BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

spécialité biotechnologies

Sujet zéro

Épreuve écrite

Biochimie – Biologie – Biotechnologies

Durée 3h- Coefficient 7

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte 12 pages.

Document de travail

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

Le mystère du patient de Berlin

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

Remarque : ce sujet zéro porte sur une thématique en lien avec un chapitre du programme faisant partie des parties exclues dans la définition d'épreuve.
Toutefois, l'ensemble des questionnements se rattache à des concepts et savoir-faire explicitement au programme de l'épreuve.

Cette ouverture thématique était caractéristique des sujets de biotechnologies et restera d'actualité pour les sujets de biochimie-biologie-biotechnologies.

Le patient de Berlin est le premier cas connu au monde de guérison du SIDA. 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.

Ainsi dénommé car il a été pris en charge par le Docteur Hütter, à Berlin, le patient de Berlin n'a plus montré de signe d'infection douze ans après le diagnostic d'infection par le VIH grâce à un idée de traitement 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

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 mis en œuvre pour le patient de Berlin.

Q1. C1. Réaliser un chronogramme de la procédure opératoire fournie dans le document 1 en précisant la spécificité de chacun des anticorps utilisés.

Document de travail

Le schéma du **document 2** correspond à l'édifice moléculaire qui se construit dans une cupule en cas de présence de l'antigène p24 et d'anticorps anti-VIH dans le plasma du patient.

Q2. C1. Identifier les molécules recherchées dans le plasma du patient sur le schéma du **document 2**, en les citant.

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. Expliquer l'intérêt d'associer la recherche des antigènes p24 avec la recherche d'anticorps anti-VIH. Pour cela, s'appuyer sur le délai nécessaire pour atteindre le seuil de détection des anticorps anti-VIH.

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

Q4. C4. Expliquer pourquoi un délai est observé entre l'entrée du virus dans l'organisme et la production des anticorps dirigés contre le VIH, à l'aide du document 4 et des connaissances.

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 l'acceptabilité des valeurs mesurées pour les échantillons, dans les conditions du jour, en utilisant les contrôles et les données obtenues.

Q6. C2. Exploiter, si possible, la valeur mesurée obtenue pour le patient de Berlin et conclure sur le résultat positif ou négatif du patient d'après le test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab.

2. Stratégie thérapeutique choisie pour le patient de Berlin

Onze ans après le diagnostic de séropositivité, le patient de Berlin a déclaré un cancer de la moelle osseuse avec un très mauvais pronostic. Le Docteur Hütter a imaginé une stratégie thérapeutique particulière qui a permis non seulement de traiter le cancer de la moelle osseuse mais aussi d'éliminer le VIH de l'organisme du patient.

La stratégie a été de réaliser une greffe de moelle osseuse provenant d'un donneur présentant une immunité naturelle contre le VIH. Selon les estimations, 0,3 % de la population mondiale est doté d'une immunité naturelle contre le VIH grâce à une mutation d'un gène codant la protéine CCR5. La protéine mutée est notée CCR5-Δ32.

Les virus ne peuvent se multiplier qu'en étant à l'intérieur d'une cellule où ils pourront profiter de la présence des organites dont ils sont dépourvus. Or c'est la moelle osseuse qui produit les principales cellules cibles du VIH : les lymphocytes T4 et les monocytes.

Le **document 6** présente un schéma du devenir des protéines CCR5 et CCR5-Δ32 et l'impact sur l'infection des lymphocytes par le VIH.

Document de travail

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 possédant toutes leurs 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. Tester des molécules bloquant la voie de transport de CCR5 vers la membrane.

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

Un axe de recherche très actif dans les laboratoires est d'identifier 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 lymphocytes contenant des protéines CCR5 fluorescentes sont mis en présence de différentes molécules (A, B et C) candidates pour inhiber sélectivement la voie de transport de CCR5 vers la membrane. L'effet de ces mêmes molécules A à 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 A, B ou C, inhibe le plus sélectivement la voie de transport de CCR5.

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

L'équipe de He Jiankui (département de biologie de l'Université des sciences et de la technologie du Sud à Shenzhen, en Chine) a développé une autre stratégie consistant à utiliser le système CRISPR-Cas9 pour modifier directement l'ADN du patient dans le but de produire des lymphocytes résistants au VIH.

Des cellules de la moelle osseuse sont mise en culture en contact avec un système paramétré pour créer une délétion de 529 paires de bases (pb) dans les allèles du gène de CCR5.

Comme la technologie CRISPR-Cas9 n'est pas efficace à 100%, le repérage des cellules réellement modifiées est réalisé par 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 par cellules isolées. Quelques cellules de chaque clone sont ensuite préparées pour amplifier les séquences d'ADN correspondant au gène CCR5. Une électrophorèse permettra d'établir quels clones sont bien porteurs de la délétion de 529 pb.

Document de travail

Les amorces utilisées pour la PCR sont situées de part et d'autre de la séquence cible. Si la technologie CRISPR-Cas9 a réussi, une portion d'ADN de 529 pb est éliminée.

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

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

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

Q12. C4. Analyser les résultats d'électrophorèse, **document 9**, pour choisir les clones à réinjecter aux patients.

Un vérification approfondie du génome sera 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. Présenter le cas particulier du patient de Berlin et justifier la stratégie thérapeutique choisie. Argumenter le fait que cette stratégie ne peut pas être généralisée à tous les patients infectés par le VIH et lister les nouvelles approches thérapeutiques présentées dans ce sujet.

Partie II - Question de synthèse

Le **document 10** présente plusieurs ressources pour réaliser la synthèse :

- La balance bénéfice / risque.
- La naissance des « bébés CRISPR » suscite une condamnation universelle.

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

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

Document de travail

<u>Document 1</u> – Extrait de la fiche technique du tests 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.

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

Réactifs :

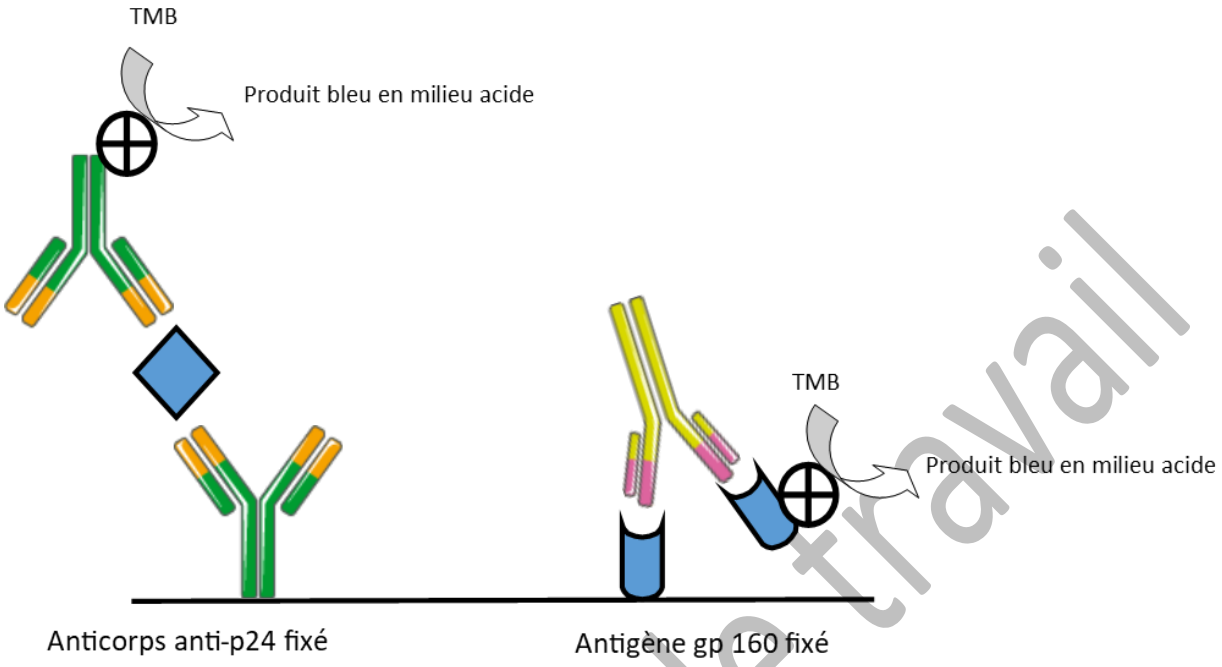
R1	barrette de 12 cupules préalablement préparées avec - des anticorps dirigés contre l'antigène p24 du VIH - et des antigènes purifiés du VIH, notamment la protéine gp 160. Les cupules sont repérées par des lettres et des chiffres A1, B1, C1, D1, D1, E1, F1…etc
R2	Solution de lavage.
R3	Contrôle négatif : 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' tetramethyl-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.

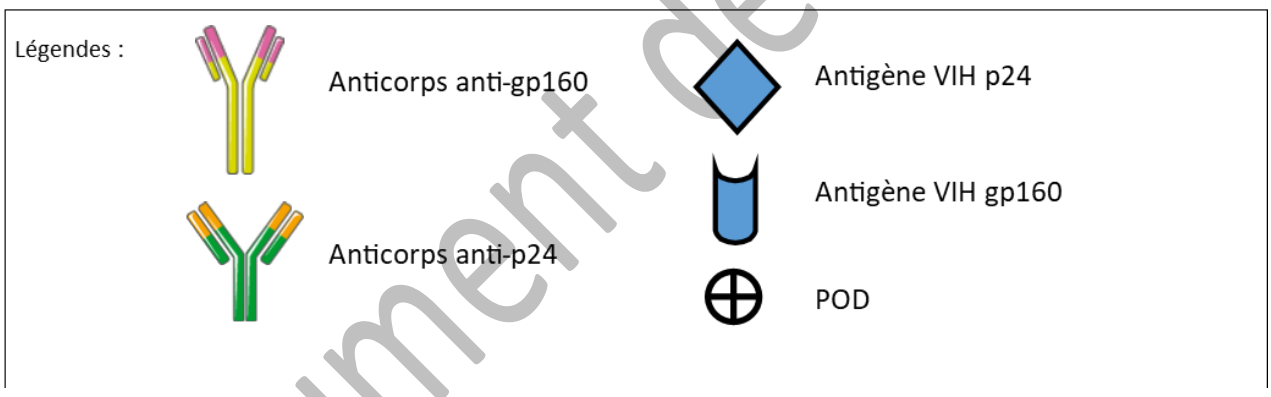
Procédure opératoire :

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). Répéter le lavage au moins 2 fois.
6) Distribuer rapidement 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.

Document de travail

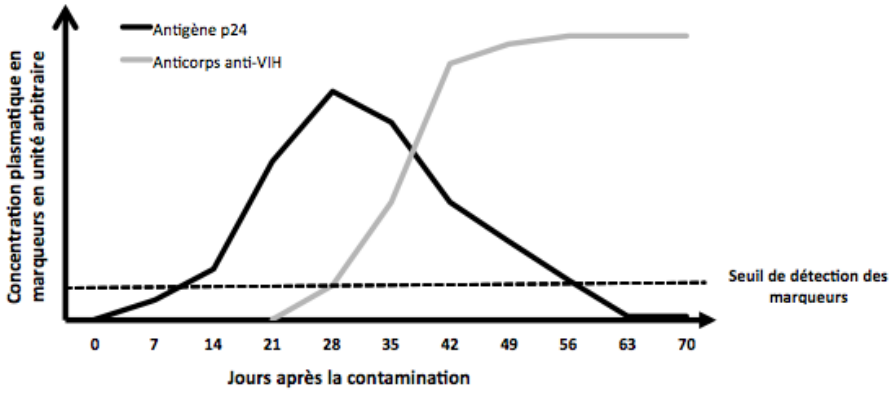
Document 2 : Représentation schématique des édifices moléculaires présents dans une cupule en présence d'antigène p24 et d'anticorps anti-VIH réalisé lors d'un test ELISA combiné





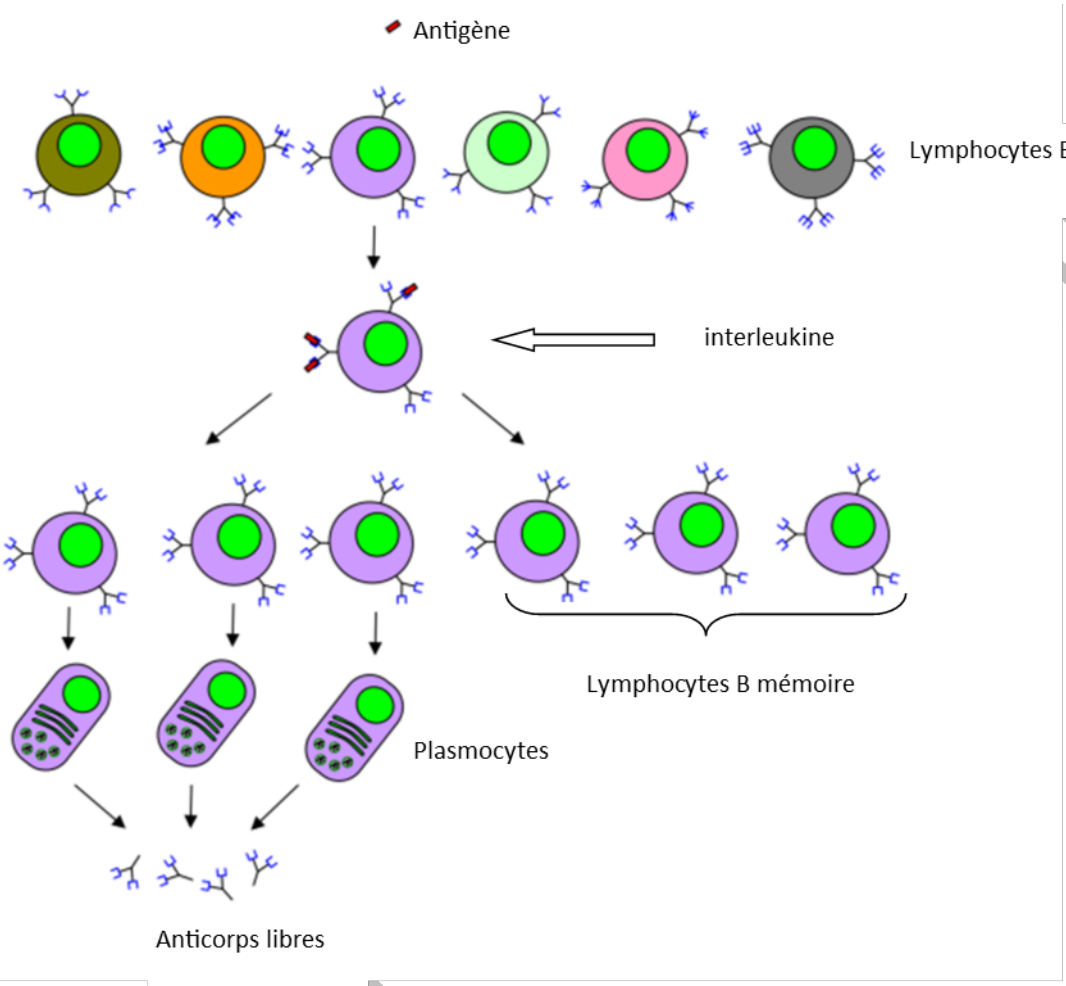
Document 3- Cinétique d'apparition de marqueurs plasmatiques virologiques au cours de la primo-infection par le VIH en l'absence de traitement.

ANRS Document d'information, novembre 1997.



Document de travail

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



Document

Document 5 : 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	0,172	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 :

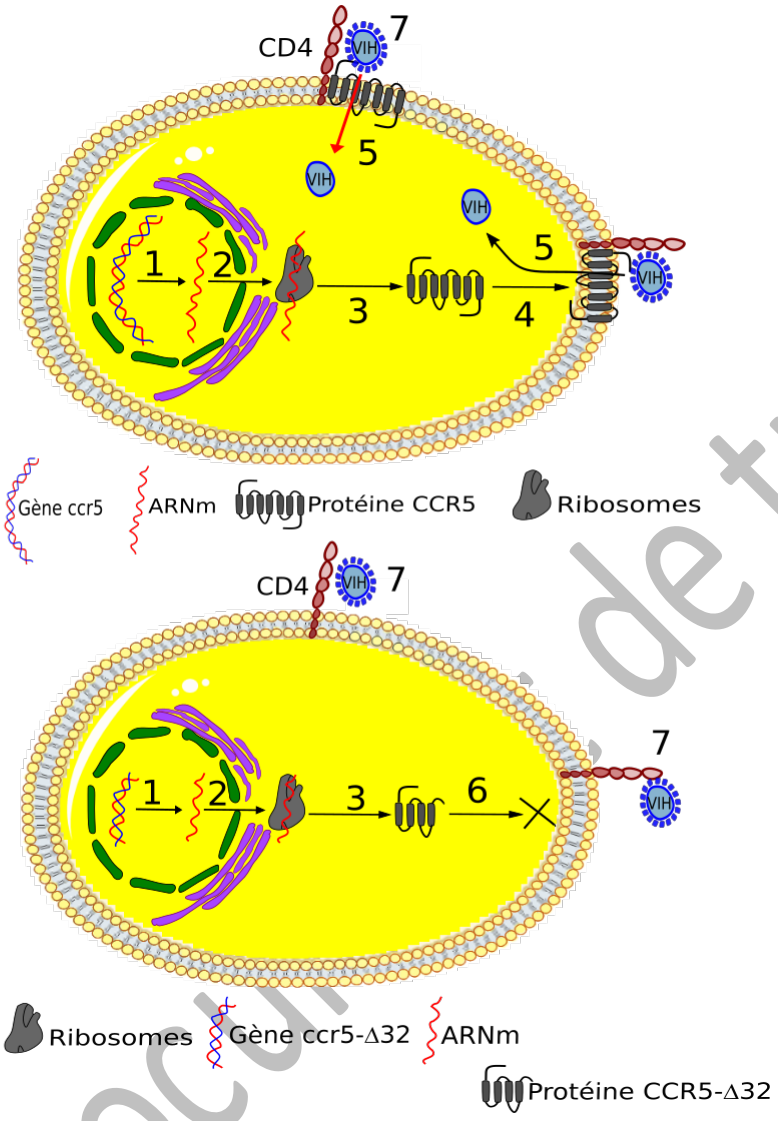
- Calcul de la moyenne des absorbances mesurées pour le contrôle négatif R3.

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

- 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 de travail

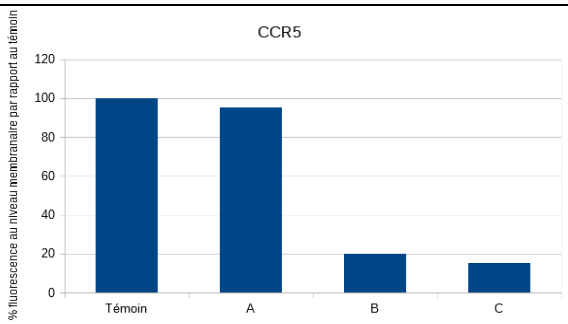
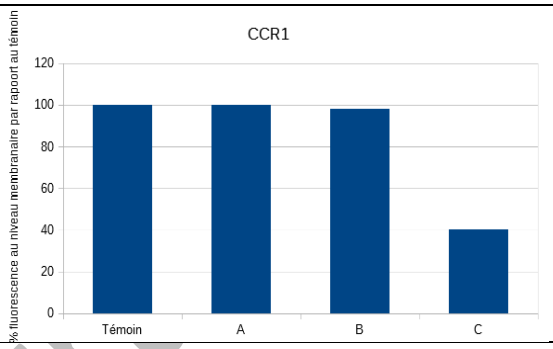
Document 6 : Impact de la mutation CCR5-Δ32 sur l'infection par le VIH.



Document de travail

Document 7 : Résultats de l'étude sur les molécules bloquant sélectivement la voie de transport des protéines CCR5 vers la membrane.

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

Conditions expérimentales	Lymphocytes contenant des protéines CCR5 fluorescentes incubées avec les molécules A, B ou C.	Lymphocytes contenant des protéines CCR1 fluorescentes incubées avec les molécules A, B ou C.
	Témoin : Lymphocytes contenant des protéines CCR5 fluorescentes.	Témoin : Lymphocytes contenant des protéines CCR1 fluorescentes.
Mesure de la fluorescence au niveau membranaire après incubation.		

Document 8 : Séquence et amorces pour amplification du gène CCR5

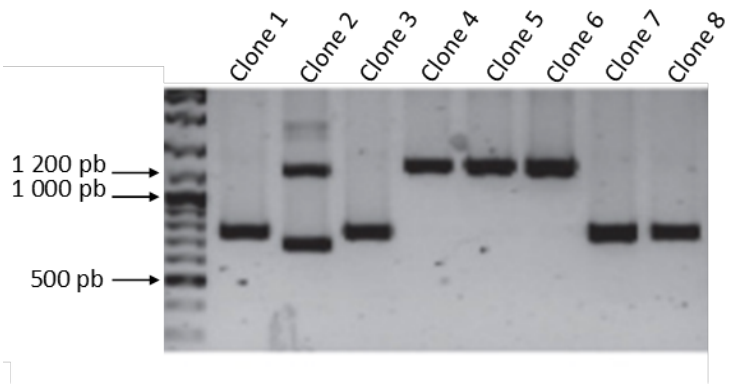
La séquence cible est la portion d'ADN correspondant au gène CCR5.
Le gène CCR5 non modifié a une longueur initiale de 1265 pb.

5'- CCT GTG CCT CTT 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 CTT CTC - 3'
Couple n°2	5' - CCT GTG CCT CTT 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'

Document de tr

Document 9 : 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.

La naissance des « bébés Crispr » suscite une condamnation universelle

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 Δ32 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 Monde avec l'Agence Française de Presse - Publié le 30 décembre 2019.

Le 30 décembre 2019, le chercheur He Jiankui a été condamné à trois ans de prison et une amende de 384 000 euros par un tribunal de Shenzhen, la métropole du sud du pays où il avait effectué ses travaux, pour *« avoir illégalement procédé à la manipulation génétique d'embryons à des fins de reproduction »*, a précisé l'agence de presse officielle.

Document de travail