

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : STL
Spécialité biotechnologies

SESSION 2019

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 tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialités :

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

SESSION 2019

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 tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

Ce sujet comporte **7** pages.

Partie 1 : pages 2 à 3

Partie 2 : pages 4 à 7

Les 2 parties sont indépendantes.

Le favisme

Le favisme est une maladie génétique consécutive au déficit d'une enzyme, la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Les malades atteints de favisme présentent une anémie hémolytique grave.

Partie 1 : étude de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (8 points)

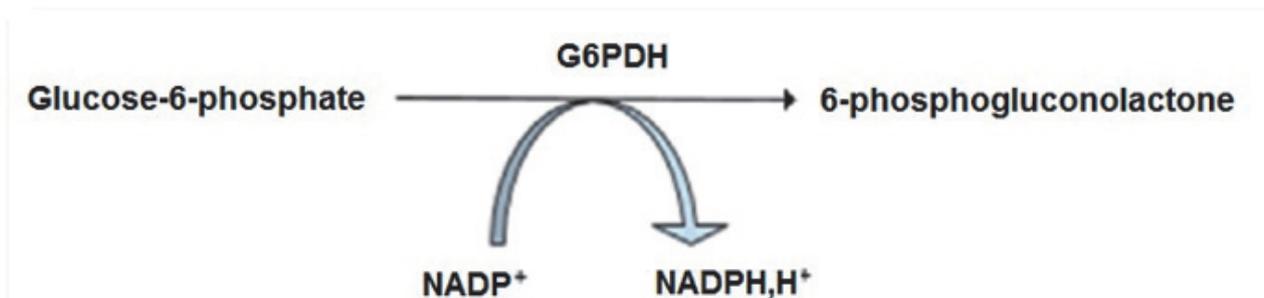
L'objectif de cette partie est d'étudier la protéine G6PDH et son rôle dans les mécanismes de protection contre certaines molécules toxiques.

La glucose-6-phosphate déshydrogénase est une enzyme composée de 515 acides aminés dont certains sont représentés dans le **document A**.

- 1.1. Proposer une définition du terme enzyme.
- 1.2. Donner la formule générale d'un acide α -aminé.
- 1.3. Recopier sur la copie la formule de l'isoleucine. Localiser et nommer les fonctions caractéristiques de cet acide aminé.
- 1.4. Identifier le (les) atome(s) de carbone asymétrique(s) sur la molécule d'isoleucine.
- 1.5. Préciser le nom de la liaison caractéristique entre deux acides aminés au sein de la structure primaire de l'enzyme.

La glucose-6-phosphate déshydrogénase catalyse la réaction d'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone.

Cette réaction permet la production du cofacteur NADPH, H^+ à partir de NADP^+ .

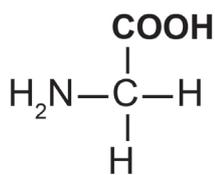


Le NADPH, H^+ est utilisé dans les mécanismes de protection cellulaire contre certaines molécules toxiques. La détoxification fait intervenir le couple oxydant/réducteur suivant : glutathion oxydé/glutathion réduit.

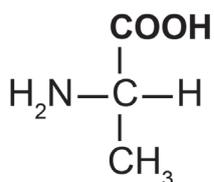
Les deux couples d'oxydoréduction sont décrits dans le **document B**.

- 1.6. Écrire la demi-équation électronique correspondant au couple $\text{NADP}^+ / \text{NADPH, H}^+$.
- 1.7. À l'aide des potentiels standard d'oxydoréduction, prévoir, en l'argumentant, le sens favorisé de la transformation mettant en jeu les deux couples.
- 1.8. Écrire l'équation associée à cette transformation.

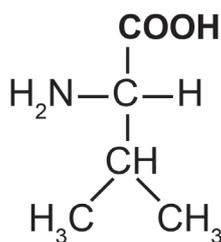
Document A : formules de certains acides α -aminés



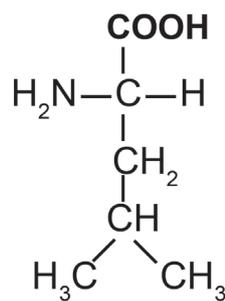
Glycine



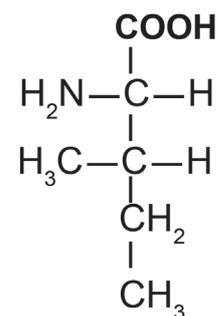
Alanine



Valine



Leucine



Isoleucine

Source : Unnumbered figure pg57 Principles of Biochemistry, 4/e © 2006 Pearson Prentice Hall, inc.

Document B : potentiel standard d'oxydoréduction en conditions physiologiques des deux couples d'oxydoréduction impliqués dans la détoxication

Couples d'oxydoréduction	Demi-équation électronique	E°' (V)
NADP ⁺ / NADPH,H ⁺		- 0,32
C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂ / C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S glutathion oxydé/glutathion réduit	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂ + 2 H ⁺ + 2 e ⁻ = 2 C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	- 0,23

Partie 2 : étude d'une famille atteinte de favisme (12 points)

L'objectif de cette partie consiste à étudier l'origine génétique du déficit en glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), ainsi que la transmission et le diagnostic du favisme.

Le **document C** représente une portion de la séquence du brin non transcrit de l'allèle de référence de la G6PDH et de l'allèle muté.

L'allèle de référence de la protéine G6PDH comporte 1545 nucléotides alors que l'allèle muté en présente 1536.

- 2.1. Montrer que la mutation est une délétion et préciser le nombre de nucléotides concernés par celle-ci.
- 2.2. Écrire, à l'aide du **document de référence**, les séquences d'ARN messager produites par la transcription de ces deux extraits de séquences.
- 2.3. En déduire, à l'aide du **document de référence**, les séquences protéiques correspondantes.
- 2.4. Émettre une hypothèse sur une conséquence possible de la mutation du gène codant la G6PDH.

L'arbre généalogique d'une famille atteinte de favisme est présenté dans le **document D**.

- 2.5. Argumenter l'affirmation suivante : « le favisme est une maladie génétique récessive ».
- 2.6. Proposer un argument en accord avec l'information complémentaire : « le favisme est une maladie gonosomique portée par le chromosome X ».
- 2.7. Donner les génotypes des individus II.1, II.2, II.3 et III.2 en utilisant la nomenclature suivante : m pour l'allèle muté impliqué dans la maladie et S pour l'allèle non muté.
- 2.8. À l'aide d'un tableau de croisement, calculer la probabilité que l'enfant III.6 soit atteint de favisme.

Plusieurs techniques permettent de diagnostiquer le favisme. La plus courante repose sur une étude hématologique qui montre, chez les patients atteints, une anémie sévère et la présence des corps de Heinz dans les globules rouges. En effet, en l'absence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), les molécules toxiques s'accumulent dans les globules rouges et conduisent à la formation de corps de Heinz. Lorsque cette accumulation devient trop importante, les globules rouges subissent une hémolyse, engendrant une anémie hémolytique. La coloration au bleu de crésyl brillant permet de mettre en évidence, au microscope photonique, la présence des corps de Heinz dans les globules rouges.

Le **document E** présente les résultats du diagnostic hématologique de l'homme III.5.

- 2.9. Analyser les résultats du **document E** afin de confirmer la maladie de l'individu III.5.

Une autre technique de diagnostic repose sur une électrophorèse qui consiste à mettre en évidence la présence ou l'absence de la protéine G6PDH dans les globules rouges.

Le **document F** donne les résultats du diagnostic moléculaire de la femme III.4.

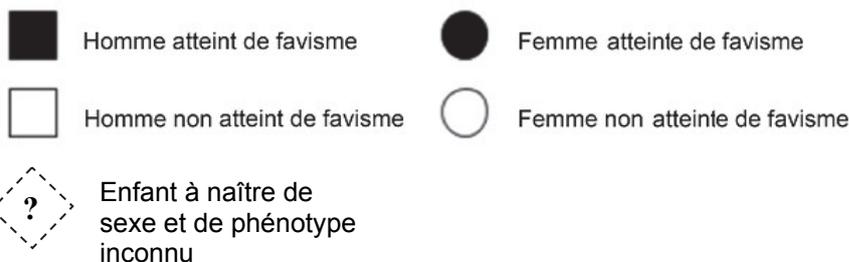
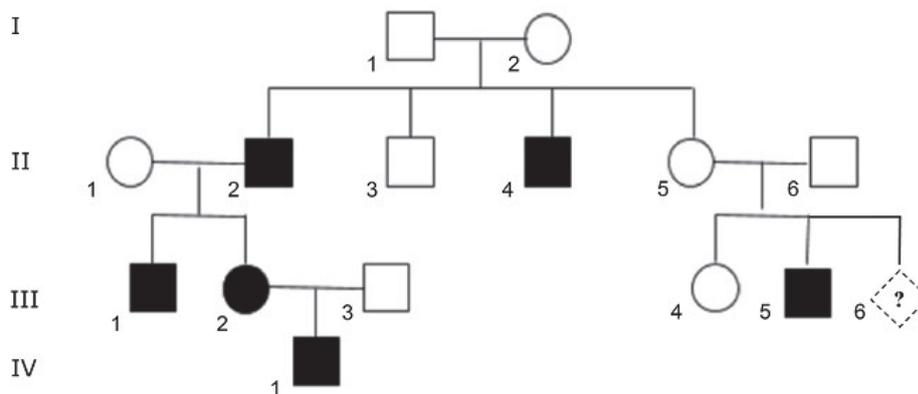
- 2.10. Analyser le **document F** pour établir le génotype de la femme III.4.
- 2.11. Expliquer l'intérêt de la technique présentée dans le **document F** pour cette femme appartenant à une famille à risque et souhaitant avoir des enfants.

Document C : extraits des séquences de brins d'ADN non transcrits du gène de la G6PDH

Gène	Extraits de séquence du brin non transcrit
G6PDH de référence	5'..GGT GCA TCG GGT GAC CTG GCC AAG AAG AAG ATC TAC..3'
G6PDH muté	5'..GGT GAC CTG GCC AAG AAG AAG ATC TAC..3'

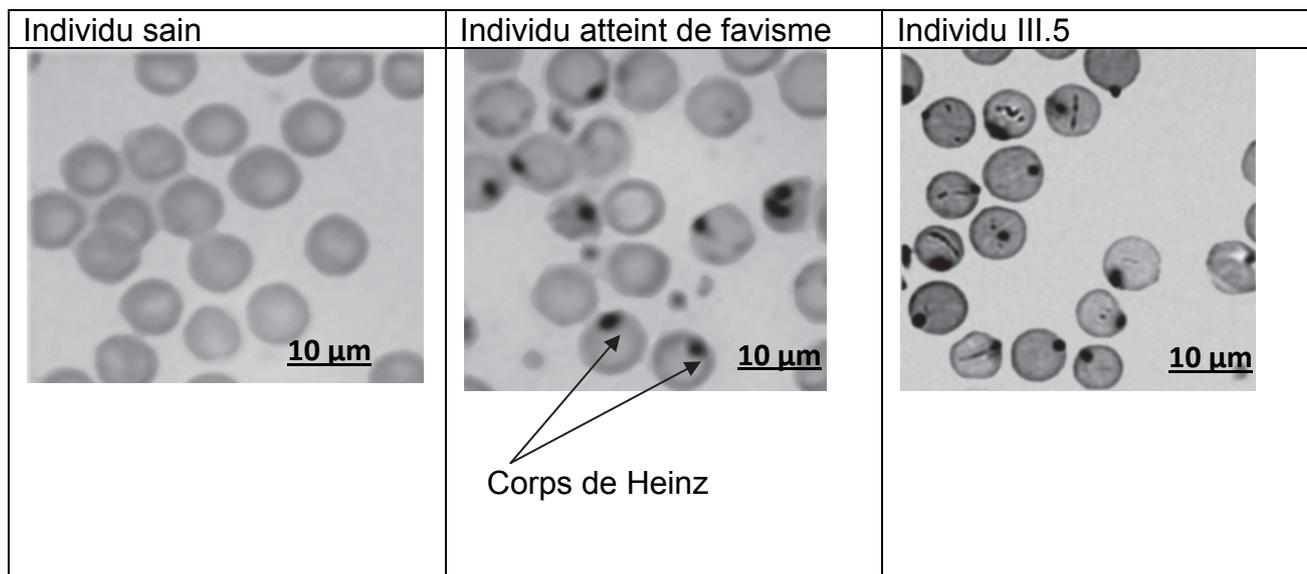
D'après : www.ebi.ac.uk/ena

Document D : arbre généalogique d'une famille atteinte de favisme



Document E : résultats du diagnostic hématologique de l'individu III.5

Résultats d'un frottis sanguin coloré au bleu de crésyl brillant chez trois individus



<https://www.jle.com/fr/revues/>
http://prepas.lavoisier.fr/BCPST/bonus/chapitre3/chap3_fig24.jpg

Résultats de l'hémogramme de l'individu III.5

	Valeurs mesurées	Valeurs de référence	Anomalies physiologiques liées à des valeurs mesurées	
			inférieures aux valeurs de référence	supérieures aux valeurs de référence
Nombre d'hématies par litre	$4,2 \cdot 10^{12}$	$4,5 \cdot 10^{12}$ à $6 \cdot 10^{12}$	Érythropénie	Polyglobulie
Concentration massique en hémoglobine ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	87	130 à 170	Anémie	Anomalies multiples
Nombre de leucocytes par litre	$8,7 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$ à $10 \cdot 10^9$	Leucopénie	Leucocytose
Nombre de plaquettes par litre	$320 \cdot 10^9$	$150 \cdot 10^9$ à $400 \cdot 10^9$	Thrombopénie	Thrombocytose

Document F : résultats du diagnostic moléculaire de l'individu III.4

L'électrophorèse est une technique de séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire sous l'effet d'un champ électrique. Cette technique est utilisée ici pour mettre en évidence de façon spécifique la présence ou l'absence dans les globules rouges de l'enzyme G6PDH de référence et de celle issue de l'expression de l'allèle muté.

Sens de migration

Ligne de dépôt

1. tampon utilisé pour les dépôts
2. échantillon contenant de la G6PDH de référence
3. échantillon contenant de la G6PDH mutée
4. échantillon contenant les protéines des globules rouges de l'individu III.4

Document de référence : tableau du code génétique

		2 ^{ème} nucléotide									
		U		C		A		G			
1 ^{er} nucléotide	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U	
		UUC	Phe	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	

3^{ème} nucléotide

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2019

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 tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

Ce sujet comporte 9 pages.

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

UNE ENZYME EXTRAITE DES FONDS MARINS POUR PIÉGER LE CO₂ DE DÉCHETS INDUSTRIELS

Pour capter le CO₂ rejeté dans les fumées industrielles, les chercheurs proposent d'utiliser une enzyme thermorésistante issue d'une bactérie vivant à proximité de cheminées volcaniques sous-marines : *Thiomicrospira crunogena*.

Cette enzyme, l'anhydrase carbonique (AC), catalyse la réaction entre le CO₂ et l'eau pour produire des ions monohydrogénéocarbonates (HCO₃⁻) ce qui permet de limiter l'effet de serre dû au CO₂, en le consommant.



Un laboratoire envisage de produire cette enzyme. Pour cela, la séquence du gène codant l'anhydrase carbonique a été extraite du génome de la bactérie thermorésistante et amplifiée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Pour mettre au point le processus de fabrication, les chercheurs vont successivement :

- transformer une souche d'*Escherichia coli* avec un plasmide recombiné par le gène codant l'anhydrase carbonique ;
- étudier les conditions nécessaires à la croissance de la souche recombinée ;
- procéder à une purification de la protéine produite.

1. VÉRIFICATION DE LA CONSTRUCTION DU PLASMIDE RECOMBINÉ PAR L'ANHYDRASE CARBONIQUE DE *THIOMICROSPIRA CRUNOGENA*

Afin de produire l'anhydrase carbonique thermorésistante de *Thiomicrospira crunogena*, le laboratoire procède en deux étapes :

- le gène d'une taille de 420 paires de bases codant l'anhydrase carbonique est inséré dans le plasmide « pBL 21 » au niveau du site *EcoRI*. En raison des conditions expérimentales utilisées, ce site n'est plus présent après l'insertion du gène.
- le plasmide recombiné obtenu, noté « pBL 21-AC », est ensuite introduit par transformation bactérienne dans une souche d'*E. coli* sensible à l'ampicilline. Les bactéries sont alors mises en culture sur un milieu contenant de l'ampicilline.

Le **document 1** présente la carte simplifiée du plasmide « pBL 21 » non recombiné.

Q1. Estimer la taille et schématiser la carte du plasmide recombiné « pBL 21-AC » en reprenant les éléments du document 1.

Q2. Expliquer l'intérêt d'utiliser une souche d'*E. coli* sensible à l'ampicilline pour la transformation avec ce plasmide.

Placé sous le contrôle d'un promoteur, le gène rapporteur code la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*), protéine qui émet une fluorescence lorsqu'elle est excitée par des UV. Après une mise en culture de 24 heures à 37 °C des bactéries transformées, on observe des colonies fluorescentes et des colonies non fluorescentes.

Q3. Expliquer pourquoi les colonies non fluorescentes correspondent aux bactéries qui ont intégré le plasmide recombiné.

Le laboratoire veut vérifier la construction du plasmide recombiné « pBL 21-AC » introduit dans *E. coli*. Pour cela, le plasmide est extrait à partir de colonies non fluorescentes, puis il subit différentes digestions enzymatiques suivies d'une électrophorèse sur gel d'agarose des produits obtenus.

Le **document 2** présente les résultats de la migration électrophorétique après coupure du plasmide par les enzymes de restriction suivantes : *Bam*HI, *Hind*III et par le mélange *Bam*HI + *Hind*III.

Q4. Estimer la taille des fragments d'ADN détectés sur l'électrophorégramme sur les pistes 2, 3 et 4. Montrer alors que le plasmide étudié est bien « pBL 21-AC ».

2. CHOIX DES CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE DE LA SOUCHE RECOMBINÉE

La souche recombinée doit être produite en grande quantité. Pour cela, deux conditions de culture sont testées :

- dans un bouillon nutritif ordinaire, noté BN ;
- dans un bouillon nutritif sous atmosphère enrichie en CO₂, noté BN + CO₂.

La culture est réalisée en milieu non renouvelé à 37 °C.

Le **document 3** présente les courbes de l'évolution du pH et les courbes de croissance de la souche transformée pour ces deux conditions.

Q5. Comparer l'évolution du pH dans le milieu ensemencé par la souche recombinée pour chacune des conditions expérimentales et expliquer la différence observée à l'aide de l'équation de la réaction catalysée par l'enzyme.

Q6. Déterminer pour chacune des conditions expérimentales :

- la vitesse spécifique de croissance de la souche transformée en phase exponentielle, μ_{expo} , exprimée en min⁻¹ ;
- le temps de génération *G* de la souche transformée, exprimé en min.

Q7. Proposer une hypothèse permettant d'expliquer la différence observée sur la vitesse spécifique de croissance de la souche recombinée.

Q8. Argumenter le choix de la condition de culture la plus adaptée à la croissance de la souche recombinée.

3. EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ANHYDRASE CARBONIQUE (AC) PRODUITE PAR LA SOUCHE D'*ESCHERICHIA COLI* RECOMBINÉE

Lors de la culture de la souche recombinée, l'anhydrase carbonique est exprimée. Elle est ensuite extraite et purifiée selon la méthode décrite dans le **document 4**.

Q9. Expliquer pourquoi cette méthode de purification permet de récupérer uniquement l'anhydrase carbonique à partir du surnageant.

Afin d'évaluer la qualité de la purification, une détermination de l'activité catalytique de l'anhydrase carbonique est mise en place dans les fractions de surnageant et d'éluat. Les résultats sont présentés dans le **document 5**.

Q10. À l'aide du mode opératoire, montrer que la méthode utilisée pour mesurer l'activité catalytique de l'anhydrase carbonique est une méthode cinétique en deux points.

Le **document 6** présente les données et équations aux grandeurs utilisées pour le suivi de purification.

Q11. Établir l'équation aux valeurs numériques permettant de calculer l'activité enzymatique de l'anhydrase carbonique dans chaque échantillon, notée $z_{(AC ; \text{échantillon})}$, exprimée en katal.

Q12. Établir les équations aux grandeurs et aux unités permettant de calculer les activités spécifiques $z_{sp} (AC ; \text{échantillon})$ dans le surnageant et l'éluat.

Q13. Vérifier, par le calcul, que les activités spécifiques dans le surnageant et l'éluat sont :

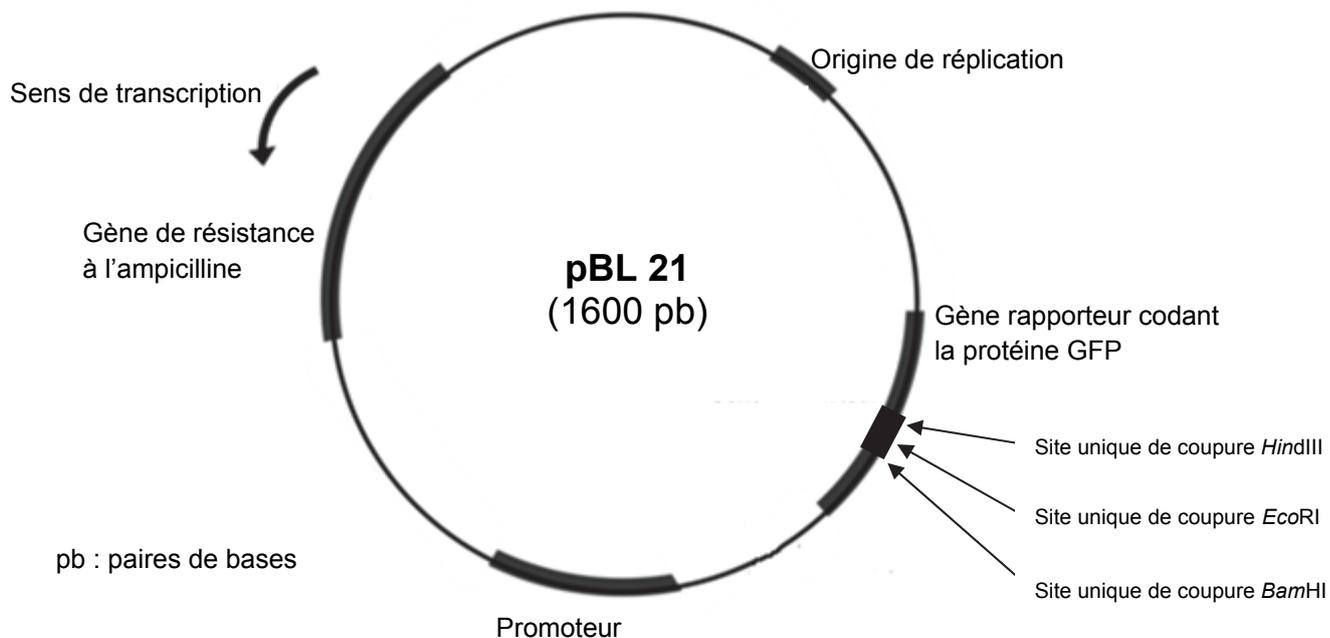
- $z_{sp} (AC ; \text{surnageant}) = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{mg}^{-1}$;
- $z_{sp} (AC ; \text{éluat}) = 6,2 \cdot 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Q14. Calculer le facteur d'enrichissement et conclure sur la qualité de cette étape de purification de l'anhydrase carbonique.

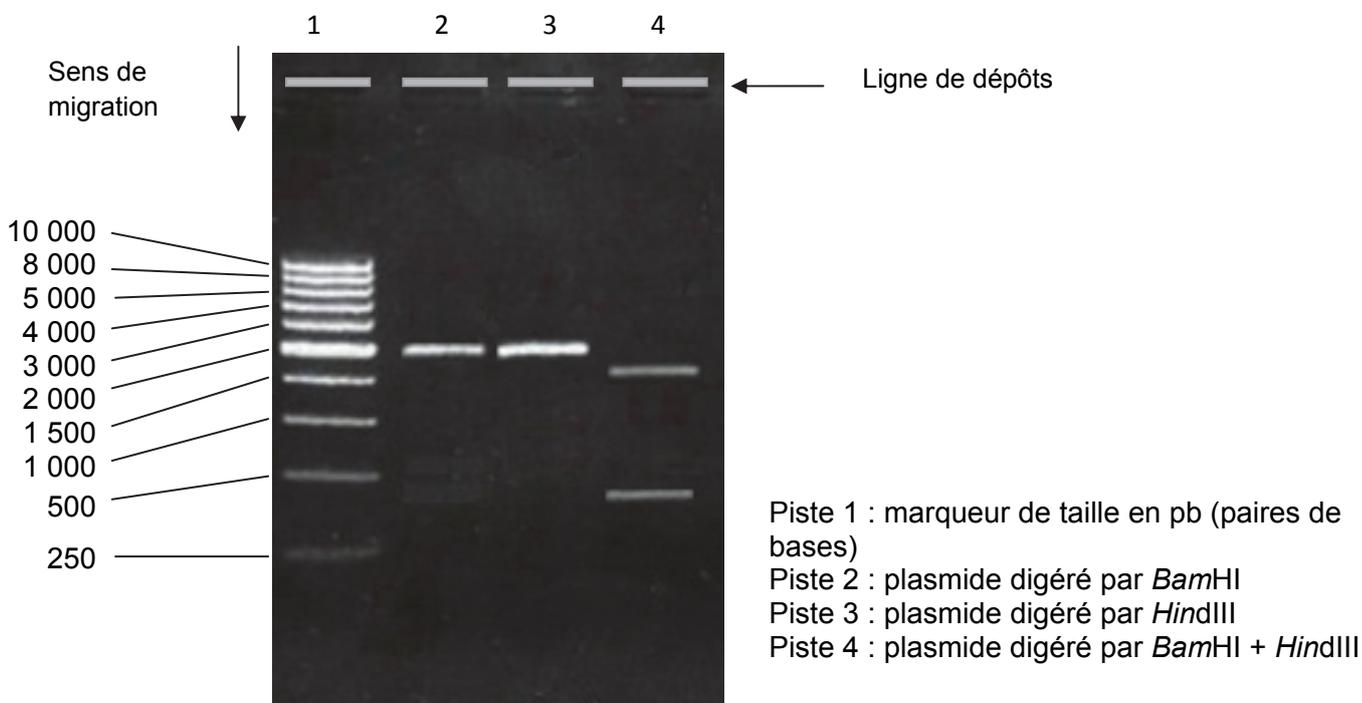
SYNTHÈSE

Q15. Réaliser un organigramme qui récapitule les différentes étapes et les conditions opératoires optimales permettant d'obtenir de l'anhydrase carbonique.

DOCUMENT 1 : carte simplifiée du plasmide pBL 21.

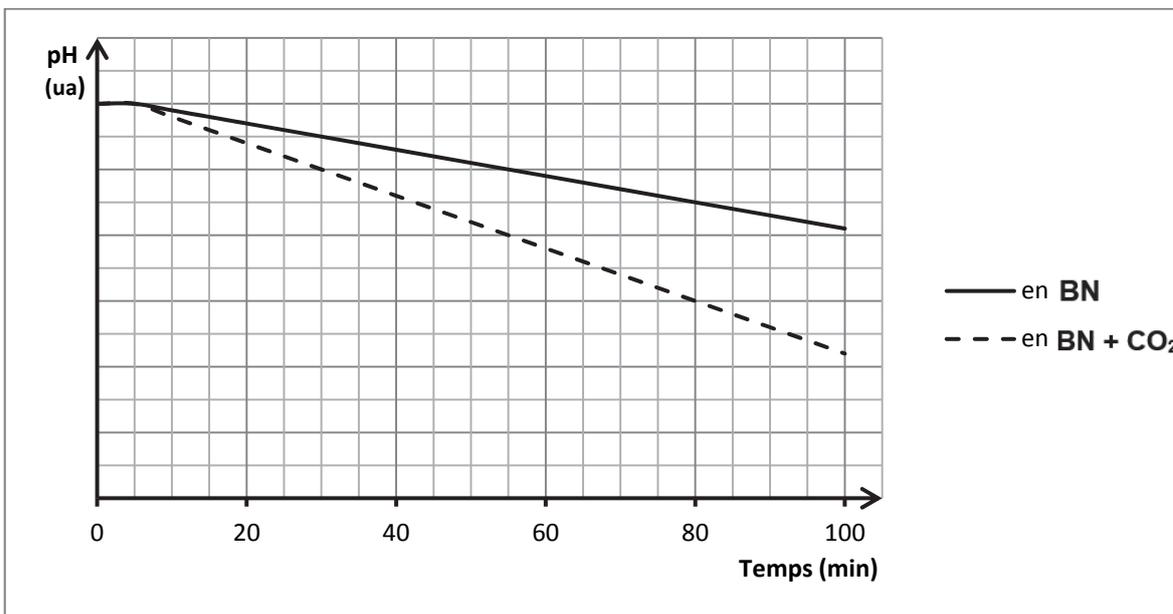


DOCUMENT 2 : électrophorégramme obtenu après digestion enzymatique du plasmide extrait de colonies non fluorescentes.



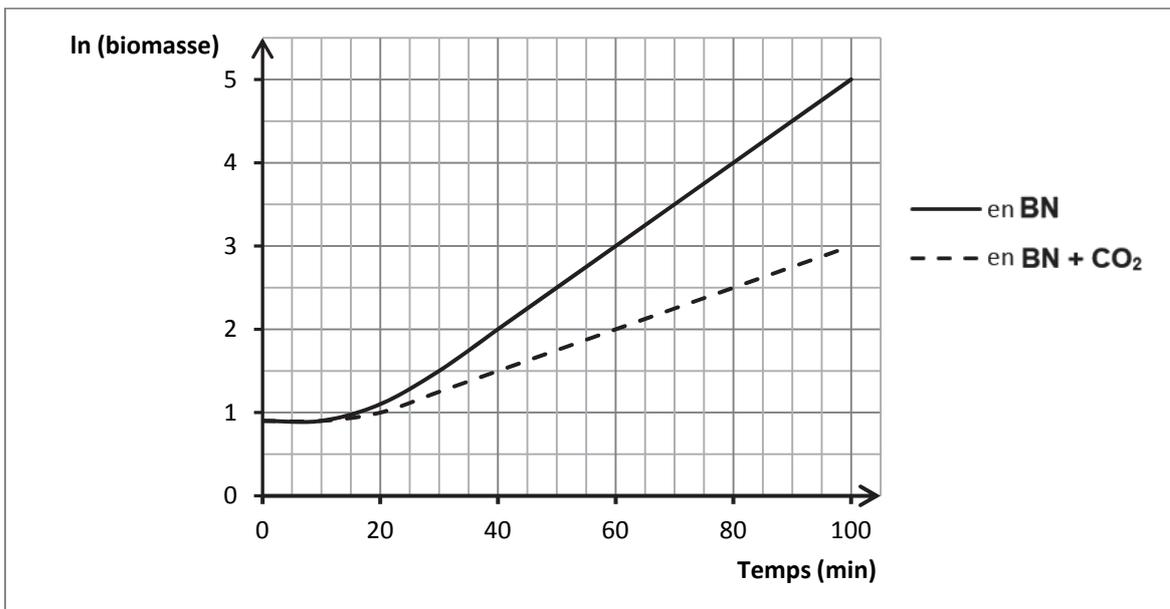
DOCUMENT 3 : cinétique d'évolution du pH et de la biomasse.

Évolution du pH du milieu, à 37 °C, avec et sans apport de CO₂



ua : unité arbitraire

Courbes de croissance de la souche transformée à 37 °C, avec et sans apport de CO₂



DOCUMENT 4 : purification de l'anhydrase carbonique.

Protocole d'extraction et de purification de l'anhydrase carbonique

Extraction de l'anhydrase carbonique

L'extraction de l'anhydrase carbonique se fait par lyse bactérienne :

- la culture de la souche d'*E. coli* modifiée est mise en suspension dans un tampon phosphate $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,8 contenant du lysozyme.

- l'ensemble est incubé 30 min à 37°C puis centrifugé 2 heures à $100\,000 \text{ g}$.

Le surnageant est conservé.

Purification de l'anhydrase carbonique par chromatographie d'affinité anticorps-antigène

La purification de l'anhydrase carbonique à partir du surnageant est réalisée en 3 étapes :

- la fixation ;

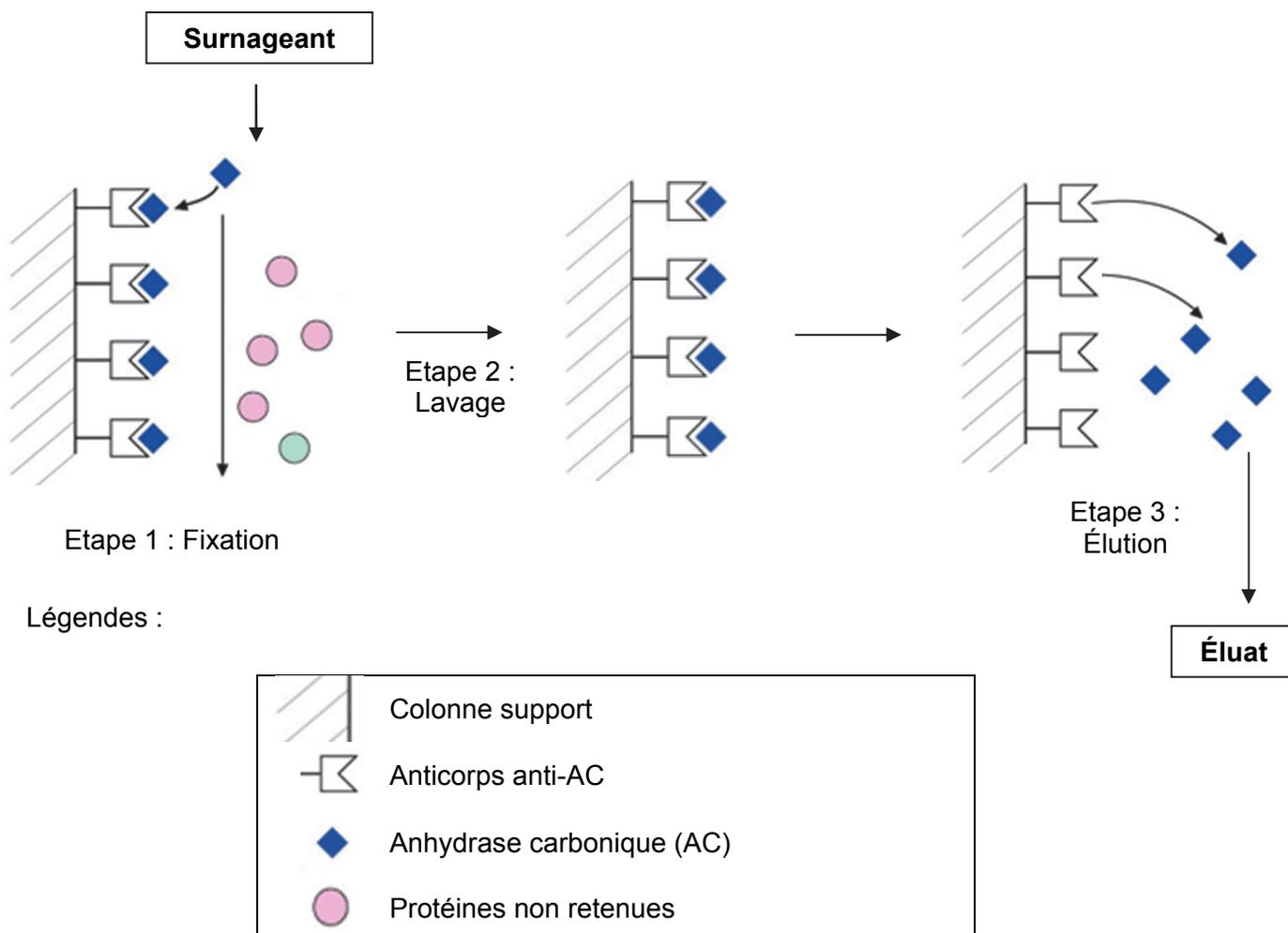
- le lavage ;

- l'éluion.

L'éluat est ainsi obtenu.

Schéma des étapes de purification de l'AC par chromatographie d'affinité

Les anticorps anti-anhydrase carbonique (anticorps anti-AC) sont fixés par covalence à un support : l'ensemble forme la phase stationnaire.



DOCUMENT 5 : détermination de l'activité enzymatique de l'anhydrase carbonique.

L'anhydrase carbonique est dosée par méthode spectrophotométrique en présence de rouge de métacrésol à 578 nm. La variation d'absorbance est mesurée après exactement 5 minutes de réaction catalysée par l'enzyme. Cette variation d'absorbance est proportionnelle à la concentration en ions H⁺ libérés au cours de la réaction.

	Surnageant	Éluat
Volume de prise d'essai de fraction (mL)	0,2	0,2
Volume de réactif au rouge de métacrésol (mL)	2,5	2,5
$\Delta A_{578 \text{ nm}}$ (pour $\Delta t = 5 \text{ min}$)	0,220	0,440

DOCUMENT 6 : suivi de la purification de l'anhydrase carbonique par chromatographie d'affinité.

Fraction	Surnageant	Éluat
Volume total de fraction (mL)	7	1
Masse totale de protéines (mg)	33	2

Activité enzymatique dans l'échantillon

Équation aux grandeurs permettant de calculer l'activité enzymatique $z_{(AC; \text{échantillon})}$ en katal dans les conditions du dosage :

$$z_{(AC; \text{échantillon})} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times 1,69 \times \frac{V_{\text{total fraction}}}{V_{\text{prise d'essai fraction}}}$$

Donnée : une activité enzymatique exprimée en katal correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer une mole de substrat par seconde.

Activité spécifique

L'activité spécifique $z_{sp (AC; \text{échantillon})}$ est l'activité enzymatique ramenée à la masse de protéines totales dans l'échantillon.

Enrichissement

L'enrichissement d'une préparation de protéines est exprimé par le rapport de l'activité spécifique après purification par rapport à l'étape précédente.

Équation aux grandeurs permettant de calculer l'enrichissement :

$$\text{Enrichissement} = \frac{z_{sp (AC; \text{éluat})}}{z_{sp (AC; \text{surnageant})}}$$

Donnée : l'étape de chromatographie est jugée satisfaisante si l'enrichissement est supérieur à 4.