

BIOTECHNOLOGIES

Durée : 3 heures

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le surveillant qui vérifiera et, éventuellement, remplacera le sujet.

Le sujet comprend au total 11 pages numérotées de 1 à 11.

Le sujet comporte 11 documents situés en pages 5 à 11.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

Avertissements :

- La plupart des questions sont indépendantes ou regroupées en parties indépendantes.**
- La question rédactionnelle (Q11) est clairement identifiée.**

Lutte biologique contre les infections opportunistes bactériennes à *Aeromonas* en aquaculture : vers une solution sans antibactériens chimiques.

De nos jours, les infections bactériennes génèrent d'énormes pertes économiques au sein de l'aquaculture industrielle et altèrent profondément l'environnement. Certaines espèces d'*Aeromonas*, bactéries pathogènes opportunistes, sont responsables d'une pathologie sévère, la furonculose, en particulier chez les salmonidés d'élevage.

La prolifération d'*Aeromonas* et sa virulence sont induites par le système de communication entre bactéries, appelé « quorum sensing » (QS), dont le médiateur clef des communications entre bactéries est une N-Acyl homo Serine Lactone (AHL).

Le « quorum quenching » (QQ) est une stratégie prometteuse de lutte contre la furonculose. Elle consiste à inhiber les effets du médiateur AHL et permet donc de prévenir l'infection ainsi que la formation d'un biofilm sur le poisson, en réduisant la prolifération bactérienne et la virulence de la communauté.

L'enzyme AHL lactonase, AiiK (isolée de *Kurthia huakuii* LAM0618^T) catalyse l'hydrolyse des médiateurs AHL. Elle semble donc être un outil pertinent pour la mise en place d'un système de bio contrôle des populations d'*Aeromonas* par « quorum quenching ».

Au cours de l'étude proposée, les principales étapes de production de l'enzyme AiiK par *Lactobacillus casei* et l'évaluation de son activité biologique seront abordées.

Partie 1.

1. Construction de la souche recombinée, *Lactobacillus casei* MCJ Δ 1 *AiiK* productrice de l'enzyme AiiK

1.1. Construction du vecteur d'expression pELCW-*aaiK*

On souhaite produire une protéine de fusion composée :

- en N-terminal, du peptide codé par le gène *nlpC* de *Lactobacillus casei* permettant l'ancrage de la protéine de fusion à la surface de la bactérie recombinée ;
- d'une étiquette 6 His de liaison ;
- en C terminal, de l'enzyme AiiK.

Le cadre ouvert de lecture de l'enzyme AiiK est amplifié par PCR avant d'être inséré dans le vecteur d'expression pELCW.

Le document 1 présente la carte du vecteur pELCW et les données nécessaires à la mise en œuvre de la PCR utilisée pour le clonage du gène *aaiK*. Les amorces utilisées sont dessinées pour contenir les sites de restriction des enzymes Bgl II et Kpn I.

Q1. Discuter l'intérêt d'introduire des sites de restriction dans les séquences des deux amorces.

Q2. A l'aide de schémas simples et des données fournies, présenter et expliquer les grandes étapes de la PCR mise en œuvre.

1.2. Obtention du vecteur d'expression pELCW – *aaiK*

La carte du vecteur pELCW - *aaiK* est présentée dans le document 2.

Q3. A partir de l'analyse des boîtes fonctionnelles du vecteur pELCW - *aaiK*, montrer qu'il s'agit d'un vecteur navette d'expression. Préciser l'intérêt des séquences suivantes :

- 6 x His ;
- MCS.

La protéine recombinée produite est une protéine de fusion.

Q4. Envisager l'intérêt de cette forme d'expression de l'enzyme AiiK dans le cadre de l'étude menée.

1.3. Étude de la stabilité du vecteur recombiné

Lactobacillus casei est une espèce de bacille à Gram (+), catalase (-) asporulée, chimioorganotrophe et polyauxotrophe. Son développement est facilité en atmosphère enrichie en CO₂.

Les bactéries recombinées sont cultivées sur gélose MRS (avec ou sans antibiotique) pour cette étude. La composition du milieu MRS et les conditions de culture sont fournies dans le document 3.

Q5. A partir de l'analyse du milieu MRS, vérifier et justifier que sa composition est en accord avec les types trophiques de *Lactobacillus casei*. Argumenter les réponses.

Le protocole et les résultats du test de la stabilité du plasmide sont présentés dans le document 4.

Q6. Argumenter la procédure suivie lors de l'étude de la stabilité du plasmide.

Q7. Analyser les résultats fournis et conclure quant à la stabilité du plasmide dans les souches transformées.

2. Test biologique de validation du Quorum Quenching

Le document 5 présente le principe du test de production de violacéine par *Chromobacterium violaceum*, le protocole mis en œuvre et les résultats obtenus.

Banque « Agro-véto »
A TB - 0322

Q8. Bâtir un organigramme des manipulations réalisées pour ce test biologique.

Q9. Proposer un ou des témoins à réaliser afin de valider la procédure. Préciser la composition envisagée et le résultat attendu.

Q10. Analyser les résultats obtenus et conclure quant à l'efficacité de *Lactobacillus casei* recombiné pour l'étude.

Q11. Question rédactionnelle

Milieu de culture et conditions de culture.

Lactobacillus casei est une espèce de bacille à Gram (+), catalase (-) asporulée, chimioorganotrophe et polyauxotrophe.

Définir les principaux types trophiques bactériens qualifiant leurs sources d'énergie et de carbone. A partir d'un exemple éloigné du cas de *Lactobacillus casei*, expliquer l'établissement de la composition d'un milieu minimum en relation avec les types trophiques.

Partie 2.

3. Étude de l'enzyme AiiK, activité et mise en évidence de son efficacité sur certains marqueurs du pouvoir pathogène d'*Aeromonas*

3.1. AiiK, une métallo- β -protéine

Les lactonases AHL sont des métallo- β -enzymes. Un domaine couramment conservé (HXHDXH) dans les lactonases AHL a été détecté dans la séquence d'acides aminés de l'enzyme AiiK. On suppose qu'il intervient dans le mécanisme de catalyse et/ou de reconnaissance du substrat.

Q12. Expliquer à quoi correspond HXHDXH à l'aide du document 6.

Les ions métalliques se fixent sur l'enzyme par le motif HXHDXH.

Q13. Identifier le type de liaisons impliquées en s'appuyant sur la structure des acides aminés mis en jeu.

Q14. Présenter les rôles des ions métalliques intervenant dans le fonctionnement des enzymes.

Q15. Expliquer l'effet de l'EDTA sur l'activité enzymatique à l'aide du document 7.

Q16. Discuter l'impact des ions métalliques testés en s'appuyant sur le document 8.

3.2. Étude de la spécificité de l'enzyme AiiK

Plusieurs molécules, avec un nombre variable d'atomes de carbone et la présence éventuelle de carbonylation à la position C-3 de la chaîne aliphatique de l'acyle, peuvent servir de substrat à l'enzyme.

Pour évaluer la spécificité de l'enzyme sur ces différents substrats, les constantes cinétiques de AiiK concernant la dégradation de ces différents AHL sont évaluées dans le document 9.

Q17. Rappeler la signification de la constante k_{cat} puis choisir le substrat le plus adapté.

Q18. Rappeler la signification du K_m puis choisir le substrat le plus adapté à l'enzyme.

Q19. Présenter un calcul permettant de choisir le substrat le plus adapté à l'enzyme étudiée et déterminer ce substrat.

Banque « Agro-véto »
A TB - 0322

Q20. Exposer la méthode de purification de l'enzyme sachant qu'une étiquette 6 histidines a été introduite dans la protéine recombinée.

3.3. Évaluation de l'efficacité de l'enzyme AiiK sur des marqueurs du pouvoir pathogène d'*Aeromonas*

La pathogénicité des *Aeromonas* passe notamment par :

- l'installation d'un biofilm ;
- l'activité protéolytique extracellulaire.

Les biofilms sont des amas bactériens enrobés d'une matrice de polymères et attachés à une surface. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles notamment lors d'une réponse immunitaire ou lors d'utilisation d'antibiotiques.

L'évaluation de la mise en place de biofilm est décrite dans le document 10.

Q21. Calculer la concentration bactérienne de la suspension déposée initialement dans les puits.

Q22. Discuter l'impact de l'enzyme AiiK sur la mise en place des biofilms d'*Aeromonas*.

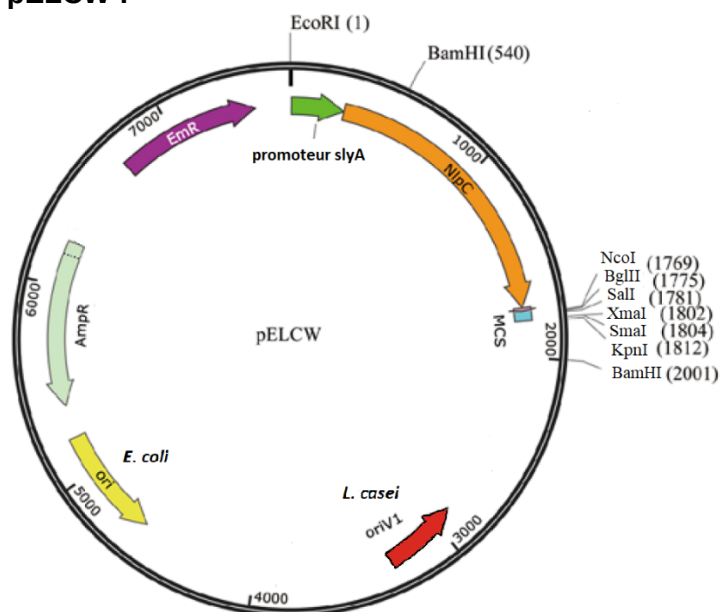
Q23. Expliquer le lien entre l'absorbance mesurée du cristal violet et la densité du biofilm en s'appuyant sur un schéma clairement annoté.

L'activité protéolytique d'*Aeromonas* permet de protéger les bactéries du biofilm, en hydrolysant les protéines, comme les anticorps, libérés par le poisson. L'évaluation de cette activité protéolytique est présentée dans le document 11.

Q24. Dégager l'intérêt de l'enzyme AiiK sur l'activité protéolytique d'*Aeromonas*.

Document 1 Carte du vecteur pELCW et PCR du gène *aiiK*

- Carte du vecteur pELCW :



- Amorces de PCR :

*aiiK*F: GGAAGATCTATGTGTCAAATAAAAAGTTGTAC

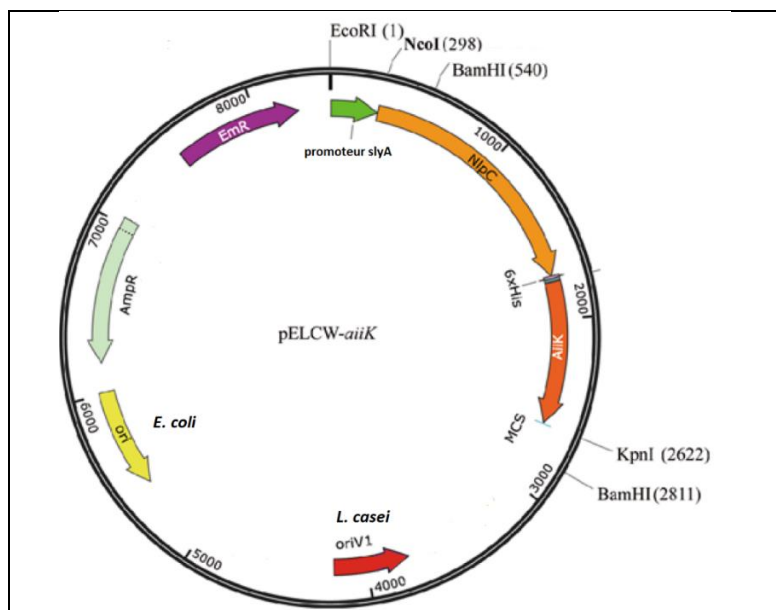
*aiiK*R: CGGGGTACCTTATTCGTAATACCCCTCCGTTGA

Les sites de restriction des enzymes Bgl II (AGATCT) et Kpn I (GGTACC) sont soulignés dans les séquences des amorces.

- Programme de PCR :

5 min	94 °C	31 cycles
30 s	94 °C	
30 s	55 °C	
120 s	72 °C	
10 min	72 °C	

Document 2 Carte du vecteur navette d'expression pELCW – *aiiK*



- Em^R : gène de résistance à l'érythromycine (*L. casei*)
- Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline (*E. coli*)
- MCS : site de clonage multiple

Document 3 Composition du milieu MRS et conditions de croissance

	Quantité en gramme pour 1 L
Tryptone	10,0
Extrait de viande	8,0
Extrait de levure	4,0
Glucose	20,0
Tween 80	volume : 1,0 mL
Hydrogénophosphate de potassium	2,0
Acétate de sodium	5,0
Citrate d'ammonium	2,0
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Agar	10,0

pH = 6,2 ± 0,2; culture à 37 °C sous atmosphère enrichie en CO₂

Source: Oxoid : <http://www.oxoid.com/>

Document 4 Test de stabilité du vecteur

• Protocole :

- Ensemencer les bactéries transformées *LcAiiK* à 1 % en bouillon MRS et incubé 12 h à 37 °C ;
- Répéter la procédure suivante 14 fois :
 - Repiquer la culture obtenue à 1 % dans un nouveau bouillon MRS et incubé 12 h à 37 °C ;
 - Effectuer 3 prélèvements :
 - sur chaque prélèvement, réaliser un dénombrement de la suspension bactérienne :
 - sur gélose MRS;
 - sur gélose MRS + 50 µg·mL⁻¹ d'érythromycine.

• Calculs :

A chaque génération :

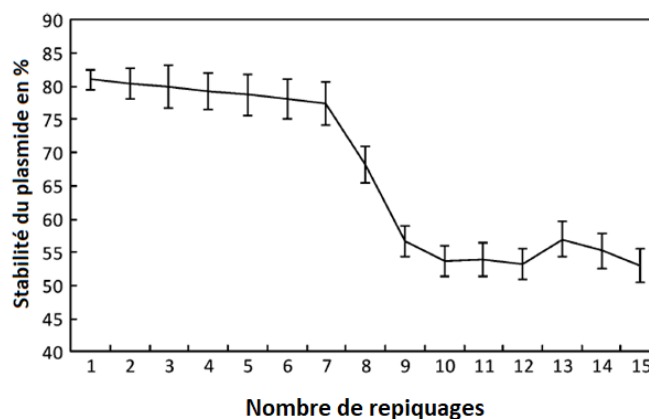
- Compter les colonies obtenues sur gélose MRS et sur gélose MRS + 50 µg·mL⁻¹ d'érythromycine ;
- Calculer alors la stabilité par génération en application la relation suivante :

$$L = \sqrt{\bar{x}/\bar{y}} \times 100$$

Avec :

$\bar{x}$: nombre moyen de colonies comptées sur gélose MRS+ 50 µg·mL⁻¹ d'érythromycine
 $\bar{y}$: nombre moyen de colonies comptées sur gélose MRS

• Résultats obtenus :



Les échantillons sont préparés en triple, les barres d'erreurs représentent l'écart type

Document 5 Test biologique de validation du Quorum Quenching

- **Principe simplifié :**

On a mis au point des souches de l'espèce bactérienne *Chromobacterium violaceum* qui ne produisent pas d'AHL mais reconnaissent et répondent aux AHL. L'AHL induit la production d'un pigment violet, la violacéine. On dispose ainsi d'un « détecteur biologique d'AHL ».

- **Protocole :**

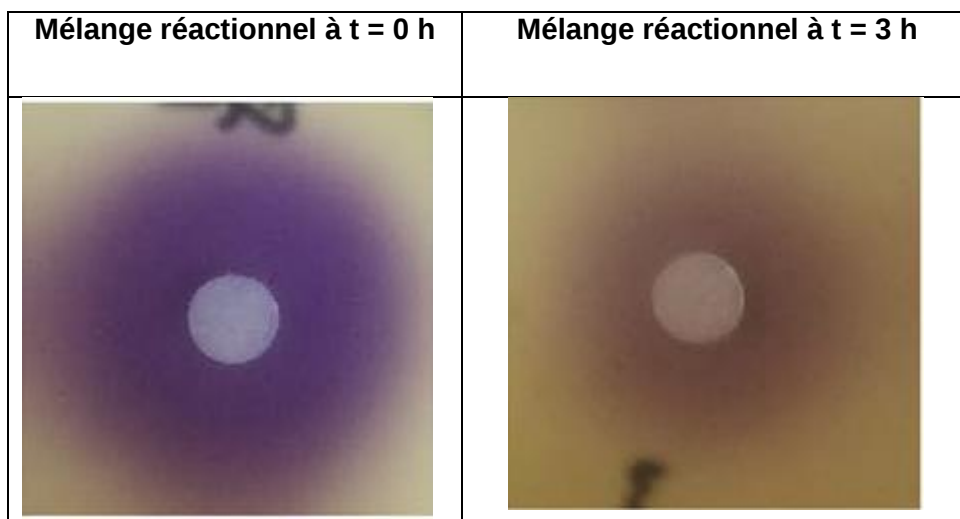
Préparation du test biologique:

- Préparer une suspension de *Lactobacillus casei* MCJΔ1 pELCW-*aiiK* en tampon PBS 10 mM pH = 7,4 ;
- Préparer 500 µL de « mélange réactionnel » composé de :
 - la suspension bactérienne calibrée (Atténuation ou OD_{600nm} = 5,0) ;
 - 50 µM de N-Hexanoyl-homo Sérine Lactone (AHL) en tampon PBS 10 mM pH = 7,4.
- Incuber 3 h à 37 °C ;
- Arrêter la réaction par addition de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) ;
- Extraire par solvant le N-Hexanoyl-homo Sérine Lactone (AHL) restant ;

Réalisation du test biologique de production de violacéine

- Mélanger 1 mL d'une culture de 18 h de *Chromobacterium violaceum* à 24 mL de gélose LB en surfusion ;
- Couler le mélange dans une boîte de Petri et laisser solidifier ;
- Déposer à la surface de la gélose solidifiée des disques de papier stérile (Ø = 5,5 mm) ;
- Déposer sur les disques 5 à 10 µL de la solution extraite précédemment par solvant ;
- Déposer les solutions témoins pour validation du test ;
- Incuber 16 h à 30 °C pour visualiser la production de la violacéine qui diffuse dans la gélose.

- **Résultats obtenus :**



Document 6 Acides aminés : codes à une lettre et à trois lettres

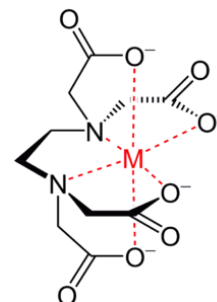
ala	arg	asn	asp	cys	glu	gln	gly	his	ile	leu	lys	met	phe	pro	ser	thr	trp	tyr	val
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V

Source : <http://www.fao.org/docrep/004/Y2775E/y2775e0e.htm#TopOfPage>

X (une lettre) ou Xaa (trois lettres) : acide aminé non spécifié

Document 7 Structure de l'EDTA

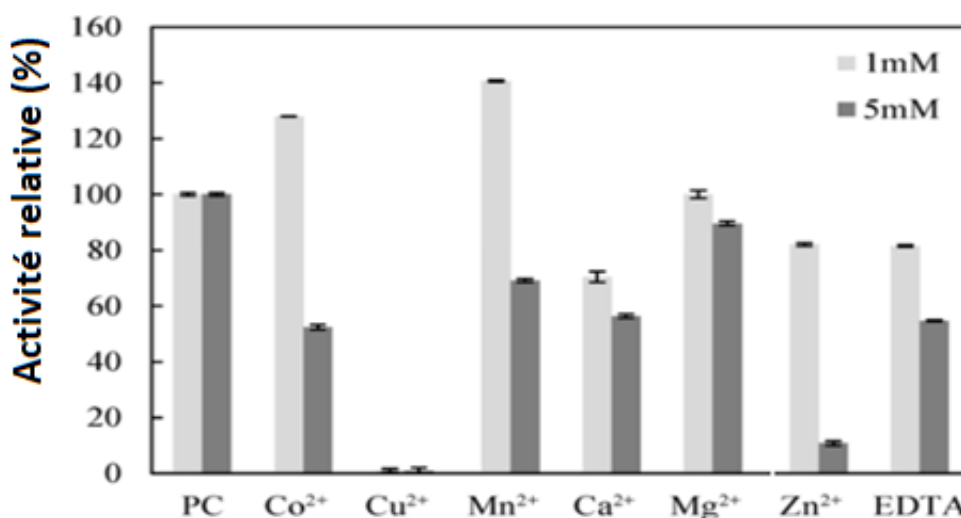
L'EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) est un chélateur puissant (constante de dissociation inférieure à 10^{-27} en fonction des ions).



Document 8 Effet des ions métalliques et de l'EDTA sur l'activité AiiK

	Charge ionique	Numéro atomique	Masse Atomique (g·mol ⁻¹)
Calcium	2+	20	40,78
Cobalt	2+ / 3+	27	58,93
Cuivre	1+ / 2+	29	63,55
Magnésium	2+	12	24,30
Manganèse	2+ / 4+	25	54,93
Zinc	2+	30	65,38

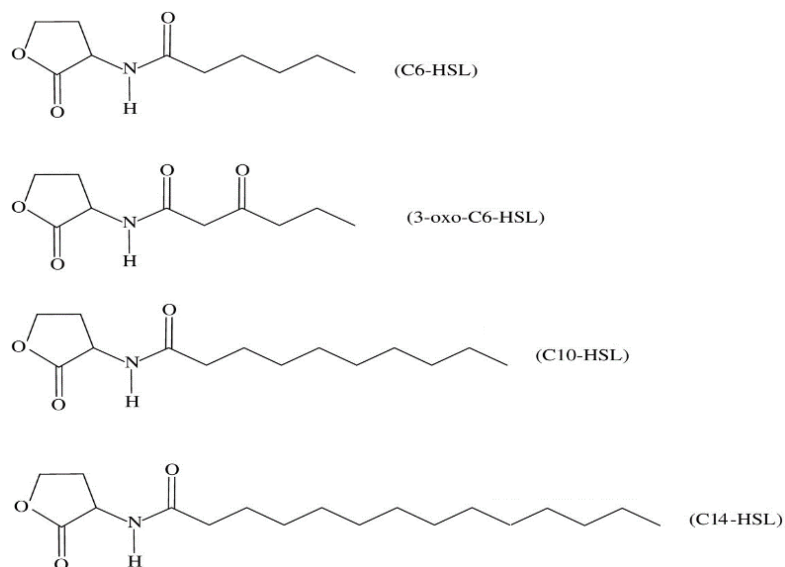
Les effets des ions métalliques et de l'EDTA sur AiiK ont été déterminés par préincubation avec 1 mM ou 5 mM de divers ions métalliques et EDTA à 4 °C pendant 30 min. Par la suite, l'activité d'AiiK a été mesurée à 45 °C pendant 10 min en utilisant la même méthode que celle des dosages enzymatiques.



PC : contrôle positif, contenant 4 µg·mL⁻¹ AiiK, 50 µM C₁₀-HSL et 10 mM PBS (pH 7,4). La réaction a été effectuée à 45 °C pendant 1 min.

Document 9 Constantes cinétiques d'AiiK et catalyse de l'hydrolyse des AHL

Afin de déterminer la cinétique de AiiK pour la dégradation des AHL, différentes concentrations (25 - 150 μM , avec un intervalle de 25 μM) de C6-HSL, 3-Oxo-C6-HSL, C10-HSL ou C14-HSL ont été ajoutées au PBS dans AiiK (4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).



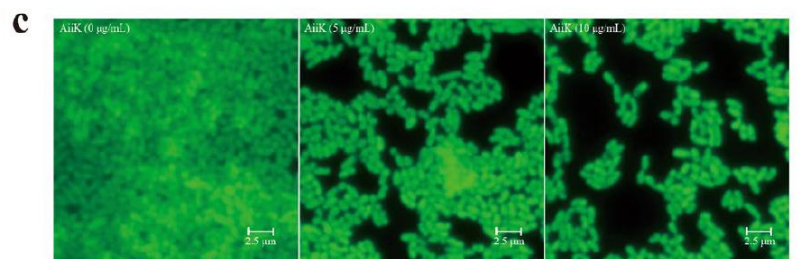
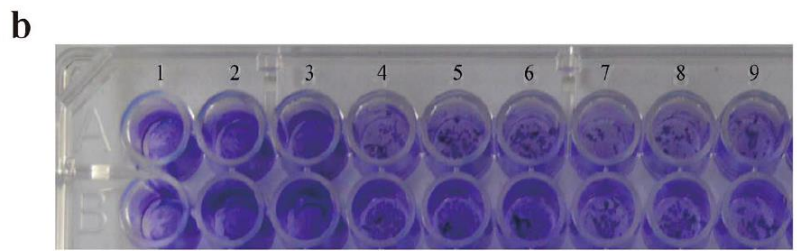
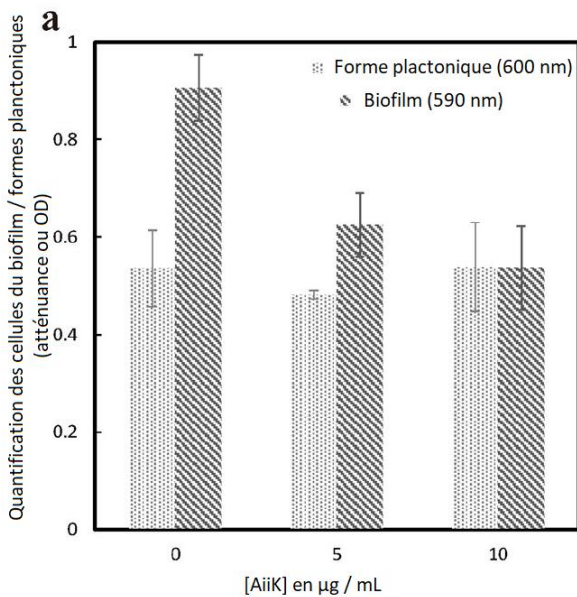
La réaction a été réalisée à 25 °C pendant 10 minutes à pH 7,4.

Les AHL restants ont été quantifiés en calculant les aires de pic pour un temps de rétention donné par rapport à ces solutions AHL de concentration connue par analyse en chromatographie liquide.

AHL		
	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	$K_m (\text{mM}^{-1})$
C ₆ -HSL	0.650 ± 0.069	0.200 ± 0.031
3-Oxo-C ₆ -HSL	0.170 ± 0.026	0.070 ± 0.020
C ₁₀ -HSL	1.320 ± 0.214	0.310 ± 0.065
C ₁₄ -HSL	0.040 ± 0.002	0.040 ± 0.004

Document 10 Effet d'AiiK sur la formation de biofilm par *Aeromonas*

- 150 μL d'une suspension à $2.10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'*Aeromonas* dans un milieu minimal M9 sont mélangés à 5 μL d'une solution d'AiiK à différentes concentrations (pour obtenir 0, 5 ou 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).
- 200 μL du mélange *Aeromonas* / AiiK sont distribués dans les puits d'une plaque de microtitration à 96 puits puis incubés à 37 °C pendant 24 h sans agitation.
- Les bactéries non fixées (dites « planctoniques ») de la plaque sont transférées doucement vers une nouvelle plaque de microtitration à 96 puits pour une mesure à 600 nm.
- Les bactéries restant au fond des puits de la plaque sont colorées avec 20 μL de cristal violet à 0,2 % à 25 °C pendant 15 min, afin d'estimer la quantité de formation de biofilm.
- Les puits sont lavés très doucement avec de l'eau distillée stérile trois fois jusqu'à ce que le cristal violet en excès soit éliminé.
- Enfin, l'absorbance à 590 nm est mesurée après l'extraction du cristal violet des bactéries en ajoutant 100 μL d'éthanol à 95 %.



(a) Formation de biofilm par *Aeromonas* représenté par une coloration au cristal violet et des cellules planctoniques d'*Aeromonas*. (Les échantillons sont préparés en triple, les barres d'erreurs représentent l'écart type)

(b) La coloration au cristal violet du biofilm formé par *Aeromonas* :

Pistes 1 à 3 : 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'AiiK;
Pistes 4 à 6 : 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'AiiK;
Pistes 7 à 9 : 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'AiiK.

(c) Microscopie à fluorescence pour la visualisation de la formation de biofilm par *Aeromonas* coloré à l'acridine orange. Un essai sur plaque de microtitration statique a été utilisé pour tester l'effet d'AiiK sur la formation de biofilm par *Aeromonas*.

Document 11 Effet de l'enzyme AiiK sur l'activité protéolytique extracellulaire d'*Aeromonas*

L'effet de AiiK sur l'activité protéolytique extracellulaire d'*Aeromonas* a été déterminé.

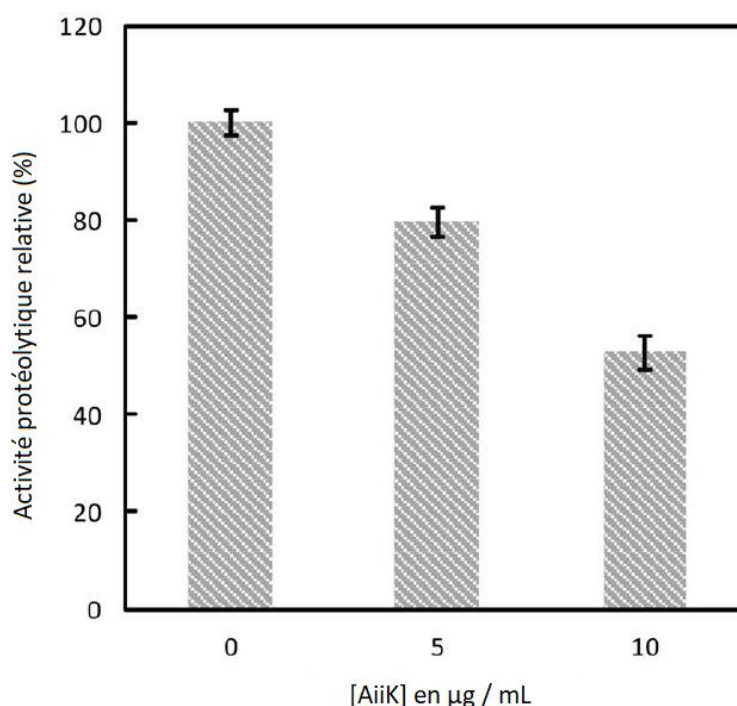
Aeromonas a étéensemencé dans un bouillon contenant différentes concentrations d'AiiK (0,5 ou 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Les surnageants de culture ont ensuite été utilisés comme extrait brut pour déterminer l'activité protéolytique extracellulaire de la culture.

Le mélange réactionnel pour le test d'activité protéolytique extracellulaire contenant :

150 μL d'extrait brut et 250 μL de protéine à 2 % dissous dans 100 μL de PBS 10 mM, pH = 7,4 a été incubé à 37 °C pendant 30 min. Puis 1,2 mL d'acide trichloracétique à 10 % a été ajouté.

Le mélange a ensuite été incubé à 25 °C pendant 15 minutes. Après cette incubation, 1,2 mL des surnageants du mélange, recueillis par centrifugation à 3000 g pendant 5 min, ont été mélangés avec 1 mL de NaOH 1M dans un nouveau tube. La mesure de l'absorbance a ensuite été déterminée à 440 nm.



Les échantillons sont préparés en triple, les barres d'erreurs représentent l'écart type

Sources bibliographiques :

Sauf mention, les documents proviennent ou sont adaptés des publications suivantes :

Heterologous expression of AHL lactonase by *Lactobacillus casei* MCJA 1 with great quorum quenching ability against *Aeromonas hydrophyla* AH-1 and AH-4, Dong W. *et al*, Microb. Cell. Fact. (2020) 19:191;

Characterization of AiiK, an AHL lactonase, from *Kurthia huakui* LAM0618 T and its application in quorum quenching on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, Dong W. *et al*, Sci Rep. 2018 Apr 16; 8(1) :6013.