

SESSION 2025

AGRÉGATION
Concours interne et CAER

Section
BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

Première épreuve

L'épreuve prend appui sur un dossier technique relatif à un problème biotechnologique.

Durée : 6 heures

L'usage du dictionnaire anglais-français est autorisé.

L'usage de la calculatrice est également autorisé.

L'usage de tout autre dictionnaire et matériel électronique est rigoureusement interdit.

Il appartient au candidat de vérifier qu'il a reçu un sujet complet et correspondant à l'épreuve à laquelle il se présente.

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.

Le fait de rendre une copie blanche est éliminatoire.

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.

AGRÉGATION INTERNE BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIE

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

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EAI	7100A	101	0809

► Concours interne de l'Agrégation de l'enseignement privé :

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EAH	7100A	101	0809

Les biotechnologies au service de l'ingénierie tissulaire : approches thérapeutiques et alimentaires

Les innovations en biotechnologies permettent de relever des défis majeurs, notamment dans les domaines de la santé et de l'environnement. La connaissance des cellules souches, des interactions entre les cellules et les matrices tridimensionnelles, ainsi que le développement des techniques de culture cellulaire ont contribué à l'émergence de l'ingénierie tissulaire.

La peau de poissons, utilisée comme biomatériau améliore la cicatrisation des plaies, accélère la régénération tissulaire et constitue une solution thérapeutique innovante de médecine régénérative dans le traitement des brûlures et des ulcérations.

Dans le domaine alimentaire, la production de viande obtenue à partir de cultures de cellules animales est explorée, dans une démarche de développement durable, pour déterminer si elle constituerait une alternative convaincante à l'élevage traditionnel.

Partie 1 : Dispositif de cicatrisation de plaies à l'aide de la peau de poissons

Dans le cadre du traitement des brûlures et des ulcérations, la société islandaise Kerecis® développe, depuis les années 2010, des solutions alternatives à la greffe de peau à partir de la valorisation de la peau de cabillaud.

Le **document 1** propose deux extraits d'articles de vulgarisation présentant le dispositif thérapeutique. Les expressions de « greffe de peau de poisson » ou de « substitut cutané » sont indifféremment employées dans ces extraits d'articles.

ST1. Rédiger un paragraphe argumenté, d'une page maximum, pour discuter de la rigueur scientifique de ces deux expressions désignant le dispositif de cicatrisation présenté.

L'efficacité relative de la cicatrisation de blessures à l'aide de peaux issues de deux espèces animales a été analysée par des chercheurs à l'aide d'un modèle expérimental animal réalisé chez le porc (**document 2**). Le taux de fermeture des plaies a été mesuré (**document 2A**) et le flux sanguin analysé par imagerie speckle laser (LSI) (**document 2B**). Cette technique d'imagerie, qui combine résolution et rapidité élevées, permet la visualisation instantanée de l'irrigation sanguine tissulaire microcirculatoire.

ST2. Réaliser une analyse synthétique des résultats présentés pour conclure sur la peau d'origine animale à choisir pour le traitement initial des brûlures.

La peau est un tissu hétérogène, à l'architecture complexe, dont la composition cellulaire et moléculaire varie entre espèces animales et entre individus. Afin d'étudier l'impact de la composition lipidique d'échantillons de peau sur leur efficacité thérapeutique, des chercheurs ont comparé quatre dispositifs thérapeutiques : de la peau de poisson acellulaire (ACS), deux peaux d'origine bovine (BCI et BCII) et de la peau de cadavre humain (HCS). Dans chaque échantillon, les chercheurs quantifient

la teneur en acides gras totaux et les identifient par chromatographie en phase gazeuse (**document 3**).

ST3. Analyser les résultats obtenus pour discuter de leur variabilité entre espèces et entre individus.

L'analyse des acides gras contenus dans chaque échantillon a également été réalisée par HPLC en phase inverse couplée à de la spectrométrie de masse MS-MS. Le principe de cette technique ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans le **document 4**.

ST4. Discuter de l'intérêt de l'utilisation d'une HPLC en phase inverse et de celui d'un couplage MS-MS de l'analyseur pour la détermination de la composition en acides gras d'un échantillon.

ST5. Synthétiser les résultats de l'analyse des acides gras par HPLC-MS/MS de 4 échantillons de peau afin d'identifier des caractéristiques communes et spécifiques.

Afin d'analyser le rôle potentiel des lipides extraits de peau de poissons sur la cicatrisation des plaies, une étude *in vitro* a été réalisée. Pour cela, des cellules issues d'une lignée immortalisée de kératinocytes humains, HaCaT, ont été traitées *in vitro* avec des extraits lipidiques provenant de peau de poissons. Des tests de blessure sont ensuite mis en œuvre sur ces cultures cellulaires afin de modéliser une plaie cutanée. Le matériel, une schématisation du mode opératoire et les résultats obtenus sont présentés dans le **document 5**.

ST6. Analyser les résultats obtenus pour conclure sur les effets *in vitro* des lipides extraits de peau de poissons sur la réépithélialisation.

ST7. Proposer des hypothèses sur les mécanismes moléculaires et cellulaires favorisant le processus de cicatrisation.

Après la réalisation de tests *in vitro*, des bandages acellulaires à base de peau de poissons ont fait l'objet d'essais *in vivo* sur l'animal et l'être humain. Le **document 6** présente des protocoles d'essais *in vivo*.

P1. Lister les objectifs et les activités d'apprentissage des séances constitutives d'une séquence pédagogique visant à engager les étudiants dans une analyse approfondie sur les enjeux éthiques de l'expérimentation animale, en respectant le cadre suivant :

- co-enseignement avec un enseignant de philosophie ;
- compétence visée : C4.4. Faire preuve d'intégrité scientifique et se positionner d'un point de vue éthique (extrait du référentiel du BTS Biotechnologie en recherche et en production repris dans le **document 8**) ;
- programmation sur un maximum de six séances d'une heure ;
- exploitation des **documents 6 et 7**.

Partie 2 : Aspects technologiques de la croissance de cellules animales en bioréacteur

Face aux besoins nutritionnels de la population mondiale et face au poids de la filière agro-alimentaire dans le changement climatique, des innovations sur les modes alternatifs de production de protéines animales sont nécessaires.

La viande artificielle est un aliment obtenu par bio-ingénierie en laboratoire à partir de cellules précurseurs de muscle de bœuf, de porc ou de volaille. Sa production nécessite de cultiver des cellules myoblastiques dans des bioréacteurs en contrôlant soigneusement la température, le pH, le degré d'oxygénation ainsi que la composition du milieu de culture.

L'un des enjeux technologiques et économiques de la production de viande cultivée est de parvenir à mettre au point un milieu de culture adapté à de nombreuses lignées cellulaires, peu coûteux, standardisé et sans risque sanitaire pour le consommateur.

Dans ce but, trois modèles de précurseurs myoblastiques ont été mis en culture et la concentration pour chacun des acides aminés dans le surnageant de culture a été analysée au cours du temps par HPLC. Le **document 9** présente la concentration pour chaque acide aminé dans le surnageant des milieux de culture au cours de la croissance des cellules.

ST8. Identifier les acides aminés qui semblent indispensables dans la composition d'un milieu de culture pour la croissance des précurseurs myoblastiques.

Pour s'affranchir complètement de la dépendance aux produits d'origine animale, l'utilisation d'extraits de microalgues, comme *Chlorella vulgaris*, riches en acides aminés, est envisagée pour compléter les milieux de culture de précurseurs myoblastiques et de myoblastes. Deux méthodes d'extraction d'acides aminés de chlorelles sont alors testées. Le **document 10** présente les profils en acides aminés d'extraits de *Chlorella vulgaris* obtenus soit par hydrolyse acide (AHE), soit par fractionnement ultrasonique.

ST9. Argumenter le choix des chercheurs d'utiliser soit l'une, soit l'autre, ou bien les deux méthodes d'extraction d'acides aminés, pour produire un extrait d'acides aminés utilisable dans le cadre de l'étude envisagée.

Des milieux de culture peuvent être optimisés en ajoutant des extraits de chlorelles. Le **document 11A** décrit une procédure expérimentale pour la préparation d'un milieu optimisé à base d'extraits de chlorelles et destiné à la culture de myoblastes bovins. Le **document 11B** présente l'étude comparative de la croissance des cellules myoblastiques dans différents milieux de culture.

ST10. Argumenter les avantages à utiliser le milieu CVNM-CM pour la production de viande artificielle à partir de myoblastes cultivés.

Le **document 12** illustre une amélioration technologique du procédé de fabrication du milieu de culture des myoblastes.

ST11. Discuter des avantages et des limites du procédé de culture cellulaire circulaire.

Dans le cadre de la préparation des élèves de terminale à l'épreuve écrite de Biochimie – Biologie – Biotechnologie du baccalauréat STL biotechnologies, ceux-ci doivent rédiger une synthèse à partir des ressources du **document 13** pour répondre à la question suivante : « *Exposer les arguments qui permettent de discuter de l'intérêt de la production de viande cultivée en laboratoire. Durée indicative pour l'élève : 30 minutes. La longueur de la synthèse ne devra pas excéder une demi-page* ».

P2. Produire un exemple de réponse attendue, accompagné de conseils méthodologiques à destination des élèves.

La production industrielle de viande de culture repose sur la croissance de myoblastes en bioréacteur. Dans ce dernier, le dioxygène, O_2 , est apporté de manière active, le plus souvent par bullage, contrairement à la culture cellulaire statique pour laquelle les échanges gazeux se produisent passivement entre l'atmosphère de l'enceinte thermostatée et le milieu de culture.

L'oxygénation du milieu de culture est limitée par la diffusion du dioxygène des bulles d'air vers le milieu. Dans le bioréacteur, cette diffusion est quantifiée grâce au coefficient de transfert volumique en O_2 , appelé k_{La} . Le **document 14** décrit la méthode dynamique d'Humphrey et Taguchi qui permet la détermination du k_{La} . Le **document 15** présente les résultats expérimentaux obtenus lors de l'étude de l'oxygénation d'un milieu de culture dans un bioréacteur par la méthode dynamique d'Humphrey et Taguchi.

ST12. Déterminer le débit de consommation d' O_2 de la culture (OUR) exprimé en $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

ST13. Déterminer le k_{La} dans les conditions expérimentales, exprimé en s^{-1} . En déduire le débit maximal de transfert d' O_2 (OTR) dans le bioréacteur en $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

ST14. Conclure sur l'efficacité du système d'oxygénation.

Les cellules souches musculaires étant des cellules adhérentes, leur croissance en bioréacteur est réalisée à l'aide de micro-porteurs. Ces derniers sont des billes, de quelques centaines de micromètres à quelques millimètres de diamètre, sur lesquelles les cellules peuvent adhérer et se multiplier. Les micro-porteurs sont mis en suspension dans le bioréacteur grâce à une turbine ou un système de balancement. Des facteurs influençant la croissance cellulaire sur micro-porteurs en bioréacteur ainsi que des résultats expérimentaux montrant le rôle de l'un de ces facteurs sur la prolifération cellulaire sont présentés dans le **document 16**.

ST15. Proposer une ou plusieurs hypothèses sur l'influence de la vitesse de rotation de la turbine dans le bioréacteur sur la croissance cellulaire.

Le **document 17** représente les limites de la zone opératoire pour le fonctionnement d'un bioréacteur de 10 000 L avec des cellules en suspension. Les zones numérotées 1 à 4 sont incompatibles avec une culture efficace.

ST16. Associer aux zones 1 à 4 les phénomènes physico-chimiques limitant la croissance cellulaire.

Le **document 18** reproduit un extrait du programme de CPGE TB (Classe préparatoire aux Grandes Écoles - Technologie et Biologie).

P3. Exposer une stratégie pédagogique destinée à amener des étudiants de 2nde année de CPGE TB à construire un document bilan sur le fonctionnement d'un bioréacteur. Préciser le format du document à construire et la temporalité de sa réalisation. Lister les consignes données aux étudiants ainsi que les ressources mises à leur disposition. Argumenter les choix pédagogiques effectués.

Document 1 : Revue de presse

Extrait n°1

Des écailles de poisson pour accélérer la cicatrisation

Adapté de : <https://app.e-pansement.fr/actualites/des-ecailles-de-poisson-pour-accelerer-la-cicatrisation> (publié le 14/08/2016)

La peau de poisson contient les fameux acides gras omega-3 et des chercheurs ont déjà suggéré leur efficacité dans le traitement des plaies chroniques. Mais la peau de poisson comporte aussi des écailles qui constituent un « échafaudage naturel » idéal pour l'épithélialisation. Lors de la grande conférence européenne sur les plaies, l'European Wound Management Symposium (EWMA), la société Kerecis® avait déjà fait beaucoup parler de sa matrice à base de peau de poisson, riche en omega-3. De nouvelles données confirment aujourd'hui l'efficacité de ce dispositif acellulaire et innovant, avec un taux de cicatrisation qui avoisine les 90 %, en seulement 4 semaines, sur un échantillon de plaies chroniques anciennes, pour certaines, de plusieurs années.

Comment cela se présente-t-il ? Les feuilles ou matrices constituées d'écailles de poisson tout à fait visibles, forment un échafaudage riche en oméga-3 qui contribue à réduire l'inflammation et à prévenir l'infection et sur lequel les cellules vont se reproduire, former du tissu humain qui finit par se substituer à la « peau de poisson » et devenir enfin utilisable pour une greffe. Aucun traitement antiviral n'est nécessaire, ajoutent les chercheurs car, chez la morue, il n'existe pas de virus transmissible à l'être humain !

De la peau de poisson à la peau du patient : le matériau de base, la peau de poisson, est séché, conditionné et stocké, si nécessaire coupé pour être mis au format de la plaie, puis plongé dans l'eau pendant 30 secondes pour être réhydraté. La matrice est alors placée à l'intérieur de la plaie, recouverte ensuite par un pansement secondaire. Au fil du temps, la greffe de peau de poisson se dissout lentement et est remplacée par le propre tissu du patient.

Extrait n°2

Faire progresser la cicatrisation des plaies grâce à la peau de poisson : l'entrepreneur islandais et son équipe nominés pour le Prix de l'inventeur européen 2024

Adapté du Communiqué de presse 16 mai 2024 - <https://www.epo.org/fr/news-events/press-centre/press-release/2024/1147735>

Munich, le 16 mai 2024 – Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 60 millions de personnes en Europe souffrent de diabète. Cette maladie entraîne une diminution de la capacité à cicatriser les plaies, ce qui ne laisse aucune alternative à certains patients. Un substitut cutané à base de peau de poisson peut aider à guérir plus rapidement et plus efficacement ces plaies, ainsi que de nombreuses autres blessures graves et douloureuses, telles que les brûlures et les cicatrices chirurgicales. L'inventeur islandais Fertram Sigurjonsson et son équipe ont mis au point un substitut cutané avancé à base de peau de poisson, qui offre de multiples avantages par rapport aux produits concurrents de cicatrisation des plaies. M. Sigurjonsson et son équipe ont été sélectionnés parmi plus de 550 candidats et sont désormais finalistes dans la catégorie « Industrie » du Prix de l'inventeur européen 2024.

Document 2 : Analyse comparée du traitement de plaies chez le porc à l'aide de peau de poisson ou de derme de veau fœtal

Adapté de Stone R 2nd et al., *Int J Mol Sci.*, 2021

2A : Analyse du taux de fermeture des plaies chez le porc suite à un traitement à l'aide de peau de poisson ou de derme de veau fœtal

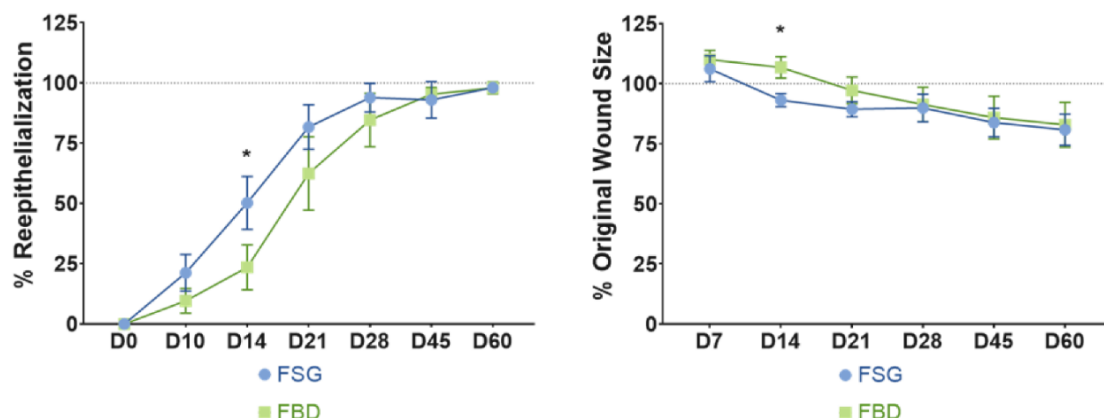
Matériel et méthodes :

Pour déterminer la réépithélialisation et la réduction des plaies au fil du temps, le logiciel SilhouetteConnect™ (Aranz Medical, Christchurch, Nouvelle-Zélande) a été utilisé. Ce logiciel permet de générer plusieurs régions d'intérêt par traçage (tatouage). Ainsi, la zone de plaie ouverte (OWA) de chaque plaie a été tracée pour chaque temps d'analyse.

Pour calculer le % de réépithélialisation (Re-ep%) pour chaque temps, la formule suivante a été utilisée, avec D0 comme OWA initiale au jour 0 et Dx représentant l'OWA aux autres jours.

$$\text{Re-ep}\% = ([\text{OWA}_{(D0)} - \text{OWA}_{(Dx)}]) * 100 / \text{OWA}_{(D0)}$$

Pour déterminer le taux de réduction de la plaie, un tracé (tatouage) est dessiné autour de chaque plaie pour chaque temps d'analyse. La surface de la plaie normalisée (Dx) a été déterminée en divisant la surface mesurée à un instant donné pour chaque plaie par l'augmentation moyenne de la surface mesurée dans les 2 plaies témoins (n'ayant pas subi de traitement) réalisées sur le même animal. La normalisation s'impose du fait de la croissance rapide du modèle animal choisi pour l'expérimentation.



Courbe de gauche : Pourcentage de réépithélialisation. La ligne pointillée représente une réépithélialisation de la plaie de 100 %.

Courbe de droite : Les taux de réduction sont indiqués en % de la taille initiale de la plaie. La ligne pointillée représente la taille initiale de la plaie. Toute valeur située en dessous de cette ligne est le résultat de la réduction des plaies au fur et à mesure qu'elles cicatrisent.

FSG : Fish skin graft (greffe de peau de poisson) ; FBD : Fetal bovine dermis (derme de veau fœtal).

Pour les deux courbes, l'astérisque indique un résultat significativement différent entre les deux conditions expérimentales (* p < 0,05 ; n=12). Analyse statistique faite par ANOVA.

2B : Analyse du flux sanguin par imagerie speckle laser (LSI – Laser speckle imaging)

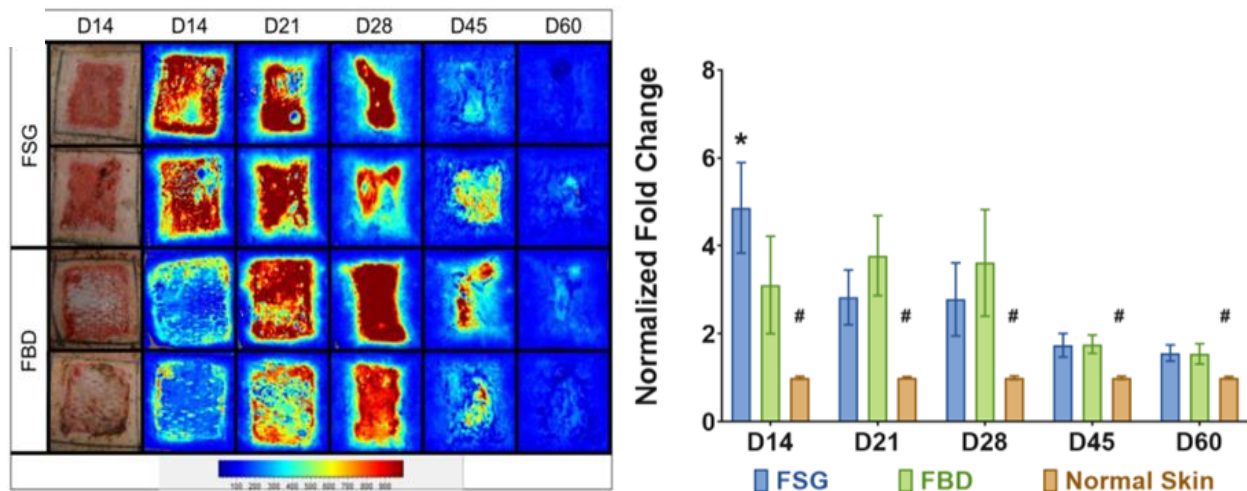


Figure de gauche : Pour chaque condition de traitement, deux plaies représentatives sont présentées. Des images numériques obtenues au jour 14 (D14) et les images de mouchetage laser correspondantes (LSI) obtenues à différents temps de l'expérience sont présentées. L'échelle de la carte thermique est présentée en-dessous : le bleu représente une faible irrigation et le rouge une forte irrigation. Il est à noter que le niveau d'irrigation dans la peau non lésée est bleu ciel et que, au moment de la cicatrisation au jour 60 (D60), les bords de la plaie ne sont plus visibles.

Figure de droite : Les images obtenues par LSI sont quantifiées et représentées sous forme du facteur de changement de l'intensité de marquage par rapport aux conditions contrôles réalisées sur chaque animal au jour désigné (# $p < 0,005$ pour la peau normale par rapport aux conditions de traitement ; * $p < 0,05$ pour FSG par rapport à FBD tel que déterminé par le test statistique ANOVA, $n = 12$).

FSG : Fish skin graft (greffe de peau de poisson) ; FBD : Fetal bovine dermis (derme de veau fœtal) ; Normal skin (peau de porc n'ayant pas subi de lésion).

Document 3 : Extraction et quantification de lipides à partir d'échantillons de peau

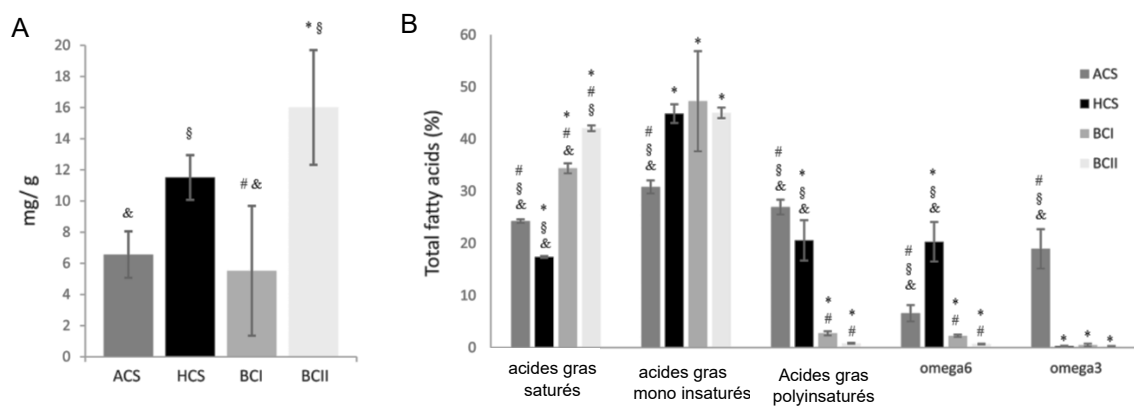
Adapté de Kotronoulas A et al., *J Tissue Eng Regen Med.*, 2020

Une extraction de lipides est effectuée à partir de 4 échantillons de peau :

- une peau de poisson acellulaire (ACS) ;
- une peau de cadavre humain (HCS) ;
- une peau d'origine bovine numérotée 1 (BCI) ;
- une peau d'origine bovine numérotée 2 (BCII).

Avant l'extraction, la surface et la masse de chaque échantillon ont été mesurées avant d'être découpés en petits morceaux. A l'issue de l'extraction, la phase organique est collectée.

La quantification des différents types de lipides est réalisée par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats sont présentés ci-dessous.



A = Rendements des extractions de lipides exprimées en mg de lipides par g de matière sèche.

B = Analyse de la composition en différents acides gras.

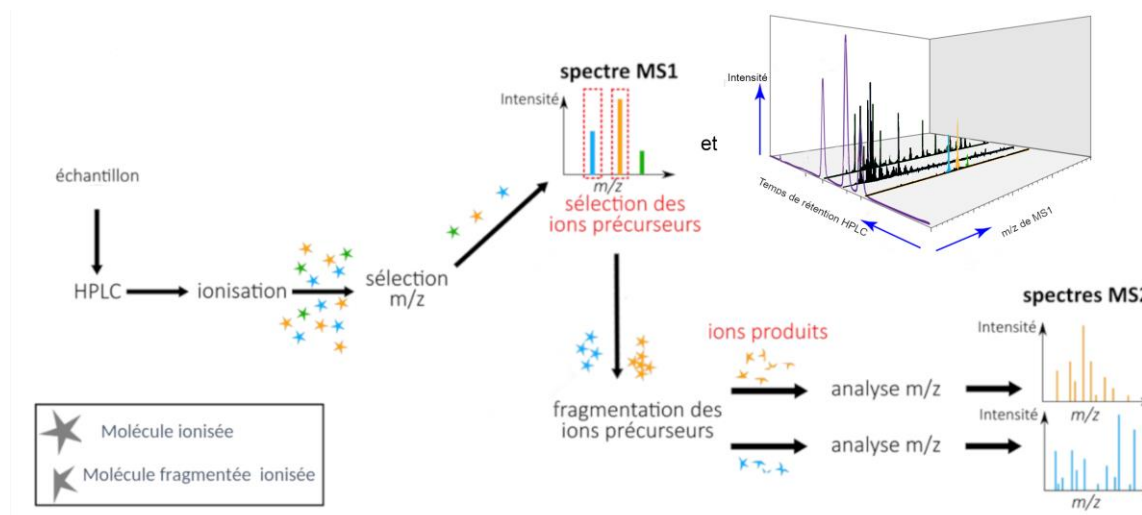
Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart type ($n = 3$). Un test statistique a permis d'identifier les différences significatives entre les groupes. * $p < 0,05$ par rapport à ACS, # $p < 0,05$ par rapport à HCS, § $p < 0,05$ par rapport à BCI, & $p < 0,05$ par rapport à BCII.

Document 4 : Analyse des acides gras par HPLC-MS/MS

Deux cent microgrammes d'extraits lipidiques ont été dissous dans 100 μL d'un mélange d'acétonitrile (ACN):H₂O (1:1) puis injectés dans un système HPLC-MS/MS.

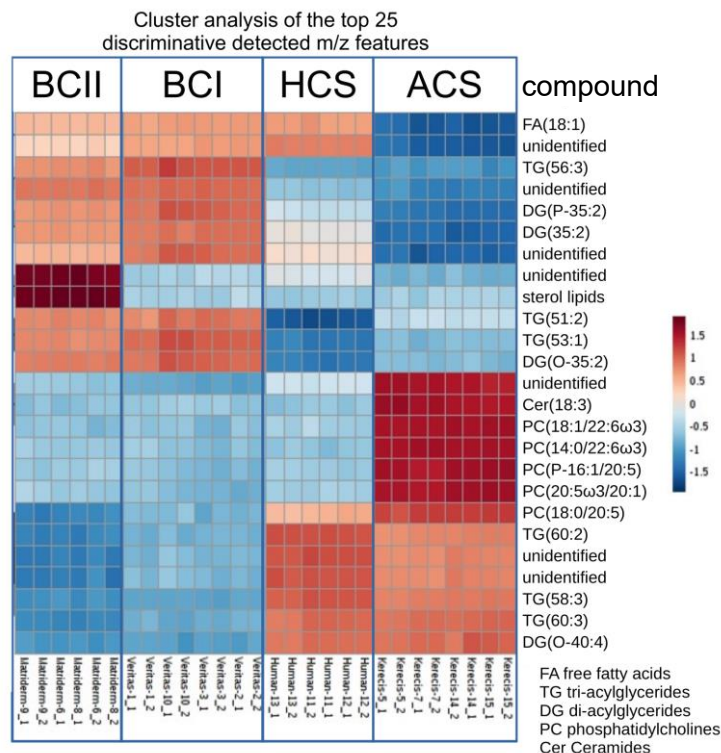
4A : Principe de l'analyseur MS/MS utilisé

Adapté de https://theses.hal.science/tel-03586760/file/BORGES_2021_archivage.pdf



4B : Heatmap de l'analyse groupée des 25 principales caractéristiques m/z discriminantes détectées dans les quatre échantillons de peau

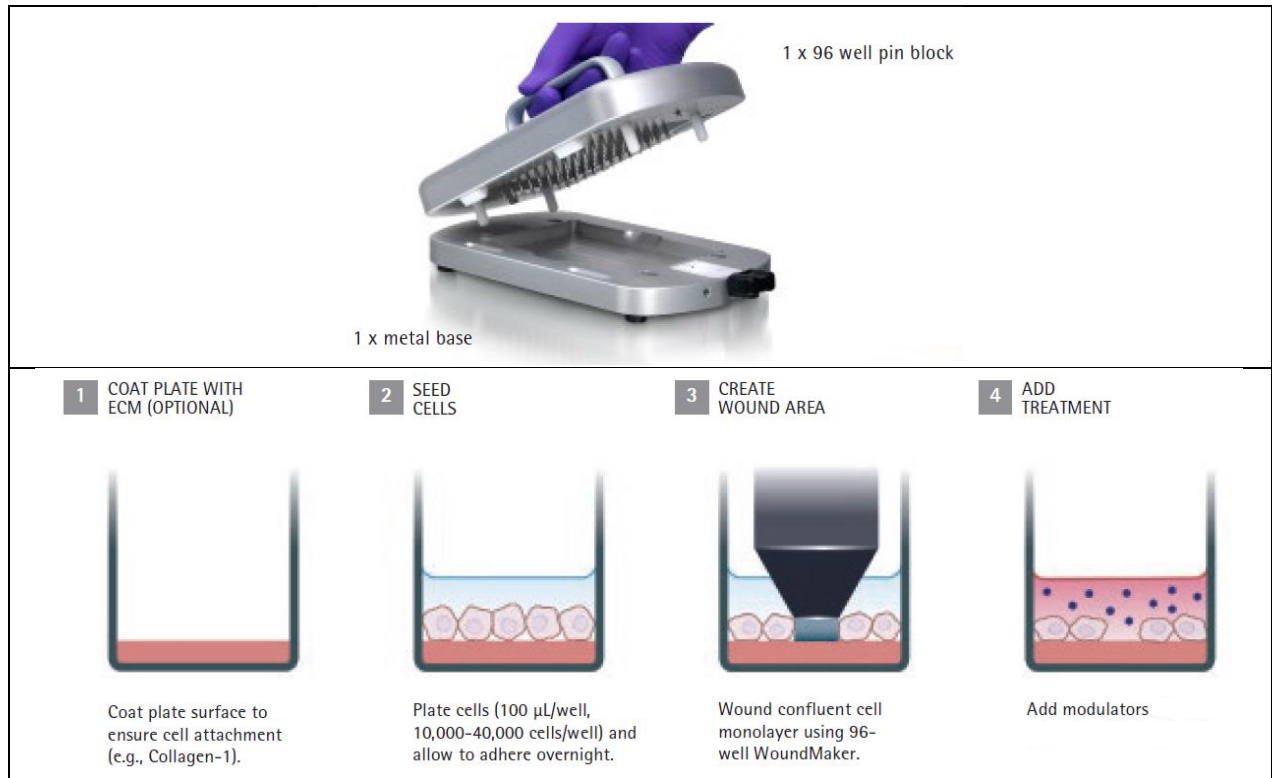
Adapté de Kotronoulas A et al., *J Tissue Eng Regen Med.*, 2020



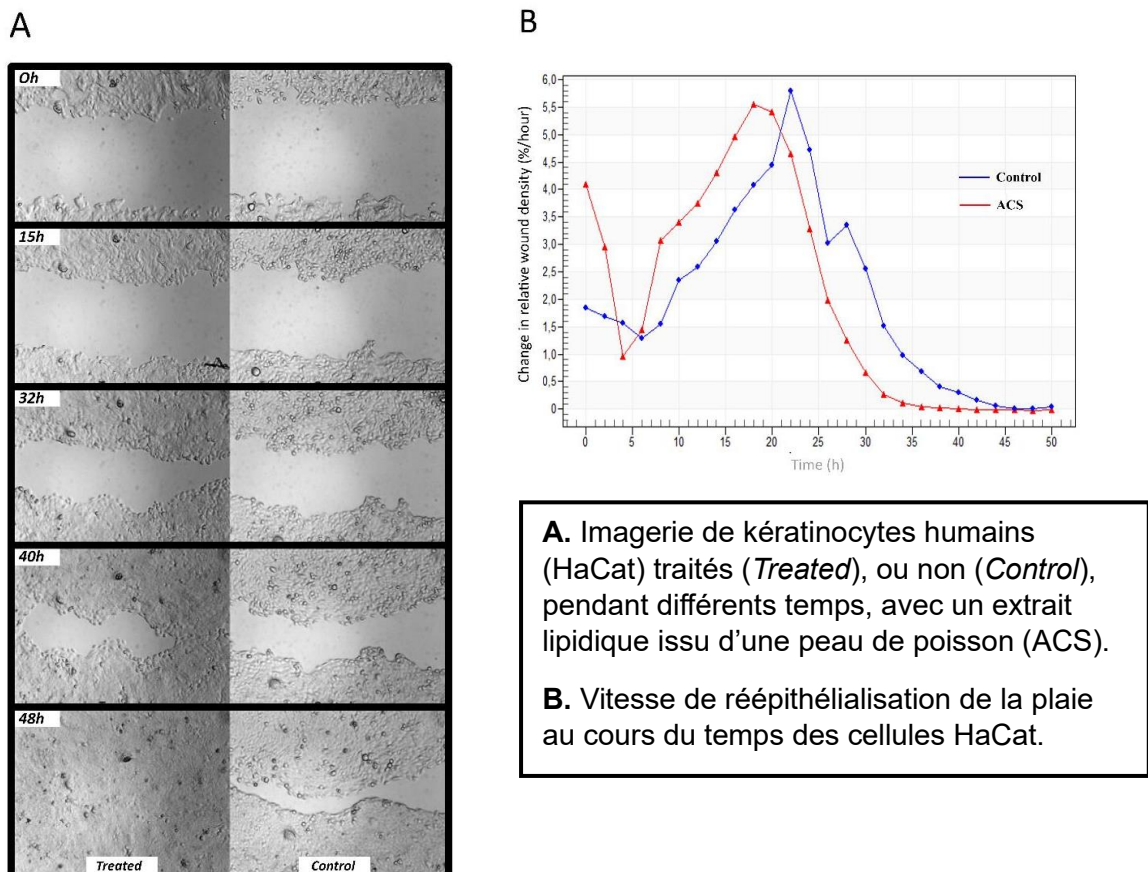
La heatmap est une représentation graphique statistique où les valeurs sont représentées par des couleurs. Le rouge correspond à une forte densité statistique et le bleu à une faible densité statistique.

Document 5 : Etude du rôle des lipides extraits d'une peau de poisson sur la cicatrisation par la réalisation d'un test de blessure *in vitro*

- Document fournisseur : Présentation de l'IncuCyte® Scratch Wound Assay (Sartorius) et schématisation de la procédure de création d'une blessure *in vitro*



- Résultats expérimentaux obtenus suite à la réalisation du test de blessure *in vitro*
Adapté de Kotronoulas A et al., *J Tissue Eng Regen Med.*, 2020



Document 6 : Protocoles de validation *in vivo* de l'utilisation de peau de poissons en cas de brûlure

- Burn Induction Step on mice

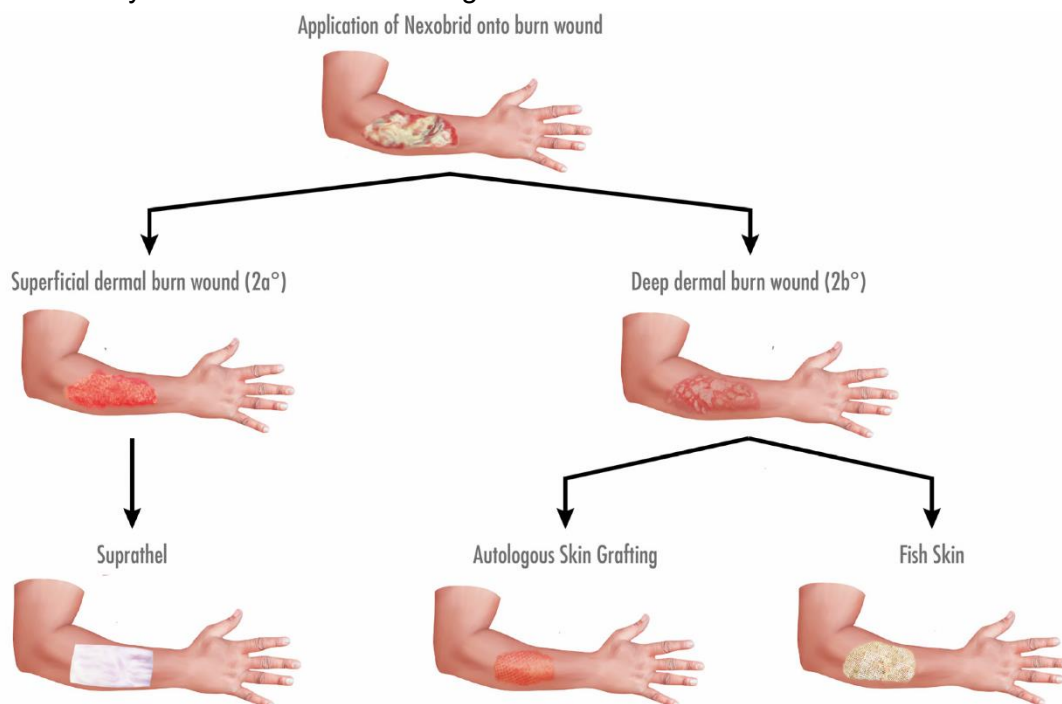
Adapté de Garrity C et al., J Funct Biomater., 2023

For this experiment, 32 C57BL/6 mice with ages ranging from 12 to 15 weeks were divided into two groups where males and females were equally represented. The mice were anesthetized using isoflurane (0.5–2%) and oxygen (2 L/min) in an induction chamber. During the induction, buprenorphine (0.05 mg/kg SC), Ceftiofur (20 mg/kg SC), and warm saline (5 mL SC) were administered subcutaneously. The mice were then transferred to a table, and maintenance isoflurane anesthesia was delivered via a nose cone. Once no pain reflex was registered on the paw pinch, the dorsum was shaved with beard clippers to expose approximately 2 cm × 3 cm area of skin. Veet hair removal cream was applied to the shaved area for 60 s to remove the hair completely. Once the cream was removed, each mouse was laid onto the plastic bed with the 20 × 30 mm opening (corresponding to 3–5% of total body surface area) overlapping the shaved area of skin. The scald burns were induced according to a previously published protocol with minor modifications. Specifically, the water temperature was raised to 56 °C, and the exposure time was increased to 30 s to ensure induction of third-degree burns. Mice were in individual cages after the burn induction. Fluids and buprenorphine were administered prior to burn induction and then twice daily for the three days following burn induction. The mice were monitored daily for 10 days post-burn. The study was repeated on additional mice with the best possible attempt to have a balanced sex representation across groups.

- Patients trials

Adapté de Wallner C et al., Eur Burn J., 2022

Data from patients (age range: 18 to 60 years old) with mixed dermal burn wounds receiving subsequent treatment with at least two different wound-cover techniques, including « Kerecis Omega3 Wound », were collected retrospectively. The patients had no other known comorbidities, such as diabetes, malnutrition, vascular disease, or immunodeficiency. After enzymatic debridement with a proteolytic enzymes mix (Nexobrid), burn wounds were covered depending on the wound depth (2a° or 2b°). Superficial partial-thickness burns were treated with Suprathel, this being the current standard of care in our unit. Deep partial-thickness burns were treated with either fish skin graft or an autologous skin graft (0.2 mm, meshed 1:1.5) (see figure below). All the relative measurements were performed with the patients' healthy skin as a control for the graft-treated areas.



Document 7 : Extrait de la réglementation sur la recherche animale

La recherche sur l'animal est encadrée au plan législatif et réglementaire par des textes européens et français dont l'évolution illustre la prise en compte croissante du bien-être de l'animal. (<https://www.inserm.fr/modeles-animaux/reglementation-et-dispositif-ethique-experimentation-animale/>)

C'est avec la Convention STE 123, élaborée par le Conseil de l'Europe en 1985, que les Etats membres ont affirmé leur devoir moral de respecter tous les animaux dans le cadre de leur utilisation à des fins scientifiques. Ils se sont engagés à réduire le nombre d'expériences et d'animaux utilisés en recherche, à encourager le développement de méthodes alternatives et à ne recourir au modèle animal qu'en l'absence d'autres méthodes pertinentes disponibles pour répondre à l'objet d'une étude.

De cette convention découle la directive européenne sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, adoptée en 1986 (directive 86/609) et révisée en 2010 (directive 2010/63). La France a transposé la directive (dans sa version initiale puis révisée) en droit national (décret 2013-118 associé à 5 arrêtés d'application). D'une manière générale, cette réglementation s'appuie sur la règle des 3 R qui consiste à remplacer les animaux autant que possible, réduire leur nombre dans les études et améliorer leurs conditions d'utilisation.

Les grands principes de la réglementation

Les recherches sur l'animal ne sont licites que si elles « *revêtent un caractère de stricte nécessité* ». Les chercheurs sont « *résolus à limiter l'utilisation des animaux à des fins expérimentales (...) avec pour finalité de remplacer cette utilisation partout où cela est possible* ». Ce point est énoncé dès la Convention STE 123.

- **Une autorisation des projets**

Pour démarrer, tout projet de recherche qui utilise des animaux doit avoir reçu une autorisation du ministère de la Recherche. L'autorisation est délivrée pour une durée de 5 ans maximum, à condition que le projet ait reçu une évaluation favorable du comité d'éthique de l'établissement dans lequel il sera réalisé.

- **Un établissement conforme et agréé**

Tout établissement qui utilise des animaux à des fins scientifiques doit détenir un agrément. Celui-ci est délivré par arrêté préfectoral, après visites des inspecteurs vétérinaires de la Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations (DDPP ou DDCSPP). Valable pour 6 ans, cet agrément dépend du ministère de l'Agriculture et doit être renouvelé sur demande écrite. Sa délivrance repose sur le respect de normes d'hébergement et de fonctionnement fixées par arrêté ministériel, visant à assurer le bien-être des animaux. Les mêmes contraintes s'imposent pour les établissements éleveurs ou fournisseurs d'animaux. Un agrément supplémentaire est requis pour l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés. C'est le ministère de la Recherche qui délivre cet agrément spécifique.

- **Un personnel compétent et formé**

Tous les personnels qui manipulent des animaux doivent posséder une qualification appropriée et assurer le maintien et l'actualisation de leurs compétences. Un temps de formation continue d'au minimum 3 jours tous les 6 ans est désormais exigible, en complément d'une formation initiale spécifique. Les personnels qui travaillent avec

des animaux d'espèces non domestiques doivent de plus détenir un certificat de capacité pour l'entretien et l'élevage des espèces en question.

- **Un choix d'espèce motivé, associé à un nombre minimal d'animaux**

La directive européenne précise que les projets *« utilisent le nombre minimal d'animaux pour obtenir des résultats fiables et exigent l'utilisation, parmi les espèces les moins susceptibles de ressentir de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse ou de subir des dommages durables, de celles qui sont optimales pour l'extrapolation dans les espèces ciblées »*.

- **Une origine identifiée des animaux**

« Les animaux utilisés ou destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales (...) doivent avoir été élevés à cette fin et provenir d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ».

- **Une réduction des contraintes**

Les contraintes imposées aux animaux lors des expérimentations doivent être réduites au maximum. Ce principe est affirmé depuis la Convention STE 123 : *« lors du choix entre procédures, devraient être sélectionnées celles qui (...) causent le moins de dommages durables, de douleurs, de souffrances et d'angoisse et qui sont susceptibles de donner les résultats les plus satisfaisants »*.

Le dispositif éthique

- **Une charte**

Dès 1992, une charte nationale sur l'éthique de l'expérimentation animale a été élaborée en application des 10 mesures énoncées par le ministre de la Recherche, Hubert Curien, qui visaient à développer une véritable politique éthique de l'expérimentation animale dans les organismes publics de recherche. Cette charte a depuis été révisée et adaptée à l'évolution de la réglementation.

- **Des comités d'éthique en expérimentation animale**

L'application de la directive a donné lieu, dans les années 1990, à la création de comités d'éthique chargés d'apprécier l'acceptabilité des protocoles eu égard, d'une part, à la pertinence de l'étude et, d'autre part, aux atteintes portées au bien-être animal. Au départ facultative, l'évaluation éthique des projets par les comités d'éthique en expérimentation animale (CEEA) est devenue obligatoire en 2013.

Les CEEA sont reconnus comme autorité compétente pour l'évaluation éthique des demandes d'autorisation de projets ayant recours au modèle animal. Les CEEA sont constitués d'au moins 5 personnes : un vétérinaire, un chercheur, un expérimentateur, un animalier et une personne du corps social non impliquée dans les activités de recherche. En 2020, 131 CEEA étaient agréés par le ministre de la Recherche.

Document 8 : Extrait du référentiel BTS biotechnologie en recherche et en production

Bloc 4- Collaboration avec les partenaires professionnels

« Le technicien conduit son activité professionnelle en respectant des principes éthiques et des obligations professionnelles. Il sait repérer les enjeux de ses innovations et de ses pratiques et formuler les problèmes éthiques que ces innovations soulèvent. Les compétences permettant de réaliser de manière autonome ces activités de réflexion, de communication et de collaboration sont développées dans le bloc de compétences 4, intégrant une part de co-enseignement en philosophie et en anglais. Les savoir-faire et savoirs associés concernés par le co-enseignement de philosophie sont repérés par la lettre Φ. »

C4.4. Faire preuve d'intégrité scientifique et se positionner d'un point de vue éthique			
Savoir faire	Indicateurs d'évaluation	Ressources	Savoirs associés
4.4.1. Conduire les recherches, en faisant preuve d'intégrité scientifique et en respectant les principes éthiques concernés	La démarche d'obtention d'un résultat est expliquée avec sincérité. Les écueils techniques et les erreurs sont rapportés. Les doutes et interrogations sont exprimés. Le registre de langage est adapté à la position hiérarchique du collaborateur.	Données brutes Documents de traçabilité Dossier de lot Littérature scientifique Charte informatique Dispositions législatives et réglementaires spécifiques Ressources sur les questions socialement vives	- Principes éthiques et responsabilité professionnelle - Obligations professionnelles - Outils de communication professionnelle - Communication professionnelle orale en français et en anglais - Ecrits professionnels en français et en anglais - Règles d'usage de la communication via le numérique - Acteurs professionnels - Fonctionnement d'une structure professionnelle
4.4.2. Maîtriser la confidentialité pour protéger les intérêts du laboratoire ou de l'entreprise	Les données relevant de la propriété intellectuelle du laboratoire ou de l'entreprise sont identifiées. Les données de l'entreprise ou du laboratoire ne sont pas divulguées. Les données sont transmises en sélectionnant les destinataires. Les données sont transmises en suivant les règles de confidentialité. Les données sont stockées dans un espace protégé.		
4.4.3. Respecter les enjeux bioéthiques et environnementaux attachés aux biotechnologies	La diffusion des données respecte l'anonymat des personnes. Le bien-être animal est préservé conformément à la législation. Les bienfaits et dangers des biotechnologies sont analysés au regard des enjeux éthiques. Les bienfaits et dangers des biotechnologies sont analysés au regard des enjeux environnementaux.		

T4.1. Règles et obligations professionnelles		
Savoirs associés	Notions et concepts fondamentaux	Attendus et limites
Principes éthiques et responsabilité professionnelle Φ	Code de déontologie appliqué aux biotechnologies Φ Législation/réglementation éthique en biotechnologie Φ Enjeu éthique Φ Conflit éthique Φ Principe de précaution Φ Droit de la personne soumise à l'expérimentation Φ Obligation envers les animaux Φ Compétence psychosociale (CPS) Φ	Dégager d'un contexte de situation professionnelle et d'un code, les règles de déontologie et les comportements appropriés. Repérer les dispositions législatives et/ou réglementaires en vigueur liées à une activité en biotechnologie. Argumenter l'évolution envisageable des dispositions législatives et/ou réglementaires concernant une avancée en biotechnologie. Dégager les enjeux éthiques que soulève une innovation en biotechnologie. Identifier les conflits éthiques auxquels se confronte une innovation en biotechnologie. Argumenter l'application du principe de précaution face à un conflit éthique identifié. Faire le lien entre les principes fondamentaux de la réglementation et l'expérimentation humaine. Faire le lien entre les principes fondamentaux de la réglementation et l'expérimentation animale.

Document 9 : Évaluation de la concentration des acides aminés pendant la croissance et la différenciation de trois modèles cellulaires de précurseurs myoblastiques

Adapté de O'Neill E et al., *npj Science of food*, 2022

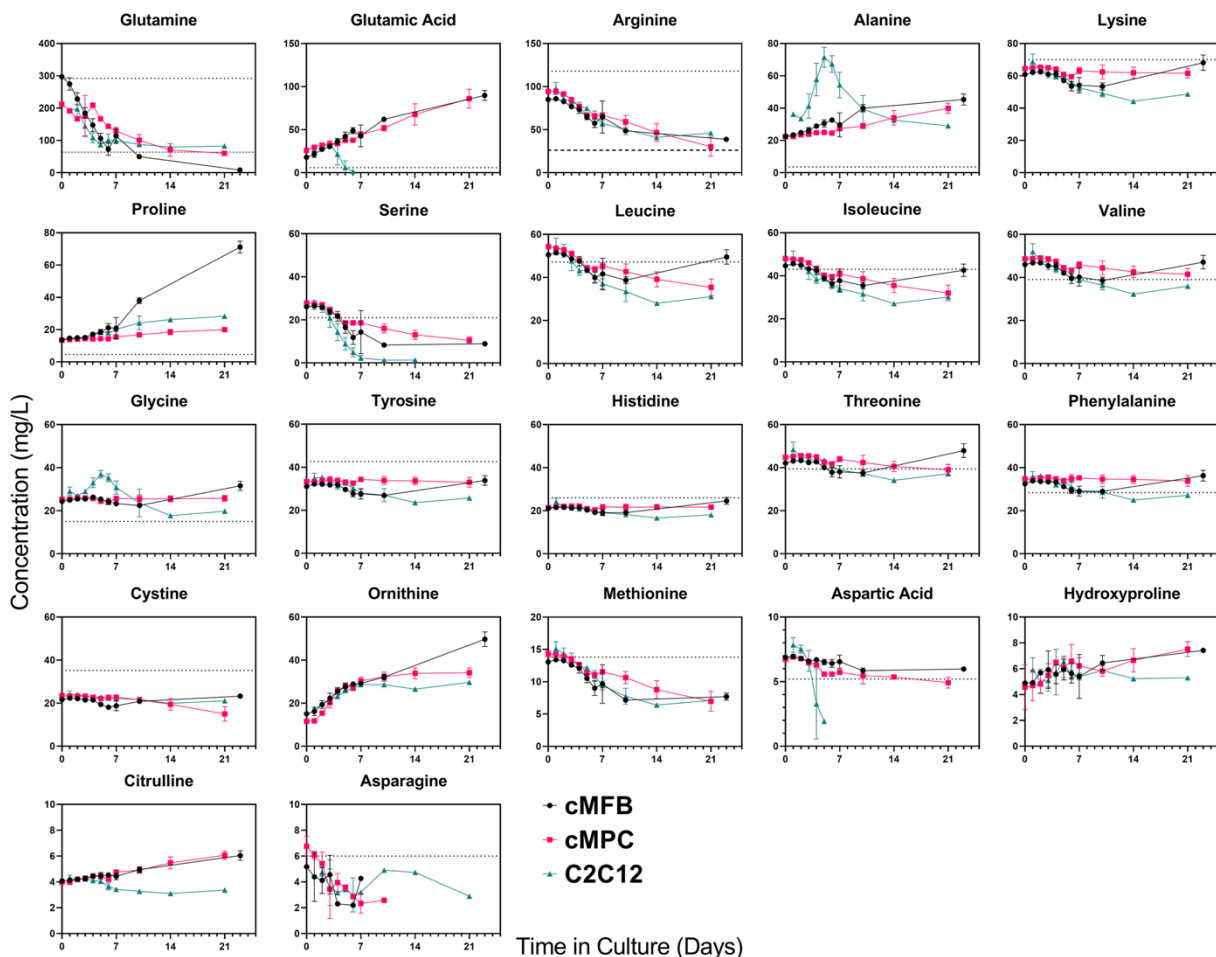
Analyse cinétique de la concentration en acides aminés dans le milieu de culture de précurseurs myoblastiques par chromatographie liquide échangeuse d'ions à haute performance, HPLC.

Méthode : Les concentrations en acides aminés ont été mesurées dans les surnageants de milieu de culture de trois types de précurseurs myoblastiques. Les lignes pointillées représentent les concentrations basales estimées en acides aminés du milieu de culture initial (40 % DMEM, 40 % F10 et 20 % de sérum de veau fœtal). Les points des courbes représentent la moyenne de triplicats +/- les variations standards.

cMFB : culture primaire de fibroblastes musculaires embryonnaires de poulet

cMPC : culture primaire de cellules précurseurs musculaires embryonnaires de poulet

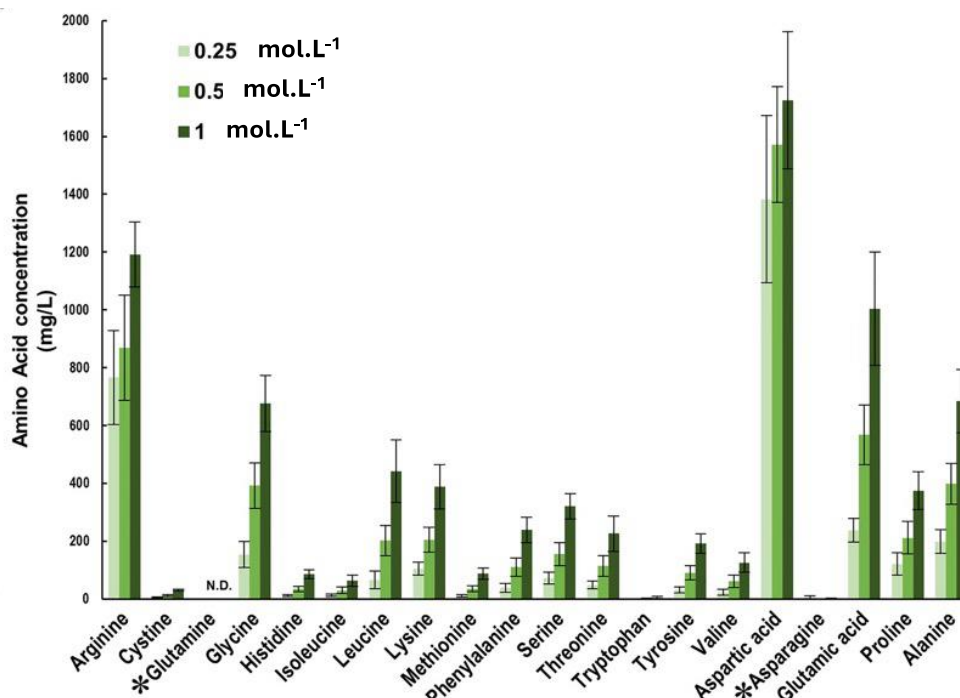
C2C12 : lignée cellulaire myoblastique murine



Document 10 : Extraction d'acides aminés de la microalgue *Chlorella vulgaris*
 Adapté de Yamanaka K. et al., Sci Rep., 2023

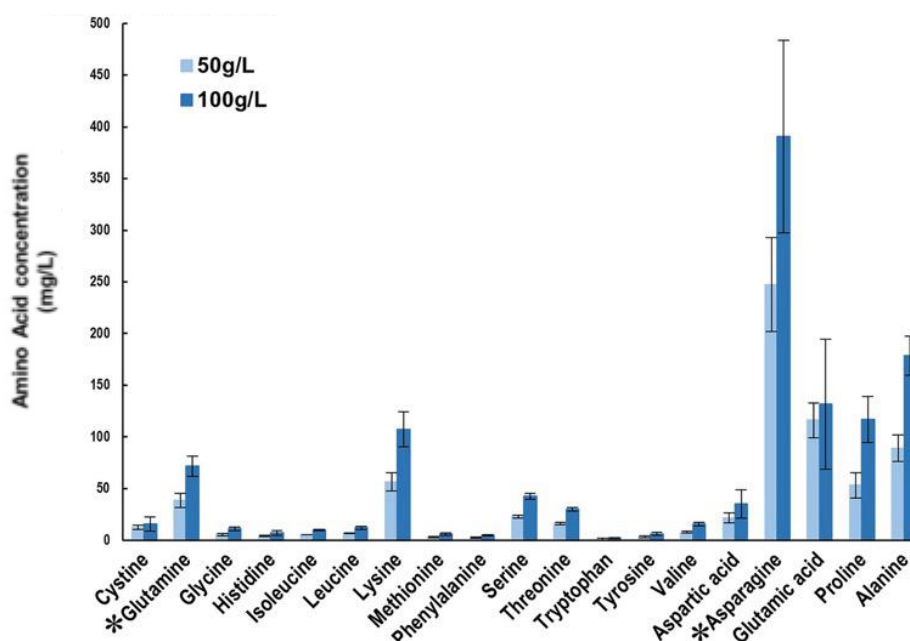
10A : Hydrolyse acide réalisée sous trois concentrations différentes d'acide chlorhydrique (de 0,25 à 1 mol·L⁻¹)

Les données sont présentées comme les moyennes ± déviation standard (n = 3 à 6).



10B : Fractionnement ultrasonique réalisé à partir de deux concentrations de *Chlorella vulgaris* (poids sec 50 g·L⁻¹ et 100 g·L⁻¹).

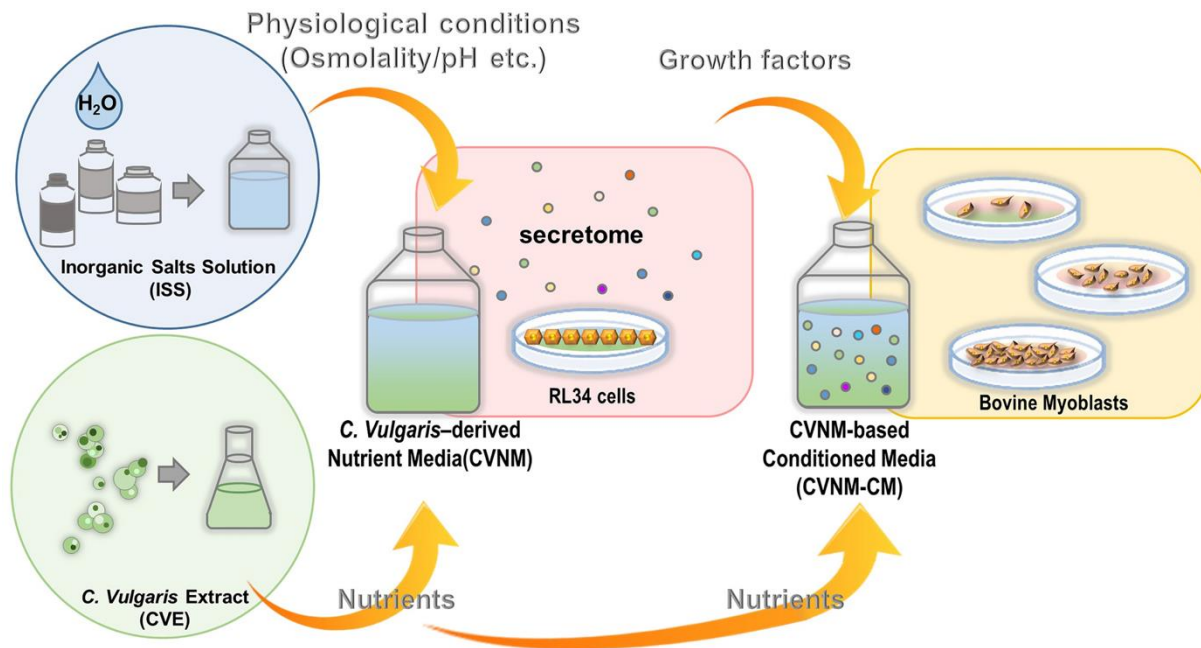
Les données sont présentées comme les moyennes ± déviation standard (n = 3 à 6).



Document 11 : Optimisation du milieu de culture de cellules myoblastiques bovines

Adapté de Yamanaka K. et al., Sci Rep., 2023

11A : Illustration de la procédure expérimentale de fabrication du milieu de culture

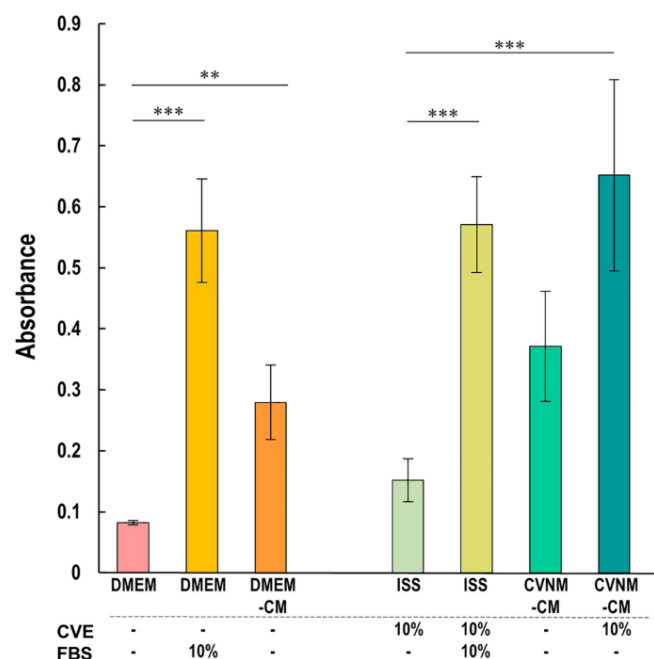


Chlorella vulgaris-derived nutrient media (CVNM) are formulated by adding *Chlorella vulgaris* extract (CVE) to inorganic salt solution (ISS) as a nutrient source for maintaining RL34 cells (rat liver epithelial). The secretome containing growth factors is secreted by RL34 cells into the culture supernatant. The supernatant containing the growth factors is known as conditioned medium (CM). The CVNM-based conditioned media (CVNM-CM), with CVE added to restore the nutrients consumed by the RL34 cells, are provided to bovine myoblasts.

11B : Test de croissance de cellules myoblastiques bovines dans différents milieux de culture

Prolifération of bovine myoblasts cultured with DMEM and CVNM for 2 days. The following media were used : DMEM, DMEM with 10% FBS, DMEM-CM, ISS with 10% CVE, ISS with 10% CVE and 10% FBS, CVNM-CM, and CVNM-CM with 10% CVE. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Statistical analysis was performed with *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

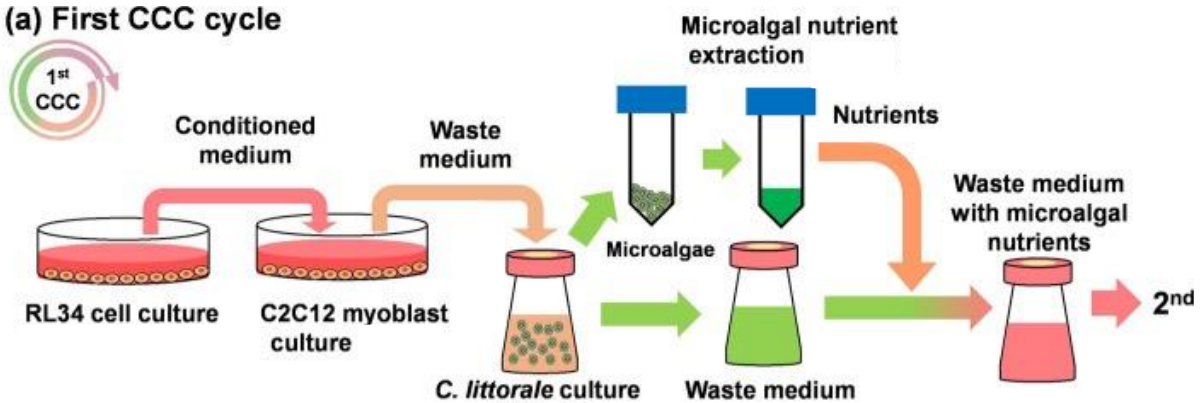
CVE : *Chlorella vulgaris* extract ; CVNM-CM : *Chlorella vulgaris*-derived nutrient media-conditioned media ; DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium ; DMEM-CM : DMEM-conditioned media ; FBS : fetal bovine serum ; ISS : inorganic salt solution.



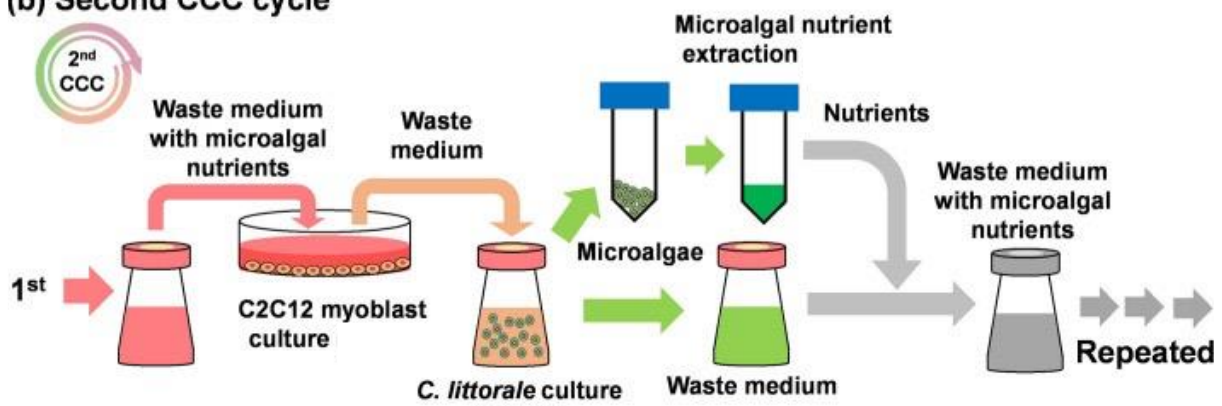
Document 12 : Procédé de culture circulaire de myoblastes utilisant des microalgues (CCC : circular cell culture system)

Adapté de Haraguchi Y. et al., Arch Microbiol., 2022

(a) First CCC cycle



(b) Second CCC cycle



RL34 : lignée d'hépatocytes de rat

C2C12 : lignée cellulaire de myoblaste murin

Conditioned medium : surnageant de culture des cellules RL34

Waste medium : milieu épuisé et récupéré après culture des cellules

C. littorale : microalgue *Chlorococcum littorale*

Document 13 : Ressources à destination d'élèves de terminale en vue de la production d'une synthèse

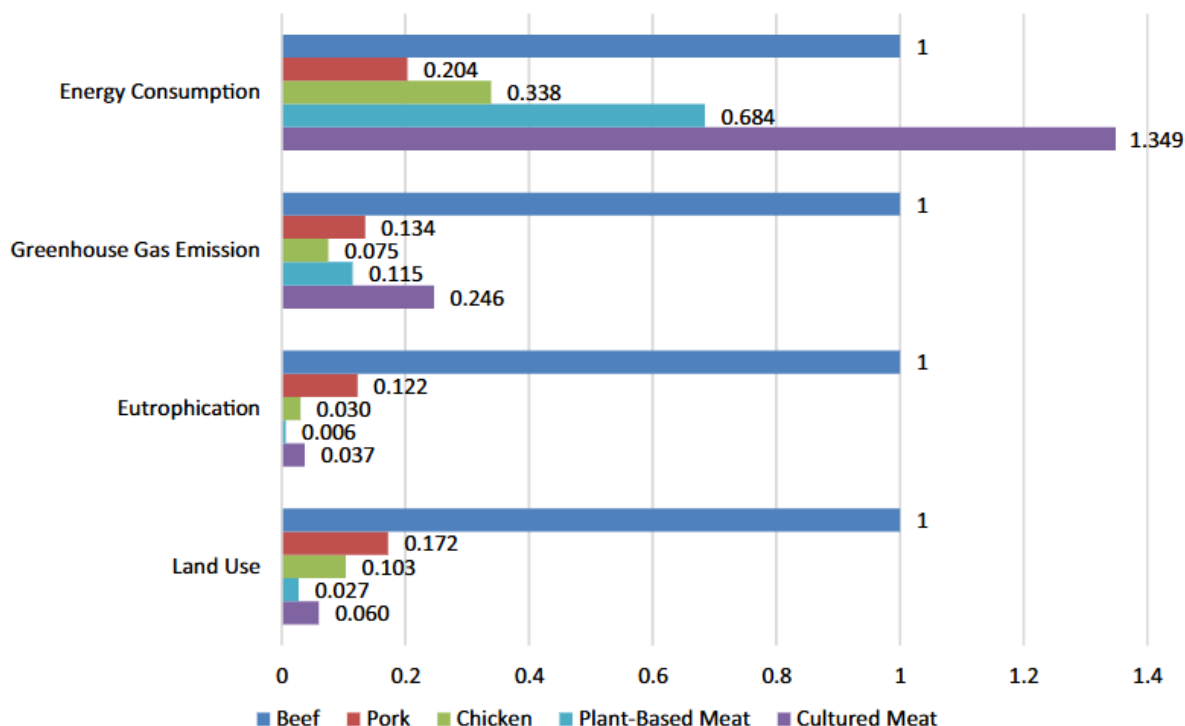
13A : Extrait de l'article de recherche intitulé : « A circular cell culture system using microalgae and mammalian myoblasts for the production of sustainable cultured meat »

Adapté de Haraguchi Y. et al., Arch Microbiol., 2022

The agricultural sector is responsible for 9% of the global carbon dioxide emissions, 37% of the methane emissions, which is a greenhouse gas (GHG) potentially 20–28 times more harmful than carbon dioxide, and 65% of the nitrous oxide emissions, which is potentially 300 times more harmful than carbon dioxide (Miranda et al. 2015; Pandurangan and Kim 2015; Cassia et al. 2018; EPA 2021; Simdi and Seker 2022). Livestock farming contributes to 14.5–18% of the global GHG emissions, which is more than the contribution of the transport sector (Tuomisto and Teixeira de Mattos 2011; Tuomisto 2019; FAO 2021). Presently, 30% of global ice-free land and 25% of the available fresh water are used for livestock (Tuomisto and Teixeira de Mattos 2011; Tuomisto 2019). Furthermore, 33% of the global arable land is used to produce livestock feed. Climate change, environmental contamination, and livestock diseases have threatened the stability, safety, and sustainability of livestock-dependent meat production. To solve the problems associated with the conventional meat production system, “cultured meat” has attracted attention worldwide as a sustainable alternative to meat (Post 2014).

13B : Quantification de l'impact environnemental d'une viande cultivée en comparaison avec d'autres viandes ou assimilés

Rubio NR. et al., Nature Comm., 2020



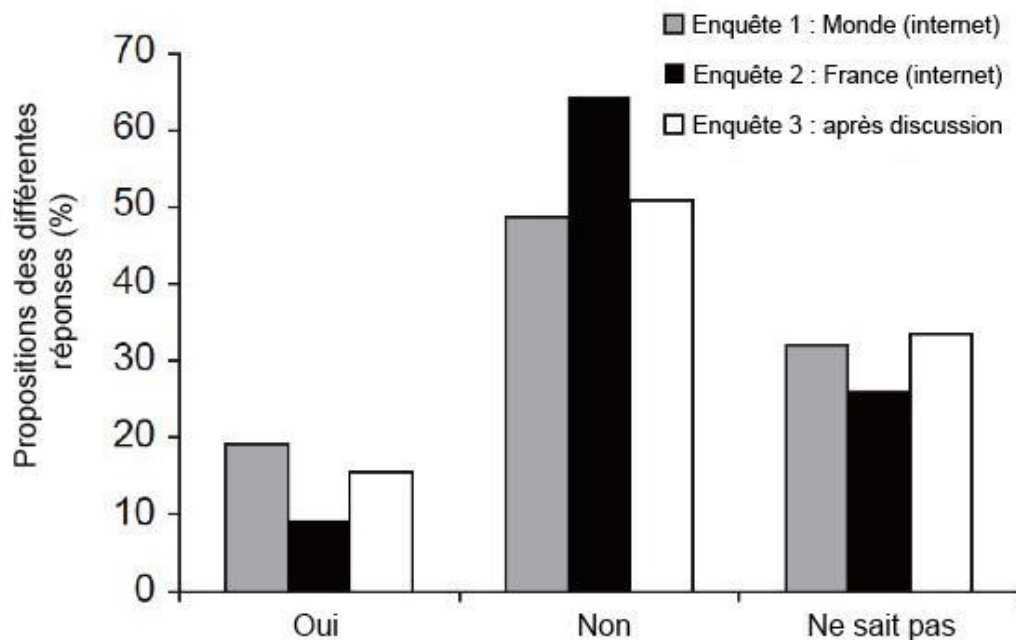
Index relatifs des différents paramètres testés normalisés par rapport à la production de viande issue de l'élevage de bœuf.

13C : Enquêtes réalisées auprès de différentes populations sur leur niveau d'acceptation de consommation de viande *in vitro*

Adapté du site internet de l'INRAE basé sur l'article scientifique de *Hocquette A. et al., JIA, 2015*

- Une enquête montre que les intentions d'achat de viande *in vitro* sont plus marquées en Chine (59 %) et en Inde (56 %) qu'aux USA (30 %).
- Le pourcentage de personnes sceptiques est beaucoup plus important dans une autre enquête menée par des chercheurs français auprès de 2000 scientifiques et étudiants de plusieurs pays du monde : seuls 10 % environ des personnes interrogées se déclarent prêts à consommer régulièrement de la viande artificielle, préférant en grande majorité réduire leur consommation de viande, tandis qu'un tiers des sondés reste indécis.

Taux de réponse à la question posée : « consommeriez-vous régulièrement de la viande artificielle ? »



Document 14 : Méthode dynamique d'Humphrey et Taguchi

Adapté de <http://www.perrin33.com/>

La loi de Henry établit la relation entre :

- la concentration maximale en dioxygène qui peut se dissoudre dans une phase aqueuse, C_{Leq} (exprimée en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) et,
- la pression partielle en dioxygène dans le gaz injecté par bullage à la température de travail donnée, P_{O_2} (exprimée en atm) :

$$C_{Leq} = K_H \times P_{O_2} = K_H \times (x_{O_2} \times P_{tot})$$

avec K_H : coefficient de Henry pour la phase aqueuse ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$)

x_{O_2} : fraction molaire de dioxygène dans le milieu

P_{tot} : pression de l'air dans le bioréacteur

L'étape limitante de la dissolution du dioxygène dans la phase aqueuse est le passage du dioxygène à travers le film liquide de l'interface bulle/phase aqueuse. La cinétique de dissolution du dioxygène dans un milieu dépend de la surface de l'interface gaz/liquide et du gradient de concentration :

$$OTR = K_{La} \times (C_{Leq} - C_L)$$

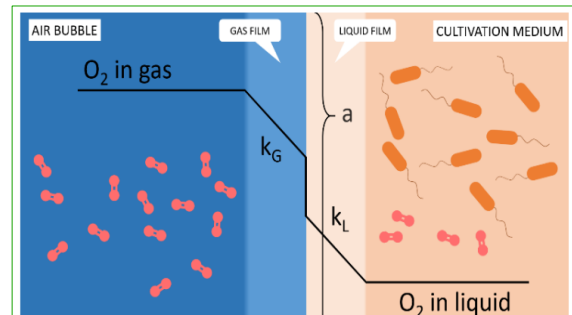


Schéma 1 : Transfert de masse du dioxygène

avec OTR (Oxygen Transfer Rate) : débit de transfert de l' O_2 entre les bulles de gaz et le milieu de culture (en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

C_L : concentration en O_2 dissous dans le milieu de culture supposé parfaitement homogénéisé (en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

C_{Leq} : concentration en O_2 dissous dans le milieu de culture obtenue lorsque le milieu est à saturation avec la phase gazeuse (en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

K_{La} : coefficient de transfert volumique ramené à l'unité de volume du milieu (exprimé en s^{-1})

La méthode dynamique d'Humphrey et Taguchi permet de déterminer le K_{La} d'un bioréacteur lors d'une culture cellulaire, dans les conditions réelles d'un process. Le bioréacteur est alimenté en dioxygène par bullage. La méthode s'appuie sur le suivi de la concentration en O_2 dans le milieu de culture, réalisé à l'aide d'un capteur à dioxygène. Dans un premier temps, l'oxygénation du bioréacteur est déclenchée et maintenue jusqu'à l'établissement de la phase d'équilibre dynamique qui permet de saturer le milieu

de culture en dioxygène et de déterminer C_{Leq} . Dans un second temps, l'oxygénation du milieu est arrêtée. Une exploitation graphique permet de déterminer le débit de consommation de l' O_2 par la culture (OUR : Oxygen Uptake Rate). Dans un troisième temps, le bullage est à nouveau actionné pour oxygéner le milieu et atteindre à nouveau une phase d'équilibre dynamique. Durant cette phase, la cinétique de réoxygénation obéit à l'équation différentielle suivante :

$$dC_L / dt = OTR - OUR = K_{La} \times (C_{Leq} - C_L) - OUR$$

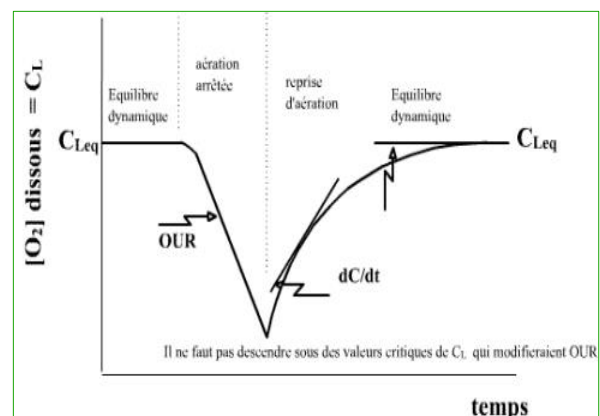


Schéma 2 : Suivi de la concentration en O_2 dissous dans le milieu de culture du bioréacteur

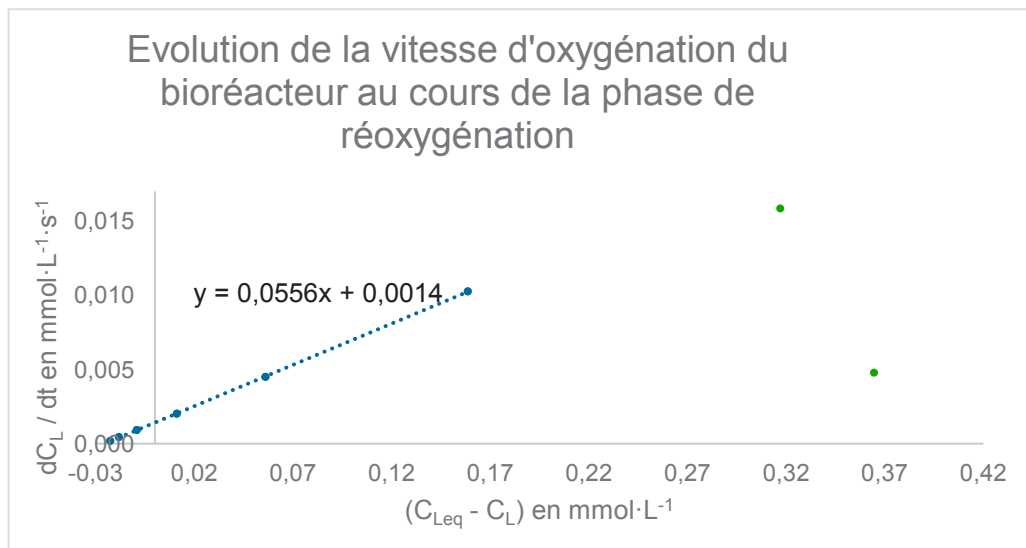
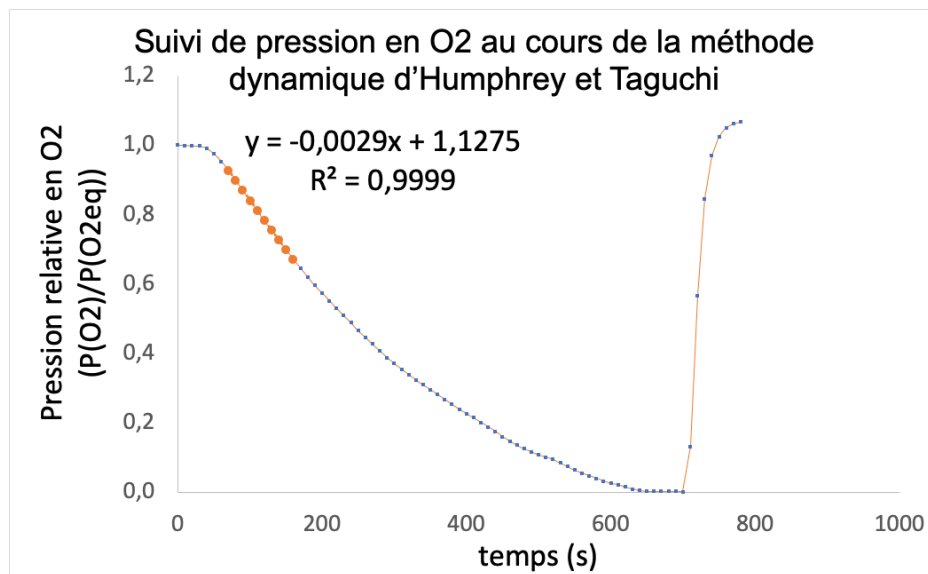
Document 15 : Mode opératoire et résultats de l'étude du système d'oxygénation d'une culture cellulaire en bioréacteur par la méthode dynamique d'Humphrey et Taguchi

Mode opératoire :

La culture cellulaire est réalisée dans les conditions suivantes :

- $T = 34\text{ }^{\circ}\text{C}$ (température de culture)
- $P_{\text{tot}} = 1,5\text{ atm}$ (pression de travail)
- $K_H = 1,166\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$
- $x_{\text{O}_2} = 0,209$

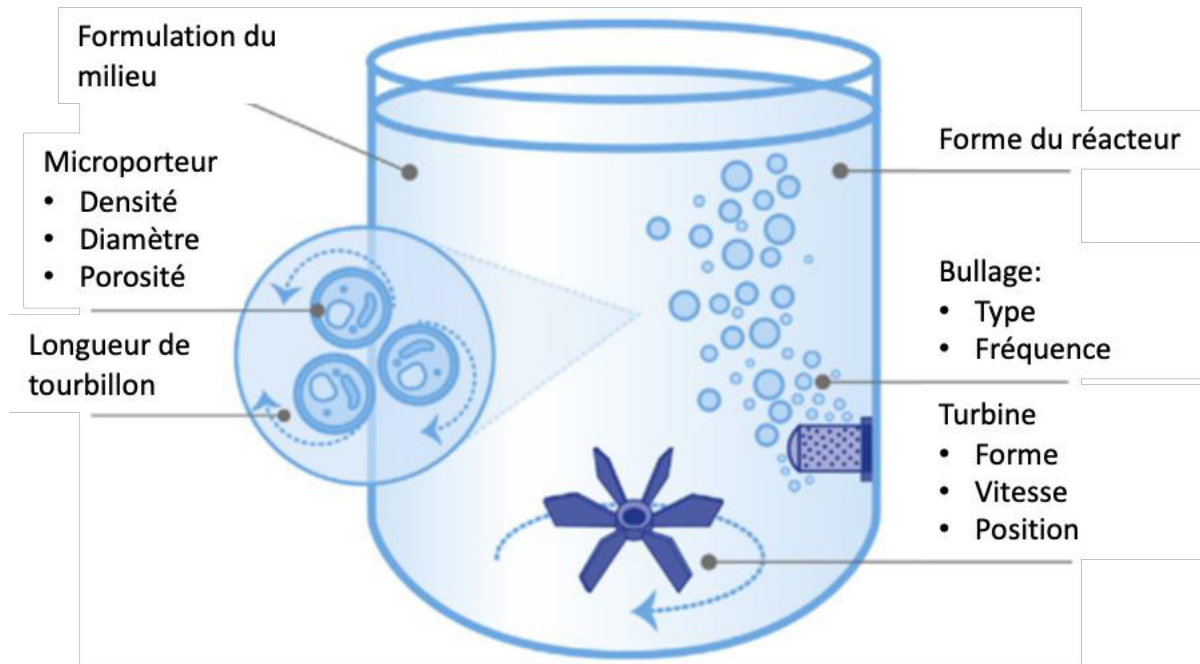
1 ^{ère} ETAPE = SATURATION DU MILIEU EN DIOXYGENE	
• Augmentation du débit d'air : 1000 rpm avec un débit d'air de $4\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à ce que P_{O_2} se stabilise à 100 %. • Puis abaissement à 600 rpm et $1,5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.	
2 ^{ème} ETAPE = ARRET DE L'AERATION	
• Fermeture de l'électrovanne d'air. • Relevé des valeurs de P_{O_2} toutes les 10 secondes jusqu'à épuisement du dioxygène.	
3 ^{ème} ETAPE = REPRISE DE L'AERATION ET MESURE DU PHENOMENE GLOBAL	
• Réouvrir l'électrovanne d'air. • Relever des valeurs de P_{O_2} toutes les 10 secondes jusqu'à ce que $P_{\text{O}_2} = 100\text{ \%}$.	



Document 16 : Culture de cellules sur micro-porteurs dans un bioréacteur à cuve agitée

16A : Facteurs influençant les forces hydrodynamiques exercées sur les cellules dans un bioréacteur à cuve agitée

Adapté de Schnitzler AC. et al., *Biochemical Engineering Journal*, 2016



16B : Paramètres de croissance d'une culture cellulaire sur micro-porteurs

Adapté de Jossen V. et al., *Stem Cells Int.*, 2016

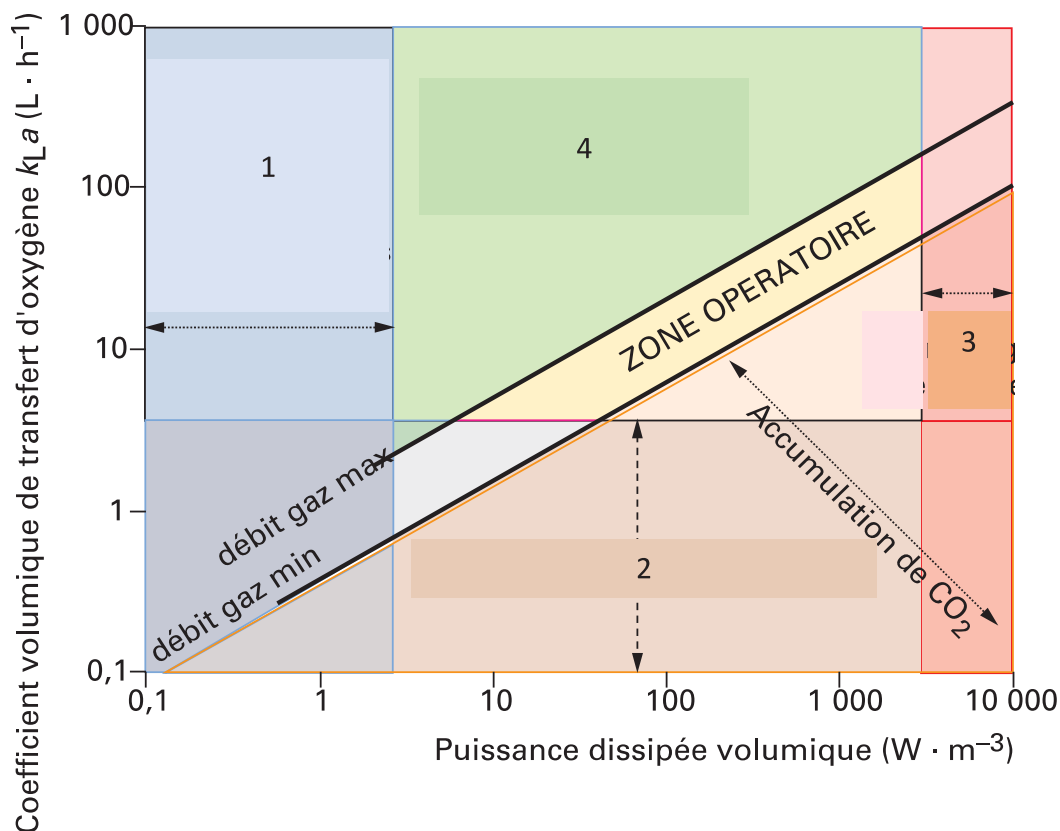
N = rotation par minute de la turbine ; P/V = puissance dissipée volumique ; LSS : stress local de cisaillement ; EFs : facteur d'expansion (nombre de cellules à J7 / nombre de cellules à J0).

N [rpm]	P/V [$\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$]	LSS^a [$10^{-3} \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$]	Total cell numbers on day 7 [10^7 cells]	Living cell density on day 7 [10^6 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$]	EFs [—]	$\mu_{\max}$ [h^{-1}] and t_d [h]
25	0.21	3.21/69	8.1 ± 0.1	0.81 ± 0.01	71.4 ± 0.2	0.026 ± 0.001 26.7 ± 0.1
43	0.65	4.43/142	6.2 ± 0.6	0.62 ± 0.06	79.6 ± 3.2	0.022 ± 0.001 31.5 ± 0.2
49	0.80	4.96/187	12.5 ± 0.5	1.25 ± 0.05	117.0 ± 4.7	0.029 ± 0.001 23.7 ± 0.1
63	1.24	6.72/224	11.1 ± 0.6	1.11 ± 0.06	97.4 ± 3.7	0.028 ± 0.001 24.8 ± 0.2
90	2.24	10.22/325	3.7 ± 0.7	0.37 ± 0.07	28.5 ± 5.1	0.020 ± 0.002 34.4 ± 0.4
120	3.63	13.56/437	2.5 ± 0.2	0.25 ± 0.02	19.4 ± 1.3	0.017 ± 0.001 41.3 ± 0.1

LSS^a : local shear stress given with volume-weighted mean/maximum values

Document 17 : Définition des limites de la zone opératoire pour le fonctionnement d'un bioréacteur de 10 m³ pour la culture de cellules en suspension

Adapté de Marc A. & Olmos E., *Techniques de l'ingénieur*, 2015



Les conditions de fonctionnement sont les suivantes : $V = 10 \text{ m}^3$;

$T = 1,85 \text{ m}$; $H = 3,7 \text{ m}$.

2 turbines Rushton 6 pales droites : $D = 0,62 \text{ m}$; $N_p = 5$.

Les vitesses d'agitation validées sont comprises entre 10 rpm

($P/V \sim 1,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$) et 160 rpm ($P/V \sim 1\,700 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$).

avec T : diamètre de la cuve ; H : hauteur de liquide ; D : diamètre de la turbine ; N_p : nombre de puissance.

Document 18 : Extrait du programme de CPGE TB (Classe préparatoire aux Grandes Écoles - Technologie et Biologie) relatif aux cultures en bioréacteur

3.3. LES MICROORGANISMES, DES OUTILS BIOTECHNOLOGIQUES

NOTIONS & CONCEPTS	COMPÉTENCES ATTENDUES
3.3.4. CULTURES EN BIORÉACTEUR Le bioréacteur de laboratoire permet d'optimiser la culture des microorganismes, à plus ou moins grande échelle. ● Culture contrôlée ● Boucle de régulation ● Analyses en ligne / hors ligne	Relier les différents éléments du bioréacteur à leur(s) rôle(s) dans le contrôle et la régulation des paramètres physico-chimiques (agitation, température, pH, gaz dissous) lors de la culture de microorganismes.