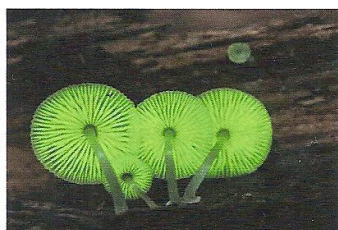


## LA BIOLUMINESCENCE

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

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



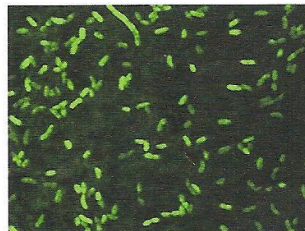
*Mycena luxaeterna* ou « champignons à lumière éternelle » de la forêt tropicale de Sao Paulo.



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



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



*Vibrio fischeri*

Un exemple de bioluminescence bactérienne.

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

Cette bioluminescence a de multiples fonctions chez les êtres vivants :

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

## 1. La bioluminescence, un phénomène biochimique valorisable

### 1.1. Organisation et diversité des systèmes bioluminescents

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

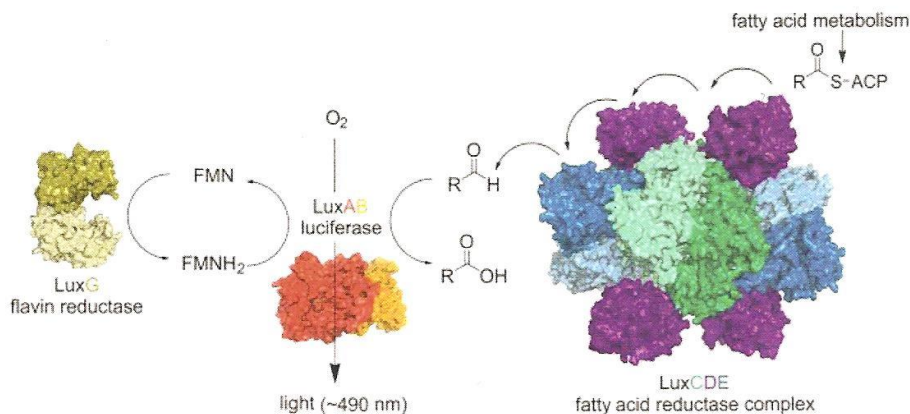
**Q1.** En vous appuyant sur le **document 1**, **rappeler** la nature des liaisons et des interactions impliquées dans les différents niveaux de conformation tridimensionnelle de l'enzyme.

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

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

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

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



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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1.2. Éclairer avec du vivant

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

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

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

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

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

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

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

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

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

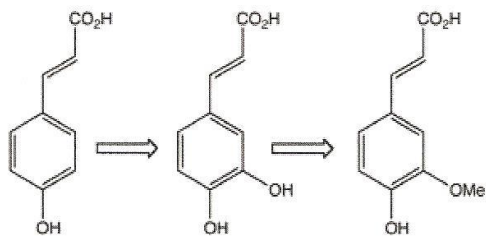
**Q15.** En vous appuyant sur le **document 8**, **argumenter** le choix du plasmide Ti d'*Agrobacterium* pour transformer la plante.

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

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



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



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

Extrait wikipedia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

### 3. La bioluminescence et la santé

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

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

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

##### 3.1.1. Anticorps et nanocorps

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

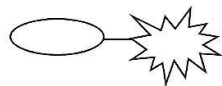
Les nanocorps trouvent également des applications dans des tests immunoenzymatiques tel que le test LuLISA

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

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

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

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



Conjugué : nanocorps anti IgE couplé à la luciférase



IgE

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

#### Expérience 1

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

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

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



support



antigène OVA



IgE anti OVA



PAL

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



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

### **Expérience 2**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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