

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 13 pages numérotées de 1 à 13.

Le sujet comporte 10 documents situés en pages 6 à 13.

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.

« Le système bactérien CBASS, à l'origine d'un mécanisme immunitaire anti-phagique »

Les bactériophages, virus capables d'infecter et de tuer les cellules bactériennes, peuvent entraîner un impact négatif dans le cadre de certaines bio-productions. Cela peut être le cas dans l'industrie laitière, lorsque la présence de bactériophages induit des défauts de saveur, de texture, d'aspect des produits, pouvant alors conduire à des larges pertes économiques.

Pour s'affranchir de ce problème, la compréhension des systèmes bactériens de lutte contre les infections phagiques est une stratégie majeure afin d'en améliorer la résistance de souche.

L'étude présentée ici s'intéresse à un système d'immunité antivirale, le système CBASS (Cyclic oligonucleotide Based Antiphagic Signal System), qui repose en partie sur :

- une nucléotidyl transférase cyclique, la cyclase Ssc-CdnE03, qui génère des nucléotides cycliques ;
- une protéine effectrice, CAP15, activée par les nucléotides cycliques, ayant pour effet d'inhiber, selon des mécanismes spécifiques à chaque système, la propagation virale.

Dans une première partie, seront présentés les outils et supports biologiques utilisés afin d'étudier le système CBASS.

Puis dans une seconde partie, certains des mécanismes impliqués dans cette défense immunitaire bactérienne seront explorés.

Sources bibliographiques:

- Banh DV, Roberts CG, Morales-Amador A, et al. Bacterial cGAS senses a viral RNA to initiate immunity [published correction appears in *Nature*. 2024 Jan;625(7993): E3. doi: 10.1038/s41586-023-06929-1]. *Nature*. 2023;623(7989):1001-1008. doi:10.1038/s41586-023-06743-9

- Guoqing Xia, Christiane Wolz, Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution, *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 21, 2014, Pages 593-601, ISSN 1567-1348, doi:10.1016/j.meegid.2013.04.022.

Partie 1. Préparation d'outils pour l'étude du système immunitaire via le système CBASS

Au cours de cette étude, les auteurs ont choisi de travailler sur le couple *Staphylococcus aureus* RN4220 / bactériophage $\Phi 80\alpha$ et ses dérivés. Des souches de staphylocoques génétiquement modifiées sont aussi utilisées.

1. Bactériophage $\Phi 80\alpha$

Le **document 1** présente l'organisation du génome du phage.

- Q1.** Dégager les caractéristiques structurales du phage et son mode de multiplication, à l'aide de l'analyse du génome du phage.

Le **document 2** propose le protocole suivi pour la production du phage en quantité.

- Q2.** Identifier et argumenter les étapes de purification du phage à partir du lysat.

On souhaite vérifier le titre de la suspension phagique initiale infectieuse en utilisant la technique des spots décrite dans le **document 2**.

On dispose d'une boîte de culture de $\varnothing = 90$ mm de *Staphylococcus aureus* en gélose semi - molle cœur cerveau (BHI) sur laquelle on peut réaliser 12 spots. On estime que l'on peut compter pour chaque spot, jusqu'à 50 PFU (Plaques Forming Unit) ou plages de lyse.

- Q3.** Argumenter, par le calcul, la préparation de la suspension phagique à utiliser pour cette vérification.
- Q4.** Présenter la réalisation pratique en présentant de manière détaillée les choix réalisés.

2. Bactériophage $\Phi 80\alpha$ - vir^{GFP}

Le phage $\Phi 80\alpha$ génétiquement modifié, nommé $\Phi 80\alpha$ - vir^{GFP}, est exclusivement lytique et exprime la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescence Protein). Ce phage est utilisé pour tester l'efficacité du système immunitaire bactérien.

La stratégie et les vecteurs utilisés pour produire le phage $\Phi 80\alpha$ - vir^{GFP} sont décrits dans le **document 3**.

- Q5.** Discuter le rôle des éléments apportés par le plasmide pDVB434. En déduire, avec l'aide complémentaire du document 1, un schéma simple de l'organisation du génome du phage $\Phi 80\alpha$ - vir^{GFP} exprimant la protéine GFP.
- Q6.** Présenter succinctement le fonctionnement du système CRISPR-Cas9 et expliquer en quoi ce système permet d'éliminer les phages non recombinants à l'étape 4 du protocole de production.
- Q7.** Proposer une méthode de modification génétique permettant d'obtenir des phages lytiques $\Phi 80\alpha$ - vir^{GFP} à partir de phages $\Phi 80\alpha$.

3. *Staphylococcus aureus* RN 4220

La souche *Staphylococcus aureus* RN4220, sensible au phage $\Phi 80\alpha$, est la souche utilisée. Les bactéries sont cultivées sur le milieu BHI Broth présenté dans le **document 2**.

- Q8.** Réaliser une analyse fonctionnelle de la composition du milieu sous forme d'un tableau.

Pour compléter l'étude du système immunitaire CBASS des souches RN4220 génétiquement modifiées sont produites. Le **document 4** regroupe les données.

Q9. Proposer une adaptation de la composition du milieu de culture pour les souches bactériennes OGM qui permette de garantir l'absence de culture de la souche bactérienne sauvage.

Q10. Présenter et argumenter l'allure des courbes de croissance obtenues en milieu BHI Broth dans les trois cas suivants :

- culture de la souche *S. aureus* RN4220, Wild type ;
- culture de la souche *S. aureus* RN4220, Wild type en présence du phage $\Phi 80\alpha$;
- culture de la souche *S. aureus* RN4220, Wild type en présence du phage $\Phi 80\alpha$ - virGFP.

Les souches bactériennes OGM de génotype ::Ssc-CdnE03-cm^R et ::Ssc-CBASS-cm^R sont obtenues par modifications génétiques au niveau du chromosome bactérien.

Q11. Argumenter ce choix technologique en présentant au moins un avantage et un inconvénient par rapport à des souches OGM contenant des plasmides recombinés.

Q12. Question rédactionnelle :

Le bactériophage $\Phi 80\alpha$ de cette étude est un phage, virus bactérien.

À l'aide d'exemples choisis, montrer la diversité structurale des virus et présenter les grandes étapes d'un cycle viral.

Proposer une méthode spécifique de mise en évidence et de quantification de virus lors d'une infection virale.

Partie 2. Etude du système immunitaire CBASS

Le système CBASS protège les procaryotes de l'attaque des bactériophages (virus des bactéries) par la production d'oligonucléotides cycliques, qui activent des protéines effectrices capables de provoquer la mort de la cellule hôte infectée.

1. Etude de la structure de la cyclase Ssc-CdnE03

La cyclase Ssc-CdnE03 est une enzyme qui est activée par sa liaison avec un ARN. La structure de la cyclase est présentée dans le **document 5** et la liste des acides aminés est disponible sur le **document 6**.

Q13. Nommer et présenter les caractéristiques ioniques des acides aminés K9, K13 et R83.

Q14. En s'appuyant sur les propriétés physico-chimiques des acides nucléiques, argumenter la liaison de l'ARN au niveau de la zone d'interaction ARN - cyclase Ssc-CDnE03.

2. Etude de l'affinité de la cyclase Ssc-CdnE03

Pour identifier les espèces d'ARN capables de se fixer à la cyclase Ssc-CdnE03, une chromatographie d'affinité a été réalisée.

Q15. Présenter, sous forme d'un schéma légendé et explicité, les étapes théoriques de la chromatographie d'affinité, en explicitant celles qui permettent l'obtention des ARN liés à la cyclase Ssc-CdnE03 dans l'étude présentée.

L'expérience de chromatographie d'affinité a été menée sur 3 échantillons :

- Échantillon sans ARN « - » ;
- Échantillon avec ARN bactérien de cellules non infectées « RN4220 » ;
- Échantillon avec ARN bactérien de cellules infectées par le bactériophage « $\Phi 80\alpha$ ».

Les ARN liés à la colonne de chromatographie d'affinité dans ces 3 conditions expérimentales ont été élués et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

L'électrophorégramme est présenté dans le **document 7**.

Q16. Préciser sur votre copie la polarité et le nom des électrodes « E1 et E2 » présentées sur le **document 7**.

Q17. Préciser l'intérêt de tester un échantillon d'ARN bactérien de cellules non infectées « RN4220 » sur la cyclase Ssc-CdnE03.

Q18. Analyser le gel d'électrophorèse obtenu et conclure sur les mécanismes d'activation de la cyclase Ssc-CdnE03.

3. Suivi de l'infection virale et de la réponse bactérienne par microscopie à fluorescence

Pour suivre l'infection virale, le bactériophage $\Phi 80\alpha$ – virGFP, génétiquement modifié pour exprimer la GFP (Green Fluorescent Protein), a été produit.

Cette protéine est très utilisée pour étudier les mécanismes fonctionnels biologiques. La structure de la GFP est présentée dans le **document 8**. Sa structure tridimensionnelle est modélisée dans le **document 8a**.

Q19. A partir de l'examen de sa structure tridimensionnelle, identifier la ou les structure(s) secondaire(s) présente(s) dans la protéine GFP.

Le chromophore mature de la GFP, présenté sur les **documents 8a et 8b**, est localisé au centre de la protéine.

Q20. Présenter la nature et le nombre précis des composants du chromophore.

Q21. Indiquer le type de modifications nécessaires pour obtenir le chromophore mature.

Le **document 8c** présente les spectres d'absorption et de fluorescence du chromophore au sein de la GFP.

Q22. En s'appuyant sur les spectres proposés, choisir la ou les longueur(s) d'onde utilisée(s) pour exciter et suivre l'émission de la GFP. Faire le lien avec le mécanisme de fluorescence.

Dans le but de suivre les modifications cellulaires induites par l'activation de l'immunité bactérienne contre les bactériophages, de l'iodure de propidium est utilisé. Sa structure est présentée dans le **document 9**.

Q23. Expliquer comment l'iodure de propidium permet d'évaluer l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne.

4. Étude de l'immunité bactérienne

Deux souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* génétiquement modifiées sont mises en présence du bactériophage $\Phi 80\alpha$ - vir^{GFP}.

Le suivi par microscopie à fluorescence des différents paramètres est présenté avec le résultat des mesures dans le **document 10**.

Q24. Discuter la survie des 2 souches de *Staphylococcus aureus* étudiées, à partir du **document 10a**, en présence du phage $\Phi 80\alpha$ - vir^{GFP}.

La protéine CAP15 est un effecteur qui perturbe l'intégrité de la membrane plasmique de la bactérie.

Q25. Analyser les résultats de fluorescence obtenus (**document 10b**). Discuter l'évolution de la présence d'iodure de propidium dans les cellules bactériennes de la souche « Ssc-CBASS ».

Q26. Proposer une hypothèse sur le mode d'action du système CBASS et notamment de l'effecteur CAP15 dans l'immunité des bactéries contre les bactériophages.

Les témoins de l'expérience ont été réalisés et validés par les chercheurs mais ils ne sont pas présentés ici.

Q27. Proposer la composition d'un témoin expérimental de votre choix en précisant son ou ses objectif(s).

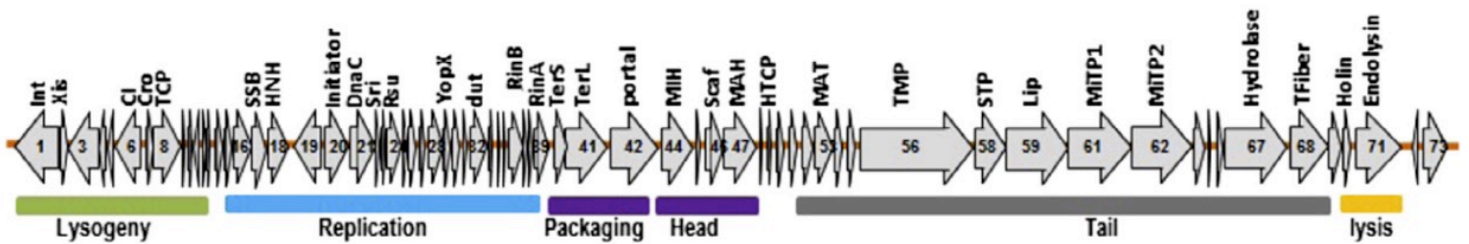
5. Conclusion

Q28. Avec l'ensemble des informations, établir un logigramme montrant la cascade des événements moléculaires intervenant dans le système CBASS étudié ici.

(Les termes suivants, obligatoires et minimum, sont attendus dans la réponse : CAP15, cyclase Ssc-CdnE03, nucléotides cycliques, bactériophage, infection, multiplication virale, membrane plasmique)

Q29. Proposer un lien entre les mécanismes étudiés ici sur les bactéries et la mort cellulaire par apoptose pouvant être observée dans les cellules humaines.

Document 1 : Organisation du génome du phage Φ80α



À noter: le détail de la signification des gènes n'est volontairement pas fourni.

Document 2 : Protocole de production du bactériophage Φ80α

Afin de produire un stock de phages à titre élevé, une culture d'une nuit de *S. aureus* RN4220 est diluée à 1:100 puis cultivée jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance (~90 min) en bouillon BHI, complété par 5 mM CaCl₂.

La culture, ajustée à une OD_{600 nm} de 0,5 (~1 × 10⁸ UFC•mL⁻¹), est alors infectée en ajoutant des phages Φ80α à une MOI (Multiplication Of Infection : nombre de phages infectants par bactéries vivantes) de 0,1 (~1 × 10⁷ PFU•mL⁻¹).

La culture infectée est cultivée à 37 °C sous agitation et suivie pour la lyse (la perte totale de turbidité est généralement observée après ~3 - 4 h).

Les lysats de culture sont centrifugés (4 300 g pendant 10 minutes). Le surnageant recueilli, est passé à travers un filtre à membrane stérile (0,45 μm) et conservé à 4 °C.

Les titres de phages sont déterminés en diluant en série au 1/10 le stock obtenu et en déposant un spot de 5 μL de chaque dilution sur de la gélose molle BHI préalablement inoculée par la souche *S. aureus* du RN4220 et complétée avec 5 mM CaCl₂. Après incubation 18 h à 37 °C, les plages de lyse individuelles (c'est-à-dire les zones de non croissance bactérienne) sont comptées et le titre viral est calculé.

- **BHI Broth:** Brain Heart Infusion Broth (<https://www.bio-rad.com>)

Base Medium

Peptone	10.0 g
Veal brain extract	12.5 g
Beef heart extract	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Disodium hydrogen phosphate anhydrous	2.5 g
Glucose	2.0 g
Distilled water	1,000 mL

Final pH at 25°C = 7.4 ± 0.2

Document 3 : Protocole de production du bactériophage $\Phi 80\alpha$ -vir^{GFP}

- Matière d'œuvre et étapes pour la production en quantité de phages $\Phi 80\alpha$ -vir^{GFP}

Bactériophage	Hôte	Insert	Étapes
$\Phi 80\alpha$ -vir ^{GFP}	<i>Staphylococcus aureus</i> ou OGM <i>S. aureus</i>	Séquence <i>gfp</i> insérée entre les séquences <i>gp18</i> et <i>gp19</i>	1) Transformation de <i>S. aureus</i> par pDVB434 ou par pDVB435 ; 2) Infection de <i>S. aureus</i> - pDVB434 par $\Phi 80\alpha$ -vir (cf. NB) et récupération de phages ; 3) Infection de <i>S. aureus</i> - pDVB435 par les phages récupérés à l'étape 2 ; 4) Récupération et concentration des phages $\Phi 80\alpha$ -vir ^{GFP} .

- Caractéristiques des vecteurs utilisés

pDVB434	Plasmide recombiné contenant la construction "séquence RBS - séquence codante du gène <i>gfp</i> ", flanquée en amont et en aval de 500 nt homologues correspondant respectivement aux séquences <i>gp18</i> et <i>gp19</i> du bactériophage $\Phi 80\alpha$.
---------	--

pDVB435	Plasmide de sélection contenant le système CRISPR-Cas9 de <i>S. aureus</i> ciblant uniquement une séquence spécifique du bactériophage $\Phi 80\alpha$
---------	--

NB : antérieure à cette étape de production de phages $\Phi 80\alpha$ -vir^{GFP}, la procédure d'obtention des bactériophages lytiques $\Phi 80\alpha$ -vir à partir des bactériophages $\Phi 80\alpha$ n'est pas décrite.

Document 4 : Principales souches utilisées

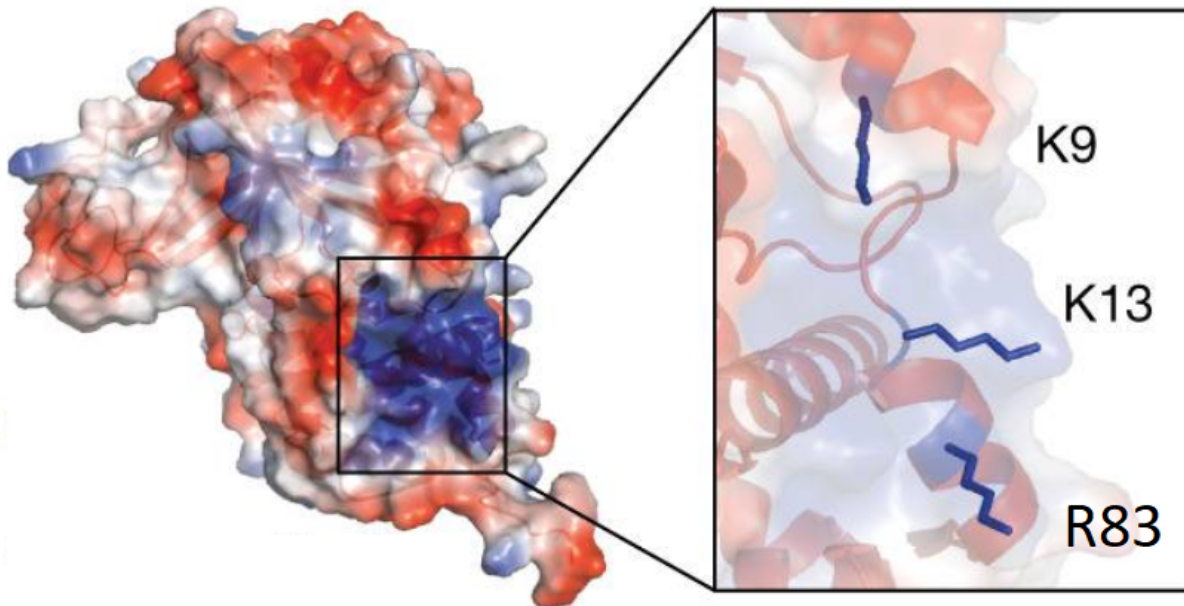
Species	Strain	Genotype	Origin
<i>S. aureus</i>	RN4220	Wild type	Kreiswerth <i>et al.</i> , Nature (1983)
<i>S. aureus</i>	RN4220	::Ssc-CBASS-cm ^R	Chromosomal integration
<i>S. aureus</i>	RN4220	::Ssc-CdnE03-cm ^R	Chromosomal integration

- **Ssc-CBASS** : sequence coding for the entire CBASS operon
- **Ssc-CdnE03** : sequence coding for the Ssc-CdnE03 enzyme involved in the CBASS operon
- **cm^R** : sequence encoding Chloramphenicol resistance

Document 5 : Structure de la protéine cyclase Ssc-CdnE03

L'étude de la structure tridimensionnelle de la protéine cyclase Ssc-CDnE03 montre la zone de liaison à l'ARN. La mesure du potentiel électrique de la cyclase Ssc-CDnE03 est présentée comme suit :

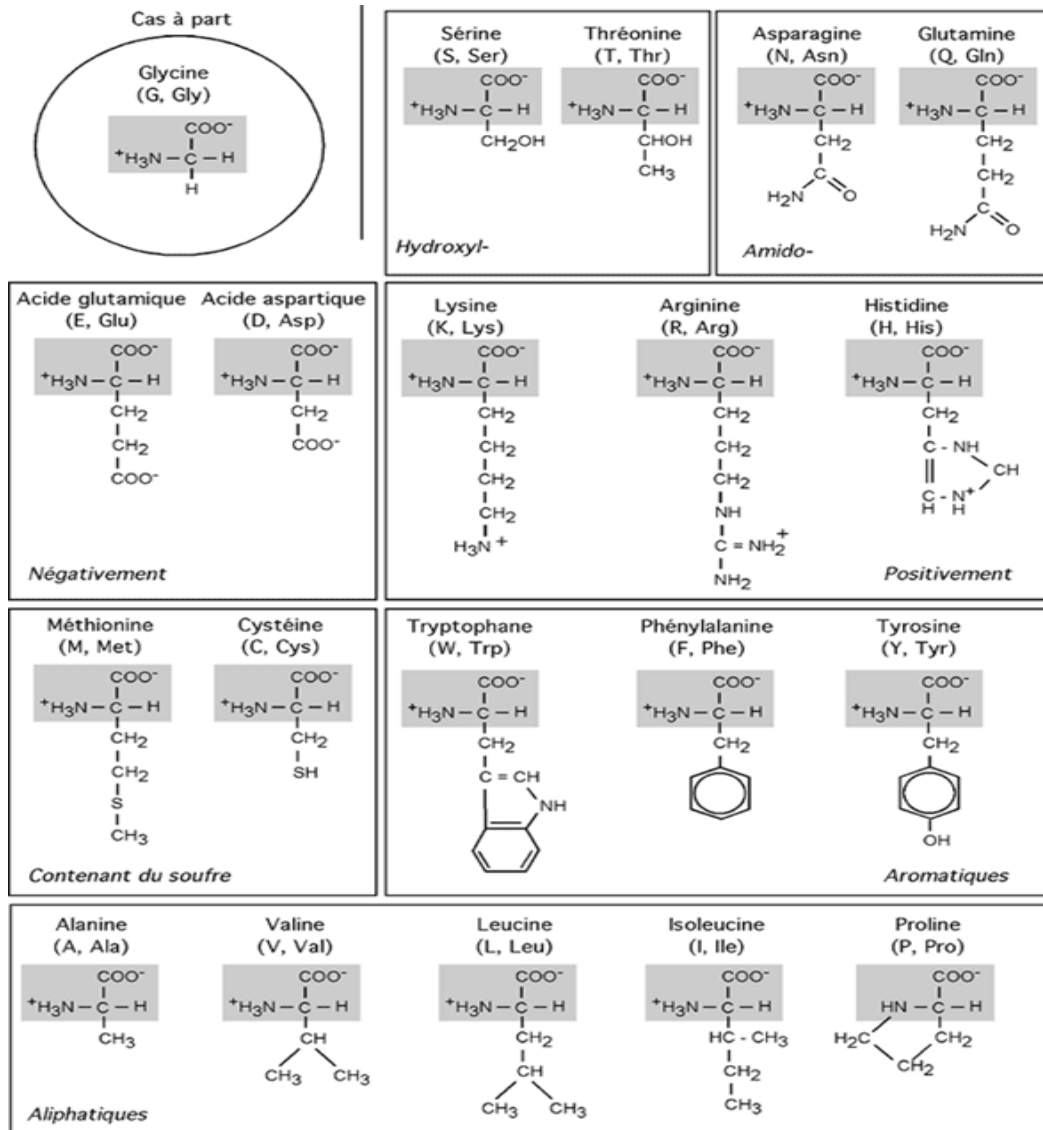
- ❑ les zones rouges présentent un potentiel électrostatique négatif ;
- ❑ les zones bleues présentent un potentiel électrostatique positif.



**Zone d'interaction
ARN-cyclase**

Adapté de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10686824/>

Document 6 : Structures et caractéristiques biochimiques des 20 acides aminés protéinogènes

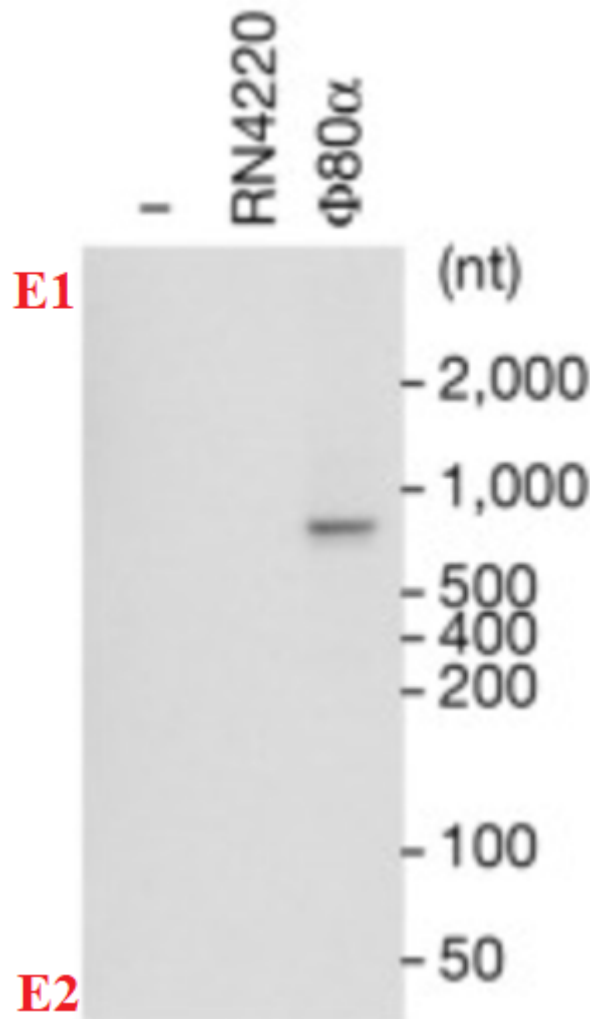


Document 7 : Electrophorèse des ARN purifiés par chromatographie d'affinité

Une chromatographie d'affinité de la cyclase Ssc-CdnE03 est réalisée à partir des 3 échantillons suivants :

- ❑ Échantillon sans ARN « - » ;
- ❑ Échantillon avec ARN bactérien de cellules non infectées « RN4220 »;
- ❑ Échantillon avec ARN bactérien de cellules infectées par le bactériophage « Φ 80 α ».

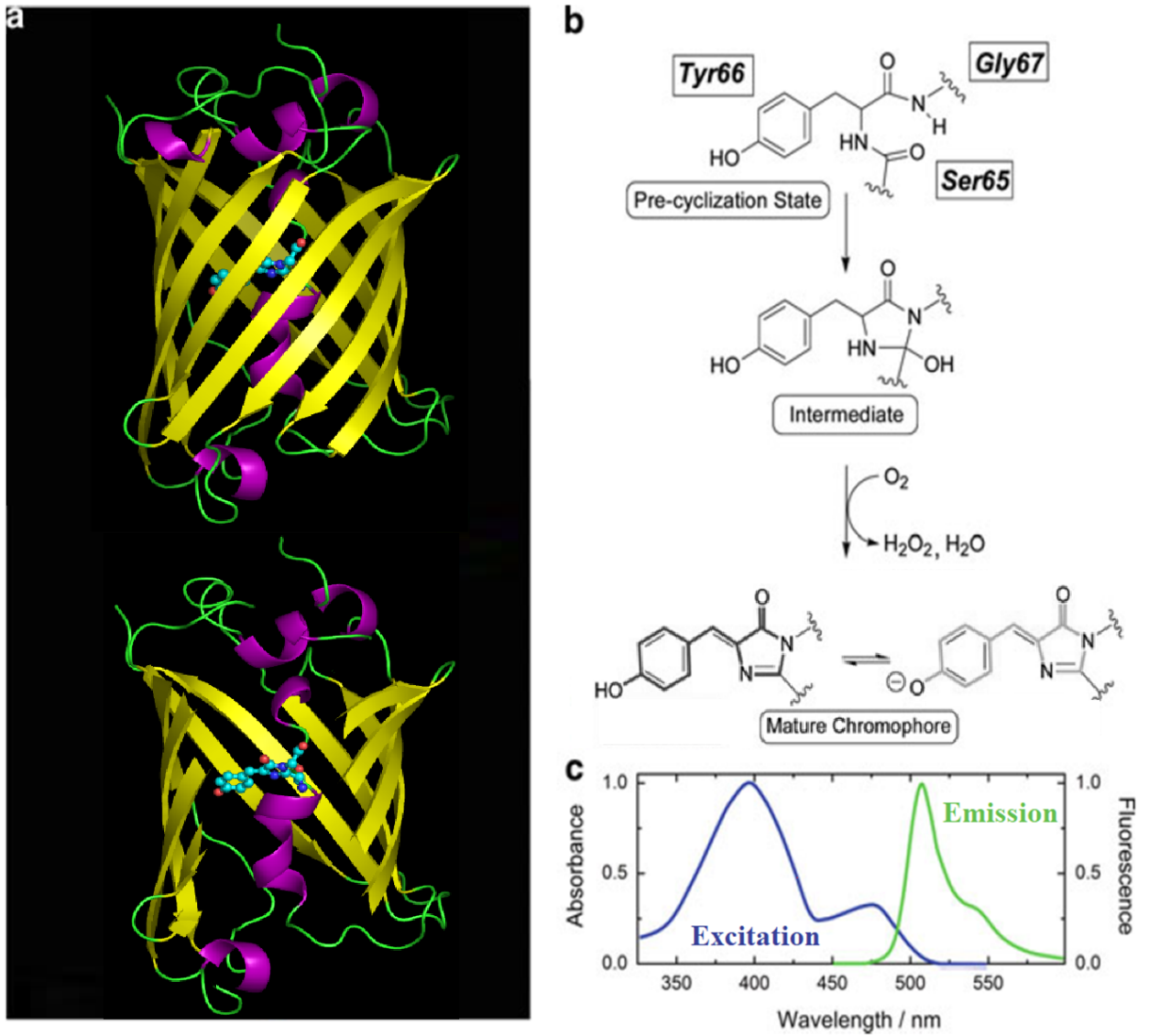
Une électrophorèse est ensuite réalisée sur l'éluat de chaque échantillon et présentée ci-dessous :



E1, E2 : électrodes.

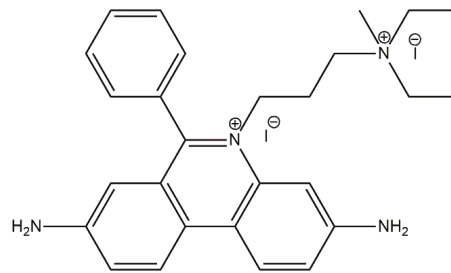
Adapté de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10686824/>

Document 8 : La protéine GFP (Green Fluorescent Protein)



Adapté de https://link.springer.com/chapter/10.1007/4243_2011_15

Document 9 : Structure de l'iodure de propidium et utilisation



Introduction

Propidium iodide (PI) is membrane impermeant and generally excluded from viable cells. PI is commonly used for identifying dead cells in a population and as a counterstain in multicolor fluorescent techniques. The counterstaining protocols below are compatible with a wide range of cytological labeling techniques—direct or indirect antibody-based detection methods, mRNA *in situ* hybridization, or staining with fluorescent reagents specific for cellular structures. These protocols can be modified for tissue staining.

Fluorescence Spectral Characteristics

When bound to nucleic acids, the fluorescence excitation maximum for PI is 535 nm and the emission maximum is 617 nm (Figure 1). PI can be excited with a xenon or mercury-arc lamp or with the 488 line of an argon-ion laser. Generally, PI fluorescence is detected in the FL2 channel of flow cytometers.

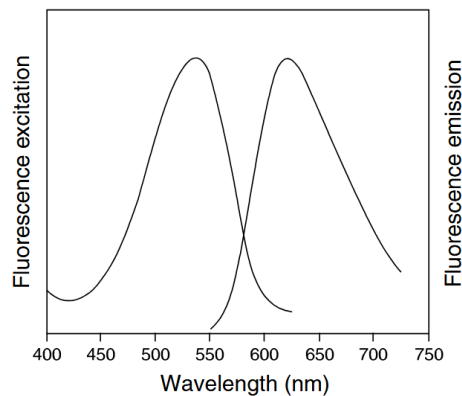


Figure 1. Fluorescence excitation and emission profiles of propidium iodide bound to dsDNA.

Source : <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp01304.pdf>

Document 10 Etude des mécanismes immunitaires bactériens

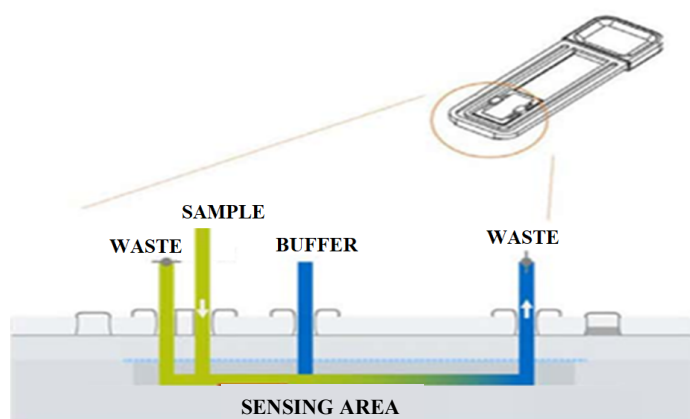
Deux souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* ont été génétiquement modifiées :

- La souche « Ssc-CBASS » possède deux gènes codant pour :
 - une protéine cyclase (Ssc-CdnE03) qui génère des nucléotides cycliques ;
 - un effecteur (CAP15) qui perturbe l'intégrité de la membrane plasmique de la bactérie.
- La souche « Ssc-CdnE03 » ne possède qu'un gène pour :
 - une protéine cyclase (Ssc-CdnE03) qui génère des nucléotides cycliques.

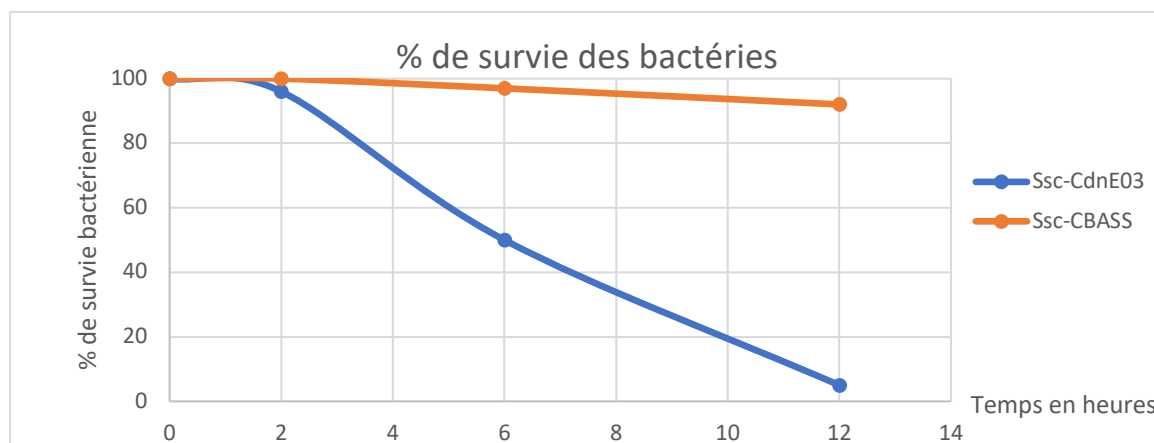
Les bactéries ont été déposées dans une chambre de dispositif à faible volume présentée ci-contre.

Après piégeage des bactéries dans la chambre, les étapes sont les suivantes :

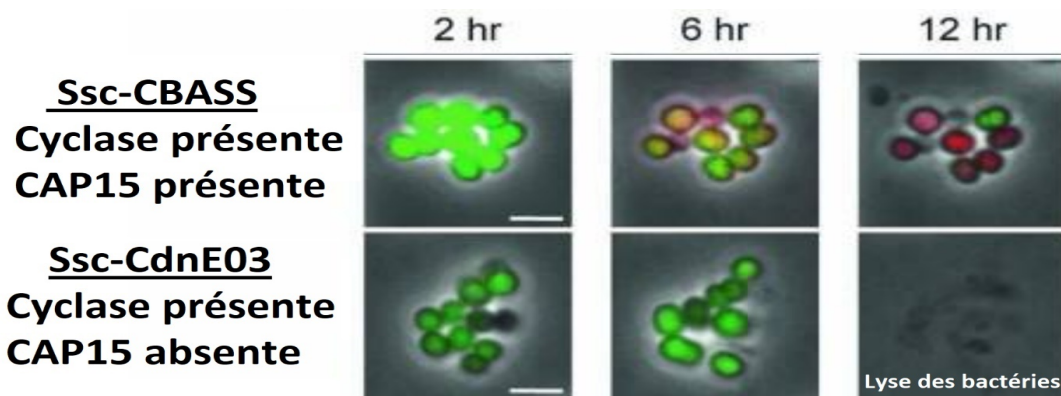
- ajout de milieu de culture « BHI » 5 mM CaCl_2 ; 10 μM d'iodure de propidium ;
- incubation pendant 1 h ;
- ajout de bactériophages « $\Phi 80\alpha$ vir^{GFP} » ;
- incubation pendant 60 min ;
- ajout du milieu de culture stérile « BHI » ;
- incubation pendant 1 h.



Document 10a : Le suivi de viabilité des bactéries est présenté dans le graphique suivant :



Document 10b : L'observation des bactéries en microscopie à épifluorescence est présentée ci-dessous :



Adapté de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10686824/>