

**Session 2009**

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR**

**BIOTECHNOLOGIES**

***MICROBIOLOGIE  
ET GÉNIE FERMENTAIRE***

Durée de l'épreuve : 2 heures  
Coefficient : 1

**CORRIGÉ ET BARÈME**

**Le virus respiratoire syncytial (VRS) : mise au point d'un vaccin recombinant  
(30 points, ramené sur 20 points sur la copie)**

Questions	CORRIGÉ	Barème
<b>Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition.</b>		<b>2 points</b>
<b>1. Le virus respiratoire syncytial</b>		<b>3,5 points</b>
<b>1.1</b>	Les cellules doivent être permissives, c'est-à-dire permettre la réalisation du cycle viral complet.	0,5 pt
<b>1.2</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. attachement du virus sur le récepteur</li> <li>2. pénétration du virus par endocytose</li> <li>3. vésicule d'endocytose</li> <li>4. fusion des membranes et libération de l'AQRN viral</li> <li>5. pénétration dans le noyau</li> <li>6.1. ARN négatif</li> <li>6.2. ARN positif</li> <li>6.3. ARN négatif</li> <li>6.4. ARN positif</li> <li>7. production des protéines de structure et enzymatique</li> <li>8. sortie des ARN négatif et positifs du noyau</li> <li>9. migration des ARN négatifs vers la membrane cytoplasmique</li> <li>10. enchâssement des protéines virales dans la membrane cytoplasmique</li> <li>11. bourgeonnement de la membrane cytoplasmique</li> <li>12. libération des particules virales complètes</li> </ol>	3 pts
<b>2. Mise au point d'un vaccin recombinant contre le VRS</b>		<b>6,5 points</b>
<b>2.1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>N-Z amine AS</b> : caséine hydrolysée, source de C, d'N</li> <li>• <b>Yeast extract</b> : extrait de levure, source de facteurs de croissance et d'oligoéléments</li> <li>• <b>solution 5052</b> : <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>glucose</b> : <b>glucide, source de C et d'énergie</b> utilisée en premier lieu par les cellules</li> <li>- <b>lactose</b> : <b>glucide, source de carbone et d'énergie</b> mais surtout permet l'induction des gènes sous le contrôle du promoteur <i>lac</i></li> </ul> </li> </ul>	1,5 pt

2.2	<p>L'induction de l'expression de la protéine recombinante est sous le contrôle du lactose ou d'un analogue comme l'IPTG.</p> <p>Dans le milieu ZYM-5052, l'induction par le lactose suivra le phénomène de <b>diauxie</b>. Le glucose sera utilisé en premier et participera à la production de biomasse. Lorsque le glucose deviendra limitant, le lactose sera utilisé grâce à la <b>levée de la répression</b> par le glucose. Le lactose présent alors dans la cellule sera <b>l'inducteur</b> d'une part de l'opéron lactose et d'autre part de l'expression de la protéine recombinante.</p>	1 pt
2.3	<p><u>Biomasse</u> : le milieu ZYM-5052 permet une biomasse de 12,1 UA alors que le milieu LB ne permet que 3,5 UA. Donc amélioration importante de la production de biomasse.</p> <p><u>Production de protéine</u> : sur l'électrophorégramme, présence d'un spot important en milieu ZYM-5052 à environ 100 Kda, dans la fraction totale, alors qu'en milieu LB on observe une bande de faible densité. Donc l'expression de la protéine recombinante est avérée dans le milieu ZYM-5052.</p>	1,5 pt
2.4	<p>Famille des bêta-lactamines. Présence d'un noyau <math>\beta</math>-lactame.</p>	0,5 pt
2.5	<p>L'ampicilline est une <math>\beta</math>-lactamine qui va donc se lier aux PLP (protéines liant les pénicillines), enzymes bactériennes impliquées dans les transpeptidations et les transglycosylations mises en œuvre lors de la biosynthèse du peptidoglycane. Par analogie de structure avec le dipeptide D Ala-D Ala du disaccharide pentapeptide (précurseur de synthèse du peptidoglycane), les <math>\beta</math>-lactamines jouent le rôle de substrat suicide des PLP (liaison covalente formée). Ainsi les PLP ne peuvent plus participer à la biosynthèse du peptidoglycane et il y a arrêt de la synthèse de la paroi des bactéries.</p>	1,5 pt
2.6	<p>Le gène AmpR code pour une <math>\beta</math> lactamase qui hydrolyse la liaison amide du cycle <math>\beta</math> lactame. L'ampicilline ne peut alors plus se lier aux PLP.</p>	0,5 pt
<b>3. Production d'une protéine virale recombinante en fermenteur pré-pilote</b>		<b>8 points</b> <b>(13,5 x2)</b> <b>3</b>
3.1	<p><b>a : circuit de refroidissement</b>, permet de refroidir le milieu pendant la croissance.</p> <p><b>b : condenseur</b>, permet de refroidir les vapeurs de milieu afin d'éviter l'évaporation.</p> <p><b>c : mobile d'agitation</b> type turbine Rushton, permet d'homogénéiser les différentes phases du moût.</p> <p><b>d : moteur</b>, entraîne la rotation du mobile d'agitation.</p> <p><b>e : électrovanne</b>, permet, sous le contrôle d'un régulateur, l'apport d'eau froide dans le circuit de refroidissement.</p>	1,5 pt

3.2	La $C_{LO_2}$ critique est la concentration en dioxygène dissous en dessous de laquelle le dioxygène devient un facteur limitant pour la croissance.	0,5 pt
3.3	On sait que le VVM est de 0,4 (volume d'air/volume (utile) de fermenteur /min). VVM = débit d'air/volume utile = débit d'air/(volume total fermenteur x (2/3)) Débit d'air = VVM x volume total fermenteur x (2/3) Débit d'air = 0,4 x 7,5 x (2/3) = 2 L /min	1 pt
3.4	<b>COM :</b> La concentration en dioxygène dissous chute assez rapidement dans le milieu pendant que la souche est en phase exponentielle de croissance. <b>INT :</b> les bactéries consomment de façon exponentielle le dioxygène dissous.  <b>COM :</b> En fin de phase exponentielle on constate que la $C_{LO_2}$ devient inférieure à 20 % (la $C_{LO_2}$ critique). <b>INT :</b> le dioxygène devient un facteur limitant pour la croissance, la croissance ralentit.	1 pt
3.5	Les conditions d'aération ne semblent pas convenables. La régulation de la $pO_2$ n'a pas permis de la maintenir au dessus de 20 %.	0,5 pt
3.6	Tracer du graphe $\ln(DO)=f(t)$ ou équation de la partie linéaire. Détermination de la phase expo. $q_{X_{expo}} = \Delta \ln DO_{600} / \Delta t$ $= (\ln(DO_{600})_{t=18,6} - \ln(DO_{600})_{t=9,2}) / (t=18,6 - t=9,2)$ $= (\ln 24,53 - \ln 1) / (18,6 - 9,2) = \mathbf{0,34 \text{ h}^{-1}}$ $G = \ln 2 / q_{X_{expo}} = \ln 2 / 0,34 = \mathbf{2 \text{ h}}$	1,5 pt
3.7	$P_{ht} = P_{hvt} \times V_{utile}$ avec $V_{utile} = V_{total} \times (2/3) = 7,5 \times (2/3) = 5 \text{ L}$ $P_{hvt} = ([X]_{final} - [X]_{initial}) / (t_{final} - t_{initial}) = [(DO_{600})_{t_{final}} - (DO_{600})_{t_{initial}}] \times FP / (t_{final} - t_{initial})$ $P_{hvt} = (40,04 - 1,00) \times 0,7 / (23,6 - 9,2) = 1,89 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ $P_{ht} = 1,89 \times 5 = \mathbf{9,5 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}}$	1,5 pt
3.8	$P_m = ([P]_{max} - [P]_{initial}) / (t_{max} - t_{initial}) = (180 - 0) / (23,6 - 19) = \mathbf{39,1 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}$	0,5 pt