

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : STL
Spécialité biotechnologies

SESSION 2016

CBSV : sous épreuve coefficient 4
Biotechnologies : sous épreuve coefficient 4

LUNDI 20 JUIN 2016

Durée totale de l'épreuve: **4 heures**

Les sujets de CBSV et de biotechnologies seront traités sur des copies séparées.

Dès que les sujets vous sont remis, assurez-vous qu'ils sont complets.

L'usage de la calculatrice est autorisé.

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

**Spécialités : - Biotechnologies
- Sciences physiques et chimiques
en laboratoire**

SESSION 2016

**Sous-épreuve écrite de
Chimie – biochimie – sciences du vivant**

LUNDI 20 JUIN 2016

Coefficient de cette sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

**Les sujets de CBSV et de spécialité seront traités
sur des copies séparées.**

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte **9** pages.

Partie 1 : pages 2 à 4
Partie 2 : pages 5 à 9

Les 2 parties sont indépendantes.

Partie I : les digesteurs de boues (8 points)

L'excédent des boues issues des stations d'épuration peut être éliminé dans des digesteurs de boues.

L'objectif de cette étude est de comprendre comment certaines voies métaboliques d'organismes vivants sont exploitées par l'être humain pour valoriser les boues excédentaires des stations d'épuration.

Le **document A** montre un des microorganismes présents dans un digesteur de boues.

- 1.1. Déterminer le moyen d'observation qui a permis d'obtenir la photographie du **document A**, en argumentant la réponse.

Fonctionnement des digesteurs de boues

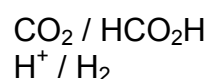
- 1.2. À partir du **document B**, construire le schéma représentant la chaîne trophique d'un digesteur de boues correspondant aux trois étapes du fonctionnement. Pour chaque étape préciser les groupes de microorganismes responsables et les molécules produites.

Étude d'une voie de méthanogenèse

La plupart des méthanogènes sont des organismes hydrogénotrophes qui produisent du méthane par réduction du dioxyde de carbone en présence de dihydrogène comme agent réducteur. La voie métabolique simplifiée de cette méthanogenèse est présentée dans le **document C**.

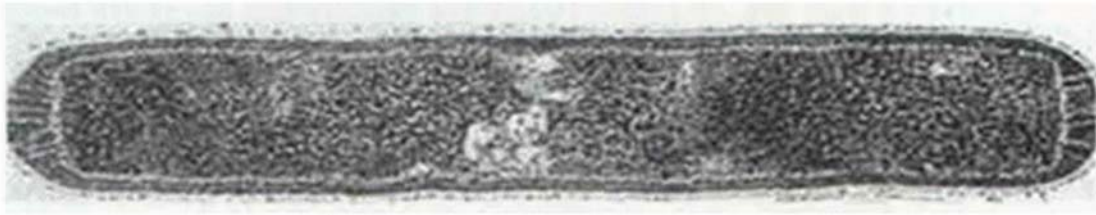
- 1.3. Après avoir recopié sur la copie les molécules A, B et C du **document C**, entourer les groupes caractéristiques et identifier les fonctions chimiques correspondantes pour chacune des molécules.
- 1.4. Chacune de ces quatre étapes est une réduction. Argumenter cette affirmation dans le cas de l'étape 2.
- 1.5. Établir l'équation de la réaction d'oxydoréduction de l'étape 1 entre le dioxyde de carbone et le dihydrogène.

On donne les couples :



- 1.6. Donner la condition nécessaire sur l'enthalpie libre apparente de réaction $\Delta_r G^\circ$ pour que cette réaction soit favorisée dans les conditions biologiques (pH = 7 et 37°C).

Document A : exemple de microorganisme méthanogène : *Methanopyrus kandleri*



Echelle :  0,1 μm

Moyen d'observation	Œil humain	Microscope photonique	Microscope électronique à transmission
Pouvoir de résolution	0,2 mm	0,2 μm	2 nm

Document B : fonctionnement des digesteurs de boues

Un digesteur de boues désigne une enceinte hermétique dans laquelle des microorganismes anaérobies vont s'alimenter des matières organiques contenues dans les boues.

On peut schématiquement distinguer trois étapes dans le fonctionnement d'un digesteur de boues. Chaque étape est réalisée par un groupe différent de microorganismes en l'absence de dioxygène. Agissant en interaction et de façon complémentaire d'un point de vue métabolique, ces différents microorganismes forment une véritable chaîne trophique en anaérobiose.

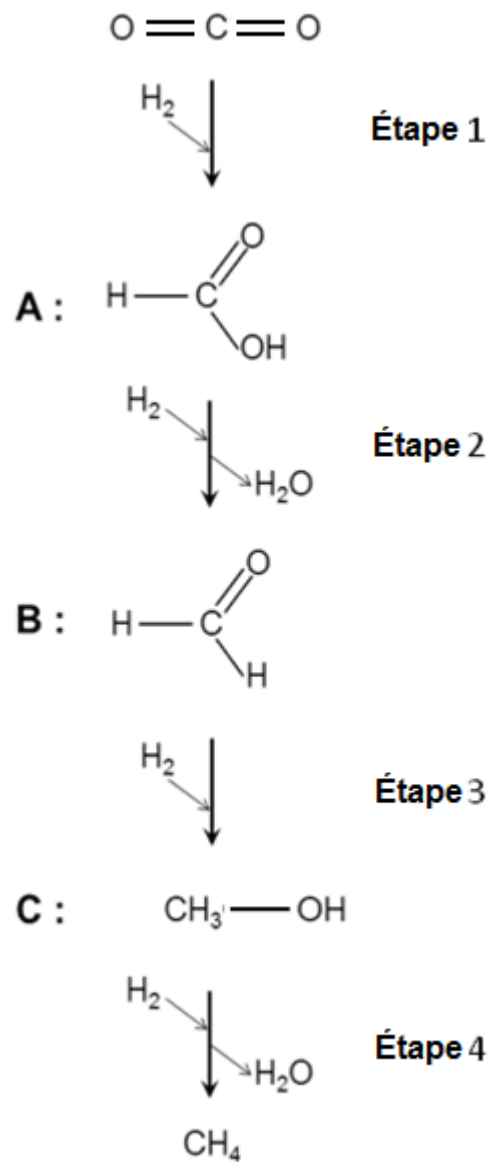
Dans un premier temps, les matières organiques complexes contenues dans les boues subissent des fermentations assurées par des microorganismes fermentaires. Ces fermentations libèrent notamment une grande variété d'acides organiques et d'alcools.

Dans un second temps, le groupe des microorganismes acétogènes permet la transformation des divers composés issus de la phase précédente en précurseurs directs du méthane : l'acide acétique CH_3COOH , le dioxyde de carbone CO_2 et le dihydrogène H_2 .

Les microorganismes méthanogènes assurent la troisième et dernière étape de la digestion des boues qui aboutit à la production de méthane CH_4 gaz combustible utilisé par l'être humain comme source d'énergie. Il existe deux voies possibles de méthanogenèse :

- l'une à partir du dihydrogène H_2 et du dioxyde de carbone CO_2
- l'autre à partir de l'acide acétique CH_3COOH .

Document C : voie métabolique simplifiée de la méthanogenèse par réduction du CO₂



Partie 2 : étude d'un traitement enzymatique du glaucome (12 points)

Le glaucome est une pathologie qui touche l'œil. Il se manifeste par une dégénérescence progressive du nerf optique pouvant aller jusqu'à la cécité. L'un des signes de la maladie est une augmentation de la pression de l'humeur aqueuse de l'œil (appelée aussi pression intraoculaire), ce qui entraîne la destruction du nerf optique par compression.

On cherche à comprendre une voie de traitement d'une forme de glaucome.

Le **document D** présente l'humeur aqueuse et son renouvellement.

Le **document E** est une coupe transversale de la partie antérieure de l'œil.

- 2.1. Émettre deux hypothèses permettant d'expliquer l'augmentation de la pression intraoculaire, responsable de l'apparition d'un glaucome.

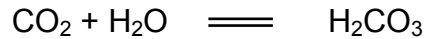
Origine génétique d'une forme de glaucome

La myociline est une protéine présente au niveau du trabéculum. Des mutations dans le gène codant la myociline sont associées à une pression intraoculaire élevée et au développement d'une certaine forme de glaucome. La myociline codée par l'allèle muté perturbe le fonctionnement du trabéculum (**document F**).

- 2.2. À l'aide des connaissances et du tableau du code génétique fourni **en annexe**, donner les deux chaînes polypeptidiques correspondant respectivement aux séquences de l'allèle de référence et de l'allèle muté du gène.
- 2.3. Formuler une hypothèse sur une des conséquences possibles de la mutation sur la structure de la chaîne polypeptidique de myociline.
- 2.4. Proposer une explication au fait que la myociline mutée intervient dans l'augmentation de la pression intraoculaire.
- 2.5. Conclure sur la région de l'œil impliquée dans l'augmentation de la pression intraoculaire pour cette forme de glaucome.

Une voie de traitement du glaucome

Pour limiter l'évolution de cette pathologie, un traitement est possible en utilisant une molécule qui inhibe l'action de l'anhydrase carbonique, l'enzyme responsable de la synthèse de l'acide carbonique. Celle-ci catalyse la réaction suivante :



L'acide carbonique (H_2CO_3), produit au cours de cette réaction, se dissocie en milieu aqueux pour donner l'ion hydrogénocarbonate (HCO_3^-).

2.6. Écrire l'équation de la réaction acide-base entre l'acide carbonique et l'eau.

L'activité de l'anhydrase carbonique aboutit à l'apparition d'ions hydrogénocarbonate dans l'humeur aqueuse.

La sécrétion de l'humeur aqueuse met en jeu des phénomènes osmotiques : des échanges de matière entre le plasma et l'humeur aqueuse se font au travers d'une barrière semi-perméable.

2.7. Interpréter les observations expérimentales données dans le **document G** relatif à une modélisation simple des phénomènes osmotiques.

2.8. Mettre en lien la production d'ions hydrogénocarbonate dans l'humeur aqueuse et le volume de celle-ci.

Le dorzolamide est un inhibiteur de l'anhydrase carbonique utilisé pour limiter la pression intraoculaire. Le **document H** présente le mode d'action de cet inhibiteur sur l'enzyme.

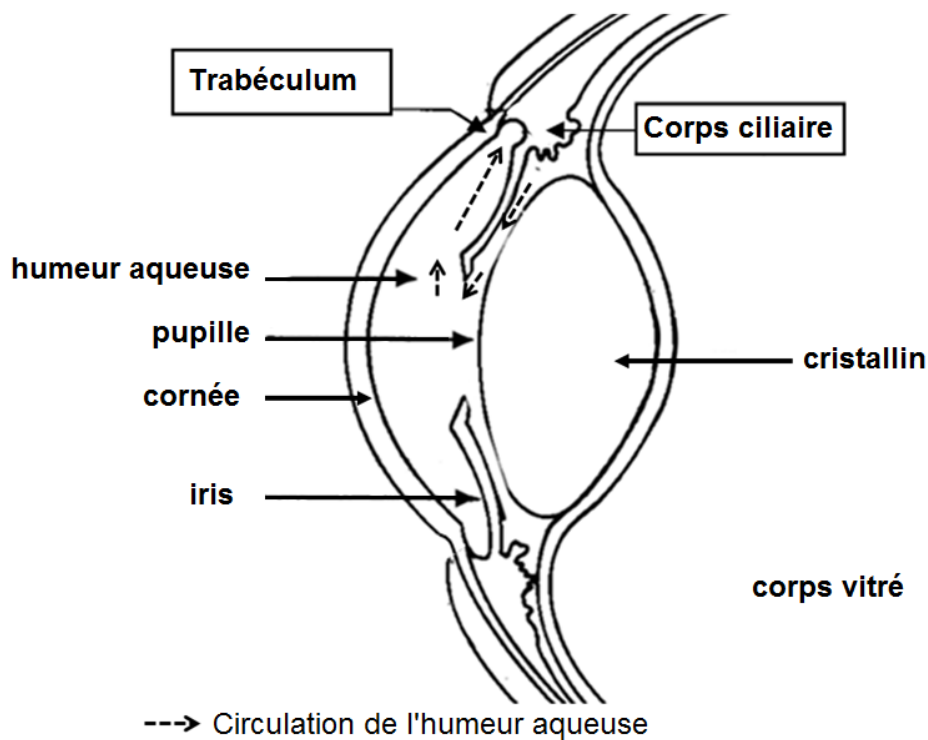
2.9. Indiquer l'effet de l'inhibiteur sur l'activité catalytique de l'anhydrase carbonique.

2.10. Expliquer en quoi l'action du dorzolamide provoque une baisse de la pression intraoculaire.

Document D : l'humeur aqueuse et son renouvellement

L'humeur aqueuse est un milieu aqueux transparent situé dans la partie antérieure de l'œil. Elle est indispensable pour assurer une bonne vision. Le renouvellement de l'humeur aqueuse est assuré par deux processus : une sécrétion à partir du plasma sanguin par les corps ciliaires, et une élimination par le trabéculum. La pression intraoculaire dépend du volume de l'humeur aqueuse située entre le cristallin et la cornée.

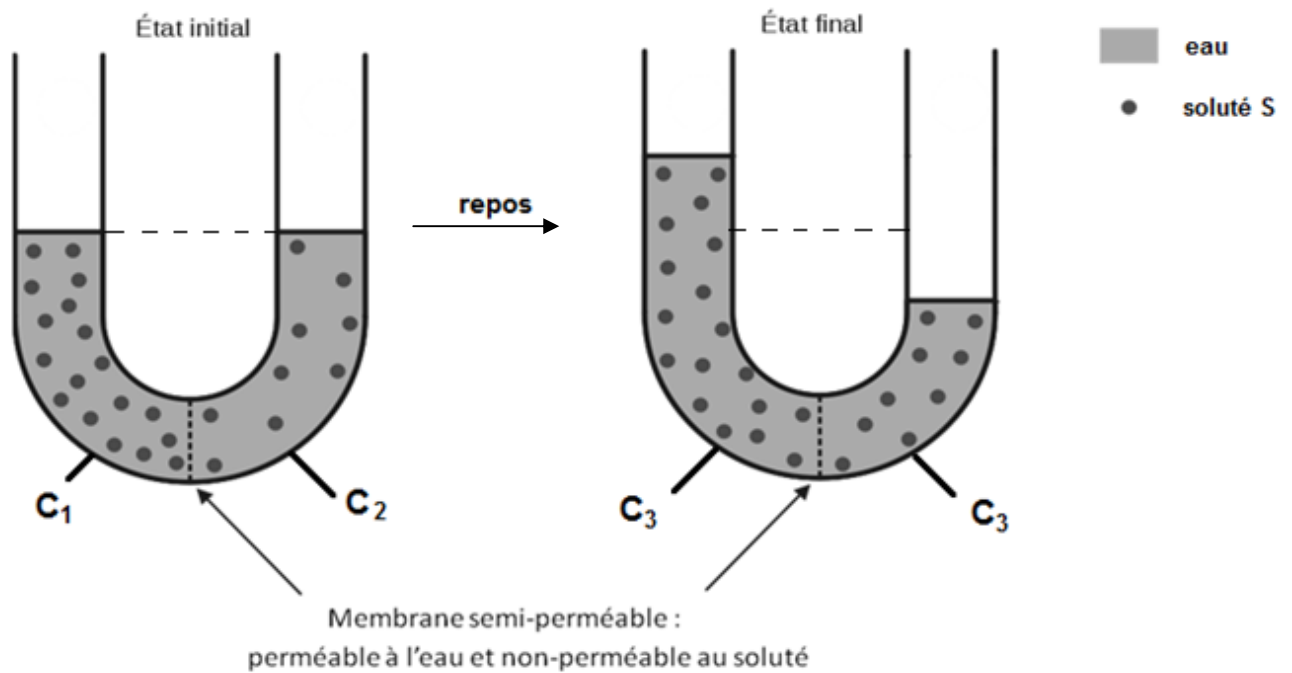
Document E : coupe transversale de la partie antérieure de l'œil



Document F : portion des séquences des brins transcrits de l'allèle de référence et de l'allèle muté du gène codant la myociline

	1092	2015
Allèle de référence	...CCCATAGTGCCTGTAAAGGGATG...	
Allèle muté	...CCCATAGTGCCTATTAAAGGGATG...	

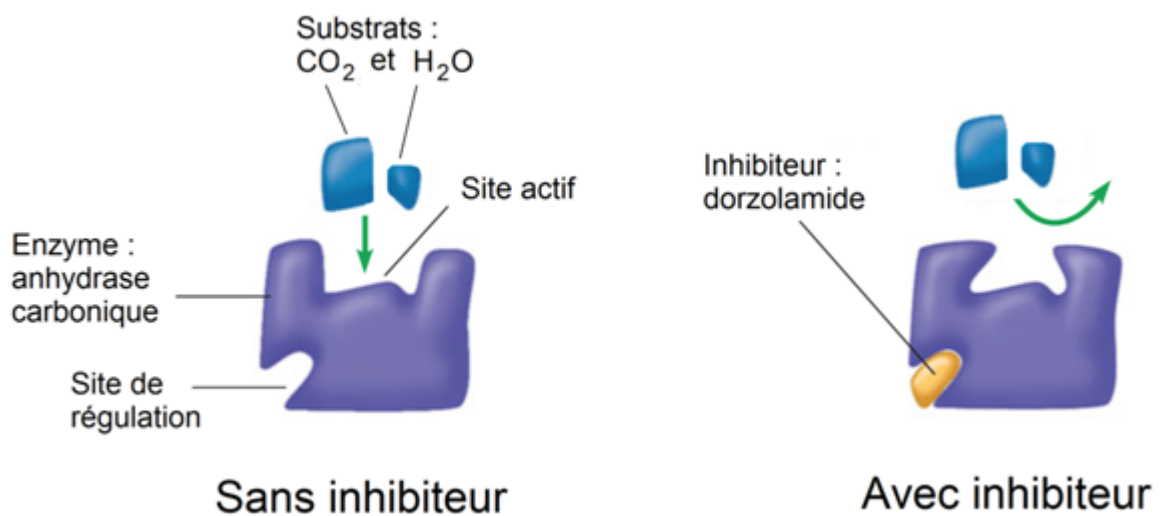
Document G : expérience mettant en évidence le principe de l'osmose



- C_i : concentration en soluté S
 $C_2 < C_3 < C_1$
- Le volume total de solution dans le tube en U est constant.

Document H : mode d'action du dorzolamide sur l'anhydrase carbonique

D'après : Campbell, *Biology : Concepts and Connections* (7^e édition)



Annexe : tableau du code génétique

		DEUXIEME NUCLEOTIDE					
		U	C	A	G		
PREMIER NUCLEOTIDE	U	UUU Phé	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	TROISIEME NUCLEOTIDE	U
		UUC Phé	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys		C
		UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop		A
		UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp		G
	C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg		U
		CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg		C
		CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg		A
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg		G
	A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser		U
		AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser		C
		AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg		A
		AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg		G
	G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly		U
		GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly		C
		GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly		A
		GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly		G

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2016

LUNDI 20 JUIN 2016

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

**Les sujets de CBSV et de biotechnologies seront traités
sur des copies séparées.**

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte **10** pages.

PRODUCTION D'INSULINE PAR GENIE GENETIQUE

Le diabète de type 1 est dû à la destruction de cellules du pancréas endocrine qui produisent une hormone polypeptidique hypoglycémisante : l'insuline. Les personnes atteintes de diabète, et présentant un défaut de production d'insuline, doivent recourir à des injections de cette hormone pour réguler leur glycémie.

Historiquement, l'insuline utilisée en thérapeutique a d'abord été extraite de pancréas de porc et de bœuf. La demande de plus en plus importante d'insuline au niveau mondial et le risque sanitaire associé à l'utilisation de produits animaux ont conduit à mettre en place des techniques de production d'insuline par génie génétique.

L'insuline humaine est maintenant produite à partir de souches bactériennes d'*Escherichia coli* transformées par un plasmide recombinant contenant le gène codant le précurseur de l'insuline (proinsuline).

On se propose d'étudier les différentes étapes de la production de l'insuline humaine par génie génétique afin de valider les choix réalisés au cours de la mise en place du procédé :

- obtention d'une souche d'*Escherichia coli* recombinante ;
- optimisation de la culture de la souche sélectionnée ;
- purification de l'insuline humaine produite ;
- dosage de l'insuline humaine purifiée.

1. OBTENTION D'UNE BACTERIE RECOMBINANTE

1.1. Construction du plasmide recombinant

Afin d'obtenir un plasmide recombinant, le gène codant le précurseur de l'insuline (proinsuline) est inséré dans le plasmide pBR322 au niveau du site de restriction de l'enzyme *Bam*H1.

Le **document 1** présente la carte de restriction simplifiée du plasmide natif pBR322. La construction du plasmide et la sélection des clones recombinants sont présentées dans le **document 2**.

Q1. A l'aide du **document 1**, indiquer les éléments justifiant l'utilisation du plasmide pBR322 en génie génétique.

Q2. Réaliser un schéma annoté du plasmide recombinant.

Q3. A l'aide des **documents 1 et 2**, argumenter l'intérêt de l'utilisation de l'enzyme *Bam*H I plutôt que l'utilisation des enzymes *Eco*R I et *Hind* III, pour la construction du plasmide recombinant.

1.2. Transformation bactérienne et sélection de clones de bactéries recombinantes

Le **document 2** présente les différents résultats possibles obtenus après transformation de la souche d'*Escherichia coli*. Quatre types de clones bactériens **A**, **B**, **C** et **D** peuvent être obtenus.

Q4. Argumenter le caractère sensible ou résistant de chaque type de clones A, B, C et D vis-à-vis de l'ampicilline et de la tétracycline.

Le **document 3** présente les résultats de la sélection des clones de bactéries recombinantes après culture sur des milieux gélosés additionnés d'antibiotiques.

Q5. À partir des **documents 2 et 3**, identifier par leur numéro les colonies correspondant au clone de type A.

Q6. En déduire le numéro des colonies de bactéries transformées par le plasmide recombinant.

2. OPTIMISATION DE LA CULTURE DE LA SOUCHE SÉLECTIONNÉE

Dans le but d'optimiser la culture d'un clone recombinant, un suivi de croissance dans deux milieux M1 et M2 est réalisé à 37° C en aérobose.

Le **document 4** présente les courbes de croissance de ce clone dans ces deux milieux dont la composition est donnée.

Q7. Déterminer la durée de la phase de latence dans ces deux milieux.

La vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle μ_{expo} ($= Q_{X\ expo}$) peut être déterminée par l'équation aux grandeurs suivante :

$$\mu_{expo} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Q8. Déterminer la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle exprimée en min^{-1} , dans les milieux M1 et M2.

Q9. À l'aide de la composition des milieux M1 et M2, expliquer les différences de résultats concernant la durée de la phase de latence et la vitesse spécifique de croissance.

Q10. En déduire le milieu permettant une croissance optimale du clone d'*E. coli*. Argumenter la réponse.

3. PURIFICATION DE L'INSULINE PRODUITE PAR LA BACTÉRIE RECOMBINANTE

L'insuline humaine est synthétisée sous forme de proinsuline par le clone sélectionné. Une étape de lyse bactérienne libère la proinsuline, laquelle subit un traitement enzymatique qui conduit à la production d'insuline mature.



Le mélange obtenu est ensuite déposé sur une colonne de chromatographie en vue de la purification de l'insuline mature.

Le **document 5** présente le schéma de principe de cette chromatographie et les caractéristiques des différents types de gels Sephadex® G utilisés pour la séparation des molécules.

Q11. Exploiter le **document 5** pour dégager le principe de séparation des molécules par cette méthode chromatographique.

Q12. Sachant qu'un acide aminé a une masse moléculaire d'environ 100 daltons (Da), calculer la masse moléculaire approximative de l'insuline mature et du peptide C.

Q13. Choisir le gel «Sephadex®» le plus adapté à la purification de l'insuline mature. Argumenter la réponse.

4. DOSAGE DE L'INSULINE HUMAINE PURIFIEE

L'insuline humaine ainsi purifiée est dosée par une technique immuno-enzymatique dont le principe est présenté dans le **document 6**.

Q14. À l'aide des symboles fournis dans la légende, schématiser l'édifice moléculaire obtenu en fin de la réaction immuno-enzymatique dans une cupule contenant l'insuline.

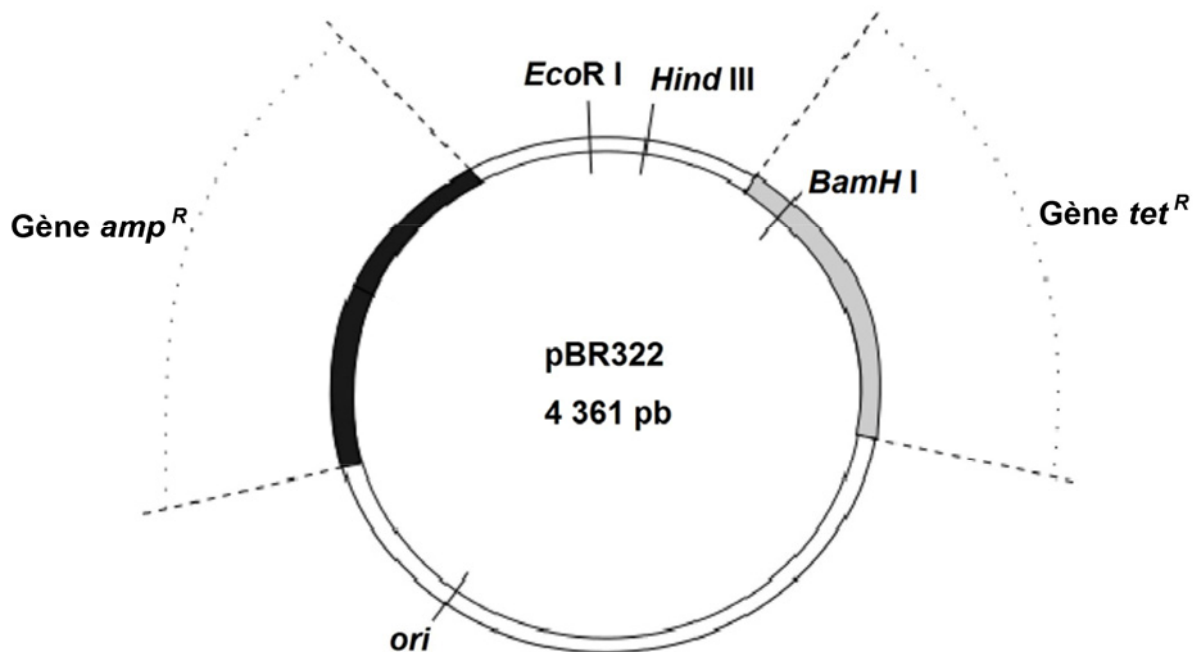
Q15. Expliquer pourquoi l'absorbance mesurée à 450 nm est proportionnelle à la concentration en insuline présente dans l'échantillon.

SYNTHESE

Q16. Réaliser un organigramme des quatre étapes principales de production de l'insuline humaine en y intégrant les choix retenus pour l'optimisation du procédé.

DOCUMENT 1 – Carte de restriction simplifiée du plasmide pBR322

Pour être utilisable en génie génétique, un plasmide doit contenir une origine de réplication lui permettant une réplication autonome dans la cellule, au moins un gène de sélection destiné à discriminer les clones recombinants et des sites de restriction permettant son remodelage.

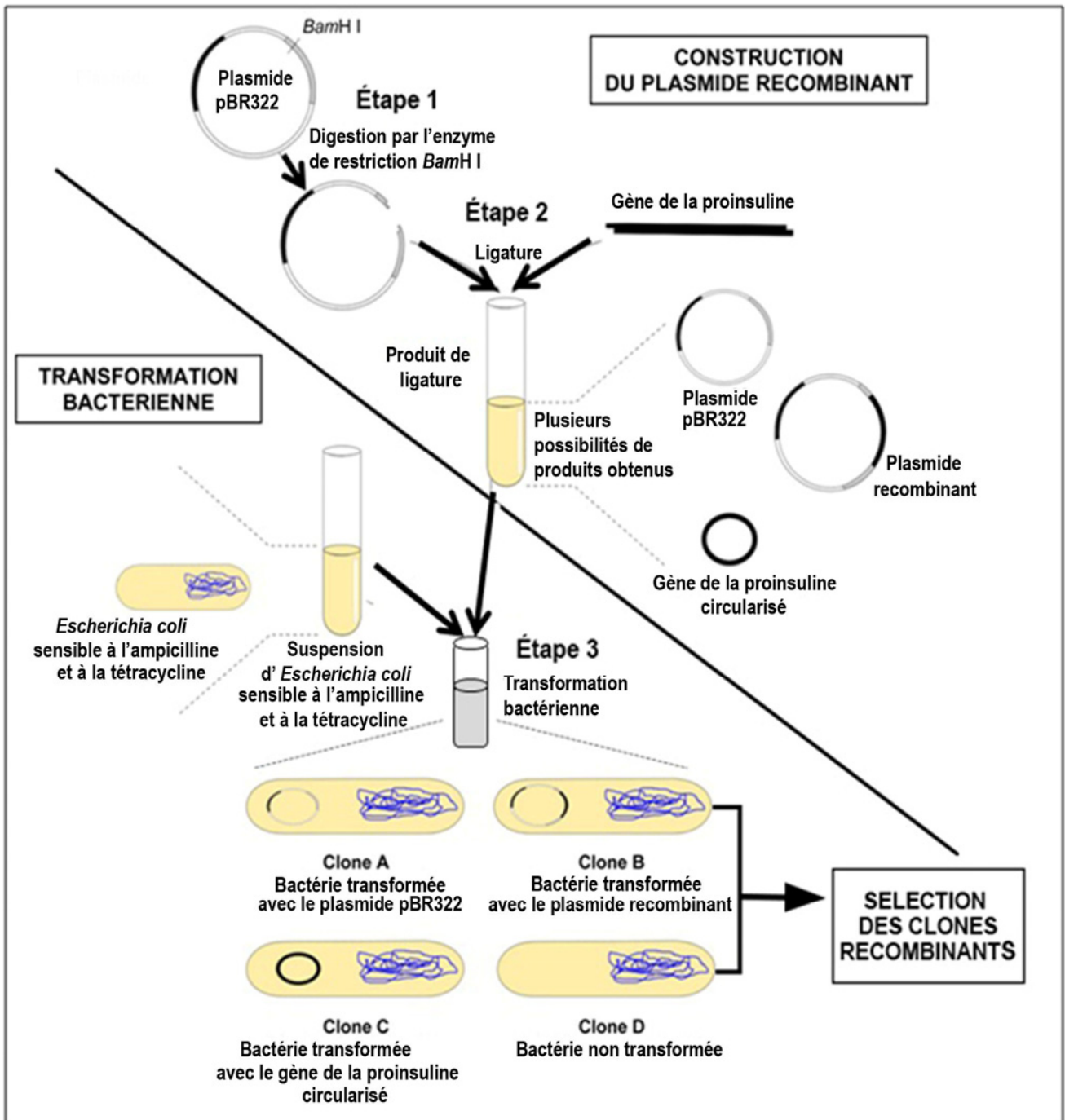


- **Gène *amp^R*** : gène de résistance à l'ampicilline
- **Gène *tet^R*** : gène de résistance à la tétracycline
- ***ori*** : origine de réplication
- ***BamH I*, *EcoR I*, *Hind III*** : sites de restriction spécifiques de chaque enzyme de restriction

Remarque : Un gène n'est traduit en protéine que lorsqu'il est sous sa forme continue, non interrompue.

DOCUMENT 2 – Obtention d'un clone recombinant

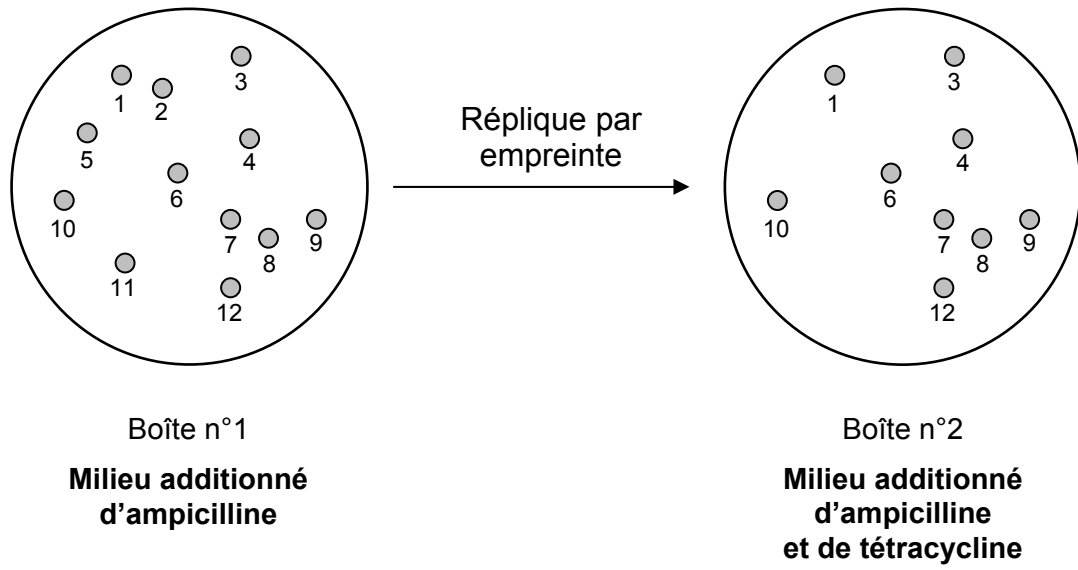
Construction du plasmide, transformation et sélection des clones recombinants



Caractéristiques des 4 types de clone transformés

	Type A	Type B	Type C	Type D
Résistance à l'ampicilline	oui	oui	non	non
Résistance à la tétracycline	oui	non	non	non

DOCUMENT 3 - Représentation schématique de la sélection des clones



Légende

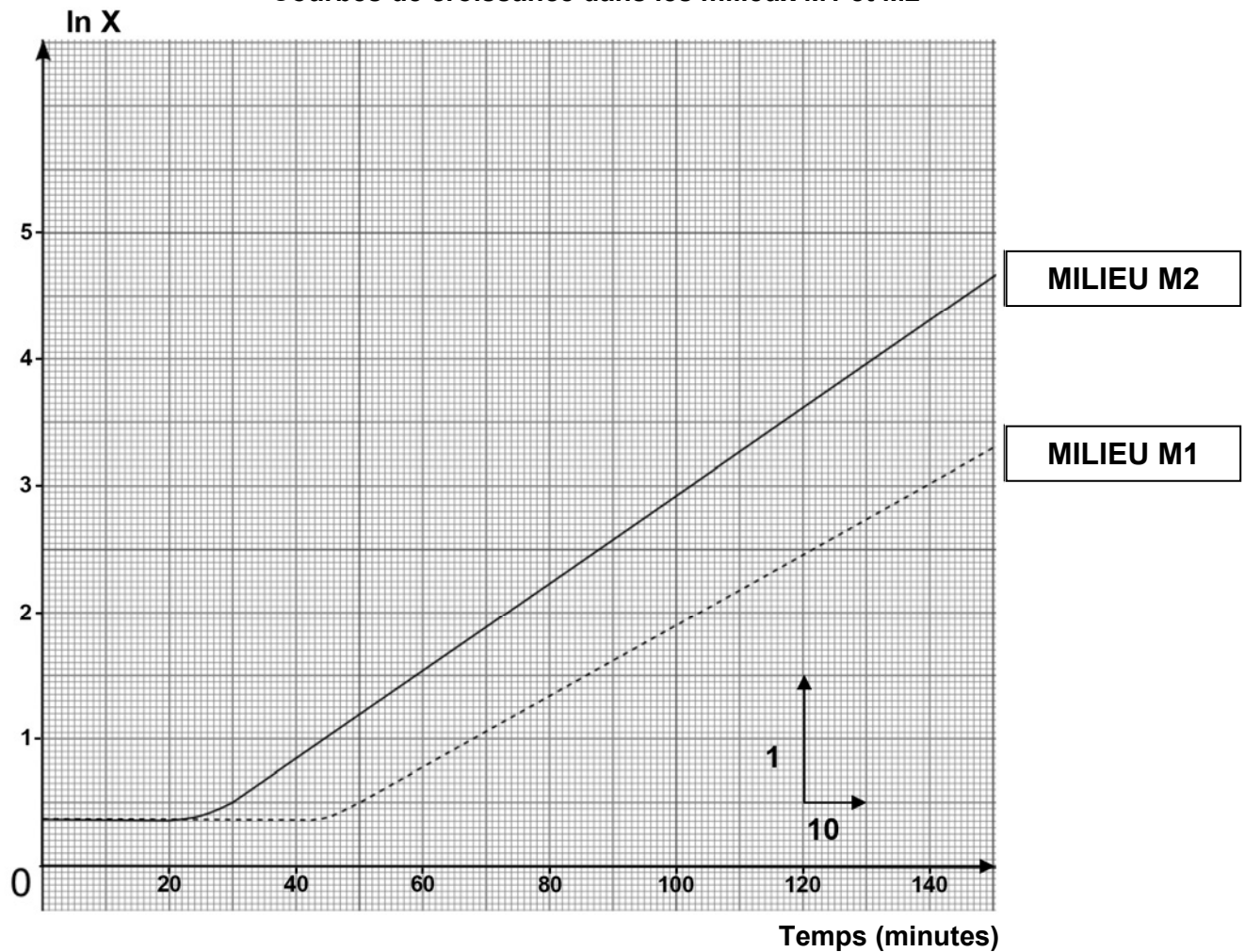
○ : colonie bactérienne d'*E.coli*

DOCUMENT 4 - Culture d'un clone recombinant dans deux milieux

Composition des milieux M1 et M2

Milieu M1 (bouillon nutritif)	Milieu M2 (bouillon cœur-cervelle)
<ul style="list-style-type: none">- Peptones- Extrait de viande- Chlorure de sodium- Eau <p>Ajusté à pH 7,2</p>	<ul style="list-style-type: none">- Peptones- Extrait cœur-cervelle- Chlorure de sodium- Glucose- Phosphate disodique- Eau <p>Ajusté à pH 7,4</p>

Courbes de croissance dans les milieux M1 et M2

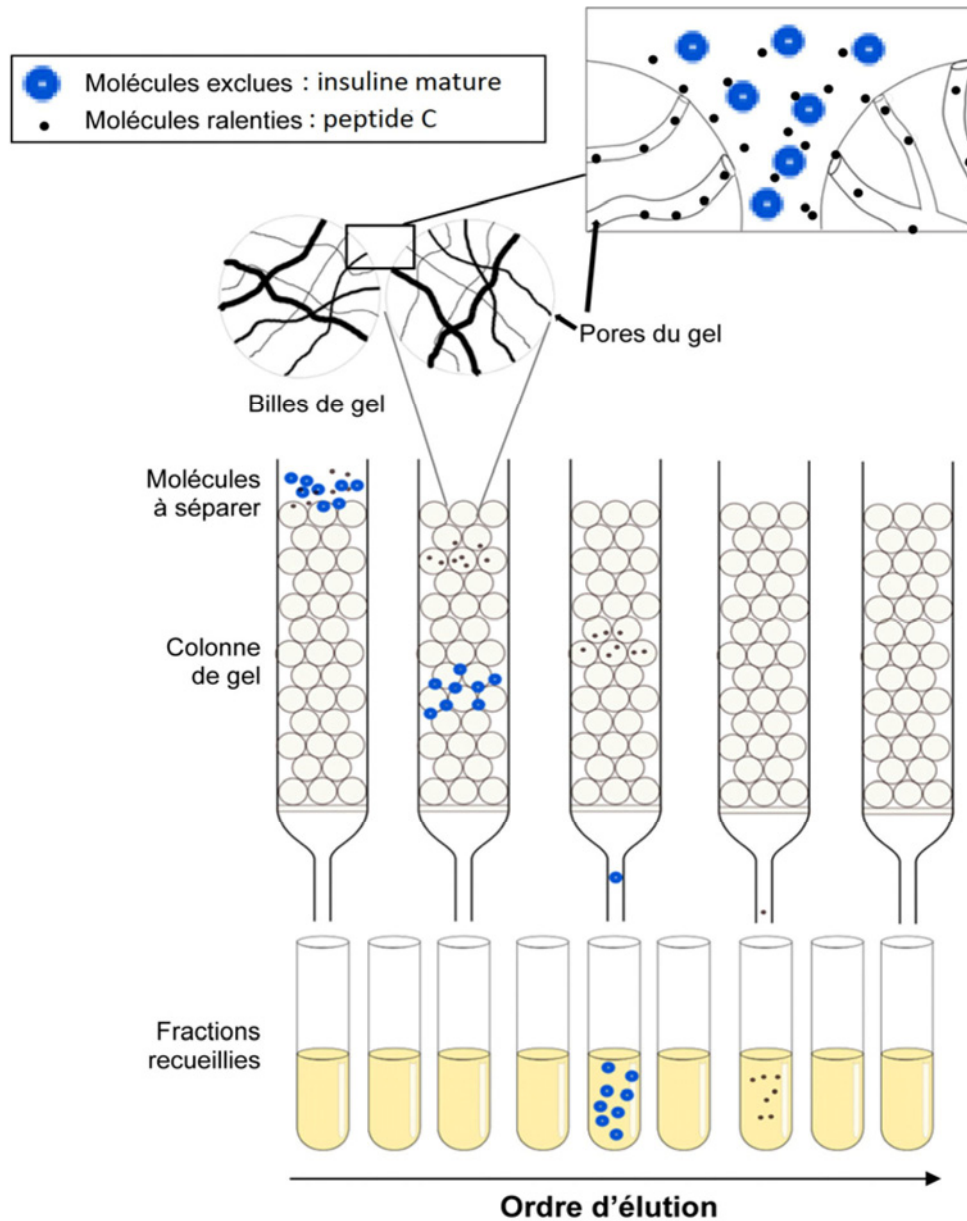


Légende : X = biomasse

DOCUMENT 5 - Chromatographie par gel-filtration

Schéma de principe

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est composée de billes de gel poreuses ; la phase mobile est une solution tampon dont le flux entraîne les molécules à séparer.



Caractéristiques de tamisage moléculaire de trois gels

Type de gel	Intervalle de masses moléculaires des composés ralentis par le gel (Da)
Sephadex [®] G15	0 à 1 500
Sephadex [®] G25	1 000 à 5 000
Sephadex [®] G200	5 000 à 800 000

DOCUMENT 6 - Principe du dosage immuno-enzymatique de l'insuline

Ce dosage est basé sur la reconnaissance simultanée de l'insuline humaine par deux anticorps.







Dans une microplaque, sont ajoutés successivement :

- le premier anticorps anti-insuline ;
- le milieu contenant l'insuline à doser ;
- le second anticorps anti-insuline, qui est couplé à la peroxydase ;
- le substrat incolore TMB.

Chacune des étapes est suivie de lavages.

La peroxydase catalyse la réaction de transformation du TMB en un produit coloré qui absorbe à 450 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en insuline présente dans l'échantillon.

Les différents acteurs intervenant dans ce dosage sont schématisés dans la légende ci-dessous :

Symbole	Signification
	Cupule de microplaque
	Insuline humaine
	Anticorps anti-insuline humaine fixé au fond des cupules
	Anticorps anti-insuline humaine couplé à la peroxydase
 Substrat  Produit coloré	Réaction catalysée par la peroxydase