Support dévaluation –partie écrite de Biochimie – Biologie – Biotechnologies

Durée 3h

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Compétences évaluées					
C1	C2	C3	C4	C5	C6
Analyser un document scientifique ou technologique	Effectuer les calculs nécessaires à l'exploitation des documents	Interpréter des données de biochimie, biologie, biotechnologie	Argumenter pour valider un choix technique, étayer un raisonnement scientifique ou répondre à une problématique de biotechnologie	Rédiger ou élaborer une synthèse en mobilisant des concepts scientifiques	Communiquer à l'écrit à l'aide d'une syntaxe claire et d'un vocabulaire scientifique ou technologique adapté
3 points	3 points	3 points	5 points	5 points	1 point

Le mystère du patient de Berlin

Réflexion sur les choix d'une stratégie thérapeutique contre le virus de l'immuno-déficience humaine

Le patient de Berlin est le premier cas de guérison du SIDA connu au monde. Le cas est historique et ouvre de nouvelles perspectives de stratégies thérapeutiques pour les 37,9 millions de malades infectés par le virus de l'immuno-déficience humaine (VIH) sur la planète.

Le patient de Berlin, ainsi dénommé en raison de sa prise en charge par le Docteur Hütter à Berlin, n'a plus montré aucun signe d'infection douze ans après le diagnostic initial de sa contamination par le VIH grâce à un traitement né d'une idée originale.

La problématique de ce sujet est d'expliciter le mécanisme qui a permis la guérison du patient de Berlin et d'en explorer les conséquences en termes de stratégie thérapeutique et de perspectives de recherche.

Les éléments de réponses à ces questions seront présentés à travers plusieurs parties du sujet :

- 1. Dépistage du VIH.
- 2. Stratégie thérapeutique choisie pour le patient de Berlin.
- 3. Nouvelles approches thérapeutiques contre le VIH.

Partie I - Questionnements scientifiques et technologiques (durée indicative 2h30)

1. Dépistage du VIH

Le dépistage repose sur la réalisation d'un test ELISA combiné (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) qui doit être effectué à deux reprises à trois mois d'intervalle si un contact à risque a eu lieu.

1.1. Principe du test ELISA combiné Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab.

Le **document 1** présente un extrait de la documentation technique fournie avec le coffret de dépistage par le test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab utilisé pour le patient de Berlin. Le schéma du **document 2** représente les édifices moléculaires qui se forment dans les cupules du test lorsque le plasma du patient contient l'antigène p24 et les anticorps anti-VIH.

Ce test combine d'une part la recherche d'un anticorps et d'autre part la recherche d'un antigène.

- Q1. C1. Pour l'édifice 1, identifier la molécule recherchée en argumentant à l'aide de la spécificité des anticorps utilisés. Identifier dans le conjugué l'élément contribuant à la reconnaissance spécifique et l'élément contribuant à la révélation. Préciser le résultat obtenu en présence de la molécule recherchée.
- Q2. C1. Procéder à la même démarche d'analyse pour l'édifice 2.

Le **document 3** est un graphique schématisant la cinétique d'apparition de marqueurs plasmatiques virologiques au cours d'une primo-infection par le VIH en l'absence de traitement.

Q3. C4. Montrer alors que la combinaison des deux tests permet d'obtenir un résultat positif quelle que soit la date du test à partir du 14^e jour.

Le **document 4** propose un schéma des principaux phénomènes moléculaires et cellulaires permettant en quelques jours la production d'anticorps en réponse à un premier contact avec un antigène.

Q4. C4. Expliquer à l'aide du document 4 la cinétique observée dans le document 3.

1.2. Résultats du patient de Berlin au test ELISA combiné

Le **document 5** fournit les résultats obtenus pour le patient de Berlin ainsi qu'un extrait de la fiche technique concernant l'exploitation des résultats pour le test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab.

- Q5. C2. Vérifier les critères de validation du test.
- **Q6.** C2. Exploiter la valeur mesurée obtenue pour le plasma patient de Berlin après avoir déterminé la valeur seuil. Conclure sur le résultat du test pour le patient d'après le test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab.

2. Stratégie thérapeutique choisie pour le patient de Berlin

Onze ans après avoir été diagnostiqué séropositif pour le VIH, le patient de Berlin déclare un cancer de la moelle osseuse.

Ce cancer se traite généralement par la destruction de la moelle du patient qui ne produit alors plus de cellules du sang. Une greffe de moelle issue d'un donneur est ensuite effectuée pour permettre la reconstitution des cellules du sang. Les lymphocytes T4, qui sont des cellules cibles du VIH, portent ainsi les caractéristiques issues du donneur.

Le docteur Hütter sélectionne donc, parmi les donneurs de moelle, un individu qui présente une immunité naturelle contre le VIH. Il espère ainsi que les lymphocytes T4 produits par la moelle greffée seront résistantes au virus.

La résistance au VIH est liée à un allèle rare du gène codant la protéine CCR5, noté alors CCR5 Δ32.

Le **document 6** présente un schéma illustrant l'effet de la mutation des protéines CCR5 sur l'infection de lymphocytes T4 par le VIH.

- Q7. C1. Associer à chaque étape numérotée 1 à 7 un des phénomènes proposés A à G.
- A. Traduction.
- B. Transport de la protéine CCR5 vers la membrane plasmique.
- C. Fixation du VIH sur la protéine CD4.
- D. Transcription.
- E. Absence de transport de la protéine CCR5 mutée vers la membrane.
- F. Entrée du VIH dans la cellule.
- G. Sortie de l'ARNm par les pores nucléaires vers le cytoplasme.
- **Q8.** C5. Argumenter l'affirmation suivante : « les personnes ne possédant que des protéines CCR5 dans l'état CCR5-Δ32 ont une immunité naturelle vis à vis du VIH ».

3. Nouvelles approches thérapeutiques contre le VIH.

3.1. <u>Tester des molécules bloquant la voie de transport de CCR5 vers la membrane.</u>

https://insb.cnrs.fr/fr/cnrsinfo/les-voies-de-transport-intracellulaire-de-nouvelles-applications

Un axe de recherche consiste à repérer des molécules qui bloquent sélectivement la voie de transport de CCR5 vers la membrane. Ces molécules seraient de bonnes candidates pour devenir un médicament anti-VIH.

Un laboratoire de recherche réalise une étude *in vitro* dans laquelle des cellules contenant des protéines CCR5 fluorescentes qui ne sont pas encore acheminées à la membrane sont mis en présence de différentes molécules candidates appelées A, B et C pour inhiber sélectivement la voie de transport de CCR5 vers la membrane. L'effet de ces mêmes molécules A, B et C sur les voies de transport d'autres protéines membranaires comme CCR1 a été testé en parallèle. Les résultats de cette étude sont présentés dans **le document 7**.

Q9. C3. Identifier quelle molécule, parmi les molécules A, B ou C, inhibe le plus sélectivement la voie de transport de CCR5.

3.2. <u>Modifier génétiquement des cellules souches de moelle osseuse par le système CRISPR-Cas9.</u>

L'équipe d'Igor Slukvin, université du Wisconsin, a travaillé sur une autre stratégie consistant à utiliser le système CRISPR-Cas9 pour modifier directement l'ADN des cellules de la moelle du patient. Ces cellules de moelle produiront ainsi des lymphocytes T4 résistants au VIH.

Des cellules de la moelle osseuse sont cultivées puis mises en contact avec un système CRISPR-Cas9 conçu pour supprimer une séquence ciblée de 529 paires de bases (pb) dans le gène de CCR5 (mutation par délétion).

Comme la technologie CRISPR-Cas9 n'est pas efficace à 100%, le repérage des cellules réellement modifiées est nécessaire. Dans le cas présent, les auteurs réalisent une PCR suivie d'une électrophorèse :

- Les cellules modifiées par CRISPR-Cas9 sont isolées et placées dans des conditions permettant leur multiplication aboutissant à la formation d'un clone pour chaque cellule isolée.
- L'ADN extrait à partir de quelques cellules de chaque clone est amplifié avec des amorces correspond au gène de CCR5 et situées de part et d'autre de la séquence cible de CRISPR-Cas9.
- Une électrophorèse permet ensuite d'établir quels clones sont bien porteurs de la délétion de 529 pb sur les deux copies du gène de CCR5.

Q10. C3. Choisir le couple d'amorces permettant l'amplification du gène de CCR5 parmi les amorces proposées dans le **document 8**. Argumenter la réponse, à l'aide de quelques phrases ou d'un schéma.

Q11. C2. Calculer la taille attendue des fragments d'ADN obtenus en cas de réussite du système CRISPR-Cas9.

Un clone ne peut être choisi pour être réinjecté au patient que si les deux copies du gène de CCR5 ont été modifiés.

Q12. C4. Analyser les résultats d'électrophorèse, **document 9**, pour choisir les clones utilisables pour traiter le patient.

Une vérification approfondie du génome est réalisée sur les clones à réinjecter car la probabilité que la technologie CRISPR-Cas9 provoque une modification de l'ADN n'importe où dans le génome n'est pas nulle.

Q13. C5. Comparer les trois approches thérapeutiques présentées dans ce sujet en identifiant un point commun, des différences, et la possibilité de généraliser ces approches à l'ensemble des malades du VIH.

Partie II - Question de synthèse- (durée indicative 0h30)

L'équipe de He Jiankui , Université de Shenzhen, en Chine, a utilisé la stratégie CRISPR Cas9 sur des cellules souches embryonnaires et non des cellules souches de moelle, pour modifier des embryons humains.

La communauté scientifique internationale s'est exprimée contre cette pratique expérimentale.

Le document 10 présente plusieurs ressources pour réaliser la synthèse :

- « Le concept de balance bénéfice / risque »
- « Des bébés génétiquement modifiés seraient nés en Chine »
- « Le chercheur chinois à l'origine des bébés génétiquement modifiés condamné à 3 ans de prison »

Q14. - C5. Développer des arguments de bioéthique expliquant ce rejet des travaux du chercheur He Jiankui par la communauté scientifique.

Document 1 – Extrait de la fiche technique du test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab.

Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab est une technique immuno-enzymatique qualitative basée sur la détection simultanée de l'antigène VIH p24 et des anticorps anti-VIH, notamment les anticorps anti gp160, dans le sérum ou le plasma humain.

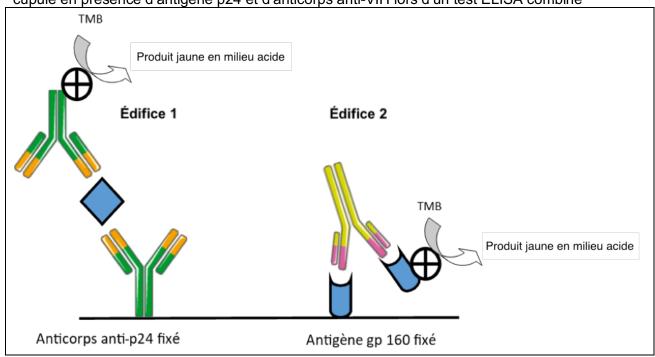
Les antigènes du VIH : p24 et gp160 sont deux protéines différentes du VIH.

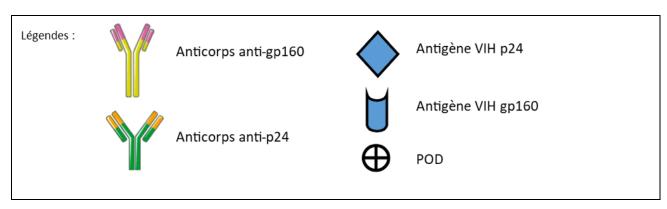
	it de la fiche technique : Test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab
Réac	tifs:
R1	barrette de 12 cupules préalablement préparées avec - des anticorps dirigés contre l'antigène p24 du VIH - et des antigènes purifiés du VIH, notamment la protéine gp 160. Les cupules sont repérées par des lettres et des chiffres A1, B1, C1, D1, D1, E1, F1etc
R2	Solution de lavage.
R3	Contrôle négatif : plasma humain, ne possédant ni antigène VIH, ni anticorps anti-VIH.
R4	Contrôle positif anticorps anti-VIH : plasma humain possédant des anticorps anti-VIH.
R5	Contrôle positif antigène VIH : plasma humain possédant des antigènes VIH, notamment gp160 et p24.
R6	Conjugué 1 : anticorps anti - p24 couplé à une enzyme (peroxydase, POD)
R7	Conjugué 2 : antigène gp 160 couplé à une enzyme (peroxydase, POD)
R8	Solution de chromogène TMB : 3,3', 5,5' tétraméthyl-benzidine est le substrat de la POD. Initialement incolore, le TMB est jaune en milieu acide et absorbe à 450 nm.
R9	Solution d'arrêt : acide sulfurique.

Procédure opératoire :

- 1) Ajouter immédiatement :
 - 75 µl de contrôle positif (R5) en A1
 - 75 µl de contrôle positif (R4) en B1
 - 75 µl de contrôle négatif (R3) en C1, D1 et E1
 - 75 µl du premier échantillon (plasma de patient) en F1.
- 2) Déposer directement 25 µL de conjugué 1 (R6) dans chaque cupule de la barette (R1).
- 3) Homogénéiser le mélange avec un agitateur de microplaque durant 5 secondes.
- 4) Incuber la microplaque pendant 1 heure à 37°C.
- 5) Ajouter dans chacune d'elles un minimum de 370 μL de solution de lavage (R2) puis éliminer la solution de lavage par aspiration. Répéter le lavage au moins 2 fois.
- 6) Distribuer 100 µL de la solution de conjugué 2 (R7) dans toutes les cupules. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- 7) Vider toutes les cupules par aspiration et laver au moins 5 fois.
- 8) Distribuer rapidement dans toutes les cupules 80 µL de la solution de révélation de l'activité enzymatique (R8).
- 9) Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.
- 10) Ajouter 100 µL de la solution d'arrêt (R9).
- 11) Mesurer l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaques.

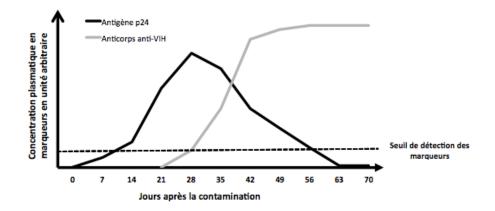
<u>Document 2</u>: Représentation schématique des édifices moléculaires qui se forment dans une cupule en présence d'antigène p24 et d'anticorps anti-VIH lors d'un test ELISA combiné



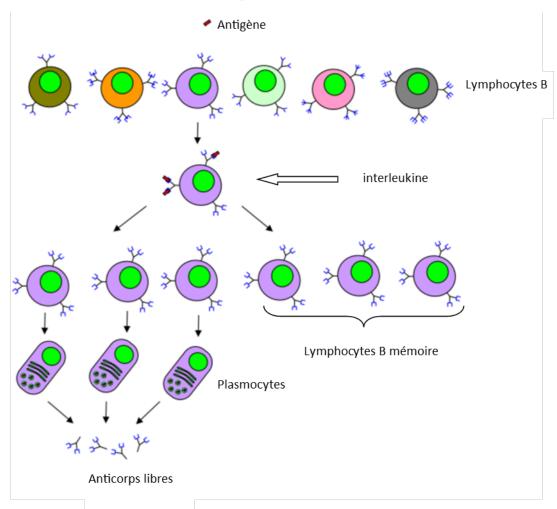


<u>Document 3-</u> Cinétique d'apparition de marqueurs plasmatiques virologiques au cours de la primo-infection par le VIH en l'absence de traitement.

ANRS Document d'information, novembre 1997.



<u>Document 4 : Mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à la production d'anticorps en réponse à un premier contact avec un antigène</u>



<u>Document 5</u> : Exploitation des résultats obtenus lors de la mise en œuvre du test ELISA combiné pour le patient de Berlin

• Valeurs mesurées pour la série : La cupule F1 correspond à celle du patient de Berlin.

Cupule	A1	B1	C1	D1	E1	F1
A _{450nm}	1,122	1,213	0,150	0,130	0,142	0,448

• Extrait de la fiche technique : Test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab

Contrôle qualité

Utiliser les contrôles positifs et négatifs dans chaque série de test pour accepter les valeurs mesurées pour les échantillons.

Critère de validation du test

- 1) Pour le contrôle négatif (R3) : cupules C1, D1 et E1.
- L'absorbance de chaque contrôle négatif (R3) doit être inférieure à $0,170:A_{(R3)} < 0,170$
- Si l'un des contrôles négatifs (R3) ne respecte pas cette condition, éliminer cette valeur et refaire le calcul de la moyenne du contrôle négatif avec les deux valeurs restantes.
- La moyenne des absorbances des contrôles négatifs doit être inférieure à 0,150 : $A_{(R3)} < 0,150$
- 2) Pour le contrôle positif anticorps VIH (R4) : Cupule A1. L'absorbance du contrôle positif anticorps VIH (R4) doit être supérieure à 0.9 : $A_{(R4)} > 0.9$
- 3) Pour le contrôle positif antigène VIH (R5) : Cupule B1. L'absorbance du contrôle positif antigène VIH (R5) doit être supérieure à 0.9 : $A_{(R5)} > 0.9$

Calcul / Interprétation des résultats

La valeur seuil est déterminée à l'aide du contrôle négatif R3 :

- Calcul de la moyenne des absorbances mesurées pour le contrôle négatif R3.

$$A_{(R3)} = \underline{A_{(C1)} + A_{(D1)} + A_{(E1)}}{3}$$

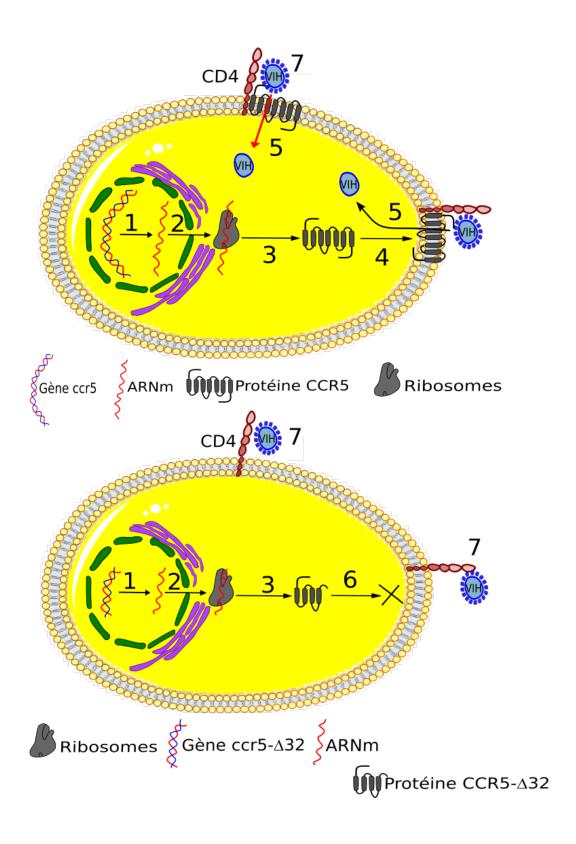
- Calcul de la valeur seuil (VS) : $VS = A_{(R3)} + 0,200$
- La présence ou l'absence d'antigène VIH ou d'anticorps anti-VIH détectable est déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil calculée.

Pour chaque échantillon, le ratio suivant est calculé :

Ratio = Absorbance de l'échantillon / Valeur Seuil

- Les échantillons dont l'absorbance est inférieure à la valeur seuil sont considérés négatifs (ratio < 1) d'après le test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab.
- Les échantillons dont l'absorbance est supérieure ou égale au seuil (ratio ≥ 1) sont considérés comme positifs par le test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab.

Document 6 : Impact de la mutation ccr5-Δ32 sur l'infection de lymphocytes T4 par le VIH.



<u>Document 7</u>: Résultats de l'étude sur la recherche de molécules bloquant sélectivement la voie de transport des protéines CCR5 vers la membrane plasmique.

https://advances.sciencemag.org/content/5/10/eaax0821

Conditions expériment ales	Cellules contenant des protéines CCR5 fluorescentes incubés avec les molécules A, B ou C.	Cellules contenant des protéines CCR1 fluorescentes incubés avec les molécules A, B ou C.		
	Témoin : Cellules contenant des protéines CCR5 fluorescentes.	Témoin : Cellules contenant des protéines CCR1 fluorescentes.		
Mesure de la fluorescenc e au niveau membranai re après incubation.	CCR5 120 100 80 40 100 80 Témoin A B C	CCR1 120 100 80 60 100 100 Témoin A B C		

Document 8: Séquence et amorces pour amplification du gène CCR5

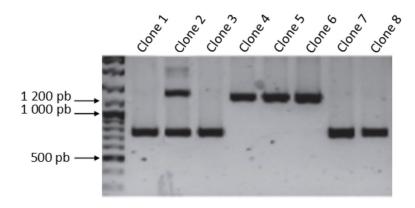
La PCR amplifie de façon spécifique une portion de l'ADN du gène de CCR5 comprenant la séquence-cible de CRISPR-Cas9.

Le fragment amplifié dans le gène de CCR5 non modifié a une longueur initiale de 1265 pb. L'élongation par l'ADN polymérase se fait à partir de l'extrémité 3' de chacune des amorces.

```
5'-CCT GTG CCT CTT CTC -séquence cible- ATG AAG ACC TTC TTT TTG- 3' 3'-GGA CAC GGA GAA GAA GAG -séquence cible- TAC TTC TGG AAG AAA AAC- 5'
```

Couple n°1	5' -CAA AAA GAA GGT CTT CAT- 3'	5' -CCT GTG CCT CTT CTC- 3'
Couple n°2	5' -CCT GTG CCT CTT CTC- 3'	5' -TAC TTC TGG AAG AAA AAC- 3'
Couple n°3	5' -GGA CAC GGA GAA GAA GAG- 3'	5' -ATG AAG ACC TTC TTT TTG- 3'
Couple n°4	5' -GTT TTT TTC ACC AAG ATG- 3'	5' -GGA CAG GGA GAA GAA GAG- 3'

<u>Document 9</u> : Résultats de l'électrophorèse de l'ADN amplifié par PCR issus des différents des clones sélectionnés.



D'après HyunJun Kang et coll, molecular therapy-nucleid acids, 2015

Document 10

Le concept de balance bénéfice-risque :

Une étude clinique n'est éthique que si le bénéfice espéré est supérieur au risque. La déclaration d'Helsinki, adoptée par l'OMS, déclare que la recherche biomédicale ne peut être faite de manière légitime que si l'importance de l'objectif est en proportion avec le risque encouru par le sujet.

L'analyse de la balance bénéfice-risque permet de choisir une stratégie thérapeutique.

Des bébés génétiquement modifiés seraient nés en Chine

Le Monde - Par Hervé Morin - Publié le 29 novembre 2018 :

Le chercheur He Jiankui a annoncé, le 26 novembre 2018, la naissance de deux jumelles, surnommées Lulu et Nana. Leur ADN aurait été modifié [afin de leur conférer une immunité naturelle contre le VIH] dont est infecté leur père. [L'objectif du scientifique était de provoquer la délétion $\Delta 32$ dans le gène CCR5 en utilisant la technologie CRISPR-Cas9, sur des cellules embryonnaires dans le cadre d'une fécondation in vitro suivi d'un transfert embryonnaire.]

En France, l'Académie nationale de médecine et l'Académie des sciences ont réagi par une déclaration commune. Elles « condamnent l'initiative de ce scientifique qui suscite de nombreuses questions scientifiques, médicales et éthiques non résolues à ce jour. De nouveaux outils moléculaires ouvrent des espoirs pour prévenir ou traiter des pathologies. Leur utilisation chez l'être humain ne doit être envisagée qu'avec la plus grande prudence. La modification du génome d'embryons humains suscite des interrogations majeures dans la mesure où elle sera transmise à la descendance et aux générations suivantes. Elle ne saurait être mise en œuvre quand le but recherché peut être atteint par d'autres moyens, comme c'est le cas pour la prévention d'une infection par le VIH ».

Le chercheur chinois à l'origine des bébés génétiquement modifiés condamné à 3 ans de prison

Le quotidien du médecin - Publié le 02/01/2020

Le chinois He Jiankui a été condamné fin décembre par le tribunal du district de Nanshan, à Shenzhen, à 3 ans de prison et une amende de 3 millions de yuans (384 000 euros) pour « avoir illégalement procédé à la manipulation génétique d'embryons à des fins de reproduction ». Ce chercheur avait créé la surprise, et suscité l'indignation, en novembre 2018 en annonçant la naissance de jumelles génétiquement modifiées pour être résistantes au VIH.