

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR

BIOTECHNOLOGIES

U2 – Biologie Moléculaire et Génie Génétique

SESSION 2024

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français.
- calculatrice non autorisée

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 10 pages numérotées de 1/10 à 10/10.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2024
U2 Biologie moléculaire et génie génétique	24-BOE2BMO	Page: 1/10

	Intitulé des compétences évaluées	points
C1	Maîtrise des connaissances scientifiques et techniques	4
C2	Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	3
C3	Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	6
C4	Pertinence et cohérence des solutions proposées	5
C5	Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2

Histoire d'une pandémie : du dépistage à la production de vaccins

En décembre 2019, une épidémie causée par un nouveau *Coronavirus* (SARS-CoV-2) a été identifiée dans la ville de Wuhan en Chine et signalée à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Rapidement, un nom pour la maladie causée par ce virus a été proposé. Il s'agit de la COVID-19.

La lutte contre la propagation rapide de ce virus dans le monde a nécessité de mettre au point des tests spécifiques et sensibles pour la détection du virus.

L'apparition rapide de mutations dans le génome à ARN de ce virus, a imposé le séquençage régulier des souches responsables de la maladie.

Enfin, pendant cette pandémie, la priorité sanitaire mondiale a également porté sur la mise au point de vaccins contre le virus et ses mutants.

1. Dépistage et épidémiologie de la COVID-19

Dans le cadre du dépistage de la COVID-19, un prélèvement biologique est soumis à une RT-qPCR en utilisant un mix-PCR contenant à la fois une transcriptase inverse et une ADN polymérase.

Chacune des amorces et des sondes nucléotidiques utilisées pour le dépistage du virus a été sélectionnée dans différentes régions du génome du SARS-CoV-2. Les séquences sont repérées dans le **document 1** : la région RdRp, la région S ou la région N.

Un extrait de la séquence au format FASTA, codant la protéine S est présenté dans le **document 2**. La partie de la séquence à amplifier est repérée en caractères gras soulignés.

- 1.1 Préciser si la séquence fournie correspond au brin codant ou non codant. Argumenter la réponse. (C1)
- 1.2 Présenter les caractéristiques du format FASTA. (C1)
- 1.3 Écrire la séquence des 10 premiers nucléotides des amorces sens et antisens permettant d'obtenir l'amplicon recherché. (C3)
- 1.4 Indiquer quatre critères importants à prendre en compte pour la sélection d'un couple d'amorces. (C1)

L'amplification des cibles spécifiques est suivie par PCR en temps réel, à l'aide de sondes d'hydrolyse (Taqman®). Le principe de la technique d'amplification est présenté dans le **document 3**.

- 1.5 Reporter sur la copie les lettres a, b et c et leur associer le nom des étapes correspondantes. Préciser un ordre de grandeur des températures habituellement utilisées pour réaliser ces étapes. Argumenter. (C1, C3)
Expliquer pourquoi la mesure de la fluorescence est réalisée lors de la dernière étape de la technique. (C3)
- 1.6 Argumenter l'intérêt d'utiliser une sonde d'hydrolyse (Taqman®) plutôt qu'un agent intercalant pour la quantification fluorimétrique pour une PCR en temps réel. (C1)

2. Émergence des mutations et conséquences sur le dépistage

Un programme de recherche a analysé l'influence des différentes mutations du génome du virus sur les résultats de RT-qPCR obtenus avec les sondes d'hydrolyse (Taqman®) utilisées classiquement dans les kits de détection.

L'impact des mutations du SARS-CoV-2 sur les résultats de RT-qPCR est présenté dans le **document 4**.

- 2.1 Expliquer la notion de « Ct ». (C1)
- 2.2 Émettre une hypothèse permettant d'expliquer les variations de ΔCt observées. (C4)
- 2.3 Analyser les résultats obtenus. En déduire l'évolution du Ct lorsque les mutations sont portées par le gène N et lorsque les mutations sont portées par le gène S. (C3)
Discuter de l'impact de ces variations sur la sensibilité de la technique de détection des virus, en cas de mutation du gène N, puis en cas de mutation du gène S. (C4)

3. Mise au point de vaccins à ARNm

Les vaccins à ARNm permettent de faire pénétrer dans une cellule cible, l'ARNm codant pour un antigène viral. La cellule cible exprime cet antigène, induisant ainsi une réponse immunitaire de l'organisme.

Le vaccin est constitué d'un ARNm synthétique. L'ajout de séquences non traduites UTR (*Untranslated Transcribed Region*) en amont permet d'optimiser sa stabilité et son niveau de traduction après la transfection.

Afin de sélectionner les séquences UTR les plus performantes, des études préliminaires utilisent l'ARNm codant pour une GFP (*Green Fluorescent Protein*).

- 3.1 Argumenter l'intérêt d'utiliser l'ARNm codant la GFP pour ces études préliminaires. (C3)

Plusieurs constructions plasmidiques sont réalisées pour tester l'effet de différents 5'UTR (a,b,c,d) sur la stabilité de l'ARNm dans la cellule transfectée. Ces constructions sont présentées dans le **document 5**.

- 3.2 Montrer que la construction pSP1 correspond à un contrôle négatif et que la construction pSP2 correspond à un contrôle positif. (C4)

Une évaluation de l'effet des différents UTR (a, b, c, d) sur la stabilité des ARNm est alors réalisée par Northern Blot.

Le protocole et les résultats sont présentés dans les **documents 6 et 7**.

Une étude de l'expression de la GFP en fonction des différentes constructions est présentée dans le **document 8**.

- 3.3 Lister les différentes étapes du Northern Blot. (C3)
Expliquer le choix de températures d'hybridation différentes pour les sondes utilisées. (C4)
- 3.4 Expliquer l'intérêt de mesurer la quantité d'ARN 16S dans le cadre de cette étude. (C1)
- 3.5 Analyser l'ensemble des résultats fournis et conclure sur l'UTR le plus performant pour optimiser la stabilité de l'ARNm de synthèse et son niveau de traduction après la transfection. (C4)

4. Production de vaccins à ARN par transcription *in vitro*

Pour produire un vaccin, une quantité importante d'ARNm est requise. Ces ARNm sont synthétisés par transcription *in vitro* à partir d'un ADNc inséré dans un vecteur.

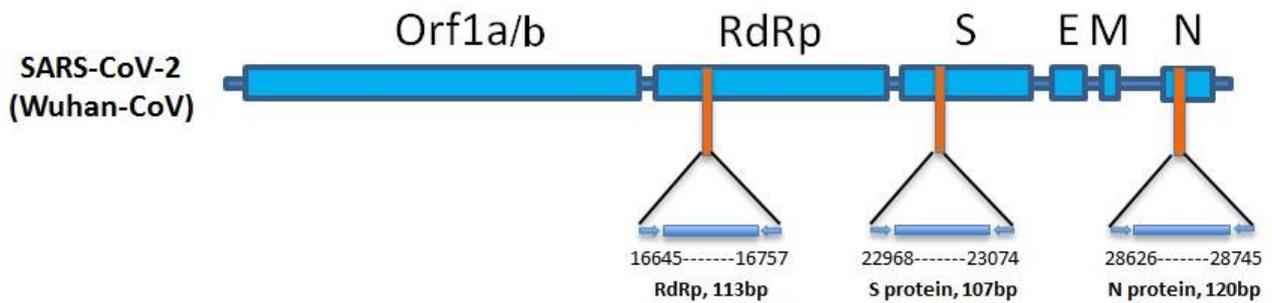
Le **document 9** présente une approche permettant d'obtenir ces ARNm synthétiques.

- 4.1 Réaliser un schéma légendé du processus d'obtention d'un ADNc clonable dans un vecteur. (C2)
- 4.2 Préciser les différentes modifications subies par un ARNm eucaryote lors de sa maturation. (C1)
- 4.3 Identifier les différentes phases de la production d'ARNm synthétiques fonctionnels *in vitro*. (C3)
Préciser la particularité de cette méthode de production d'ARNm synthétiques en comparaison avec le processus naturel de maturation cellulaire des ARNm. (C3)

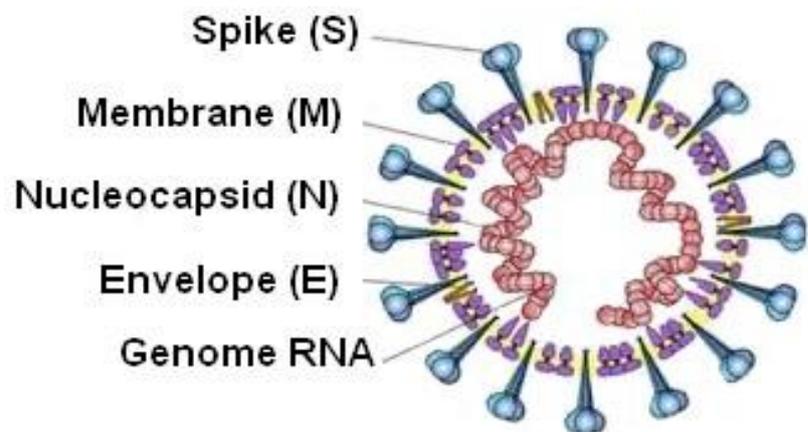
La dernière étape de la production d'ARNm consiste en leur purification.

- 4.4 Schématiser le principe d'une méthode permettant de purifier spécifiquement les ARNm produits *in vitro*. (C2)

Document 1. SARS-CoV-2 structure, genome and relative positions of amplicon targets



Numbers below amplicon are genome locations corresponding to Wuhan-CoV genome MN908947



ORF : open reading frame

RdRP : RNA dependant RNA polymerase

S: surface glycoprotein

E: envelope protein

M: membrane protein

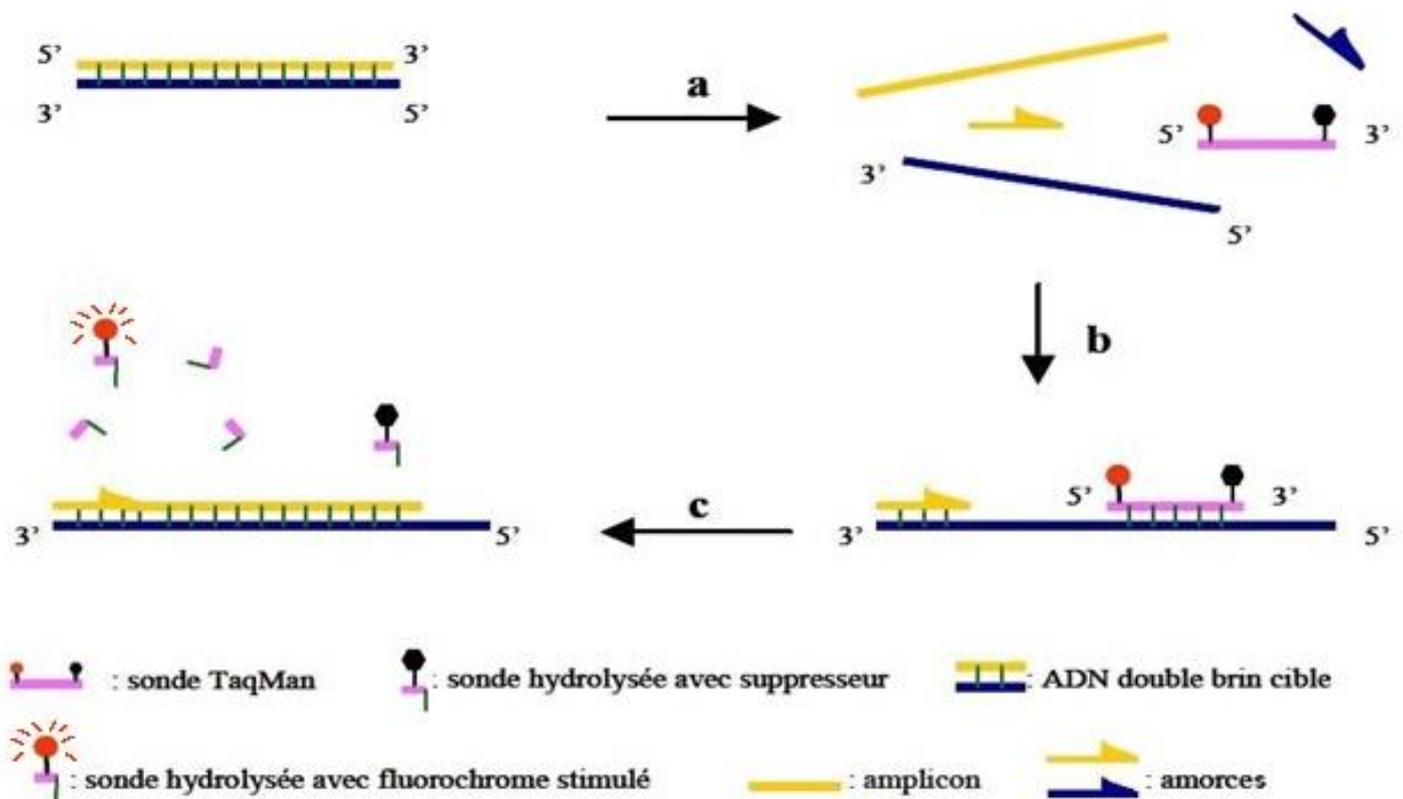
N: nucleocapsid protein

Disponible sur: <https://www.clinisciences.com/sars-cov-2-rt-qpcr-pour-la-recherche-5107/sars-cov-2-covid-19-qpcr-primer-181891261.html>

Document 2. Extrait de la cds de la protéine S du *Coronavirus* au format FASTA

```
>NC_045512.2:21563-25384 Severe acute respiratory syndrome coronavirus2
ATGTTTGTTCCTTCTGTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACAACCAGAAC
TCAATTACCCCTGCATACACTAATTCTTTCACACGTGGTGTTCATTACCCTGACAAAGTTTCA
GATCCTCAGTTTTACATTCAACTCAGGACTTGTCTTACCTTCTTTTCCAATGTTACTTGGTTC
CATGCTATACATGTCTCTGGGACCAATGGTACTAAGAGGTTTGATAACCCTGTCCTACCATTTAA
...///.CTAATGTCTATGCAGATTCAATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCC
AGGGCAAACCTGGAAAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTA
TAGCTTGGAAATCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTG
TTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAG
CACACCTTGTAATGGTGTGGAAGGTTTAATTGTTACTTTCTTTTACAATCATATGGTTTCCAAC
CCACTAATGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCA
CCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTAAAAACAAATGTGTCAATTTCAA
CTTCAATGGTTTAAACAGGCAC...////..CAGTTGTAAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCTC
AATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGAACTTGAAAGTATGAGCA
GTATATAAAATGGCCATGGTACATTTGGCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGG
```

Document 3. Principe d'une PCR en temps réel basée sur l'utilisation d'une sonde d'hydrolyse (Taqman®)



Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: Principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology. 1 janv 2003;2:2-11.

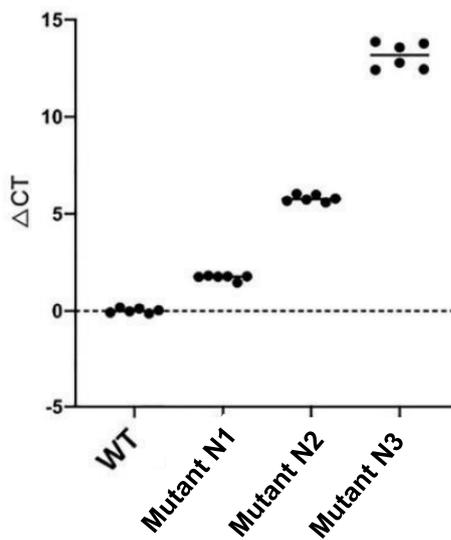
BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2024
U2 Biologie moléculaire et génie génétique	24-BOE2BMO	Page: 6/10

Document 4. Impact des mutations du SARS-CoV-2 sur les résultats de RT-qPCR

Valeurs de ΔCt pour le virus sauvage (WT) et des virus portant une mutation au niveau du site d'hybridation des sondes d'hydrolyse (Taqman®) China-CDC-Prb-N et China-CDC-Prb-S utilisées lors de la PCR en temps réel ciblant respectivement les gènes N (A) et S (B).

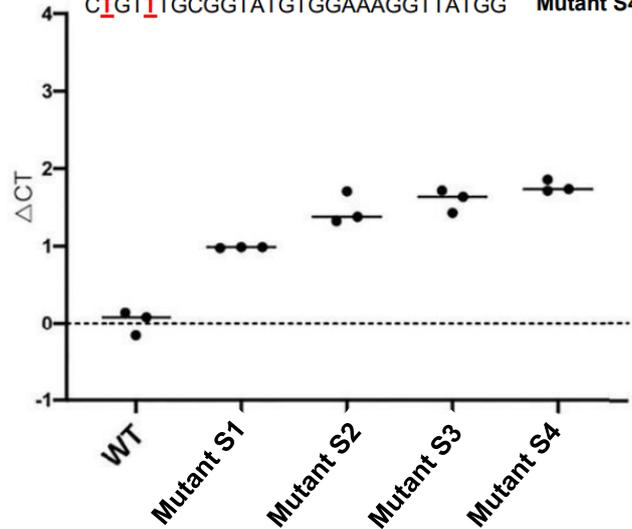
A China-CDC-Prb-N

TTGCTGCTGCTTGACAGATT WT
 TTGCTGCTGCTTGACAGATT Mutant N1
 TTGCTGCTGCTTGAAGATT Mutant N2
 TTGCTGCTGCTTGAAGATT Mutant N3



B China-CDC-Prb-S

CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG WT
 CIGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG Mutant S1
 CCGTITGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG Mutant S2
 CCGTCTGIGGTATGTGGAAAGGTTATGG Mutant S3
 CIGTITGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG Mutant S4



La quantité initiale d'ARN viral est identique pour tous les essais.

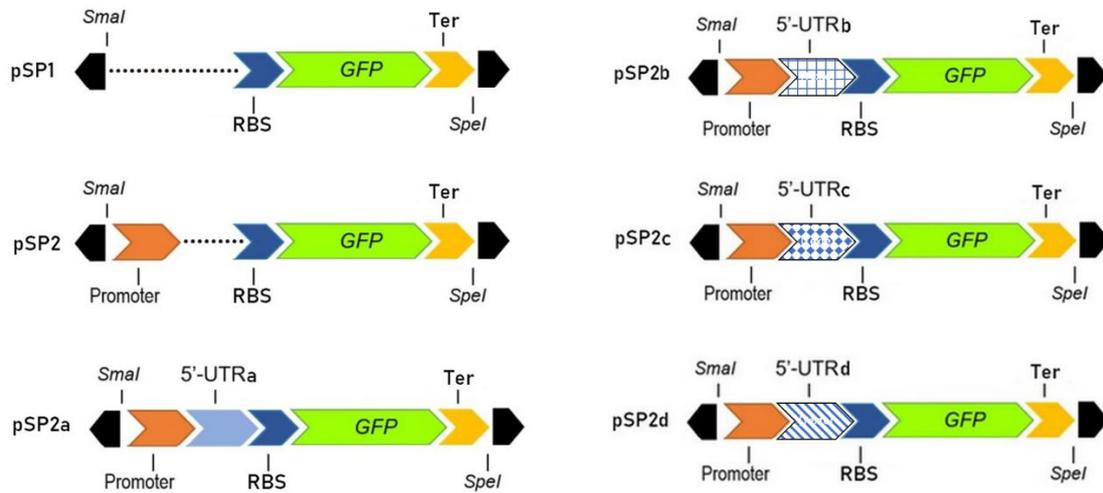
Le ΔCt correspond à la différence entre le Ct obtenu pour le virus testé et le Ct obtenu pour le virus sauvage (WT).

Adapté de Cao L, Xu T, Liu X, Ji Y, Huang S, Peng H, et al. The Impact of Accumulated Mutations in SARS-CoV-2 Variants on the qPCR Detection Efficiency. Front Cell Infect Microbiol. 28 janv 2022;12:823306.

Document 5. Constructions utilisées pour l'étude de la stabilité de l'ARNm via l'expression de la GFP

pSP1 et pSP2 ont été utilisées comme contrôles.

pSP2a, 2b, 2c, 2d contiennent différentes versions de l'UTR, en aval d'un promoteur inducible.



Viegas SC, Apura P, Martínez-García E, de Lorenzo V, Arraiano CM. Modulating Heterologous Gene Expression with Portable mRNA-Stabilizing 5'-UTR Sequences. ACS Synth Biol. 21 sept 2018;7(9):2177-88

Document 6. Northern Blot protocol

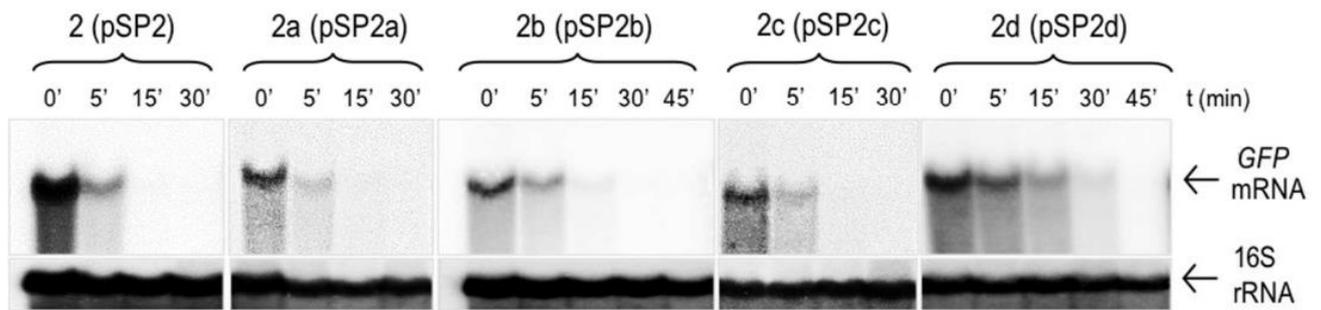
After extraction, RNA integrity was checked on an agarose gel. For northern blot analysis, 20 µg of total RNA was separated under denaturing conditions in a 1.5 % (w/v) agarose gel. RNA was transferred to Hybond-N membrane by capillarity using 20X SSC as transfer buffer. RNA was UV-crosslinked to the membrane immediately after transfer.

Membrane was cut in two pieces to separate 16S RNA band and GFP mRNA band.

The two membranes obtained were then hybridized in PerfectHyb Buffer at 68 °C for GFP labelled probes and 43 °C in the case of 16S RNA-labelled probes (Probes were labeled with [³²P]-α-UTP). After hybridization, membranes were washed and finally observed by autoradiography.

Document 7. Northern blot analysis of GFP transcript stability

The mRNA were purified 0 to 45 minutes after induction of transcription.

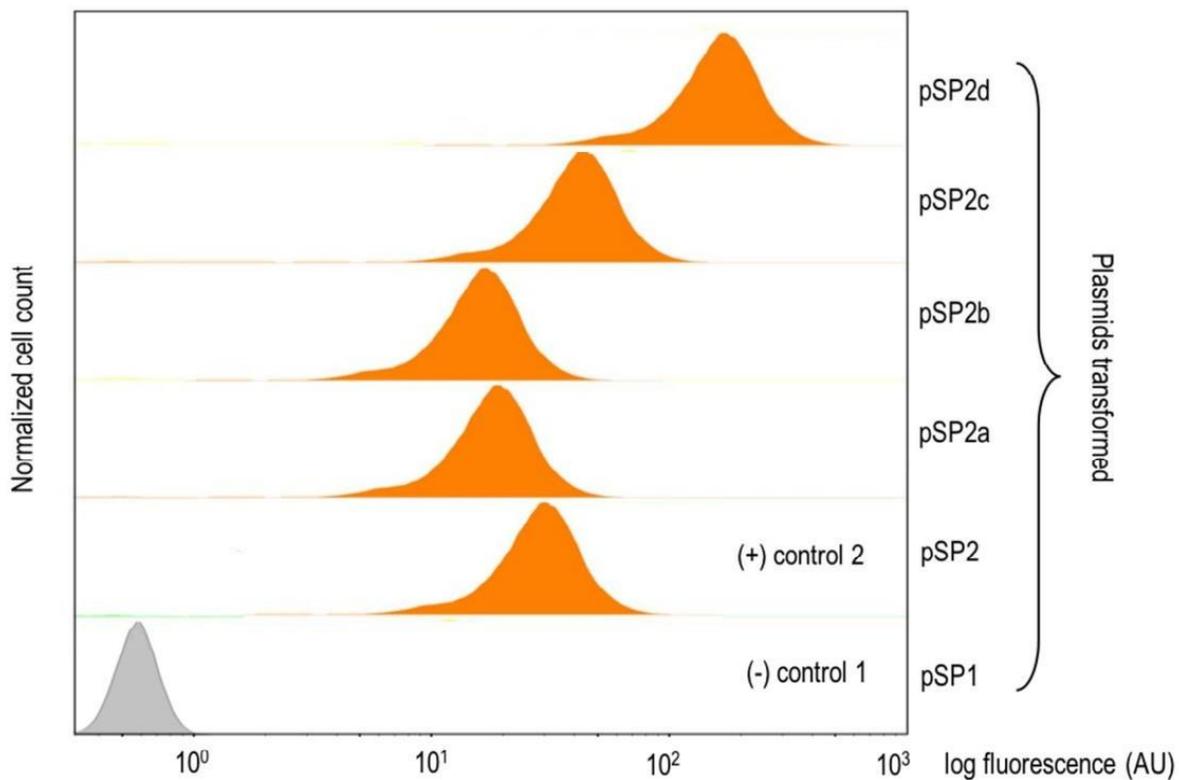


Half-life (min)	3.1±0.1	4.9±0.7	5.9±0.6	4.8±0.5	12.9±1.5
-----------------	---------	---------	---------	---------	----------

Viegas SC, Apura P, Martínez-García E, de Lorenzo V, Arraiano CM. Modulating Heterologous Gene Expression with Portable mRNA-Stabilizing 5'-UTR Sequences. ACS Synth Biol. 21 sept 2018;7(9):2177-88.

Document 8. Characterization of heterologous gene expression ruled by different 5'-UTR segments.

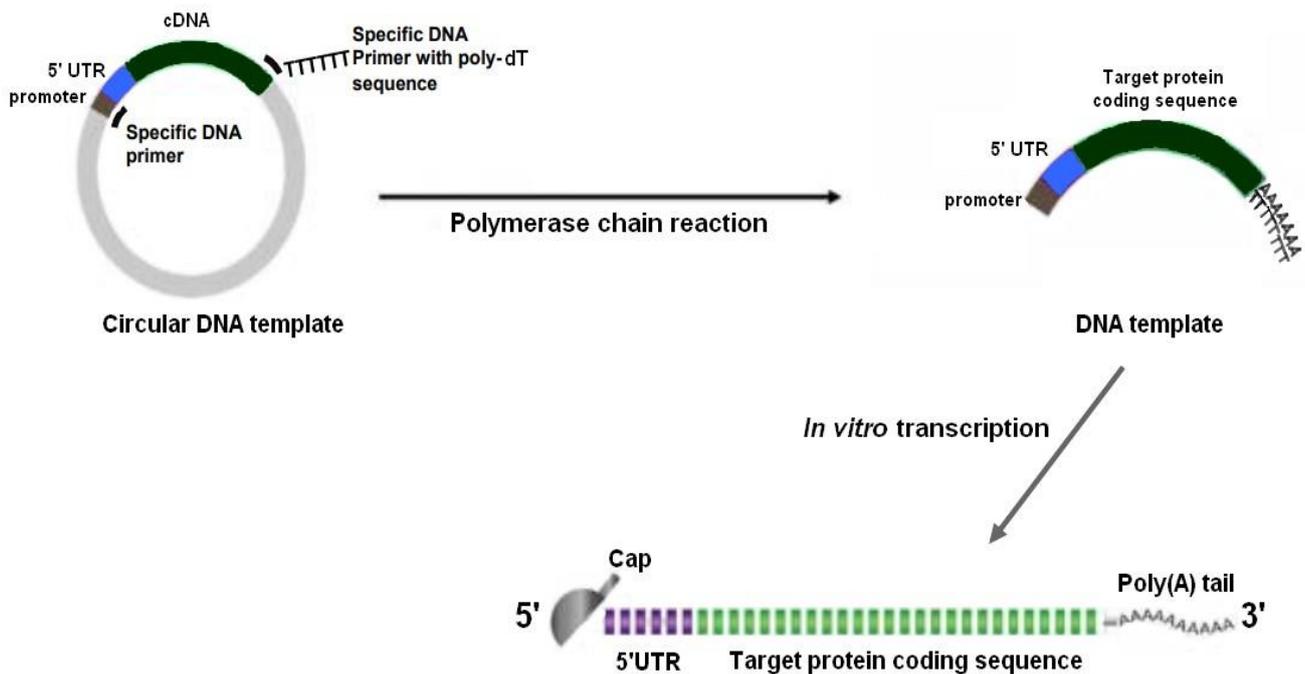
GFP Fluorescence measure of cells transformed with plasmids of interest.



Document 9. Schematic overview of synthesis of mRNA by *in vitro* transcription (IVT)

The cDNA sequence of the desired protein was first cloned in an expression vector and then amplified by PCR using a DNA primer with a long poly-dT sequence and a specific DNA primer.

To produce the synthetic mRNA, an *in vitro* transcription reaction is performed and a 5'-cap structure is added during this process



Hyokyung K, Minjeong K, Yunmi S, Yae Seul M, Hwa Jeong L, Kyuri L, Hyukjin L. Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*, Vol. 156, February 2018, 172-193