

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOTECHNOLOGIE

Durée : 4 h 00

Coef. : 6

SESSION 2001

Calculatrices non autorisées

ÉPREUVE : SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GÉNIE BIOLOGIQUE

LES BIOTECHNOLOGIES AU SERVICE DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

La thérapie génique vise à traiter des maladies d'origine génétique.

Elle nécessite le transport, l'intégration et l'expression de gènes thérapeutiques au sein de cellules du patient, afin d'y corriger leur déficience génétique ou de les détruire (dans le cas de cellules cancéreuses). Pour remplir cette mission, on utilise des vecteurs, notamment rétroviraux.

De récents développements permettent d'espérer traiter efficacement des patients atteints de syndrome d'immunodéficience.

Ainsi l'exemple suivant illustre une thérapie génique utilisant un rétrovirus pour infecter les cellules hématopoïétiques d'un patient atteint d'une déficience en adénosine désaminase (ADA).

Cette déficience conduit à des anomalies du métabolisme des nucléosides puriques qui sont sélectivement toxiques pour les lymphocytes.

1. CONSÉQUENCES DU DÉFICIT EN ADENOSINE DESAMINASE (ADA) (29 points)

- 1.1. La mutation du gène codant pour l'ADA entraîne une diminution de l'activité de cette enzyme. Définir l'activité enzymatique et l'unité d'activité katal. Donner, en les justifiant, les conditions expérimentales de mesure de cette activité.
- 1.2. Cette mutation a aussi pour conséquence une diminution de la synthèse d'ADN et une augmentation du niveau de dATP et des métabolites associés.
 - 1.2.1. Donner la formule du dATP et écrire la structure chimique du fragment d'ADN suivant : pApTpGpC. Les formules détaillées des bases azotées ne sont pas exigées.
 - 1.2.2. Préciser le nom et le rôle des protéines impliquées au niveau de la fourche de réplication.

2. LES VECTEURS RÉTROVIRAUX (32 points)

2.1. Caractères généraux

- 2.1.1. Donner la définition d'un virus.
- 2.1.2. Réaliser le schéma d'un rétrovirus.
Préciser ses constituants biochimiques et la fonction biologique des diverses structures.

2.1.3. Comparer les modes de répllication et de transcription des rétrovirus et des virus à ADN comme les adénovirus, eux aussi utilisés comme vecteurs dans les thérapies géniques. Présenter les résultats sous forme de tableau ou de schémas.

2.2. Particularités du rétrovirus utilisé pour la thérapie génique ADA.

Le rétrovirus initial a la carte génomique suivante :

cis 1	gag	pol	env	cis 2
-------	-----	-----	-----	-------

cis : régions régulatrices nécessaires en position cis.

gag code *MA* *protéine de matrice*
 CA *protéine de structure de la capside*
 NC *protéine de la nucléocapside*
 PR *protéase*

pol code *RT* *transcriptase inverse*
 IN *intégrase*

env code *glycoprotéines de surface*

Le rétrovirus modifié, utilisé comme vecteur dans la thérapie génique ADA, est déficient et recombiné. Il est produit dans des cellules transcomplémentantes. Sa carte génétique est schématisée ci-dessous.

cis 1	ADA	Cis 2
-------	-----	-------

Les cellules transcomplémentantes ont été préparées par intégration des gènes gag, pol et env dans leur génome.

2.2.1. Expliquer le sens général des termes “virus déficient recombiné” et “cellule transcomplémentante”.

Quel est le but de la séparation des gènes viraux en deux stocks génétiques, l’un chez le virus déficient et l’autre chez la cellule transcomplémentante ?

2.2.2. Dans le contexte de la thérapie génique ADA, préciser les fonctions assurées par les séquences cis et ADA.

3. PRODUCTION DES VECTEURS RÉTROVIRAUX (37 points)

Les premières étapes de production consistent à transférer de l’ADN viral recombiné dans la lignée de cellules eucaryotes transcomplémentantes et à la mettre en culture.

3.1. Caractéristiques génétiques de la lignée transcomplémentante

La lignée cellulaire utilisée exprime, sous le contrôle d’un promoteur fort et inductible, les protéines virales de structure.

3.1.1. Montrer au moyen d’un schéma la place du promoteur d’un gène.

3.1.2. Présenter le rôle du promoteur dans l’expression d’un gène. Quelles sont les particularités d’un promoteur fort et inductible ?

3.2. Transfection de la lignée cellulaire transcomplémentante

3.2.1. Définir le terme de lignée cellulaire établie.

3.2.2. Donner le principe de 3 techniques d'introduction d'ADN étranger dans les cellules eucaryotes animales.

3.3. Culture des cellules transfectées

3.3.1. Conditions de cultures

3.3.1.1. Justifier l'importance de l'utilisation de sérum de veau foetal lors de la culture de cellules animales.

3.3.1.2. Quels sont les avantages liés à l'utilisation d'un milieu de culture de cellules animales sans sérum de veau foetal dans le cadre de la production de virus recombinés à visée thérapeutique ?

3.3.2. Risques de contamination microbiologique

Les mycoplasmes sont des bactéries très particulières contaminant très fréquemment les milieux de culture.

L'analyse de leurs ARN ribosomiaux 16S et 5S montre qu'elles sont en relation phylogénétique avec le genre Clostridium.

La classification actuelle des bactéries s'attache à être phylogénétique.

Expliquer très succinctement ce que cela signifie. Pourquoi l'analyse des ARN 16S a-t-elle été choisie pour établir les relations phylogénétiques ?

3.3.3. Purification des particules virales

La chromatographie d'affinité est une technique de choix pour purifier les particules virales. Présenter les différentes étapes de cette technique en l'appliquant aux virus.

4. INFECTION CORRECTRICE DES CELLULES HEMATOPOIETIQUES (22 points)

Le déficit en ADA se traduit par une thymopoïèse réduite d'où un nombre de lymphocytes T circulants très faible.

4.1. Déficit en lymphocytes T

4.1.1. Lors de la maturation thymique des lymphocytes T, une sélection positive et une sélection négative se produisent. Préciser leur intérêt.

4.1.2. Expliquer comment un déficit en lymphocytes T conduit à une immuno-déficience affectant les réponses cellulaire et humorale.

4.2. Infection correctrice des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques sont mises en culture en présence de cytokines adaptées puis infectées par un rétrovirus recombiné portant le transgène ADA. Après trois jours, les cellules ayant intégré le transgène sont réimplantées chez le patient. Pendant l'année qui suit la transplantation, on recherche :

- *la présence de leucocytes transformés par PCR,*
- *la persistance de l'expression de l'enzyme ADA par la technique dite de RT-PCR (transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne).*

4.2.1. Donner une définition générale des cytokines.

4.2.2. Décrire le principe de RT-PCR en vous appuyant sur la connaissance de la structure des ARN chez les organismes eucaryotes. Justifier la nécessité de détruire toute trace d'ADN lors de l'extraction.