

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

MARDI 17 JUIN 2014

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 8 pages.

Partie 1 : pages 2 à 4

Partie 2 : pages 5 à 8

Les 2 parties sont indépendantes.

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

Les perturbateurs endocriniens : Etude des effets du bisphénol A (BPA) sur la reproduction

Début 2013, l'Organisation Mondiale de la Santé a publié un rapport sur les perturbateurs endocriniens, dans lequel elle évalue l'impact de ces produits chimiques sur la santé publique. Le nombre de pathologies liées à une dérégulation du système hormonal augmente depuis vingt ans. L'implication de ces molécules dans ces pathologies est suspectée. (Source : *La Recherche*, juin 2013)

Partie I - Communication hormonale et perturbateur endocrinien (8 points)

L'étude de la communication hormonale permet de comprendre les étapes susceptibles d'être affectées par le bisphénol A (BPA). L'étude est limitée à deux hormones de la reproduction, l'hormone lutéinisante (LH) et l'œstradiol.

QUESTIONS :

A l'aide des **documents A et B** et des connaissances acquises lors de la formation, répondre aux questions suivantes :

- 1.1. Décrire les étapes de la communication hormonale, de la cellule endocrine sécrétrice à l'effet biologique observé.
- 1.2. Dans le **document A**, une des cellules est insensible aux 2 hormones étudiées. Expliquer cette insensibilité.
- 1.3. Identifier sur les formules de l'œstradiol et de la sous-unité α de la LH les fonctions chimiques signalées par les flèches repérées de A à D.
- 1.4. Indiquer la signification des symboles \blacktriangle et $\dot{\equiv}$ sur la molécule de l'œstradiol.
- 1.5. Sur la sous-unité α de la LH, identifier le(s) numéro(s) du (des) atome(s) de carbone asymétrique(s).
- 1.6. Choisir parmi les propositions A et B du **document C** celle qui modélise au mieux :
 - la molécule d'œstradiol,
 - la molécule de BPA.Justifier les choix.
- 1.7. Expliquer pourquoi, des deux hormones étudiées, la voie faisant intervenir l'œstradiol est affectée par le BPA.

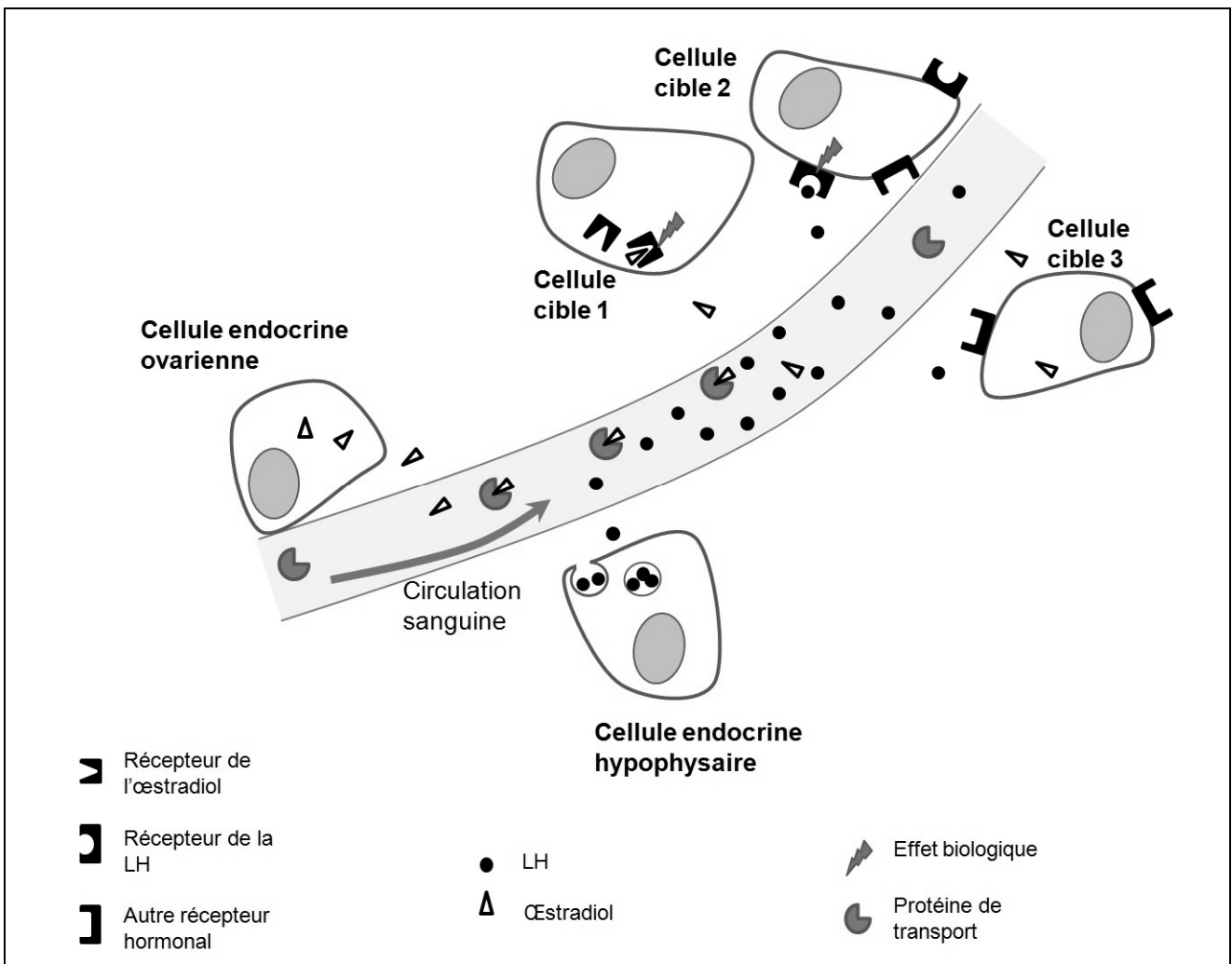
DOCUMENTS :

Document A : mécanisme d'action des hormones

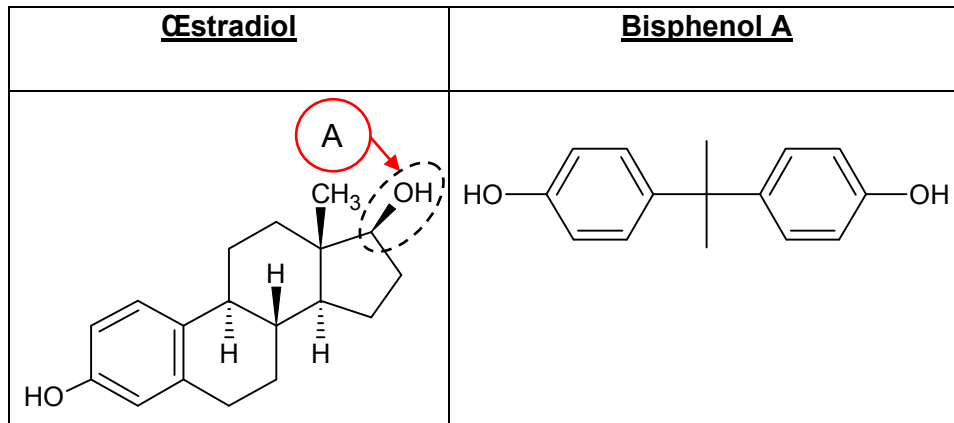
Document B : structure de l'œstradiol, du BPA et de la sous-unité α de la LH

Document C : propositions de modélisation

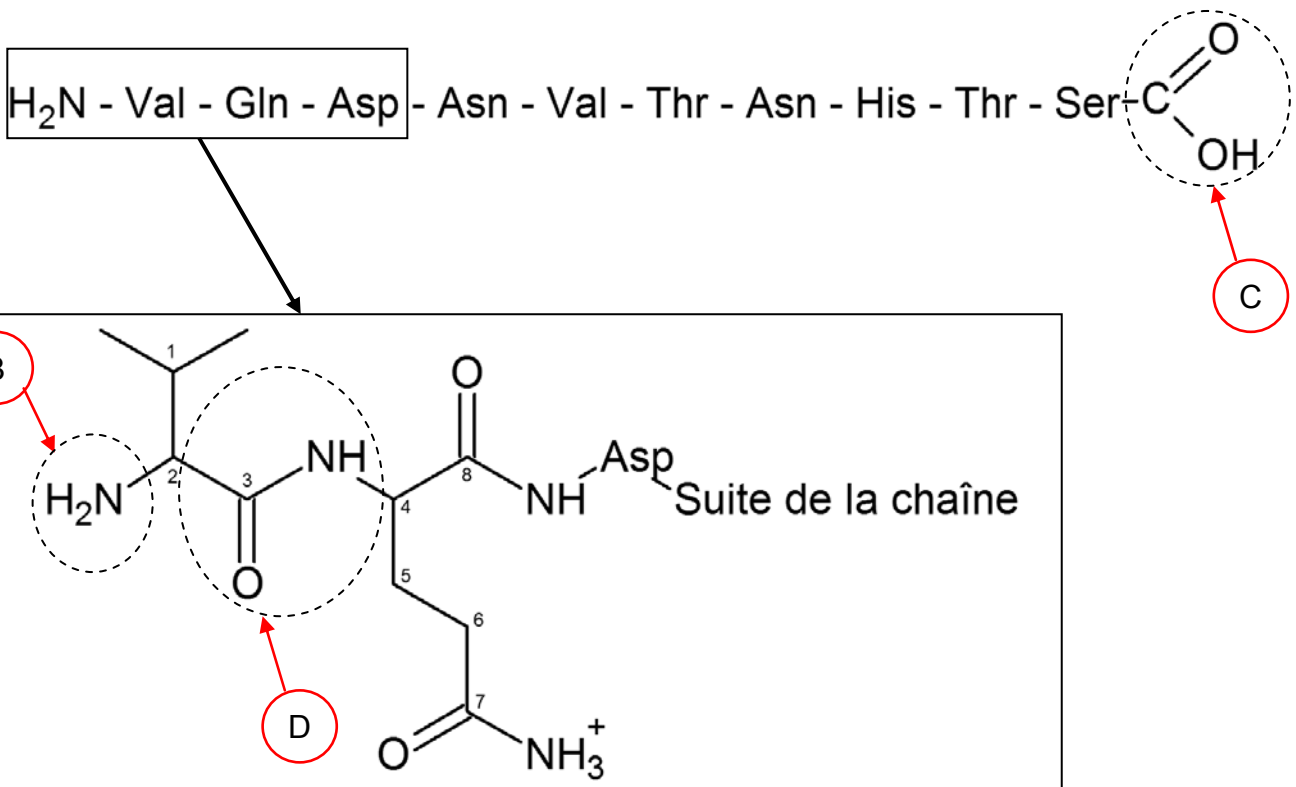
Document A : mécanisme d'action des hormones



Document B : structures de l'œstradiol, du BPA, de la sous-unité α de la LH



Sous-unité α de l'hormone lutéinisante LH



Les numéros de 1 à 8 désignent des atomes de carbone.

Document C : propositions de modélisation

	Proposition A	Proposition B
Modèle		
Représentation	<p>■ : région hydrophobe □ : région hydrophile</p>	

Partie II - Etude des effets du bisphénol A (BPA) sur la reproduction (12 points)

On cherche à montrer que le BPA est non seulement un perturbateur endocrinien dans l'organisme, mais qu'il peut être aussi à l'origine de perturbations au niveau d'autres mécanismes de la reproduction sexuée.

QUESTIONS :

A l'aide des **documents D à F** et des connaissances acquises lors de la formation, répondre aux questions suivantes.

Etude des effets du BPA sur la sensibilité de l'hypophyse à la GnRH (expérience historique)

- 2.1. Relever la concentration plasmatique de LH avant injection de GnRH.
- 2.2. Décrire les résultats présentés dans le **document E** et conclure sur le rôle de la GnRH.
- 2.3. Déterminer les conséquences du traitement au BPA.
- 2.4. Proposer à quel niveau de l'axe gonadotrope (ou axe hypothalamo-hypophysaire) a lieu l'action du BPA. Justifier la réponse.

Etude des effets du BPA sur la méiose

Une équipe de l'université de Barcelone a mené des travaux de recherche sur les effets *in vitro* du BPA sur des ovocytes humains.

Leurs résultats révèlent que 27% des ovocytes incubés avec du BPA présentent des anomalies.

Les figures du **document F** présentent différentes étapes de la méiose d'une cellule animale ($2n = 4$).

- 2.5. Associer chaque étape présentée (a à f) à la première ou à la deuxième division de méiose.
- 2.6. Préciser la ou les étape(s) dans lesquelles les cellules sont diploïdes.
- 2.7. Classer les figures dans l'ordre chronologique de la méiose en recopiant les lettres sur la copie.

Des résultats de recherche semblent montrer que le BPA augmente le nombre de crossing-over en prophase I. Cela pourrait se traduire par un nombre plus élevé de non disjonction de paires de chromosomes lors de l'anaphase I.

- 2.8. Sur le modèle **du document F**, schématiser sur la copie les gamètes obtenus à la fin de la méiose dans le cas où l'anaphase I est perturbée par la présence de BPA.
- 2.9. Indiquer les conséquences possibles sur le contenu chromosomique de la cellule obtenue après fécondation de ces gamètes par un gamète normal.
- 2.10. Rédiger, en une cinquantaine de mots, une synthèse résumant les différents effets du BPA sur la reproduction.

DOCUMENTS :

Document D : protocole de l'expérience : injection de GnRH sans ou avec traitement au BPA

Document E : évolution des concentrations plasmatiques de LH avant et après injection de GnRH chez les brebis non traitées ou traitées au BPA.

Document F : cellules issues des étapes de la méiose d'une cellule animale ($2n = 4$)

Document D :

Protocole de l'expérience : injection de GnRH avec ou sans traitement au BPA

- L'expérience est menée sur des brebis stérilisées par ablation des ovaires.
- Etape préparatoire : injections d'œstradiol quelques heures avant l'expérience (les concentrations plasmatiques en œstradiol sont contrôlées et restent faibles).
- Les brebis sont réparties en deux lots :

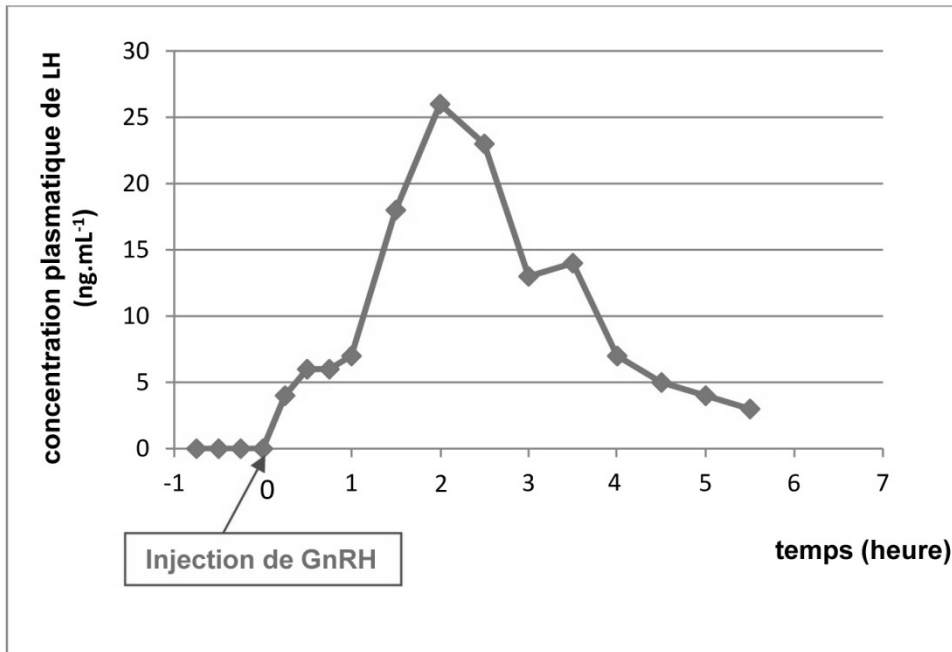
Lot 1 : brebis non traitées (injection d'eau physiologique)	Lot 2 : brebis traitées par injection de BPA
Injection par voie intramusculaire d'eau physiologique, 2 fois par semaine pendant 8 semaines.	Injection par voie intramusculaire de BPA à la dose de 3.5 mg par kg de masse corporelle, 2 fois par semaine pendant 8 semaines.
La 8 ^e semaine, injection de GnRH à 10,5 ng par kg de masse corporelle	La 8 ^e semaine, injection de GnRH à 10,5 ng par kg de masse corporelle

- Pendant les 45 min précédant l'injection de GnRH : un prélèvement sanguin est effectué toutes les 15 min.
- Après l'injection de GnRH : un prélèvement sanguin est effectué toutes les 15 min pendant 1 h, puis toutes les 30 min pendant 5 h.
- La LH plasmatique est dosée dans chaque prélèvement et les résultats sont présentés dans le **document E**.

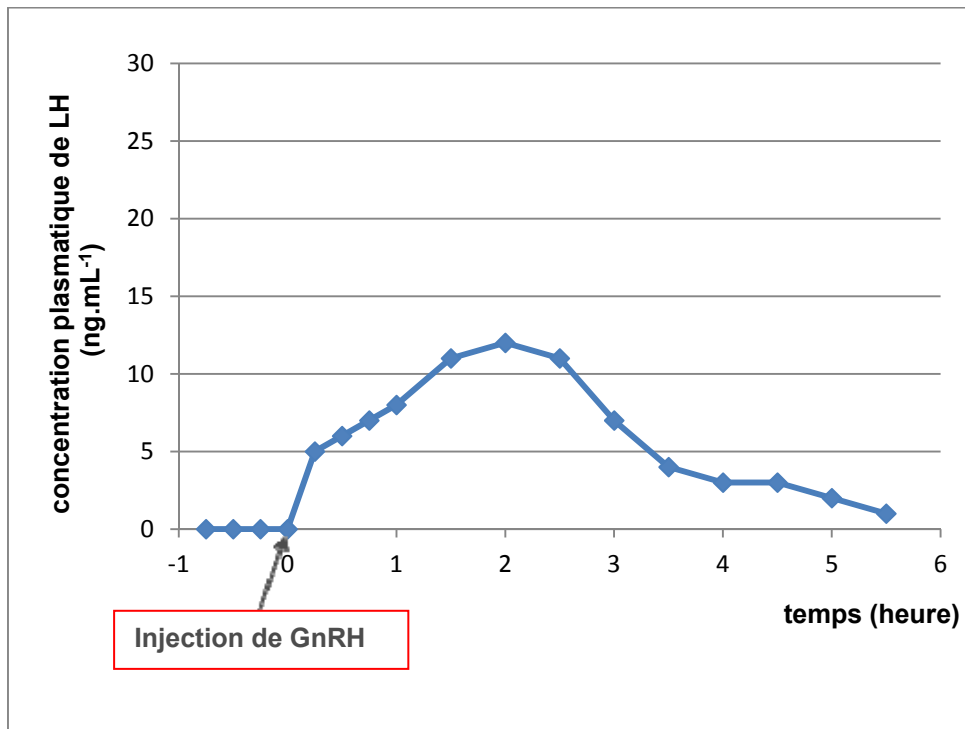
Document E :

Evolution des concentrations plasmatiques de LH avant et après injection de GnRH chez les brebis non traitées ou traitées au BPA

Lot 1 : brebis non traitées



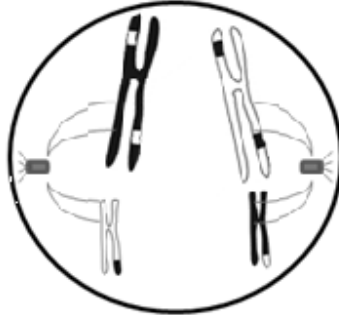
Lot 2 : brebis traitées au Bisphénol A



Document F : Cellules issues des étapes de la méiose d'une cellule animale ($2n = 4$)



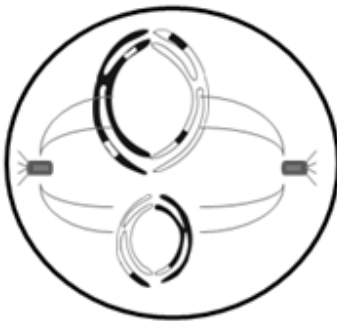
a



b



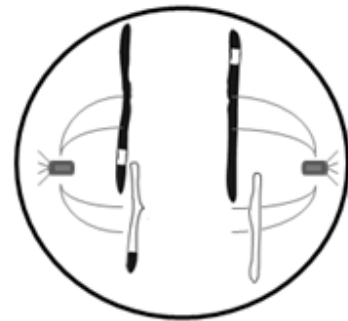
c



d



e



f

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire
Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2014

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

MARDI 17 JUIN 2014

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 **9** pages.

OPTIMISATION D'UN PROCESSUS DE FERMENTATION D'UN RÉSIDU DE L'INDUSTRIE CÉRÉALIÈRE : LE SON DE BLÉ

Une entreprise souhaite valoriser le son de blé, un des produits obtenu lors de l'extraction de la farine du grain de blé. Le son de blé subit diverses transformations qui aboutissent à un extrait liquide : le sirop de son de blé.

Ce sirop riche en glucides permet par fermentation d'obtenir de l'acide lactique capable de polymériser en acide polylactique (P.L.A.). Ce bio-polymère permet de fabriquer des emballages biodégradables.

Le laboratoire de recherche et développement de l'entreprise souhaite optimiser la production d'acide lactique en fermenteur à partir des glucides du sirop de son de blé.

Le laboratoire se donne trois objectifs :

- choisir une souche bactérienne capable d'utiliser les glucides présents dans le sirop de son de blé ;
- optimiser la production d'acide lactique par la souche sélectionnée ;
- construire une souche génétiquement modifiée productrice d'acide D-lactique.

1. CHOIX D'UNE SOUCHE PRODUCTRICE D'ACIDE LACTIQUE CAPABLE D'UTILISER LES GLUCIDES DU SIROP DE SON DE BLÉ

1.1. Identification des glucides présents dans le sirop de son de blé

Afin d'identifier les glucides présents dans le sirop de son de blé, une chromatographie sur couche mince (CCM) est réalisée.

- Q1.** Interpréter les résultats du chromatogramme fourni dans le **document 1**.
- Q2.** Tous les glucides présents dans le sirop de son de blé ne sont pas identifiables par cette CCM. Proposer une adaptation du protocole afin d'identifier tous les glucides présents.

1.2. Identification de souches capables de fermenter les glucides présents dans le sirop de son de blé et de produire de l'acide lactique

Le laboratoire dispose de plusieurs souches de *Lactobacillus* productrices d'acide lactique. La fermentation des glucides pour chaque souche est étudiée grâce à une micro-galerie. Un extrait de la fiche technique de cette micro-galerie ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans le **document 2**.

- Q3.** A partir de l'analyse du document, expliquer le principe de lecture d'une cupule positive et préciser sa couleur.
- Q4.** A partir de la réponse à la question **Q1** et des résultats fournis dans le **document 2**, argumenter le choix de la souche la plus adaptée à la production d'acide lactique à partir des glucides présents dans le sirop de son de blé.

2. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE

Afin de suivre la production d'acide lactique produit au cours de la fermentation, un dosage d'acide lactique est réalisé selon la fiche technique fournie dans le **document 3**.

2.1. Dosage de l'acide lactique

La fermentation produit deux formes d'acide lactique : l'acide L-lactique et l'acide D-lactique.

- Q5.** Repérer dans le **document 3** ce qui permet d'affirmer que le coffret de dosage choisi est adapté au dosage de ces deux formes.
- Q6.** Expliquer l'évolution de l'absorbance à 340 nm.
- Q7.** Expliquer ce qui est mesuré par chacune des absorbances A_1 , A_2 et A_3 de l'essai.
- Q8.** Calculer le volume de milieu réactionnel V_{MR} lors de la lecture de A_3 .
- Q9.** Etablir l'équation aux unités et aux valeurs numériques de $\rho_{(ac. lactique ; \text{échantillon})}$.
Vérifier, par le calcul, que $\rho_{(ac. lactique ; \text{échantillon})} = 5,6 \text{ g.L}^{-1}$.

Données : $\Delta A_{ac. lactique total} = \Delta A_{D-ac. lactique} + \Delta A_{L-ac. lactique} = 0,344$
Facteur de dilution : $Fd = 50$

2.2. Choix du milieu de culture adapté à la production d'acide lactique

Afin d'optimiser la production d'acide lactique à moindre coût, la souche de *Lactobacillus* choisie est cultivée dans deux milieux A et B dérivés du milieu MRS additionné des glucides du sirop de son de blé (présentés dans le **document 4**)

Les sources d'azote présentes dans les milieux de culture comme les peptones, les extraits de levure et les extraits de viande, sont des ingrédients coûteux pour les industriels. Les éléments minéraux le sont beaucoup moins.

L'entreprise choisit le milieu B pour la production d'acide lactique.

- Q10.** Argumenter ce choix à l'aide du **document 4**.

3. CONSTRUCTION D'UN LACTOBACILLUS GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉ PRODUCTEUR D'ACIDE D-LACTIQUE

Afin de produire des bio-polymères de P.L.A. plus résistants, il est préférable d'utiliser la forme D de l'acide lactique.

Pour cela, la souche de *Lactobacillus* choisie a été modifiée génétiquement : le gène codant la L-LDH a été inactivé puis un plasmide noté pD-LDH contenant le gène D-LDH a été introduit dans cette souche.

- Q11.** Schématiser et annoter les deux étapes décrites ci-dessus permettant d'obtenir la souche génétiquement modifiée à partir de la souche sauvage de *Lactobacillus*.

Le technicien veut vérifier l'identité du plasmide introduit dans la souche de *Lactobacillus*. Pour cela, il extrait le plasmide et réalise une digestion enzymatique suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose.

Le **document 5** présente la carte de restriction du plasmide pD-LDH ainsi que les résultats de la migration électrophorétique après coupure du plasmide extrait par les enzymes de restriction *BamH1* et *Pst1*.

Q12. Déterminer la taille approximative des fragments d'ADN obtenus après coupure par les enzymes de restriction.

Q13. Démontrer que le plasmide extrait correspond au plasmide pD-LDH.

SYNTHESE

Q14. Rédiger une synthèse regroupant l'ensemble des éléments permettant une production optimale, à moindre coût d'acide D-lactique à partir du sirop de son de blé.

Q15. Proposer un avantage de fabriquer des emballages à partir d'un bio-polymère de l'acide lactique.

DOCUMENT 1 : Chromatographie sur couche mince du sirop de son de blé

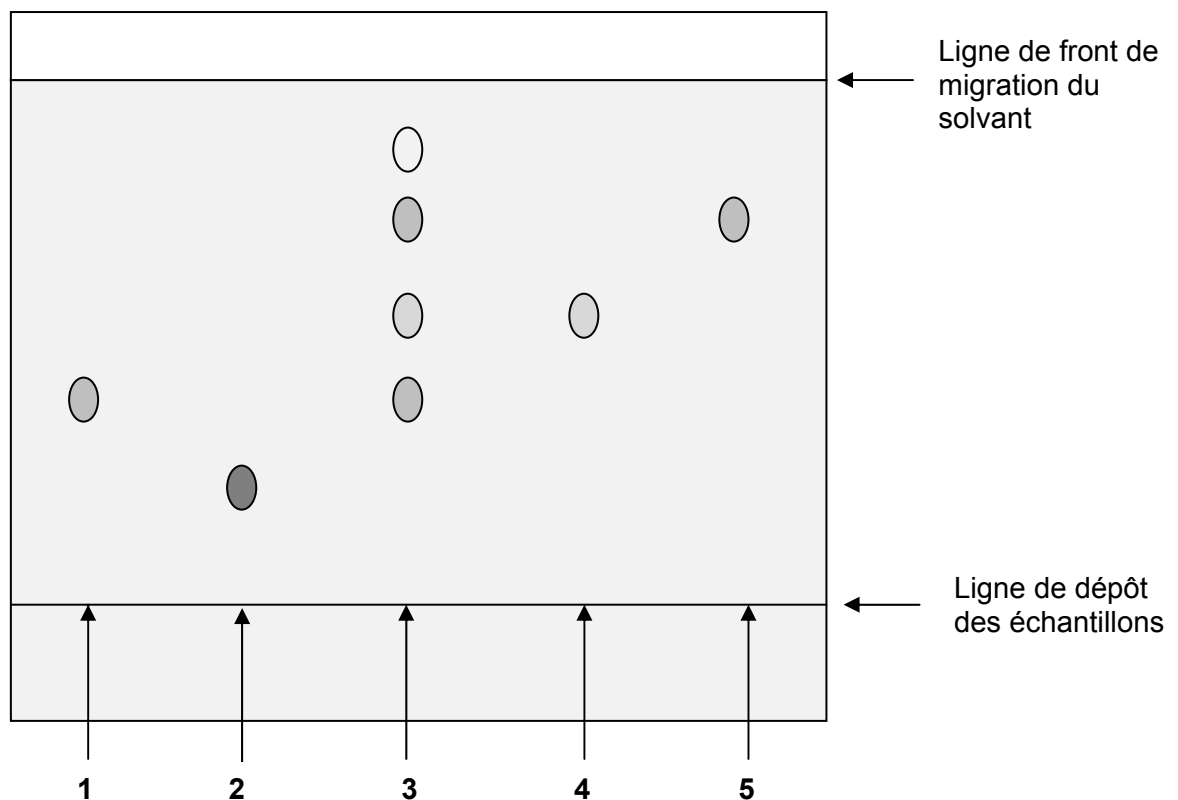
Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode de séparation qui permet l'identification des différents constituants d'un mélange.

Cette technique repose sur la différence de solubilité d'une substance dans deux phases non miscibles :

- la phase stationnaire, liée au support adsorbant ; c'est une couche de silice hydratée déposée sur une feuille d'aluminium ;
- la phase mobile constituée par le solvant ; le solvant est choisi pour son aptitude à solubiliser sélectivement les constituants du mélange sans réagir avec eux.

Résultats obtenus pour le sirop de son de blé



Nature des dépôts :

1. Glucose
2. Maltose
3. Echantillon de sirop de son de blé
4. Arabinose
5. Xylose

DOCUMENT 2 : Identification de la souche capable d'utiliser les glucides du son de blé

Extrait de la fiche technique de la micro-galerie « API 50 CHL Medium »

Principe : Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu « API 50 CHL Medium » puis inoculé dans chaque tube de la galerie. Chaque tube contient un glucide différent sous forme déshydratée (seule source de carbone). Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides conduit à la production d'acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique permettant l'identification du microorganisme à l'aide du logiciel d'identification.

Le milieu « API 50 CHL Medium » destiné à l'identification du genre *Lactobacillus* et germes apparentés est prêt à l'emploi.

Il permet l'étude de la fermentation des 49 glucides de la galerie « API 50 CHL Medium ».

Composition du milieu 50 CHL Medium

Polypeptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Tween 80	1 mL
Phosphate dipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0,20 g
Sulfate de manganèse	0,05 g
Bromocrésol pourpre	0,17 g
Eau déminéralisée	qsp* 1000 mL

*qsp : quantité suffisante pour

Zone de virage du bromocrésol pourpre (BCP) :

pH < 5,2 : jaune ; pH > 6,8 : pourpre

Profils de fermentation obtenus après 48 h d'incubation à 35°C

Souches	Arabinose	Glucose	Maltose	Fructose	Sorbitol	Xylose
<i>Lactobacillus curvatus</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus pentosus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	+	+	+	+	-	-

Production d'acide lactique obtenue en 24 h à 35°C, pH 5,6

La culture des différentes souches est effectuée en bouillon MRS additionné de sirop de son de blé.

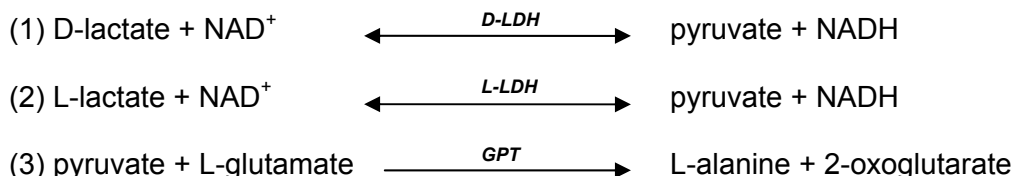
Souches	Production d'acide lactique (en g.L ⁻¹)
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1,9
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	5,6
<i>Lactobacillus pentosus</i>	4,8
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	3,2

DOCUMENT 3 : Extrait de la fiche technique du coffret de dosage de l'acide lactique

Principe

Le dosage de l'acide lactique dans l'échantillon nécessite que cette molécule soit consommée grâce aux réactions mises en jeu, celles-ci doivent donc être totalement déplacées vers la production de pyruvate (rôle de la réaction 3). Il est nécessaire d'attendre la fin de la réaction pour effectuer le mesurage.

Réactions mises en jeu :



D-LDH : D-lactate deshydrogénase

L-LDH : L-lactate deshydrogénase

GPT : glutamate pyruvate transaminase

L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 340 nm.
Le NADH absorbe à 340 nm.

Mode opératoire

Réactifs en quantité suffisante

R1	Tampon pH 10 ; L-glutamate en large excès.
R2	NAD ⁺
R3	GPT
R4	D-LDH
R5	L-LDH

Procédure d'essai : longueur d'onde 340 nm

Volumes en mL	Blanc	Essai
R1	1	1
R2	0,2	0,2
R3	0,02	0,02
Eau	1,0	0,9
Echantillon	0	0,1
Homogénéiser et lire l'absorbance A₁		
R4	0,02	0,02
Homogénéiser et lire l'absorbance A₂ après 45 min		
R5	0,02	0,02
Homogénéiser et lire l'absorbance A₃ après 45 min		

Ajuster le spectrophotomètre au zéro d'absorbance contre de l'eau

Calcul du $\Delta A_{\text{ac. lactique total}}$

$$\Delta A_{\text{ac. lactique total}} = \Delta A_{\text{D-ac. lactique}} + \Delta A_{\text{L-ac. lactique}}$$

avec :

$$\text{pour l'acide D-lactique : } \Delta A_{\text{D-ac. lactique}} = (A_2 - A_1)_{\text{essai}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$$

$$\text{pour l'acide L-lactique : } \Delta A_{\text{L-ac. lactique}} = (A_3 - A_2)_{\text{essai}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanc}}$$

Calcul de la concentration massique en acide lactique

$$\rho_{(\text{ac. lactique ; échantillon})} = \frac{\Delta A_{\text{ac. lactique total}}}{\varepsilon_{\text{NADH}} \cdot \ell} \times \frac{V_{\text{MR}}}{V_{\text{échantillon}}} \times M_{\text{ac. lactique}} \times Fd$$

$$\varepsilon_{\text{NADH}} = 6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

ℓ : trajet optique = 1 cm

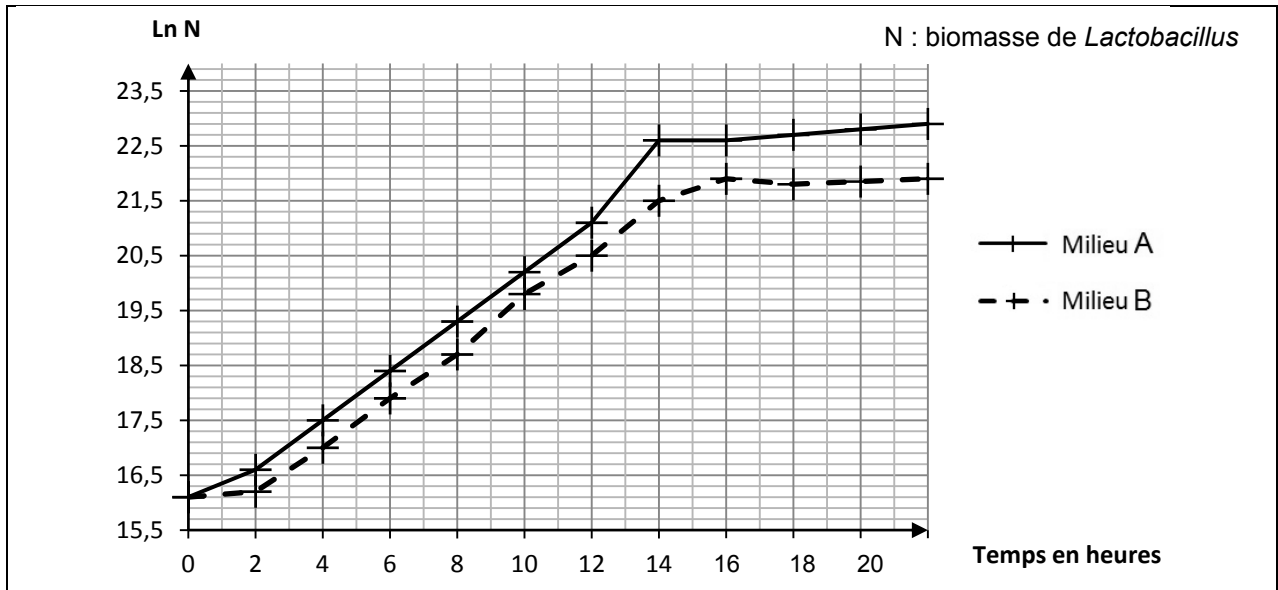
V_{MR} : volume de milieu réactionnel

$$M_{\text{ac. lactique}} = 90,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

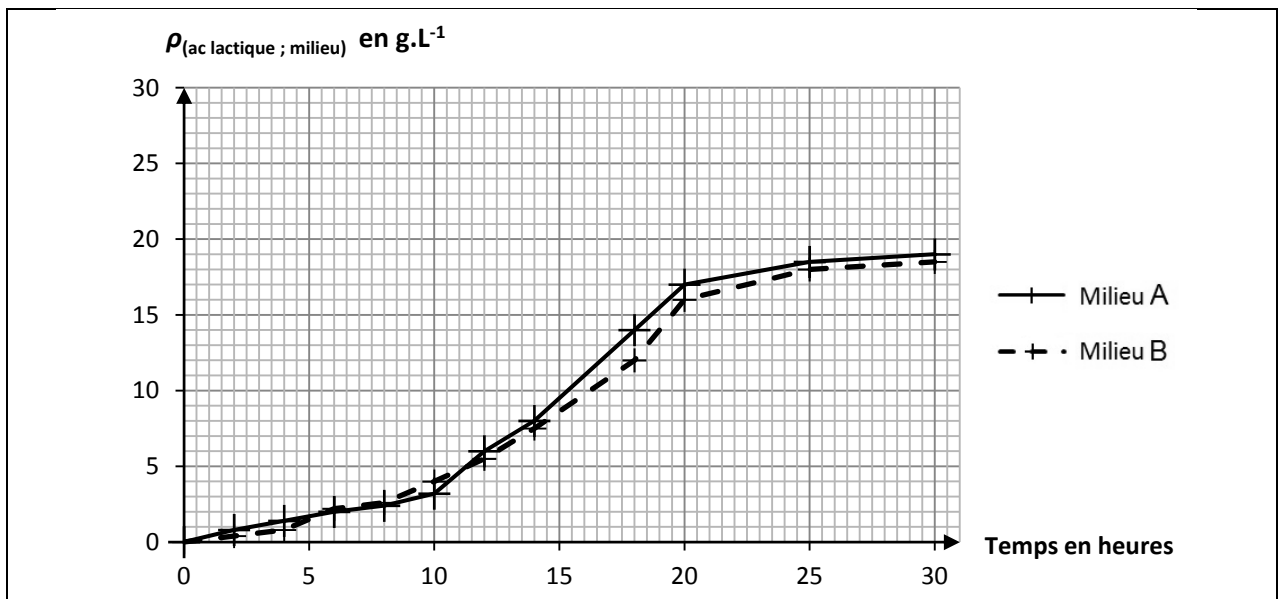
Fd : facteur de dilution

DOCUMENT 4 : Productions d'acide lactique dans deux milieux A et B

Influence du milieu de culture sur la croissance bactérienne



Influence du milieu de culture sur la production d'acide lactique

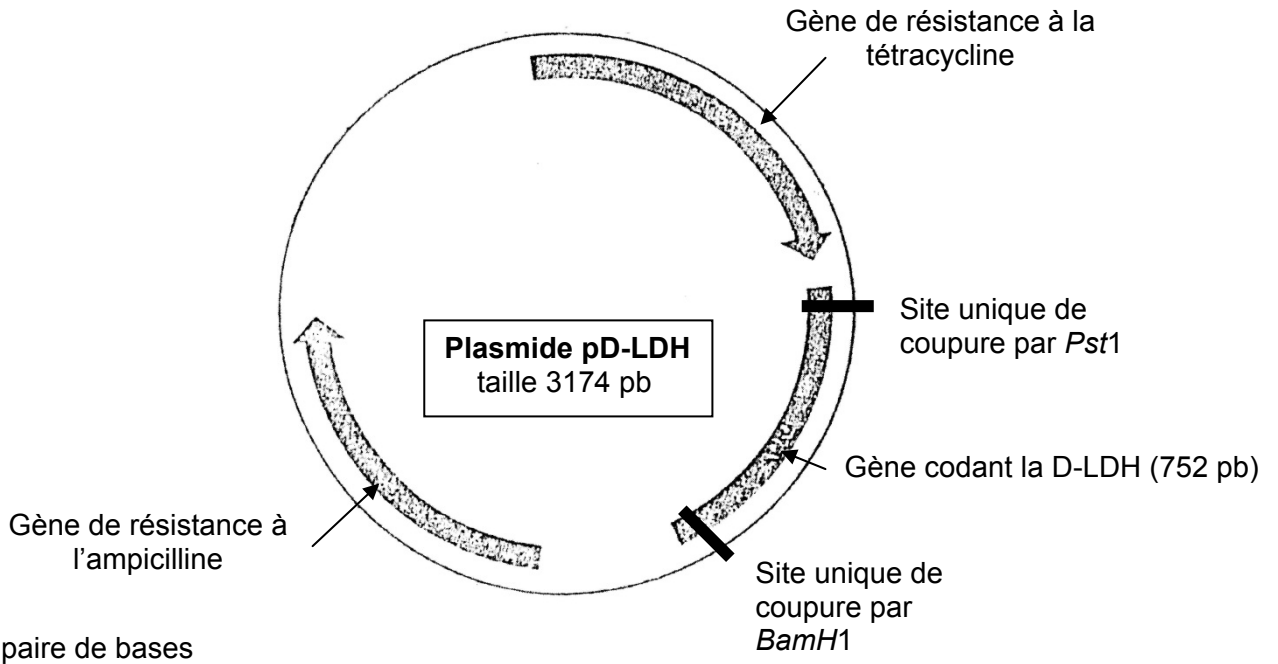


Composition des milieux A et B en g.L⁻¹

Constituants	Milieu A	Milieu B
Extrait de levure	8,75	5
Peptone de caséine	10	2,5
Extrait de viande	10	2,5
NH ₄ PO ₄	2	0,5
Tween 80	1	1
Phosphate dipotassique	2	2
Citrate de sodium	5	7,5
Phosphate d'ammonium	0,2	3
Sulfate de manganèse	0,05	0,05

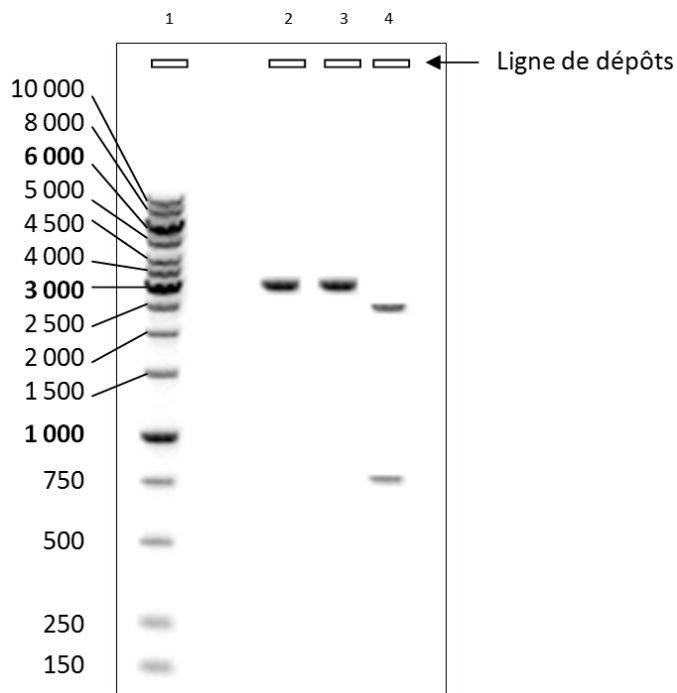
DOCUMENT 5 : Contrôle du plasmide recombinant pD-LDH

Cartographie du plasmide pD-LDH



Electrophorégramme des fragments d'ADN obtenus après coupure du plasmide extrait

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN chargés négativement en fonction de leur masse moléculaire.



- Piste 1 : marqueur de taille en paire de bases
- Piste 2 : plasmide extrait coupé par *BamH1*
- Piste 3 : plasmide extrait coupé par *Pst1*
- Piste 4 : plasmide extrait coupé par *BamH1* et *Pst1*