

CONCOURS GÉNÉRAL DES LYCÉES

—

SESSION 2021

—

**BIOCHIMIE-BIOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIES**

(Classes de terminale série STL)

EPREUVE D'ADMISSIBILITE

Durée : 5 heures

*L'usage de la calculatrice avec mode examen actif est autorisé.  
L'usage de la calculatrice sans mémoire « type collège » est autorisé.*

*L'usage du dictionnaire « anglais-français » est autorisé.*

*Les différentes parties du sujet peuvent être traitées de manière indépendante.*

**Consignes aux candidats**

- Ne pas utiliser d'encre claire
- N'utiliser ni colle, ni agrafe
- Numéroté chaque page en bas à droite (numéro de page / nombre total de pages)
- Sur chaque copie, renseigner l'en-tête + l'identification du concours :

Concours / Examen : CGL

Epreuve : 101

Matière : BIOT

Session : 2021







## LA BIOLUMINESCENCE

La bioluminescence, production et émission de lumière par un organisme vivant, est un phénomène qui serait apparu chez les premiers êtres vivants il y a près de 4 milliards d'années. Elle a été observée chez des **méduses** et des **insectes** dès l'Antiquité par Homère ou Aristote. L'écrivain romain Pline l'Ancien avait observé que la **crevette** *Pholas dactylus* émet de la lumière quand on la mange. Il avait aussi noté que le **lichen** *Omphalotus olearius* est lumineux de nuit.

Il existe une grande variété d'organismes qui produisent de la lumière. Entre 2017 et 2019, l'institut de recherche de l'aquarium de la baie de Monterey en Californie a démontré que 76% des animaux vivant en eau libre entre la surface et 4000 mètres de profondeur (plancton, méduses, crustacés, poissons et calmars) étaient lumineux et que dans les milieux profonds, ils représentaient encore 30 à 40% des espèces. Sur terre, les plus connus sont des insectes, les lucioles et vers luisants ; mais certains champignons et bactéries produisent également de la lumière.



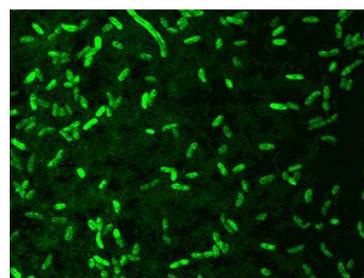
***Mycena luxaeterna*** ou « champignons à lumière éternelle » de la forêt tropicale de Sao Paulo.



**Une méduse bioluminescente** - Photo Chris Favero. Source de l'image : Flickr



Les eaux côtières chargées en **phytoplancton bioluminescent** (sud de la Tasmanie)



***Vibrio fischeri***

Un exemple de bioluminescence bactérienne.

Nombre de ces organismes produisent leur propre lumière, par un mécanisme intracellulaire ou extracellulaire. La majorité des animaux bioluminescents vivent en symbiose avec des bactéries productrices de bioluminescence.

Cette bioluminescence a de multiples fonctions chez les êtres vivants :

- Communiquer, se reproduire : les femelles qui ne volent pas montent le long d'une tige et émettent des signaux lumineux pour se faire remarquer par le mâle.
- Attirer les proies : la baudroie des abysses a une lanterne lumineuse qui attire les petits poissons qui deviennent ensuite ses proies.
- Leurrer un prédateur : la production de lumière peut permettre d'éblouir ou de distraire des prédateurs. La fuite est ainsi facilitée.

## 1. La bioluminescence, un phénomène biochimique valorisable

### 1.1. Organisation et diversité des systèmes bioluminescents

La luciférase est une enzyme de nature protéique présente dans de nombreux organismes eucaryotes et procaryotes ; unicellulaires ou pluricellulaires.

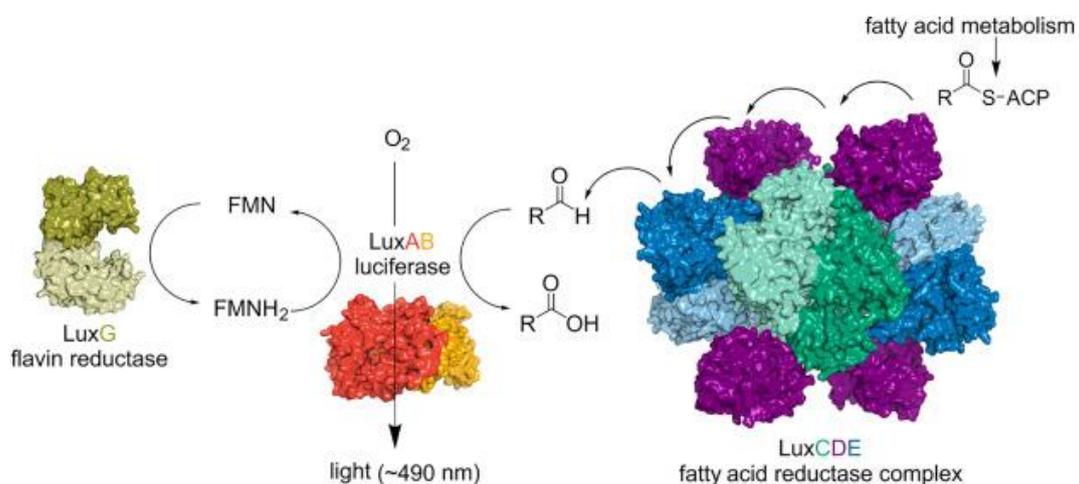
**Q1.** En vous appuyant sur le **document 1**, **rappeler** la nature des liaisons et des interactions impliquées dans les différents niveaux de conformation tridimensionnelle de l'enzyme.

**Q2. Expliquer** en quoi cette conformation est importante pour l'activité de l'enzyme.

Le **document 2** présente quelques exemples de réactions catalysées par la luciférase.

**Q3. Analyser** les équations de réactions pour **identifier** les types de réactions réalisées.

Chez *Vibrio fischeri*, la production de lumière implique trois enzymes différentes : la luciférase, le complexe « acide gras réductase » pour la synthèse d'aldéhyde et la FMN réductase. L'émission de lumière résulte de la réaction de l'oxygène moléculaire avec FMNH<sub>2</sub> et un aldéhyde à longue chaîne, et s'accompagne de production de FMN, d'eau et de l'acide gras correspondant. La réaction est hautement spécifique de FMNH<sub>2</sub>, qui est protégée contre l'auto-oxydation une fois liée à l'enzyme. La réaction bioluminescente est schématisée de la façon suivante :



Source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6279958/>

L'énergie générée par l'oxydation est plus que suffisante pour fournir les 60 Kcal · mol<sup>-1</sup> nécessaires à l'émission de lumière. Il s'agit cependant d'un processus énergétiquement coûteux. Hastings et Nealson ont estimé que l'émission de lumière représente une dépense énergétique d'environ six molécules d'ATP pour chaque photon, en supposant une efficacité de 100% pour la réaction. Cela explique pourquoi l'énergie est conservée dans les organismes bioluminescents et exprimée uniquement lorsque cela est physiologiquement nécessaire.

**Q4. Montrer** que la molécule de Flavine Mono-Nucléotide (FMN) est un coenzyme d'oxydoréduction analogue à ceux mis en jeu dans la respiration.

Le **document 3** présente l'organisation des gènes codant pour ces enzymes chez *Vibrio*. Ces gènes sont organisés sous forme de deux opérons et leur expression est régulée par un phénomène connu sous le nom d'auto-induction.

**Q5.** En vous appuyant sur le **document 3**, **expliquer** la nécessité d'une organisation de ces gènes inductibles sous forme d'opéron.

Le *quorum sensing* (ou détection de quorum) correspond à la communication de cellule à cellule, c'est un facteur de l'expression des gènes qui devient ainsi dépendante de la densité des cellules bactériennes. Le *quorum sensing* implique une phéromone diffusible appelée auto-inducteur (AI).

**Q6. Analyser** le **document 3** et expliquer en quoi la N-acétyl homosérine lactone (AHL) est un auto-inducteur. Argumenter l'importance du « *quorum sensing* » dans l'induction de cet opéron, appelé « opéron lux ».

L'**ATPmétrie** est une technique de biologie moléculaire, basée sur le principe de la bioluminescence, qui permet de mesurer quasi instantanément la quantité d'ATP (Adénosine Triphosphate) présente dans un échantillon. Cette technique est fondée sur l'action de la luciférase en présence de luciférine, et la détection de la lumière émise par luminométrie. L'ATPmétrie est notamment utilisée pour quantifier les cellules viables dans une eau, un milieu ou une préparation.

**Q7. Expliquer** en quoi le dosage de l'ATP peut être un indicateur pour déterminer la concentration en cellules viables.

**Q8. Expliquer** à l'aide du **document 2**, le choix de cette luciférase pour mettre en œuvre cette technique.

Le **document 4** présente la technologie de l'ATP-métrie de seconde génération (ATP 2G). Il s'agit d'une alternative fiable, facile à utiliser, peu onéreuse et dont les résultats sont donnés en quelques minutes seulement. Elle donne une indication extrêmement fidèle de la quantité totale de micro-organismes vivants dans un échantillon (biomasse totale, charge biologique totale ou flore totale active). L'ATP 2G est une technique d'analyse quantitative car elle intègre la calibration de la mesure par l'utilisation d'un standard permettant d'exprimer le résultat de la mesure en picogramme d'ATP. Il a été établi que lorsque la biomasse totale est mesurée, chaque bactérie contient en moyenne 1 femtogramme d'ATP (Wilfred, 1991). Ainsi, il est possible d'estimer la quantité de bactéries présentes dans un échantillon en prenant pour convention : 1 pg d'ATP ≈ 1 000 équivalents bactéries.

L'ATPmétrie trouve de multiples applications dans le secteur médical, en particulier dans le cadre de la prévention des maladies nosocomiales.

**Q9. Proposer une** origine probable de l'ATP extracellulaire résiduel.

**Q10. Expliquer** la démarche permettant de déterminer la concentration en ATP intracellulaire dans le prélèvement.

**Q11. Proposer** une autre technique permettant d'estimer la concentration en cellules bactériennes dans un échantillon.

Le gène *lux* de la luciole a été cloné pour la première fois en 1985. Des gènes codant des luciférases issus d'organismes variés sont utilisés pour produire des plasmides recombinants qui permettront de transférer des cellules. Le gène *lux* utilisé peut ainsi servir de gène rapporteur de l'expression génétique dans une cellule transfectée.

Le gène *lux* peut également donner une nouvelle fonctionnalité à un organisme récepteur qui pourra alors être utilisé comme éclairage du futur.

## 1.2. Éclairer avec du vivant

Des scientifiques mais aussi des architectes, des « designers » s'inspirent aujourd'hui des organismes vivants bioluminescents pour mettre au point des éclairages urbains. La bioluminescence dispense en effet une lumière non-agressive, dite lumière "froide". Entre autres avantages, elle pourrait aider à lutter contre la pollution lumineuse. Celle-ci se révèle néfaste pour la biodiversité et pourrait causer de nombreux effets délétères, notamment sur la migration des oiseaux, la chute des feuilles des arbres, mais aussi sur la santé humaine, notamment des dérèglements hormonaux.

Le **document 5** présente un panel de projets développés en Europe.

**Q12. Montrer** que chacun de ces projets relève bien des biotechnologies, c'est-à-dire « de l'utilisation du vivant pour produire un bien ou un service ».

Les systèmes d'éclairage bioluminescents développés peuvent s'appuyer sur des cultures bactériennes (exemple : projet de Glowee) ou végétales (exemple : projet de woodlight). Le **document 6** présente deux milieux de culture pour ces deux catégories d'organismes ainsi que les protocoles de mise en culture.

**Q13. Comparer** les conditions nutritionnelles et physico-chimiques de culture des bactéries, ainsi que celles des plantes pour montrer en quoi, dans chacun des cas, ces conditions sont adaptées à leur utilisation.

Des chercheurs californiens, dans une start-up appelée Glowing Plant, ont développé des plants d'*Arabidopsis thaliana* [végétal de la famille de la moutarde ou Brassicaceae, utilisé comme modèle en laboratoire] bioluminescents. Pour cela, ils ont modifié le plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens* et ainsi transféré des « gènes de bioluminescence » au végétal. Cette technologie est présentée dans le **document 7**.

**Q14.** En amont de la première étape, une étape de construction du plasmide Ti a été réalisée.

**Rappeler** le rôle de la ligase et **identifier** l'autre catégorie d'enzymes nécessaire pour la construction.

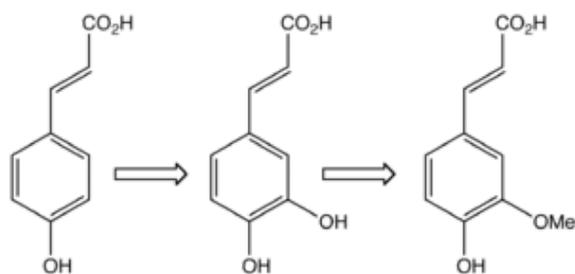
**Expliquer** le rôle de la kanamycine dans la technologie présentée.

**Q15.** En vous appuyant sur le **document 8**, **argumenter** le choix du plasmide Ti d'*Agrobacterium* pour transformer la plante.

**Expliquer** pourquoi ce vecteur est appelé vecteur d'expression.

En 2017, des chercheurs du M.I.T. ont développé des végétaux luminescents mais la lumière n'était produite que pendant 3h30. En 2019, une autre équipe a présenté dans la revue *Nature Biotechnology* de nouveaux résultats : elle a créé des plants capables de

produire une lueur autoentretenu à vie en utilisant un système de bioluminescence fongique, qui convertit l'acide caféique en luciférine. L'acide caféique ou acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque est un composé organique, intermédiaire clé dans la biosynthèse de la lignine. La démarche est présentée dans le **document 9**.



Dans les plantes, l'acide caféique (milieu) est formé par hydroxylation de l'acide paracoumarique (gauche) et transformé en acide férulique (droite).

*Extrait wikipedia*

**Q16. Montrer** que ces molécules sont des acides organiques.

**Expliquer** pourquoi l'acide caféique est présent dans toutes les plantes.

**Schématiser** la dérivation de la voie de synthèse de la lignine à partir de l'acide caféique pour produire de la lumière en présence des 4 gènes fongiques.

**Q17. Expliquer** le terme de plantes auto-luminescentes.

**Identifier** tous les arguments permettant de conclure à l'intérêt de cette méthode.

**Q18. Discuter** de l'impact environnemental et socioéconomique de ces nouveaux éclairages urbains bioluminescents en présentant les avantages économique, écologique et esthétique et également les inconvénients.

Une autre application de la bioluminescence est d'utiliser l'expression du gène de la luciférase pour révéler la présence de toxiques, comme les composés œstrogéniques.

## 2. Utilisation de la luminescence dans l'environnement : mise en évidence de l'activité œstrogénique dans des systèmes aquatiques

Les systèmes aquatiques sont aujourd'hui contaminés par une diversité de composés chimiques. Parmi ces contaminants, les perturbateurs endocriniens ont la capacité d'altérer le fonctionnement du système endocrinien et engendrent des effets sur la reproduction, le développement d'un organisme ou de sa descendance.

Les œstrogènes, notamment d'origine pharmaceutique, sont particulièrement actifs. Ces composés se déversent en continu dans les eaux usées pouvant contaminer les nappes phréatiques et perturber les écosystèmes des milieux aquatiques. Ils peuvent alors affecter des populations entières même à des concentrations extrêmement faibles.

**Q19. Emettre une hypothèse** quant à l'origine de la présence de ces hormones stéroïdiennes

En vous appuyant sur le **document 10**, **expliquer** l'impact de ces perturbateurs endocriniens sur les trois cibles de la fonction reproductrice des organismes exposés.

Les méthodes chimiques de détection de ces substances se heurtent à des problèmes de limite de quantification et de sensibilité des techniques. Par conséquent, des méthodes de détection biologique ont fait leur apparition ces dernières années. Fondées sur l'utilisation de biotests (cellules ou organismes vivants), ces méthodes permettent **une détection sensible et spécifique** de ces substances actives au sein de matrices environnementales complexes (effluents, sédiments, eau de surface).

Les premiers biotests faisaient appel à des organismes entiers, comme le poisson-zèbre. De plus en plus, ce sont des lignées cellulaires humaines transformées qui sont utilisées.

**Q20. Argumenter** le choix de l'utilisation de lignées cellulaires par rapport aux organismes entiers.

Des lignées cellulaires humaines, sont transformées génétiquement par ajout d'une séquence d'ADN comportant un gène rapporteur de l'activité œstrogénique, codant pour la luciférase.

**Le document 11** présente le principe du dosage des œstrogènes par cette méthode.

Dans un premier temps, les œstrogènes diffusent à travers la membrane cytoplasmique et interagissent avec leur récepteur.

**Q21. Expliquer** en quoi un perturbateur endocrinien œstrogénique possède la capacité de traverser facilement les membranes biologiques, à l'aide de la structure d'une hormone stéroïde présentée dans le **document 12** et de l'organisation moléculaire d'une membrane cytoplasmique.

Le récepteur humain  $\alpha$ , récepteur aux œstrogènes, est une protéine structurée en plusieurs domaines.

**Q22.** À partir de l'observation du **document 13**, proposer une définition du terme de domaine.

**Illustrer** cette définition en décrivant le « DNA binding domain » C et en présentant son rôle.

Dans un second temps, le récepteur lié à son ligand se fixe sur le promoteur (ERE) du gène rapporteur de la luciférase et l'active, pour produire *in fine* une bioluminescence proportionnelle à la quantité d'œstrogènes présents dans le milieu et détectable à l'aide d'un luminomètre (**document 11**).

**Q23. Rappeler** le rôle d'un promoteur. **Analyser** le **document 11** pour nommer et décrire les différentes étapes aboutissant à la synthèse de la luciférase à partir du gène rapporteur activé.

**Q24. Analyser** le **document 11** pour expliquer comment ce biotest permet de détecter des œstrogènes dans les milieux aquatiques.

Les expériences ont été réalisées sur deux lignées cellulaires transformées différentes. Les avantages et les limites de ces biotests sont indiqués dans le **document 14**.

**Q25. Expliciter** chaque avantage et chaque limite proposés pour ce test dans le **document 14**.

Tous les œstrogènes n'ont pas la même affinité vis à vis de leur récepteur. On souhaite donc évaluer cette affinité. En pratique, il s'agit de mettre en contact l'échantillon à tester, selon une gamme de dilution, avec des cellules en culture de manière à obtenir des courbes dose-réponse. Ces courbes dose-réponse servent à déterminer une  $EC_{50}$  (concentration efficace 50 %) correspondant à une estimation graphique du logarithme de la concentration en hormone produisant 50 % de l'effet maximum (**document 15**).

**Q26. Commenter** l'allure de la courbe et expliquer la détermination graphique puis le calcul à effectuer pour obtenir la valeur de la concentration  $EC_{50}$ .

Le **document 16** compare l' $EC_{50}$  de l'œstrogène de synthèse, molécule retrouvée dans les pilules contraceptives (**ethinyl-œstradiol**) en comparaison de l'œstrogène naturel (**œstradiol**) dans différents modèles de cellules utilisées *in vitro*.

Parmi les lignées cellulaires humaines utilisées, le récepteur aux œstrogènes peut être présent de manière endogène par la cellule (cellules T47D : modèle ER-CALUX) ou introduit en parallèle du gène rapporteur à l'aide d'un vecteur d'expression (cellules Hela : modèle Hela 993).

**Q27. Expliquer** pourquoi plus l'affinité est grande, plus la valeur de  $EC_{50}$  est faible

**Q28. Analyser le document 16** en comparant l'affinité du récepteur vis-à-vis de l'œstradiol et de l'éthinyl-œstradiol pour chaque lignée cellulaire. **Proposer** une hypothèse quant aux différences observées entre ces lignées. **En déduire** la lignée la plus intéressante pour détecter les œstrogènes de synthèse dans les milieux aquatiques.

Le gène de la luciférase peut être utilisé comme gène rapporteur du fait de sa capacité à rendre visible l'expression génétique, l'enzyme luciférase elle-même, peut aussi être utilisée comme révélateur direct d'une réaction antigène anticorps.

### 3. La bioluminescence et la santé

#### 3.1. LuLISA un exemple de technologie diagnostique

L'Institut Pasteur associé à la fondation Roquette, travaille sur un projet qui consiste à développer une méthode d'analyse pour diagnostiquer rapidement les allergies alimentaires chez un médecin à partir d'une goutte de sang, et qui permettrait également de suivre la progression de l'immunité collective contre la Covid 19.

En fait, les chercheurs ont mis au point des tests sérologiques qui utilisent la luciférase associée à des nanocorps (ou « nanobodies »), les tests LuLISA - Luciferase-Linked Immunosorbent Assay, ce sont des tests beaucoup plus sensibles que les tests ELISA.

##### 3.1.1. Anticorps et nanocorps

Les anticorps sont synthétisés par les plasmocytes, cellules différenciées à partir des lymphocytes B après contact avec une molécule immunogène. La structure générale des anticorps a été décrite en 1959 par Porter à la suite des travaux d'Edelman. Ces deux chercheurs ont été associés pour le prix Nobel de décerné en 1972.

Pour un même antigène, les anticorps sont répartis en cinq classes présentées dans le **document 17**.

**Q29. Décrire** la structure commune à toutes les classes d'anticorps.

**Q30.** En vous appuyant sur le **documents 18**, **repérer** les structures montrant que les anticorps sont des protéines.

**Q31.** En vous aidant de la structure d'une IgG, **expliquer** la grande hétérogénéité des anticorps qui permet leur spécificité.

Les nanocorps ont été découverts à la fin des années 1980 dans le sérum des camélidés lors de la purification d'anticorps dans le cadre de l'épidémie du SIDA. Ils sont présents également chez les poissons cartilagineux et utilisés en tant que molécules thérapeutiques et outils de diagnostic.

**Q32. Analyser le document 19** pour **identifier** la différence majeure entre l'anticorps de camélidé et l'anticorps classique.

**Q33. Commenter** alors la structure du nanocorps présentée dans le **document 19**.

Le tableau du **document 20** présente les caractéristiques des différents anticorps existants.

**Q34. Repérer** les arguments pour utiliser des nanocorps plutôt que des anticorps monoclonaux en tant que molécules thérapeutiques.

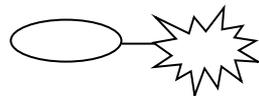
Les nanocorps trouvent également des applications dans des tests immunoenzymatiques tel que le test LuLISA

### 3.1.2. TEST LuLISA Luciferase-Linked Immunosorbent Assay : principe et applications

La recherche des allergènes se fait actuellement par des tests cutanés qui peuvent occasionner des risques irritants ou de surinfection. Pour pallier ces effets secondaires éventuels et pour mieux détecter les allergènes, le test LuLISA plus sensible que le test ELISA, a été mis au point.

Ce test d'immuno-adsorption détecte les IgE de patients allergiques grâce à des conjugués : nanocorps anti IgE liés à la luciférase. Ils qui reconnaissent la région constante C3 du domaine Fc l'IgE humaine. (**document 21**).

**Q35. Schématiser**, à l'aide des symboles suivants, le complexe immunoenzymatique, en entourant le site de reconnaissance épitope-paratope du complexe antigène anticorps ici réalisé.



Conjugué : nanocorps anti IgE couplé à la luciférase



IgE

Des expériences ont été réalisées pour mettre en évidence des performances du test LuLISA. Deux d'entre elles sont présentées et analysées ci-dessous.

#### Expérience 1

La procédure opératoire des tests LuLISA et ELISA pour doser les IgE dans une solution étalon d'albumine d'œuf (OVA) est présenté dans le **document 22**.

**Q36.** L'étape 2 de chaque procédure opératoire est identique. **Indiquer** son intérêt.

**Q37. Schématiser** l'édifice moléculaire obtenu pour le test ELISA en utilisant les symboles suivants :



support



antigène OVA



IgE anti OVA



Conjugué : anticorps anti globuline IgE couplé à la phosphatase alcaline (PAL)

PAL

Les résultats du dosage de chaque test sont présentés dans le **document 23**.

## **Expérience 2**

Trois types d'anti immunoglobulines IgE, IgG1 et IgG4 (sous-classes d'anticorps produits lors d'une immunothérapie à un allergène) vis à vis de l'allergène « *Der p 2* » d'acarien de la poussière ont été dosés par le LuLISA. Les résultats sont donnés dans le **document 24**.

**Q38. Analyser** les résultats de l'expérience 2 pour montrer la spécificité de la méthode mise en évidence.

**Q39.** En vous appuyant sur les **documents 23 à 25**, **montrer** en quoi le test LuLISA est performant pour détecter ou doser des anticorps.

Une dernière utilisation envisagée ici, concerne des tests de bioluminescence chez la souris pour mettre au point des thérapies contre certains cancers.

### **3.2. Utilisation de la bioluminescence in vivo pour la mise au point de bactéries « tueuses de tumeurs »**

Les bactéries possèdent la capacité naturelle de se multiplier préférentiellement à côté des tumeurs après une administration dans la circulation systémique, ce qui en fait des outils novateurs dans la stratégie anti-tumorale. En effet, suite à l'insertion de plasmides recombinants, ces bactéries peuvent coloniser des tumeurs et exprimer localement des protéines thérapeutiques.

La technologie BLI (bioluminescence imaging *in vivo*) permet d'observer la colonisation des tumeurs par des bactéries bioluminescentes chez des souris préalablement inoculées avec des cellules cancéreuses. L'emplacement et la concentration bactérienne dans les tumeurs au cours du temps peuvent être facilement appréciés.

**Q40.** À partir de du **document 26**, **réaliser** un logigramme des différentes étapes de la manipulation.

**Q41. Discuter** de la dimension éthique d'une telle manipulation.

La suspension de cellules tumorales nécessite un dénombrement dans le but d'injecter une quantité appropriée de cellule dans la circulation sanguine de la souris, les résultats du dénombrement sont indiqués dans le **document 27**.

**Q42. Calculer** la concentration en cellules totales de la suspension de cellules tumorales ainsi que le taux de viabilité à l'aide des équations, aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques.

Les résultats présentés dans le **document 28** de cette expérience sont obtenus selon deux méthodes :

- *ex vivo* par dénombrement des cellules viables récupérées sur les tumeurs de souris sacrifiées.
- *in vivo* grâce à la technologie BLI sur des souris anesthésiées

**Q43. Analyser** les résultats de cette étude pour **vérifier** que la bioluminescence permet de visualiser la concentration bactérienne au niveau des tumeurs des souris vivantes.

**Q44. Expliquer** l'intérêt de la localisation constatée des bactéries, sachant qu'on envisage de remplacer dans leur génome le gène de la luciférase par un gène provoquant la production d'une molécule cytotoxique.

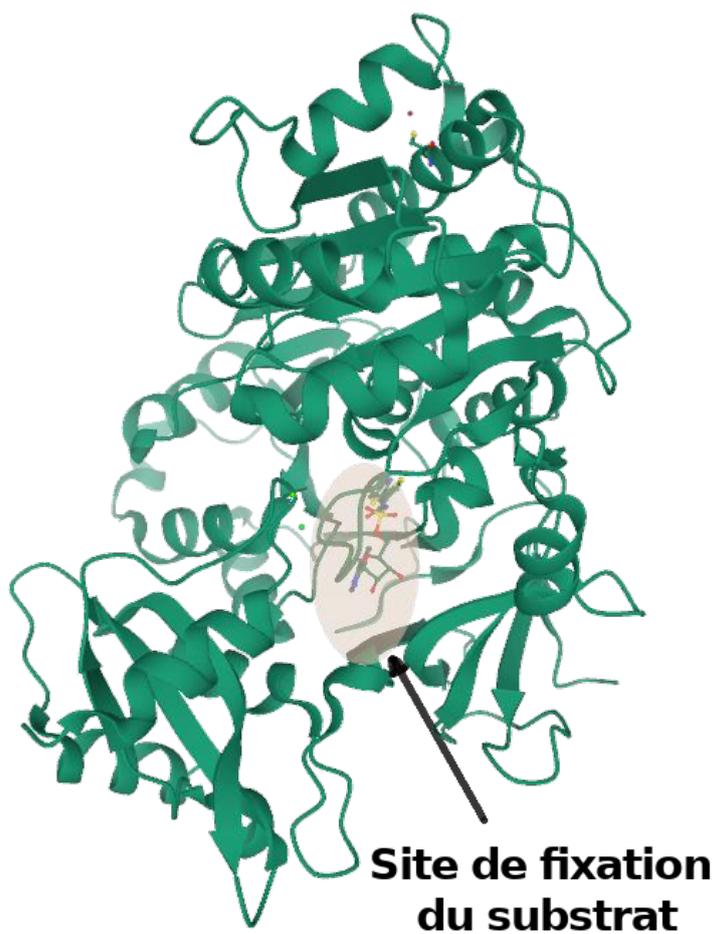
Les bactéries injectées dans la circulation sanguine de la souris se multiplient préférentiellement à proximité des cellules tumorales. Des études ont été réalisées pour comprendre l'échappement de ces microorganismes au système immunitaire et leur affinité pour les tissus tumoraux.

**Q45.** À partir des **documents 29 et 30**, **décrire** les caractéristiques du microenvironnement qui autorisent la multiplication des bactéries aéro-anaérobie facultatives proche des tumeurs.

**Q46.** En vous appuyant sur vos réponses précédentes, **argumenter** sur la possibilité d'utiliser *E. coli* comme outil thérapeutique dans une stratégie anticancéreuse.

**Document 1 : Structure cristalline de la luciférase de luciole**

Source : <https://www.rcsb.org/3d-view/2D1S/1>

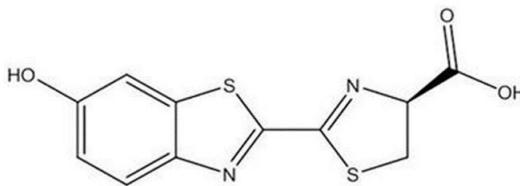


## Document 2 : Diversité des réactions catalysées par la luciférase en fonction des organismes

Source : d'après <http://bioluminescence.free.fr/geneluc.htm>

Bioluminescence	Reaction		
<b>Bacterial</b>	Aldehyde + FMNH <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>	Luciferase → dimeric 80kDa	Carboxylate + FMN + Light
<b>Firefly</b>	Luciferin + ATP + Mg <sup>2+</sup> + O <sub>2</sub>	Luciferase → monomeric 61kDa	Oxyluciferin + AMP + PPi + CO <sub>2</sub> + Light
<b>Renilla</b>	Coelenterazine + O <sub>2</sub>	Luciferase → monomeric 36kDa	Coelenteramide + CO <sub>2</sub> + Light

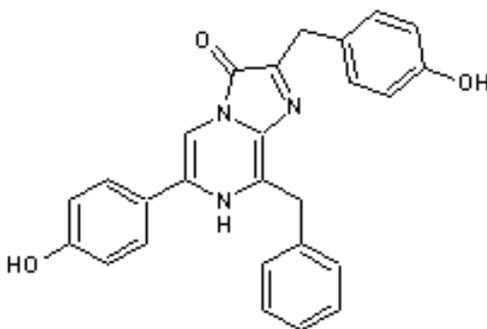
FMN : Flavine mononucleotide (ou riboflavine 5'-phosphate)



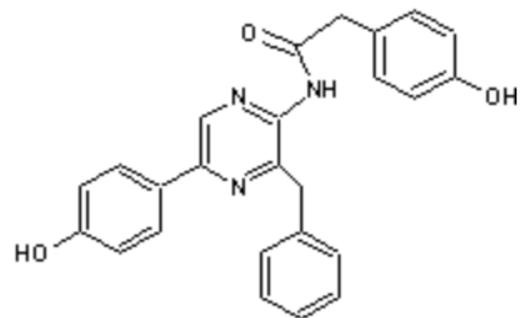
D-luciferin



Oxyluciférine



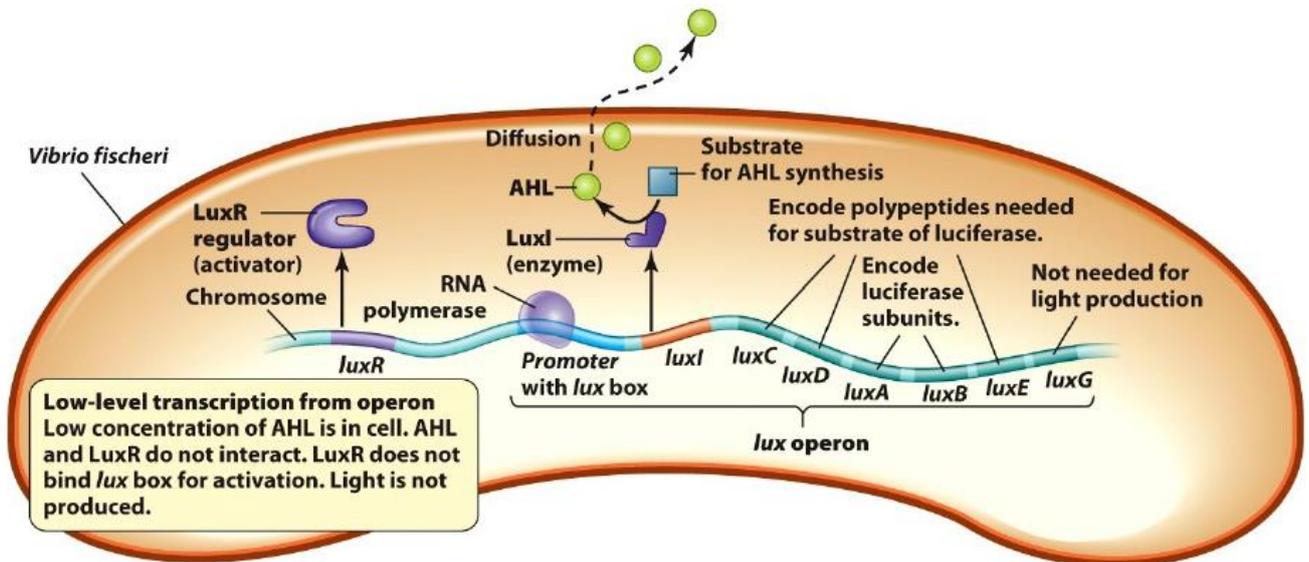
Coelentérazine



Coelentéramide

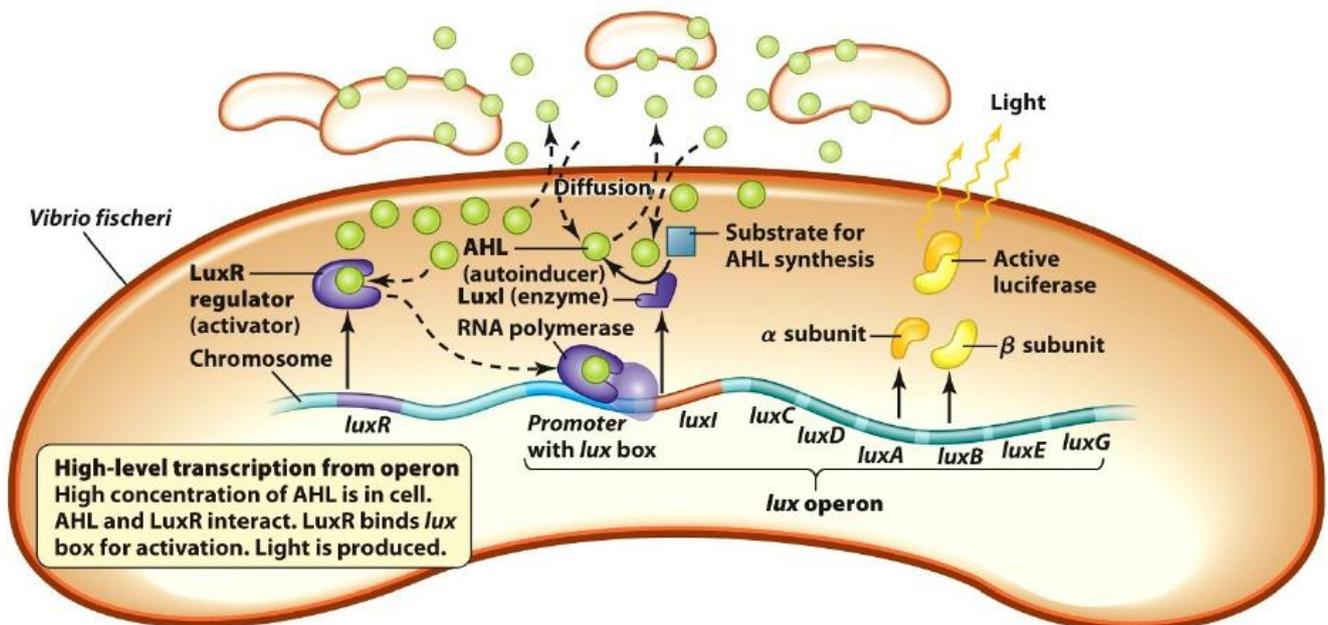
### Document 3 : Organisation et régulation de l'opéron Lux chez *V.fischeri*

L'auto-induction dans le système *lux* de *V. fischeri* est régulée par deux gènes *lux R* et *lux I*. Le *lux I* code pour une AI synthase. Chez *V. fischeri*, l'auto-inducteur (AI) est la N-acétyl homosérine lactone (AHL).



Low population density; low concentration of AHL

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

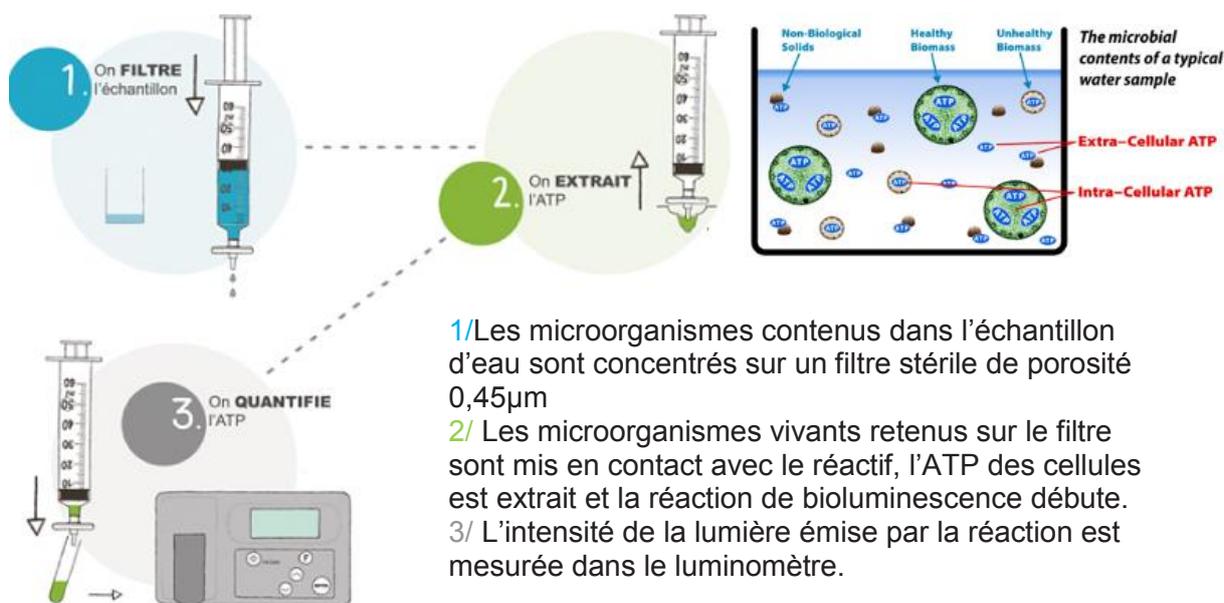


High population density; high concentration of AHL

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

## Document 4 : Principe d'un dosage ATPmétrique 2G sur un échantillon d'eau

Source : [http://www.aqua-tools.com/textes/Application\\_Note\\_Finale\\_Chimie.pdf](http://www.aqua-tools.com/textes/Application_Note_Finale_Chimie.pdf)



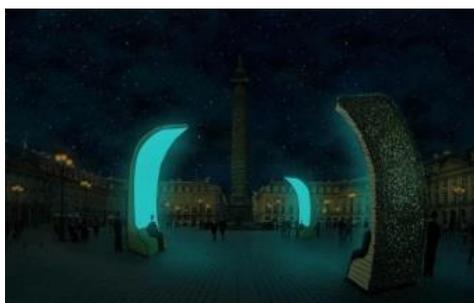
Contenu du kit QGO-M™	
Luminase	Enzyme Luciférase + Luciférine
UltraCheck 1	Ing/ml Standard d'ATP
LumiClean	Réactif de nettoyage du filtre
UltraLyse 7 <sup>21</sup>	Agent d'extraction de l'ATP
UltraLute	Tampon de dilution de l'ATP

Ce kit mesure en quelques minutes, l'activité microbologique totale par une simple analyse et prévient tout processus d'une détérioration, de l'optimisation d'une maintenance et d'une intervention pour régler un programme de désinfection. **Le kit QGO-M™ possède une gamme de quantification allant de 4 à 2x10<sup>6</sup>pg ATP/mL.**

Le kit Quench-Gone Modified (QGO-M™) contient tous les réactifs nécessaires à effectuer l'analyse de 100 échantillons.

## Document 5 : Panel de projets d'éclairages bioluminescents

**1 Une start-up française, Glowee**, a introduit six gènes venus d'un calmar abyssal dans la bactérie *Escherichia coli*. Quand l'arabinose est abondant dans le milieu, les protéines bioluminescentes sont produites et la bactérie s'allume... La lumière, une fois émise, se maintient jusqu'à l'épuisement des cultures bactériennes, selon une durée très variable. « L'éclairage peut durer plusieurs heures, voire plusieurs jours, selon le milieu et la température. » La lumière est bleue.



Jusqu'ici, les dispositifs lumineux créés étaient installés dans des espaces clos, avec une durée de vie limitée. Glowee a par exemple mis au point la Glowzen Room, une salle de relaxation. Glowee teste actuellement le transfert de sa technologie en extérieur, sur du mobilier urbain contenant les bactéries, en partenariat avec la ville de Rambouillet.

### 2/ **Projet biolight de Philips**

Cet éclairage autonome est écologique car il ne nécessite pas d'électricité pour produire de la lumière. Il utilise des bactéries bioluminescentes qui se nourrissent de méthane et de matières compostées générées par la vie quotidienne de la maison.

Telle une œuvre d'art, Bio-light se présente sous différentes formes (cellules de verres soufflées maintenues par un cadre en acier. Contenant des cultures bactériennes ou cellules de verres reliées ensemble par des tubes de silicium qui rejoignent la base de la lampe qui est un réservoir de nourriture pour les bactéries).



**3/ L'entreprise néerlandaise Bioglow** commercialise pour sa part des bouteilles contenant des algues naturellement bioluminescentes, qui s'éclairent lorsqu'elles sont secouées, après le coucher du soleil. Elles peuvent survivre plusieurs mois et nécessitent un entretien similaire à celui d'une plante d'intérieur.

**4/ Une start-up strasbourgeoise Woodlight** a transféré la capacité à produire de la lumière chez des plantes, les rendant ainsi bioluminescentes. Elle utilise pour cela des bactéries génétiquement modifiées.

L'entreprise présente ainsi son projet d'éclairage urbain : réaction naturelle, la bioluminescence ne nécessite aucun apport lumineux ou électrique. Cette lumière douce et diffuse diminuera la pollution lumineuse. Ces plantes pourront vivre aussi longtemps que des plantes normales. Acclimatées à différents environnements, elles offriront un panel de possibilités presque infini sur le design de notre produit. Elles seront non fertiles et dépendantes d'un milieu de croissance spécifique évitant ainsi leur diffusion dans l'environnement.



## Document 6 : Cultures bactériennes et végétales

### 1/ Culture de bactéries

Ensemencer les bactéries dans le milieu liquide dont la composition est fournie.  
Incuber en étuve entre 30 et 37°C en normoxie pendant 18h.

#### Composition du milieu pour bactéries

Milieu trypticase soja

Hydrolysate tryptique de caséine	17,0 g·L <sup>-1</sup>
Peptone de soja	3,0 g·L <sup>-1</sup>
Chlorure de sodium	5,0 g·L <sup>-1</sup>
Phosphate dipotassique	2,5 g·L <sup>-1</sup>
Glucose	2,5 g·L <sup>-1</sup>
Eau	QSP 1L
pH 7,3 ± 0,2 à 25°C	

### 2/ Culture d'explants végétaux

Transférer les explants prélevés dans le milieu gélosé dont la composition est fournie.  
Incuber à 20-25 °C, en atmosphère humide et normoxie, avec une alternance jour/nuit de 16 h/8 h pendant quelques semaines.  
Quand le plant est suffisamment vigoureux, le transférer dans du terreau en serre d'acclimatation.

#### Composition du milieu pour Arabidopsis

Milieu de Murashige et skoog  
(solution de macroéléments et microéléments) :

à utiliser, dilué au demi dans de l'eau, solvant du milieu.

Nitrate d'ammonium (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1.650 mg·L <sup>-1</sup>
Acide borique (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6,2 mg·L <sup>-1</sup>
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	440 mg·L <sup>-1</sup>
Chlorure de cobalt (CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O)	0,025 mg·L <sup>-1</sup>
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	370 mg·L <sup>-1</sup>
Sulfate de cuivre (CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O)	0,025 mg·L <sup>-1</sup>
Phosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170 mg·L <sup>-1</sup>
Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	27,8 mg·L <sup>-1</sup>
Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> )	1.900 mg·L <sup>-1</sup>
Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O)	22,3 mg·L <sup>-1</sup>
Iodure de potassium (KI)	0,83 mg·L <sup>-1</sup>
Molybdate de sodium (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	0,25 mg·L <sup>-1</sup>
Sulfate de zinc (ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	8,6 mg·L <sup>-1</sup>
EDTA (Na <sub>2</sub> EDTA, 2H <sub>2</sub> O)	37,2 mg·L <sup>-1</sup>



Ajouts d'additifs :

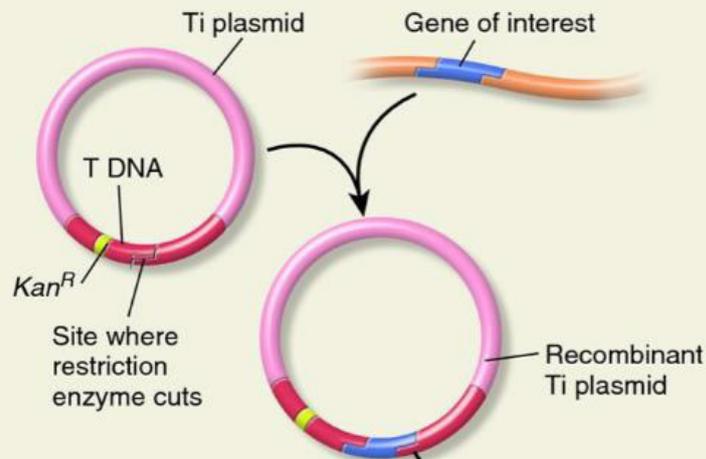
- Vitamines :

i-Inositol	100 mg·L <sup>-1</sup>
Acide nicotinique	0,5 mg·L <sup>-1</sup>
Pyridoxine / HCl	0,5 mg·L <sup>-1</sup>
Thiamine / HCl	0,1 mg·L <sup>-1</sup>

- Glycine à	1 g·L <sup>-1</sup>
- Saccharose à	20 g·L <sup>-1</sup>
- Phytohormones (ex : auxines à	1 g·L <sup>-1</sup> )
- Agar à	7g·L <sup>-1</sup>

**Document 7 : Principales étapes de la transformation d'une plante par *Agrobacterium tumefaciens***

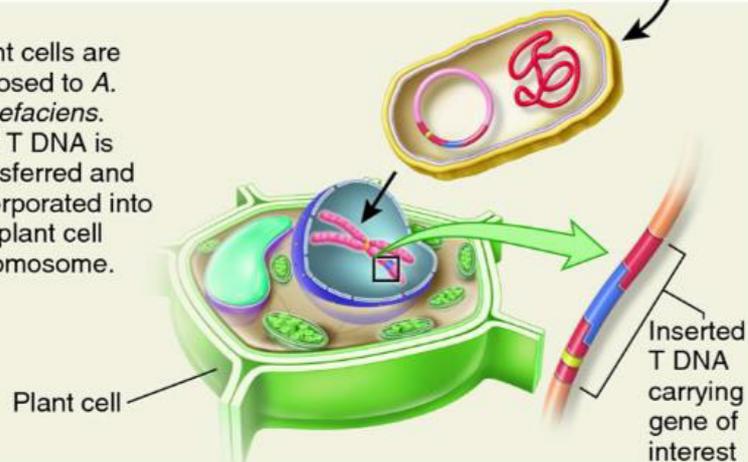
- 1** Gene of interest is inserted into the T DNA of the Ti plasmid.



- 2** The recombinant Ti plasmid is transformed into *A. tumefaciens*.



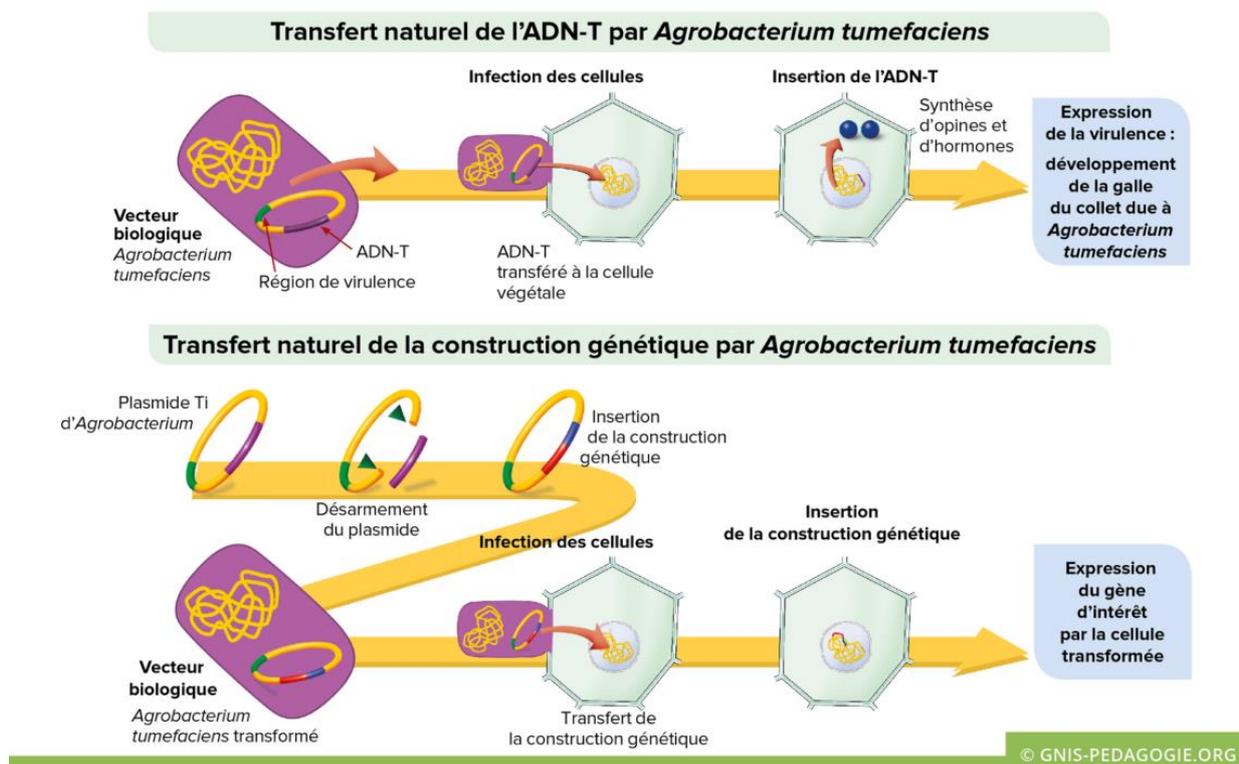
- 3** Plant cells are exposed to *A. tumefaciens*. The T DNA is transferred and incorporated into the plant cell chromosome.



- 4** The plant cells are placed in a medium containing kanamycin and carbenicillin. Kanamycin kills plant cells that have not taken up T DNA. Carbenicillin kills *A. tumefaciens*. The surviving plant cells are transferred to growth media that has plant hormones necessary for regenerating an entire plant.



## Document 8 : Infection des cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens* induisant une tumeur



## Document 9 : Production de végétaux auto-luminescents

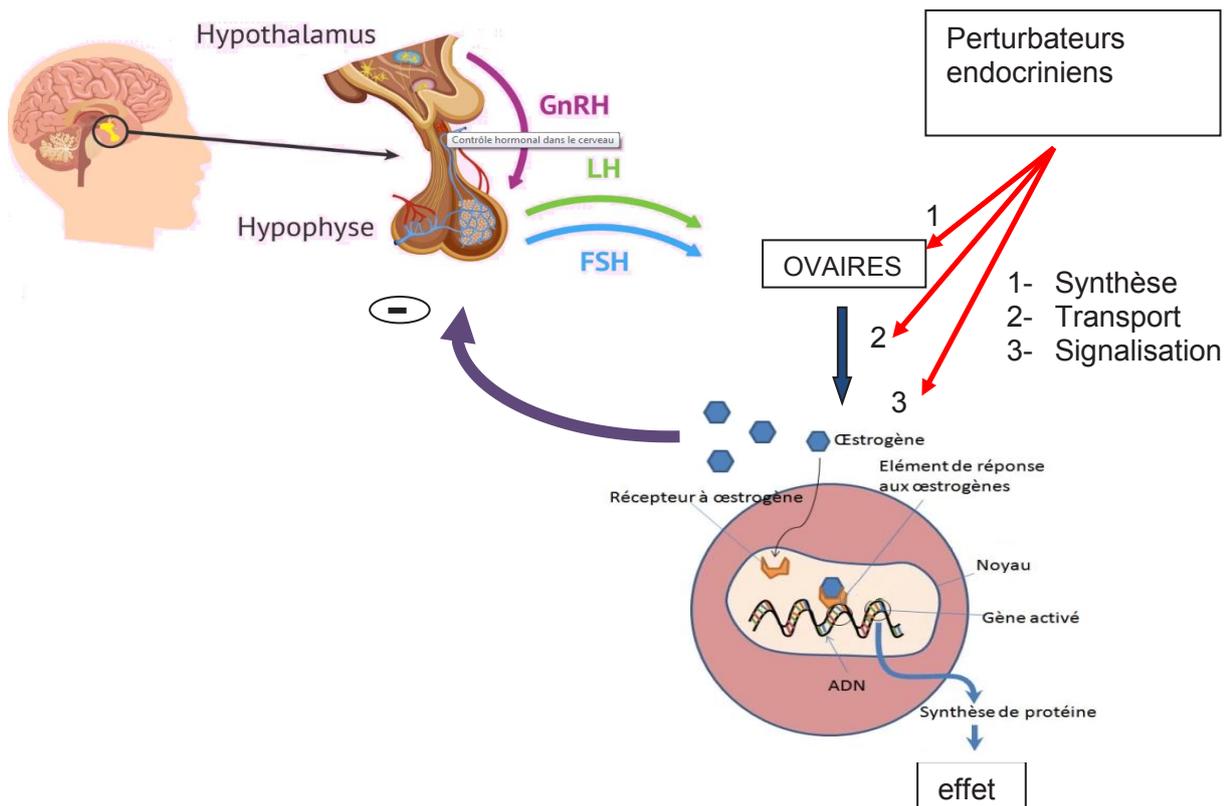
Source : D'après « <https://trustmyscience.com/plantes-auto-luminescentes-toute-leur-vie/> »



Les champignons bioluminescents utilisés synthétisent la luciférine à partir d'un composé appelé acide caféique. Ce dernier est exploité par quatre enzymes : deux enzymes le transforment en un précurseur luminescent, une troisième oxyde ce précurseur pour produire un photon et enfin, la quatrième enzyme régénère la molécule d'acide caféique, qui peut alors être recyclé dans le même processus.

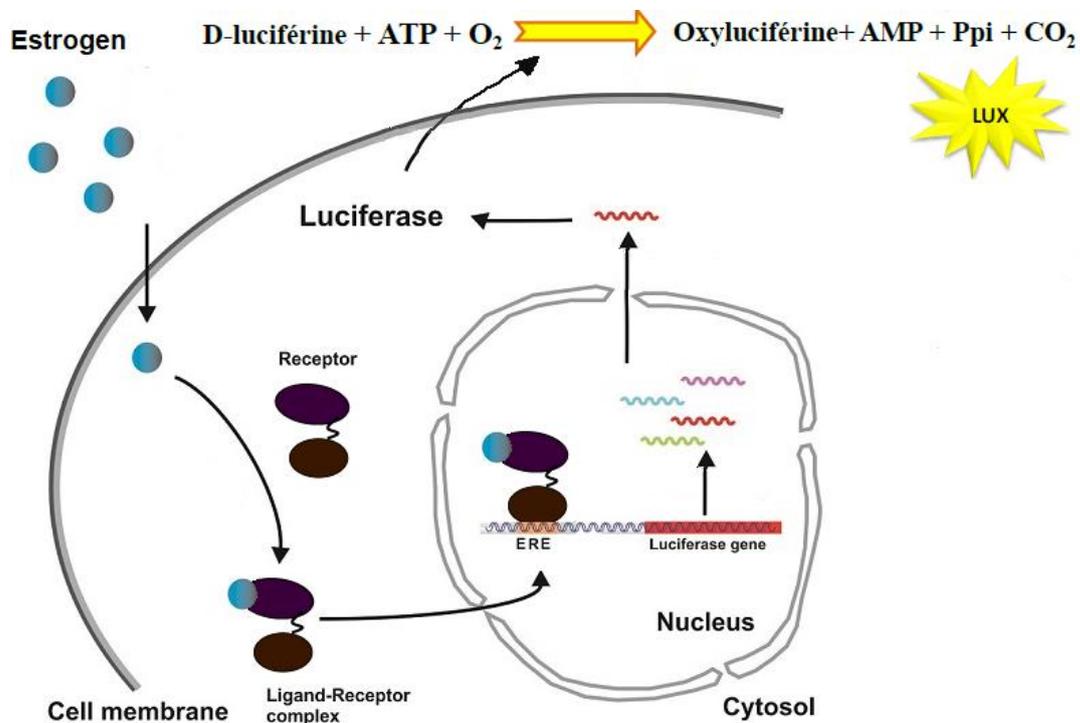
Or, l'acide caféique est également un composé organique clé dans la biosynthèse de la lignine, une molécule de la paroi cellulaire, qui apporte résistance et rigidité dans les végétaux. L'équipe de recherche a donc pensé qu'il pourrait être possible de modifier génétiquement les plantes pour réaffecter une partie de leur acide caféique à la biosynthèse de la luciférine, comme c'est le cas naturellement pour les champignons bioluminescents. Ils ont alors modifié leurs plants de tabac avec quatre gènes fongiques associés à la bioluminescence, laissé croître leurs plants sans aucun ajout de substrat exogène. Au cours de leur développement, ils ont constaté que les plantes brillaient d'une lumière visible à l'œil nu, du semis à la maturité et ce, sans aucun impact apparent sur la santé des plantes : « *Le phénotype global, la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes, la période de floraison et la germination des graines ne différaient pas du tabac de type sauvage dans la serre, à l'exception d'une augmentation de 12% de la hauteur médiane des plantes transgéniques* », ont précisé les chercheurs dans leur rapport.

**Document 10 : L'axe œstrogénique « in vivo » et ses perturbateurs endocriniens**



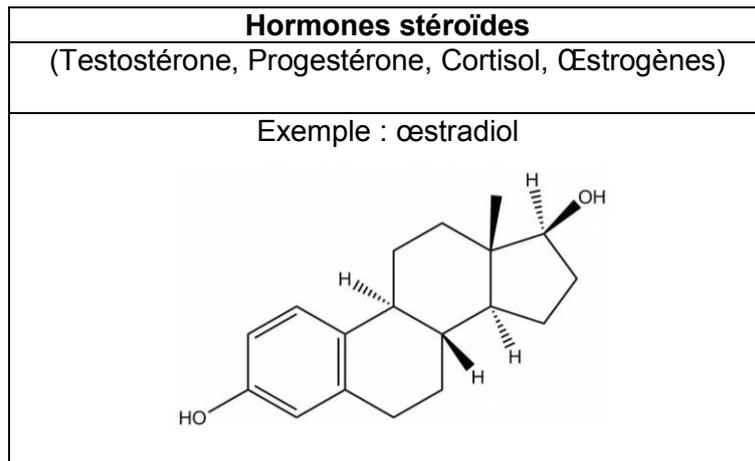
Source : inspirée de <https://www.invitro.com/fr/hormones-sexuelles>

**Document 11 : Principe de l'utilisation d'un gène rapporteur de la luciférase dans des lignées cellulaires humaines transformées**



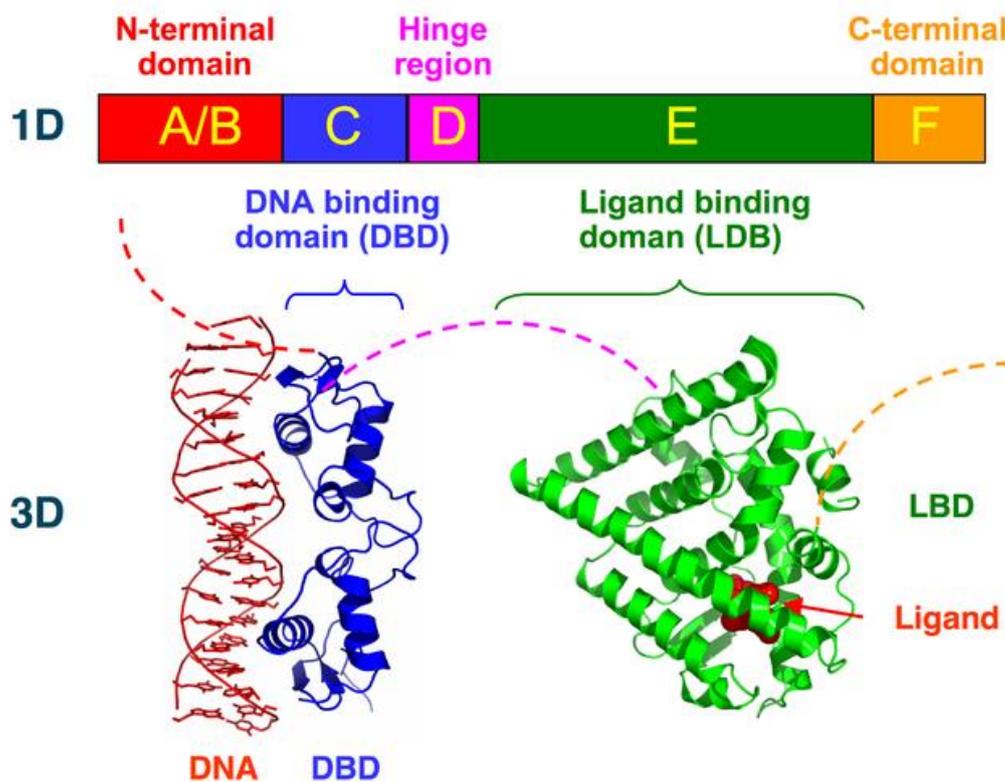
Source : inspiré de la revue bibliographique « validation de la mesure de l'activité œstrogénique dans les matrices environnementales » S.Aït-Aïssa, N.Creusot déc 2015

**Document 12 : Structure moléculaire d'une hormone stéroïdienne**



Source Wikipédia

**Document 13 : Organisation structurale et fonctionnelle de l'isotype  $\alpha$  du récepteur aux œstrogènes humain.**



Les pointillés représentent une séquence d'acides aminés non détaillée dans cette représentation.

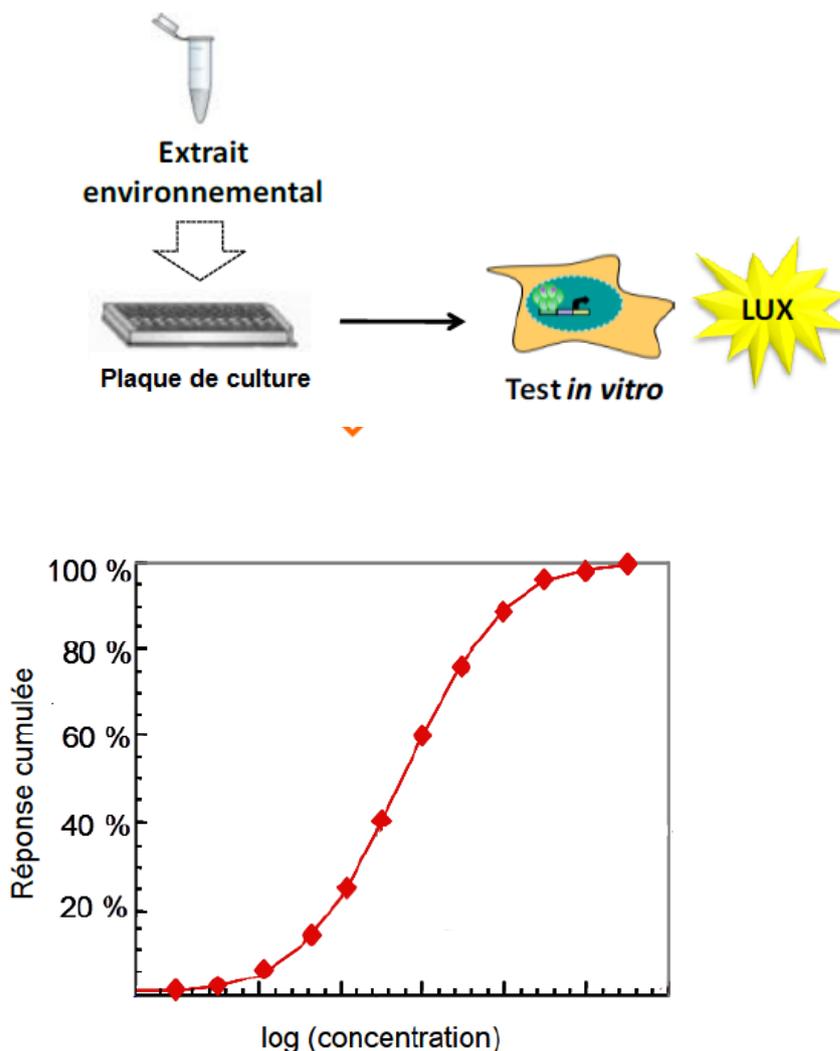
Source Wikipédia

**Document 14 : Avantages et limites des Biotests testés pour la détection d'œstrogènes**

Modèle cellulaire	Exemple de bioessais	Types cellulaire	Avantages	Limites
Cellules humaines	Hela 993	Hela	Simple Spécifique Sensible Convient à la détection de nombreux toxiques	Réponse artificielle Investissement matériel
	ER-CALUX	T47D		

Source : inspiré de la revue bibliographique « validation de la mesure de l'activité œstrogénique dans les matrices environnementales » S.Aït-Aïssa, N.Creusot déc 2015

**Document 15 : Principe d'obtention d'une courbe dose-réponse**



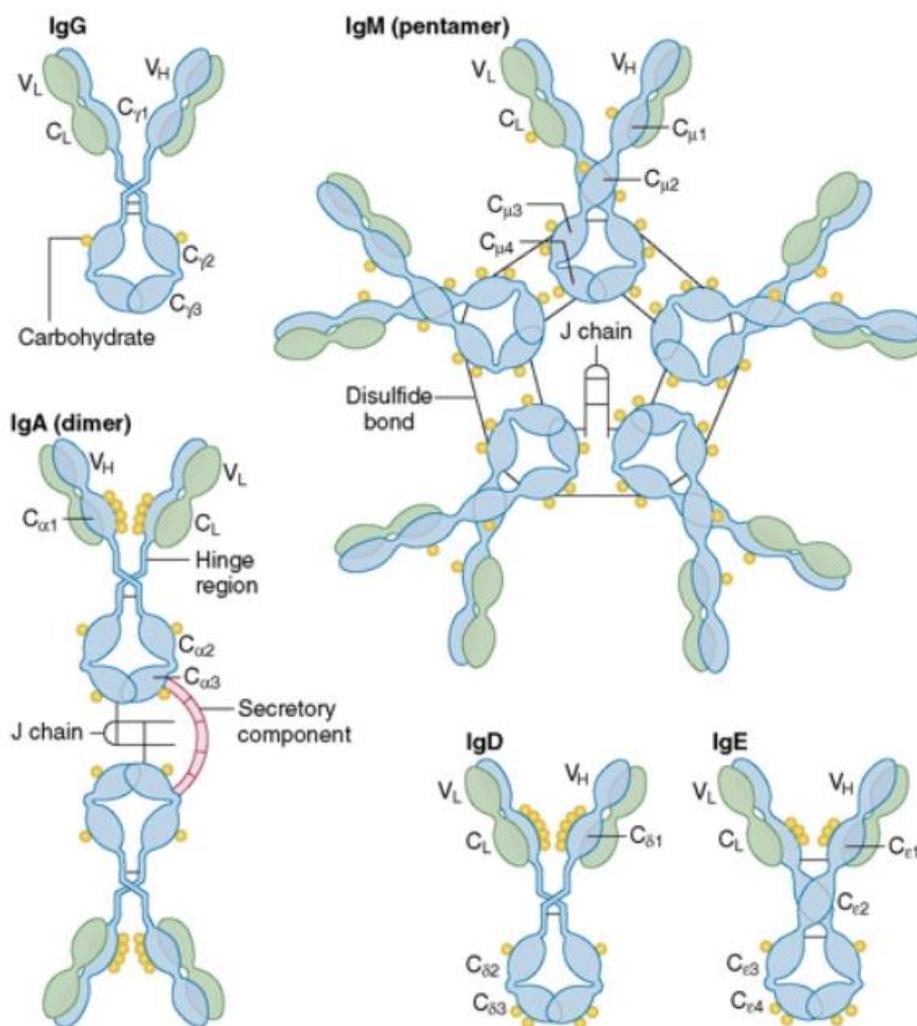
Source : inspiré de la revue bibliographique « validation de la mesure de l'activité œstrogénique dans les matrices environnementales » S.Aït-Aïssa, N.Creusot déc 2015

**Document 16 : Valeur d'EC<sub>50</sub> des oestrogènes testés dans deux lignées cellulaires**

Substances	EC <sub>50</sub> Hela 993	EC <sub>50</sub> ER-CALUX
oestradiol	0,006 nM	0,0025 nM
ethinyl- oestradiol	0,006 nM	0,0002 nM

Source : inspiré de la revue bibliographique « validation de la mesure de l'activité œstrogénique dans les matrices environnementales » S.Aït-Aïssa, N.Creusot déc 2015

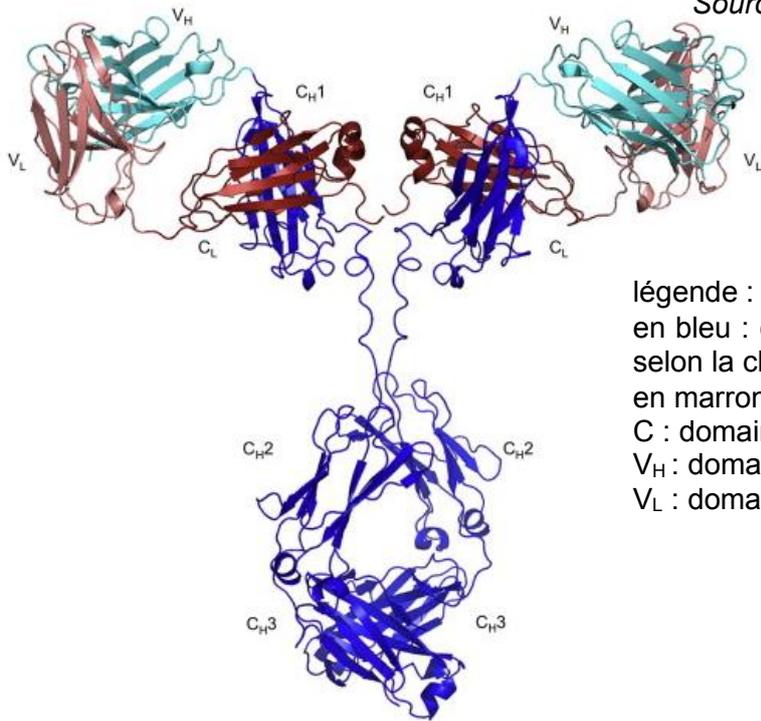
**Document 17 : Modélisation des différentes classes d'anticorps**



Source : J. Actor (2013)

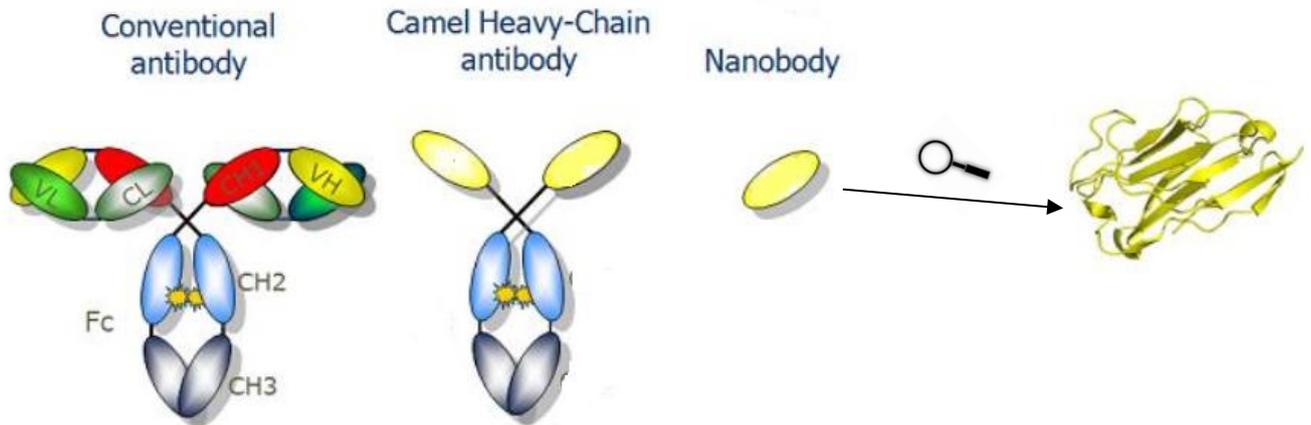
**Document 18 : Conformation tridimensionnelle d'un anticorps**

Source : <https://www.sciencedirect.com>



légende :  
en bleu : chaîne heavy (H)  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ou  $\mu$   
selon la classe d'immunoglobuline  
en marron : chaîne légère (L)  $\mu$  ou  $\lambda$   
C : domaine constant  
V<sub>H</sub> : domaine variable de la chaîne lourde  
V<sub>L</sub> : domaine variable de chaîne légère

**Document 19 Présentation de structures comparées d'un anticorps classique, d'un anticorps présents dans le sérum d'un chameau et d'un nanocorps.**



Source : *Nanobody-aided crystallography*

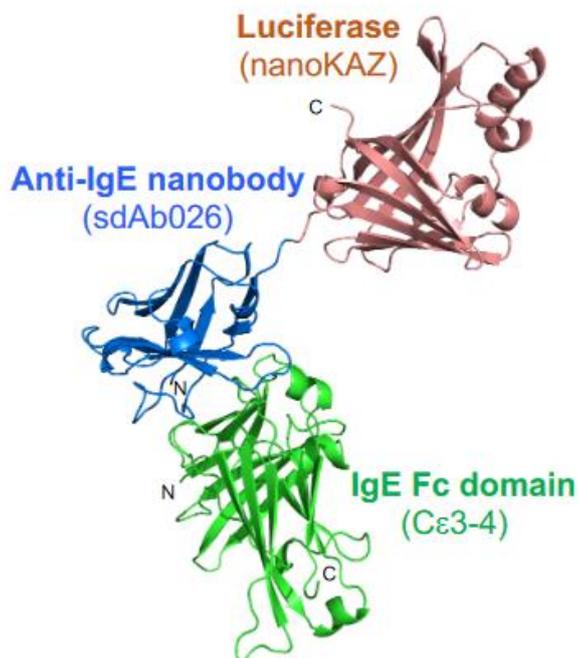
**Document 20 : Caractéristiques des anticorps monoclonaux et des nanocorps**

	<b>anticorps monoclonal</b>	<b>Nanocorps (VH)</b>
<b>taille</b>	150 kDa	15 kDa
<b>Pénétration dans les tissus</b>		x
<b>fixation dans les petites cavités</b>		x
<b>haute affinité</b>		x
<b>haute spécificité</b>	x	x
<b>haute reproductibilité lot à lot</b>	x	x
<b>stabilité au pH et à la température</b>		x
<b>détection quantitative de la cible</b>	x	x
<b>limitation des coûts pour une production à grande échelle</b>		x
<b>mode de production</b>	immunisation des animaux hybridomes	bactéries Escherichia coli
<b>immunogénicité</b>	importante	faible

source : d'après un document modifié interchim " anticorps à domaine unique VH "

**Document 21 : Complexe immuno enzymatique obtenu lors de la détection d'IgE par la méthode LuLISA**

source : doi : 10.1111/ALL.14365



## **Document 22 : Procédure opératoire des tests LuLISA et ELISA**

### **Test LuLISA**

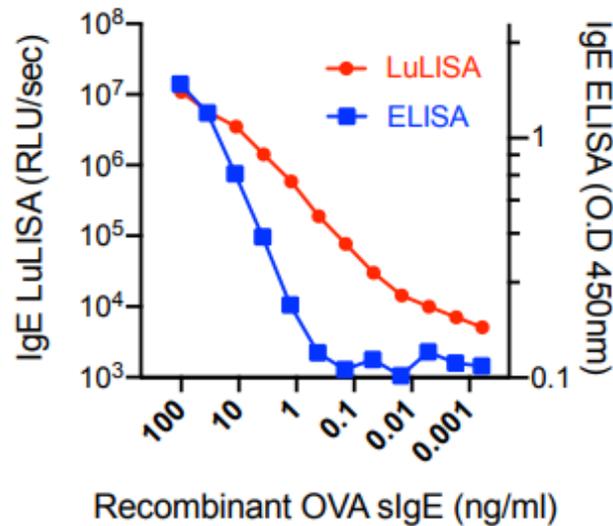
- Étape 1 : Distribuer 50 µL d'OVA à 10 µg/mL dans des puits à fond plat d'une plaque de microtitration
- Laisser 2 heures à température ambiante.
- Vider les puits
- **Étape 2 : Ajouter de l'albumine de sérum bovin à 100 µg/mL dans du PBS**
- Laisser agir 1 heure à température ambiante.
- Laver quatre fois chaque puits avec 100 µL de PBS/Tween 20 à 0,1 %.
- Ajouter 50 µL de dilution de l'étalon IgE anti OVA en PBS
- Incuber 1 heure à température ambiante
- Laver quatre fois les puits avec 100 µL de PBS/Tween 20 à 0,1 %.
- Ajouter 50 µL de conjugué anti IgE - luciférase
- Incuber 30 min à température ambiante.
- Laver les puits quatre fois avec 100 µL de PBS/Tween 20 0,1%.
- Ajouter 50 µL de furimazine
- Agiter sur agitateur de plaque pendant 5 secondes
- Mesurer la quantité de photons émis pendant 1 seconde grâce au luminomètre, trois fois

### **Test ELISA**

- Distribuer 50 µL d'OVA à 10 µg/mL dans des puits à fond plat d'une plaque de microtitration.
- Laisser 2 heures à température ambiante.
  - o Vider les puits
- **Étape 2 : Ajouter de l'albumine de sérum bovin à 100 µg/mL dans du PBS**
- Laisser agir 1 heure à température ambiante.
- Laver quatre fois chaque puits avec 100 µL de PBS/Tween 20 à 0,1 %.
- Ajouter 50 µL de dilution d'étalon IgE anti OVA en PBS
- Incuber 1 heure à température ambiante
- Laver quatre fois les puits avec 100 µL de PBS/Tween 20 à 0,1 %.
- Ajouter 50 µL d'IgG de chèvre anti-IgE OVA conjugués avec de la phosphatase alcaline
- Incuber 1h à température ambiante.
- Laver les puits quatre fois avec 100 µL de PBS/Tween 20 0,1 %.
- Ajouter 50 µL de substrat pNPP à 1 mg/mL
- Incuber pendant 3 h à température ambiante ou pendant la nuit à 4 °C.
- Lire l'absorbance du pNP formé à 405 nm avec un spectrophotomètre

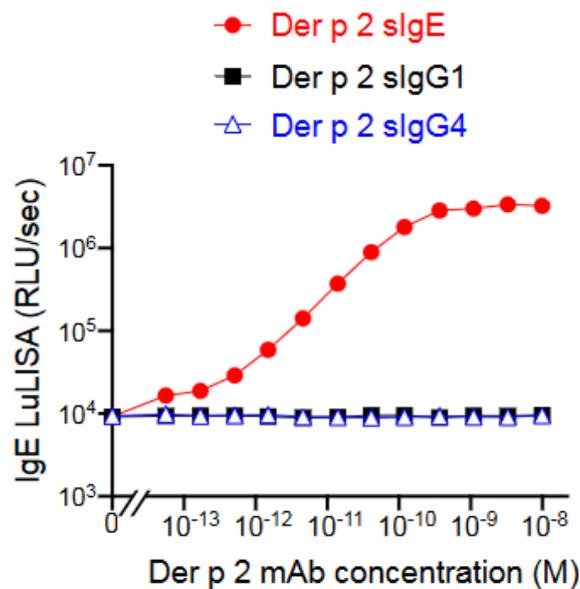
*extrait du projet LuLISA de l'Institut Pasteur DOI:10.1111/all.14365.*

## Document 23 : Résultats des dosages d'IgE par les tests ELISA et LuLISA



extrait du projet LuLISA de l'Institut Pasteur DOI:10.1111/all.14365.

## Document 24 : Dosage d'anticorps anti-allergène « Der p 2 »



extrait du projet LuLISA de l'Institut Pasteur DOI:10.1111/all.14365.

## Document 25 : Amélioration du test

Les nanocorps renforcent la sensibilité du test en augmentant leur affinité pour la protéine cible. La chercheuse Dr Sophie Goyard de l'Institut Pasteur a augmenté par mutagenèse, l'activité de la luciférase par 10, a diminué de moitié son adsorption ce qui a permis d'améliorer de 20 fois le ratio sur le bruit.

Le test LuLISA permet de travailler sur des volumes de sérum faible de l'ordre du microlitre alors que le test ELISA demande un volume plus important.

## **Document 26 : Détection de la bioluminescence bactérienne *in vivo***

D'après le protocole <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3578263/>

### **1 / Induction de la tumeur**

Des cellules tumorales sont cultivées *in vitro*, la concentration en cellule de la suspension obtenue et la viabilité des cellules sont déterminées à l'aide d'une cytomètre de Malassez et d'un colorant d'exclusion, le bleu trypan.

Les cellules tumorales en suspension dans 200  $\mu\text{L}$  de milieu de culture sont injectées par voie sous-cutanée dans le flanc des souris.

### **2. Préparation bactérienne**

La souche bactérienne utilisée dans ce protocole est *E. coli* K-12 MG1655. Elle contient un plasmide recombinant portant l'opéron luxABCDE qui sert de système de détection.

Les bactéries sont incubées dans un milieu LB (milieu qui permet le maintien en vie et la culture de lignées recombinantes d'*E. coli*) à 37 °C.

La culture est centrifugée à 6 000  $\times$  g pendant 5 min puis lavée et diluée dans du PBS. La concentration de la suspension obtenue est de  $10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

### **3. Inoculation de la suspension bactérienne**

Les souris sont réparties au hasard en groupes expérimentaux lorsque les tumeurs atteignent un volume d'environ 100 mm<sup>3</sup>.

Une injection de  $10^6$  bactéries est réalisée au niveau de la veine latérale de la queue.

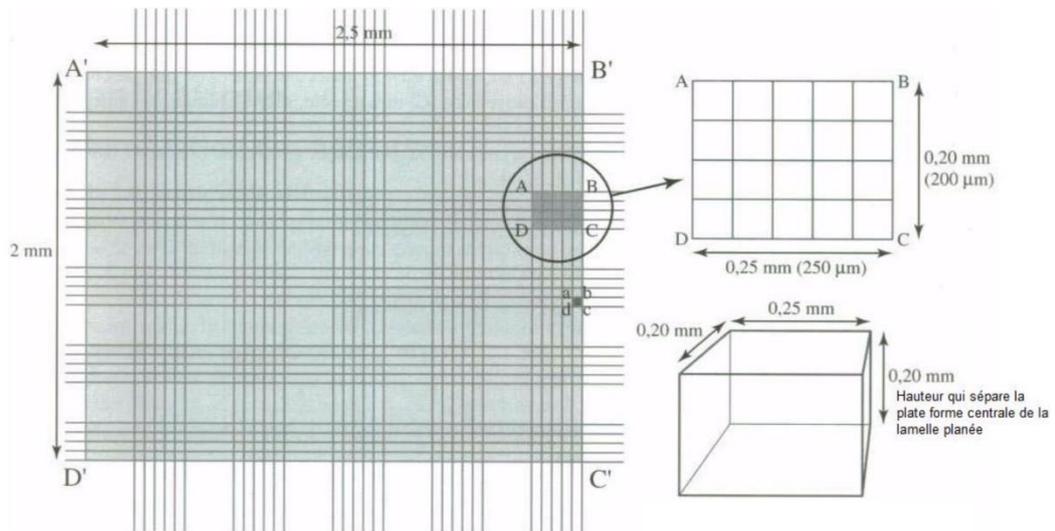
### **Imagerie par BioLuminescence et dénombrement bactérien**

Le développement de la tumeur et la croissance bactérienne (*in vivo* et *ex vivo*) sont contrôlés deux fois par semaine.

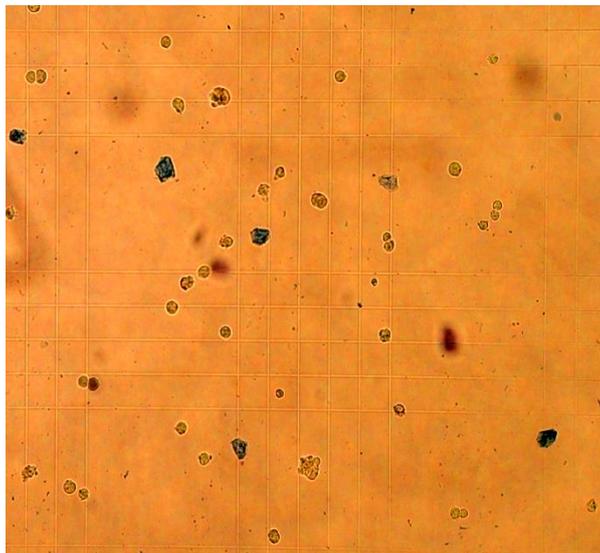
L'imagerie BLI en 2D est réalisée à l'aide de l'IVIS100 (Caliper) sur les souris anesthésiées.

## Document 27 : Résultats du dénombrement en cellule de malassez

La suspension de cellules tumorales obtenue a été diluée (volume/volume) dans un colorant d'exclusion, le bleu trypan.



Le quadrillage complet A'B'C'D' comporte **100 rectangles ABCD (10x10)**.  
Chaque rectangle ABCD surmonté de la lamelle formera une unité de comptage d'un volume



Observation microscopique d'une suspension cellulaire après coloration au bleu trypan  
Grossissement X 100

### Résultats du dénombrement :

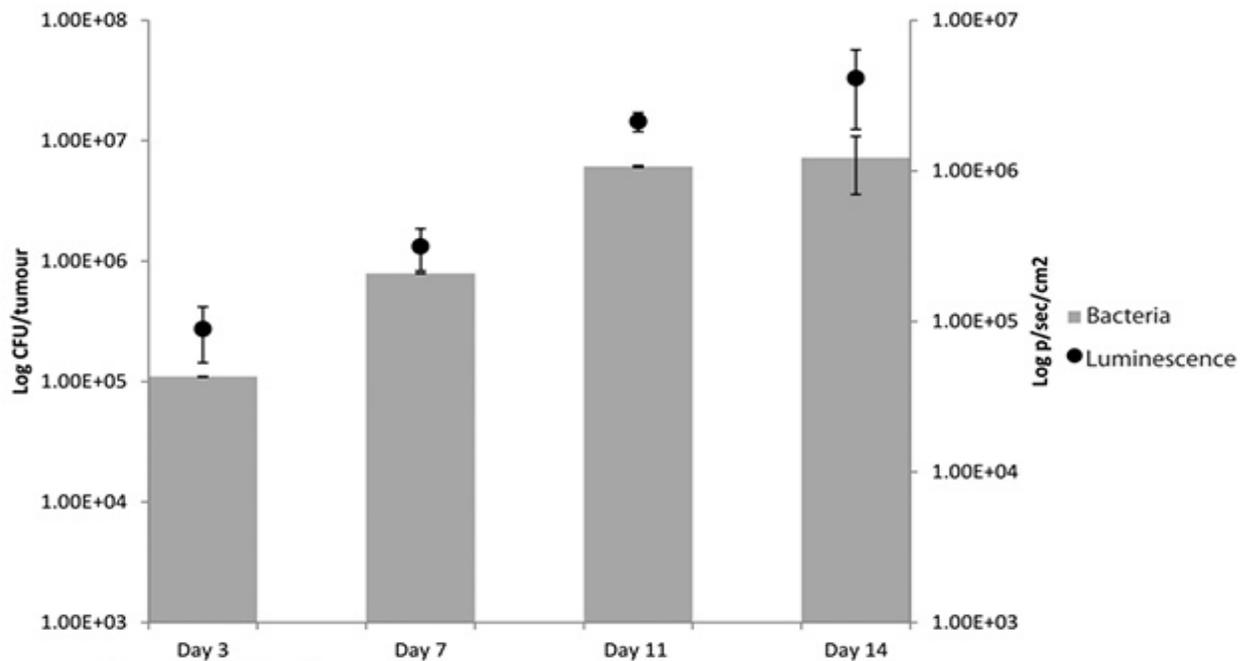
- Cellules incolores : 225
- Cellules bleues : 8
- Nombre de rectangles compté : 45

**Document 28 : Présentation des résultats expérimentaux pour la localisation de bactéries bioluminescentes au niveau de tumeurs chez la souris.**

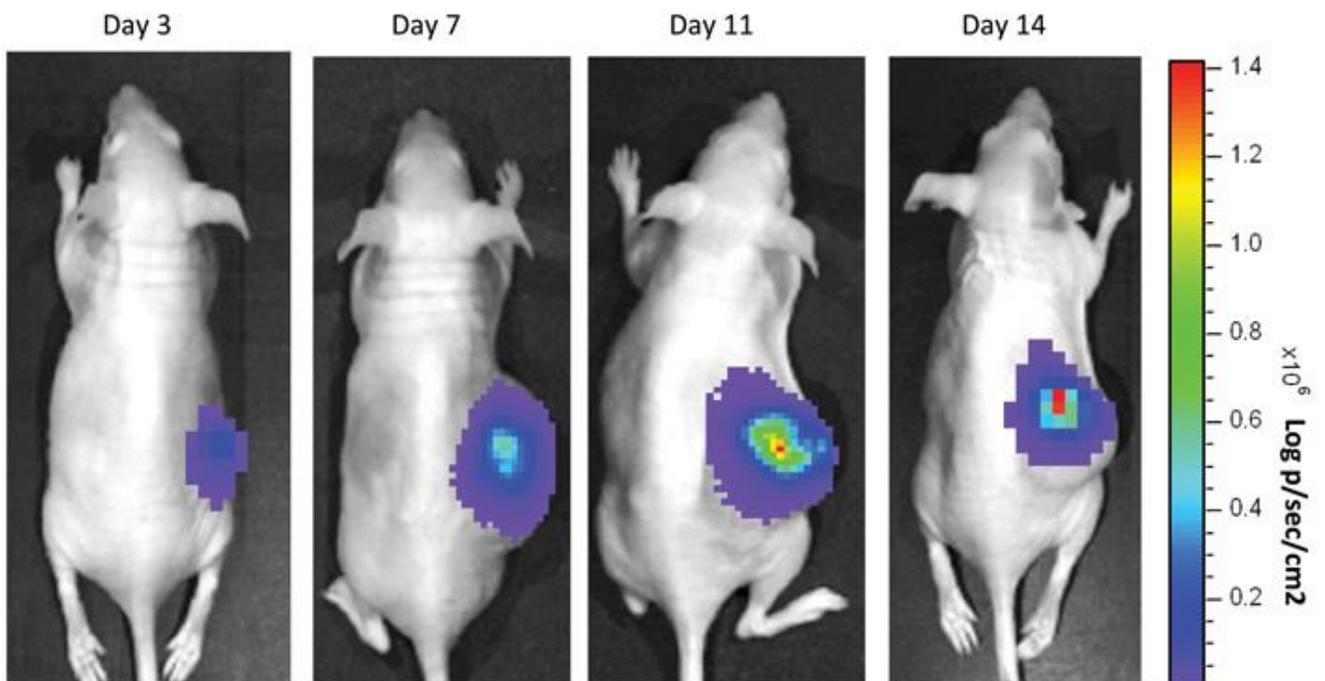
Source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3578263/>

Le dénombrement des bactéries viables sur des souris sacrifiées (histogramme en A) et l'intensité de la lumière émise sur des souris vivantes (points en A, et B) sont mesurées à 3, 7, 11 et 14 jours.

A

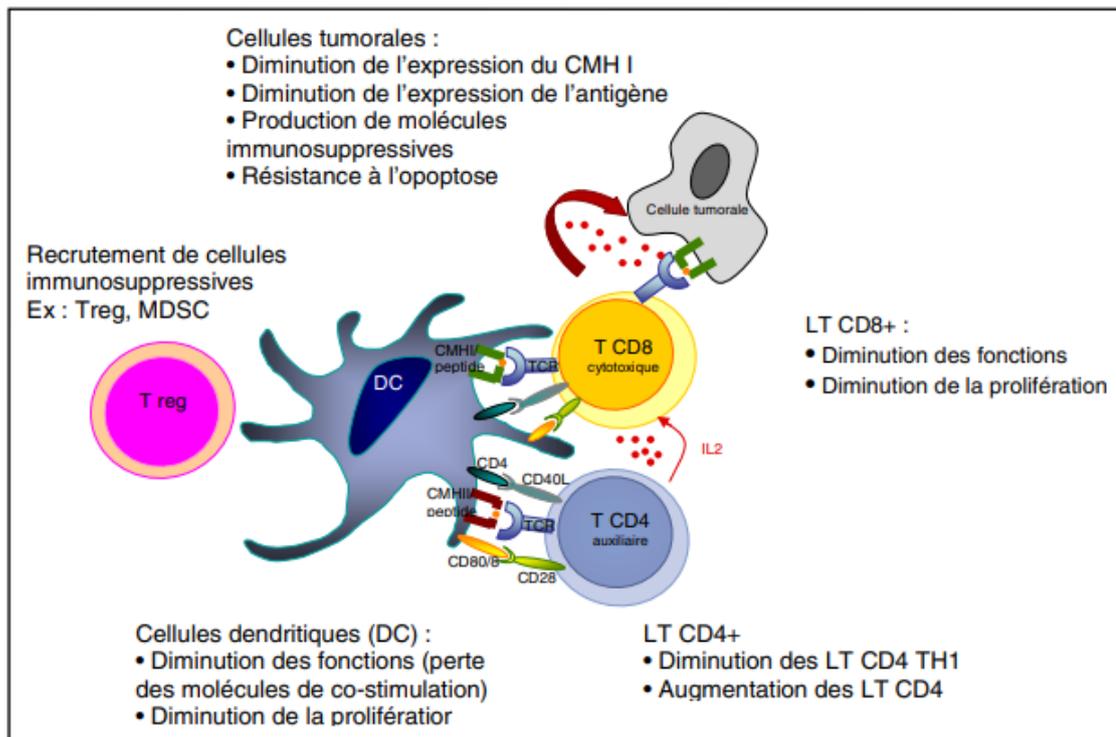


B



## Document 29 : Mécanismes d'échappement du système immunitaire

Source : <https://www.jomos.org/articles/mcbcb/pdf/2014/03/mcbcb140002.pdf>



La tumeur a la capacité de créer un environnement tolérogénique en induisant un profil cytokinique local immunosuppresseur. La sécrétion au sein du microenvironnement tumoral d'interleukine 2 (IL-2), cytokine stimulant les lymphocytes T effecteurs (Teff), est très diminuée, tandis que celles de l'interleukine 10 (IL-10) et du transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), molécules inhibitrices du système immunitaire, sont augmentées.

## Document 30 : Evaluation de la pression en O<sub>2</sub> dans des cerveaux de rats sains et à proximité de tumeurs cérébrales.

Source : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00460939/document>

