Banque « Agro-véto »
TB – 0325

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 9 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 (Q13) est clairement identifiée.

Etude d'un candidat vaccin contre la maladie de Lyme

La maladie de Lyme, aussi appelée borréliose de Lyme, est causée par des bactéries, du genre *Borreliella*, portées et transmises par les tiques, notamment *Ixodes ricinus* en Europe et *Ixodes scapularis* aux États-Unis et Canada. Malgré de nombreuses recherches, aucun vaccin contre cette maladie n'est encore disponible.

Un vaccin candidat VLA15, actuellement en phase 3 de développement clinique, présente des premiers résultats de performance intéressants, qui ont été publiés en septembre 2023. VLA15 est basé sur une technologie de protéine recombinante dérivée de la protéine de surface Osp A (Osp : Outer surface protein), permettant de produire des anticorps capables de cibler six sérotypes des souches de *Borreliella* les plus communes aux États-Unis et en Europe.

Dans la première partie du sujet, la systématique et le mode de colonisation des vecteurs par des bactéries impliquées dans la maladie de Lyme seront étudiés, puis dans la seconde partie seront abordées les expérimentations mises en place pour développer et évaluer l'efficacité de la protéine OspA comme agent vaccinal.

Sources bibliographiques :

- Comstedt P, Schüler W, Meinke A, Lundberg U. The novel Lyme borreliosis vaccine VLA15 shows broad protection against Borrelia species expressing six different OspA serotypes. PLoS One. 2017 Sep 1;12(9):e0184357. doi: 10.1371/journal.pone.0184357. PMID: 28863166; PMCID: PMC5581183;

- Kurokawa, C., Lynn, G.E., Pedra, J.H.F. et al. Interactions between Borrelia burgdorferi and ticks. Nat Rev Microbiol 18, 587–600 (2020). https://doi.org/10.1038/s41579-020-0400-5

Partie 1. Le genre *Borreliella* et la maladie de Lyme

1. Le genre *Borreliella* et la notion de taxonomie évolutive

Le **document 1** présente la place du genre *Borreliella* dans la classe des spirochètes et précise les principales espèces impliquées dans la maladie de Lyme.

Q1. Réaliser un schéma annoté de l'organisation structurale et ultra-structurale type d'une cellule bactérienne du genre *Borreliella.*

Q2. Proposer une série de tests à mettre en œuvre au laboratoire, à partir des données fournies dans le **document 1**, permettant l'identification phénotypique du genre *Borreliella*. Après les avoir décrits façon synthétique, présenter les résultats attendus.

Des éléments de taxonomie génotypique sont utilisés pour compléter et préciser l'identification phénotypique.

Q3. Définir la donnée « DNA G + C content (mol %) ». Décrire le principe et la technique expérimentale de détermination de cette donnée.

2. Colonisation par *Borreliella burgdorferi* de la tique *Ixodes ricinus*

L'expression des 4 protéines de surface OspA, OspB et OspC (Osp : Outer surface protein) et VlsE (Variable Lipoprotein Surface-Exposed) dépend de l'environnement dans lequel les *Borreliella* se trouvent. Les variations d'expression permettent une adaptation rapide des bactéries et leur possible échappement, en particulier, aux systèmes immunitaires de la tique ou des hôtes mammifères.

Un opéron code pour les protéines OspA, et OspB

Q4. Proposer une définition du concept d'opéron. Expliquer un avantage de cette organisation génétique spécifique des procaryotes.

2.1. Construction des souches de *Borreliella burgdorferi*

Quatre souches de *Borreliella burgdorferi* génétiquement modifiées sont produites (**document 2**), afin de déterminer les rôles respectifs des 3 protéines OspA, OspB et OspC. Pour cela, des tiques *Ixodes ricinus* nourries avec du sang de souris préalablement infectées par les souches bactériennes génétiquement modifiées sont étudiées et la capacité de ces bactéries à coloniser les tiques est analysée en fonction des différentes constructions génétiques et de la ou des protéines exprimées.

Q5. A partir du **document 2**, discuter l'intérêt de :
- la cassette « flgBp-aacC1 » ajoutée pour la construction des souches génétiquement modifiées ;
- du « stop codon in the ospB ORF ».

2.2. Test de colonisation par *Borreliella burgdorferi* de la tique *Ixodes ricinus*

On se propose d'étudier le rôle de la protéine OspA :
- dans la colonisation de la tique par les bactéries ;
- dans le maintien des bactéries dans la tique, hôte primaire.

Le **document 3** présente l'acquisition par la tique *Ixodes ricinus* des souches de *Borreliella burgdorferi,* suite à un repas de sang pris sur les souris immunocompétentes Swiss-Webster infectées par les souches bactériennes sauvage ou génétiquement modifiées.

Q6. Indiquez deux objectifs que vous aurez identifiés pour ces manipulations et analyser les résultats présentés dans le **document 3**. Proposez une hypothèse suite à l'interprétation des résultats obtenus pour la construction « $A_p ospA$ ».

Q7. Argumenter le choix de la protéine OspA comme protéine candidate pour l'élaboration d'un vaccin contre la maladie de Lyme.

3. Préparation de suspensions de *Borreliella burgdorferi* « OspA + » calibrée en vue d'un test d'efficacité du vaccin VLA15

Le **document 4** présente le protocole de préparation et de contrôle des suspensions bactériennes destinées à vérifier l'efficacité du vaccin VLA15 après inoculation à différents lots de souris.

Q8. Présenter le principe de la cytométrie en flux utilisée pour valider les deux suspensions bactériennes. Identifier les deux paramètres suivis pour contrôler la qualité des suspensions préparées.

Q9. Présenter, sous forme de logigramme, les principales étapes du protocole mis en œuvre en précisant l'intérêt des étapes et réactifs utilisés.

Le **document 5** présente un extrait de la fiche technique du réactif LDS 751 utilisé dans le protocole de cytométrie en flux.

Q10. Dégager le principe du test au LDS 751.

Les résultats de cytométrie en flux peuvent être présentés :

- soit sous forme d'un diagramme (figure du **document 5**) ;
- soit sous forme d'une représentation secondaire ou scattergramme pour deux paramètres suivis : l'un en abscisse et l'autre en ordonnée, chaque point obtenu représentant une cellule.

Q11. Représenter l'histogramme « Nbre de bactéries = f (intensité de fluorescence LDS-751 Dye) » attendu pour les suspensions bactériennes ZS7 de *Borreliella burgdorferi* (ST1) et PHei de *Borreliella garinii* (ST5). Argumenter la représentation proposée.

Q12. Représenter le scattergramme obtenu pour l'une des suspensions bactériennes choisie avec : en abscisse l'intensité de fluorescence du flurorochrome PE et en ordonnée l'intensité de fluorescence du marqueur LDS 751. Argumenter la représentation proposée.

Q13. Question rédactionnelle : L'étude taxonomique génotypique du genre *Borrelellia* et du microbiote de la tique a bénéficié des dernières technologies de séquençage (technologies NGS *Next-generation sequencing*).

Présenter la méthode de séquençage de Sanger et ses principales évolutions techniques récentes. Dégager les grandes différences des technologies NGS par rapport à la méthode de séquençage de Sanger en illustrant leurs avantages par quelques exemples pertinents.

NB : les principes et techniques NGS ne sont pas à développer en détail.

Partie 2. La proteine OspA, principe actif du vaccin

1. La proteine OspA

La protéine OspA (OspA = Outer Surface Protein A) est l'un des antigènes dominants exprimés sur la membrane externe des spirochètes lorsqu'ils sont présents chez une tique.
Sa séquence primaire présente une cystéine N-terminale qui peut être ensuite la cible d'une modification post-traductionnelle, avec la fixation d'un lipide, ce qui fait d' OspA une lipoprotéine.
Le processus de modification post-traductionnelle est présenté dans le **document 6**.

Q14. Analyser la composition de la protéine OspA expliquant son caractère membranaire à partir des formes Pre-pro-OpsA et Lyso-OspA

Dans le cadre de la production d'un vaccin, la protéine OspA est produite par génie génétique dans un système bactérien, dans lequel il n'y a pas de modification post-traductionnelle.

Q15. Expliquer l'intérêt de ne pas maintenir la fixation de la partie lipidique dans le but de produire un vaccin injectable.

L'expression et la purification de la protéine OspA sans sa partie lipidique peuvent être réalisées de plusieurs façons.
La première possibilité repose sur des techniques biochimiques qui consistent à retirer la partie lipidique de la lipoprotéine après son expression.

Q16. Donner le nom d'une enzyme susceptible d'obtenir le résultat souhaité.

La deuxième façon est d'utiliser le génie génétique pour empêcher l'ajout de la partie lipidique sur OspA.

Q17. Expliquer comment obtenir par génie génétique la protéine OspA sans sa partie lipidique

2. Essai de stabilisation de la protéine OspA par ajout de ponts disulfures

Il a été démontré que la protéine OspA stabilisée donne de meilleurs résultats d'immunisation que la protéine dans sa conformation native. Cette stabilisation a été obtenue par l'introduction de ponts disulfures par mutagénèse dirigée.
Les modifications réalisées, sont présentées dans le **document 7**.

Q18. Préciser le ou les acides aminés mis en jeu dans les ponts disulfure et proposer un schéma moléculaire de pont disulfure.

Pour analyser l'effet stabilisant des ponts disulfures insérés par génie génétique, la température de dénaturation (melting temperature) est mesurée.

Q19. Proposer une hypothèse expliquant les différences entre les 5 protéines mutées en s'appuyant sur les positions des acides aminés modifiés.

Q20. Présenter, à l'aide d'un schéma, les modifications de structure d'une des 5 protéines générées soumise à une température voisine de la température de dénaturation

La mesure de la température de dénaturation est réalisée dans des conditions réductrices en utilisant le dithiothréitol (DTT) ou non réductrices (sans DTT). Les résultats sont présentés dans le **document 7.**

Q21. Expliquer l'influence des conditions réductrices ou non réductrices du milieu sur les ponts disulfures d'une protéine.

Q22. Analyser les températures de dénaturation obtenues pour la protéine OspA non modifiée (M2-His) et proposer une hypothèse quant à la présence de nouveaux ponts disulfures.

Q23. Choisir, parmi les 5 protéines mutées, la forme la plus stable. Argumenter.

3. Dosage des immunoglobulines produites par immunisation

Les chercheurs ont ensuite évalué l'immunogénicité des protéines OspA modifiées après immunisation de souris. Pour cela, ils ont déterminé la concentration en immunoglobulines anti-OspA dans le sérum des souris par une technique ELISA dont le protocole présenté dans le **document 8**.
Le SDS dont la structure est donnée dans le **document 9** présente des propriétés dites « amphiphiles ».

Q24. Présenter, à l'aide d'un schéma, l'action du SDS sur une protéine.

Q25. Expliquer alors le rôle du SDS dans cette technique ELISA.

Q26. Déterminer dans cette expérience le volume de SDS déposé dans chaque cupule.

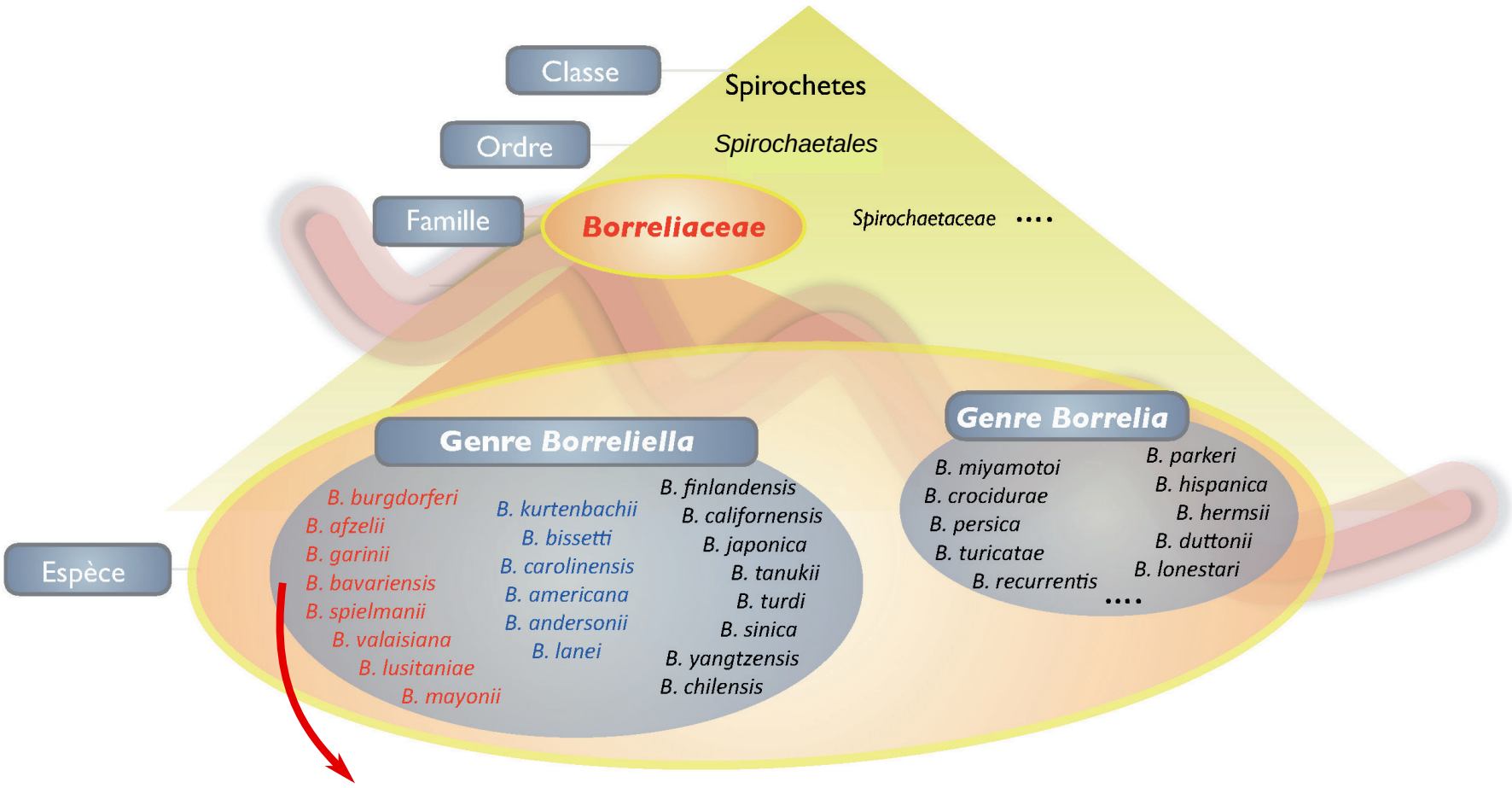
Q27. Schématiser l'architecture moléculaire obtenue dans les cupules au moment de la lecture de l'absorbance à 405 nm.

Q28. Proposer un protocole pour diluer le sérum à tester compte tenu des informations disponibles.

La réponse immunitaire peut être suivie par mesure de la concentration plasmatique en IgG ou en IgM.

Q29. Proposer une modification du protocole ELISA pour détecter des IgM plutôt que IgG.

Document 1 Agents infectieux responsables de la borréliose de Lyme



Borrelia impliquées en pathologie humaine

Les dernières données taxonomiques ont été publiées dans le Bergey's Manual en 2019.

Les cellules sont de forme hélicoïdale, d'un diamètre de 0,2 à 0,3 µm et de 15 à 30 µm de long. Les longueurs supérieures à 40 µm représentent deux cellules filles temporairement associées.

Les spirochètes possèdent à la fois une membrane externe et une membrane interne, un peptidoglycane de composition particulière.

Espèce type: *Borreliella burgdorferi*
Nombre d'espèces : 19

Les spirochètes *Borreliella burgdorferi* n'ont pas de lipopolysaccharide classique dans la membrane externe et sont décrits comme des bactéries à Gram négatif.
Le génome de *Borreliella burgdorferi* est composé d'un seul chromosome linéaire de 900 à 1000 kpb, de plusieurs plasmides linéaires, généralement de 15 à 60 kpb, et d'un ou plusieurs plasmides circulaires de 6 à 32 kpb, en simple exemplaire.

Teneur en G + C de l'ADN (mol %) : 28-29 ;

Les bactéries sont très mobiles dans un milieu liquide.

Elles se développent dans des conditions microaérophiles et à des niveaux élevés de CO_2 dans un milieu de bouillon complexe, qui comprend de la N-acétylglucosamine, des acides gras à longue chaine, des peptides courts et des acides aminés, des nucléosides, de l'albumine et une source ou un substitut de sérum.

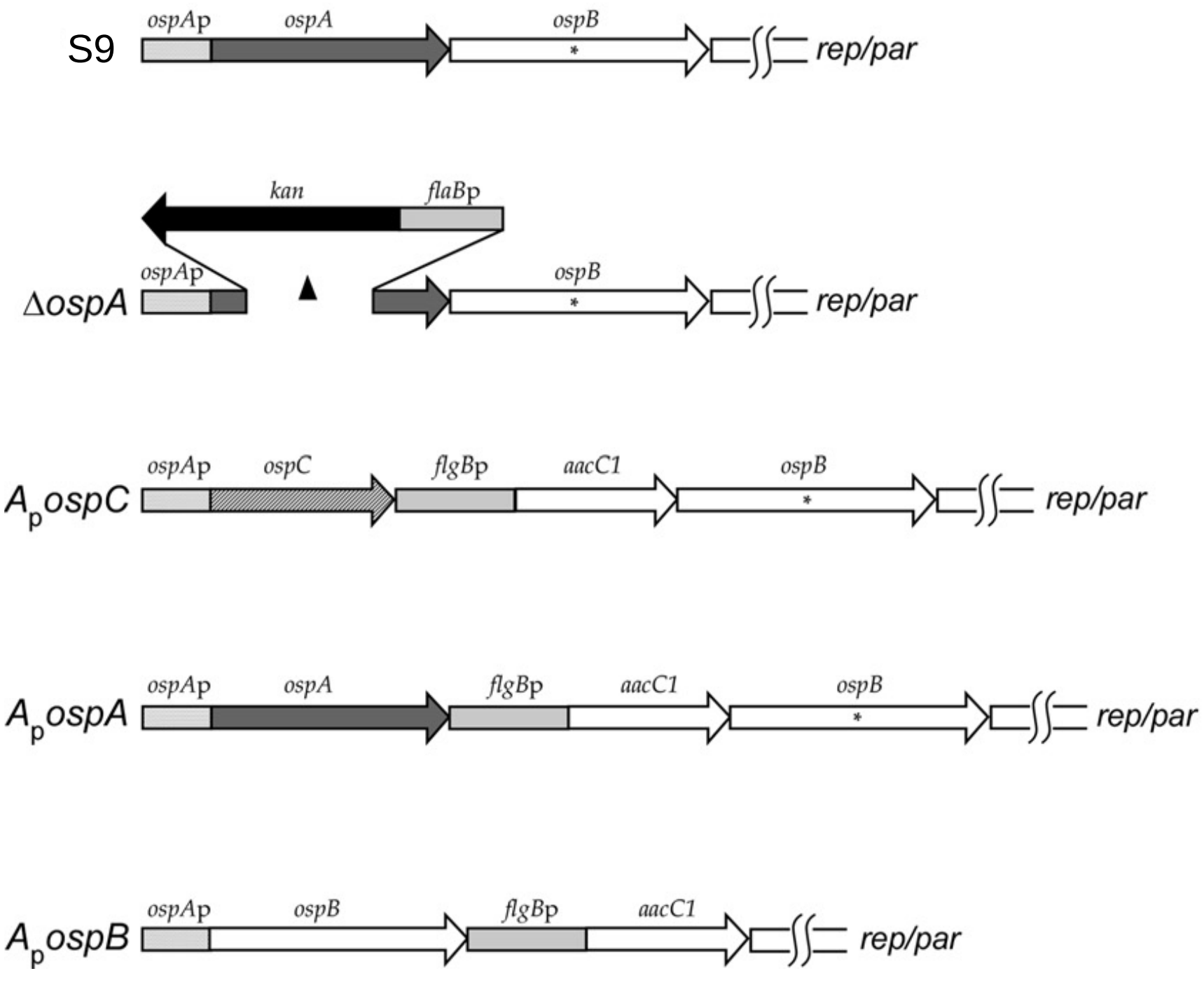
Les bactéries *Borreliella* sont chimio-organotrophes. Elles fermentent le glucose et le mannose et utilisent le glycérol et les disaccharides, maltose et chitobiose, comme sources de carbone.

Croissance optimale entre 33 et 38° C, inhibée au-dessus de 42° C.

Source adaptée : Barbour, A. G. and Qiu, W. (2019). Borreliella. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh). doi:10.1002/9781118960608.gbm01525.

Document 2 Constructions génétiques utilisées pour étudier les rôles des protéines Osp

Les constructions sont réalisées à partir de l'opéron Osp de la souche *Borreliella burgdorferi* de référence S9.

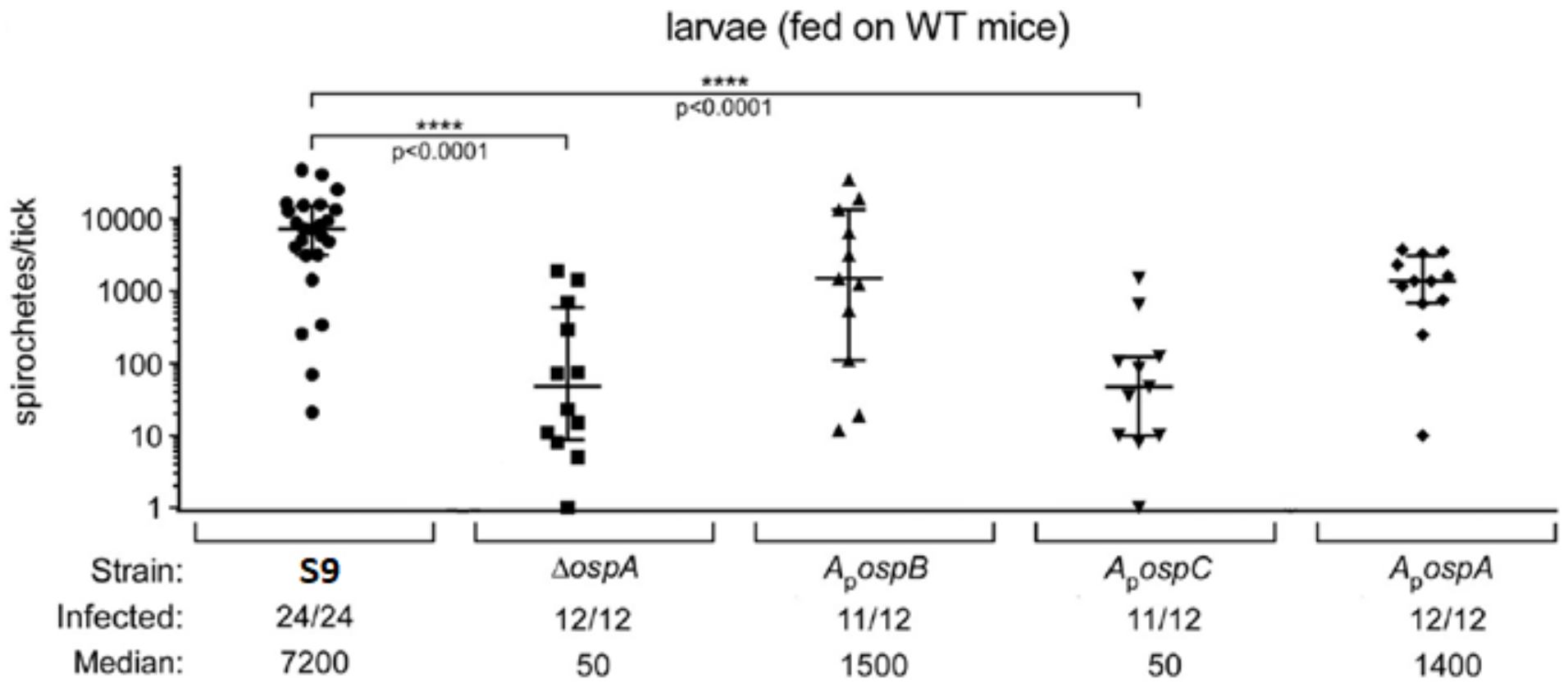


Legend of *ospAB* loci of strains used in this study:

- *ospAp*, *ospA* promoter;
- A capital delta indicates deleted sequences;
- An asterisk indicates the position of the stop codon in the *ospB* ORF;
- *kan flgBp* : the *flgB* promoter linked to the *kan* gene conferring kanamycin resistance ;
- *rep/par* indicates the nearby position of ORFs thought to be involved in the replication;
- *flgBp-aacC1* denotes a selectable marker (the *flgB* promoter linked to the *aacC1* gene) conferring gentamicin resistance.

Source: Tilly K, Bestor A, Rosa PA. Functional Equivalence of OspA and OspB, but Not OspC, in Tick Colonization by Borrelia burgdorferi. Infect Immun. 2016 Apr 22 ;84(5):1565-1573. doi: 10.1128/IAI.00063-16. PMID: 26953324; PMCID: PMC4862709.

Document 3 Résultats des tests de colonisation de la tique *Ixodes ricinus* alimentée sur des lots de souris infectées par 5 souches de *Borreliella burgdorferi.*



Les symboles (●, ■, ▲, ▼, ◆) représentent le nombre d'UFC dans les tiques individuelles, déterminé par l'ensemencement d'homogénats de tiques sur un milieu solide. Les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués.

La proportion de tiques infectées, « **Infected** », (nombre de tiques infectées par rapport au nombre total de tiques dénombrées) et la charge médiane, « **Median** », de spirochètes retrouvés par tique sont indiquées sous le graphique.

Document 4 Protocole de préparation et de contrôle des suspensions bactériennes

Afin de tester l'efficacité du vaccin, il faut disposer de souches de *Borreliella burgdorferi* calibrées et de différents sérotypes OspA. Pour cela, des souches ZS7 de *Borreliella burgdorferi* (ST1) ou PHei de *Borreliella garinii* (ST5) sont cultivées *in vitro* et analysées en cytométrie en flux.

- Cytométrie en flux :

- Les bactéries ont été fixées par l'ajout d'un volume égal de paraformaldéhyde à 4 % et par une incubation de 1 à 2 heures à température ambiante ;
- Les cellules ont été lavées avec du HBSS +2% BSA (HBSS-B) ;
- Un sérum polyclonal contenant des Ac anti-ospA est ajouté ;
- Les spirochètes lavés ont été remis en suspension dans 100 µL de sérum et incubés pendant 45 minutes à température ambiante. Les cellules ont été lavées avec du HBSS-B et ensuite remises en suspension dans 100 mL de HBSS-B ;
- 1 µL d'anticorps secondaire (IgG anti-souris de chèvre conjuguée au PE ; Beckman Coulter, USA) a été ajouté et incubé pendant 45 minutes à température ambiante dans l'obscurité ;
- Les spirochètes ont été lavés avec du HBSS-B puis remis en suspension dans 200 µL de HBSS contenant 5 mg de LDS 751 (Life technologies, USA) et incubés pendant 10 min à température ambiante dans l'obscurité ;
- Les spirochètes colorés ont été centrifugés et remis en suspension dans 200 µL de HBSS-B ;
- Les spirochètes marqués ont été mesurés avec un cytomètre de flux FC500 (Beckman Coulter).

Pour le test d'efficacité du vaccin, les souris reçoivent des injections de :

- 1×10^2 bactéries ZS7 de *Borreliella burgdorferi* (ST1) cultivées *in vitro*

ou

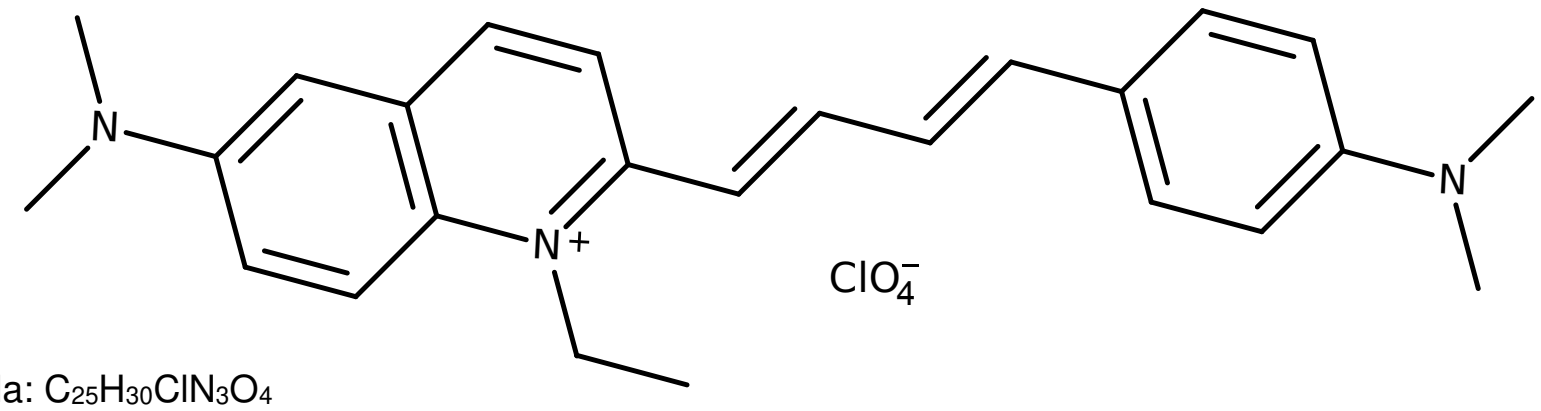
- 1×10^4 bactéries PHei de *Borreliella garinii* (ST5) cultivées *in vitro*.

L'infection des souris n'a été réalisée qu'avec des cultures où plus de 80% des spirochètes étaient positifs pour l'expression de la protéine de surface OspA.

Note : HBSS-B : Hank's Balanced Salt Solution Buffer ; PE : PhycoErythrine fluorochrome

Document 5 Réactif LDS 751 réf : 7595 Invitrogen™

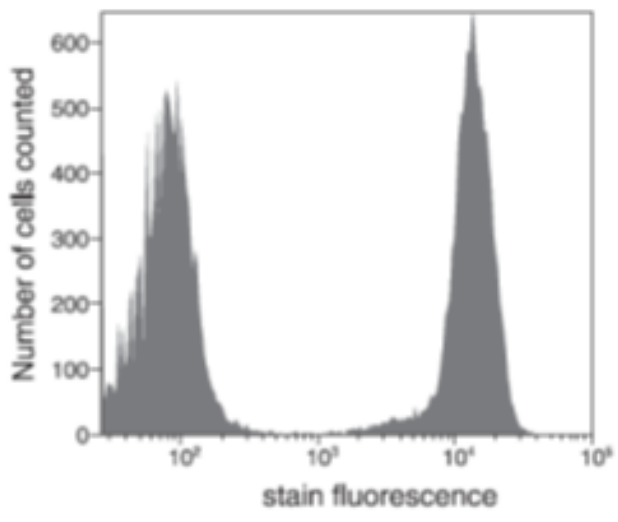
Chemical structure



Molecular Formula: $C_{25}H_{30}ClN_3O_4$
Molecular Weight: 471.98
CAS Name: Quinolinium, 6-(dimethylamino)-2-[4-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-butadienyl]-1-ethyl, perchlorate
CAS Number: 181885-68-7

Long-Wavelength LDS 751 Dye

Le LDS 751 est un colorant d'acides nucléiques perméable aux cellules, utilisé pour distinguer par cytométrie en flux les cellules intactes des cellules endommagées. Le LDS 751 peut être excité par le laser à argon-ion à 488 nm avec un pic d'excitation se situant à ~543 nm pour l'ADNdb. Le LDS 751 est particulièrement utile dans les analyses multicolores en raison de son maximum d'émission à grande longueur d'onde (~712 nm). La liaison du LDS 751 à l'ADNdb natif entraîne une forte augmentation de la fluorescence.

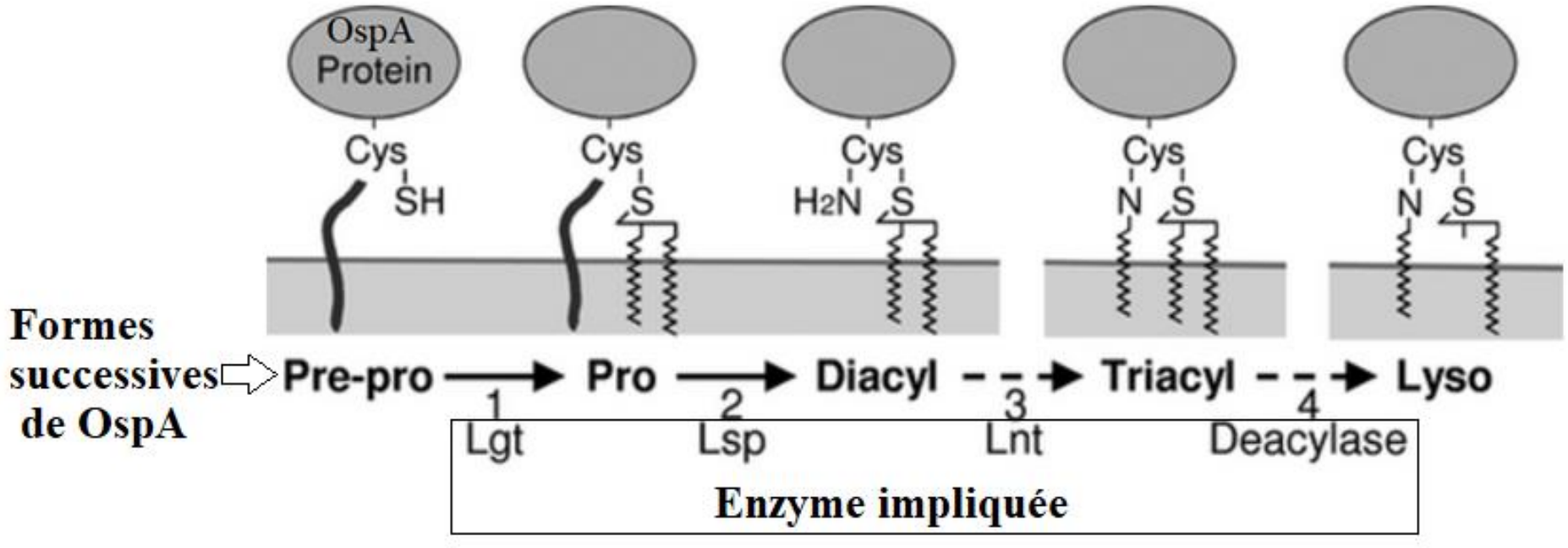


Live and dead cells distinguished by flow cytometry

Source : https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7595

Document 6 Représentation de la structure de la lipoprotéine OspA

Enchaînement des modifications post traductionnelles conduisant à la fixation d'un lipide sur la protéine OspA.



Lgt : preprolipoprotein diacylglyceryl transferase ; **Lsp** : lipoprotein signal peptidase ; **Lnt** : apolipoprotein N-acyltransferase.

Source : https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.12041

Document 7 Etude de l'insertion de ponts disulfures dans la protéine OspA

Le tableau ci-dessous présente les acides aminés modifiés au sein des 5 protéines M2A à M2E pour créer des ponts disulfure.

	Amino acid positions[a]		β-carbon atom distances[b]
Modification	**1st aa**	**2nd aa**	**modified OspA**
M2A	141 (Asp)	241 (Asn)	6.1 Å
M2B	182 (Glu)	269 (Lys)	3.9 Å
M2C	244 (Thr)	259 (Ala)	4.1 Å
M2D	165 (Tyr)	265 (Leu)	4.3 Å
M2E	182 (Glu)	272 (Leu)	4.3 Å

[a]Positions and residue indicated in parentheses for the 1st and 2nd amino acid (aa) corresponding to the five selected modifications (A to E).
[b] Distances in Ångström (Å) between the two β-carbon atoms based on the crystal structures of full-length OspA from *B. burgdorferi* (serotype 1) and a modified OpsA.

Le tableau ci-dessous présente les températures de dénaturation mesurées pour la protéine OspA en milieu réducteur (en présence de DTT) ou non réducteur. Les données pour la forme sauvage native (M2-His) et les 5 formes modifiées sont présentées.

	Melting temperatures[a]	
OspA monomer	**Non-reducing**	**Reducing**
M2-His	47.6°C	47.0°C
M2A-His	58.4°C	54.8°C
M2B-His	70.4°C	58.4°C
M2C-His	58.4°C	45.2°C
M2D-His	54.5°C	54.9°C
M2E-His	55.3°C	52.2°C

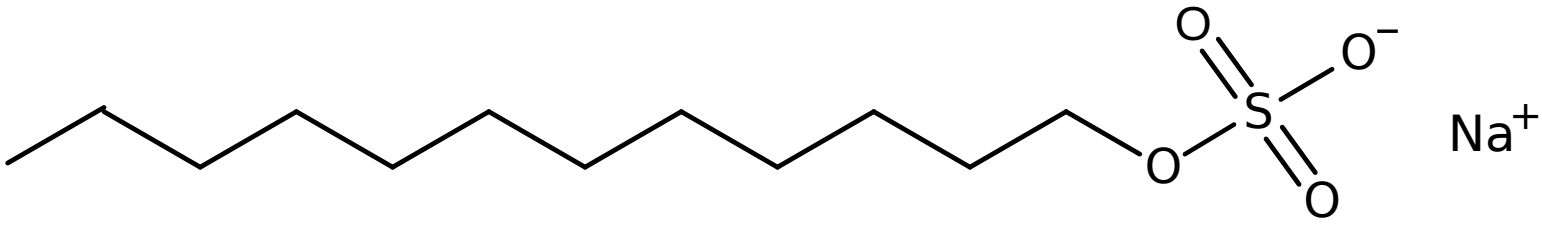
[a]T_m in degrees Celsius (°C) under non-reducing (without DTT) and reducing (with DTT) conditions.

Source adaptée : https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25409015/

Document 8 Protocole de dosage des immunoglobulines spécifiques de la protéine OspA par technique ELISA

Le protocole est le suivant :

- Les cupules ELISA ont été recouvertes de 50 ng de protéine OspA dilués dans du PBS (200 µL) et incubées à 4°C pendant la nuit.
- Les cupules ont ensuite été bloquées avec 50 µL d'une solution PBS - 1% de BSA additionnée de 0,5% de Tween-20 pendant 1 à 2 h à température ambiante.
- Les cupules ont été lavées avec 100 µL de PBS additionné de 0,1% Tween-20.
- Le sérum de souris à tester a été dilué en PBS (dilution au 1:5) et testé en double essai par incubation de 100 µL de sérum dilué par cupule pendant 1 h à température ambiante.
- Les cupules ont été lavées avec 100 µL de PBS additionné de 0,1% Tween-20.
- L'anticorps secondaire (IgG de lapin anti-souris conjuguée au peroxyde de raifort [HRP]) a été dilué au 1:2000 en PBS et incubé pendant 1 h à température ambiante
- Les cupules ont été lavées avec 100 µL de PBS additionné de 0,1% Tween-20.
- Un volume de 100 µL d'une solution d'ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) a été utilisé comme substrat.
- Une solution de SDS à 2% a été ajoutée dans chaque cupule pour obtenir une concentration finale à 1% de SDS.
- Lecture de l''absorbance à 405 nm.

Source adaptée : https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25409015/

Document 9 Structure du dodécyl sulfate de sodium ou SDS