

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

Biologie moléculaire et génie génétique

SESSION 2023

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français, tout autre matériel est interdit.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 8 pages numérotées de 1/8 à 8/8.

	Intitulé des capacités évaluées	points
C1	Maitrise des connaissances scientifiques et techniques	4
C2	Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	4
C3	Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	7
C4	Pertinence et cohérence des solutions proposées	3
C5	Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2

Étude des méthylations du génome, marqueurs épigénétiques liés aux cancers

En 2018 en France, le cancer colorectal était responsable de 17000 décès, avec 43300 nouveaux cas. Le gène *MLH1* est mis en cause dans le syndrome héréditaire de Lynch, qui représente 5 % des cancers colorectaux.

Ce gène code une protéine qui participe à la réparation des erreurs commises par l'ADN polymérase lors de la réplication. Une diminution de l'expression de cette protéine engendre une hausse des mutations, favorisant ainsi la cancérogenèse.

L'étude menée propose de rechercher le lien entre l'expression du gène *MLH1* et les méthylations du promoteur de ce gène, au niveau des îlots CpG, séquences riches en GC. En effet certains patients atteints de cancers colorectaux ne montrent pas de mutation du gène *MLH1*, alors que son expression est modifiée.

La connaissance du profil des méthylations des gènes impliqués dans les cancers pourrait alors permettre de proposer un traitement spécifique à chaque patient.

1 Étude du gène *MLH1*

Un schéma de structure d'un gène eucaryote est présenté dans le **document 1**. Ce schéma fait apparaître les séquences permettant l'expression d'un gène et la régulation de son expression.

1.1 Donner la signification des termes « *promoter* », « *enhancer* » et du sigle « UTR ». Préciser leur rôle. (C1)

Le **document 2** décrit les conséquences des modifications épigénétiques par méthylation des cytosines au niveau des îlots CpG.

1.2 Expliquer es conséquences possibles de l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* sur l'expression de ce gène. (C3, C4)

La séquence partielle du gène *MLH1* présentée dans le **document 3**, correspond à une partie de la séquence codante de ce gène et aux 198 nucléotides situés en amont de celle-ci, incluant le promoteur de ce gène.

1.3 Présenter les étapes permettant d'obtenir ce format de séquence partielle par bioinformatique via le portail NCBI. Préciser en quoi le format FASTA diffère de la présentation du document 3. (C1)

L'étude de la méthylation du promoteur du gène *MLH1* nécessite en premier lieu une extraction de l'ADN génomique à partir de tissus humains sains et à partir de tissus humains tumoraux.

Dans les deux cas, l'ADN extrait est fragmenté par l'action d'enzymes de restriction. Le site de restriction et de coupure de l'endonucléase *PstI* choisie pour cette étape est le suivant : CTGCA/G.

1.4 Schématiser et orienter les deux fragments d'ADN obtenus après l'action de *PstI* sur un ADN double brin contenant un site de restriction pour *PstI*. Caractériser le type d'extrémités obtenues. (C1, C2)

1.5 Calculer alors la taille du fragment d'ADN obtenu après coupure par *PstI* du gène *MLH1* de la séquence d'ADN contenant le promoteur. (C3)

2 Méthode d'analyse des méthylations du gène *MLH1*

L'analyse de la méthylation des échantillons d'ADN est conduite en deux temps :

- un traitement de l'ADN au bisulfite de sodium pour différencier les ADN méthylés des ADN non méthylés ;
- une amplification des produits du traitement précédent par PCR en temps réel en technologie Taqman, qualifiée dans ce cas précis de PCR spécifique d'ADN méthylé (MSP).

Les fragments d'ADN obtenus par l'action de *PstI* sur la séquence du gène *MLH1* subissent le traitement chimique au bisulfite de sodium décrit dans le **document 4**.

2.1 Expliquer la conséquence du traitement au bisulfite de sodium sur une cytosine non méthylée d'une part et sur une cytosine méthylée d'autre part. (C3)

La séquence d'ADN double brin matrice, cible de l'amorce sens utilisée lors de la MSP, est présentée ci-dessous :



2.2 Écrire la séquence double brin orientée obtenue après traitement au bisulfite de sodium de cette séquence cible non méthylée. (C3)

2.3 En déduire la séquence de l'amorce sens à utiliser pour amplifier cette dernière. (C4)

La séquence de l'amorce anti-sens est obtenue de la même manière à l'aide de séquence cible de cette amorce.

L'amplification spécifique des ADN méthylés est réalisée sur des échantillons d'ADN, soit traités, soit non traités au bisulfite de sodium en utilisant deux couples d'amorces spécifiques, sens et antisens.

La comparaison des résultats suite à ces deux amplifications permet de conclure quant à la méthylation du promoteur du gène *MLH1*.

Le **document 5** présente le principe de cette amplification incluant la qPCR en technologie Taqman.

2.4 Dégager le principe de la PCR en technologie Taqman® sous la forme d'un schéma annoté et légendé. (C2)

- 2.5 Identifier et expliciter les trois étapes A, B et C soulignées dans le protocole d'amplification. (C2)
- 2.6 Identifier l'étape du cycle d'amplification à laquelle doit être effectuée la lecture de fluorescence. Expliquer. (C3)
- 2.7 Préciser l'avantage principal de la quantification d'ADN en technologie Taqman® par rapport à la technologie Sybr®Green. (C2)

3 Méthylation du gène *MLH1* et cancer colorectal

Des expériences sont menées chez des patients atteints de cancer colorectal, afin d'étudier le lien entre la méthylation des îlots CpG du promoteur du gène *MLH1* et l'expression de ce gène.

Le niveau d'expression du gène *MLH1* est évalué par transcription inverse suivie d'une PCR quantitative (RT-qPCR). Pour cela, une gamme d'étalonnage est réalisée à partir de solutions d'ADN en quantités connues. La courbe d'étalonnage obtenue à partir de ces amplifications est présentée dans le **document 6**.

Les courbes d'amplification d'échantillons de tissus sains et tumoraux sont également présentées sur ce même document.

- 3.1 Déterminer graphiquement la quantité d'ADNc contenue dans l'échantillon 19N. Expliquer la démarche suivie. (C3)

Pour chaque patient, l'état de méthylation des îlots CpG est également analysé sur des échantillons de tissus non tumoraux (N) et des échantillons de tissus tumoraux (T) d'un même patient.

Le **document 7** présente les résultats de l'expression du gène *MLH1* et de l'état de méthylation des îlots CpG de son promoteur, pour des échantillons de tissus prélevés sur les tissus tumoraux de 25 patients (2T, ..., 28T) et les tissus non tumoraux (2N, ..., 28N), des mêmes patients.

Le gène *ACTB* est utilisé comme gène de référence dans l'étude de l'expression du gène *MLH1*.

- 3.2 Proposer une définition d'un gène de référence puis préciser l'intérêt de son utilisation en PCR quantitative. (C1)

- 3.3 Pour les échantillons issus du patient 17 (échantillons 17N et 17T), analyser l'expression du gène *MLH1* puis l'état de méthylation des îlots CpG de son promoteur. Proposer une hypothèse expliquant la différence d'expression du gène *MLH1*. (C3, C4)

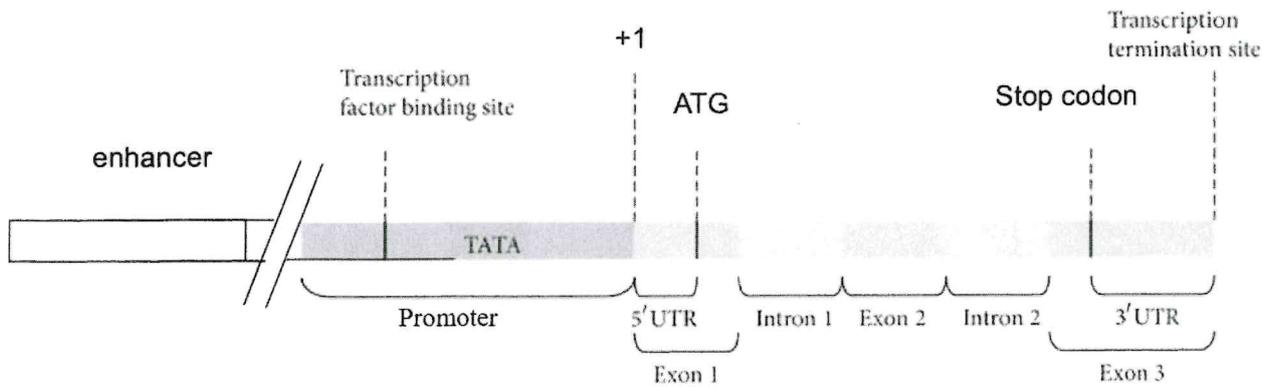
- 3.4 Réaliser, de la même façon, l'analyse des résultats obtenus à partir des échantillons issus du patient 19. (C3, C4)

Proposer une hypothèse sur l'origine de la cancérogenèse chez ce patient 19.

Dans la perspective de traitements anticancéreux, des substances inhibitrices des méthylases DNA 5méthylC MéthylTransférases (DNMTs) peuvent être utilisées. La Commission européenne a délivré une autorisation de mise sur le marché pour la 5-Azacytidine (Vidaza®) en décembre 2008. Le Vidaza® est l'une des substances inhibitrices des DNMTs.

- 3.5 Expliquer l'intérêt d'utiliser la 5-Azacytidine dans le traitement de certains cancers. Préciser si ce traitement est adapté pour les patients 17 et 19. Argumenter. (C3, C4)

Document 1 : Schéma de structure d'un gène eucaryote



Huang, Wen-Lin, *et al.*, Rule-Based Knowledge Acquisition Method for Promoter Prediction in Human and Drosophila Species, 2014, The Scientific World Journal.

Document 2. Modifications épigénétiques par méthylation des cytosines

Les modifications épigénétiques consistent en des modifications chimiques, en particulier la méthylation des bases azotées C (5mC)* dans des îlots riches en dinucléotides CpG. Une hyperméthylation des séquences modifie les interactions faibles avec les histones, conduisant à un degré supérieur de compaction de la chromatine nommée alors hétérochromatine.

Des enzymes de méthylation, nommées méthylases comme les DNA 5méthylC MéthylTransférases (DNMTs) et des enzymes de déméthylation, les déméthylases, rendent le processus réversible.

*(5mC : Cytosine portant un résidu -CH₃ sur le carbone C5).

Source personnelle de l'auteur

Document 3 : Séquence partielle du gène *MLH1*

NG_007109.2:5001-62497 Homo sapiens mutL homolog 1 (MLH1),
RefSeqGene (LRG_216) on chromosome 3

```

1 gaagagactg cagaaccac agagtcgga aattcgaacg gcattcaagc tgtccaatca
61 atagctgccg ctgaagggtg gggctggatg gggtaaccta cagctgaagg aagaacgtga
121 gcacgaggca ctgaggatgat tgcgcgaaga cacgtcgatt gagcatctag acgtttcctt
181 ggctcttctg gcgccaaaat gtcgttcgtg gctgcagtta ttcggcggct ggacgagaca
241 gtggtgaacc gcatcgcggc gggggaagtt atccagcggc cagctaagtc tatcaaagag
301 atgattgaga actggtacgg agggagtcga gccgggctca ctaagggtc acgacttaac
361 gggccgcgtc actcaatggc gcggacacgc ctctttgccc gggcagaggc atgtacagcg

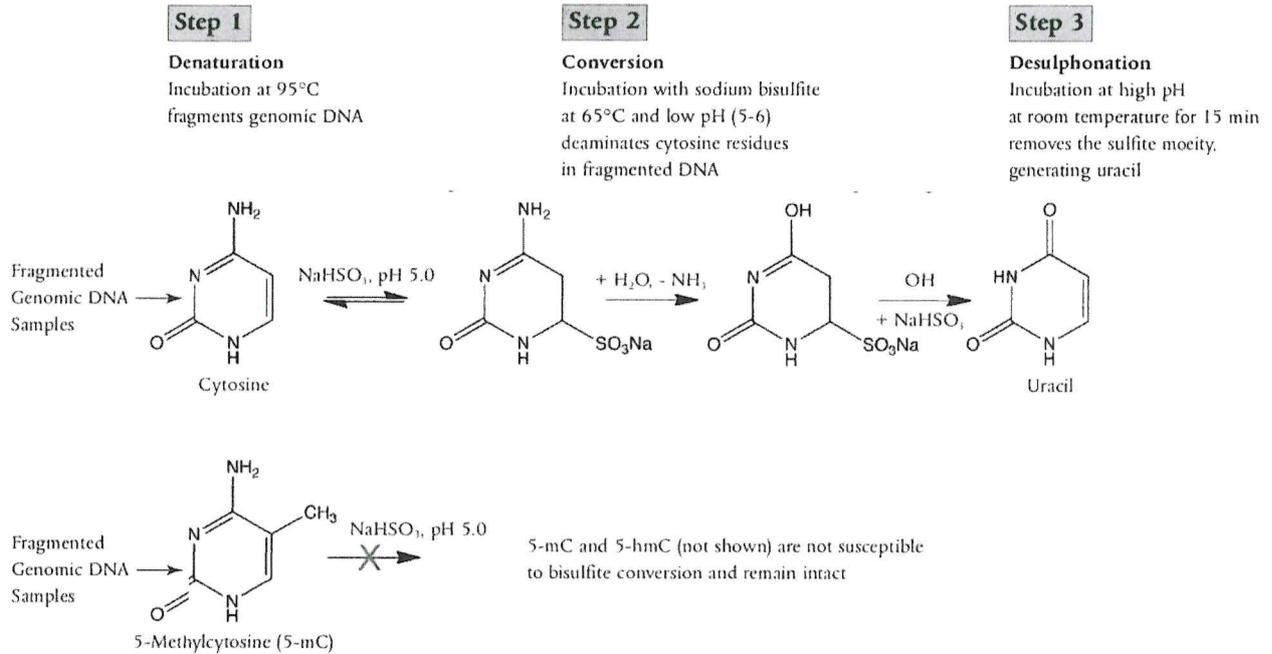
```

Légende :

- Souligné 1 trait : sites de restriction de *Pst*I
- Souligné 2 traits : codon d'initiation
- Souligné en pointillés : position des amorces sens et antisens utilisées lors de la MSP

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007109.2?report=genbank&from=5001&to=62497 [consulté le 08/12/21]

Document 4 : Action du bisulfite de sodium (NaHSO₃) sur la cytosine et sur la 5-méthylcytosine



https://www.neb.com/~media/nebus/page%20images/newsized%20brochure%20images/epigenetics/bisulfite_conversion.jpg [consulté le 08/12/21]

Document 5 : Mise en évidence des ADN méthylés par amplification spécifique

- MSP aim

Bisulfite conversion can be followed by PCR amplification to reveal the methylation status of every cytosine. Uracils are amplified in PCR reaction as thymines, whereas 5-mC residues get amplified as cytosines. Applications such as Methylation-Specific PCR (MSP) involve analyzing untreated and bisulfite treated DNA using **two different sets of PCR primer pairs**, one pair that targets the unaltered, methylated sequence and the other that targets the converted unmethylated sequence.

<https://international.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion> [consulté le 08/12/21]

- Principe d'une PCR en temps réel reposant sur l'utilisation de sondes d'hydrolyse Taqman®

Les ADN génomiques méthylés ou non sont amplifiés séparément avec deux couples d'amorces, l'un ciblant la séquence méthylée, l'autre la séquence non méthylée. La sonde oligonucléotidique type Taqman® comprend un fluorochrome appelé « reporter » en 5', le 6FAM et un agent bloquant l'émission de fluorescence appelé « quencher » en 3', le TAMRA.

L'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase hydrolyse la sonde et libère le fluorochrome qui émet alors de la fluorescence. La fluorescence est mesurée par le détecteur d'un appareil de type ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer). Après dépassement d'un seuil de détection de fluorescence, l'amplification par PCR conduit à un signal fluorescent proportionnel à la quantité de produit de PCR générée. La quantité de matrice initiale peut être déduite du nombre de cycles auquel le signal fluorescent franchit un seuil dans la phase exponentielle de la réaction PCR. Les essais sont normalisés en utilisant des échantillons de référence.

- Protocole d'amplification

Les amplifications PCR de l'ADN traité au bisulfite et de l'ADN non traité au bisulfite, sont réalisées en microplaque à 96 puits avec un mélange réactionnel final de 25 µl, constitué de 600 nM d'un des deux couple d'amorces, de 200 nM de sonde, 200 µM de dATP, dCTP, dGTP et dTTP, 3,5 mM de MgCl₂, tampon TaqMan®, Taq polymérase et de l'un des deux échantillons d'ADN matrice.

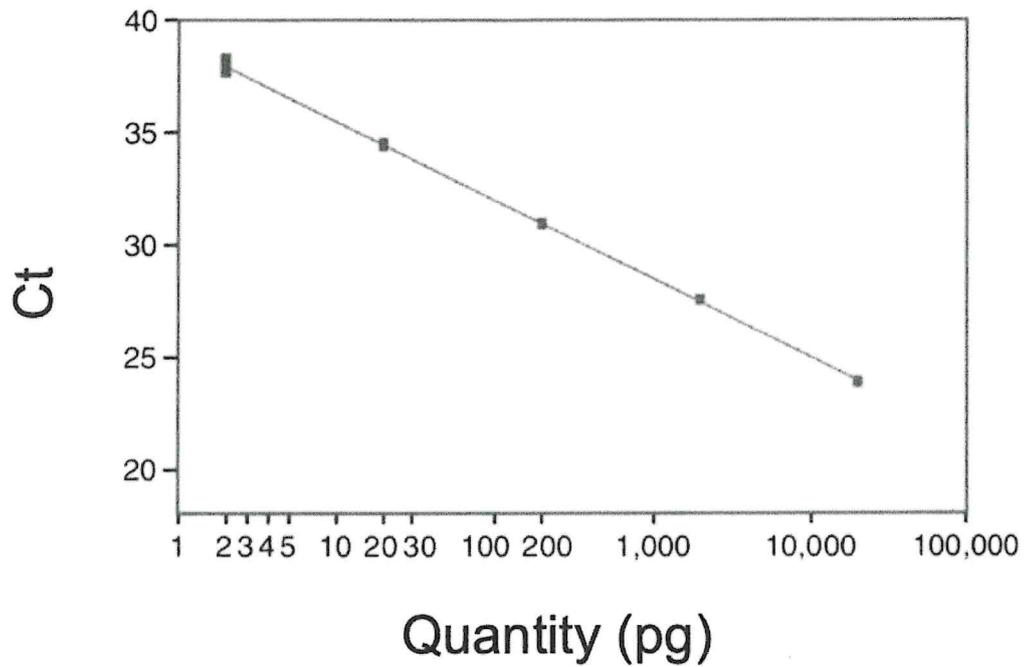
Le programme d'amplification est le suivant : 95 °C pendant 10 min, suivi de 40 cycles incluant 95°C pendant 30 s (étape A), 63 °C pendant 15 s (étape B) et 72 °C pendant 1 min (étape C).

Cindy A. Eads *et al.*, MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation, *Nucleic Acids Res.* 2000 Apr 15; 28(8): e32, PMC102836.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2023
Biologie moléculaire et génie génétique	23BOE2BMO	Page: 6/8

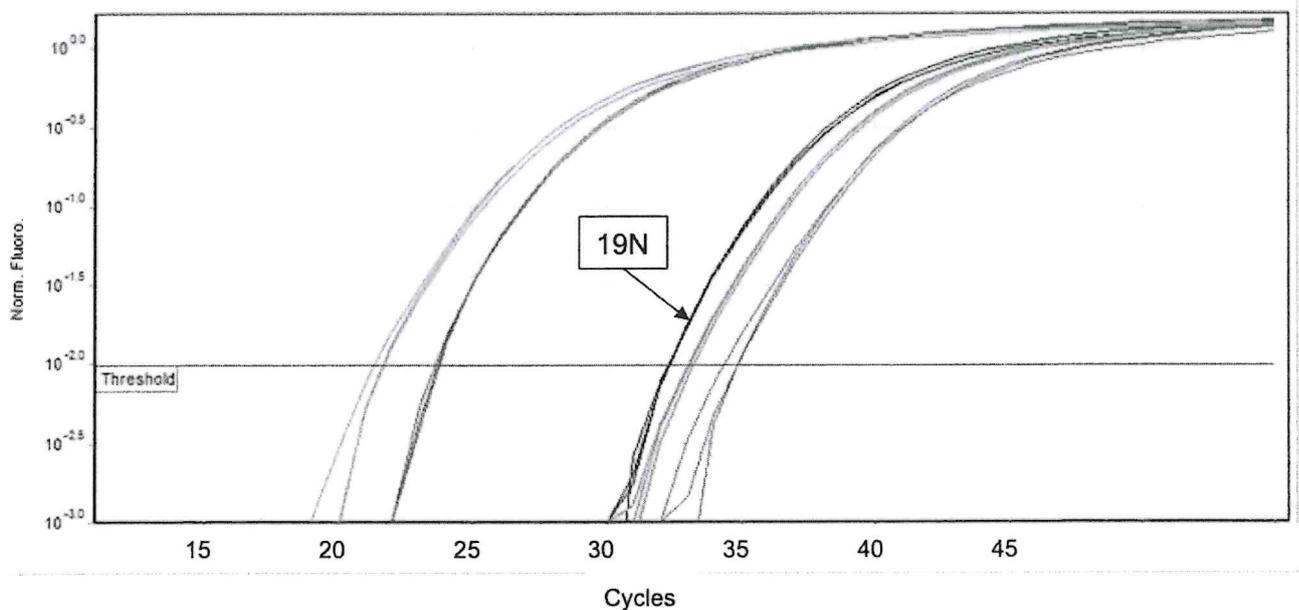
Document 6 : Quantification des transcrits du gène *MLH1* par qPCR

Courbe d'étalonnage : $Ct = f(\text{quantité d'ADNc})$



<https://international.neb.com/products/m3004-luna-universal-probe-qpcr-master-mix#Product%20Information> [consulté le 08/12/21]

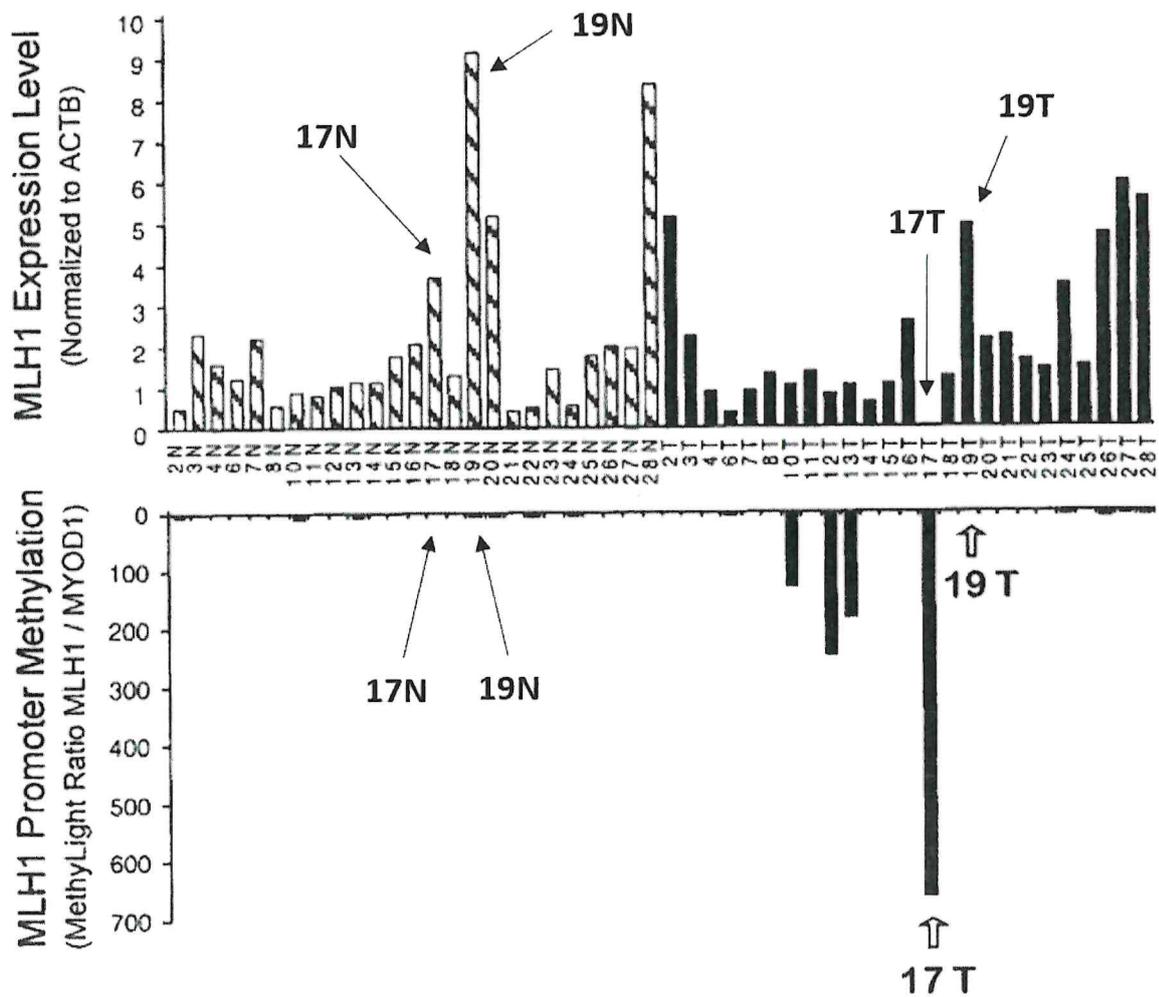
Exemples de courbes d'amplification pour différents échantillons



Norm. Fluoro. : Fluorescence normalisée.

https://en.wikipedia.org/wiki/Real-time_polymerase_chain_reaction#/media/File:Qpcr-cycling.png [consulté le 08/12/21]

Document 7 : Comparison of *MLH1* expression, and *MLH1* promoter methylation of 25 matched-paired human colorectal samples



Upper: *MLH1* expression levels measured by quantitative, real time RT-PCR (TaqMan®) in matched normal (hatched bars) and tumor (solid black bars) colorectal samples. The expression levels are displayed as a ratio between *MLH1* and *ACTB* measurements.

Lower: Methylation status of the *MLH1* promoter as determined by MSP.

Cindy A. Eads *et al.*, MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation, *Nucleic Acids Res.* 2000 Apr 15; 28(8): e32, PMC102836