Biotechnologies

Classe de terminale

« Les bio-industries » : les agro-carburants

Domaine / Thème	Les Bioindustries : Agro-carburants
Repère dans l'année	**Avril / Mai**
Pré-requis	**AT n°1 :** • Savoir effectuer un dénombrement direct en cellule de Malassez. • Savoir réaliser expérimentalement un suivi de croissance bactérienne en milieu non renouvelé et exploiter une courbe de croissance pour en déduire les paramètres cinétiques. • Être capable de réaliser le dosage d'une substance d'intérêt avec étalon. **AT n°2 :** • Connaître la structure de l'ADN bi-caténaire. • Connaître le mécanisme de la réplication de l'ADN. • Savoir que des modifications du patrimoine génétique d'un organisme permettent de lui conférer de nouvelles potentialités. • Savoir pipeter des micro-volumes. • Savoir analyser les risques d'altération du matériel biologique. • Savoir prendre des mesures adéquates de protection du matériel biologique.
Objectifs AT1	**AT n°1 : Suivi de fermentation et de production d'éthanol (environ 3 séances)** **Problématique :** **« La mélasse de la betterave sucrière est-elle utilisable par la levure comme milieu de culture pour produire de l'éthanol ? »** • Mettre en œuvre une technique de génie fermentaire. • Mettre en œuvre un suivi de fermentation en conditions anaérobies par des levures et étudier l'influence de substrats différents sur le rendement de la production d'éthanol. • Mettre en forme et traiter les données et résultats expérimentaux bruts collectés, lors du suivi de croissance de Saccharomyces cerevisiae, dans le cadre de la problématique définie : la mélasse est-elle un bon milieu de culture pour produire de l'éthanol ? • Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité liées aux activités de microbiologie et biochimiques.
Objectifs AT2	**AT n°2 : Mise en évidence d'un gène d'intérêt dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae* (environ 2 séances)** **Situation :** **« Des levures ont été modifiées génétiquement par insertion d'un gène leur permettant de produire correctement de l'éthanol en présence des**

Domaine / Thème	Les Bioindustries : Agro-carburants
	fortes teneurs en substances non glucidiques, présentes dans la mélasse. Le but est de vérifier la présence de ce gène. » • Maîtriser la réalisation d'une PCR. • Identifier le rôle des différentes molécules impliquées (ADN matrice, amorces, enzyme, nucléotides). • Analyser les résultats après électrophorèse d'un amplifiat. • Appliquer les bonnes pratiques de laboratoire.
Démarche	• Investigation pour la mise en place de la problématique. • Déductive pour l'analyse des résultats.
Durée indicative	• Durée indicative : 45 minutes. • AT n°1 : peut se développer sur 3 séances, durée indicative totale de 8 heures • AT n°2 : peut se développer sur 2 séances, durée indicative totale de 4 heures ***Salle équipée pour la microbiologie + salle de biologie moléculaire***

Introduction

Fiche de présentation de la séance d'introduction

CONTENUS	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ENSEIGNANT	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ELEVE
Mise en place d'une situation permettant de déboucher sur la problématique :	• Cible l'attention des élèves. • Oriente la discussion : ◦ toutes les stations-services possèdent-elles des pompes à bioéthanol ? ◦ quelle est l'intérêt de ce produit ?	• Observation de la photo. • Discussion sur l'intérêt du produit : • Le bioéthanol commence à jouer un rôle de plus en plus important en tant que source d'énergie en remplacement des produits pétroliers.
Présentation de la réaction de fermentation réalisée par *Saccharomyces cerevisiae* pour produire du bioéthanol à partir de saccharose.	• Explique comment le bioéthanol est produit. • Oriente la discussion : ◦ Où trouver une source carbonée telle que le saccharose, renouvelable, disponible en grande quantité et bon marché ?	• Ecoute. • Réflexion / Recherche d'idées.
<u>Hypothèse</u> : La mélasse de la betterave sucrière est-elle utilisable par la levure comme milieu de culture pour produire de l'éthanol ?		
	• Oriente la discussion : ◦ comment vérifier cette hypothèse ?	• Recherche d'idées.
<u>Mise en commun des propositions retenues</u> : **Etudier la croissance de *saccharomyces cerevisiae* en présence de saccharose seul et sur mélasse (= mélange d'oses, de dérivés d'oses et de substances non glucidiques) brute et plus ou moins purifiée.** **Comparer les productions de biomasse et d'éthanol.**		

Production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* en fermenteur et étude de l'influence du milieu de culture sur la fermentation alcoolique

POINTS CONNUS ET MAITRISES	
NOTIONS THEORIQUES	**TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES**
• *Culture en milieu non renouvelé et culture continue.* • *Suivi de croissance bactérienne et détermination des paramètres cinétiques.* • *Cinétique d'une réaction enzymatique.* • *Utilisation des enzymes en biochimie analytique.*	• *Procédures de sécurité inhérentes aux manipulations en milieu stérile.* • *Dénombrement en hématimètre.* • *Dénombrement en surface par étalement.* • *Suivi turbidimétrique de la croissance bactérienne.* • *Dosage enzymatique de substrats - Méthode en point final.*

POINTS RENFORCES PAR L'AT	
Autonomie du travail : • *Organiser au sein d'une équipe son travail.* • *Mettre en œuvre de nouvelles techniques microbiologiques et biochimiques.* • *Utiliser la documentation disponible.*	**Techniques microbiologiques :** • *Utilisation d'un biofermenteur.* • *Dénombrement par la méthode des spots.* • *Traitement et exploitation informatiques de données expérimentales.* **Techniques biochimiques :** • *Dosage enzymatique de l'éthanol*

1. Points évalués

Compétences évaluées	A / EA / NA	Note
Organiser son poste de travail		
Organiser correctement son poste et son temps de travail		
Ranger correctement son poste de travail		
Mettre en œuvre des techniques de génie fermentaire		
Préparer et stériliser un bio-fermenteur		
Suivre des indicateurs de croissance (mesure de densité optique)		
Mettre en œuvre une technique de dosage de l'éthanol produit au cours de la fermentation alcoolique		
Réaliser la manipulation en autonomie		
S'adapter aux aléas de mise en œuvre		
Mettre en œuvre des techniques de dénombrement (par méthode des spots ou par hématimètre)		
Préparer ou ajuster soigneusement une dilution en série		
Ensemencer convenablement des milieux lors d'un dénombrement en surface ou réaliser une mise en hématimètre		
Obtenir des résultats exploitables		
Analyser, interpréter et présenter les résultats expérimentaux		
Présenter des résultats (tableaux réalisés par informatique, graphes complets)		
Exploiter les données et résultats (calcul de concentrations microbiennes, de concentrations massiques d'éthanol)		
Etablir une liste de matériel		
Interpréter et conclure		

A, acquis / EA, en cours d'acquisition / NA, non acquis

2. Introduction :

Les fermenteurs et leurs applications :

Le domaine des biotechnologies utilise les capacités de synthèse des micro-organismes à produire industriellement de nombreuses substances. Les applications sont diverses : production de médicaments, de vaccins, d'additifs alimentaires, d'insecticides biologiques, de levures de boulangerie.

Une application plus répandue ces dernières années, concerne la valorisation des déchets, telle que la mélasse produite à partir de la betterave sucrière. Le but de notre étude est :

- de montrer que des levures, telles que Saccharomyces cerevisiae, sont capables de se multiplier en utilisant ces déchets ;
- de montrer l'influence de la présence ou non d'impuretés ou de produits non glucidiques dans la mélasse, sur la croissance de Saccharomyces cerevisiae ;
- de montrer l'influence de la présence ou non d'impuretés ou de produits non glucidiques dans la mélasse, sur la production de produits finaux obtenus, tel que le bioéthanol, formés au cours de la fermentation alcoolique.

Le procédé batch ou culture discontinue :

Ce procédé utilisé pour ces travaux pratiques, présente un même volume de milieu de culture. On parle également de milieu non renouvelé. Les micro-organismes s'y multiplient (augmentation de la population cellulaire) et y accumulent leurs produits. Le milieu est ensuite retiré du fermenteur pour subir les traitements visant à la purification des substances recherchées (dans notre cas, le bioéthanol). Il y a arrêt du fermenteur entre chaque culture d'où le terme batch.

Proposition d'organisation des activités technologiques sur trois séances :

- Lors de la première séance, les élèves se répartissent par groupe de 4. Le groupe travaille avec un milieu de culture à base de saccharose pure, de mélasse plus ou moins composée d'impuretés ou de mélasse brute (MS, M20, M40, MB).
- Lors de la deuxième séance, chaque membre d'un groupe travaille sur un atelier A, B, C ou D différent. Chaque élève doit avoir abordé les 4 ateliers proposés au cours de cette 2ième séance.
- Lors de la troisième séance, une mise en commun de l'ensemble des résultats est réalisée avec l'ensemble de la classe. Une réflexion pourra être menée par la classe entière, par groupe de 4 élèves travaillant sur un même milieu ou individuellement.

3. Principe

Saccharomyces cerevisiae est placée dans des conditions de croissance particulières, favorisant la fermentation alcoolique selon la réaction globale :

$$\text{Glucose} \longrightarrow 2 \text{ éthanol} + CO_2$$

- Quatre milieux différents et riches en nutriments assimilables ou non sont testés.
- Les conditions de températures sont convenables.
- Les conditions d'oxygénation sont favorables.

La production d'éthanol est favorisée lorsque la biomasse est suffisante, la souche étant placée en anaérobiose.

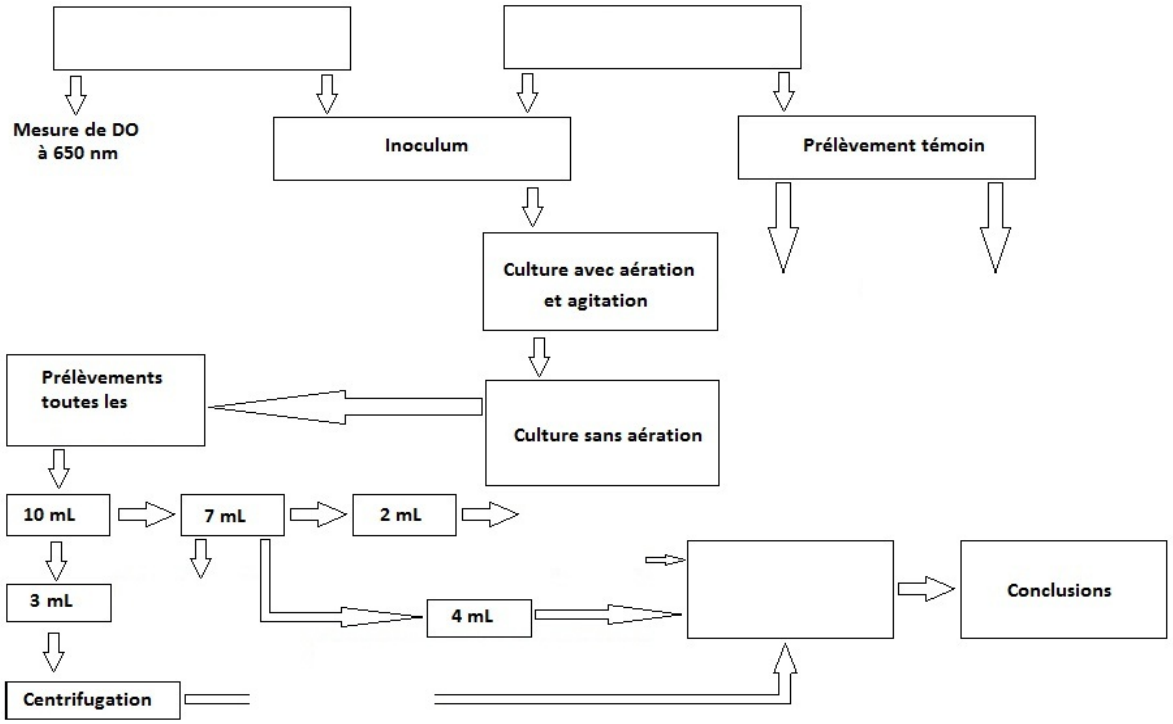
Différentes mesures permettront de suivre l'évolution de la biomasse :

- la mesure turbidimétrique du milieu au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650 nm ;
- le dénombrement en hématimètre, par comptage en cellule de Malassez ; ce dénombrement permet de déterminer la biomasse totale et la biomasse viable après coloration différentielle ;
- le dénombrement en surface sur milieu Sabouraud, par la méthode des spots ; ce dénombrement permet de confirmer les résultats obtenus par l'hématimètre.

Un dosage enzymatique de l'éthanol produit sera effectué en parallèle.

4. Mode opératoire

L'organigramme incomplet ci-dessous résume les principales étapes des opérations à effectuer sur les trois jours.



Cette manipulation nécessite un suivi de fermentation pendant 3h. La préparation des échantillons prélevés, l'estimation par turbidimétrie de la biomasse et la numération en hématimètre doivent être réalisés sans retard, dès l'obtention des prélèvements. Le dénombrement par méthode des spots ainsi que le dosage d'éthanol peuvent être réalisés ultérieurement.

- à l'aide des modes opératoires proposés par le professeur, compléter le diagramme d'organisation des travaux à effectuer.

5. Montage expérimental et stérilisation du matériel

5.1 Analyse du montage et des milieux de culture

Le fermenteur a pour fonction d'assurer un environnement favorable à la croissance des micro-organismes et à la production des biomolécules. Il doit donc être capable de résister aux actions corrosives des substances qu'il est susceptible de contenir, aux variations de pression et aux contraintes mécaniques consécutives à l'agitation.

La fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* s'effectue dans une série de petits bioréacteurs de 750 mL de volume total. Ces réacteurs dans lesquels seront réalisées les cultures en anaérobiose, sont disposés sur une rampe d'agitation dans une étuve à 30°C.

5.2 Préparation du fermenteur à stériliser

Un groupe de 4 élèves travaille avec un bioréacteur (P1 à P8).

- Les petits bioréacteurs (P) sont équipés d'un système de prélèvement par le bas.
- Fermer l'extrémité du tuyau de prélèvement à l'aide d'un coton cardé puis équiper le système d'une pince de Mohr.
- Couvrir l'ensemble du système de prélèvement avec du papier aluminium.

5.3 Préparation d'un milieu de culture à stériliser

Le tableau ci-dessous rappelle les caractéristiques des réacteurs et des milieux utilisés :

MATERIEL et CONDITIONS	IDENTIFICATION DES BIOREACTEURS	COMPOSITIONS DES MILIEUX (Source principale de carbone)		CONDITIONS
REACTEUR 750 mL EN ANAEROBIOSE	P_1 à P_4	**S**	Milieu saccharose pur	Faible agitation
		M20	Milieu mélasse + 20 % d'impuretés	Milieu recouvert d'huile de vaseline
	P_5 à P_8	**M40**	Milieu mélasse + 40 % d'impuretés	
		MB	Milieu mélasse brute	$T_{culture}$ = 30°C

Un groupe de 4 élève travaille avec un milieu de culture initial (S, M20, M40, MB).

- Couvrir les milieux de culture présentés sur chaque paillasse avec du papier aluminium.
- Porter le milieu et le bioréacteur jusqu'à l'autoclave, accompagné du professeur. La stérilisation des milieux et des bioréacteurs s'effectue pendant 1h30, à 120°C grâce à la technique d'autoclavage.

5.4 Préparation d'une préculture

- A l'aide d'une pipette Pasteur fermée, prélever 5 colonies de *Saccharomyces cerevisiae* isolées sur Sabouraud et ensemencer 100 mL de bouillon (milieu Sabouraud). Ceci constitue une préculture.
- Sachant qu'une unité d'absorbance (UA) équivaut à $1{,}3.10^7$ cellules.mL^{-1}, estimer la concentration de cellules.mL^{-1} présentes dans la préculture par mesure d'absorbance à 650 nm.
- Afin de respecter la limite de linéarité (0,7 UA), ajuster la suspension par dilution en milieu Sabouraud.

5.5 Volume de préculture à introduire dans le bio fermenteur

A partir de cette première évaluation, déduire le volume d'inoculum à ajouter dans le fermenteur en Jour 2.

Pour une fermentation alcoolique, le volume d'inoculum doit être compris entre 5 et 10 % du volume total du bouillon de culture et le nombre de levure doit être en début de fermentation, de l'ordre de $1{,}5.10^6$ cellules.mL^{-1}.

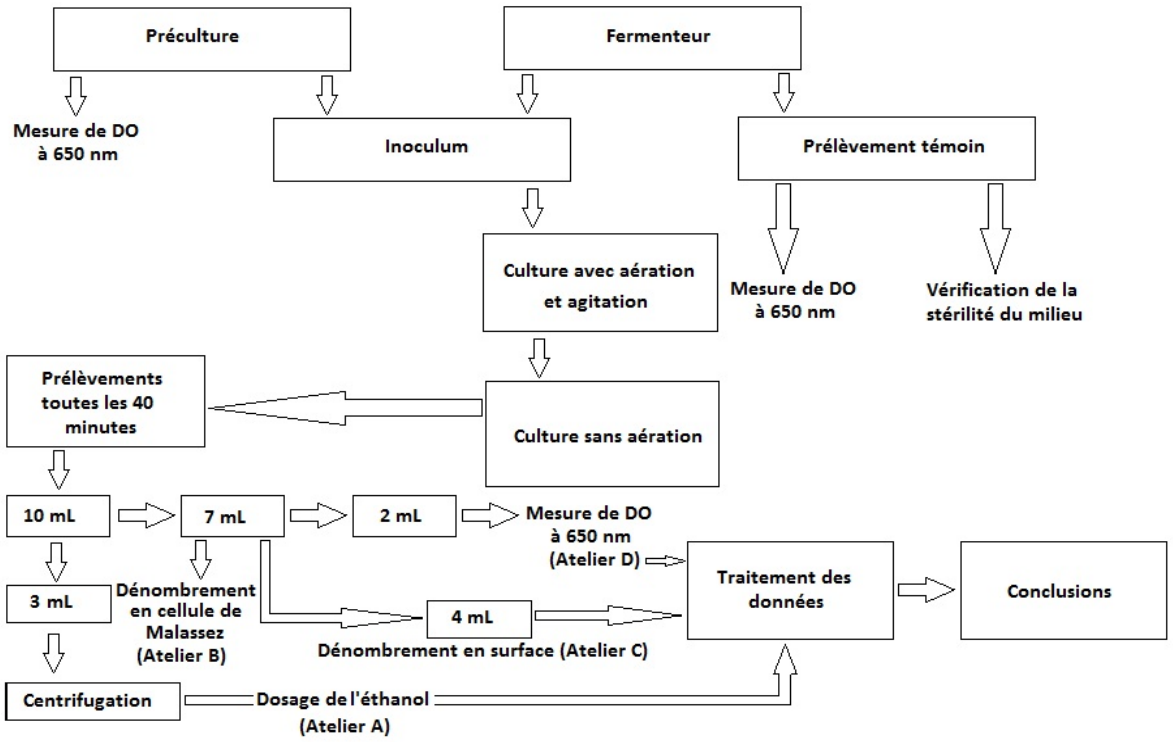
6. Mise en place des groupes de travail

6.1 Répartition des élèves par groupe de travail :

Suivi de fermentation de *Saccharomyces cerevisiae*			
Groupe 1 Suivi sur milieu **S**	**Groupe 2** Suivi sur milieu **M20**	**Groupe 3** Suivi sur milieu **M40**	**Groupe 4** Suivi su milieu **MB**

6.2 Répartition des élèves par atelier :

Suivi de fermentation de *Saccharomyces cerevisiae*				
prélèvement	**Atelier A**	**Atelier B**	**Atelier C**	**Atelier D**
	Prélèvement Dosage d'éthanol	Dénombrement des levures en cellule de Malassez	Dénombrement en surface des levures sur gélose Sabouraud	Suivi de biomasse par mesure de DO
1	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
1	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
1	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3
1	Gr4	Gr4	Gr4	Gr4
2	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
2	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
2	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3
2	Gr4	Gr4	Gr4	Gr4
3	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
3	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
3	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3
3	Gr4	Gr4	Gr4	Gr4
4	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
4	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
4	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3
4	Gr4	Gr4	Gr4	Gr4



Document professeur

AT n°1 : production de bioéthanol

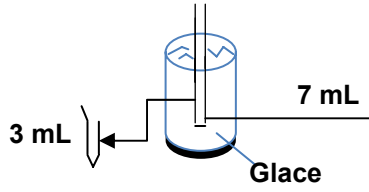
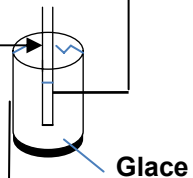
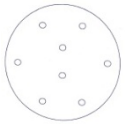
Fiche de présentation de la séance n°1

CONTENUS	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ENSEIGNANT	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ELEVE
Présentation de la situation : • On se propose de suivre, à l'aide de plusieurs bio-réacteurs, l'influence de sources carbonées (saccharose, mélasse) sur la fermentation alcoolique par une levure, Saccharomyces cerevisiae.	• Cible l'attention des élèves.	• Écoute.
Distribution et lecture du protocole du AT n°1	• Distribue un mode opératoire contextualisé. • Oriente les élèves dans la constitution de groupes d'atelier (<u>manipulations réalisées en séance 2</u>) : ◦ **Atelier A :** Prélèvement - Dosage d'éthanol. ◦ **Atelier B :** Dénombrement de levures par cellules de Malassez. ◦ **Atelier C :** Dénombrement de levures en surface - Méthode des spots. ◦ **Atelier D :** Suivi de la biomasse par turbidimétrie.	• Écoute. • Complète un diagramme d'organisation spatio-temporelle (plan de travail des séances sur deux jours), fonctionnelle et pratique. • Complète des documents. • S'organise en groupe de travail : ◦ **Séance 1 :** • 1 groupe de 4 élèves travaille sur 1 milieu de culture prédéfini. ◦ **Séance 2 :** • 1 groupe de 4 élèves travaille sur 4 ateliers différents. Au cours de la culture, 4 à 5 prélèvements sont effectués. Les élèves d'un même groupe change d'atelier.
Manipulations : Préparation du fermenteur et des annexes	• Présente les fermenteurs de 750 mL à préparer avant l'autoclavage. • Vérifie l'utilisation conforme des matériels de stérilisation et le respect des procédures de sécurité.	• Prépare le fermenteur : ◦ Ferme les entrées et sorties du bioréacteur.

CONTENUS	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ENSEIGNANT	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ELEVE
Manipulations : Préparation de l'inoculum	• Accompagne les élèves jusqu'à l'autoclave. • Contrôle le respect de la limite de linéarité lors de la mesure de l'absorbance ... • Oriente les élèves en donnant des consignes supplémentaires concernant : **Atelier A** : la recherche de la longueur d'onde de travail à l'aide du spectre d'absorption de l'éthanol. Identification des réactions principales intervenant dans le protocole de dosage de l'éthanol. **Atelier B** : les précautions lors de la mise en hématimètre ; les caractéristiques de l'hématimètre nécessaires à l'élaboration à l'exploitation. **Atelier C** : le rappel de la mise en forme exploitable des données, des résultats et l'établissement des formules littérales. **Atelier D** : le rappel des différentes phases de croissance en milieu non renouvelé.	• Accompagné du professeur, stérilisation par autoclavage du dispositif et du milieu de culture du fermenteur, pendant 1h30. • Préparation l'inoculum : ◦ mise en suspension la levure et évaluation de la concentration par absorptiométrie (ceci constitue une subculture). ◦ ajustement de la suspension par dilution. ◦ détermination à partir de cette première évaluation du volume d'inoculum à ajouter dans le fermenteur en deuxième séance. • Elaboration de l'organisation pratique des activités proposées et des calculs à effectuer : ◦ **Atelier A** : prendre connaissance de la démarche à suivre pour réaliser le dosage d'éthanol ; ◦ répond aux questions posées ; ◦ dresse une liste de matériel. ◦ **Atelier B** : élaborer la formule littérale de la concentration en levures du milieu de culture à partir d'une numération en cellule de Malassez. ◦ **Atelier C** : effectuer le choix des dilutions de la culture à effectuer en pour un dénombrement en surface par dépôt de spots de 15 µL, au cours du suivi de croissance des levures. ◦ **Atelier D** : déterminer des paramètres de la croissance microbienne μ_{expo} et G dans le cas d'une culture en milieu non renouvelé.
Manipulation : mise en place du fermenteur	• Donne des consignes et des conseils.	• Remplit le fermenteur, une fois stérilisé, avec le milieu de culture approprié.
Manipulation : élimination du milieu de culture et du matériel bio-contaminés	• Évalue l'élimination conforme des cultures et du matériel et la remise en ordre correct de l'espace de travail.	• Élimine les cultures et le matériel bio-contaminé. • Range le poste de travail.

Fiche de présentation de la séance n°2

CONTENUS	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ENSEIGNANT	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ELEVE
Rappel de la séance n°1 : La fermentation alcoolique par une levure *Saccharomyces cerevisiae*, sous l'influence de diverses sources carbonées est suivie dans plusieurs bioréacteurs différents.	• Cible l'attention des élèves. • Distribue des grilles de suivi de croissance. • Précise la composition des groupes d'élèves.	• Echange et écoute. • Complète des documents.
Manipulation (séance 2) : **Atelier A :** Suivi du pH - Dosage d'éthanol	• Donne des consignes et des conseils.	• Réalise un prélèvement toutes les 40 minutes, suivant les bonnes pratiques de microbiologie (soit 4 à 5 prélèvements au cours de la séance). • Suit les démarches opérationnelles proposées pour le dosage d'éthanol du prélèvement.
Manipulations (séance 2) : **Atelier B :** Dénombrement des levures en cellule de Malassez	• Donne des consignes et des conseils.	• Prélève stérilement un échantillon de la suspension provenant de l'atelier A. • Réalise une dilution arbitraire de la suspension à évaluer. • Réalise la mise en hématimètre. • Dénombre les cellules. • Evalue la biomasse (concentration de levures).
Manipulations (séance 2) : **Atelier C :** Dénombrement des levures en surface Méthodes des spots	• Donne des consignes et des conseils.	• Prélève stérilement une fraction de la culture provenant de l'atelier B. • Réalise des dilutions en séries décimales suivant les calculs effectués lors de la numération en cellule de Malassez. • Dépose les spots de 4 dilutions successives (2 essais par dilution). • Mettre les milieux à incuber.
Manipulations (séance 2) : **Atelier D :** Suivi de la biomasse par turbidimétrie	• Vérifie le relevé des indicateurs de suivi de croissance et les réponses techniques apportées pour la mise en œuvre.	• Prélève stérilement une fraction de la culture provenant de l'atelier B. • Evalue la concentration de levure par turbidimétrie. • Ajuste sa mesure, si nécessaire, par dilution de la suspension afin de respecter la limite de linéarité lors de la mesure spectrophotométrique.
Manipulation : élimination du milieu de culture et du matériel bio-contaminés	• Vérifie l'élimination conforme des cultures et du matériel et la remise en ordre correcte de l'espace de travail.	• Elimine les cultures et le matériel bio-contaminé. • Range le poste de travail.

SEANCE N°2 : SUIVI DE FERMENTATION PAR LA LEVURE *Saccharomyces cerevisiae* (document fourni à chaque élève)			
Atelier A Prélèvement - Dosage d'éthanol	**Atelier B** Dénombrement direct des levures en cellule de Malassez	**Atelier C** Dénombrement en surface des levures - Méthode des spots sur gélose Sabouraud	**Atelier D** Suivi de population de levures Méthode par turbidimétrie
• Prélever 10 mL de milieu de culture. • Bien homogénéiser et conserver 3 mL en microtube ; le reste, plongé dans un bac à glace, est transmis à l'atelier B :  • Placer les 3 mL dans un bain Marie à 80°C, pendant 15 minutes pour stopper toutes réactions enzymatiques (recouvrir correctement le tube car l'éthanol est volatil). • Centrifuger les 3 mL pendant 5 minutes à 2500 tours.min^{-1}. • Doser l'éthanol dans le surnageant dilué par la méthode enzymatique à l'alcool déshydrogénase en Annexe	**4 mL** **2 mL**  **500 µL** • Ajouter à l'échantillon 500 µL de bleu de méthylène ou bleu de Funk dans un tube à hémolyse. • Effectuer la numération des cellules en suivant les instructions de l'Annexe • Compter toutes les cellules et les levures viables (non colorées). Les cellules mortes sont colorées en bleues. On doit compter entre 10 et 50 cellules par rectangle unitaire de la chambre de comptage, pour une lecture correcte au microscope. • Réaliser une dilution si nécessaire au 1/5 ou 1/10 ou 1/20 en eau physiologique de la suspension initiale, en tube à hémolyse, sous un volume final de 1 mL. • Recommencer la numération jusqu'à obtenir un bon résultat.	• Garder le prélèvement dans la glace et bien homogénéiser **1 mL** • A partir des résultats obtenus grâce à la numération par cellule de Malassez, calculer quatre dilutions successives que l'on peut tester par dénombrement en surface (méthode des spots) ; des spots dénombrables contiennent de 1 à 50 colonies. • Réaliser les dilutions en cascade adéquates de raison 10 ; le diluant est l'eau physiologique ; la dilution est réalisée en tubes à hémolyse, sous un volume final de 1 mL. • Déposer 10 µL de chacune des dilutions successives à tester, suivant le canevas mis à votre disposition en Annexe. Les dépôts de chaque dilution se font en double essai, sur une gélose Sabouraud. • Laisser sécher pendant 10 bonnes min. • Incuber à 30°C, 24 à 48h. • Exemple de canevas 	• Garder le prélèvement dans la glace et bien homogénéiser **2 mL** • Préparer des dilutions en tube à hémolyse, en série du 1/2 au 1/32 en milieu Sabouraud stérile, sous un volume final de 1 mL. • Mesurer l'absorbance à 650 nm et garder la valeur la plus haute mais inférieure à 1. • Le zéro de l'appareil est réglé avec le milieu de culture testé de départ (**Attention ! le garder durant tout le temps de la manipulation**).

Séance n°2 : annexes (document fourni à chaque élève)

1. Atelier A : Dosage d'éthanol - Méthode enzymatique

Principe de la méthode

L'éthanol est oxydé en présence de l'alcool déshydrogénase (ADH) par le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD), suivant la 1ère étape réactionnelle :

$$\text{Ethanol} + NAD^+ \xleftrightarrow{ADH} \text{Acétaldéhyde} + NADH,H^+$$

L'équilibre de la réaction réversible est déplacé vers la formation d'éthanol et de NAD^+.

La réaction peut être déplacée dans l'autre sens, dans des conditions alcalines et en piégeant l'acétaldéhyde formé, suivant la 2ième étape réactionnelle :

$$\text{Acétaldéhyde} + NAD^+ + H2O \xrightarrow{Al\text{-}DH} \text{Acide acétique} + NADH,H^+$$

L'acétaldéhyde est quantitativement oxydé en présence de l'aldéhyde déshydrogénase (Al-DH).

La présence de $NADH,H^+$ est révélée par mesure d'absorbance à 340 nm.

Mode opératoire

	Blanc (mL)	Essai (mL)
Réactifs 2*	1,000	1,000
Eau redistribuée	0,033	-
Solution essai	-	0,033
Homogénéiser. Après approximativement **3 min**. lire l'absorbance (A_1) à 340 nm des solutions		
Réactifs 3**	0,017	0,017
Homogénéiser ; la réaction est complète, après approximativement **5 à 10 min**. Lire l'absorbance (A_2) à 340 nm des solutions, immédiatement les unes après les autres.		

Remarques

*Tampon diphosphate de potassium, pH approx. 9,0 ; NAD^+, approx. 4 mg ; ADH, approx. 0,8 U

** Al-DH, approx. 7000 U

Les réactifs sont portés à 20°C avant utilisation.

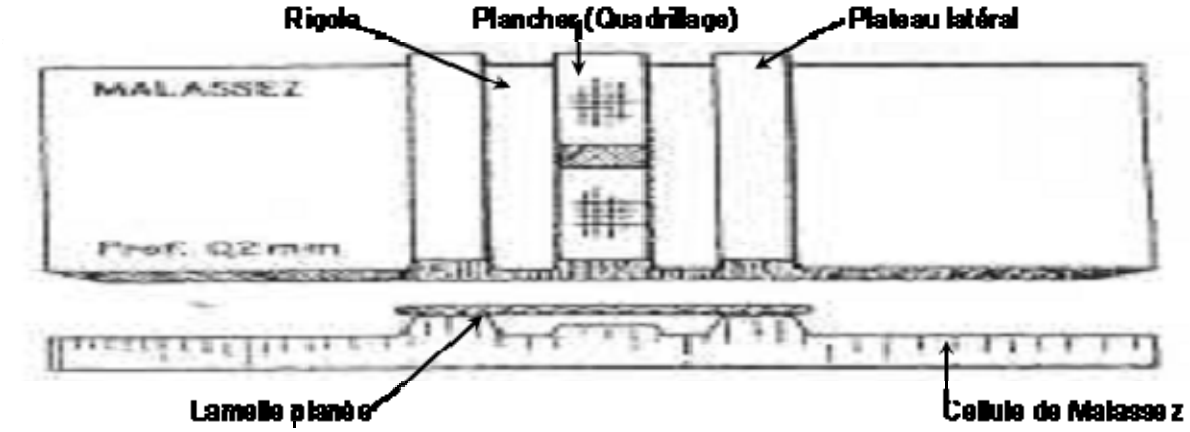
Longueur de la cuve : 1 cm

Volume réactionnel final : 1,05 mL

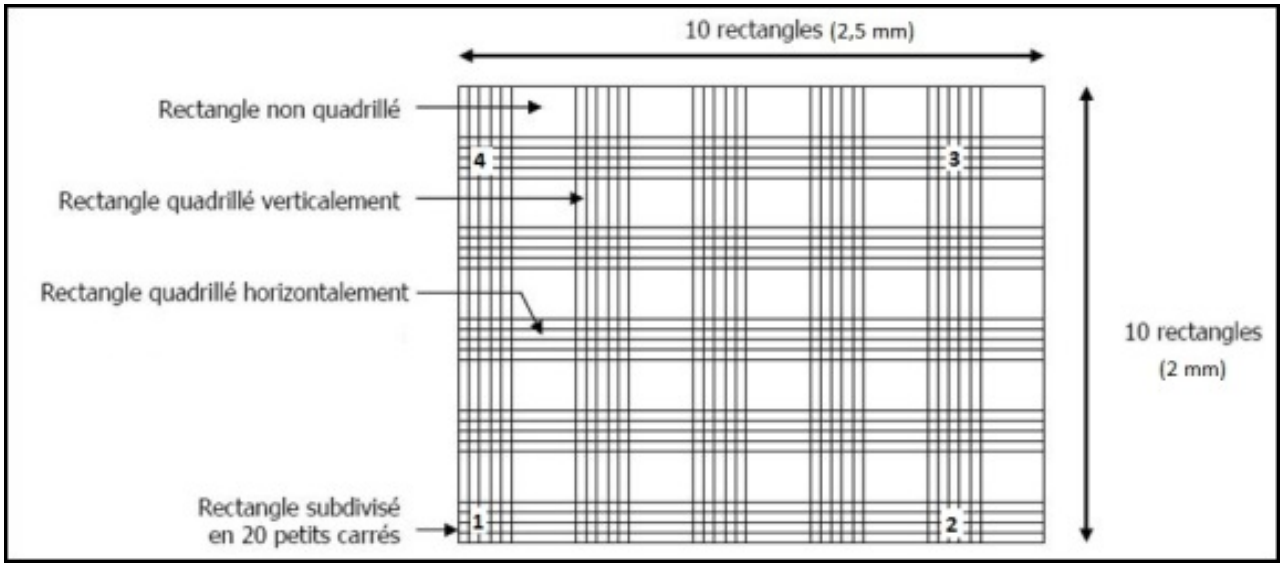
Les lectures du blanc et des essais se font contre l'air (sans cuve) ou contre l'eau

2. **<u>Atelier B :</u> Dénombrement des levures – Cellule de Malassez**

Présentation générale de la cellule de Malassez



L'hématimètre de Malassez



Pose de la lamelle

Poser la lamelle sur les plateaux en prenant soin de ne pas la graisser avec les doigts. Pour qu'elle s'adapte exactement sur les plateaux, passer un doigt légèrement humide à leur surface et appuyer fortement avec les pouces sur la lamelle tout en faisant légèrement glisser.

Remplissage de l'hématimètre

- Prélever la suspension de cellules avec une pipette, après l'avoir préalablement **homogénéisée correctement**. Amener la pointe de la pipette au bord de la lamelle (tenir la pipette et appuyer obliquement sur le plancher). L'espace compris sous la lamelle doit être totalement rempli avec le **liquide** et **ne doit pas déborder**.
- **Attendre 10 minutes** afin que les cellules sédimentent.

Observation au microscope

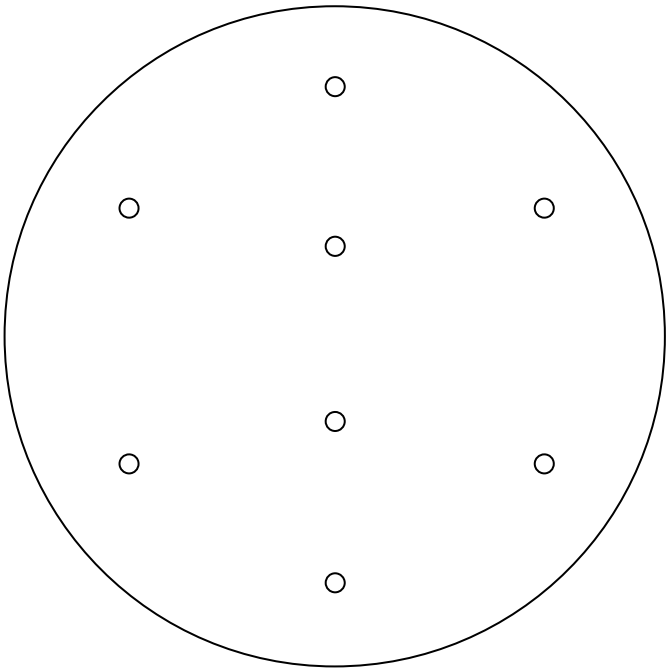
- Poser l'hématimètre sur la platine du microscope.
- **Vérifier** à l'objectif 10 **l'homogénéité de la répartition** dans le grand rectangle. Choisir un rectangle situé dans un coin extrême du quadrillage et observer à l'objectif 40.
- Compter toutes les cellules à l'intérieur du rectangle et celles situées sur deux côtés voisins. Compter de la même façon les cellules contenues dans les rectangles situées aux quatre coins du quadrillage.

3. <u>Atelier C :</u> Dénombrement en surface des levures - Méthode des spots sur gélose Sabouraud

Exemple de répartitions de 4 dilutions successives par méthode des spots

(2 essais par dilution)

Poser la boite à l'envers sur le canevas, est marqué d'une croix, chaque dépôt à effectuer, au dos de la boite.



Atelier D

Suivi de la population de levures – Méthode par turbidimétrie

Pour que l'absorbance à 650 nm reste proportionnelle à la concentration cellulaire, les mesures doivent s'effectuer dans la zone de validité de la loi Beer-Lambert.

$$\mathbf{A_{650nm} < 0,7\ U}$$

On peut donc établir une correspondance entre la valeur de A_{650nm} lue et le nombre de microorganismes réels présents dans le milieu de culture.

SEANCE N°2 : TRAITEMENT DES RESULTATS COLLECTES **(document fourni à chaque élève)**

Atelier A
Dosage d'éthanol
Méthode enzymatique

Déterminer les différences d'absorbance

(A_2-A_1) de l'essai et du blanc réactif. Sous-traire la différence d'absorbance du blanc de celle de l'essai :

$$\Delta A = (A_2-A_1)_{essai} - (A_2-A_1)_{blanc}$$

Cette différence d'absorbance devrait être au moins de 0,100 unités d'absorbance pour parvenir à des résultats suffisamment précis.

Déterminer la concentration en éthanol

Calcul de (Ethanol) = c, exprimée en ($g.L^{-1}$) :

$$c = \frac{(V.MG.\Delta A.F)}{(\varepsilon.d.v.2 \times 1000)}$$

avec

V = volume réactionnel final.

v = volume de la prise d'essai.

M = Masse molaire moléculaire de l'éthanol ; $M_{éthanol}$ = 46,07 $g.mol^{-1}$

d = trajet optique dans la cuve (cm).

ε = coefficient d'extinction de NADH à 340 nm ; ε = 6,3 ($L.mmol^{-1}.cm^{-1}$).

F = facteur de dilution au cours de la préparation de l'essai.

Compléter la grille ci-après, de l'ensemble des résultats du groupe.

Atelier B
Dénombrement direct des levures
en cellule de Malassez

Longueur d'un rectangle : mm
Largeur d'un rectangle : mm
Surface d'un rectangle : mm^2
Volume d'un parallélépipède rectangle : mm^3

Profondeur (hauteur lamelle - quadrillage) : 1/5 mm
Surface totale d'une chambre de comptage : mm^2
Volume total de la chambre de comptage : mm^3

Détermination de la concentration de la suspension cellulaire

- Déterminer le nombre total de cellules comptées dans les 4 rectangles unitaires.
- Rapporter le nombre de cellules au volume de la chambre de comptage (1 mm^3 soit 1 µL).
- Prendre en compte l'éventuel facteur de dilution de la suspension cellulaire initiale.
- Exprimer le résultat du nombre total de **levures. mL^{-1}**, en puissance de dix avec deux chiffres significatifs.

Détermination du % ou taux de viabilité cellulaire

- Indiquer le nombre de cellules mortes et de cellules totales comptées.
- En déduire le taux de viabilité (Tv) des levures :

$$Tv = N_1 \times 100 / N_T$$

Atelier C
Dénombrement en surface des levures
Méthode des spots sur gélose Sabouraud

Dénombrement de levures au cours de la fermentation

- Compter le nombre de colonies pour chaque dilution sur les boîtes, sachant qu'un nombre de 1 à 50 colonies par dépôt réalisé, peut être considéré comme exploitable.
- Préciser les dilutions retenues.
- En déduire les concentrations de levures obtenues :

$$N = \frac{n.F.F'}{V_i}$$

avec

N = concentration cellulaire.mL^{-1}.

n = nombre de colonies comptées.

Vi = volume de l'inoculum déposé sur la boite.

F = facteur de dilution dont on doit obligatoirement tenir compte lors des dilutions en série.

F' = facteur de dilution dont on doit éventuellement tenir compte lors de la préparation de l'inoculum.

Compléter la grille ci-après, de l'ensemble des résultats du groupe.

Atelier D
Suivi de population de levures
Méthode par turbidimétrie

L'absorbance à 650 nm est proportionnelle à la concentration cellulaire dans un certain intervalle de concentration.

La formulation de cette proportionnalité est ressemblante à la loi de Beer-Lambert s'appliquant aux milieux troubles :

$$A_{650\ nm} = k.c.d$$

$A_{650\ nm}$: absorbance mesurée à □ = 650 nm.

c, concentration cellulaire de la suspension.

d, trajet optique de la lumière dans la cuve.

k, coefficient de proportionnalité.

A partir des résultats de dénombrement obtenus en cellule de Malassez ou par la méthode des spots, établir une correspondance entre la valeur de l'absorbance à 650 nm et le nombre de microorganismes réellement présents par mL de milieu de culture initial.

Compléter la grille ci-après, de l'ensemble des résultats du groupe.

SEANCE N°2 : TRAITEMENT DES RESULTATS COLLECTES **(document fourni à chaque élève)**			
	N_1 = nombre de cellules vivantes. N_T = nombre de cellules totales. **Compléter la grille ci-après, de l'ensemble des résultats du groupe.**		
Expression des résultats			
Calcul de la concentration massique d'éthanol : **g d'éthanol.mL^{-1}** de milieu de initial	Calcul de la concentration cellulaire : **levures total.mL^{-1}** de milieu et le **% de viabilité**.	Calcul de la concentration cellulaire : **levures revivifiables.mL^{-1}** de milieu de culture.	Détermination de l'absorbance par mL de milieu de culture initial et détermination du logarithme népérien - **ln (A_{650nm})**

DOCUMENT A REMPLIR PAR GROUPE D'ELEVES (ET FOURNI A CHAQUE ELEVE D'UN MEME GROUPE)

Le même tableau sera utilisé pour chaque type de milieu : S, M20, M40, MB

SEANCE N°2 : MISE EN FORME DES DONNEES BRUTES ET DES RESULTATS – MILIEU																			
Prélèvement	Heure du prélèvement	Temps de culture	Volume prélevé	**Atelier A :** Dosage d'éthanol Méthode enzymatique						**Atelier B :** Dénombrement direct des levures en cellule de Malassez			**Atelier C :** Dénombrement en surface des levures Méthode des spots			**Atelier D :** Suivi de population de levures Méthode par turbidimétrie			
				$A_{340\,nm}$ 1 Blanc	$A_{340\,nm}$ 1 Essai	$A_{340\,nm}$ 2 Blanc	$A_{340\,nm}$ 2 Essai	$\Delta A_{340\,nm}$	C éthanol g.L^{-1}	Levures totales comptées dans 4 rectangles	Levures.mL^{-1}	Taux de viabilité	Dilutions à effectuer et déduites du	Dilutions retenues	Levures.mL^{-1}	Densité optique à λ = 650 nm	Dilution retenue	$DO_{650\,nm}$ réelle	Ln ($DO_{650\,nm}$)
P1																			
P2																			
P3																			
P4																			
Exemples de calcul				Calcul de $c_{éthanol}$ produit au cours de la culture :						Calcul du $N_{levures}$: Calcul du taux de viabilité			Calcul du $N_{levures}$:			Calcul de A_{650nm} réelle :			

DOCUMENT A REMPLIR PAR L'ENSEMBLE DE LA CLASSE (ET FOURNI A CHAQUE ELEVE)

SEANCES N°2 ET 3 : MISE EN FORME DES DONNEES BRUTES ET DES RESULTATS

SUIVI DE FERMENTATION DANS LES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE ETUDIES

Prélèvement	Temps de culture – Milieu S	Temps de culture – Milieu M20	Temps de culture – Milieu M40	Temps de culture – Milieu MB	**Atelier A** Dosage d'éthanol Méthode enzymatique				**Atelier B** Dénombrement direct des levures en cellule de Malassez				**Atelier C** Dénombrement en surface des levures Méthode des spots				**Atelier D** Suivi de population de levures Méthode par opacimétrie			
					C éthanol ($g.L^{-1}$)				Levures.mL^{-1} Taux de viabilité				Levures.mL^{-1}				Ln ($A_{650\ nm}$)			
					Milieux étudiés				Milieux étudiés				Milieux étudiés				Milieux étudiés			
					S	**M20**	**M40**	**MB**	**S**	**M20**	**M40**	**MB**	**S**	**M20**	**M40**	**MB**	**S**	**M20**	**M40**	**MB**
P1																				
P2																				
etc																				
Interprétations					Comparer la production de bioéthanol produit lors de la fermentation dans les différents milieux de culture :				Comparer l'évolution des taux de viabilité cellulaire obtenus au cours de la fermentation dans les différents milieux de culture :				Comparer l'accroissement de levures produites lors de la fermentation dans les différents milieux de culture et les résultats obtenus grâce aux deux dénombrements réalisés :				Comparer les résultats obtenus par turbidimétrie de ceux obtenus par dénombrement vrai, dans les différents milieux de culture :			

DOCUMENT FOURNI A CHAQUE ELEVE

SEANCE N°3 : REPRESENTATIONS ADAPTEES DES RESULTATS COLLECTES ET CONCLUSIONS

Atelier A	**Atelier B**	**Atelier C**	**Atelier D**
Dosage d'éthanol Méthode enzymatique	Dénombrement direct des levures en cellule de Malassez	Dénombrement en surface des levures Méthode des spots	Suivi de population de levures Méthode par opacimétrie

Objectifs

Saisir sous Excel v2010 (Système d'exploitation Windows 7) des données brutes, les calculs à effectuer à partir des coordonnées de cellules du classeur. Utiliser le tableur Excel permettant de refaire les calculs un grand nombre de fois sans retaper les formules, après avoir saisi ou acquis les données.

Démarches

- Ouvrir le logiciel Excel.
- Créer une feuille de calculs permettant de déterminer d'après les numérations effectuées en hématimètre de Malassez, la concentration cellulaire totale.
- Dans la cellule A1, saisir un titre général. On peut facilement fusionner plusieurs cellules : Sélectionner les cellules A1 à A6. Par un clic droit, suivre la commande **Format de cellule**. Dans l'onglet **Alignement**, cocher la puce **Fusionner les cellules**.
- Dans les cellules A3 à F3, entrer les intitulés dans l'ordre :
Prélèvement / Temps de culture / Cellules vivantes / Cellules totales / Taux de viabilité / Concentration cellulaire totale (levures.mL^{-1})
- Saisir les valeurs obtenues de numérations au cours des différents prélèvements et donc aux différents temps de culture de *Saccharomyces cerevisiae*.

Numération d'une suspension cellulaire					
Prélèvement	Temps de culture (min)	Cellules vivantes	Cellules totales	**Taux de viabilité (%)**	**Concentration cellulaire totale (levures.mL^{-1})**
1	240	170	182		
2	280	186	194		
3	320	197	233		
4	360	256	287		
	ZONE DE SAISIE			ZONE DE CALCUL	

- Ne rentrer qu'une formule de calcul (correspondant au Taux de viabilité) ; puis la recopier vers le bas, afin d'obtenir l'ensemble des résultats. Le principe est de rentrer non pas la valeur mais les coordonnées de la cellule nécessaires au calcul, le tableur se chargeant de la **copie incrémentée** : c'est à dire l'adaptation des coordonnées des cellules, lors de la translation de la formule, au moment de la copie.

Prélèvement	Temps de culture (min)	Cellules vivantes	Cellules totales	Taux de viabilité (%)
1	240	170	182	93
2	280	186	194	96

3	Prélèvement	Temps de culture (min)	Cellules vivantes	Cellules totales	Taux de viabilité (%)	Le numéro de ligne est incrémenté de 1, lors de la copie vers le bas
4	1	240	170	182	=C4*100/D4	
5	2	280	186	194	=C5*100/D5	

➢ **Retrouver la formule à incrémenter par copie pour déterminer la concentration totale en cellules.mL^{-1} de suspension de départ.**

DOCUMENT FOURNI A CHAQUE ELEVE

SEANCE N°3 : REPRESENTATIONS ADAPTEES DES RESULTATS COLLECTES ET CONCLUSIONS

Atelier A Dosage d'éthanol Méthode enzymatique	**Atelier B** Dénombrement direct des levures en cellule de Malassez	**Atelier C** Dénombrement en surface des levures Méthode des spots	**Atelier D** Suivi de population de levures Méthode par turbidimétrie

Objectifs

Saisir sous Excel v2010 (Système d'exploitation Windows7) des données brutes et réaliser des histogrammes.

Démarches

- Travailler sur une nouvelle feuille du logiciel Excel.
- Créer une feuille permettant de présenter et traiter les données brutes obtenues et calculées, lors du dénombrement, par la méthode des spots.
- Dans la cellule A1, saisir un titre général.
- Fusionner les cellules C3 à F3.
- Dans les cellules A3 à F3, entrer les intitulés dans l'ordre :

  Prélèvement / Temps de culture / Concentration cellulaire totale (levures.mL^{-1})

- Fusionner les cellules A3 et A4. Et fusionner les cellules B3 et B4.
- De C4 à F4, entrer les intitulés dans l'ordre :

  Milieu S / Milieu M20 / Milieu M40 / Milieu MB

- Saisir les valeurs de concentrations cellulaires obtenues au cours des dénombrements en surface et pour les différents milieux de culture étudiés. (**Atelier C**)

Dénombrement de levures

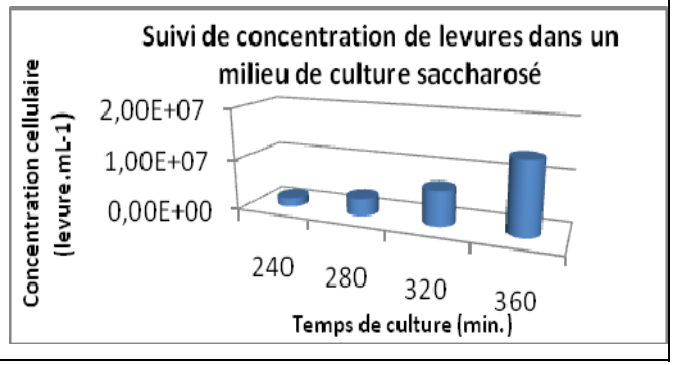
Prélèvement	Temps de culture (min)	Concentration cellulaire totale (levures.mL^{-1})			
		Milieu S	Milieu M20	Milieu M40	Milieu MB
1	240	$1,7.10^6$			
2	280	$3,4.10^6$			
3	320	$6,8.10^6$			
4	360	$1,4.10^7$			

ZONE DE SAISIE

- Sélectionner les plages de données qui doivent être exploitées.

(la 1ère colonne sélectionnée correspond à l'axe des abscisses, la 2ème à l'axe des ordonnées).

- Activer l'outil graphique : Choisir le type de graphiques "Histogramme 3D".
- Préciser les titres (du graphique, de chaque axe, de chaque série de données).
- Réaliser les histogrammes pour chacun des milieux étudiés. Insérer les graphiques sur la feuille de calcul.



En saisissant les données brutes et calculées de l'exemple, on obtiendrait ce type d'histogramme :

- D'après vos illustrations, en déduire le milieu permettant une croissance optimale de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Expliquer les différences observées entre les différents milieux de culture.

DOCUMENT FOURNI A CHAQUE ELEVE

SEANCE N°3 : REPRESENTATIONS ADAPTEES DES RESULTATS COLLECTES ET CONCLUSIONS

Atelier A : Dosage d'éthanol Méthode enzymatique	**Atelier B :** Dénombrement direct des levures en cellule de Malassez	**Atelier C :** Dénombrement en surface des levures Méthode des spots	**Atelier D :** Suivi de population de levures - Méthode par opacimétrie

Objectifs

Saisir sous Excel v2010 (Système d'exploitation Windows7) des données brutes, les calculs à effectuer à partir des coordonnées de cellules du classeur, des graphes illustrant à la fois, le suivi de la production en éthanol dans différents milieux de culture et le suivi d'une population de levure.

Démarches

- Travailler sur une nouvelle feuille du logiciel Excel.
- Créer une feuille permettant de présenter et traiter les données brutes obtenues et les données calculées, lors du suivi de la biomasse par détermination de l'absorbance et lors du suivi de la production d'éthanol.

- Dans la cellule A1, saisir un titre général.
- Fusionner les cellules B3 à E3. Et fusionner les cellules F3 et G3.
- Dans les cellules A3 à G3, entrer les intitulés dans l'ordre :
  Temps de culture / Concentration en éthanol ($g.L^{-1}$) / Biomasse
- Fusionner les cellules A3 et A4.
- De B4 à G4, entrer les intitulés dans l'ordre :
  Milieu S / Milieu M20 / Milieu M40 / $A_{650\ nm}$ / Ln ($A_{650\ nm}$)

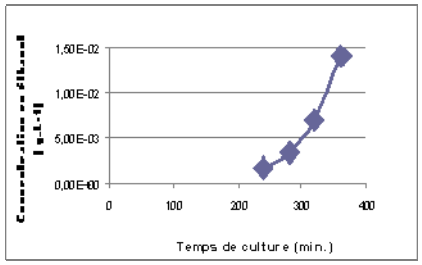
- Saisir les valeurs de concentrations d'éthanol au cours des dosages enzymatiques et pour les différents milieux de culture étudiés (**Atelier A**) ainsi que les valeurs d'absorbance (**Atelier D**).

Suivi de la production d'éthanol et de la biomasse en fonction du temps de culture

Temps de culture (min)	Concentration en éthanol ($g.L^{-1}$)				Biomasse	
	Milieu S	Milieu M20	Milieu M40	Milieu MB	A_{650nm}	Ln (A_{650nm})
240	$1,7.10^6$					
280	$3,4.10^6$					
320	$6,8.10^6$					
360	$1,4.10^7$					

ZONE DE SAISIE — CALCUL

- Rentrer en G5 une formule de calcul (correspondant à Ln Abs) ; puis la recopier vers le bas, afin d'obtenir l'ensemble des résultats.
- Sélectionner les plages de données qui doivent être exploitées.
  (la 1ère colonne sélectionnée correspond à l'axe des abscisses, la 2ème à l'axe des ordonnées)
- Activer l'outil graphique : Choisir le type de graphiques "Nuage de points avec courbe lissée".
- Préciser les titres (du graphique, de chaque axe, de chaque série de données).
- Réaliser un 2ème graphe de la fonction Ln ($A_{650\ nm}$) = f (Temps de culture). Insérer les graphiques sur la feuille de calcul.



En saisissant les données brutes et calculées de l'exemple, on obtiendrait le type de graphe ci-contre :

- D'après les graphes, en déduire le milieu favorisant la production d'éthanol au cours de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae*.
- Expliquer les différences observées lors du suivi de la biomasse en fonction du temps dans les divers milieux de culture.

Fiche de présentation de la séance n°3

CONTENUS	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ENSEIGNANT	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ELEVE
Exploitation des résultats	Donne des consignes et des conseils.	• Reporte les valeurs d'absorbance, de numérations et les dosages effectués dans un tableau. • Représente graphiquement les différents paramètres du suivi de croissance à l'aide de l'outil informatique. • Calcule les concentrations en éthanol dans chaque essai et conclut.
Bilan : • **La production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur la mélasse de betterave sucrière est d'autant plus importante que le milieu de culture contient du saccharose pur.** • **Les substances non glucidiques présentes dans la mélasse semblent perturber la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevesiae*.**		

Fiche de présentation de la séance n°4 : Mise en évidence de la présence du gène d'intérêt dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae*

CONTENUS	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ENSEIGNANT	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ELEVE
Introduction	• Oriente la discussion : **Comment augmenter le rendement de production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* sans apporter de traitements à la mélasse, ce qui ne serait pas intéressant économiquement ?**	• Discussion et recherche d'idées.
<u>Mise en commun des propositions retenues :</u> **Utiliser des levures, *Saccharomyces cerevisiae*, transformées génétiquement pour qu'elles puissent supporter de fortes teneurs en substances non glucidiques.**		
Présentation de la situation : **Des levures ont été modifiées génétiquement par insertion d'un gène leur permettant de produire correctement de l'éthanol en présence des fortes teneurs en substances non glucidiques, présentes dans la mélasse.** **Le but est de vérifier la présence de ce gène.** • Présentation de la démarche : • amplification du gène d'intérêt par PCR ; • vérification par électrophorèse.	• Cible l'attention des élèves. • Présente le génome de la levure modifiée.	• Écoute. • Pose des questions.
Distribution et lecture du protocole du AT n°2	• Présente le protocole.	• Lit le protocole.

CONTENUS	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ENSEIGNANT	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ELEVE
	• Donne des consignes et des conseils.	• Ecoute et pose des questions.
Manipulation : Amplification du gène d'intérêt par PCR	• Demande à un élève de faire une démonstration de pipetage de microvolumes. • Contrôle. • Met en route le thermocycleur.	• Réalise le mélange réactionnel pour la PCR • Dépose le micro-tube PCR dans le thermocycleur.
Présentation du principe de la PCR (pendant l'amplification)	• Expose le principe de la PCR.	• Écoute. • Complète un document sur le principe de la PCR.
Manipulation : électrophorèse des produits de PCR	• Arrête le thermocycleur. • Fait une démonstration de dépôt sur gel. • Surveille le dépôt et donne des conseils. • Met en route l'électrophorèse. • Arrête l'électrophorèse. • Prend la photo du gel.	• Récupère le micro-tube PCR à la fin de l'amplification. • Prépare le micro-tube pour l'électrophorèse • Dépose sur le gel.

AT n°2 : Mise en évidence de la présence du gène d'intérêt dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae*

Une solution d'ADN est préparée à partir d'une souche de levures *Saccharomyces cerevisiae* modifiée génétiquement pour qu'elle surexprime l'alcool-déshydrogénase ; ainsi les levures supportent de fortes teneurs en substances non glucidiques et peuvent utiliser la mélasse comme milieu de culture pour produire le bioéthanol.

L'étude consiste en la vérification de l'insertion du gène d'intérêt dans le génome de la levure.

Pour cela, il faut réaliser :

- dans un premier temps, l'amplification du gène d'intérêt par PCR ;
- dans un deuxième temps, l'analyse du produit de l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose.

1. Compétences :

« Je suis capable... » :

- ***de restituer le principe de la PCR et identifier le rôle des différentes molécules impliquées.***
- ***de mettre en œuvre une amplification d'un fragment d'ADN.***
- ***de déposer l'échantillon d'ADN sur gel d'agarose.***
- ***de respecter les consignes de sécurité lors de la manipulation de produits biologiques.***
- ***d'identifier les dangers liés au BET et mettre en œuvre les équipements de protection individuelle et collectifs adéquats.***
- ***d'exploiter un électrophorégramme.***
- ***de gérer les déchets biologiques.***

2. Matériel et réactifs

2.1 Matériel

- micropipettes (0,5-10 / 10-100 / 100-1000) + cônes stériles
- 1 chronomètre
- 1 microtube de 0,2 mL stérile « spécial PCR »
- 1 microtube de 0,5 mL stérile

2.2 Réactifs

- 100 µL d'eau désionisée
- 3 µL de Taq polymérase à 0,5 U/µL, noté « Taq »
- 3 µL de tampon de travail pour la Taq 10x concentré, noté « Tampon Taq »
- 2 µL de MgCl2 à 25 mmol.L-1, noté « MgCl2 »
- 3 µL d'amorce 5' à 5 µmol.L-1, noté « amorce 5' » (amorce du brin sens)
- 3 µL d'amorce 3' à 5 µmol.L-1, noté « amorce 3' » (amorce du brin antisens)
- 3 µL de dNTPs à 2,5 mmol.L-1, noté « dNTP »
- 15 µL d'ADN de Saccharomyces cerevisiae modifié à 0,2 ng/µL, noté « ADN matrice »
- marqueur de taille
- tampon de charge 6x concentré

3. Mode opératoire

3.1 Préparation du mélange réactionnel

Tous les réactifs doivent être placés dans la glace ainsi que le microtube contenant le mélange réactionnel.

Introduire dans un microtube spécial PCR tous les réactifs ci-dessous et dans l'ordre :

- 2 µL d'eau désionisée stérile
- 2,5 µL de tampon d'amplification Taq 10X concentré
- 1,5 µµL de MgCl2 à 25 mmol.L-1
- 2 µL de dNTPs à 2,5 mmol.L-1
- 2,5 µL de l'amorce 5' à 5 µmol.L-1
- 2,5 µL de l'amorce 3' à 5 µmol.L-1
- 2 µL de Taq polymérase à 0,5 U/µL
- 10 µL de l'ADN matrice à 0,2 ng/µL

3.2 Amplification du gène d'intérêt inséré dans le génome de Saccharomyces cerevisiae

Introduire le tube dans le thermocycleur en prenant soin de noter la position de votre tube sur la feuille de gestion.

Les caractéristiques de l'amplification sont les suivantes :

- cycle d'entrée : 5 min. à 94°C,
- 30 cycles de 3 min. (1 min. à 94°C ; 1 min. à 50°C ; 1 min. à 72°C),
- cycle de sortie : 5 min. à 72°C.

3.3 Contrôle de la présence du gène d'intérêt

Le contrôle de la présence du gène d'intérêt est réalisé par une analyse électrophorétique sur gel d'agarose.

Dans un microtube, introduire :

- 25 µL de l'amplifiat,
- 5 µL de tampon de charge 6X concentré.

Déposer 10 µL de la solution préparée ci-dessous dans un gel d'agarose à 1,5 %.

4. Exploitation des résultats

4.1 Annoter l'électrophorégramme obtenu :

- placer l'anode (pôle +) et la cathode (pôle -) ;
- flécher le sens de migration ;
- placer la ligne de dépôts ;
- identifier les puits avec les marqueurs de taille et avec l'amplifiât.

4.2 À partir de l'électrophorégramme obtenu, conclure quant à la présence ou non du gène d'intérêt dans le génome de Saccharomyces cerevisiae.

4.3 Estimer la taille de la bande à l'aide des marqueurs de taille. Pour cela tracer, à l'aide de l'outil informatique, le graphique représentant le Log de la masse moléculaire de chaque marqueur de taille en fonction de la distance de migration de chacun des marqueurs de taille.

4.4 Conclure.

5. TP n°2 : Mise en évidence de la présence du gène d'intérêt dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae*

Matière d'oeuvre

MATERIEL PAR ELEVE	REACTIFS PAR ELEVE
Micropipettes (0.5-10 / 10-100 / 100-1000) + cônes stériles	1 microtube contenant 100 µL d'eau distillée stérile
1 micro-tube de 0,2 mL stérile « spécial PCR + portoir	1 micro-tube contenant 3 µL de Taq polymérase à 0,5 U/µL noté « Taq »
1 micro-tube de 0,5 mL stérile	1 micro-tube contenant 3 µL de tampon de travail pour la Taq 10x concentré, noté « Tp Taq »
1 chronomètre	1 microtube contenant 2 µL de $MgCl_2$ à 25 mmol.L^{-1} noté « $MgCl_2$ »
Gels d'agarose à 1.5% avec Bromure d'éthydium (BET)	1 micro-tube contenant 3 µL d'amorce 5' à 5 µmol.L^{-1} noté « amorce 5' » **amorce 5' (amorce du brin sens) :** **5' GGG ATT CAG TAA CAT TCA CG 3'**
1 bac à glace	1 micro-tube contenant 3 µL d'amorce 3' à 5 µmol.L^{-1} noté « amorce 3' » **amorce 3' (amorce du brin antisens)** **5' TGC TGG TAT CTA TGA CAA GG 3'**
2 gels d'agarose à 1,5% avec GelRed.	1 micro-tube contenant 3 µL de dNTPs à 2,5 mmol.L^{-1} noté « dNTP »
	1 micro-tube contenant 15 µL d'ADN de *Saccharomyces cerevisiae* modifié à 0,2 ng/µL noté « ADN matrice »

Réactifs communs : Par salle

- Marqueur de taille : 100bpDNA Ladder.
- Tampon de charge 6X concentré (2 microtubes).

Annexe :

PRINCIPE DE LA PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique d'amplification en chaîne d'acides nucléiques par polymérisation. Elle a été mise au point en 1985, par Karry MULLIS (prix Nobel en 1993).

La PCR a représenté un progrès méthodologique décisif. De ce fait, elle a conquis une place prépondérante en biologie moléculaire.

La PCR permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de le multiplier rapidement.

1. Les différentes molécules impliquées au cours de la PCR

MOLECULES	ROLES
ADN matrice double brin	Contient le fragment à amplifier.
Amorces sens et anti-sens (20 nucléotides environ)	S'hybrident de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.
Enzyme : Taq polymérase (enzyme thermorésistante)	Permet la polymérisation de chacun des brins de l'ADN.
Nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates)	Éléments de base utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins complémentaires.

2. Les différentes étapes de la PCR

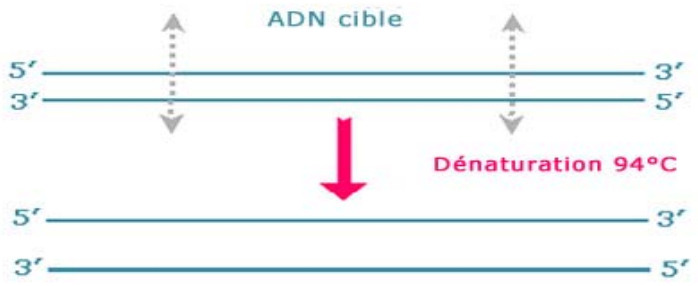
Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

- une dénaturation,
- une hybridation,
- une élongation.

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.

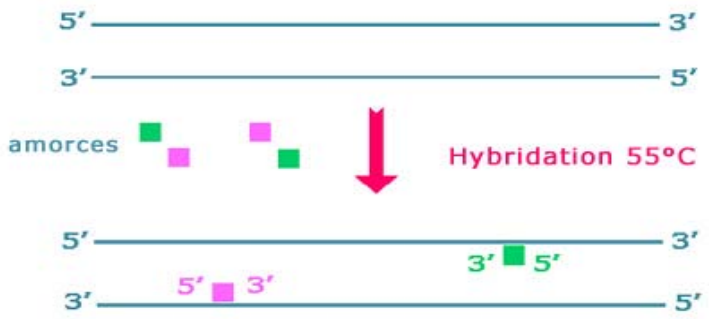
2.1. La dénaturation

La dénaturation consiste à séparer les 2 brins de l'ADN par chauffage quelques secondes à 94°C. La double hélice de l'ADN est ainsi ouverte.



2.2. L'hybridation

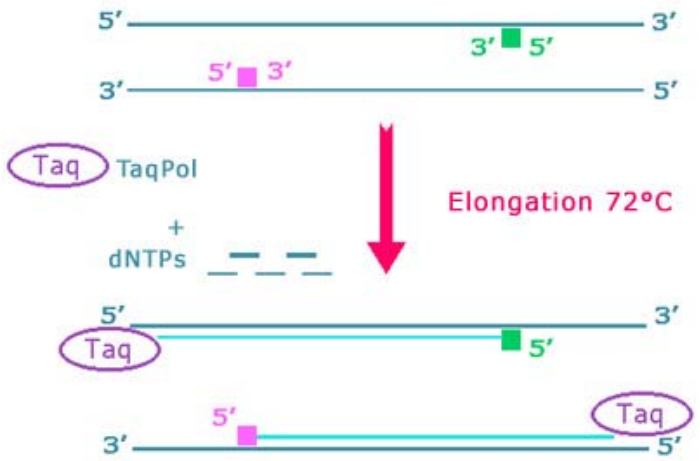
La température est rapidement abaissée à 55°C, afin que les amorces « reconnaissent » leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles et puissent s'hybrider chacune sur leur brin respectif. Cette étape dure une minute afin de laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement. L'ADN total étant plus long, n'aura pas le temps de s'hybrider à nouveau.



2.3. L'élongation

La température du tube est ensuite augmentée à 72°C, ce qui permet à la Taq Polymérase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5' vers 3'. Les nucléotides ne sont pas incorporés de façon aléatoire mais en fonction de la séquence cible (nucléotide complémentaire). Cette étape dure 1 minute.

Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible, vient d'être synthétisé.



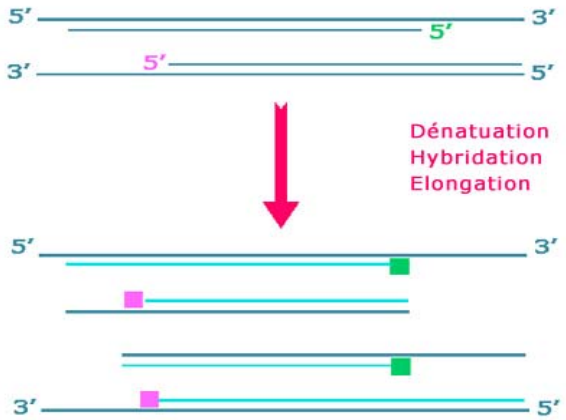
3. Résultats obtenus à la fin de chaque cycle d'amplification

3.1. Le premier cycle

Il a permis de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube. Ils deviennent à leur tour des ADN cibles.

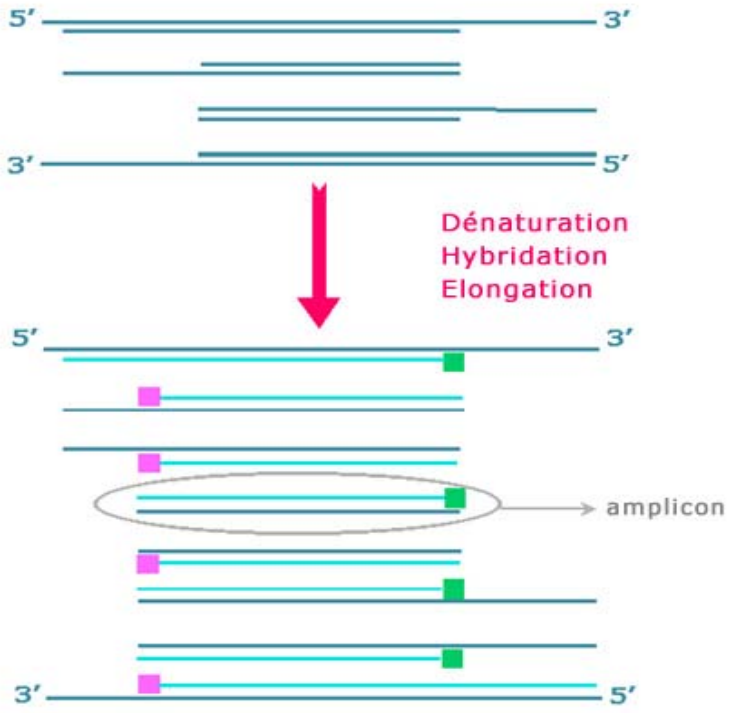
3.2. Le deuxième cycle

La quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins, dont la taille est limitée par les deux amorces, font leur apparition.



3.3. Le troisième cycle

Les premiers amplicons apparaissent. Les amplicons sont des molécules d'ADN double-brin bornées par les amorces, correspondants au fragment d'ADN recherché. La taille des fragments varie généralement de 50 paires de bases (pb) à 2 kilobases (kb).



Au fil des cycles la quantité d'amplicons va augmenter de façon exponentielle. On obtient, en théorie 2n copies pour n cycles. Dans la pratique, pour un rendement classique de 85 %, une PCR de 30 cycles produit environ 10^6 copies (amplicons de taille attendue).

4. Visualisation des produits d'amplification

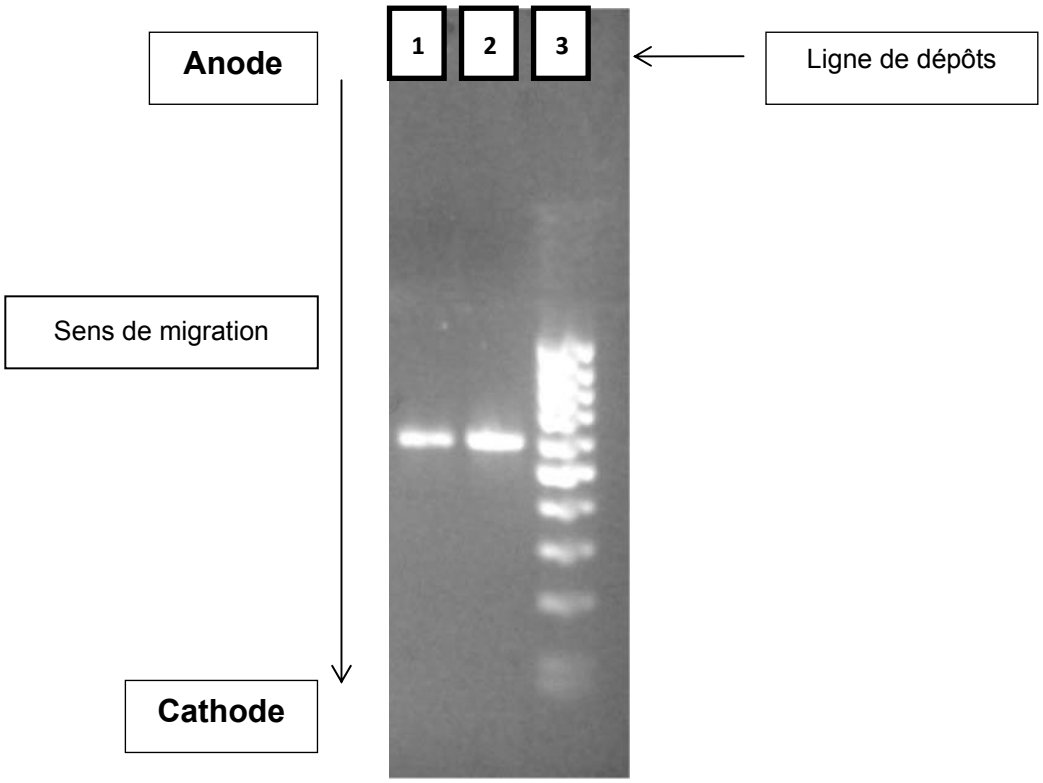
Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose additionné de bromure d'éthidium (BET), ou de GelRed, ou de SybrGreen.

Les acides nucléiques vont ainsi migré au travers du gel, en fonction de leur masse moléculaire, donc du nombre de bases de l'ADN testé. La vitesse est inversement proportionnelle à leur masse moléculaire donc du nombre de nucléotides présents.

Le BET est un produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques. Lorsqu'elle est intercalée, cette molécule présente une fluorescence orange sous illumination par des UV.

La présence et la taille des amplicons pourront être vérifiées sur un électrophorégramme, tel que celui-ci-après :

1. Amplicon élève 1.
2. Amplicon élève 2.
3. Marqueur de tailles (fragments d'ADN ayant un nombre de paires de bases connu).



Grâce au marqueur de tailles, la taille des amplicons visualisés peut être déterminée graphiquement, à partir du graphique représentant le log du nombre de paires de base de chaque marqueur de taille en fonction de la distance de migration de chaque marqueur de taille.

6. Fiche de présentation de la séance n°5 : AT n°2 : Mise en évidence de la présence du gène d'intérêt dans le génome de Saccharomyces cer evisiae

CONTENUS	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ENSEIGNANT	ACTIVITES PRINCIPALES DE L'ELEVE
Exploitation des résultats + Rédaction du compte-rendu	• Conseille. • Répond aux questions éventuelles.	• Rédige le compte-rendu. • Analyse l'électrophorégramme sur photo et détermine la taille de l'amplifiât obtenu en utilisant l'outil informatique. • Conclut sur la présence ou non du gène d'intérêt.
Bilan et Perspectives	• Oriente la discussion pour élargir sur des perspectives : ◦ comment vérifier l'efficacité du gène d'intérêt ? ◦ existe-t-il d'autres biocarburants que le bioéthanol ? ◦ les biocarburants sont-ils une solution d'avenir ?	• Recherche d'idées en utilisant les TIC.
OUVERTURE : **Les biocarburants obtenus à partir de la biomasse constituent-ils une énergie renouvelable ?**		