

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 4

ÉTUDE DE PROJET

Le sujet comporte 10 pages numérotées de 1/10 à 10/10

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

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

Matériel nécessaire : une feuille de papier millimétré.

Toxines de *Bacillus thuringiensis* et biopesticides

Les δ -endotoxines produites par *Bacillus thuringiensis* représentent 90% des biopesticides commercialisés. Parallèlement aux δ -endotoxines spécifiques d'espèces d'insectes, les *Bacillus thuringiensis* peuvent produire également une β -exotoxine non spécifique, toxique pour les animaux. De ce fait, il est nécessaire de mettre au point des méthodes de dosage de la β -exotoxine permettant de garantir l'absence de celle-ci dans les biopesticides utilisés. Pour éviter la pulvérisation des plantations par des cultures de *Bacillus thuringiensis*, la recherche s'oriente également vers le développement de plantes transgéniques produisant des δ -endotoxines.

1. Détection de la β -exotoxine dans les biopesticides (53 points)

1.1 Structure de la β -exotoxine ; séparation et dosage par HPLC : **document 1.**

1.1.1 À quel groupe de biomolécule s'apparente la β -exotoxine ? Justifier. **Document 1.1.**

1.1.2 Étude du **document 1.2** :

1.1.2.1 Sous forme d'un schéma fonctionnel, donner les différents éléments du système chromatographique utilisé. Préciser leur rôle.

1.1.2.2 Quel est le mode de séparation utilisé ? Justifier.

1.1.2.3 Quel est le mode d'éluion utilisé ? Justifier.

1.1.2.4 Justifier le choix de la longueur d'onde de mesure.

1.1.2.5 Indiquer et justifier les traitements préliminaires des échantillons et des solvants lors de la réalisation d'une HPLC.

1.1.2.6 Déterminer le volume d'une fraction et le volume de tampon nécessaire pour réaliser l'analyse d'un échantillon de β -exotoxine.

1.1.2.7 Donner le temps de rétention de la β -exotoxine. Calculer son volume d'éluion et le facteur de dilution de l'échantillon.

1.2 Mise au point d'une technique immunoenzymatique de dosage : **document 2.**

Après avoir préparé les antigènes (**document 2.1**), obtenu les anticorps chez le lapin (**document 2.2**) et testé ces anticorps (**document 2.3**), on veut effectuer le dosage de la β -exotoxine par une méthode ELISA (**document 2.4**).

1.2.1 Préparation des antigènes : **document 2.1.**

1.2.1.1 Pourquoi doit-on coupler la toxine à une protéine ?

1.2.1.2 Donner l'équation du couplage de la β -exotoxine et d'une protéine (symbolisée R-NH₂), par la méthode au glutaraldéhyde (formules semi-développées demandées).

1.2.1.3 Commenter les résultats du tableau et les mettre en relation avec les données du **document 1.1.**

1.2.1.4 Quelle méthode de couplage semble la plus adaptée pour l'obtention d'anticorps ? Justifier.

BOPRO

- 1.2.2 Dosage de la β -exotoxine par méthode ELISA : **documents 2.3 et 2.4.**
- 1.2.2.1 Pourquoi n'utilise-t-on pas le même antigène pour tapisser la plaque et pour immuniser les lapins ?
 - 1.2.2.2 Comment peut-on interpréter les résultats du document 2.3 ?
 - 1.2.2.3 Sur un grand schéma, traduire les étapes du protocole de dosage de la β -exotoxine, en faisant apparaître les réactifs et les temps d'action. (**document 2.4**)
 - 1.2.2.4 Dans quel domaine de concentrations peut-on utiliser la courbe pour le dosage de la β -exotoxine dans les biopesticides ? (**document 2.4**)
- 1.3 Influence de la composition du milieu de culture sur la production de la β -exotoxine par *Bacillus thuringiensis* variété *kurstaki*.
- 1.3.1 Citer les principales caractéristiques du genre *Bacillus*.
 - 1.3.2 On étudie la production de β -exotoxine dans trois milieux différents, en dosant la toxine par la technique ELISA précédemment mise au point. (**document 3**).
 - 1.3.2.1 Comment mesure-t-on l'absorbance des suspensions bactériennes après 12 h de culture ? Justifier
 - 1.3.2.2 Déterminer pour le milieu 3 les différentes phases de la croissance.
 - 1.3.2.3
 - Comment détermine-t-on :
 - le temps de génération,
 - la vitesse spécifique de croissance maximale ?
 - Évaluer ces deux paramètres dans le cas de la culture sur milieu M₁ et M₃. Conclure.
 - 1.3.2.4 Expliquer le phénomène observé dans le milieu M₂ entre la 4^{ème} et la 14^{ème} heure de culture.
 - 1.3.2.5 Commenter la cinétique de production de cette toxine. À quel type de métabolite appartient-elle ?
 - 1.3.2.6 Quel est l'effet de la teneur en glucide du milieu sur la production de la β -exotoxine ? En déduire le milieu le plus adapté à la production de biopesticide.

2. Les δ -endotoxines et le riz transgénique (27 points)

Les larves de *Scirpophaga incertulas* (insecte lépidoptère) sont les principaux ravageurs responsables des diminutions massives de rendement des récoltes de riz. Ces larves sont sensibles à différentes δ -endotoxines, dont CryIAc.

Un cultivar de riz transgénique exprimant la toxine CryIAc a été développé par transfection de plants de riz, avec le plasmide recombinant pBCT1.

- 2.1 Le plasmide pBCT1.
- 2.1.1 Quel est le rôle des éléments soulignés du plasmide pBCT1 présenté dans le **document 4** ?
 - 2.1.2 À quelle catégorie de vecteur appartient ce plasmide ? Justifier.
 - 2.1.3 Que désigne le sigle *Bam*HI ?
- 2.2 La transfection des cals embryogènes de riz : **document 5.**
- 2.2.1 Définir un cal.
 - 2.2.2 Quelle est la méthode utilisée pour transférer ces cellules végétales ? Citer deux autres moyens de transfection d'une cellule eucaryote en général.

- 2.2.3 Quel est le rôle de l'hygromycine B dans le milieu de culture des cals « bombardés » ?
- 2.2.4 Indiquer le rôle des molécules 6-benzylaminopurine et acide α -naphtalene-acétique du milieu de culture.

2.3 Résultats, étude des plantes transgéniques : **document 6.**

2.3.1 Recherche de la présence du gène par PCR (*polymerase chain reaction*) **document 6.1.**

- 2.3.1.1 Sur un schéma, résumer le principe de la technique PCR, positionner les amorces, écrire les séquences bordantes du fragment de gène à amplifier, préciser le sens de l'élongation.
- 2.3.1.2 Pourquoi utilise-t-on des amorces de cette dimension ? Quelles doivent être les autres caractéristiques des amorces ?

2.3.2 Résultats de tests effectués sur les plants venant d'être régénérés à partir des cals : **document 6.2.**
Commenter le tableau :

2.3.2.1 Quel est le nombre total de plants transformés :

- résistants à l'hygromycine,
- ayant intégré le gène,
- exprimant le gène ?

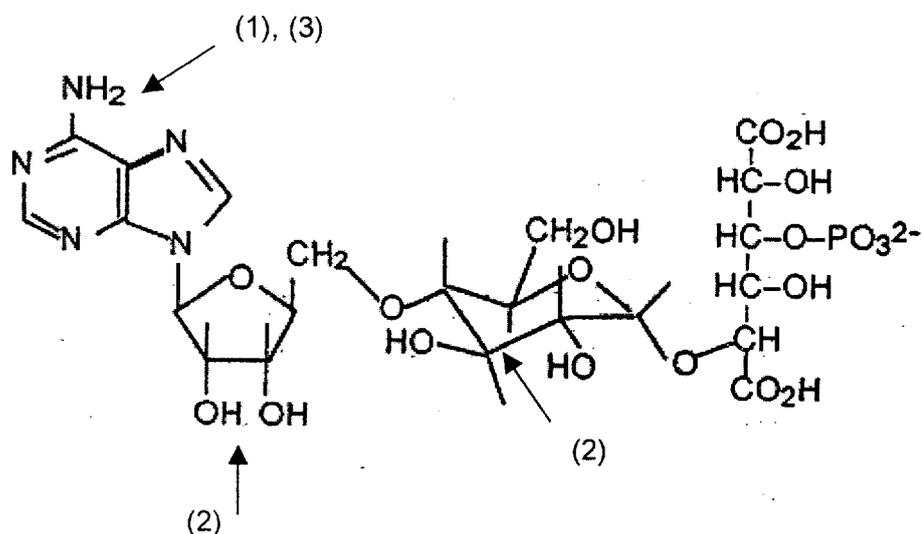
2.3.2.2 Analyser et interpréter les cas n° 4, 6 et 9.

DOCUMENT 1

Document 1.1 : Structure of β -exotoxin.

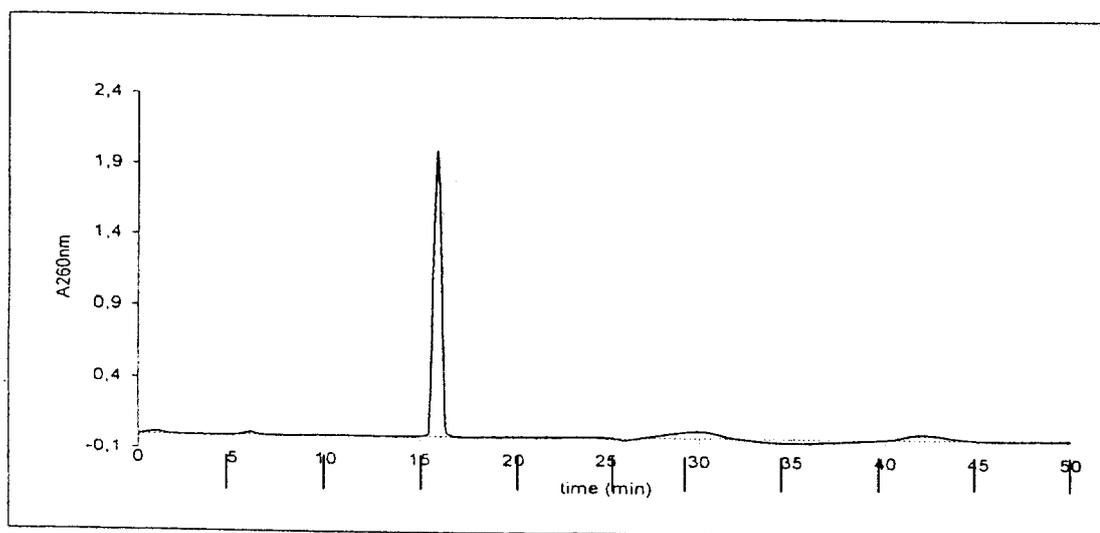
Arrows show positions of conjugation by :

- 1 : diazotation
- 2 : periodate coupling
- 3 : glutaraldehyde coupling

**Document 1.2 : HPLC β -exotoxin assay.**

A varian 9010 HPLC system with a 9050 UV-visible detector set at $\lambda = 260 \text{ nm}$ and a octadecylsilane bonded phase (C18). Column (15cm x 4,6 mm, 5 μm packing) from Supelco, Inc. (Bellefonte, PA) was used to fraction samples according to the method of Campbell et al. (1987).

The injection volume was 10 μL and fractions were collected every minute from 0 to 50 min. A mobile phase of 50 mmol.L^{-1} KH_2PO_4 , pH 3,0 with a flow rate of 2 mL.min^{-1} provides adequate conditions to separate the β -exotoxin components.



DOCUMENT 2

Document 2.1 : Préparation des antigènes.

La β -exotoxine est couplée à 2 protéines, soit à la sérum albumine de bœuf (SAB) soit à l'hémocyanine de mollusque, en utilisant trois techniques de couplage différentes :

- par diazotation,
- par la méthode au periodate,
- par la méthode au glutaraldéhyde.

Le couplage de la toxine avec les protéines est évalué en déterminant le rapport molaire (β -exotoxine / protéine) par spectrophotométrie d'absorption à 260 et à 280 nm. Les résultats obtenus pour les 3 méthodes de couplage à l'hémocyanine sont les suivants :

	diazotation	glutaraldéhyde	periodate
β -exotoxine / hémocyanine	5,4	6,6	99

Document 2.2 : Obtention des anticorps par immunisation des lapins.

Les lapins ont été immunisés, par voie intradermique avec le conjugué (β -exotoxine-hémocyanine) obtenu par une des 3 méthodes de couplage, comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

	diazotation	glutaraldéhyde	periodate
Lapins n°	939 et 942	948 et 950	957 et 961

Après une première immunisation avec 100 μ g de conjugué en présence d'adjuvant complet de Freund, on pratique trois rappels à quatre semaines d'intervalle avec le même conjugué en présence d'adjuvant incomplet de Freund. Après la dernière injection, on prélève le sang des animaux, on prépare les immun-sérums qui sont testés selon le protocole du document 2.3.

Document 2.3. : Dosage immunoenzymatique indirect des Anticorps de lapin anti- β -exotoxine.

Les puits d'une microplaque de titration sont tapissés en déposant 100 μ L de la β -exotoxine conjuguée à la SAB en tampon carbonate 0,5 mol.L⁻¹, pH 9,6 à la concentration de 20 μ g.mL⁻¹. Les plaques sont recouvertes et incubées une nuit à 4°C.

Le deuxième jour, les plaques tapissées sont lavées 5 fois avec du PBS pour éliminer l'antigène non fixé. Des dilutions en série de l'antisérum, en PBS, sont ajoutées à raison de 100 μ L par puits et les plaques sont incubées 2 h à température ambiante. Les plaques sont ensuite lavées 5 fois. 50 μ L d'IgG de chèvre anti-IgG de lapin marquées à la phosphatase alcaline, diluées en PBS (1/2500), sont ajoutées dans chaque puits et les plaques sont incubées 2 h à température ambiante. Après 5 nouveaux lavages, l'activité phosphatasique est mesurée en ajoutant dans chaque puits 100 μ L de pNPP (1mg.mL⁻¹ en tampon diéthanolamine, pH 9,8). L'intensité de la coloration est lue à 405 nm après 30 min d'incubation à température ambiante.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

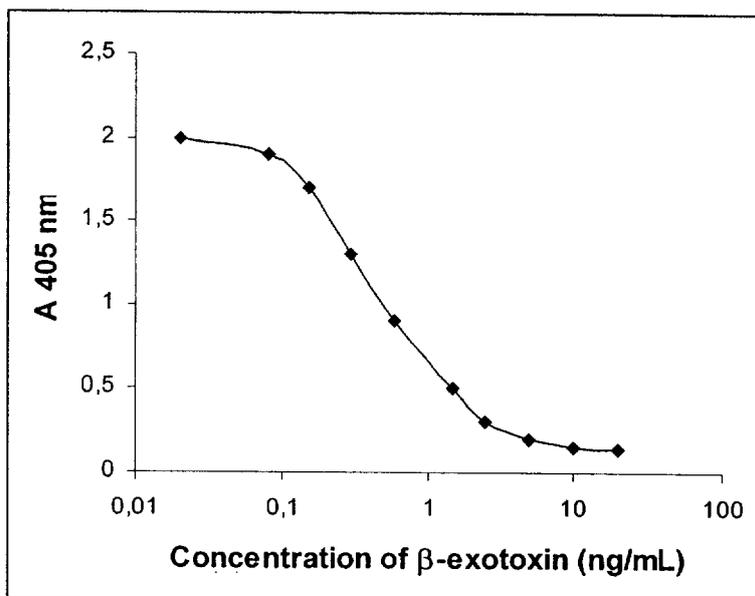
Antigène adsorbé sur la plaque = β -exotoxine couplée à la SAB par	Antisérum testé provenant des lapins n°					
	939	942	948	950	957	961
Diazotation	-	-	-	-	-	++
Glutaraldéhyde	-	-	-	-	+	++
Periodate	-	-	+	++	++	+++

Intensité de la coloration : (-) = faible, (+) = modérée, (++) = élevée, (+++) = très élevée.

Document 2.4 : β -exotoxine quantification by competitive enzyme immunoassay

The procedure for competitive ELISA was essentially the same as that for the indirect ELISA described above. Firstly, the plates were coated by adding β -exotoxin-BSA conjugates and incubated overnight. In the same time, dilutions of β -exotoxin or sample containing exotoxin in distilled water were incubated overnight at room temperature with the rabbit anti- β -exotoxin antiserum. Then, those dilutions were added to the coated and washed plates. From there, the enzyme immunoassay was performed as in document 2.3.

An example of calibration curve obtained with rabbit n°957 antiserum is given below :



DOCUMENT 3

Influence de la composition du milieu de culture sur la production de la β -exotoxine par *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Btk).

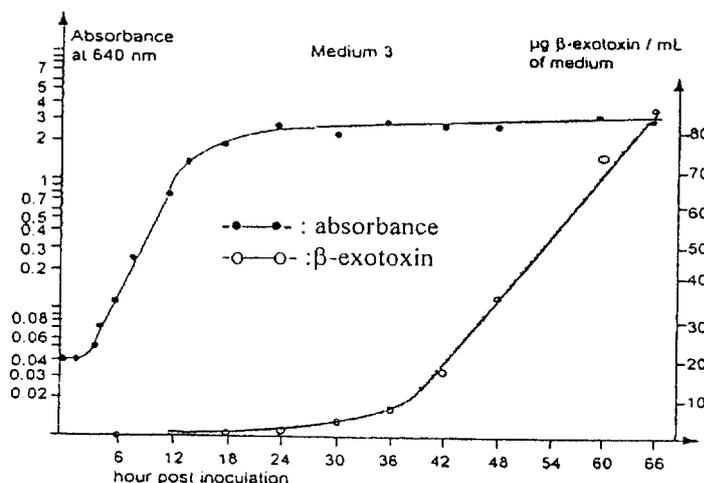
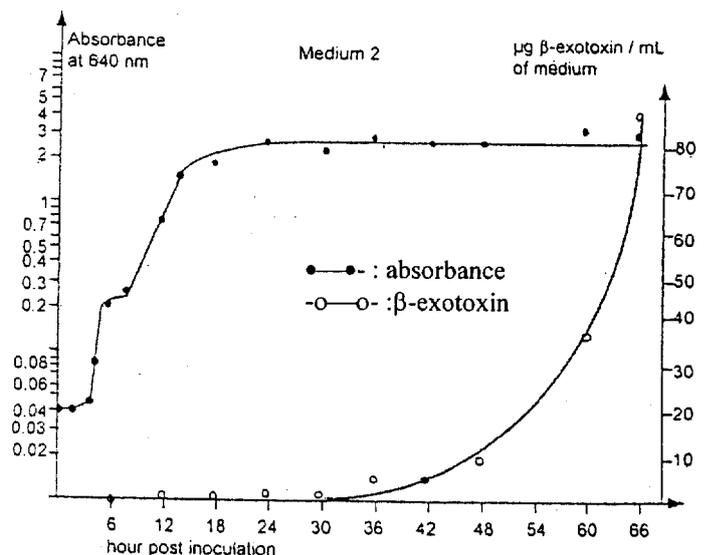
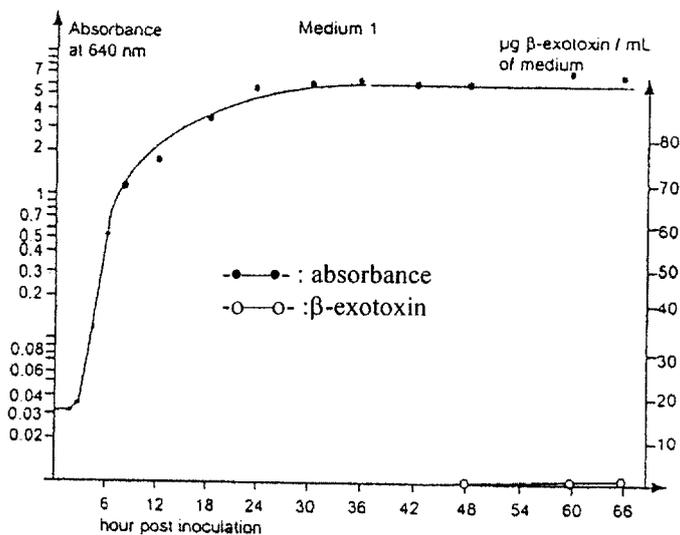
Trois fioles d'Erlenmeyer de 250 mL, contenant chacune 50 mL d'un milieu différent (M1, M2, M3) préchauffées à 34°C, sontensemencées avec un inoculum de 500 μ L.

Les fioles sont incubées dans un bain thermostaté à 34°C, sous agitation de 200 osc/min.

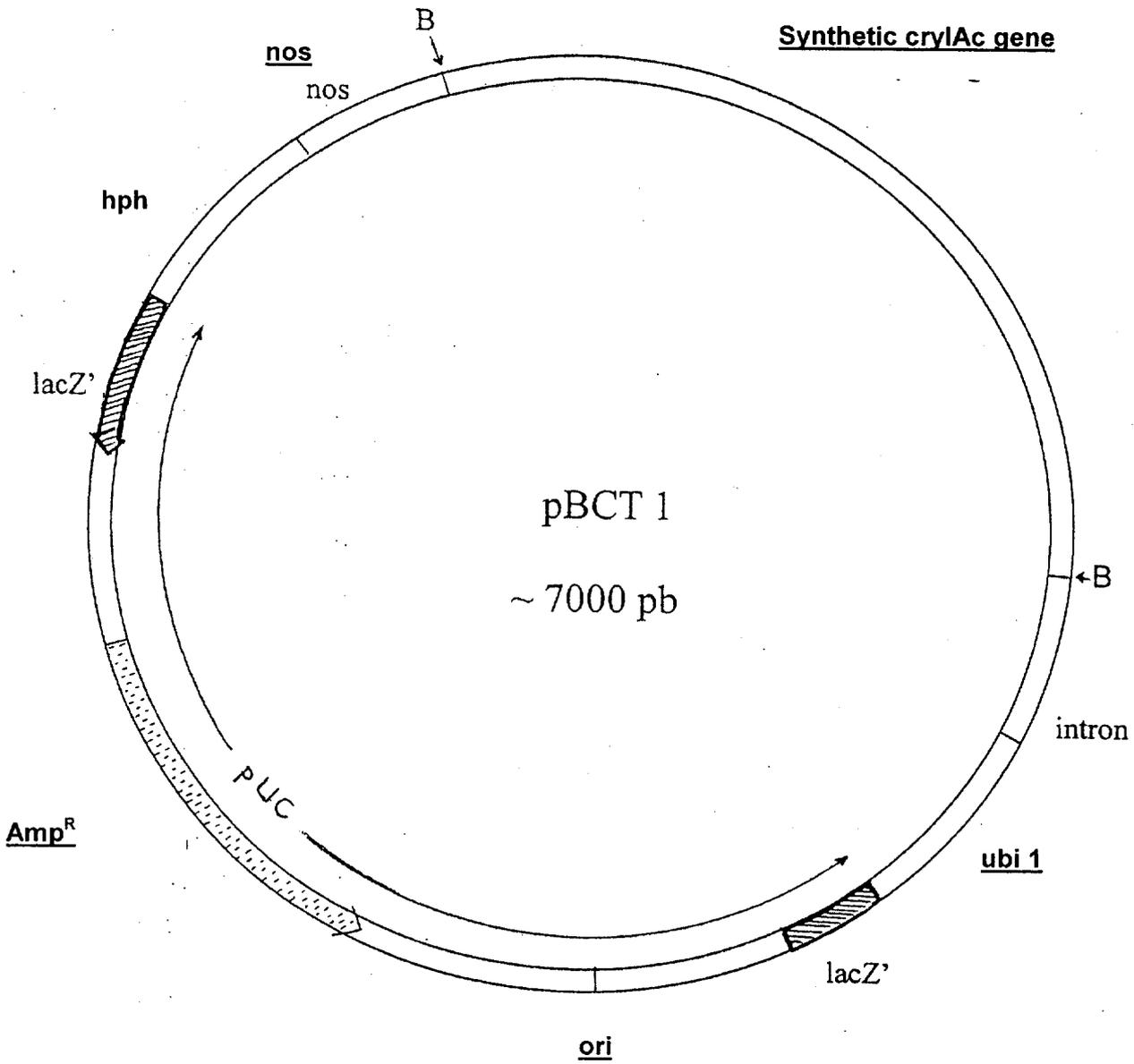
L'inoculum correspond à une culture d'une nuit en bouillon trypticase soja de Btk incubé dans un bain thermostaté à 34°C, sous agitation de 200 osc/min.

A intervalles de temps réguliers, des aliquots sont prélevés dans chaque fiole puis congelés en attendant l'analyse par ELISA.

Composition	Pancreatic digest of casein (g/L)	Papaic digest of soybean meal (g/L)	NaCl (g/L)	Dextrose (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	pH à 25°C
M1	17.0	3.0	5.0	15.0	2.5	7.3 \pm 0.2
M2	17.0	3.0	5.0	2.5	2.5	7.3 \pm 0.2
M3	17.0	3.0	5.0	-	2.5	7.3 \pm 0.2



DOCUMENT 4 : Plasmide pBTC 1



B = *Bam*HI

hph = gène codant l'hygromycine phosphotransférase ; l'hygromycine phosphorylée est inactive.

nos = nopaline synthetase terminator

ubi 1 = ubiquitin 1 promoter

ubiquitine = protéine conservée chez tous les eucaryotes

DOCUMENT 5

Rice transformation :

Embryogenic calli were initiated from tissues of mature seed embryo of indica rice (IR64). One-month-old calli were bombarded with plasmid DNA pBTC1 using a Bio-Rad 1000/He Biolistic gun at 1100 psi (psi = pound per square inch). After 24 h, the bombarded calli were transferred to fresh medium containing 50 µg/mL hygromycin B. After two sub-cultures, each lasting two weeks, rapidly growing calli were separated and cultured in the selection medium for another three sub-cultures. Surviving calli were transferred to the preregeneration medium and incubated under 16 h light / 8 h dark photoperiod (3 000 lux) at 24°C for ten days, followed by transfer to Murashige and Skoog (MS) medium without any growth regulators for plant regeneration.

Murashige and Skoog (MS) medium = salts and vitamins

Preregeneration medium = MS medium + 3 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) + 1 mg/L α-naphtaleneacetic acid (ANA) + 3% sucrose + 1% agar, pH 5,7.

DOCUMENT 6

Document 6.1.

PCR analysis employed the following primers :

5'-ACCAGATCATGGCCTCTCCAGTT-3'
5'-TTCAAGATTGTA CT CAGCCTCAAG-3'

for amplification of a 905-bp fragment from the *cryIac* gene.

Document 6.2. : Summary of transformation experiments :

Cal number	Mass bombarded (mg)	Number of plants		
		Hyg-resistant	<i>cryIac</i> ⁺	showing high <i>cryIac</i> protein expression
1	462	11	8	-
2	384	7	3	-
3	457	17	12	2
4	387	14	11	-
5	456	9	6	1
6	389	-	-	-
7	417	16	12	1
8	433	8	6	-
9	446	24	18	2