

# BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

ÉPREUVE D'ENSEIGNEMENT DE SPÉCIALITÉ

**SESSION 2021**

## **SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE**

### **Biochimie, Biologie et Biotechnologies**

Durée de l'épreuve : **3 heures**

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

Dès que ce document vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.

Ce document comporte 22 pages numérotées de 1/22 à 22/22 :

- sujet 1 : page 3/22 à 11/22
- sujet 2 : page 13/22 à 22/22

**Le candidat traite au choix un sujet parmi les deux sujets proposés.**

**Le candidat traite l'intégralité du sujet choisi et reporte le numéro du sujet choisi sur sa copie.**

**Parties du programme mobilisées dans chacun des sujets**

L'évaluation s'effectue par compétences. La pondération des compétences est identique pour les deux sujets. Les compétences sont indiquées entre parenthèses au niveau de chaque question et mobilisent des concepts et savoir-faire indiqués dans les programmes.

**Afin de faciliter le choix du sujet à traiter par le candidat**, les parties essentielles mobilisées dans chacun des sujets sont indiquées ci-dessous.

**Sujet 1 : p 3/22 à 11/22**

| <b>PRODUCTION ET PURIFICATION D'UNE ENZYME, LA TAQ POLYMÉRASE</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| S3.1 Propriétés et structure des acides nucléiques<br>T4.2 Réaliser un dénombrement après culture en milieu solide<br>T7.3 Séparation des biomolécules par chromatographie d'exclusion moléculaire dans le but de les purifier<br>T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR<br>T9.4 Clonage d'un fragment d'ADN<br>L1.2.4 Évaluation des résultats expérimentaux |

**OU**

**Sujet 2 : p 13/22 à 22/22**

| <b>ÉTUDE D'UN VACCIN ORAL CONTRE LE PALUDISME À BASE DE SPIRULINE GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉE</b>                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| S2.3 Réponse immunitaire adaptative<br>T2.2 Modélisation de la croissance en milieu non renouvelé<br>T6 Détecter et caractériser les biomolécules (agglutination)<br>T9.4 Clonage d'un fragment d'ADN<br>L1.2.4 Évaluation des résultats expérimentaux |

| <b>COMPÉTENCES ÉVALUÉES</b> |                       |                         |                               |                       |                       |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>C1</b>                   | <b>C2</b>             | <b>C3</b>               | <b>C4</b>                     | <b>C5</b>             | <b>C6</b>             |
| Analyser un document        | Effectuer les calculs | Interpréter des données | Argumenter un choix technique | Élaborer une synthèse | Communiquer à l'écrit |
| <b>4 points</b>             | <b>3 points</b>       | <b>4 points</b>         | <b>3 points</b>               | <b>5 points</b>       | <b>1 points</b>       |

# SUJET 1

## PRODUCTION ET PURIFICATION D'UNE ENZYME, LA TAQ POLYMÉRASE

Les ADN polymérases sont les enzymes les plus utilisées dans le domaine de la biologie moléculaire, en particulier certaines d'entre elles pour les expériences de PCR (Polymerase Chain Reaction). La première enzyme thermostable de ce type à avoir été caractérisée en 1976, et probablement une des plus utilisées dans les laboratoires, est issue de la bactérie *Thermus aquaticus*. De ce fait, elle est appelée Taq polymérase. L'extinction du brevet commercial de la Taq polymérase a eu pour conséquence de voir le prix de cette enzyme chuter. De plus, il offre la possibilité de se procurer des clones bactériens d'*Escherichia coli* transformés avec un plasmide contenant le gène codant l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* et, par conséquent, de pouvoir effectuer une production particulièrement économique.

D'après : Jérôme Olivares, Cahier des techniques de l'INRA, 2016

### Partie I - Questionnement scientifique et technologique (durée indicative 2 h 30)

Un laboratoire souhaite produire une Taq polymérase à moindre coût à partir d'une culture de clones d'*E.coli* transformés avec un plasmide contenant le gène de *Thermus aquaticus* codant la Taq polymérase.

La démarche se décompose en 3 parties :

1. Sélection et culture d'un clone bactérien transformé avec un plasmide contenant le gène codant la Taq polymérase, nommé pAKTaq.
2. Extraction et purification de la Taq polymérase produite.
3. Mise en évidence de l'activité de la Taq polymérase produite par PCR.

#### 1. SÉLECTION ET CULTURE D'UN CLONE BACTÉRIEN TRANSFORMÉ AVEC LE PLASMIDE pAKTaq

La transformation bactérienne consiste en l'introduction du plasmide recombiné pAKTaq dans le cytoplasme de la bactérie *Escherichia coli* sensible à l'ampicilline. Le plasmide pAKTaq introduit dans les bactéries est présenté dans le **document 1**. Les bactéries recombinées obtenues après transformation sont isolées sur milieu gélosé LB additionné avec de l'ampicilline.

##### 1.1 Sélection des clones d'*Escherichia coli* transformés

**Q1.** (C1) Argumenter l'utilisation du milieu LB additionné avec de l'ampicilline pour sélectionner spécifiquement les bactéries transformées.

##### 1.2 Culture des clones d'*Escherichia coli* transformés

Les colonies isolées sont remises en culture en milieu liquide et la croissance bactérienne est suivie par mesure de l'atténuation à 550 nm notée  $D_{\text{suspension à 550 nm}}$ .

La procédure d'extraction de la Taq polymérase produite par *E.coli* transformé nécessite d'avoir une suspension bactérienne d'au minimum  $1,2 \cdot 10^8$  bactéries  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>.

**Q2.** (C2) Calculer l'atténuation minimale à atteindre pour arrêter la culture avant de réaliser l'extraction.

Données :

- $D_{\text{suspension à } 550 \text{ nm}} = 0,1$  pour la concentration  $C_{N(E.coli ; \text{suspension})} = 6,0 \cdot 10^7 \text{ bactéries} \cdot \text{mL}^{-1}$
- Limite de linéarité  $D_{\text{suspension à } 550 \text{ nm}} = 0,5$

La mesure de l'atténuation peut être vérifiée en déterminant la concentration bactérienne par un dénombrement dans la masse en milieu gélosé PCA, lorsque l'atténuation atteint 0,600. Les résultats du dénombrement sont présentés dans le **document 2**.

**Q3.** (C2) Vérifier en calculant la concentration bactérienne précise si l'extraction de la Taq polymérase est possible.

## 2. EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA TAQ POLYMÉRASE PRODUITE

Dans le but d'extraire la Taq polymérase produite par les clones d'*E.coli* transformés avec le plasmide pAKTaq, les bactéries sont lysées. Dans un second temps, deux méthodes de purification sont réalisées successivement pour purifier l'enzyme :

- Filtration sur membrane Jumbosep® pour éliminer les débris cellulaires de grande taille
- Chromatographie échangeuse d'ions sur le surnageant.

La seconde étape de purification est décrite dans les **documents 3 et 4**.

**Q4.** (C1) Expliquer la rétention de l'enzyme dans la colonne.

**Q5.** (C1) Après avoir comparé la composition du tampon A et du tampon B, expliquer l'élution de la Taq polymérase par le tampon B.

## 3. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ DE LA TAQ POLYMÉRASE PAR PCR

### 3.1 Place de la Taq polymérase dans la PCR

Le **document 5** présente le principe de la PCR mise en œuvre pour contrôler l'activité de la Taq polymérase purifiée.

**Q6.** (C1) Reporter sur la copie les lettres (A) (B) (C) de légende du **document 5** puis compléter avec les termes manquants.

**Q7.** (C4) Expliquer en quoi la PCR est un test qui permet de mettre en évidence que la Taq polymérase produite est bien fonctionnelle.

### 3.2 Mise en œuvre d'une PCR pour contrôler l'activité de la Taq polymérase

Afin de contrôler l'activité de l'enzyme produite, deux PCR sont réalisées :

- l'une avec la Taq polymérase purifiée ;
- l'autre avec une Taq polymérase commerciale.

Les résultats de ces deux PCR sont ensuite comparés après migration par électrophorèse.

Le **document 6** présente le protocole suivi pour mettre en œuvre, par PCR, l'estimation semi-quantitative de l'activité enzymatique de la Taq polymérase produite.

**Q8.** (C2) Calculer les  $T_m$  (températures de fusion) des amorces choisies.

**Q9.** (C4) Sachant que la température d'hybridation doit être inférieure d'au moins 4 °C au  $T_m$ , discuter du choix d'utiliser la température de 56 °C comme température d'hybridation pour l'amplification du gène de référence.

Le **document 6** présente le résultat de l'analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.

**Q10.** (C1) Vérifier l'absence d'ADN détectable en l'absence de Taq polymérase.

**Q11.** (C3) Expliquer la différence d'intensité de fluorescence obtenue pour les différentes conditions réalisées avec la Taq polymérase commerciale.

**Q12.** (C3) Analyser le gel d'électrophorèse obtenu pour montrer que le protocole de production de la Taq polymérase est efficace.

**Q13.** (C1) Déterminer la dilution de l'extrait de Taq polymérase purifiée à utiliser pour obtenir un résultat équivalent à celui de la Taq commerciale diluée au 1/40.

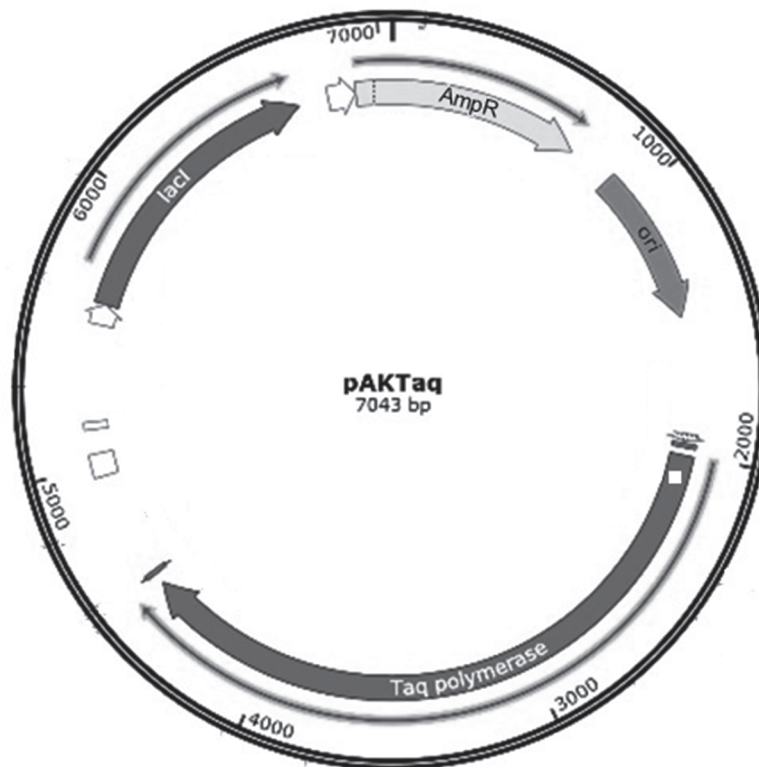
**Q14.** (C5) Rassembler sous la forme d'un organigramme la succession des étapes ayant conduit à la production d'une Taq polymérase à partir d'une bactérie *E. coli* transformée avec un plasmide contenant le gène codant l'enzyme.

### Partie II – Question de synthèse (durée indicative 30 min)

Le **document 7** présente deux ressources portant sur le développement de nouvelles enzymes développées pour la PCR.

**Q15.** (C5) Montrer que la démarche menée dans le laboratoire évoqué en partie I relève d'une démarche de développement de produit en vue d'une production mais pas d'une démarche de recherche, contrairement aux exemples présentés dans le **document 7**.

**DOCUMENT 1 — Sujet 1 : représentation schématique du plasmide pAKTaq contenant le gène codant la Taq polymérase de *Thermus aquaticus***



Ce plasmide comporte :

- gène codant la Taq polymérase de *Thermus aquaticus*
- gène de résistance à l'ampicilline (antibiotique) : AmpR
- plusieurs sites de restriction enzymatique
- ori : origine de réplication

Source : <http://www.addgene.org/browse/sequence/99882/>

## **DOCUMENT 2 — Sujet 1 : dénombrement de *Escherichia coli* en milieu gélosé PCA**

**Méthode** : Dénombrement en simple essai dans la masse d'un milieu gélosé PCA (non sélectif et non différentiel)  
Volume d'inoculum :  $V = 1 \text{ mL}$

**Résultat** :

|              |           |           |           |
|--------------|-----------|-----------|-----------|
| Dilution (d) | $10^{-6}$ | $10^{-7}$ | $10^{-8}$ |
| n (colonies) | 292       | 54        | 2         |

**Extrait de la norme ISO 7218 octobre 2007 :**

Le **calcul** du nombre d'UFC par mL ou par g de produit, consiste à faire la moyenne pondérée du nombre de colonies obtenues sur **deux dilutions successives dont l'une, au moins, présente un minimum de 10 colonies.**

Ce calcul est valable dans le cas où le rapport du nombre de colonies entre deux dilutions est cohérent avec le facteur de dilution.

Choisir deux dilutions successives dont :

- l'une au moins **présente un minimum de 10 colonies.**
- le "nombre maximal de colonies en totalité est de 300 par boîte" ; en présence d'un agent de différenciation, le "nombre maximal des colonies caractéristiques ou présumées est de 150 par boîte "

**Équation aux grandeurs :**

$$N = \Sigma c / (V \times 1,1 d)$$

avec :

- $N$  = concentration en nombre d'UFC par millilitre
- $\Sigma c$  = somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues.
- $V$  = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte en millilitre.
- $d$  = dilution correspondant à la première boîte retenue, avec l'inoculum le moins dilué.

Le résultat est arrondi avec 2 chiffres significatifs, exprimé avec un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance de 10 appropriée.

### **DOCUMENT 3 — Sujet 1 : purification de la Taq polymérase par chromatographie échangeuse d'ions**

Après extraction, l'enzyme est chargée négativement et peut donc être purifiée par chromatographie échangeuse d'anions.

La résine échangeuse d'anions utilisée est au préalable équilibrée avec du tampon A (50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8).

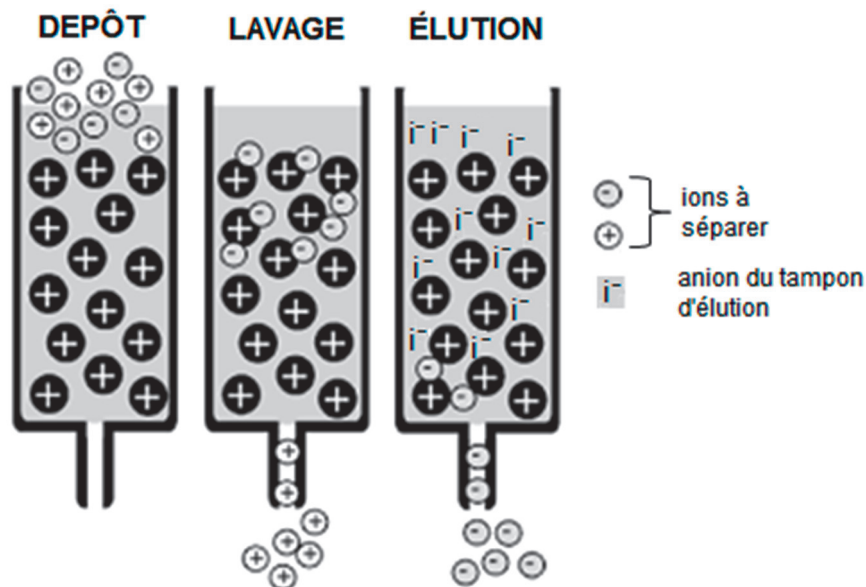
La solution contenant l'enzyme est ensuite déposée sur la résine.

Un lavage de la résine est réalisé par passage du tampon A.

L'éluion de l'enzyme est réalisée par passage du tampon B (50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8 – 0,5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl) à travers la colonne.

### **DOCUMENT 4 — Sujet 1 : schéma du principe de la chromatographie sur colonne échangeuse d'anions**

Le principe de la chromatographie échangeuse d'anions repose sur la capacité d'une colonne composée d'une résine chargée positivement de retenir les anions qui la traversent (rétention). Un lavage permet d'éliminer les molécules non retenues. Les anions sont ensuite libérés de la colonne par ajout d'une solution d'éluion de force ionique élevée.

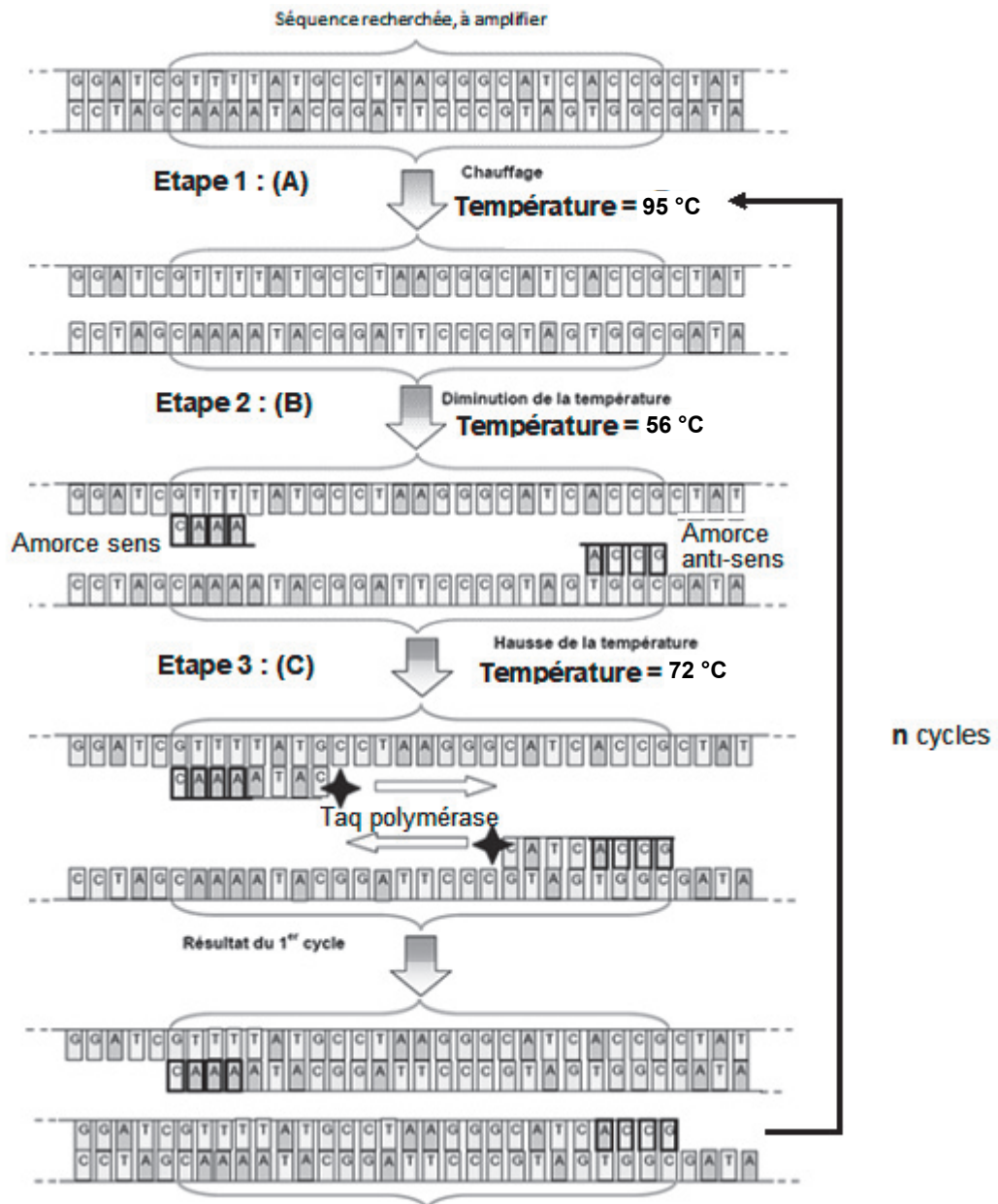




**DOCUMENT 5 — Sujet 1 : schéma de la réaction de PCR mise en œuvre pour contrôler l'activité de la Taq polymérase purifiée**

La PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou *réaction de polymérisation en chaîne*) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro* qui permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase thermorésistante, la Taq polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une augmentation exponentielle de la séquence d'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute).



Source : d'après Ifremer – décembre 2009 – Fiche réalisée pour Bibliomer et le centre de veille des produits aquatiques

## **DOCUMENT 6 — Sujet 1 : protocole de l'estimation semi-quantitative de l'activité enzymatique de la Taq purifiée**

L'estimation semi-quantitative de l'activité de la Taq polymérase purifiée est estimée par comparaison à l'activité de la Taq polymérase commerciale après électrophorèse sur gel d'agarose.

Les auteurs du protocole ont choisi d'amplifier une séquence de 1363 pb d'un gène couramment amplifié par la Taq polymérase commerciale.

### **Choix des amorces**

Amorce sens : SKdr-F / 5' - GGCCGACACTTAATTTACTCAT - 3'

Amorce anti-sens : SKdr-R / 3' - GCAATCCCACATGCTCTCTA - 5'

Paramètres de réglage du thermocycleur :

|                          |                           |
|--------------------------|---------------------------|
| 95 °C pendant 3 minutes  |                           |
| 35 cycles                | 95 °C pendant 30 secondes |
|                          | 56 °C pendant 45 secondes |
|                          | 72 °C pendant 1 min 30    |
| 72 °C pendant 10 minutes |                           |

Formule pour le calcul de la température de fusion  $T_m$  d'une amorce (en °C) :

Formule de Wallace :  $T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_C + n_G)$

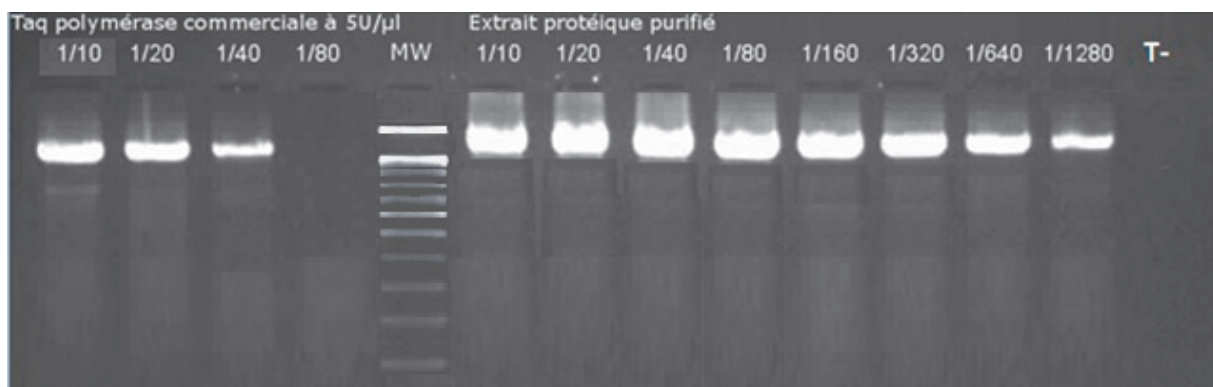
$n_A$  : nombre de nucléotides « A » dans l'amorce     $n_T$  : nombre de nucléotides « T » dans l'amorce  
 $n_C$  : nombre de nucléotides « C » dans l'amorce     $n_G$  : nombre de nucléotides « G » dans l'amorce

### **Analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose**

Migration sur gel d'agarose des produits de PCR avec diverses dilutions en cascade de la Taq polymérase commerciale (à gauche) et de la Taq polymérase purifiée (à droite).

MW : marqueur de taille en pb (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100)

T- : témoin négatif dont la composition est la suivante : ADN de référence, couple d'amorces spécifiques, désoxyribonucléotides.



## **DOCUMENT 7 — Sujet 1 : données sur les polymérases utilisées pour la PCR**

### **Invention de la PCR**

*D'après La saga des brevets sur la PCR, V.B. dans mensuel 283, daté de janvier 1996 - <https://www.larecherche.fr/la-saga-des-brevets-sur-la-pcr>*

La PCR est une méthode d'amplification exponentielle de l'ADN inventée par l'Américain Kary Mullis en 1985, prix Nobel de chimie en 1993, et utilisant une enzyme thermostable. Trois brevets, deux pour la méthode, un pour la Taq polymérase, ont été déposés par la société américaine Cetus® à la fin des années 1980. Les droits d'exploitation ont été rachetés par la société suisse Hoffmann-La Roche® en 1991 (...). La firme suisse a ainsi pu attaquer en 1992 DuPont de Nemours pour contrefaçon des brevets de la PCR puis la société américaine Promega pour contrefaçon de la Taq polymérase et a obtenu gain de cause devant les tribunaux américains.

### **Exemple d'innovation pour la PCR : la technologie Phusion®**

*D'après New England Biolabs, [neb-online.fr](http://neb-online.fr), document commercial*

La « Phusion DNA Polymerase » est une nouvelle enzyme issue de la fusion entre une ADN polymérase issue de *Pyrococcus* et un fragment protéique améliorant la processivité\*. Elle génère des produits de PCR avec une précision et une vitesse encore jamais atteintes par une seule enzyme. Elle est également capable d'amplifier de longues séquences – ses tests de contrôle qualité incluent l'amplification de 7,5 kb d'ADN génomique et de 20 kb d'ADN du phage Lambda. La structure et les caractéristiques uniques de la « Phusion DNA Polymerase » en font une polymérase de choix en matière de performances PCR.

Avantages :

- haute fidélité (50 fois supérieure à celle de la Taq polymérase) ;
- rapidité – réduction considérable des temps d'élongation (10 fois plus rapide que la Pfu polymérase) ;
- réactions robustes – excellents résultats avec une optimisation minimale ;
- rendement élevé – quantité de produits accrue avec une quantité d'enzyme minimale.

\* *processivité* : propriété indicatrice de la rapidité de synthèse d'ADN par l'enzyme

**Page laissée intentionnellement blanche.**

## SUJET 2

### ÉTUDE D'UN VACCIN ORAL CONTRE LE PALUDISME À BASE DE SPIRULINE GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉE

Le paludisme est une maladie parasitaire qui touche chaque année 200 millions de personnes et provoque plus de 400 000 décès dans le monde. Il est causé par le parasite *Plasmodium falciparum* qui est transmis à l'être humain par les piqûres de certains moustiques.

En 2018, une entreprise de biotechnologies a présenté un projet de vaccin contre le paludisme reposant sur la création d'une souche de spiruline génétiquement modifiée. Cette spiruline produit une protéine du parasite et pourrait être administrée, par voie orale, aux populations exposées au paludisme pour stimuler leur immunité contre le parasite.

La spiruline est un microorganisme photosynthétique appartenant au phylum des cyanobactéries. Riche en protéines, vitamines et minéraux, elle se développe naturellement dans des lacs proches de l'équateur où les populations locales la consomment régulièrement. Très appréciée pour ses qualités nutritionnelles, la spiruline connaît un succès croissant dans les pays industrialisés en tant que complément alimentaire. Son utilisation à des fins de vaccination pourrait se révéler très avantageuse d'un point de vue technique et économique.

*D'après <https://www.lumenbioscience.com/malaria-grant>*

#### Partie I – Questionnement scientifique et technologique (durée indicative 2 h 30)

Ce sujet repose sur l'étude d'une souche de spiruline génétiquement modifiée, possédant des propriétés vaccinales.

La démarche se décompose en trois parties :

1. Étude de l'immunogénicité d'un parasite du genre *Plasmodium*.
2. Vérification de la construction plasmidique.
3. Recherche d'un dispositif adapté de production de spiruline génétiquement modifiée.

#### 1. ÉTUDE DE L'IMMUNOGÉNÉICITÉ D'UN PARASITE DU GENRE *PLASMODIUM*

Afin de s'assurer qu'une stratégie de vaccination contre *Plasmodium falciparum* est envisageable et d'identifier des protéines immunogènes candidates, une expérimentation est conduite chez la souris.

Le **document 1** présente l'expérimentation effectuée et les résultats obtenus.

**Q1.** (C1) Analyser les deux courbes pour montrer l'existence d'une mémoire immunitaire

**Q2.** (C4) Exposer les deux arguments qui permettent d'affirmer que la réponse immunitaire est une réponse adaptative.

#### 2. VÉRIFICATION DE LA CONSTRUCTION PLASMIDIQUE

La protéine immunogène Pfs25 de *Plasmodium falciparum* a été identifiée comme une bonne candidate dans la recherche d'un vaccin contre le paludisme. Afin de créer une souche de spiruline génétiquement modifiée potentiellement porteuse de propriétés vaccinales, une séquence d'intérêt codant une partie immunogène de cette protéine est insérée dans le plasmide pBV.

Le **document 2** présente les étapes de la construction et la carte du plasmide recombiné.

**Q3.** (C1) Représenter un logigramme rassemblant les quatre étapes présentées dans le **document 2**.

**Q4.** (C4) Argumenter l'intérêt de l'existence d'un gène de résistance à l'ampicilline dans le plasmide utilisé.

**Q5.** (C2) Démontrer, à partir de la construction du plasmide, que le gène *Pfs25* a une taille inférieure à 510 paires de bases.

Pour contrôler la présence du gène *Pfs25* dans le plasmide recombiné pBV-Pfs25, ce dernier est purifié puis digéré par des enzymes de restriction. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats sont présentés dans le **document 3**.

**Q6.** (C3) Préciser la taille correspondant aux bandes 2 et 3 et expliquer l'obtention d'une bande unique pour les pistes 2 et 3.

**Q7.** (C4) Argumenter, à l'aide des résultats de la piste 4, le fait que le plasmide pBV a bien intégré le gène *Pfs25*.

### **3. RECHERCHE D'UN DISPOSITIF ADAPTÉ DE PRODUCTION DE SPIRULINE GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉE**

Le **document 4** présente les deux principaux dispositifs de production de microalgues actuellement commercialisés dans le monde.

**Q8.** (C1) A l'aide du **document 4**, proposer deux arguments qui justifient *a priori* la préférence de l'entreprise de biotechnologies pour une production de spiruline en photobioréacteur plutôt qu'en bassin.

#### **3.1. Vérification des paramètres optimaux de culture pour la spiruline génétiquement modifiée**

Une spiruline non modifiée génétiquement se développe de manière optimale dans les conditions suivantes :

- un apport contrôlé de minéraux (salinité comprise entre 10 et 14 g·L<sup>-1</sup>), de lumière et de CO<sub>2</sub> ;
- un pH compris entre 8,5 et 10 ;
- une température comprise entre 30 et 38 °C.

L'industriel vérifie les paramètres optimaux de culture (température, pH et salinité) de la spiruline génétiquement modifiée.

Les résultats sont présentés dans le **document 5**.

**Q9.** (C3) Vérifier que les valeurs optimales pour les trois paramètres étudiés de la souche de spiruline génétiquement modifiée sont compatibles avec les intervalles donnés pour la spiruline naturelle.

### 3.2. Suivi de croissance de la spiruline génétiquement modifiée

Un suivi du début de la croissance de la spiruline génétiquement modifiée est effectué dans un bassin à ciel ouvert et dans un photo-bioréacteur.

Le **document 6** présente les courbes de croissance obtenues avec les deux dispositifs testés.

**Q10.** (C1) Déterminer la durée de la phase de latence de la spiruline génétiquement modifiée pour chaque dispositif testé.

**Q11.** (C2) Calculer la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle de la spiruline génétiquement modifiée  $\mu_{\text{expo}}$  (exprimée en  $\text{h}^{-1}$ ) dans les deux dispositifs testés.

Donnée : La vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle  $\mu_{\text{expo}}$  peut être déterminée par l'équation aux grandeurs suivante :

$$\mu_{\text{expo}} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_1 - t_2}$$

**Q12.** (C4) Comparer les résultats obtenus et discuter le dispositif de production à choisir par l'industriel.

### 3.3. Vérification de la présence de la protéine immunogène de *P. falciparum*

À l'issue de la production de spiruline génétiquement modifiée, l'industriel souhaite s'assurer que la protéine immunogène Pfs25 est bien exprimée. Le **document 7** présente le test d'agglutination permettant la mise en évidence de cette protéine.

**Q13.** (C3) Interpréter les résultats pour conclure sur la présence ou non de la protéine Pfs25 dans la spiruline.

**Q14.** (C5) Présenter, sous forme d'un logigramme, les différentes étapes de la recherche d'un vaccin contre *Plasmodium*, depuis la mise en évidence de l'immunogénicité de *Plasmodium* jusqu'à la production de la protéine Pfs25.

## Partie II - Question de synthèse – (durée indicative 30 min)

La mise au point d'un vaccin au laboratoire n'est que la première étape d'un long processus avant sa mise sur le marché et sa production à grande échelle. Des tests précliniques chez l'animal, puis des tests cliniques chez l'être humain sont réalisés pour montrer la tolérance et l'efficacité du vaccin.

Le **document 8** présente les différents types de vaccin ainsi que, pour l'exemple de la poliomyélite, les caractéristiques de deux vaccins et de leurs formes d'administration.

**Q15.** (C5) Présenter les avantages et inconvénients qu'aurait l'utilisation d'un vaccin à base de spiruline génétiquement modifiée.

## **DOCUMENT 1 — Sujet 2 : immunisation de souris par *Plasmodium***

*D'après Seon-Heo Kim et coll., Korean J. Parasitol., 2017*

### **Procédure**

Six souris sont infectées par *Plasmodium yoelii*, un parasite non létal, lors d'une première injection de parasites dans le sang.

Le sang des souris est régulièrement prélevé (entre 0 et 21 jours) et le taux de parasites dans le sang (parasitémie) est suivi par observation microscopique sur lame.

Au bout de trois semaines, les souris présentent une parasitémie nulle et une seconde injection *Plasmodium yoelii* est alors réalisée dans le sang des souris.

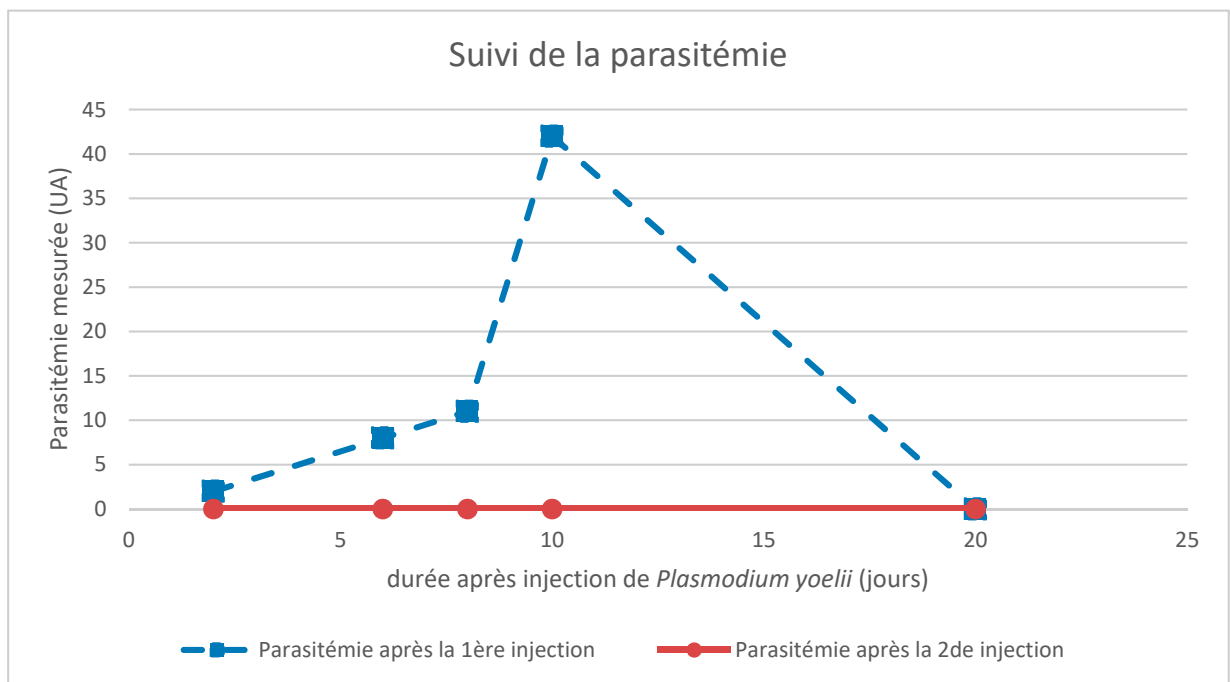
Le sang des souris est prélevé et la parasitémie mesurée comme précédemment pendant 21 jours.

En parallèle, la concentration en anticorps dirigés contre *Plasmodium* est déterminée dans les prélèvements sanguins.

### **Résultats**

Aux cours de l'infection, des anticorps dirigés contre *Plasmodium* ont été mis en évidence dans le sérum des souris étudiées.

Le graphique ci-dessous présente la parasitémie obtenue à partir du temps zéro correspondant à chaque injection de parasites dans le sang.





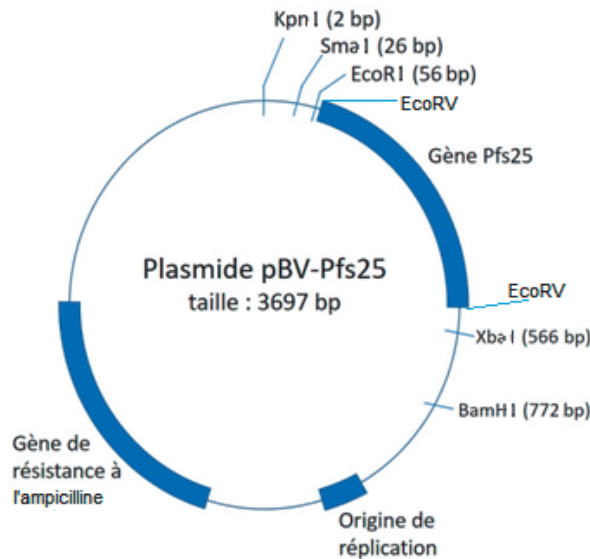
**DOCUMENT 2 — Sujet 2 : construction d'un plasmide recombiné contenant le gène codant la protéine Pfs25**

Les quatre étapes suivantes ont été mises en œuvre pour construire le plasmide :

- Le gène *Pfs25* est extrait de l'ADN génomique du parasite *P. falciparum* grâce à l'enzyme de restriction *EcoRV*.
- Parallèlement, le plasmide pBV est coupé par cette même enzyme de restriction.
- Une ligase est utilisée pour insérer le gène *Pfs25* dans le plasmide pBV.
- Le plasmide recombiné pBV-Pfs25 peut alors être introduit dans la spiruline.

Les sites de restriction *EcoRV* résultant de la construction ainsi que les sites uniques de restriction *KpnI*, *SmaI*, *EcoRI*, *XbaI* et *BamHI* sont indiqués sur la carte du plasmide présentée ci-dessous.

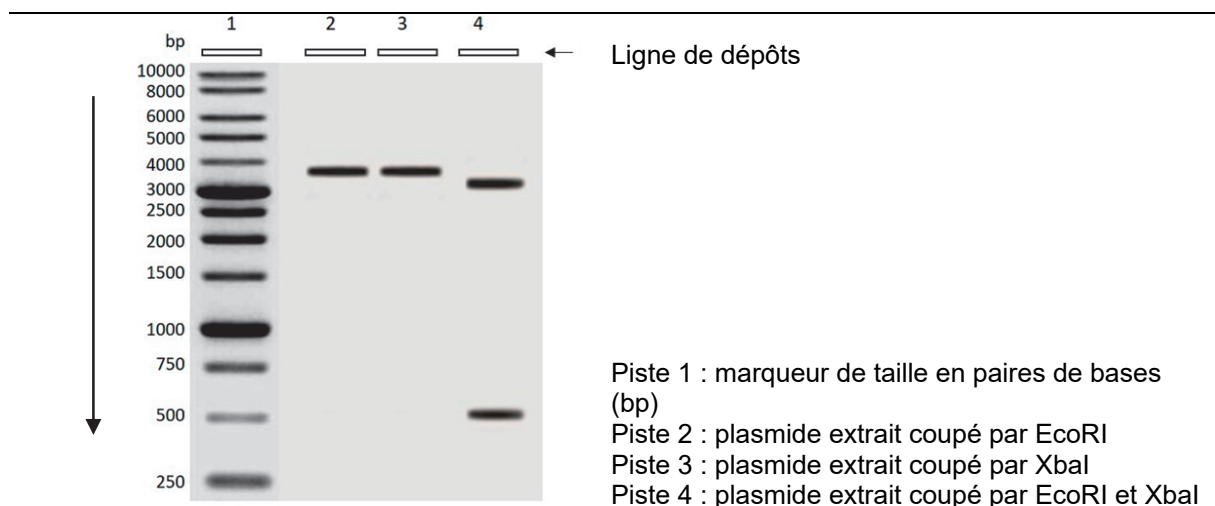
La position exacte de chaque site de restriction est donnée en paires de bases (pb) à partir d'un nucléotide choisi arbitrairement.



D'après <https://www.addgene.org>

**DOCUMENT 3 — Sujet 2: électrophorégramme des molécules d'ADN obtenues après digestion du plasmide extrait**

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les molécules d'ADN chargées négativement en fonction de leur masse moléculaire.



## **DOCUMENT 4 — Sujet 2 : dispositifs de production industrielle de spiruline**

### ▪ **Conditions de culture**

Les variétés de spiruline à usage alimentaire peuvent se cultiver assez facilement tant que trois conditions principales sont réunies :

- température ne descendant pas en dessous de 20 °C,
- agitation faible à nulle, permettant de conserver les filaments spiralés formés par les cyanobactéries,
- surface d'exposition à la lumière du jour maximisée.

### ▪ **Les bassins à ciel ouvert**

Ce sont des systèmes ouverts sans agitation qui permettent de cultiver la spiruline. Les bassins à ciel ouvert ne peuvent pas éviter le contact avec l'environnement et ses contaminants (insectes, pluie, poussière, pollutions transportées par le vent).

Source : *AlgaeIndustryMagazine.com* (April 2011)



### ▪ **Les photo-bioréacteurs**

Ce sont des tubes de verre qui constituent un système fermé. Ils permettent d'optimiser tous les paramètres de production de la spiruline : température, luminosité, agitation, nutriments et hygiène. Ce procédé est entièrement contrôlé et sécurisé.

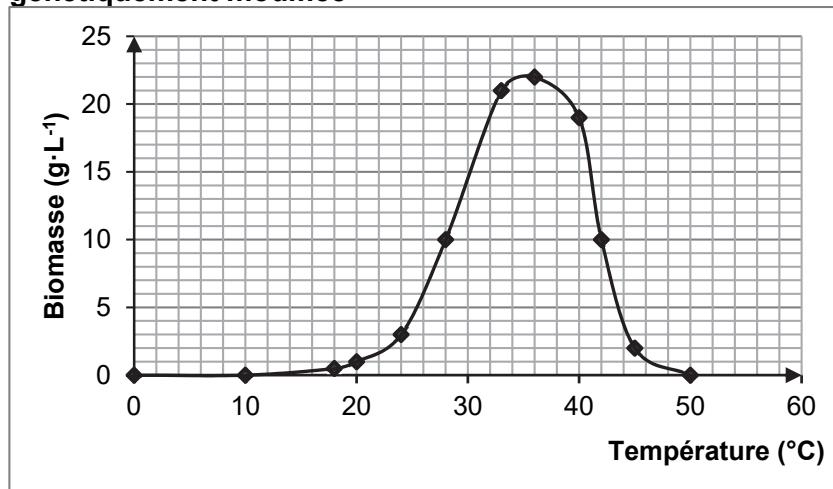
Source : <https://photobioreactor.wikipedia.org>



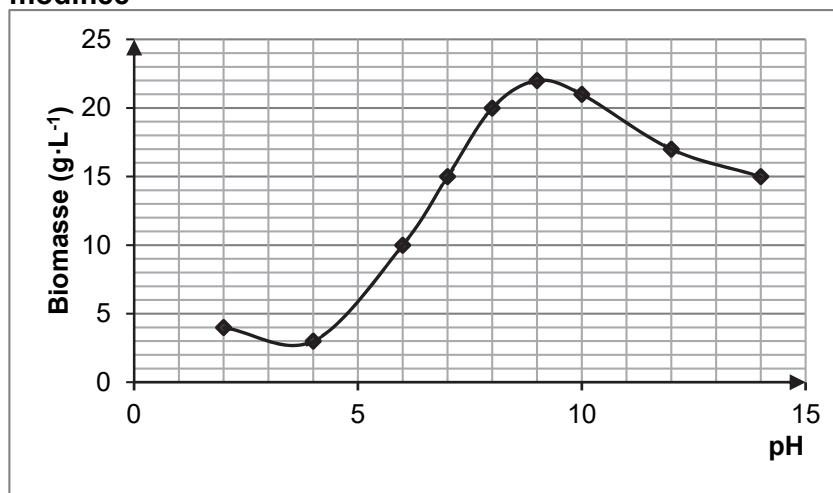
| <b>Critères de choix</b>                                                      | <b>Bassins à ciel ouvert</b> | <b>Photo-bioréacteurs</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| <b>Biomasse produite par unité de surface exploitée</b>                       | faible                       | élevée                    |
| <b>Besoins énergétiques (agitation, aération, éclairage)</b>                  | faibles                      | élevés                    |
| <b>Coût matériel (installation, maintenance, ...)</b>                         | faible                       | élevé                     |
| <b>Risque de dissémination dans l'environnement du microorganisme cultivé</b> | élevé                        | faible                    |

**DOCUMENT 5 — Sujet 2 : étude des conditions de croissance de la spiruline génétiquement modifiée**

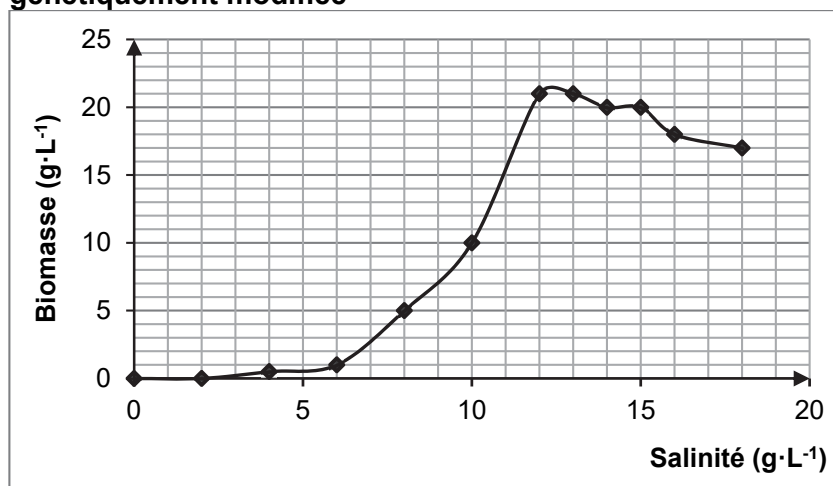
**Courbe A – Influence de la température sur la biomasse de spiruline génétiquement modifiée**



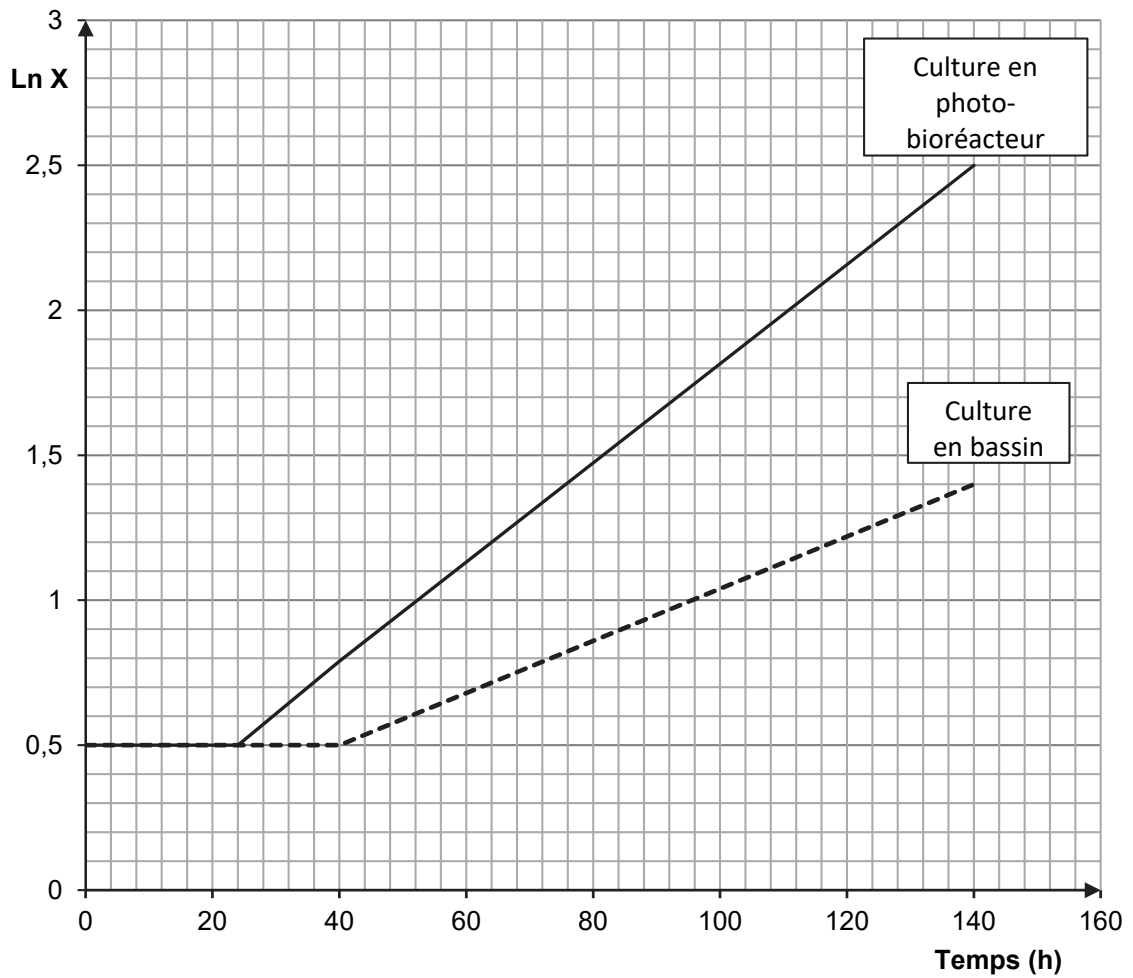
**Courbe B – Influence du pH sur la biomasse de spiruline génétiquement modifiée**



**Courbe C – Influence de la salinité sur la biomasse de spiruline génétiquement modifiée**



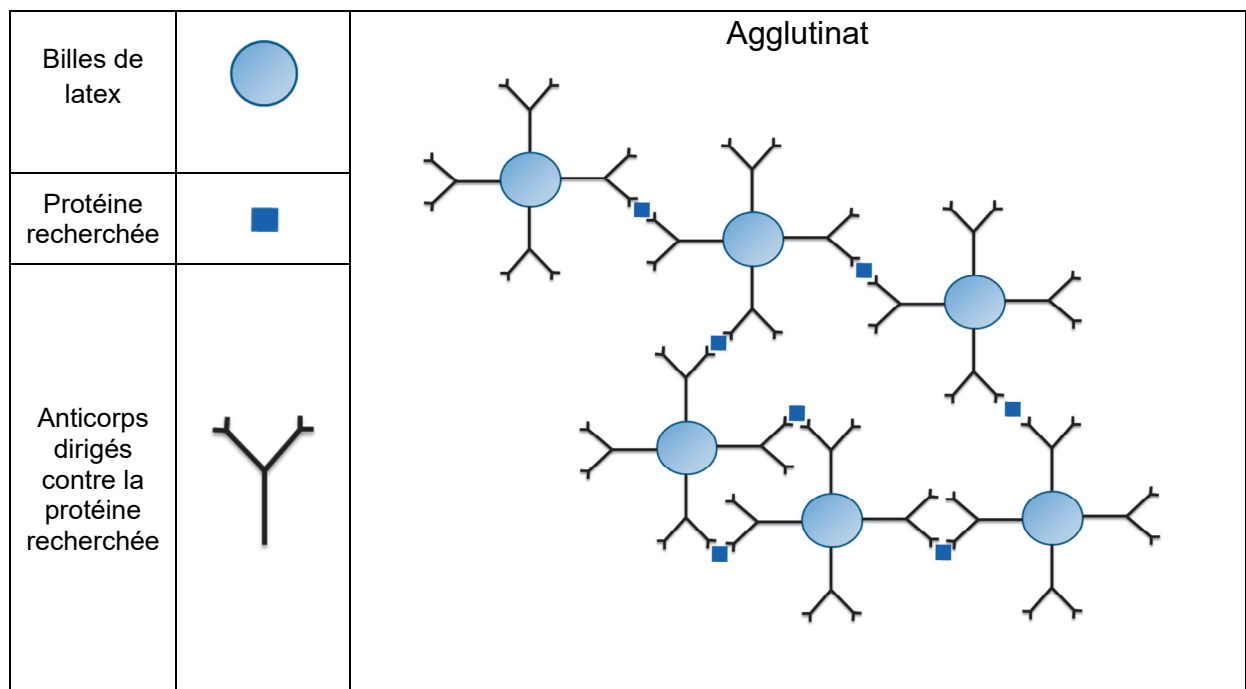
**DOCUMENT 6 — Sujet 2 : Courbes de croissance modélisées de la spiruline génétiquement modifiée dans deux dispositifs de production différents**



Donnée :  
X = biomasse de spiruline génétiquement modifiée

## **DOCUMENT 7 — Sujet 2 : recherche de la protéine Pfs25 par agglutination**

### **Représentation moléculaire d'une agglutination**



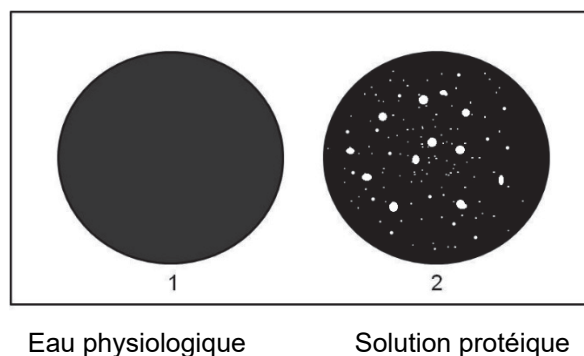
### **Réactifs et échantillon**

- Solution protéique issue de la suspension « S » de spiruline génétiquement modifiée
- Billes de latex recouvertes d'anticorps anti-Pfs25
- Eau physiologique

### **Mode opératoire**

- Préparer une carte d'agglutination à fond noir.
- Déposer une goutte de billes de latex recouvertes d'anticorps anti-Pfs25 dans les deux cercles.
- Déposer une goutte d'eau physiologique dans le cercle 1.
- Déposer une goutte de solution protéique issue de la suspension « S » dans le cercle 2.
- Mélanger les deux gouttes du cercle 1 à l'aide d'un bâtonnet.
- Mélanger les deux gouttes du cercle 2 à l'aide d'un bâtonnet.
- Effectuer des mouvements de rotation de la carte.
- Observer l'aspect des mélanges au bout de 30 secondes.

### **Résultats**



## **DOCUMENT 8 — Sujet 2 : critères de choix d'un vaccin**

### **Vaccins atténués ou inactivés**

- Les vaccins vivants atténués sont constitués d'agents infectieux vivants, mais modifiés pour perdre leur pouvoir pathogène. Ils créent donc une infection *a minima*, très proche de l'infection naturelle mais sans ses dangers. Ce type de vaccin entraîne généralement une très bonne réponse immunitaire. Mais en raison de la nature vivante de l'agent utilisé, ce type de vaccin est contre-indiqué chez les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées.
- Les vaccins inactivés ne contiennent pas d'agents infectieux vivants et ne créent pas d'infection *a minima*. Ils peuvent contenir soit un fragment de l'agent infectieux, soit la totalité de l'agent infectieux qui est inactivé. La réponse immunitaire obtenue après une seule dose n'est généralement pas suffisante pour obtenir une protection efficace. Il faut donc pratiquer des rappels.

*D'après Planète vaccination, santé publique France, juin 2017*

### **Comparaison de deux vaccins contre le virus de la poliomyélite**

Pour prévenir la poliomyélite paralytique, on utilise aujourd'hui deux vaccins très efficaces : le premier, vaccin polio inactivé injectable (VPII), a été mis au point par J. Salk ; il est composé de souches sauvages inactivées. Le second, vaccin polio atténué oral (VPAO), a été mis au point par A. Sabin ; il est composé de souches atténuées. Chacun de ces deux vaccins présente des avantages et quelques inconvénients, mais ils sont tous les deux d'une grande efficacité.

Le VPII, utilisé dans la majorité des pays développés, confère une bonne immunité générale et est parfaitement sûr. Cependant, il doit être administré par du personnel médical, nécessite des rappels réguliers, et il est relativement onéreux.

Le VPAO peut être administré par du personnel non médical, ce qui facilite grandement son utilisation dans les pays en développement. Il est peu onéreux et confère une bonne immunité générale. (...) Malheureusement, les souches vaccinales du VPAO présentent une certaine instabilité génétique. En effet, au cours de l'étape de multiplication des souches atténuées dans l'intestin, celles-ci peuvent retrouver exceptionnellement leur pathogénicité (phénomène appelé « réversion des déterminants d'atténuation »). Ces réversions sont à l'origine de très rares cas de poliomyélite paralytique qui affecte les enfants en cours de vaccination ou leurs contacts non vaccinés.

*D'après Delpeyroux et coll., Médecine/sciences 2013*