

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

ÉPREUVE D'ENSEIGNEMENT DE SPÉCIALITÉ

SESSION 2023

SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE

Biochimie, Biologie et Biotechnologies

Durée de l'épreuve : **3 heures**

*L'usage de la calculatrice avec mode examen actif est autorisé.
L'usage de la calculatrice sans mémoire, « type collègue » est autorisé.*

Dès que ce document vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce document comporte 10 pages numérotées de 1/10 à 10/10.

COMPÉTENCES ÉVALUÉES					
C1	C2	C3	C4	C5	C6
Analyser un document	Effectuer des calculs	Interpréter des données	Argumenter un choix technique	Élaborer une synthèse	Communiquer à l'écrit
3 points	3 points	4 points	4 points	5 points	1 point

AMÉLIORATION DE MICROALGUES POUR L'ÉLABORATION D'UN COMPLÉMENT ALIMENTAIRE LIPIDIQUE

Les microalgues sont des microorganismes souvent utilisés en milieu agroalimentaire et industriel. En effet, les microalgues sont faciles à cultiver et produisent des quantités importantes de lipides. Chez certaines microalgues, ces lipides sont riches en acides gras polyinsaturés à très longue chaîne, d'intérêt majeur pour la santé humaine et la santé animale.

Partie I - Questionnement scientifique et technologique (durée indicative 2 h 30)

Un laboratoire cherche à faire évoluer de manière naturelle des microalgues du genre *Tisochrysis lutea* afin d'obtenir une souche ultraproductrice de lipides qui servira de base dans la composition d'un nouveau complément alimentaire.

Pour cela, le laboratoire met en œuvre une étude en trois étapes :

- obtention de mutants par pression de sélection continue ;
- suivi de croissance des microalgues sauvages et mutées ;
- production de lipides dans le but de fabriquer un complément alimentaire riche en lipides.

1. OBTENTION DE MICROALGUES MUTÉES PAR PRESSION DE SÉLECTION CONTINUE

L'obtention de mutants par pression de sélection continue vise à produire des souches d'intérêt sans modification artificielle du génome : elle repose sur le principe de sélection naturelle mis en évidence par Darwin.

Le **document 1** présente le principe d'obtention de mutants par pression de sélection ainsi que les résultats obtenus dans deux conditions expérimentales.

Q1. (C1) Analyser les résultats pour montrer que les conditions de culture 1 et 2 impactent la croissance de la microalgue.

Q2. (C4) Argumenter le choix de la condition 2 de culture pour sélectionner une microalgue qui s'est adaptée à son environnement.

Le séquençage du génome de la souche de microalgue obtenue dans la condition 2 a permis de mettre en évidence une mutation par substitution nucléotidiques sur le gène codant une enzyme nommée β -cétoacyl-ACP réductase.

La β -cétoacyl-ACP réductase est impliquée dans la synthèse des acides gras. Le **document 2** présente la réaction catalysée par cette enzyme et les propriétés spectrales de son coenzyme.

La longueur d'onde choisie pour suivre la réaction enzymatique est de 340 nm.

Q3. (C4) Argumenter le choix de cette longueur d'onde.

Q4. (C3) Nommer le composé suivi et en déduire le sens de la variation de l'absorbance au cours de la réaction enzymatique.

Les structures spatiales des β -cétoacyl-ACP réductases des microalgues sauvages et mutées ont été déterminées. Le **document 3** présente les résultats obtenus.

Q5. (C1) Comparer les structures protéiques des deux enzymes.

Pour poursuivre l'étude, une comparaison des deux vitesses initiales maximales ($v_{i, \max}$) de réaction des deux enzymes est effectuée. Le **document 4** présente les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat permettant de déterminer $v_{i, \max}$.

Q6. (C1) Estimer la valeur de $v_{i, \max}$ pour chacune des deux enzymes étudiées.

Q7. (C3) Comparer les vitesses $v_{i, \max}$ des deux enzymes et conclure sur l'impact de la mutation sur le fonctionnement de cet enzyme.

Afin d'étudier les conséquences de cette mutation, l'activité catalytique de l'enzyme est déterminée pour la souche sauvage et la souche mutée. Les résultats sont fournis dans le **document 5**.

Q8. (C3) Analyser les résultats et en déduire la conséquence attendue sur la synthèse des lipides par la microalgue mutée.

Q9. (C5) Mettre en lien les analyses précédentes afin de proposer une hypothèse à la différence d'activité catalytique observée entre l'enzyme de la souche sauvage et de la souche mutante.

2. SUIVI DE CROISSANCE DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DE LA SOUCHE MUTÉE EN MILIEU NON RENOUVELÉ

Une fois l'étape de mutation de la microalgue par pression de sélection continue effectuée, les souches de *Tisochrysis lutea* sauvage et mutée sont cultivées en milieu non renouvelé afin de comparer les paramètres de croissance des deux souches. Les résultats de suivi de croissance sont présentés dans le **document 6**.

Q10. (C1) Identifier et délimiter les différentes phases de croissance pour la souche sauvage en précisant les temps de début et de fin de chaque phase.

Q11. (C3) Interpréter les résultats obtenus pour conclure sur la quantité de biomasse produite en phase stationnaire.

Q12. (C2) Calculer la vitesse spécifique de croissance spécifique μ_{expo} pour chacune des souches.

Q13. (C2) Déterminer le temps de génération pour la souche sauvage et la souche mutée.

Q14. (C4) À l'aide du rapport des biomasses produites et des temps de génération, expliquer si une des deux souches a une croissance plus avantageuse pour une production industrielle de microalgues.

3. COMPARAISON DE LA PRODUCTION DE LIPIDES DES DEUX SOUCHES

Les souches de *Trisochrysis lutea* sauvage et mutée sont récupérées puis centrifugées afin d'extraire et de doser les lipides qu'elles contiennent. Le **document 7** présente la procédure opératoire de mesure de la concentration en lipides extraits par méthode enzymatique. Les résultats obtenus à la suite de ce dosage sont rassemblés dans le **document 8**.

Q15. (C1) Identifier, dans la procédure opératoire, le volume de prise d'essai des échantillons à doser.

Q16. (C2) À l'aide de l'équation de la droite, démontrer l'équation suivante :

$$m_{\text{lipide}} = \frac{(A_{570\text{nm}} + 0,0062)}{3,5083}$$

Q17. (C2) Calculer la masse de lipides obtenue dans l'extrait de microalgues sauvages et dans l'extrait de microalgues mutées. En déduire la concentration en lipides de chaque extrait.

Q18. (C4) Comparer ces deux valeurs pour orienter le choix de la souche de microalgue à utiliser pour produire un complément alimentaire riche en lipides.

4. BILAN

Q19. (C5) Mettre en relation l'ensemble des réponses pour choisir la souche de microalgue la plus adaptée à la production d'un complément alimentaire riche en lipides.

Partie II – Question de synthèse (durée indicative 30 min)

Le **document 9** présente :

- Un article qui traite de l'utilisation des microalgues au niveau mondial ;
- La notion de brevet et ses limites pour les matières biologiques.

Q20. (C5) A partir des données de la partie I et du document 9, développer des arguments scientifiques et techniques sur lesquels peut s'appuyer le laboratoire afin de déposer un brevet pour l'algue *Trisochrysis lutea* mutée.

DOCUMENT 1 : Principe d'obtention de mutants de la microalgue *Tisochrysis lutea* par pression de sélection continue

D'après « Amélioration de microalgues à vocation énergétique par pression de sélection continue », thèse de H. Bonnefond, 2015.

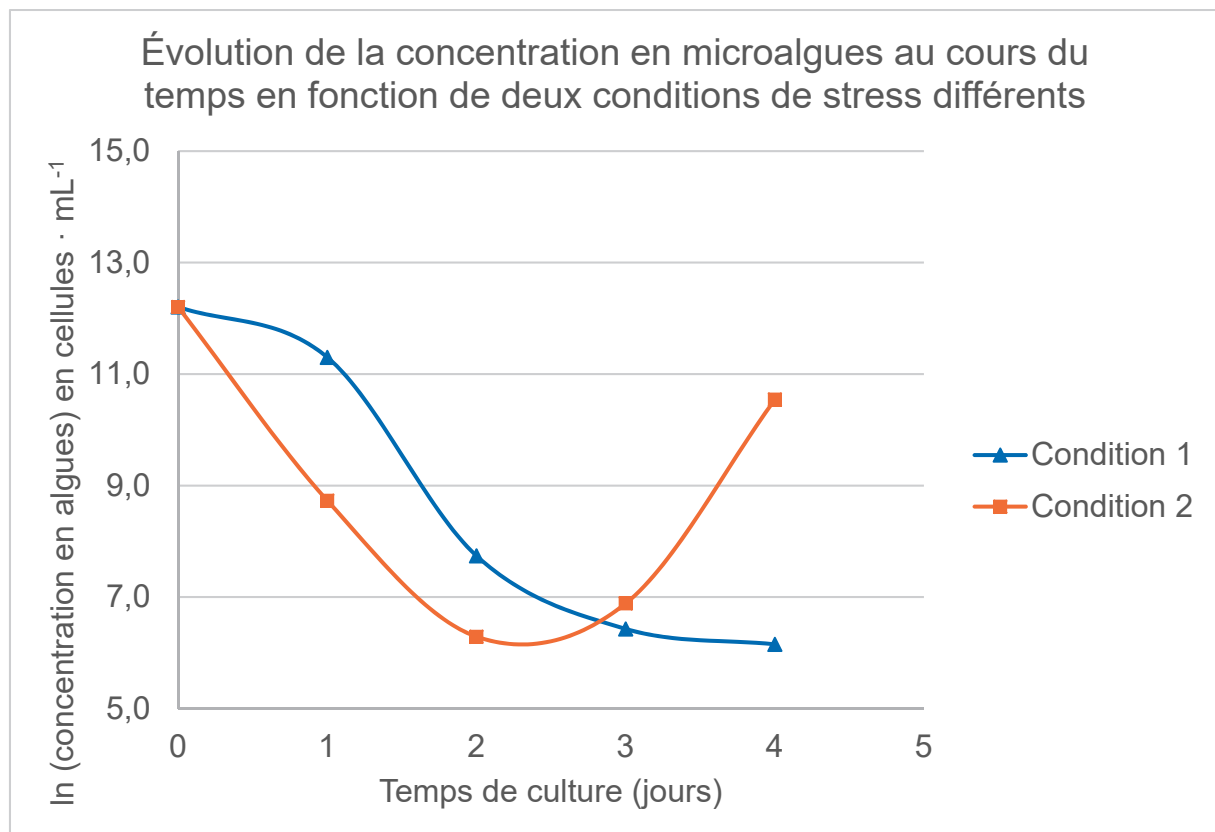
Selon le principe de la biologie de l'évolution, un organisme subissant un faible stress du fait d'un changement environnemental s'acclimate à ce stress par modification de son phénotype. À partir du moment où le stress dépasse les limites physiologiques de l'organisme, des mutations génétiques rares, aléatoires et spontanées permettent l'apparition d'individus plus aptes à résister et à proliférer dans ce nouvel environnement. Ces individus, plus performants dans ces nouvelles conditions environnementales, transmettent cette modification génétique à leur descendance.

Dans l'optique d'augmenter la capacité de la microalgue *Tisochrysis lutea* à stocker des ressources nutritives, une souche de microalgue *Tisochrysis lutea* a été cultivée dans deux conditions de stress différentes :

- condition 1 : un stress thermique en soumettant la culture à une température élevée ;
- condition 2 : un faible apport en azote.

Ces conditions sont connues pour limiter la croissance de cette microalgue.

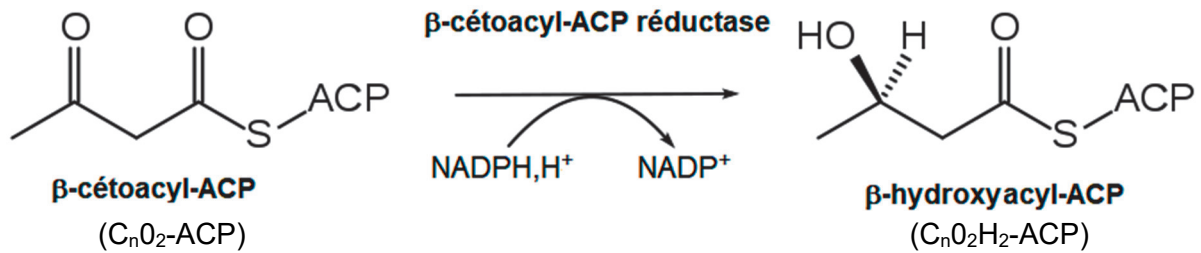
On détermine par dénombrement direct la concentration en algues dans chaque milieu. Les résultats obtenus sont les suivants :



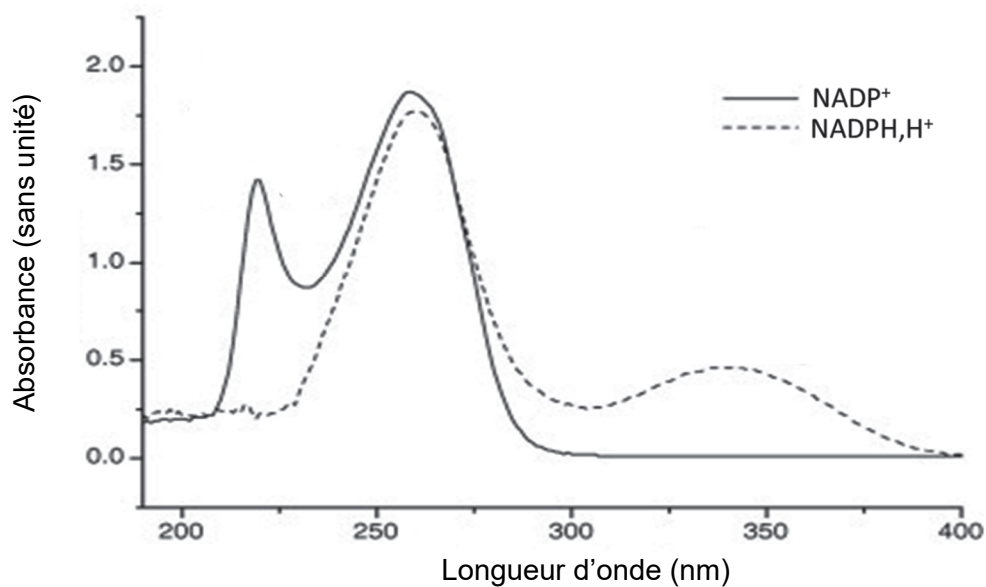
Donnée : La souche cultivée en condition optimale (sans stress) atteint ln (29,2) cellules · mL⁻¹ après 4 jours d'incubation.

DOCUMENT 2 : Réaction catalysée par la β -cétol-ACP réductase et propriétés spectrales de son coenzyme

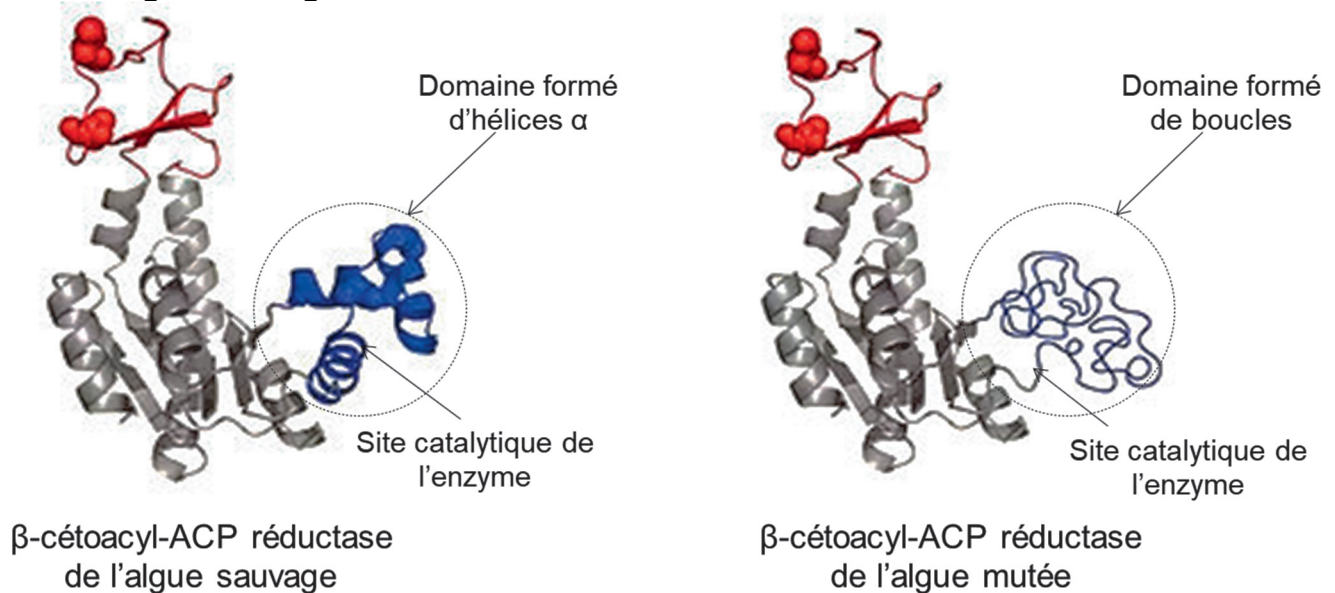
a - Réaction catalysée par la β -cétol-ACP réductase



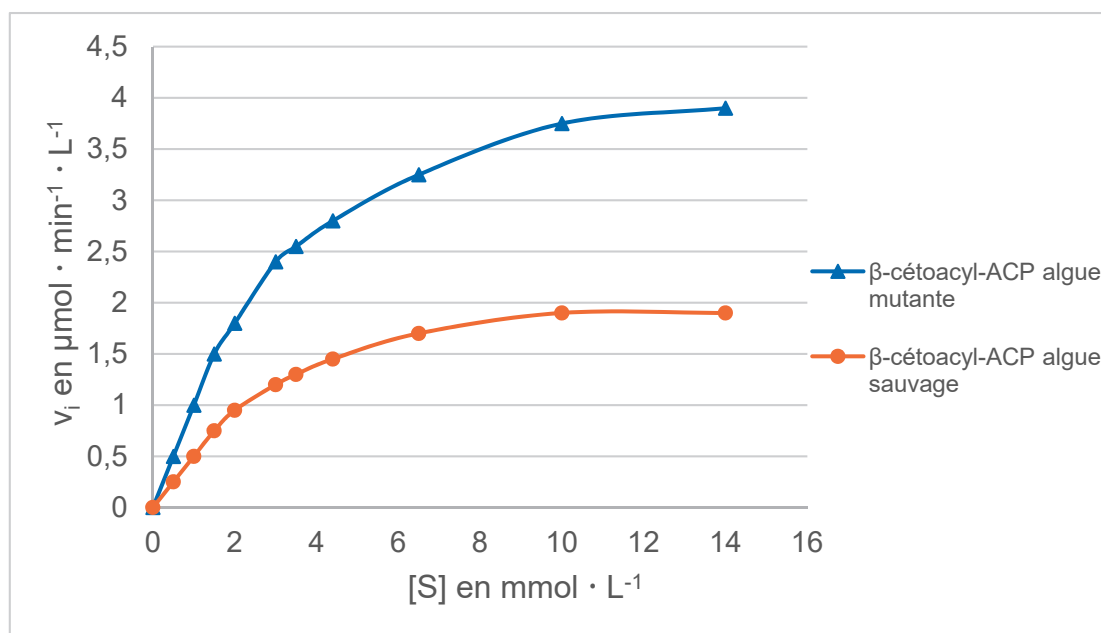
b - Spectres d'absorption du coenzyme sous formes réduite et oxydée



DOCUMENT 3 : Structure tridimensionnelle des β -cétol-ACP réductases extraites des microalgues sauvage et mutée



DOCUMENT 4 : Détermination de la vitesse initiale maximale de réaction ($v_{i, \max}$) des β -cétoacyl-ACP réductases extraites des microalgues sauvages et mutées



Représentation des courbes $v_i = f[S]$

DOCUMENT 5 : Comparaison de l'activité catalytique des β -cétoacyl-ACP réductases synthétisées par la microalgue sauvage et par la microalgue mutée

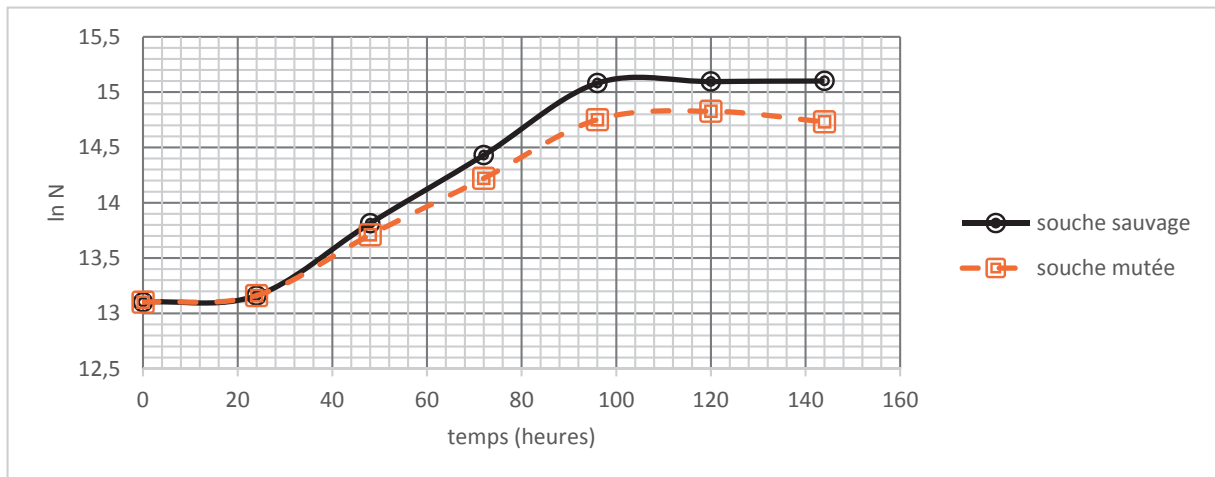
L'étude des deux β -cétoacyl-ACP réductases a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales à partir d'un extrait d'un milligramme de chaque souche d'algue.

L'activité catalytique mesurée dans le milieu réactionnel ($z_{(\text{réductase} ; v_{\text{MR}})}$) se rapportant à 1 mg de chaque souche d'algue est mesurée dans des conditions opératoires similaires pour les deux souches. Elle est exprimée en U par mg de microalgue.

$$z_{(\text{réductase} ; v_{\text{MR}})} = v_{i(\text{réductase})} \times V_{\text{MR}}$$

	Activité catalytique $z_{(\text{réductase} ; v_{\text{MR}})}$ (en U par mg de microalgue)
β -cétoacyl-ACP réductase extraite de l'algue sauvage	7
β -cétoacyl-ACP réductase extraite de l'algue mutée	16

DOCUMENT 6 : Résultats de suivi de croissance des microalgues en milieu non renouvelé



D'après « Allocation du carbone et métabolisme azoté chez l'haptophyte *Tisochrysis lutea* », thèse de M. Garnier, 2016.

Données :

Calcul de μ_{expo} :

$$\mu_{expo} = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

Calcul du temps de génération

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu_{expo}}$$

Définition du temps de génération : durée nécessaire au doublement de la population durant la phase exponentielle de croissance.

DOCUMENT 7 : Mesure de la concentration en lipides extraits par méthode enzymatique en point final

a - Réactifs

- Étalon acide palmitique à $10,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Mélange enzymatique
- Solution tampon
- 100 μL d'acides gras extraits de la souche de *Trisochrysis lutea* sauvage
- 100 μL d'acides gras extraits de la souche de *Trisochrysis lutea* mutée

b - Procédure opératoire

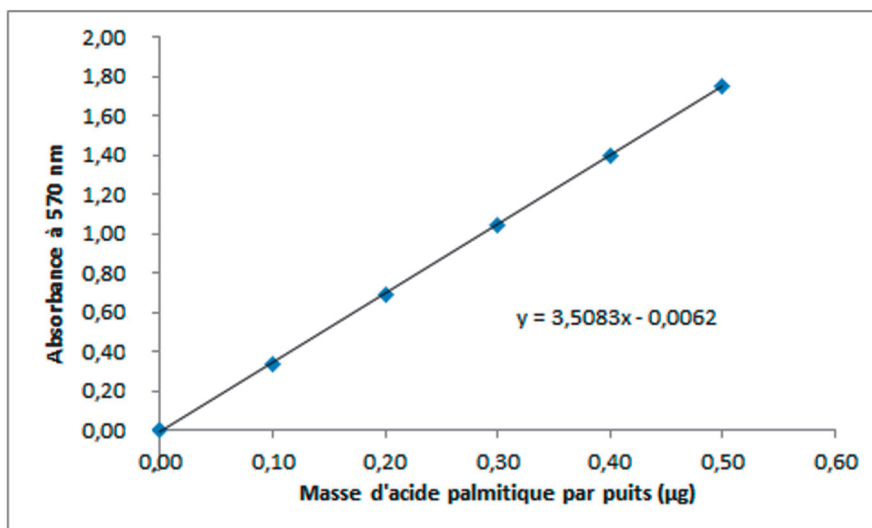
1. Préparation de la gamme d'étalonnage : Déposer 0, 10, 20, 30, 40, 50 μL de la solution étalon d'acide palmitique (à $10,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) dans 6 puits d'une microplaque. Ajuster à 50 μL par puits avec la solution tampon.
2. Préparation des échantillons : Déposer 50 μL de chaque extrait dans 2 puits différents. Les lipides contenus dans 50 μL d'extrait proviennent de 1 μg de microalgues.
3. Ajouter dans chaque puits (gamme d'étalonnage et échantillons) 50 μL du mélange enzymatique.
4. Agiter puis incuber 30 minutes à 37°C .
5. Mesurer l'absorbance à 570 nm contre le blanc réactif (premier puits).

DOCUMENT 8 : Résultats de mesure de la concentration en lipides

a - Gamme d'étalonnage

Dosage des lipides par méthode enzymatique

$$A_{570\text{nm}} = f(m_{\text{acide palmitique}})$$



b - Résultats obtenus pour les extraits de la souche sauvage et mutée

	Essai souche sauvage	Essai souche mutée
A à 570 nm	0,871	1,397

DOCUMENT 9 : Données sur la brevetabilité du vivant

a - Utilisation des microalgues à l'échelle mondiale

D'après d'un article du site m.actu-environnement : « Les microalgues au cœur du Green business »

Avec l'explosion des énergies renouvelables dans les années 2000, la production de biocarburant à partir de microalgues se retrouve sur le devant de la scène. Leur teneur élevée en lipides et leur forte productivité drainent plusieurs centaines de millions d'euros d'investissements depuis 2007 dans des sociétés développant des biocarburants dits de "3^e génération". Chez les microalgues, le rendement de la synthèse d'acides gras destinés à la production de biocarburants est en effet jusqu'à 250 fois plus élevé que chez le soja. Si le panel d'applications possibles à partir de ces organismes photosynthétiques est très large, peu d'analystes se sont penchés sur leur potentiel commercial. Seule une dizaine de microalgues est aujourd'hui sur le marché : spirulines, chlorelles et algues des genres *Cryptocodinium*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Ulkenia*. L'industrie les exploite sous forme de biomasse sèche (microalgue entière) ou d'extrait, dans des segments de marché aussi variés que l'alimentation humaine et animale, la cosmétique ou la recherche.

b - Brevetabilité d'une matière biologique

D'après ipside.com, brevetabilité des micro-algues

Un brevet est un titre de propriété qui protège une invention technique, c'est-à-dire qu'il confère à son détenteur le monopole d'exploitation de l'invention brevetée.

À la fin des années quatre-vingt-dix, la directive européenne 98/44 relative aux inventions biotechnologiques a autorisé la brevetabilité des matières biologiques.

Une matière biologique, qui peut être une souche de microorganisme, peut être brevetée si elle présente un intérêt industriel et si elle n'est pas déjà connue pour cela. Ceci inclut les organismes génétiquement modifiés par transfert de gènes ou par modification du génome, mais également ceux obtenus par mutagenèse aléatoire de la même façon que ceux préexistants à l'état naturel. En revanche, les organismes animaux et végétaux ne peuvent pas faire l'objet de brevets au sein de l'Union européenne.

Un brevet est donc possible pour un microorganisme, même lorsque celui-ci préexiste à l'état naturel, sous réserve qu'il n'ait pas été identifié jusqu'alors (critère de nouveauté) et qu'il participe à la résolution d'un problème d'ordre technique (il ne s'agit pas d'une simple découverte). Ainsi, par exemple, un microorganisme existant à l'état naturel et produisant un antibiotique serait brevetable.