



## VOIE TECHNOLOGIQUE

STL : sciences et technologies de laboratoire

2<sup>DE</sup>

1<sup>RE</sup>

T<sup>LE</sup>

*Biochimie-biologie-biotechnologies*

ENSEIGNEMENT

SPECIALITE

## SUJET SPÉCIMEN N° 2

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

#### Étude d'un vaccin oral contre le paludisme à base de spiruline génétiquement modifiée

S2.3 Réponse immunitaire adaptative  
T2.2 Modélisation de la croissance en milieu non renouvelé  
T6 Détecter et caractériser les biomolécules (agglutination)  
T9.4 Clonage d'un fragment d'ADN  
L1.2.4 Évaluation des résultats expérimentaux

#### Compétences évaluées

C1	C2	C3	C4	C5	C6
Analyser un document	Effectuer les calculs	Interpréter des données	Argumenter un choix technique	Élaborer une synthèse	Communiquer à l'écrit
4 points	3 points	4 points	3 points	5 points	1 point

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

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

Retrouvez éducol sur



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

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

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

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

La démarche se décompose en trois parties :

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

### **1. Étude de l'immunogénicité d'un parasite du genre plasmodium**

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

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

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

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

### **2. Vérification de la construction plasmidique**

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

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

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

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

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

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

Les résultats sont présentés dans le **document 3**.

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

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

### 3. Recherche d'un dispositif adapté de production de spiruline génétiquement modifiée

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La mise au point d'un vaccin au laboratoire n'est que la première étape d'un long processus avant sa mise sur le marché et sa production à grande échelle.

Des tests précliniques chez l'animal, puis des tests cliniques chez l'être humain sont réalisés pour montrer la tolérance et l'efficacité du vaccin.

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

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

### Document 1 : immunisation de souris par *Plasmodium*

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

#### Procédure

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

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

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

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

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

#### Résultats

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

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

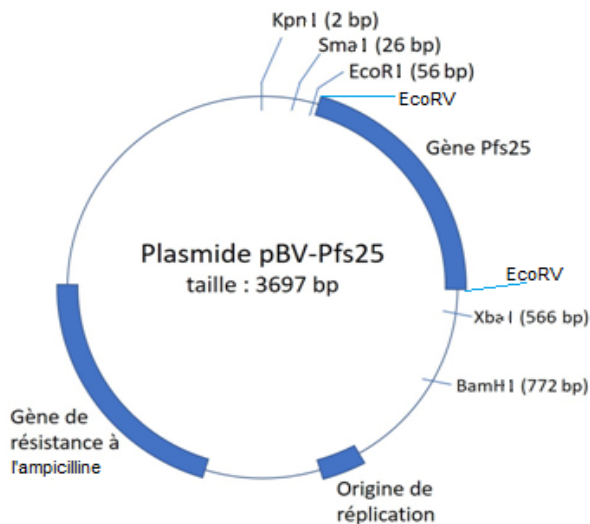
### Document 2 : construction d'un plasmide recombiné contenant le gène codant la protéine Pfs25

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

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

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

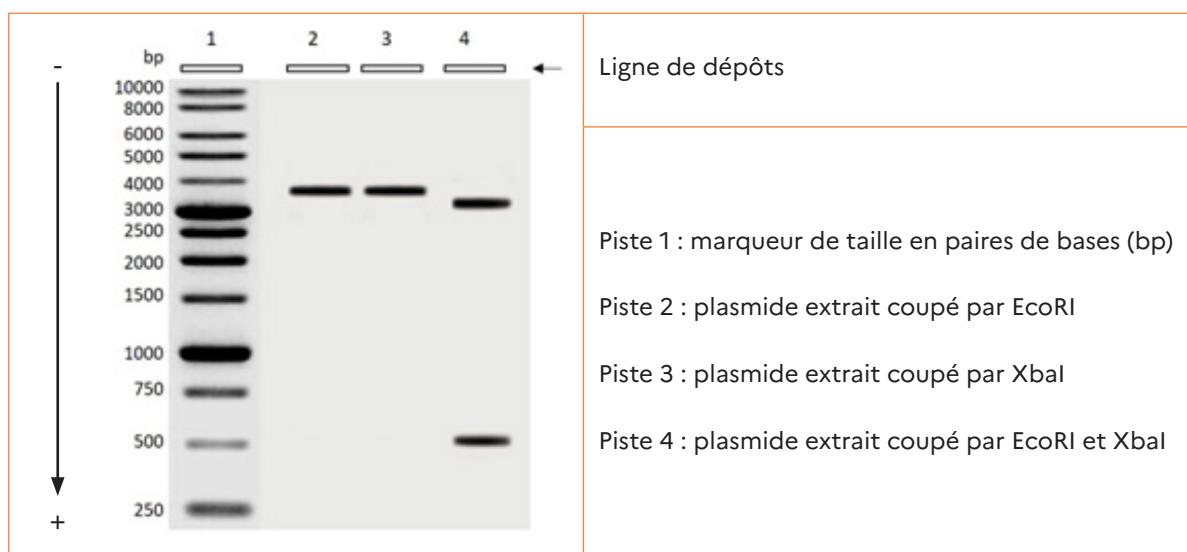
La position exacte de chaque site de restriction est donnée en paires de bases (pb) à partir d'un nucléotide choisi arbitrairement.



D'après <https://www.addgene.org>

### Document 3 : électrophorégramme des molécules d'ADN obtenues après digestion du plasmide extrait

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



## Document 4 : dispositifs de production industrielle de spiruline

### Conditions de culture

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

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

### Les bassins à ciel ouvert

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



Source : [AlgaeIndustryMagazine.com](http://AlgaeIndustryMagazine.com) (April 2011)

### Les photo-bioréacteurs

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



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

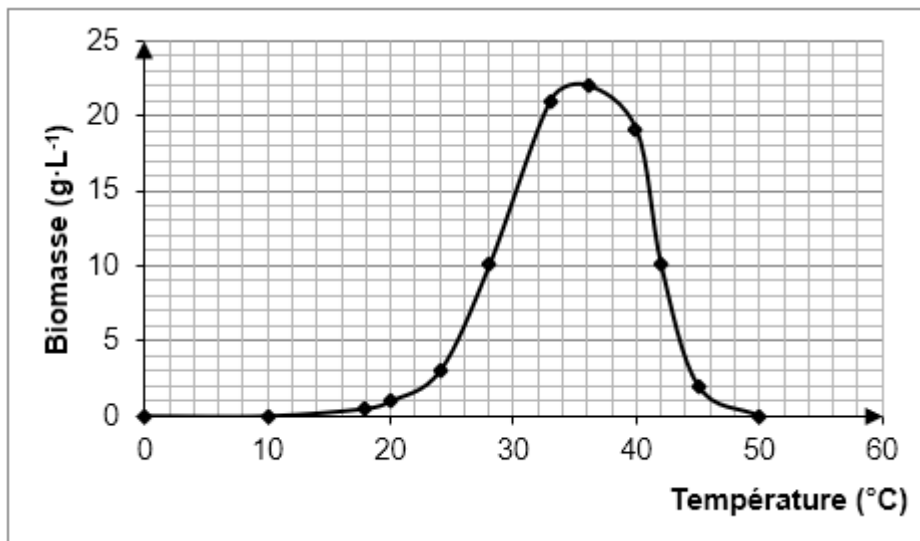
Critères de choix	Bassins à ciel ouvert	Photo-bioréacteurs
Biomasse produite par unité de surface exploitée	faible	élevée
Besoins énergétiques (agitation, aération, éclairage)	faibles	élevés
Coût matériel (installation, maintenance...)	faible	élevé
Risque de dissémination dans l'environnement du microorganisme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

Retrouvez éducol sur

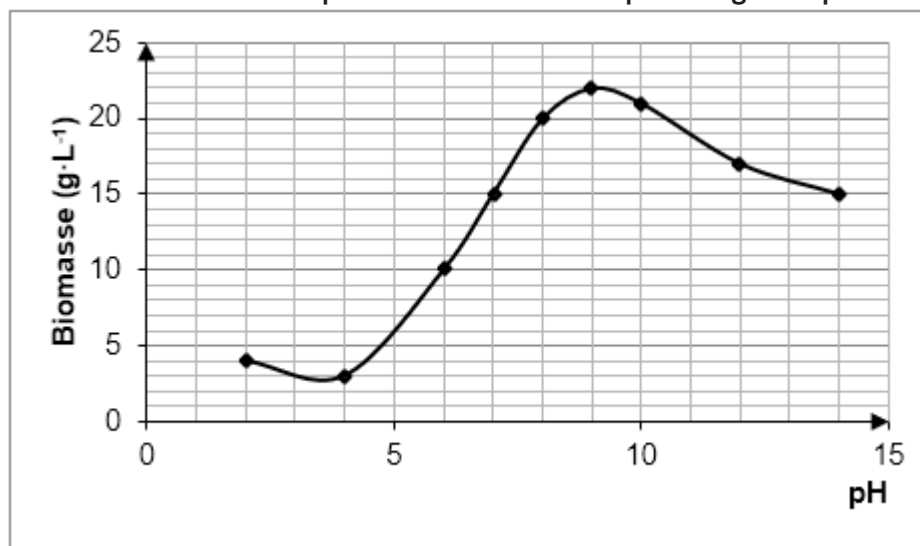


## Document 5 : étude des conditions de croissance de la spiruline génétiquement modifiée

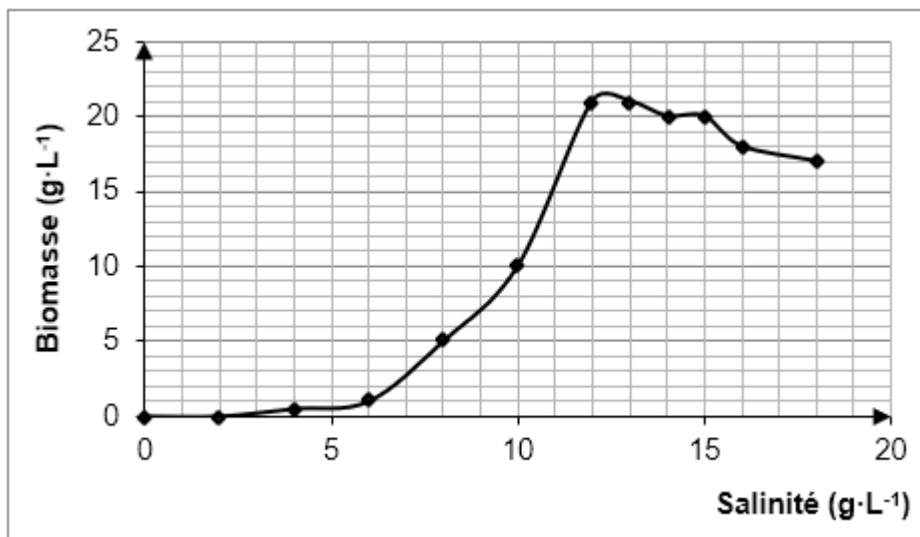
Courbe A – Influence de la température sur la biomasse de spiruline génétiquement modifiée



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



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

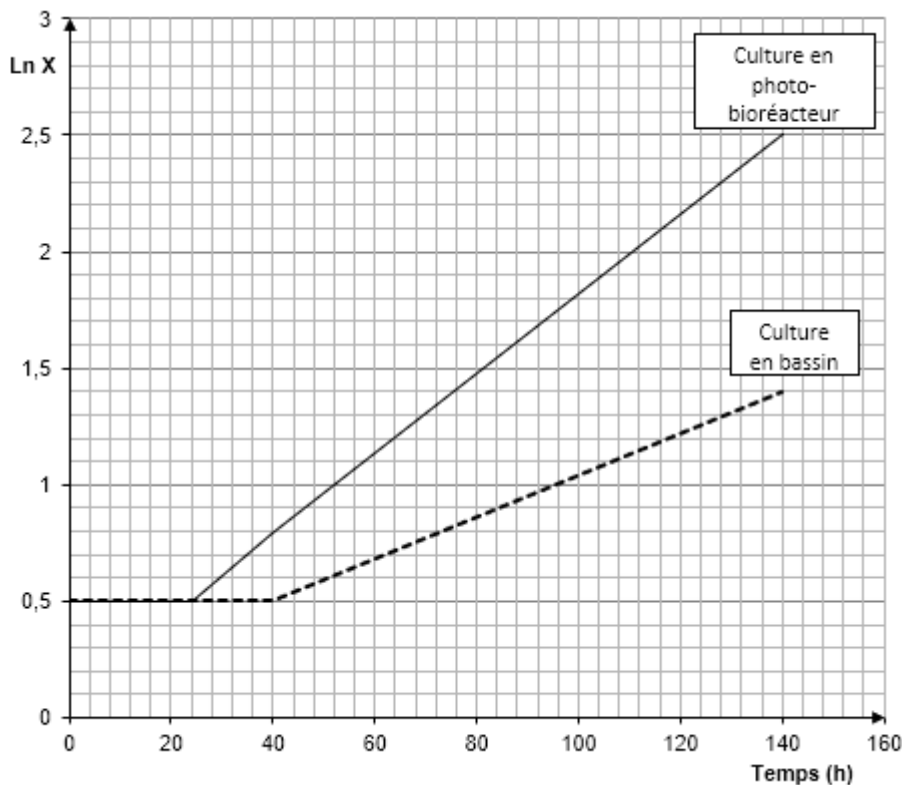


Retrouvez éducol sur





### Document 6 : courbes de croissance modélisées de la spiruline génétiquement modifiée dans deux dispositifs de production différents

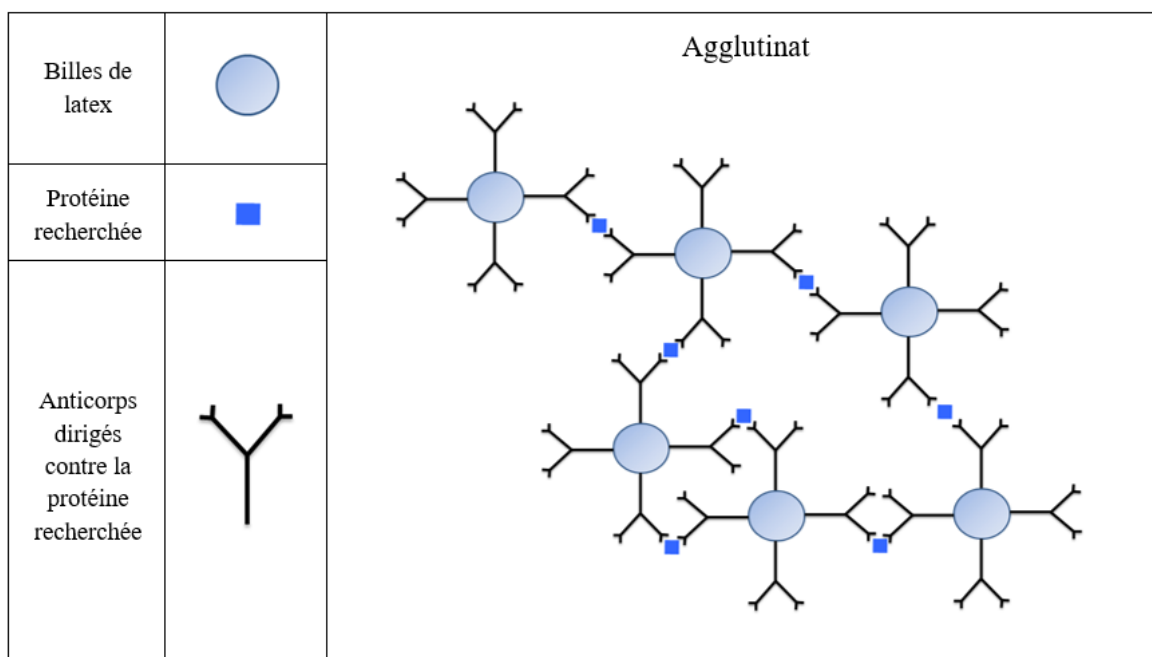


Donnée :

X = biomasse de spiruline génétiquement modifiée

### Document 7 : recherche de la protéine Pfs25 par agglutination

#### Représentation moléculaire d'une agglutination



Retrouvez éducol sur



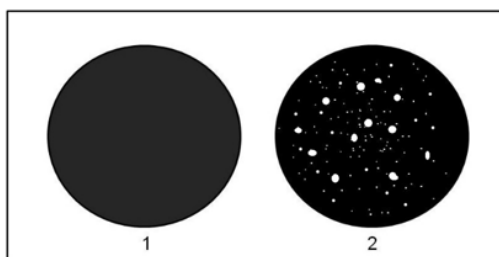
### Réactifs et échantillon

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

### Mode opératoire

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

### Résultats



Eau physiologique

Solution protéique

## Document 8 : critères de choix d'un vaccin

### Vaccins atténués ou inactivés

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

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

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

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

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

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

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