

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2013

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

Ce sujet sera traité par les candidats
**se présentant pour la première fois aux épreuves terminales
du baccalauréat.**

**Les sujets de CBSV et de biotechnologies seront traités
sur des copies séparées.**

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte 7 pages.

PRODUCTION D'UNE ALPHA-AMYLASE THERMOSTABLE CHEZ UNE BACTÉRIE

Un laboratoire décide de créer une nouvelle version de Maxilase[®], un sirop contenant de l'alpha-amylase, une enzyme utilisée comme traitement d'appoint de l'inflammation aiguë de la gorge. Ce nouveau médicament, destiné à être commercialisé dans des régions tropicales, doit être constitué d'une enzyme pouvant supporter des températures élevées afin d'améliorer la durée de conservation du sirop à la température ambiante de ces régions.

Pour ce faire, une équipe de recherche et développement en pharmacologie cherche à extraire l'alpha-amylase d'une bactérie archée hyperthermophile découverte dans une station thermale de l'Est de l'Algérie. Cette souche produit naturellement une alpha-amylase thermostable.

L'équipe décide d'isoler le gène codant l'enzyme thermostable puis d'insérer ce gène dans un plasmide (vecteur de clonage) et de l'introduire dans une bactérie dont les conditions de croissance seront optimisées, en vue d'une production industrielle de l'enzyme.

Cette nouvelle alpha-amylase thermostable, spontanément sécrétée par la bactérie recombinante, est purifiée puis dosée par la technique de Mancini.

1. CONSTRUCTION ET SÉLECTION DU VECTEUR DE CLONAGE

Le gène de l'alpha-amylase thermostable est amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) puis introduit dans un plasmide (vecteur de clonage) permettant sa production chez la bactérie, comme présenté dans le **document 1**. Avant la phase de production, les constructions plasmidiques issues du clonage sont analysées par électrophorèse en gel d'agarose afin de sélectionner les plasmides ayant intégré le gène codant l'alpha-amylase.

Le **document 2** présente les résultats de l'analyse par électrophorèse des deux constructions plasmidiques « CP1 » et « CP2 » schématisées dans le **document 1**.

Q1. Expliquer la nécessité d'effectuer un dépôt du plasmide (P) et un dépôt de l'insert (I).

Q2. Analyser l'électrophorégramme du **document 2** et déterminer la taille approximative de chacun des résultats de construction « CP1 » et « CP2 ».

Q3. Choisir, en argumentant, la construction plasmidique (« CP1 » ou « CP2 ») à conserver en vue de la production d'alpha-amylase.

2. SUIVI DE CROISSANCE DE LA BACTÉRIE RECOMBINANTE

La construction plasmidique retenue est introduite dans une bactérie en vue de l'expression du gène de l'alpha-amylase, pour une production industrielle de l'enzyme.

Afin de déterminer le milieu de culture le plus adapté, la bactérie recombinante est cultivée en bioréacteur dans 2 milieux de culture différents (notés A et B).

Les courbes de croissance obtenues sont présentées dans le **document 3**.

Q4. Déterminer graphiquement la vitesse de croissance spécifique ($\mu_{X \text{ expo}}$ ou $Q_{X \text{ expo}}$) de la bactérie au cours de la phase exponentielle pour la culture en milieu A et celle en milieu B.

Données :
$$\mu_{X \text{ expo}} = Q_{X \text{ expo}} = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

Avec N_2 = nombre de bactéries par mL au temps t_2
 N_1 = nombre de bactéries par mL au temps t_1

Q5. Comparer les résultats obtenus.

En déduire le milieu le plus adapté à la croissance de la bactérie recombinante.

3. PURIFICATION DE L'ALPHA-AMYLASE PRODUITE

Les étapes de la purification de l'alpha-amylase sont présentées dans le document 4.

Q6. Expliquer pourquoi la purification de l'alpha-amylase est réalisée sur le surnageant de culture et non sur le culot 1 de centrifugation des bactéries.

Le **culot 2** de centrifugation contient l'alpha-amylase ($M = 42\,134 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et une protéine P de masse molaire d'environ $20\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Une chromatographie d'exclusion est alors effectuée pour séparer ces deux protéines (cf document 4).

Q7. Expliquer dans quel ordre sont éluées l'alpha-amylase et la protéine P.

Le document 5 présente les spectres d'absorption de l'ADN et des protéines.

Q8. À partir des documents 4 et 5, expliquer le choix de la longueur d'onde utilisée pour repérer les fractions éluées riches en protéines.

4. DOSAGE DE L'ALPHA-AMYLASE PURIFIÉE

La purification permet l'obtention d'une fraction riche en alpha-amylase.

Un dosage spécifique de l'alpha-amylase sur cette fraction est réalisé par une réaction d'immuno-précipitation selon la technique de Mancini. Deux essais sont réalisés (X_1 et X_2).

Le principe de cette technique et les résultats obtenus sont présentés dans le document 6.

Q9. À l'aide du document 6A, expliquer comment procéder pour déterminer la concentration en alpha-amylase dans la fraction éluee.

Q10. Mesurer les diamètres des anneaux obtenus avec les essais X_1 et X_2 sur la photographie du document 6B,

Q11 Déterminer graphiquement la concentration massique en alpha-amylase dans la fraction étudiée.

La masse d'alpha-amylase présente dans le culot 2 de centrifugation (document 4) est estimée à $(7,0 \pm 0,5) \text{ mg}$. Le volume d'élution est de 5 mL .

Q12. Exprimer le résultat de la masse d'alpha-amylase sous forme d'intervalle.

Q13. Calculer l'intervalle dans lequel se situe le rendement de la purification par chromatographie d'exclusion, en utilisant la formule suivante :

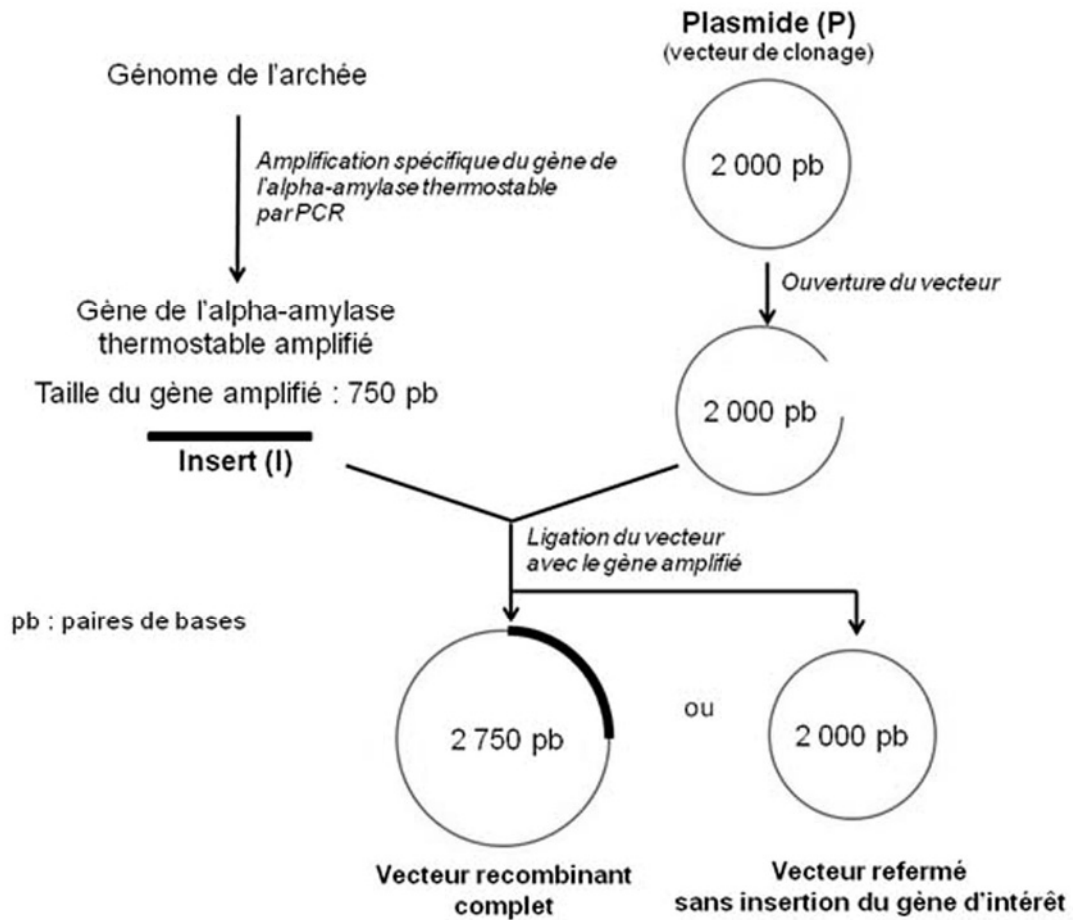
$$R = \frac{\text{quantité de protéines obtenues après purification}}{\text{quantité de protéines soumises à purification}}$$

5. SYNTHÈSE

Q14. Proposer une synthèse, sous forme d'un organigramme simple, des principales étapes de production de l'alpha-amylase thermostable purifiée à partir de la bactérie archée hyperthermophile contenant le gène codant pour l'alpha-amylase thermostable.

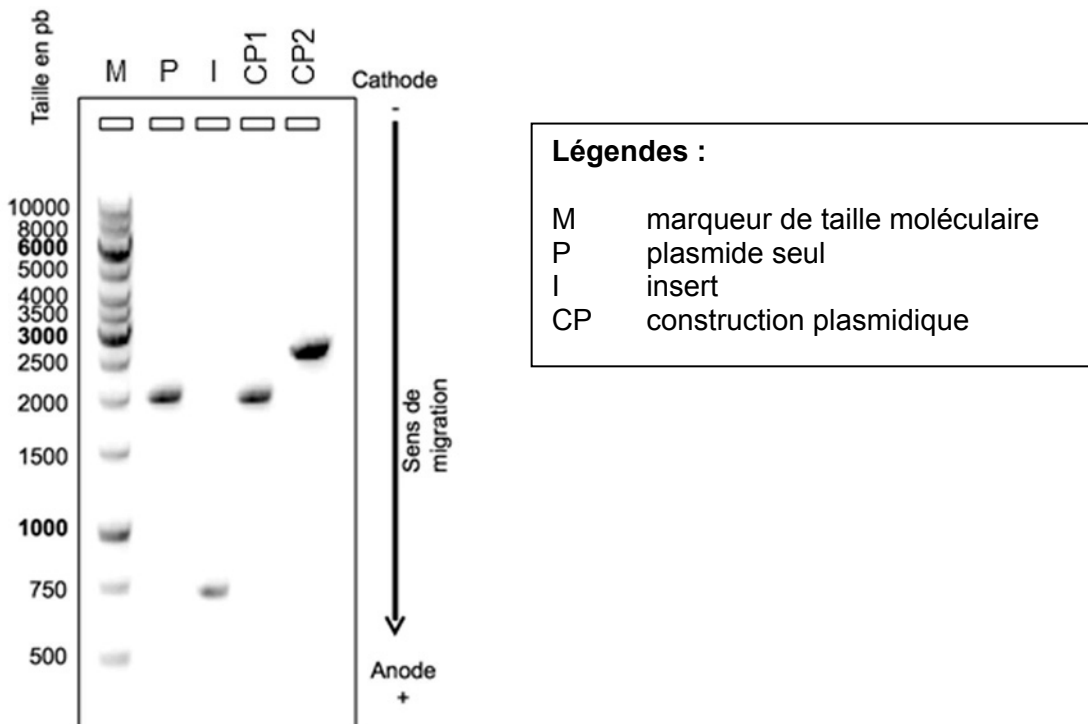
DOCUMENT 1

Construction du vecteur de clonage



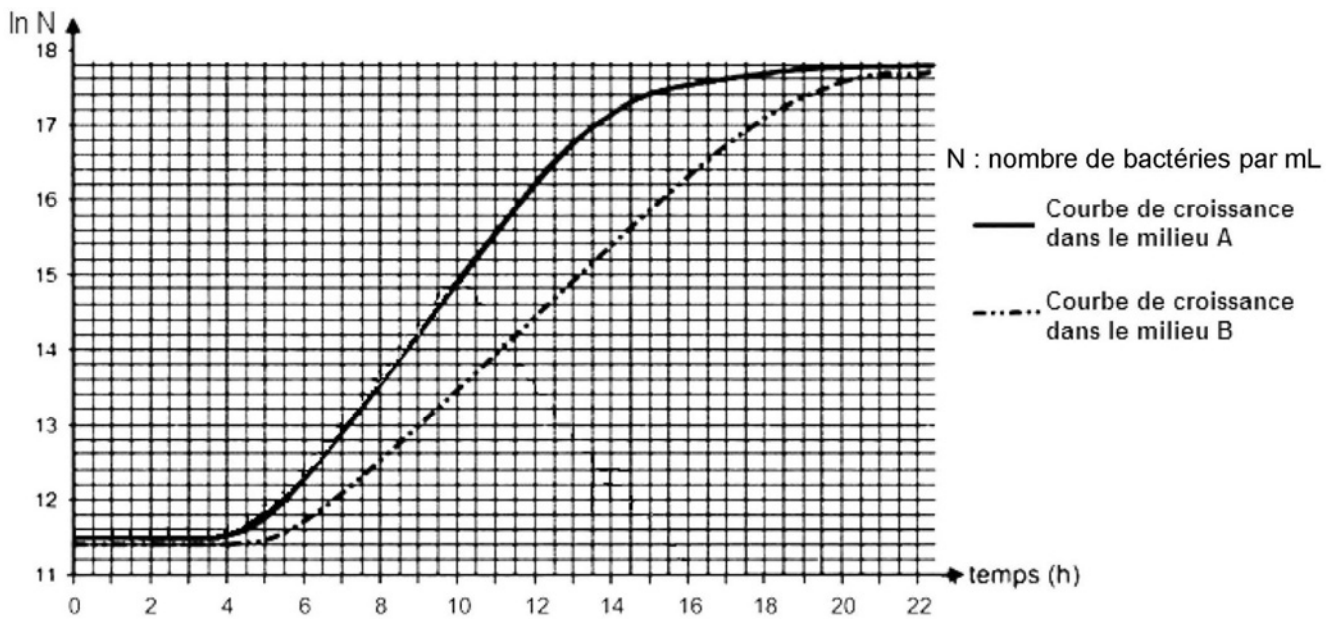
DOCUMENT 2

Analyse de deux produits de construction plasmidique par électrophorèse en gel d'agarose



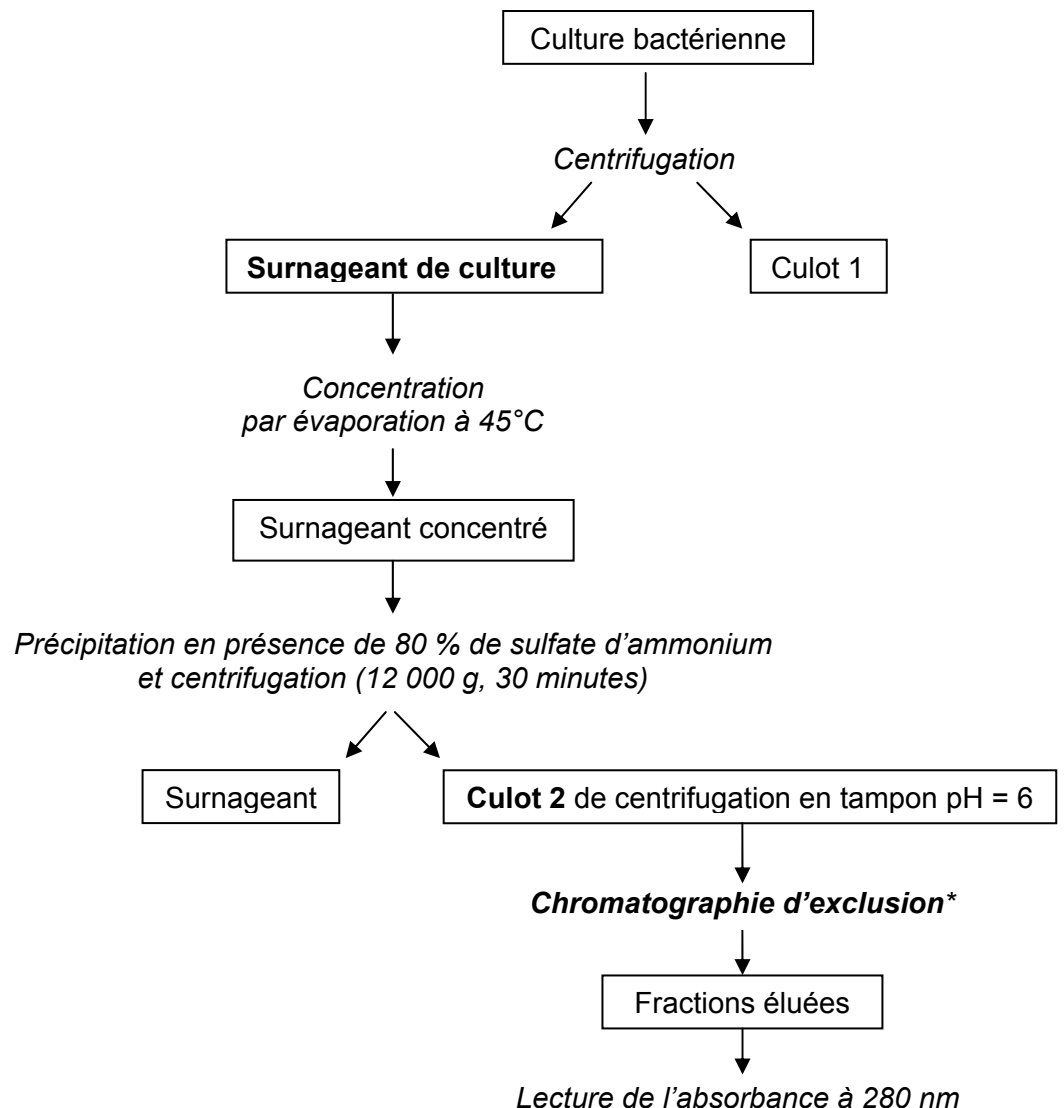
DOCUMENT 3

Courbes de croissance de la bactérie recombinante dans deux milieux de culture A et B



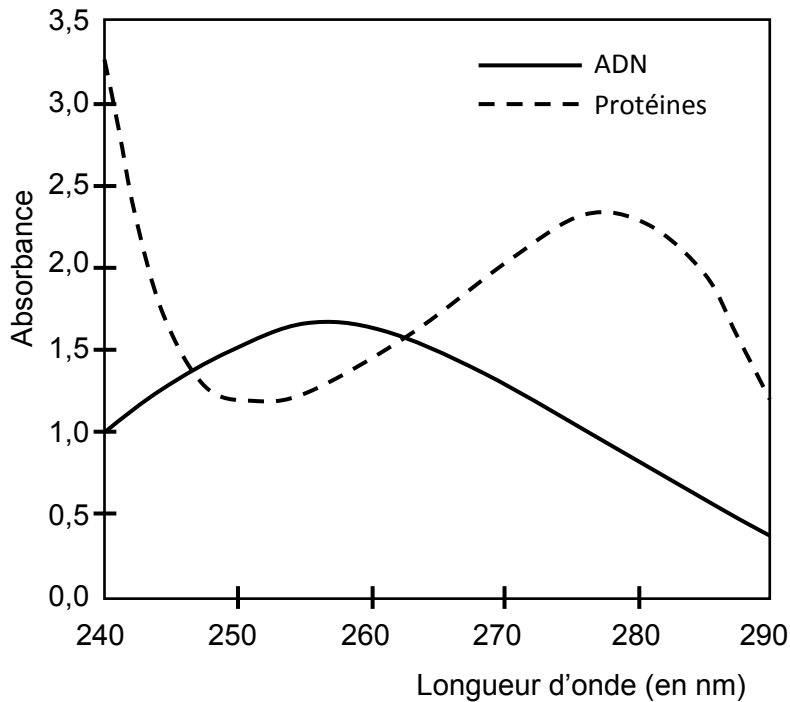
DOCUMENT 4

Purification de l'alpha-amylase thermostable spontanément sécrétée par la bactérie recombinante



* Donnée :
La chromatographie d'exclusion permet la séparation des molécules en fonction de leur taille par passage à travers une colonne de granules de gel poreux. Les protéines de masse moléculaire élevée sont éluées en premier.

DOCUMENT 5 :
Spectres d'absorption d'ADN et de protéines

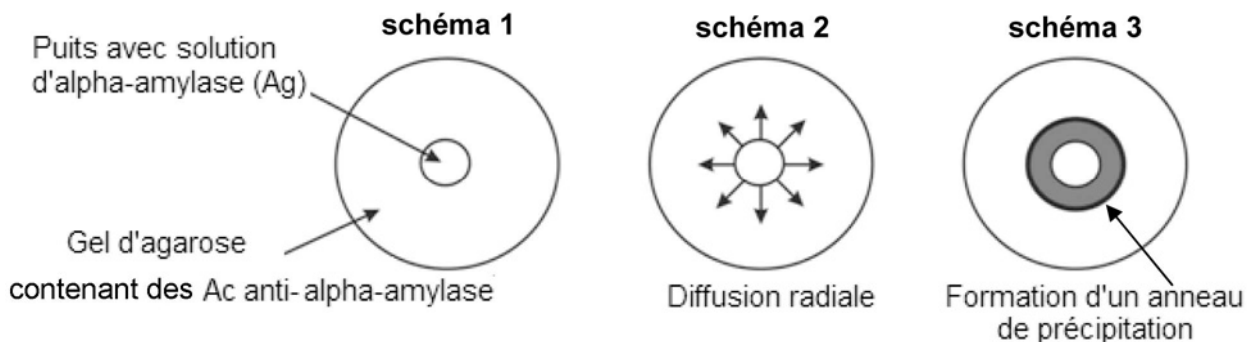


DOCUMENT 6 :
Dosage de l'alpha-amylase par la technique de Mancini

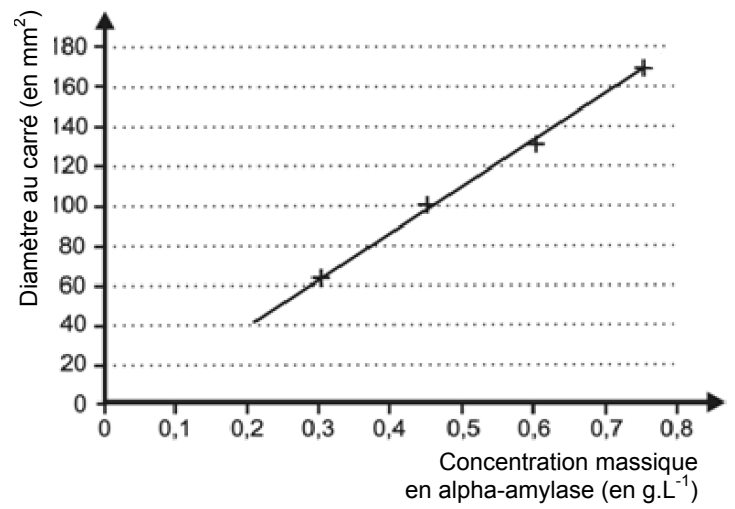
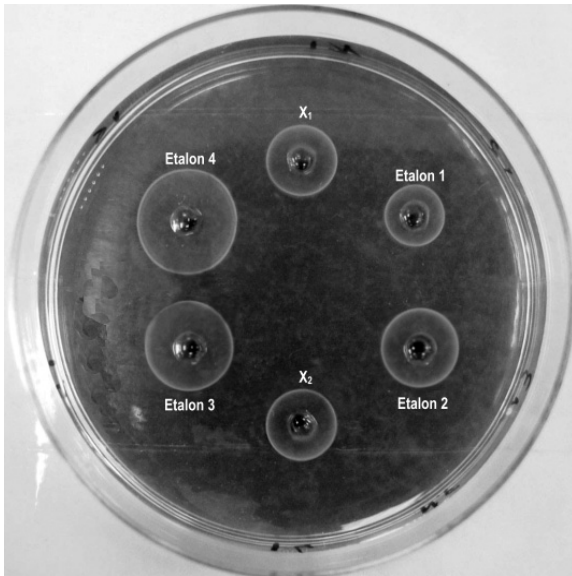
Document 6A : principe du dosage de l'alpha-amylase par la technique de Mancini

La technique de Mancini est une méthode d'immunodiffusion simple.

- La réaction s'effectue dans un gel d'agarose coulé en petite boîte de Pétri. Ce gel contient des Ac anti-alpha-amylase.
- Un volume donné de solution contenant de l'alpha-amylase est déposé dans un puits calibré, creusé dans le gel (**schéma 1**). Plusieurs puits sont creusés pour déposer un volume identique des solutions étalons de concentration connue, ou de l'échantillon à analyser.
- L'alpha-amylase diffuse alors radialement autour du puits en formant un gradient de concentrations décroissantes (**schéma 2**).
- Au cours de leur diffusion, les antigènes d'alpha-amylase forment, avec les Ac spécifiques contenus dans le gel, un anneau de précipitation dans la zone où les concentrations en Ag et en Ac correspondent à l'équivalence (**schéma 3**).
- L'anneau de précipitation se stabilise en 48 heures et est visible à l'œil nu. Le diamètre au carré (D^2) de l'anneau est proportionnel à la concentration massique en alpha-amylase.



Document 6B : résultats du dosage de l'alpha-amylase par immunoprécipitation



Photographie des résultats obtenus pour les étalons et les essais X₁ et X₂ de la fraction étudiée (échelle : x1)