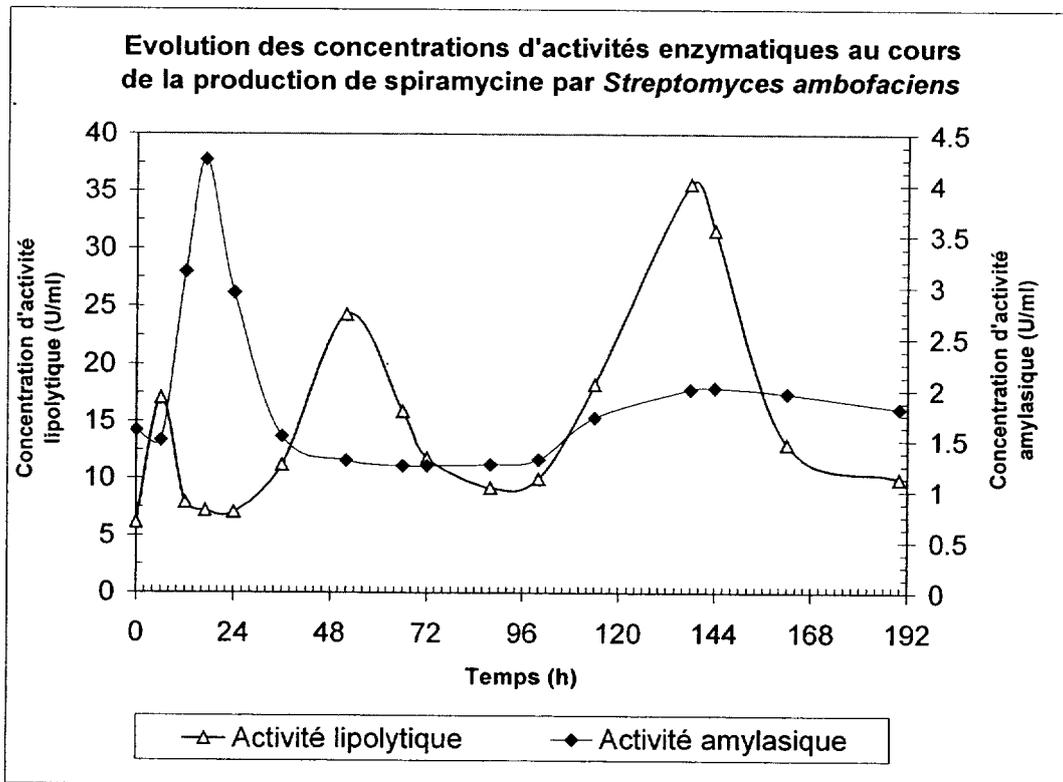
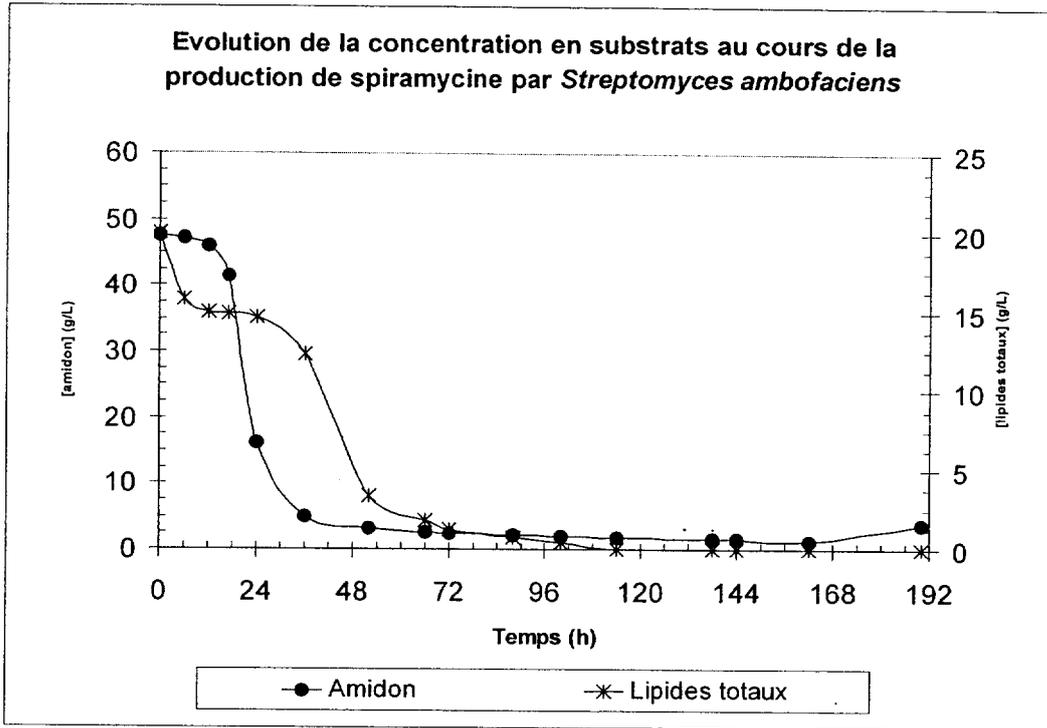
Indiquer sur le schéma les deux régimes d'écoulement du milieu de culture. Les schémas A' et B' correspondent respectivement aux mobiles d'agitation A et B, du schéma 1 *du document 3*.



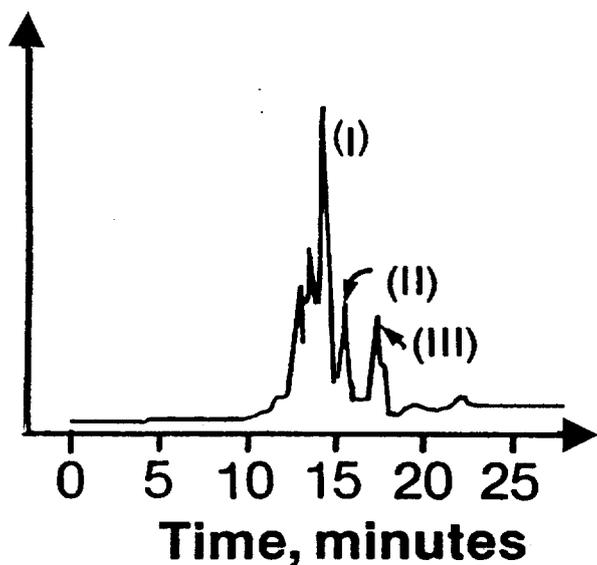
A'



B'



DOCUMENT 6

Chromatogramme de la séparation des trois formes de spiramycine par HPLC.

Methanol or alkaline ethyl extracts of the culture broths were used to assay antibiotic activity and for analysis of products by high pressure liquid chromatography (HPLC). For spiramycin platenolide, analytical HPLC was performed with a Waters C18- μ Bondapak reverse column (3.9 by 300 mm) using various solvent systems and operated at a flow rate of $1 \text{ mL} \cdot \text{mn}^{-1}$. A gradient system of 30 to 70% acetonitrile-sodium perchlorate (0.01 M; pH 4.0; 23 min) was used for separation of spiramycin and its analogs. The effluent was monitored at 232 nm.

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOTECHNOLOGIE

ÉPREUVE : ÉTUDE DE PROJET

Durée : 4 h
Coefficient : 4

Session 2005

DOCUMENT 7 À RENDRE AVEC LA COPIE

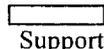
Légende à utiliser pour les schémas



AC



Ag



Support

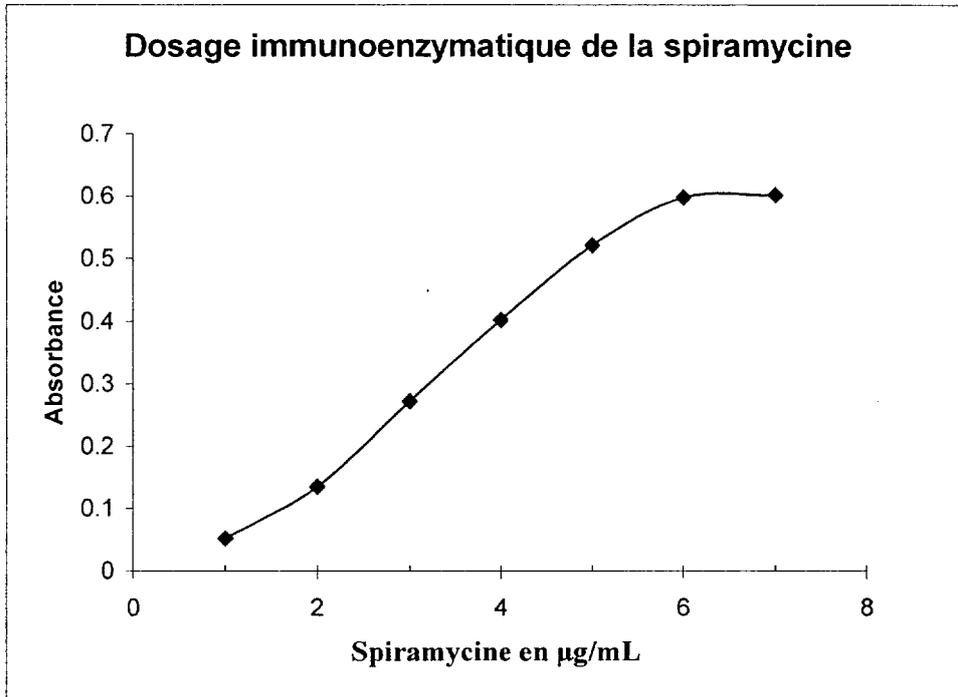
Protocole expérimental	Rôles des différentes étapes	Schémas des différentes étapes
<ul style="list-style-type: none"> - Placer 200 μL de AC dans les cupules de la microplaque - Incuber 3 heures à 37°C - Vider et laver avec du tampon PBS 		
<ul style="list-style-type: none"> - Distribuer 250μL de SAB à 2% dans chaque cupule - Placer 24h à 4°C 		
<ul style="list-style-type: none"> - Vider et rincer 3 fois avec du tampon PBS Tween - Laver avec du tampon PBS - Ajouter 100μL de A - Incuber 1 heure puis laver 3 fois au PBS Tween, puis rincer avec du PBS - Ajouter 100 μL de AC* - Agiter et incuber 1 heure à 37°C 		
<ul style="list-style-type: none"> - Laver et rincer 3 fois avec du PBS Tween, puis avec du PBS - Ajouter 150 μL de S - Incuber 15 min à 37°C - Addition de 50 μL de NaOH à 1 mol.L⁻¹ 		

A = Spiramycine = Ag
SAB = Sérum albumine bovine
S : Substrat de la phosphatase alcaline

AC = Anticorps anti-spiramycine
AC* = Anticorps anti-spiramycine marqué à la phosphatase alcaline

DOCUMENT 8

Résultats d'un dosage de la spiramycine par la technique ELISA



DOCUMENT 9

Caractéristiques des quatre souches de *Streptomyces ambofaciens* testées génétiquement.

<i>Strains of Streptomyces ambofaciens</i>			
Stock designation	Strain	pSAM extra chromosomal form	pSAM integrated form
A	<i>S. ambofaciens</i> ATCC15154	+	+
B	<i>S. ambofaciens</i> DSM40697	—	—
C	<i>S. ambofaciens</i> ETH9427	No published data	
D	<i>S. ambofaciens</i> ETH11317	No published data	

ATCC, American Type Culture Collection ; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen ; +/- Detection of plasmid DNA.

Analyse ADN par PFGE

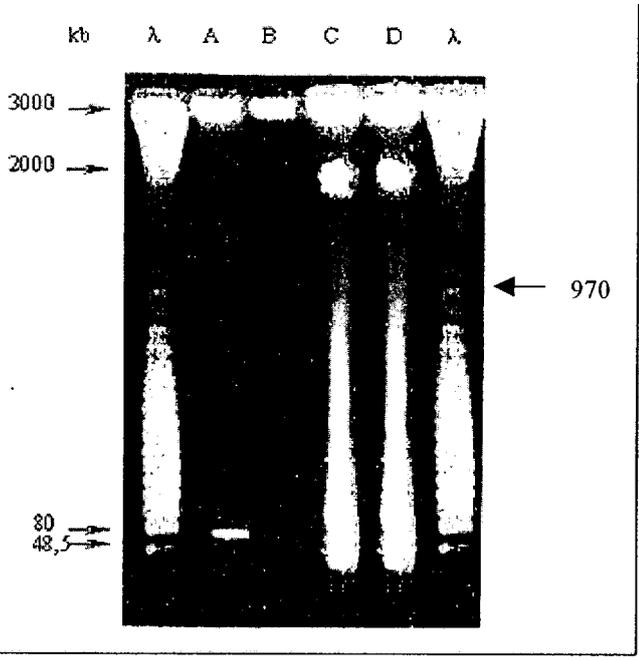


Figure 1

PFGE analysis of undigest DNA of *Streptomyces ambofaciens* strains after growth at 37°C for 8 h.
 Lanes : λ, concatemers of λ DNA used as size standard, A, strain A ; B, strain B ; C, strain C ; D, strain D ;
 Runnig conditions were 180V for 24 h with ramped pulse time from 60 s to 120 s.

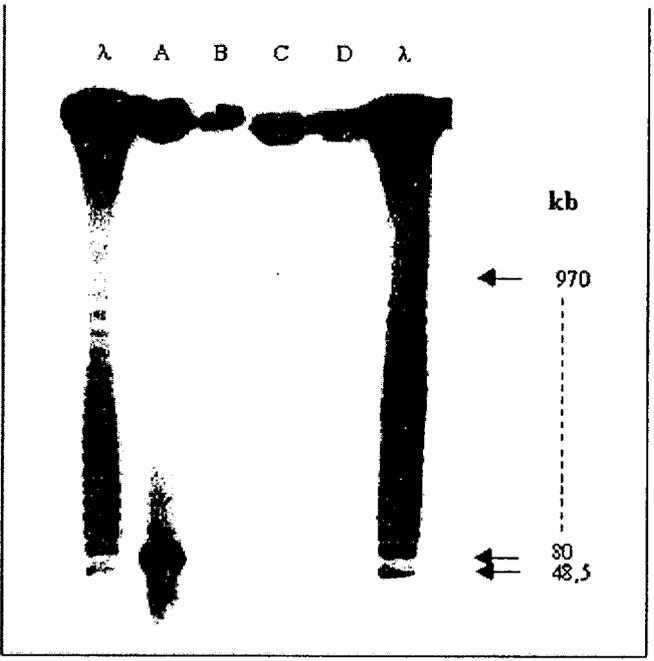


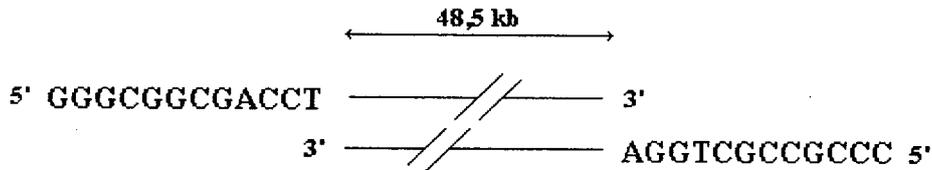
Figure 2

Hybridation of ³²P-labelled pSAM DNA with PFGE pattern of undigest DNA of *S. ambofaciens* strains.
 Lanes λ, hybridation of ³²P-labelled λ DNA with concatemers of λ DNA ; A, strain A ; B, strain B ; C, strain C ; D, strain D ;

DOCUMENT 11

Séquence des extrémités de l'ADN du phage lambda

Concatemers of bacteriophage lambda DNA provided a convenient marker up to 1000 Kb.



DOCUMENT 12

Plasmid pKC67 was constructed by cloning a *Cla* I – *Kpn* I fragment from pSAM into *Cla* I + *Kpn* I – cut pKC34 (a pUC-based vector).

Thin line indicate DNA derivated from pKC34. Open boxes indicate pSAM DNA.

Blackened box indicates plasmid/phage attachment site. Hatched box represents the integrate location, and the arrowheads indicate the direction of transcription.

