Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV©

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :
www.formav.co/explorer

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOANALYSES ET CONTRÔLES

ÉPREUVE E3 – UNITÉ U33

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2018

_____

Durée : 2 heures

Coefficient : 3

_____

Calculatrice interdite

Matériel autorisé :

Dictionnaire anglais-français

Compétences évaluées :

C2.1. Analyser une problématique	**8 points**
C2.2. Analyser un protocole, une fiche, un dossier technique ou des documents	**13 points**
C2.4. Présenter des informations, analyser, interpréter, valider des résultats	**11 points**
C3.1. Adapter ou optimiser des procédures ou des procédés	**6 points**

L'expression écrite, le soin et la formulation des réponses (concision, qualité des schémas, des tableaux…) seront évalués à hauteur de 2 points sur 40 points.

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 9 pages, numérotées de 1/9 à 9/9.

Base nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Grippe aviaire : Techniques de détection et d'identification, enjeux majeurs dans la lutte contre la pandémie

Le diagnostic d'infections virales par la grippe A chez les volailles ou les oiseaux sauvages est un enjeu de santé humaine et vétérinaire persistant. Il est rendu difficile notamment par des variations de pathogénicité du virus selon les hôtes aviaires.

La méthode standard de diagnostic au laboratoire repose sur l'isolement du virus, son typage H et N, et son profil de pathogénicité. Cette technique de diagnostic est cruciale pour une analyse virologique complète, en particulier lors d'une épidémie initiale, mais les délais qu'elle implique ne sont pas compatibles avec un contrôle efficace de la maladie.

L'évolution récente des techniques de biologique moléculaire permet de mettre en place de nouvelles méthodes de diagnostic accéléré :

- RT-PCR ;
- amplification isotherme d'acide nucléique ;
- méthodes de séquençage de nouvelle génération ;
- immuno-chromatographie…

Ces techniques contribuent à un diagnostic plus simple et plus rapide. Les avantages de chacune de ces techniques diagnostiques doivent permettre d'améliorer l'efficacité du contrôle de la grippe aviaire.

Référence : M. Okamatsu et al. / The Veterinary Journal 215 (2016) 82–86

1. Les virus de la grippe

Le virus de la grippe ou virus Influenza type A, dont la structure est présentée dans le **document 1**, est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité négative. Le génome viral est constitué de 8 segments d'ARN qui subissent un épissage alternatif schématisé dans le **document 2**.

Q1. Expliquer l'intérêt de cet épissage alternatif en lien avec la structure du génome viral.

Q2. Justifier la présence de la polymérase au sein de la particule virale en précisant son activité enzymatique.

2. Isolement du virus par culture cellulaire

2.1. Culture sur œufs embryonnés

La culture sur œufs embryonnés décrite dans le **document 3** est la technique de référence pour diagnostiquer les premiers cas cliniques et obtenir la souche virale isolée nécessaire aux autres analyses de laboratoire. Les échantillons sont prélevés à partir d'animaux morts ou vivants (fèces, cloaque, prélèvement oro-pharyngé) par écouvillonnage.

Q3. Expliquer l'intérêt d'additionner des antibiotiques au tampon PBS. Préciser l'importance de moduler leur composition en fonction du type de prélèvement.

Q4. Donner la signification de « SPF ». Déduire l'importance de l'utilisation d'œufs SPF pour la réussite de la technique.

Base nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

2.2. Culture *in vitro* sur lignée cellulaire

La culture de cellules de mammifères MDCK (Madin Darbin Canine Kidney) peut également être une alternative pour la production de souches virales d'influenza. Ces cellules sont cultivées en adhérence dans du milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) complémenté de sérum de veau fœtal (SVF), selon le protocole de maintenance présenté dans le **document 4**. Leur temps de génération est d'environ 24 heures.

Q5. Exposer les rôles et les effets du sérum de veau fœtal en culture cellulaire. En déduire le rôle des lavages au PBS avant la trypsination.

Un nouveau type cellulaire est à l'étude pour la culture de virus Influenza. Il s'agit des cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney) qui ont la particularité de cultiver en suspension. Afin de valider cette lignée cellulaire pour l'étude du virus de la grippe aviaire, l'expression de récepteurs de type acide sialique sur la membrane plasmique des cellules est recherchée par cytométrie de flux couplée à un marquage fluorescent dont le principe est représenté dans les **documents 5** et **6**.

Q6. Schématiser l'édifice moléculaire présent sur les cellules et détecté par le FACS.

Q7. Commenter les résultats du FACS pour tous les contrôles. Interpréter les résultats obtenus pour les cellules HEK-293 et conclure sur l'intérêt de leur choix pour la culture du virus Influenza.

Q8. Proposer une méthode permettant de vérifier l'infectiosité du virus Influenza sur les cellules HEK-293.

3. Détection par génie moléculaire : RT-PCR multiplex

Le principal inconvénient de l'isolement du virus est le temps nécessaire à l'obtention du diagnostic. Il nécessite de plus du matériel biologique contrôlé (œufs embryonnés, lignées cellulaires en culture) et des installations de laboratoire de biosécurité.

Une détection directe dans des échantillons d'un ou plusieurs segments du génome de la grippe A par RT-PCR permet une rapidité et une sensibilité améliorées pour la détection, le typage et le sous-typage du virus de la grippe. Un protocole de RT-PCR multiplex permettant de détecter plusieurs souches du virus Influenza est présenté dans le **document 7**.

Q9. Identifier le but de l'étape 2.

Q10. Dans le tableau 1 de l'étape 3, les séquences des amorces sont données par paire. Schématiser un segment d'ADN double brin à amplifier en positionnant les deux amorces.

Le **document 8** présente un exemple de résultat obtenu par cette méthode.

Q11. Expliquer le sens de migration des échantillons.

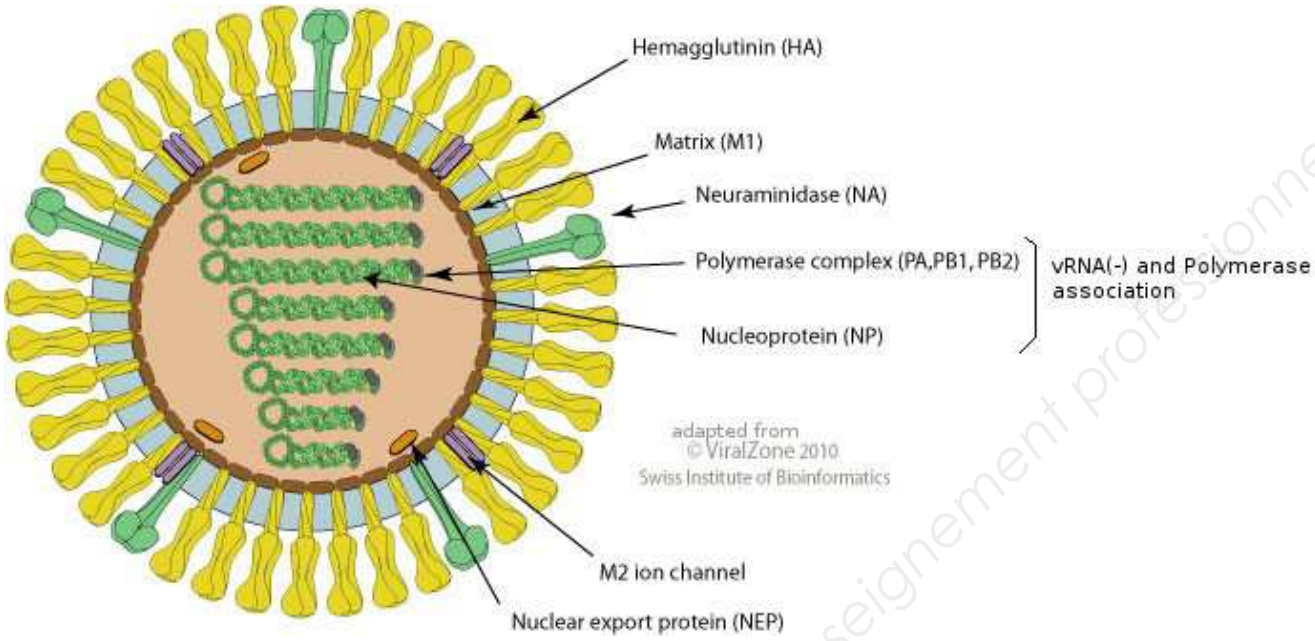
Q12. Proposer une composition possible du contrôle négatif.

Q13. Analyser l'électrophorégramme pour valider la technique et conclure sur le type et le sous-type des trois souches testées.

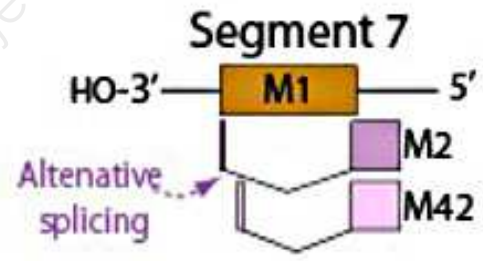
Q14. Conclure sur l'intérêt de cette technique de RT-PCR multiplex par rapport à une RT-PCR classique.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 1 : Structure du virus *Influenza*



Document 2 : Exemple d'épissage alternatif sur le segment 7 du génome viral



Adapted from
© ViralZone 2014
SIB Swiss Institute of Bioinformatics

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 3 : Culture de virus sur œuf embryonné

La méthode de référence pour multiplier le virus influenza A est l'inoculation d'œufs embryonnés de poulet SPF (« *specific pathogen free* »).

- Dilution des échantillons en tampon PBS (*isotonic phosphate-buffered saline*, pH 7,0–7,4) additionné d'antibiotiques (pénicilline (2000 units/mL), streptomycine (2 mg/mL), gentamycine (50 µg/mL) et mycostatine (1000 units/mL) pour les prélèvements oro-pharyngés, mais 5 fois plus concentrés pour les échantillons de fèces ou cloaque).
- Clarification des suspensions par centrifugation à 1000 g des suspensions en PBS + antibiotiques.
- Inoculation du sac allantoïque des œufs embryonnés SPF de 9 à 11 jours d'incubation.
- Incubation à 37 °C (± 2 °C) durant 2 à 7 jours.
- Refroidissement des œufs 4 h à 4 °C.
- Prélèvement du sac allantoïque et criblage par différentes techniques (immunodiffusion en gel, ELISA, RT-PCR, …)

d'après OIE Terrestrial Manual 2015

Document 4 : Maintenance des cellules MDCK

Les cellules MDCK sont cultivées en adhérence (flasques T-75) dans du milieu EMEM supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur (30 min à 56 °C). Ces cellules sont re-ensemencées 2 à 3 fois par semaine dans du milieu frais, à des densités allant de 0,05 à $0{,}15 \cdot 10^6$ cellules/mL (volume de culture : 10 mL), et incubées à 37 °C et 5 % CO_2.

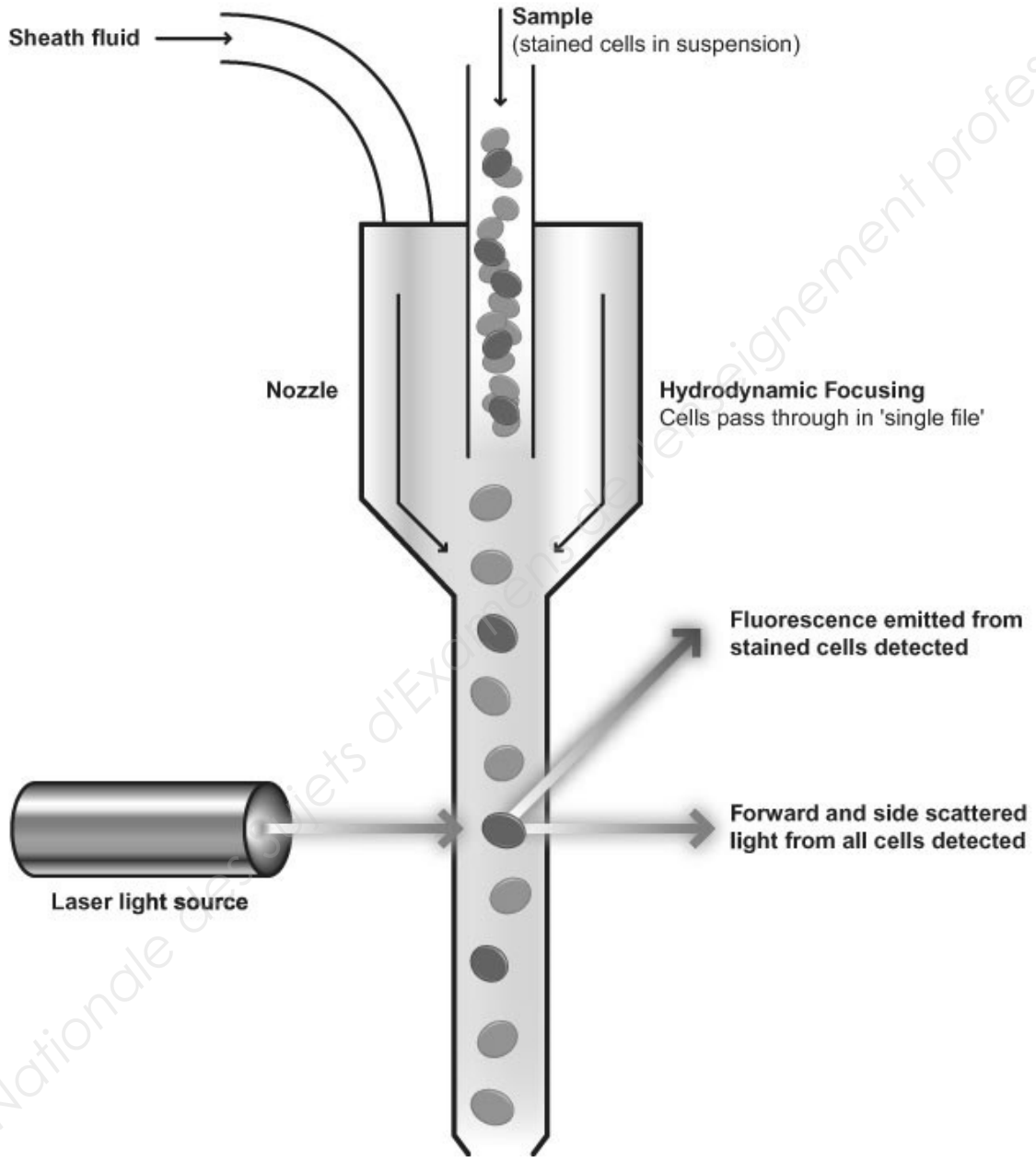
<u>Trypsination des cellules</u> :

Après 2 lavages au PBS pour retirer toute trace de sérum, les cellules sont décollées sous action de 0,25 % Trypsine-EDTA à raison de 2-3 mL de trypsine par flasque T-75 (7-15 min). Une fois les cellules décollées, l'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 7-8 mL de milieu de culture (EMEM + 10 % SVF), et les cellules sont comptées et repiquées à la densité voulue.

Banque nationale de sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 5 : Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS) est une technique permettant de faire défiler des cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, en les comptant et en les caractérisant. Couplée à l'utilisation de marqueurs fluorochromes spécifiques, la lumière réémise (par fluorescence) permet de caractériser des populations cellulaires (taille, granulométrie, type cellulaire, …).



Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 6 : Test de détection Sia2-3Gal et Sia2-6Gal

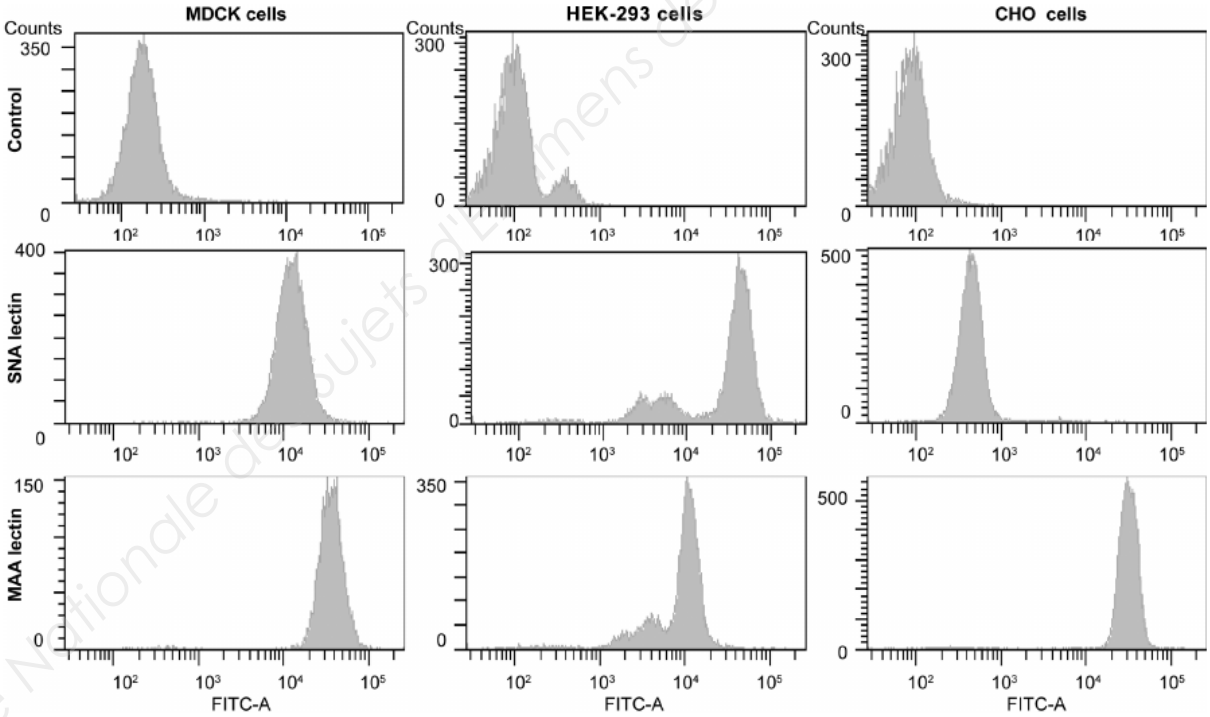
La présence des acides sialiques de type Sia2-3Gal et Sia2-6Gal nécessaires à la fixation du virus influenza sur la cellule est déterminée en utilisant un kit commercial (DIG Glycan Differenciation kit, Roche). Ce kit contient des lectines marquées au DIG, reconnues par un anticorps anti-DIG conjugué à un fluorochrome FITC-A. La détection se fait ensuite par cytométrie de flux (FACS).

Les deux lectines sont Sambucus nigra agglutinin (SNA) qui se fixe spécifiquement sur Sia2-6Gal, et Maackia amurensis agglutinin (MAA) qui se fixe sur Sia2-3Gal.

Préparation des échantillons :

- Trypsination des cellules adhérentes (CHO ou MDCK)
- Ajustement à la densité de $0{,}25 \cdot 10^6$ cellules totales dans 0,5 mL de PBS (CHO, HEK-293 ou MDCK)
- Addition de 2 µL de lectine SNA-DIG ou 10 µL de lectine MAA-DIG dans 0,5% de BSA, et incubation sur de la glace pendant 30 min.
- Centrifugation (200 g x 5 min) des cellules pour éliminer le surnageant, et re-suspension avec 10 µL (1/50ème) d'anticorps anti-DIG conjugués au FITC-A, puis incubation sur de la glace pendant 30 min.
- Centrifugation (200 g x 5 min) des cellules et élimination du surnageant. Re-suspension des cellules dans 0,5 mL de PBS + 0,5 % BSA.
- Conservation à 4 °C avant analyses au FACS.

Résultats du FACS (représentations monoparamétriques)



Données d'interprétation :

- Seuil de positivité du signal fluorescent (FITC-A) : valeurs supérieures à 1000.
- La ligne « control » correspond à la mesure de fluorescence de cellules trypsinées mais non marquées.
- Les cellules MDCK et les CHO servent de contrôles : les cellules MDCK exprimant à la fois Sia2-3Gal et Sia2-6Gal et les cellules CHO n'exprimant que Sia2-3Gal.

Base Nationale de sujets d'examens de l'enseignement professionnel

Document 7 : Protocole de RT-PCR multiplex

d'après S. Dhakad & Co. Indian Journal of Medical Microbiology, vol 33, p73-77, 2015

Étape 1 :

L'extraction d'ARN a été réalisée sur un échantillon de 350 µL avec le Mini kit RNEASY (Qiagen).

Étape 2 :

Pour un volume réactionnel de 12,5 µL, 5,0 µL d'ARN viral, 500 ng d'amorces aléatoires avec 200 µM de chaque désoxynucleotide triphosphate (dNTPs) et 10 unités d'AMV RT (reverse transcriptase de myéloblaste aviaire) ont été utilisés.

Le mélange réactionnel a été incubé à 37 °C pendant 90 minutes, puis chauffé à 65 °C pendant 10 minutes pour inactiver l'enzyme.

Étape 3 :

La PCR multiplex a été réalisée avec 5 µL d'ADNc synthétisé à l'étape 2. Les 25 µL de volume réactionnel contiennent 200 µM de chaque dNTPs, 50 picomoles de tous les couples d'amorces sens (F) et antisens (R) (Tableau 1), et 1,5 U de TaqPolymérase.

L'amplification d'ADN a été exécutée en utilisant une dénaturation initiale pendant 3 minutes à 94°C, suivie de 40 cycles de dénaturation pendant 30 s à 94 °C, d'hybridation pendant 30 s à 50 °C et d'extension pendant 30 s à 72 °C, avec une extension finale pendant 10 minute à 72 °C dans un thermocycleur.

Données : Les amorces utilisées pour la détection du virus de la grippe visent l'amplification du gène M ou Mat (segment 7) pour la grippe A et du gène NS (segment 8) pour la grippe B. Le typage de la grippe A (H1N1 et H3N2) est réalisé par l'utilisation d'amorces spécifiques du gène HA codant l'hémagglutinine (segment 4) et du gène NA codant la neuraminidase (segment 6).

Table 1: Primer sequences used for typing and sub-typing of influenza virus by Multiplex RT-PCR

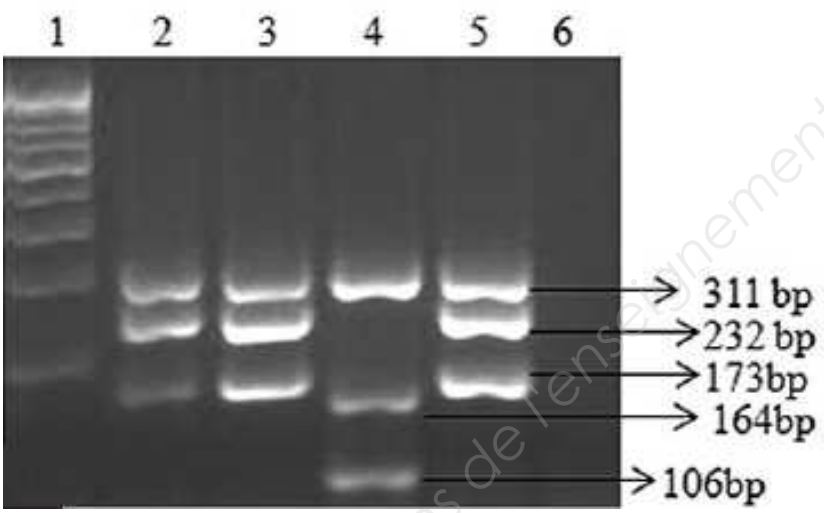
Primer	Genomic location and sequences (5′-3′)	Amplicon size (bp)
TypeA/Mat-I	F-CGAGATCGCACAGAGACTGAAGAT	311
	R-GGCAAGTGCACCAGCAGAATAACT	
TypeA/Mat-II	F-AGGTCGAAACGTACGTTCTTTCTA	348
	R-AGTAGCTT AGTGACACTTCTTTGG	
TypeB/NS	F-ACAAATGAGGGGGTCCG	108
	R-ACCAGGGTAGTCAAGGGCT	
Sub-type H1	F-AATTTGCTATGGCTGACGGA	164
	R-CTACAGAGACATAAGCATTTC	
Sub-type H3	F-GCAAGCTTACAGCAACTGTT	232
	R-ATAGTCAGCTTCAGCGCTG	
Sub-type N1	F-AAGGGGTTTTCATACAGGTATGGT	106
	R-TCTGTCCATCCATTAGGATCC	
Sub-type N2	F-GGAAATCGTTCATATTAGCCCATTG	173
	R-AGCACACATAACTGGAAACAATGC	
HA-1 (Pdm)	F-TGTAAAACGACGGCCAGTAG	465
	R-CAGGAAACAGCTATGACCCA	

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 8 : Électrophorégramme de RT-PCR multiplex

<u>Dépôts</u> :

1- Marqueurs de taille (*100pb ladder*)
2 à 4 - Échantillons de souches testées
5- Contrôle positif obtenu à partir d'une souche de type A/Mat-I, sous-type H3N2
6- Contrôle négatif



Migration en gel d'agarose concentré.
Révélation au bromure d'éthidium.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.