



SERVICES CULTURE ÉDITIONS  
RESSOURCES POUR  
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la  
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

**Campagne 2012**

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR  
BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

**ÉPREUVE E3 – UNITÉ U33  
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE  
ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE**

SESSION 2012

\_\_\_\_\_  
Durée : 2 heures  
Coefficient : 3  
\_\_\_\_\_

**Calculatrice non autorisée.**

**Dictionnaire Français-Anglais autorisé.**

**Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.  
Le sujet se compose de 6 pages, numérotées de 1/6 à 6/6.**

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2012
Nom de l'épreuve : Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : BAE3BC	Page : 1/6

# CONTRÔLES VÉTÉRINAIRES DANS LE CADRE DE L'EXTRACTION D'UN ANTICOAGULANT

Les héparines sont des anticoagulants très utilisés obtenus à partir d'intestins de porc.

Suite à différentes crises sanitaires des contrôles sur la qualité des matières premières et la recherche de toute contamination par des muqueuses d'origines ovine, caprine ou bovine sont effectués. Pour cela des techniques d'immunoprécipitation sont mises en œuvre.

Les virus porcins étant très répandus, il convient aussi de vérifier l'état de santé des porcs chez qui les muqueuses sont prélevées. Ces contrôles s'effectuent par des techniques de biologie moléculaire.

## **1 - Contrôle de la qualité d'un lot de muqueuses intestinales (22 points)**

Une technique d'immunoprécipitation utilisant un mélange polyclonal d'anticorps permet de détecter la présence de muqueuses intestinales d'origines ovine, caprine ou bovine dans les muqueuses intestinales de porc. On détecte cette contamination en recherchant une protéine, l'albumine, présente chez toutes les espèces.

**1.1** - Dans un premier temps, il s'agit d'obtenir « le mélange polyclonal d'anticorps » par immunisation de lapins.

**1.1.1** - Définir l'expression « mélange polyclonal d'anticorps ».

**1.1.2** - Indiquer le protocole d'immunisation permettant d'obtenir ce mélange polyclonal.

**1.1.3** - À l'aide du **document 1**, dégager les principales caractéristiques des réponses immunitaires humorales des anticorps primaire et secondaire produits. Préciser la classe des anticorps produits.

**1.1.4** - Les anticorps utilisés pour les réactions d'immunoprécipitation sont des IgG. Présenter la structure d'une IgG à l'aide d'un schéma légendé.

**1.2** - Dans un deuxième temps, il s'agit de tester la spécificité des anticorps obtenus, selon la technique d'Ouchterlony. Le **document 2** présente les résultats obtenus.

**1.2.1** - Expliquer succinctement le principe de la technique d'Ouchterlony.

**1.2.2** - Analyser les résultats obtenus (**document 2**).

**1.2.3** - Expliquer pourquoi l'antisérum obtenu chez le lapin est utilisé pour rechercher les contaminations ovine, caprine ou bovine dans des extraits de muqueuse intestinale de porc.

**1.3** - Dans un troisième temps, ces anticorps sont utilisés dans le cas de la recherche d'une contamination de la muqueuse intestinale de porc. Nommer une technique d'immunoprécipitation, autre que la technique d'Ouchterlony, permettant de réaliser cette recherche.

## **2 - Contrôle sanitaire : détection du virus de la peste porcine classique (38 points)**

**2.1** - La peste porcine classique est une maladie virale contagieuse due au CSFV (classical swine fever virus). Elle touche les suidés (dont le porc domestique et le sanglier). Les virus peuvent être observés en microscopie électronique par coloration négative.

**2.1.1** - Présenter le principe de la coloration négative. Préciser l'aspect de l'image obtenue.

Le CSFV appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *Pestivirus*. Il possède un génome à ARN linéaire non segmenté simple brin à polarité positive et polycistronique. Le génome code à la fois les protéines structurales (protéines d'enveloppe : Erns, E1 et E2 et protéines de capsid), et les protéines non structurales (réplicase et protéase de maturation). La capsid virale est de symétrie icosaédrique.

**2.1.2** - Réaliser, à partir des éléments donnés précédemment, un schéma annoté avec précision de la structure du CSFV.

**2.1.3** - Que signifient les expressions « ARN non segmenté » et « ARN à polarité positive » ?

**2.1.4** - L'extrémité 5' du génome viral présente un site d'entrée de ribosome interne (IERS). Indiquer les particularités des extrémités 5' et 3' d'un ARN messager eucaryote.

**2.1.5** - Présenter la réplication du génome viral sous forme d'un schéma simplifié sachant qu'il s'agit d'un ARN à polarité positive.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES	Session 2012
Nom de l'épreuve : Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : BAE3BC
	Page : 2/6

**2.2** - Les méthodes de laboratoire pour le diagnostic du CSFV ont pour objectif la mise en évidence du virus et son acide nucléique. La recherche du virus dans le sang ou les tissus, prélevés sur un animal fiévreux, est la méthode de choix pour détecter, précocement, les élevages infectés.

Le **document 3** présente un protocole d'immunofluorescence pour la détection du virus.

**2.2.1** - Quelle est la nature du conjugué utilisé ?

**2.2.2** - Élaborer un schéma légendé de l'édifice moléculaire obtenu pour un résultat positif.

**2.2.3** - Indiquer les rôles des contrôles proposés dans le protocole du **document 3**.

**2.3** - Afin de limiter les pertes économiques dues aux *Pestivirus*, les recherches actuelles se tournent vers la production d'un vaccin à ADN basé sur la préparation d'un plasmide recombinant. La vaccination par ADN consiste en l'introduction dans les tissus des porcs d'élevage (par injection intramusculaire par exemple) du plasmide purifié contenant une séquence codant un antigène donné. Après administration du plasmide recombinant, l'antigène est exprimé par les cellules transfectées induisant une réponse immunitaire spécifique.

Le vecteur utilisé peut être par exemple le plasmide pcDNA 3 présenté dans le **document 4**.

**2.3.1** - Quelles sont les caractéristiques générales des vecteurs plasmidiques ?

La protéine d'enveloppe E2 du CSFV s'avère être très antigénique : c'est donc le gène de cette protéine qui est ciblé pour la fabrication du vaccin à ADN. Le CSFV étant un virus à ARN (+), cela nécessite de travailler avec un ADNc, codant la protéine E2, avant l'insertion dans le vecteur plasmidique.

**2.3.2** - Présenter à l'aide de schémas légendés l'obtention de l'ADNc à partir de l'ARN viral. Préciser la signification du sigle ADNc.

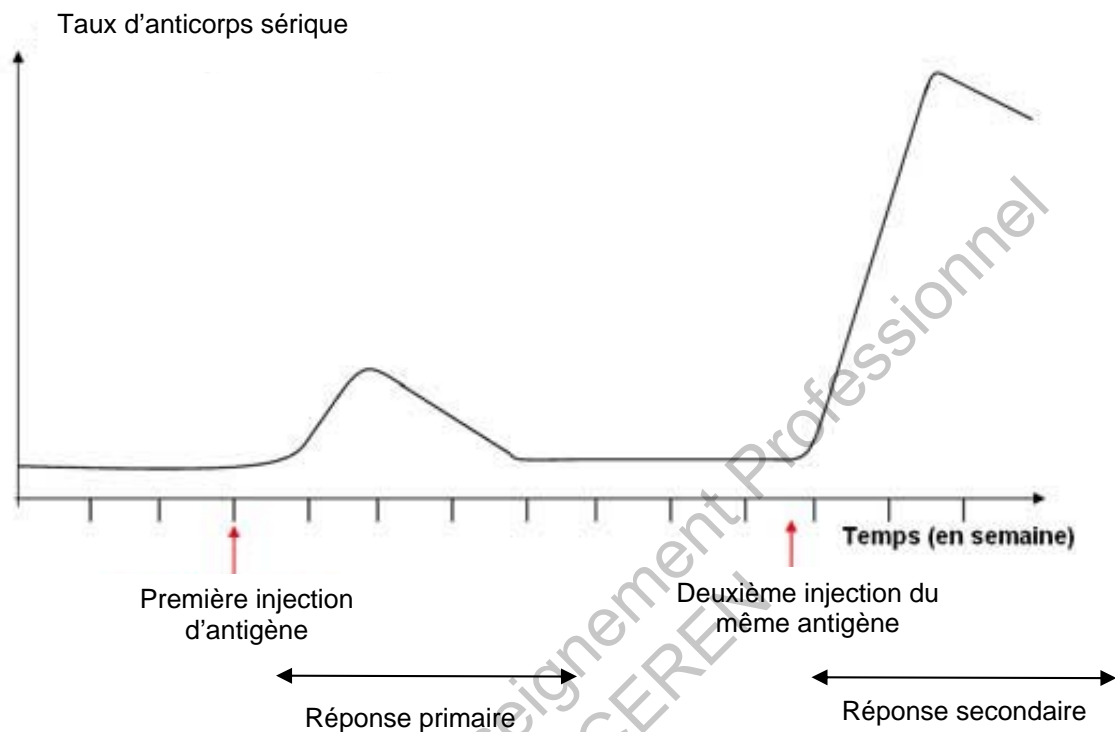
L'ADNc obtenu est amplifié par PCR. Le **document 5** précise les amorces sens et anti sens utilisées.

**2.3.3** - Définir le sigle PCR. Quelle est l'enzyme utilisée dans cette technique ? Quelles sont ses particularités ?

**2.3.4** - À l'aide des **documents 4 et 5**, indiquer les étapes et les modalités techniques d'obtention du plasmide recombinant utilisé dans le vaccin à ADN contre le CSFV.

## DOCUMENT 1

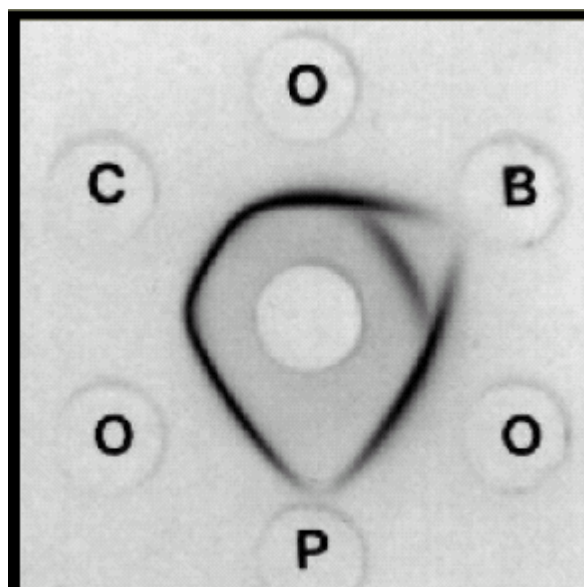
### Production d'un antisérum polyclonal obtenue après immunisation d'un lapin Cinétique de la réponse immunitaire humorale



## DOCUMENT 2

### Specificity test antisera to ruminant albumins by agar gel double immunodiffusion

- Central hole:  
Rabbit anti Ovin Serumalbumin
- Peripheral holes:  
B: Bovin serumalbumin  
O: Ovin serumalbumin  
C: Caprin serumalbumin  
P: Porcin serumalbumin



## **DOCUMENT 3**

### **Protocole d'immunofluorescence *in situ***

(from "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008")

1. Cut out a piece of tissue of app. 1 x 1 x 0,5 cm and mount it on a cryostat chuck.
2. Freeze the piece of organ (the freezing temperature of the cryostat should be -15-20°C.)
3. Cut sections of maximum 5 µm thickness and mount them onto microscope slides. Prepare several slides with sections from the same tissue.
4. Fix the mounted sections for 10 minutes in acetone (analytic grade) at -20°C.
6. Immerse the sections briefly in washing buffer.
7. Dispense the FITC-conjugate at the suitable working dilution in washing buffer onto the entire section, close the moist chamber and incubate in the dark for 30 minutes at 37 °C.
8. Wash the sections 3 x 10 minutes at room temperature with washing buffer;
10. If necessary, counterstain in evans blue for 30 seconds.
12. Place a cover slip with mounting buffer onto the section.
14. Examine the sections for fluorescence by UV microscopy.

#### **Controls**

Negative and positive control sections must be included in each series of organ samples to be examined.

#### **FITC-conjugate** (fluorescein isothiocyanate –conjugate)

It is recommended that primary diagnosis is carried out with FITC-conjugates prepared from a polyclonal antibody to *Pestivirus*.

This will not distinguish between the antigens of different pestiviruses, but does provide assurance that minor variant viruses will not be missed.

FITC-conjugates should be prepared from immune serum prepared in specific pathogen free pigs.

#### **Interpretation**

Any sample showing specific cytoplasmic reaction (brilliant green fluorescence) shall be considered positive for *Pestivirus*.

#### **Vocabulaire :**

Cryostat chuck: support du microtome sur lequel on fixe l'échantillon

Cover slip: lamelle de verre circulaire

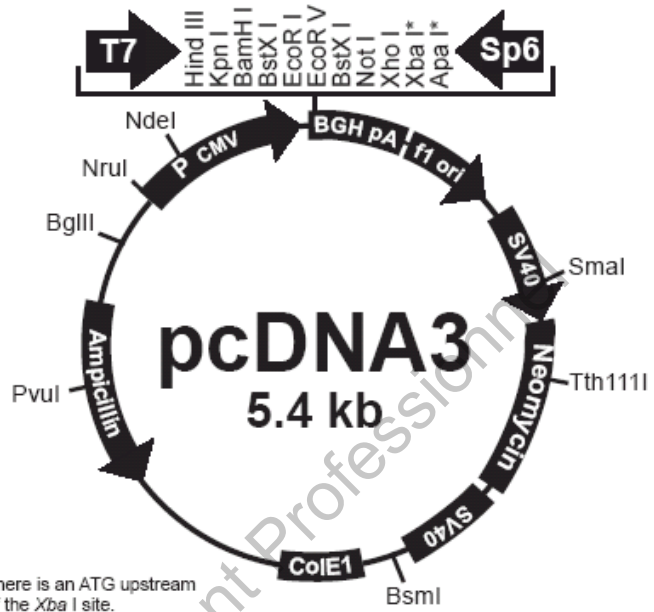
Counterstain: contre-coloration

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2012
Nom de l'épreuve : Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : BAE3BC	Page : 5/6

## DOCUMENT 4

### Plasmide pcDNA 3 (Invitrogen)

5446 nucleotides  
CMV promoter: bases 209-863  
Polylinker: bases 889-994  
BGH poly A: bases 1018-1249



CMV : cytomégalo virus (virus animal)

## DOCUMENT 5

### Cloning of the CSFV (classical swine fever virus) E2 gene

cDNA product was used as a template for amplification of the E2 region.  
The sense primer contains the BamHI restriction enzyme site.  
The antisense primer contains the XbaI restriction enzyme site and a stop codon.  
After digestion with these two enzymes, the E2 PCR product was inserted into the BamHI and the XbaI sites of the pcDNA3 mammalian expression vector.