

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 :

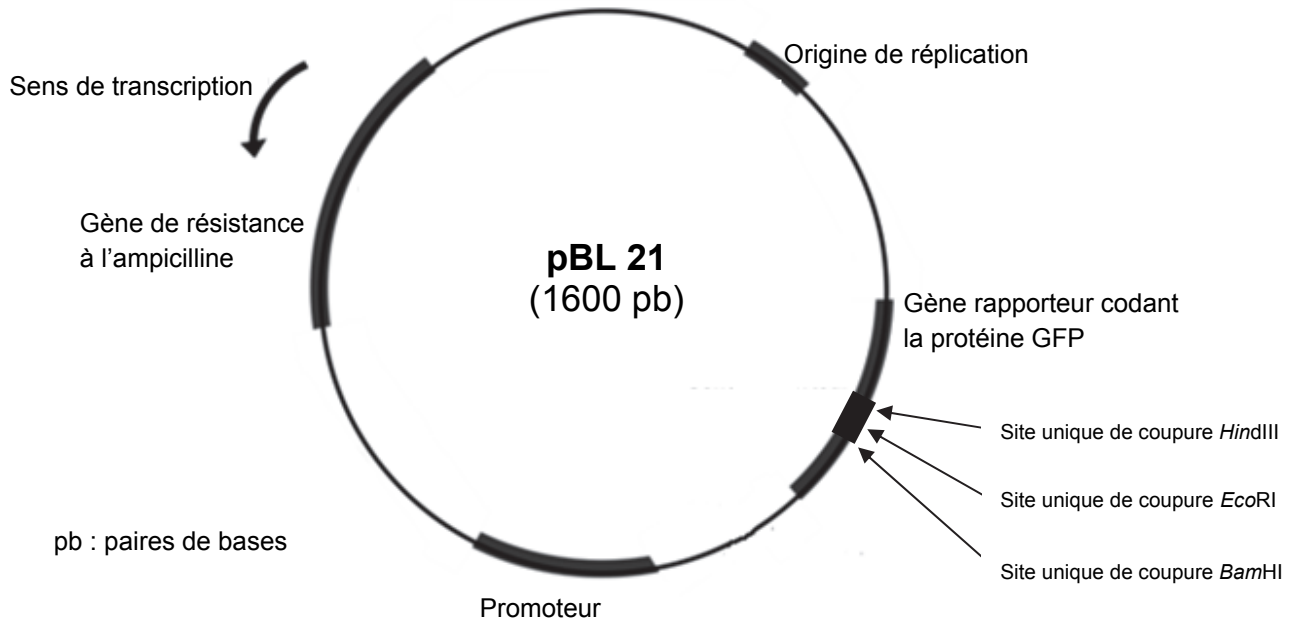
- $Z_{sp (AC ; \text{surnageant})} = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{mg}^{-1}$;
- $Z_{sp (AC ; \text{éluat})} = 6,2 \cdot 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{mg}^{-1}$.

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

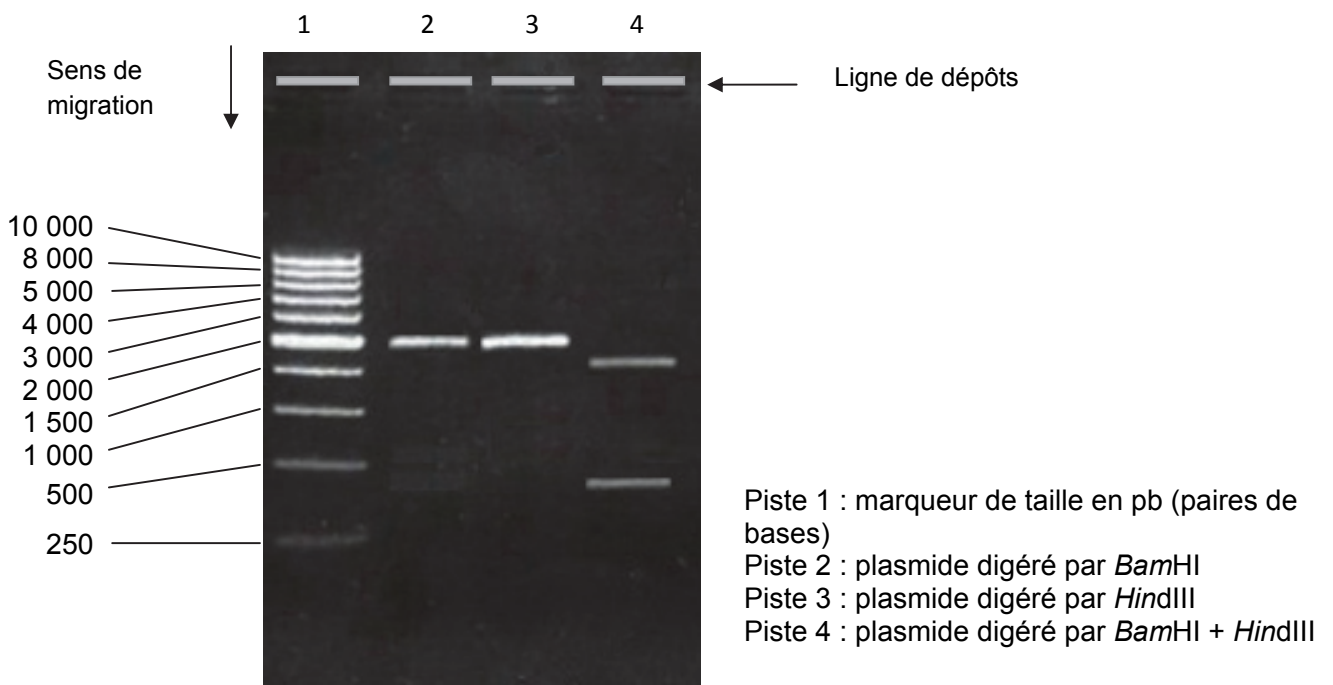
SYNTHÈSE

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.

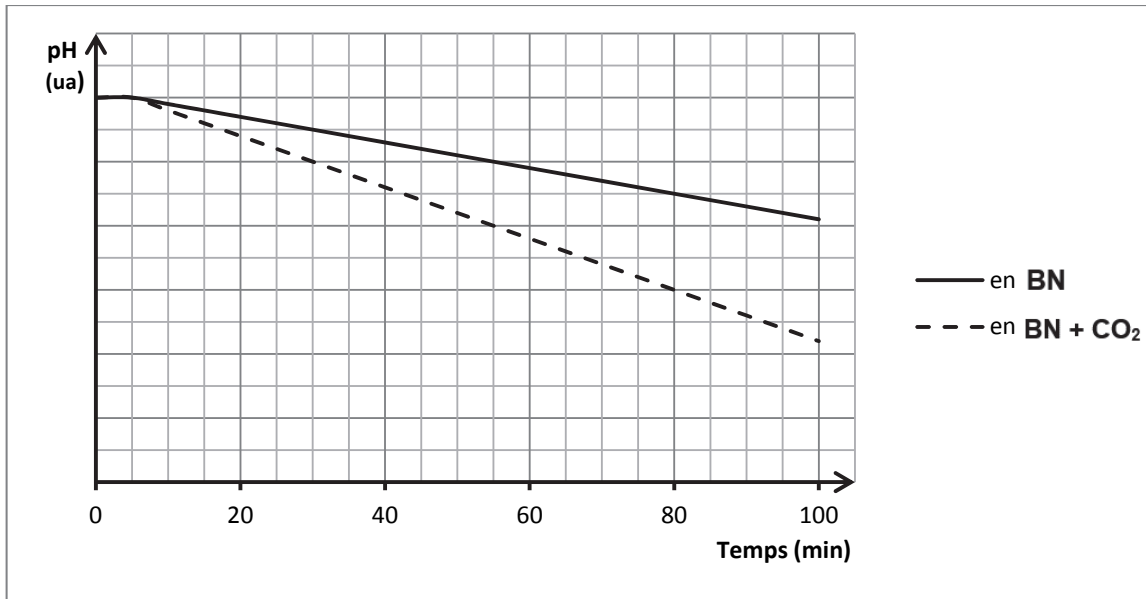


DOCUMENT 2 : électrophorégramme obtenu après digestion enzymatique du plasmide extrait de colonies non fluorescentes.



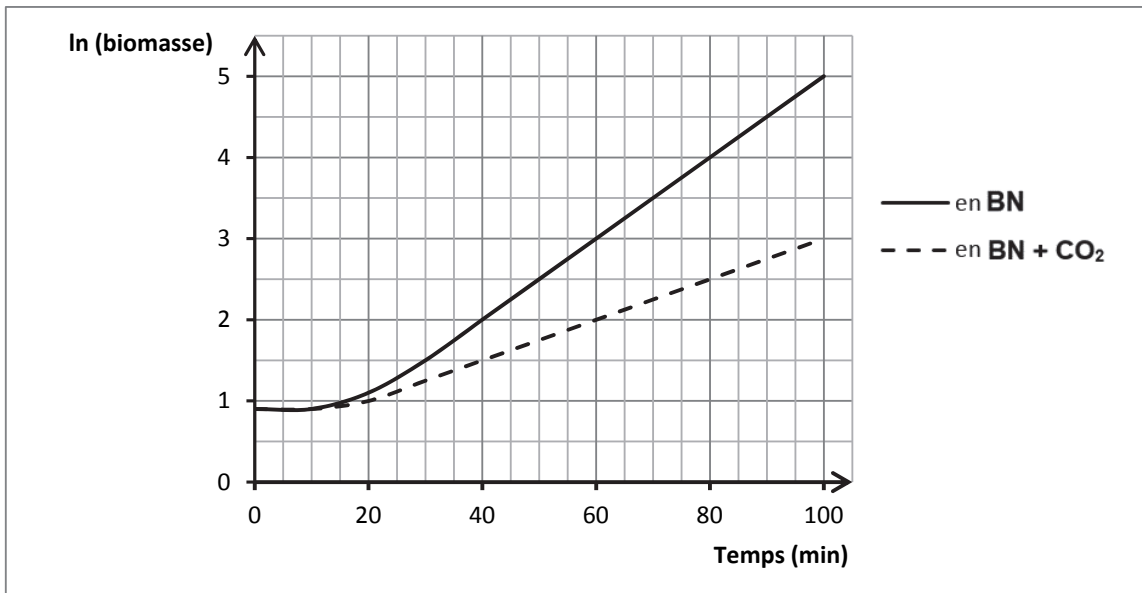
DOCUMENT 3 : cinétique d'évolution du pH et de la biomasse.

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 mmol·L⁻¹, pH 6,8 contenant du lysozyme.
- l'ensemble est incubé 30 min à 37 °C puis centrifugé 2 heures à 100 000 g.

Le surnageant est conservé.

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

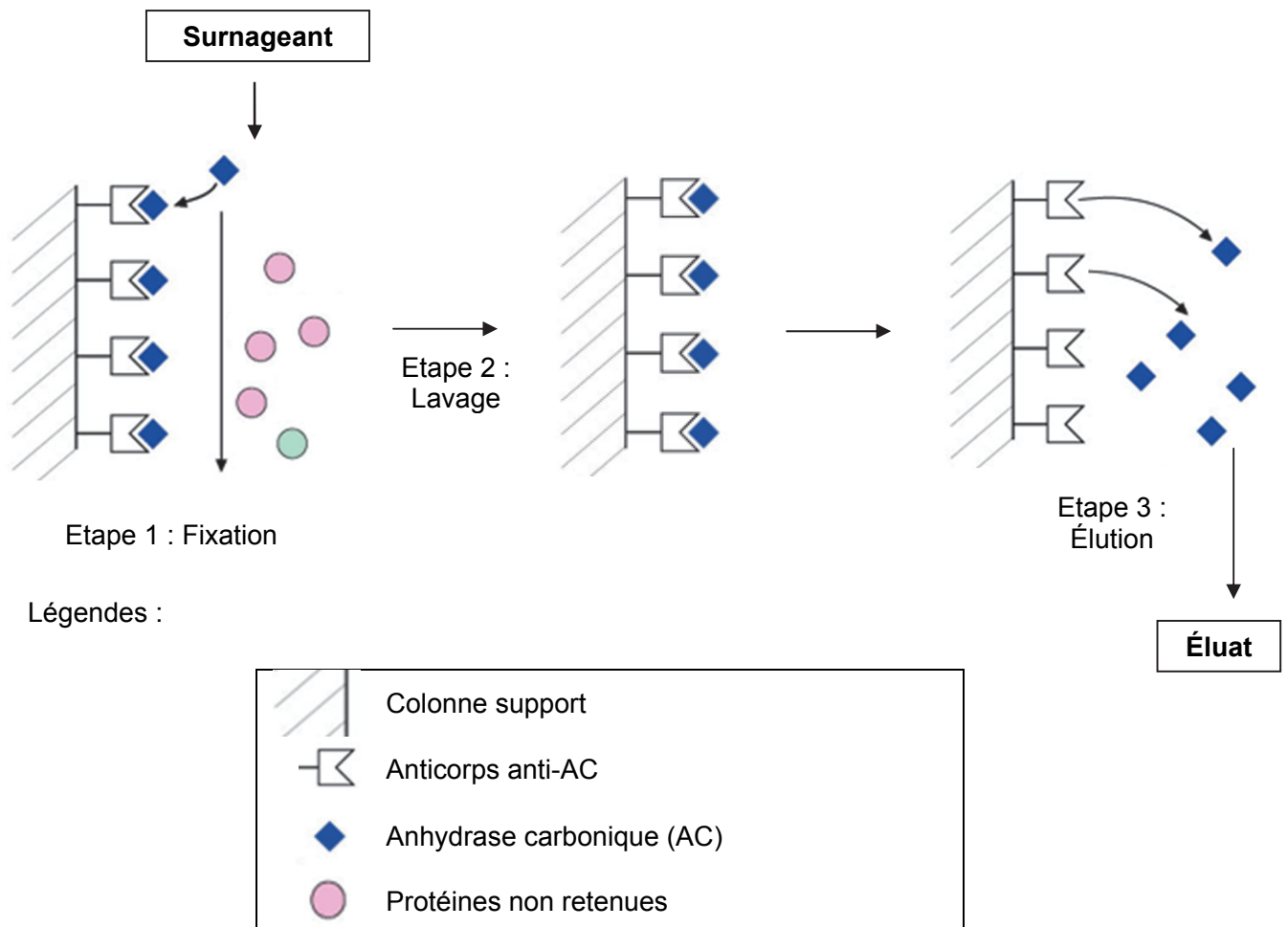
La purification de l'anhydrase carbonique à partir du surnageant est réalisée en 3 étapes :

- 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.