

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOTECHNOLOGIE

Durée : 4 H 00

Coef. : 6

Session 2004

Calculatrices non autorisées.

ÉPREUVE : SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GÉNIE BIOLOGIQUE

LE PRION

Le prion est considéré comme l'agent responsable des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) chez les animaux et l'homme.

Ce sont des maladies qui entraînent une dégénérescence du système nerveux (maladies neuro-dégénératives), à incubation lente, dont le mode de transmission et l'agent infectieux sont mal définis.

L'étude des caractéristiques structurales et fonctionnelles du prion devrait permettre la mise au point de tests de diagnostic ainsi que la découverte de traitements thérapeutiques.

1. Le prion : un agent infectieux initialement assimilé à un virus (24 points)

L'encéphalopathie spongiforme bovine (maladie de la vache folle, ESB) et la maladie de Creutzfeld-Jacob font partie des ESST.

Certains auteurs préfèrent encore employer le terme d'agent transmissible non conventionnel, plutôt que prion, pour définir les agents infectieux responsables de ces maladies.

En effet, leur nature étant mal connue au départ, le prion a longtemps été assimilé à un virus.

- 1.1. Donner la définition d'un virus.
- 1.2. Citer les critères à la base de la classification structurale des virus.
- 1.3. L'hypothèse d'une analogie entre prion et virus de la poliomyélite a pu être formulée à un moment donné car ce virus peut atteindre les neurones de la moelle épinière.
Le virus de la poliomyélite est un virus non enveloppé, de symétrie icosaédrique, à ARN monocaténaire de polarité positive.
 - 1.3.1. Proposer un schéma annoté de l'architecture de cette particule virale.
 - 1.3.2. Donner la définition d'un ARN (+).
 - 1.3.3. Schématiser les étapes du cycle de multiplication d'un virus à ARN (+) dans une cellule.
 - 1.3.4. Quelle différence y-a-t-il entre un cycle de virus à ARN (-) et un cycle de virus à ARN (+) ?

2. Étude de la structure du prion (38 points)

Afin d'isoler l'agent responsable des encéphalopathies spongiformes transmissibles, des expériences ont été réalisées chez des mammifères. A partir du broyat d'un cerveau de hamster présentant des signes cliniques d'infection, des fractions ont été inoculées à des cerveaux de souris. Une fraction infectieuse hautement purifiée (10^6 DL₅₀/mL) conserve son pouvoir pathogène après différents traitements : protéinase K, rayons UV et γ , ultrasons, urée, méthanal, nucléases.

2.1.

2.1.1 Donner la définition de la classe d'enzyme à laquelle appartiennent la protéinase K et les nucléases.

2.1.2 Préciser la réaction catalysée par la protéinase K.

2.1.3 Rappeler le principe de la classification internationale des enzymes.

2.2. En 1985, après traitement de la fraction infectieuse par la protéinase K, Prusiner a mis en évidence une protéine de masse moléculaire évaluée à 27-30 kDa. Il baptise cette protéine PrP pour « **P**roteinaceous infectious **P**articles » (ou **P**rotéine du **P**rion).

2.2.1 Donner la masse molaire de la protéine PrP. Justifier.

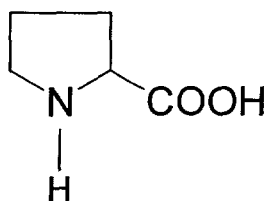
2.2.2 La masse moléculaire des protéines a été évaluée par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide. Donner le principe général de cette électrophorèse. Préciser la nature chimique et le rôle du réactif dénaturant.

La protéine PrP isolée de cerveaux sains est nommée PrP^c et celle de cerveaux infectés PrP^{sc}. Le séquençage des deux types de PrP donne des résultats identiques. Leur structure tridimensionnelle est donnée en document annexe.

2.3 L'étude de la structure primaire montre l'existence d'un peptide signal, d'une région riche en glycine et proline, d'un ancrage GPI (GlycoPhosphatidylInositol), d'hélices transmembranaires et amphiphiles et d'une partie hydrophobe éliminée.

2.3.1 Écrire la formule semi-développée du dipeptide glycyl-proline.

Donnée : formule de la proline



2.3.2 Définir les quatre niveaux de structure d'une protéine en précisant la nature des liaisons mises en jeu à chaque niveau d'organisation.

2.3.3 Donner la définition d'un peptide signal. Expliquer son rôle.

- 2.3.4. Indiquer la propriété caractéristique des acides aminés présents dans un segment transmembranaire. Citer deux exemples d'acides aminés possédant cette caractéristique.

L'hypothèse actuelle sur le mécanisme de la maladie causée par le prion est la suivante : la présence d'une PrP^{sc} serait responsable d'un mauvais repliement des PrP saines au niveau de leur structure secondaire et de leur conformation tridimensionnelle. Les PrP synthétisées en présence de PrP^{sc} seraient donc anormales et leur accumulation entraînerait des troubles neurologiques.

- 2.4.1 Identifier les structures A, B, C du document **annexe** et reporter leur nom sur la copie.
- 2.4.2. Comparer les deux structures protéiques de l'annexe.
- 2.4.3. Donner le nom des protéines intervenant lors du repliement des protéines naissantes et responsables de la structure spatiale de ces molécules.

3. Étude génétique du prion (33 points)

Afin d'isoler le gène codant la PrP, une démarche partant de l'ADNc de la PrP a été suivie en 1985, incluant la création d'une banque d'ADNc et le criblage de cette banque par une sonde PrP obtenue par synthèse chimique.

3.1.

- 3.1.1. Définir précisément le terme ADNc.
- 3.1.2. Citer les différentes étapes de la création de la banque d'ADNc.
- 3.1.3. Présenter à l'aide d'un schéma commenté une technique de synthèse de l'ADNc, en faisant ressortir les étapes indispensables et communes à toutes les techniques.
- 3.1.4. A l'ADNc sont ensuite ajoutés des adaptateurs (linkers) de jonction. Préciser le principe et l'intérêt de cette addition.

3.2 La conception de la sonde repose sur la connaissance d'une partie N terminale de la séquence en acides aminés de la PrP.

- 3.2.1 Nommer et résumer le principe général d'une méthode de séquençage d'un peptide.
- 3.2.2 Indiquer les étapes aboutissant à l'obtention de la sonde PrP.
- 3.2.3 La sonde PrP est dite « dégénérée ». Pourquoi ce qualificatif ?

3.3. Le gène codant la PrP est un gène cellulaire ubiquitaire présent sur le chromosome 2 de la souris. Il est noté *Prn-p*. Il possède un intron de 10 kb. Le cadre de lecture ouvert est situé sur le second exon.

- 3.3.1 Donner la définition d'un exon et d'un intron.
Schématiser la structure d'un gène eucaryote en faisant ressortir les différents éléments nécessaires à son fonctionnement.
- 3.3.2. Que signifie l'expression « cadre de lecture ouvert » ?

4. Tests de détection du prion (25 points)

Les tests immunologiques de détection d'une encéphalopathie spongiforme transmissible utilisent des anticorps monoclonaux ou non, dirigés contre la protéine PrP.

4.1 La sensibilité est un des critères de qualité d'une méthode de détection :

- la définir,
- citer et définir deux autres critères de qualité.

4.2 Présenter, en les justifiant, toutes les étapes de la production d'anticorps monoclonaux.

4.3 Plusieurs tests immunologiques sont basés sur la différence de comportement entre la protéine PrP^c et PrP^{sc} vis-à-vis de la protéinase K. L'enzyme provoque une hydrolyse complète de la PrP^c et une protéolyse partielle de la PrP^{sc} engendrant la protéine isolée par Prusiner : PrP₂₇₋₃₀.

Un anticorps anti PrP reconnaît la PrP₂₇₋₃₀.

La fixation de cet anticorps sur l'échantillon digéré par la protéinase K indique la présence de la forme anormale PrP^{sc} dans l'échantillon analysé.

La mise en évidence du prion dans un extrait cérébral peut être réalisée par Western blot. Donner (éventuellement à l'aide de schémas) toutes les étapes de cette recherche à partir de l'extrait cérébral. Envisager les résultats possibles.

ANNEXE

