

**BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE**  
**Série : Sciences et Technologies de Laboratoire**  
**Spécialité : Biotechnologies**

**Jeudi 20 juin 2019**

**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.

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

## UN EXEMPLE DE BIOREMÉDIATION : LA DÉGRADATION DU POLYETHYLENE TEREPHTALATE

Près de 300 millions de tonnes de plastique sont fabriquées chaque année dans le monde. Utilisé dans la quasi-totalité des objets et produits de notre quotidien, le plastique est omniprésent et se retrouve dans notre environnement pour des dizaines, voire des centaines d'années.

Le polyéthylène téréphtalate ou PET représente à lui seul 1/6 de cette production. Issu du raffinage du pétrole, il n'est pas biodégradable et son impact écologique est considérable. La question de son élimination est donc cruciale.

Afin de procéder à une dégradation biologique de ce plastique (bioremédiation), une équipe scientifique recherche un micro-organisme capable d'assimiler le PET pour sa croissance.

La démarche est la suivante :

- rechercher et identifier un micro-organisme plastivore capable de dégrader le PET ;
- déterminer les caractéristiques de l'enzyme impliquée dans la dégradation du PET, extraite du micro-organisme plastivore ;
- optimiser la production de l'enzyme d'intérêt par génie génétique.

*D'après S Yoshida et coll., A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate) Science, 11 mach 2016 Vol 351 issue 6278*

### 1. RECHERCHE ET IDENTIFICATION D'UNE BACTÉRIE PLASTIVORE

La première étape consiste à rechercher, dans l'environnement, des micro-organismes capables de dégrader le PET.

Le **document 1** présente la procédure mise en œuvre et les résultats obtenus.

**Q1.** Analyser les clichés pour chaque échantillon polymicrobien testé en expliquant l'intérêt de l'expérience D.

**Q2.** En déduire l'échantillon à retenir pour l'étude.

L'étape suivante consiste à sélectionner, dans l'échantillon polymicrobien, la (les) espèce(s) bactérienne(s) capable(s) de dégrader le PET.

Le **document 2** présente la procédure mise en œuvre et les résultats obtenus.

**Q3.** Expliquer le rôle de la pesée du film PET tous les 10 jours.

**Q4.** Démontrer, par l'analyse comparative des graphes du **document 2**, qu'une espèce bactérienne en particulier est responsable de la dégradation du PET.

**Q5.** Proposer une hypothèse expliquant le fait que la vitesse de dégradation du PET par l'espèce bactérienne isolée soit supérieure à celle du mélange microbien.

L'équipe scientifique souhaite identifier la souche bactérienne sélectionnée. Un frottis sur colonie, fixé et coloré au Gram, a révélé des bacilles à Gram négatif. Cet aspect microscopique conduit les chercheurs à supposer qu'il s'agit d'une protéobactérie, embranchement très important qui comprend cinq classes. L'équipe souhaite identifier la classe à laquelle appartient cette souche tout en validant qu'il s'agit bien d'une protéobactérie. Pour cela, elle réalise une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dite multiplex, dont le principe et les résultats sont indiqués dans le **document 3**.

**Q6.** À l'aide du principe de la PCR multiplex, expliquer le résultat attendu pour une espèce n'appartenant pas à l'embranchement des protéobactéries.

**Q7.** Analyser les résultats obtenus pour identifier l'embranchement puis la classe auxquels appartient l'espèce bactérienne sélectionnée.

## 2. CARACTÉRISTIQUES DE L'ENZYME PLASTIVORE

L'équipe scientifique a nommé l'espèce bactérienne sélectionnée précédemment *Ideonella sakaiensis*. La première enzyme de la voie métabolique de la dégradation du PET a été nommée PETase. La PETase de *Ideonella sakaiensis* n'est pas la seule enzyme connue capable de dégrader le PET : d'autres enzymes étaient déjà connues pour cette activité, dont l'enzyme LCCase produite par une actinobactérie. L'équipe de chercheurs compare les caractéristiques enzymatiques de la PETase et de la LCCase.

Le **document 4** présente les résultats et la démarche d'exploitation graphique pour la détermination des paramètres enzymatiques des deux enzymes.

**Q8.** Déterminer les paramètres enzymatiques  $v_{i\ max}$  et  $K_M$  de chaque enzyme.

L'activité de l'enzyme est mesurée par la quantité de produit libéré.

Le **document 5** présente l'effet de la température sur la libération du produit.

**Q9.** Déterminer la température optimale de la PETase et de la LCCase.

L'enzyme d'intérêt doit présenter les propriétés suivantes :

- une affinité forte pour le substrat PET et une vitesse de transformation élevée ;
- une température optimale basse, afin de minimiser les coûts énergétiques du traitement du plastique.

**Q10.** À l'aide des trois caractéristiques déterminées pour chaque enzyme, choisir l'enzyme qui sera la plus adaptée à la dégradation du PET en tenant compte des propriétés souhaitées.

### 3. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE L'ENZYME PLASTIVORE

Les chercheurs souhaitent développer un procédé de production industrielle de l'enzyme PETase. Ils décident pour cela d'intégrer le gène codant l'enzyme dans un vecteur d'expression qui servira à transformer une souche d'*Escherichia coli* dont les conditions de culture sont maîtrisées à l'échelle industrielle. Ils choisissent un plasmide comportant un gène de résistance à l'ampicilline et un site d'intégration d'une séquence d'ADN. Ce site d'intégration ne se trouve pas dans le gène de résistance à l'ampicilline.

Le **document 6** présente les variations de la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle en fonction de la température de culture pour *Ideonella sakaiensis* et une souche d'*E. coli*.

**Q11.** Déterminer graphiquement la valeur maximale de la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle ( $\mu_{expo}$ ) pour chacune des deux souches étudiées.

**Q12.** Montrer que le choix par l'équipe de chercheurs d'utiliser *E. coli* transformée pour la production industrielle de la PETase est pertinent.

**Q13.** Schématiser le plasmide utilisé, avant et après intégration du gène d'intérêt, en représentant ses éléments caractéristiques.

**Q14.** Proposer un moyen de sélectionner les colonies ayant été transformées par le plasmide. Argumenter la réponse.

#### SYNTHESE

**Q15.** Rédiger une synthèse présentant la démarche suivie par les chercheurs pour produire une enzyme plastivore et les résultats obtenus.

## **DOCUMENT 1 : recherche des micro-organismes capables de dégrader le PET.**

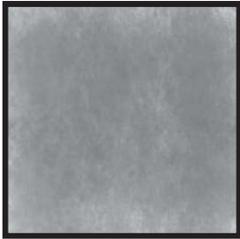
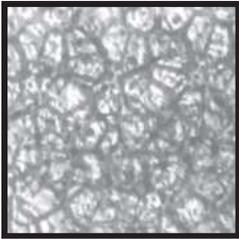
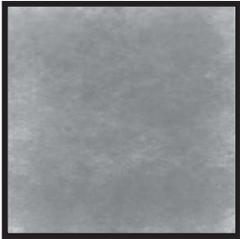
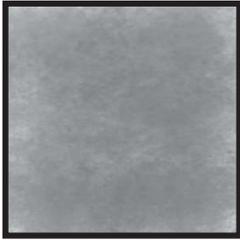
(D'après "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)", Science - Mars 2016)

### **Procédure opératoire**

- Collecte de deux échantillons polymicrobiens n°1 et n°2 dans des environnements pollués par du PET.
- Inoculation d'un milieu minimum stérile contenant en suspension un film PET présentant un aspect homogène en microscopie électronique à balayage.
- Incubation pendant 20 jours à 30 °C.
- Lavage puis observation en microscopie électronique à balayage du film PET (10 000 x).

Remarque : le PET dégradé présente, en microscopie électronique à balayage, un aspect irrégulier dû à la disparition de matière plastique solide.

### **Résultats obtenus**

<b>Expérience A</b>	<b>Expérience B</b>	<b>Expérience C</b>
Film PET avant inoculation (jour 0)	Film PET inoculé par l'échantillon n°1 (jour 20)	Film PET inoculé par l'échantillon n°2 (jour 20)
		
<b>Expérience D</b>		
Film PET sans inoculum (jour 20)		
		

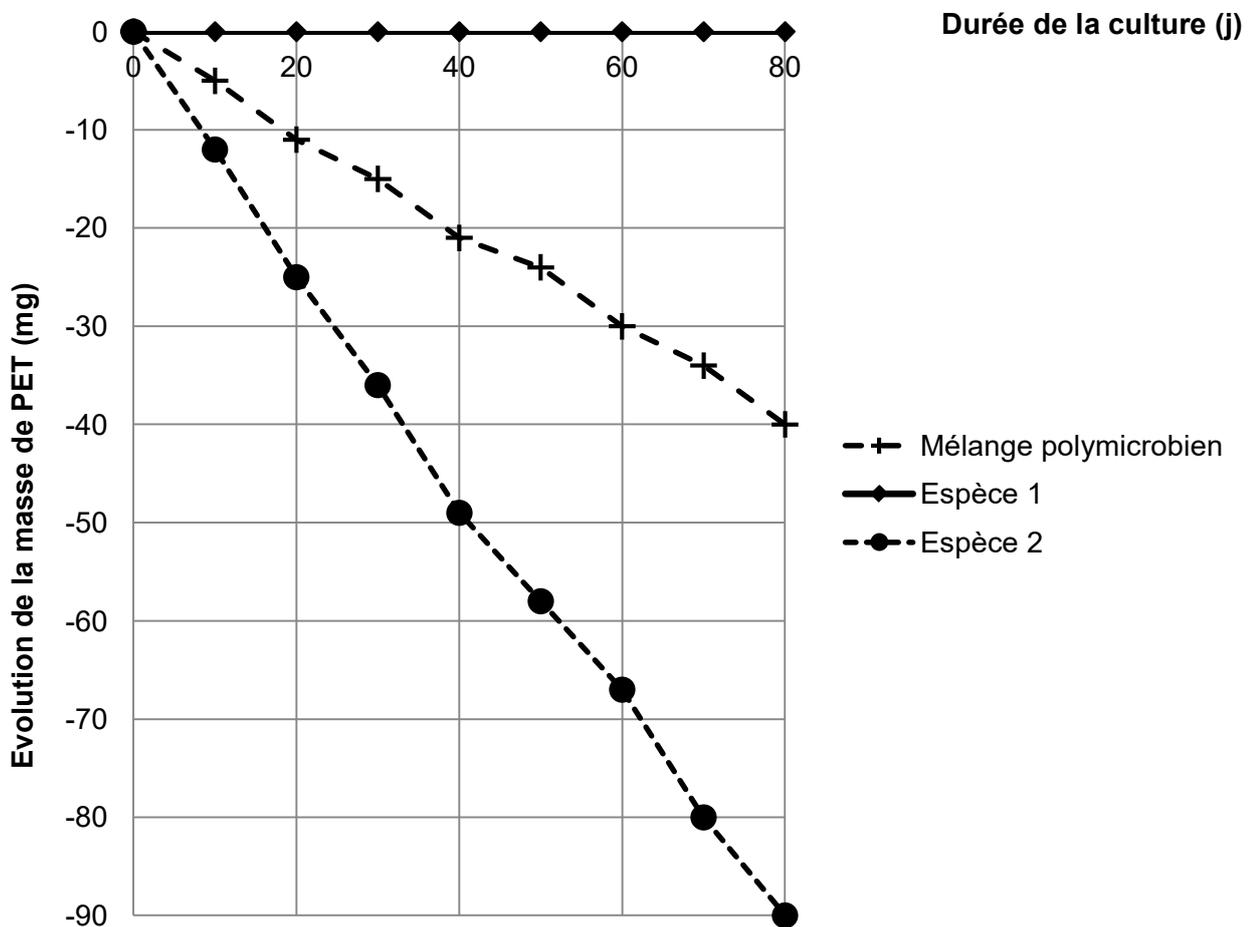
## DOCUMENT 2 : isolement d'une espèce bactérienne plastivore.

(D'après "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)", Science - Mars 2016)

### Procédure opératoire

- À partir du mélange polymicrobien retenu, deux espèces bactériennes présentant un aspect macroscopique différent ont été sélectionnées sur milieu solide.
- Le mélange polymicrobien, ainsi que chaque espèce isolée, sont mis en culture dans un milieu minimum contenant du PET.  
La quantité totale de bactéries utilisées pour ensemercer les milieux est la même pour chaque expérience.
- Le film de PET est pesé tous les 10 jours en conditions stériles.

### Résultats obtenus



### **DOCUMENT 3 : mise en œuvre d'une PCR multiplex dans un but d'identification de la souche sélectionnée.**

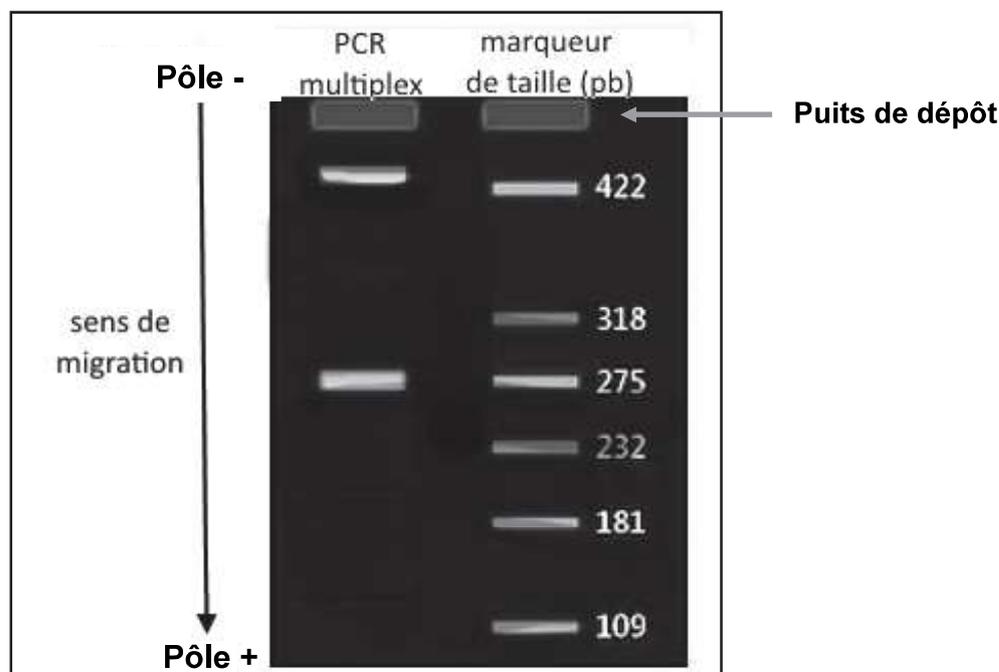
#### **Principe :**

La PCR multiplex est une technique de biologie moléculaire très utilisée pour l'amplification de multiples fragments d'ADN dans un seul tube de PCR. Le mélange réactionnel contient :

- l'ADN matrice extrait de la souche à identifier ;
  - la Taq polymérase et les cofacteurs nécessaires à son activité ;
  - les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), monomères essentiels à la synthèse d'ADN ;
  - autant de couples d'amorces que de fragments d'ADN spécifiques à amplifier.
- L'appartenance de la souche bactérienne à l'embranchement des protéobactéries est vérifiée à l'aide d'un couple d'amorces permettant la formation d'un fragment d'ADN de 430 paires de bases (pb).
  - L'appartenance à une classe de protéobactérie est vérifiée à l'aide de 5 couples d'amorces spécifiques de chacune des 5 classes, choisis pour permettre l'amplification d'un fragment d'ADN de taille caractéristique :

<b>Nom de la classe</b>	<b>Taille du fragment d'ADN attendu en pb</b>
$\alpha$ protéobactéries	371
$\beta$ protéobactéries	275
$\gamma$ protéobactéries	202
$\delta$ protéobactéries	141
$\epsilon$ protéobactéries	105

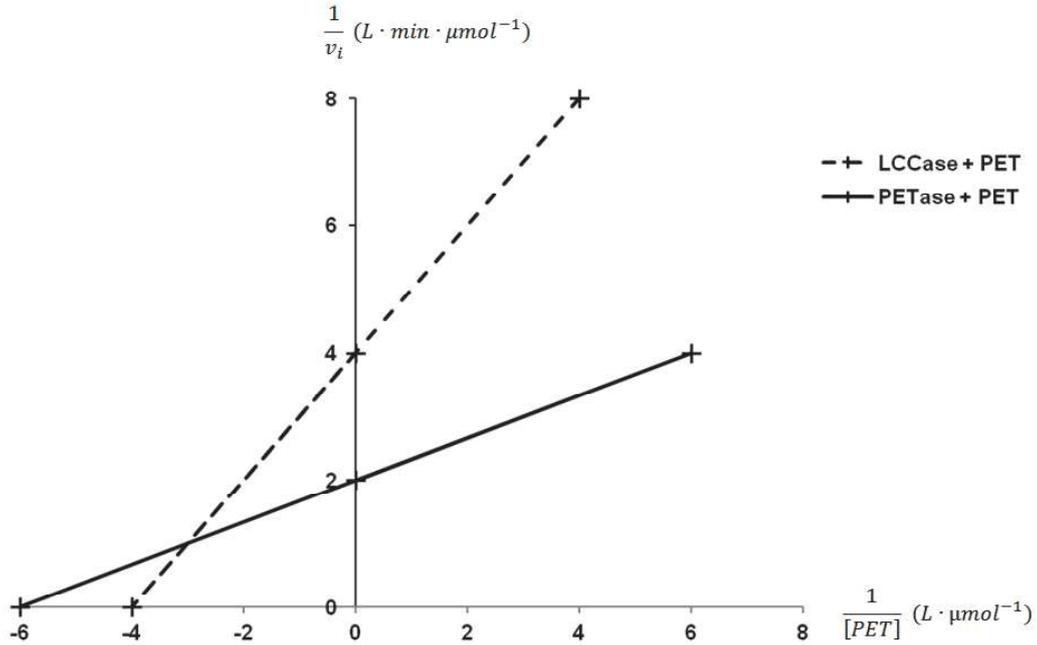
**Résultat :** électrophorégramme obtenu après migration des produits de la PCR multiplex.



**DOCUMENT 4 : détermination des paramètres cinétiques de la PETase et de la LCCase pour le substrat PET – Représentation de Lineweaver-Burk.**

Chaque enzyme a été incubée dans les mêmes conditions opératoires (température, pH).

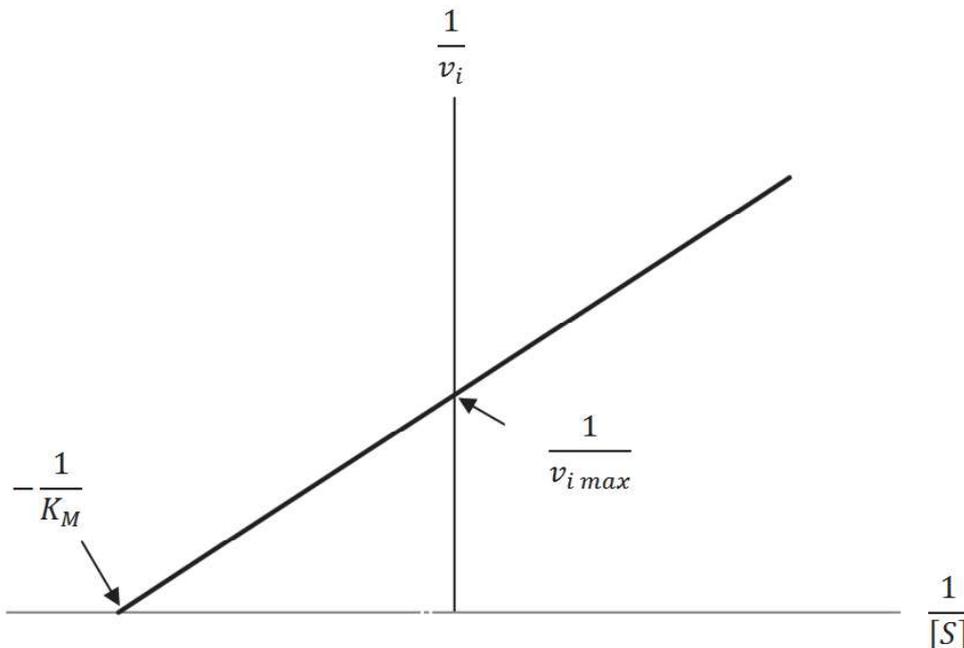
**A- Résultats obtenus pour chacune des deux enzymes**



**Données :**

- $[PET]$  : concentration en substrat PET dans le milieu réactionnel en  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .
- $v_i$  : vitesse initiale de la réaction de transformation enzymatique en  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .

**B- Exploitation d’une représentation de Lineweaver-Burk**



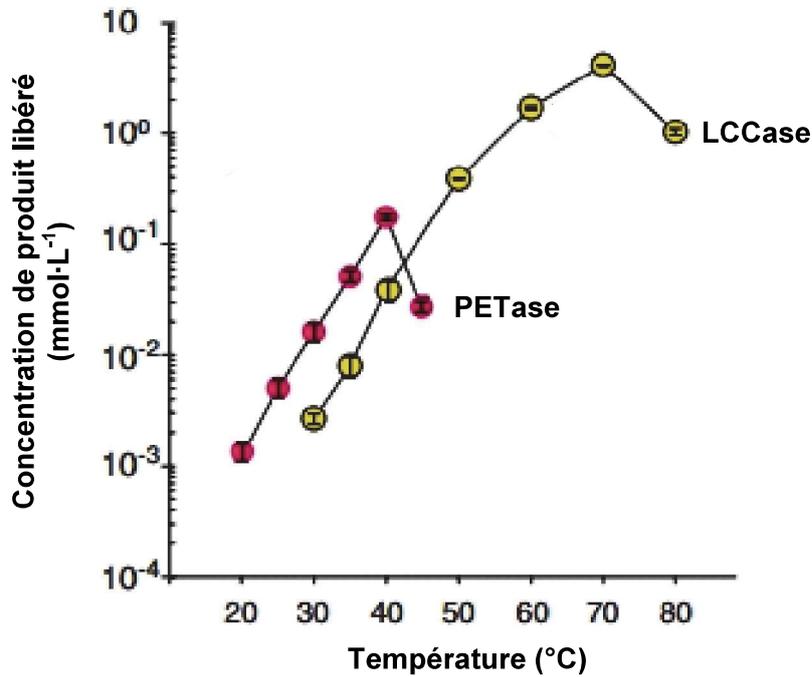
- $[S]$  : concentration en substrat dans le milieu réactionnel en  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .
- $v_{i \max}$  : vitesse initiale maximale de la réaction de transformation enzymatique en  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .
- $K_M$  : constante de Michaëlis en  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Le  $K_M$  permet d’estimer l’affinité de l’enzyme pour son substrat : plus le  $K_M$  est élevé, plus l’affinité de l’enzyme pour son substrat est faible.

**DOCUMENT 5 : effet de la température sur la dégradation enzymatique du film PET.**

(D'après "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)", Science - Mars 2016)

Les enzymes sont incubées dans des milieux de composition et pH strictement identiques, pendant une durée d'action similaire.



**DOCUMENT 6 : effet de la température sur la vitesse spécifique de croissance de *Ideonella sakaiensis* et d'*Escherichia coli*.**

