

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON

Concours d'admission session 2020

Filière universitaire : Second concours

COMPOSITION DE BIOLOGIE-BIOCHIMIE

Durée : 3 heures

L'utilisation des calculatrices n'est pas autorisée pour cette épreuve

Ce livret comprend 13 pages numérotées de 1 à 13.

Le sujet comprend 29 questions,
le temps à consacrer à chacune d'elle est donc entre 3 et 6 min.
La progression des questions suit un ordre logique, il est donc recommandé de les traiter dans l'ordre prévu, mais de nombreuses questions peuvent être traitées indépendamment des autres (ou omises), en particulier entre les différentes parties.

Les différentes parties :

Questions 1 à 10 : Introduction sur la dystrophine et la myopathie de Duchenne

Questions 11 à 15 : Traitement avec de l'AAV micro-dystrophine

Questions 16 à 20 : Traitement *eteplirsén*

Questions 21 à 23 : Traitement par CRISPR

Questions 24 à 28 : Traitement *ataluren*

NB : Une brève analyse des résultats obtenus suivie d'une conclusion dûment justifiée est attendue pour chaque réponse.

Illustrations introductives : La dystrophine et son gène *DMD*

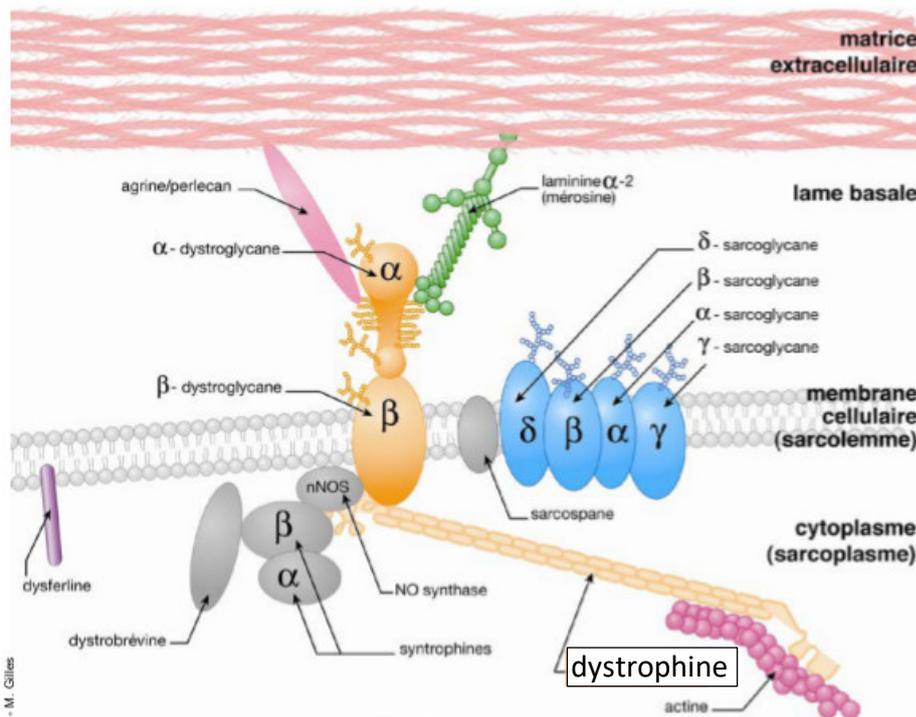


Illustration 1 : Le complexe de Glycoprotéines Associées à la Dystrophine (DAG). La dystrophine est la pierre angulaire d'un complexe appelé DAG. Ce complexe relie, à travers la membrane cellulaire, le cytosquelette de la cellule musculaire (appelée fibre musculaire) à la matrice extracellulaire située à l'extérieur de la cellule.

La dystrophine comprend quatre domaines structuraux :

- I- une extrémité N-terminale, présentant des motifs de liaison à l'actine (ADB1);
- II- un domaine central constitué de la répétition de 24 segments répétés structurellement proches de la spectrine (souvent notés R1 à R24) et contenant quatre régions charnières (souvent notés H1 à H4)
- III- un domaine riche en cystéine faisant le lien avec le DAG par l'intermédiaire du β -dystroglycane, noté CYS-rich ou CR
- IV- une extrémité C-terminale, en forme d'hélice, qui interagit avec les syntrophines, notée C-ter ou CR.

Illustration 2 :
Correspondance entre les 79 exons du gène de la dystrophine et les 4 domaines de la protéine.

Schéma simplifié représentant l'ARN messenger dystrophine. (UTR signifie Région Non Traduite). Les exons sont numérotés de 1 à 79.

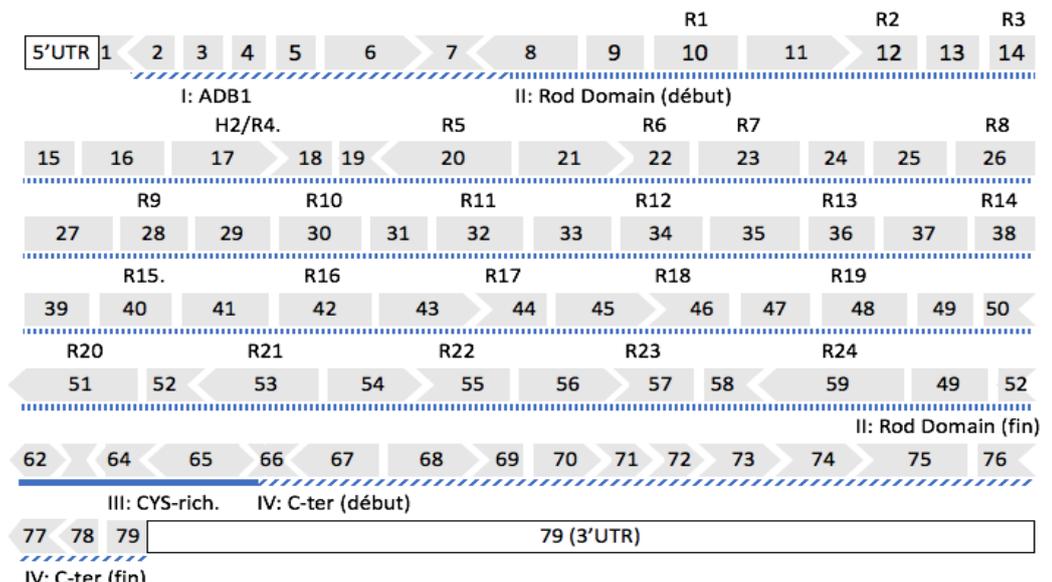
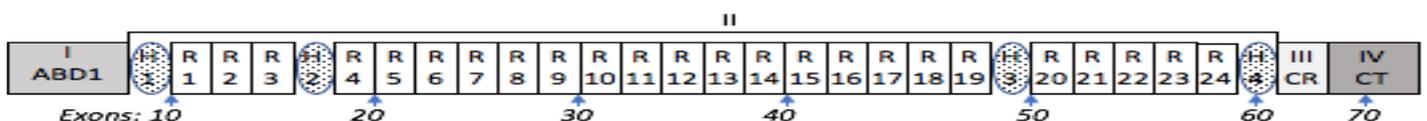


Illustration 3 : Les grands domaines de la protéine dystrophine. (abréviations expliquées ci-dessus)



La myopathie de Duchenne, ou dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme (squelettiques (y compris respiratoires) et cardiaques). C'est la forme de myopathie la plus fréquente chez l'enfant, mais elle reste une maladie rare qui touche chaque année de 150 à 200 nouveaux-nés en France, dont 99,9% sont des garçons. Il s'agit dans 70% de formes dites familiales, mais la maladie apparaît aussi spontanément dans 30% des cas (formes sporadiques). Elle est liée à des anomalies du gène *DMD* (illustration 2), responsable de la production d'une protéine qui a été appelée dystrophine (illustration 1 et 3). La dystrophine n'est pas impliquée dans la contraction musculaire, mais dans le soutien de la fibre musculaire, et, en son absence, les contractions entraînent une dégénérescence des fibres musculaires.

Question 1 : A l'aide des informations ci-dessus et en analysant l'arbre généalogique suivant, décrivez le mode de transmission héréditaire de cette maladie en justifiant votre réponse. Comment qualifieriez-vous l'individu 5 ?

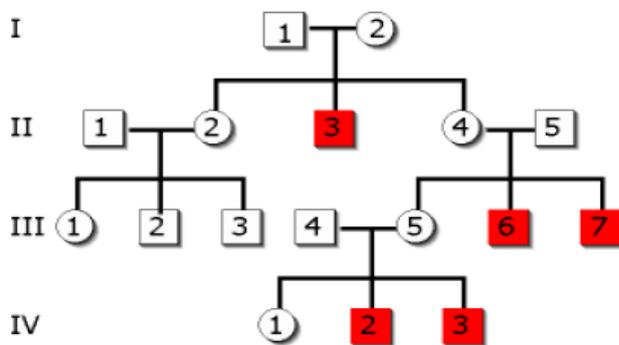


Figure Q1 : Arbre généalogique d'une famille dont plusieurs garçons sont atteints d'une forme familiale de la myopathie de Duchenne. Les hommes sont représentés par des carrés et les femmes par des ronds. Les garçons malades sont représentés en grisé ou rouge. I, II, III et IV sont les différentes générations.

Le gène codant la dystrophine est l'un des plus grands gènes connus. Il couvre 2,4 mégabases et comporte 79 exons qui donneront un ARNm de 14 kilobases comportant un cadre de lecture ouvert de 11 kilobases (voir illustration 2).

Question 2 : Sur un schéma simplifié d'une page maximum vous représenterez les différentes étapes qui permettent la production d'une protéine à partir d'un gène comportant (pour simplifier) trois exons. Vous vous placerez dans le cas d'une cellule eucaryote, noyau et cytoplasme devront figurer sur votre figure pour permettre de localiser les différentes étapes. Vous indiquerez pour chaque étape son nom et celui des principaux acteurs impliqués.

Le diagnostic, notamment pour les formes sporadiques, se base en premier lieu sur un examen clinique (diminution de la masse musculaire, raideur articulaire, difficultés respiratoires, difficultés pour réaliser certains gestes...). Des biopsies musculaires (un examen invasif et douloureux) étaient aussi souvent réalisées par le passé.

Question 3 : En vous aidant du schéma légendé proposé et des informations associées, vous réaliserez un dessin d'observation légendé de la portion encadrée des coupes histologiques de muscle normal et de muscle dystrophique qui vous sont proposées. Sur la base de vos observations, vous rédigerez une courte hypothèse sur les bases cellulaires conduisant à la diminution de la masse et de la force musculaire observée chez les patients dystrophiques.

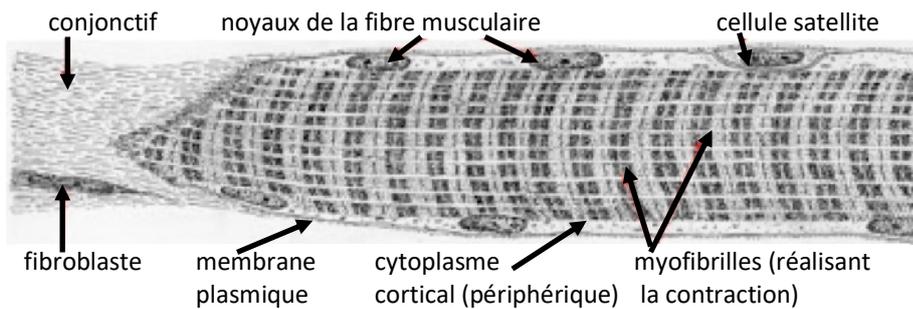


Figure Q3.1 :
Représentation schématique d'une portion de cellule musculaire striée squelettique en vue longitudinale. (Diamètre : 50 micromètre environ)

Note: Les cellules satellites sont des cellules souches qui, lorsque le muscle est endommagé, donnent normalement naissance à de nouvelles cellules musculaires (de petite taille et avec un noyau central au début de leur développement) ou à de nouveaux fibroblastes qui se transforment éventuellement en cellules adipeuses (le gras est éliminé lors de la préparation des coupes donnant l'impression d'un trou dans une coupe histologique).

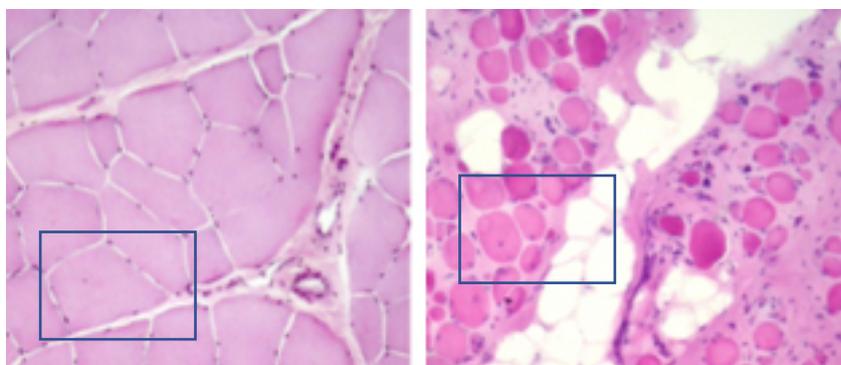


Figure Q3.2 : Coupe histologique de muscle normal (à gauche) et dystrophique (à droite) en coupe transversale. Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline (qui colore fortement les noyaux) et à l'éosine, qui colore le cytoplasme des cellules (musculaires et autres) et plus faiblement le conjonctif. Les cadres que vous dessinerez font environ 75 micromètres de large

Pour confirmer un diagnostic de DMD, on peut réaliser un immunomarquage de la dystrophine sur une coupe histologique réalisée à partir d'une biopsie de muscle. Ce marquage est réalisé avec un anticorps fluorescent pouvant se fixer à la dystrophine sur la coupe, que l'on peut observer grâce à un microscope à fluorescence.

Question 4 : Que pouvez-vous dire de la localisation de la dystrophine dans les fibres musculaires ? Que constatez-vous pour le patient atteint de DMD?

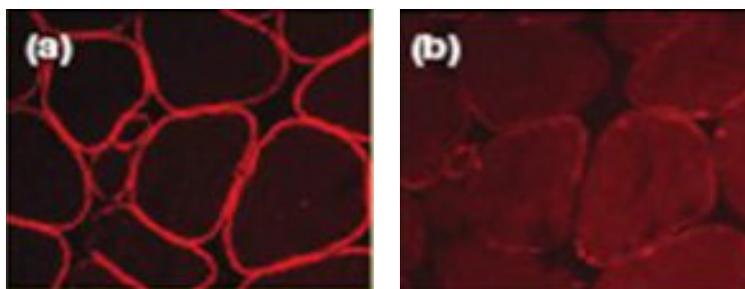


Figure Q4 : Analyse de la présence de la dystrophine par immunomarquage sur des coupes transversales de muscle normal (a) et de patient dystrophique (b). Le diamètre des fibres est de 50micromètres environ.

Les mutations responsables de la maladie étant de mieux en mieux connues, et avec les progrès des techniques d'analyse génétique, les diagnostics génétiques sont réalisés de plus en plus tôt. Dans 70% des cas, la maladie est causée par une délétion plus ou moins importante dans le gène de la dystrophine.

Question 5 : Est-il besoin de réaliser une biopsie musculaire pour effectuer une analyse génétique sur le gène *DMD* ? Justifiez votre réponse.

On constate un plus grand nombre de délétions dans certaines régions du gène, qui sont donc analysées en priorité, notamment grâce à une technique de PCR multiplex mise au point dans les années 1990.

La PCR, Réaction de Polymérisation en Chaîne, est une technique de biologie moléculaire qui permet d'amplifier une région spécifique d'ADN située entre deux amorces (petits fragments d'ADN complémentaires des extrémités de la région que l'on souhaite amplifier). Les fragments d'ADN obtenus après amplification sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose qui sépare les fragments en fonction de leur taille et ils sont visualisés grâce à du bromure d'éthidium.

Question 6 : Quels sont les éléments nécessaires à la réalisation d'une PCR ? A l'aide d'un schéma ou en quelques lignes, décrivez les différentes étapes de la PCR.

Une PCR multiplex est une PCR dans laquelle des couples d'amorces sont mélangés, permettant l'amplification simultanée de différents fragments d'ADN. La PCR multiplex utilisée pour le diagnostic de la DMD est réalisée à partir d'un mélange de couples d'amorces, chaque couple permettant d'amplifier une partie d'un exon (le nom du couple d'amorce est le nom de l'exon qu'elles permettent d'amplifier et PM correspond à un couple permettant d'amplifier le promoteur musculaire du gène). On se place dans des conditions de réaction telles que chaque amorce ne peut réagir qu'avec l'amorce complémentaire du même couple. Deux réactions comprenant chacune 9 couples d'amorces ont été réalisées en parallèle sur les échantillons de 6 patients et d'un individu normal C.

Question 7 : A partir du résultat d'expérience ci-dessous, vous réaliserez une carte approximative des délétions observées chez les patients 1 à 4, en ne faisant figurer que le promoteur du gène et les exons étudiés.

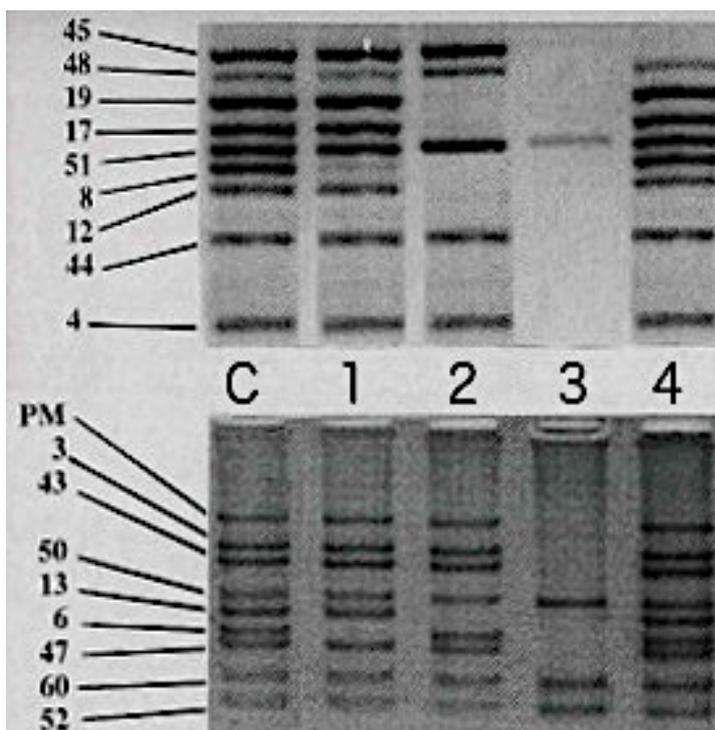


Figure Q7 : Analyse de délétions dans l'ADN génomique de 4 patients atteints de myopathie par PCR multiplex et d'une personne contrôlée (C).

Chaque bande correspond à une portion de séquence de l'un des exons du gène *DMD* amplifiée par PCR. Le numéro de l'exon partiellement amplifié est indiqué en légende (PM correspondant au promoteur).

Une délétion très fréquemment observée chez les patients (non montrée ici) touche l'exon 51 dont la séquence et sa traduction sont indiquées dans la figure suivante.

Question 8 : A la lumière de cette séquence pouvez-vous expliquer la légende de l'illustration 2 au niveau des jonctions exon-exon, reprise ici pour 3 jonctions ?

50
51
52
53

Exon # 50	Exon # 51	
CTG ACC ACT ATT GGA GCC TCT CCT ACT CAG ACT GTT ACT CTG GTG ACA CAA CCT GTG GTT ACT AAG GAA ACT GCC ATC TCC AAA CTA GAA	Leu Thr Thr Ile Gly Ala Ser Pro Thr Gln Thr Val Thr Leu Val Thr Gln Pro Val Val Thr Lys Glu Thr Ala Ile Ser Lys Leu Glu	
2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460		
Exon # 51		
ATG CCA TCT TCC TTG ATG TTG GAG GTA CCT GCT CTG GCA GAT TTC AAC CGG GCT TGG ACA GAA CTT ACC GAC TGG CTT TCT CTG CTT GAT	Met Pro Ser Ser Leu Met Leu Glu Val Pro Ala Leu Ala Asp Phe Asn Arg Ala Trp Thr Glu Leu Thr Asp Trp Leu Ser Leu Leu Asp	
2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490		
Exon # 51		Exon # 52
CAA GTT ATA AAA TCA CAG AGG GTG ATG GTG GGT GAC CTT GAG GAT ATC AAC GAG ATG ATC ATC AAG CAG AAG GCA ACA ATG CAG GAT TTG	Gln Val Ile Lys Ser Gln Arg Val Met Val Gly Asp Leu Glu Asp Ile Asn Glu Met Ile Ile Lys Gln Lys Ala Thr Met Gln Asp Leu	
2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520		
Exon # 52		
GAA CAG AGG CGT CCC CAG TTG GAA GAA CTC ATT ACC GCT GCC CAA AAT TTG AAA AAC AAG ACC AGC AAT CAA GAG GCT AGA ACA ATC ATT	Glu Gln Arg Arg Pro Gln Leu Glu Glu Leu Ile Thr Ala Ala Gln Asn Leu Lys Asn Lys Thr Ser Asn Gln Glu Ala Arg Thr Ile Ile	
2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550		
Exon # 52	Exon # 53	
ACG GAT CGA ATT GAA AGA ATT CAG AAT CAG TGG GAT GAA GTA CAA GAA CAC CTT CAG AAC CGG AGG CAA CAG TTG AAT GAA ATG TTA AAG	Thr Asp Arg Ile Glu Arg Ile Gln Asn Gln Trp Asp Glu Val Gln Glu His Leu Gln Asn Arg Arg Gln Gln Leu Asn Glu Met Leu Lys	
2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580		

Question 9 : Quelle conséquence a selon-vous la délétion de l'exon 51 ? Pourquoi conduit-elle à des symptômes plus graves qu'une délétion de l'exon 48 par exemple ?

La myopathie de Becker (BMD) est elle aussi une myopathie causée par des mutations dans le gène de la dystrophine, dont les symptômes sont beaucoup moins sévères que ceux de la DMD. Le génome du premier patient décrit comprenait pourtant une grande délétion s'étendant de l'exon 17 à l'exon 48, d'autres résultent de mutations plus limitées.

Une analyse de l'expression de la protéine dystrophine et de protéines du complexe associé à la dystrophine (DAG, voir illustration 1 en introduction) dans des muscles de patients atteints de DMD et de BMD a été réalisée en parallèle par Western-Blot.

Le Western-Blot est une technique permettant d'étudier les protéines. Les protéines que l'on souhaite caractériser sont isolées depuis un tissu, déposées sur un gel de polyacrylamide puis mises à migrer dans des conditions permettant de les séparer en fonction de leur taille (les protéines de plus haut poids moléculaire sont en haut du gel, les protéines de plus petit poids moléculaire migrent plus bas). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose, elle gardent leur position en fonction du puits dans lequel on les a déposées et de leur taille. Le transfert sur membrane permet de mettre des anticorps en contact avec les protéines fixées sur la membrane et de révéler leur présence par une réaction colorée. L'utilisation d'anticorps permet de détecter spécifiquement les protéines que l'on souhaite.

Question 10 : Analysez les résultats obtenus, en vous aidant des questions suivantes pour justifier vos réponses.

Quel est l'intérêt d'avoir réalisé un marquage de la myosine, notamment pour la piste 6 ?
 Quelle différence faites-vous entre la BMD et la DMD en termes d'expression de la dystrophine / en termes d'expression des protéines du complexe DAG ?

Quelle différence observez-vous entre les deux patients BMD et entre les deux patients DMD ?

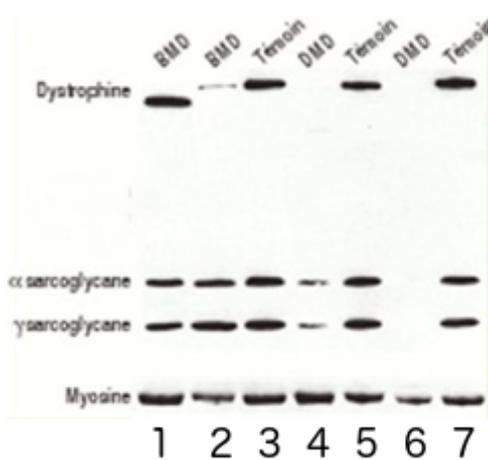


Figure Q10 : Comparaison de l'expression de la dystrophine et de membres du Complexe associé à la Dystrophine chez des patients atteints de Myopathies de Duchenne (DMD) et Becker (BMD) par Western-Blot Multiplex. Des protéines de muscle deux patients BMD et de deux patients DMD et d'une personne témoin ont été analysées par Western-Blot multiplex. Il s'agit d'un Western-Blot pour lequel la présence de différentes protéines de tailles différentes (dystrophine, alpha et gamma sarcoglycane, mais aussi myosine) sont révélées en même temps. NB : La myosine est une protéine abondante du muscle, dont le niveau d'expression est connue pour ne pas être affectée par la myopathie.

En s'inspirant de la dystrophine trouvée dans la BMD, des chercheurs ont créé un gène de 4 kilobases codant une protéine qu'ils ont appelée micro-dystrophine. Ce gène est alors suffisamment petit pour entrer dans un virus transformé en vecteur de thérapie génique capable d'atteindre beaucoup de cellules musculaires de l'organisme. Ce virus appelé Virus Adéno-Associé (AAV) entre dans les cellules et exprime le gène qu'il contient sans s'intégrer dans le génome des cellules. Il peut être injecté directement dans le muscle (IM = Intra-Musculaire) ou injecté en intraveineuse (IV) pour tenter de toucher tous les muscles.

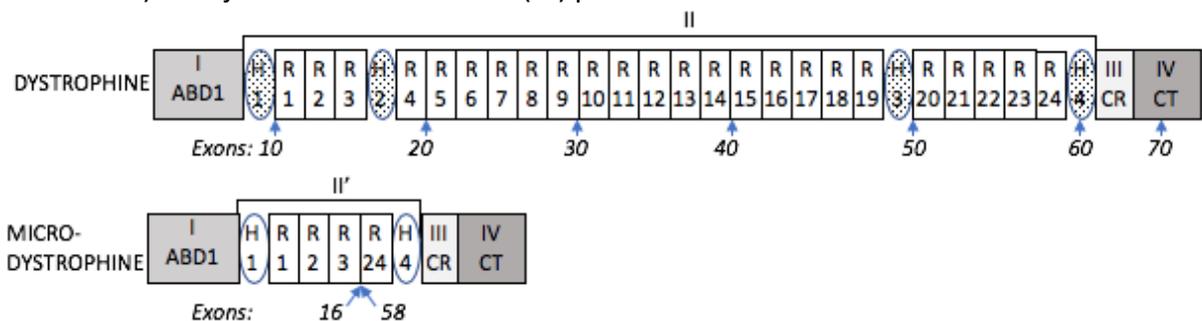


Figure : Comparaison des domaines structuraux présents dans la dystrophine et de la micro-dystrophine. (Signification des abréviations données en introduction)

Un AAV codant la micro-dystrophine a été injecté en intramusculaire (IM) dans un modèle de chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) présentant une DMD congénitale. Dans les expériences ci-dessous, le vecteur codant la dystrophine appelé AAV-microdys a été injecté dans un muscle d'une patte antérieure, l'autre patte (non injectée) étant utilisée comme contrôle négatif. L'expression de la dystrophine dans chacune des deux pattes a ensuite été analysée par immunohistochimie.

Question 11 : Analysez cette figure.

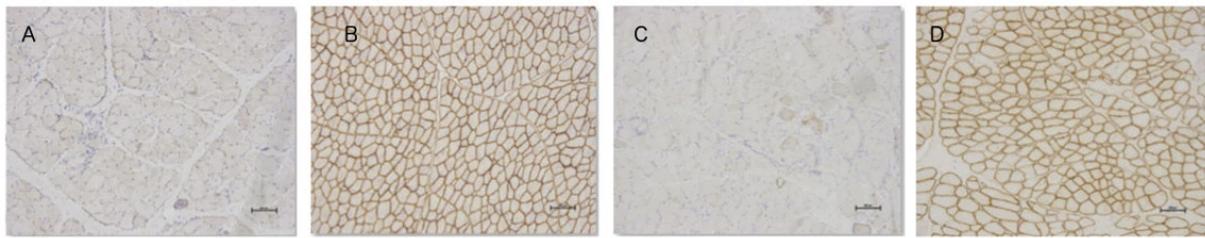


Figure Q11 : Expression de la (micro-)dystrophine dans des muscles de pattes de chien 3 mois après injection (ou non) d'un vecteur AAV-microdys. Des coupes histologiques ont été réalisées dans le même muscle de la patte chez un chien GMDR non traité (A), un chien sain (B), un muscle de la patte du chien GMDR dans lequel l'AAVmicro-dys avait été injecté 3 mois plus tôt (D) et de la patte non injectée du même chien (C). Un marquage histochimique capable de révéler la présence de la dystrophine et de la micro-dystrophine a été réalisé sur toutes les coupes : les coupes sont mises en contact avec un anticorps reconnaissant la dystrophine et la microdystrophine, suite à sa fixation, sa présence (et donc la présence de la protéine) est révélée par une réaction colorée. Le pourcentage de fibres exprimant de la dystrophine ou de la micro-dystrophine a été estimé à (A) <0,5% (B) 100% (C) 4,1% (D) 84,1%.

L'expression de la dystrophine dans ces différents muscles a aussi été étudiée par Western-Blot, technique présentée à la question 12. Cette fois-ci, les protéines analysées sont la dystrophine et la micro-dystrophine d'une part, et la GAPDH d'autre part (la GAPDH est une protéine, qui, comme la myosine, est exprimée à un niveau comparable dans les muscles de chien normal et de chien GRMD).

Question 12 : Analysez cette figure en n'oubliant pas de commenter l'intérêt de doser la GAPDH et l'analyse réalisée dans les lignes E et F.

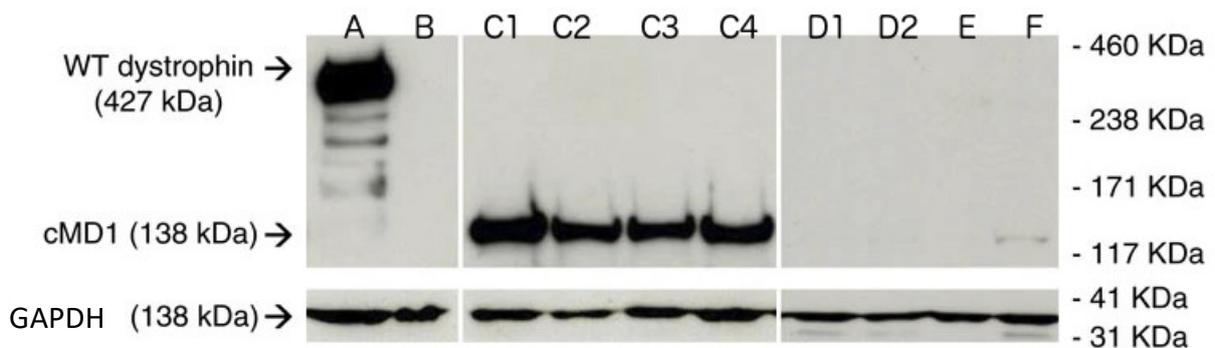


Figure Q12 : Expression de la (micro-)dystrophine dans des muscles de pattes de chien 3 mois après injection IM (ou non) d'un vecteur AAV codant la microdystrophine. Une analyse par Western-Blot a été réalisée pour étudier le niveau d'expression de la dystrophine et/ou de la microdystrophine (elles sont reconnues par le même anticorps) dans du muscle de patte d'un chien normal (A), d'un chien GMDR non traité (B), différents échantillons de muscle de patte de chien GMDR dans lequel l'AAV-microdys avait été injecté 3 mois plus tôt (C1,C2,C3,C4) et de la patte non injectée du même chien (D1,D2). Les muscles du cœur (E) et du diaphragme (F) de ce chien ont aussi été analysés. WT dystrophin = dystrophine normale ; cMD1=micro-dystrophine.

Question 13 : Des analyses complémentaires ont été réalisées par histochimie. Quelles conclusions supplémentaires apportent-elles par rapport aux expériences précédentes ?

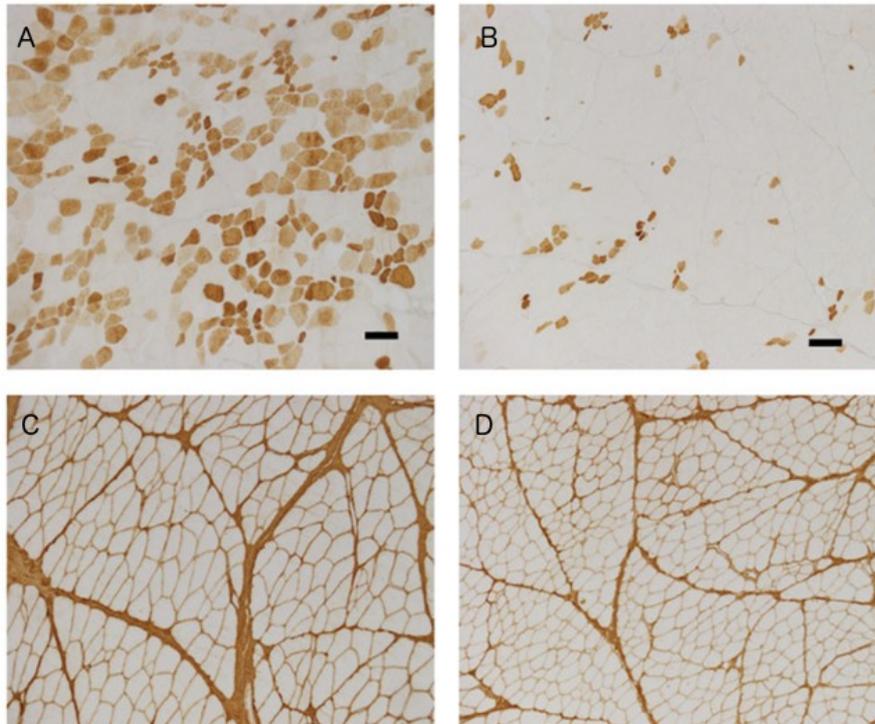


Figure Q13 : Analyse histochimique de muscle de chien GRMD 3 mois après injection IM (ou non) du vecteur AAV-microdystrophine.

Les images A et C correspondant au muscle non injecté, les images B et D au muscle traité.

Des marquages histochimiques révélant la présence d'une forme de myosine spécifique des muscles en régénération (A,B) ou du collagène (C,D) ont été réalisées.

La barre correspond à 50 micromètres.

Question 14 : La force musculaire des membres de chiens GRMD traités ou non a été mesurée sur une période de 3 mois, en comparaison de celles de chiens sains et de chiens GRMD non traités. Interprétez la figure Q14.

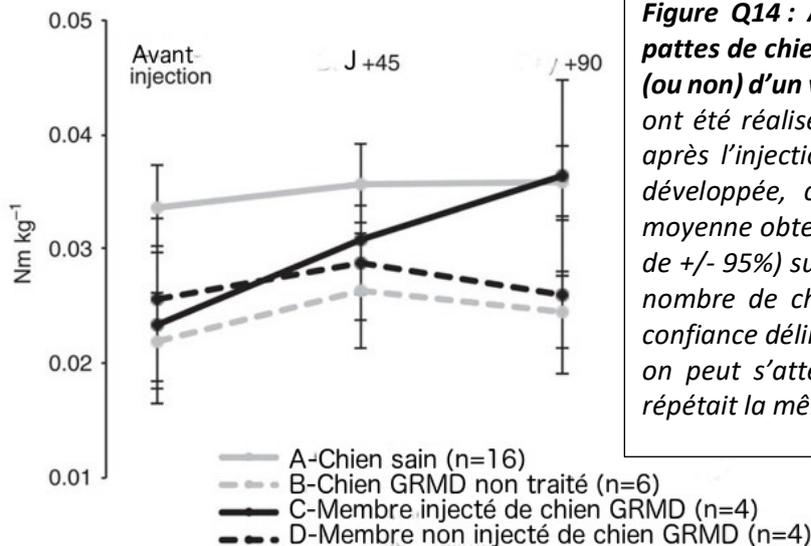


Figure Q14 : Analyse de la force musculaire de pattes de chiens GRMD 3 mois après injection IM (ou non) d'un vecteur AAV-microdys. Des mesures ont été réalisées avant l'injection, 45 et 90 Jours après l'injection. Evolution de la force maximale développée, chaque point représente la valeur moyenne obtenue (avec un intervalle de confiance de +/- 95%) sur les groupes de chiens indiqués (n= nombre de chiens). Remarque : un intervalle de confiance délimite les valeurs extrêmes auxquelles on peut s'attendre dans 95 cas sur cent si l'on répétait la même expérience.

Question 15 : Quelles sont selon vous les avantages et les limites de cette stratégie thérapeutique ?

Une autre stratégie thérapeutique appelée saut d'exon, vise à interférer spécifiquement avec le mécanisme de formation de l'ARNmessenger dystrophine, grâce à des oligonucléotides antisens synthétiques ciblant la zone à éliminer.

Question 16 : Voici la formule chimique d'un analogue de nucléotide de type morpholino. Quelles sont les différences avec la formule d'un ARN classique ?

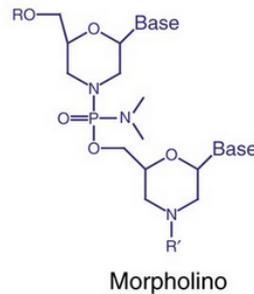


Figure Q16 : Formule chimique des morpholinos. Les morpholinos sont des polymères, R et R' représentent la suite de la chaîne.

Un couple de morpholinos appelé *eteplirsen* permettant d'éliminer l'exon 51 a été testé chez l'homme. Dans l'essai clinique suivant, 12 patients de 7 à 13 ans ont reçu des injections hebdomadaires d'eterlipsen ou d'un placebo pendant 24 semaines, puis les deux groupes ont pu recevoir le traitement et ont été suivis pendant 24 semaines supplémentaires. (Un bénéfice ayant été constaté au bout de 24 semaines, l'éthique impose de faire bénéficier du traitement le groupe placebo le plus vite possible). Les tests réalisés comprenaient : des biopsies musculaires et un test de la marche consistant à mesurer en mètres la distance que le patient est capable de parcourir en 6 minutes. Les résultats présentés correspondent à des patients dont les résultats sont représentatifs.

La RT est une Reverse-Transcription : c'est une réaction qui permet de générer de l'ADNcomplémentaire à partir d'ARNmessenger. Les ARNmessagers sont isolés et mis en présence d'une enzyme qui crée un brin d'ADNcomplémentaire correspondant aux ARNmessagers présents. Les quantités d'ADNcomplémentaire générées sont proportionnelles à la quantité initiale d'ARNmessenger. L'ADNcomplémentaire obtenu peut ensuite être amplifié par PCR, on parle alors de RT-PCR.

Question 17 : Que constatez-vous en termes d'ARNmessagers dystrophine exprimés suite après 48 semaines de traitement *eteplirsen* ? Analysez la figure suivante.

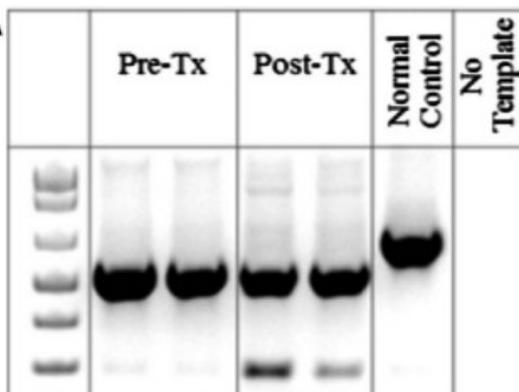


Figure Q17 : Expression des ARNmessagers dystrophine dans des biopsies musculaires de patient avant et après 48 semaines de traitement à l'eterlipsen. Les ARNmessagers ont été isolés de biopsies de muscle du même patient réalisées avant traitement (Pre-Tx) et après 48 jours de traitement (Post-Tx). Les ARNmessagers ont été analysés par RT-PCR. Une RT-PCR contrôle a été réalisée sans ajouter d'ARN (No Template). Les amorces ont été choisies dans une région encadrant la région de l'exon 51. (Deux échantillons du même patient ont été analysés).

Question 18 : Quel constat faites-vous au niveau de l'expression de la protéine dystrophine ? Analysez la figure suivante.

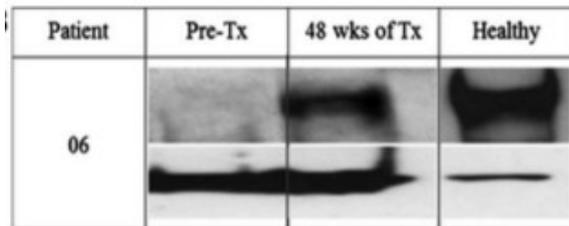


Figure Q18 : Expression de la dystrophine dans des biopsies du patient 6 avant et après 48 semaines de traitement à l'eterlipsen en comparaison d'un échantillon témoin sain. Une analyse par Western-Blot a été réalisée pour étudier le niveau d'expression de la dystrophine et de la GAPDH (voir Q14).

Question 19 : Les résultats obtenus par les participants à cette étude ont été comparés à un groupe de patients n'ayant reçu aucun traitement mais portant une mutation similaire (patients suivis avant que ce traitement soit disponible). Interprétez la figure. Quelles sont les limites de cette approche pour obtenir un groupe contrôle ?

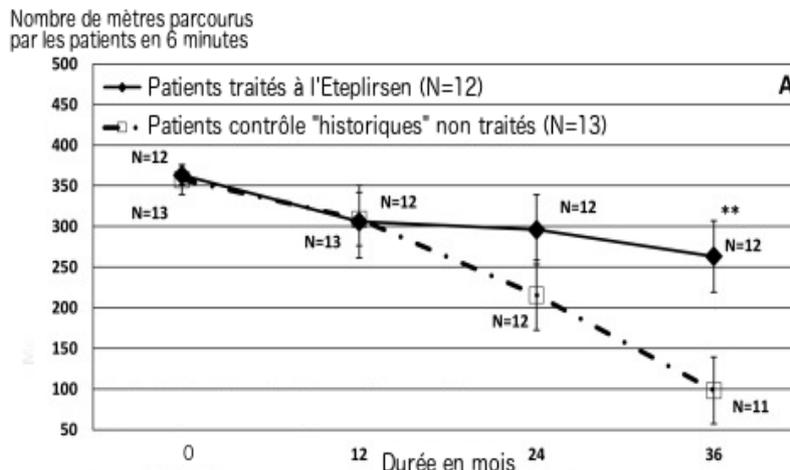


Figure Q19 : Évolution du nombre de mètres que peut parcourir un patient DMD en 6 mois 12, 24 et 36 mois après le début d'un traitement eteplirsen (et patients témoins sans traitement). Le nombre indiqué correspond à la moyenne et les barres correspondent à l'écart-type.

Question 20 : Quels sont selon vous les avantages de ce traitement et quelles en sont les limites ?

Nous allons maintenant nous intéresser à une stratégie similaire consistant à éliminer un exon de l'ARNmessenger final, mais cette fois-ci grâce au système CRISPR. Le système CRISPR est un système de ciseaux moléculaires identifié chez les bactéries, qui permet de découper l'ADN des cellules en ciblant précisément une séquence d'ADN grâce à des ARNguides. Dans l'étude suivante, réalisée chez un modèle de souris dystrophique appelé *mdx*, c'est l'exon 23, porteur de la mutation, qui est éliminé. Le système CRISPR a été livré par une injection intramusculaire dans une patte antérieure de l'animal avec un vecteur viral de type AAV (introduit en préambule à la question 13) qui exprime les ARNguides et l'enzyme réalisant la coupure, l'autre patte ayant été injectée avec une solution saline.

Question 21 : Analyse par PCR et RT-PCR des muscles traités et non traités avec un AAV-CRISPR. Interprétez cette figure en précisant à quoi correspondent les bandes de Haut et Bas poids moléculaire ? Commentez notamment leurs intensités respectives proportionnelles à leur quantité initiale.

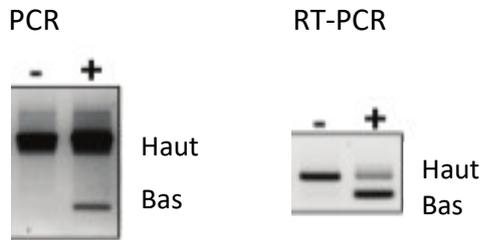


Figure Q21 : Analyse des effets d'un traitement CRISPR par PCR et RT-PCR. La PCR vous a été présentée avant la question 7 et la RT-PCR à la question Q18. Les amorces utilisées sont situées dans les exons 22 et 24 du gène de souris de la dystrophine. + : muscle traité - : muscle non traité

Question 22 : Analyse du niveau d'expression de la dystrophine de muscles traités et non traités avec un AAV-CRISPR en comparaison. Interprétez ce résultat.

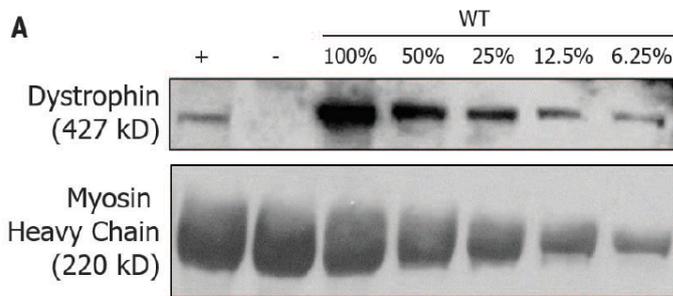


Figure Q22 : Expression de la protéine dystrophine dans des biopsies du muscle traité + et non traité - avec un AAV-CRISPR en comparaison d'un muscle normal. Une analyse par Western-Blot a été réalisée pour étudier le niveau d'expression de la dystrophine et de la myosine (voir Q14). L'échantillon témoin a été dilué de 2 en 2 comme indiqué.

Question 23 : Quels seraient selon vous les avantages et les inconvénients de ce traitement, en particulier par rapport au précédent.

30% des patients DMD ne sont pas porteurs de grandes délétions mais d'une mutation ponctuelle ou de micro-délétions. 13% comportent une mutation du type de celle décrite à la question 24.

Question 24 : Quelques patients sont par exemple porteurs d'une mutation notée 433C->T dans l'exon 6, qui correspond à une mutation du nucléotide n°433 de C en T, au niveau d'un codon Arginine. Voici la séquence correspondante de l'ARN messager. En vous aidant du code génétique fourni, pouvez-vous décrire quelle est la conséquence de cette mutation ?

... 421 CTGAGCTGGG TCCGACAATC AACTCGTAAT 450 ...

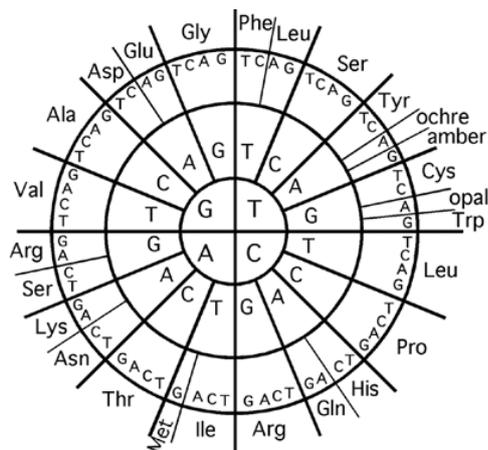


Figure Q24 : Code génétique.

Le premier codon du triplet est au Centre, les deuxième et troisième codons sont autour.

Les abréviations conventionnelles des acides aminés sont utilisées, Arg correspond par exemple à l'Arginine. ochre, amber et opal correspondent à des codons stop.

Question 25 : Un traitement connu pour interférer avec le fonctionnement du ribosome, appelé *ataluren*, s'est montré efficace pour les patients porteurs de ce type de mutations. Quel est selon vous l'effet de ce traitement sur le ribosome ?

Question 26 : Vous réalisez une étude avec ce traitement et analysez des muscles à la fin de vos expériences. Représentez sur votre copie les résultats auxquels vous vous attendez en analysant l'ADN, l'ARNmessenger et la protéine dystrophine des muscles de vos patients. Vous ferez figurer les contrôles appropriés et donnerez pour chaque type de molécule le nom de la technique d'analyse employée.

Question 27 : Des patients ont pris, en 3 prises journalières, 40mg/kg d'*ataluren* (10+10+20) ou 80mg/kg d'*ataluren* (20+20+30) par jour pendant 48 semaines. Leurs capacités motrices ont été évaluées par le test de la marche en 6 minutes (distance maximale parcourue en 6 minutes). Interprétez le résultat suivant.

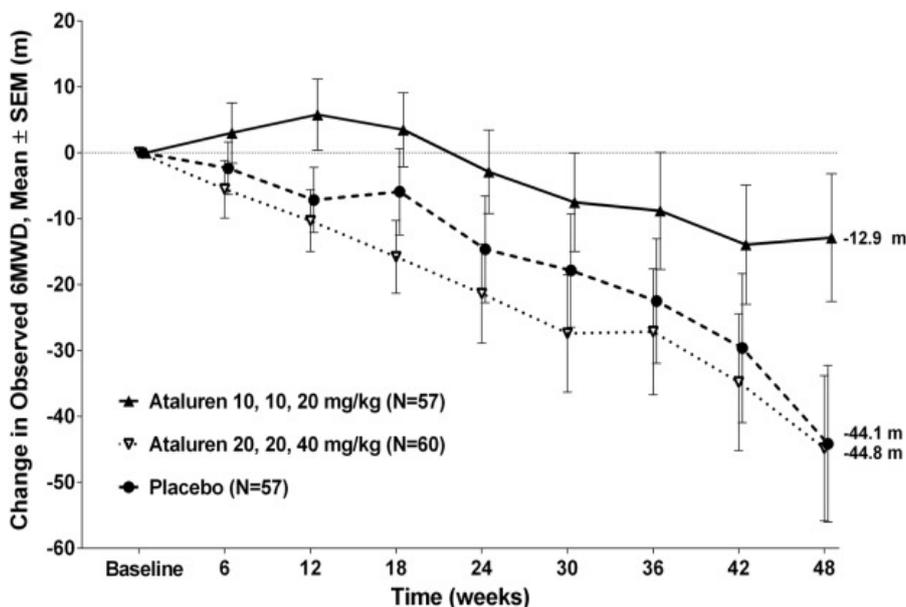


Figure Q27 : Évolution du nombre de mètres que peuvent parcourir des patients DMD dans les 48 semaines suivant le début d'un traitement ataluren. Les distances sont exprimées en mètres parcourus en moins ou en plus par rapport au niveau de base (en m) et les barres représentent les écarts-types. Le nombre N indique le nombre de patients pris en compte dans chaque groupe. Deux doses journalières ont été testées : 80mg/kg (10+10+20) et 40mg/kg (20+20+40)

Question 28: Quels sont, selon-vous, les avantages et inconvénients de ce traitement ?

Question 29: Confronté à un patient hypothétique qui pourrait être traité par les 4 techniques étudiées, quel traitement lui recommanderiez-vous préférentiellement à la lumière des données que vous avez analysées ? (Les réponses non justifiées ne seront pas prises en compte).

Bibliographie :

Les images et informations générales ont été principalement extraites des documents d'information aux patients de l'Association Française pour les Myopathies et du livre « Biologie Moléculaire et Médecine » par Kaplan et Delpech aux éditions Flammarion (éventuellement adaptées).

Dessin de fibre issu de <http://audilab.bmed.mcgill.ca/>.

Les données de recherche sont issues des articles suivants :

- 1- AAV micro-dystrophine : Le guiner et al. Nat Comm 2017.
- 2- eteplirsén : Mendell et al. Ann Neurol 2013 et Mendell et al. Ann Neurol 2016.
- 3- AAV CRISPR : Nelson et al. Science 2016.
- 4- ataluren : Bushby et al. Muscle & Nerve 2014.

Certaines informations ont été omises/simplifiées pour les besoins de l'exercice.