Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV®.

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour consulter tous nos sujets d'annales et corrigés du Bac STL, veuillez visiter :
bacstl.fr/annales-sujets-et-corriges

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

ÉPREUVE D'ENSEIGNEMENT DE SPÉCIALITÉ

SESSION 2021

SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE

Biochimie, Biologie et Biotechnologies

Vendredi 10 septembre 2021

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 collège » est autorisé.

Dès que ce document vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce document comporte 21 pages numérotées de 1/21 à 21/21 :

- sujet 1 : page 3/21 à 12/21
- sujet 2 : page 13/21 à 21/21

.

Le candidat traite <u>au choix</u> un sujet parmi les deux sujets proposés.

Le candidat traite l'intégralité du sujet choisi et reporte le numéro du sujet choisi sur sa copie.

Parties du programme mobilisées dans chacun des sujets

L'évaluation s'effectue par compétences. La pondération des compétences est identique pour les deux sujets. Les compétences sont indiquées entre parenthèses au niveau de chaque question et mobilisent des concepts et savoir-faire indiqués dans les programmes.

Afin de faciliter le choix du sujet à traiter par le candidat, les parties essentielles mobilisées dans chacun des sujets sont indiquées ci-dessous.

SUJET 1 p 3/21 à 12/21

QUELQUES ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES ET DIAGNOSTIQUES DE LA PANDÉMIE DE COVID-19
S2.2 Réponse immunitaire innée S2.3 Réponse immunitaire adaptative T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR S3.1 Propriété et structure des acides nucléiques (Calcul de Tm) S1.7 Les enzymes du métabolisme et la régulation T8.1 Dosage d'un substrat par une méthode enzymatique en point final L1.2.4 Évaluation des résultats expérimentaux

OU

SUJET 2 p 13/21 à 21/21

DÉVELOPPEMENT D'UNE LESSIVE ÉCOLOGIQUE CONTENANT UNE PROTÉASE
S1.7 Les enzymes du métabolisme et la régulation T2.2 Modélisation de la croissance en milieu non renouvelé T7.1 Fractionnement d'un mélange hétérogène T7.3 Séparation des biomolécules par chromatographie d'exclusion moléculaire dans le but de les purifier T8.2 Dosage d'une activité enzymatique (z) et de sa concentration d'activité (b) T9.4 Clonage d'un fragment d'ADN L1.2.4 Évaluation des résultats expérimentaux

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

SUJET 1

QUELQUES ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES ET DIAGNOSTIQUES DE LA PANDÉMIE DE COVID-19

Le 9 janvier 2020, la découverte d'un nouveau coronavirus SARS-CoV-2 a été annoncée officiellement par les autorités sanitaires chinoises et l'Organisation mondiale de la santé. Le virus SARS-Cov2 est un virus à génome ARN ; il est l'agent responsable d'une nouvelle maladie infectieuse respiratoire appelée COVID-19.

La compréhension des mécanismes à l'origine de la pathologie et le développement des méthodes de diagnostic sont deux enjeux majeurs de la lutte contre la pandémie.

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

Ce sujet vise à expliciter l'intervention du système immunitaire de l'hôte suite à une infection par le SARS-CoV-2 et à étudier différentes méthodes de diagnostic de la maladie COVID-19.

Des éléments d'étude seront abordés à travers les différentes parties du sujet :
1. mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte lors d'une infection par le SARS-CoV-2 ;
2. diagnostic par qRT-PCR ;
3. dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) permettant de mettre en évidence certaines lésions d'organes.

1. MISE EN PLACE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE L'HÔTE LORS D'UNE INFECTION PAR LE SARS-COV-2

Une équipe australienne a publié en 2020 dans la revue *Nature Medicine* une étude mettant en évidence l'implication de certaines cellules du système immunitaire dans la lutte contre le virus SARS-CoV-2. Des résultats expérimentaux issus de cette étude sont présentés dans le **document 1**.

Q1. (C3) Relever les arguments permettant de montrer que les monocytes sont mobilisés lors d'une infection COVID-19.

Q2. (C3) Montrer que les LT CD4+ et les LT CD8+ sont impliqués dans la réponse dirigée contre le SARS-Cov2.

Le **document 2** présente la phase effectrice de la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire.

Q3. (C4) Expliquer le mécanisme de la réaction immunitaire adaptative à médiation cellulaire et en présenter l'intérêt dans la lutte antivirale.

L'infection au SARS-CoV-2 mobilise également l'immunité adaptative à médiation humorale induisant l'activation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

En avril 2020, la Haute Autorité de Santé (HAS) a recommandé de ne pas effectuer de test sérologique (dosage des anticorps anti-SARS-CoV-2) dans le cadre du diagnostic précoce de l'infection COVID-19, c'est-à-dire au cours des dix premiers jours après l'apparition des symptômes.

Q4. (C1) Exploiter le **document 3** pour justifier cette recommandation de l'HAS.

2. DIAGNOSTIC PAR RT-qPCR

Le diagnostic précoce représente une des étapes essentielles dans la lutte contre la propagation du SARS-CoV-2.
En France, les individus testés positifs ont été invités :

- à contribuer, avec l'aide de personnels de l'Agence Régionale de Santé, au repérage des personnes « cas-contacts » ;
- à respecter les mesures d'isolement.

La mise en évidence de la présence du virus SARS-CoV-2 dans un prélèvement nasopharyngé s'effectue par RT-qPCR (Reverse Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction).

La RT-qPCR en temps réel est une technique fondée sur le principe de la PCR et permettant de quantifier en temps réel un ARN (viral ou non) au sein d'un échantillon biologique grâce à une sonde marquée.
La première étape consiste à synthétiser un brin ADN complémentaire à partir d'un brin d'ARN viral matrice.
Le **document 4** présente le principe de la RT-qPCR.

Q5. (C4) Montrer, en argumentant la réponse, que le cycle 2 de l'étape 2 de PCR quantitative en temps réel présente les caractéristiques fondamentales d'une PCR.

Pour effectuer la PCR, un couple d'amorces (sens et anti-sens), qui délimitent la séquence à amplifier, sont nécessaires pour initier l'étape de polymérisation.

Le **document 5** présente les caractéristiques des amorces ainsi que les critères permettant de choisir le couple d'amorces le plus adapté pour réaliser la PCR, en particulier la température de fusion (Tm) de chaque amorce.

Q6. (C4) Montrer, à l'aide d'un schéma, que le couple d'amorces 2 permet d'amplifier la séquence d'ADN. Pour cela, s'appuyer sur la complémentarité des bases et l'orientation des brins.

La température d'hybridation d'une amorce dépend de sa température de fusion (Tm). La température de fusion d'un fragment d'ADN double brin correspond à la température pour laquelle 50 % de ce fragment est dissocié sous forme d'ADN simple brin.

Q7. (C2) Calculer la Tm de l'amorce "sens" et en déduire si elle est compatible avec la Tm de l'amorce "anti-sens" qui est égale à 68 °C.

Q8. (C4) Argumenter par un calcul le choix de la température de l'étape d'hybridation.

Après un premier cycle de PCR quantitative, un amplicon est obtenu et de la fluorescence est émise selon le mécanisme présenté dans le **document 4**.

Q9. (C3) Expliquer l'augmentation de la fluorescence au cours des cycles à partir du cycle 2 de l'étape 2.

Le **document 6** présente les résultats obtenus à l'issue d'une RT-qPCR. La courbe obtenue pour l'échantillon analysé permet, par comparaison avec celles des témoins positif et négatif, de conclure sur la présence ou l'absence d'ARN d'intérêt recherché.

Q10. (C4) Expliquer pourquoi aucune fluorescence n'est observée pour la courbe du témoin négatif.

Q11. (C3) Conclure quant à la présence d'ARN viral dans l'échantillon analysé et indiquer si le patient est diagnostiqué positif.

3. DOSAGE DE LA LDH POUR METTRE EN ÉVIDENCE DES LÉSIONS D'ORGANES CHEZ DES INDIVIDUS PRÉSENTANT UNE FORME GRAVE DE COVID-19

Une équipe de recherche a recensé les anomalies observées dans les analyses sanguines de patients infectés par le SARS-CoV-2. Une de ces anomalies consiste en l'augmentation de la concentration d'activité catalytique de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le plasma. Cette augmentation témoigne de lésions de certains organes du corps humain (rein, cœur, muscles, foie, poumons).

La concentration d'activité catalytique de la LDH peut être dosée dans le plasma.
La méthode utilisée est présentée dans l'extrait de la fiche technique du **document 7**.
En cas de lésions rénales ou hépatiques, ou en cas d'embolie pulmonaire, la concentration catalytique de la LDH plasmatique augmente fortement.

Q12. (C1) Expliquer comment l'absorbance de la réaction varie au cours du temps.

Q13. (C2) À partir de l'équation aux grandeurs fournie dans le **document 7,** établir l'équation aux unités puis l'équation aux valeurs numériques afin de calculer la concentration d'activité catalytique de la LDH dans le plasma du patient hospitalisé.

Q14. (C3) Exprimer le résultat de mesure en respectant les règles de métrologie et conclure sur l'état de ce patient.

Partie II (durée indicative 30 minutes)

D'après l'Institut Pasteur, la durée de l'incubation de COVID-19 est en moyenne de 5 jours avant l'apparition de symptômes.
L'infection peut être asymptomatique chez 30 à 60 % des sujets infectés. Certains patients présentant des symptômes développent des formes graves de la maladie qui nécessitent une hospitalisation voire une admission dans un service de réanimation.

Aucun traitement d'efficacité prouvée n'ayant été disponible en novembre 2020, plus de trois milliards de personnes ont été confinées, soit la moitié de la population mondiale. Une stratégie globale utilisant plusieurs types de tests a donc été mise en œuvre.

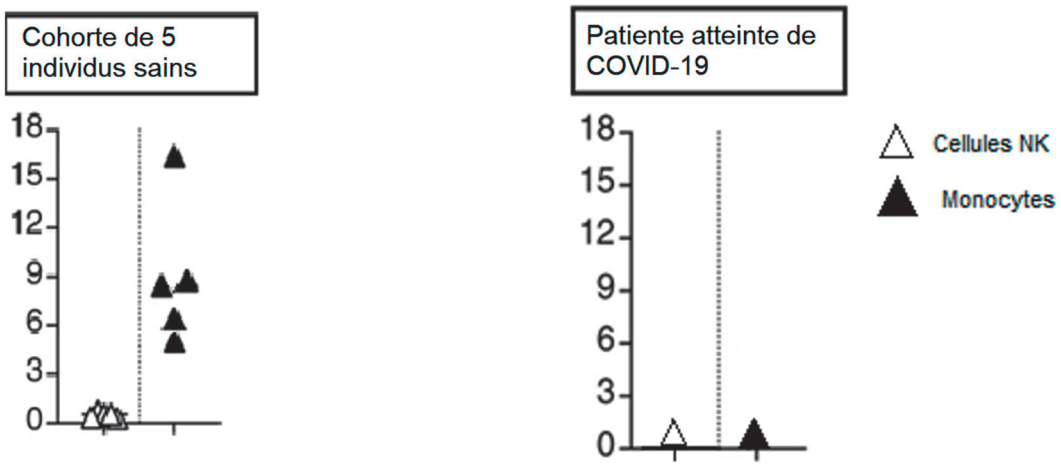
Le **document 8** présente plusieurs ressources pouvant servir de point d'appui pour réaliser la synthèse.

Q15. (C5) Recenser les applications et les caractéristiques des tests présentés, puis argumenter l'intérêt des différents tests chez un patient présentant des symptômes.

<u>DOCUMENT 1</u> — Sujet 1 : étude de cas d'une patiente de 47 ans originaire de Wuhan
Source : Nature Medicine, mars 2020

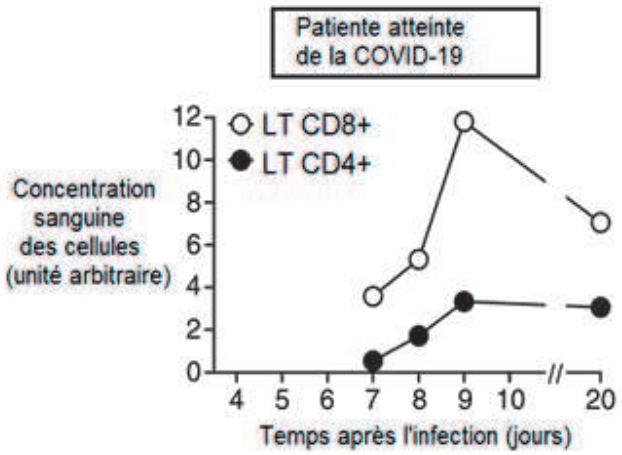
Pour une patiente souffrant de COVID-19, un suivi de sa réponse immunitaire a débuté au septième jour de son hospitalisation (J7).
Parallèlement, une cohorte de 5 individus non infectés par le virus (« individus sains ») a aussi été suivie selon les mêmes modalités que la patiente infectée.

<u>Document 1a</u> : Dosage de la concentration sanguine en cellules de l'immunité innée à J7



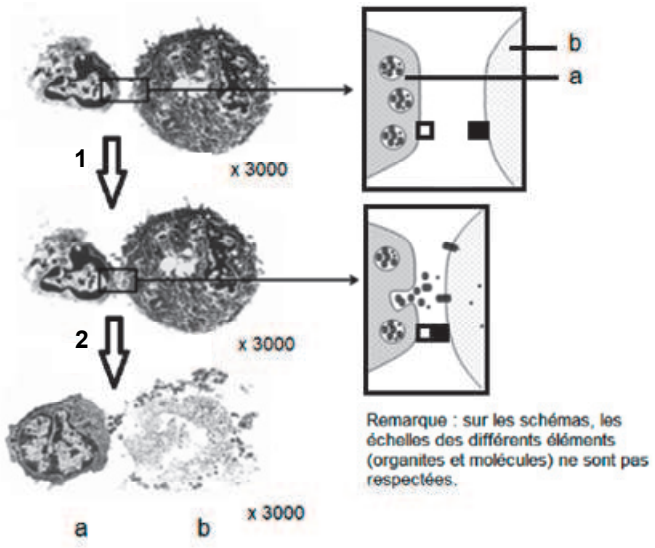
<u>Données</u> : les cellules NK (natural killer) et les monocytes sont des cellules sanguines impliquées dans l'immunité innée antivirale. Lors d'une infection, les monocytes sont recrutés sur le site de pénétration de l'antigène et deviennent des macrophages tissulaires. Ils ne sont alors plus détectés dans le sang.

<u>Document 1b</u> : Suivi (J7-J20) de la concentration sanguine en cellules de l'immunité adaptative



<u>Donnée</u> : Chez un individu non infecté, la concentration sanguine en LT $CD4^+$ et LT $CD8^+$ est de l'ordre de 0 à 2 unités arbitraires.

<u>DOCUMENT 2</u> — Sujet 1 : détail de la phase effectrice de la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire (observation au MET et schématisation)



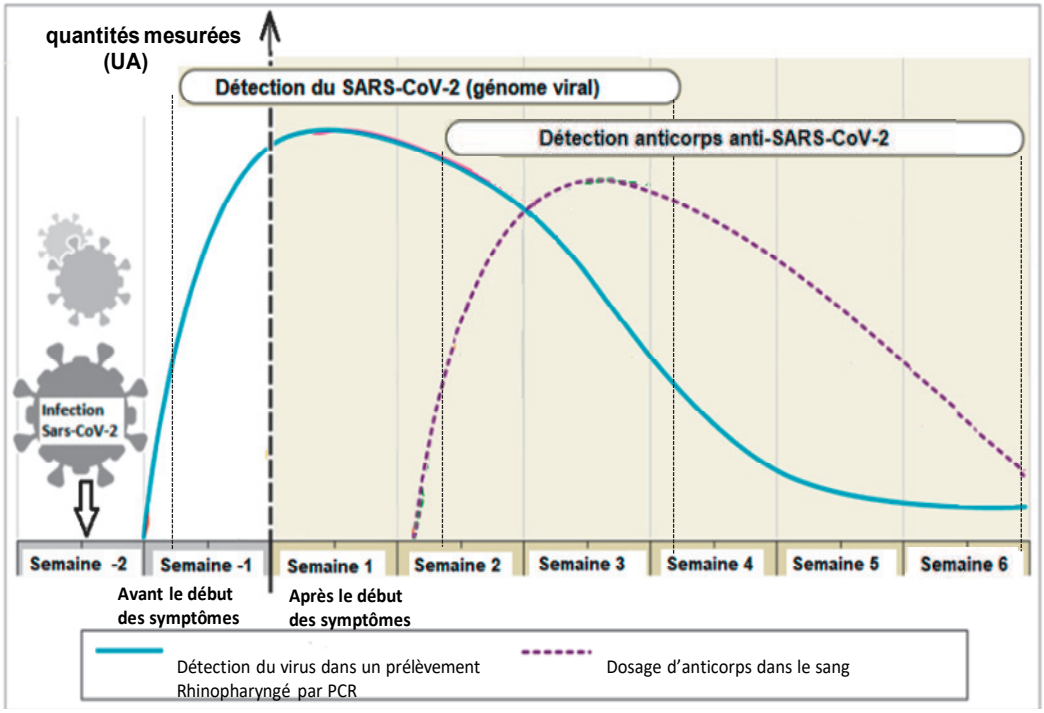
Légende :
a : Lymphocyte T $CD8^+$
b : cellule infectée, productrice de virus

1 : étape de reconnaissance et adhésion

2 : étape de dégranulation et mort cellulaire

<u>DOCUMENT 3</u> — Sujet 1 : mesure de la présence du virus SARS-CoV-2 et des anticorps dirigés contre SARS-CoV-2 chez un patient avant et après apparition des symptômes
Source : adapté de biofutur.eu, la sérologie du coronavirus SARS-CoV-2 responsable du Covid, mai 2020

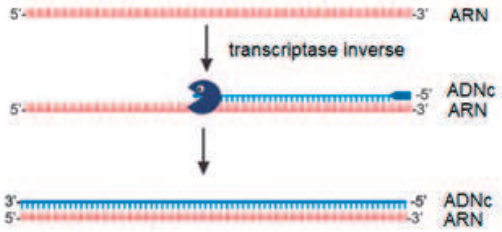
- Évolution au cours du temps de la concentration en immunoglobulines (Ig anti-SARS-CoV-2) dans le sérum d'un individu infecté par le SARS-CoV-2,
- Évolution de la présence du virus SARS-CoV-2 dans la sphère nasopharyngée de ce même individu.



<u>DOCUMENT 4</u> — Sujet 1 : principe de la RT-qPCR en temps réel avec détection des amplicons grâce à une sonde Taqman™

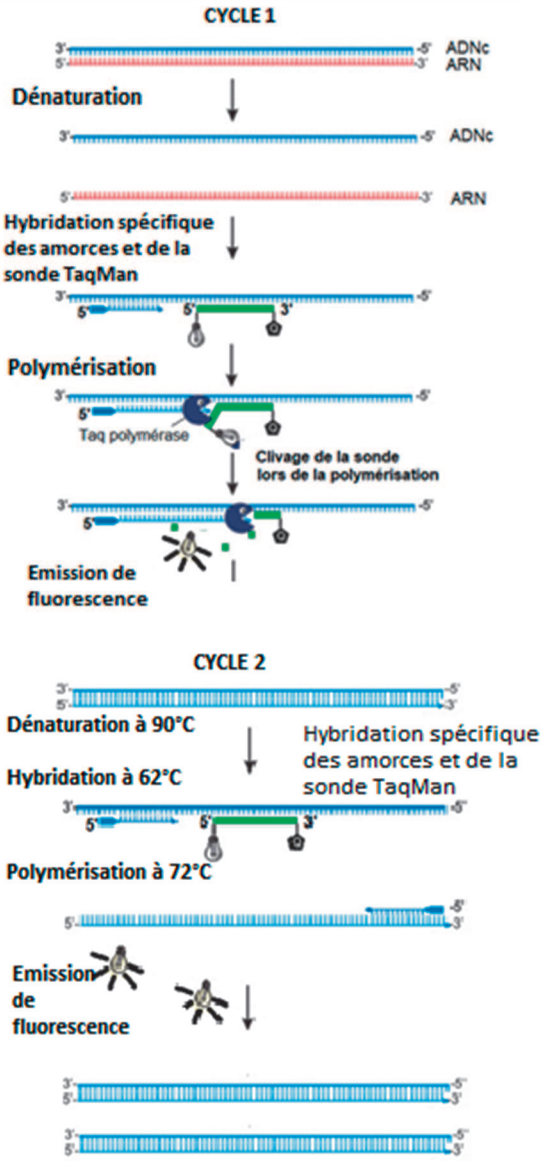
La RT-qPCR est effectuée à partir de l'ARN génomique du virus extrait et purifié.
Source : adapté de S Bustin et R Mueller, Clinical Science, 2020

Étape 1 : rétrotranscription



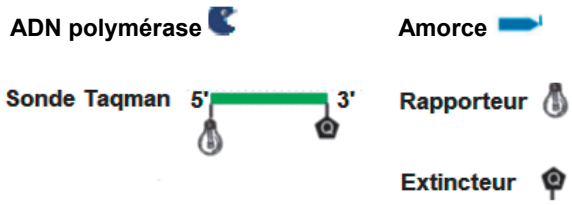
La transcriptase inverse est une enzyme capable de synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un ARN matrice.

Étape 2 : PCR quantitative en temps réel



Le cycle 2 est répété 15 à 40 fois

Légende :



Une sonde TaqMan™, complémentaire d'une séquence ciblée du brin 3'→ 5' de l'ADN, contient une molécule fluorescente appelée « rapporteur » au niveau de son extrémité 5' et une molécule appelée « extincteur » au niveau de son extrémité 3'.

La sonde TaqMan™ est présente en grande quantité dans le mélange réactionnel.
Tant que la sonde est intacte, la proximité entre le rapporteur et l'extincteur bloque l'émission de fluorescence du rapporteur.
Lors de l'élongation de l'ADN par la Taq polymérase (polymérisation), la sonde est clivée, libérant ainsi le rapporteur qui émet alors de la fluorescence.

À chaque cycle de PCR, une sonde TaqMan™ se fixe sur chaque brin d'ADN monocaténaire 3'->5' obtenu à l'issue de l'étape de dénaturation. A chaque cycle de polymérisation, le processus de clivage qui se produit entraîne une augmentation de l'intensité de la fluorescence proportionnelle à la quantité d'amplicons produite.

<u>DOCUMENT 5</u> — Sujet 1 : séquence des amorces pour l'amplification d'une partie de l'ADN issu de la rétrotranscription de l'ARN viral.

Séquence d'ADN à amplifier
Seules les séquences de chaque brin d'ADN s'hybridant avec les amorces sont représentées.
Les séquences internes de l'ADN à amplifier sont représentées par des tirets.

5' CCGCAAGGTTCTTCTTCGTAAG ---------- GAAAACTGGAACACTAAACATAGCA 3'
3' GGCGTTCCAAGAAGAAGCATTC ---------- CTTTTGACCTTGTGATTTGTATCGT 5'

Séquences des amorces

Couples d'amorces proposés	Amorces « sens » *L'amorce sens s'hybride sur le brin 3'-5'*	Amorces « anti sens » *L'amorce anti-sens s'hybride sur le brin 5'-3'*
Couple 1	5' GGCGTTCCAAGAAGAAGCATTC 3'	5' CTTTTGACCTTGTGATTTGTATCGT 3'
Couple 2	5' CCGCAAGGTTCTTCTTCGTAAG 3'	5' TGCTATGTTTAGTGTTCCAGTTTTC 3'

Source : adapté de *https://www.sigmaaldrich.com/france/ncov-coronavirus.html*

Température de fusion (T_m) :
Formule de Wallace permettant le calcul de la température de fusion Tm d'une amorce en degrés Celsius :

$T_m = 2 \times (nA + nT) + 4 \times (nC + nG)$	nA = nombre de nucléotides « A » dans l'amorce nT = nombre de nucléotides « T » dans l'amorce nC = nombre de nucléotides « C » dans l'amorce nG = nombre de nucléotides « G » dans l'amorce

Les deux amorces doivent avoir une T_m proche, l'écart entre les deux températures de fusion doit être inférieur ou égal à 2 °C.

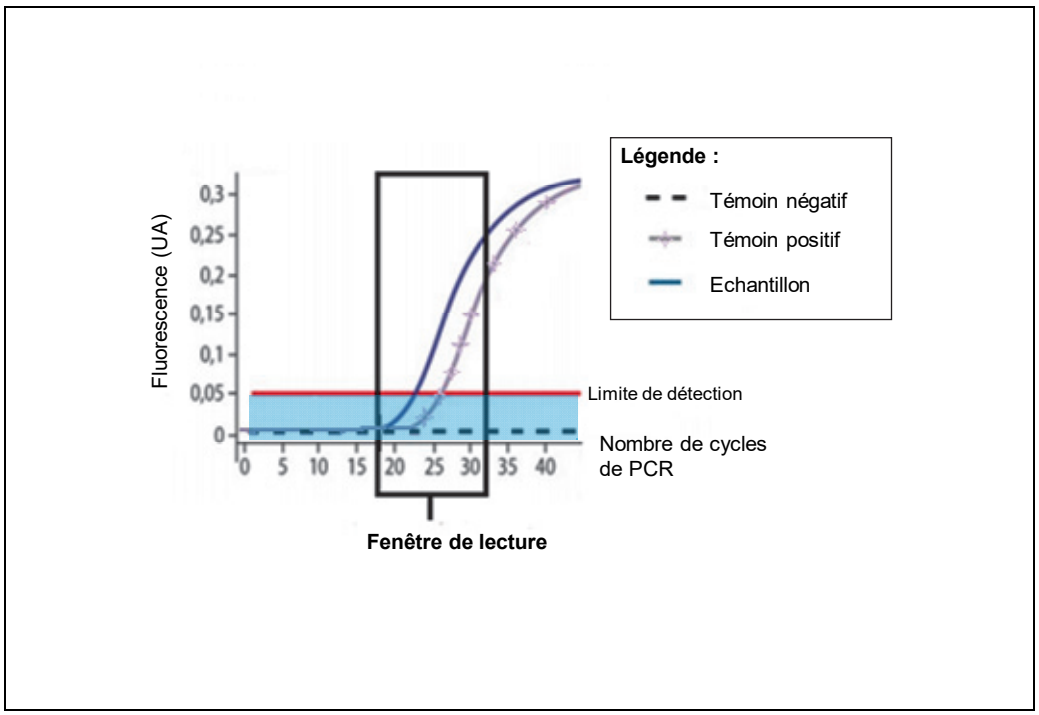
Température d'hybridation des amorces (TH) :
La température d'hybridation TH de l'ADN cible doit être inférieure d'au moins 4 °C au Tm de chaque amorce.

<u>DOCUMENT 6</u> — Sujet 1 : résultat de la RT-qPCR

Pour qu'un individu soit diagnostiqué positif, l'allure du graphe doit être similaire à celle du témoin positif (courbe sigmoïde) et positionnée à gauche de la courbe obtenue pour le témoin positif (moins de cycles nécessaires pour obtenir la même quantité d'ADN par amplification dans la fenêtre de lecture).

Évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycles

Conditions expérimentales :
- prélèvement nasopharyngé d'un individu dépisté ;
- témoin positif d'amplification effectué à partir d'ARN du SARS-CoV-2 préalablement purifié ;
- témoin négatif sans ARN viral.



Source : adapté de concours général biotechnologie 2020

Légendes
Témoin positif : ARN du virus SARS-CoV-2 purifié et de concentration connue + mix RT-qPCR
Témoin négatif : sans ARN du virus SARS-CoV-2 + mix RT-qPCR
Échantillon de l'individu dépisté + mix RT-qPCR

<u>DOCUMENT 7</u> — Sujet 1 : extrait de la fiche technique du kit Biolabo LDH (méthode SFBC modifiée)

Source : adapté de http://www.biolabo.fr/

Principe

Le schéma réactionnel est le suivant

$$Pyruvate + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} L-lactate + NAD^+$$

Le NADH,H+ absorbe à 340 nm.

Réactifs

Falcon R1 : Tampon-substrat	Tampon Tris pH 7,2 Pyruvate Conservateur	80 mmol·L^{-1} 1,6 mmol·L^{-1}
Flacon R2 : Coenzyme	NADH NaCl	≥ 20 mmol·L^{-1} 200 mmol·L^{-1}

Préparation des réactifs : ajouter le contenu du flacon R1 dans le flacon R2.

Procédure opératoire

Porter les réactifs et échantillons à température ambiante

Introduire dans une cuve thermostatée de 1 cm de trajet optique :

- $V_{réactif}$ = 1 mL

Laisser la température s'équilibrer à 30 °C ou 37 °C puis ajouter :

- V_{plasma} = 20 µL

Mélanger. Après 30 secondes, lire l'absorbance initiale à 340 nm puis toutes les minutes pendant 2 min.

Obtention du résultat

Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute $\frac{\Delta A}{\Delta t}$.

La concentration d'activité catalytique de la LDH dans le plasma, notée $b_{(LDH;plasma)}$ est déterminée par le calcul suivant :

$$b_{(LDH;plasma)} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon_{NADH}^{340\ nm} \times l} \times \frac{V_{réactif} + V_{plasma}}{V_{plasma}} \times 10^6$$

<u>Données</u> :

Compléments sur des grandeurs de l'équation	$\varepsilon_{NADH}^{340\ nm}$ = 6300 L·mol^{-1}·cm^{-1} l = trajet optique en cm (cuve de trajet optique 1 cm)
Indication de mesure pour le plasma du patient	$\frac{\Delta A}{\Delta t}$ = 0,125 min^{-1}
Valeurs physiologiques de la concentration d'activité catalytique de la LDH chez l'adulte (à 37 °C)	[200 à 400] µmol·min^{-1}·L^{-1}

Données métrologiques pour l'expression du résultat de mesure :

Résultat de mesure = valeur mesurée retenue ± incertitude élargie ; le niveau de confiance de l'incertitude élargie est à préciser.

L'incertitude élargie (U) est calculée en multipliant l'incertitude type composée (u_c) par le facteur d'élargissement (par exemple k=2 pour un intervalle de confiance, ou niveau de confiance, de 95 %).

u_c = 30 µmol·min^{-1}·L^{-1}

DOCUMENT 8 — Sujet 1 - Revue de presse sur la pandémie de COVID-19 du mois de novembre 2020

« Les sérologies : réponses à vos questions »
Site internet du Ministère de la santé et des solidarités, publié le 29.05.20

Qu'est-ce qu'un test sérologique ?
Un test sérologique est un test réalisé par prélèvement sanguin.
Il existe plusieurs types de tests sérologiques : les test automatiques ELISA et les tests rapides. En fonction de la technologie qu'ils utilisent, ils peuvent détecter : soit les IgM, soit les IgG, soit les deux.
Ces tests indiquent si la personne a développé des anticorps contre le coronavirus et a donc contracté la COVID-19, même sans avoir eu de symptômes.

Pourquoi ne pas directement prescrire des tests sérologiques à tout le monde ?
L'objectif de la période actuelle est d'empêcher la circulation du virus. Il est donc très important de pouvoir détecter la présence du virus chez une personne, afin que celle-ci puisse prendre toutes les précautions pour ne pas le transmettre. En conséquence, le test le plus utile dans la lutte contre l'épidémie est le test virologique par RT-PCR dans la mesure où il permet de dire si oui ou non la personne est porteuse du virus à un instant T.

« COVID-19 : la HAS positionne les tests antigéniques dans trois situations » -
Communiqué de presse - Mis en ligne le 09 oct. 2020

La Haute Autorité de Santé a rendu fin septembre un avis favorable à l'utilisation des tests antigéniques sur prélèvement nasopharyngé chez les personnes qui présentent des symptômes de la COVID-19 : fièvre, toux sèche, perte de l'odorat ou du goût, etc. Elle en a précisé les performances requises : une sensibilité minimale supérieure à 80 % et une spécificité minimale supérieure à 99 %.
Pour les patients qui ont des symptômes
Dès lors que le résultat du test RT-PCR ne peut être obtenu dans un délai de 48 h, la HAS recommande de réaliser un test antigénique dans les 4 premiers jours après l'apparition des symptômes.
Compte tenu de l'excellente spécificité de ces tests, elle considère qu'il n'est pas nécessaire de confirmer par un test RT-PCR les tests antigéniques positifs.
Pour les **patients à risque de développer une forme grave de la maladie** (…), la HAS préconise de confirmer par RT-PCR les résultats négatifs obtenus par test antigénique. L'enjeu est de s'assurer de ne pas rater de cas d'infection chez ces patients.

« Tests du covid-19 : tout ce qu'il faut savoir sur les différentes méthodes existantes »
Science et vie, publié le 17 septembre 2020

Tests antigéniques : plus rapides… mais moins fiables
Ils nécessitent également un prélèvement de cellules nasales profondes. Mais, grosse différence avec la PCR : ils détectent des protéines présentes à sa surface du virus, ou antigènes – et non le génome viral. Et ce, *via* un dispositif plus simple, similaire à un test de grossesse. Concrètement, le prélèvement est déposé sur une bandelette qui contient des anticorps capables de fixer spécifiquement les antigènes recherchés.

SUJET 2

DÉVELOPPEMENT D'UNE LESSIVE ÉCOLOGIQUE CONTENANT UNE PROTÉASE

Le suivi d'indicateurs environnementaux à l'échelle mondiale révèle une forte dégradation de l'environnement depuis 50 ans.
La pollution d'origine humaine prend plusieurs formes et provient par exemple de l'utilisation de produits ménagers contenant des détergents comme la lessive. Ces détergents peu biodégradables sont retrouvés dans les eaux, le sol et certains organismes vivants.
L'incorporation dans les lessives d'enzymes biodégradables telles que les protéases, lipases et amylases, capables de dégrader les taches de nature alimentaire, permet de diminuer leur contenu en détergent.

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

Un laboratoire cherche à développer une lessive écologique contenant une protéase issue d'une bactérie.
Pour cela, plusieurs étapes sont nécessaires :

- sélectionner une souche bactérienne produisant une protéase efficace et utilisable dans les conditions d'une lessive ;
- réaliser le clonage du gène codant cette protéase pour la produire dans une bactérie facilement cultivable ;
- produire et purifier la protéase.

1. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE PROTÉASES

Le laboratoire a testé plusieurs souches bactériennes afin d'en sélectionner une capable de produire une protéase.

Le **document 1** présente l'activité enzymatique de la protéase pour deux souches bactériennes.

Q1. (C1) Argumenter le choix de l'espèce bactérienne à sélectionner.

Les deux souches sont mises en culture pour mesurer leurs paramètres de croissance. Les courbes de suivi de croissance sont présentées dans le **document 2**.

Q2. (C2) Déterminer la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle pour *Escherichia coli*.

Q3. (C3) Argumenter l'espèce bactérienne adaptée pour la production de biomasse.

Q4. (C4) Montrer l'intérêt de cloner le gène de la protéase de *Bacillus licheniformis* dans la bactérie *Escherichia coli*.

2. AMPLIFICATION ET CLONAGE DU GÈNE D'INTÉRÊT

Le laboratoire de recherche clone le gène codant la protéase de *Bacillus licheniformis* dans une souche d'*Escherichia coli*.

Dans un premier temps, ce gène d'intérêt est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le fragment d'ADN amplifié par PCR contient le gène d'intérêt encadré par des sites pour les enzymes de restriction *Bam*H*I* et *Eco*R*I*.
Ce fragment est ensuite digéré par *Bam*H*I* et *Eco*R*I* générant ainsi un insert prêt à être inséré dans un vecteur de clonage.
Le **document 3** présente un schéma simplifié du fragment obtenu après PCR.

Q5. (C1) Représenter sur la copie le schéma de l'insert obtenu après coupure du fragment par les deux enzymes de restriction *Bam*H*I* et *Eco*R*I*.

Dans un second temps, le vecteur de clonage pUC18 est digéré par ces mêmes enzymes de restriction dont les sites de restriction sont localisés dans le gène LacZ.
Le **document 4** présente un schéma simplifié du vecteur de clonage obtenu après coupure enzymatique.

Dans un troisième temps, l'insert est incubé avec le vecteur de clonage pUC18 digéré en vue de son intégration.

Q6. (C3) Montrer, à l'aide d'un schéma, que le fragment d'ADN digéré peut être inséré dans le plasmide.

Les plasmides obtenus sont utilisés pour transformer une souche d'*Escherichia coli* sensible à l'ampicilline et ne fermentant pas le lactose. La composition du milieu utilisé est fournie dans le **document 5**.

- Les bactéries transformées par le plasmide pUC18 ayant intégré l'insert donnent des colonies blanches sur la gélose LB additionnée d'ampicilline et de X-gal

- Les bactéries transformées par le plasmide pUC18 sans insert donnent des colonies bleues.

Q7. (C4) Expliquer, d'après la composition du milieu, la couleur des colonies observée après incubation :

- pour les bactéries ayant intégré le plasmide pUC18 sans insert ;
- pour les bactéries ayant intégré le plasmide pUC18 avec insert.

Préciser alors la couleur des colonies à prélever pour la purification.

3. PURIFICATION DE LA PROTÉASE PRODUITE PAR LES BACTÉRIES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES

Les bactéries génétiquement modifiées sont cultivées pour produire la protéase d'intérêt.
Le laboratoire met en œuvre un protocole afin d'extraire et de purifier la protéase qui est localisée dans le cytoplasme des bactéries productrices. Un organigramme de ce protocole est présenté dans le **document 6**.

Q8. (C4) Argumenter, à l'aide de la localisation de la protéase, le choix des fractions qui sont conservées aux deux premières étapes du protocole de purification.

Le laboratoire cherche à optimiser l'étape 3 du protocole de purification avec différentes concentrations de sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$. Le **document 7** présente les résultats de détermination de la concentration d'activité catalytique des extraits enzymatiques dans les fractions C et D en fonction de la teneur en sulfate d'ammonium.

Q9. (C4) Argumenter le choix de la teneur en sulfate d'ammonium assurant la précipitation optimale des protéases.

La protéase est une protéine de 30 kDa qui a une charge globale négative, ce qui permet de la purifier selon deux techniques chromatographiques décrites dans le **document 8**.

Q10. (C3) Expliquer le principe de la chromatographie d'exclusion ou gel-filtration et en déduire le type de résine Sephadex qui conviendra à la purification de la protéase.

Q11. (C1) Argumenter le choix du type de colonne échangeuse d'ions adaptée à la purification de la protéase.

Après la mise en œuvre de chacune des deux techniques, le laboratoire dose les protéines et détermine l'activité enzymatique totale (z) de la protéase d'intérêt dans les extraits obtenus. Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 9**.

Q12. (C2) Calculer les valeurs de l'activité spécifique z_{sp} obtenue à l'issue de la mise en œuvre de chacune des techniques chromatographiques.

Q13. (C4) Argumenter le choix de la technique de chromatographie permettant de purifier le plus efficacement la protéase.

Q14. (C5) Présenter, sous forme d'un organigramme, les choix pris par le laboratoire pour optimiser la production de la protéase afin de développer une lessive écologique.

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

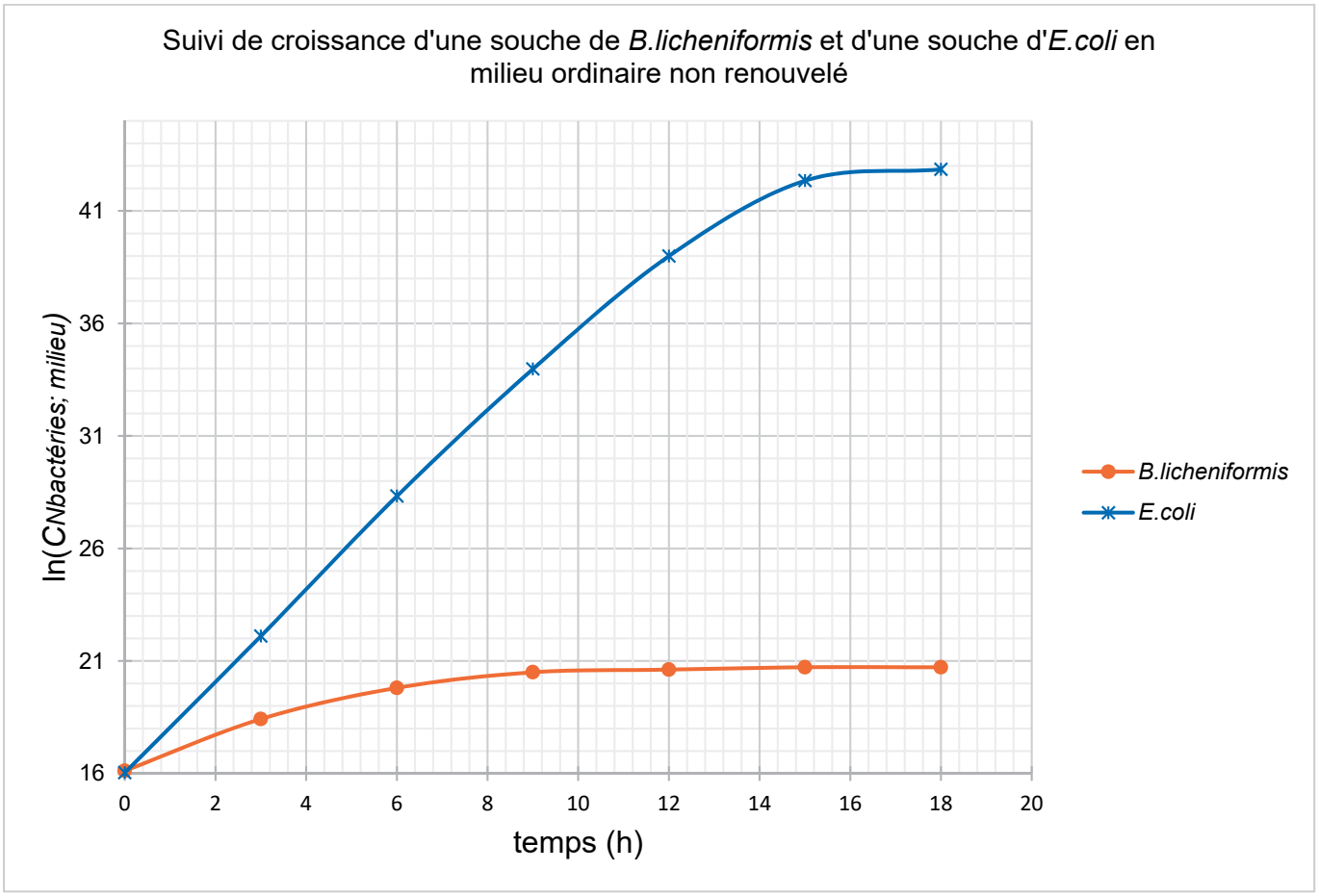
La transformation par un vecteur plasmidique porteur d'un gène d'intérêt n'est pas le seul moyen de modifier l'information génétique d'un organisme. La mutagénèse dirigée par l'utilisation des « ciseaux moléculaires » (CRISPR Cas) permet également de modifier un gène d'intérêt. Ce procédé n'est cependant pas soumis à la même réglementation que celle qui régit les OGM.

Q15. (C5) En distinguant les principales caractéristiques des deux procédés de modification d'un gène, proposer des arguments pour expliquer la position du Conseil d'État.

DOCUMENT 1 — Sujet 2 : activité protéasique d'*Escherichia coli* et de *Bacillus licheniformis*

	Escherichia coli	*Bacillus licheniformis*
Activité enzymatique (en $U.mL^{-1}$)	0,34	4,51

DOCUMENT 2 — Sujet 2 : courbes de croissance des deux souches testées par le laboratoire



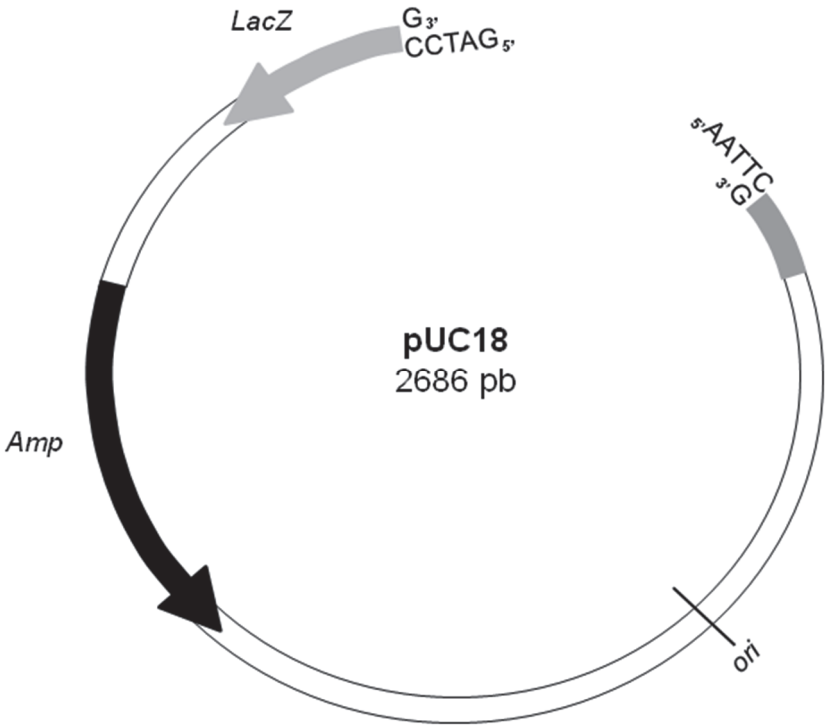
DOCUMENT 3 — Sujet 2 : schéma simplifié du fragment obtenu après PCR



Données :

Enzyme de restriction	***Eco*RI**	***Bam*HI**
Séquence du site de restriction	5'...G|AATTC...3' 3'...CTTAA|G...5'	5'...G|GATCC...3' 3'...CCTAG|G...5'

<u>DOCUMENT 4</u> — Sujet 2 : schéma simplifié du plasmide pUC18 digéré par les enzymes de restriction *Bam*H*I* et *Eco*R*I*

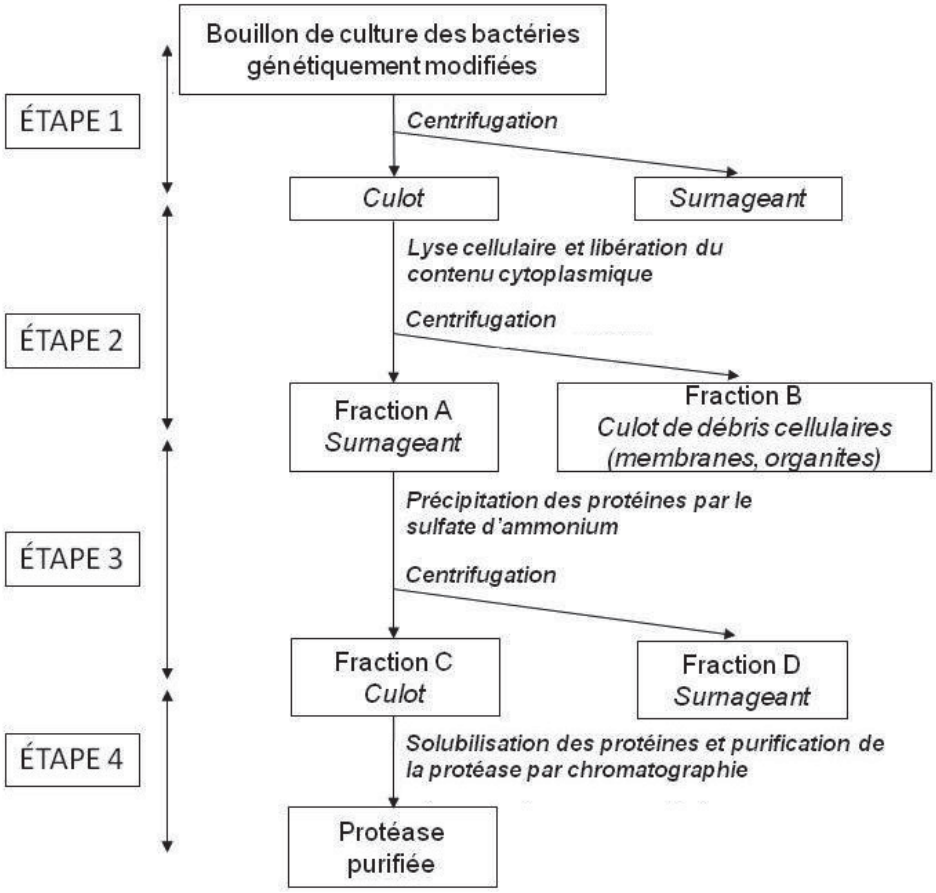


Amp : gène de résistance à l'antibiotique ampicilline
LacZ : gène de la β-galactosidase
ori : origine de réplication
pb : paires de bases nucléotidiques

<u>DOCUMENT 5</u> — Sujet 2 : composition du milieu LB additionné d'ampicilline et de X-gal

Composants	Concentration en masse ($g \cdot L^{-1}$)	Rôles
Tryptone	10	Source d'oligopeptides et d'acides aminés
Extrait de levure	5	Source de facteurs de croissance
NaCl	10	Maintien de la pression osmotique
Ampicilline	0,1	Antibiotique
X-gal	40	Substrat synthétique dont le produit de dégradation par la β-galactosidase est bleu
Agar	15	Gélifiant

<u>DOCUMENT 6</u> — Sujet 2 : organigramme du protocole d'extraction-purification de la protéase



DOCUMENT 7 — Sujet 2 : concentration d'activité catalytique de la protéase à l'issue de l'étape 3 du protocole d'extraction-purification

Teneur en sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ (%)	Concentration d'activité catalytique ($U \cdot mL^{-1}$ d'extrait enzymatique)	
	Fraction C	Fraction D
40	15,30	19,58
60	38,40	8,85
80	62,84	Absence

DOCUMENT 8 — Sujet 2 : techniques chromatographiques de gel-filtration et d'échange d'ions

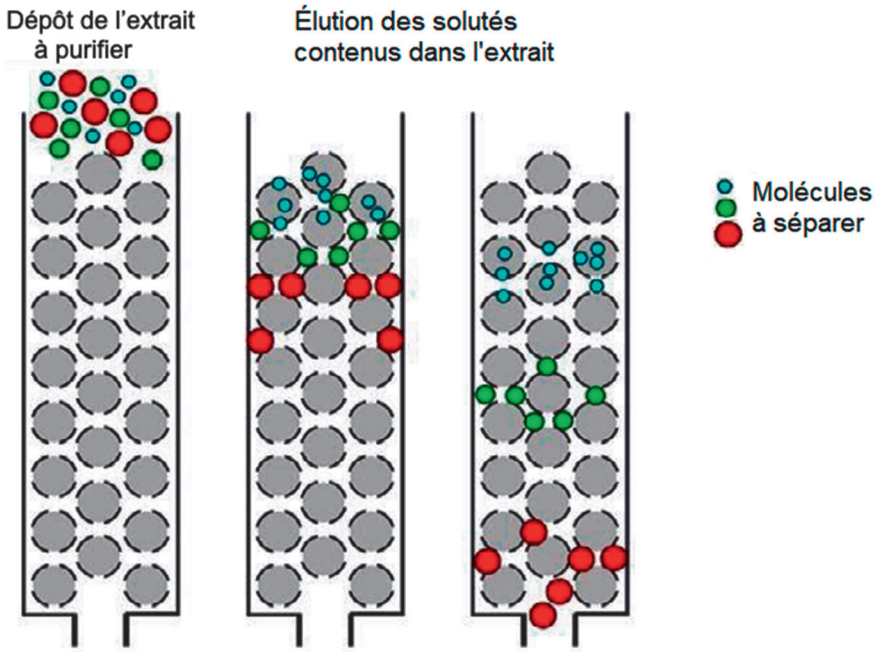
Les techniques chromatographiques permettent de purifier des biomolécules d'intérêt.

Pour purifier les protéines, deux techniques sont particulièrement utilisées :

- La chromatographie d'échange d'ions permet de retenir la protéine en fonction de sa charge. La colonne chromatographique est remplie d'une résine qui peut être chargée positivement (échangeuse d'anions) ou négativement (échangeuse de cations).

- La chromatographie d'exclusion ou de gel-filtration permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Le maillage de la résine est choisi en fonction de la masse moléculaire de la protéine d'intérêt à purifier :

Type de résine	Sephadex G10	Sephadex G25	Sephadex G75	Sephadex G100
Intervalle de fractionnement des protéines (Da)	700	1 000 – 5 000	3 000 – 7 000	4 000 – 150 000



<u>DOCUMENT 9</u> — Sujet 2 : purification de la protéase par deux techniques différentes de chromatographie

	m (protéines totales ; volume sol. enzymatique) (µg)	z (protéase ; volume sol.enzymatique) (U)
Protéines purifiées par chromatographie par gel filtration	3,22	680
Protéines purifiées par chromatographie échangeuse d'ions	0,66	522

Données

m = masse de protéines obtenue dans la fraction étudiée

z = activité enzymatique totale en protéase pour l'ensemble de la fraction

z_{sp} = activité spécifique : activité enzymatique totale rapportée à une masse de protéines

$$z_{sp(protéase;\, sol.enzymatique)} = \frac{z_{(\text{protéase; volume sol.enzymatique})}}{m_{(\text{protéines totales;volume sol.enzymatique})}}$$

<u>DOCUMENT 10</u> — Sujet 2 : documentation à propos de la réglementation encadrant les modifications génétiques chez les organismes vivants

Réglementation sur les OGM obtenus par transgenèse

D'après le manuel du Haut Conseil des Biotechnologies sur l'utilisation confinée d'OGM, consulté sur le site internet du 3RB, esst-inrs.fr

La réglementation sur les OGM concerne actuellement plusieurs techniques de modification génétique comprenant notamment les techniques de recombinaison de l'acide nucléique par insertion, injection de molécules d'ADN ou d'ARN produites en dehors d'un organisme. La fusion de cellules est également considérée comme un OGM.
Toutes ces techniques aboutissent à l'incorporation d'une information génétique étrangère dans un hôte dans lequel elle n'est pas présente à l'état naturel. C'est la raison pour laquelle leur utilisation est contrôlée.
En effet, la réglementation est apparue nécessaire après l'émergence de risques réels ou supposés pour la santé et l'environnement.

Mutagenèse dirigée grâce au système CRISPR-Cas9

D'après Sciences et Avenir, septembre 2020
La mutagenèse désigne un ensemble de techniques destinées à obtenir des mutations génétiques chez un organisme vivant. Elle consiste à introduire dans la cellule un matériel génétique étranger pour y provoquer une mutation recherchée sans que le matériel génétique introduit ne demeure à long terme dans l'organisme.

CRISPR-Cas9, découverte chez les bactéries, est une machine moléculaire qui cible un endroit précis du génome et coupe l'ADN. Les biologistes utilisent aujourd'hui ces "ciseaux moléculaires" pour corriger des gènes défectueux. Cette méthode pourrait corriger des maladies génétiques comme la myopathie de Duchenne. La méthode n'est cependant pas exempte de risques comme la genèse des mutations indésirables ou encore la survenue de cancers (d'après *Nature Medicine*)

Pour le Conseil d'Etat, les organismes obtenus par mutagenèse doivent respecter la réglementation OGM

D'après : Conseil d'Etat (conseil-etat.fr), février 2020

Le Conseil d'Etat juge que les organismes obtenus au moyen des techniques de mutagenèse développées depuis l'adoption de la directive de 2001 doivent être soumis aux obligations imposées aux OGM. Il précise que tel est le cas non seulement de la mutagenèse dirigée mais aussi de la mutagenèse aléatoire *in vitro*, utilisée notamment pour rendre tolérantes aux herbicides des plantes comme le tournesol ou le colza. En revanche, les variétés obtenues au moyen de techniques plus anciennes, dont la sécurité est avérée depuis longtemps, ne sont pas soumises à ces obligations.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.