

BIOTECHNOLOGIES

Durée : 3 heures

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le surveillant qui vérifiera et, éventuellement, remplacera le sujet.

Le sujet comprend au total 12 pages numérotées de 1 à 12.

Le sujet comporte 11 documents situés en pages 6 à 12.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

Avertissements :

- La plupart des questions sont indépendantes ou regroupées en parties indépendantes.

La question rédactionnelle (Q12) est clairement identifiée.

Les nanocorps : outil thérapeutique contre la COVID-19

Des stratégies de traitements préventif ou curatif contre le virus SARS-CoV-2 (document 1) peuvent s'appuyer sur l'utilisation d'anticorps neutralisants. L'étude proposée présente la procédure de préparation et la validation immunologique de nanocorps produits à partir d'alpagas immunisés. Les anticorps d'alpagas sont très particuliers (document 2) et il s'agit de produire des domaines VHH (document 2) - appelés nanocorps - neutralisants.

Des travaux de recherche ont conduit à produire des nanocorps de haute affinité contre des marqueurs antigéniques du virus SARS-CoV-2 ou de ses variants :

- soit des marqueurs présents uniquement dans le domaine RBD de Spike ;
- soit des marqueurs présents sur l'ensemble de la protéine Spike

Source : Pymm P, Adair A, Chan LJ, et al. Nanobody cocktails potentially neutralize SARS-CoV-2 D614G N501Y variant and protect mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;118(19):e2101918118. doi:10.1073/pnas.2101918118

PARTIE 1.

Préparation d'une banque de nanocorps par la méthode du « phage display »

On se propose d'étudier les principales étapes de la création de la banque de nanocorps exprimés à la surface de phages (document 5) par la méthode du « phage display ».

La stratégie est présentée ci-dessous :

- dans un premier temps
 - on immunise des alpagas avec la protéine Spike et le domaine RBD de la protéine Spike ;
 - on crée, par génie génétique, une bibliothèque de séquences d'ADN codant la diversité des séquences VHH à partir de lymphocytes isolés chez ces alpagas ;
- dans un deuxième temps
 - on produit une bibliothèque de phages Fd qui expriment la protéine pIII fusionnée avec un VHH ;
 - on peut alors cribler dans la bibliothèque, les VHH les plus spécifiques de la protéine Spike ou du domaine RBD de la protéine Spike.

1. Les nanocorps et le phage fd outils de l'étude

Q1. Comparer, sous forme d'un tableau, l'organisation structurale des anticorps

humains et des anticorps d'alpagas présentée dans le document 2. Proposer l'intérêt de choisir les nanocorps plutôt que les anticorps humains comme outil thérapeutique contre la COVID-19.

On souhaite produire une bibliothèque de phages fd qui expriment la protéine III fusionnée avec un VHH (technique dite du « phage display »).

- Q2.** A l'aide du document 5, représenter l'organisation d'un phage recombiné exprimant à sa surface la protéine de fusion pIII – VHH

La suite du sujet détaille quelques étapes clef de la conception et production de la banque de phages recombinés présentant à leur surface les nanocorps.

2. Préparation d'une banque d'ADNc - VHH ou nanocorps

Après immunisation d'alpagas par injection de la protéine virale Spike et du domaine RBD, le sang total est collecté. Les lymphocytes sont purifiés. La réponse immunitaire génère une grande diversité de lymphocytes producteurs d'anticorps, dirigés contre les déterminants antigéniques de la protéine Spike. Des ADNc sont préparés à partir des ARN totaux lymphocytaires.

- Q3.** Schématiser les étapes d'obtention d'ADNc à partir des ARNm lymphocytaires. Préciser pour chacune d'elles les réactifs nécessaires à leur réalisation pratique.

- Q4.** Expliquer l'intérêt d'utiliser les ARNm plutôt que l'ADN génomique lymphocytaire.

Une amplification par PCR des ADNc est ensuite mise en œuvre afin de générer la banque d'ADNc de VHH. Le document 3 présente les amorces disponibles au laboratoire.

- Q5.** Etablir la composition qualitative du milieu réactionnel d'une PCR pour amplifier les séquences codant un nanocorps VHH.

Les auteurs ont utilisé la stratégie de la PCR nichée (Nested PCR) avec deux couples d'amorces, CALL001 /CALL002 et VVH-Back /VVH-Forward.

- Q6.** Montrer en quoi la réalisation de deux PCR successives augmente la spécificité de la réaction et la qualité des amplicons obtenus.

3. Clonage des ADNc - VHH dans le phagemide pMES4

Les produits de PCR sont clonés dans le vecteur phagemide d'expression pMES4 dont la carte est fournie dans le document 4, afin de produire les phages fd présentant les nanocorps à leur surface (phage display).

- Q7.** A l'aide des documents 3 et 4, présenter les étapes du clonage des produits de PCR dans le vecteur pMES4. Préciser l'intérêt d'un clonage en phase.

- Q8.** Schématiser l'unité de transcription d'un phagemide recombiné. Montrer que ce vecteur permet l'expression d'une protéine de fusion.

4. Production des phages recombinés fd

La souche *E. coli* TG1 électro compétente est transformée par la banque de vecteurs recombinés pMES4 - VHH. La souche *E. coli* TG1 est une entérobactérie, bacille à Gram (-), oxydase (-), Nitrate Réductase (+), mésophile qui cultive sur les bouillons LB ou 2X TY. Leur composition est présentée dans le document 6.

- Q9.** A partir de l'étude de la composition des milieux, vérifier que la souche qui est hétérotrophe chimio-organotrophe, se développe bien sur les deux milieux.

Après électroporation les bactéries sont étalées sur des boîtes carrées de 24,5 cm de côté (600 cm²) de milieu gélosé LB contenant 100 µg mL⁻¹ ampicilline. Les boîtes sont incubées pendant 18 h à 37°C. Cet ensemble de boîtes constitue la banque de clones. Classiquement, 1000 colonies sont comptables sur une boîte de Petri Ø 90 mm (environ 60 cm²)

Q10. Déterminer le nombre de boîtes carrées de 24,5 cm de côté àensemencer pour obtenir 10⁷ clones. Discuter de l'organisation des manipulations et de la charge de travail.

Tous les clones bactériens sont collectés et rassemblés en bouillon LB contenant 100 µg mL⁻¹ ampicilline. Cet ensemble constitue la banque génétique de VHH.

Les particules phagiques sont produites selon le protocole présenté en document 7.

Q11. Construire un organigramme du protocole. Proposer un rôle pour chacune des étapes. A l'aide des documents 4 et 5, expliquer la nécessité d'utiliser le phage assistant VSCM13.

Q12. Question rédactionnelle : la production des phages recombinés nécessite l'infection d'une culture bactérienne préalable en phase exponentielle de croissance vers 4·10⁸ bactéries mL⁻¹ soit avec une atténuation ou densité optique à 600 nm proche de 0,5 (avec le matériel utilisé).

Présenter les principales méthodes utilisées au laboratoire permettant de déterminer la concentration d'une suspension bactérienne. On choisira quelques exemples significatifs de méthodes avec ou sans culture en précisant les intérêts et limites.

La réponse devra être soigneusement organisée et rédigée.

PARTIE 2.

Caractérisation des nanocorps dirigés contre les antigènes viraux.

L'immunisation des animaux, pour obtenir des nanocorps, et les tests in-vitro sont réalisés en utilisant 2 antigènes (document 1) :

- La protéine Spike du SARS-CoV-2
- Le domaine RBD de la protéine Spike sur SARS-CoV-2

1. Caractérisation des antigènes par électrophorèse

Les 2 antigènes sont analysés par électrophorèse pour vérifier leur masses moléculaire et leur structure. Les résultats sont regroupés dans le document 8.

Q13. Présenter les étapes clef d'une électrophorèse SDS-PAGE et préciser l'intérêt de l'utilisation du polyacrylamide.

Q14. Proposer une hypothèse concernant la différence de masses moléculaires observées entre les conditions réductrice et non réductrice.

Q15. Discuter de la pureté des échantillons utilisés en comparant les deux électrophorégrammes proposés.

2. Evaluation de la qualité de l'immunisation par comparaison de la réactivité des sérums pré- et post-immunisation

La réactivité des sérums produits est analysée par la technique ELISA en utilisant les deux antigènes suivants :

- La protéine Spike du SARS-CoV-2
- Le domaine RBD de la protéine Spike sur SARS-CoV-2

La méthode utilisée est décrite dans le document 9.

Q16. Schématiser l'édifice moléculaire final de ce dosage ELISA pour un résultat positif. Il convient de soigner la légende pour faire apparaître clairement les différents éléments.

Les résultats de l'analyse par ELISA des sérums d'alpaga pré- et post-immunisation (document 9) révèlent un taux d'anticorps important après immunisation par rapport au signal obtenu avant immunisation.

Q17. Proposer une hypothèse pour expliquer que les résultats observés sur les sérums avant immunisation (en blancs sur les résultats du document 9) ne soient pas à zéro.

Q18. Proposer une modification du protocole pour éviter ce bruit de fond.

3. Technique de révélation du dosage ELISA

La réaction de révélation utilise la PAL comme enzyme. La réaction catalysée est donnée dans le document 9. Elle est arrêtée par ajout d'une solution fortement basique au bout de 120 secondes précisément.

Q19. Discuter de la relation entre l'absorbance mesurée et la quantité de la protéine recherchée dans les sérums d'alpaga.

Q20. Expliquer le mode d'action de la solution basique utilisée pour arrêter la réaction.

Q21. Discuter du choix d'arrêter la réaction après 120 secondes.

Q22. Argumenter le choix d'effectuer une lecture à 405nm pour la meilleure sensibilité

4. Evaluation de la capacité de liaison des nanocorps

Pour vérifier que les nanocorps étudiés inhibent la liaison entre le domaine RBD de la protéine Spike du SARS-CoV-2 et la protéine ACE2, la technique du FRET est utilisée. Elle est présentée dans le document 10.

Q23. A l'aide du document 10, identifier le phénomène moléculaire mis en évidence par la mesure d'une intensité lumineuse dans la technique FRET.

Q24. Argumenter que le couple DyLight-488 et 594 est utilisable pour la technique FRET alors que le couple DyLight-488 et 755 ne l'est pas.

Lors de l'expérience on utilise les 2 protéines suivantes :

- domaine RBD de la protéine Spike marqué avec DyLight-488.
- protéine ACE2 marquée avec DyLight-594.

L'ajout du domaine RBD non marqué, aux 2 protéines précédentes, en concentration 5 fois plus élevée élimine quasi totalement le signal FRET.

Q25. Proposer une explication de l'action du domaine RBD de la protéine Spike non marqué sur le signal FRET mesuré.

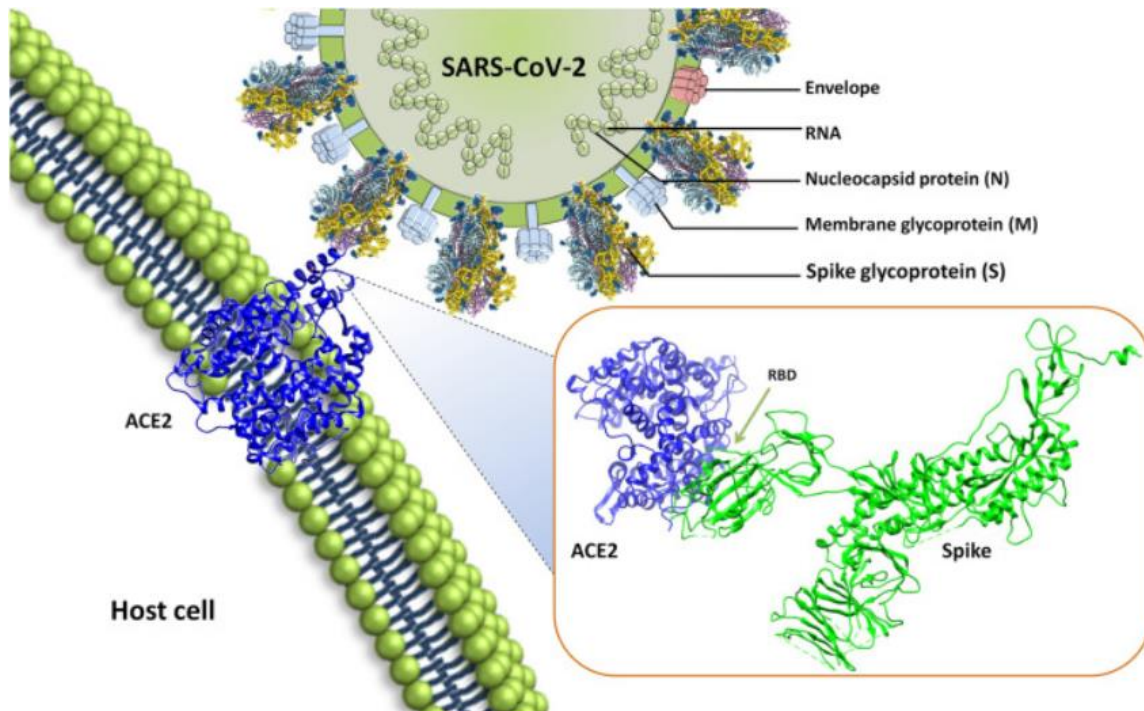
Le document 11 présente l'effet de différentes molécules sur l'interaction RBD – ACE2 évalué par la technique du FRET

Q26. Discuter de la capacité de liaison du domaine RBD de la protéine Spike sur la cible ACE2 humaine ou de souris.

Q27. Discuter de l'efficacité de chaque nanocorps (24 et 26) et identifier le plus performant dans le cadre de la thérapie étudiée.

Document 1

Interaction du virus SARS-CoV-2 avec la cellule hôte



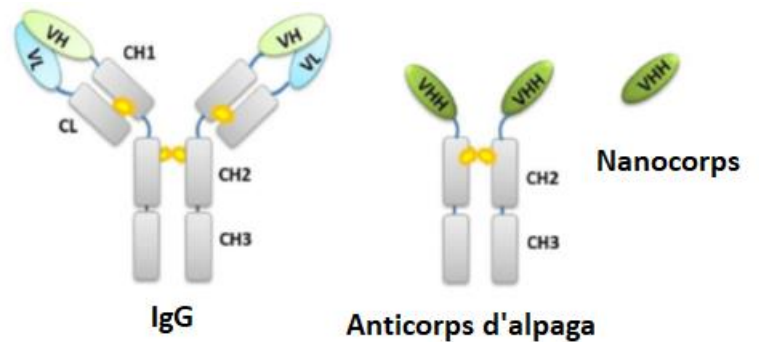
Virusdisease, 2020 Dec 5 ;31(4) :1-9.

Document 2

Alpagas, anticorps et nanocorps



Des alpagas dans la pampa

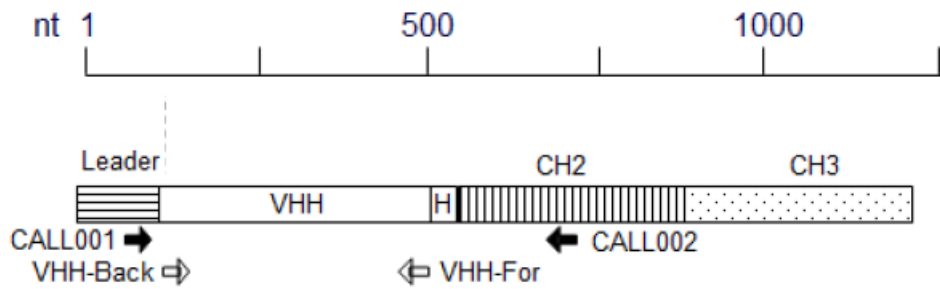


CH, CL : domaine constant de la chaîne lourde (H), de la chaîne légère (L)
VH, VL : domaine variable de la chaîne lourde (H), de la chaîne légère (L)

Document 3

Amplification par PCR des ADNc codant les domaines VHH

- Organisation des séquences d'ADNc codant une chaîne d'anticorps d'alpagas



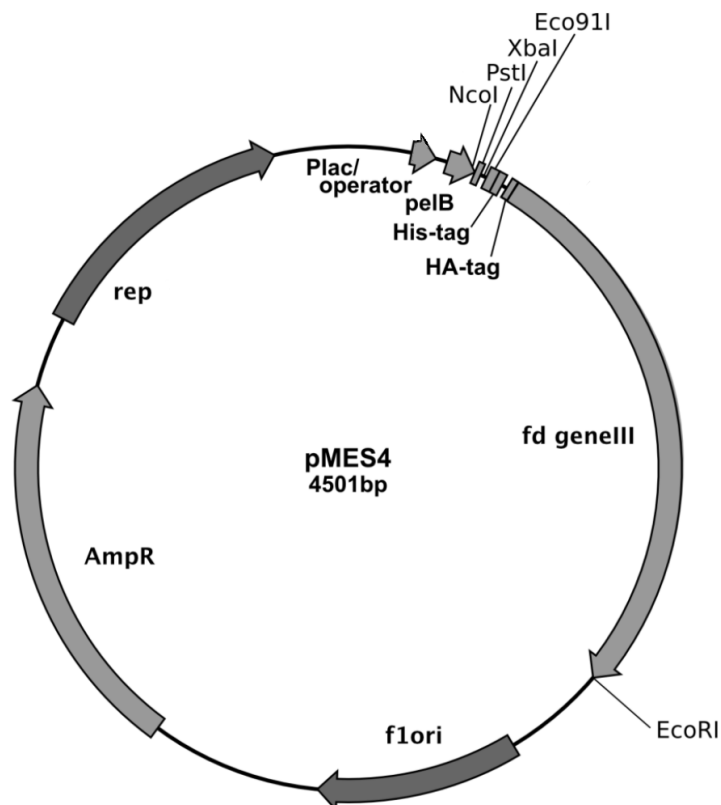
nt : nucléotide ; H : domaine charnière ; CH2 : domaine constant 2 ; CH3 : domaine constant 3 ; VHH: domaine variable d'une chaîne lourde

- Amorces

CALL001 : 5'-GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG-3'	VHH-Back : 5'-GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG-3' (PstI)
CALL002 : 5'-GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3'	VHH-For : 5'-CTAGTGCGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT-3' (Eco91I)

Document 4

Vecteur pMES4 de phage display

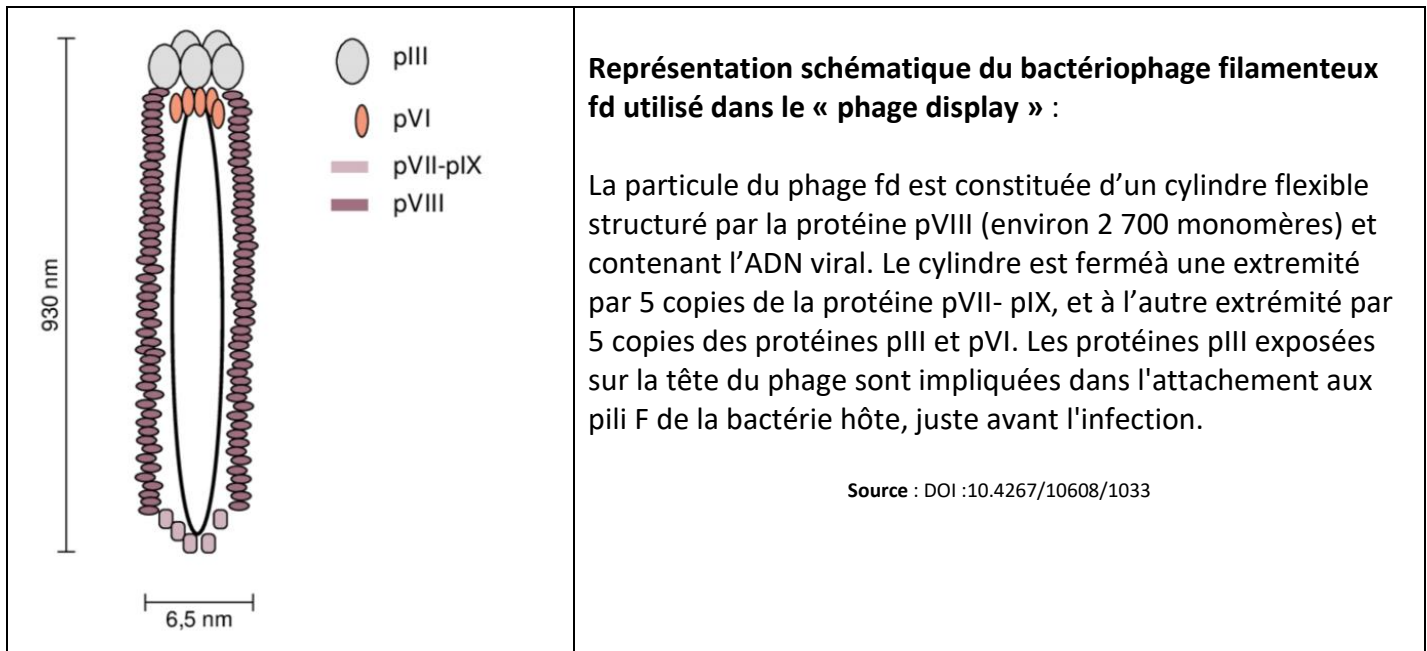


Carte de pMES4 (4501bp, Genbank GQ907248):

- séquence <i>pelB</i> (<i>peIB</i>) code pour le peptide signal de sécrétion de PelB; - étiquette 6 histidines (His-tag) suivie d'une étiquette hémagglutinine (HA-tag); - gene codant pour la protéine pIII du phage (<i>fd geneIII</i>);	- promoteur/opérateur lac (<i>Plac/opérateur</i>); - gène conférant la résistance à l'ampicilline (<i>AmpR</i>); - deux origines de replication: bactérienne (<i>rep</i>) et phagique f1 (<i>f1ori</i>).
---	--

Document 5

Organisation structurale du phage fd



Document 6

Composition des milieux LB et TY à compléter avec 2 % Glucose

Bouillon LB	2X TY Broth
Formulation pour 1 litre :	Composant Quantité pour 1 L
- 10 g SELECT Peptone 140	Tryptone 16 g
- 5 g SELECT Extrait de Levure	Extrait de 10 g
- 5 g Chlorure de sodium	levure
	NaCl 5 g
	Ajuster le pH à 7.0.

Document 7

Production des phages recombinés présentant les nanocorps

- Inoculer *E. coli* à la concentration de 48×10^8 cellules mL^{-1} dans un Erlenmeyer de 250 mL contenant 60 mL de milieu 2xTY à $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ d'ampicilline et 2 % de glucose. Pour une bibliothèque typique de 10^8 clones, cet inoculum permettra contiendra statistiquement 48 copies de chaque clone de la bibliothèque ;
- Cultiver sous agitation jusqu'à ce que la culture atteigne la phase exponentielle requise pour la production de pili F ;
- Transférer 10 mL de la culture-en phase exponentielle dans un tube à centrifuger de 50 mL. Surinfecter avec 4×10^{10} pfu du phage assistant VSCM13. Mélanger doucement et incubé 30 minutes à 37°C sans agitation pour permettre au phage d'infecter les cellules. Puis cultiver sous agitation une nuit ;
- Transférer la culture de nuit dans un tube à centrifuger de 50 mL et centrifuger pendant 15 minutes à 3 200 g et 4°C pour éliminer les cellules ;
- Transférer 40 mL du surnageant dans un nouveau tube à centrifuger de 50 mL et ajouter 10 mL d'une solution de PEG6000 à 20 % / NaCl $2,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Bien mélanger en retournant le tube 5 fois et garder sur la glace pendant au moins 30 min pour précipiter les phages et obtenir une suspension homogène et trouble ;
- Centrifuger pendant 15 min à 20 000 g et 4°C , retirer le surnageant et remettre en suspension le culot de phage dans 1 mL de PBS glacé. Centrifuger pendant 1 min à 20 000 g et 4°C pour éliminer complètement les contaminants bactériens. Transférer le surnageant dans un nouveau tube pour récupérer la suspension de phages.

Document 8

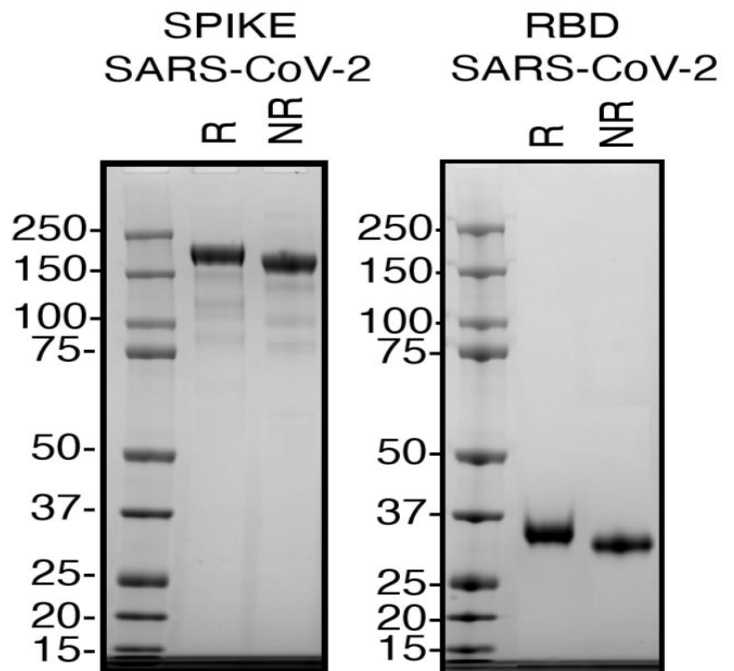
Caractérisation des Antigènes par SDS-PAGE

Pour l'immunisation des alpagas et les tests in vitro, deux antigènes différents sont utilisés

- La protéine Spike du SARS-CoV-2
- Le domaine RBD sur SARS-CoV-2

Les antigènes utilisés pour l'immunisation ont été analysés par la technique SDS-PAGE dans des conditions non réductrices (NR) et réductrices (R) pour vérifier leurs poids moléculaires. Le poids moléculaire en kDa est indiqué sur la gauche des deux gels colorés au Coomassie.

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate



Document 9

Evaluation de la qualité de l'immunisation par comparaison de la réactivité des sérums pré- et post-immunisation

Tous les lavages sont répétés trois fois avec du PBS à 0,1% de Tween. Toutes les incubations durent 1 h à température ambiante. Tous les échantillons sont réalisés en duplicat.

Les plaques à fond plat de 96 puits sont pré remplies avec 50 μ L de PBS. Elles sont ensuite sensibilisées par 125 nmol de protéines cibles (Spike ou RBD).

Les plaques sont lavées puis saturées avec une solution à 10% de lait écrémé.

50 μ L de sérum pré ou post immunisation dilués au 1/1000 est déposé dans chaque puits

Les plaques sont lavées puis incubées avec un anticorps de chèvre anti-Alpaga conjugué à la phosphatase alcaline (PAL).

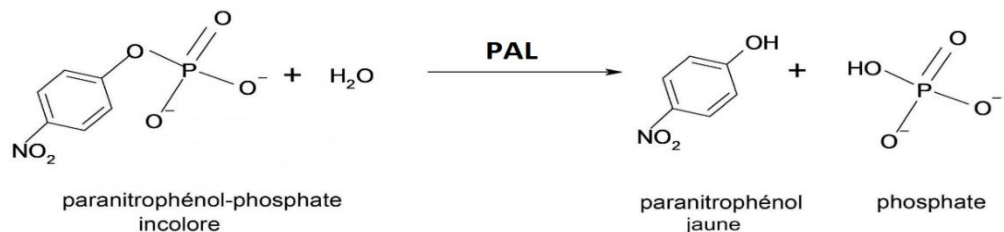
Après lavage, 50 μ L de pNPP sont ajoutés.

Les plaques sont alors incubées à température ambiante pendant 120 secondes.

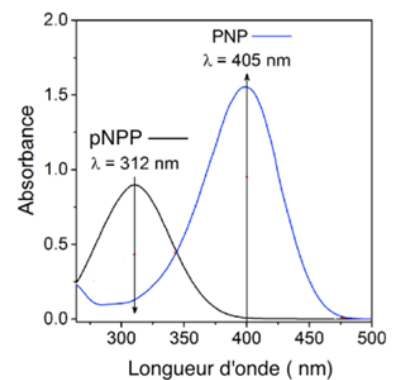
La réaction est arrêtée par l'ajout de 50 μ L de solution de soude à 1%.

L'absorbance des puits est mesurée à 405 nm.

Réaction enzymatique mise en jeu dans la révélation

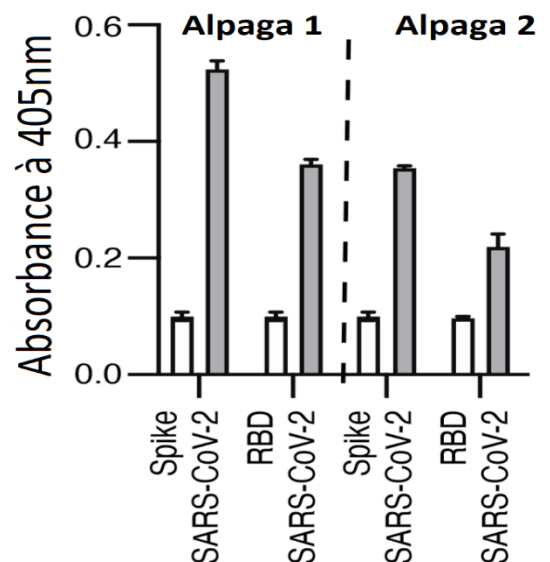


Spectres du pNPP et du pNP (même concentration molaire)



Analyse de la réactivité des sérums pré-immun (en blanc) et post-immun (en gris) vis-à-vis de la protéine Spike ou du domaine RBD de la protéine Spike.

Les sérums de deux alpagas 1 et 2 sont analysés



Document 10

Technique FRET

La technique FRET repose sur le transfert d'énergie par résonance entre 2 fluorochromes : le donneur D et le receveur R.

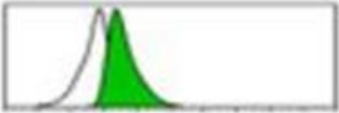
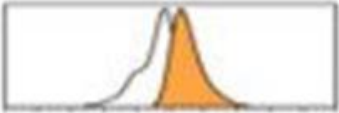
Le fluorochrome D est excité par une lumière de longueur d'onde appartenant à son spectre d'absorption.

L'énergie de fluorescence libérée par D excité est transférée par résonance à R (sans émission d'un photon). Le fluorochrome R passe alors dans un état excité et retourne à son état fondamental avec émission d'un photon.

Ce transfert d'énergie par résonance est possible si :

- R et D sont très proches (1 à 10 nm en règle générale).
- le spectre d'émission de D et le spectre d'excitation de R se recouvrent.

Le tableau ci-dessous présente 3 exemples de fluorochromes dérivés de DyLight avec leurs spectres d'absorption et d'émission.

DyLight 488	493/518 Absorption/Emission en nm	 518
DyLight 594	593/618 Absorption/Emission en nm	 618
DyLight 755	754/776 Absorption/Emission en nm	 776

Document 11

Analyse par FRET de l'effet des nanocorps sur l'interaction ACE2 - RBD

Les 2 protéines suivantes sont mélangées dans des proportions équivalentes (1 pour 1) :

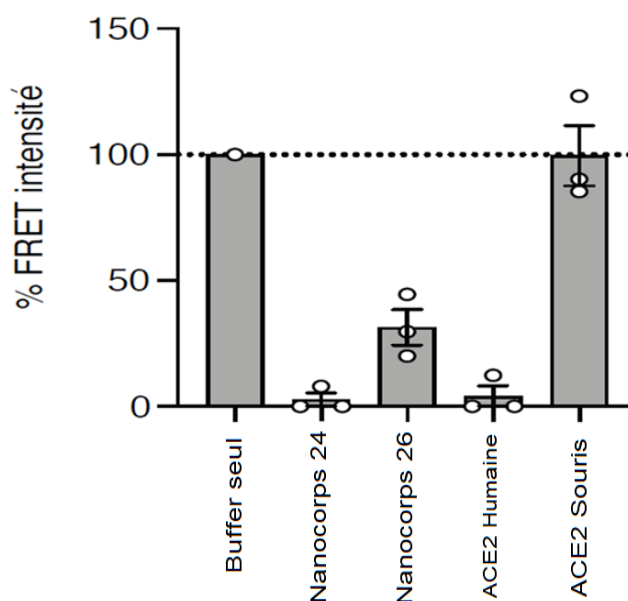
- domaine RBD de la protéine Spike marqué avec DyLight-488 ;
- protéine ACE2 marquée avec DyLight-594.

La mesure de FRET est réalisée dans les conditions suivantes :

- mélange initial additionné du tampon, noté « buffer seul » ;
- mélange initial additionné du Nanocorps 24 ;
- mélange initial additionné du Nanocorps 26 ;
- mélange initial additionné de protéine ACE2 humaine ;
- mélange initial additionné de protéine ACE2 souris ;

Toutes les protéines rajoutées sont non marquées.

Les résultats sont récapitulés dans le graphique ci-dessous :



FIN DU SUJET