

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : STL
Spécialité biotechnologies

SESSION 2017

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

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 2017

Sous-épreuve écrite de Chimie – Biochimie – Sciences du vivant

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 **11** pages.

Partie I : pages 2 à 5

Partie II : pages 7 à 11

Les deux parties sont indépendantes.

PARTIE I : la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) (8 points)

La leucémie aiguë lymphoblastique est un cancer du sang. Le processus prend naissance dans la moelle osseuse et évolue rapidement.

La LAL est liée à la multiplication incontrôlée de cellules sanguines, appelées lymphoblastes, qui envahissent la moelle osseuse et passent progressivement dans le sang.

L'objectif de cette partie est d'étudier le processus physiologique de production des cellules sanguines ainsi que la dérégulation à l'origine de l'apparition de cette maladie et de présenter une thérapie possible.

Le **document A** présente la leucémie aiguë lymphoblastique. Le déroulement normal de la production de cellules sanguines appelé hématopoïèse est schématisé sur le **document B**.

- 1.1. Reporter les numéros de 1 à 9 du **document B** sur la copie et y associer les mots en caractères gras présents dans le texte du **document A**.

Le diagnostic de la LAL repose essentiellement sur un comptage des éléments figurés du sang effectué sur un frottis sanguin coloré et sur un examen de la moelle osseuse appelé myélogramme.

Le **document C** présente deux photographies correspondant à une observation au microscope d'un frottis sanguin normal et d'un frottis sanguin d'un patient atteint de la LAL.

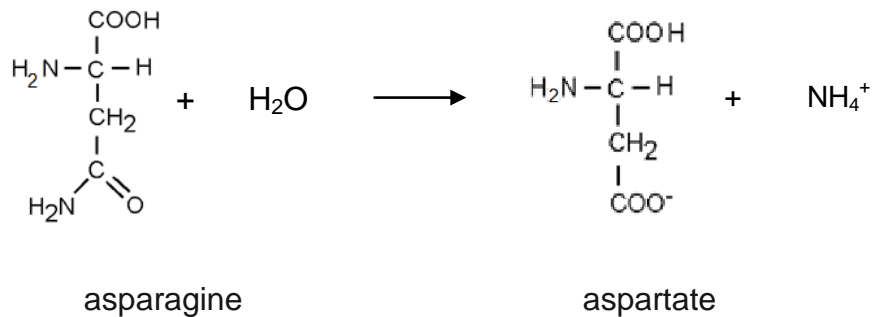
- 1.2. Nommer la technique d'observation des frottis photographiés sur le **document C**. Argumenter la réponse.
- 1.3. À l'aide du **document A**, identifier le frottis du patient atteint de la LAL en argumentant la réponse.

Certaines modifications génétiques des cellules de la moelle osseuse peuvent provoquer une multiplication exagérée des lymphoblastes.

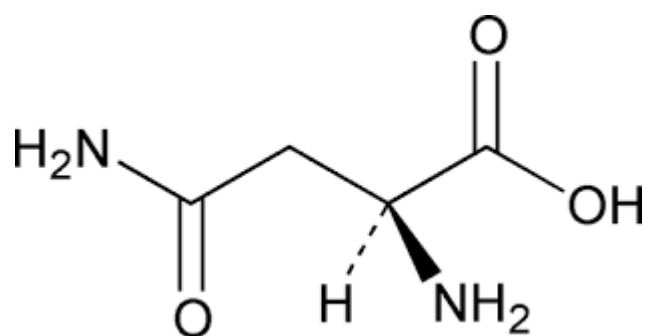
- 1.4. À l'aide du **document D**, indiquer la durée de chaque étape du cycle cellulaire. Préciser le nombre de chromatides par chromosome pour les phases G_1 et G_2 .
- 1.5. La mitose comprend quatre phases désignées a, b, c et d dans le **document E**. Classer ces quatre phases par ordre chronologique et les nommer.
- 1.6. À l'aide des informations données dans le **document F**, choisir une des deux familles de gènes et expliquer en quoi elle peut être à l'origine de la dérégulation du cycle cellulaire des lymphoblastes.

Une des approches thérapeutiques pour traiter la LAL est la chimiothérapie. Elle consiste à injecter dans le sang de l'asparaginase, enzyme provoquant la dégradation de l'asparagine qui est un acide aminé indispensable à la multiplication des lymphoblastes.

L'équation de la réaction catalysée par l'enzyme asparaginase est la suivante :



- 1.7. L'asparaginase est un catalyseur enzymatique. Expliquer le rôle d'un catalyseur.
- 1.8. L'asparagine est un acide aminé. Argumenter cette affirmation à l'aide de la formule de cette molécule recopiée sur la copie.
- 1.9. Donner la définition d'un atome de carbone asymétrique. Repérer le (ou les) atome(s) de carbone asymétrique(s) dans la formule de l'asparagine recopiée à la question 1.8.
- 1.10. L'asparaginase ne catalyse cette réaction que pour la L-asparagine (représentée ci-dessous). Donner la représentation de Cram de la D-asparagine.



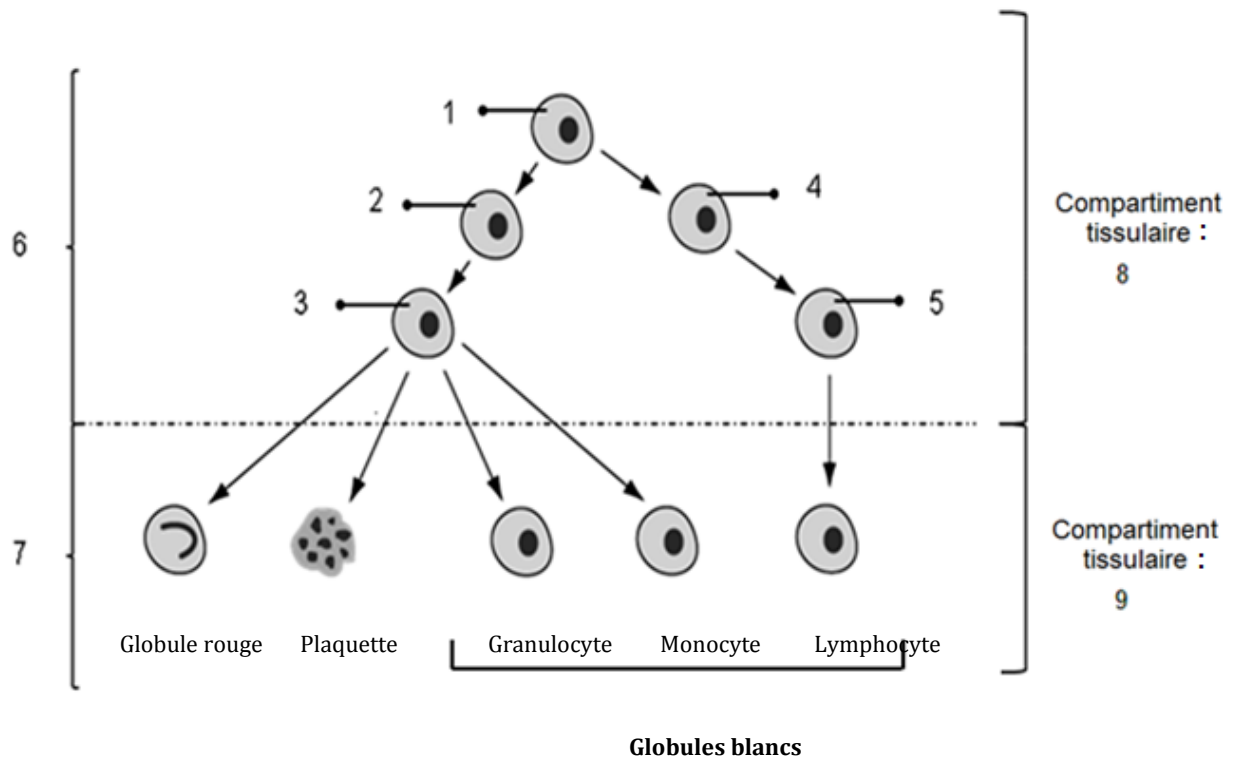
Représentation de Cram de la L-asparagine

Document A : présentation de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)

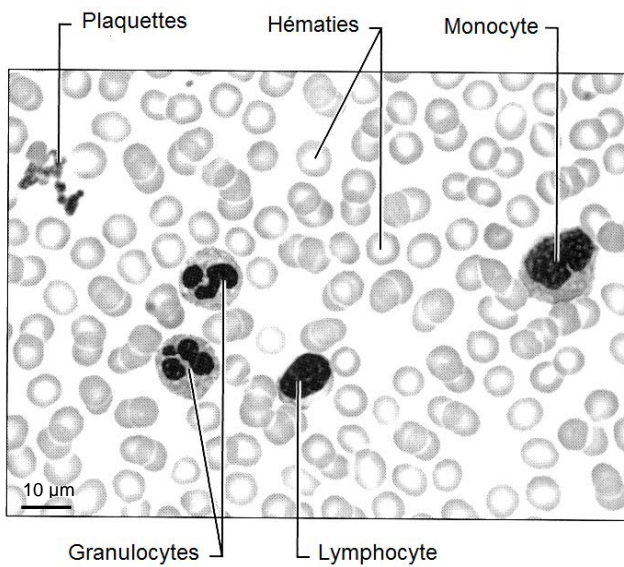
La moelle osseuse contient des **cellules souches hématopoïétiques**. Ces dernières se transforment en d'autres types de cellules ayant des fonctions distinctes. Les cellules souches hématopoïétiques deviennent des **cellules souches myéloïdes et lymphoïdes**, puis des cellules blastiques (**myéloblastes et lymphoblastes**), qui sont des **cellules sanguines immatures**. Les cellules de la lignée myéloïde se différencient en globules rouges, en plaquettes, en granulocytes et en monocytes. Les cellules de la lignée lymphoïde se différencient uniquement en lymphocytes.

Dans le cas de la LAL, certaines cellules lymphoblastiques prolifèrent anormalement et ne deviennent pas des **cellules sanguines matures**. Avec le temps, les lymphoblastes deviennent anormalement abondants dans le **sang**.

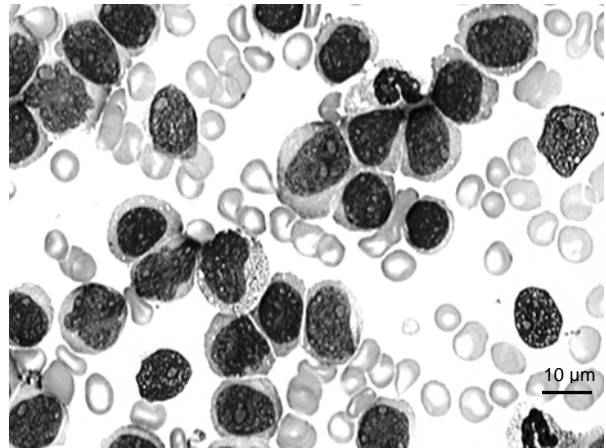
Document B : représentation simplifiée du déroulement normal de l'hématopoïèse



Document C : photographies de frottis sanguins d'un individu sain et d'un patient atteint de la LAL

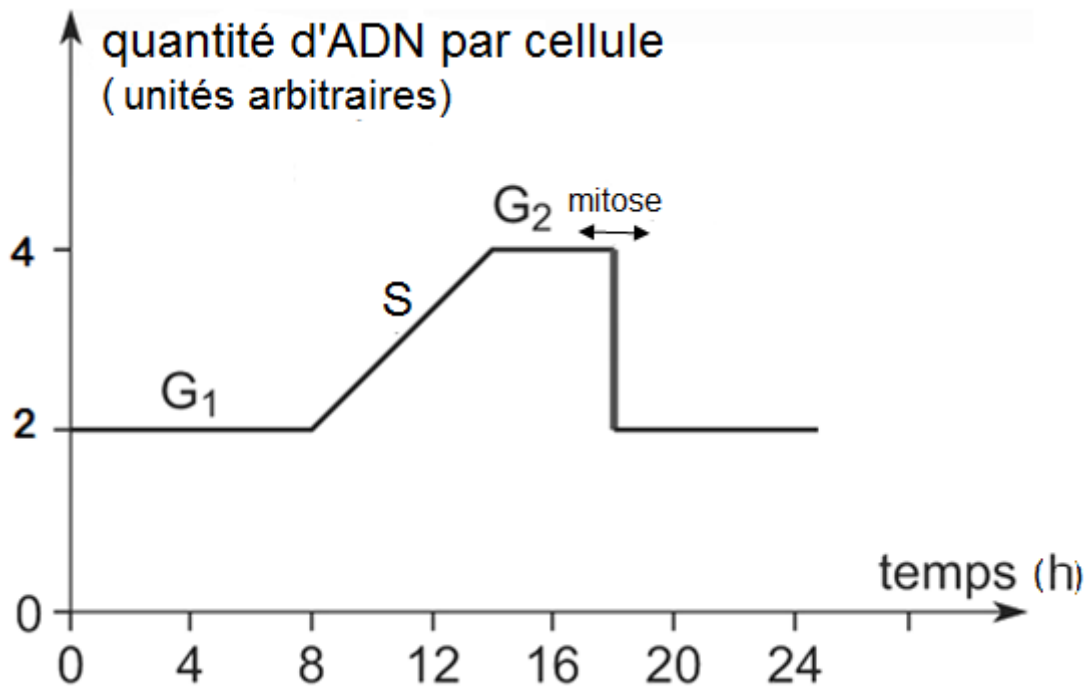


Document C1

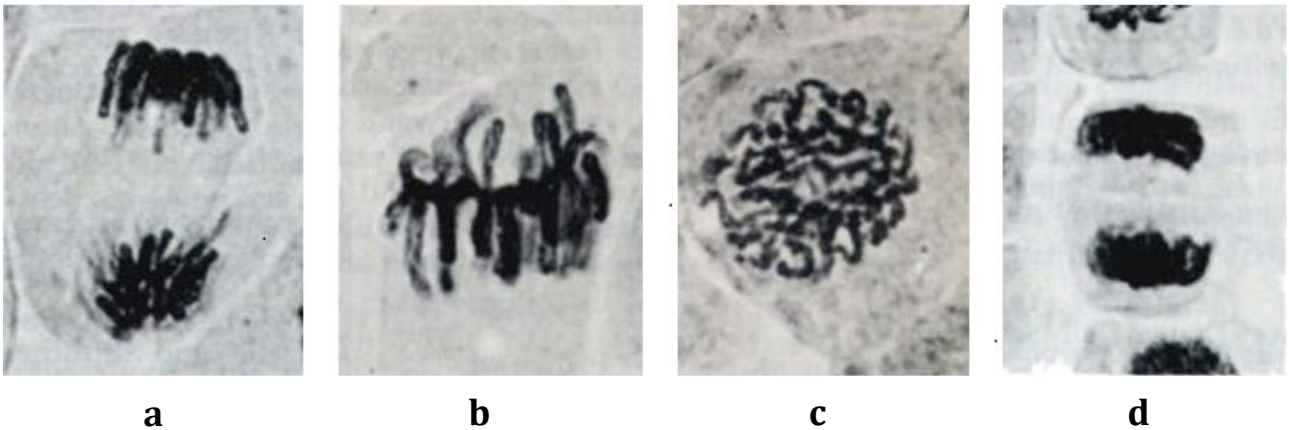


Document C2

Document D : variation de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire



Document E : micrographies des différentes phases de la mitose



Document F : présentation du rôle des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire

Dans une cellule non cancéreuse, le cycle cellulaire est sous contrôle de deux familles de gènes antagonistes, ceux qui activent la prolifération cellulaire et ceux qui l'inhibent. Les gènes activateurs accélèrent le cycle cellulaire, alors que les gènes inhibiteurs le ralentissent.

PARTIE 2 : étude du métabolisme de l'azote chez les légumineuses (12 points)

L'azote est un élément indispensable au développement des végétaux qui le trouvent dans le sol sous forme d'ions ammonium ou nitrate. Ce sont principalement les ions nitrate qui sont assimilés du fait de leur plus grande disponibilité.

Certains végétaux comme les légumineuses sont cependant capables de se développer sur des terrains pauvres et d'enrichir naturellement le sol en azote.

L'objectif de cette étude est de comprendre le mécanisme par lequel les légumineuses assimilent l'azote.

Le métabolisme de l'azote dans le sol

2.1. Reporter sur la copie les repères 1.a, 1.b et 1.c de la partie 1 du schéma du **document G** et à partir du **document H**, indiquer leur signification.

L'équation de la nitrification est la suivante : $2 \text{NH}_4^+ + 3 \text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{NO}_2^- + 2 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{H}^+$

L'un des couples intervenant est $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$.

2.2. Identifier l'autre couple et indiquer si, dans cette étape, les ions ammonium sont oxydés ou réduits.

2.3. La réaction étant spontanée, attribuer les potentiels d'oxydoréduction suivants à chacun des couples en justifiant la réponse :



La particularité des légumineuses

Les plantes absorbent les ions nitrate du sol par leurs racines. Elles les transforment en ions ammonium, puis en acides aminés, et finalement en protéines.

La plupart des plantes en culture nécessitent l'apport d'engrais azotés car le sol s'appauvrit en azote au fur et à mesure des récoltes. Les légumineuses, au contraire, peuvent être cultivées en absence d'apport d'engrais azotés. Ces plantes présentent des excroissances appelées nodosités, situées sur les racines.

Le **document I** présente la photographie d'une coupe de nodosité. On constate la présence d'un grand nombre de bactéries du genre *Rhizobium* dans ces nodosités.

2.4. Estimer la taille du *Rhizobium* fléché.

Le **document J** présente des résultats issus de la culture de légumineuses dans un sol pauvre en azote dans différentes conditions.

2.5. Proposer une hypothèse permettant d'expliquer la capacité des légumineuses à croître dans un sol pauvre en azote.

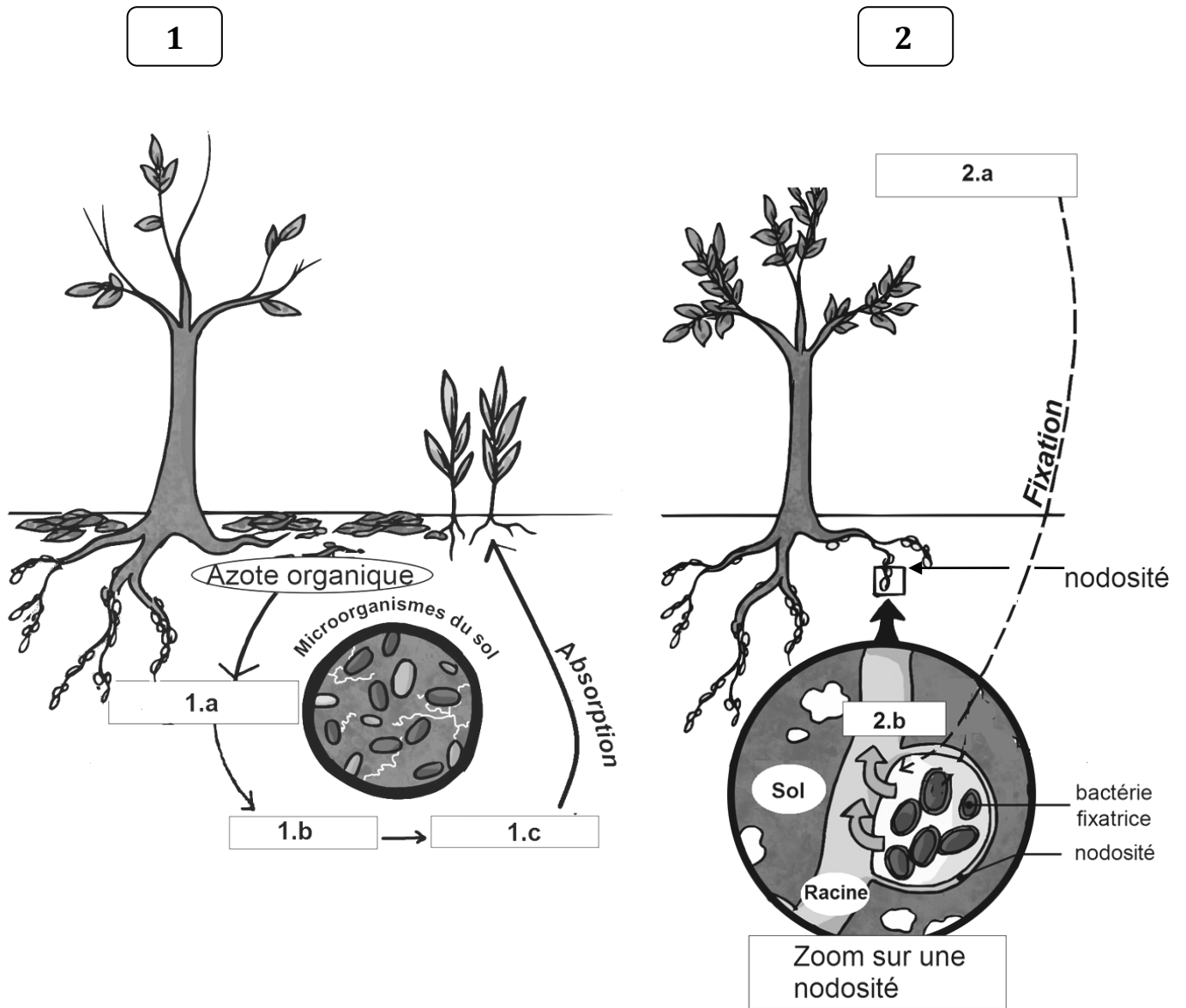
Le *Rhizobium* a la capacité de fixer le diazote atmosphérique N₂ et de le convertir en ions ammonium. Des résultats d'expérience avec deux souches de *Rhizobium* sont présentés dans le **document K**.

- 2.6. Reporter sur la copie les repères 2.a et 2.b du schéma du **document G** et indiquer leur signification.
- 2.7. Exploiter les résultats expérimentaux et conclure sur l'intérêt de la colonisation des légumineuses par le *Rhizobium*.

En agriculture biologique, les cultures de légumineuses sont fréquemment utilisées en alternance avec des cultures de céréales. L'INRA (Institut national de recherche agronomique) de Toulouse propose même d'associer simultanément les cultures de céréales et de légumineuses telles que le pois.

- 2.8. D'après l'ensemble des données des questions précédentes, expliquer un intérêt de l'utilisation des légumineuses dans ces pratiques agricoles.

Document G: schémas de l'absorption d'azote par les végétaux
(Adapté de www.solicaz.fr/notre-innovation/fixation-dazote/)



Document H : le devenir de l'azote dans le sol

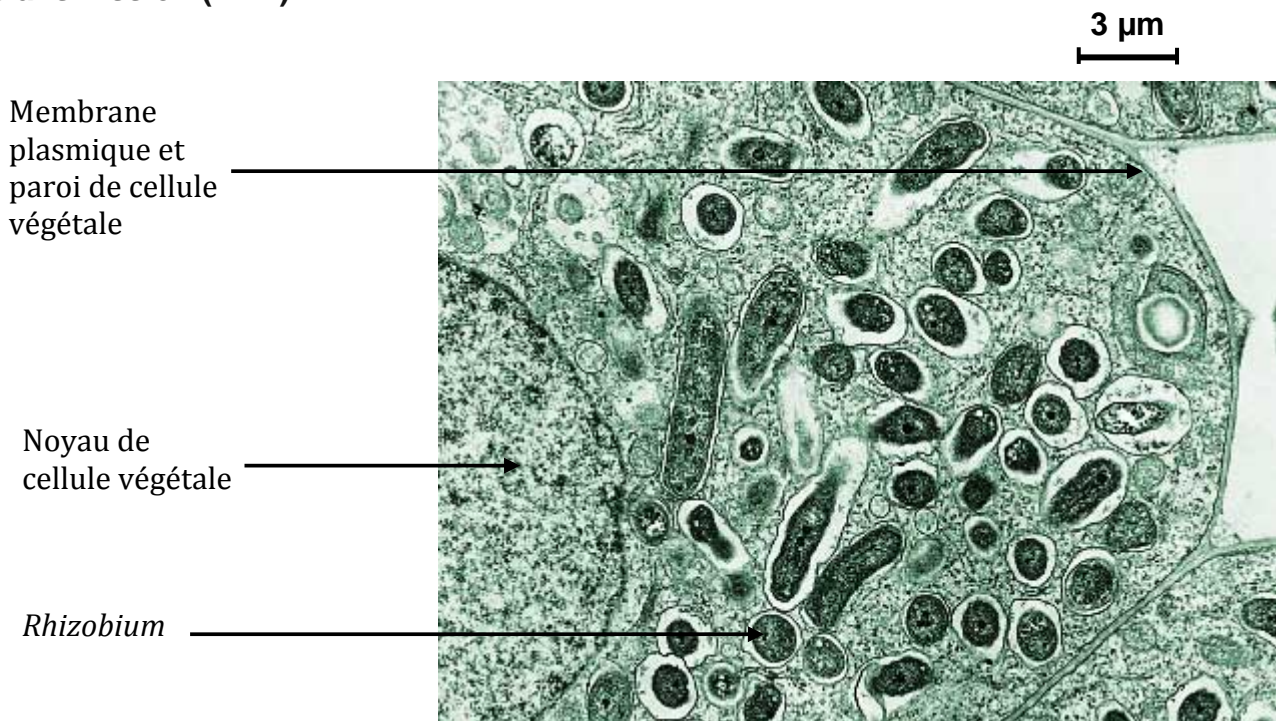
Les ions nitrate proviennent de la décomposition de la matière organique azotée présente dans le sol. Celle-ci est d'abord transformée en ions ammonium (NH_4^+) par des bactéries ammonifiantes du sol : c'est l'ammonification.

Les ions ammonium sont ensuite transformés en ions nitrite (NO_2^-) par des bactéries comme *Nitrosomonas* : c'est la nitritation.

Les ions nitrite sont enfin transformés en ions nitrate (NO_3^-) par des bactéries telles que *Nitrobacter* : c'est la nitratation.

Une petite partie des ions nitrate du sol peut être convertie en diazote par des bactéries dénitrifiantes. Ce diazote formé retourne dans l'atmosphère.

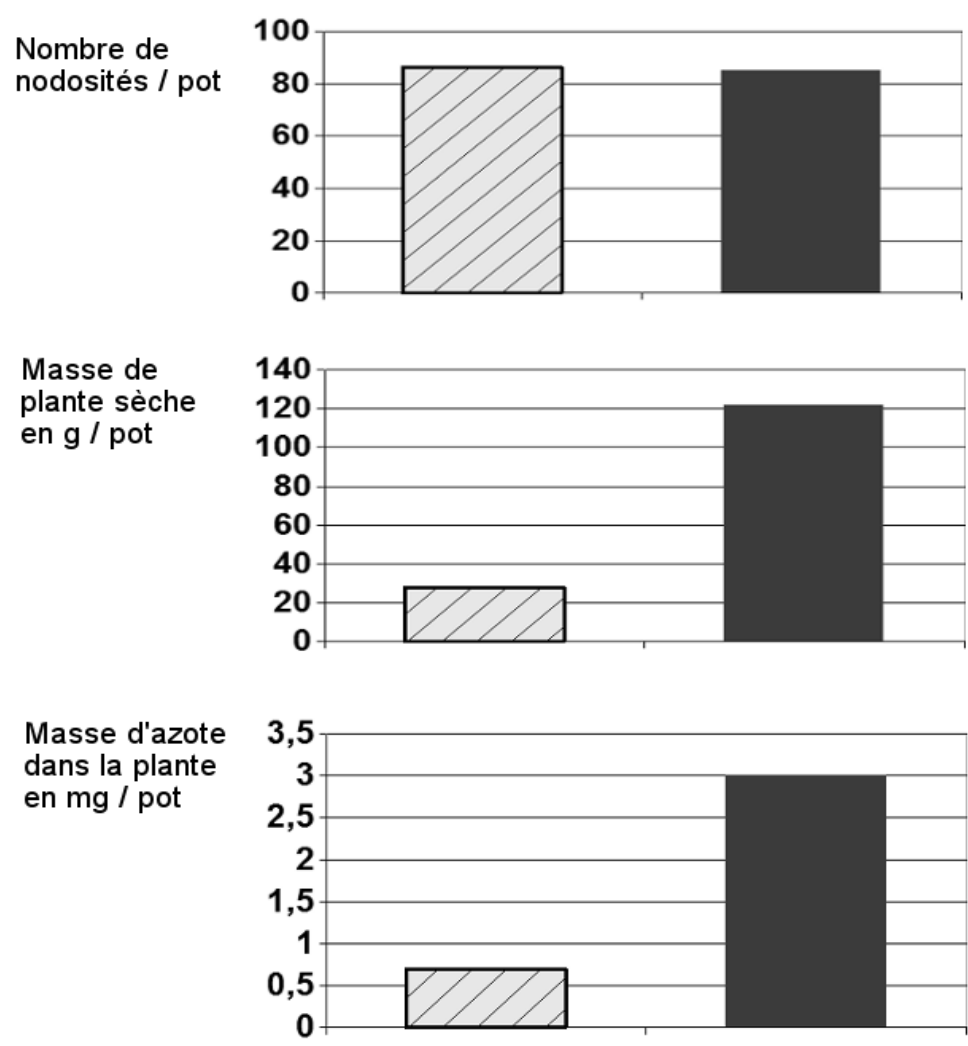
Document I : coupe de nodosité observée en microscope électronique à transmission (MET)



Document J : développement de plants de légumineuse avec ou sans nodosités dans un sol pauvre en azote pour une même durée

Plants	Croissance moyenne de plants (en cm)	Gain moyen en masse de matière sèche des plants (en g)	Gain moyen en masse de protéines des plants (en mg)
Sans nodosités	4,3	0,06	8
Avec nodosités	15,8	0,62	128

Document K : croissance de légumineuses en pots, inoculées soit par du *Rhizobium* fixant efficacement l'azote atmosphérique soit par du *Rhizobium* fixant très peu l'azote atmosphérique.



BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2017

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.

Compétences évaluées :					
C1	C2	C3	C4	C5	C6
Extraire une information	Analyser un document	Expliquer une démarche	Argumenter une réponse	Construire une synthèse	S'exprimer à l'écrit
1 point	7 points	5 points	3 points	3 points	1 point

Ce sujet comporte 8 pages.

OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE PRODUCTION DE PÉNICILLINE

La pénicilline, antibiotique découvert en 1928 par Alexander Fleming, est une molécule produite par une moisissure du genre *Penicillium*.

La production industrielle des antibiotiques nécessite de cultiver le microorganisme producteur dans des conditions optimales (milieu de culture, température, pH, oxygénation) pour la croissance de la souche comme pour la production d'antibiotique.

Un industriel souhaite optimiser son procédé de production. Dans les conditions actuelles, après six jours de culture, la productivité volumique est de 7 g de pénicilline par litre de milieu. L'objectif est d'atteindre, dans le même délai, une concentration minimale de 9 g·L⁻¹. L'industriel envisage de changer le milieu de culture de la souche sélectionnée, notamment pour améliorer le temps de génération G actuellement de 10 h.

La démarche d'optimisation du procédé de fabrication impose de :

- contrôler la souche sélectionnée avant l'ensemencement en fermenteur ;
- suivre la croissance de cette souche dans le nouveau milieu de culture ;
- évaluer la production de pénicilline par dosage immuno-enzymatique.

1. CONTROLE DE LA SOUCHE PRODUCTRICE DE PÉNICILLINE

Le contrôle de pureté de la souche avant ensemencement en fermenteur est réalisé sur gélose Sabouraud. La composition de ce milieu est fournie dans le **document 1**.

Q1. Expliquer le choix de ce milieu pour cultiver la souche productrice de pénicilline.

La moisissure ainsi isolée est observée au microscope optique après coloration. Des photographies annotées de moisissures A et B observées au microscope grossies 400 fois sont présentées dans le **document 2**.

Q2. Utiliser le **tableau du document 2** pour identifier, en précisant la démarche, laquelle des moisissures A ou B observées, est la souche d'intérêt isolée.

2. PRODUCTION DE PÉNICILLINE EN FERMENTEUR

Afin de déterminer les conditions optimales de croissance pour la production de pénicilline, la souche isolée de *Penicillium* est cultivée dans trois milieux de culture M1, M2 et M3, de compositions différentes. Les résultats de croissance et de production d'antibiotique par gramme de biomasse, sont présentés dans le **document 3**.

Q3. Argumenter le choix du milieu M2 pour la production de l'antibiotique.

La souche sélectionnée est cultivée dans le milieu M2, à une température de 22 °C, pendant six jours. Les suivis de croissance et de production de pénicilline, effectués en parallèle, sont présentés dans le **document 4**.

Q4. Analyser la courbe de croissance pour identifier les différentes phases et leur durée respective.

Q5. A l'aide de la courbe et de l'équation aux grandeurs ci-après, déterminer la vitesse spécifique de croissance (μ_{expo} ou $Q_{x \text{ expo}}$) de la souche au cours de la phase exponentielle de croissance, exprimée en h^{-1} .

Donnée : équation aux grandeurs
$$\mu_{\text{expo}} = Q_{x \text{ expo}} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Q6. Déterminer, graphiquement ou par le calcul, le temps de génération G , exprimé en h .

Donnée : équation aux grandeurs
$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{expo}}}$$

Q7. Analyser la courbe représentant l'évolution de la concentration en masse en pénicilline au cours du temps en identifiant les phases de la courbe de croissance au cours desquelles la pénicilline est produite.

Q8. À l'aide du **document 5**, préciser à quel type de métabolite appartient la pénicilline.

Q9. Déterminer graphiquement la concentration en masse en pénicilline obtenue après 140 heures de culture.

3. DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE DE LA PÉNICILLINE PRODUITE

Le **document 6** présente le mode opératoire de détermination de la concentration en masse en pénicilline par méthode immuno - enzymatique ELISA. La réalisation du dosage de la pénicilline nécessite de préparer une gamme d'étalonnage de concentration en masse en pénicilline. Les cupules correspondant à la gamme sont traitées en même temps que les essais dans la même microplaque.

Q10. À l'aide de la légende fournie, schématiser **sur la copie** l'édifice moléculaire obtenu à l'issue de chacune des étapes **3, 5 et 7**.

Q11. Expliquer le rôle du lavage avec du tampon PBS-Tween de l'étape **4**.

Q12. Identifier la couleur attendue dans les cupules positives. Expliquer ce résultat.

En parallèle de la gamme d'étalonnage, un témoin de spécificité est réalisé avec du milieu de culture stérile à la place de la pénicilline.

Q13. Décrire le résultat attendu et expliquer l'intérêt de ce témoin.

L'intensité de coloration du pNP est mesurée par spectrophotométrie et les résultats obtenus sont présentés dans le **document 7**. Dans le domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage, la grandeur $A_{(\text{pNP à } 405 \text{ nm})}$ est proportionnelle à la grandeur $\ln(\rho_{(\text{pénicilline ; solution étalon})})$.

Q14. Repérer les valeurs de $\ln(\rho_{(\text{pénicilline ; solution étalon})})$ délimitant le domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage. Relever les valeurs de $\rho_{(\text{pénicilline ; solution étalon})}$ correspondantes.

L'échantillon de milieu de culture de la souche étudiée dans le **document 4**, est prélevé après 140 heures de culture. Il est dilué au 1/400 puis analysé par méthode ELISA.

Q15. Montrer la nécessité de diluer cet échantillon de milieu de culture pour réaliser le dosage immuno-enzymatique.

Pour l'échantillon dilué, l'absorbance mesurée à 405 nm contre le blanc réactif est égale à 0,280.

Q16. À l'aide du **document 7**, déterminer la concentration en masse en pénicilline en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans cet échantillon (à $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ près). Expliquer la démarche.

SYNTHÈSE

Q17. En rappelant les objectifs à atteindre, rédiger une synthèse pour montrer que les conditions de culture de la souche sélectionnée permettent l'optimisation souhaitée par l'industriel.

DOCUMENT 1 : Gélose Sabouraud

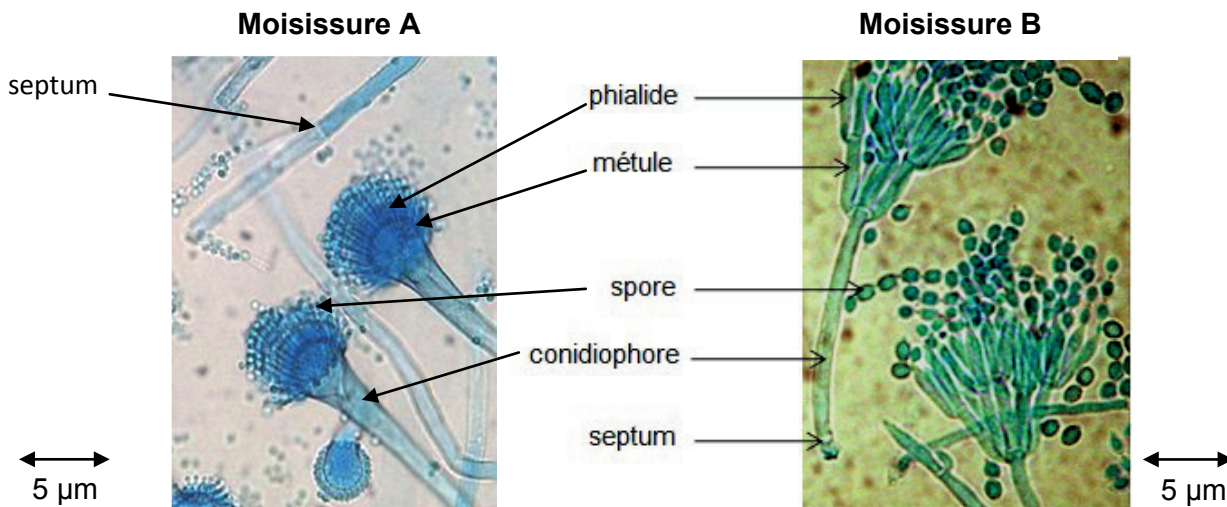
La gélose Sabouraud est recommandée pour l'isolement des levures et des moisissures, micro-organismes acidophiles.

Formule type pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande10,0 g
 - Glucose.....20,0 g
 - Agar agar.....15,0 g
- pH du milieu à 25 °C : 5,7 ± 0,2

DOCUMENT 2 : Caractères morphologiques des moisissures

2.a Observation microscopique des moisissures A et B (x 400)



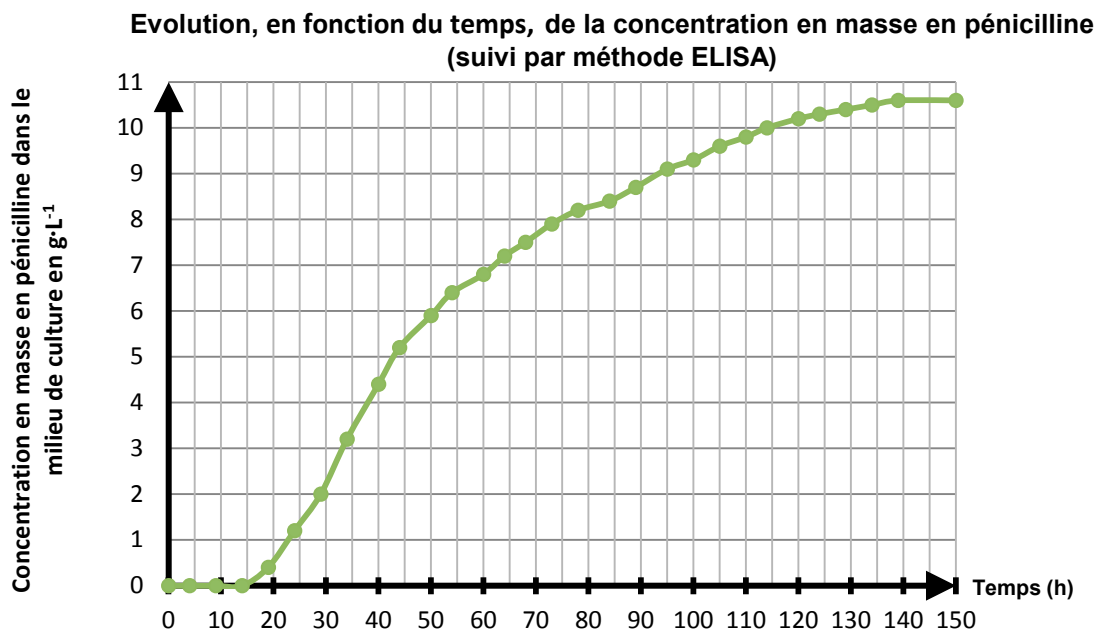
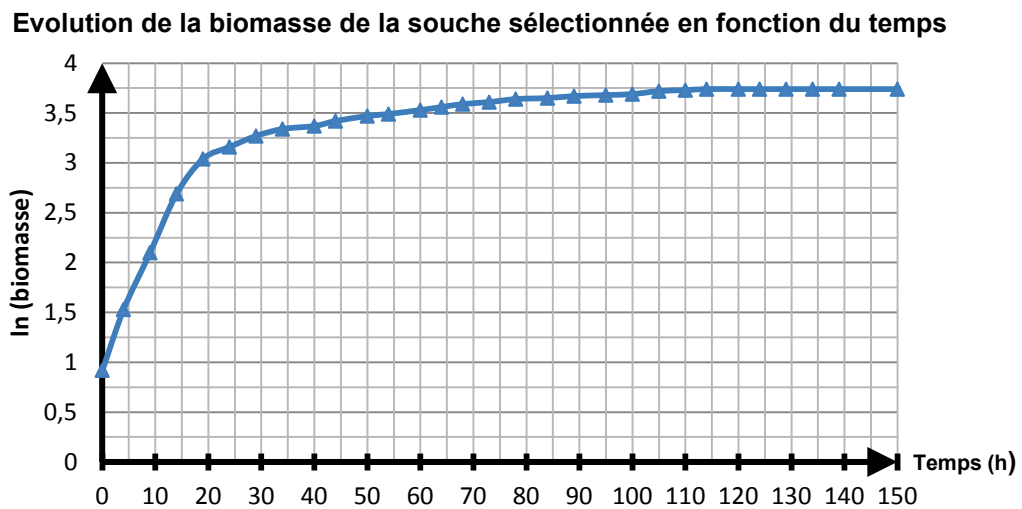
2.b Tableau d'identification morphologique des moisissures

Hyphes	Spores	Structure microscopique	Genre
Septés	Externes	Conidiophore terminé en vésicule ou en « pomme d'arrosoir ». Conidiophore portant des métules ramifiées en phialides qui donnent naissance à des chaînes de spores.	<i>Aspergillus</i>
		Conidiophore avec un aspect « en pinceau ». Conidiophore portant des métules ramifiées en phialides qui donnent naissance à des chaînes de spores.	<i>Penicillium</i>
Non septés	Internes	Sporange contenant des spores internes, porté par un sporangiophore.	<i>Mucor</i>
		Sporangiophore en bouquet présentant des structures ressemblant à des racines.	<i>Rhizopus</i>

DOCUMENT 3 : Culture de la souche sélectionnée.

Milieu de culture	M1	M2	M3
Temps de génération en heure	4	7	10
Quantité de pénicilline produite par gramme de biomasse	+	++	++

DOCUMENT 4 : Suivi de croissance de la souche sélectionnée et de la production de pénicilline en milieu M2 et à 22 °C



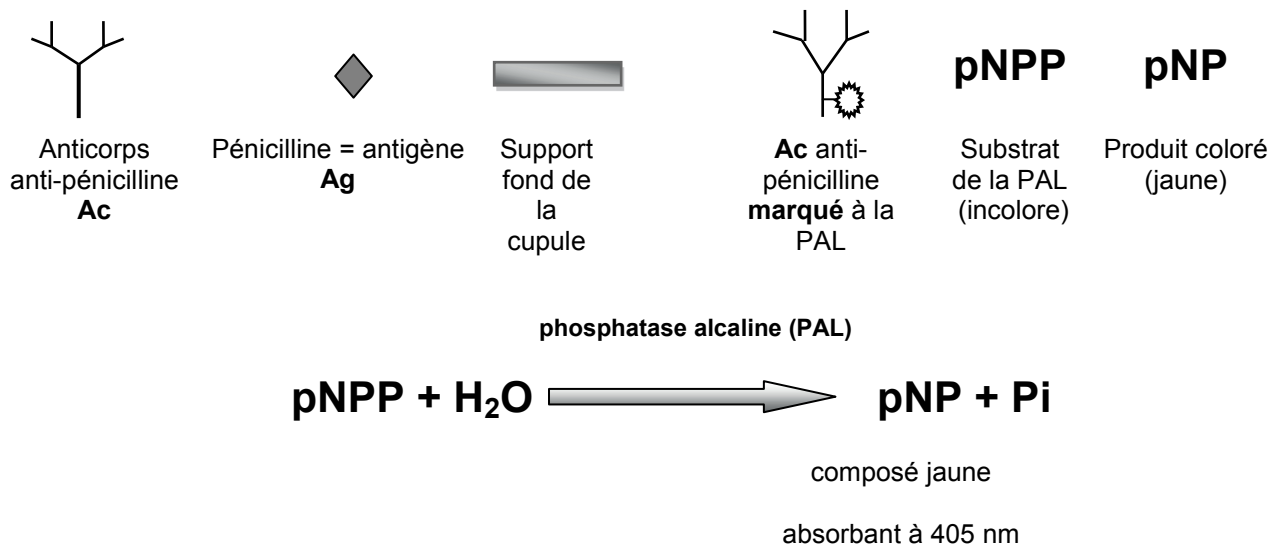
DOCUMENT 5 : Les différents types de métabolites

Type de métabolite	Définition
Métabolite primaire	Molécule indispensable à la cellule, produite dès la phase exponentielle de croissance.
Métabolite secondaire	Molécule produite après la fin de la phase exponentielle de croissance.

DOCUMENT 6 : Mode opératoire de détermination de la concentration en masse en pénicilline par une technique ELISA en microplaque

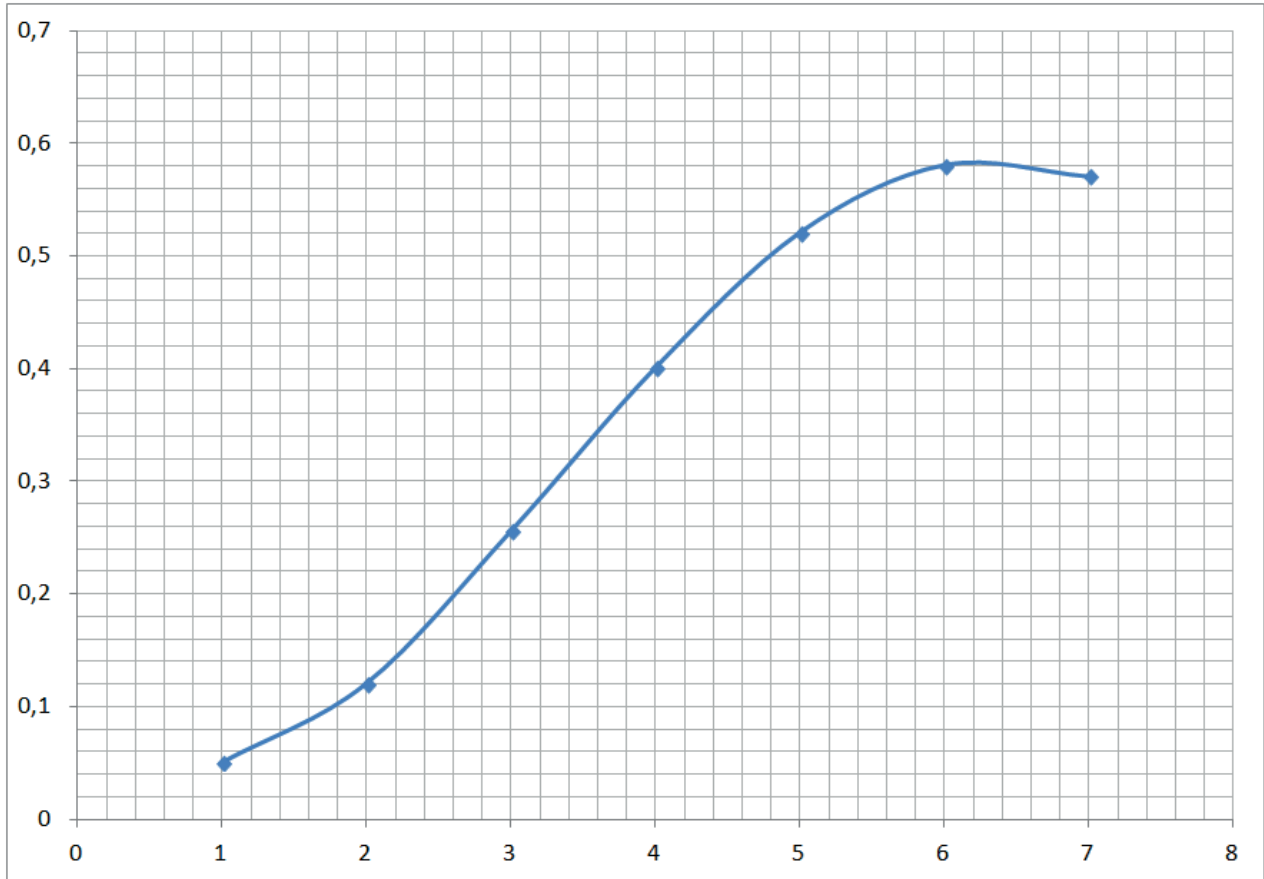
N° de l'étape	Instructions
1	- Fixer 200 µL d' Ac dans le fond des cupules de la microplaque.
2	- Incuber 3 heures à 37 °C. - Vider les cupules et laver avec du tampon PBS. - Saturer les sites non spécifiques avec un tampon de saturation. - Laver trois fois avec du PBS-Tween.
3	- Ajouter 100 µL de la solution d' Ag correspondante, dans chaque cupule de la gamme et des essais.
4	- Incuber 1 heure à température ambiante. - Laver 3 fois avec du PBS-Tween.
5	- Ajouter 100 µL d' Ac marqué .
6	- Agiter et incuber 1 heure à 37 °C. - Laver et rincer 3 fois avec du PBS Tween.
7	- Ajouter 150 µL de substrat. - Incuber 15 minutes à 37 °C.
8	- Ajouter 50 µL de solution d'arrêt (NaOH à 1 mol·L ⁻¹).
9	- Mesurer l'absorbance à 405 nm.

Légende à utiliser pour les schémas :



DOCUMENT 7 : Courbe d'étalonnage du dosage immunoenzymatique de la pénicilline par la technique ELISA

A (pNP à 405 nm contre blanc réactif)



$\ln(\rho \text{ (pénicilline ; solution étalon) (mg·L}^{-1}\text{)})$

Tableau de correspondance entre les grandeurs $\ln(\rho \text{ (pénicilline ; solution étalon) (mg·L}^{-1}\text{)})$ et $\rho \text{ (pénicilline ; solution étalon) (mg·L}^{-1}\text{)}$

$\ln(\rho \text{ (pénicilline ; solution étalon) (mg·L}^{-1}\text{)})$	$\rho \text{ (pénicilline ; solution étalon) (mg·L}^{-1}\text{)}$	$\ln(\rho \text{ (pénicilline ; solution étalon) (mg·L}^{-1}\text{)})$	$\rho \text{ (pénicilline ; solution étalon) (mg·L}^{-1}\text{)}$	$\ln(\rho \text{ (pénicilline ; solution étalon) (mg·L}^{-1}\text{)})$	$\rho \text{ (pénicilline ; solution étalon) (mg·L}^{-1}\text{)}$
1,0	2,72	3,2	24,53	5,4	221,41
1,2	3,32	3,4	29,96	5,6	270,43
1,4	4,06	3,6	36,60	5,8	330,30
1,6	4,95	3,8	44,70	6,0	403,43
1,8	6,05	4,0	54,60	6,2	492,75
2,0	7,39	4,2	66,69	6,4	601,85
2,2	9,03	4,4	81,45	6,6	735,10
2,4	11,02	4,6	99,48	6,8	897,85
2,6	13,46	4,8	121,51	7,0	1096,63
2,8	16,44	5,0	148,41	7,2	1339,43
3,0	20,09	5,2	181,27	7,4	1635,98