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 SUPERIEUR

BIOTECHNOLOGIES

U41 Microbiologie et génie fermentaire

SESSION 2018

DUREE DE L'EPREUVE : 2 h 00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

Dictionnaire anglais/français
L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 8 pages numérotées de 1/8 à 8/8.

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

Komagataella pastoris : production l'antigène HBs du virus de l'hépatite B

Malgré l'existence d'un vaccin efficace à base de l'antigène de surface (HBs) du virus, l'hépatite B est une maladie chronique qui affecte près de deux milliards de personnes dans le monde. Les vaccins actuels sont trop coûteux à produire pour des pays en voie de développement. Cependant, il serait possible de produire un vaccin à moindre coût en améliorant les techniques actuelles de production utilisant la levure *Komagataella pastoris* génétiquement modifiée.

1. Le virus de l'hépatite B (VHB) (3,5 points)

C'est un virus enveloppé particulièrement résistant. Sa structure est présentée sur le document 1.
La classification virale selon Baltimore est présentée sous forme schématique par le document 2.

1.1 Identifier la place du VHB dans la classification de Baltimore et indiquer la principale différence avec la famille des rétrovirus.

Les différentes étapes du cycle de la réplication virale sont présentées sur le document 3.

1.2 Proposer deux étapes du cycle viral de l'hépatite B pouvant faire l'objet d'un ciblage thérapeutique pour inhiber la prolifération du virus.

Le processus de réplication virale conduit à la formation de particules virales et de particules appelées « Virus-Like Particles » présentées dans le document 1. Ce sont ces dernières, purifiées à partir de prélèvements de porteurs sains, qui ont servi comme vaccin avant l'apparition du Génie Génétique. En effet, elles contiennent l'antigène HBs (HBs Ag), une glycoprotéine de 226 acides aminés permettant la production d'anticorps neutralisants.

1.3 Argumenter le choix d'utiliser des « Virus-Like Particles » comme vaccin.

1.4 Montrer la nécessité d'utiliser la levure plutôt qu'une bactérie comme *E. coli* pour la production des protéines sécrétées.

2. La levure *Komagataella pastoris* (6,5 points)

La levure *Komagataella pastoris* aussi appelée *Pichia pastoris* appartient à l'embranchement des ascomycètes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*. C'est une levure homothallique, mésophile, aérobie stricte.
Son cycle de vie est présenté document 4.

2.1 Reporter les numéros sur la copie et proposer une légende pour chacun d'eux. Argumenter que cette levure est une levure homothallique.

Banque nationale des sujets d'examens de l'enseignement professionnel

La ploïdie de *Ko. pastoris* est stable, mais la mitose et la méiose peuvent être induites par des conditions environnementales.

2.2 Préciser la condition environnementale permettant d'induire la fusion des cellules haploïdes et la méiose pour cette levure.

Cette levure est méthylotrophe, c'est à dire qu'elle est capable de cultiver sur des substrats monocarbonés (méthanol, formaldéhyde…) comme seule source de carbone et d'énergie. Le métabolisme du méthanol a lieu dans le péroxysome, un compartiment cellulaire dont la quantité de vésicules est induite par ces substrats. Ce métabolisme est présenté dans le document 5.

Le méthanol (CH_3OH) est oxydé en formaldéhyde qui est à un carrefour métabolique entre deux voies A et B. Ce métabolisme est étroitement associé à celui de l'oxygène.

2.3 Identifier les molécules produites par ces deux voies métaboliques et dégager le rôle de chacune des voies.

2.4 Identifier l'enzyme X et préciser son importance biochimique.

Ces voies métaboliques sont réprimées en présence de glucides comme le glucose.

2.5 Représenter et commenter la courbe de croissance attendue dans le cas d'une culture dans un milieu contenant à la fois du glucose et du méthanol. Nommer le phénomène observé.

3. Production de l'Antigène HBs (8 points)

Dans le but d'obtenir la production d'antigènes HBs (HBs Ag), une souche de *Ko. pastoris* a été construite par génie génétique. Le gène codant pour HBs Ag a été placé sous la dépendance du promoteur inductible au méthanol *AOX1*.

La production est réalisée en culture discontinue alimentée (fed-batch) selon le protocole présenté dans le document 6. La culture est conduite en deux phases.

3.1 Déterminer la source de carbone et d'énergie pour chacune des deux phases. Expliquer le rôle de ces deux phases. Relever la durée de la première phase.

Les données de suivi sont présentées dans le document 7.

3.2 A partir de la figure B, déterminer la vitesse spécifique maximale de croissance ainsi que le temps de génération lors de la première phase.

3.3 A partir de la figure A, repérer la valeur de la concentration en biomasse au début de la phase d'alimentation et calculer le rendement de production de biomasse par rapport au substrat glycérol ($R_{X/S}$).

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

Des résultats de régulation du pH et du suivi de l'apport en ammoniaque sont présentés dans la figure C du document 7.

3.4 Dégager le rôle de la solution d'ammoniaque.

Ko. pastoris est une levure aérobie stricte. L'oxygénation du milieu est un paramètre critique régulé.

3.5 Justifier l'importance de cette régulation. Citer deux actionneurs (effecteurs) classiques utilisables pour réguler le dioxygène dissous des bioréacteurs.

3.6 Sur la figure D, montrer que la concentration en dioxygène dans le milieu est régulée par le procédé et indiquer l'effecteur de régulation utilisé dans le cas présent. Calculer le débit d'aération par volume de milieu en début de process.

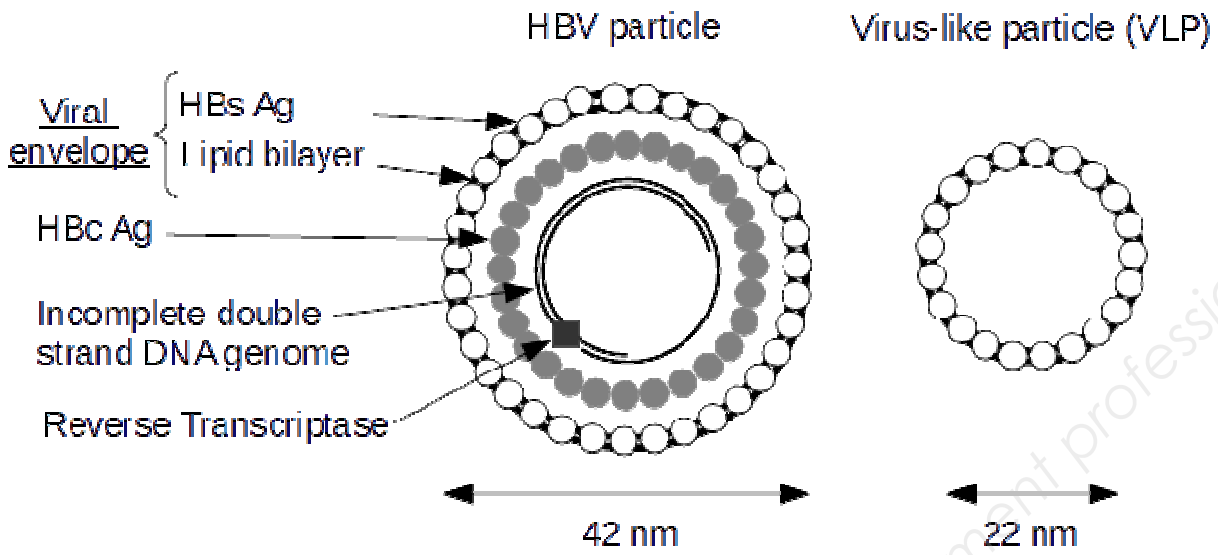
La figure B présente les résultats de la production de l'antigène HBs par *Ko. pastoris* en fonction de la croissance de la levure.
Après la lyse des levures les concentrations en antigène HBs totaux et solubles sont déterminées. Les antigènes solubles sous la forme de « Virus-like particles » sont purifiés pour faire les vaccins.

3.7 En considérant que la concentration initiale en antigène HBs est nulle, déterminer la productivité volumique horaire en antigènes HBs solubles de l'inoculation à la fin de production après 200h. Choisir le temps d'arrêt de production de manière à optimiser ce paramètre et déterminer le gain de productivité volumique horaire.

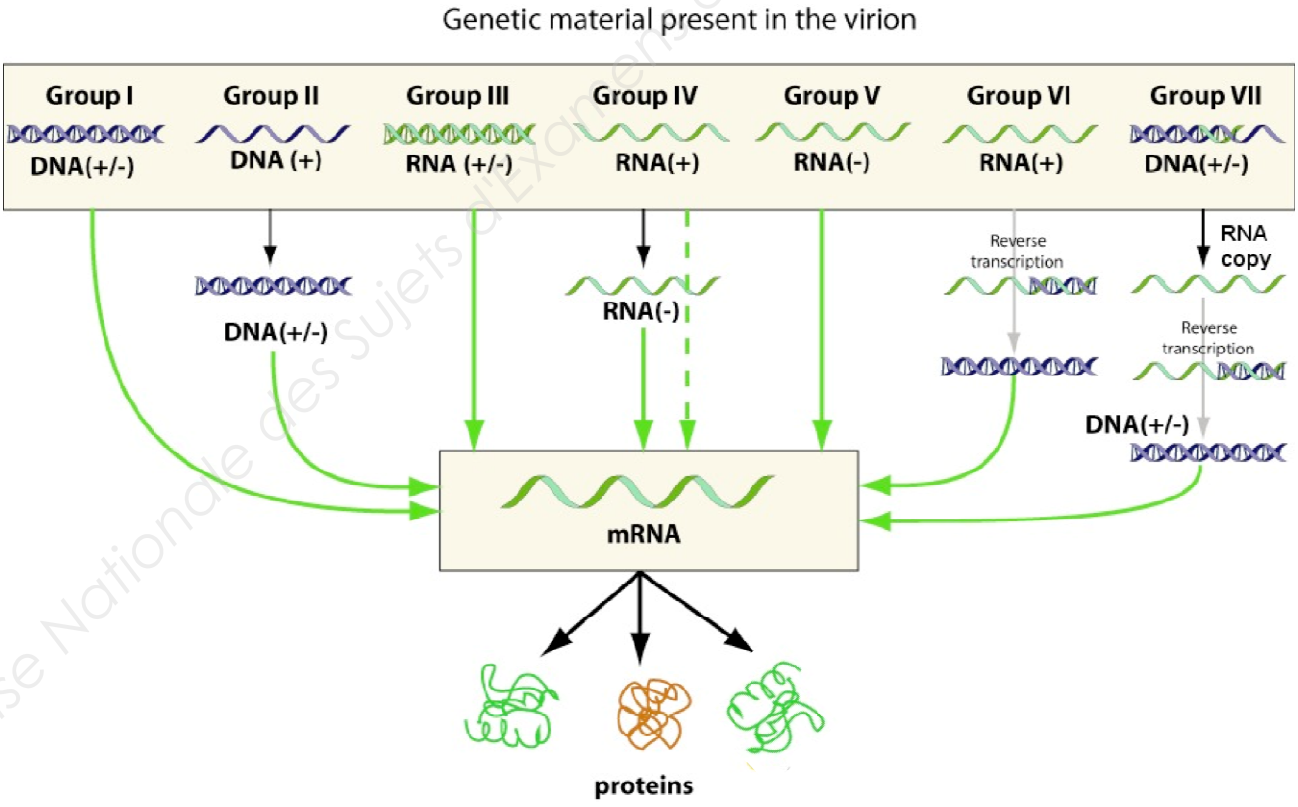
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)
Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

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

Document 1 : Hepatitis B virus and virus-like particle



Document 2 : Représentation schématique de la classification des virus selon Baltimore



Adaptée de http://viralzone.expasy.org. Juin 2017

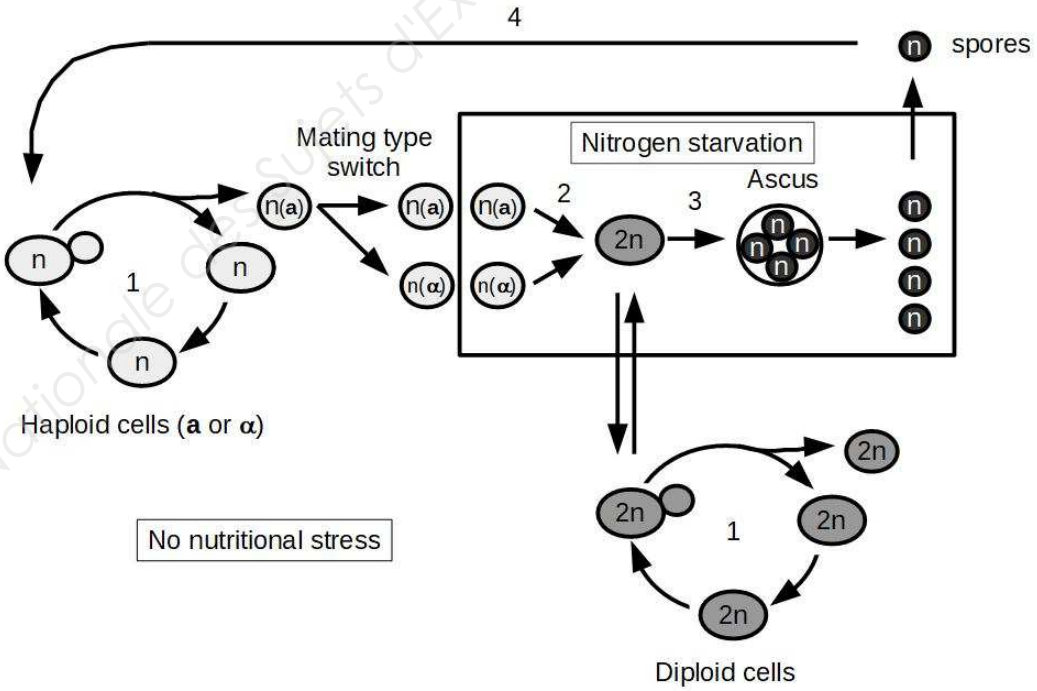
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 3 : Etapes du cycle de réplication du VHB

- Le virus de l'hépatite B se fixe aux récepteurs de l'hôte par le biais d'un antigène de surface et pénètre dans la cellule.
- L'ADN génomique sous forme circulaire relâchée (ADN-CR) et la capside sont transportés jusqu'au noyau dans lequel l'ADN pénètre par un pore nucléaire. L'ADN-CR est réparé pour former de l'ADN circulaire fermé par liaison covalente (ADN-CC).
- L'ADN-CC est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire en ARNm viral et en ARN pré-génomique (ARNpg).
- L'ARN pré-génomique quitte le noyau par exportation à travers les pores nucléaires.
- Dans le cytoplasme, l'ARN pré-génomique est encapsulé et rétro-transcrit à l'intérieur de la nucléocapside pour former un nouvel ADN génomique relâché (ADN-CR).
- Les nucléocapsides contenant l'ADN-CR sont enveloppées à partir du réticulum endoplasmique et les nouveaux virions enveloppés sont libérés par exocytose.

Document 4 : Cycle de reproduction de *Komagataella pastoris*

Yeast cells can exist in both a haploid (a) and diploid (b) state. Haploid cells have either mating type **a** or mating type α, making them capable of mating with a cell of the opposite mating type only in starvation condition (nitrogen starvation for example). In nutrient-rich conditions, both haploid and diploid cells can proliferate asexually by budding. Diploid cells are heterozygous for the mating type locus (mating type **a**/α), which makes diploids incapable of mating. When exposed to some nutrient-poor conditions, diploids undergo sporulation (meiosis followed by spore formation), resulting in the conversion of a diploid cell into four haploid spores, two possessing mating type **a** and two having mating type α, which can germinate into haploid cells when conditions improve. In homothallic strains, the haploid derivatives can undergo a mating type switch together with the mother cell.

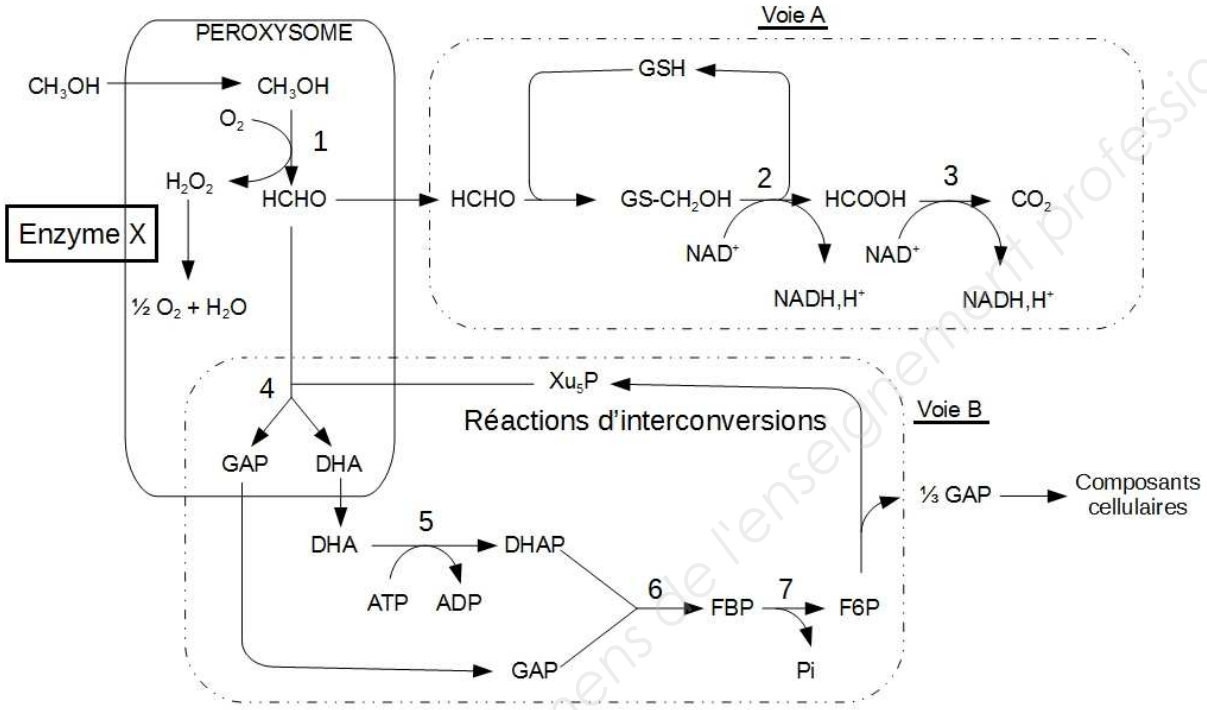


Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 5 : Voie métabolique du méthanol chez *Ko. pastoris*

Enzymes : 1, Alcool oxydase ; 2, Formaldéhyde déshydrogénase ; 3, Formate déshydrogénase ; 4, Dihydroxyacétone synthase ; 5, Dihydroxyacétone kinase ; 6, Fructose 1,6 biphosphate aldolase ; 7, Fructose 1,6 biphosphatase

Métabolites : GSH, glutathion ; GAP, Glycéraldéhyde 3-phosphate ; DHA, Dihydroxyacétone ; DHAP, Dihydroxyacétone phosphate ; FBP, Fructose 1,6 biphosphate ; Xu5P, Xylulose 5-monophosphate



Document 6 : High-cell density fed-batch cultivation, culture conditions and control

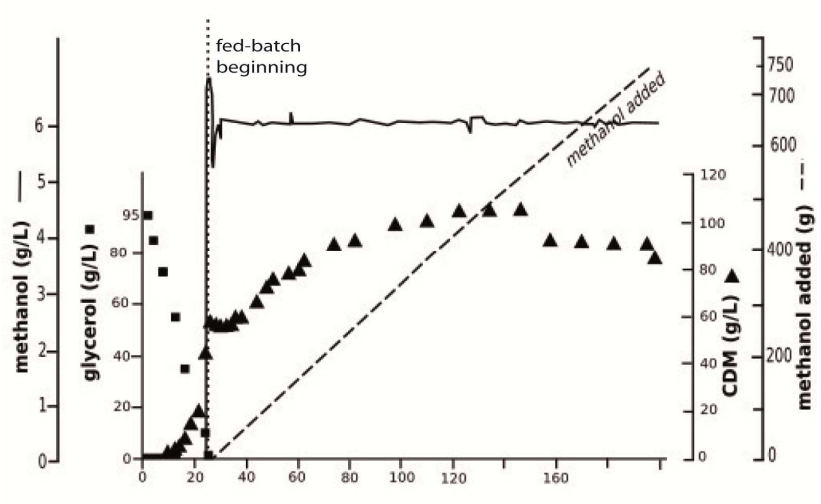
Cultivation was carried out in a 15 L bioreactor. A 1 L inoculum was transferred to the bioreactor containing 9 L growth medium. Initial biomass is 0.2 g L^{-1} (cell dry biomass).
The growth medium contained per liter: glycerol, 95.2 g; potassium di-hydrogen phosphate, 9.4 g; yeast trace metal (YTM) solution, 1.14 g; ammonium sulfate, 15.7 g; magnesium sulfate hepta-hydrate, 1.83 g; calcium chloride di-hydrate, 0.28 g; and biotin, 0.4 mg.
Temperature was maintained at 30°C and pH at 5.5 with 12.5% (v/v) NH_3 solution. Aeration rate of 5 L min^{-1} was constant throughout the process.
After consumption of glycerol (26 h), indicated by an increase of the dioxygen (DO) concentration, production of recombinant HBs Ag was initiated by the addition of a methanol solution [98.6% (w/w) methanol and 1.4 % (w/w) YTM] to a final methanol concentration of 6 g L^{-1}. For the remainder of the cultivation, the methanol concentration was kept at 6 g L^{-1} in the culture.

Documents 6 et 7 adaptés de Gurramkonda C. *et al*. ; Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with *Pichia pastoris*: Application to intracellular production of Hepatitis B surface antigen. Microbial Cell Factories. 2009, 8 :13.

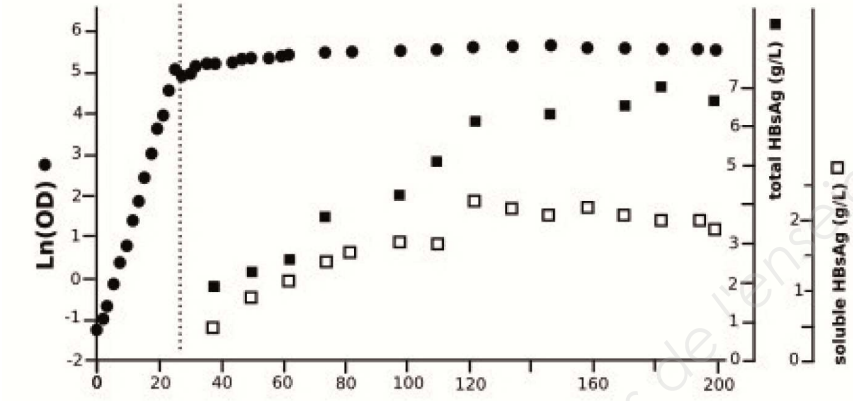
Disponible sur : https://microbialcellfactories.biomedcentral.com

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

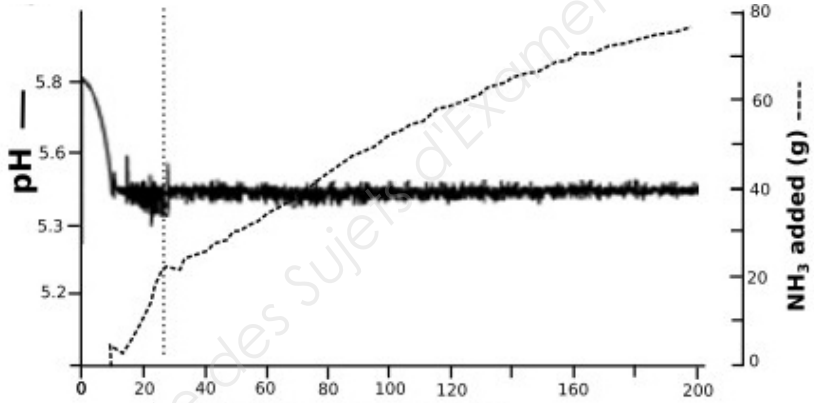
Document 7 : Culture discontinue alimentée de *Ko. pastoris*



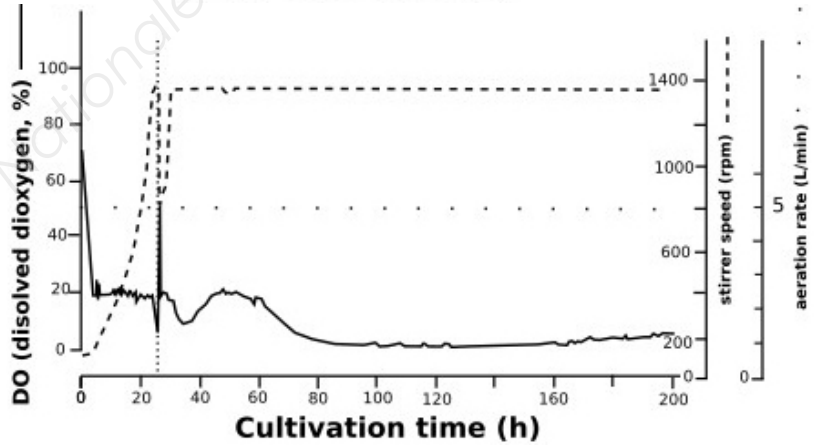
(**A**) Concentration en glycérol (carrés pleins) et biomasse (biomasse sèche, CDM, triangles pleins). Concentration en méthanol (ligne continue) et quantité de méthanol ajoutée dans le bioréacteur (ligne discontinue).



(**B**) Croissance cellulaire (OD pour « optical density », cercles pleins) et accumulation de l'antigène HBs (HBs Ag), (HBs Ag total ; carrés pleins et HBs Ag soluble : carrés vides).



(**C**) pH du milieu (ligne continue) et quantité d'ammoniaque ajoutée dans le bioréacteur (ligne discontinue).



(**D**) Concentration en dioxygène dissous (DO, « dissolved oxygen », ligne continue), débit d'aération (ligne de points) et vitesse d'agitation (ligne discontinue).

Les lignes pointillées verticales indiquent la fin de la croissance sur glycérol et le début de l'alimentation en méthanol.

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.