

SESSION 2021

**AGRÉGATION
CONCOURS INTERNE
ET CAER**

Section : BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

PREMIÈRE ÉPREUVE

Durée : 6 heures

Le dictionnaire bilingue anglais français est autorisé.

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre dictionnaire et de tout matériel électronique (y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.

Si vous repérez ce qui vous semble être une erreur d'énoncé, vous devez le signaler très lisiblement sur votre copie, en proposer la correction et poursuivre l'épreuve en conséquence. De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, vous devez la (ou les) mentionner explicitement.

NB : Conformément au principe d'anonymat, votre copie ne doit comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé consiste notamment en la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de la signer ou de l'identifier.

Tournez la page S.V.P.

INFORMATION AUX CANDIDATS

Vous trouverez ci-après les codes nécessaires vous permettant de compléter les rubriques figurant en en-tête de votre copie.

Ces codes doivent être reportés sur chacune des copies que vous remettrez.

► **Concours interne de l'Agrégation de l'enseignement public :**

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EAI	7100A	101	0809

► **Concours interne du CAER / Agrégation de l'enseignement privé :**

EAH	7100A	101	0809
-----	-------	-----	------

Cette épreuve prend appui sur un dossier technique relatif à un problème biotechnologique. Elle permet d'évaluer les capacités du candidat à :

- mobiliser ses connaissances scientifiques et technologiques pour expliciter ou valider les solutions retenues ;
- utiliser une ressource proposée pour élaborer un support pédagogique permettant la transmission ou l'évaluation de connaissances et méthodes par les élèves à un niveau de formation déterminé.

Le candidat doit situer l'exercice dans un processus d'apprentissage et par rapport aux autres enseignements scientifiques ou technologiques qui lui sont associés.

Dans le sujet, les lettres **ST** identifient les questions mobilisant les compétences et connaissances scientifiques et technologiques, la lettre **P** identifie les questions d'ordre pédagogique.

Des extraits de référentiels et programmes sont regroupés en annexe en fin de sujet (pages **23-24**).

La biologie synthétique

La biologie de synthèse ou biologie synthétique consiste à utiliser la connaissance et la compréhension des systèmes biologiques pour concevoir, puis réaliser des systèmes complexes biologiques nouveaux, dotés ou non de fonctions absentes dans la nature. La biologie synthétique représente une avancée scientifique d'importance car elle permet de nouvelles techniques de production et offre un vaste champ d'applications industrielles (énergie, chimie, environnement, agro-alimentaire, biomatériaux, santé, ...).

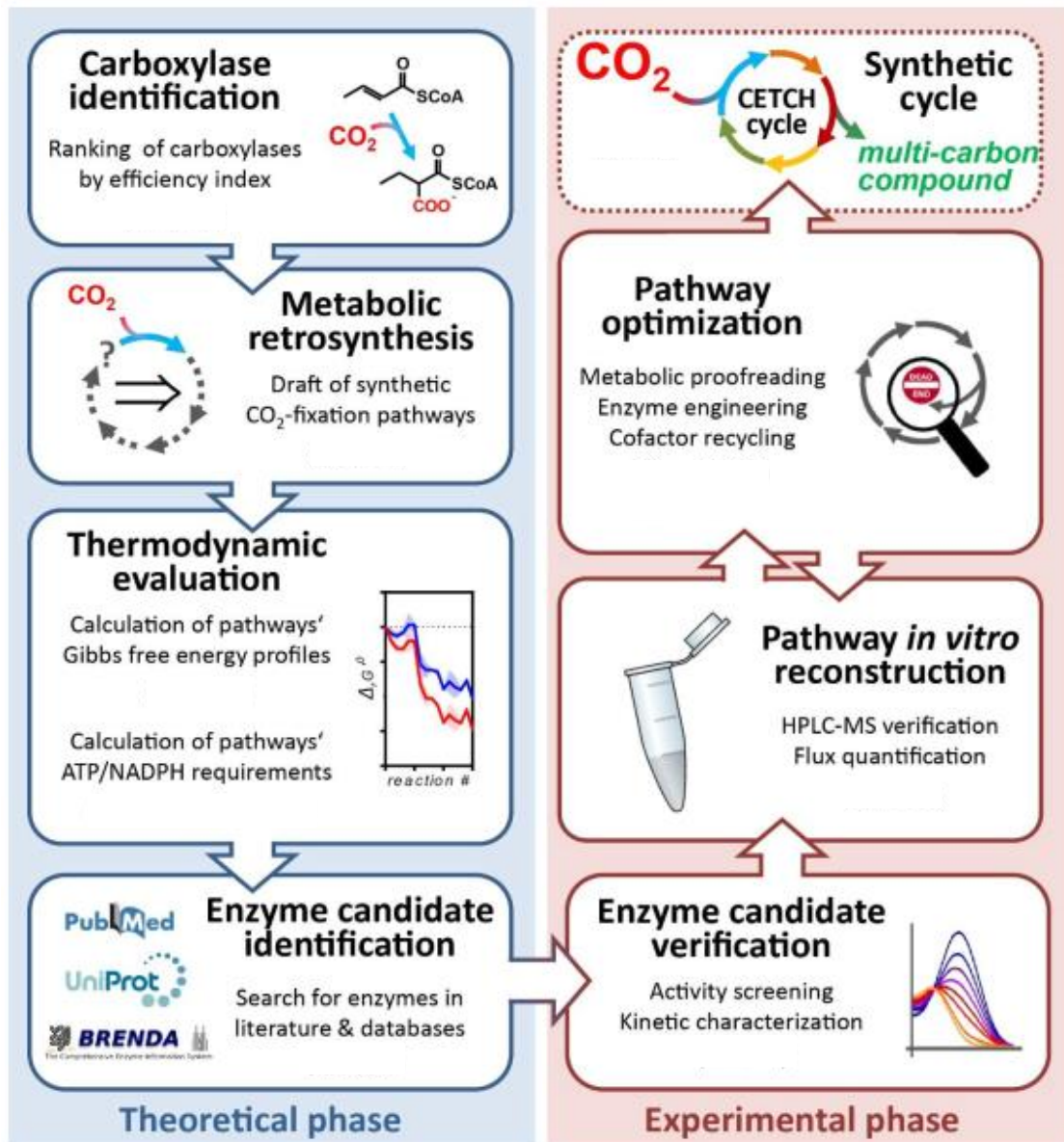
Le développement de la biologie de synthèse soulève toutefois des questions en matière d'éthique, de sécurité et de propriété intellectuelle et le Groupe Européen d'Éthique préconise la mise œuvre de moyens de contrôle internationaux de la biologie de synthèse. Actuellement, la Commission Européenne examine la possibilité d'assujettir les produits issus de la biologie de synthèse à la directive qui traite de la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement.

Le sujet porte sur deux applications possibles de la biologie synthétique. Dans une première partie, le sujet traite de la création d'un cycle constituant une nouvelle voie métabolique de fixation du CO₂ et la constitution de plateformes photosynthétiques semi-artificielles. La seconde partie présente les principes de la construction et de la validation d'une plateforme de génomique permettant la production de particules virales de synthèse.

Partie 1 : Création d'une nouvelle voie métabolique de fixation du CO₂

La fixation autotrophique du carbone représente un moyen permettant la diminution de la pollution liée à une émission accrue de CO₂. Six voies métaboliques de fixation du carbone ont été identifiées qui permettent de transformer annuellement 350 gigatonnes de CO₂. La voie majeure de fixation est celle du cycle de Calvin qui assure la fixation de 90 % du CO₂. Cette voie a néanmoins une efficacité limitée car certaines de ses enzymes sont sensibles au dioxygène ce qui diminue son rendement de fixation de carbone en aérobiose. De plus, l'incorporation du CO₂ par les voies existantes permet, certes, l'augmentation de la biomasse mais ne permet pas la production d'un produit réutilisable, comme par exemple un biocarburant. Des chercheurs ont entrepris de créer *in vitro* une 7^{ème} voie métabolique de fixation du CO₂, moins sensible au dioxygène, présentant un meilleur rendement d'incorporation du CO₂ et produisant des produits carbonés réutilisables dont certains à forte valeur ajoutée : cette nouvelle voie a été nommée cycle « **CETCH** » pour « *crotonyl-coenzymeA(CoA)/éthylmalonyl-CoA/hydroxybutyryl-CoA* ».

Le document suivant présente les étapes ayant conduit à l'obtention de cette nouvelle voie métabolique.



Cette partie propose l'étude de certaines étapes de la construction du cycle CETCH et de son intégration dans des microcapsules. Les microcapsules sont des chloroplastes artificiels en vue d'une fixation industrielle efficace du CO₂.

1. Conception et optimisation du cycle CETCH

Le cycle CETCH conçu est représenté dans le **document 1**. Chacune des réactions fait intervenir une ou plusieurs activités enzymatiques et est signalée par un « # suivi du n° de la réaction ». L'évolution thermodynamique de l'énergie libre à chaque étape est également présentée dans le **document 1**.

1.1. Design du cycle

On s'intéresse, dans un premier temps, à l'étape de carboxylation #6 du cycle théorique.

ST1 A l'aide des informations consignées dans le **document 2**, montrer la nécessité d'un couplage énergétique pour cette étape.

Après que les chercheurs ont vérifié que la version du cycle CETCH proposée était thermodynamiquement réalisable, des enzymes candidates pour chacune des réactions sont recherchées dans des banques de données. Le fonctionnement du cycle est ensuite testé en présence de ces enzymes présélectionnées (cycle sous sa version initiale). La première expérience consiste à vérifier le fonctionnement du cycle en le subdivisant en cinq grandes étapes. Le cycle est ainsi testé de manière séquentielle en ajoutant successivement la ou les enzymes nécessaires à la réalisation de l'étape étudiée. Les produits obtenus sont séparés et identifiés par HPLC-MS. Les résultats sont présentés dans le **document 3**.

ST2 Discuter les valeurs des temps de rétention du propionyl-CoA, du méthylmalonyl-CoA et du succinyl-CoA.

ST3 Interpréter les résultats obtenus par HPLC-MS après chacune des étapes 1 à 4.

ST4 Montrer en quoi les résultats obtenus à l'étape 5 ont permis aux chercheurs de valider le fonctionnement du cycle.

1.2. Optimisation du cycle par modification d'une activité enzymatique

Au cours de la phase d'optimisation du cycle CETCH, certaines réactions limitantes ou générant des effets indésirables ont été remplacées. Ainsi, la réaction catalysée par la Propionyl-CoA carboxylase (Pcc) a dû être remplacée par deux réactions catalysées respectivement par la Propionyl-CoA oxydase (Pco) et la Crotonyl-CoA réductase (Ccr).

Néanmoins, la Pco d'*Arabidopsis thaliana* retenue oxyde, avec la même efficacité, le propionyl-CoA et le 4-hydroxybutyryl-CoA, un autre intermédiaire du cycle CETCH. A partir de la comparaison de ces deux substrats, une stratégie de mutagenèse dirigée en vue d'obtenir une Pco avec une affinité moindre pour le 4-hydroxybutyryl-CoA est développée. Différents variants de la Pco présentant des substitutions des résidus d'acides aminés Thr 134, Leu 137, Val 138 ou Val 291 sont obtenus. Les résultats sont présentés dans le **document 4**.

ST5 En vous appuyant sur les données des **documents 4 et 5**, expliciter le choix de la substitution pour chacun des quatre acides aminés mutés.

- ST6** Expliquer la signification biologique des grandeurs exprimées (V_{\max} , K_M et $k_{\text{cat}} \cdot K_M^{-1}$).
- ST7** Proposer une hypothèse expliquant l'évolution globale des valeurs des V_{\max} et K_M pour tous les mutants analysés.
- ST8** Identifier le variant qui, selon vous, permet d'optimiser au mieux le cycle.
- P1** Présenter une activité pédagogique en terminale STL qui permette la détermination du bilan de matière du cycle CETCH. Identifier les points critiques pour la réalisation de ce bilan par les élèves et proposer des moyens de remédiation *a priori*.

2. Réalisation d'une plateforme photosynthétique à partir de chloroplastes artificiels

Après les phases de design et d'optimisation *in vitro* du cycle, l'objectif des chercheurs est de créer une plateforme d'assemblage automatique de compartiments réactionnels miniatures (volumes de l'ordre du picolitre) permettant la conversion photo-dépendante du CO_2 en composés multi-carbonés, imitant ainsi la fonction des chloroplastes.

La stratégie expérimentale comporte plusieurs étapes :

- l'obtention de TEM (*Thylakoid membrane-based Energy Modules*) ;
- la réalisation de tests fonctionnels des TEM et le remaniement de certaines réactions du cycle ;
- la miniaturisation et l'automatisation de l'assemblage du système.

On se propose d'étudier les techniques et les résultats de quelques-unes des étapes précitées.

2.1. Obtention des TEM

Les compartiments réactionnels miniatures (nommés TEM) doivent permettre la régénération photo-dépendante d'ATP et de NADPH, H^+ consommés par le cycle CETCH. Les TEM sont fabriqués à partir de membranes de thylakoïdes isolées de chloroplastes de jeunes pousses d'épinard (*Spinacia oleracea*).

La procédure d'isolement des thylakoïdes est décrite dans le **document 6**.

- ST9** Expliquer le principe de la purification sur gradient de Percoll et la position relative des fractions d'intérêt obtenues dans les conditions de l'étude.
- P2** Réaliser un logigramme synoptique de la procédure opératoire présentée dans le **document 6**, permettant d'illustrer une séance d'activité technologique pour des étudiants en section de Technicien Supérieur portant

sur la séparation d'organites cellulaires par centrifugation. Proposer une grille d'autoévaluation permettant aux étudiants de valider leur logigramme au regard des critères.

2.2. Vérification du fonctionnement des TEM

La capacité des TEM à régénérer de l'ATP et du NADPH,H⁺ pour deux réactions de carboxylation catalysées par la Ccr et la Pcc est ensuite testée. Les résultats sont consignés dans le **document 7**.

ST10 Analyser les résultats des expériences du **document 7** afin d'identifier les conditions expérimentales permettant le fonctionnement optimal des TEM.

2.3. Encapsulation des TEM et tests fonctionnels

Les TEM sont ensuite encapsulés avec les enzymes et substrats du cycle dans des microgouttelettes d'eau à partir d'une émulsion eau-huile. L'idée est de permettre un autoassemblage des micro-compartiments dont l'activité peut être contrôlée par une illumination externe et analysée en temps réel.

Des tests réalisés sur les premières versions encapsulées ont conduit à de nouvelles optimisations du cycle CETCH. Les tests fonctionnels de la dernière version sont consignés dans le **document 8**.

ST11 Montrer en quoi les deux conditions expérimentales « TEM + CETCH - Ccr » et « NADPH,H⁺ + CETCH - Ccr » du **document 8B** constituent des contrôles.

ST12 A l'aide des résultats présentés dans le **document 8D**, interpréter les résultats obtenus dans la condition « TEM + CETCH » du **document 8B**. Conclure par rapport à la fixation de CO₂ par le système testé.

Partie 2 : Mise en œuvre et validation d'une plateforme de biologie synthétique en vue de la néosynthèse d'une particule virale

Les génomes de certains virus à ARN, tels que ceux des coronavirus, sont difficiles à cloner et à manipuler dans *Escherichia coli* notamment en raison de leur grande taille. L'objectif de la biologie synthétique est de décomposer ce génome en petits fragments modulables, potentiellement individuellement modifiables, en vue de reconstituer un génome sauvage ou modifié. Cette stratégie facilite la compréhension de ces virus et de leur pathogénèse afin de développer des traitements et des vaccins.

P3 Présenter une séquence pédagogique en terminale ST2S permettant de faire travailler la capacité exigible suivante : « Identifier les différentes catégories d'agents pathogènes ». Une ou plusieurs compétences transversales visées par le programme seront mobilisées.
Les conditions de mise en œuvre seront précisées (durée, matériel nécessaire, déroulement de l'activité). Un document à destination des élèves pourra être présenté pour illustrer le propos.

Les BioBrick® représentent la première approche de biologie synthétique développée par le « Massachusetts Institute of Technology » (MIT) dans le cadre du concours annuel « International Genetically Engineered Machine » (iGEM).

Le **document 9** présente la définition des BioBrick® et leur technique d'assemblage. Cette dernière utilise notamment des isocaudomères telles que les enzymes de restriction XbaI et SpeI.

Données : La séquence du site de restriction de XbaI est T*CTAGA et celle de SpeI est A*CTAGT (les séquences sont orientées de 5' vers 3' et * indique la position de la coupure par ces enzymes de restriction).

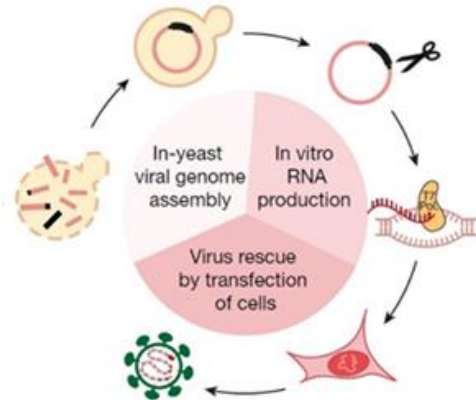
ST13 A l'aide des séquences des sites de restriction de XbaI et SpeI, expliquer la notion d'isocaudomère et souligner l'importance de leur utilisation pour l'assemblage de deux BioBrick®.

ST14 Etablir la liste des différentes constructions obtenues après l'étape de ligature lors de l'assemblage de deux BioBrick® dans un vecteur receveur.
Argumenter le choix de l'antibiotique choisi pour sélectionner les clones hébergeant la construction d'intérêt. Indiquer l'intérêt du gène *ccdB* lors de l'étape de sélection.

D'autres approches d'assemblage ont été développées de manière à faciliter et à accélérer la création de constructions génétiques complexes. Ainsi, *Saccharomyces cerevisiae* peut être utilisée comme plateforme de génomique synthétique. Cette plateforme est particulièrement intéressante pour l'étude des coronavirus car elle permet de générer rapidement des virus mutants.

La démarche expérimentale est la suivante :

- construction du génome de synthèse (**document 10**)
- validation du génome (**document 11**)
- production d'ARN viraux *in vitro*
- production d'un virus virulent (**document 12**)



Le **document 10** présente les étapes nécessaires à la synthèse, à l'aide d'une plateforme génomique, du virus de l'hépatite murine (MHV) appartenant au groupe 2 des coronavirus.

ST15 Expliquer le rôle de l'étape de transcription inverse lors de la RT-PCR pour l'obtention des fragments de génome viral.

ST16 Expliciter les modalités de la reconstitution du génome de synthèse du virus MHV. Préciser les avantages de cette approche par rapport à celle des BioBrick®.

Le **document 11** présente le principe et les résultats expérimentaux de la vérification de l'efficacité de l'assemblage du génome de synthèse du virus MHV par PCR multiplexe.

ST17 Présenter le principe de la PCR multiplexe et détailler les contraintes associées à sa mise en œuvre. Préciser son intérêt dans le cadre de la validation des assemblages obtenus.

Le **document 12** présente la dernière étape de la démarche expérimentale qui consiste à valider la fonctionnalité de la plateforme opérationnelle dans un but d'obtention de particules virales de synthèse.

ST18 Expliquer l'intérêt d'intégrer le gène de la GFP au sein du génome viral.

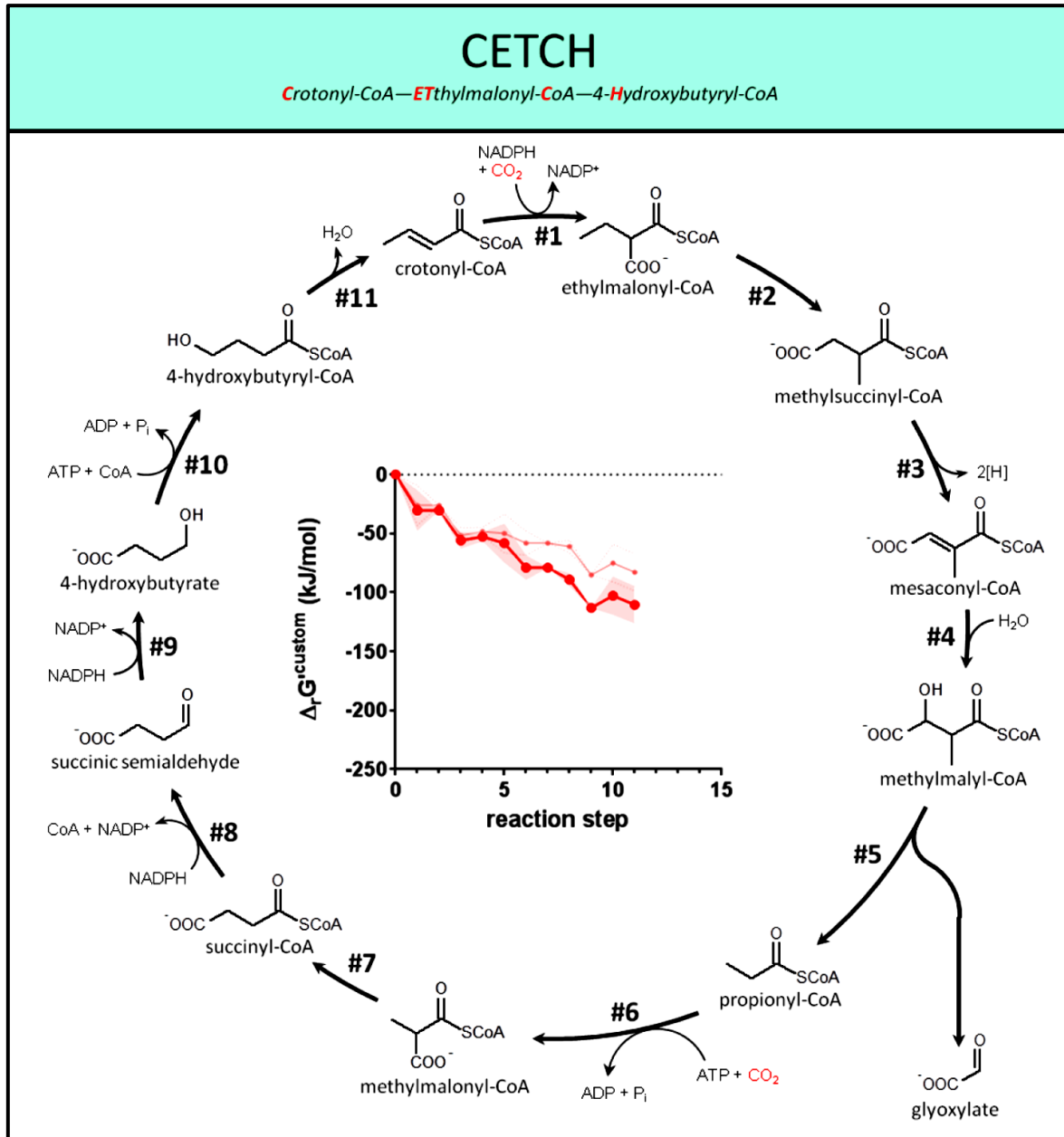
ST19 Expliciter la procédure opératoire suivie permettant l'établissement des courbes de cinétiques de production virale.

ST20 Montrer en quoi celles-ci valident la méthode d'obtention de particules virales de synthèse mise en œuvre.

ST21 Discuter les applications réglementaires et les enjeux bioéthiques de la biologie synthétique.

Document 1 : version théorique du cycle CETCH

Extrait de Schwander T. *et al.*, A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*. *Science*, 2016.



Document 2 : données thermodynamiques

Données adaptées du site : <http://equilibrator.weizmann.ac.il/>

- Réaction de décarboxylation du méthylmalonyl-CoA



Reaction Gibbs Energy		
Estimated $\Delta_r G^m$	-36.7 ± 11.7 [kJ/mol]	Enter custom concentrations »
Estimated $\Delta_r G'^\circ$	-19.6 ± 11.7 [kJ/mol]	$K'_{\text{eq}} = 2.7 \times 10^3$
Estimated using	Component Contribution (2013)	
pH	<input type="text" value="7.0"/>	<input type="range"/>
Ionic strength [M]	<input type="text" value="0.1"/>	<input type="range"/>

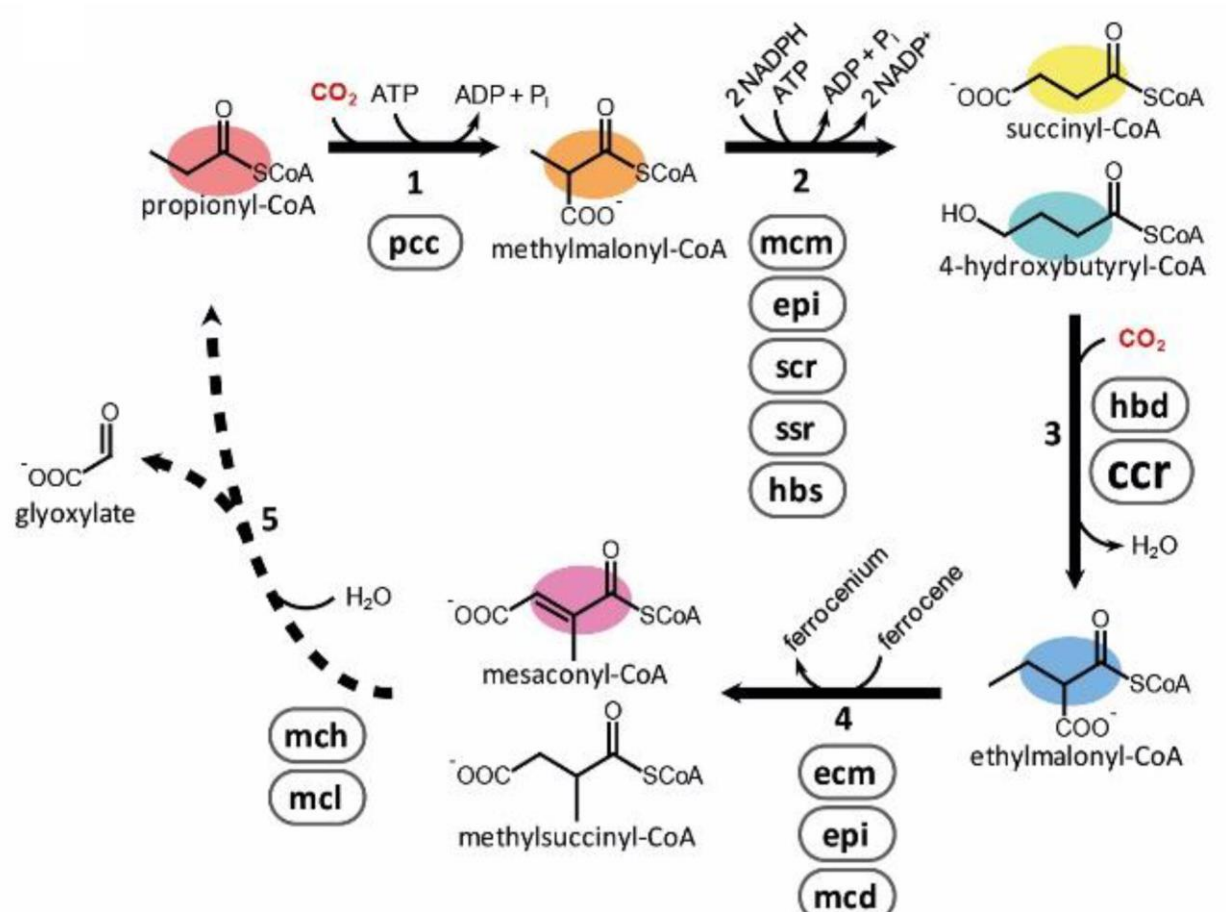
- Réaction d'hydrolyse de l'ATP



Reaction Gibbs Energy		
Estimated $\Delta_r G^m$	-43.5 ± 0.6 [kJ/mol]	Enter custom concentrations »
Estimated $\Delta_r G'^\circ$	-26.4 ± 0.6 [kJ/mol]	$K'_{\text{eq}} = 4.2 \times 10^4$
Estimated using	Component Contribution (2013)	
pH	<input type="text" value="7.0"/>	<input type="range"/>
Ionic strength [M]	<input type="text" value="0.1"/>	<input type="range"/>

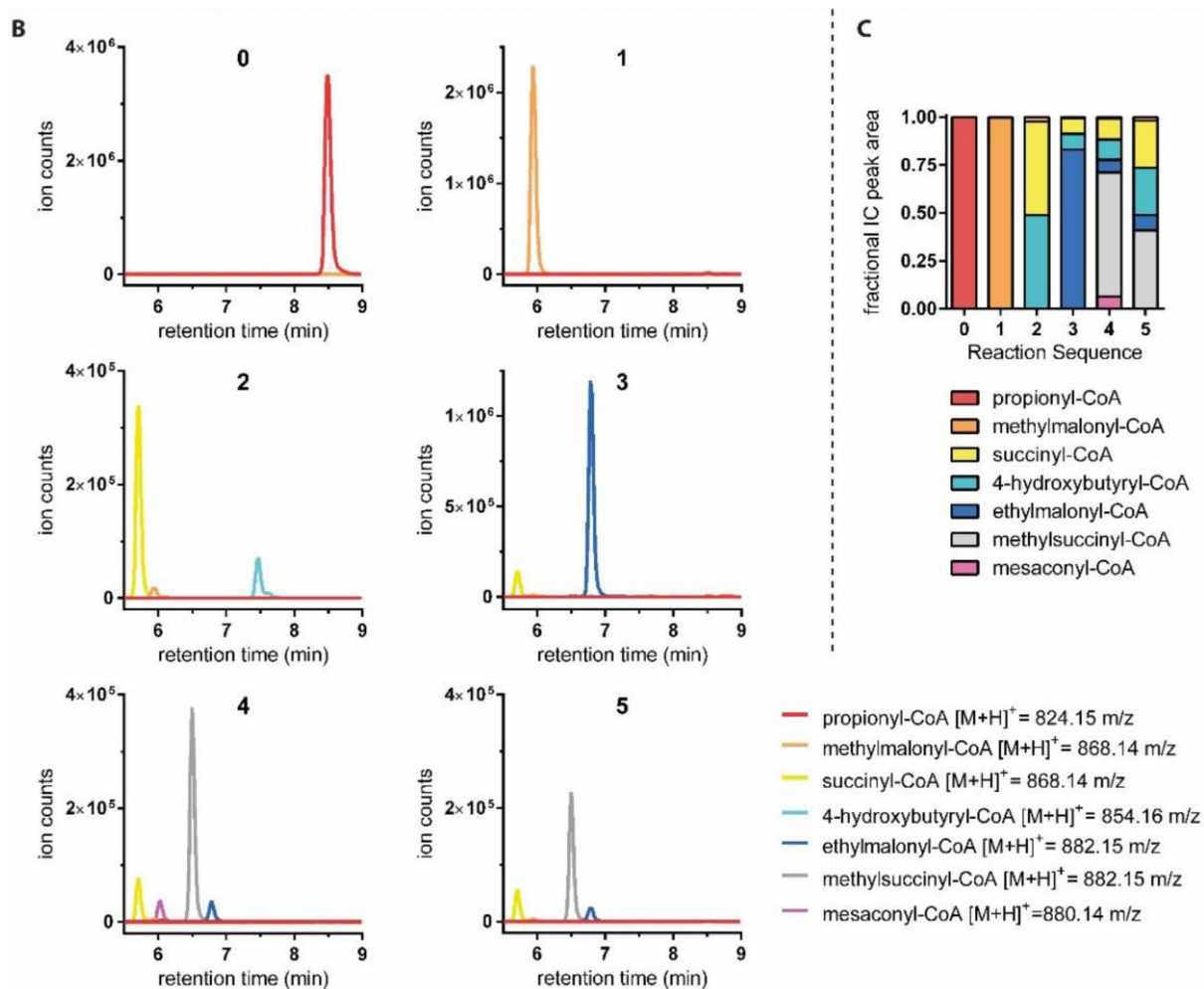
Document 3 : résultats expérimentaux obtenus lors de la mise en œuvre séquentielle du cycle CETCH

Extrait de Schwander T. *et al.*, A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*. *Science*, 2016.



A. Représentation schématique du cycle CETCH

Suite du document à la page suivante



B. Identification des produits obtenus par HPLC-MS (High Pressure Liquid Chromatography – Mass Spectrometry). Les cinq étapes sont réalisées de manière séquentielle par l'ajout successif de la (ou des) enzyme(s) indiquée(s) sur le schéma présenté dans le document 3A. Entre chaque ajout d'enzyme(s), le mélange réactionnel est incubé 10 min à 30 °C puis un échantillon est prélevé. Les esters de coenzyme A ainsi obtenus sont séparés et identifiés par HPLC-MS. L'étape 0 correspond au résultat avant ajout de la première enzyme, la Pcc ou Propionyl-CoA carboxylase.

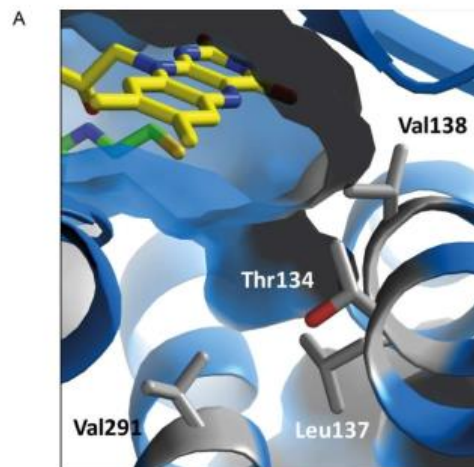
C. Présentation des taux relatifs de chacun des composés obtenus après chacune des étapes.

Caractéristiques techniques de l'HPLC :

- Phase stationnaire : colonne de silice greffée en C18
- Phase mobile : gradient de 0 à 80 % méthanol en formiate d'ammonium 50 mM
- Débit : 250 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$

Document 4 : modifications de la Pco ACX4

Extrait de Schwander T. *et al.*, A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*. *Science*, 2016.



B

Variant	V_{max} (U·mg ⁻¹) propionyl-CoA	K_M (μM) propionyl-CoA	V_{max} (U·mg ⁻¹) 4-hydroxybutyryl-CoA	K_M (μM) 4-hydroxybutyryl-CoA	$\frac{(k_{cat} \cdot K_M^{-1})_{propionyl-CoA}}{(k_{cat} \cdot K_M^{-1})_{4-hydroxybutyryl-CoA}}$
Non muté	38,9 ± 1,0	12,5 ± 1,3	12,2 ± 0,2	13,6 ± 1,2	4
L137F	3,0 ± 0,1	7,0 ± 0,7	1,90 ± 0,05	38,0 ± 3,4	9
V138L	3,0 ± 0,1	59,2 ± 4,7	0,14 ± 0,01	63 ± 20	23
V138I	non détectée		non détectée		
V291I	8,9 ± 0,3	65,4 ± 6,0	2,73 ± 0,14	225 ± 29	12
V291L	non détectée		non détectée		
V291F	non détectée		non détectée		
T134I	5,1 ± 0,3	148 ± 16	0,18 ± 0,01	182 ± 38	34
T134L	12,3 ± 0,5	43,7 ± 5,3	0,38 ± 0,03	239 ± 45	180

Ingénierie de l'enzyme ACX4 en vue d'obtenir une propionyl-CoA oxydase (Pco) spécifique

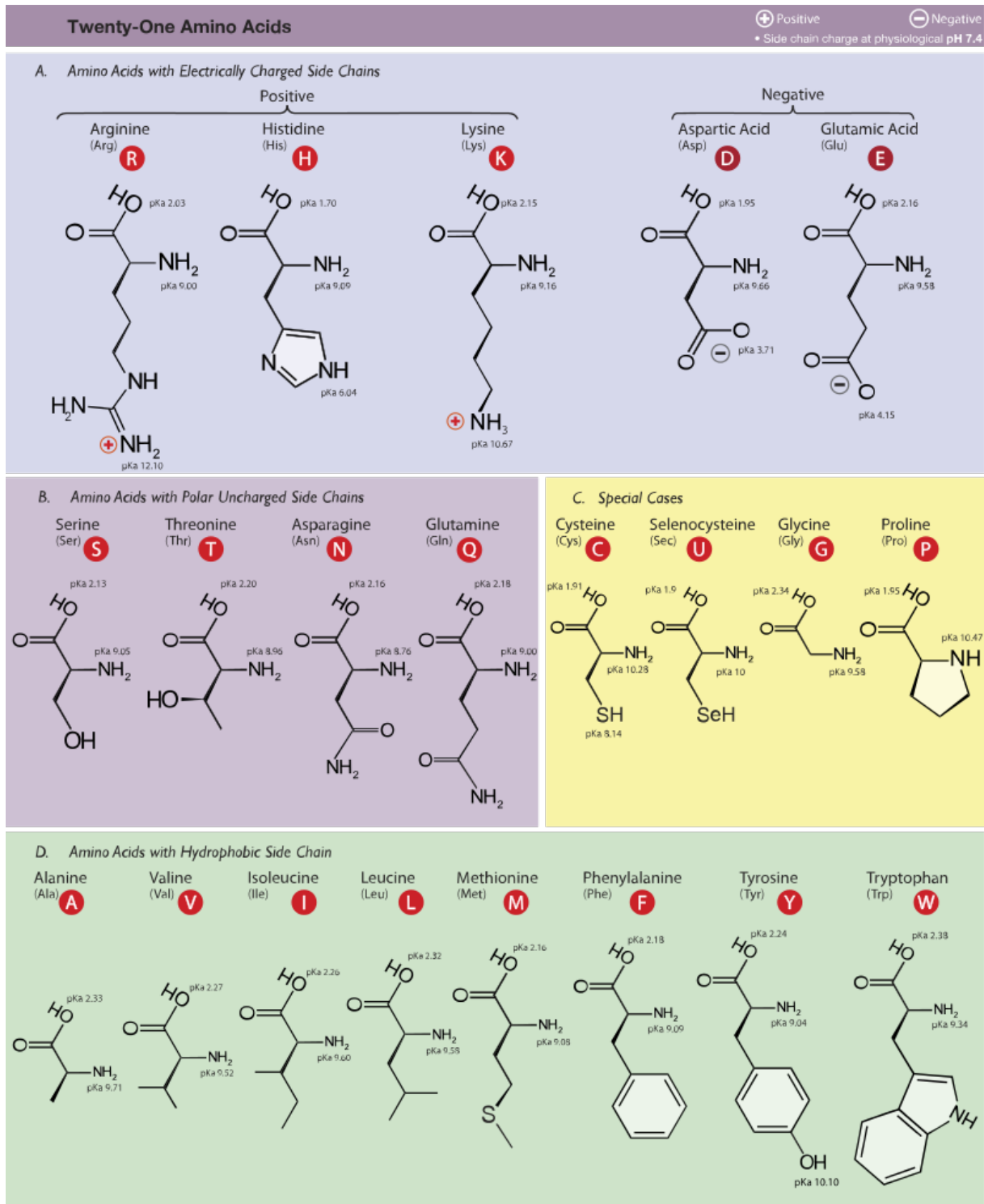
L'enzyme ACX4 (oxydase à chaîne courte 4) de *A. thaliana* a été modifiée afin d'obtenir une spécificité vis-à-vis du substrat propionyl-CoA. En effet, cette enzyme possède aussi une activité envers le 4-hydroxybutyryl-CoA.

(A) La structure du site actif (PBD: 2IX5) permet d'identifier l'existence d'une grande poche de liaison du substrat entourée des résidus T134, L137, V138 et V291.

(B) Données cinétiques des mutants analysés.

Document 5 : structure des vingt et un acides aminés

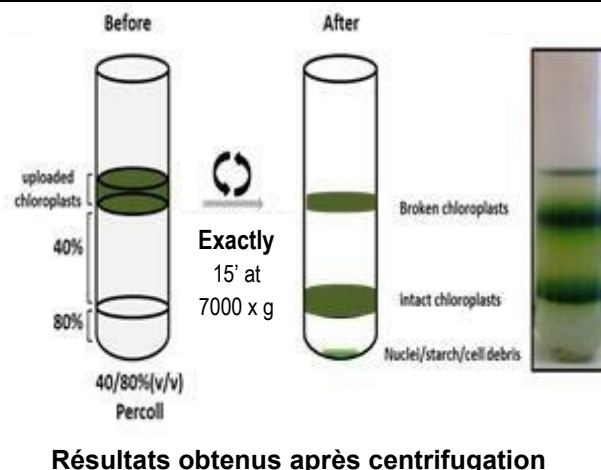
D'après Dancojocari — Travail personnel Print It Here, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9176441>



Document 6 : purification des chloroplastes – centrifugation en gradient de densité non à l'équilibre

Adapté de Miller TE. *et al.*, Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts. *Science*, 2020.

Chloroplasts were **isolated** from young spinach (...). Spinach leaves were stored in the dark at 4-8 °C until use. The leaves were **washed** and the large stems were removed and buffer was added at a ratio of 1 g plant material to 1 mL cold buffer (330 mM sorbitol, 50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 0.1 % (w/v) bovine serum albumin) and **blended** using a standard kitchen immersion blender. The resulting solution was **pressed** through a piece of fine mesh cotton fabric and the **filtrate** was **centrifuged** for



3 minutes at 200 x g to remove unwanted whole cells and cell wall debris. The **supernatant** is **collected** and **centrifuged** for 7 minutes at 1,000 x g to sediment the chloroplasts as a green pellet. The **pellet** was gently **resuspended** in buffer (300 mM sorbitol, 50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, and 10 mM sodium L- ascorbate), using a fine paint brush to remove any clumps. This was **overlaid** on an 80/40 % **percoll gradient** (80 %: 2 mL percoll in 0.5 mL 10 mM sodium L-ascorbate, 250 mM sucrose, 66 mM MOPS-KOH pH 7.6 and 40 %: 4 mL percoll in 6 mL 10 mM sodium L-ascorbate, 250 mM sucrose, 25 mM MOPS-KOH pH 7.6) and **centrifuged** at 3 °C for exactly 15 min at 7000 x g.

The **fractions containing thylakoids and intact chloroplasts** were **pooled** and **diluted** in buffer and **centrifuged** for 10 min at 3000 x g. The **pellet** was **resuspended** in osmotic shock buffer (10 mM HEPES-KOH, 10 mM MgCl₂, 10 mM sodium L-ascorbate). **Thylakoids were flash frozen** with 10 % DMSO as an osmoprotectant and stored at -80 °C until use. The thylakoid/chloroplast solutions were maintained in darkness.

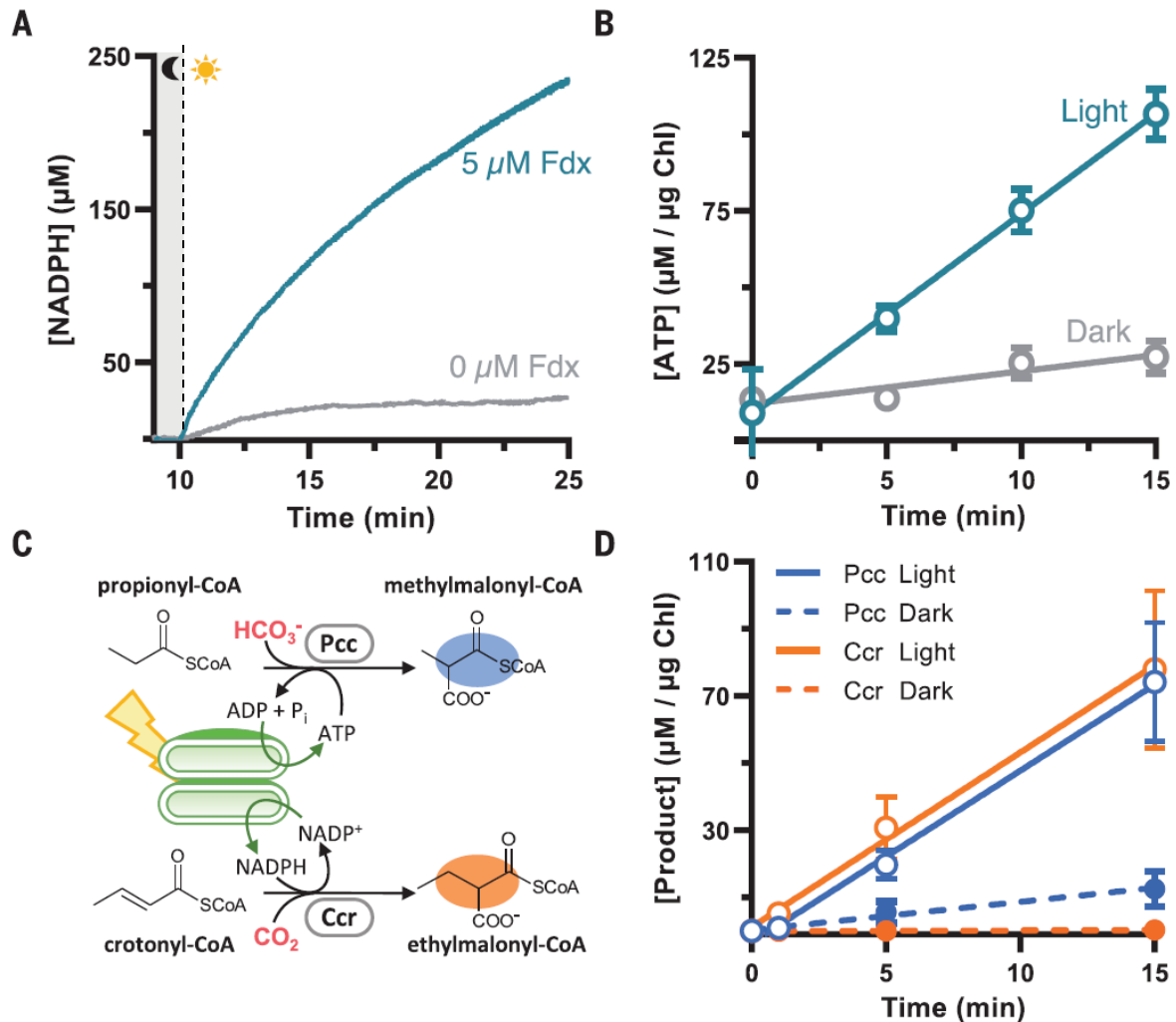
Before use, thylakoids were stored on ice and washed 2-3 times in a buffer containing: 0, 330, or 700 mM sorbitol, 10 mM HEPES-KOH pH 7.6, 10 mM MgCl₂, and 10 mM sodium L- ascorbate.

Données :

Densités des différents organites d'une cellule eucaryote végétale	Organites		Densité en g·cm ⁻³
	Mitochondrie		1,18
	Lysosome		1,12
	Peroxisome		1,20 – 1,23
	Membrane plasmique		1,22
	Fragment du réticulum endoplasmique rugueux		1,30
	Vésicule de Golgi		1,24
	Ribosome		1,41
	Chloroplaste intact		1,15 – 1,28
	Chloroplaste cassé		1,10 – 1,12
Différentes solutions de Percoll utilisées dans la procédure opératoire			Densité en g·cm ⁻³
	80 %		1,13
	40 %		1,07

Document 7 : étude de la régénération d'ATP et de NADPH,H⁺ par les TEM

Extrait de Miller TE. *et al.*, Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts. *Science*, 2020.



A. Suivi de la concentration molaire de NADPH,H⁺ au cours du temps, dans des TEM seuls, par mesure de l'absorbance à 340 nm en présence ou absence de ferredoxin (Fdx) et en absence (entre 0 et 10 min) ou présence de lumière (après 10 minutes).

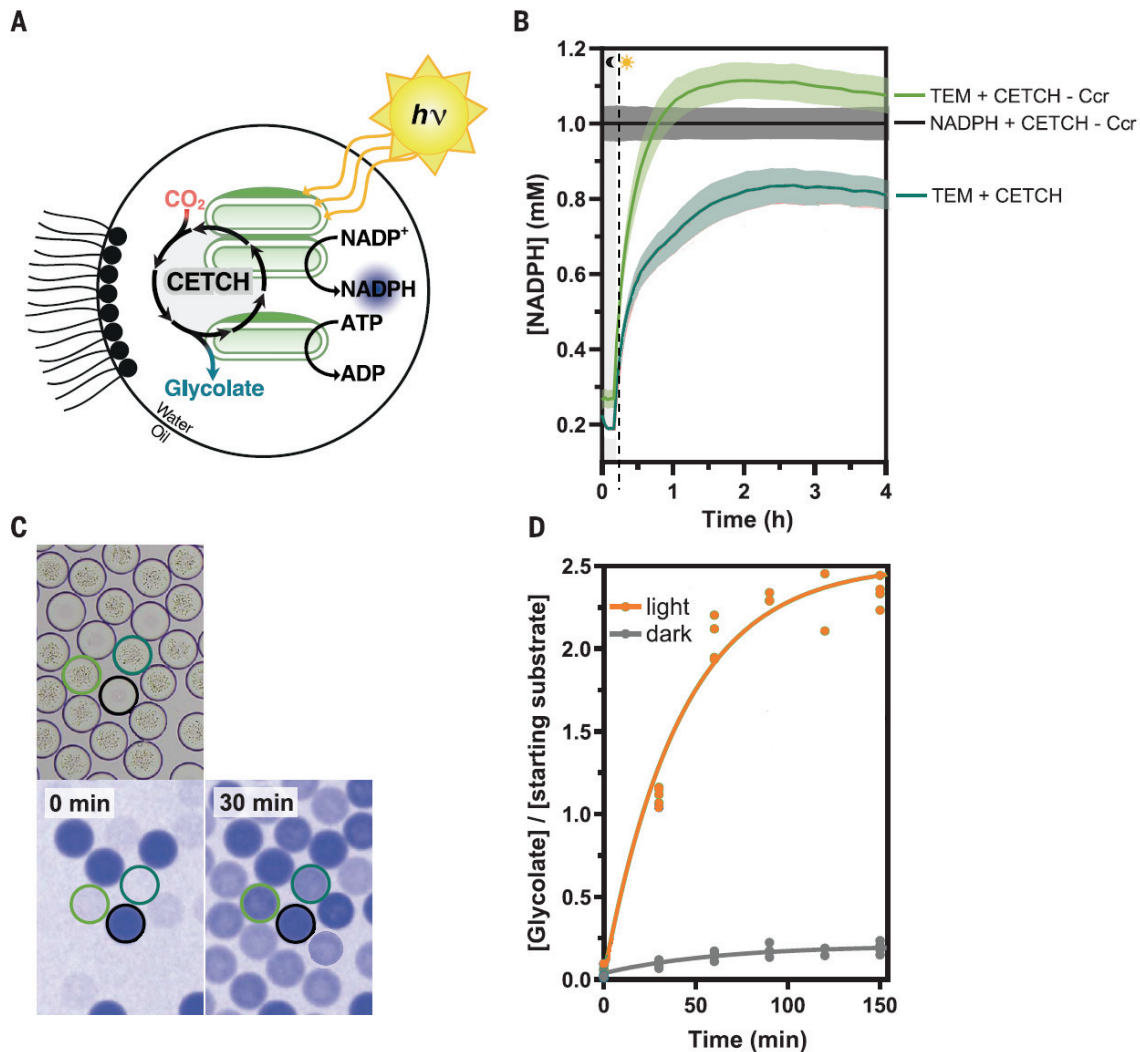
B. Suivi de la concentration molaire d'ATP au cours du temps, dans des TEM seuls, par mesure à l'aide du système HPLC-MS (décrit précédemment).

C. Schéma des couplages putatifs entre les réactions de carboxylation et les réactions s'opérant au niveau des TEM.

D. Suivi des concentrations molaires en méthylmalonyl-CoA et éthylmalonyl-CoA au cours du temps, lors du couplage des différentes réactions de carboxylation avec les TEM, par mesure à l'aide du système HPLC-MS (décrit précédemment).

Document 8 : tests fonctionnels sur les TEM encapsulés

Extrait de Miller TE. *et al.*, Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts. *Science*, 2020.



A. Schéma du couplage entre le cycle CETCH et les TEM dans les microgouttelettes. Le glycolate est obtenu par réduction du glyoxylate.

B. Suivi de la concentration de NADPH, H⁺ au cours du temps par mesure spectrophotométrique à 340 nm dans trois populations de gouttelettes.

- Bleu-vert : gouttelettes contenant des TEM (60 μg de Chl·mL⁻¹), 1 mmol·L⁻¹ de NADP⁺ et les composants du cycle CETCH.
- Vert : gouttelettes contenant des TEM (60 μg de Chl·mL⁻¹), 1 mmol·L⁻¹ de NADP⁺ et les composants du cycle CETCH à l'exception de la Ccr.
- Noir : gouttelettes contenant 1 mmol·L⁻¹ de NADPH, H⁺ et les composants du CETCH à l'exception de la Ccr.

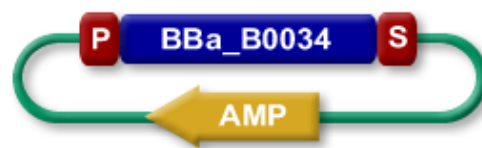
C. Images des gouttelettes utilisées dans l'expérience présentée en B. Le code couleur est le même. En haut : image obtenue en lumière blanche. En bas : images représentant la fluorescence émise par le NADPH, H⁺ après 0 ou 30 min d'illumination.

D. Suivi, au cours du temps, du ratio de la concentration du glycolate formé dans les gouttelettes sur la concentration initiale de substrat du cycle, en présence ou en absence d'illumination. Les mesures sont effectuées par HPLC-MS (décrit précédemment). Il s'agit de la condition expérimentale « TEM + CETCH » du document 8B.

Document 9 : BioBrick®, définition et principe de la méthode d'assemblage

Définition (d'après http://parts.igem.org/Help:An_Introduction_to_BioBricks, consulté le 03.07.2020) :

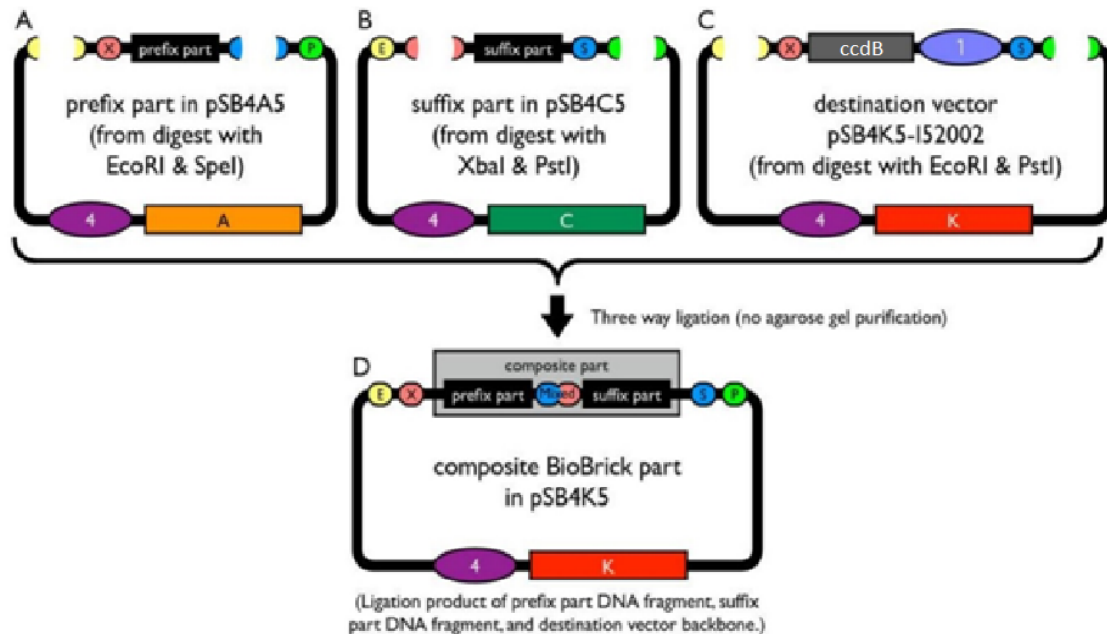
Une BioBrick® est une séquence d'ADN double brin standardisée comprenant, entre autres, des promoteurs, des sites de liaison aux ribosomes (RBS), des gènes codant des protéines, incluse dans un plasmide circulaire et faisant partie de l'approche BioBrick® de la biologie synthétique. La « cargaison » de la BioBrick® est bordée par des séquences (P « préfixe » et S « suffixe ») universelles et précisément définies qui ne sont pas considérées comme faisant partie de la BioBrick® au sens strict. Ces séquences, identiques pour toutes les BioBrick®, contiennent des sites de restriction, dont au moins deux sont reconnus par des isocaudomères, qui permettent, après coupure, la création de BioBrick® de taille supérieure par assemblage, dans un ordre désiré, de BioBrick® unitaires. Au cours du procédé d'assemblage, le site de restriction hybride résultant de la ligature de deux extrémités cohésives compatibles de deux cargaisons de BioBrick® élémentaires est rendu non reconnaissable par les enzymes de restriction, ce qui permet de ne pas le détruire lors d'additions ultérieures. Ces sites hybrides laissent cependant une « cicatrice de ligature » qui peut parfois poser des problèmes de déphasage du cadre de lecture. Malgré ces limitations et la nécessité de nombreuses étapes d'assemblage pour la fabrication d'une construction génétique complexe, un nombre important de systèmes biologiques enthousiasmant ont pu être inventés et réalisés par cette approche.



Suite du document à la page suivante

Principe de la méthode d'assemblage

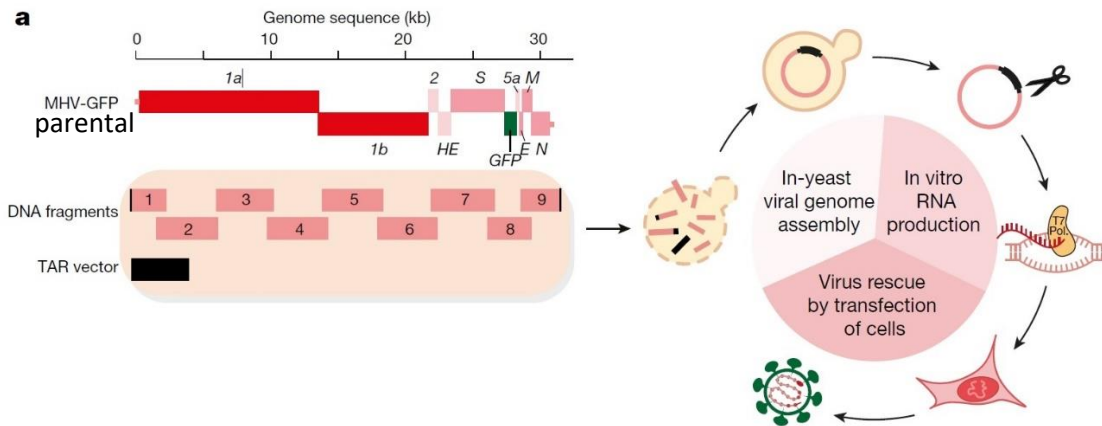
D'après Shetty RP. *et al.* Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *J. Biol. Eng.* 2008.



How to use a new BioBrick® vector for standard assembly. Assembly strategy for two BioBrick® standard biological parts using a new BioBrick® vector. (A) Digest the prefix part with enzymes EcoRI and SpeI. (B) Digest the suffix part with restriction enzymes XbaI and PstI. (C) Digest the destination vector (pSB4K5-I52002) into which the two parts will be assembled with restriction enzymes EcoRI and PstI. Without agarose gel purification of the linearized DNA, ligate the three fragments, transform into *E. coli* and plate on LB agar plates supplemented with the antibiotic corresponding to the destination vector resistance marker. (D) Most of the resulting colonies contain the composite BioBrick® part cloned into the destination vector.

Légendes : Préfixe et Suffixe = éléments de BioBrick® à assembler ; E (jaune) = site de restriction EcoRI ; X (rose) = site de restriction XbaI ; S (bleu) = site de restriction SpeI ; P (vert) = site de restriction PstI ; 1 = origine de réplication à haut nombre de copies dérivée de pUC19 ; 4 = origine de réplication PSC101 ; A, C et K : cassettes de résistance à, respectivement, l'ampicilline, au chloramphenicol et à la kanamycine ; rectangle gris : gène *ccdB* codant un inhibiteur de la girase.

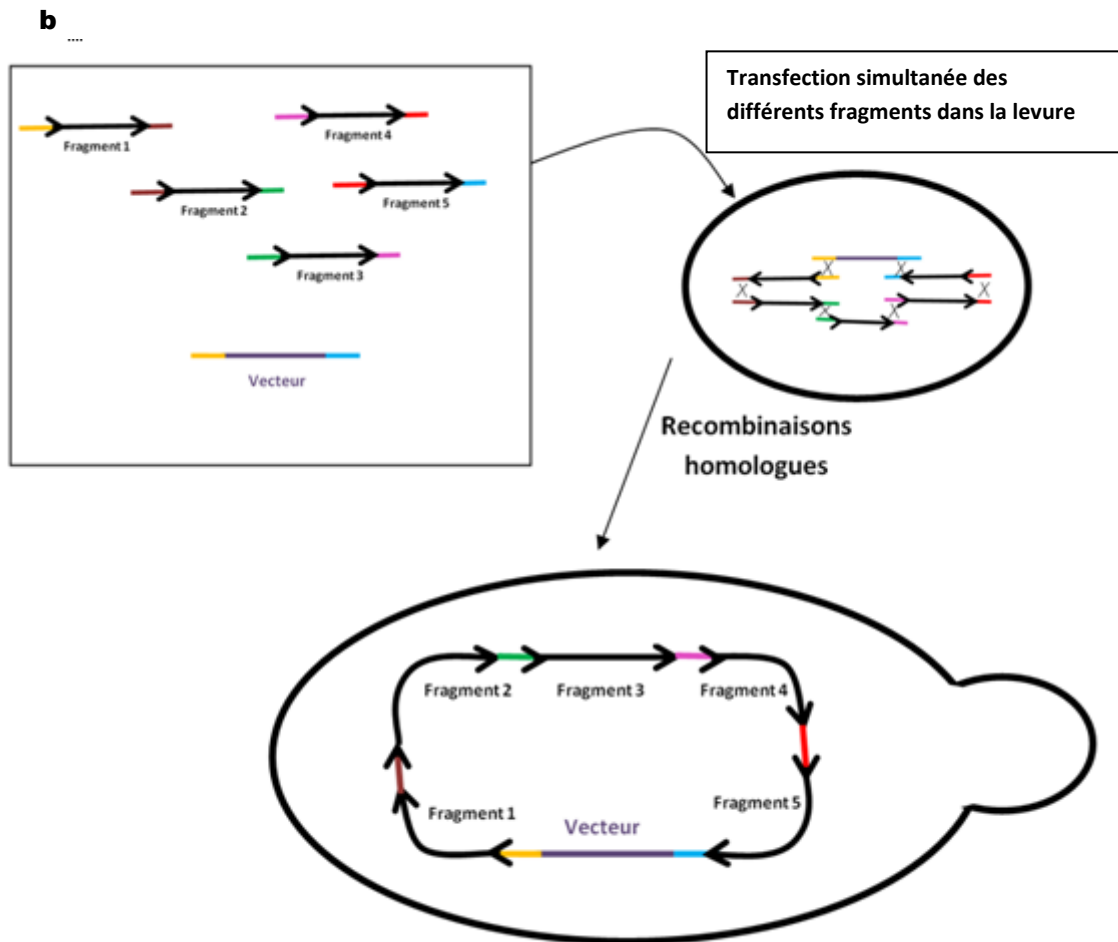
Document 10 : Étapes de construction d'un virus à l'aide d'une plateforme génomique - exemple du virus de l'hépatite murine (MHV-GFP), virus utilisé pour valider la plateforme



a) Étapes de la construction du virus MHV-GFP : Les neuf fragments d'ARN du virus de l'hépatite murine contenant le gène de la protéine fluorescente GFP (MHV-GFP) ont été produits dans des cellules de souris 17 Cl-1 puis amplifiés par RT-PCR. Les fragments obtenus, ainsi que le vecteur TAR pVC 604, sont transfectés simultanément dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* VL6-48N (MAT α trp1- Δ 1 ura3- Δ 1 ade2-101 his3- Δ 200 lys2 met14 cir) dans laquelle a lieu leur assemblage sous forme de YAC par recombinaison homologue (TAR cloning). La construction est extraite de colonies de levures cultivées sur milieu minimum dépourvu d'histidine. Le YAC est ensuite linéarisé et transcrit *in vitro* par l'ARN polymérase T7.

Extrait de Thao TTN. *et al.*, Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature*, 2020.

Suite du document à la page suivante



b) Étape de transfection des différents fragments dans la levure et TAR

cloning : TAR cloning was first pioneered by Botstein and colleagues (1987) and was since further developed by Larionov and coworkers (1994). Its principle is the homologous recombination that occurs at a high rate in the yeast *S. cerevisiae* after the yeast spheroplast has been co-transformed with genomic DNA of the organism of interest and a TAR shuttle vector containing one or two specific target sequences as “hooks” from the genome region to be cloned.

The size of the target can be ~60 bp at a minimum and up to 1.5 kb (Noskov *et al*, 2001). Using positive and negative selectable markers the yield of positives is 0.05 – 40 % of transformants as either circular or linear molecules within the yeast host. The size of the cloned sequence depends on the position of the targets in the genome and can be up to 300 kb.

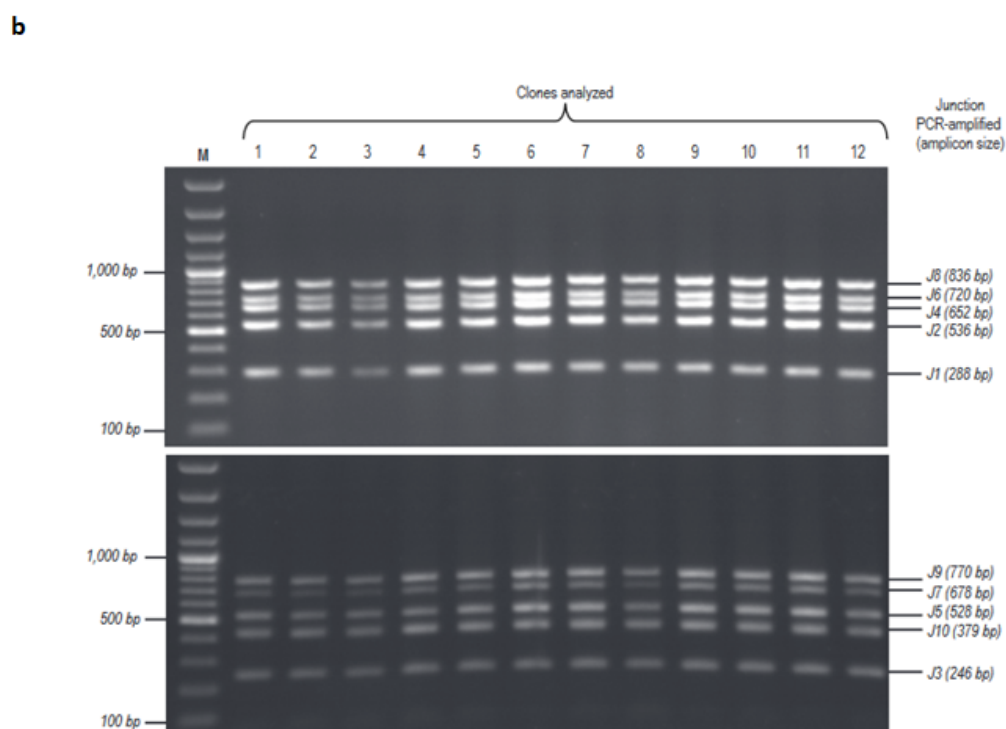
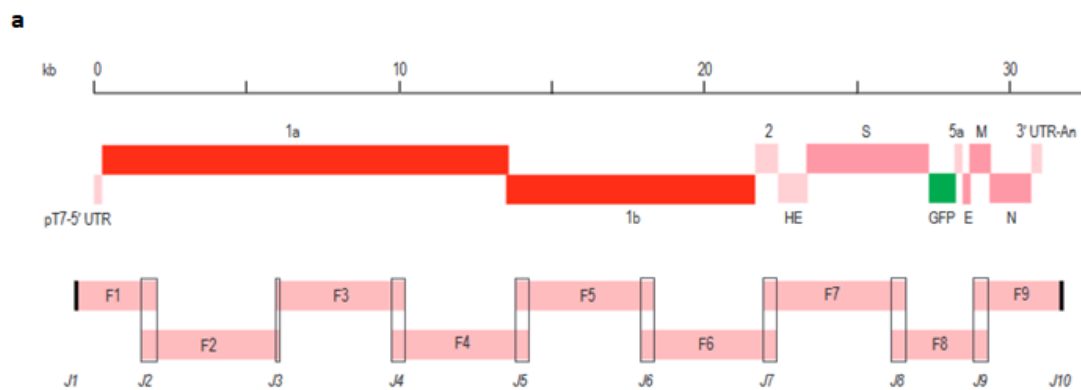
Extrait de Kouprina N. *et al.*, Transformation-associated recombination (TAR) cloning for genomics studies and synthetic biology. *Chromosoma*, 2016.

Document 11 : Vérification par PCR multiplexe de l'intégrité du génome viral de MHV-GFP obtenu grâce à la plateforme du document 10

Extrait de Thao TTN. *et al.*, Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature*, 2020.

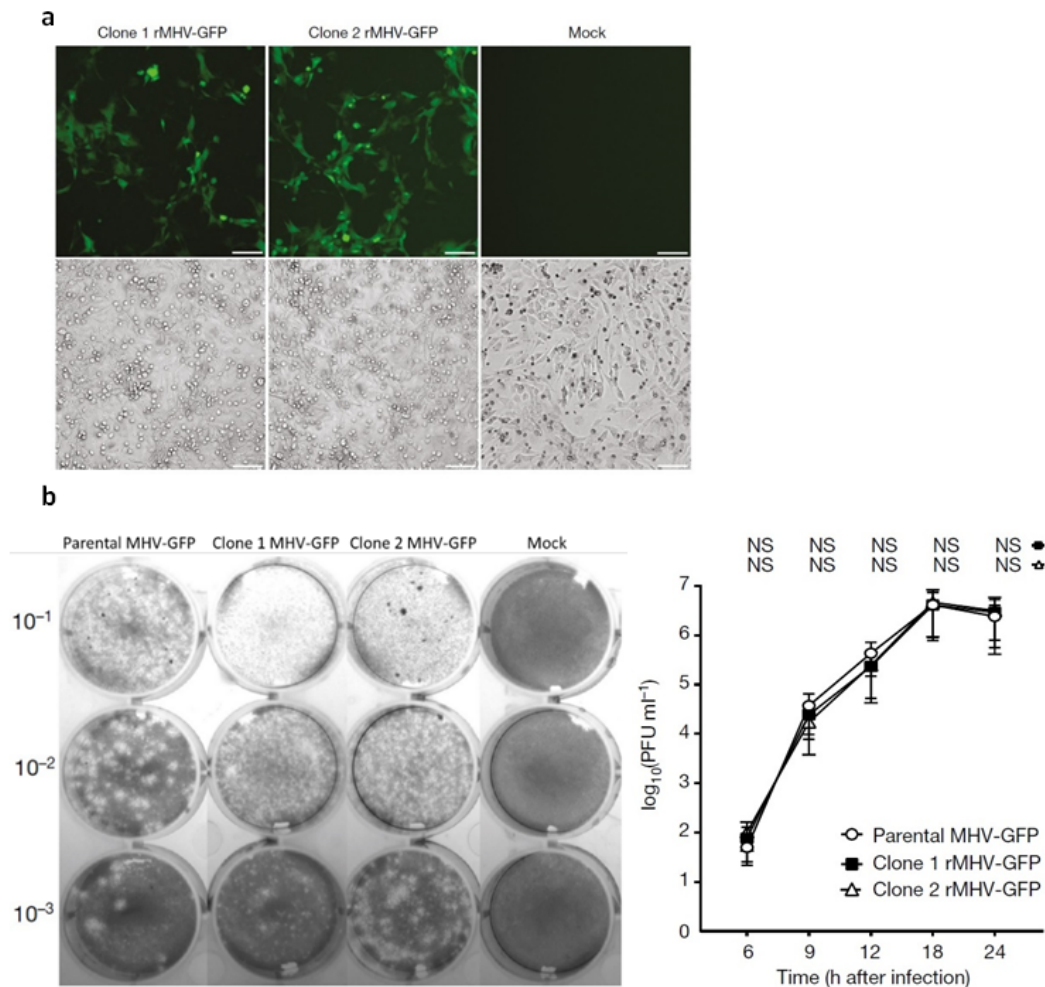
a Schematic representation of the MHV-GFP genome organization and 9 viral subgenomic fragments (F1-9) used for TAR-cloning. Viral open reading frames (ORFs), the ORF for GFP and sequence elements at the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) are indicated. J2-J9 represent the junctions, that is, overlapping regions, between the subgenomic fragments. J1 and J10 represent junctions with the TAR vector.

b Gel images show the results of two multiplex PCRs designed to confirm the presence of correctly recombined junctions. Multiplex PCR using set 1 primers (top) detects junctions J1, J2, J4, J6, J8, and multiplex PCR using set 2 primers (bottom) detects junctions J3, J5, J7, J9, J10.



Document 12 : Vérification de la capacité du génome viral obtenu grâce à la plateforme génomique à engendrer des particules virales infectieuses

Extrait de Thao *et al.*, Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature*, 2020.



a) Les ARN de synthèse produits par la levure (clone 1 ou clone 2) sont transfectés conjointement à un ARNm codant la protéine de nucléocapside (N) du virus MHV dans des cellules BHK-MHV-N placées en coculture avec des cellules 17 CI-1 sensibles au MHV. Les cellules sont observées au microscope inversé (ligne du bas) pour vérifier les effets cytopathologiques du virus MHV ainsi qu'en microscopie à fluorescence (ligne du haut) pour vérifier l'expression de la protéine GFP.

b) La cinétique de production virale est déterminée par dénombrement des plages de lyse au cours du temps. Les résultats obtenus pour les clones 1 et 2 de la plateforme génomique sont comparés à ceux du génome parental. Légende : NS correspond aux résultats des tests de Student réalisés entre « carré noir ou triangle blanc » et la condition « parental ». NS = Not Significant.

Annexe

Programme CBPH – système immunitaire et défense de l'organisme (durée conseillée : 7 semaines) - Bulletin officiel spécial n°8 du 25 juillet 2019



Biologie et physiopathologie humaines

Objectifs et enjeux de cet enseignement

L'enseignement de biologie et physiopathologie humaines donne à l'élève de la série Sciences et technologies de la santé et du social les connaissances qui lui permettent de comprendre l'organisation générale de l'être humain et d'appréhender son fonctionnement intégré.

L'étude des grandes fonctions, caractéristique de la formation en biologie humaine de cette série technologique, ancre sa spécificité dans une approche contextualisée de l'enseignement par l'étude de certaines pathologies.

Cet enseignement permet de conduire une analyse des interactions de l'organisme avec l'environnement dans ses dimensions biologiques et médico-sociales.

Il développe des savoirs et des compétences en biologie et physiopathologie humaines déterminants pour la poursuite d'études supérieures dans les secteurs paramédical et social.

Compétences visées

La formation en biologie et physiopathologie humaines repose sur une approche technologique qui allie la démarche expérimentale et une analyse du fonctionnement normal et pathologique de l'individu. Une telle approche permet à l'élève :

- d'acquérir une démarche d'analyse ;
- de développer esprit critique et raisonnement scientifique ;
- de conforter et renforcer les capacités d'expression écrite et orale ;
- d'acquérir un vocabulaire scientifique et médical et de le mobiliser ;
- d'appréhender le fonctionnement de l'organisme humain dans son environnement, échangeant matière et information ;
- de comprendre les mécanismes d'apparition de pathologies majeures et d'aborder des éléments de leur diagnostic et de leurs traitements.

Présentation du programme de la classe terminale

Inscrit dans la continuité du programme de la classe de première et adoptant, dans son architecture, le même esprit, le programme de la classe terminale traite de grandes fonctions physiologiques qui s'articulent les unes avec les autres et permettent d'aborder des problèmes actuels de santé publique :

- « **Fonctionnement intégré et homéostasie** » permet de comprendre l'organisation hiérarchisée de l'organisme, son fonctionnement intégré ouvert sur son environnement et la nécessité de régulation.
- « **Défense de l'organisme** » permet de comprendre les mécanismes immunitaires mis en œuvre par l'organisme pour lutter contre le « non soi ». Il permet une ouverture vers des problèmes sanitaires et sociaux de dimension internationale (épidémie, accès aux médicaments, vaccination ...).
- « **Transmission de la vie et hérédité** » trouve une cohérence dans l'étude des caractères héréditaires et des mécanismes assurant leur transmission.

L'étude de la terminologie s'appuie sur la liste suivante des principaux préfixes et suffixes et reprend les acquis de la terminologie de la classe de première.

Préfixes : a, anti, brady, dys, en, endo, eu, exo, hémi, hyper, hypo, macro, micro, néo, oligo, poly, tachy.

Suffixes : algie, centèse, cide, cyte, ectasie, ectomie, émie, gène, genèse, gramme, graphie, ite, logie, lyse, mégalie, ome, ose, pathie, pénie, plastie, plégie, rragie, rrhée, scopie, stomie, thérapie, tomie, trophie, urie.

© Ministère de l'Éducation nationale et de la Jeunesse > www.education.gouv.fr

• **Système immunitaire et défense de l'organisme**

Notions et contenus	Capacités exigibles <i>Activités technologiques support de la formation</i>
<p>Comment le système immunitaire distingue-t-il le soi et le non-soi ? Comment l'organisme se défend-il contre le non-soi ? Quelle prévention et quels traitements peut-on envisager contre les maladies infectieuses ?</p>	
<p>Maladies infectieuses : Agents pathogènes. Bactéries et multiplication bactérienne. Virus et cycle viral. Antibiothérapie et résistance aux antibiotiques.</p> <p>Soi et non-soi. Organes et cellules de l'immunité.</p> <p>Un exemple de mise en jeu des défenses immunitaires : la grippe. Voie de contamination. Notion de barrière cutanéomuqueuse. Immunité innée : réaction inflammatoire.</p> <p>Réponse acquise à médiation humorale : rôle des anticorps.</p>	<p>Identifier les différentes catégories d'agents pathogènes. Comparer la structure des bactéries et des virus et caractériser leur mode de reproduction respectif. Repérer les étapes d'un cycle viral. Lire et interpréter un antibiogramme. Repérer les principales cibles cellulaires des antibiotiques. Distinguer résistance naturelle et résistance acquise par mutation ou transfert de gènes. Faire le lien entre l'utilisation des antibiotiques et la sélection de souches résistantes. En déduire l'intérêt des campagnes de prévention. <i>Observation de microorganismes.</i> <i>Réalisation d'un antibiogramme.</i></p> <p>Distinguer la notion de soi et de non soi à partir de résultats expérimentaux. Identifier et localiser les principaux marqueurs du soi. Définir les notions d'antigène et d'épitope. Localiser les organes lymphoïdes primaires et secondaires et donner leurs rôles. Identifier les éléments figurés du sang. <i>Observation de frottis sanguins.</i></p> <p>Citer les principaux symptômes de la grippe en lien avec la voie de contamination du virus et les cellules cibles. Présenter les différentes défenses cutanéomuqueuses. Relier les phénomènes vasculaires et cellulaires aux quatre symptômes de la réaction inflammatoire. Présenter le rôle et le mécanisme de la phagocytose. Présenter l'activation spécifique des lymphocytes B, leur multiplication et leur différenciation en plasmocytes. Comparer l'ultrastructure des lymphocytes B et des plasmocytes. Relier l'ultrastructure des plasmocytes à leur fonction. Localiser paratope, site de fixation du complément et site</p>