

# BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

ÉPREUVE D'ENSEIGNEMENT DE SPÉCIALITÉ

**SESSION 2021**

## **SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE**

**Biochimie, biologie et biotechnologies**

### **Sujet zéro**

Durée de l'épreuve : **3 heures**

*L'usage de la calculatrice est autorisé*

Dès que ce document vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.

Ce document comporte **21 pages** numérotées de 1/21 à 21/21 :

- **sujet 1 : pages 3/21 à 12/21**
- **sujet 2 : pages 13/21 à 21/21**

**Le candidat traite, au choix, un sujet parmi les deux sujets proposés.**

**Le candidat traite l'intégralité du sujet choisi et reporte le numéro du sujet choisi sur sa copie.**

## Parties du programme mobilisées dans chacun des sujets

L'évaluation s'effectue par compétences. La pondération des compétences est identique pour les deux sujets. Les compétences sont indiquées entre parenthèses au niveau de chaque question et mobilisent des concepts et savoir-faire indiqués dans les programmes.

**Afin de faciliter le choix du sujet à traiter par le candidat**, les parties essentielles mobilisées dans chacun des sujets sont indiquées ci-dessous.

### Sujet 1 : pp. 3/21 à 12/21

#### LE MYSTÈRE DU PATIENT DE BERLIN

Biochimie-biologie partie D « Information et communication » (synthèse des protéines)

S2.3 Réponse immunitaire adaptative

S3.2 Réplication

T6 Détecter et caractériser les biomolécules (ELISA)

T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR

L1.2.4 Évaluation des résultats expérimentaux

### OU

### Sujet 2 : pp. 13/21 à 21/21

#### EXPLORATION D'UNE HÉMOPATHIE

S1.7 Les enzymes du métabolisme et la régulation

S2.2 Réponse immunitaire innée

S3.2 Réplication

T8.2 Dosage d'une activité enzymatique (z) et de sa concentration d'activité (b)

T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR

L1.2.4 Évaluation des résultats expérimentaux

#### COMPÉTENCES ÉVALUÉES

| C1                   | C2                    | C3                      | C4                            | C5                    | C6                    |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Analyser un document | Effectuer les calculs | Interpréter des données | Argumenter un choix technique | Élaborer une synthèse | Communiquer à l'écrit |
| <b>5 points</b>      | <b>2 points</b>       | <b>3 points</b>         | <b>4 points</b>               | <b>5 points</b>       | <b>1 point</b>        |

# SUJET 1

## LE MYSTÈRE DU PATIENT DE BERLIN

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'immunodéficience 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.

### Partie I - Questionnement scientifique et technologique (durée indicative 2h30)

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.

#### 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 que la combinaison des deux tests permet d'obtenir un résultat positif quelle que soit la date du test à partir du 14<sup>e</sup> 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 médecin traitant 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 Tester des molécules bloquant la voie de transport de CCR5 vers la membrane

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

Une équipe de recherche 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).

Pour repérer les cellules modifiées, les auteurs réalisent une PCR suivie d'une électrophorèse :

- l'ADN extrait à partir de quelques cellules modifiées 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 modifiées.

**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 – Sujet 1

### Extrait de la fiche technique du test Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab

Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab est une technique immuno-enzymatique qualitative fondée 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 :

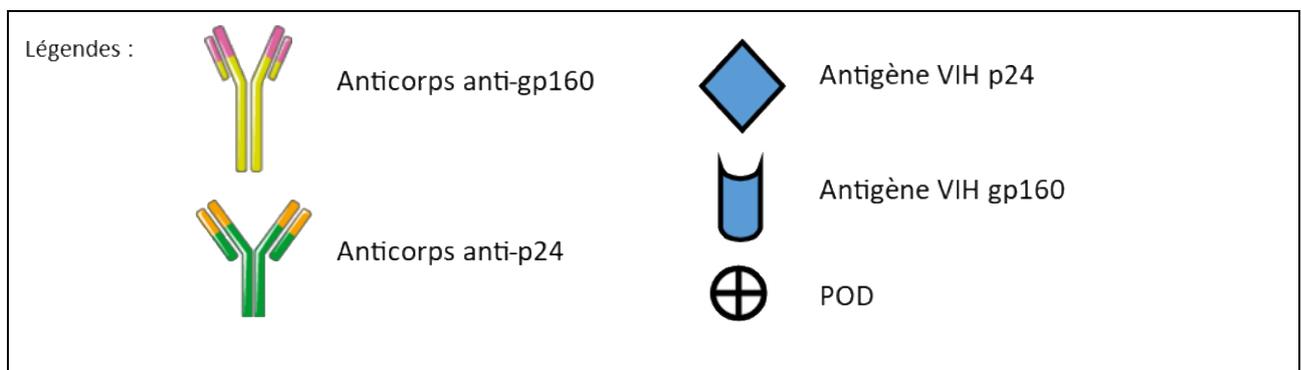
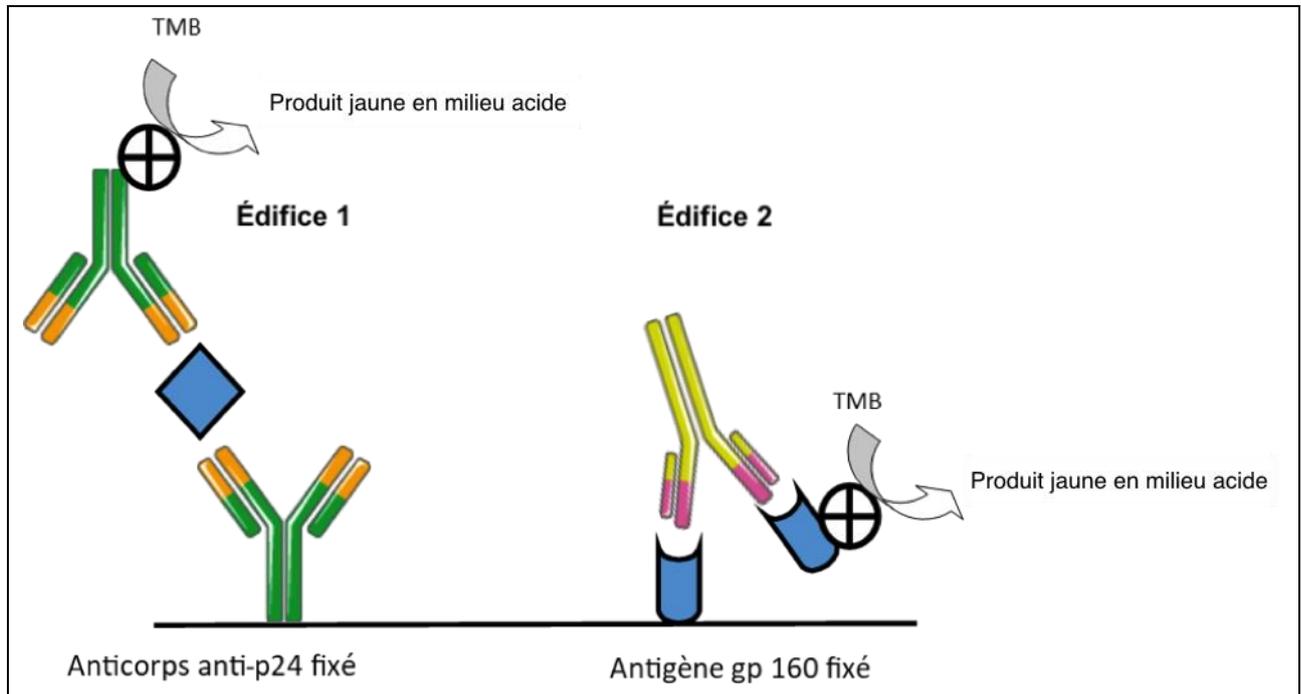
|           |  |
|-----------|--|
| <b>R1</b> | barrette de 12 cupules préalablement préparées avec<br>- des anticorps dirigés contre l'antigène p24 du VIH<br>- et des antigènes purifiés du VIH, notamment la protéine gp160.<br><br>Les cupules sont repérées par des lettres et des chiffres A1, B1, C1, D1, D1, E1, F1... |
| <b>R2</b> | Solution de lavage.  |
| <b>R3</b> | Contrôle négatif : plasma humain, ne possédant ni antigène VIH, ni anticorps anti-VIH.   |
| <b>R4</b> | Contrôle positif anticorps anti-VIH : plasma humain possédant des anticorps anti-VIH.  |
| <b>R5</b> | Contrôle positif antigène VIH : plasma humain possédant des antigènes VIH, notamment gp160 et p24.   |
| <b>R6</b> | <b>Conjugué 1</b> : anticorps anti-p24 couplé à une enzyme (peroxydase, POD)   |
| <b>R7</b> | <b>Conjugué 2</b> : antigène gp160 couplé à une enzyme (peroxydase, POD)   |
| <b>R8</b> | 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.  |
| <b>R9</b> | 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 barrette (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.

## Document 2 – Sujet 1

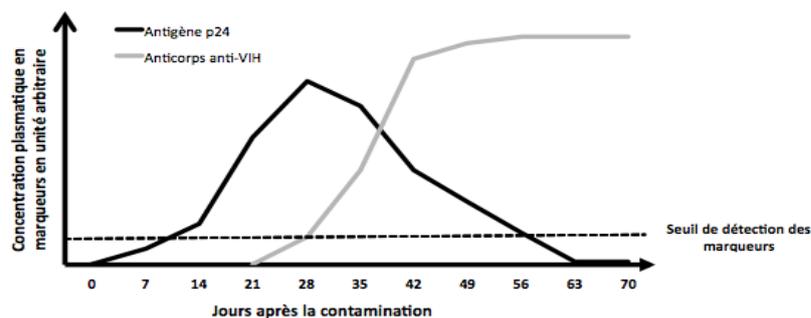
Représentation schématique des édifices moléculaires qui se forment dans une cupule en présence d'antigène p24 et d'anticorps anti-VIH lors d'un test ELISA combiné



## Document 3 – Sujet 1

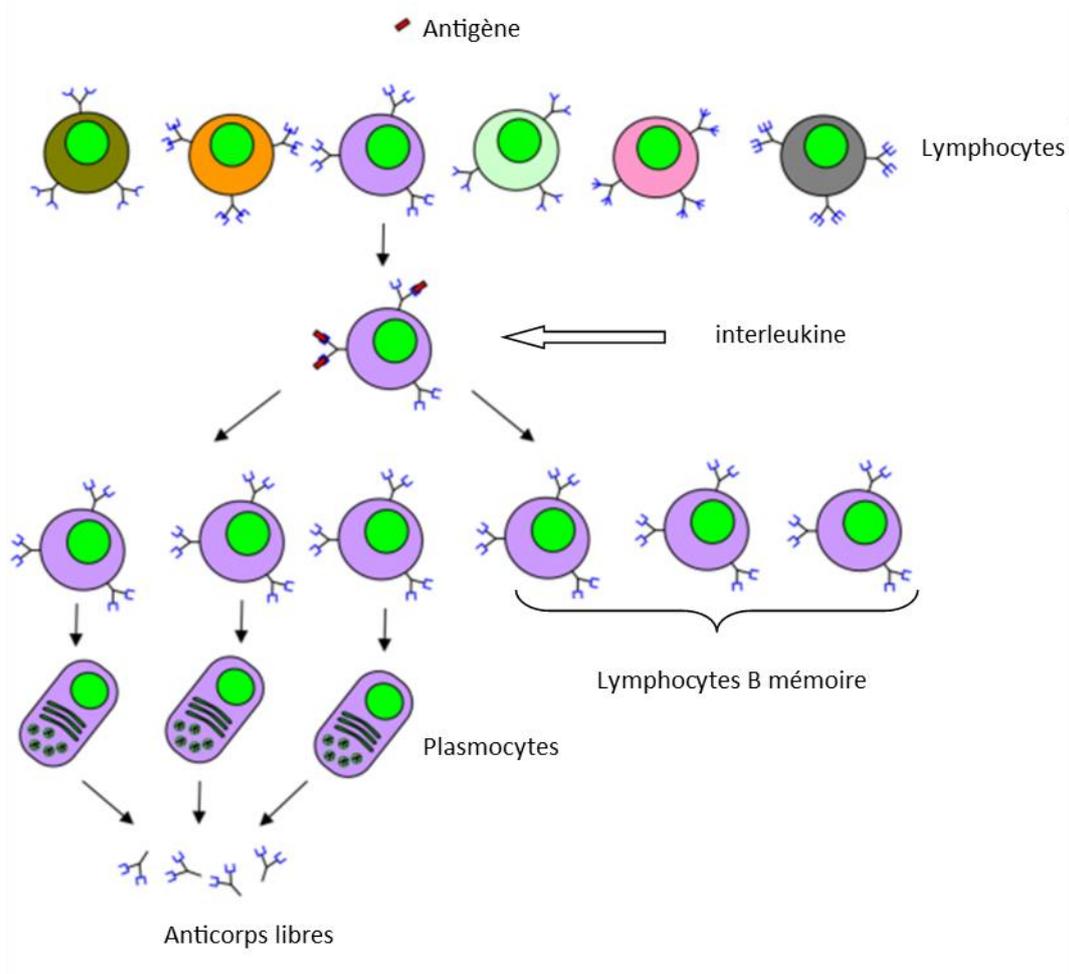
Cinétique d'apparition de marqueurs plasmatiques virologiques au cours de la primo-infection par le VIH en l'absence de traitement

ANRS Document d'information, novembre 1997.



**Document 4 – Sujet 1**

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



## Document 5 – Sujet 1

### 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 <sub>450nm</sub> | 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 tests 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.

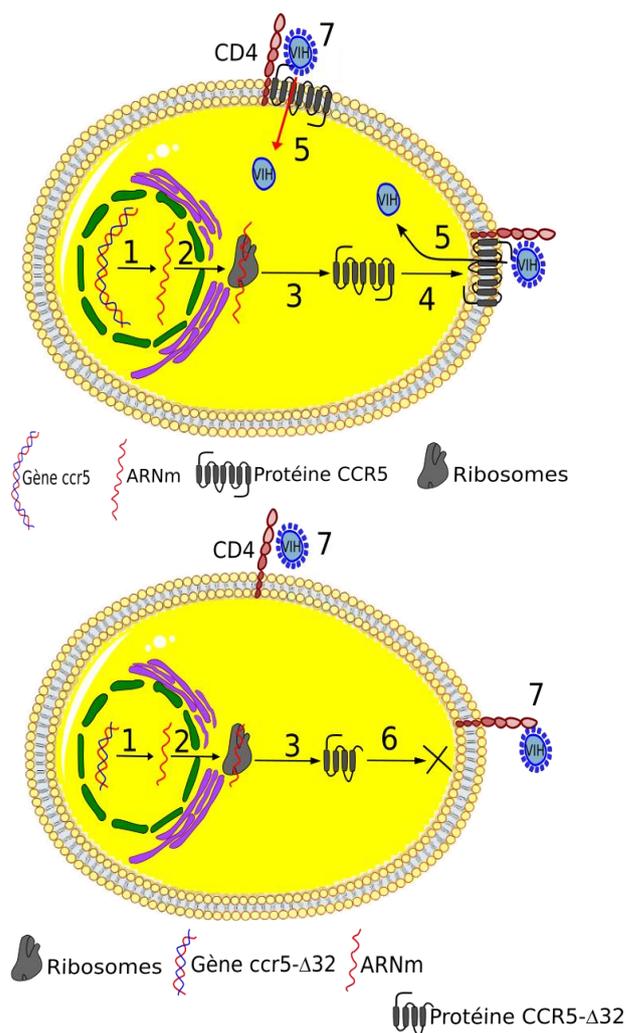
Pour chaque échantillon, le ratio suivant est calculé :

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 6 – Sujet 1

### Impact de la mutation CCR5-Δ32 sur l'infection de lymphocytes T4 par le VIH



## Document 7 – Sujet 1

### Résultats de l'étude sur la recherche de molécules bloquant sélectivement la voie de transport des protéines CCR5 vers la membrane plasmique

| Conditions expérimentales   | Cellules contenant des protéines CCR5 fluorescentes incubées avec les molécules A, B ou C.  | Cellules contenant des protéines CCR1 fluorescentes incubées avec les molécules A, B ou C. |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
|---|---|--|---|--------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|--|-----------|---|--------|-----|---|------|---|-----|---|-----|
|   | Témoin : Cellules contenant des protéines CCR5 fluorescentes.   | Témoin : Cellules contenant des protéines CCR1 fluorescentes.                              |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| Mesure de la fluorescence au niveau membranaire après incubation. | <p align="center"><b>CCR5</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Condition</th> <th>% de fluorescence au niveau membranaire par rapport au témoin</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Témoin</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>~95</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>~20</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>~15</td> </tr> </tbody> </table> | Condition  | % de fluorescence au niveau membranaire par rapport au témoin | Témoin | 100 | A | ~95 | B | ~20 | C | ~15 | <p align="center"><b>CCR1</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Condition</th> <th>% de fluorescence au niveau membranaire par rapport au témoin</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Témoin</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>~100</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>~95</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>~40</td> </tr> </tbody> </table> | Condition | % de fluorescence au niveau membranaire par rapport au témoin | Témoin | 100 | A | ~100 | B | ~95 | C | ~40 |
| Condition   | % de fluorescence au niveau membranaire par rapport au témoin   |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| Témoin  | 100   |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| A   | ~95   |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| B   | ~20   |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| C   | ~15   |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| Condition   | % de fluorescence au niveau membranaire par rapport au témoin   |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| Témoin  | 100   |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| A   | ~100  |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| B   | ~95   |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |
| C   | ~40   |  |   |        |     |   |     |   |     |   |     |  |           |   |        |     |   |      |   |     |   |     |

## Document 8 – Sujet 1

### **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.

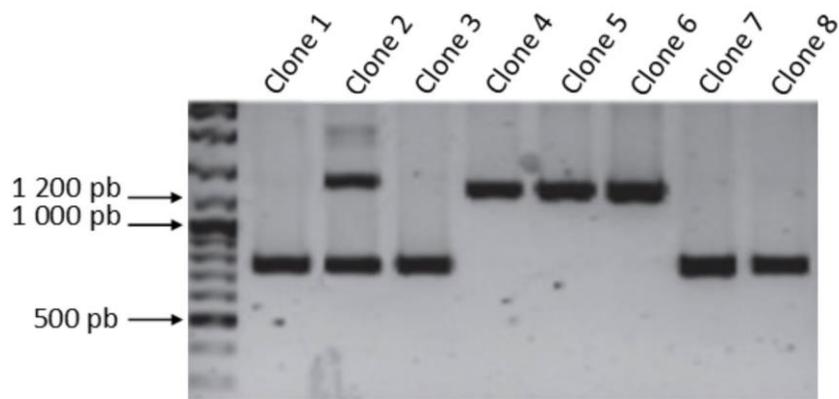
L'élongation par l'ADN polymérase se fait à partir de l'extrémité 3' de chacune des amorces.

5' -CCT GTG CCT CTT 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 9 – Sujet 1

### **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 – Sujet 1**

### **Le concept de balance bénéfico-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 bénéfico-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.

# SUJET 2

## EXPLORATION D'UNE HÉMOPATHIE

Au centre hospitalier universitaire Robert-Debré à Paris, un garçon âgé de 11 ans sans antécédents particuliers a été hospitalisé par le biais des urgences pédiatriques. Son admission à l'hôpital s'explique par une fièvre persistante depuis deux semaines pour laquelle les parents ont déjà consulté un médecin précédemment. (Cas relaté dans les *Annales de Biologie Clinique* 2011 ; 69 (4) : 481-4).

### Partie I - Questionnement scientifique et technologique (durée indicative 2h30)

L'objectif de ce sujet est d'identifier la pathologie existante chez l'enfant et d'étudier les mécanismes de son apparition.

#### 1. Les macrophages en première ligne contre l'infection

Une infection à *Staphylococcus aureus* associée à une réponse inflammatoire généralisée a été décelée chez l'enfant.

En cas d'infection, les macrophages déclenchent et amplifient la réaction inflammatoire qui contribue à attirer au site infectieux les acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Le **document 1** décrit le mécanisme qui conduit à l'activation des macrophages.

**Q1.** (C1) Montrer que la bactérie *S.aureus* peut activer les macrophages en identifiant le ou les ligands mis en jeu dans la reconnaissance de *S.aureus* par les macrophages et le récepteur associé.

**Q2.** (C1) À partir de l'analyse du **document 1- c**, montrer que l'activation du macrophage déclenche la réaction inflammatoire.

**Q3.** (C4) Argumenter alors le fait que les macrophages sont qualifiés de « cellules sentinelles » du système immunitaire.

#### 2. Suspicion d'un déficit en enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase

Suite à l'inflammation, une destruction massive des globules rouges dans le sang de l'enfant, appelé accident hémolytique, a aggravé son état de santé. Ce type d'accident hémolytique est souvent lié à une maladie génétique : le déficit en enzyme *glucose-6-phosphate déshydrogénase* (G6PD).

**Q4.** (C1) Établir un logigramme reliant l'absence d'activité de l'enzyme G6PD à un accident hémolytique à la suite d'une infection, à partir du **document 2**.

Conformément aux recommandations de la Haute autorité de santé, il a été procédé à un dosage de la concentration d'activité enzymatique de la G6PD dans le sang pour dépister cette maladie.

Une fiche technique du dosage de la concentration d'activité de l'enzyme G6PD est présentée dans le **document 3**.

**Q5.** (C3) Expliquer l'augmentation de l'absorbance mesurée entre t1 et t2 pour une mesure d'activité.

**Q6.** (C2) Déterminer par le calcul la valeur de la concentration d'activité catalytique  $b_{(G6PD; \text{hémolysat})}$  chez le patient. Les équations aux unités et aux valeurs numériques sont attendues.

**Q7.** (C3) Comparer la valeur de  $b_{(G6PD; \text{hémolysat})}$  aux valeurs physiologiques de référence et indiquer si le patient souffre ou non d'un déficit enzymatique en G6PD.

### 3. Recherche d'une mutation du gène codant l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase

Dans le cas où un déficit enzymatique en G6PD est observé, un séquençage du gène codant l'enzyme peut être effectué pour en rechercher la cause. Dans le cas du patient, un séquençage à haut débit *Next Generation Sequencing* (NGS) a été réalisé pour repérer d'éventuelles mutations ponctuelles.

Le séquençage NGS nécessite de mettre en œuvre une succession d'étapes de préparation de l'ADN pour disposer de fragments d'ADN fixés sur une plaque et amplifiés séparément.

Le **document 4** présente les étapes de cette préparation, appelée « bridge PCR ».

**Q8.** (C4) Représenter par un schéma le résultat obtenu à l'issue de l'étape 2, en faisant figurer l'orientation des brins obtenus. En déduire l'intérêt de cette étape.

**Q9.** (C1) Faire correspondre les étapes A, B et C de l'étape 3 du **document 4** avec les termes « élongation », « dénaturation » et « hybridation ». Argumenter chaque réponse.

**Q10.** (C4) Montrer que l'amplification génique présentée dans l'étape 3 du **document 4** est analogue à une PCR, en utilisant les termes suivants « séquence cible », « polymérisation », « complémentarité » et « amorce ».

L'analyse de la séquence de l'ADN du patient met en évidence une mutation du gène codant l'enzyme G6PD. Cette mutation notée « 202 G > A » se manifeste par la substitution d'une guanine en une adénine en position 202 de l'ADN codant la protéine. La séquence protéique de l'enzyme se trouve alors modifiée : l'acide aminé valine en position 68 de la protéine est substitué par une méthionine.

Des mesures d'activité ont été effectuées sur la forme sauvage et la forme mutée de la protéine (**document 5**).

**Q11.** (C4) Expliquer à partir des données obtenues les raisons du déficit enzymatique en G6PD à l'origine de la pathologie du patient.

### 4. Bilan

**Q12.** (C5) **Regrouper** et **organiser** les données permettant d'expliquer l'accident hémolytique chez l'enfant déficitaire en enzyme G6PD. Alimenter cette synthèse en utilisant de manière cohérente les mots suivants :

- accident hémolytique
- infection
- stress oxydatif
- mutation
- séquence protéique de l'enzyme G6PD
- déficit en enzyme G6PD
- activité catalytique

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

Les progrès des techniques de séquençage permettent de faire de la biologie moléculaire un atout majeur pour la médecine diagnostique.

Il existe par ailleurs des tests génétiques dits prédictifs qui permettent de dépister, chez un individu asymptomatique, d'éventuelles mutations et ainsi de révéler une « prédisposition génétique », c'est-à-dire une probabilité de développer une maladie en raison de cette mutation. En France, cet accès aux tests génétiques prédictifs est réglementé, à la différence des États-Unis.

Le **document 6** expose les modalités de réalisation des tests génétiques prédictifs en France ainsi que des avis et témoignages recueillis à ce sujet.

**Q13.** (C5) Argumenter l'intérêt d'encadrer, par un avis médical, les démarches liées à l'utilisation d'un test génétique prédictif.

## Document 1 – Sujet 2

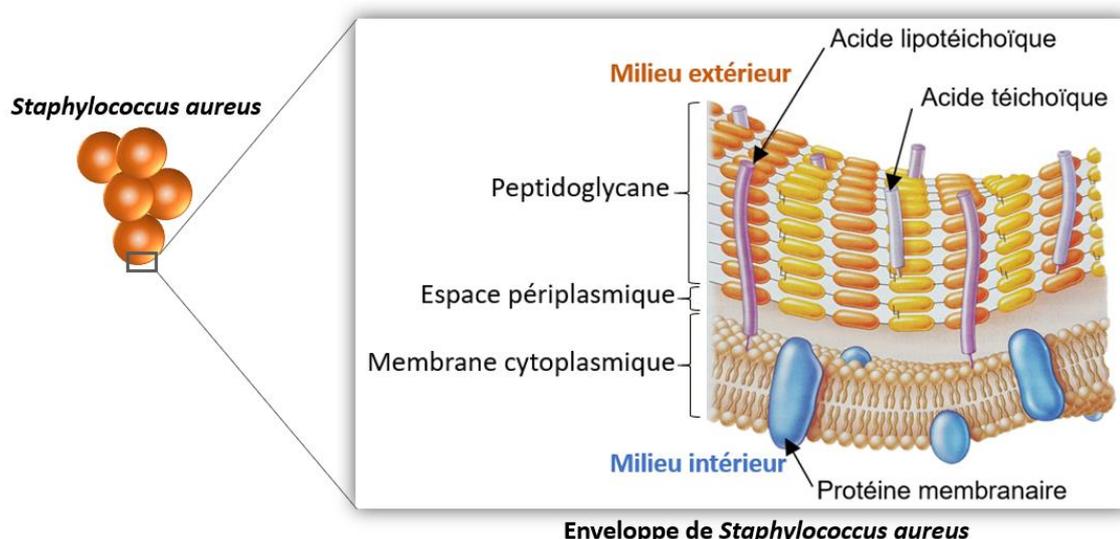
### Les macrophages face aux agents pathogènes

#### a) Détection d'agents pathogènes par le macrophage

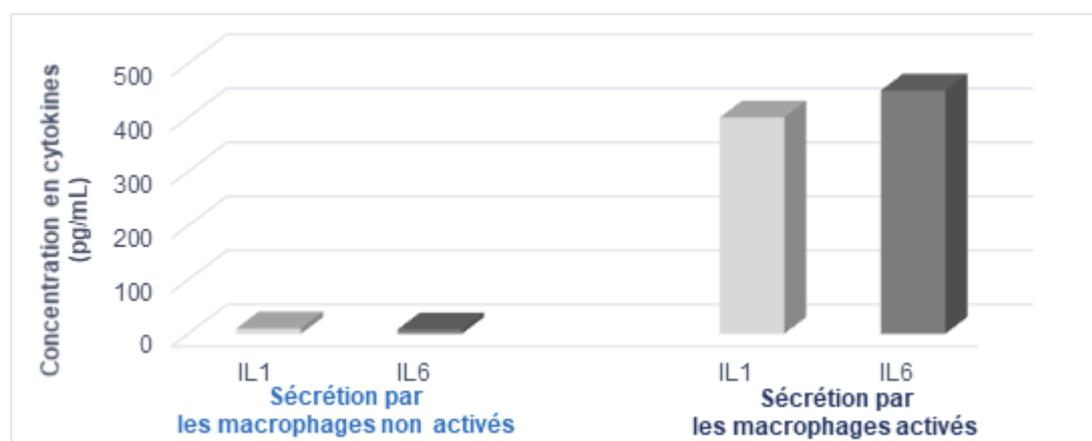
Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée. Certains macrophages résident dans les tissus et sont capables de reconnaître les agents infectieux via leurs récepteurs de surface « PRR » (*Pattern Recognition Receptor*). Ces récepteurs détectent des molécules, les « PAMP » (*Pathogen Associated Molecular Pattern*), spécifiques de certains micro-organismes et n'existant pas dans l'organisme. Cette reconnaissance récepteur-ligand active le macrophage induisant chez lui la sécrétion de protéines particulières, les cytokines, ainsi que sa capacité à phagocyter l'agent étranger.

| Type de récepteurs PRR à la surface des macrophages | Ligands PAMP reconnus par le récepteur                   |
|---|--|
| TLR 2   | Peptidoglycane ou acides teichoïques des bactéries Gram+ |
| TLR 3   | ARN double brin de virus                                 |
| TLR 4   | Lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-            |
| TLR 6   | Glucides de la membrane des levures                      |

#### b) Ultrastructure de l'enveloppe (paroi et de la membrane) de *Staphylococcus aureus*



#### c) Étude *in vitro* de la sécrétion de cytokines par les macrophages

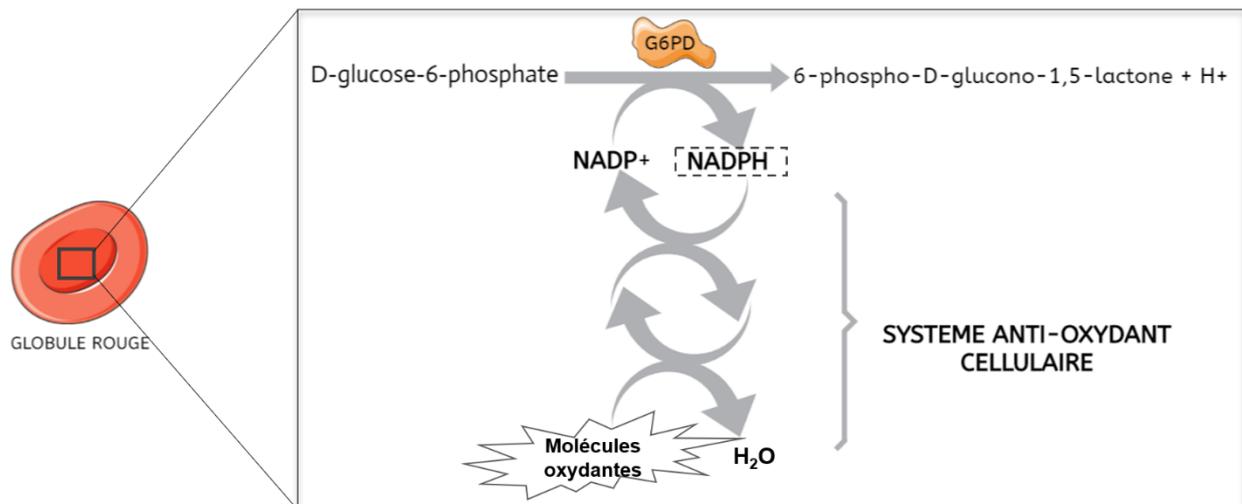


Les cytokines sont de petites protéines sécrétées par les cellules en réponse à une stimulation.

Les cytokines IL1 et IL6 agissent notamment sur les cellules des parois des capillaires, favorisant la vasodilatation des capillaires et la diapédèse d'autres cellules immunitaires.

## Document 2 – Sujet 2

### Mécanisme intracellulaire de protection contre le stress oxydatif dans le globule rouge



Le stress oxydatif correspond à une accumulation dans la cellule d'espèces chimiques oxydantes dérivées de l'oxygène. Ce phénomène altère les cellules, et peut aller jusqu'à la mort cellulaire.

Le système anti-oxydant régule l'accumulation d'espèces chimiques oxydantes dans la cellule. Il est composé de protéines et d'enzymes cytoplasmiques agissant en cascade. La réaction catalysée par l'enzyme G6PD ne fait pas partie de ce système mais elle apporte le NADPH nécessaire au bon fonctionnement du système qui a pour fonction de transformer les molécules oxydantes en molécules réduites et stables comme les molécules d'eau.

Dans le cas d'une infection grave, la réaction inflammatoire exacerbée engendre un stress oxydatif accru dans les cellules. Si le système de défense anti-oxydant est défaillant, les espèces chimiques oxydantes ne sont plus transformées et finissent par s'accumuler dans le cytoplasme, provoquant alors une oxydation importante des constituants cellulaires.

Dans le globule rouge, cela se manifeste par l'oxydation de la membrane plasmique et de l'hémoglobine. Les globules rouges altérés en grand nombre par le stress oxydatif sont alors massivement détruits, ce phénomène est appelé accident hémolytique.

## Document 3 – Sujet 2

### Fiche technique du dosage de l'activité enzymatique de la *glucose-6-phosphate 1-déshydrogénase* (technique Biosentec®)

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Principe du dosage</b> | Le dosage de l'activité enzymatique de l'enzyme G6PD est pratiqué sur un échantillon de sang hémolysé. Il repose sur la mise en évidence de l'apparition du NADPH par mesure spectrophotométrique. La molécule NADPH absorbe à 340 nm, et pas NADP <sup>+</sup> , ce qui permet de suivre la réaction enzymatique. La quantité de NADPH formée par unité de temps reflète l'activité G6PD présente dans l'échantillon.<br><b>D-glucose 6-phosphate + NADP<sup>+</sup> → 6-phospho-D-glucono-1,5-lactone + NADPH + H<sup>+</sup></b>   |
| <b>Réactifs</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tampon pH 8,6</li> <li>▪ Glucose-6-phosphate à 1 mmol·L<sup>-1</sup></li> <li>▪ Eau déminéralisée</li> <li>▪ NADP<sup>+</sup> à 1,5 mmol·L<sup>-1</sup></li> </ul>   |
| <b>Mode opératoire</b>    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Préparation d'un hémolysat standardisé : centrifuger 2 mL sang et récupérer le culot de globules rouges dans 0,4 mL d'eau physiologique. Hémolyser avec de l'eau déminéralisée à 4 °C. Centrifuger et récupérer le surnageant, appelé « <b>hémolysat</b> ».</li> <li>2. Préparation du <b>mélange réactionnel</b> : dans une cuve, introduire : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1 mL de tampon pH 8,6</li> <li>▪ 0,2 mL de NADP<sup>+</sup></li> <li>▪ 0,6 mL d'eau déminéralisée</li> <li>▪ 0,1 mL d'hémolysat</li> </ul> </li> <li>3. Incuber le mélange 5 min à 37 °C puis mesurer l'absorbance initiale <b>t<sub>1</sub></b> à 340 nm.</li> <li>4. Ajouter 0,1 mL de glucose-6-phosphate au mélange, homogénéiser par retournement et déclencher le chronomètre. Incuber à 37 °C.</li> <li>5. Après 5 minutes exactement, mesurer l'absorbance <b>t<sub>2</sub></b> à 340 nm.</li> </ol> |

| Résultats des mesures effectuées pour le dosage de la concentration d'activité de l'enzyme G6PD (Biosentec®) |  |
|--|--|
| Absorbance A(t <sub>1</sub> ) à 340 nm   | Absorbance A(t <sub>2</sub> ) à 340 nm |
| 0,021  | 0,397                                  |

- **Équation aux grandeurs du calcul de l'activité enzymatique  $Z_{(G6PD; V_{hémolysat})}$  en U (ou  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )**

$$Z_{(G6PD; V_{hémolysat})} = \frac{\Delta_{Abs \text{ à } 340 \text{ nm}}}{\Delta_t} \times \frac{1}{\varepsilon_{(NADPH)} \cdot l} \times V_{mélange \text{ réactionnel}} \times 10^6$$

- **Équation aux grandeurs du calcul de la concentration d'activité catalytique  $b_{(G6PD; hémolysat)}$  en U/mL**

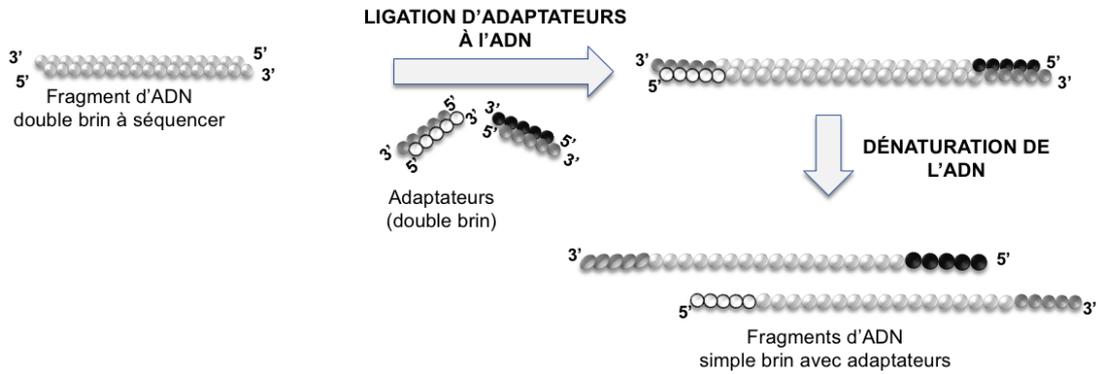
$$b_{(G6PD; hémolysat)} = \frac{Z_{(G6PD; V_{hémolysat})}}{V_{hémolysat}}$$

| Grandeurs incluses dans les équations                            |   |
|--|---|
| $V_{mélange \text{ réactionnel}}$ (L)                            | Volume dans la cuve lors de la mesure d'absorbance                                  |
| $\varepsilon_{(NADPH)}$ (L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ) | Absorptivité molaire du NADPH : 6200 L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> à pH 8,6 |
| $l$ (cm)   | Longueur du trajet optique : 1 cm   |
| $V_{hémolysat}$ (mL)   | Volume d'hémolysat standardisé de globule rouge                                     |
| $\Delta_{Abs \text{ à } 340 \text{ nm}}$                         | [Absorbance finale – Absorbance initiale] mesurées à 340 nm                         |
| $\Delta t$ (minutes)   | [temps final - temps initial]   |

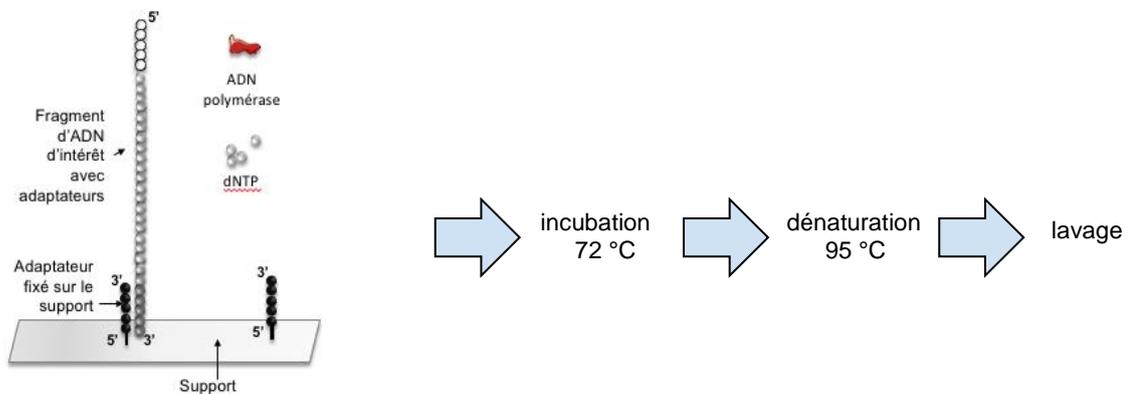
- **Intervalle physiologique de référence de la concentration d'activité catalytique de l'enzyme G6PD dans l'hémolysat : [0,84 – 1,96] U/mL à 37 °C.**

## Document 4 – Sujet 2

### Préparation d'une bibliothèque d'ADN pour le séquençage

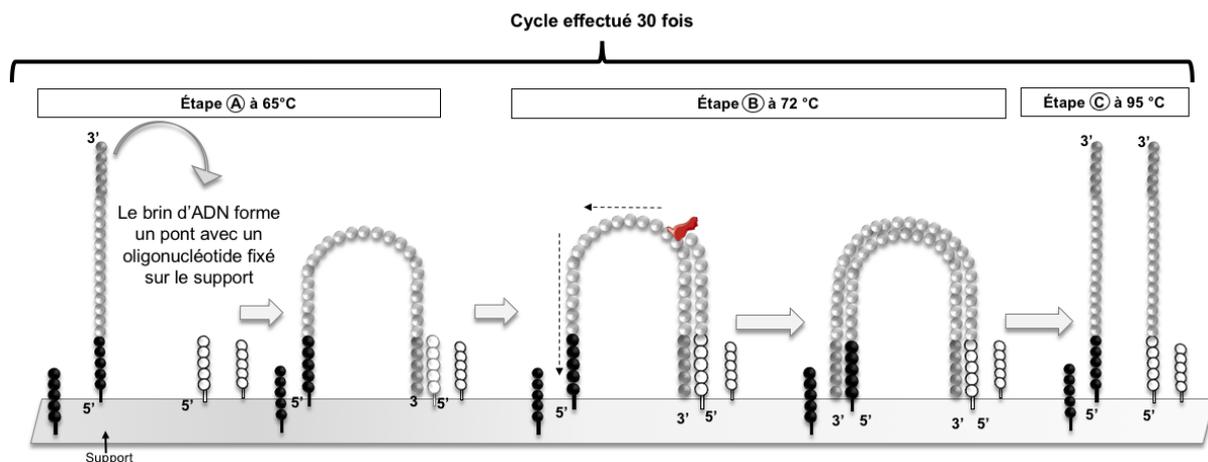


**Étape ①** L'ADN à séquencer est d'abord fragmenté. Des oligonucléotides bicaténaires, de courtes séquences appelés « adaptateurs » sont ensuite fixés à l'aide d'une ligase sur chaque extrémité des fragments d'ADN. Ces fragments d'ADN sont alors dénaturés afin d'obtenir des fragments d'ADN simple brin.



**Étape ②** L'adaptateur lié à une extrémité de l'ADN d'intérêt s'hybride à l'adaptateur complémentaire fixé sur un support. Cette étape est représentée ci-dessous.

À partir de cet oligonucléotide, l'ADN polymérase (Taq polymérase) synthétise un brin complémentaire au brin initial. Le brin initial sera ensuite éliminé par dénaturation et lavage.



**Étape ③** Le brin néosynthétisé fixé sur le support forme un pont avec un adaptateur voisin fixé sur le support. À partir de cet oligonucléotide, l'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire. Le pont « double brin » ainsi formé est ensuite dénaturé.

Cette opération est renouvelée de nombreuses fois (30 cycles), permettant ainsi de copier chaque fragment d'ADN en des centaines d'exemplaires. Les brins d'ADN issus de chaque fragment sont alors prêts à être séquencés.

## Document 5 – Sujet 2

### L'enzyme *glucose-6-phosphate-1-déshydrogénase* (G6PD)

#### Analyse comparée de l'activité et de la stabilité de l'enzyme non mutée et de l'enzyme issue du gène muté 202 G > A

On qualifie de « sauvage » l'enzyme dont la séquence protéique et la structure sont généralement retrouvées dans la population. L'enzyme G6PD « mutée » est retrouvée chez le patient. Les propriétés des deux enzymes G6PD sont étudiées après production en laboratoire.

#### Caractéristiques cinétiques des enzymes G6PD

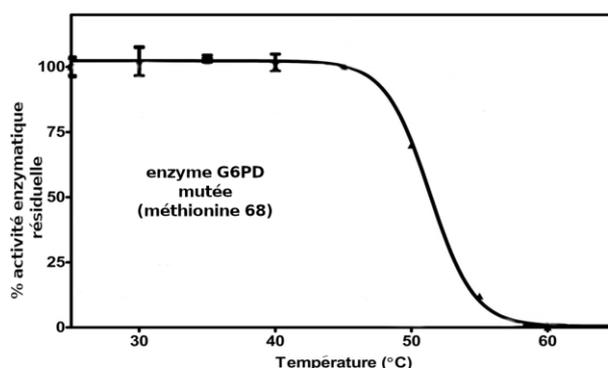
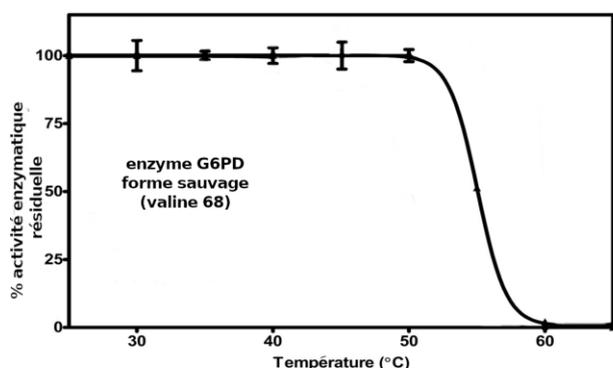
| Enzyme       | Activité catalytique par unité d'enzyme (constante catalytique $k_{cat}$ , en $s^{-1}$ ) | Précipitation au cours de la purification |
|--------------|--|---|
| G6PD sauvage | $202,4 \pm 11,5$   | Faible                                    |
| G6PD mutée   | $30,1 \pm 1$   | Élevée                                    |

Remarque : un taux de précipitation élevé correspond à une structure quaternaire instable.

#### Inactivation thermique des enzymes G6PD

La stabilité des enzymes est étudiée en plaçant des échantillons d'enzyme à une température de 20 à 65 °C pendant 20 minutes, puis en effectuant une mesure d'activité enzymatique résiduelle dans l'échantillon.

**fraction d'activité enzymatique résiduelle** =  $\frac{\text{activité enzymatique mesurée après traitement thermique}}{\text{activité enzymatique mesurée avant traitement thermique}}$



D'après *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 158, September 1, 2020, Pages 884-893 : *Functional and structural analysis of double and triple mutants reveals the contribution of protein instability to clinical manifestations of G6PD variants*, Aun Praoparotai et al.

## **Document 6 – Sujet 2**

### **Réflexion autour des tests génétiques prédictifs**

#### **Modalités de réalisation des tests génétiques prédictifs en France**

En France, les tests d'identification de facteurs de risque génétique (appelés aussi tests génétiques prédictifs) sont réalisés uniquement sur prescription médicale et quand les antécédents médicaux le justifient.

Le patient pour lequel un test prédictif est prescrit bénéficie d'un accompagnement par un médecin praticien agréé afin de l'informer et de l'orienter dans sa prise en charge. Un consentement du patient, écrit, libre, éclairé, spécial et révocable à tout moment doit être préalable à l'examen génétique.

Le résultat d'un examen génétique ne doit pas être directement communiqué au patient par le laboratoire mais par le prescripteur à l'occasion d'une consultation de conseil génétique. L'achat de tests génétiques prédictifs vendus sur internet est interdit en France et est passible d'amende.

D'après la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique et l'arrêté du 27 mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales.

#### **Doit-on élargir l'accès aux tests génétiques ?**

« Dans l'optique préventive, je pense qu'il faut donner un accès plus large au dépistage de mutations génétiques impliquant un risque très élevé de maladie. On sait que la mutation du gène BRCA est la cause principale des formes familiales du cancer du sein [...]. D'après des études récentes, les patients atteints d'un cancer du sein, de l'ovaire, de la prostate ou du pancréas porteurs d'une mutation d'un gène BRCA ne présentaient d'antécédents familiaux que pour la moitié d'entre eux, et donc ne rentraient pas dans l'indication du dépistage. Mais, attention, le test en population générale ne peut se concevoir sans un accompagnement médical. Je ne suis pas du tout favorable à ce que les gens aillent sur internet pour savoir s'ils ont une mutation du gène BRCA ! »

Pascal Pujol, président de la Société française de médecine prédictive et personnalisée (SFMPP). Extrait de l'article « Doit-on élargir l'accès aux tests génétiques ? » du journal *L'Express*, 4 déc 2019.

#### **« Mon choix médical »**

« Ma mère a combattu le cancer pendant près d'une décennie et est décédée à 56 ans [...]. Je porte un gène « défectueux », BRCA1, qui augmente fortement mon risque de développer un cancer du sein et un cancer de l'ovaire. [...] Ceux qui ont un défaut BRCA1 ont un risque de 65% de développer ces cancers, en moyenne. Une fois que j'ai su que c'était ma réalité, j'ai décidé d'être proactive et de minimiser autant que possible les risques. J'ai pris la décision d'avoir une double mastectomie\* préventive. »

\* Mastectomie: ablation d'un sein

Interview de Mme A. J, extrait de la tribune *My Medical Choice* publiée dans le *New York times*, 14 mai 2013.