

# EPREUVES DE LA SESSION 1988

---

## SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GENIE BIOLOGIQUE

Durée : 4 h

Coef. : 6

### Remarques préliminaires :

- 1 - Le sujet proposé est, à l'image des biotechnologies, nécessairement pluridisciplinaire : le candidat devra veiller à répondre d'une manière concise aux différentes questions posées.
- 2 - On peut suggérer au candidat de consacrer impérativement à chaque question un temps prenant en compte le nombre de points attribués.

### L'INTERLEUKINE 2

Découverte en 1975, l'interleukine 2 (IL-2) est une lymphokine qui joue un rôle central dans la régulation des réponses immunitaires. L'IL-2 est potentiellement capable de restaurer les déficits immunitaires liés à certaines maladies.

Le gène humain codant pour ce polypeptide a été cloné pour la première fois en 1983. La production d'IL-2 par des bactéries recombinées ou par culture de lignées cellulaires constitue un enjeu économique important.

L'IL-2 est sécrétée par des lymphocytes T auxiliaires (helpers) activés soit par un antigène soit par un agent mitogène.

L'IL-2 peut être considérée comme un facteur de croissance déterminant le passage de cellules T, exprimant le récepteur de l'IL-2 après activation, du stade G1 au stade S. Son activité peut être mesurée sur des cellules T tests IL-2 dépendantes maintenues en culture permanente.

### Question 1 - (25 points)

- 1.1. Indiquer les méthodes de caractérisation et de séparation des lymphocytes T.
- 1.2. L'activation des lymphocytes T par les agents mitogènes peut être analysée par cytofluorométrie de flux. Deux paramètres cellulaires sont étudiés séparément : le contenu en ADN et le récepteur de l'IL-2 reconnu par un anticorps monoclonal.  
  
Montrer comment cette méthode permet de mettre en évidence d'une part l'apparition du récepteur de l'IL-2 et d'autre part le déclenchement de la prolifération.
- 1.3. Préciser les caractéristiques générales des lymphocytes T : maturation, activation par un antigène, fonctions.
- 1.4. A partir des données ci-dessus, proposer une méthode de dosage biologique de l'activité de l'IL-2 dans une préparation.

L'IL-2 humaine est une protéine de 133 amino-acides, dont 3 cystéines, de pHi égal à 6,8, avec un seul pont disulfure dont la localisation et l'importance pour l'activité ont été montrées par mutagenèse dirigée.

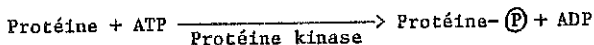
### Question 2 - (5 points)

- Définir le pI ou pHi d'un polypeptide. Pourquoi le pHi peut-il varier selon la nature du polypeptide ?
- En partant du pHi de l'IL-2, que peut-on dire de sa composition en acides aminés ?

### Question 3 - (10 points)

- Qu'entend-on par mutagenèse dirigée ? Quel est son intérêt par rapport aux autres méthodes de mutagenèse ?
- Montrer comment elle a pu être utilisée pour étudier la relation entre la structure et la fonction dans le cas présent.

On s'est intéressé, pour préciser le mécanisme d'action de l'IL-2, à l'activité enzymatique correspondant à la réaction :



Cette activité augmente transitoirement au niveau de la membrane cytoplasmique, après contact avec l'IL-2.

### Question 4 - (5 points)

Comment pourrait-on mesurer l'activité enzymatique correspondant à la réaction ci-dessus ?

### Question 5 - (18 points)

- 5.1. La réaction évoquée constitue un exemple de couplage énergétique. Montrer pourquoi.
- 5.2. L'ATP ainsi consommé est régénéré dans les lymphocytes pour l'essentiel au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Indiquer brièvement les grands principes de cette régénération.
- 5.3. La réaction citée révèle l'activité d'une protéine kinase. Quelle relation doit-il exister entre cette activité et la prolifération cellulaire ?

La production d'IL-2 recombinante nécessite l'isolement des ARN messagers cytoplasmiques, par exemple par chromatographie d'affinité, puis la synthèse d'ADNc à partir de ces ARN messagers. L'ADNc est ensuite cloné dans *Escherichia coli* à l'aide d'un vecteur plasmidique. La production de la protéine nécessitera ensuite d'insérer l'ADNc cloné dans un vecteur d'expression.

### Question 6 - (20 points)

Résumer les propriétés des plasmides naturels bactériens.

Question 7 - (10 points)

Après avoir rappelé les caractéristiques des ARN messagers cytoplasmiques des cellules eucaryotes, montrer qu'il est possible d'utiliser la chromatographie d'affinité pour isoler ces ARN.

Question 8 - (15 points)

- 8.1. Comment peut-on sélectionner et repérer les clones de bactéries transformées par un plasmide recombinant ?
- 8.2. Pour le criblage de la banque d'ADNc obtenue, plusieurs techniques peuvent être envisagées.
  - Décrire la technique utilisable si l'ADNc de l'IL-2 recherché ne s'exprime pas.
  - Citer la ou les méthodes utilisables si cet ADNc s'exprime.

---

La production d'IL-2 peut être obtenue également par culture d'une lignée de cellules T leucémiques naturellement productrices (par exemple la lignée Jurkatt) ou à partir de lignées cellulaires non lymphocytaires rendues productrices par transfection (par exemple les cellules VERO). Cette culture peut être réalisée en cytotuteur.

Question 9 - (12 points)

- 9.1. Exposer le principe de la détermination d'un taux de croissance de cellules en culture.
- 9.2. Quelles sont les exigences d'une culture de cellules animales que doit satisfaire un cytotuteur ?

Quelles doivent être les particularités d'un tel bioréacteur par rapport à un fermenteur ?

Durée : 4 h

Coef. : 4

Le candidat traitera les deux parties sur des copies distinctes qui seront relevées séparément.

**PREMIERE PARTIE : MATHEMATIQUES**

Durée : 2 h - Coef. : 1,5

Rappel : La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

### EXERCICE 1 - Etude d'un modèle de croissance d'une colonie bactérienne.

On ensemence une boîte de Pétri et l'on mesure en  $\text{cm}^2$  l'étendue  $s$  de la colonie. La fonction  $s$  est une fonction du temps  $t$  ( $t \geq 0$ ,  $t$  exprimé en jours), elle est supposée deux fois dérivable sur  $\mathbb{R}^+$  et vérifie l'équation différentielle

$$(E) : \frac{s'}{s^2} = \frac{ab}{s} - a$$

dans laquelle  $a$  et  $b$  sont deux constantes strictement positives.

#### A - RESOLUTION DE L'EQUATION DIFFERENTIELLE (E).

1° On considère la fonction  $z : t \longrightarrow z(t) = \frac{1}{s(t)}$ .

Calculer sa dérivée  $z'$  en fonction de  $s$  et  $s'$ .

Montrer que si  $s$  vérifie (E), alors  $z$  vérifie une équation différentielle linéaire du premier ordre (E') que l'on précisera.

2° Résoudre l'équation (E').

3° Sachant que l'étendue initiale de la colonie est  $s(0) = \lambda$  ( $\lambda > 0$ ), en déduire :

$$s(t) = \frac{b\lambda}{(b-\lambda)e^{-abt} + \lambda}$$

#### B - ETUDE DE LA FONCTION $s$ SUR $\mathbb{R}^+$ , DANS LE CAS $b > \lambda > 0$ .

1° Calculer  $\lim_{t \rightarrow +\infty} s(t)$

Qu'en résulte-t-il pour le graphique de la fonction  $s$  ? Ce graphique est noté (G).

2° Etudier les variations de  $s$  sur  $\mathbb{R}^+$ .

#### C - CONSTRUCTION DE LA COURBE (G) DANS LE CAS PARTICULIER : $a = 0,044$ ; $b = 49,25$ ; $\lambda = 0,25$ .

1° Calculer  $s(t)$  pour  $t$  entier,  $0 \leq t \leq 4$ .

2° Tracer la courbe (G) dans un repère tel que :

sur  $ot$  : 1 jour est représenté par 2,5 cm.

sur  $os$  : 10  $\text{cm}^2$  sont représentés par 5 cm.

EXERCICE 2 - Recherche d'un intervalle de confiance d'un coefficient de corrélation linéaire.

A - PRELIMINAIRES

1° Soit  $r$  un nombre réel de l'intervalle  $[0,1[$ .

Démontrer l'inégalité  $\frac{1+r}{1-r} > 1$ .

2° On considère la fonction numérique  $g$ , définie sur  $[0,1[$  par :

$$g : r \longrightarrow g(r) = \frac{1}{2} \ln \frac{1+r}{1-r}.$$

Démontrer que  $g(r) > 0$

Soit  $z = g(r) = \frac{1}{2} \ln \frac{1+r}{1-r}$ , établir l'équivalence :  $z = \frac{1}{2} \ln \frac{1+r}{1-r} \iff r = \frac{e^{2z} - 1}{e^{2z} + 1}$ .

3° Soit  $f$  la fonction numérique définie sur  $\mathbb{R}^+$  par :

$$f : z \longrightarrow f(z) = r = \frac{e^{2z} - 1}{e^{2z} + 1}.$$

Démontrer que  $f$  est strictement croissante sur  $\mathbb{R}^+$ .

En déduire que : si  $0 < a < z < b$ , alors  $f(a) < f(z) < f(b)$ .

B - ETUDE DE LA VITESSE DE DISSOLUTION D'UN TYPE DE STREPTOMYCINE EN POUDRE.

Parmi les facteurs capables d'avoir une influence sur cette vitesse (une dissolution rapide est appréciée des utilisateurs), on s'intéresse à la densité de la solution avant séchage.

Soit une population (population mère) composée d'un grand nombre de lots de streptomycine. A chaque lot on associe la densité  $X$  et la vitesse de dissolution  $Y$ . On désigne par  $r_0$  le coefficient de corrélation de ces deux variables pour la population mère. De même sur chaque échantillon de taille  $n$ , on peut définir le coefficient de corrélation de ces deux variables noté  $\rho$ , et on fait correspondre à cet échantillon  $z = g(\rho)$  (cf A - 2°).

On définit ainsi une variable aléatoire notée aussi  $z$ . On admet que  $z$  est une variable normale de moyenne  $\bar{z} = g(r_0)$  et d'écart-type égal à

$$\frac{1}{\sqrt{n-3}}$$

1° Le tableau ci-dessous représente les résultats des mesures de  $X$  et  $Y$  pour un échantillon donné de taille  $n = 13$ .

DENSITE X	MISE EN SOLUTION Y (seconde)
1140	95
1092	35
1127	15
1175	110
1162	105
1105	20
1160	70
1143	90
1170	100
1105	45
1150	45
1145	55
1120	45

Calculer le coefficient de corrélation  $\rho$  pour cet échantillon et calculer  $z = g(\rho)$ .

- 2° On admet que l'on peut estimer  $\bar{z}$  par ce nombre  $g(\rho)$ .  
Déterminer un intervalle de confiance  $[a, b]$  pour  $\bar{z}$ , au risque de 0,03.
- 3° En déduire, en utilisant la question A-3°, l'intervalle de confiance  $[f(a), f(b)]$  pour  $r_0$ , au risque de 0,03.

**DEUXIEME PARTIE : SCIENCES PHYSIQUES**

(Durée : 2 h - Coef. : 2,5)

L'usage des instruments de calcul est autorisé.

Les trois parties A, B et C sont indépendantes.

**A - CHIMIE ORGANIQUE (10 points)**

- 1) La réduction de la méthyl-2 cyclohexanone par  $\text{LiAlH}_4$  donne deux isomères A et B.  
Représenter ces deux isomères et indiquer la configuration (R ou S) des carbones asymétriques.
- 2) Les produits A et B sont traités par le chlorure d'acétyle  $\text{CH}_3\text{COCl}$ .  
Quelle est la structure des produits C et D formés ?  
Préciser le mécanisme de la réaction pour un des deux isomères.
- 3) La déshydratation des produits A et B donne 2 produits E et F.  
Donner la structure de E et F. Quel est le produit prépondérant ?

**B - DOSAGE COMPLEXOMETRIQUE (15 points)**

On dose une solution S contenant un mélange d'ions calcium et baryum par une solution d'ions éthylènediamine-tétracétate ( $\text{Y}^{4-}$ ).  
En prenant pour variable x, la proportion de  $\text{Y}^{4-}$  ajouté par rapport à la quantité initiale en ions  $\text{Ca}^{2+}$ , tracer le graphe :

$$pY = -\log [\text{Y}^{4-}] = f(x), \quad x \text{ variant de } 0 \text{ à } 3.$$

N.B. On négligera la variation de volume au cours du dosage.

Données :

Solution S : prise d'essai  $V = 100 \text{ ml}$

$$[\text{Ca}^{2+}] = [\text{Ba}^{2+}] = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$\text{solution } \text{Y}^{4-} : [\text{Y}^{4-}] = 1 \text{ mol.l}^{-1}$$

constantes de dissociation des complexes :  $pK_{\text{Ca}} = 10,6$   $pK_{\text{Ba}} = 7,8$

## C - OPTIQUE (25 points)

1. Le constructeur d'un spectrocolorimètre donne les informations suivantes :
  - appareil à lecture directe utilisable de 800 à 320 nm.
  - source lumineuse : lampe à iode sous enveloppe de quartz.
  - monochromateur à réseau ;
    - nombre de traits du réseau : 620 traits/mm
    - longueur du réseau : 1 cm
    - bande passante du monochromateur : 8 nm
  - cellules photoélectriques photoémisives
    - de 800 nm à 600 nm : une cellule au caesium
    - de 600 nm à 320 nm : une cellule à l'antimoine
- 1.1. Faire un schéma simplifié d'un appareil à lecture directe.  
Expliquer comment il permettra la mesure de l'absorbance d'une solution.
- 1.2. Pourquoi l'enveloppe de la lampe est-elle en quartz et non en verre ?
- 1.3. Définir la longueur d'onde de seuil  $\lambda_0$  d'une cellule photoélectrique photoémisive. Que peut-on dire de la longueur d'onde de seuil de la cellule à l'antimoine ?
- 1.4. On suppose que le réseau est un réseau par transmission et qu'il travaille en incidence normale dans l'ordre 1.
  - 1.4.1. Calculer le pas du réseau.
  - 1.4.2. Calculer la direction du maximum principal de la longueur d'onde de 800nm.
  - 1.4.3. Définir le pouvoir de résolution d'un monochromateur. Quel est le pouvoir de résolution maximal de celui-ci ? Quelle est en nm la limite théorique de résolution. La comparer à la bande passante. Commenter.
2. Avec l'appareil ci-dessus on a mesuré l'absorbance d'une solution de permanganate de potassium.
  - 2.1. A 530 nm, une solution de 24,5 mg/l dans une cuve de 1 cm de longueur a une absorbance de 0,82.
    - 2.1.1. Calculer le coefficient d'extinction molaire du permanganate à 530 nm.
    - 2.1.2. Calculer le pouvoir transmissif de la solution.  
(masse molaire de  $\text{KMnO}_4$  : 158 g).
  - 2.2. Que devient le pouvoir transmissif de la solution si on double la longueur de la cuve ?

## FRANÇAIS

Durée : 3 h

Coef. : 2

En médecine, comme dans les autres sphères de l'activité humaine, la tradition se voit toujours plus rapidement dépréciée par l'accélération des inventions techniques. Regretter cet état de fait n'est pas nécessairement adopter une attitude réactionnaire. Car la tradition n'est pas que routine et refus de l'invention, elle est aussi, pour toute invention, épreuve d'efficacité, discrimination progressive des bénéfiques et des inconvénients, mise au jour de conséquences d'abord latentes, bref, expérience d'usage. L'engouement pour le progrès technique privilégie la nouveauté par rapport à l'usage. L'homme retrouve ici, sous une forme savante, une très primitive tactique du vivant, même unicellulaire, celle des essais et des erreurs, mais avec cette différence que la répétition accélérée des essais le prive du temps nécessaire à l'instruction par l'erreur. L'invention technique s'inscrit désormais dans le temps technique, qui est affolement et discontinuité, et en dehors du temps biologique, qui est maturation et durée.

La médecine, qui ne peut et ne doit refuser, pour la défense de la vie, aucun des secours que la vie peut recevoir de la technique, se trouve être, nécessairement et électivement, le champ dans lequel le vivant humain prend conscience du conflit, de la discordance entre les valeurs organiques et les valeurs mécaniques, au sens très large d'artifice. Comme, en outre, la médecine, aussi bien que toute autre forme d'activité technique, est aujourd'hui un phénomène à l'échelle des sociétés industrielles, des choix de caractère politique se trouvent impliqués dans tous les débats concernant les rapports de l'homme et de la médecine. Toute prise de position concernant les moyens et les fins de la nouvelle médecine comporte une prise de position, implicite ou explicite, concernant l'avenir de l'humanité, la structure de la société, les institutions d'hygiène et de sécurité sociale, l'enseignement de la médecine, la profession médicale, tellement qu'il est parfois malaisé de distinguer ce qui l'emporte, dans quelques polémiques, du souci pour l'avenir de l'humanité ou des craintes pour l'avenir du statut des médecins. Il n'y a pas que la raison qui ait ses ruses, les intérêts aussi ont les leurs.

La forme aujourd'hui la plus aiguë de la crise de la conscience médicale, c'est la diversité et même l'opposition d'opinions relatives à l'attitude et au devoir du médecin, devant les possibilités thérapeutiques que lui offrent les résultats de la recherche en laboratoire, l'existence des antibiotiques et des vaccins, la mise au point d'interventions chirurgicales de restauration, de greffe ou de prothèse, l'application à l'organisme des corps radioactifs. Le public des malades réels ou possibles souhaite et redoute à la fois l'audace en thérapeutique. D'une part, on estime que tout ce qui peut être fait pour procurer la guérison doit l'être, et on approuve toute tentative pour reculer les limites du possible. D'autre part on craint de devoir reconnaître dans ces tentatives l'esprit anti-physique qui anime la technique, l'extension d'un phénomène universel de dé-naturation qui atteint maintenant le corps humain. La thérapeutique moderne semble avoir perdu de vue toute norme naturelle de vie organique. Sans référence expresse, bien souvent, à la norme singulière de santé de tel ou tel malade, la médecine est entraînée, par les conditions sociales et légales de son intervention au sein des collectivités, à traiter le vivant humain comme une matière à laquelle des normes anonymes, jugées supérieures aux normes individuelles spontanées, peuvent être imposées. Quoi d'étonnant si l'homme moderne appréhende confusément, à tort ou à raison, que la médecine en vienne à le déposséder, sous couleur de le servir, de son existence organique propre et de la responsabilité qu'il pense lui revenir dans les décisions qui en concernent le cours.



- 1) Résumez le texte en 200 mots, avec une marge de tolérance de plus ou moins 10 %.  
(Indiquez à la fin du résumé le nombre de mots utilisés).

- 8 POINTS -

- 2) Définissez les termes et expressions suivants :

- tradition (ligne 2)
- le vivant (ligne 11)

- 3 POINTS -

- 3) Dans un développement composé, en vous appuyant sur des exemples précis, vous commenterez et éventuellement discuterez ce jugement de l'auteur :

"La thérapeutique moderne semble avoir perdu de vue toute norme naturelle de vie organique (...). Quoi d'étonnant si l'homme moderne appréhende confusément, à tort ou à raison, que la médecine en vienne à le déposséder, sous couleur de le servir, de son existence organique propre et de la responsabilité qu'il pense lui revenir dans les décisions qui en concernent le cours."

- 9 POINTS -

# ANGLAIS

Durée : 2 h

Coef. : 2

## The importance of being blue

New genetically altered bacteria may lead to safer testing.

It has been a year of dramatic progress and turbulence for scientists experimenting for the first time outside the lab with genetically engineered bacteria. This past April, California scientists made the first outdoor tests of ice-minus, a bacterium genetically altered to retard frost formation on leaves. Only four months later, Montana State University Professor Gary Strobel created a national outcry when it became known that he had flouted strict federal regulations by failing to get approval before injecting elm trees with bacteria designed to combat Dutch elm disease. This week Clemson University scientists, mindful of public fears about the escape of dangerous microbes, will begin a potentially revolutionary, 18-month test of special blue bacteria that have been modified so that researchers can readily detect their presence in the environment.

If all goes according to plan, a team of Clemson researchers at the school's agricultural research station near Blackville, S.C., will sprinkle a murky white liquid teeming with billions of Pseudomonas fluorescens bacteria on winter wheat seeds during planting. It should be easy enough to tell whether the invisible microorganisms survive and spread : the Pseudomonas bacteria have been altered by genetic engineers to turn a brilliant shade of blue in the presence of a compound called X-Gal. Declares Benton Box, dean of Clemson's College of Forest and Recreation Resources : "The potential we now have for tracking a genetically altered organism in the soil offers a tremendous opportunity. I think this is going to be a breakthrough." Says Jane Rissler, of the Environmental Protection Agency's office of toxic substances : "Unlike larger organisms, which can be tracked visually, these microorganisms are simply very small. The public has a right to know where they are."

Strobel's unauthorized action, which earned him a slap on the wrist from the EPA and Montana State, as well as the disapproval of most U.S. scientists, was not in itself dangerous - federal officials and researchers alike agree on that. But by sidestepping the arduous regulatory process, Strobel fanned the fears of those who think genetically altered bugs might behave unpredictably in the wild, setting off an ecological catastrophe or disrupting local ecosystems. Most scientists consider the public's fears exaggerated, but they nonetheless acknowledge the need for caution. Says David Drahos, a senior research group leader at Monsanto, the giant chemical maker that is sponsoring the Clemson test : "We are all in the process of learning something very new and wanting to do it wisely and carefully."

Indeed, the experiment represents an attempt by Monsanto to accommodate regulatory guidelines that many scientists think are too strict. It is also aimed at mollifying public fears.

Michael D. Lemonick. TIME Nov. 9 1987

### Notes vocabulaire

to flout : passer outre (cf. to sidestep). murky = épais, opaque. to teem : fourmiller.  
elm : orme. Dutch elm disease : champignon parasite de l'orme.

### QUESTIONS

- (10 points) - Translate from the beginning (title included) down to : "during planting".
- (5 points) - The expressions "genetically altered or modified or engineered" keep recurring in the text. What do these words refer to ? State in a few sentences what you think essential about the subject.
- (5 points) - What are the main concerns of biotechnologists when they release genetically altered bacteria ? What might happen if they are not careful enough ?

# EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

## A - ETUDE DE PROJET

Durée : 4 heures

Coef. : 4

### Remarques préliminaires :

- 1 - L'usage d'un dictionnaire "Anglais-Français" est autorisé.
- 2 - La lecture préalable de l'ensemble des documents n'est pas nécessaire avant d'aborder le sujet. Des précisions, quant à leur utilisation, sont fournies pour chaque question.

### Production d'interféron par culture en masse de fibroblastes humains diploïdes

Dans le but de produire en grande quantité de l'interféron par culture cellulaire, on se propose de faire une étude préalable, dans un volume restreint de 500 ml. La souche cellulaire W<sub>1</sub> 38 (fibroblastes humains embryonnaires de poumon) sera fixée sur microporteurs.

#### 1. (15 points)

Dans un premier temps, on veut fixer les conditions opératoires et en premier lieu les conditions de pH.

- 1.1. Dans le laboratoire, des fibroblastes humains KL (proches de W<sub>1</sub> 38) avaient déjà été testés dans un milieu contenant de l'hydrogencarbonate de sodium (cf. document 1).  
Commenter les courbes de la figure 1.
- 1.2. D'après la figure 2, quel est le pH optimal de la culture de W<sub>1</sub> 38.
- 1.3. En fait, le milieu utilisé sera le DME (cf. tableau 1, document 1).  
Justifier sa composition et l'utilisation de l'HEPES.

#### 2. (25 points)

D'après le document 2, expliquer l'intérêt d'une technique utilisant des microporteurs. Utiliser les renseignements du document 3 pour justifier le choix d'un type de microporteur pour cette culture de manière à ce qu'elle soit la plus rentable possible. Préciser le rôle des groupes substituants des microporteurs dans cette technique.

#### 3. (25 points)

- 3.1. A l'aide du document 4, établir un protocole pour l'étude préalable envisagée en précisant en particulier :
  - la concentration en microporteur CYTODEX
  - la manière de fixer les cellules
  - la concentration de l'inoculum.

L'incubation sera réalisée à 37°C.

3.2. Si les composants du milieu ne deviennent pas facteur limitant, au bout de combien de temps pourra-t-on récupérer les cellules et à quelle concentration seront alors les cellules (document 4).

4. (5 points)

A l'aide du document 5, déterminer la quantité de sérum à introduire dans le milieu DME au départ, de manière à se trouver dans les meilleures conditions de croissance.

5. (10 points)

Le document 5 fournit les étapes permettant la production d'interféron.

5.1. Doit-on maintenir la même concentration en sérum ?

5.2. Expliquer le rôle de l'introduction de poly (I) et poly (C) complexé au DEAE Dextrane.

Réf. - "Microcarrier cell culture : principles and methods"  
PHARMACIA

- "Some effects of environmental pH on cellular metabolism and function" H. EAGLE

Inoculation medium	
DME*	$10^{-2}M$
alanine	$10^{-2}M$
asparagine	$10^{-2}M$
aspartic acid	$10^{-2}M$
glutamic acid	$10^{-2}M$
glycine	$10^{-2}M$
lysine	$3 \times 10^{-2}M$
adenine	$10^{-3}M$
hypoxanthine	$3 \times 10^{-4}M$
pyruvate	$10^{-2}M$
HEPES	$10^{-2}M$
Serum	
Replenishment medium	
DME	$10^{-2}M$
HEPES	
Serum	

A. supplement of inositol  $10^{-2}M$  and choline  $10^{-2}M$  is advantageous when maintaining high culture densities at low serum concentrations.

In certain cases the following components may be used to replenish the culture (fig. 32).

Cysteine	30 $\mu g/ml$
Glutamine	0.3 mg/ml
Inositol	2 $\mu g/ml$
Glucose	2 mg/ml
Choline HCl	1 $\mu g/ml$

These additives are used only in the presence of low serum concentrations (5%, v/v, or less) and only when the pH is at a level suitable for cell survival and growth.

\* DME contains the non-essential amino acid serine.

HEPES : 4-(2 hydroxyethyl)-1 piperazine ethane sulfonic acid  
 M = 238.31  
 pKa = 7.55 at 20°C  
 Buffer pH range 6.8 - 8.2

DOCUMENT 1

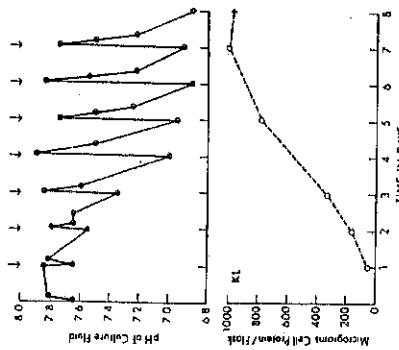


Figure 1  
 pH variation in a human fibroblast (KL) culture in medium containing 24 mM  $NaHCO_3$  and changed daily (arrows, change of medium): 3 ml in a 15-ml stoppered container). Reproduced with permission from Eagle 1971 (copyright by the American Association for the Advancement of Sciences).

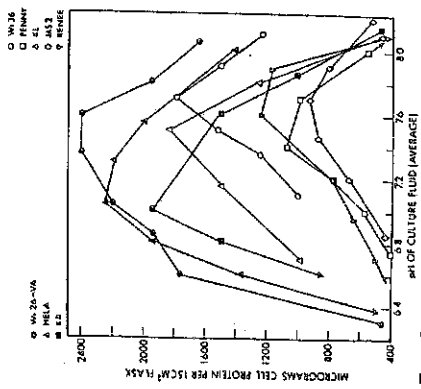


Figure 2  
 pH optima for the growth of human cells. From Eagle (1973) with permission of J. Cell. Physiology.

### Increased production capacity

The very large culture surface area to volume ratio offered by the microcarrier system (e.g. 30 cm<sup>2</sup> in 1 ml using 5 mg Cytodex 1) provides high cell yields without having to resort to bulky equipment and tedious methodology. For a given quantity of cells or their products microcarrier cultures demand much less space than other types of monolayer cultures. The possibility to culture cells in small compact culture systems is especially important when working with pathogenic organisms.

### Improved control

Suspension culture systems provide excellent opportunities for the control of culture parameters (e.g. pH, gas tensions etc). The microcarrier technique provides a method for growing anchorage-dependent cells in a system having all the advantages of suspension culture. The improved control possibilities with microcarrier culture allow for a homogeneous culture system having a wide variety of process designs. Monitoring and sampling microcarrier cultures is simpler than with any other technique for producing large numbers of anchorage-dependent cells.

### Reduced requirements for culture medium

When compared with other monolayer culture techniques stirred microcarrier cultures yield 2-4 times as many cells for a given volume of medium. The superior yields with microcarrier culture have been reported for a wide variety of systems including chicken fibroblasts, pig kidney cells, fish cells, Chinese hamster ovary cells, human fibroblasts, primary monkey kidney cells, and transformed mouse fibroblasts. This reduction in requirements for medium means considerable savings in cell culture costs, particularly when expensive serum supplements such as foetal calf serum are used.

### Reduced requirements for labour

Because large numbers of cells can be cultured in small volumes (more than 10<sup>9</sup> cells/litre) fewer culture vessels are required when working with microcarrier cultures. For example, with microcarrier culture one technician can handle a vaccine production equivalent to 900 roller bottles per week. One litre of microcarrier culture can yield as many cells as up to 50 roller bottles (490 cm<sup>2</sup> bottles). The simplified procedures required with microcarrier culture reduce the labour necessary for routine production and save on cleaning and preparation of glassware. Separation of cells from the culture medium is simple; when the stirring is stopped the microcarriers with cells attached settle under the influence of gravity and the supernatant can be removed. Unlike true suspension cell culture systems, no centrifugation steps are necessary.

### Lower risk of contamination

In cell culture the risk of contamination is related to the number of handling steps (opening and closing of culture vessels) required to produce a given quantity of cells or their products. Microcarrier culture provides a method for reducing the number of handling steps. There is a much reduced risk of contamination when the production of a large quantity of cells is from a single microcarrier culture rather than several hundred roller bottles.

The principles and methods necessary to achieve the best results with microcarrier culture are described in this book. Although this technique is one of the most advanced in animal cell culture it need not be restricted to experienced cell culturists. Since cell culture is being used by a wide variety of scientists this book is written for both beginners and those experienced in cell culture and only a basic knowledge of cell culture is assumed.

Cell culture techniques have become vital to the study of animal cell structure, function and differentiation and for the production of many important biological materials such as vaccines, enzymes, hormones, antibiotics, interferons and nucleic acids. Microcarrier culture introduces new possibilities and for the first time makes possible the practical high yield culture of anchorage-dependent cells. In microcarrier culture cells grow as monolayers on the surface of small spheres (fig. 1) which are usually suspended in culture medium by gentle stirring. By using microcarriers in simple suspension culture systems it is possible to achieve yields of several million cells per millilitre.

Cytodex® microcarriers have been specifically developed by Pharmacia Fine Chemicals for the high yield culture of a wide range of animal cells in culture volumes ranging from a few millilitres to several hundred litres. The special requirements of the microcarrier system are best fulfilled by the dextran-based beads which are subsequently dehydrated to form the three types of Cytodex microcarriers.

- The surface characteristics of the microcarriers have been optimized for efficient attachment and spreading of cells.
- The size and density are optimized to facilitate even suspension and give good growth and high yields for a wide variety of cells.
- The matrix is biologically inert and provides a strong but non-rigid substrate for stirred microcarrier cultures.
- The microcarriers are transparent and allow easy microscopic examination of the attached cells.

Experience with Cytodex for a wide variety of applications has confirmed the importance and benefits of the microcarrier technique.

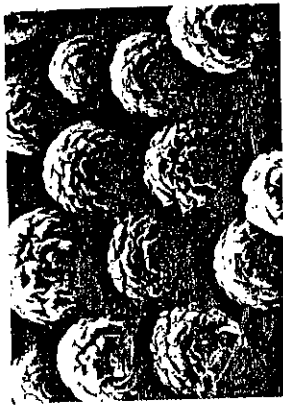


Fig. 1. Scanning electron micrograph of pig kidney cells (1ER-S3) growing on Cytodex 72H after inoculation. (Original photograph by G. Chadler, I.N.V., Broesek, Belgium, reproduced by kind permission.)

### New opportunities and applications for animal cell culture

Cytodex provides convenient surfaces for the growth of animal cells and can be used in suspension culture systems or to increase the yield of cells from standard monolayer culture vessels and perfusion chambers. Applications include production of large quantities of cells, viruses and cell products, studies on differentiation and cell function, perfusion culture systems, microscopy studies, harvesting mitotic cells, isolation of cells, membrane studies, storage and transportation of cells, assays involving cell transfer and studies on uptake of labelled compounds.

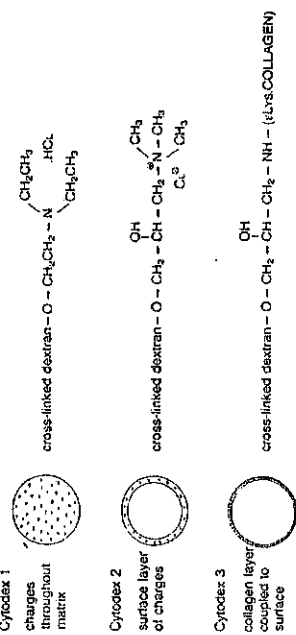


Fig. 18. Schematic representation of the three alternative types of Cytodex microcarriers.

## Cytodex 1

Cytodex 1 microcarriers are based on a cross-linked dextran matrix which is substituted with positively charged N,N-dichylaminoethyl (DEAE) groups to a degree which is optimal for cell growth (fig. 4). The charged groups are found throughout the entire matrix of the microcarrier (fig. 18).

Published procedures for substituting cross-linked dextran with DEAE groups to form microcarriers for cell culture can lead to the formation of a high proportion (up to 35%) of tandem charged groups (see 24). The chemical reaction conditions used to produce Cytodex 1 microcarriers are controlled so that formation of such tandem groups is minimized (only approx. 15% of groups); thus stability and homogeneity of the charged groups is enhanced and possible leakage of charged groups from the microcarriers is minimized. *Windig et al.*<sup>25</sup> used pyrolysis mass spectroscopy to examine the possible presence of linked DEAE-dextran in concentrated polio vaccines prepared from microcarrier cultures using Cytodex 1. If leakage of such groups occurred it was found to be below the limits of detection, i.e. less than 20 ppm.

The physical characteristics of Cytodex 1 are summarized in Table 4.

## Cytodex 2

Cytodex 2<sup>\*</sup> microcarriers are formed by substituting a cross-linked dextran matrix with only a surface layer of positively charged N,N,N-trimethyl-2-hydroxyaminopropyl groups (fig. 18). Because substitution with this quaternary amine does not lead to the formation of any tandem groups the charged groups are very homogeneous and the density of charges necessary for cell attachment is accurately controlled within this thin surface layer. The N,N,N-trimethyl-2-hydroxyaminopropyl groups are firmly bound to the microcarrier matrix and are very stable under cell culture conditions.

Unlike Cytodex 1, Cytodex 2 microcarriers do not have charged groups present inside the matrix (fig. 18). Cytodex 2 microcarriers have a much lower total degree of substitution than Cytodex 1 microcarriers but still provide a charged surface which is optimal for cell growth. The reduction in total charge capacity achieved with Cytodex 2 means that these microcarriers show negligible binding of medium components, metabolites and cell products to the inner microcarrier matrix.

The physical characteristics of Cytodex 2 are summarized in Table 4.

## Cytodex 3

Cytodex 3<sup>\*</sup> microcarriers are based on an entirely different principle for microcarrier culture. While most surfaces used in cell culture possess a specific density of small charged molecules to promote attachment and growth of cells (e.g. glass, plastic, Cytodex 1, Cytodex 2), certain proteins can also provide a surface for the growth of cells in culture. The connective tissue protein, collagen, has proved to be a valuable cell culture substrate. Cytodex 3 microcarriers consist of a surface layer of denatured collagen covalently bound to a matrix of cross-linked dextran (fig. 18). The amount of denatured collagen bound to the microcarrier matrix is approx. 60 µg/cm<sup>2</sup> and results in maximum cell yields. The denatured collagen (MW 60,000-200,000) is derived from pig skin type I collagen which has been extracted and denatured by acid treatment, concentrated and purified by an ion exchange step and steam sterilized before being coupled to the microcarrier matrix. These microcarriers combine the advantages of collagen coated culture surfaces (see below) with the advantages and possibilities of microcarrier culture. Cytodex 3 microcarriers can also be used as a general purpose collagen-coated cell culture substrate.

Most normal epithelial cells will attach more efficiently to collagen than to other cell culture surfaces. Consequently, collagen-coated culture surfaces are used frequently for establishing primary cultures and for growing cells which are normally difficult to grow in culture.

Table 4. Some physical characteristics of Cytodex microcarriers.

	Cytodex 1	Cytodex 2	Cytodex 3
Density* (g/ml)	1.03	1.04	1.04
Size* d <sub>50</sub> (µm)	180	155	175
d <sub>1-99</sub> (µm)	131-220	114-198	133-215
Approx. area* (cm <sup>2</sup> /g dry weight)	6,000	5,500	4,600
Approx. no. microcarrier/g dry weight	6.6x 10 <sup>6</sup>	5.8x 10 <sup>6</sup>	4.0x 10 <sup>6</sup>
Swelling (mg dry weight)	18	15	14

Size is based on diameter at 50% of the volume of a sample of microcarriers (d<sub>50</sub>), or the range between the diameter at 5% and 95% of the volume of a sample of microcarriers (d<sub>1-99</sub>). This size is calculated from cumulative volume distributions.

\* In 0.9% NaCl.

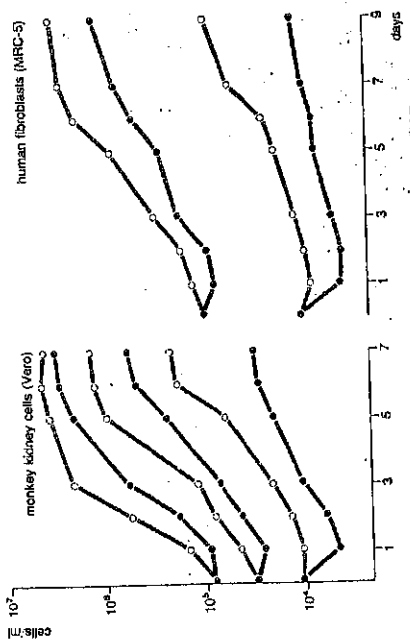


Fig. 3. The effect of inoculation density and initial culture procedure on the growth of monkey kidney cells and human fibroblasts on Cytoblox 1 microcarriers. Cultures were inoculated with cells and stirred continuously at 60 rpm (—) or 80 rpm (---) or were cultured in a reduced volume during the attachment stage of culture (—•—). The modified initial culture procedure (—○—) involved stirring at 130 rpm every 60 min in 1/3 of the total culture volume. After 4 h (Vero) or 6 h (MRC-5) the cultures were diluted to the final volume and stirred (60 rpm). All cultures contained 3 mg Cytoblox 1/ml final volume. (From Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden and Clark, J., Hirtsmann, M., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 369 (1981) 33, by kind permission of the authors and publisher).

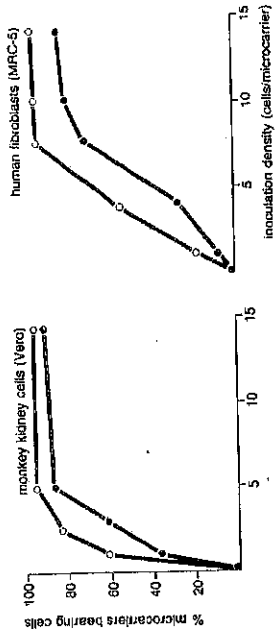


Fig. 5. The effect of inoculation density on the proportion of microcarrier bearing cells at the plateau stage of culture. Cultures contained 3 mg Cytoblox 1/ml final volume and were either stirred continuously at 60 rpm (—) or were stirred with a reduced volume and intermittent stirring before the culture was diluted to the final volume and stirred at 60 rpm (—○—). Details of the modified culture procedure are given with fig. 3. The proportion of microcarriers bearing cells was determined after 7 days (Vero) or 9 days (MRC-5). (From Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden).

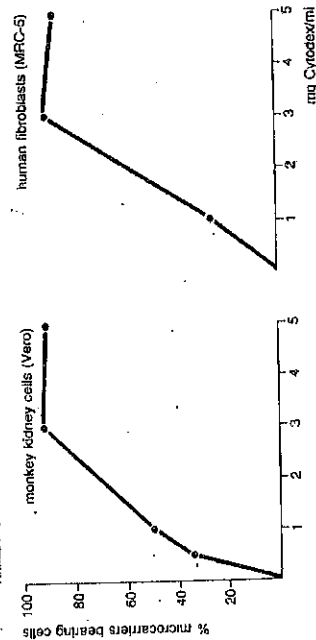


Fig. 4. The effect of microcarrier concentration on the proportion of microcarriers bearing cells at the plateau stage of culture. Cultures were inoculated with 5 viable Vero cells/microcarrier or 10 viable MRC-5 cells/microcarrier and stirred immediately at 60 rpm. The proportion of microcarriers bearing cells was determined after 7 days (Vero) or 9 days (MRC-5). Cultures were maintained under standard conditions where supply of medium and control of pH were not limiting cell growth. (From Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden).



### The purpose of serum in culture media

A serum supplement is usually an essential component of culture media for animal cell culture and in the absence of serum most cells fail to proliferate. Sera used to supplement culture media come from a variety of sources and are used at concentrations ranging from 0.5% to 30% (v/v). In microcarrier culture it is usual to use a serum supplement of 5–10% (v/v) for general purpose cultures.

While culture media are chemically defined the serum supplement is undefined, especially with respect to those components responsible for promoting growth of cell cultures. The serum serves two vital functions. Firstly it assists attachment of cells to the culture surface, probably by supplying exogenous glycoproteins involved in the attachment process. Secondly, growth factors and hormones in the serum promote proliferation of cells. The serum also has a protective effect on cells in culture and enhances viability. A further function of the serum is to provide protease inhibitors which inactivate the trypsin used in routine subculturing procedures.

### Reducing the serum concentration

The concentration of the serum supplement can often be reduced below the levels traditionally used for a given type of cell. Maintaining optimal culture conditions (e.g. pH and gas tensions) is particularly important if high cell yields are to be obtained in the presence of lower serum concentrations. *Giard and Fleischaker* reported that 5% (v/v) foetal calf serum was more suitable for microcarrier culture of human fibroblasts than the more usual 10% (v/v) supplement. A period of adaptation or "training" using successive decreases in serum concentrations may improve the growth of cells in reduced serum concentrations.

Unless special media are used, the plating efficiency of cells at low culture densities is proportional to the concentration of the serum and maximum plating efficiency usually occurs with 10–20% serum.

At the beginning of the culture the role of serum in attachment and protection of cells is important and higher concentrations are often required than at later stages of the culture. At higher cell densities the medium becomes conditioned and cell proliferation depends to a lesser extent on the serum concentration. Hence the requirement for a serum supplement depends on the stage of the culture cycle and is related to the functions of the serum.

Once the culture has reached confluence the concentration of serum is reduced further, often as low as 2–5%.

### Interferon production

When the culture has reached confluence, the culture medium is removed and the culture washed twice with 100 ml PBS and once with 100 ml DME. DME containing 5 mg/ml human plasma protein (or albumin) and 50 IU of fibroblast interferon/ml (optional) is added to 200 ml. The culture is gently stirred at 10–20 rpm. After 16 h the medium is removed and the culture is briefly washed in 50 ml DME containing DEAE-Dextran (100 µg/ml). 200 ml DME containing cycloheximide (10 µg/ml) and poly(I), poly(C) (20 µg/ml) complexed with DEAE-Dextran (100 µg/ml) are added and the culture is stirred gently at 10–20 rpm.

After 5 h actinomycin D (0.75 µg/ml) is added and gentle stirring is continued for 3 h. The medium is removed and the culture is washed three times in 50 ml DME with 10 mins for each wash. 200 ml DME containing human or bovine albumin (Cohn Fract. V, 0.5 mg/ml), ascorbic acid ( $10^{-3}$  M) and pyruvate ( $10^{-3}$  M) are added and the culture is stirred at 10–20 rpm for 16–20 h and the culture fluid is collected as a source of crude interferon.

# EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

## B. REALISATION PRATIQUE D'OPERATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE

DUREE TOTALE : 8 H

COEF. : 8

**Premier Jour** : (Durée : 7 h + 1 h pour repas pris sur place)

### PRESENTATION DE L'EPREUVE :

**PARTIE I :** ETUDE DE LA CINÉTIQUE D'INDUCTION DE LA  $\beta$ GALACTOSIDASE CHEZ ESCHERICHIA COLI.

(16 POINTS)

. manipulation longue, qui nécessite une bonne organisation.

**PARTIE II :** ENTRETIEN D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE CULTIVANT EN MONOCOUCHE.

(4 POINTS)

. manipulation courte, dont la technique sera étroitement contrôlée.

### PARTIE I : Etude de la cinétique d'induction de la $\beta$ galactosidase chez Escherichia Coli

La  $\beta$ galactosidase est chez Escherichia Coli une enzyme inductible. On se propose de suivre parallèlement la croissance d'E.Coli et la variation de l'activité  $\beta$ galactosidase après addition (ou non) d'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) au milieu de culture.

#### Souche utilisée :

E. Coli lactose + inductible ( $i^+ z^+ y^+ a^+$ )

#### Milieu de culture :

milieu minimum + glycérol (0,5 % final)

La croissance sera suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm. La détermination de l'activité enzymatique sera effectuée sur un lysat de culture, à 37°C et pH 6,8, avec comme substrat l'ortho-nitrophényl galactoside (ONPG). Une unité sera définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse une nanomole d'ONPG en 10 minutes dans les conditions opératoires.

#### 1. - Démarrage des cultures

A partir de la culture fournie, ensemercer immédiatement deux fioles d'Erlenmeyer contenant 100 ml de milieu de culture avec 2 ml d'inoculum. Incuber à 37°C. Agiter régulièrement durant toute l'incubation.

#### 2. - Addition de l'inducteur au milieu de culture

Environ une heure après le démarrage des cultures, ajouter dans l'une des fioles d'Erlenmeyer 10 ml de solution d'IPTG à  $10^{-2}$  mol.l<sup>-1</sup> et dans l'autre 10 ml d'eau distillée.

Ces additions définissent le temps zéro de l'étude de la cinétique d'induction.

3.1. - pour la détermination de l'activité enzymatique :

- . prélever aux temps t : 1 minute, t5 minutes, t10 minutes, t20 minutes, t30 minutes, t60 minutes, t120 minutes,
- 0,5 ml de chaque culture dans des tubes préparés préalablement contenant - 50 µl de chloramphénicol à 0,1 %  
- 20 µl de toluène  
- 30 µl de désoxycholate à 1 %
- . mélanger au vortex et laisser dans la glace 20 minutes environ avant de déterminer l'activité.

3.2. - pour l'étude de la croissance :

- . Prélever aux temps t : 1 minute, puis toutes les 25 minutes après le temps 0:
- 4 ml de chaque culture dans des tubes préparés préalablement contenant 200 µl de chloramphénicol à 0,1 %.
- . Mélanger
- Les tubes peuvent être laissés dans la glace si la lecture de l'absorbance n'est pas immédiate.

REMARQUES :

- . Tous les temps sont donnés à titre indicatif. Noter avec précision le temps réel de l'exécution de l'opération.
- . Le temps t : 1 minute a pour but de décrire la situation juste après l'addition d'inducteur (ou d'eau distillée).

4. - Détermination de l'activité enzymatique

- . Dans chaque tube contenant 1 aliquote de culture prélevée et lysée, ajouter 2,4 ml de solution d'ONPG (à 0,1 % dans un tampon phosphates pH 6,8 - 0,05 mol.l<sup>-1</sup>) préincubée. 5 minutes environ à 37°C.
- . Incuber 10 minutes à 37°C
- . Ajouter 1 ml de solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mol.l<sup>-1</sup>
- . Lire à 420 nm contre un blanc adéquat.

5. - Courbe d'étalonnage de l'ONP formé

A partir d'une solution d'ONP à 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup> en eau distillée, préparer une gamme de 50 à 250 nanomoles par tube.  
La composition du blanc réactif est la suivante :

2,5 ml de tampon phosphate pH 6,8 - 0,05 mol.l<sup>-1</sup>  
1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mol.l<sup>-1</sup>

Lecture à 420 nm.

6. - Quantification des cultures6.1. - Mesures :

- . Lecture de l'absorbance à 600 nm
- . La limite de linéarité de la relation absorbance/nombre de bactéries par ml se situe aux environs de 0,6 unités d'absorbance.

6.2. - Vérification de la relation entre l'absorbance et le nombre de bactéries par ml

- . Mesurer l'absorbance de la culture fournie à 600 nm.
- . Faire un dénombrement en boîtes de gélose numération. Réaliser deux essais pour la ou les dilutions retenues (3 dilutions maximum).

6.3 - Données :

Une unité d'absorbance à 600 nm est estimée correspondre à  $5 \cdot 10^8$  bactéries/ml et à 0,3 mg de matière sèche par ml.

7. - RESULTATS DEMANDES

- 7.1. - Donner tous les résultats bruts obtenus
- 7.2. - Tracer les courbes de croissance des bactéries pour les deux cultures sur un même graphique et déterminer le taux de croissance dans les conditions opératoires.
- . Tracer les courbes.
    - unités de  $\beta$ galactosidase par ml en fonction du temps
    - unités de  $\beta$ galactosidase pour  $10^6$  cellules en fonction du temps.
  - Présenter à chaque fois les deux conditions de culture sur un même graphique.
  - . Indiquer les calculs et traitements effectués.
  - . Conclusions.

REMARQUE :

La possibilité ou non d'utiliser un ordinateur couplé au spectrophomètre et muni d'un logiciel d'acquisition et de traitement de données pour le tracé et l'exploitation de la courbe d'étalonnage de l'ONP(5) sera précisée au début de l'épreuve.

PARTIE II : Entretien d'une lignée cellulaire cultivant en monocouche

A partir de la culture d'une lignée cellulaire fournie, on demande de réaliser les opérations suivantes :

1. - Supplémentation du milieu de culture avec du sérum de veau foetal de manière à obtenir un taux final de 5 %.
2. - Trypsinisation :
  - Eliminer le milieu de culture
  - Rincer la culture avec environ 5 ml de trypsine à 0,25 % en tampon PBS préchauffée à 37°C.
  - Incuber en présence de 1 à 2 ml de trypsine
  - Lorsque le feuillet est détaché, ajouter 5 ml de milieu de culture.
3. - Dispersion dans environ 5 ml de milieu de culture supplémenté

4. - Numérer en présence de Bleu Trypan à 0,2 %
5. - Transfert : mise en culture à la densité de  $5.10^4$  cellules par ml dans un flacon de 25 cm<sup>2</sup>
6. - Mettre à incuber à 37°C.

RESULTATS :

Donner :

- L'aspect de la culture fournie
- Le résultat de la numération
- Le pourcentage de viabilité.

**Deuxième Jour** : (Durée : 1 h)

PARTIE I : Etude de la cinétique d'induction de la  $\beta$ galactosidase chez Escherichia Coli

1. -

- 1.1. Résultats des numérations de la culture fournie le premier jour.
- 1.2. Relation exacte entre l'absorbance à 600 nm et le nombre de bactéries par ml.

2. -

- 2.1. La concentration finale en chloramphénicol dans les prélèvements de culture destinés à la numération bactérienne était au moins égale à la CMI. Pourquoi ?
  - 2.2. Déterminer la CMI à partir de la plaque de microtitration fournie.
  - 2.3. La détermination de l'activité enzymatique dans les lysats de culture a-t-elle été réalisée avec une concentration saturante en substrat ? Justifier.
  - 2.3. Une souche bactérienne recombinée porte une fusion génétique qui place le gène Lac Z sous le contrôle de l'un des gènes du système SOS.
- Quelle peut être alors la signification de l'induction de la  $\beta$ galactosidase dans ce cas ?

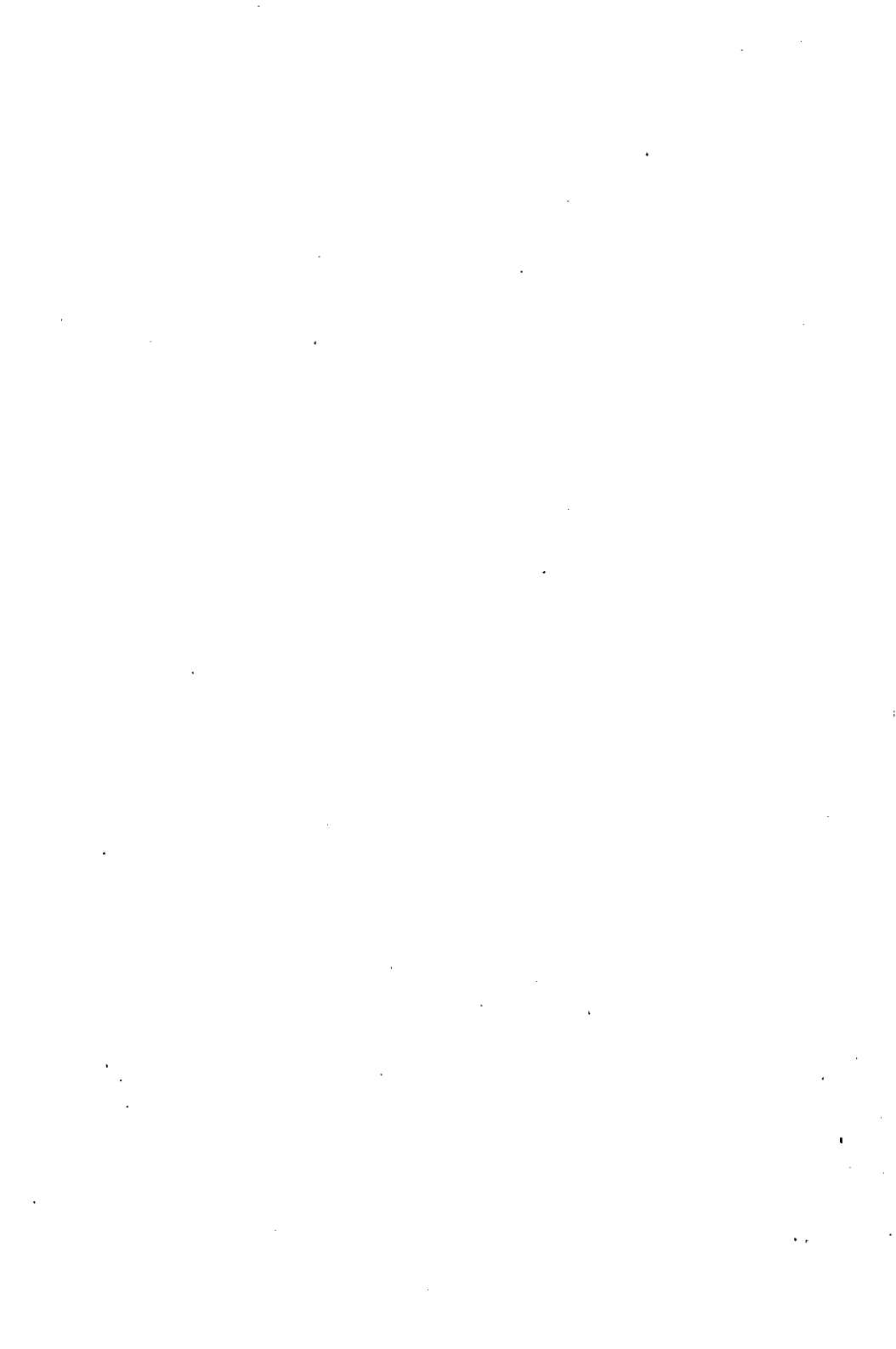
PARTIE II : Entretien d'une lignée cellulaire cultivant en monocouche

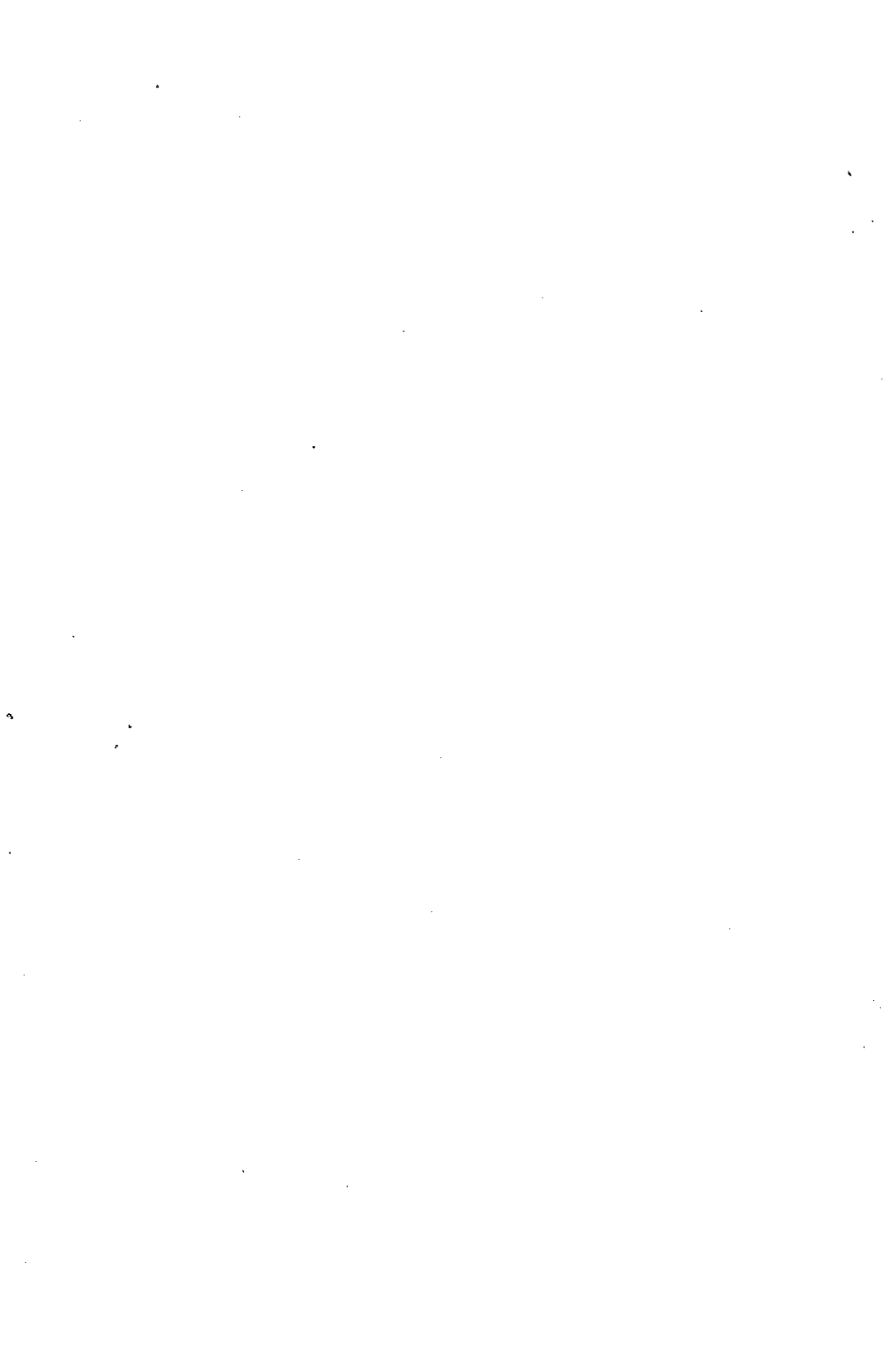
1. - Aspect de la culture repiquée
2. - Pourquoi le milieu a-t-il été supplémenté avec du sérum de veau foetal ?

DONNEES :  $K_M$  de la  $\beta$ galactosidase pour l'ONPG à 37°C et pH 6,8 =  $4.10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>

$M_{ONPG} = 301,25$  g.mol<sup>-1</sup>









BTS BIOTECHNOLOGIE

SESSION 1989

part

plan

plan

plan

plan

plan  
plan  
plan

plan

## SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GENIE BIOLOGIQUE

Durée : 4 h

Coef. : 6

Remarques préliminaires :

- 1 - Le sujet proposé est, à l'image des biotechnologies, nécessairement pluridisciplinaire : le candidat devra veiller à répondre d'une manière concise aux différentes questions posées.
- 2 - On peut suggérer au candidat de consacrer impérativement à chaque question un temps prenant en compte le nombre de points attribués.

---

 LA FIXATION SYMBIOTIQUE D'AZOTE ET LA PHYTOPATHOGENICITE

Ces deux grands types de relation entre bactéries et végétaux ont une grande importance en agriculture et sont de ce fait l'objet de nombreuses études et recherches.

1. Relations bactéries-hôtes. (5 points)

Rappeler quelles sont les principales relations qui peuvent s'établir entre une bactérie et un hôte.

2. Fixation symbiotique d'azote. (55 points)

La fixation d'azote permet de diminuer l'apport d'engrais azoté. La symbiose Rhizobium-légumineuse, responsable de près de la moitié de l'azote fixé annuellement à la surface du globe, est doublement intéressante : elle augmente le rendement de culture de la légumineuse et enrichit le sol pour les cultures suivantes dans une éventuelle rotation. On estime qu'en moyenne la fixation d'azote par les symbioses Rhizobium-légumineuses fourragères (luzerne, trèfle) est de l'ordre de 200 kilogrammes par hectare en 3 ans.

2.1. Donner le cycle de l'azote en insistant sur les étapes où seules les bactéries interviennent. (10 points)

2.2. Comment certaines plantes participent-elles à la fixation d'azote et quel bénéfice en tirent-elles ? (10 points)

2.3. Cette fixation nécessite une grande quantité d'énergie fournie par la photosynthèse. Après avoir schématisé un chloroplaste, donner les étapes essentielles de la photosynthèse. Aucune formule n'est demandée. (15 points)

2.4. On a pensé faire bénéficier de la fixation d'azote d'autres plantes d'intérêt agronomique (comme le blé) grâce à un transfert des gènes mis en jeu. Vu la complexité du mécanisme de la symbiose, les travaux actuels s'orientent plutôt vers l'amélioration des symbioses existantes avec la production d'inoculums de qualité permettant d'inoculer, au moment des semis, des sols pauvres en Rhizobium. La production en masse des Rhizobium sélectionnés s'effectue en fermenteur. Expliquer les différentes étapes de la mise en oeuvre d'une production en fermenteur en précisant :

- l'organisation du temps lors de la préparation du matériel, des milieux et de la souche,

- les types de contrôles à effectuer et leur mise en oeuvre pratique pour suivre l'évolution de la production d'une biomasse en culture pure. (15 points)

2.5. La fixation d'azote suppose l'infection de la racine de la plante hôte par les Rhizobium qui y déclenchent l'apparition de nodules.

Pour identifier les souches les plus infectieuses, des tests de compétitivité sont réalisés : des plantes cultivées stérilement sont inoculées simultanément avec deux souches différentes de Rhizobium qui sont par la suite recherchées dans les nodules par immunofluorescence.

Quels sont les principes de l'immunofluorescence directe et indirecte ? (5 points)

### 3. Le pouvoir phytopathogène (40 points)

Le pouvoir phytopathogène exprime la capacité d'une bactérie à déclencher des troubles (localisés ou généralisés) chez une plante. Il a des mécanismes et des manifestations divers.

3.1. Le pouvoir pathogène d'*Erwinia chrysanthemi* chez le Saint-Paulia est lié à la production d'enzymes lytiques qui détruisent les tissus de la plante. Il s'agit de dépolymérase telles que les pectinases, les cellulases et les protéases.

Les enzymes responsables de la dépolymérisation des biopolymères appartiennent-toutes à la classe 3 des hydrolases sauf la majorité des enzymes pectolytiques qui relèvent de la classe 4 des lyases (4.2.2.2. est une pectate lyase).

3.1.1. La cellulose est un biopolymère végétal substrat des cellulases. Donner la structure chimique d'une molécule de cellulose ; préciser ses particularités biologiques, la nature des liaisons hydrolysées par les cellulases bactériennes (par exemple 3.2.1.4.) et la nature des produits obtenus. (5 points)

3.1.2. Les enzymes en général sont caractérisées par leur grande efficacité catalytique.

Quelles sont les raisons de cette efficacité ? (10 points)

3.2. *Agrobacterium tumefaciens* induit des tumeurs (galle du collet) dans les plantes infectées en leur injectant un facteur transformant : le plasmide Ti dont une partie, l'ADN-T, est transférée dans le génome de la cellule hôte et en perturbe le métabolisme. Ceci réalise une transformation in vivo et on utilise ce plasmide "désarmé" (rendu non pathogène) pour transférer des gènes nouveaux à des végétaux.

3.2.1. Décrire une méthode de transfert de gènes in vitro lors d'une manipulation de génie génétique. On peut choisir une cellule procaryote ou une cellule eucaryote. (5 points)

3.2.2. Citer d'autres techniques possibles pour un tel transfert. (5 points)

3.2.3. Donner des exemples de gènes (déjà clonés ou non) conférant aux plantes un avantage agronomique supplémentaire. (5 points)

3.3. L'étude du mécanisme du pouvoir pathogène nécessite l'utilisation de mutants non pathogènes. Il existe par exemple des souches d'*Erwinia chrysanthemi* qui présentent une chute de leur pouvoir pathogène par mutation des gènes des pectate lyases.

A partir d'un exemple, montrer par quel mécanisme moléculaire une lésion de l'ADN due à un agent génotoxique, permet d'induire une mutation. (10 points)

4. Production de plantes en culture stérile (20 points)

L'étude de ces relations bactéries-végétaux suppose en un premier temps la production de plantes en culture stérile.

- 4.1. Quelles sont les conditions de culture in vitro des végétaux ? (5 points)
- 4.2. Préciser les étapes d'un microbouturage (ou micropropagation). (5 points)
- 4.3. Les milieux sont souvent additionnés de phytohormones. Citer les principales en indiquant leurs effets majeurs. (10 points)

ETS BIOTECHNOLOGIE  
EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE  
(A) ÉTUDE DE PROJET

Durée : 4 h  
Coefficient : 4

REMARQUES PRELIMINAIRES

La lecture préalable de l'ensemble des documents n'est pas nécessaire avant d'aborder le sujet. Des précisions, quant à leur utilisation, sont fournies pour chaque question.

Ce sujet comporte : 12 pages  
dont : sujet : p.1 à 4 . documents : p. 5 à 12

ETUDE DU COMPORTEMENT DE BREVIBACTERIUM LINENS  
ATCC 9175 EN FERMENTEUR : INFLUENCE DES CONDITIONS  
DE CULTURE SUR LA CROISSANCE ET LE METABOLISME DU  
LACTATE ET DES ACIDES AMINES

Tous les documents sont des extraits de la thèse de M.H. FEMELART. L'étude a été réalisée au laboratoire de microbiologie laitière dirigé par Monsieur M.J. DEMAZEAUD à l'INRA CNRS de JOUY-EN-JOSAS.

INTRODUCTION

RICHARD et ZADI (1983) ont montré que la fraction dominante de la flore non lactique de la surface de camemberts fabriqués avec du lait cru était constituée de bactéries corynéformes, dont une partie identifiable à Brevibacterium linens.

EL-ERIAN (1972) a étudié le rôle de B. linens dans le cas du Limburger. Cette bactérie représentant un tiers de la flore totale de surface du fromage commercialisé, était capable de liquéfier en trois semaines d'incubation plus ou moins le milieu de culture constitué de portions de fromage, tandis que les levures et des souches de type Arthrobacter n'y étaient pas parvenues. Les portions de fromages liquéfiées par les souches de B. linens les plus protéolytiques avaient une composition proche de celle de l'hydrolysât de caséine ("casamino acids") utilisé comme témoin, tandis que ceux moins protéolysés par certains Arthrobacter ressemblaient plus ou moins au fromage de Limburger affiné.

Compte tenu de ce rôle au cours de l'affinage des fromages, les fabricants de levains (Lacto-Labo et les laboratoires Roger) ont donc commercialisé certaines cultures de B. linens. Ces fournisseurs préconisent l'utilisation de leurs levains purs en addition au lait, par vaporisation, ou en addition à l'eau de lavage destinée aux soins de frottage opérés en cave d'affinage. Ils peuvent être utilisés pour l'aromatisation et la coloration de fromages à pâte molle (Maroilles, Livarot) et en fin d'affinage pour "colorer" les Camemberts affinés. Ce levain est même commercialisé sous forme de mélange pour reproduire avec d'autres souches d'Arthrobacter, microcoques et levures, le goût et l'aspect typique du "Camembert traditionnel normand".

Les renseignements techniques indiquent que ces souches acido-sensibles doivent être utilisées à des pH compris entre 5,8 et 8,0, avec un optimum à 7, et à une température comprise entre 10 et 20°C.

La production de ces levains doit nécessairement passer par le stade des cultures en fermenteurs. Déjà KUNZ et al. (1980) (VEB OSTRA à Dresde) proposent des ferments lyophilisés de Brevibacterium linens (colonies blanches et orange), obtenus en culture par immersion. Ces auteurs insistent sur les conditions de pH, de température et d'aération comme ayant une forte influence sur la croissance du microorganisme.

Dans le but d'atteindre une meilleure maîtrise de la production, pour une meilleure utilisation de ce type de flore d'affinage mal connu, il s'avère donc nécessaire d'entreprendre des études physiologiques sur B. linens : étude de sa croissance et de son métabolisme sur un milieu chimiquement défini, en fermenteur dans des conditions maîtrisables et réglables. L'utilisation d'un fermenteur permettra de fixer de façon certaine les paramètres de la croissance et de mesurer leur action sur le microorganisme.

La première étape a consisté en l'élaboration du milieu de culture chimiquement défini, nécessitant un certain nombre de choix. En fin d'affinage du Camembert, des quantités résiduelles d'acide lactique apparaissent (SCHORMULLER, 1968 et MARKWALDER, 1982). Ce substrat produit par les bactéries lactiques est initialement consommé par les levures et les moisissures, puis probablement par B. linens. Il occupe une place privilégiée. En effet, il constitue avec l'acétate le meilleur substrat assimilé (MULDER et al., 1966). LEE (1985) indique que le lactate fournit le meilleur rendement, ainsi que le meilleur taux de croissance de B. linens souche 47.

Lors de phénomènes de diauxie, c'est le lactate qui est consommé avant le glucose (VELDKAMP, 1970 ; et LEE, 1985). La morphologie des Arthrobacter, genre proche de B. linens est dépendante des conditions nutritionnelles : la croissance sur glucose produit uniquement des cellules en forme de coques, tandis que l'ajout de lactate induit la formation des cellules en bâtonnets et, sa disparition, le retour à la forme coque.

Le lactate a donc été utilisé comme substrat carboné, et un mélange d'acides aminés sous la forme d'un hydrolysate de caséine comme source d'azote. Ce milieu reproductible permettra d'étudier la croissance de Brevibacterium dans des conditions de culture fixées en fermenteur, et d'optimiser croissance et métabolisme : consommation de l'acide lactique, des acides aminés et production de l'ammoniaque. Brevibacterium linens est un microorganisme alcalinisant ; cette propriété est-elle liée à ses capacités à produire de l'ammoniaque ?

Kuntz et al. (1980) citent les facteurs : oxygène, pH, température et composition du milieu, comme essentiels pour la croissance de B. linens. D'autres auteurs ont étudié l'influence de ces mêmes facteurs essentiels pour l'utilisation des microorganismes pour l'industrie fromagère. Un pH initial de 6,5 ou 8,5 semble favorable à la croissance (KUNZ et al., 1980) tandis qu'une valeur de 7,5 l'est moins. Le pH final des cultures était toujours de 8,5, quelle que soit sa valeur initiale. A un pH initial inférieur à 8,5, la culture alcalinise, alors qu'à un pH supérieur à 8,5, elle acidifie.

STADHOUDERS et LANGEVELD (1962) n'observent pas de croissance pour des valeurs de pH inférieures à 6,0. Kunz et al. (1980) résolvent le problème de l'oxygénation des cultures en fermenteur de B. linens en utilisant en permanence de l'air comprimé filtré qui doit permettre d'atteindre des concentrations élevées en oxygène dissous.

L'effet de la température a été étudié par WILKINS (1973) dans une étude sur les bactéries Gram-positives, non sporulantes et psychrotrophes : se multipliant à 10°C, Brevibacterium linens est effectivement classé parmi ce type de bactéries psychrotrophes.

La plupart des auteurs situent la température optimale de croissance à 25°C environ (KUNZ et al, 1980). Wilkins (1973) a calculé les taux de croissance spécifiques pour des cultures réalisées à 10, 20, 30 et 37°C. L'optimal était obtenu à 30°C, mais le taux de croissance ne diminuait que de 10 % lorsque la température s'élevait jusqu'à 37°C. Par contre, BOYVAL et DESMAZEUD (1983) citent un article de CROMBAH (1974) qui indique qu'une température de 37°C ne permet pas d'observer de multiplication.

L'hétérogénéité des résultats doit provenir des différences entre souches utilisées, ainsi que des différences entre les autres conditions expérimentales : milieu, pH et oxygénation.

L'effet d'un facteur ne s'exprime pas sans qu'interviennent les autres conditions expérimentales. Il est même imprudent de parler et de comparer des coefficients de température, par exemple, si les expérimentations n'ont pas été effectuées scrupuleusement dans les mêmes conditions.

### 1ère Partie : OPTIMISATION DES CULTURES (20 points)

1. Donner la définition et les buts de l'optimisation globale des cultures.  
Préciser la nature des conditions expérimentales à faire varier et quels paramètres permettent ensuite de mesurer l'effet produit.
2. En utilisant le document (1) préciser quelle information supplémentaire apporte l'expérimentation planifiée par rapport à la méthode classique dans l'exemple cité.
3. Quel est l'intérêt général des méthodes planifiées en microbiologie appliquée ?

### 2ème PARTIE : ETUDE FINE DU COMPORTEMENT DE B.LINENS SUR DES MILIEUX LACTATE ET ACIDES AMINES

Afin de mieux comprendre la croissance de ce microorganisme en fonction des substrats présents dans le milieu de culture, des études complémentaires sont menées.

Les cultures sont toutes réalisées dans les conditions optimales de pH, température et oxygène dissous.

Le document 2 donne quelques renseignements concernant le matériel et les méthodes utilisés.

N.B. Dans tous les documents l'absorbance est notée D.O.

#### 1. Principe des calculs effectués sur les résultats expérimentaux (15 points)

- 1.1. Définir et proposer une méthode de détermination des paramètres de croissance suivants :
  - taux de croissance ou vitesse spécifique de croissance maximum
  - vitesse spécifique de croissance maximum
  - rendement de biomasse global
  - rendement de biomasse à chaque instant
- 1.2. Quels autres paramètres utilise-t-on en microbiologie appliquée pour décrire une production de biomasse. Préciser leur méthode de détermination.



2. Influence du lactate et des acides aminés sur la croissance (15 points)
- 2.1. A partir des documents (3) et (4), comparer les "D.O maximales" atteintes pour chaque culture.
    - En déduire le rôle du lactate ou des acides aminés comme facteur limitant.
    - Lorsque les concentrations en acides aminés sont faibles, quel est l'intérêt métabolique d'un apport de lactate même faible ?
  - 2.2. Comparer les vitesses spécifiques maximales des cultures (" $\mu$  max") n°84, 90, 91 et 99.  
Pour lesquelles peut-on dire que l'un des substrats n'est pas en "concentration saturante" ?
    - Connaissant la composition du milieu BIO-CASE (document 2), expliquer pourquoi la phase exponentielle ne dure pas plus de 38 % de la croissance totale pour les cultures 91 et 99 alors que Monod obtient des phases exponentielles de 75 % de la croissance totale pour E.coli sur milieu lactosé.
  - 2.3. En utilisant les documents (5) et (6), préciser le rôle des acides aminés dans la diminution du taux de croissance pendant la culture.
3. Cinétique de production et d'utilisation de l'ammoniaque (15 points)
- 3.1. Classer les cultures 84, 90, 91, 92 et 99 en deux groupes en fonction de la cinétique observée pour l'ammoniaque et de la composition relative du milieu en source de carbone et d'azote.  
(utiliser les cinétiques générales décrites aux documents (7), (8) et (9)).
  - 3.2. Quelle est l'origine et le rôle métabolique de la production d'ammoniaque dans ces cas ?
  - 3.3. Confirmer votre hypothèse par des observations précises sur les cinétiques générales des croissances.
4. Etude de l'évolution du rendement de croissance pendant la croissance (15 points)
- A l'aide des documents (7) et (9) concernant les cultures 90 et 92 :
- 4.1. Déterminer graphiquement les différents rendements de croissance par rapport aux substrats lactate et acides aminés pour les cultures 90 et 92.
  - 4.2. Faire correspondre les brusques variations de rendement observées pendant la croissance avec un événement déterminant des cinétiques générales.
  - 4.3. En déduire l'influence de la nature des substrats consommés sur la valeur du rendement de croissance.

DOCUMENT (1)

## LA METHODE DE PLANIFICATION

La méthode encore la plus utilisée pour étudier l'influence de facteurs sur un phénomène complexe, consiste à modifier un seul de ces facteurs à la fois tout en maintenant les autres constants. Ces autres facteurs seront ensuite étudiés par la même méthode. On oppose bien souvent à cette méthode "classique", l'expérimentation planifiée factorielle, qui fait varier tous les facteurs à la fois, d'une façon optimale. Par exemple, l'étude de l'influence de la température et du pH sur un phénomène complexe sera entreprise de deux manières possibles :

- Dans le cas de la première méthode, dite "classique", à l'aide de trois expérimentations :
  - . l'expérimentation témoin à T1 et P1, respectivement température et pH
  - . une expérimentation permettant d'estimer l'effet de la température à T2 et P1,
  - . une expérimentation permettant d'estimer l'effet du pH à T1 et P2,
 qu'il faudra répéter afin d'estimer également l'erreur expérimentale.
- Dans le cas de la deuxième méthode, factorielle, à l'aide de quatre expérimentations :
  - . l'expérimentation témoin à T1 et P1,
  - . une expérimentation à T2 et P1,
  - . une expérimentation à T1 et P2,
  - . une expérimentation à T2 et P2.

DOCUMENT (2)MATERIEL ET METHODES

Les échantillons prélevés toutes les deux heures sont dosés en biomasse (D.O.), lactate, acides aminés et ammoniac

La correspondance entre D.O. et poids sec cellulaire a été utilisée pour transformer les mesures de D.O. en gramme de biomasse :  
 1 ml de culture à D.O. 1 contient 0,356 mg de poids sec cellulaire.  
 Les milieux de culture utilisés sont présentés ci-dessous, pour les substrats carbonés et azotés, seuls modifiés.

N° de culture	acides aminés BIO-CASE (g poudre/l)	L-lactate (g/l)
84	3	10
90	3	50
91	3	0
92	30	10
99	30	0

Le milieu de culture contient en outre des éléments minéraux, un tampon phosphate et des vitamines.

.../...

Document 2 (suite)

COMPOSITION APPROXIMATIVE DE LA BIO-CASE "LOW-SALT"  
 BIO-MERIEUX REF 5 301 1  
 Concentrations exprimées en g pour 100 g de poudre

origine hydrolyse	caseine HCl	
AZOTE total aminé	12,87 10,30	
SELS (chlorure)	0,12	
HUMIDITE	4,45	
CENDRES	1,27	
ACIDES AMINES	FOURNIE	MESUREE
ASP	5,87	6,23
THR	3,97	3,18
SER	-	3,74
GLU	22,54	15,29
PRO	6,35	9,27
GLY	1,59	1,39
ALA	-	3,11
CYS	0,48	0
VAL	6,51	3,94
MET	2,70	1,58
LEU	4,29	1,94
LEU	5,56	5,00
TYR	4,92	1,43
PHE	1,11	1,52
TRP	-	0
LYS	5,87	6,10
HIS	1,11	3,52
ARG	2,22	2,47
	75,09	72,17
VITAMINES	inférieur à 10	

DOCUMENT (3)

TAUX DE CROISSANCE MAXIMAL (ESTIME PAR AJUSTEMENT A L'EQUATION  $DX/DT = \mu \cdot X$  EN QUANTITE DE BIOMASSE FORMEE PAR UNE UNITE DE BIOMASSE EN 1 HEURE) AINSI QUE INTERVALLES DE CONFIANCE, TEMPS DE GENERATION  $\tau$  (TEMPS ECOULE ENTRE 2 DIVISIONS EN HEURES CALCULE A L'AIDE DE L'EXPRESSION  $\tau = \text{LOG}(2)/\mu$ ) ET D.O. MAXIMALE OBSERVEE POUR LES DIFFERENTS MILIEUX.

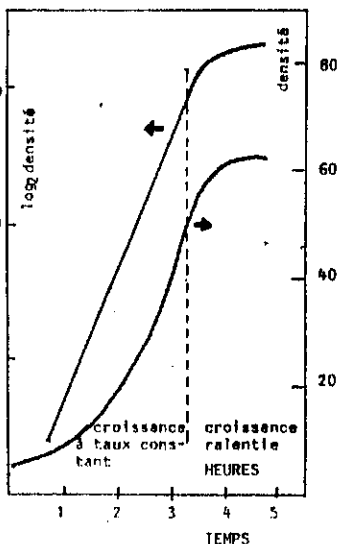
CULTURE	LACTATE (g/l)	ACIDES AMINES (mM)	TAUX DE CROISSANCE MAX. (H)	intervalle de confiance	TEMPS DE GENERATION (H)	D.O. MAX.
84	10	19	0.156	0.153 - 0.159	4.44	14
92	10	200	0.086	0.084 - 0.088	8.06	> 40 (**)
91	0	15	0.129	0.128 - 0.131	5.37	5
99	0	200	0.186	0.184 - 0.188	3.72	50
90	50	15	0.174	0.168 - 0.179	3.98	12

(\*\*) culture non achevée

Les valeurs de concentration des acides exprimées en mM de ce tableau pour les cultures 84, 91 et 90 sont celles mesurées, alors que le milieu est préparé avec 3 g/l de poudre dans les 3 cas ; cette différence provient de la précision du dosage, qui n'a pas été répété.

DOCUMENT (4)

COURBE DE REPRESENTATION DE LA DENSITE BACTERIENNE ET DE SON LOGARITHME EN FONCTION DU TEMPS, APRES UNE EXPERIENCE DE MONOD (1942) DE CROISSANCE DE *E. COLI* SUR MILIEU LACTOSE. LA PHASE EXPONENTIELLE SE POURSUIT TRES LONGTEMPS DANS LE CAS DE CES CULTURES.



MONOD (1942) présente des courbes de croissance de *E. coli* sur milieu lactosé où la phase exponentielle est longue et bien définie ; elle se poursuit pendant les trois quarts de la croissance totale, se termine brusquement, les taux de croissance diminuant très rapidement (Fig. 36).

Les courbes obtenues sont différentes comme l'indiquent les figures 31 à 35.

La phase exponentielle comprend systématiquement moins de 40 % de la croissance totale et dure moins de 50 % de la durée totale de la culture.

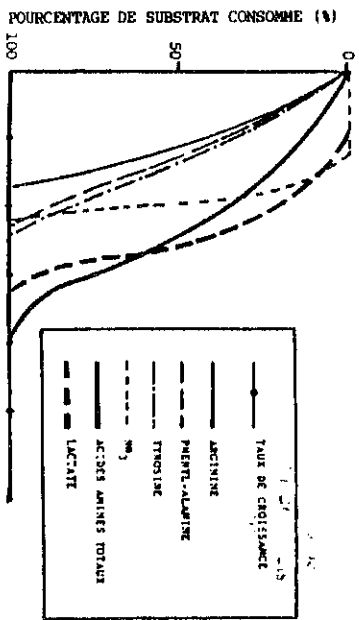
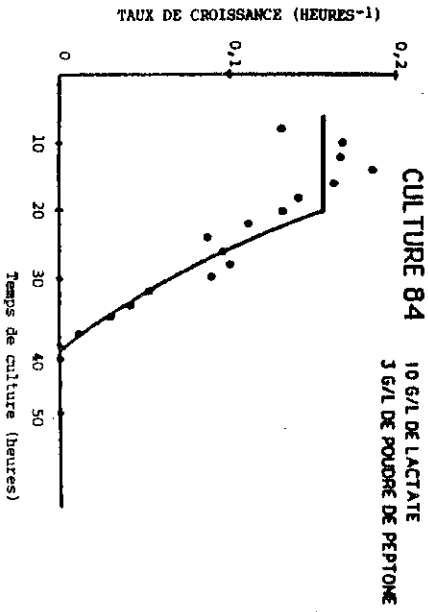
MONOD (1942) observe que même en augmentant les concentrations de "bouillon" de tous ses milieux complexes, il ne parvient pas à rallonger la phase exponentielle extrêmement courte, et observe toujours une phase de ralentissement longue. Avec un milieu synthétique comportant un sucre, la phase exponentielle se maintient plus longtemps. Il interprète cette observation, par la multitude de substrats disponibles dans le milieu complexe, entraînant des phénomènes semblables à la diauxie (utilisation préférentielle d'une source carbonée parmi plusieurs d'entre elles, et apparition de courbes de croissance biphasiques).

Concernant nos cultures, c'est dans le cas où le milieu est constitué des acides entrés seuls que la phase exponentielle est la plus importante (culture 91 et 99, avec acides aminés seuls, respectivement 38 et 32 % de la croissance sont effectués pendant la phase exponentielle, contre 3, 12 et 25 % respectivement pour les cultures 92, 90 et 84 avec lactate et acides aminés).

DOCUMENT 5

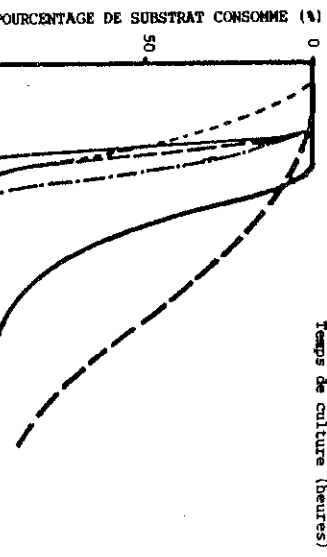
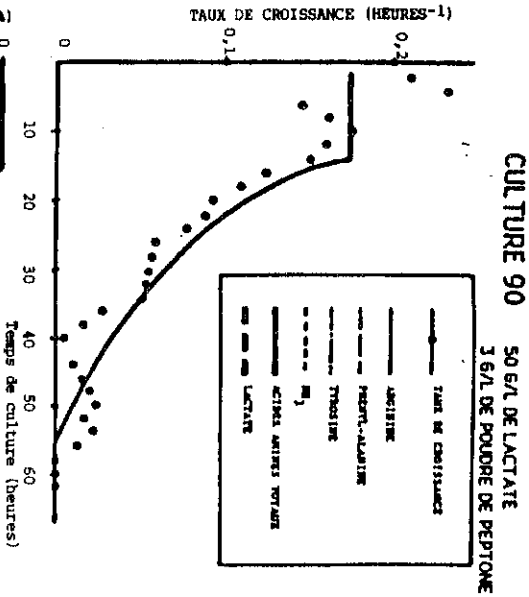
CULTURE 84 10 G/L DE LACTATE  
3 G/L DE POUDRE DE PEPTONE

RELATION ENTRE LE TAUX DE CROISSANCE (h<sup>-1</sup>) ET LA CONSOMMATION DES ACIDES AMINES (EN POURCENTAGE D'ACTIVES AUTRES CONSOMMÉS) : LA PARTIE LINÉAIRE DE LA COURBE DU TAUX DE CROISSANCE EN FONCTION DU TEMPS CORRESPOND AUX RESULTATS OBTENUS PAR L'AUTODIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL À L'ÉQUATION IN/DT = P (voir X).



CULTURE 90 50 G/L DE LACTATE  
3 G/L DE POUDRE DE PEPTONE

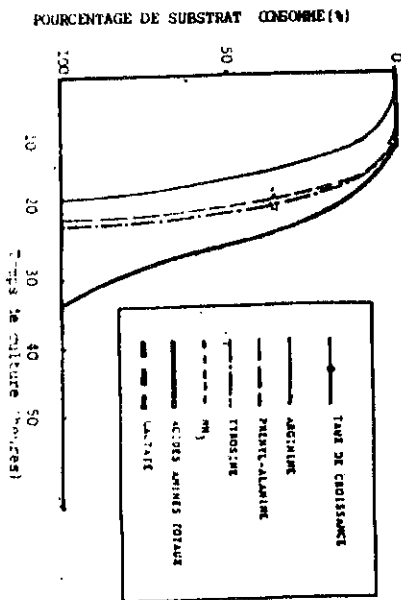
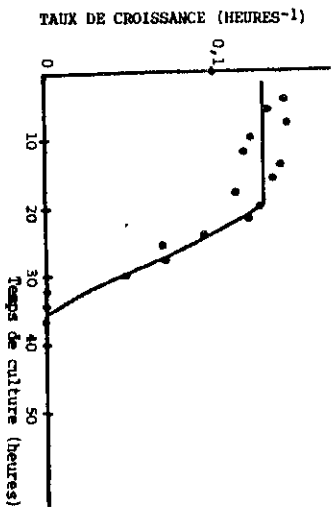
RELATION ENTRE LE TAUX DE CROISSANCE (h<sup>-1</sup>) ET LA CONSOMMATION DES ACIDES AMINÉS (EN POURCENTAGE D'ACTIVES AUTRES CONSOMMÉS) : LA PARTIE LINÉAIRE DE LA COURBE DU TAUX DE CROISSANCE EN FONCTION DU TEMPS CORRESPOND AUX RESULTATS OBTENUS PAR L'AUTODIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL À L'ÉQUATION IN/DT = P (voir X).



## DOCUMENT 6

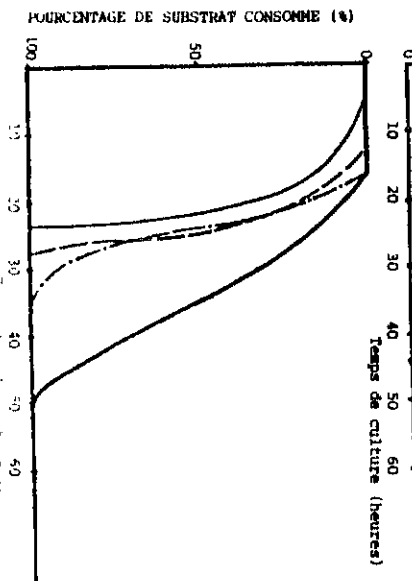
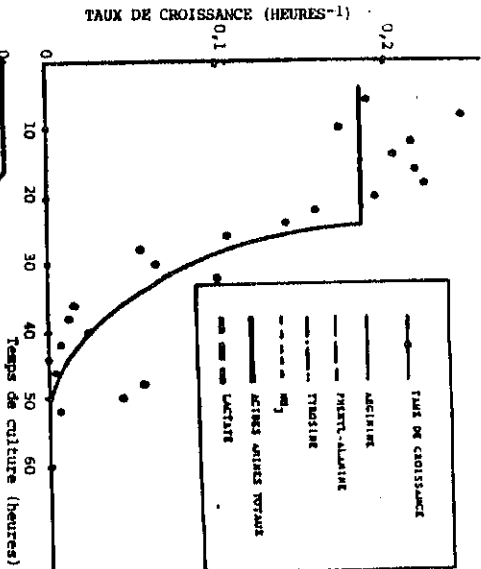
CROISSANCE EN FONCTION DE TEMPS CORRESPOND AUX RESULTATS FOURNIS PAR L'ANALYSEUR DIFFERENTIEL A L'EGALITEUR IX/72 =  $\mu$  dans X.

## CULTURE 91 3 G/L DE Poudre DE PEPTONE



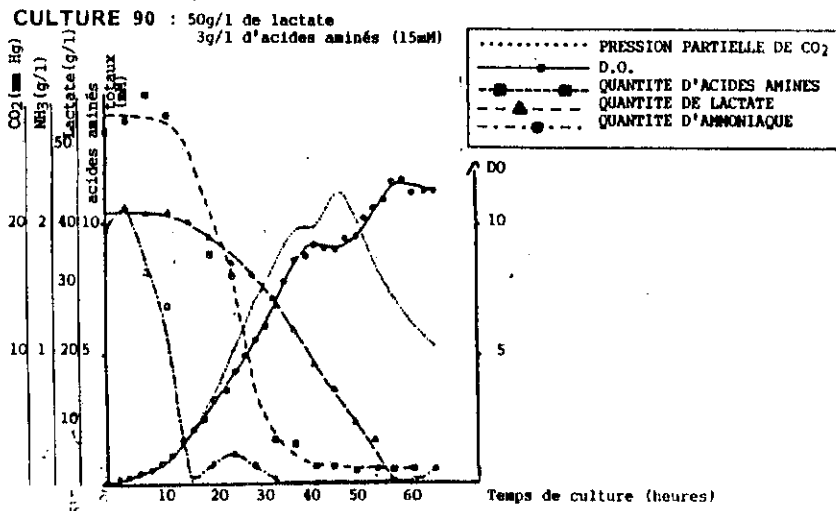
CROISSANCE EN FONCTION DE TEMPS CORRESPOND AUX RESULTATS FOURNIS PAR L'ANALYSEUR DIFFERENTIEL A L'EGALITEUR IX/72 =  $\mu$  dans X.

## CULTURE 99 30 G/L DE Poudre DE PEPTONE

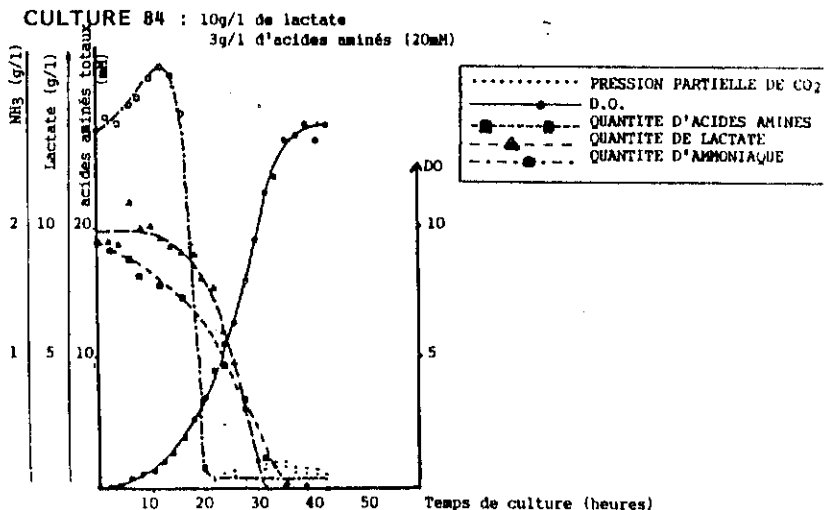


## DOCUMENT 7

REPRESENTATION DE LA D.O. (—●—), DES ACIDES AMINES RESIDUELS (—■—), ET DU LACTATE (—▲—), DE L'AMMONIAC (—○—), ET DE CO PRODUIT (.....) AU COURS DE LA CULTURE 90.



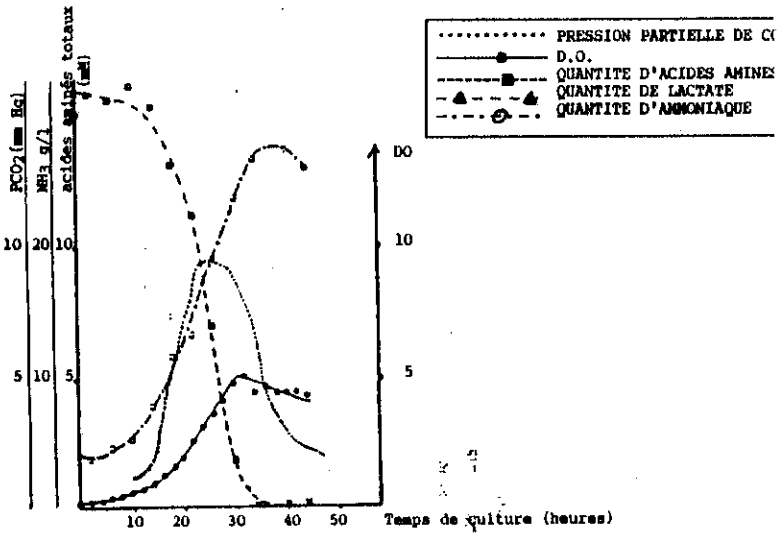
REPRESENTATION DE LA D.O. (—●—), DES ACIDES AMINES RESIDUELS (—■—), ET DU LACTATE (—▲—), DE L'AMMONIAC (—○—), ET DE CO PRODUIT (.....) AU COURS DE LA CULTURE 84.



## DOCUMENT 8

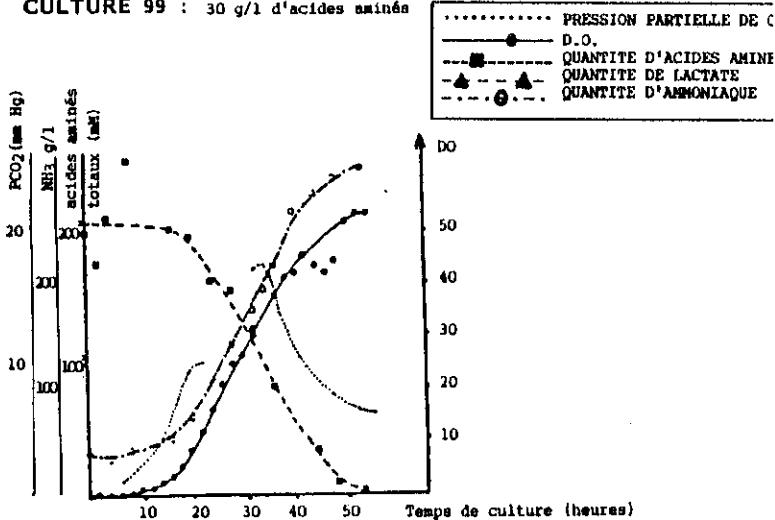
REPRÉSENTATION DE LA D.O. (—●—), DES ACIDES AMINÉS RESIDUELS (—■—), ET LACTATE (—▲—), DES QUANTITÉS D'AMMONIAC (—○—) ET DE CO<sub>2</sub> (.....) PRODUITS AU COURS DE LA CULTURE 91

CULTURE 91 : 3 g/l d'acides aminés (15 mM)



REPRÉSENTATION DE LA D.O. (—●—), DES ACIDES AMINÉS RESIDUELS (—■—), ET LACTATE (—▲—), DE L'AMMONIAC (—○—) ET DU CO<sub>2</sub> (.....) PRODUITS AU COURS DE LA CULTURE 99.

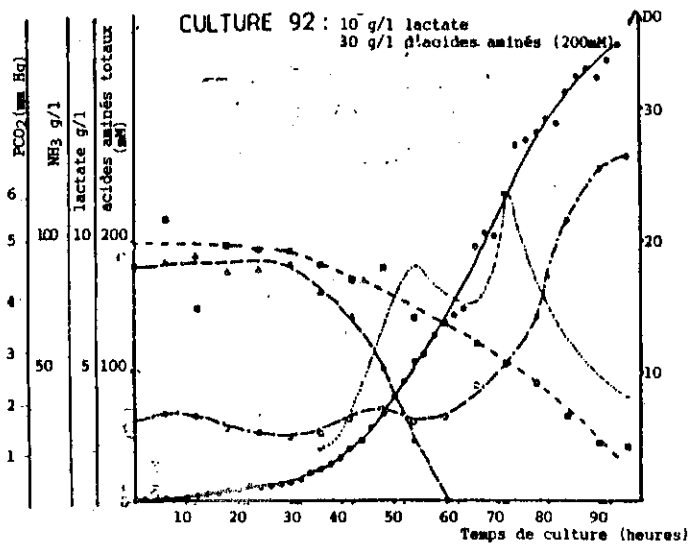
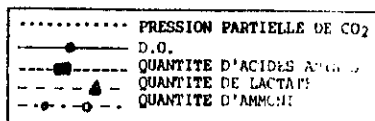
CULTURE 99 : 30 g/l d'acides aminés



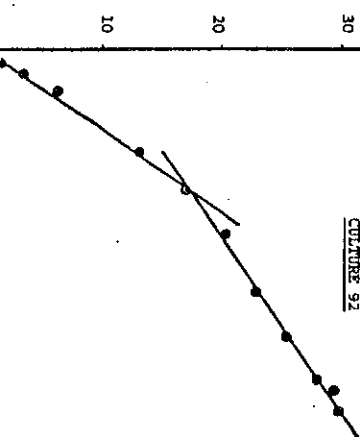


## DOCUMENT 9

ÉVOLUTION DE LA D.O. (—●—), DES ACIDES AMINÉS RESIDUELS (—○—), DU LACTATE  
 (—●—), DE L'AMMONIAC (—○—), ET DU CO<sub>2</sub> PRODUIT (.....) AU COURS DE LA  
 CULTURE 92.

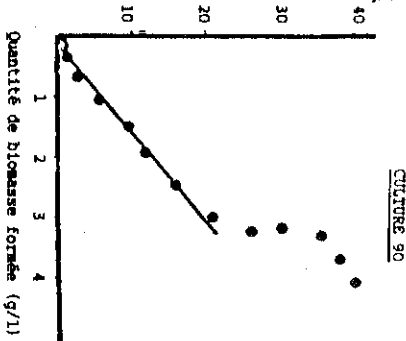


Quantité totale de substrat consommé (g/l)



ONCLE DES RENDUS DE BIOMASSE : REPRÉSENTATION DE LA QUANTITÉ DE SUBSTRAT  
 LACTATE ET DES ACIDES AMINÉS CONSOMMÉS (EN G/L) EN FONCTION DE LA BIOMASSE FORMÉE  
 DEPUIS LE DÉBUT INITIAL POUR LA CULTURE 92 A 10<sup>-1</sup> G/L ET 25 G/L RESPECTIVEMENT  
 LACTATE ET D'ACIDES AMINÉS INITIAUX.

Quantité totale de substrat consommé (g/l)



REPRÉSENTATION DES QUANTITÉS DE SUBSTRAT LACTATE ET ACIDES AMINÉS CONSOMMÉS  
 EN FONCTION DES QUANTITÉS FORMÉES DE BIOMASSE PÉRIODES DEPUIS LE DÉBUT INITIAL

BTS BIOTECHNOLOGIE  
EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

B. Réalisation pratique d'opérations de génie Biologique

Durée totale 8 heures

Coefficient 8

PREMIER JOUR

durée 6 h 45

+ 1 h pour le repas pris sur place

Sujet 6 pages

PRESENTATION DE L'EPREUVE

Il sera demandé au candidat de gérer correctement le temps de travail prévu afin de réaliser entièrement les manipulations suivantes :

PARTIE I : Génie génétique et antibiotiques de sélection.  
(17 POINTS)

1. TRANSFERT DE GENES (portés par un plasmide : pBR 322) DANS UN HOTE : une souche d'Escherichia coli.

Utilisation d'un ANTIBIOTIQUE de SELECTION pour repérer les hôtes transformés.

2. DOSAGE D'ANTIBIOTIQUE.

Contrôle de la qualité d'un antibiotique utilisé afin d'être sûr de son activité. On réalisera un dosage d'antibiotique par la méthode de diffusion en gélose.

PARTIE II : Mise en oeuvre d'un appareil de laboratoire ou d'un outil de traitement de données.  
(3 POINTS)

Interrogation individuelle pendant laquelle il sera demandé au candidat un exposé pratique et une démonstration sur un appareil ou un outil de traitement. (Question tirée au sort)

## PARTIE I : Génie génétique et antibiotiques de sélection

### 1. TRANSFERT DE GENES DANS UN HÔTE. (technique de Dagert et Ehrlich, 1979 et thèse de Joël Crouzet, 1987)

On réalise une transformation d'une souche bactérienne réceptrice de plasmide pBR 322. La souche est sensible à l'ampicilline. Il s'agit d'une souche d'E.coli. Les plasmides peuvent transformer E.coli en début de phase exponentielle, en présence de CaCl<sub>2</sub> à 4°C.

Les hôtes transformés seront sélectionnés par étalement sur boîte contenant de l'ampicilline. Il faut réaliser un témoin avec la souche non transformée.

L'ESSENTIEL POUR REUSSIR UNE TRANSFORMATION EST LE FROID.

Toutes les opérations doivent donc être réalisées à 4°C et STERILEMENT.

Il est indispensable de partir d'une culture fraîche (culture de la nuit). Les candidats disposeront d'une préculture à saturation.

#### 1.1. CULTURE BACTERIENNE

Chaque candidat dispose d'un erlenmeyer de culture contenant 50 ml de milieu LB stérile (milieu Luria-Bertani).

- Y ajouter stérilement 0,5 ml de préculture (donc culture diluée 100 fois)
- Après mélange lire l'absorbance de départ à 610 nm en utilisant des cuves à usage unique semi-micro de 1 ml. Une absorbance d'environ 0,03 est correcte dans cette fiche technique et permet de prévoir un arrêt dans environ 2 heures.
- Le "blanc" pour réglage du zéro optique est du milieu LB stérile (le reste du milieu doit absolument rester stérile)
- Les erlenmeyers ensemencés sont rapidement mis en place dans un bain agité à 37°C jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance qui sera vérifiée par mesure de l'absorbance à 610 nm.
- Relire l'absorbance au bout de 1 heure en remettant rapidement l'erlenmeyer à 37°C.

Ensuite prendre des DECISIONS sachant que :

- \* les cellules à transformer sont cultivées jusqu'à une absorbance de 0,3 (au maximum 0,35)
- \* le temps de génération est de 20 minutes environ
- \* une absorbance trop forte donnera un résultat nul (pas de cellules compétentes)
- \* une absorbance plus faible que 0,3 donnera le lendemain peu de colonies.

L'objectif en génie génétique est d'obtenir le plus possible de cellules transformées afin de réussir par la suite un clonage.

- Après ensemencement mettre rapidement sur glace : la solution individuelle de CaCl<sub>2</sub>, les tubes à centrifuger, tous les autres tubes et solutions nécessaires ; mettre les pipettes à 4°C (réfrigérateur) ; mettre en route le système de réfrigération de la centrifugeuse.

- FAIRE INSCRIRE par un membre du jury les absorbances obtenues à différents temps et les noter dans le compte-rendu.

- ARRÊT de la croissance à A = 0,3

- Plonger l'erlenmeyer IMMEDIATEMENT dans la glace pendant 20 minutes pour arrêter la croissance (20 minutes au moins ; on peut laisser un peu plus si la centrifugeuse n'est pas disponible).

### 1.2. PREPARATION DES CELLULES COMPETENTES

- Délivrer (à l'aide d'une pipette stérile de 10 ml) 40 ml de culture dans un tube à centrifuger conique, FROID, stérile, à bouchon, en polystyrène résistant ; la contenance du tube est de 50 ml ; ceci évitera l'équilibrage des tubes avant centrifugation.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 tours par minute à 4°C
- Jeter le surnageant en le versant dans les erlenmeyers de culture dorénavant inutiles
- Remettre en suspension les cellules récoltées par centrifugation dans 25 ml environ de solution glacée  $\text{CaCl}_2$  à 0,1 mole par litre.
- Laisser ce tube 30 minutes sur la glace en l'enfonçant bien (on peut laisser un peu plus si la centrifugeuse n'est pas disponible mais le mieux est de respecter les temps donnés)
- Centrifuger à nouveau pendant 10 minutes à 3000 tours par minute et à 4°C.
- Jeter le surnageant. Sur le culot mettre stérilement (pipette froide) 1ml de  $\text{CaCl}_2$  froid. Remettre les cellules en suspension en agitant (on peut gratter avec cette pipette). Ne pas mélanger avec un Vortex. Remettre rapidement ce tube au froid. Maintenant les cellules sont compétentes. On peut les laisser plusieurs heures au froid (excellente efficacité au bout de 12 heures).

### 1.3. TRANSFORMATION DES CELLULES COMPETENTES

Il s'agit de transférer le plasmide pBR 322 porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline dans la souche bactérienne réceptrice rendue compétente.

- 2 essais sont réalisés :
  - \* un témoin sans ADN
  - \* un essai avec le plasmide pBR 322

#### TECHNIQUE

- Préparer 2 tubes à hémolyse en verre stériles ; les numéroter 1 et 2 au crayon indélébile.
- Les mettre sur la glace
- Avoir une réserve d'environ 10 ml de LB stérile dans un tube stérile
- Mettre stérilement 200 microlitres de cellules compétentes dans chacun des tubes à hémolyse. Laisser sur glace.
- Dans le tube n°1 on n'ajoutera pas de plasmide (témoin cellules)
- Dans le tube n°2 on ajoute le vecteur pBR 322 fourni à 0,25 nanogrammes par microlitre. On ajoute 2,5 nanogrammes de pBR 322 dans ce tube. Pipeter 40 microlitre avec un cône jaune stérile qu'on rince par aspiration et refoulement du mélange du tube très doucement. Après agitation douce remettre le tube sur la glace. (Ne pas mélanger avec un Vortex).
- Précautions pour garder l'ADN intact : mettre des gants pour ouvrir le tube, le refermer immédiatement et garder ce tube sur la glace constamment surtout lors du passage d'un candidat à l'autre. Ne pas chauffer le tube dans la main ; ne pas le

mettre près de la flamme ; ne pas le renverser. Un examinateur surveillera ce pipetage.

- Laisser les tubes n°1 et n°2 30 minutes sur la glace.

- Préparer 2 erlenmeyers vides bouchés (coton ou vis) stériles : erlenmeyer n°1 pour le tube 1 et erlenmeyer n°2 pour le tube 2 (en plus des repères personnels)

- **CHOC THERMIQUE** : bien respecter la technique. C'est à ce moment-là que l'ADN rentre dans la cellule. On va faire passer les tubes de 4°C à 42°C. Opérer de la façon suivante :

- \* s'assurer qu'un bain thermostaté à 42°C avec portoir pour tubes à hémolyse est disponible.
- \* après les 30 minutes sur la glace, porter les 2 tubes dans leur bac à glace à côté du bain à 42°C. Se munir d'un minuteur.
- \* plonger les 2 tubes rapidement dans le bain à 42°C EXACTEMENT 2 MINUTES
- \* puis rapidement et stérilement ajouter 2 ml de LB stérile dans chaque tube.

- Transvaser stérilement le contenu du tube 1 dans l'erlenmeyer 1 et le contenu du tube 2 dans l'erlenmeyer 2

- Porter les erlenmeyers 1 heure au bain agité à 37°C pour exprimer la résistance plasmidique. Les cellules transformées ou non se multiplient.

#### 1.4. ÉTALEMENT SUR BOÎTE

On étalera une partie du contenu des erlenmeyers sur milieu sélectif. L'antibiotique de sélection est l'ampicilline. Chaque candidat disposera de 4 boîtes de milieu LB + ampicilline.

- S'assurer que les boîtes sont bien sèches (sinon les faire sécher).

- Les étalements :

\* étaler sur un boîte n°1 500 microlitres de culture de l'erlenmeyer n°1 en prélevant avec une pipette stérile de 1 ml. Étaler en utilisant une technique classique de bactériologie. Laisser la boîte un peu ouverte à côté de la flamme pour bien sécher.

\* préparer 3 boîtes de type n°2 pour étaler différents volumes de l'erlenmeyer n°2. On demande de bien noter sur la boîte le volume étalé pour vérification le lendemain.

On étalera sur la boîte 2.1. : 100 microlitres  
sur la boîte 2.2. : 50 microlitres  
sur la boîte 2.3. : 20 microlitres

On prélèvera dans l'erlenmeyer n°2 en utilisant des cônes stériles.

- Pour étaler ces petites quantités le candidat utilisera des pipettes râteau ou la technique des billes de verre stériles. Les boîtes doivent être bien sèches avant de les retourner. Mettre les boîtes à l'étuve à 37°C pendant une nuit.

- Chaque boîte doit-être facile à identifier le lendemain : n° de poste du candidat boîte n°1, boîte n°2.1., n°2.2., n°2.3. en précisant les volumes déposés.

## 1.5. LECTURE DES BOITES LE LENDEMAIN

2. DOSAGE D'ANTIBIOTIQUE

VERIFICATION DU TITRE REEL D'UN FLACON DE STREPTOMYCINE PAR METHODE DE DIFFUSION EN GELOSE.

## 2.1. Principe

On utilise une méthode différentielle qui consiste à comparer les diamètres d'inhibition obtenus avec l'échantillon à doser et le standard déposés sur des disques de papier placés à la surface d'un milieu gélosé ensemencé avec la souche sensible.

On réalise une gamme de dilutions pour l'échantillon E ainsi que pour le standard S.

## 2.2. Mode opératoire

\* Préparation de la boîte : (120 x 120) culture de 18h donnee à  $10^{10}$  germes/ml

Faire fondre 50 ml de milieu de culture et ramener à 45°C environ. Ensemencer avec une suspension de la bactérie indicatrice (*Enterobacter cloacae*) pour obtenir un inoculum de  $10^6$  à  $10^7$  germes par ml. Placer la boîte sur un support horizontal et couler ensuite la gélose ensemencée bien uniformément. Laisser solidifier.

\* Préparation de la gamme standard :

A partir de la solution de streptomycine à 200 mg/l, préparer une pré-dilution en tampon pH 7,9 à 100 mg/l qui constituera le standard S1 puis réaliser 3 dilutions de raison (ou de pas) 1,8 en tube à hémolyse en soins stérilité. On obtient ainsi les standards S2, S3 et S4. Par exemple pour préparer S2 on peut ajouter 0,8 ml de tampon à 1 ml de S1.

\* Préparation de la gamme essai :

A partir de la solution de streptomycine dont le titre est à contrôler et qui a été préparée comme le standard par pesée de 200 mg de poudre pour un litre de diluant, réaliser suivant le même protocole les essais E1, E2, E3 et E4 sans pré-dilution de la solution à doser (donc E1 est la solution mère).

\* Dépôt et imprégnation des disques :

- chaque point de la gamme standard et de la gamme essai est répété 2 fois.
- déposer les disques à l'aide d'une pince stérile.
- les imprégner avec 25 microlitres des solutions d'antibiotique au moyen d'une pipette automatique en suivant le schéma fourni.
- laisser diffuser 1/2 heure à la température du laboratoire.
- incubé à 37°C pendant 16 à 18 heures.

PARTIE II : Mise en oeuvre d'un appareil de laboratoire ou d'un outil de traitement de données.

Question tirée au sort, selon l'ordre et l'heure prévus et annoncés en début de séance. Durée totale, temps de préparation compris : 30 minutes.

=====

ANNEXE PARTIE I QUESTION 2 : Schéma de dépôt des disques au hasard

boîte 120 x 120

E1	S3	E2	S1
S4	S2	E4	E3
E2	S1	E1	S2
E3	E4	S4	S3

ETS BIOTECHNOLOGIE  
EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

REALISATION PRATIQUE D'OPERATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE

Durée totale 8 heures

Coefficient 8

DEUXIEME JOUR

Durée 1 h 15

SUJET : 1 page

PARTIE I : Génie génétique et antibiotiques de sélection.

1. TRANSFERT DE GENES DANS UN HOTE.

RESULTATS

1.1. Compter le nombre de colonies sur chaque boîte même si ces colonies sont très nombreuses. Si nécessaire on divise la boîte en 8 secteurs. Donner dans le compte-rendu le résultat pour chaque boîte. Commenter ces résultats.

1.2. Calculer l'efficacité de la transformation. L'exprimer en nombre de colonies par microgramme de pBR 322. Pour ce calcul il est nécessaire de consulter le sujet du premier jour.

2. DOSAGE D'ANTIBIOTIQUE

RESULTATS

2.1. Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

2.2. Faire la moyenne des valeurs obtenues pour chaque point de la gamme standard et de la gamme essai. Donner un tableau de résultats.

2.3. Représenter graphiquement la variation du diamètre d'inhibition en fonction du logarithme de la dilution en antibiotique (sur papier millimétré semi-logarithmique ou non au choix du candidat) pour la gamme essai et la gamme standard.

2.4. Exploiter ces deux courbes de façon à en déduire le titre de la solution essai mère de streptomycine à doser en mg de streptomycine par litre.

2.5. En déduire la pureté de la poudre pesée (grammes de streptomycine pour 100 grammes de poudre).