

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : STL
Spécialité biotechnologies

SESSION 2015

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 2015

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 7 pages.

Partie 1 : pages 2 à 3

Partie 2 : pages 4 à 7

Les 2 parties sont indépendantes.

L'évaluation tiendra compte de la qualité de la communication scientifique.

La galactosémie

La galactosémie est une maladie caractérisée par une concentration anormalement élevée de galactose dans le sang. C'est une maladie génétique qui touche un nouveau-né sur 35 000 en Europe. En l'absence de traitement, elle entraîne des manifestations graves pouvant menacer la vie du nourrisson.

Partie I : galactose et galactosémie (8 points)

Cette partie a pour objectifs d'étudier le galactose, de mettre en évidence les causes génétiques de la galactosémie et de comprendre le régime alimentaire spécifique des nourrissons atteints.

Structure et origine du galactose

À l'aide du **document A** et des connaissances acquises :

- 1.1 Nommer les fonctions chimiques du galactose à partir de sa représentation de Fischer.
- 1.2 À partir de la représentation de Fischer du galactose, indiquer le numéro du ou des atomes de carbone asymétrique(s) présent(s) dans la molécule.
- 1.3 Le galactose est un produit de la digestion du lactose. Le lactose est un oside présent dans les produits laitiers qui, au cours de la digestion, subit une réaction d'hydrolyse.
En utilisant la représentation de Haworth, établir l'équation d'hydrolyse du lactose et nommer les produits de la réaction.

Origine génétique de la galactosémie

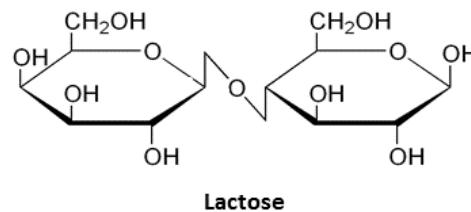
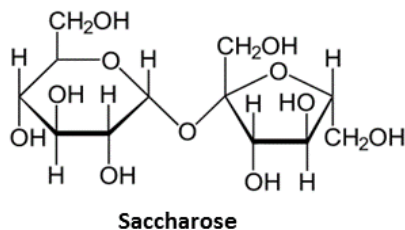
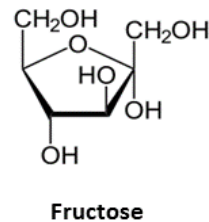
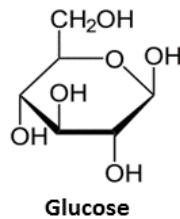
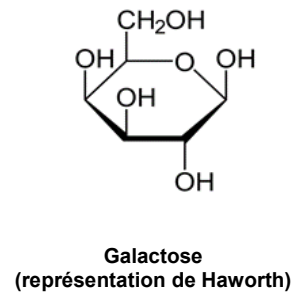
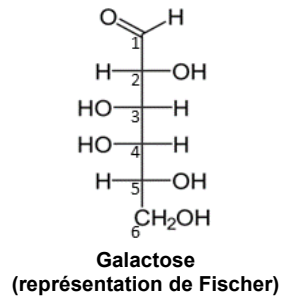
La galactose-1-phosphate uridyl-transférase (GALT) est une enzyme indispensable dans le catabolisme du galactose. La galactosémie est caractérisée par l'absence d'activité de la GALT, entraînant une accumulation du galactose et de ses dérivés dans le sang. Cette accumulation provoque les troubles à l'origine de la maladie.

La recherche de mutations dans le gène codant pour l'enzyme GALT est effectuée par la comparaison des séquences de l'allèle de référence et de l'allèle présent chez les personnes atteintes.

À partir du **document B** et des **documents de référence** :

- 1.4 Décrire les différences constatées entre les séquences nucléotidiques et conclure sur le type de mutation.
- 1.5 Pour chacune des séquences partielles des allèles du gène GALT, établir la séquence de l'ARN messager et en déduire la séquence d'acides aminés correspondante.
- 1.6 Comparer ces séquences d'acides aminés puis proposer une hypothèse expliquant l'absence d'activité enzymatique chez le patient atteint de galactosémie.
- 1.7 En mettant en relation l'ensemble des réponses et des données précédentes, justifier l'exclusion de tout produit laitier dans le régime alimentaire des nourrissons atteints de galactosémie.

Document A : formules de quelques oses et osides



Document B : séquences partielles des allèles du gène GALT

Séquences de 15 nucléotides du brin d'ADN codant (non transcrit)

- de l'allèle de référence : **T C A T T C C A G T A C A C G**

- de l'allèle à l'origine de la maladie : **T C A T T C C G G T A C A C G**

Documents de référence :

Les différents types de mutations

Mutation nucléotidique	Conséquence dans la séquence nucléotidique
Insertion	Ajout d'un nucléotide
Délétion	Suppression d'un nucléotide
Substitution	Remplacement d'un nucléotide

Tableau du code génétique

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

Partie II : transmission de la galactosémie et étude de ses conséquences sur la fertilité (12 points)

Cette partie a pour objectifs de comprendre le mode de transmission de la galactosémie et d'analyser quelques troubles hormonaux fréquemment observés chez les femmes atteintes.

Mode de transmission de la galactosémie

À l'aide du **document C** et des connaissances acquises :

- 2.1 Démontrer que l'allèle muté à l'origine de la maladie est récessif.
- 2.2 Donner les arguments permettant de penser que le gène GALT responsable de la maladie est situé sur un chromosome non sexuel (autosomique).
- 2.3 Écrire les génotypes des individus II.1 et II.2 en utilisant la notation suivante : soit S l'allèle non muté et soit m l'allèle muté à l'origine de la maladie.
- 2.4 Concevoir un tableau de croisement permettant d'établir la probabilité pour le couple d'individus II.1 et II.2 d'avoir un enfant III.4 atteint de galactosémie.

Galactosémie et trouble de la fertilité

Un très grand nombre de femmes atteintes de galactosémie (même correctement traitées) présente une insuffisance ovarienne précoce (IOP). Celle-ci se manifeste par un arrêt précoce des règles et une diminution drastique de la fertilité bien avant 40 ans. Les documents présentés permettent d'explorer les aspects histologiques et hormonaux de l'IOP.

- 2.5 À partir du **document D**, décrire l'évolution de la concentration en œstrogènes d'une femme présentant une IOP et celle d'une femme non atteinte.
- 2.6 À partir du **document D**, décrire l'évolution de la concentration en FSH d'une femme atteinte d'IOP et celle d'une femme non atteinte.
- 2.7 À l'aide des connaissances acquises concernant l'action des hormones sexuelles sur le complexe hypothalamo-hypophysaire, expliquer la valeur de la concentration de FSH observée chez la femme présentant une IOP.

Le **document E** indique les différentes étapes d'une méthode très souvent utilisée en laboratoire pour doser les hormones comme la FSH : la méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

- 2.8 En utilisant les représentations des différentes substances fournies dans le **document F**, schématiser le complexe obtenu à la fin du dosage.
- 2.9 Citer les interactions spécifiques pouvant s'établir entre l'anticorps anti-FSH et la FSH.

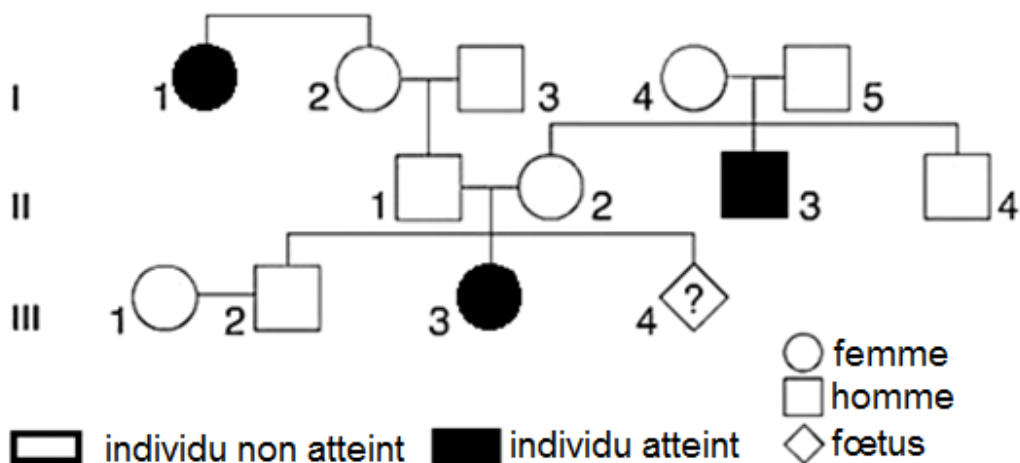
Dans les étapes de la méthode ELISA, une solution tampon PBS est utilisée pour les lavages.
A l'aide du **document G**, répondre aux questions suivantes :

2.10 Écrire l'équation de réaction acido-basique entre l'ion dihydrogénophosphate et l'eau.
Les couples acide/base mis en jeu sont : H_2PO_4^- / HPO_4^{2-} et H_3O^+ / H_2O .

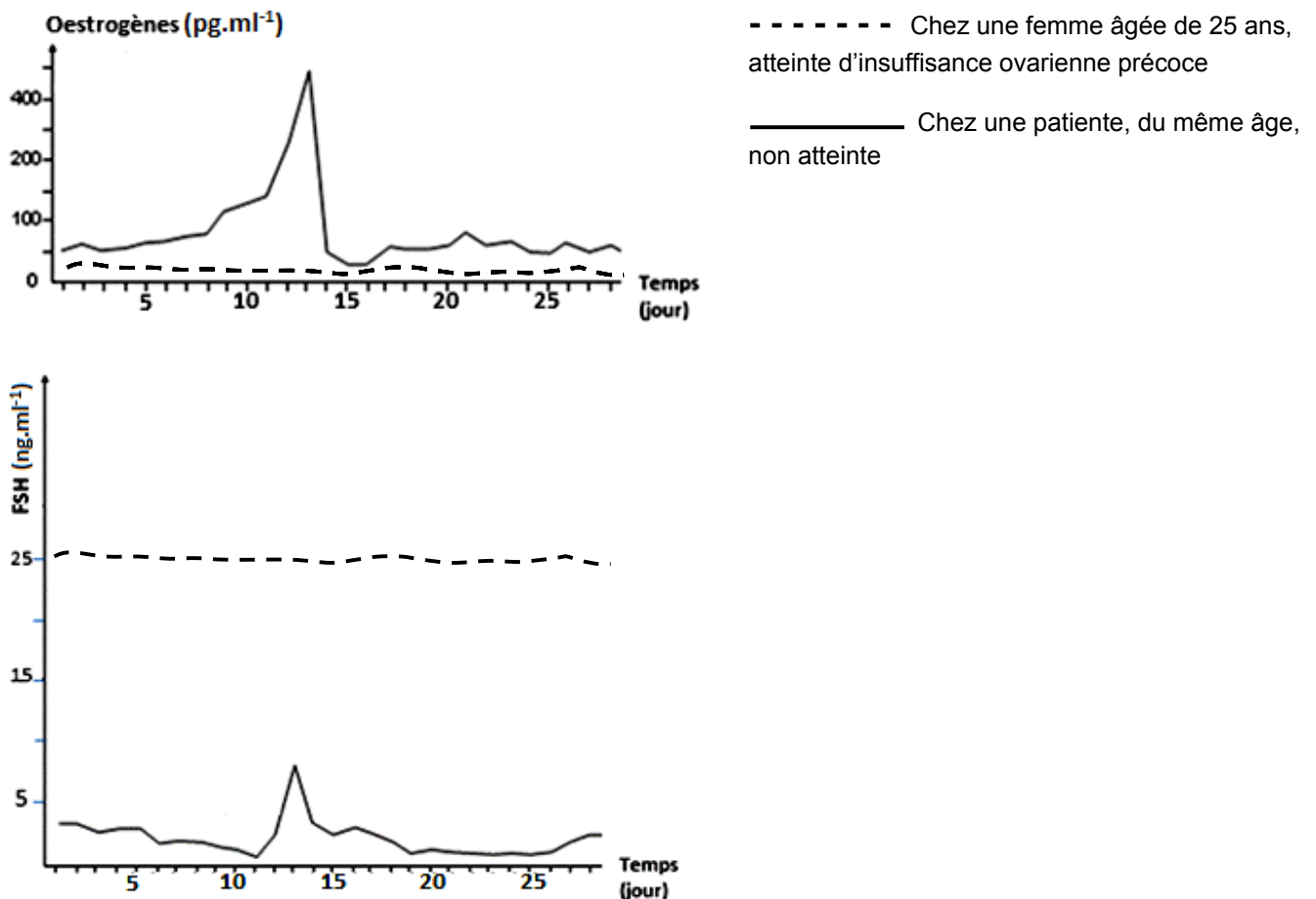
2.11 Calculer le pH de la solution tampon PBS et en déduire que le PBS possède les caractéristiques d'une solution tampon.

2.12 Indiquer le rôle des lavages réalisés avec la solution tampon PBS de la méthode ELISA (**document E**).

Document C : arbre généalogique d'une famille touchée par la galactosémie



Document D : dosages hormonaux d'œstrogènes et de FSH



Document E : protocole de dosage de FSH sérique par la méthode ELISA

Etape 1 : mise en contact du sérum à tester avec le support solide sur lequel sont adsorbés des anticorps anti-FSH. Incubation puis lavage avec la solution tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline*).

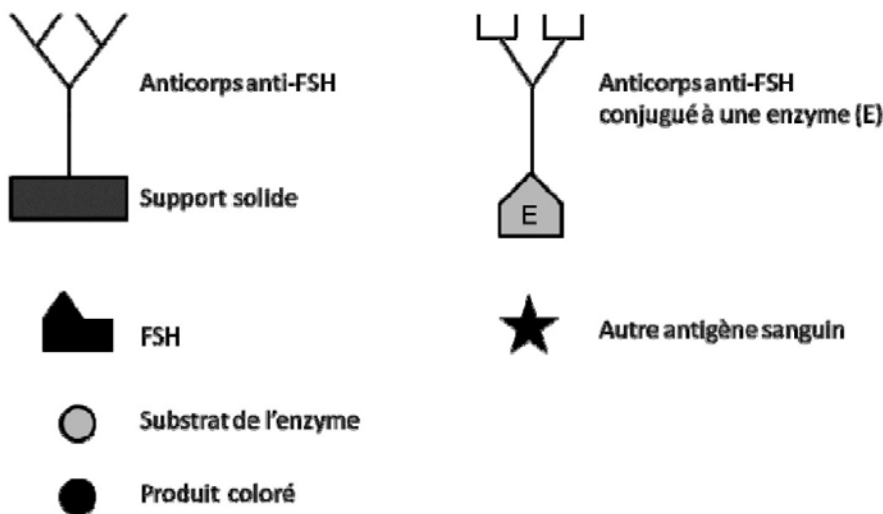
Etape 2 : ajout des anticorps anti-FSH couplés à une enzyme. Incubation puis lavage avec la solution tampon PBS.

Etape 3 : ajout du substrat spécifique de l'enzyme. Incubation puis lecture de l'absorbance au spectrophotomètre.

Donnée :

Le substrat est initialement incolore et lorsqu'il est en contact avec l'enzyme, il est transformé en un produit coloré.

Document F : schéma des principales substances présentes dans le test ELISA



Document G : le tampon PBS

Le **tampon phosphate salin** (souvent abrégé **PBS**, de l'anglais *phosphate buffered saline*) est une solution tampon couramment utilisée en biochimie. Il s'agit d'une solution physiologique contenant des ions sodium, des ions chlorure, des ions dihydrogénophosphate, des ions hydrogénophosphate. En général, les concentrations de ces ions dans la solution tampon et dans le milieu intérieur au corps humain sont identiques (isotonicité). Ce tampon sert au lavage du milieu réactionnel.

Son pouvoir tampon repose sur le couple ion dihydrogénophosphate / ion hydrogénophosphate dont le pK_A est égal à 7,2.

La solution tampon PBS contient :

Espèce chimique	Concentration
Ion sodium Na^+	$164 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$
Ion chlorure Cl^-	$140 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$
Ion hydrogénophosphate HPO_4^{2-}	$10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$
Ion dihydrogénophosphate $H_2PO_4^-$	$4,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

La relation entre le pH et le pK_A d'un couple acide/base : $pH = pK_A + \log \frac{[base]}{[acide]}$

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2015

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.

OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE FABRICATION DE SUCRE INVERTI

L'industrie sucrière produit du sucre d'intérêt agro-alimentaire à partir de saccharose extrait de la betterave à sucre. La France est le premier producteur mondial de sucre de betterave.

La directive européenne 2001/11/CE désigne sous le terme de « sucres » les principaux glucides à saveur sucrée : glucose, fructose, saccharose, sirop de glucose, sucre inverti.

Le sucre inverti a un pouvoir sucrant plus grand que le saccharose, expliquant son utilisation en confiserie, boulangerie, pâtisserie, biscuiterie et chocolaterie. Il est obtenu par hydrolyse du saccharose en présence d'invertase. Cette enzyme peut être produite à l'échelle industrielle par des levures.

Un industriel cherche à optimiser son procédé de production de sucre inverti. Pour cela, il effectue :

- une vérification de la teneur en saccharose dans le jus sucré extrait de la betterave ;
- la sélection d'une souche de levure productrice d'invertase ;
- la détermination des conditions de culture optimales des levures ;
- le contrôle de la qualité de l'invertase extraite.

1. ÉTAPES DE PRODUCTION DU SUCRE INVERTI ET DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN SACCHAROSE DU JUS SUCRÉ DE BETTERAVE PAR POLARIMÉTRIE

Q1. A partir du **document 1**, représenter sous forme d'un organigramme toutes les étapes de production du sucre de consommation et du sucre inverti.

Pour être exploitable, un jus sucré de betterave doit avoir une teneur en saccharose comprise entre 15 % et 20 %.

Q2. Déterminer, à l'aide du **document 2**, la teneur en saccharose du jus sucré de betterave.

Q3. Comparer la teneur en saccharose du jus sucré de betterave obtenue à celle attendue et conclure.

2. CHOIX D'UNE SOUCHE DE LEVURE ADAPTÉE À LA PRODUCTION D'INVERTASE

Pour choisir la souche de levure adaptée à la production d'invertase, l'industriel effectue un test d'assimilation des glucides. Le **document 3** présente le principe du test et les résultats obtenus.

Q4. Expliquer l'apparition d'un trouble dans certains tubes.

Q5. Expliquer le rôle des tubes témoins et interpréter les résultats obtenus pour ces tubes.

Q6. Analyser les résultats obtenus et proposer la ou les souche(s) de levure adaptée(s) aux besoins de l'industriel.

3. ETUDE DES CONDITIONS DE CULTURE DES SOUCHES DE LEVURES PRODUCTRICES D'INVERTASE

Les levures sélectionnées sont mises en culture en milieu Sabouraud additionné d'un antibiotique, le chloramphénicol.

Les levures sont des microorganismes dont la température optimale de croissance est en général située entre 25 °C et 30 °C. Ces deux températures d'incubation ont été testées, afin de déterminer la température permettant d'optimiser la croissance.

Q7. Argumenter l'addition de chloramphénicol dans le milieu de culture.

Q8. Proposer une méthode permettant de suivre la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* au laboratoire et l'expliquer succinctement.

Q9. À l'aide du **document 4**, déterminer graphiquement les paramètres de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* pour chaque température :

- la vitesse spécifique de croissance maximale μ_{expo} (encore notée $Q_{\text{X expo}}$) ;
- le temps de génération G.

Q10. Comparer les valeurs obtenues et proposer la température de culture des levures à utiliser par l'industriel afin d'optimiser la production d'invertase. Argumenter ce choix.

4. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DE L'INVERTASE EXTRAITE

Deux invertases sont extraites suivant un procédé standardisé à partir de *Cryptococcus laurentii* et à partir de *Saccharomyces cerevisiae*. Pour chaque invertase, l'industriel contrôle :

- l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose par chromatographie ;
- la concentration d'activité catalytique de l'invertase.

4.1. Contrôle de l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose

L'analyse de la composition en sucres invertis produits avec ces deux enzymes est réalisée par chromatographie d'adsorption sur couche mince (CCM) dont le résultat est présenté dans le **document 5**.

Elle permet d'identifier les glucides présents et de contrôler l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose.

Q11. Analyser les résultats obtenus pour les deux essais.

Q12. Identifier les sucres constitutifs des sucres invertis obtenus en expliquant la démarche.

Q13. Déterminer la réaction d'hydrolyse du saccharose catalysée par l'invertase, à partir des résultats obtenus.

Q14. Conclure sur l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase issue de chaque microorganisme.

4.2. Contrôle de l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose

La concentration d'activité catalytique de l'invertase est déterminée par méthode cinétique. Pour cela, l'apparition du produit (sucre inverti) est mesurée au cours du temps par spectrophotométrie. Les conditions d'hydrolyse enzymatique du saccharose sont identiques dans les essais 1 et 2.

Les valeurs mesurées sont présentées dans le **document 6**.

Q15. Vérifier la cohérence des valeurs de concentration d'activité catalytique mesurées avec les résultats obtenus par l'analyse qualitative de la chromatographie sur couche mince.

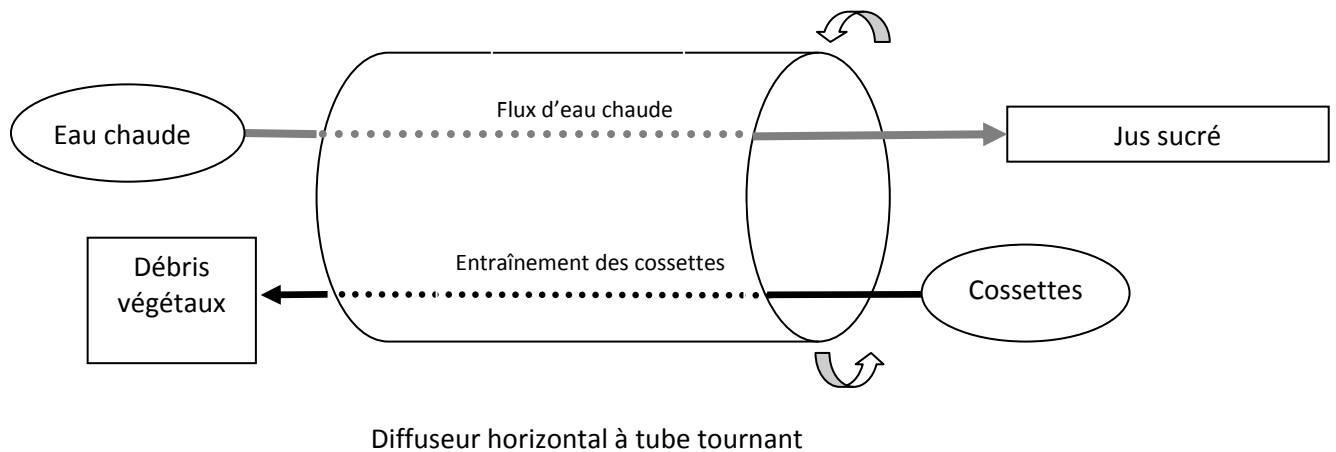
Q16. Conclure quant à la souche qui permettra de produire l'invertase la plus intéressante pour l'industriel.

SYNTHESE

Q17. Rédiger une synthèse de la démarche globale et des différents choix effectués par l'industriel dans le but d'optimiser son procédé de production de sucre inverti.

DOCUMENT 1 - Étapes de production du sucre de consommation et du sucre inverti

- 1) Elimination des impuretés extérieures de la betterave (terre, pierre, débris végétaux...) dans l'atelier de réception et de lavage.
- 2) Découpe des betteraves sous forme de cossettes (fines lanières rigides de betterave) dans l'atelier de découpage.
- 3) Extraction du sucre par diffusion : un diffuseur horizontal à tube tournant permet l'entraînement des cossettes dans un sens pendant qu'en sens inverse progresse un flux d'eau chaude. Après diffusion des molécules hydrosolubles contenues dans les betteraves, dont le sucre, un jus sucré est récupéré. A l'opposé, les débris végétaux sont éliminés.



- 4) Filtration du jus sucré.
- 5) Traitement d'une partie du filtrat par évaporation, cristallisation et séchage afin de produire du sucre de consommation.
- 6) Traitement de l'autre partie du filtrat par l'invertase afin de produire du sucre inverti qui sera employé en confiserie.

Source : www.labetterave.com

DOCUMENT 2 - Dosage polarimétrique du saccharose

- Principe d'un dosage polarimétrique

La lumière naturelle est une onde vibratoire multidirectionnelle. Lorsque la lumière traverse un polariseur, ses vibrations sont limitées à un seul plan : le **plan de polarisation**.

Les oses sont des substances optiquement actives : traversées par une lumière polarisée, elles sont capables de faire tourner le plan de polarisation d'un angle α .

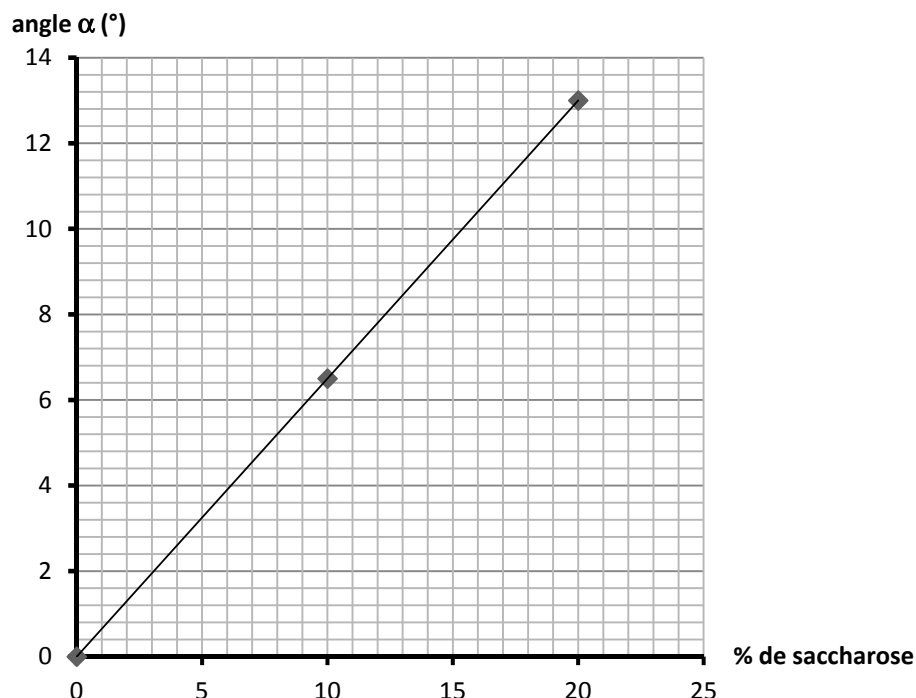
- Procédure opératoire du dosage polarimétrique du saccharose

1. Préparation des solutions étalon de saccharose à 10 % et à 20 %.
2. Ajustage du zéro.
3. Mesure du pouvoir rotatoire des solutions étalon.
4. Mesure du pouvoir rotatoire de la solution de saccharose à doser.

- Indications obtenues pour le dosage polarimétrique du saccharose

Solutions	Indications de mesure de l'angle α
Solution étalon de saccharose à 10 %	6,50°
Solution étalon de saccharose à 20 %	13,00°
Jus de betterave à doser	10,00°

- Droite d'étalonnage du polarimètre pour le dosage du saccharose : $\alpha = f(\% \text{ saccharose})$



DOCUMENT 3 - Test d'assimilation des glucides

Principe du test d'assimilation des glucides

Le test, effectué en tubes à hémolyse, consiste à ensemencer chacune des 4 souches de levure dans un milieu minimum additionné d'un glucide.

Les glucides testés sont présentés dans le tableau. En parallèle, un témoin sans glucide est réalisé pour chaque souche.

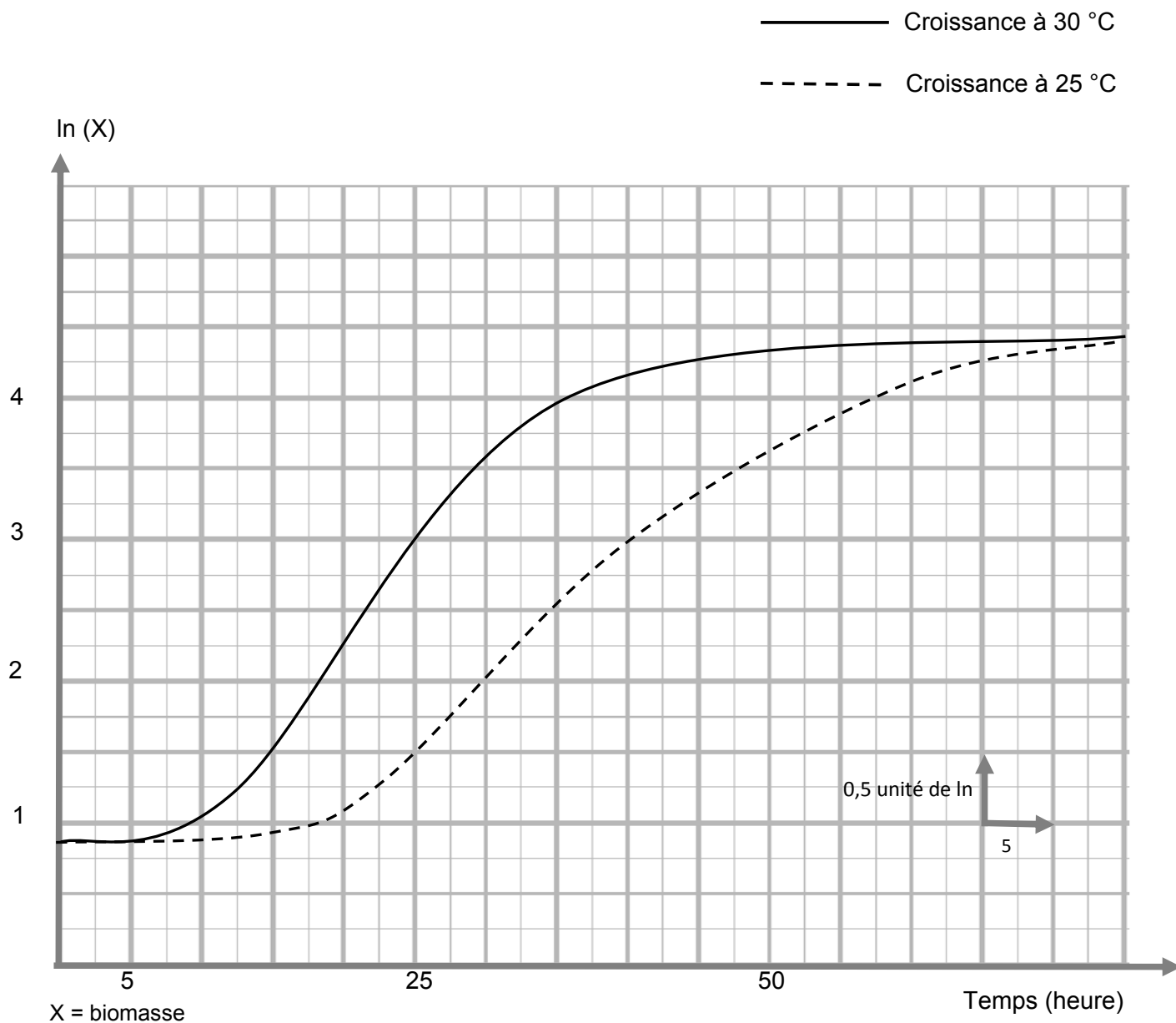
Résultats des tests d'assimilation effectués sur différentes souches de levures

Le tableau présente l'aspect des tubes après incubation.

	Solutions étudiées			
Souches	témoin	glucose	arabinose	saccharose
<i>Cryptococcus laurentii</i>	limpide	trouble	trouble	trouble
<i>Cryptococcus terreus</i>	limpide	trouble	trouble	limpide
<i>Kloeckera spp</i>	limpide	trouble	limpide	limpide
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	limpide	trouble	limpide	trouble

DOCUMENT 4 - Courbes de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* à 25 °C et 30 °C en milieu Sabouraud additionné de chloramphénicol

Les mêmes résultats sont obtenus avec *Cryptococcus laurentii*.



Données :

Pendant la phase exponentielle de croissance, la vitesse spécifique de croissance maximale μ_{expo} est proportionnelle au nombre de générations par unité de temps. Le temps de génération **G** correspond au temps nécessaire au doublement d'une population microbienne pendant la phase exponentielle de croissance.

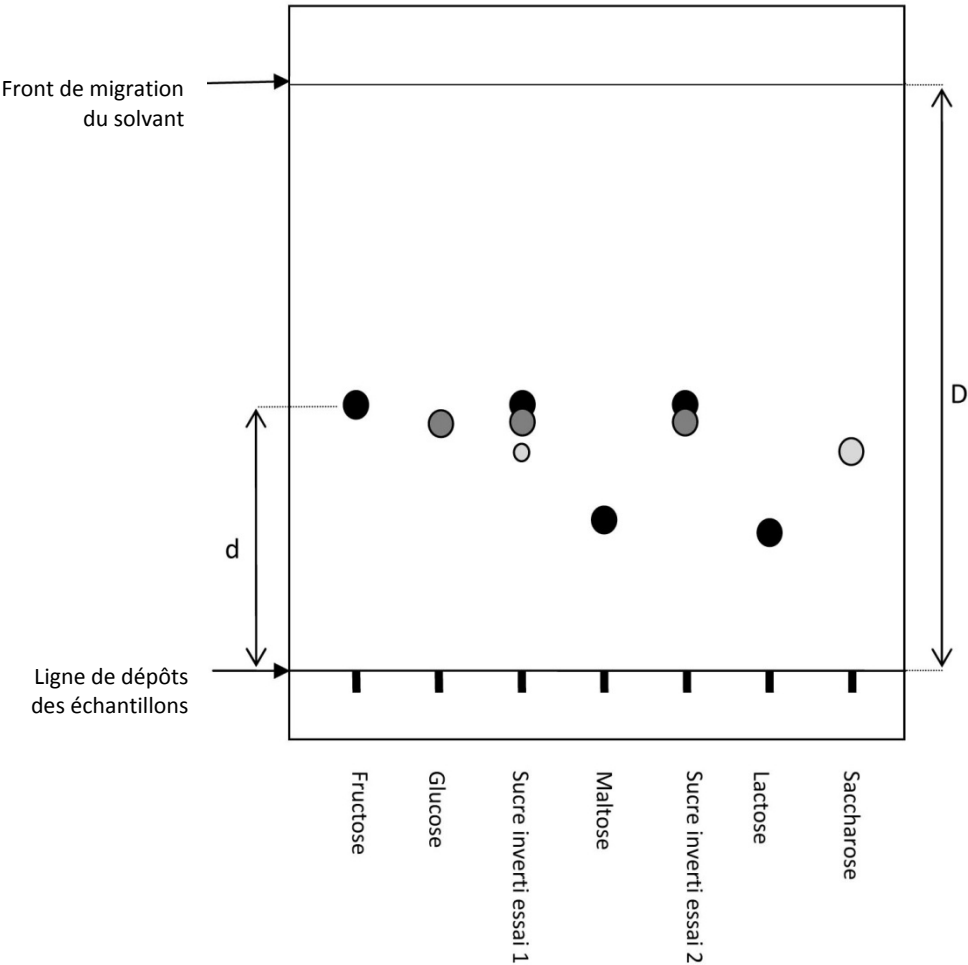
Equations aux grandeurs :

$$\mu_{expo} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{expo}}$$

DOCUMENT 5 - Analyse qualitative du sucre inverti par chromatographie sur couche mince

5a - Schéma du chromatogramme obtenu



L'essai 1 est réalisé avec l'invertase extraite de *Cryptococcus laurentii*.
L'essai 2 est réalisé avec l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae*.

5b - Exploitation des résultats pour les solutions étalon de glucides

Dépôts	Étalon fructose	Étalon glucose	Étalon maltose	Étalon lactose	Étalon saccharose
Rf	0,45	0,42	0,26	0,23	0,38
Couleur	Noir	Gris foncé	Noir	Noir	Gris clair

DOCUMENT 6 - Concentration d'activité catalytique de l'invertase

Souche de levure	Concentration d'activité catalytique de l'invertase (µkat.L ⁻¹)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
<i>Cryptococcus laurentii</i>	50

Rappel : L'unité microkatal (µkat) est la quantité d'enzyme qui catalyse l'apparition d'une micromole de produit par seconde dans des conditions opératoires précises.