

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2017

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Mardi 20 juin 2017

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

Ce sujet comporte 8 pages.

**Les sujets de CBSV et de biotechnologies seront traités
sur des copies séparées.**

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Compétences évaluées					
C1 Extraire une information	C2 Analyser un document	C3 Expliquer une démarche	C4 Arguer une réponse	C5 Construire une synthèse	C6 S'exprimer à l'écrit
1 point	7 points	5 points	3 points	3 points	1 point

INFECTION PAR LE VIRUS ZIKA : DIAGNOSTIC ET RECHERCHE D'UN TRAITEMENT

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a déclaré en 2016 que l'épidémie causée par le virus Zika constituait une urgence de santé publique. Cette infection, transmise par la piqûre d'un moustique porteur du virus, est majoritairement bénigne. Cependant, chez les enfants dont la mère a été infectée pendant la grossesse, on a pu observer un nombre anormalement important de microcéphalies. Ces anomalies correspondent à une diminution de la taille de la boîte crânienne et du cerveau entraînant une déficience intellectuelle et une espérance de vie réduite.

Le virus Zika est transmis à l'être humain par piqûre de moustique. Son génome est constitué d'ARN simple brin.

Afin d'améliorer le suivi et le traitement de patients contaminés par le virus Zika, un laboratoire pharmaceutique décide de :

- tester deux techniques permettant le diagnostic de l'infection par le virus Zika :
 - une RT-PCR afin de détecter l'acide nucléique du virus dans le sérum des patients ;
 - une technique immuno-enzymatique afin de détecter la présence d'anticorps dans le sérum des patients.
- comparer, *in vitro*, l'activité antivirale de deux molécules en vue de tests cliniques.

1. PREMIÈRE ÉTAPE DU DIAGNOSTIC : DÉTECTION DE L'ACIDE NUCLÉIQUE DU VIRUS ZIKA

La mise en évidence du virus Zika dans un prélèvement sanguin s'effectue par RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*). Cette technique repose sur une étape de transcription inverse (RT) catalysée par une enzyme, la transcriptase inverse, suivie d'une étape de PCR classique.

Dans un premier temps, l'ARN génomique du virus est extrait du sérum du patient. On obtient alors un échantillon directement utilisable pour la RT-PCR dont le principe général est présenté dans le **document 1**.

Q1. Schématiser le principe de la RT-PCR en précisant le nom des acides nucléiques.

Q2. Expliquer la nécessité de l'étape de transcription inverse pour la détection de ce virus.

Le **document 2** présente les caractéristiques des amorces et les critères permettant de choisir le couple d'amorces le plus adapté pour réaliser la PCR, en particulier les températures de fusion (T_m) des amorces.

Q3. Calculer les températures de fusion des amorces « anti-sens » pour chaque couple d'amorces.

Q4. Choisir le couple d'amorces le plus adapté à la PCR. Argumenter la réponse.

Afin d'exploiter les résultats de la RT-PCR pour le sérum du patient, les produits de la PCR ont été analysés à l'aide d'une électrophorèse en gel d'agarose.

Q5. Analyser l'ensemble des résultats de l'électrophorèse présentés dans le **document 3** et conclure.

2. DEUXIÈME ÉTAPE DU DIAGNOSTIC : DÉTECTION D'ANTICORPS ANTI-ZIKA

Pour confirmer le diagnostic, la recherche des anticorps anti-Zika est systématiquement effectuée, même lorsqu'un résultat négatif est obtenu par RT-PCR. Cette recherche est également réalisée lorsque le diagnostic est réalisé plus de trois jours après l'apparition des symptômes.

Ce test utilise une méthode immuno-enzymatique présentée dans le **document 4**.

Q6. Reporter sur la copie les lettres A, B, C, D de l'étape 4 et indiquer leur signification.

Q7. Expliquer le rôle des trois lavages de la procédure opératoire.

Afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus pour le sérum du patient, un témoin de spécificité et un témoin d'efficacité sont réalisés en parallèle du dosage.

Q8. À l'aide de sa composition, expliquer le rôle de chacun des deux témoins.

Q9. Analyser l'ensemble des résultats et conclure.

Le **document 5** présente l'évolution des marqueurs de l'infection par le virus Zika en fonction du temps. L'analyse de ce graphique montre la nécessité d'effectuer les deux techniques pour réaliser le diagnostic.

Q10. Expliquer pourquoi les deux techniques, RT-PCR et ELISA, permettent de diagnostiquer l'infection virale à des périodes différentes.

Q11. En utilisant les résultats obtenus par RT-PCR et ELISA, démontrer que le patient est infecté depuis au moins 12 jours.

3. APPROCHE THÉRAPEUTIQUE : COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DE DEUX MOLÉCULES

Deux molécules sont étudiées *in vitro* au laboratoire afin d'évaluer l'efficacité de leur activité antivirale : CMFC1 et AZFT.

Pour cela, des cellules cibles du virus Zika, appelées cellules Vero, sont mises en culture puis infectées par le virus, en présence ou en absence de la molécule antivirale à étudier.

L'efficacité de la molécule antivirale est évaluée par la technique des plages de lyse. Le **document 6** présente le principe de ce test, les observations réalisées et les résultats obtenus.

Q12. Synthétiser sous forme d'un logigramme les différentes étapes nécessaires à la mise en œuvre du test de la molécule AZFT en précisant la durée de chaque étape et la composition des différents milieux de culture utilisés.

Q13. Analyser et expliquer les résultats obtenus pour les témoins. Démontrer en quoi le témoin positif sert de repère quantitatif pour l'exploitation du test.

Q14. À l'aide des résultats obtenus, argumenter le choix de la molécule ayant l'activité antivirale la plus efficace.

SYNTHÈSE

Q15. Un patient présente une forte suspicion d'infection au virus Zika depuis 15 jours. Proposer la démarche de diagnostic la plus adaptée et une possibilité de traitement pour ce patient.

DOCUMENT 1 : Principe général de la RT-PCR

La méthode de RT-PCR repose sur deux étapes :

- La *reverse transcription* (RT) = synthèse d'un ADN double brin à partir d'une matrice d'ARN simple brin. L'enzyme catalysant cette réaction est la transcriptase inverse (*reverse transcriptase*).
- La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) = amplification de manière sélective d'une portion de l'ADN obtenu à l'issue de l'étape RT. L'enzyme catalysant cette réaction est l'ADN polymérase.

DOCUMENT 2 : Caractéristiques des amorces et critère de choix pour la PCR

Gène cible : gène codant la protéine NS5 spécifique du virus Zika

Amorces :

Couple d'amorces	Séquence des amorces	T _m
n°1	amorce « sens » 1.a : 5' - GTGACACGTTGCTGTGTGAC - 3'	62 °C
	amorce « anti-sens » 1.b : 5' - CTGACCAGTCCTCCCCATA - 3'	?

Couple d'amorces	Séquence des amorces	T _m
n°2	amorce sens 2.a : 5' - ACACGTTGCTGTGTGACATAG - 3'	62 °C
	amorce anti-sens 2.b : 5' - TATGGTCTTGTTCGCTCC - 3'	?

Critère de choix des amorces

L'écart des T_m des deux amorces du couple doit être inférieur ou égal à 2 °C

Calcul de la température de fusion d'une amorce (T_m) à l'aide de la formule de Wallace

$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_C + n_G)$$

Avec :

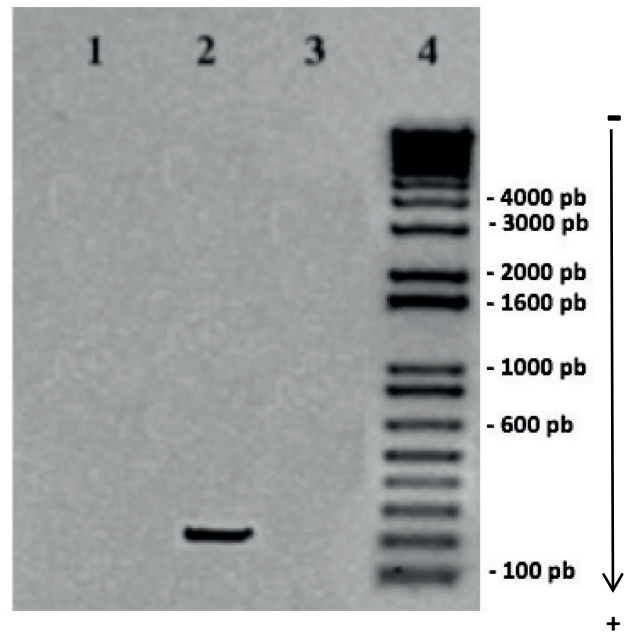
- n_A : nombre d'adénosine dans l'amorce
- n_T : nombre de thymidine dans l'amorce
- n_G : nombre de guanosine dans l'amorce
- n_C : nombre de cytidine dans l'amorce

DOCUMENT 3 : Photographie du gel d'agarose obtenu après migration électrophorétique des produits de PCR

- Puits 1 : Témoin négatif
- Puits 2 : Témoin positif
- Puits 3 : Echantillon patient
- Puits 4 : Marqueur de taille

- Dans le témoin négatif, le sérum est remplacé par de l'eau.
- Dans le témoin positif, le sérum est remplacé par l'acide nucléique du virus Zika.

La taille du fragment amplifié, au sein du gène NS5, est de 205 pb.



pb = paire de bases

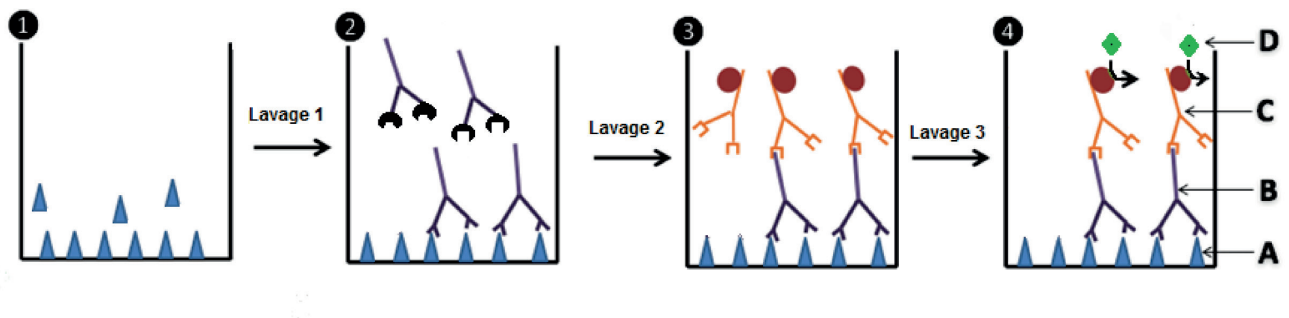
DOCUMENT 4 : Recherche d'anticorps anti-Zika dans le sérum d'un patient

a) Principe

Le laboratoire Euroimmun® a développé un test permettant de détecter les anticorps anti-Zika (IgG et IgM) susceptibles d'être présents dans le sérum d'un patient. Ce test immuno-enzymatique repose sur une technique « ELISA indirecte ».

- Cette technique nécessite l'utilisation d'une plaque sur laquelle des antigènes caractéristiques du virus Zika sont fixés au fond des différents puits (schéma ❶).
- Après une étape de saturation (non représentée sur le schéma ci-dessous), le sérum du patient est ajouté. S'il contient des anticorps anti-Zika, ceux-ci se fixent sur les antigènes présents (schéma ❷).
- L'anticorps secondaire, issu de lapin, est un anticorps anti-anticorps humains. Il est conjugué à la peroxydase et se fixe de façon spécifique aux anticorps du patient (schéma ❸).
- La peroxydase catalyse la transformation d'un substrat en un produit coloré dont l'absorbance est mesurée à 450 nm contre un blanc réactif (schéma ❹).

b) Schématisation des étapes dans le cas d'un résultat positif



c) Composition des témoins

1) Témoin de spécificité : antigène + sérum contenant des anticorps non spécifiques des antigènes du virus Zika + anticorps secondaire conjugué + substrat.

2) Témoin d'efficacité : antigène + sérum contenant des anticorps spécifiques des antigènes du virus Zika + anticorps secondaire conjugué + substrat

d) Résultats

Données de validité du test :

- Seuil de validité du témoin de spécificité : $A_{450\text{ nm}} \leq 0,15$

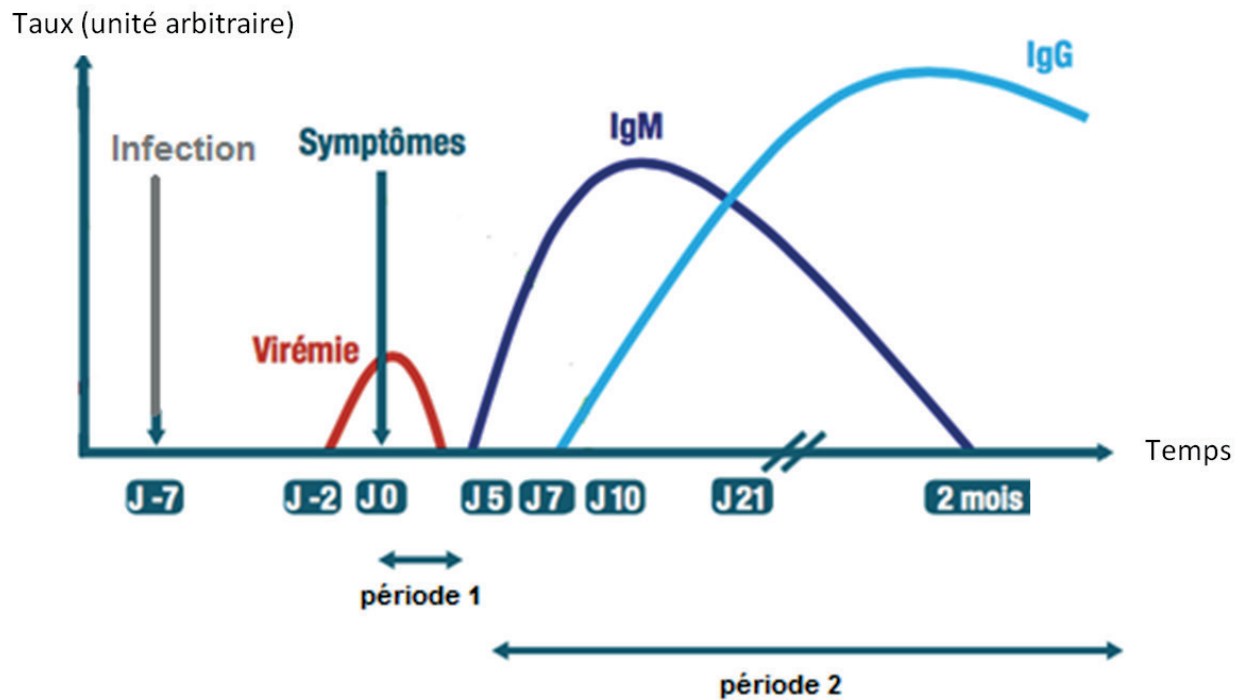
- Seuil de validité du témoin d'efficacité : $A_{450\text{ nm}} \geq 1,00$

Critère de positivité de l'essai : $A_{450\text{ nm}} \text{ essai} \geq 1,20$

	Témoin 1 spécificité	Témoin 2 efficacité	Essai Sérum du patient
Absorbance à 450 nm	0,05	1,08	1,85

DOCUMENT 5 : Cinétique des marqueurs de l'infection par le virus Zika

Source : Institut national de prévention et d'éducation pour la santé du 28 décembre 2015.



Données :

- **Période 1** : phase au cours de laquelle des marqueurs viraux sont détectables par RT-PCR
- **Période 2** : phase au cours de laquelle des marqueurs viraux sont détectables par ELISA
- **Virémie** : présence de virus dans le sang.

DOCUMENT 6 : Test d'efficacité antivirale

1. Principe

Cette technique consiste à infecter des cellules eucaryotes par une souche virale et à ajouter la molécule antivirale à tester. L'ajout d'agarose dans le milieu de culture permet d'éviter la dispersion de ces particules virales. Ainsi une particule virale infecte uniquement une cellule et ses cellules voisines. Par conséquent, **chaque particule virale** est responsable de la **formation d'une plage de lyse** observable à l'œil nu.

2. Procédure opératoire

On dispose de quatre boîtes contenant chacune un tapis homogène de cellules eucaryotes adhérentes (appelées cellules Vero), obtenu après 48 h de culture en milieu liquide DMEM.

Les quatre boîtes sont préparées selon les indications du tableau ci-dessous. Deux molécules antivirales sont testées : CMFC1 et AZFT

	Témoins		Essais	
	N°1	N°2	CMFC1	AZFT
Présence de la molécule antivirale	Non	Non	Oui	Oui
Addition de suspension virale	Non	Oui	Oui	Oui

Après une heure d'incubation, le milieu de culture liquide est enlevé et remplacé par du milieu DMEM additionné d'agarose.

Les boîtes sont remises en culture pendant 6 à 7 jours. Puis les cellules sont colorées au cristal violet afin de visualiser les éventuelles plages de lyse.

3. Résultats

	Témoins		Essais	
	N°1	N°2	CMFC1	AZFT
Nombre moyen de plages de lyse	0	99	3	44

- **Témoin N°1** = Témoin négatif permettant de vérifier que les cellules Vero se multiplient de façon optimale dans les conditions opératoires sans apparition de plages de lyse
- **Témoin N°2** = Témoin positif permettant de vérifier l'action ciblée du virus sur les cellules Vero en l'absence de molécules antivirales