

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 6

*SCIENCES BIOLOGIQUES
FONDAMENTALES ET
GÉNIE BIOLOGIQUE*

Le sujet comporte 6 pages numérotées de 1/6 à 6/6

Quelques apports des biotechnologies dans la lutte contre les infections virales et bactériennes.

De nombreux traitements « classiques » contre les infections sont efficaces, mais certains peuvent présenter des inconvénients : troubles liés à l'intolérance au médicament, efficacité limitée des vaccins contre les agents pathogènes intracellulaires, apparition de souches résistantes par mutation de l'agent pathogène...

Les biotechnologies permettent l'élaboration de nouvelles méthodes de lutte anti-virale et anti-microbienne : nouvelles molécules thérapeutiques, vaccins modernes...

1. Un nouveau traitement contre la grippe (32 points)

1.1. Le virus de la grippe.

Le virus de la grippe est un virus à ARN de polarité négative et fragmenté en 8 molécules entourées chacune d'une capsidie à symétrie hélicoïdale. L'ensemble forme une particule sphérique, entourée d'une enveloppe comportant des molécules d'hémagglutinine et de neuraminidase.

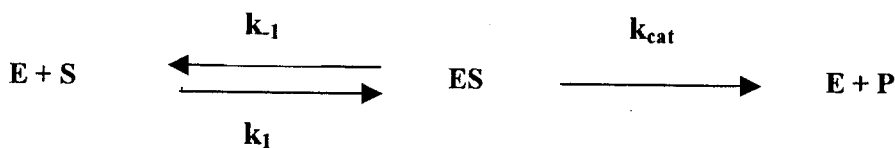
Ce virus présente une haute variabilité génétique : de nouvelles souches, mutantes, apparaissent chaque année, rendant généralement caduc le vaccin élaboré l'année précédente.

- 1.1.1. Donner la définition des virus.
- 1.1.2. Faire le schéma légendé du virus de la grippe.
- 1.1.3. Rappeler les critères de la classification des virus.
- 1.1.4. Décrire succinctement les différentes étapes du cycle de multiplication d'un virus à ARN de polarité négative.

1.2. Les enzymes, cibles des médicaments antiviraux.

L'industrie pharmaceutique teste actuellement plusieurs molécules obtenues par synthèse chimique. Le zanamivir, par exemple, se fixe sur le site actif de la neuraminidase et inhibe l'activité de cette enzyme en modifiant la valeur de K_M .

On peut décrire le processus enzymatique par 2 étapes successives :



- 1.2.1. Briggs et Haldane ont proposé l'hypothèse de l'état stationnaire. Préciser cette hypothèse.
- 1.2.2. Dans cette hypothèse, montrer que :

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_M} \quad \text{avec} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_{\text{cat}}}{k_1}$$

- 1.2.3. Donner l'équation de Michaelis et Menten, en rappelant la définition des paramètres cinétiques.
- 1.2.4. Montrer graphiquement que cette équation permet de déterminer la valeur de K_M . Préciser son unité.
- 1.2.5. À quel type d'inhibiteur appartient le zanamivir ? Expliquer.

2. Les antibiotiques dans la lutte antibactérienne (26 points)

2.1. Production des antibiotiques.

La sélection de nouvelles souches sécrétrices de bêta-lactamines et la production de celles-ci par hémisynthèse ont permis d'améliorer considérablement leur stabilité biochimique et leurs propriétés pharmacologiques, tout en diminuant leurs effets secondaires.

2.1.1. Citer deux genres microbiens producteurs d'antibiotiques.
Préciser à quels groupes d'êtres vivants ils appartiennent.

2.1.2. Écrire la structure de base d'une bêta-lactamine.
Qu'appelle-t-on hémisynthèse ?

2.1.3. À quel type de métabolites appartiennent généralement les antibiotiques ? Justifier.

Représenter sur un même graphe l'allure générale des courbes de croissance de la souche et de production de l'antibiotique.

2.1.4. Sachant qu'une souche productrice est aérobic stricte, faire le schéma légendé d'un bioréacteur industriel « STR » (Stirred Tank Reactor) en indiquant les dispositifs d'agitation et d'aération.

2.2. Sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques.

Les mécanismes d'acquisition de résistance sont différents selon les souches et selon les antibiotiques. On peut citer :

- le rejet de l'antibiotique par un mécanisme nommé « efflux ».
- une modification, après mutation, de la cible de l'antibiotique empêchant ainsi sa fixation,
- l'imperméabilité des enveloppes bactériennes.

2.2.1. Quel est le quatrième mécanisme possible ? Illustrer la réponse dans le cas d'une bêta-lactamine.

2.2.2. Indiquer les caractéristiques du transport correspondant à l'efflux d'un antibiotique.

2.2.3. Préciser le mode d'action d'une bêta-lactamine.

3. Évolution des vaccins : vaccins génétiques (33 points)

3.1. Les différents types de vaccins

La vaccination est un élément fondamental de la lutte contre les agents infectieux.

Les vaccins classiques sont utilisés parfois depuis plus d'un siècle mais on s'efforce actuellement de préparer de nouveaux vaccins.

3.1.1. Définir les différentes catégories de vaccins classiques et donner, pour chacune d'elles, un exemple.

3.1.2. Citer quatre améliorations recherchées dans la mise au point des vaccins modernes.

3.1.3. Décrire trois exemples de stratégies utilisées pour l'élaboration de ces nouveaux vaccins.

3.2. Les vaccins génétiques

Parmi les méthodes nouvelles de vaccination, on envisage d'utiliser des « *vaccins génétiques* ». En effet, on a constaté que des cellules transfectées par un plasmide dans lequel on a incorporé le gène d'un antigène, pouvaient exprimer cet antigène à leur surface et provoquer une réponse immunitaire spécifique vis-à-vis de cet antigène.

La mise en évidence de la production d'antigènes par ces cellules peut être réalisée par *immunofluorescence*.

- 3.2.1. Présenter, à l'aide de schémas annotés, les étapes de cette détection par immunofluorescence indirecte. Mettre en parallèle une cellule exprimant l'antigène et une cellule ne l'exprimant pas. Justifier chacune des étapes.
- 3.2.2. Préciser quels sont les avantages de cette technique par rapport à l'immunofluorescence directe.

L'expérimentation des vaccins génétiques, chez l'animal, a montré qu'il était important que les plasmides contenant le gène de l'antigène, pénètrent dans des **cellules présentatrices d'antigènes (CPA)** : cet antigène est présenté aux lymphocytes T auxiliaires afin de permettre leur activation spécifique.

- 3.2.3. Présenter, à l'aide d'un schéma annoté, les molécules membranaires mises en jeu dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T auxiliaires par les CPA. Préciser leurs rôles.

4. Recherche fondamentale sur le génome de l'agent du SRAS (Syndrome respiratoire aigu sévère) (29 points)

Des études sont menées pour rechercher les séquences nucléotidiques codant des motifs peptidiques impliqués dans la production d'anticorps.

Ces études comportent :

- la création d'une banque d'expression à l'aide d'une méthode très puissante : le « phage display » (utilisation de vecteur phagique d'exposition ou de présentation d'un motif peptidique en surface),
- le criblage de la banque,
- le séquençage des éléments criblés.

On utilise le phage lytique T₇ de *E.coli* (voir document en annexe).

4.1. Réalisation de la banque d'expression.

Elle est effectuée selon les étapes suivantes :

- extraction des ARN totaux d'un isolat de cellules humaines infectées par l'agent responsable du SRAS,
- purification des ARN messagers,
- synthèse de molécules d'ADNc méthylées en utilisant un mélange d'amorces hexanucléotidiques,
- ligature d'un adaptateur contenant un site de restriction à chaque extrémité des molécules d'ADNc,
- recombinaison in vitro de l'ADNc avec le génome du phage T₇,
- infection d' *E.coli* par le phage recombiné pour amplification.

- 4.1.1. Expliquer à l'aide de schémas la synthèse d'ADNc. Justifier l'utilisation d'un mélange d'hexanucléotides amorces de séquences variables.
- 4.1.2. Pour utiliser le phage recombiné comme vecteur d'expression, quels sont les sites de restriction contenus dans les adaptateurs de l'ADNc ? Justifier la réponse.
- 4.1.3. La protéine de fusion exprimée est une protéine chimère. Indiquer les deux parties qui la constituent et préciser leur orientation. Comment doit-on réaliser la construction afin d'orienter convenablement le fragment d'ADNc et d'exprimer la protéine chimère.

4.2. Purification des virions exprimant les antigènes du SRAS.

Elle s'effectue grâce à la rétention des virions libérés dans le milieu de culture, par des anticorps polyclonaux fixés sur une phase stationnaire. Ces anticorps polyclonaux sont extraits de sérum d'individus déjà infectés par le virus du SRAS.

Citer le nom de cette méthode de séparation.

Expliquer, à l'aide d'un schéma, son principe dans le cas de la méthode du « phage display ».

4.3. Séquençage.

Un criblage permet d'obtenir une collection de virions recombinés et d'envisager le séquençage des ADNc clonés. Le séquençage, réalisé en thermocycleur, utilise des didésoxynucléotides triphosphates fluorescents, la Taq polymérase et une amorce unique.

4.3.1. Indiquer le rôle des constituants du mélange réactionnel cité ci-dessus.

4.3.2. Comment sont analysés les produits de la réaction pour permettre le séquençage ?

DOCUMENT : structure et génome du phage T₇ utilisé dans la méthode « phage display ».

