

CONCOURS GÉNÉRAL DES LYCÉES

SESSION 2025

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.*

Consignes aux candidats

- Ne pas utiliser d'encre claire
- N'utiliser ni colle, ni agrafe
- Ne joindre aucun brouillon
- Ne pas composer dans la marge
- 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 : admissibilité Matière : BIOT Session : 2025

Tournez la page S.V.P.

L'évaluation valorisera deux stratégies possibles :

- **Persévérance** : tient compte du nombre de réponses **successives** traduisant un niveau « acceptable » dans chaque partie
- **Approfondissement** : tient compte du nombre de réponses traduisant un niveau « maîtrisé » pour l'ensemble du sujet

Les biotechnologies végétales au service de l'alimentation et de la production de biomédicaments

La France est le premier producteur européen de produits agroalimentaires. Alors que les besoins alimentaires de la population mondiale devraient croître de 50 % à l'horizon 2050, les biotechnologies végétales apportent des solutions innovantes répondant aux besoins de la population pour améliorer la performance de la production agricole, concilier alimentation et santé, proposer des nouvelles méthodes de production, concevoir des produits alimentaires alternatifs plus durables. Le plan France 2030, dans son axe stratégique pour « une agriculture saine et durable », contribue à développer les filières d'entreprises innovantes dans le domaine de l'agriculture (« AgriTech ») et de l'alimentation (« FoodTech ») qui répondent à ces enjeux. Le volet « Innovation santé 2030 » du même plan d'investissement promeut la filière « Healthtech », rassemblant les entreprises innovantes en santé.



Source : <https://www.gouvernement.fr/actualite/la-french-agritech-au-service-de-l-innovation-agricole> consulté le 22/10/24

Le sujet se décline en trois parties portant sur trois filières dans lesquelles les biotechnologies végétales peuvent être mobilisées :

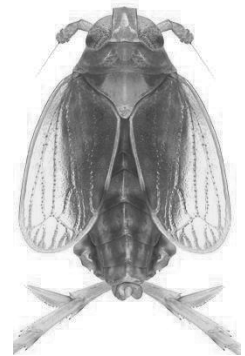
Partie 1 - AgriTech : révolution des biopesticides grâce à la biologie moléculaire.

Partie 2 - HealthTech : bioproduction végétale d'un anticancéreux, la podophyllotoxine

Partie 3 - Foodtech : la biologie végétale, source d'inspiration en agroalimentaire.

Certains insectes sont capables de véhiculer des virus pathogènes et de les transmettre aux plantes. C'est le cas notamment de *Nilaparvata lugens*, un insecte suceur qui se nourrit principalement de la sève des plants de riz. Cet insecte est considéré comme un des parasites les plus problématiques pour la riziculture qui nourrit environ la moitié de la population humaine mondiale.

Pour lutter contre cet insecte, un pesticide chimique est utilisé mais de plus en plus d'insectes y sont résistants.



Nilaparvata lugens

Source : Natasha Wright

1. Résistance de *Nilaparvata lugens* aux pesticides chimiques

L'utilisation massive de pesticides a entraîné des résistances de *Nilaparvata lugens* vis-à-vis des pesticides chimiques conventionnels, tels que le buprofézine. Pour comprendre cette résistance, une étude du microbiote intestinal de *Nilaparvata lugens* a été réalisée.

Le **document 1** présente la proportion des différentes espèces bactériennes composant le microbiote intestinal d'insectes résistants au buprofézine (NIB) ou sensibles à ce pesticide (NIS).

Q1. Montrer que les bactéries du genre *Serratia* pourraient conférer une résistance au pesticide.

La structure développée du buprofézine est donnée dans le **document 2**, ainsi que les résultats de la culture de bactéries appartenant au genre *Serratia* sur milieu minimum, en présence et en absence de buprofézine.

Q2. Écrire la formule brute du buprofézine.

Q3. Analyser les résultats expérimentaux.

Q4. En déduire une hypothèse qui pourrait expliquer le lien entre la résistance de l'insecte au buprofézine et la présence de bactéries du genre *Serratia*.

2. Les biopesticides à ARN interférent, une alternative aux pesticides chimiques

2.1. Principe des biopesticides à ARN interférent

Une nouvelle catégorie de pesticides a été développée pour faire face à la résistance des insectes vis-à-vis des pesticides chimiques. Cette nouvelle catégorie de pesticides, nommée biopesticides, cible l'ARN messager (ARNm), un ARN clé de la cellule.

Le **document 3** présente une schématisation du dogme de la synthèse protéique, une modélisation du mécanisme d'action des ARN interférents (ARNi) dans la cellule et une expérience réalisée sur des souris transgéniques pour mettre en évidence l'action des ARNi.

Q5. Montrer que l'ARNm est indispensable à la synthèse protéique et donner la signification scientifique de l'expression « le gène est exprimé ».

Une expérience est effectuée sur des souris transgéniques en développement, de la cellule-œuf au stade embryonnaire « morula », pour illustrer l'action des ARN interférents.

Q6. Montrer que le gène de la GFP est exprimé au cours du développement de la souris transgénique.

Q7. Expliquer le rôle de l'expérience réalisée dans les conditions b.

Q8. Analyser la totalité de l'expérience et montrer que son résultat est cohérent avec la modélisation présentée.

2.2. Mesure de l'efficacité des ARNi par RT-qPCR

La mesure de l'efficacité des biopesticides à ARNi peut s'effectuer par quantification en temps réel de l'ARNm ciblé dans la cellule. La technique utilisée est la « PCR quantitative après transcription inverse » ou RT-qPCR (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction).

2.2.1. Purification des ARNm à partir des ARN totaux présents dans les cellules d'insectes

Dans les cellules eucaryotes, les ARN messagers (ARNm) ne représentent qu'environ 5 % des ARN synthétisés. Les ARNm sont les seuls ARN qui subissent une modification post-transcriptionnelle pour augmenter leur stabilité. Cette modification consiste en l'ajout d'une queue de poly-Adénosine à l'extrémité 3'.

Cette particularité est utilisée pour purifier par chromatographie d'affinité les ARNm, à partir des ARN totaux d'une cellule.

Le **document 4** présente les étapes de la séparation par chromatographie d'affinité des ARNm à partir de l'ensemble des ARN d'un extrait cellulaire.

Q9. Expliquer, à l'aide d'un schéma annoté, le principe de la liaison des ARNm à la résine, puis le principe de leur élution.

2.2.2. Quantification des ARNm par RT-qPCR

La RT-qPCR permet de quantifier en temps réel les ARN au sein d'un échantillon biologique.

La technique est réalisée en deux étapes :

- une transcription inverse (reverse transcription, RT) des ARN cibles en ADN
- puis une PCR quantitative en temps réel rendue possible par l'utilisation d'un fluorophore : le SYBR® Green.

Le **document 5** présente le principe de la RT-qPCR.

Q10. Argumenter le choix de l'ADN polymérase à ajouter dans le mix pour réaliser l'étape 1 et celle à utiliser pour l'étape 2 de la RT- qPCR.

Q11. Déterminer la séquence de l'amorce 1 permettant d'obtenir des ADNc à partir des ARNm lors de l'étape de transcription inverse dans la RT-qPCR.

Q12. Montrer que le nombre de molécules d'ADNc produites est identique au nombre de molécules d'ARNm de départ.

Le **document 6** présente la séquence du gène *delta* à amplifier et celle de deux couples d'amorces à disposition. Les règles de détermination de la température d'hybridation sont également rappelées.

Q13. Argumenter, à l'aide d'un schéma annoté, le choix du couple d'amorces à utiliser pour d'amplifier la séquence d'ADNc du gène *delta*.

Q14. Calculer les températures de fusion des amorces choisies puis argumenter le choix d'une température d'hybridation.

Le **document 7** présente une méthode pour quantifier l'ADNc selon la fluorescence produite en temps réel pendant la qPCR.

Q15. Déterminer graphiquement le cycle seuil (Ct) de chaque solution étalon d'ADN.

Q16. Montrer par un graphique que la valeur du Ct est proportionnelle au logarithme du nombre de copies d'ADNc initial.

Q17. Expliquer l'aspect décroissant du graphique obtenu.

Q18. Proposer une démarche à suivre pour déterminer la quantité d'ARNm dans un échantillon.

2.2.3. Résultats expérimentaux

Pour vérifier l'efficacité des biopesticides à ARN, les chercheurs injectent aux insectes en stade nymphe un ARNi qui cible l'ARNm codant la protéine Delta, essentielle au développement de l'insecte vers le stade adulte.

L'ARNm codant la protéine Delta est quantifié par RT-qPCR dans les cellules d'insecte, 1 jour et 5 jours après injection.

Les résultats sont présentés dans le **document 8**.

Q19. Montrer que les lots 1 et 3 sont des lots témoins.

Q20. Analyser les résultats obtenus pour conclure sur l'efficacité de l'ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine Delta et sur la stabilité de son action.

2.3. Effet sur la survie et le phénotype des insectes

Le taux de survie des insectes est quantifié de 1 à 6 jours après l'injection des ARNi pour différentes doses d'ARNi. Les résultats sont présentés dans le **document 9**.

Q21. Argumenter le choix de la dose la plus pertinente d'ARNi à injecter pour un effet biopesticide.

Q22. Discuter l'aspect de la courbe correspondant à l'injection d'ARNi-GFP.

Une étude du phénotype est réalisée au stade « Macroptère » de l'insecte *Nilapavarta lugens*.

Le **document 10** présente des photographies des insectes traités avec l'ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine GFP ou avec l'ARNi ciblant l'ARNm d'une protéine de développement.

L'expérience est également effectuée avec un ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine Delta. Les résultats obtenus sont comparables.

Q23. Indiquer une différence morphologique de l'insecte induite par l'injection de l'ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine de développement.

Q24. Émettre une hypothèse reliant le phénotype observé dans le **document 10** au faible taux de survie constaté dans le **document 9** pour les insectes traités par l'ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine Delta.

3. Bilan

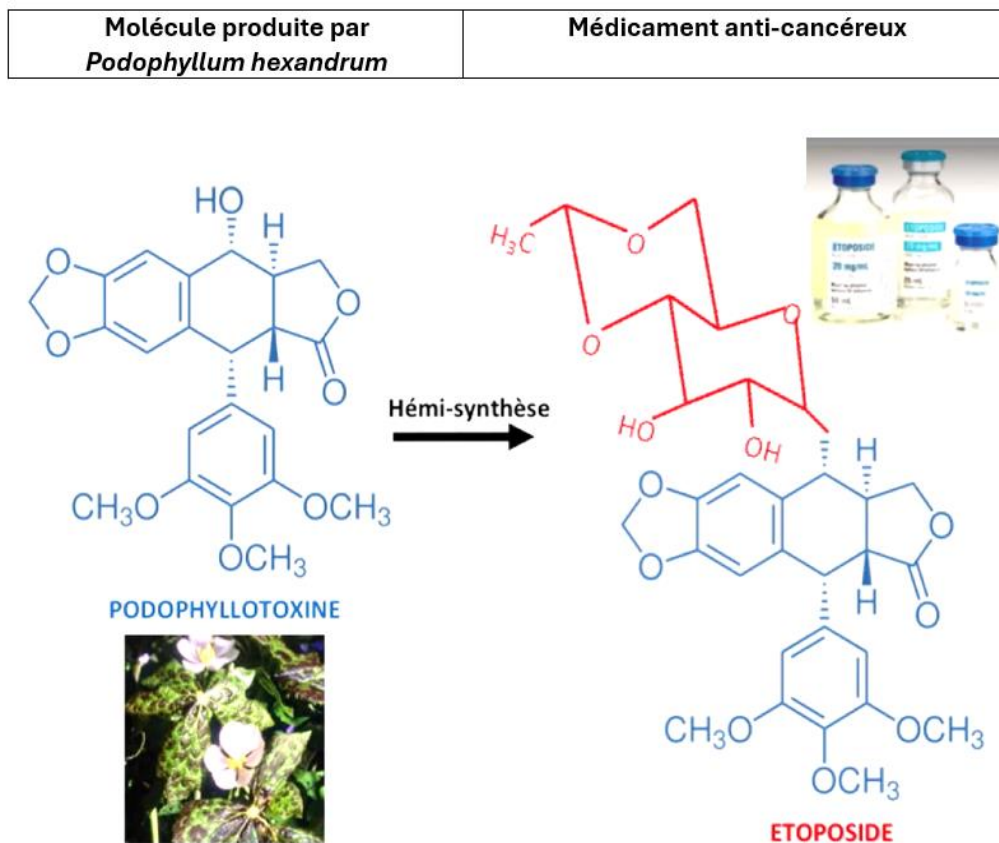
Q25. Récapituler les critères pour montrer l'efficacité de la technique d'ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine Delta comme biopesticide contre *Nilapavarta lugens*.

Le **document 11** présente plusieurs articles portant sur l'utilisation des ARNi.

Q26. Présenter en quelques phrases pourquoi l'usage des biopesticides fait l'objet de débats.

Partie 2 - HealthTech : Bioproduction végétale d'un anticancéreux, la podophyllotoxine

Les plantes ont toujours été une source précieuse de médicaments. Ainsi l'étoposide, un médicament indiqué dans le traitement de certains cancers et qualifié d'« essentiel » par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), est produit à partir de la **podophyllotoxine (PTOX)**, une molécule extraite d'une plante himalayenne : *Podophyllum hexandrum*.



En raison de son intérêt dans le domaine de la santé, *Podophyllum hexandrum* fait l'objet d'une cueillette intensive excédant ses capacités de régénération naturelle : la plante apparaît désormais sur l'appendice II du CITES (Convention for international trade in endangered species) répertoriant les espèces menacées de disparition.

Bien que techniquement possible, la synthèse chimique de la PTOX représente un coût très important. La recherche d'une source rentable et durable de PTOX pour produire l'étoposide est donc un enjeu à la fois de Santé publique et de maintien de la biodiversité.

1. Recherche d'une source végétale durable de PTOX

Des études menées sur différentes plantes du genre *Linum* ont montré que plusieurs espèces de lin (*Linum flavum*, *Linum mucronatum*, *Linum album*) peuvent accumuler dans leurs racines des quantités exploitables de PTOX ainsi que des molécules apparentées qui présentent des propriétés cytotoxiques. Ces plantes sont donc de bons candidats pour la production de médicaments anticancéreux car capables de détruire des cellules cancéreuses (cytotoxiques). Elles disposent cependant d'un faible volume de racines qui implique que leur exploitation industrielle soit liée à la faisabilité de l'amplification de leur production racinaire.

Le **document 12** présente l'impact d'une infection par deux bactéries du genre *Agrobacterium* sur le lin jaune, *Linum flavum*.

Q27. Argumenter le choix d'*Agrobacterium rhizogenes* pour induire un phénotype d'intérêt chez *Linum flavum*.

Tournez la page S.V.P.

Un plant de *Linum flavum* est infecté par *Agrobacterium rhizogenes* en vue de la production de lignées végétales présentant le phénotype d'intérêt. Les lignées obtenues sont ensuite analysées par biologie moléculaire, PCR et RT-PCR pour deux lignées, HRLF15.2 et HRLF94.2. Les résultats sont présentés dans le **document 13**.

Q28. Analyser les résultats de PCR des pistes 1 et 2 pour identifier les gènes présents dans la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* et dans une plante non infectée.

Q29. Analyser les résultats obtenus pour le gène *Vir-D* et en déduire si les bactéries *Agrobacterium rhizogenes* sont présentes ou non au niveau des racines des lignées HRLF analysées.

Q30. Analyser les résultats de PCR pour montrer que les lignées HRLF sont obtenues par transfert de gènes.

Q31. Expliquer en quoi la RT-PCR sur l'actine (*ACTIN-2*) est un contrôle.

Q32. Analyser les résultats de la RT-PCR pour montrer que le phénotype « chevelu racinaire » est lié à l'expression des gènes transférés des bactéries *Agrobacterium rhizogenes* à la racine.

Les lignées obtenues par infection par des bactéries *Agrobacterium rhizogenes* et présentant un phénotype « chevelu racinaire » sont dites « transformées ».

2. Extraction et purification de la podophyllotoxine

Après 14 jours de croissance racinaire d'une lignée de *Linum flavum* transformée dans un milieu de culture adapté, on cherche à extraire la molécule d'intérêt à partir du « chevelu racinaire » pour vérifier que la plante produit de la PTOX.

Les « chevelus racinaires » sont broyés dans le tampon d'extraction le plus adapté.

Le **document 14** présente une comparaison de l'efficacité d'extraction de la PTOX selon différents paramètres.

Q33. Analyser les résultats expérimentaux pour identifier le solvant d'extraction le plus efficace et discuter de l'influence de la durée d'extraction sur la quantité de PTOX extraite.

Après broyage, plusieurs techniques de fractionnement sont mises en œuvre à partir de l'extrait racinaire pour disposer d'un échantillon exploitable en chromatographie de partage sur colonne en phase inversée.

Q34. Proposer une technique de fractionnement et argumenter le choix de la fraction à retenir contenant la PTOX.

Après l'étape de fractionnement, deux molécules chimiquement proches, la PTOX et la 6-méthoxy podophyllotoxine (6-MPTOX), sont obtenues dans les mêmes fractions. La 6-MPTOX présente une toxicité supérieure à la PTOX et provoque beaucoup d'effets secondaires. Les industriels veulent donc davantage produire la PTOX que la 6-MPTOX. La séparation des molécules se fait par chromatographie de partage sur colonne en phase inversée (**document 15**).

Q35. Décrire les étapes de la chromatographie de partage sur colonne en phase inversée permettant l'obtention des différentes fractions d'élution.

Q36. En déduire le principe de séparation des molécules par chromatographie de partage sur colonne en phase inversée.

Q37. Analyser le chromatogramme pour déterminer le temps d'élution de la PTOX.

L'analyse de la production de PTOX et de la 6-méthoxy podophyllotoxine (6-MPTOX) est effectuée sur plusieurs lignées transformées. Les résultats sont présentés dans le **document 16**.

Q38. Argumenter l'intérêt de la transformation du plant de *Linum flavum* dans le cadre de la production de PTOX.

Q39. Argumenter le choix de retenir HRLF15.2 et HRLF94.2 pour la production industrielle de PTOX.

Q40. Récapituler les étapes de production de PTOX par le lin jaune génétiquement modifié.

3. Bioproduction de principe actif d'origine végétale à l'échelle industrielle

L'exploitation *in vitro* de cellules ou d'organes végétaux, comme la culture en bioréacteurs de racines manipulées génétiquement pour produire des métabolites en grande quantité est une bonne alternative à l'extraction à partir de plantes rares ou protégée. Cependant, les coûts d'infrastructure demeurent très élevés et il est difficile de conserver des conditions de parfaite stérilité en développant cette technique à l'échelle industrielle.

C'est pourquoi des biologistes de l'Institut National de la Recherche Agronomique et de l'Environnement (INRAE) ont imaginé une technique de culture des plantes entières en condition hors sol. L'innovation consiste à faire excréter les molécules d'intérêt par les racines pour les récupérer sans détruire les plantes, dans une solution qui sera alors plus pure qu'un extrait racinaire. Cette technique de culture a été dénommée « plantes à traire. »

Le **document 17** présente les étapes de production d'un métabolite d'intérêt par des plantes à traire.

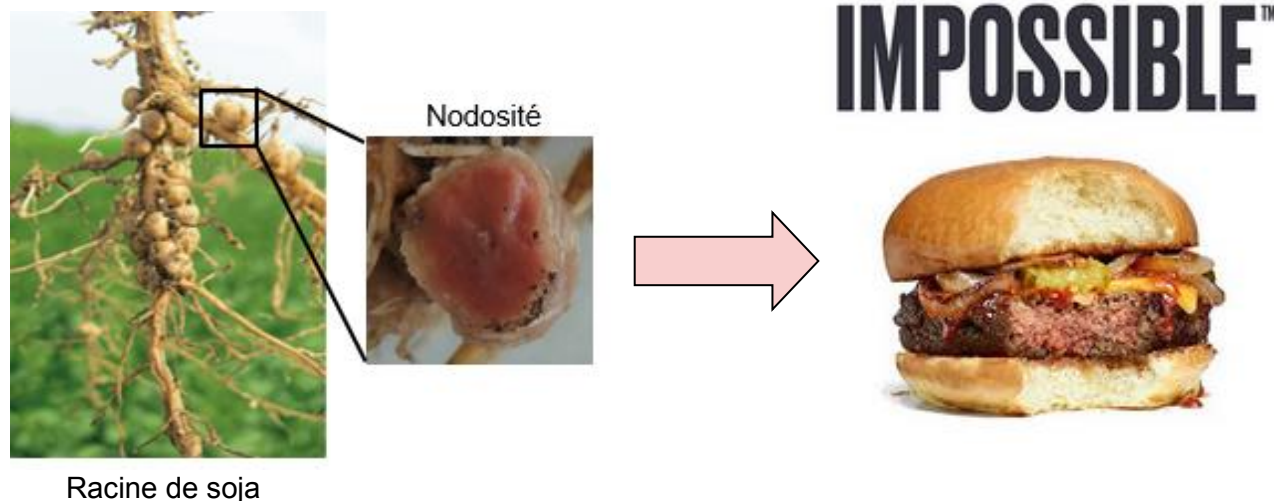
Q41. Proposer un organigramme des principales étapes de production de la PTOX, à l'aide « plantes à traire ».

4. Bilan

Q42. Argumenter l'intérêt d'une production de PTOX à partir de lin jaune génétiquement modifié cultivé selon la méthode des « plantes à traire » par rapport à une production de PTOX industrielle mobilisant des méthodes d'extraction racinaire et de purification classiques.

Les analogues de viandes à base de plantes sont conçus pour offrir une alternative aux produits carnés traditionnels. Ces produits, tels que les steaks végétaux, ont gagné en popularité en raison des préoccupations liées à l'impact environnemental de la production de viande, ainsi que des considérations sanitaires et éthiques sur le bien-être animal.

« Impossible Foods », une entreprise californienne fondée en 2011, s'est donné comme enjeu de trouver une molécule d'origine végétale qui pourrait conférer aux steaks végétaux des propriétés organoleptiques (texture, goût, couleur) plus proches de celles des produits animaux. Leur choix s'est porté sur une molécule naturellement présente dans les racines de soja, la leghémoglobine.



Après avoir dans un premier temps envisagé de cultiver du soja et d'en extraire la leghémoglobine, l'entreprise a rapidement choisi de produire la molécule d'intérêt en utilisant une levure, *Pichia pastoris* par des bioprocédés innovants de biologie synthétique.

On se propose ici d'identifier différents arguments expliquant la stratégie d'Impossible Foods :

- critères de choix de la leghémoglobine pour une production de steaks végétaux ;
- apports de la recherche fondamentale sur la production de leghémoglobine chez le soja ;
- modalités de production industrielle de leghémoglobine de soja par *Pichia Pastoris* ;
- enjeux de sécurité alimentaire pour la production industrielle de la leghémoglobine de soja par *Pichia pastoris*.

1. Choix de la leghémoglobine pour une production de steaks végétaux

Dans les cellules musculaires squelettiques, c'est la myoglobine, et notamment l'hème qu'elle contient, qui confère à la viande rouge une grande partie de ses propriétés organoleptiques : texture, goût et couleur. La structure tertiaire de la protéine est déterminante dans ce rôle.

Le **document 18** présente l'aspect de différentes protéines obtenues dans des cristaux analysés par diffraction aux rayons X.

Q43. Construire un tableau pour comparer les structures tridimensionnelles des trois protéines selon les critères suivants : structure secondaire, structure quaternaire, hétéro ou holoprotéine.

Données :

Hétéroprotéine : protéine formée d'un enchaînement d'acides aminés associé à des groupements non protidiques de natures diverses.

Holoprotéine : protéine constituée uniquement d'acides aminés.

Q44. Argumenter le choix d'« Impossible Foods » d'utiliser la leghémoglobine pour produire un steak végétal.

2. Apports de la recherche fondamentale sur la production de leghémoglobine chez le soja

Les ingénieurs d'« Impossible Foods » ont dans un premier temps envisagé de cultiver du soja, plante dans laquelle la leghémoglobine est naturellement produite au niveau racinaire dans certaines conditions bien connues.

2.1. Localisation de la leghémoglobine chez le soja

Le **document 19** présente l'organisation à différentes échelles de racines de soja, cultivées en présence ou en absence de bactéries du genre *Rhizobium*.

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont des bactéries libres du sol, bacilles Gram-négatif, mobiles grâce à des flagelles polaires ou péritriches, aérobies strictes ou micro-aérophiles.

Q45. Calculer :

- le plus grand diamètre de la nodosité observée sur l'image **C**,
- le plus grand diamètre de la cellule de type A indiquée par la flèche sur l'image **D**
- la longueur de la vésicule sur l'image **F**.

Q46. Montrer que l'élément visible dans la vésicule des cellules de type A peut correspondre à une bactérie.

Q47. Montrer que la présence de leghémoglobine chez le soja est corrélée à la présence des bactéries du genre *Rhizobium*.

2.2. Rôle de la leghémoglobine chez le soja

Cette partie a pour objectif de regrouper les connaissances fondamentales permettant de comprendre pourquoi la leghémoglobine est synthétisée chez le soja en présence de bactéries du genre *Rhizobium*.

Le **document 20** regroupe un ensemble d'informations concernant les interactions entre les bactéries du genre *Rhizobium* et le soja.

Q48. Expliquer l'intérêt nutritionnel des interactions entre les bactéries du genre *Rhizobium* et le soja pour chacun des deux partenaires.

Les bactéries du genre *Rhizobium* ont la capacité d'utiliser le diazote de l'air, N_2 , comme source d'azote grâce à un complexe enzymatique : la nitrogénase.

La nitrogénase est irréversiblement dénaturée en présence de dioxygène alors qu'elle catalyse une succession de réactions endergoniques nécessitant un catabolisme énergétique aérobie.

Q49. Proposer une hypothèse sur le rôle de la leghémoglobine.

Q50. Expliquer pourquoi la leghémoglobine est indispensable dans l'interaction soja - *Rhizobium*.

2.3. Les limites de la synthèse de la leghémoglobine *in vivo* chez le soja

Quelques données quantitatives sont fournies :

Masse de leghémoglobine dans un steak d'Impossible Foods	150 mg
Nombre moyen de nodosités par plant de soja	25
Masse moyenne d'une nodosité de plant de soja	10 mg
Masse moyenne de leghémoglobine par unité de masse de nodosité de plant de soja	20 mg.g ⁻¹

Q51. Déterminer par le calcul le nombre de plants de soja nécessaires pour fabriquer un steak « Impossible Foods ».

Le grand nombre de plants à traiter et les difficultés d'extraction et de purification de la leghémoglobine à partir des nodosités de soja ont rapidement conduit les ingénieurs d'« Impossible Foods » à abandonner la piste d'une production de leghémoglobine *in vivo* chez la plante.

3. Modalités de la production industrielle de la leghémoglobine de soja par *Pichia pastoris*

Les ingénieurs d'« Impossible Foods » se sont ré-orientés vers une production de la protéine leghémoglobine par la levure *Pichia pastoris*. L'innovation biotechnologique de l'entreprise repose sur l'utilisation de nouveaux principes de bioprocédés : l'ingénierie métabolique et la biologie de synthèse comme décrit dans le **document 21**.

Q52. Rédiger un argumentaire pour l'utilisation de *Pichia pastoris* dans une bioproduction industrielle de leghémoglobine de soja.

En vue de rendre *Pichia pastoris* capable de produire de la leghémoglobine par génie génétique, les ingénieurs se sont intéressés aux voies de biosynthèse de l'hème contenu dans la leghémoglobine de soja. Le **document 22** présente ces voies.

Q53. Expliquer pourquoi les ingénieurs ont retenu la voie bactérienne de biosynthèse de l'hème pour le clonage chez *Pichia pastoris*.

Le **document 23** présente les constructions génétiques et le processus de culture qui ont permis de rendre *Pichia pastoris* capable de produire de la leghémoglobine.

Q54. Argumenter la nécessité d'une transformation génétique de *Pichia Pastoris* par les quatre plasmides pour permettre la synthèse de la leghémoglobine.

Q55. Expliquer la stratégie utilisée pour sélectionner les levures transformées par les quatre plasmides.

Q56. Montrer que l'ajout de méthanol dans le milieu de culture permet la synthèse de leghémoglobine.

4. Enjeux de sécurité alimentaire de la production industrielle de la leghémoglobine de soja par *Pichia pastoris*

La leghémoglobine est une molécule naturelle que l'on trouve dans certains tissus végétaux. Toutefois, l'évaluation de sa sécurité devient cruciale lorsqu'elle est produite par génie génétique pour être utilisée dans des produits destinés à l'alimentation humaine. Le test de Ames, présenté dans le **document 24**, est utilisé pour évaluer la génotoxicité d'une molécule *in vitro*.

Q57. Expliquer le lien entre le nombre de colonies obtenues après incubation et l'effet mutagène de la substance à analyser.

Q58. Expliquer l'intérêt de réaliser le test de Ames avec et sans les extraits de foie de rat S9.

Q59. Analyser les résultats obtenus pour conclure sur la génotoxicité de la leghémoglobine en commençant par les contrôles pour valider la méthode.

Une autre expérience visant à l'évaluation du produit consiste à vérifier sa digestibilité par les enzymes humaines. Elle est présentée dans le **document 25**.

Q60. Présenter les rôles et les résultats attendus pour les contrôles : Gel A et Gel B d'une part, et puits 1 et 11 d'autre part.

Q61. Analyser l'ensemble des résultats pour déterminer si la préparation de la leghémoglobine purifiée à partir de *Pichia Pastoris* est digestible ou non.

5. Bilan

Q62. Représenter la stratégie de développement du steak végétal à base de leghémoglobine par « Impossible Foods » sous forme de logigramme.

Synthèse – Des innovations en bioproductions industrielles durables grâce à la recherche fondamentale
--

La recherche fondamentale en biologie végétale vise, à travers l'étude de processus fondamentaux de la vie des plantes, à répondre aux défis sociétaux majeurs en nutrition, santé, agriculture et environnement.

Parallèlement le développement d'outils performants en bio-informatique ou encore en génie génétique permet un nombre important d'innovations en biotechnologies.

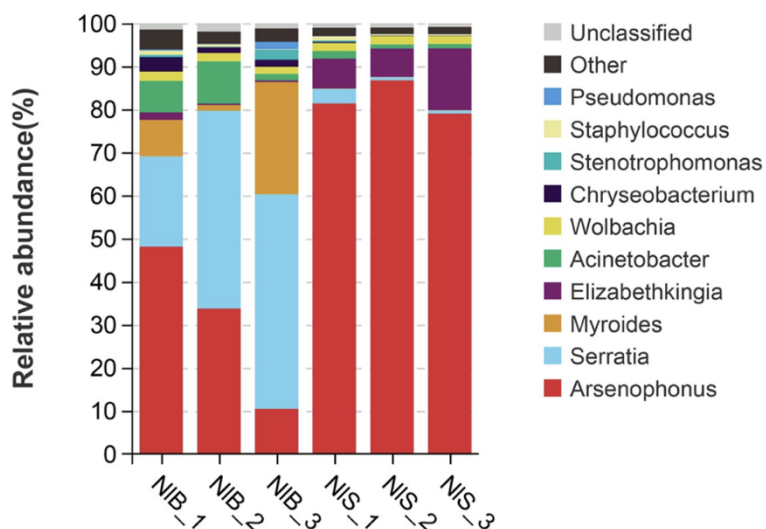
Au croisement de ces deux disciplines, c'est toute la communauté scientifique académique et privée, qui peut ainsi développer des technologies de dernière génération appliquée pour une bioproduction à grande échelle et durable.

Q63. Illustrer par des exemples en quoi la recherche fondamentale en biologie végétale a permis des innovations dans différents domaines des biotechnologies. (une demi-page maximum)

Document 1 : Proportion des genres bactériens dans le microbiote de *Nilaparvata lugens*

Source : Zeng et coll. *PLOS pathogens*, 2023 ; <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011828>

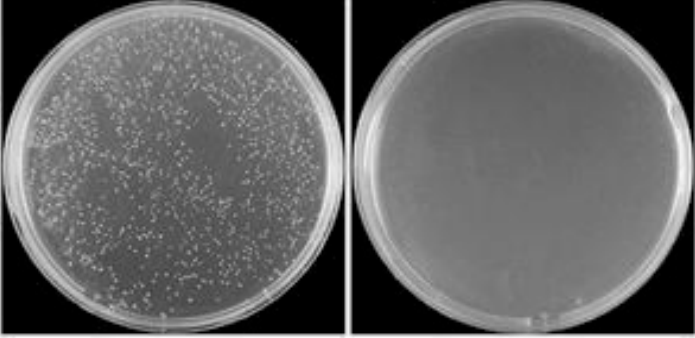
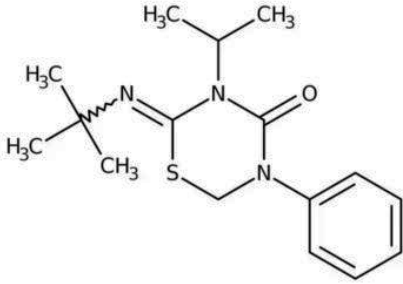
Le microbiote de trois insectes résistants au buprofezine (NIB_1, NIB_2, NIB_3) et de trois insectes sensibles au buprofezine (NIS_1, NIS_2, NIS_3) est étudié par biologie moléculaire puis analysé par bioinformatique. Les proportions relatives des différents genres bactériens constituant le microbiote de chaque insecte est représenté ci-dessous.



Document 2 : Étude des propriétés culturelles de *Serratia*

Source : Zeng et coll. *PLOS pathogens*, 2023 ; <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011828>

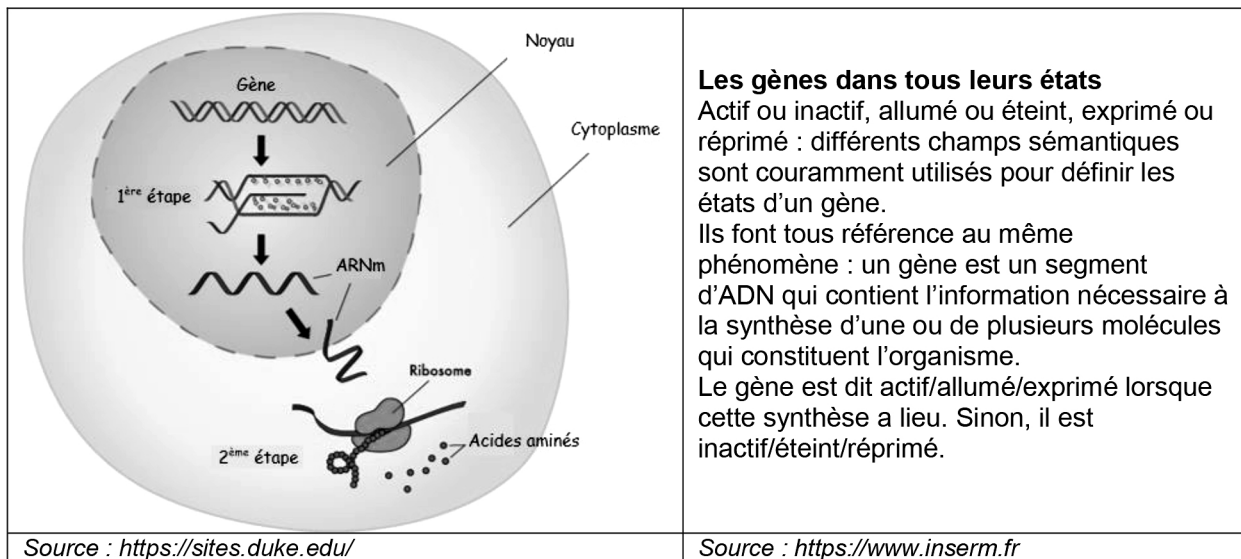
Une souche de *Serratia* est mise en culture sur milieu minimum additionné (+) ou non (-) de buprofézine. L'expérience est effectuée en milieu solide par un ensemencement en surface. Après 24h de culture à 37°C, les différents milieux ensemencés sont observés.

Culture sur milieu minimum additionné de buprofézine (+) ou non (-)	Formule développée de la molécule de buprofézine <i>Fisher Scientific</i> , https://www.fishersci.fr/
 + -	

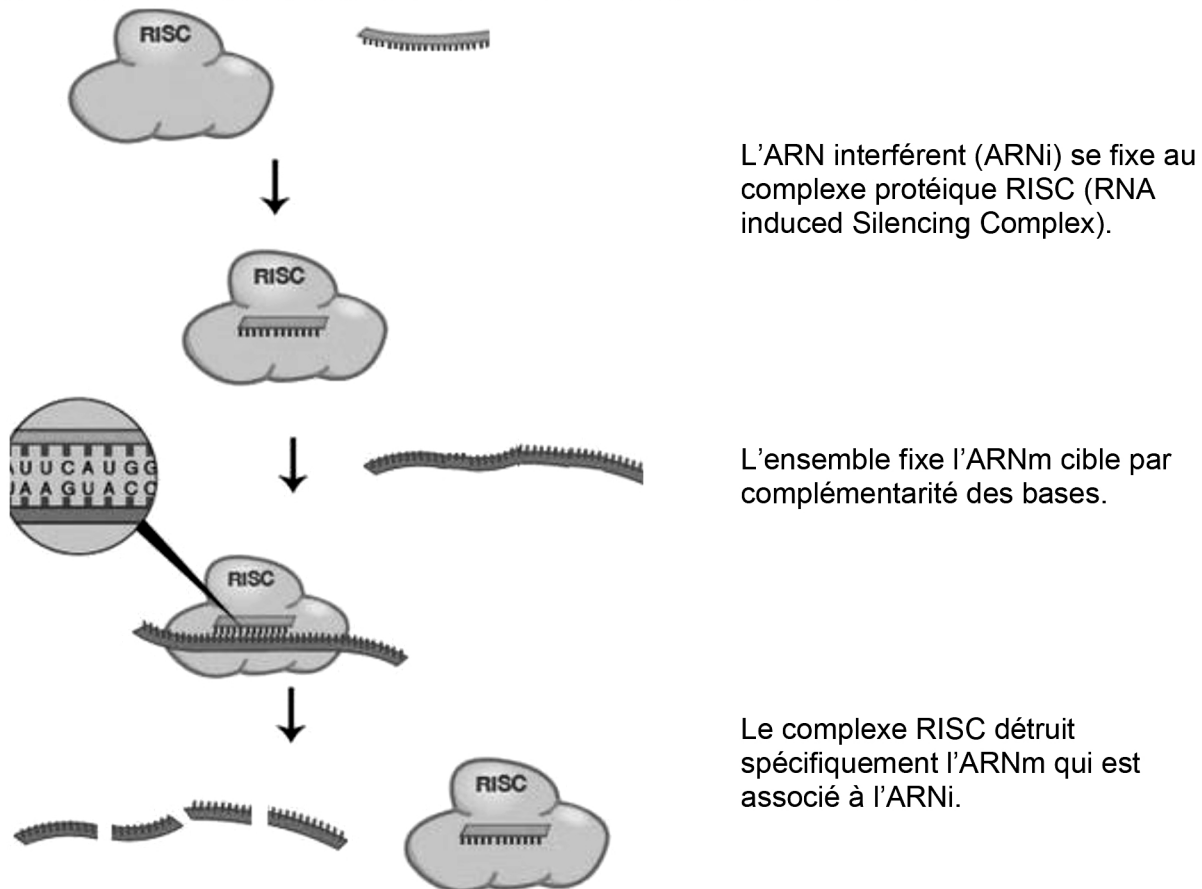
Document 3 : Mode d'action des ARNi dans une cellule

Les biopesticides à ARN interférents (ARNi) sont des ARN de petite taille, capables d'interagir avec les ARNm.

L'expression génétique : étapes de la synthèse protéique dans la cellule à partir d'un gène



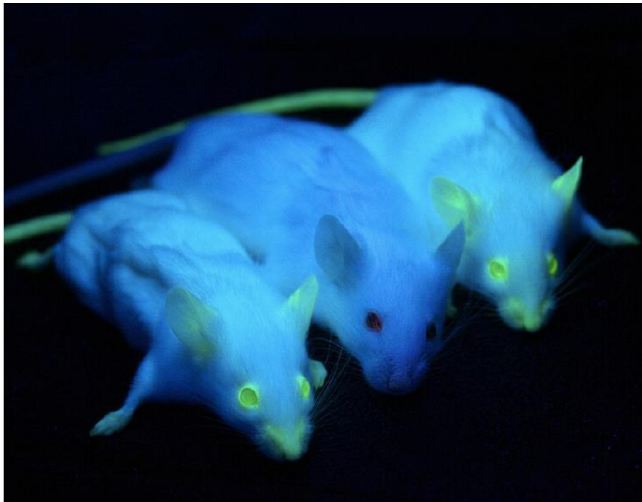
Modélisation : mécanisme d'action d'un ARNi sur son ARNm cible



Tournez la page S.V.P.

Effet des ARNi sur un organisme eucaryote

Source : Wanny et coll., *Nature cell biology*, 2000 ; <https://doi.org/10.1038/35000016>



Deux souris transgéniques GFP-positives (à gauche et à droite) entourant une souris non transgénique (au centre).

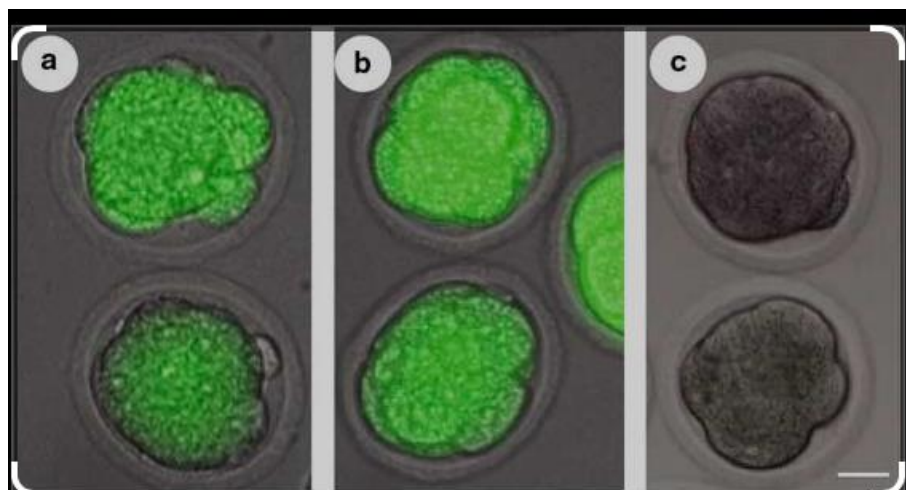
La GFP fluoresce en vert sous la lumière UV utilisée.

Source : Moen et coll. *BMC Cancer*. 2012 ; <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-21>

Des souris transgéniques GFP-positives sont fécondées puis des cellules-œuf exprimant la GFP sont prélevées. Ces cellules sont mises en culture après traitement selon les conditions différentes :

- a : cellule œuf non injectée par un ARNi
- b : cellule œuf après injection avec un ARNi ciblant un ARNm qui n'est pas présent dans les cellules de souris
- c : cellule œuf après injection d'un ARNi ciblant l'ARNm de la GFP.

Les cellules-œuf se divisent durant quelques jours puis sont observées sous lumière UV au stade « morula » de 8 cellules. Les résultats sont présentés ci-dessous.



Document 4 : Purification d'ARNm par chromatographie d'affinité

Source : Fabien Cézard, BTS Biotechnologies 27 fiches Edition Dunod 2017

Les ARN messager (ARNm) contiennent une succession de ribonucléotides « Adénosine » à leur extrémité 3', appelée « queue poly(A) ».

La chromatographie d'affinité utilisée se déroule dans une colonne.

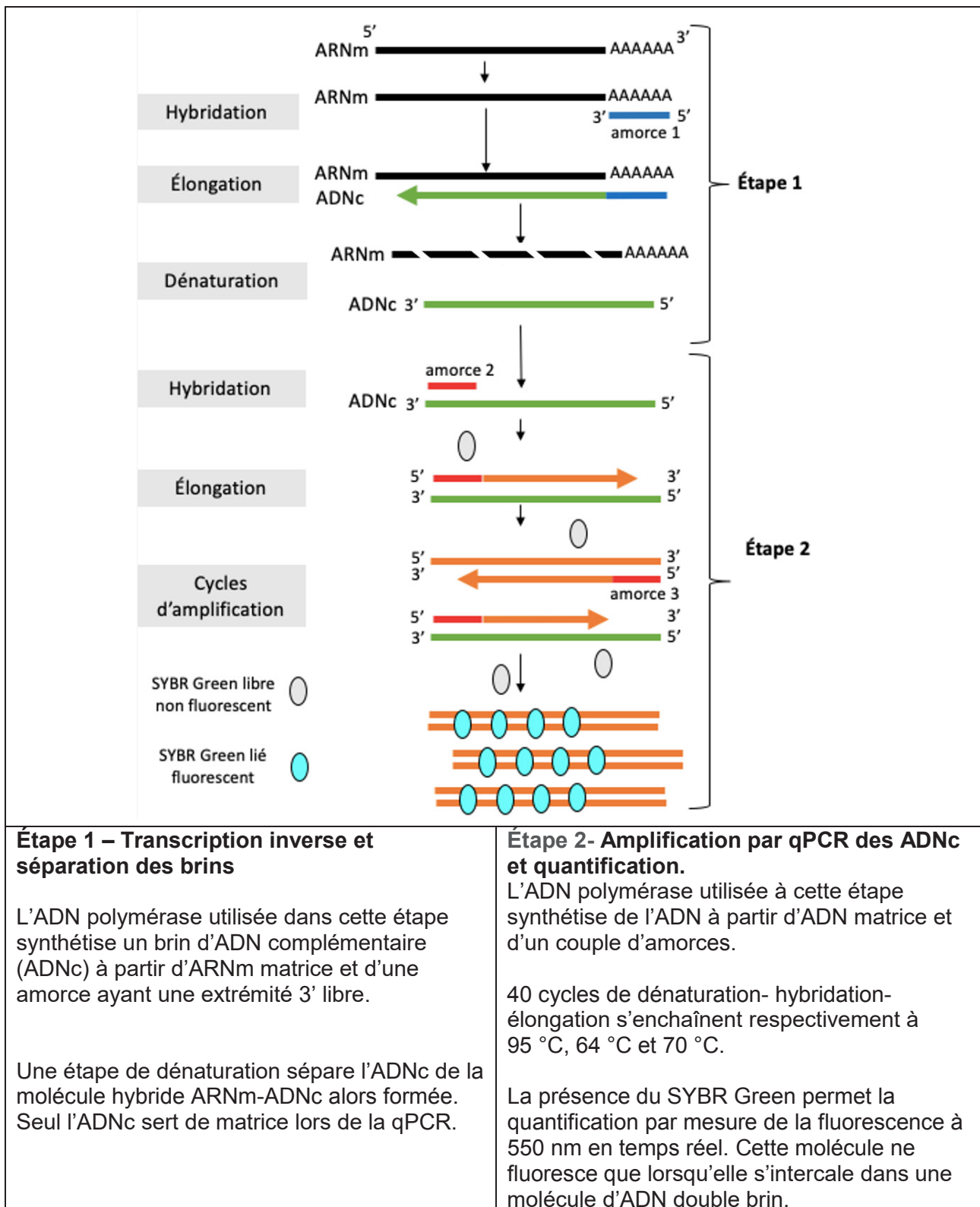
La phase stationnaire est une résine constituée de billes d'agarose ou polyacrylamide sur lesquelles sont greffées chimiquement des ligands, ici des oligo-dT, oligomères de désoxythymidine, noté TTTT.

Deux phases mobiles sont utilisées :

- pour le lavage : un tampon de faible force ionique ;
- pour l'élution : un tampon de forte force ionique.

Tournez la page S.V.P.

Document 5 : Principe de la RT-qPCR



Deux ADN polymérases sont nécessaires pour réaliser une RT-PCR :

Nom de la polymérase	Activité enzymatique	Résistance à 95°C
Taq Polymérase	ADN polymérase-ADN dépendante	Oui
Transcriptase inverse	ADN polymérase-ARN dépendante	Non

Document 6 : Mise au point de la PCR

Source : Yang et coll, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022 ; <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1023729>

Représentation de la portion du gène *delta* à amplifier lors de la qPCR :

Seules les séquences de chaque brin d'ADN s'hybridant avec les amorces sont représentées. Les séquences internes de l'ADN à amplifier sont représentées par des tirets.

5' CTCCCACTCCTACACCCAACACAA-----ACAGGAGCAGGTCTCAGAAGCA 3'
3' GAGGGTGAGGATGTGGGTTGTGTT-----TGTCCTCGTCCAGAGTCTTCGT 5'

Couples d'amorces disponibles :

Couple d'amorces	Amorce « sens »	Amorces « anti sens »
Couple 1	5' CTCCCACTCCTACACCCAACACAA 3'	5' TGCTTCTGAGACCTGCTCCTGT 3'
Couple 2	5' ACAGGAGCAGGTCTCAGAAGCA 3'	5' TTGTGTTGGGTGTAGGAGTGGGAG 3'

L'amorce sens s'hybride sur le brin 3' → 5'

L'amorce anti-sens s'hybride sur le brin 5' → 3'

Détermination de la température de fusion (T_m) :

Formule de Wallace permettant le calcul de la température de fusion (T_m) d'une amorce en degrés Celsius :

$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_C + n_G)$$

Avec :

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

Critère pour choisir la température d'hybridation des amorces (T_h) :

La température d'hybridation T_h de l'ADN cible doit être inférieure d'au moins 4°C au T_m de chaque amorce.

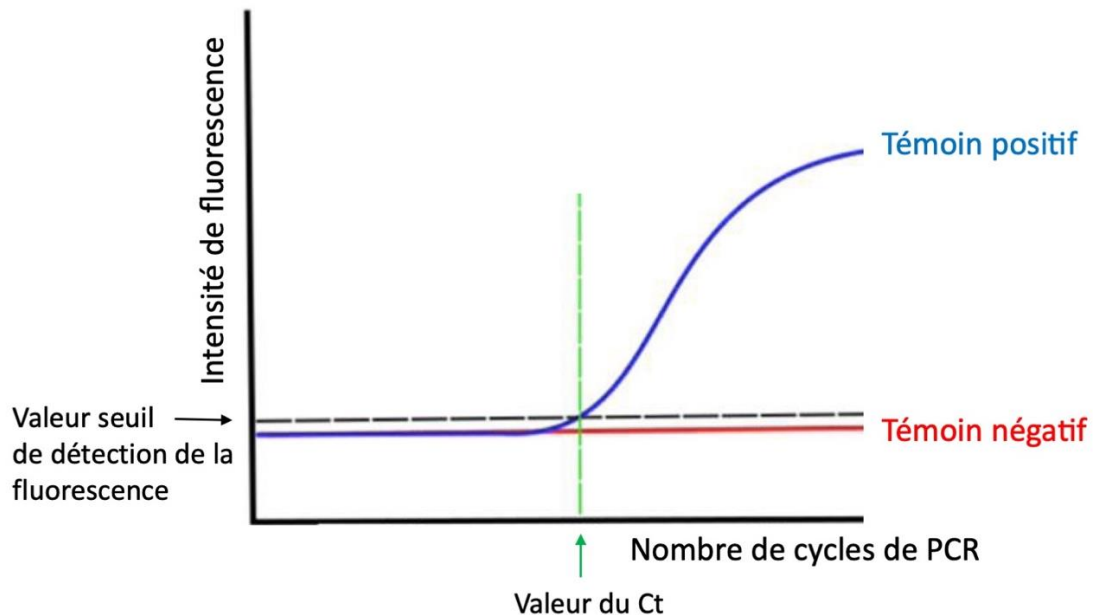
Tournez la page S.V.P.

Document 7 : Quantification de l'ADNc par qPCR en temps réel

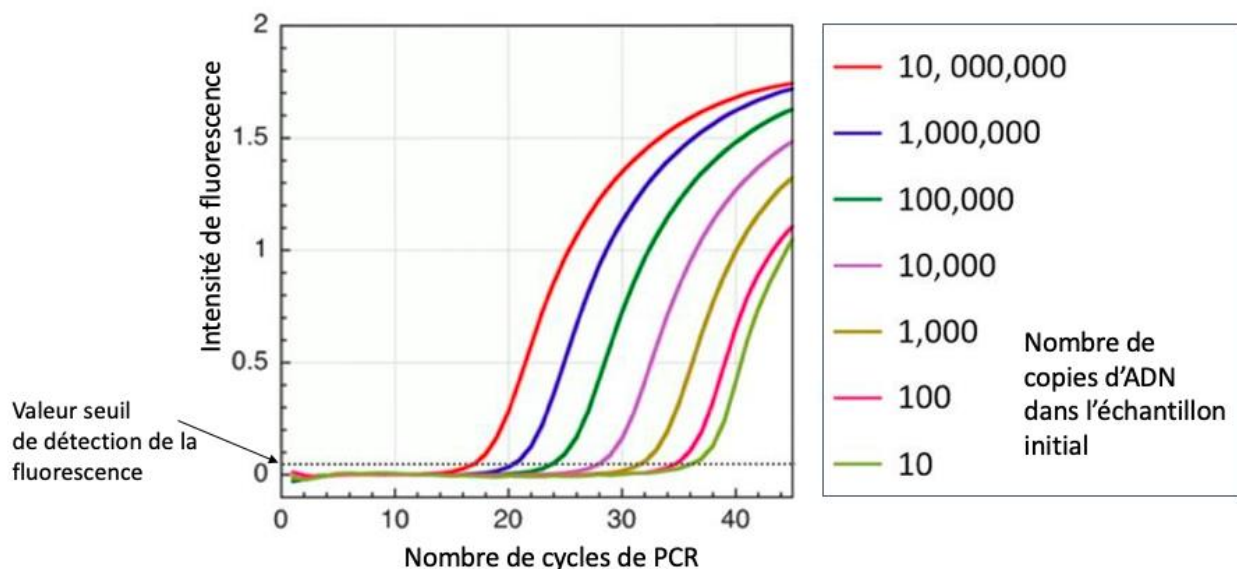
D'après <https://equine.ca.uky.edu> consulté le 21 octobre 2024

La quantification des ADNc initialement présents se fait en déterminant le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour obtenir une quantité d'amplicons permettant d'atteindre une fluorescence égale à la valeur seuil de détection de la fluorescence. Ce nombre de cycles est noté Ct (cycle threshold ou cycle seuil).

Méthode pour déterminer graphiquement la valeur de Ct :



Courbes d'amplification de 7 solutions étalons d'ADN par qPCR :



Règle sur les logarithmes :

$$\text{Nb copies ADN} = 10^{\log(\text{Nb copies ADN})}$$

Document 8 : Efficacité des ARNi ciblant le gène *delta*

Source : Yang et coll, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022 ; <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1023729>

Des insectes au stade nymphe sont répartis en 4 lots et reçoivent une injection d'ARNi ciblant l'ARNm de la GFP ou de la protéine Delta. Pour chaque lot, les insectes sont sacrifiés selon les critères expérimentaux décrits ci-dessous.

Les ARN totaux sont extraits de différents tissus, puis quantifiés. Une RT-qPCR réalisée sur une même quantité d'ARN totaux permet de mesurer la quantité d'ARNm codant la protéine Delta présente dans les cellules des insectes.

Donnée :

La GFP est une protéine produite par une méduse (*Aequorea victoria*) mais absente chez les insectes.

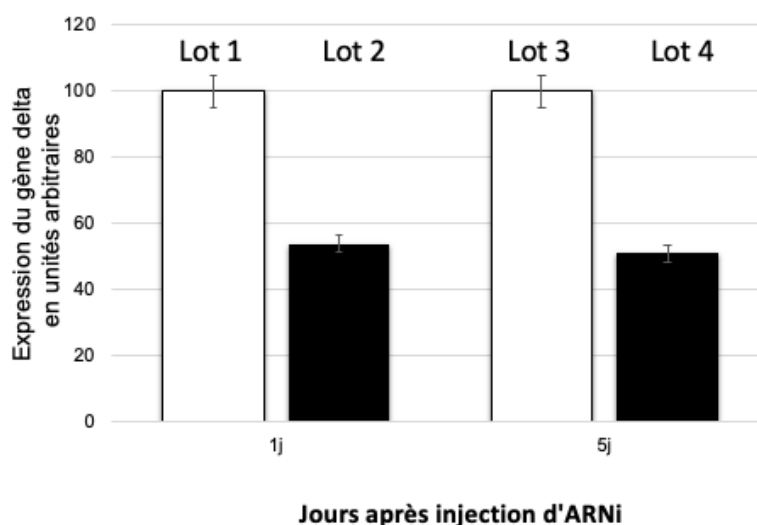
Stade nymphe: stade de développement de l'insecte entre la larve et l'adulte.

Conditions expérimentales :

Lot d'insectes	Traitement des insectes : injection d'un ARNi	Durée après injection
Lot 1	ARNi ciblant l'ARNm codant la GFP	1 jour
Lot 2	ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine Delta	1 jour
Lot 3	ARNi ciblant l'ARNm codant la GFP	5 jours
Lot 4	ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine Delta	5 jours

Résultats :

Les valeurs obtenues ont été calculées à partir des Ct préalablement déterminés dans les différents lots.



Estimation de l'efficacité

Diminution d'expression par rapport au témoin :	Interprétation
inférieure à 40 %	Technique inefficace
entre 40 et 70 %	Technique relativement efficace
supérieure à 70 %	Technique très efficace

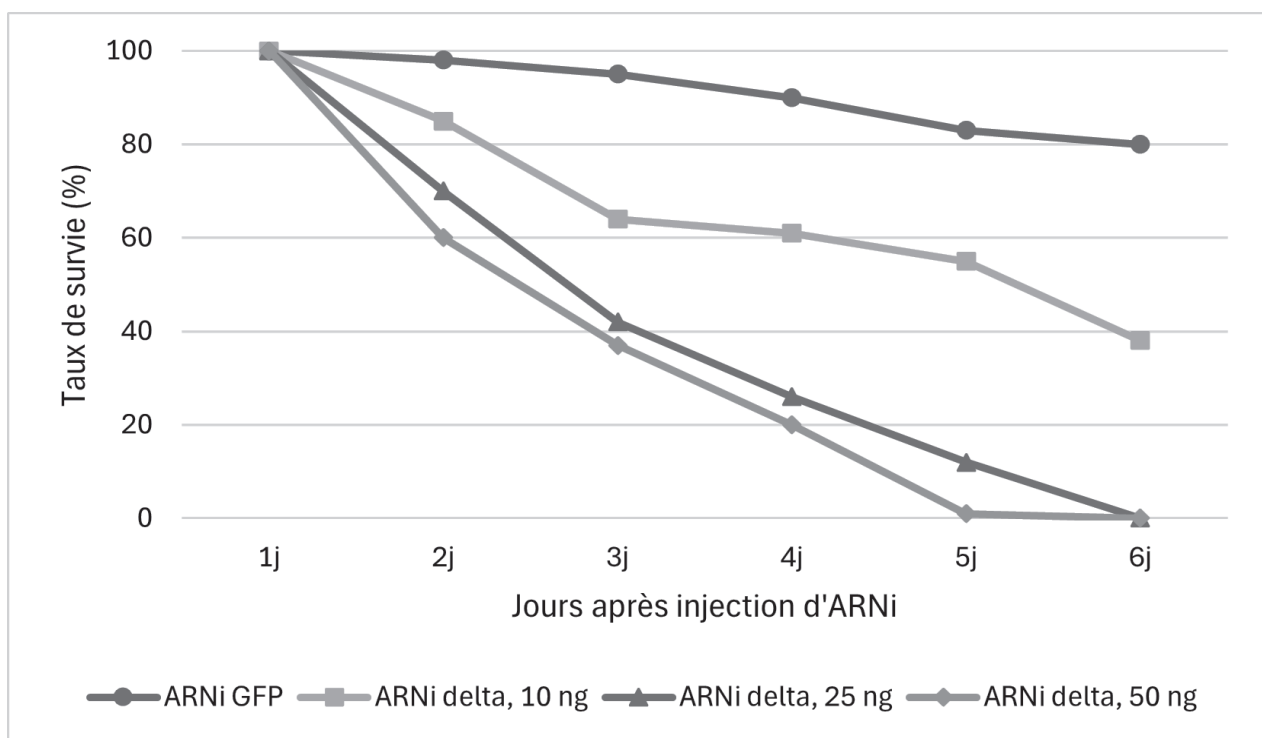
Tournez la page S.V.P.

Document 9 : Taux de survie de *Nilaparvata lugens* après injection de différentes doses d'ARNi

Source : Yang et coll, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022 ; <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1023729>

Une injection d'ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine GFP ou d'ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine Delta a été effectuée au stade de nymphe, sur environ 50 insectes *Nilaparvata lugens* pour chaque lot. Plusieurs doses d'ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine Delta ont été testées : 10 ng, 25 ng ou 50 ng par insecte. Le taux de survie des insectes est mesuré pour chaque dose sur les six jours suivant le traitement.

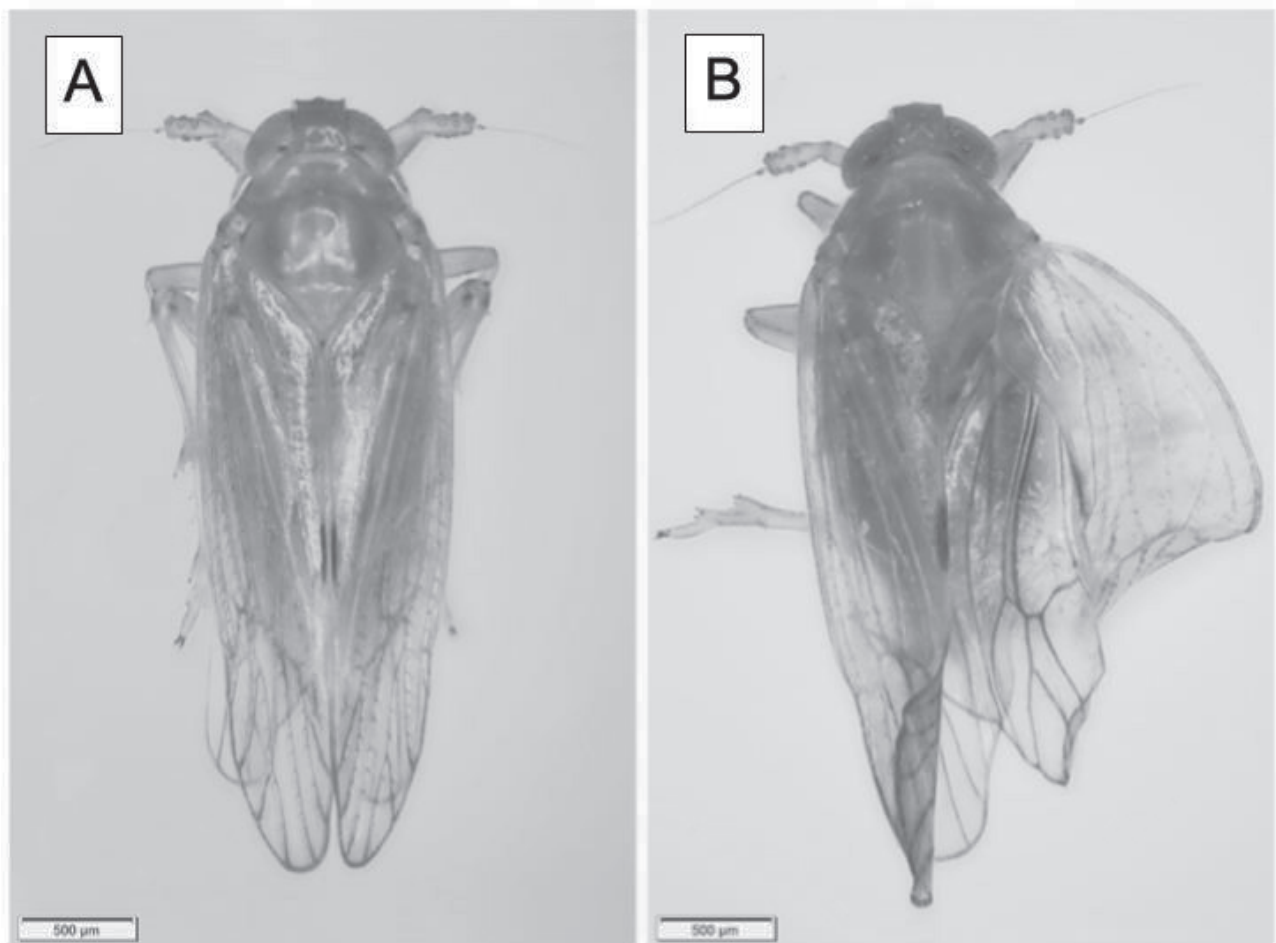
Le taux de survie visé chez l'espèce ciblée pour que le biopesticide soit considéré comme efficace doit être inférieur à 10 %. La dose à utiliser doit être la plus faible possible afin de limiter de potentiels effets secondaires sur d'autres espèces.



Document 10 : Phénotype des insectes

Source : Yang et coll, Front. Bioeng. Biotechnol., 2022 ; <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1023729>

Photographies des insectes traités avec l'ARNi ciblant l'ARNm codant la protéine GFP (figure A) et avec l'ARNi ciblant l'ARNm codant une protéine de développement (figure B)



Tournez la page S.V.P.

Document 11 : Pesticides et biopesticides

1. Les dangers des pesticides classiques sur la santé

Source : <https://www.inserm.fr/expertise-collective/pesticides-et-sante-nouvelles-donnees-2021/> consulté le 22/10/24

En considérant les études sur des populations qui manipulent ou sont en contact avec des pesticides régulièrement, et qui sont a priori les plus exposées, l'expertise confirme la présomption forte d'un lien entre l'exposition aux pesticides et six pathologies : lymphomes non hodgkiniens (LNH), myélome multiple, cancer de la prostate, maladie de Parkinson, troubles cognitifs, bronchopneumopathie chronique obstructive et bronchite chronique. Pour les LNH, il a été possible de préciser des liens (présomption forte) avec des substances actives (malathion, diazinon, lindane, DDT) et avec une famille chimique de pesticides (organophosphorés), et pour la maladie de Parkinson et les troubles cognitifs avec les insecticides organochlorés et les organophosphorés respectivement. Il s'agit essentiellement de pesticides pour lesquels les études se sont appuyées sur des biomarqueurs permettant de quantifier l'exposition. Les études toxicologiques confirment que les mécanismes d'action de ces substances actives et de ces familles de pesticides sont susceptibles de conduire aux effets sanitaires mis en évidence par les études épidémiologiques.

2. L'EPA* enregistre une nouvelle technologie de pesticides pour les cultures de pommes de terre

Source : <https://www.epa.gov/> publié le 23 décembre 2023

Ledprona est un nouveau type de pesticide qui repose sur un mécanisme naturel - appelé interférence de l'ARN (RNAi) - utilisé par les plantes et les animaux pour se protéger contre les maladies. Ledprona est un produit d'acide ribonucléique à double brin (dsRNA) pulvérisable qui cible le coléoptère de la pomme de terre du Colorado (CPB), un ravageur majeur des cultures de pommes de terre cultivée aux États-Unis. (...)

La nouvelle technologie des pesticides peut offrir des alternatives aux pesticides à base de produits chimiques qui peuvent présenter des risques potentiels plus élevés pour la santé humaine ou l'environnement ou avoir une efficacité réduite en raison de problèmes de résistance. (...).

En mai 2023, l'EPA a approuvé un permis d'utilisation expérimentale en vertu de la Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act pour les tests dans 10 États. En septembre 2023, l'EPA a ouvert une période de commentaires publics pour cette proposition d'enregistrement. L'EPA a examiné les commentaires reçus et estime qu'elle dispose de toutes les informations nécessaires pour étayer sa décision d'enregistrer cette nouvelle technologie de biopesticide. L'EPA a déterminé qu'il n'y a aucun risque de préoccupation pour la santé humaine et l'environnement, y compris aucun effet sur les espèces répertoriées en vertu de la loi sur les espèces en voie de disparition.

** L'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (Environmental Protection Agency ou EPA) est une agence indépendante du gouvernement des États-Unis, dont les activités sont contrôlées par le Comité des sciences, de l'espace et des technologies de la Chambre des représentants des États-Unis.*

3. Effets secondaires des biopesticides

Source : <https://www.quechoisir.org/enquete-agriculture-les-genes-des-nuisibles-cibles-n111094/> publié le 21/09/23

L'association Pollinis, qui œuvre à la protection des abeilles, bourdons, guêpes, papillons, fourmis, etc., remet en cause les propos rassurants de ces groupes industriels. En procédant à une analyse sur l'ADN de 2 500 espèces de pollinisateurs, elle a constaté que les gènes visés par les pesticides à ARNi étaient très proches de ceux d'un grand nombre de ces insectes. Ainsi, « 136 espèces de pollinisateurs pourraient être victimes d'effets hors cible » en raison de cette similarité génétique. Sur les 26 produits à ARNi étudiés, 14 provoqueraient « des effets mortels » sur eux. Un carnage à venir ? Une publication de l'OCDE relativise cependant ce risque.

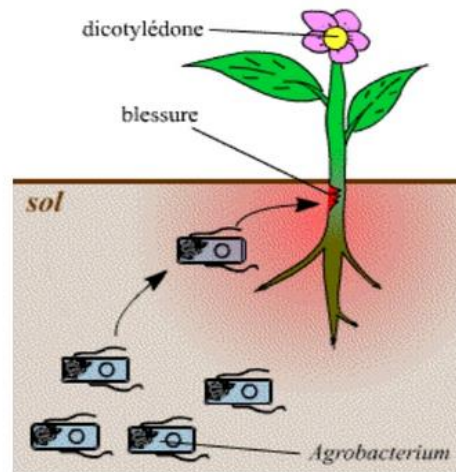
Document 12 : Modification du phénotype des plantes infectées par les bactéries du genre *Agrobacterium*

Source : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-transgenese-grace-a-agrobacterium-tumefaciens> consulté le 24/10/24

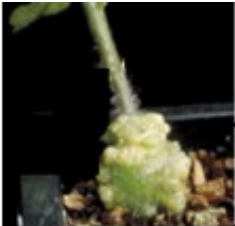
Infection de la plante par *Agrobacterium*

Les bactéries du genre *Agrobacterium* sont attirées par des composés phénoliques sécrétés par certaines plantes lorsqu'elles sont blessées. *Agrobacterium*, bactérie du sol, est capable de se fixer au niveau du tissu lésé. C'est le début d'une infection.

Les cellules végétales se multiplient alors de manière importante, donnant naissance à une formation tumorale se traduisant par une modification du phénotype racinaire dont l'aspect est différent selon l'espèce d'*Agrobacterium*.



Phénotypes induits par l'infection de *Linum Flavum* par différentes espèces d'*Agrobacterium* (Crété, 2006)

Lot A	Lot B	Lot C
Culture en absence de bactérie du genre <i>Agrobacterium</i>	Culture en présence d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Culture en présence d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
Aspect des racines après 15 jours en condition de culture comparable		
Phénotype sans infection	Phénotype « galle du collet »	Phénotype « hairy roots » ou « chevelu racinaire »
 tige racine	 galle du collet	 Chevelu racinaire

Tournez la page S.V.P.

Document 13 : Modifications liées à une infection par *Agrobacterium rhizogenes*

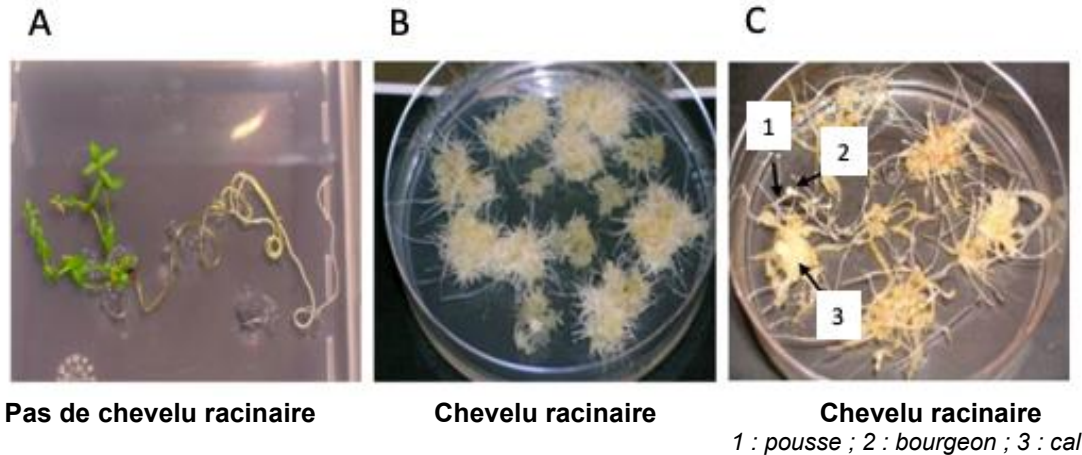
Modifications du phénotype de lignées des plantes *Linum flavum*

Source : Renouard et coll., Int. J. Mol. Sci. 2018 ; <https://doi.org/10.3390/ijms19040990>

Plusieurs lignées ont été produites et cultivées de manière à observer la production de racines poilues, également appelées « hairy roots » ou « à chevelu racinaire ».

- **A** : *Linum flavum* de type sauvage non infecté par *Agrobacterium rhizogenes*.
- **B et C** : *Linum flavum* infecté par *Agrobacterium rhizogenes*. Les deux lignées obtenues sont nommées : **lignée HRLF15.2** (expérience B) et **lignée HRLF94-2** (expérience C).

Les lignées sont photographiées après 4 semaines de culture.



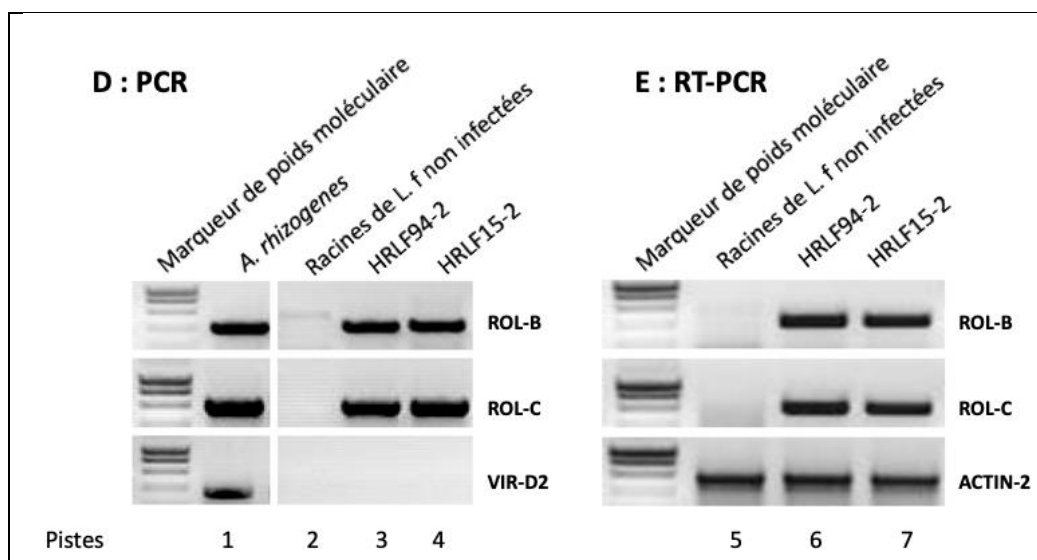
Modifications génétiques des racines des différentes lignées de *Linum flavum*

Les racines des différentes lignées de *Linum flavum* (L.f) obtenues sont lavées et désinfectées avant d'être broyées pour en extraire les acides nucléiques. Une PCR ou une RT-PCR ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques. Les produits d'amplification obtenus ont été déposés sur gel d'électrophorèse et le résultat de la migration est présenté après révélation des acides nucléiques.

- **D** : PCR sur l'ADN génomique extrait afin d'amplifier les gènes *ROL-B*, *ROL-C* et *VIR-D2*.
- **E** : RT-PCR sur les ARNm extraits afin d'évaluer l'expression des gènes *ROL-B*, *ROL-C* et *ACTIN-2*.

Donnée :

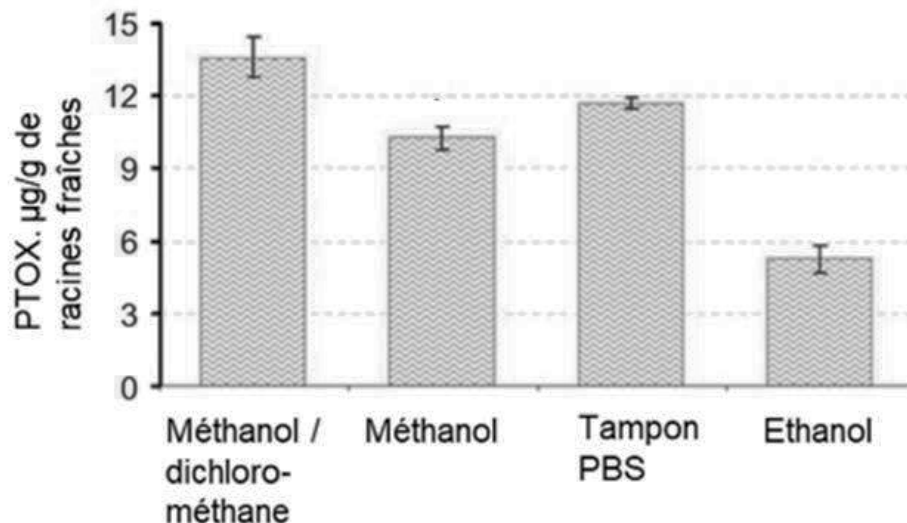
Le gène *ACTIN-2* est présent dans toutes les cellules eucaryotes ; il est transcrit en ARN messager dans les cellules en permanence.



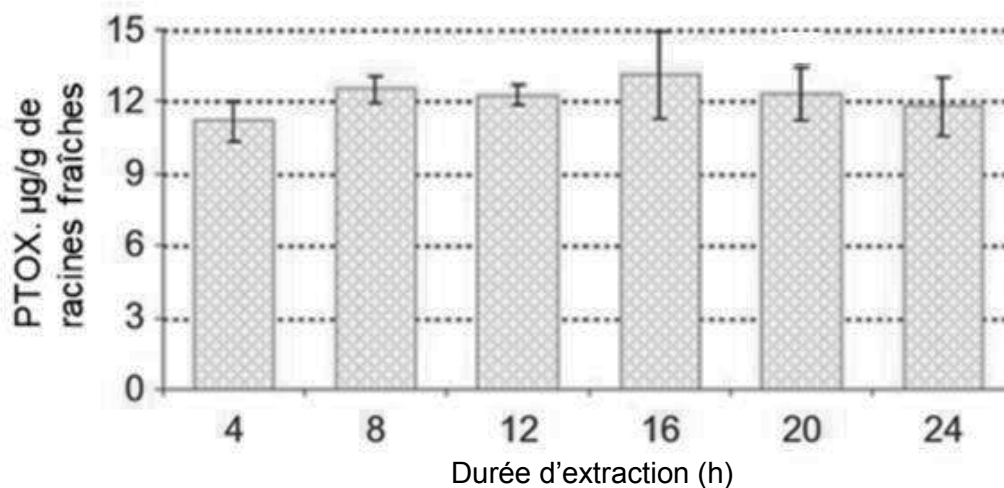
Document 14 : Effets de la variation des conditions d'extraction racinaire sur la quantité de podophyllotoxine extraite

Source: Yousefzadi et coll., *Pharm Biol.* 2010; <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.489564>

**Comparaison de l'efficacité de différents tampons d'extraction
(pendant 24h)**



Influence de la durée d'extraction sur la quantité de podophyllotoxine extraite dans un solvant d'intérêt



Les résultats expérimentaux sont représentés avec des barres d'erreurs.
Les barres d'erreur représentent l'incertitude sur la valeur mesurée.

Document 15 : Purification de la PTOX

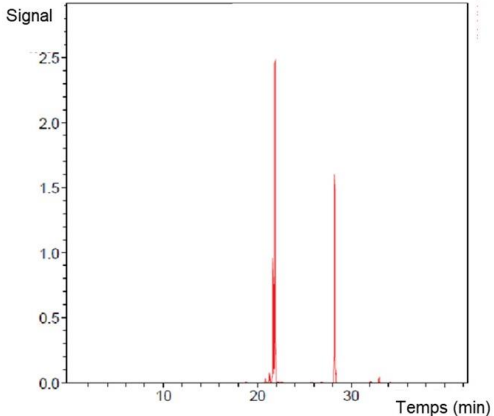
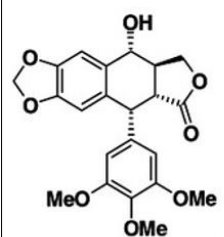
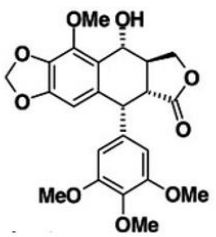
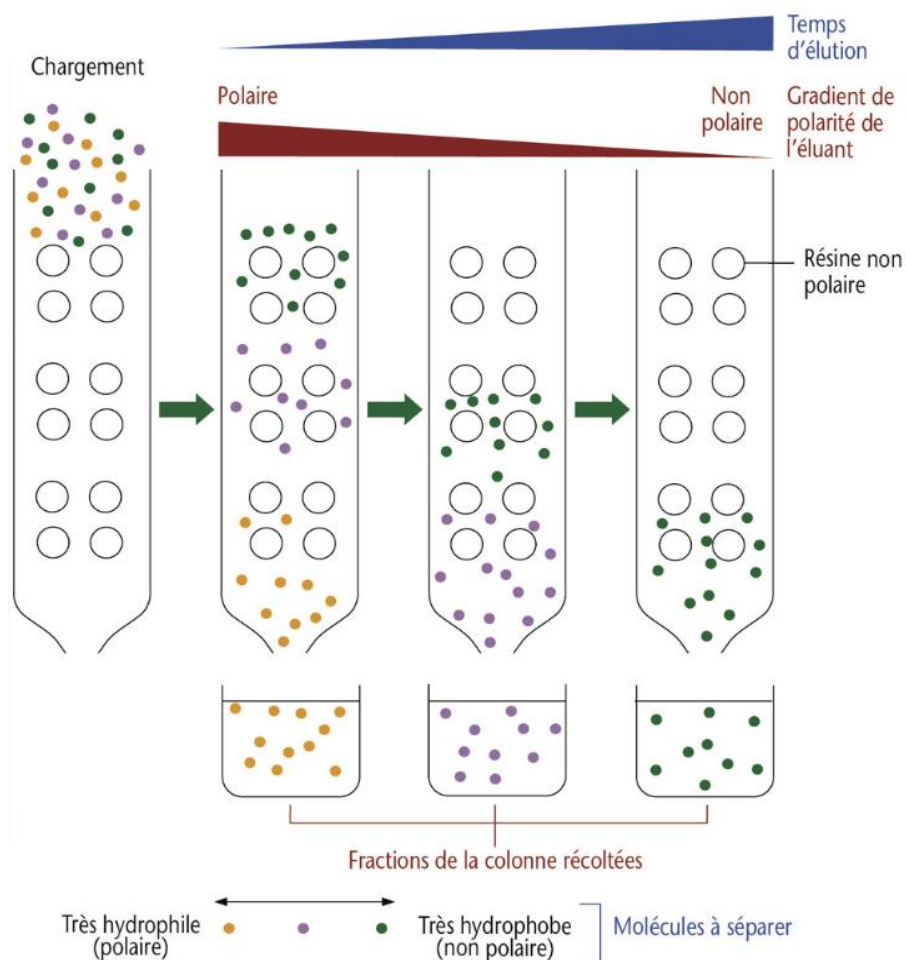
Données sur PTOX et 6-MPTOX		Chromatogramme obtenu suite à l'analyse d'un mélange de PTOX et 6-MPTOX
Source : Renouard et coll., <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2018; https://doi.org/10.3390/ijms19040990		
PTOX  Très polaire	6-MPTOX  Polaire	
Une molécule polaire a tendance à être hydrophile. À l'inverse, une molécule apolaire a tendance à être hydrophobe.		Lorsque les molécules sont éluées et sortent de la colonne, elles sont détectées grâce à un signal. On obtient alors un graphique appelé chromatogramme. La présence d'un pic témoigne du passage d'un type de molécules devant le détecteur.

Schéma du principe de la chromatographie de partage en phase inverse.

Source : Tessier, *Technologies des bioprocédés industriels*, ed. Centre collégial de développement de matériel didactique, 2018



Document 16 : Mesure de la production de PTOX et de 6-MPTOX, dans les racines de différentes lignées cellulaires de *Linum flavum*

Source : Renouard et coll., Int. J. Mol. Sci. 2018 ; <https://doi.org/10.3390/ijms19040990>

Lignées cellulaires	6-MPTOX (mg·g ⁻¹ DW)	PTOX (mg·g ⁻¹ DW)	Indice de croissance (entre 0 et 20 Jours)
<i>Linum flavum</i> sauvage	1.7 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1
HRLF15.1	8.3 ± 1.6	0.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1
HRLF15.2	1.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2	3.8 ± 0.1
HRLF15.3	5.1 ± 0.6	0.3 ± 0.1	3.5 ± 0.1
HRLF15.4	3.0 ± 0.3	0.2 ± 0.1	3.4 ± 0.1
HRLF94.1	3.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	5.0 ± 0.2
HRLF94.2	8.4 ± 0.4	0.6 ± 0.2	5.9 ± 0.2
HRLF94.3	5.6 ± 1.2	0.3 ± 0.1	5.2 ± 0.3
HRLF94.4	6.3 ± 0.7	0.2 ± 0.1	5.0 ± 0.2
HRLF94.7	3.2 ± 1.2	0.3 ± 0.1	4.4 ± 0.2
HRLF94.8	6.9 ± 1.1	0.2 ± 0.1	4.9 ± 0.2
HRLF94.9	6.3 ± 2.0	0.2 ± 0.1	4.8 ± 0.2

DW : dry weight = masse sèche de *Linum flavum*

Données :

- Un indice de croissance est un indicateur de la croissance des racines. Plus cet indice est grand, plus la croissance des racines est importante.
- Les lignées HRLF sont des lignées obtenues après transformation par *Agrobacterium rhizogenes*.

Document 17 : Les plantes à traire, une innovation en bioproduction végétale industrielle

Un exemple de l'utilisation des plantes à traire en pharmaceutique

Source : <https://www.rtflash.fr/> consulté le 24/10/24



Plantes à traire en culture



Aspect des racines

La biotech « Plant Advanced Technologies » (PAT) exploite la technique de la traite des plantes. Concrètement, la société de Vandœuvre-lès-Nancy (Meurthe-et-Moselle) stimule des végétaux pour extraire les molécules actives en plongeant leurs racines dans un bain solvant.

La technologie issue du laboratoire Agronomie et environnement (INRAE-Université de Lorraine) est développée depuis 2005 par l'entreprise qui emploie 42 personnes et cultive 3 hectares selon cette méthode. Grâce à elle, PAT a mis au point plusieurs actifs cosmétiques et développe aujourd'hui une première molécule pharmaceutique, un anti-psoriasis, une maladie chronique de la peau.

Principe d'obtention des métabolites d'intérêt

Source : <https://www.mediachimie.org/> consulté le 24/10/24

Production des métabolites secondaires

Dans une première étape, la plante est cultivée sur un milieu liquide suivant une technique couramment utilisée pour cultiver des tomates et des concombres : l'hydroponie. Les racines, dont les extrémités trempent dans l'eau, sont régulièrement irriguées avec une solution nutritive composée d'eau et d'éléments minéraux. L'hydroponie présente un double avantage sur la culture en terre : elle permet de doser avec précision les éléments nécessaires à la croissance de la plante et de la protéger des parasites présents dans le sol. On stimule ensuite la production de métabolites secondaires, molécules synthétisées en cas de stress de la plante présentant souvent un intérêt pour leur fonction.

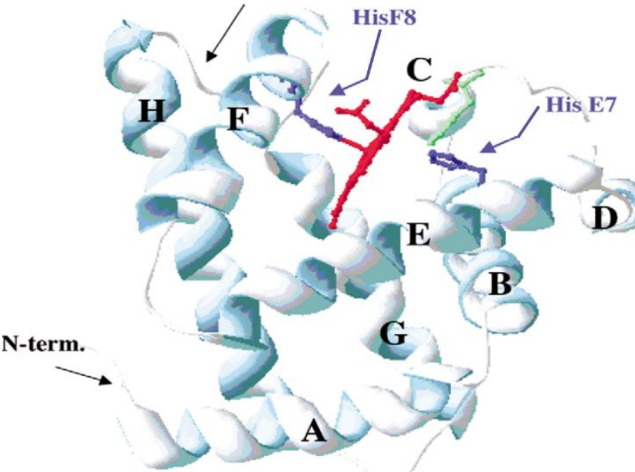
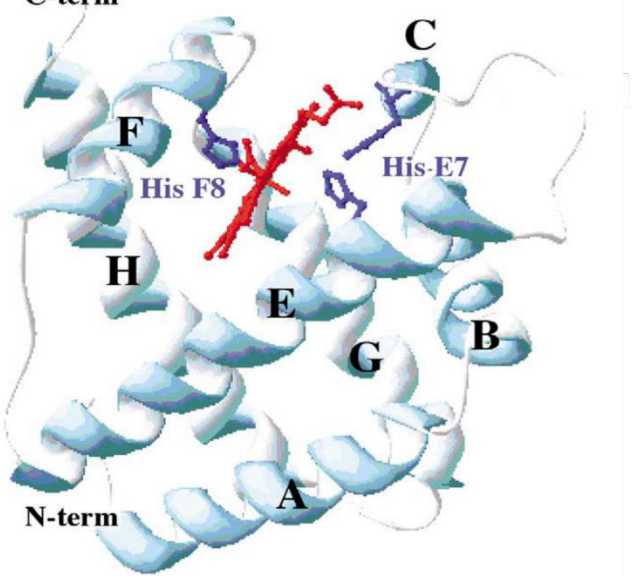
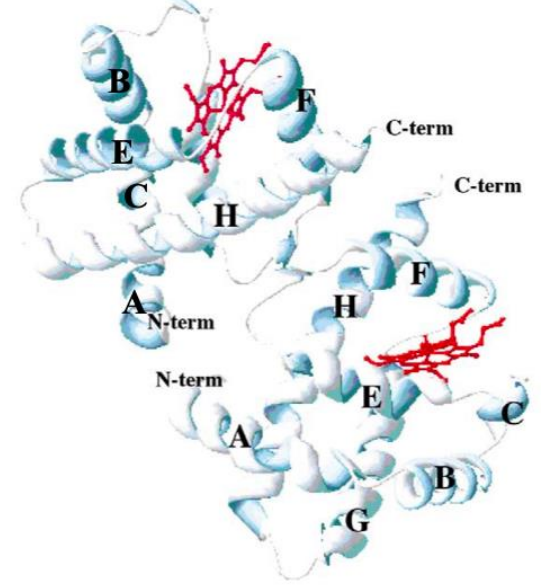
Récupération des métabolites secondaires

La deuxième étape, qui fait toute l'originalité du procédé, est la traite ou récupération des métabolites secondaires. L'excrétion est obtenue naturellement chez certaines plantes. La solution nutritive qui contient un grand nombre de molécules diverses est remplacée par de l'eau. Progressivement, les racines libèrent les métabolites secondaires dans l'eau. Dans d'autres cas, l'excrétion doit être forcée par des moyens chimiques (ajout de tensioactifs) ou physiques (ultra-sons, élévation de température). Ainsi, l'ajout de tensioactif rend les parois des racines perméables en augmentant la différence de pression entre l'intérieur de la cellule et la solution nutritive et permet de récupérer 20 à 80 % des métabolites secondaires contenus dans les racines. Les méthodes classiques de chimie sont utilisées pour purifier le métabolite d'intérêt.

Document 18 : Structures de différentes globines obtenues par cristallisation et analysées par diffraction aux rayons X

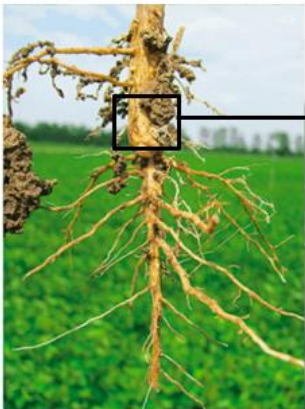
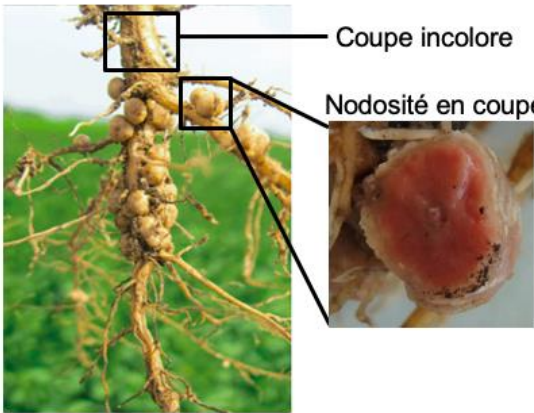
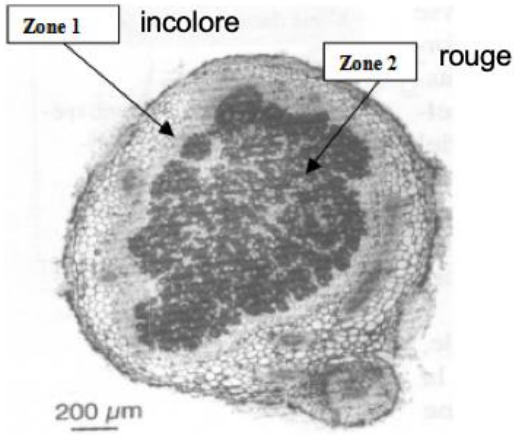
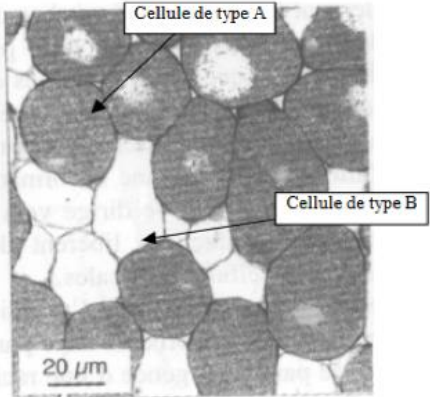
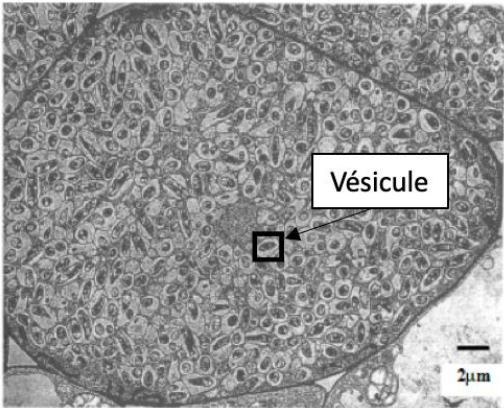
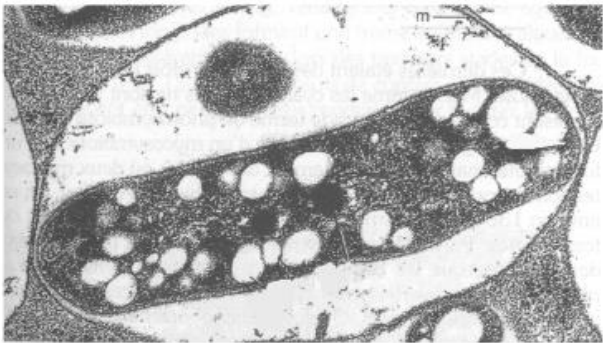
Source : H. Wajcman, L. Kiger, C. R. Biologies (2002) Académie des sciences ; Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

La myoglobine, l'hémoglobine et la leghémoglobine sont constituées d'une partie protéique, la globine, et d'un noyau hème non protéique.

Myoglobine animale 	Les hélices α sont repérées par les lettres A à H de l'extrémité N-terminal vers l'extrémité C-terminal. La position de certains acides aminés, importants dans l'établissement de la structure secondaire ou tertiaire de la protéine, est indiquée. Par exemple <i>His E7</i> correspond à une <i>Histidine</i> positionnée en 7^{ème} position dans la structure primaire de l'hélice α E. L'hème (en rouge sur le schéma), fixe réversiblement le dioxygène. Pour la myoglobine animale, le noyau hème est localisé entre les hélices α E et F. Les histidine E7 et F8 collaborent au maintien de l'atome de fer dans le noyau hème.
Leghémoglobine végétale 	Hémoglobine bactérienne (<i>Vitreoscilla</i>)  structure dimérique

Tournez la page S.V.P.

Document 19 : Observations à différentes échelles de racines de soja cultivées en présence ou en absence de bactéries du genre *Rhizobium*

A- Aspect macroscopique de racines de soja en absence de bactéries <i>Rhizobium</i>  Coupe incolore Absence de nodosité	B- Aspect macroscopique de racines de soja en présence de bactéries <i>Rhizobium</i> dans la culture  Coupe incolore Nodosité en coupe Présence de nodosités
C- Coupe d'une nodosité Observation au microscope optique  Zone 1 incolore Zone 2 rouge 200 μm	D- Zone 2 Observation au microscope optique  Cellule de type A Cellule de type B 20 μm Les cellules de type A sont rouges Les cellules de type B sont incolores
E- Cellule de type A Observation au microscope optique  Vésicule 2 μm	F- Vésicule Observation au microscope électronique  1 μm

Données :

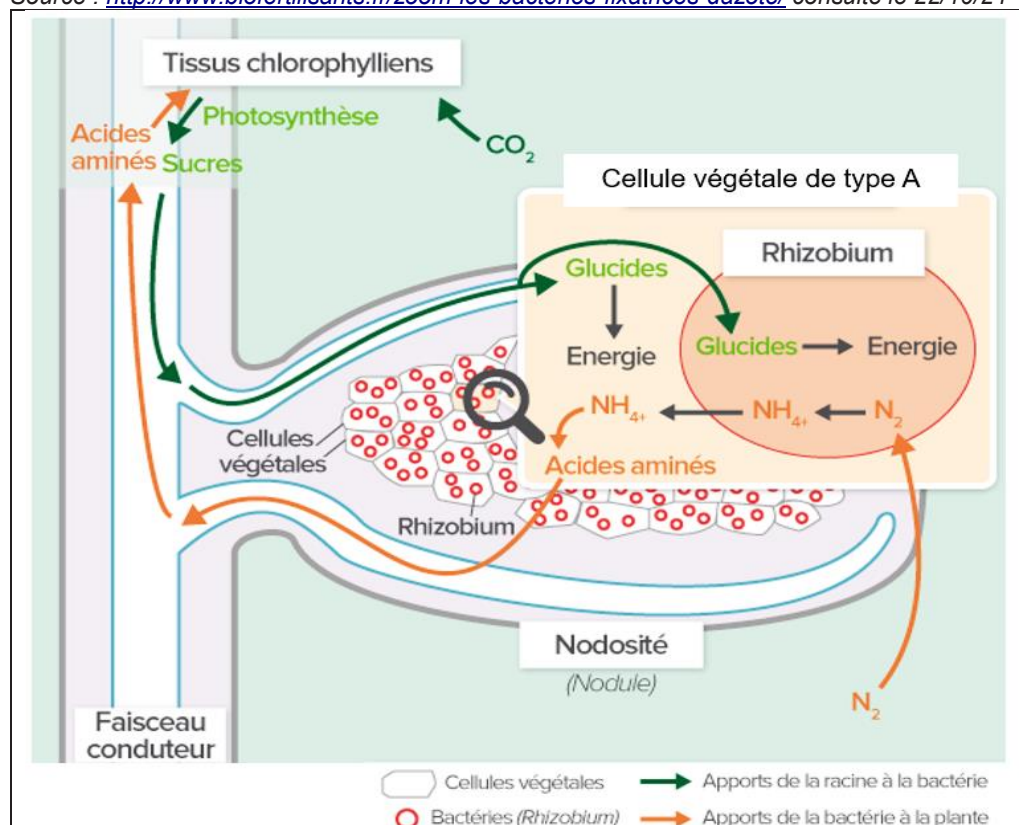
La leghémoglobine confère une coloration rouge aux cellules qui la produisent.

Aucune bactérie n'a été détectée en-dehors des nodosités, ni dans la zone 1 des nodosités, ni dans les cellules de type B de la zone 2.

Document 20 : Les apports de la recherche fondamentale

Échanges nutritionnels entre la cellule végétale et *Rhizobium*

Source : <http://www.biofertilisants.fr/zoom-les-bacteries-fixatrices-dazote/> consulté le 22/10/24

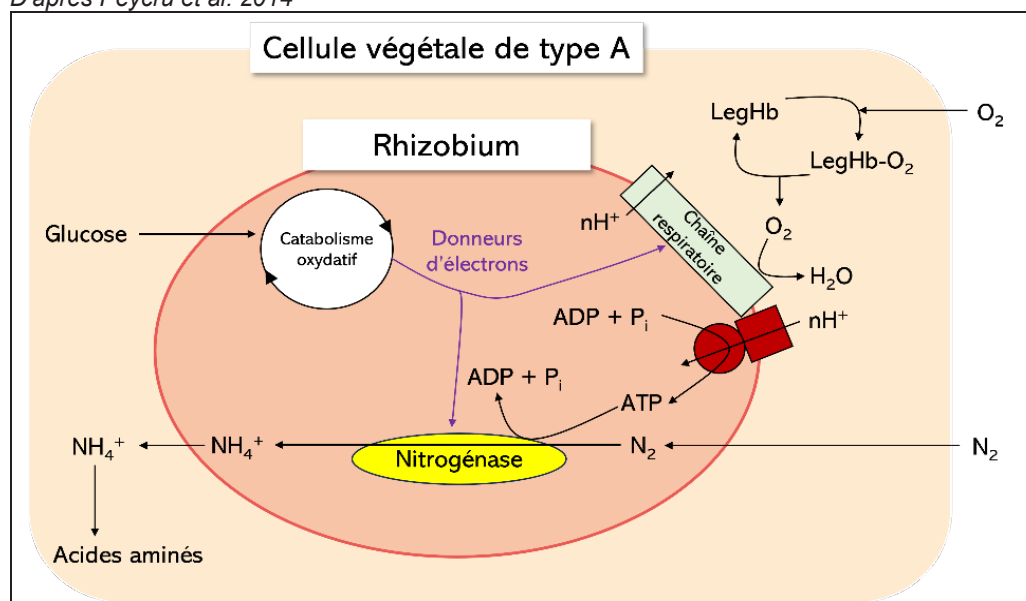


L'azote est un élément incontournable pour la croissance des cultures, mais les végétaux ne peuvent pas l'assimiler seuls sous la forme de diazote N_2 .

Il existe plusieurs formes d'azote assimilables par les végétaux dont l'ammoniac NH_3 rapidement transformé en ion ammonium NH_4^+ .

Vue d'ensemble du fonctionnement d'une nodosité

D'après Peycry et al. 2014



Données :

La concentration en dioxygène provoquant une dénaturation de la nitrogénase a été estimée à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Des mesures de la concentration en dioxygène ont été réalisées dans le sol et dans le cytoplasme des cellules de type A :

$$C(\text{O}_2 \text{ dissous, sol}) = 250 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

$$C(\text{O}_2 \text{ dissous, cellule type A}) = 1 \text{ nmol.L}^{-1}$$

Document 21 : Apport de la biologie de synthèse aux bioproductions industrielles

Ingénierie métabolique et biologie de synthèse

La biologie de synthèse repose sur les acquis du génie génétique et les connaissances fondamentales, notamment sur les voies métaboliques. Le principe de la biologie de synthèse repose sur la création d'unités biologiques, appelées « biobriques », constituées de gènes permettant une fonction précise, comme par exemple l'expression d'une enzyme de biosynthèse. Les utilisateurs peuvent alors assembler plusieurs « biobriques » en systèmes fonctionnels non existants dans la nature afin de développer de nouvelles voies métaboliques pour produire de nouvelles molécules dans des organismes existants.

Production durable et optimisée par valorisation de sous-produits de l'industrie du biodiesel

D'après Ergün et coll. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2022 <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02234-7>

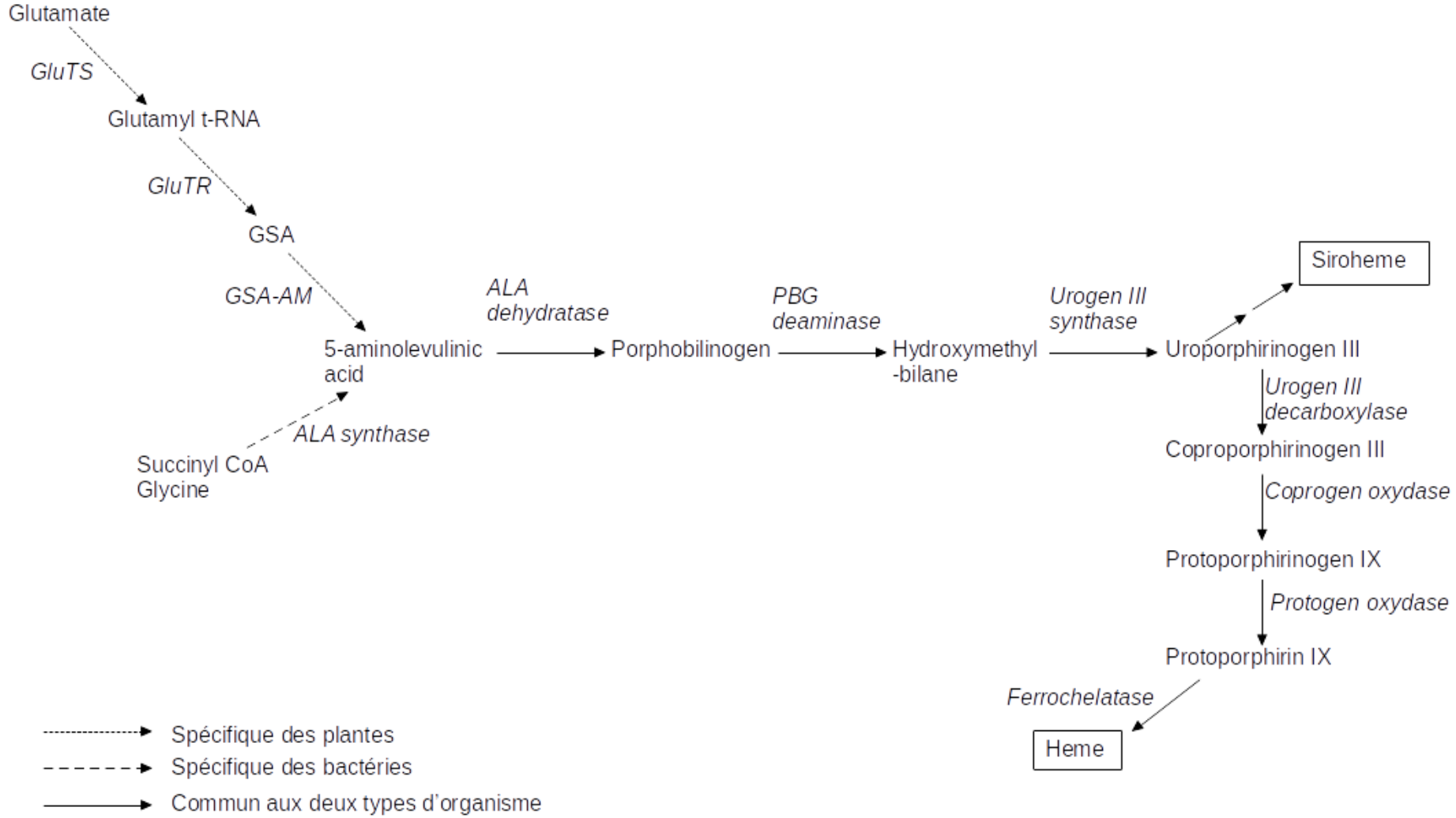
(...) Lors de la production de biodiesel 10 %, le glycérol brut est généré comme principal sous-produit et son prix est faible (~ 0,17 \$/kg).

La valorisation du glycérol brut permet l'élimination du glycérol comme déchet de production et fournit une source de carbone et d'énergie bon marché permettant de produire de la biomasse et des bioproduits à valeur ajoutée. Les solutions de glycérol contiennent des impuretés telles que le méthanol, le savon, les catalyseurs, les sels, les matières organiques autres que le glycérol et les acides gras libres (...). *P. pastoris* peut métaboliser efficacement le glycérol : lors de cultures alimentées en glycérol, la concentration cellulaire peut atteindre jusqu'à 140 g de matière sèche par litre. En outre, la nature méthylotrophique de *P. pastoris* lui confère une capacité d'utilisation du méthanol toxique.

Pichia pastoris, un organisme de choix pour les productions industrielles

D'après Bolmanis et coll. *Processus* 2023 <https://doi.org/10.3390/pr11113215>

La levure méthylotrophe *Pichia pastoris* est un organisme de production industrielle non toxique et non pathogène d'une utilisation sûre (...). Cette levure méthylotrophe constitue un excellent choix grâce à sa manipulation génétique simple, à ses capacités robustes d'expression de protéines intra- et extracellulaires et à sa capacité à réaliser des modifications post-traductionnelles complexes des protéines eucaryotes, telles que la glycosylation, la formation de ponts disulfures et le traitement protéolytique. En outre, les faibles niveaux de protéines natives sécrétées simplifient la purification des protéines recombinantes exprimées.



Document 23 : Production de leghémoglobine par la levure *Pichia pastoris*

Source : Shankar et Hoyt. Brevet déposé le 23 juin 2020

Pichia pastoris possède deux gènes codant une alcool-oxydase, *Aox1* et *Aox2*, dont le promoteur est fortement inducible par le méthanol : ces promoteurs sont des portions d'ADN sur lesquelles se fixe initialement l'ARN polymérase avant de démarrer la synthèse de l'ARNm. Un promoteur est inducible si certaines conditions physiques (chaleur, hypoxie, stress oxydatif) ou chimique (ions métalliques, acides gras, sucres, alcool...) sont nécessaires pour rendre le promoteur actif.

Si des gènes sous contrôle du promoteur d'*Aox1* ou d'*Aox2* sont présents sur les plasmides, il sera possible d'induire la synthèse de protéine en présence de méthanol.

Présentation des constructions plasmidiques permettant la production de leghémoglobine

La leghémoglobine est une protéine constituée d'une globine et d'un noyau hème. Dans le modèle ici présenté, la production de la globine est rendue possible par l'ajout du gène *LegH* du soja à la levure *Pichia pastoris*.

Plusieurs gènes sont présents sur ces plasmides :

- les gènes codant les enzymes ALA-déhydratase, ALA synthase, Coprogyne oxydase, Ferrochélatase, PBG déaminase, Protogène oxydase, UPS (urogène III décarboxylase) et UPD (urogène III synthase).
- les gènes conférant une résistance à des antibiotiques :
 - *AmpR* : gène codant une résistance à l'ampicilline
 - *ZeoR* : gène codant une résistance à la zéocine
 - *NatR* : gène codant une résistance à la nourséothricine
 - *HygromycinR* : gène codant une résistance à l'hygromycine

Plasmide	Descriptif du plasmide
1	- Gène <i>AmpR</i> - Gène <i>ZeoR</i> - Gène <i>ALA-déhydratase</i> sous contrôle du promoteur <i>Aox1</i> - Site de restriction PmeI
2	- Gène <i>AmpR</i> - Gène <i>HygromycinR</i> - Gène <i>LegH</i> sous contrôle du promoteur <i>Aox1</i> - Site de restriction SfiI
3	- Gène <i>AmpR</i> - Gène <i>NatR</i> - Gène <i>UPS</i> sous contrôle du promoteur <i>Aox1</i> - Gène <i>UPD</i> sous contrôle du promoteur <i>Aox1</i> - Gène <i>Coprogyne oxydase</i> sous contrôle du promoteur <i>Aox1</i> - Site de restriction SfiI
4	- Gène <i>AmpR</i> - Gène <i>ALA synthase</i> sous contrôle du promoteur <i>Aox1</i> - Gène <i>Protogène oxydase</i> sous contrôle du promoteur <i>Aox1</i> - Gène <i>Ferrochélatase</i> sous contrôle du promoteur <i>Aox1</i> - Gène <i>PBG déaminase</i> sous contrôle du promoteur <i>Aox1</i> - Site de restriction SfiI

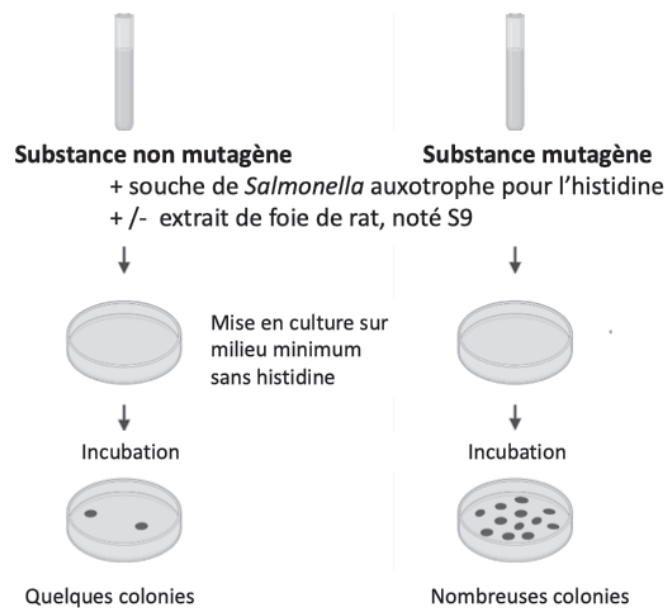
Stratégie pour sélectionner les levures transformées par les quatre plasmides :

Le clonage a lieu en deux temps :

- transformation des levures par le plasmide 4 et sélection sur gélose nutritive additionnée d'ampicilline.
- transformation par les plasmides 1, 2 et 3 des levures obtenues et sélection sur gélose nutritive additionnée d'hygromycine, de zéocine et de nourséothricine.

Document 24 : Évaluation de la génotoxicité par le test de Ames

Principe du test de Ames

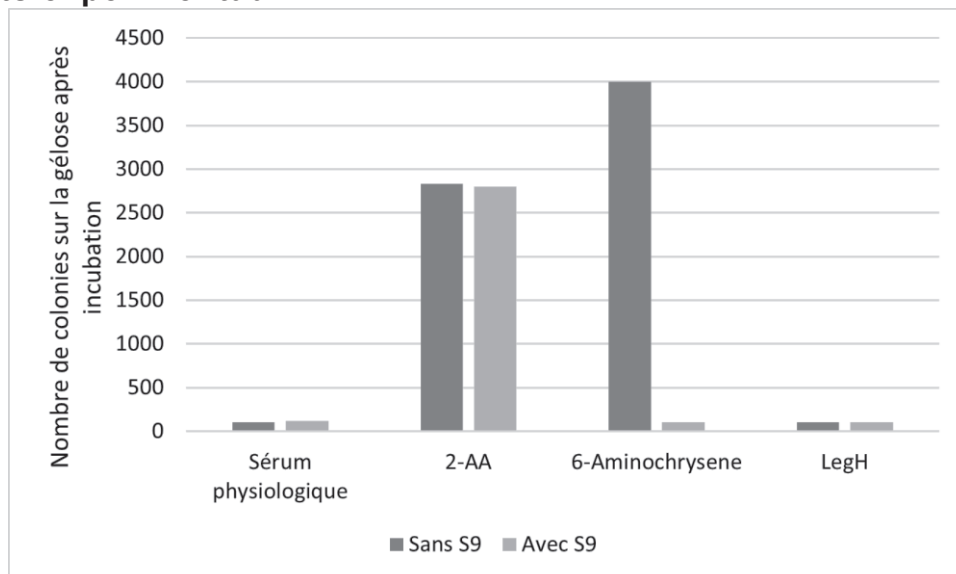


Données sur l'extrait de foie de rat S9 :

- Le foie présente une fonction de détoxification des molécules toxiques grâce aux nombreuses enzymes contenues dans les cellules hépatiques. L'extrait de foie S9 est obtenu après broyage cellulaire et filtration permettant d'éliminer les membranes cellulaires. Il contient donc, notamment, les enzymes intracellulaires.

Pour une molécule initialement toxique, si le test de Ames montre l'absence de toxicité en présence de S9, la consommation de cette molécule est considérée comme sans danger pour la santé.

Résultats expérimentaux



Contrôles : Sérum physiologique, 2AA, 6-Aminochrysene

LegH : Leghémoglobine purifiée à partir de *Pichia Pastoris*

Document 25 : Test de digestibilité de la leghémoglobine

Source: Jin et Coll, Molecular Nutrition & Food Research 2017 ; <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700297>

Principe :

La digestibilité des protéines est validée si la protéine est digérée par la pepsine en 60 minutes maximum.

Méthode :

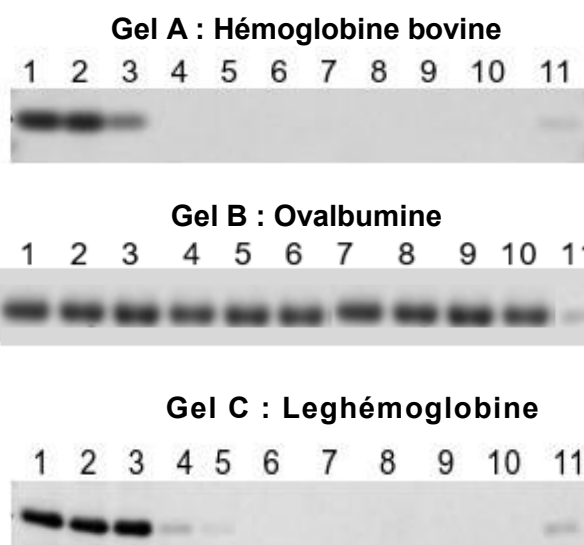
Les trois protéines dont la digestibilité est testée sont mises en présence de pepsine dans des conditions optimales et comparables.

- Des prélèvements sont effectués à différents temps compris entre 0 et 60 minutes.
- Des contrôles sont réalisés.
- Les prélèvements subissent une électrophorèse SDS-PAGE.
- La révélation des protéines dans le gel est assurée par le bleu de Coomassie brillant.

Des tests préliminaires ont montré que la pepsine est capable de digérer l'hémoglobine bovine mais est incapable de digérer l'ovalbumine (OVA).

Contrôle positif de digestibilité : Hémoglobine bovine	Gel A
Contrôle négatif de digestibilité : Ovalbumine	Gel B
Préparation de leghémoglobine purifiée à partir de <i>Pichia Pastoris</i>	Gel C

Résultats de la migration en gel d'électrophorèse SDS-PAGE



Plan de dépôt :

Piste 1 : Contrôle protéine sans pepsine à 0 minutes

Pistes 2 à 10 : Protéine en présence de pepsine pendant respectivement 0 - 0,5 - 1 - 2 - 5 - 10 - 20 - 30 - 60 minutes.

Piste 11 : Contrôle 10 % de protéine non digérée.