

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

U2 BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET GÉNIE GÉNÉTIQUE

SESSION 2021

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français,

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 11 pages numérotées de 1/11 à 11/11.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2021
Biologie Moléculaire et Génie Génétique	BOE2BMO	Page : 1/11

Mise au point de vecteurs lentiviraux pour une surexpression de la GFP dans les neurones du système nerveux central

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (HIV-1) est un virus enveloppé à ARN et fait partie des lentivirus. Il est capable d'intégrer son génome dans l'ADN de la cellule cible, de manière stable.

Les vecteurs lentiviraux dérivés du génome de HIV-1 sont des outils de premier choix pour réaliser une transgénèse à long terme et notamment celle des neurones, qui sont très difficiles à transformer par ailleurs. L'information génétique du transgène est sous forme ARN, empaqueté dans les vecteurs lentiviraux, qui infecteront les cellules cibles, à traiter par thérapie génique.

Pour permettre une expression spécifique et stable du transgène dans les neurones, une étape de mise au point est nécessaire. L'étude présentée utilise le gène de la GFP pour tester différentes séquences régulatrices dans la perspective d'un traitement de la maladie de Parkinson par des vecteurs lentiviraux (H. Hioki *et al.*, *Gene Therapy* (2007), 14, 872-882).

1. HIV-1, un virus à l'origine d'un vecteur de thérapie génique (3,5 points)

Le HIV-1 infecte les lymphocytes T4 (LT4), s'y multiplie puis provoque leur mort progressive. La disparition de ces cellules entraîne un effondrement complet du système immunitaire adaptatif.

Les caractéristiques majeures du virion et du provirus HIV-1 ainsi que son cycle de reproduction sont présentés dans le **document 1**.

- 1.1. Préciser l'activité des enzymes virales, Reverse Transcriptase (RT) et Intégrase, codées par le gène *pol*.
- 1.2. Identifier chacune des étapes du cycle de reproduction dans lesquelles sont impliquées les protéines codées par le gène *pol*.
- 1.3. Parmi les différentes étapes du cycle viral, préciser celles nécessaires pour obtenir une transfection stable avec un vecteur lentiviral, dérivé de ce type de virus.

2. Méthode de production d'un vecteur lentiviral de 2^{ème} génération (4 points)

Pour être utilisées sur des cellules cibles, les vecteurs lentiviraux de deuxième génération doivent être produits par des cellules en culture de type 293T (fibroblastes humain immortalisés), appelées cellules d'empaquetage.

Le **document 2** présente les grandes étapes de la production et de l'utilisation d'un vecteur lentiviral

Le **document 3** présente les trois plasmides utilisés pour la co-transfection des cellules d'empaquetage.

- Un plasmide d'enveloppe (document 3.1) qui porte le gène codant la protéine de fusion VSV-G. Cette protéine virale transmembranaire a la propriété de faire fusionner l'enveloppe des vecteurs lentiviraux avec la membrane plasmique lors de l'infection des cellules cibles de mammifères.
- Un plasmide d'empaquetage (document 3.2) qui porte les gènes *gag* et *pol*.
- Un plasmide de transfert (document 3.3) qui porte le transgène (dans ce cas, codant la GFP) au sein d'une cassette de transfert délimitées par les séquences LTR. Ces séquences LTR permettent la production du transcrit d'ARN génomique.

Les trois vecteurs présentés possèdent les éléments génétiques « *Amp^R* » et « *ori* ».

- 2.1. Rappeler à quoi correspondent ces deux éléments et leur utilité en génie génétique.
- 2.2. Identifier les produits d'expression des plasmides pEnv et pEmpac. Expliquer leur rôle dans les virions produits ou dans les cellules cibles lors de l'intégration du transgène.
- 2.3. Expliquer le rôle du plasmide pLenti_GFP, en précisant les éléments génétiques présents dans ce plasmide qui permettront l'intégration du transgène dans le génome des cellules cibles de mammifères.
- 2.4. Schématiser l'ARN du vecteur lentiviral produit par les cellules d'empaquetage co-transfectées, en faisant apparaître les différents éléments génétiques contenus.

Le vecteur lentiviral obtenu est incapable d'induire un cycle viral complet dans les cellules.

- 2.5. Argumenter cette affirmation.
- 2.6. Expliquer en quoi cette caractéristique est nécessaire pour l'utilisation des lentivirus en tant que vecteurs à visée thérapeutique.

3. Production de vecteurs lentiviraux (6,5 points)

La transfection des cellules d'empaquetage 293T est réalisée par la méthode au phosphate de calcium (**document 4.1**).

- 3.1. Présenter le principe général de la transfection des cellules adhérentes en culture par cette méthode.

Le point 3 du protocole (**document 4.1**) résume la préparation de la solution de transfection contenant les trois plasmides.

- 3.2. Donner la composition précise de la solution de transfection avant dépôt sur cellules en tenant compte des données expérimentales (**document 4.2**).

Après production du vecteur, il est important de titrer la solution virale obtenue. On utilise la technique de RT-qPCR en technologie SYBR[®]Green. La séquence amplifiée est une région de la séquence codante de la GFP, fournie dans le **document 5.1**.

- 3.3. Déterminer les séquences orientées d'amorces, de 15 nucléotides, sens et antisens, nécessaires pour obtenir des amplicons correspondant à la séquence cible en caractères gras sur le **document 5.1**.
- 3.4. Rappeler les différentes étapes d'un cycle de PCR en précisant leurs températures, et indiquer à quel moment du cycle est réalisée la mesure de fluorescence émise par le SYBR®Green dans le cadre d'une PCR en temps réel.

Les résultats de la RT-qPCR pour 3 lots de production (A, B et C) d'un même lentivirus sont présentés dans le **document 5.2**. On souhaite sélectionner le lot le plus concentré en lentivirus.

- 3.5. Recopier l'allure des courbes d'amplification et montrer comment les exploiter dans le cadre d'une quantification.
En déduire le lot présentant le titre en vecteur lentiviral le plus important.

4. Recherche de promoteurs efficaces et spécifiques pour l'utilisation de vecteurs lentiviraux dans le cerveau. (4 points)

La recherche clinique sur les maladies neuro-dégénératives développe des vecteurs permettant de transfecter des neurones du cerveau afin de restaurer une déficience en protéine fonctionnelle. Pour sélectionner le promoteur le plus efficace et spécifique des neurones, plusieurs cassettes d'expression utilisant la GFP comme gène rapporteur sont testées.

Dans cette perspective, trois vecteurs de transfert ont été produits à partir du modèle du vecteur pLenti_GFP (**document 3.3**) :

- Le vecteur **pLenti_GFP_Enh/CMV** porte la séquence codante de la GFP sous contrôle du promoteur fort du CytoMegalovirus (CMV) couplé à l'enhancer du CMV.
- Le vecteur **pLenti_GFP_SYN** porte la séquence codante de la GFP sous contrôle du promoteur de la syntaxine humaine (SYN), sans enhancer du CMV.
- Le vecteur **pLenti_GFP_Enh/SYN** porte la séquence codante de la GFP sous contrôle du promoteur syntaxine humaine (SYN), couplé à l'enhancer du CMV.

Des suspensions de mêmes titres de vecteurs ont été produites et injectées directement dans le cerveau de rats adultes.

- 4.1. Analyser les résultats du **document 6.1** et conclure sur le vecteur conduisant à une expression importante et spécifique de la GFP dans les neurones.
- 4.2. Analyser les résultats du **document 6.2**. Indiquer s'ils confirment ou non, les résultats du **document 6.1**.
- 4.3. Indiquer en quoi l'expérience exposée dans le **document 6.2** permet-elle de confirmer la stabilité de l'intégration du vecteur dans le génome des cellules ?

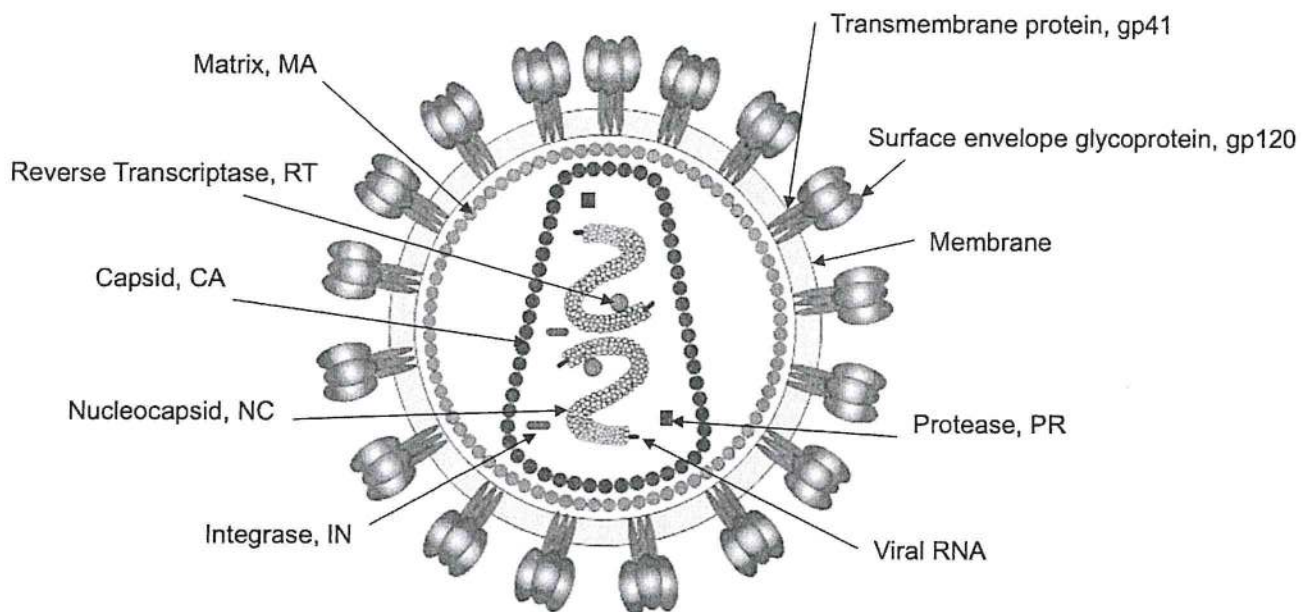
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

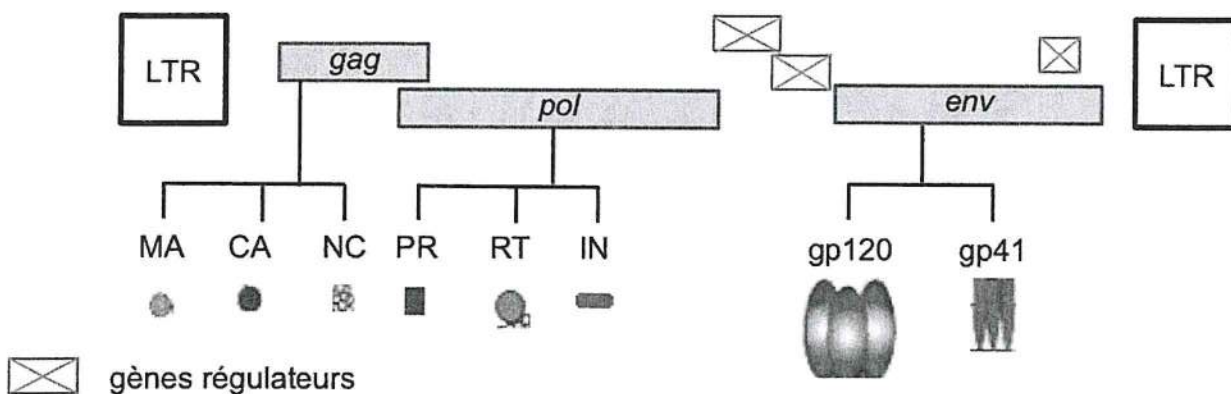
Document 1 : Caractéristiques majeures et cycle de reproduction du virus HIV-1

1.1. Ultrastructure du virion HIV-1



<https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:HI-Virion.svg> (consulté en nov 2020)

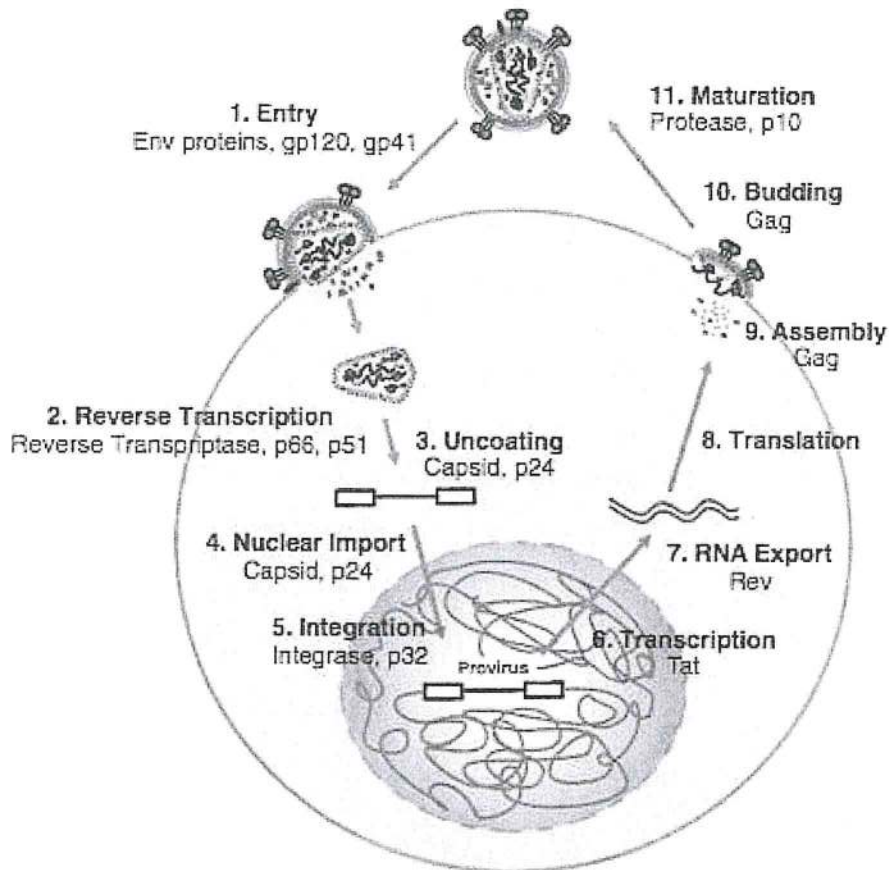
1.2. Éléments génétiques principaux contenus dans l'ARN du HIV-1



Encyclopedia of AIDS (2013)

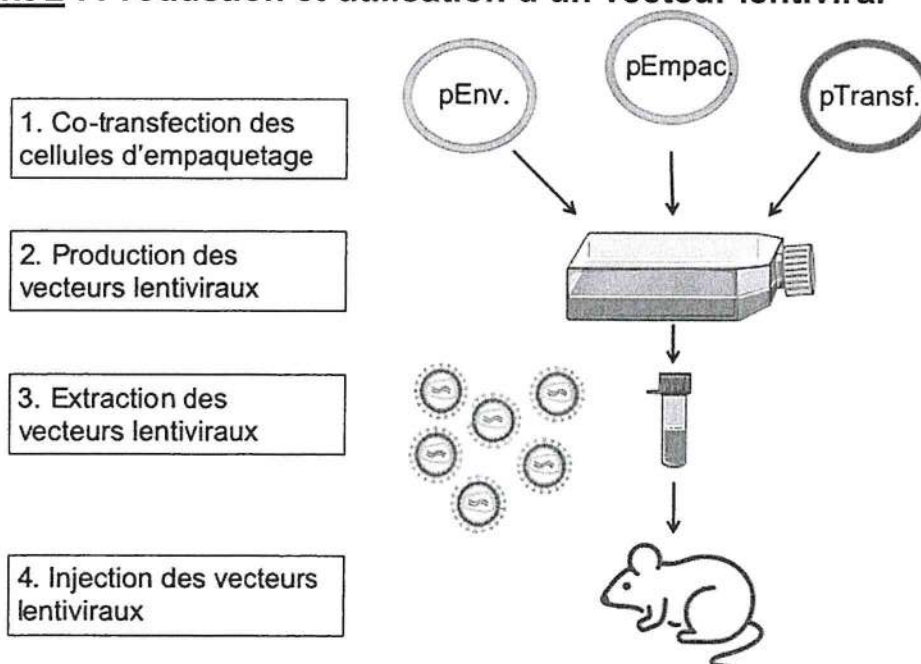
1.3. Cycle de reproduction du HIV-1

Les protéines impliquées dans chaque étape du cycle sont indiquées ci-dessous.



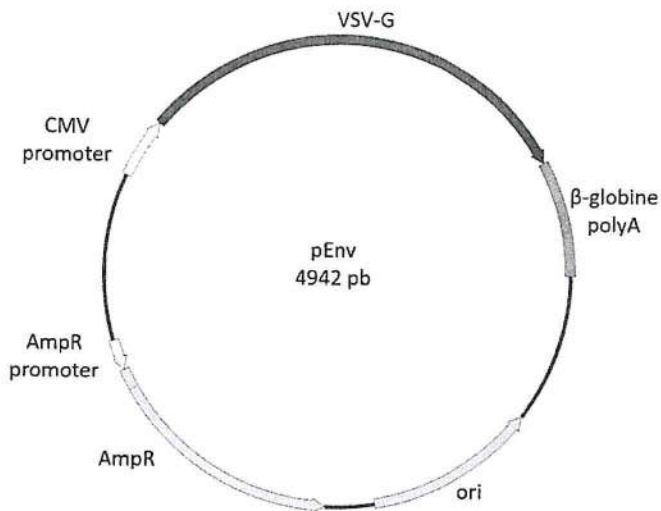
Encyclopedia of AIDS (2013)

Document 2 : Production et utilisation d'un vecteur lentiviral

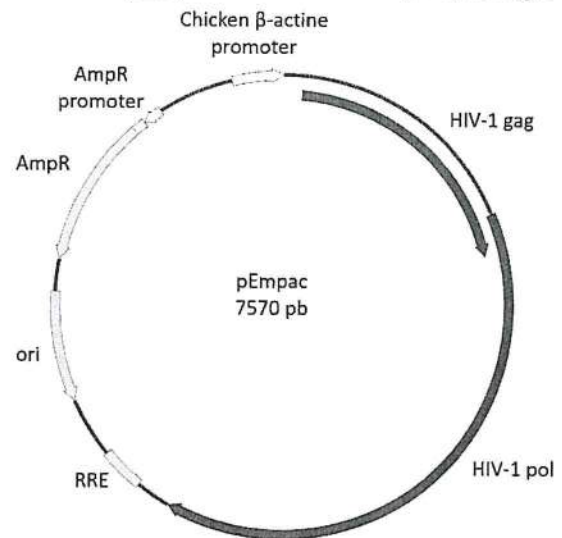


Document 3 : Cartes des trois plasmides utilisés pour la production des vecteurs lentiviraux

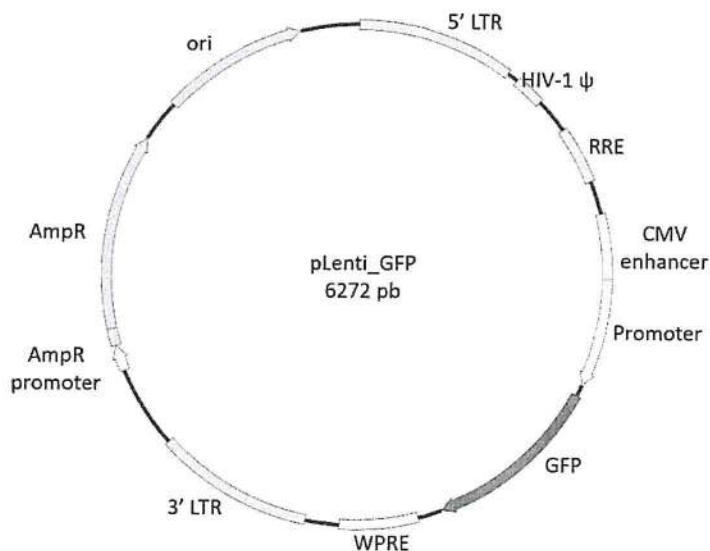
3.1. Plasmide d'enveloppe



3.2. Plasmide d'empaquetage



3.3. Plasmide de transfert



Éléments	Description
VSV-G	Protéine virale permettant la fusion enveloppe / membrane cellulaire.
β-globin poly (A)	Signal de polyadénylation de la bêta-globine humaine
CMV promoter	Promoteur fort du virus animal CMV.
CMV enhancer	Séquence enhancer du virus animal CMV
Chicken β actin promoter	Promoteur constitutif du gène de la bêta-actine du poulet.
HIV-1 gag	Séquence codante du gène <i>gag</i> de HIV-1.
HIV-1 pol	Séquence codante du gène <i>pol</i> de HIV-1.
HIV-1 ψ (psi)	Signal d'empaquetage de l'ARN de HIV-1
RRE	Signal d'adressage de l'ARN de HIV-1 vers le cytosol
WPRE	Signal de stabilisation de l'ARN viral
LTR	Long Terminal Repeat

Document 4 : Technique de transfection des cellules d'emballage

4.1. Extrait du protocole de production des vecteurs lentiviraux (Invitrogen)

Lentivirus preparation by Calcium-Phosphate Transfection

1. Coat 10 cm cell culture dish with 10 mL 0.1% gelatin, place at 4°C for 1 h.
2. Aspirate off the gelatin, plate 2.5×10^6 of 293T cells per 10 cm dish in 10 mL culture medium and incubate at 37°C with 5% CO₂.
3. 24h later, prepare calcium-phosphate precipitate (for one 10 cm dish): mix 20 µg lentivirus plasmid, 15 µg packaging plasmid and 6 µg envelope plasmid in a 1.5 mL sterile Eppendorf tube. Add 125 µL 1 M CaCl₂ and bring the volume to 0.5 mL with sterile water. Add 0.5 mL 2x BES buffered saline (10.7 g.L⁻¹ BES, 16.0 g.L⁻¹ NaCl, 0.27 g.L⁻¹ Na₂HPO₄) and shake briefly. Keep at RT for 20 min. Add dropwise of the precipitate solution to the cells and mix gently with medium. Incubate at 37°C with 5% CO₂.

4.2. Concentrations en ADN des solutions plasmidiques disponibles

Lentivirus plasmid:	10 µg.µL ⁻¹
Packaging plasmid solution:	5 µg.µL ⁻¹
Envelope plasmid:	12 µg.µL ⁻¹

Document 5 : Titrage de la solution virale par RT-qPCR

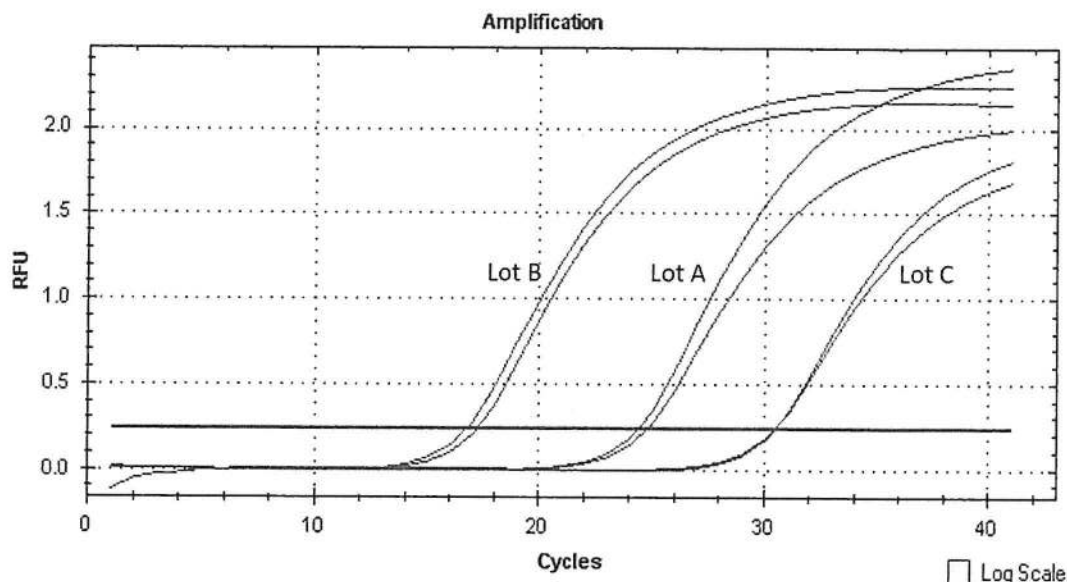
5.1. Localisation de la région cible dans la séquence codant la GFP

ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTTCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTCCACACA
ACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTTCCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCA
TAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAATGCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGG
ATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACATTCCA
TCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACCTTGGCTGAA
TCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACT
CCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCA
ATTACATATGCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTC
TAACCTCATTTCCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACA
GGGTTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGG
GAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCTGA
ATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAG
AGGATCTTGGATTATTCCTCTGCCAAGAACTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGG
ATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAATA
CTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGGA
ACTACCACAGAAAGGGAAGTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTC
TGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCTTTATACATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCT
TAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCTGATGATGAGAGT
TTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAA
GCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCA
TCTTTGCATTAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAAG
TGA

Séquence en gras : région à amplifier par PCR

5.2. Courbes d'amplification obtenues à l'issue de la RT-qPCR

Trois lots de production (A, B et C) ont été titrés en duplicats. Le même volume de prise d'essai a été testé pour chaque lot.



Document 6 : Étude de différents promoteurs pour le développement d'un vecteur lentiviral ciblant les neurones du système nerveux central

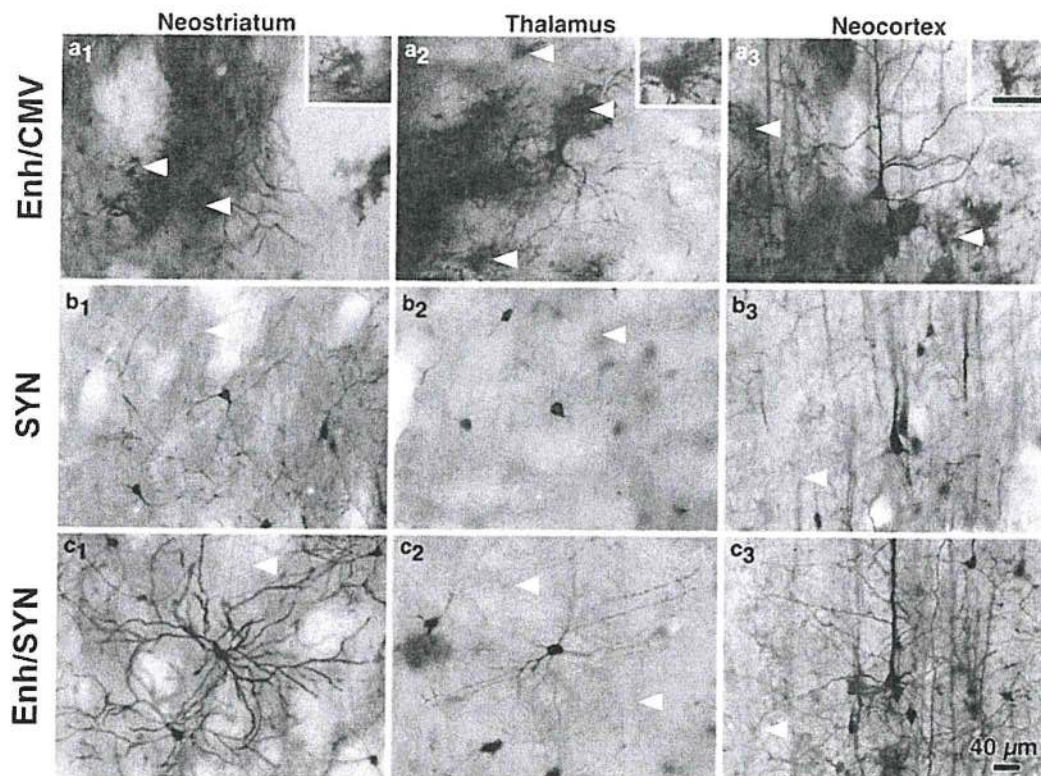
6.1. Détection de la GFP (visualisée en noir sur ces images) dans des coupes fines de trois régions du cerveau de rat (néostriatum, thalamus et néocortex) après injection de la solution de vecteur lentiviral :

Enh/CMV : Enhancer CMV - Promoteur CMV - GFP

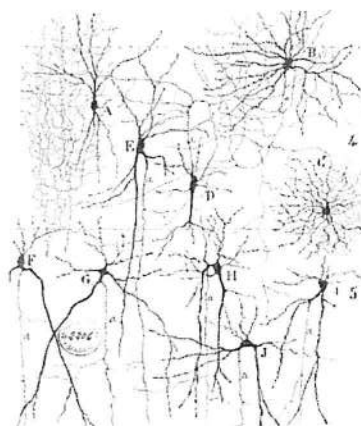
SYN : Promoteur syntaxine - GFP

Enh/SYN : Enhancer CMV - Promoteur syntaxine - GFP

Les flèches blanches indiquent la présence de cellules gliales, cellules différentes des neurones.



L'allure de différents neurones du cerveau est rappelée ci-dessous.



Dessins originaux de Ramon y Cajal, 1911.

6.2. Recherche de la proportion de neurones parmi la population de cellules du striatum positives pour la GFP

Les neurones sont mis en évidence par la présence de NeurineN (protéine spécifiquement exprimée par les neurones) dans 200 cellules du striatum positives pour la GFP après transfection par un des trois vecteurs (Enh/CMV, SYN ou Enh/SYN).

Le pourcentage de cellules NeuN+ a été déterminé à différents temps (3 jours à 8 semaines) après l'injection.

