

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : STL
Spécialité biotechnologies

SESSION 2014

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 la calculatrice est autorisé.

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

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

SESSION 2014

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 la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte **6** pages.

Partie 1 : pages 2 à 3

Partie 2 : pages 4 à 6

Les 2 parties sont indépendantes.

L'évaluation tiendra compte de la qualité de l'expression et de la communication.

Première partie - Régulation de la glycémie (8 points)

Le glucose est une molécule qui occupe une place prépondérante dans le métabolisme énergétique. Sa concentration plasmatique, appelée glycémie, est soumise à des variations. Des mécanismes régulateurs permettent de limiter l'amplitude de ces variations.

Afin de mettre en évidence ces modalités de régulation de la glycémie, on étudie le rôle du pancréas et du foie à partir d'une expérience historique.

Une molécule de glucose est donnée en représentation de Fischer dans le **document A**.

- 1.1. Recopier cette molécule en représentation de Fischer sur la copie et :
- identifier par un astérisque (*) les atomes de carbone asymétriques,
 - entourer et nommer les groupes caractéristiques des fonctions chimiques,
 - préciser la série (D ou L) à laquelle appartient cette molécule de glucose.

La glycémie est régulée en particulier grâce à l'intervention de deux hormones A et B synthétisées par une glande mixte : le pancréas. Le **document B** présente un graphique des variations de concentrations plasmatiques de ces deux hormones en fonction de la glycémie.

1.2. Proposer une définition du terme hormone.

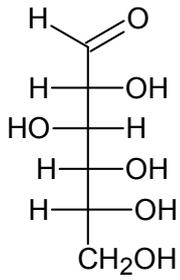
1.3. L'insuline est une hormone hypoglycémiante, le glucagon est une hormone hyperglycémiante. En s'appuyant sur l'analyse graphique du **document B**, nommer les deux hormones pancréatiques A et B et justifier la réponse.

Le **document C** présente des variations au cours du temps de la glycémie et du taux de glycogène hépatique, avant et après ablation du pancréas chez un chien à jeun (ablation effectuée deux heures après le début des mesures).

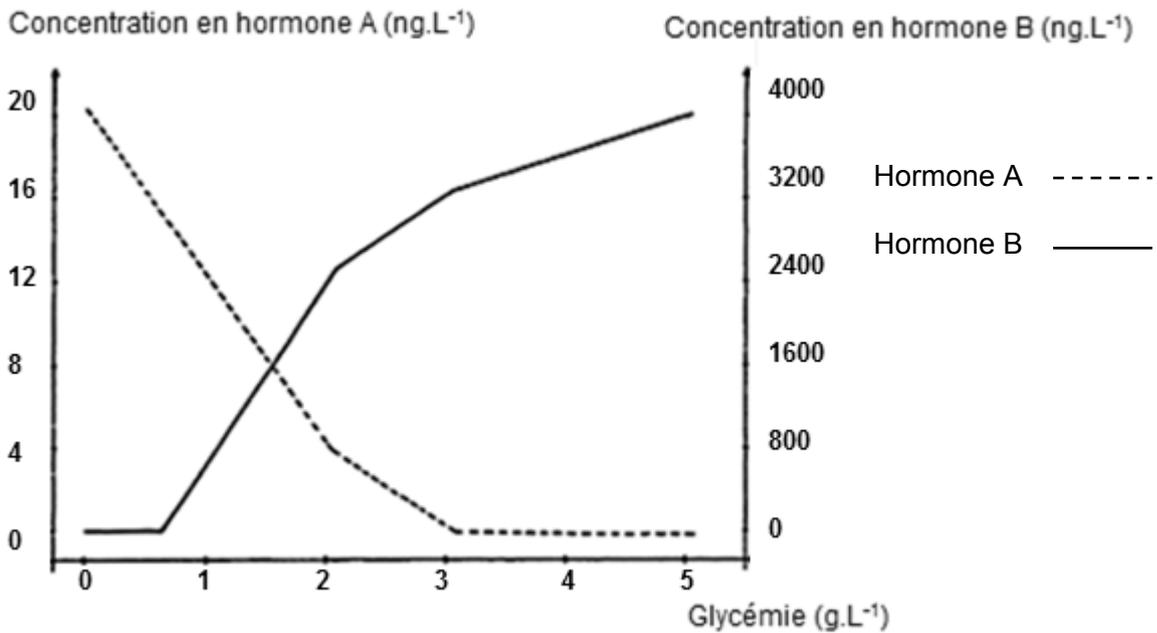
1.4. Indiquer comment varient la glycémie et le taux de glycogène hépatique chez ce chien. Proposer une explication quant au lien qui existerait entre ces deux observations.

1.5. En mettant en relation les documents B et C, expliquer quelle hormone pourrait être injectée à ce chien pour restaurer une glycémie normale.

Document A : représentation de Fischer d'une molécule de glucose sous sa forme linéaire



Document B : variations des concentrations plasmatiques de deux hormones pancréatiques A et B



Document C : conséquences de l'ablation du pancréas chez un chien à jeun (expérience historique)

Temps (heure)	Glycémie (g.L ⁻¹)	Glycogène hépatique (en % de la masse du foie)
0	1	2,8
1	0,9	2,7
2	1	2,6
3	1,2	2,5
4	1,5	2,3
5	1,8	2,1
6	2,4	1,9
7	2,8	1,7
8	3,0	1,5
9	3,2	1,3
10	3,2	1,1
11	3,3	1,0
12	3,4	1,0
13	3,4	0,9

Ablation du pancréas →

Deuxième partie - Le diabète insipide central (DIC) chez l'enfant (12 points)

Le diabète insipide central (DIC) de l'enfant est une pathologie rare qui se manifeste avant l'âge de dix ans. L'enfant présente une polyurie (accroissement du volume d'urine émis en 24 h) pouvant dépasser les 10 L d'urine par jour. Une perte de poids y est fréquemment associée. Un ralentissement de la croissance est possible.

On identifie des cas de DIC génétique lié à une mutation du gène AVP-NP_{II} responsable de la synthèse de l'ADH (hormone antidiurétique dénommée aussi vasopressine).

Cette mutation est responsable d'un déficit de synthèse de l'ADH.

Source : article Juliane Léger (cf. page « Articles médicaux & scientifiques » du site de l'Association française du diabète insipide)

On se propose de mettre en évidence le mécanisme biochimique responsable du déficit de synthèse de l'ADH et la conséquence physiologique de cette carence.

Mode de transmission du DIC héréditaire

L'arbre généalogique d'une famille dont certains membres présentent les symptômes d'un DIC est figuré sur le **document D**. Les symboles a_1 ou a_2 seront utilisés pour désigner les deux allèles du gène AVP-NP_{II}, a_2 symbolisant l'allèle muté.

2.1. L'allèle a_2 responsable du DIC est dominant. Justifier cette affirmation.

2.2. Poursuivre l'analyse afin de déduire si le gène est porté par un chromosome sexuel ou non sexuel.

Le couple identifié (II7, II8) attend un troisième enfant.

2.3. Etablir les génotypes du couple (II7, II8), en justifiant la réponse.

2.4. Construire un échiquier de croisement et en déduire la probabilité que ce couple ait un enfant atteint de DIC.

Séquence des allèles a_1 et a_2 de l'ADH

Le **document E** présente un extrait de la séquence nucléotidique de chaque allèle du gène AVP-NP_{II}. Seul le brin d'ADN matrice (brin transcrit) est représenté. Sur les trois exons et deux introns du gène, seuls sont indiqués les 3 triplets de la fin de l'exon 2.

2.5. Comparer les séquences de nucléotides dans le **document E** afin de mettre en évidence la mutation à l'origine du DIC et, à l'aide du **tableau du code génétique**, expliquer la conséquence de cette mutation au niveau de la séquence de l'ADH.

Rôle de l'ADH dans la réabsorption d'eau tubulaire rénale

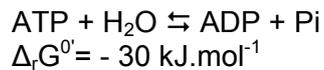
La réabsorption d'eau par les cellules rénales est due à la présence de canaux membranaires hydriques, les AQuaporines (AQP). L'ouverture des aquaporines (AQP) dépend d'une réaction de phosphorylation. Une AQP phosphorylée permet la réabsorption d'eau alors qu'une AQP non phosphorylée est fermée.

L'ADH permet les réactions enzymatiques de phosphorylations dans les cellules rénales.

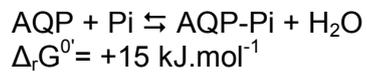
On étudie les conditions thermodynamiques permettant l'ouverture de ce canal hydrique.

Deux réactions sont étudiées :

Réaction 1 : réaction d'hydrolyse de l'ATP :



Réaction 2 : réaction de phosphorylation de l'AQP :



Pi correspond à un phosphate inorganique.

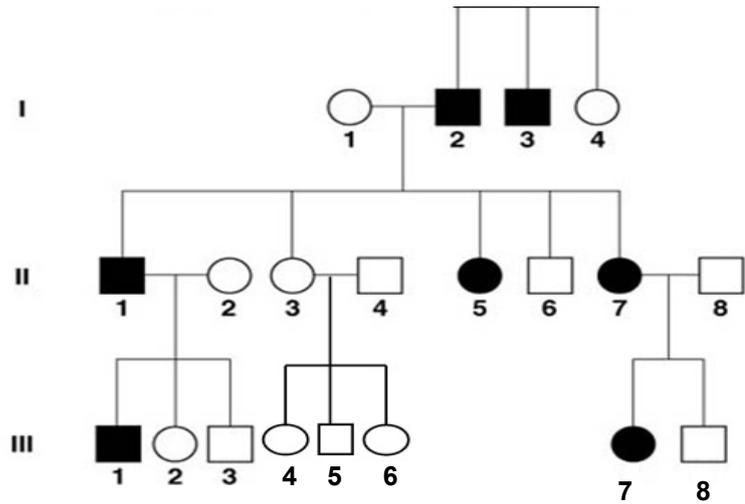
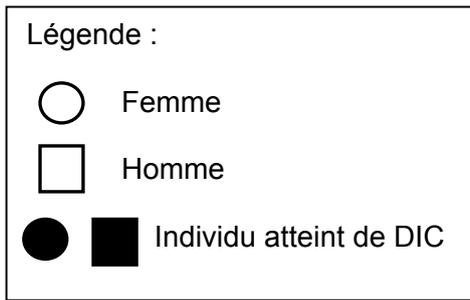
2.6. Déterminer, en justifiant, si chaque réaction (1) et (2) est favorisée ou non dans les conditions biologiques : pH = 7,0 et T = 310 K.

2.7. Ecrire la réaction de couplage chimio-chimique (ou couplage énergétique) entre ATP et AQP.

2.8. Calculer l'enthalpie libre standard de réaction $\Delta_r G^{0'}$ de la réaction trouvée en 2.7. Conclure quant à l'intérêt de ce couplage pour l'ouverture de l'AQP.

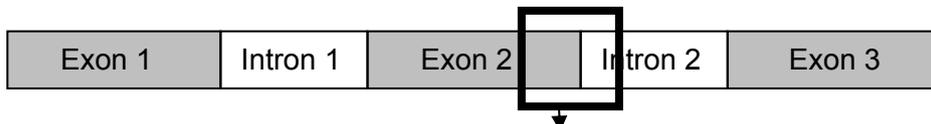
2.9. Expliquer la conséquence d'une ADH modifiée ou d'un déficit en ADH sur l'ouverture des aquaporines et relier cette conséquence à un des symptômes du DIC.

Document D : arbre généalogique d'une famille



<http://www.citruscollege.edu/Home.aspx>. Document modifié.

Document E : séquence partielle des allèles a_1 et a_2 de l'ADH



Exon 2 | Intron 2

Allèle a_1 (brin transcrit)GCAACGACG ...

Allèle a_2 (brin transcrit)GCAACGACT ...

Document de référence : tableau présentant le code génétique

		DEUXIÈME NUCLEOTIDE								
		U	C	A	G					
PREMIER NUCLEOTIDE	U	UUU	Phé	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC	Phé	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
						TROISIEME NUCLEOTIDE				

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2014

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 la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte **8** pages.

CONTRÔLE DU LAIT DE VACHE DANS LE CAS DE MAMMITES BOVINES

En cas de développement d'une mammite (inflammation des glandes mammaires) chez une vache, la qualité du lait produit est affectée (teneur en matière grasse, teneur en protéine, teneur en lactose et concentration en ions).

Lorsque la mammite est d'origine infectieuse, un traitement antibiotique des animaux malades est nécessaire. L'éleveur se doit alors d'exclure le lait des vaches traitées afin qu'il ne soit retrouvé aucun antibiotique dans le lait commercialisé.

La qualité du lait est très contrôlée dans l'industrie laitière, car elle conditionne le bon déroulement des processus de transformation du lait en produits dérivés (yaourts, fromages...). En effet, une faible teneur en lactose limite le phénomène de coagulation des protéines lors de la fermentation par les bactéries lactiques. D'autre part, la présence d'antibiotique ralentit le développement bactérien nécessaire à la fermentation.

Avant chaque livraison, une entreprise spécialisée dans la production de dérivés laitiers doit réaliser plusieurs contrôles avant la transformation du lait dont :

- une détermination de la concentration massique en lactose ;
- une recherche d'antibiotiques résiduels.

Ces contrôles qualités entraînent une longue immobilisation du lait avant transformation. Dans une démarche d'amélioration continue et de réduction du temps d'immobilisation du lait, un test alternatif de détection d'antibiotique est en cours de validation. Dans cette optique, la recherche d'antibiotique est réalisée par méthode classique microbiologique et méthode alternative de type immuno-chromatographique.

1. DOSAGE DU LACTOSE DANS LE LAIT DE VACHE

Le dosage du lactose par une méthode enzymatique est effectué sur le lait réceptionné par l'entreprise,. Le principe, le mode opératoire du dosage ainsi que les spectres d'absorption du NAD^+ et du NADH, H^+ sont présentés dans les **documents 1 et 2**.

- Q1.** Montrer que ce dosage enzymatique fait appel à une méthode en point final.
- Q2.** Expliquer le choix de la longueur d'onde de lecture de l'absorbance à 340 nm.
- Q3.** Calculer, en g.L^{-1} , la concentration en lactose du lait testé.
- Q4.** Exprimer le résultat de la concentration en lactose en g pour 100mL de lait, avec son incertitude, à l'aide du **document 3**, sachant que $u_c = 0,04$ g de lactose dans 100 mL de lait.
- Q5.** Conclure, sachant que le lait utilisable par l'entreprise doit avoir une concentration en lactose comprise entre 4,5 et 5,0 g pour 100 mL de lait.

2. DÉTECTION D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT DE VACHE PAR MÉTHODE MICROBIOLOGIQUE

Le laboratoire de contrôle recherche la présence d'antibiotiques dans le lait testé. Les principes de ces tests sont décrits dans les documents 4 et 5.

La méthode utilisée en routine dans le laboratoire de contrôle comporte deux étapes successives.

La première étape consiste en un test de détection par mesure de l'acidification.

- Q6.** Après analyse du document 4, établir la composition qualitative des témoins positif et négatif.
- Q7.** Interpréter les résultats des témoins.
- Q8.** En déduire la présence éventuelle d'antibiotique dans le lait testé et conclure.

En cas de résultat positif, un test de confirmation par diffusion en gélose est réalisé.

- Q9.** Expliquer le rôle des deux témoins présentés dans le document 5.
- Q10.** Réaliser un schéma annoté de la boîte de Pétri après incubation.
- Q11.** Analyser les résultats obtenus et argumenter pour justifier le rejet du lait par l'industriel.

3. DÉTECTION D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT PAR UNE MÉTHODE ALTERNATIVE

Un des enjeux pour l'entreprise est de réduire l'immobilisation du lait après livraison, due aux contrôles qualités. Le laboratoire met en place une technique alternative : le test Béta-Star[®] (Néogen), dont le principe est présenté dans le document 6.

Pour valider l'utilisation de ce test en routine, le laboratoire compare les résultats obtenus par test Béta-Star[®] avec ceux des tests classiques réalisés précédemment.

- Q12.** Synthétiser par une représentation schématique légendée l'assemblage moléculaire qui se forme dans le cas d'un lait contenant un antibiotique lors de la première étape du test.
- Q13.** Montrer comment le phénomène de compétition permet d'expliquer l'absence de bande au niveau de la zone test dans le cas d'un lait contenant un antibiotique.
- Q14.** Analyser les résultats obtenus et conclure.

SYNTHESE

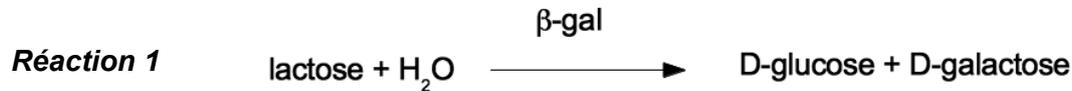
- Q15.** Comparer le test Béta-Star[®] alternatif et les tests microbiologiques classiques. Argumenter quant au test le plus avantageux pour l'industriel.
- Q16.** Rédiger une synthèse des résultats d'analyse du lait testé permettant de conclure sur l'utilisation possible ou non du lait analysé pour la fabrication de produits dérivés.

DOCUMENT 1 : Dosage du lactose du lait par méthode enzymatique

(d'après la fiche technique Biosentec, coffret de dosage « lactose/galactose »)

Principe

La concentration en lactose est proportionnelle à la concentration de NADH,H⁺ formé



- NAD⁺ : nicotinamide-adénine-dinucléotide
- NADH,H⁺ : nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit
- β-Gal : β-galactosidase
- Gal-DH : galactose-déshydrogénase

Préparation de l'échantillon de lait testé

- Déprotéiniser l'échantillon de lait
- Diluer l'échantillon au **1/100**

Mode opératoire

Dans une cuve pour spectrophotomètre :

- Ajouter l'échantillon dilué, le tampon et la β-galactosidase.
- Mélanger et incuber 20 minutes entre 20°C et 37°C.
- Ajouter ensuite la galactose-déshydrogénase et le NAD⁺, en excès.
- Mélanger et incuber 30 minutes environ, entre 20°C et 37°C.
- Lire l'absorbance à 340 nm.
- Réaliser en parallèle le dosage à partir d'une solution étalon de lactose

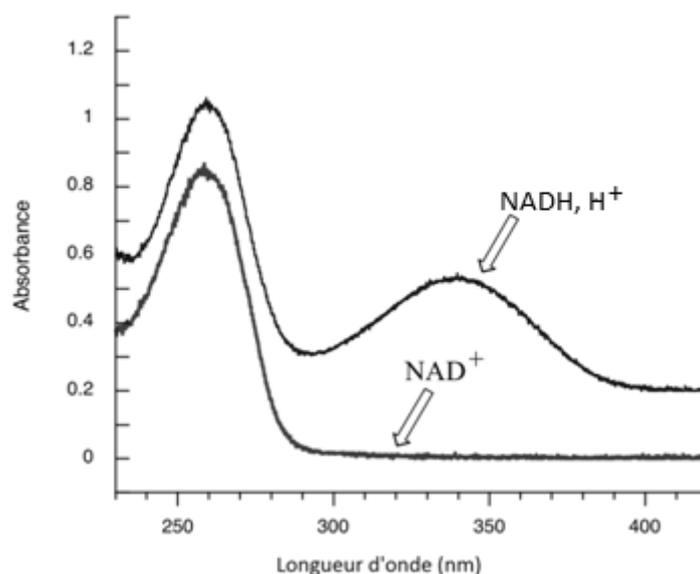
Résultats

	Etalon	Lait testé
Absorbance à 340 nm	0,800	0,754

Données

$$\rho_{\text{(lactose ; étalon)}} = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$$

DOCUMENT 2 : Spectre d'absorption du NAD^+ et du NADH, H^+



DOCUMENT 3 : Expression du résultat de mesure (aide mémoire de métrologie)

L'incertitude élargie U est calculée en multipliant l'incertitude-type composée u_c par le facteur d'élargissement k associé à un niveau de confiance donné. La valeur de k généralement utilisée est de 2, ce qui correspond à un niveau de confiance d'environ 95 %.

L'incertitude élargie U est ensuite arrondie selon les cas :

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif.

Dans certains cas, l'incertitude élargie U est directement donnée avec son niveau de confiance.

Pour l'arrondissement du résultat, le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

Grandeur mesurée = (valeur retenue $\pm U$) unité

DOCUMENT 4 : Test d'acidification

Principe

Le lait testé est inoculé par une souche de *Geobacillus stearothermophilus*. En absence d'antibiotique, cette bactérie se multiplie dans le lait enrichi en nutriments et produit des composés acides. La production d'acides est comparée à celle de cultures témoins effectuées avec ou sans antibiotiques.

Mode opératoire

- Chauffer l'échantillon de lait 5 minutes à 80°C
- Ajouter l'extrait de levure (source de nutriments) et l'indicateur de pH
- Ajuster le pH à 7
- Ensemencer avec une souche de *Geobacillus stearothermophilus*
- Incuber 2h30 à 64°C

Résultat

échantillon de lait	lait témoin « positif »	lait témoin « négatif »	lait testé
Couleur du milieu après incubation	violet	jaune	violet

Données

L'indicateur de pH utilisé est le bromocrésol pourpre dont la variation de couleur en fonction du pH est donnée dans le tableau ci-dessous.

	pH ≤ 5,2	5,2 ≤ pH ≤ 6,8	pH ≥ 6,8
Bromocrésol pourpre	jaune	zone de virage	violet

Geobacillus stearothermophilus est sensible aux antibiotiques suivants : pénicilline G, tétracycline

DOCUMENT 5 : Test de confirmation

Principe

Les antibiotiques éventuellement présents dans le lait diffusent du disque imprégné de lait vers la gélose et inhibent la croissance du microorganisme test. Il en résulte la formation d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné de lait.

Mode opératoire

Sur un milieu nutritif solide coulé en boîte de Petri :

- Ensemencer le milieu par la souche de *Geobacillus stearothermophilus* de façon à obtenir des colonies jointives mais non confluentes.
- A la surface du milieu ensemencé, déposer 3 disques de papier filtre de 6 mm de diamètre préalablement imprégnés de :
 - Témoin 1 : lait stérile sans antibiotique
 - Témoin 2 : lait stérile contenant $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de pénicilline G
 - Lait testé
- Incuber 24 heures à la température optimale de l'espèce bactérienne utilisée.

Résultat

Echantillons de lait	Témoin 1	Témoin 2	Lait testé
Diamètre d'inhibition (en mm)	6	20	15

Données

Les échantillons positifs donnent des zones d'inhibition d'au moins 10 mm de diamètre.

Geobacillus stearothermophilus est sensible aux antibiotiques suivants : pénicilline G, tétracycline

DOCUMENT 6 : Test Béta-Star® - méthode de type immuno-chromatographique

Principe - Mode opératoire

Le test Béta-Star® utilise un récepteur spécifique aux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, couplé à des particules d'or colloïdal, à l'origine d'une coloration rouge lorsqu'elles sont concentrées.

- **1^{ère} étape** : Un volume de lait à tester est incubé pendant 3 minutes dans un flacon contenant les récepteurs spécifiques liés aux particules d'or.
- **2^{ème} étape** : une bandelette immuno-chromatographique est alors plongée dans le mélange lait-récepteurs (obtenu à l'étape 1) et incubée 2 minutes. Durant les 2 minutes, le lait migre par capillarité sur le support pour atteindre deux lignes de capture :
 - **la ligne test** :
A l'emplacement de cette ligne se trouvent des molécules d'antibiotique immobilisées sur la bandelette. Les récepteurs « libres » (non liés aux antibiotiques) migrent sur la bandelette et se fixent sur les molécules d'antibiotique immobilisées.
 - ✓ Une coloration rouge intense apparaît en absence de bêta-lactamines.
 - ✓ On n'observe pas de coloration en présence de bêta-lactamines dans le lait.
 - **la ligne contrôle** :
L'apparition d'une coloration rouge permet de contrôler la validité du test.

Résultat

- Immuno-chromatogramme A : lait testé
- Immuno-chromatogramme B : témoin positif, lait contenant des bêta-lactamines
- Immuno-chromatogramme C : témoin négatif, lait ne contenant pas de bêta-lactamines

