

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

ÉPREUVE D'ENSEIGNEMENT DE SPÉCIALITÉ

SESSION 2023

SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE

Biochimie, Biologie et Biotechnologies

Mardi 21 mars 2023

Durée de l'épreuve : **3 heures**

*L'usage de la calculatrice avec mode examen actif est autorisé.
L'usage de la calculatrice sans mémoire, « type collègue » est autorisé.*

Dès que ce document vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce document comporte 9 pages numérotées de 1/9 à 9/9.

COMPÉTENCES ÉVALUÉES					
C1	C2	C3	C4	C5	C6
Analyser un document	Effectuer les calculs	Interpréter des données	Argumenter un choix technique	Élaborer une synthèse	Communiquer à l'écrit
4 points	2 points	5 points	3 points	5 points	1 point

VALORISATION DE DÉCHETS AGRICOLES PAR UN MICROORGANISME GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉ

La L-valine est un acide aminé essentiel utilisé dans le secteur pharmaceutique et le secteur cosmétique. Depuis quelques années, son utilisation s'étend surtout en tant qu'additif alimentaire pour les animaux car cet acide aminé est indispensable pour une croissance musculaire optimale dans l'objectif de produire de la viande.

La L-valine est principalement obtenue après extraction de protéines de soja. Cependant, la production du soja ayant un impact environnemental négatif, de nombreuses entreprises cherchent une alternative pour l'obtenir en grande quantité par d'autres moyens.

Les biotechnologies ont permis de réaliser une production à l'échelle industrielle de la L-valine par fermentation à l'aide d'une souche bactérienne, *Corynebacterium glutamicum*, transformée par génie génétique.

Cette bactérie est capable de dégrader des déchets agricoles et peut donc également être utile dans une stratégie de dépollution.

Partie I – Questionnement scientifique et technologique (durée indicative 2 h 30)

Ce sujet repose sur l'étude de la mise au point d'un procédé bio-industriel de production de la L-valine par une souche de *Corynebacterium glutamicum* génétiquement modifiée notée « *C. glutamicum* GM ».

La démarche suivie se décompose en trois parties :

1. Étude de la production de la souche de *C. glutamicum* GM.
2. Suivi de croissance de *C. glutamicum* GM.
3. Valorisation des déchets végétaux par synthèse de L-valine.

1. CONSTRUCTION ET SÉLECTION DE *C. glutamicum* GM

C. glutamicum est capable de synthétiser par fermentation naturelle deux acides aminés à partir du pyruvate : la L-valine et la L-isoleucine. Ce procédé permet bien la production de L-valine mais en quantité limitée en raison de la production simultanée de L-isoleucine à partir du même substrat.

Afin d'augmenter la production de L-valine, la souche est modifiée génétiquement par un plasmide recombiné permettant de synthétiser la L-valine en grande quantité. Le plasmide est présenté dans le **document 1**.

1.1. Construction du plasmide recombiné

Les scientifiques ont utilisé le plasmide pECKA afin d'obtenir le vecteur recombiné pECKB qui possède les trois gènes *ilvC*, *ilvN* et *ilvB* codant les enzymes impliquées dans la synthèse de la L-valine à partir du pyruvate.

Q1. C1 Comparer les plasmides pECKA et pECKB pour distinguer :

- les gènes communs aux deux plasmides ;
- les gènes insérés qui ensemble constituent l'insert.

Q2. C2 Calculer la taille de l'insert.

Le **document 2** présente les étapes du clonage de *C. glutamicum*.

Q3. C1 Identifier les enzymes 1 et 2 et expliquer leur rôle.

Q4. [C3] Expliquer pourquoi le gène *lacZ* n'est plus fonctionnel dans le plasmide pECKB.

1.2. Sélection des clones transformés recombinés

Les bactéries obtenues après l'étape de transformation sont cultivées sur un milieu gélosé adapté à la croissance de *C. glutamicum* et additionné de kanamycine et de X-gal.

Le **document 2** présente la transformation des bactéries.

Q5. [C3] Montrer que les bactéries non transformées ne cultivent pas sur ce milieu.

X-gal est un substrat de la β -galactosidase dont la réaction est présentée dans le **document 3**.

Q6. [C3] Expliquer pourquoi les bactéries ayant un gène *lacZ* fonctionnel donnent des colonies bleues.

Q7. [C4] En déduire la couleur des colonies de *C. glutamicum* GM à sélectionner pour produire la L-valine en grande quantité.

2. SUIVI DE CROISSANCE DE *C. glutamicum*

Dans l'objectif d'évaluer la possibilité d'utiliser la souche génétiquement modifiée à des fins de production, un suivi de la croissance des souches de *C. glutamicum* et de *C. glutamicum* GM est effectué par mesure de l'atténuation D selon une méthode turbidimétrique.

En parallèle, le dosage de la L-valine est réalisé pour permettre de déterminer la vitesse de production de l'acide aminé par les deux souches.

2.1. Contrôle des paramètres de croissance de *C. glutamicum*

Le **document 4** présente l'étude de la croissance en milieu non renouvelé, dans les mêmes conditions, pour *C. glutamicum* et *C. glutamicum* GM.

Q8. [C4] Présenter la démarche à suivre pour déterminer μ_{expo} à partir de la courbe pour la souche de *C. glutamicum* GM.

Q9. [C2] Calculer la vitesse spécifique de croissance μ_{expo} (en h^{-1}) puis le temps de génération G de la souche de *C. glutamicum* GM pendant la phase exponentielle de croissance.

Le temps de génération de la souche *C. glutamicum* non modifiée est égal à $1,55 \text{ h} \pm 0,05 \text{ h}$.

Q10. [C3] En déduire si la modification génétique de la souche influe sur sa croissance.

2.2. Suivi de la production de L-valine

Le **document 4** présente également les cinétiques de production de L-valine dosée dans le milieu de culture lors de la culture de *C. glutamicum* et *C. glutamicum* GM en milieu non renouvelé.

Q11. [C1] Identifier la phase de croissance au cours de laquelle cet acide aminé est produit pour les deux souches.

Q12. [C4] Argumenter à l'aide de valeurs expérimentales sur l'intérêt de la modification génétique de la souche de *C. glutamicum* pour les industriels produisant la L-valine.

3. SYNTHÈSE DE L-VALINE ET VALORISATION DES DÉCHETS VÉGÉTAUX

La production industrielle de L-valine à l'aide d'autres souches bactériennes nécessite actuellement de les cultiver dans des milieux contenant de fortes quantités de glucose, substrat coûteux à grande échelle et dont l'utilisation à des fins industrielles entre en compétition avec les besoins nutritionnels de la population.

Les déchets végétaux contiennent de grandes quantités de xylose, or la souche de *C. glutamicum* utilise du xylose en tant que nutriment pour produire de l'énergie.

Le **document 5** montre une représentation simplifiée du métabolisme mis en place par les souches de *C. glutamicum*.

Q13. [C1] À l'aide du document, établir le bilan de matière de la dégradation d'une mole de glucose en pyruvate pour la voie B puis, par la même méthode, établir le bilan de matière de la dégradation d'une mole de xylose en pyruvate pour la voie A.

Q14. [C2] Déterminer alors le nombre de moles d'ATP produit à partir d'une mole de xylose en sachant qu'une mole de NADH, H^+ , fournit 3 moles d'ATP.

Q15. [C3] Montrer que *C. glutamicum* GM présente un intérêt dans la valorisation des déchets végétaux.

4. BILAN

Q16. [C5] Comparer sous la forme d'un tableau l'ensemble des caractéristiques biochimiques et métaboliques des souches de *C. glutamicum* non modifiée et *C. glutamicum* GM, évoquées dans les 3 parties précédentes.

Partie II – Question de synthèse (durée indicative 30 minutes)

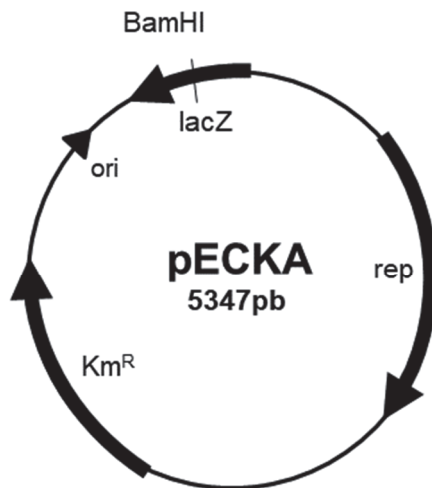
L'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM) soulève des questions de société en raison notamment des risques qu'ils présentent pour l'environnement. L'utilisation des bactéries génétiquement modifiées dans les bio-productions industrielles et celle des plantes génétiquement modifiées sont étroitement contrôlées.

Le **document 6** présente des extraits de rapports officiels mentionnant les risques environnementaux liés à l'utilisation des OGM, et les règlements à suivre pour l'utilisation de microorganismes GM.

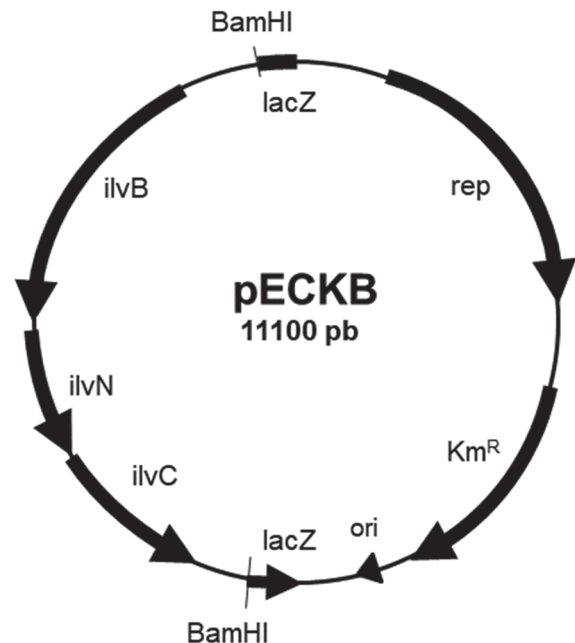
Q17. [C5] Rédiger un texte présentant une démarche d'analyse des risques appliquée aux plantes génétiquement modifiées.

DOCUMENT 1 - Cartes simplifiées des plasmides utilisés dans le clonage de *C. glutamicum*

A - Plasmide pECKA



B- Plasmide recombiné pECKB



Légende :

ori : origine de réplication du plasmide

Km^R : gène de résistance à la kanamycine (antibiotique)

ilvC, ilvN, ilvB : gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse de la L-valine

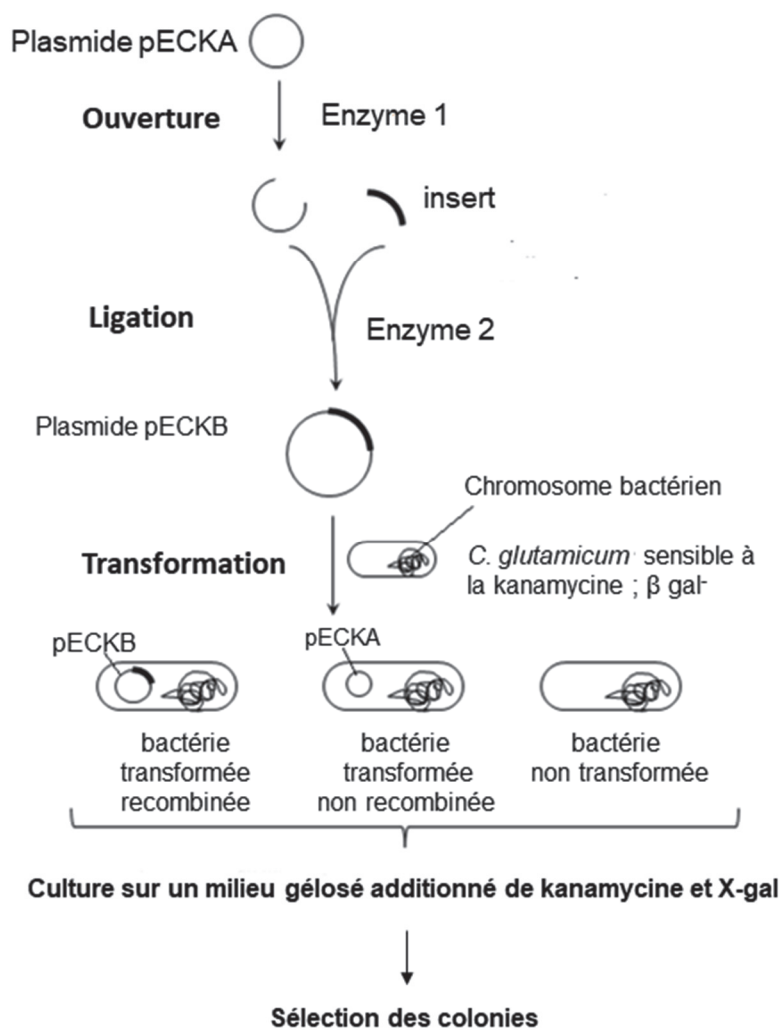
BamHI : site de restriction enzymatique

lacZ : gène de sélection codant la β -galactosidase

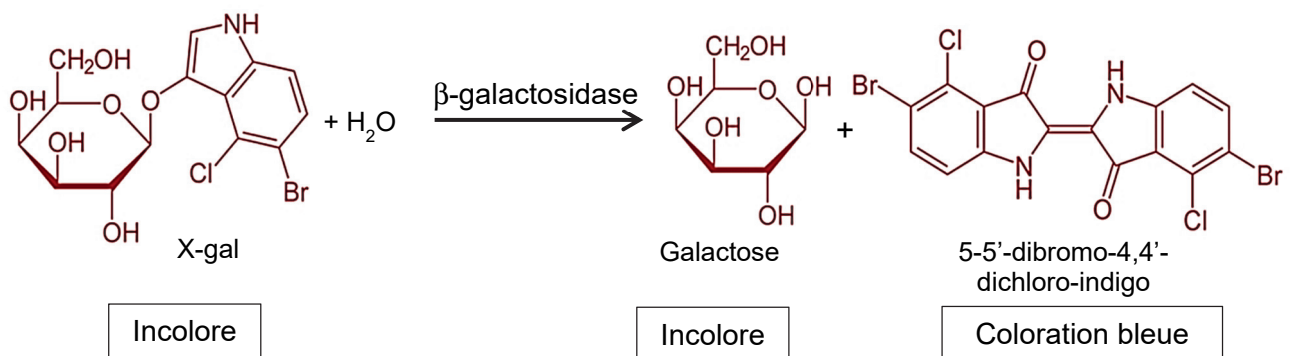
rep : gène codant la protéine initiatrice de la réplication du plasmide

Source du document : extrait modifié du brevet US 7,585,959 B2 (8 septembre 2009)

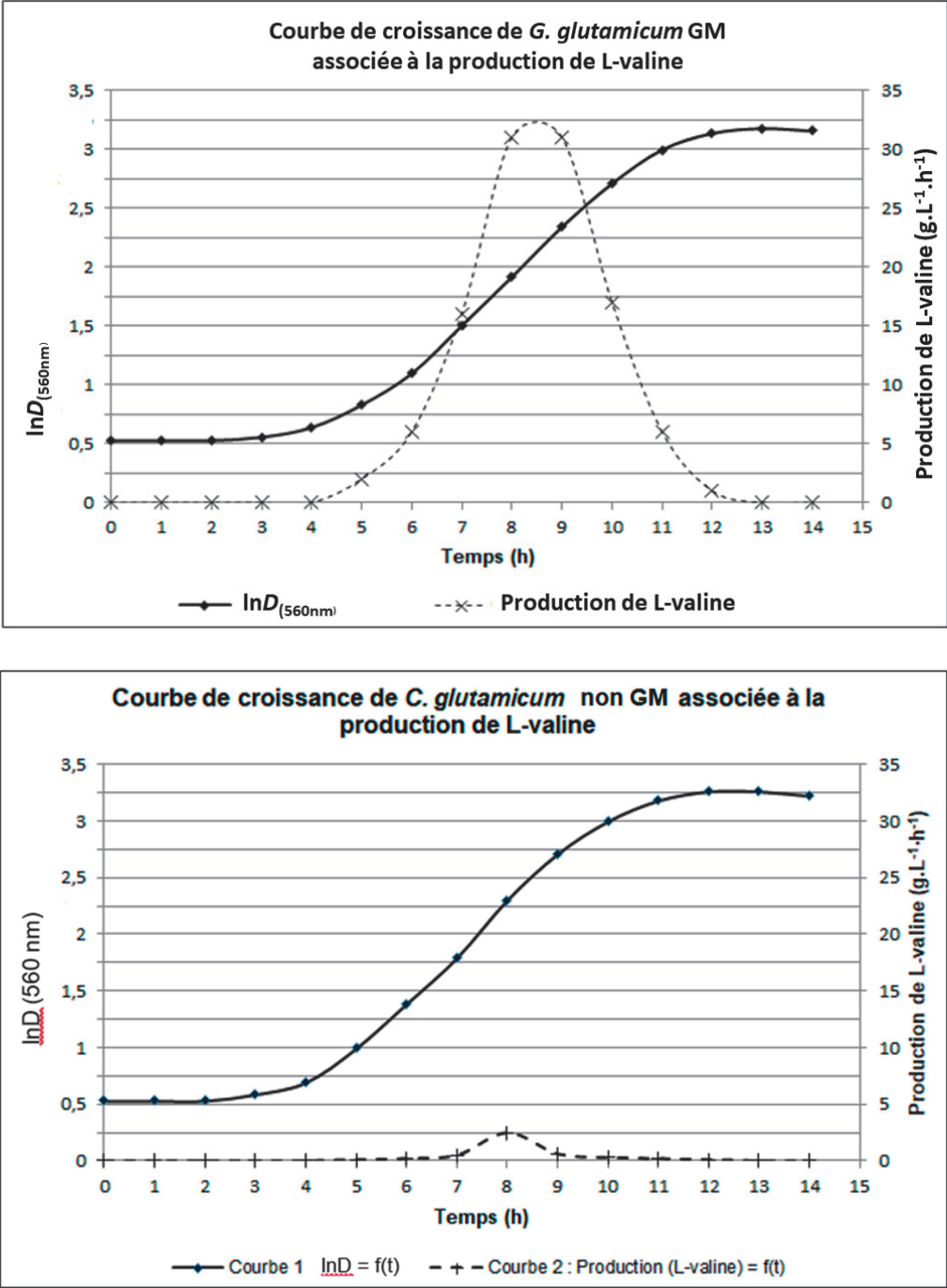
DOCUMENT 2 - Étapes du clonage de *C. glutamicum*



DOCUMENT 3 - Réaction d'hydrolyse du X-gal par la β -galactosidase



DOCUMENT 4 - Courbes de croissance de *C. glutamicum* et de *C. glutamicum* génétiquement modifiée, associées aux cinétiques de production de L-valine



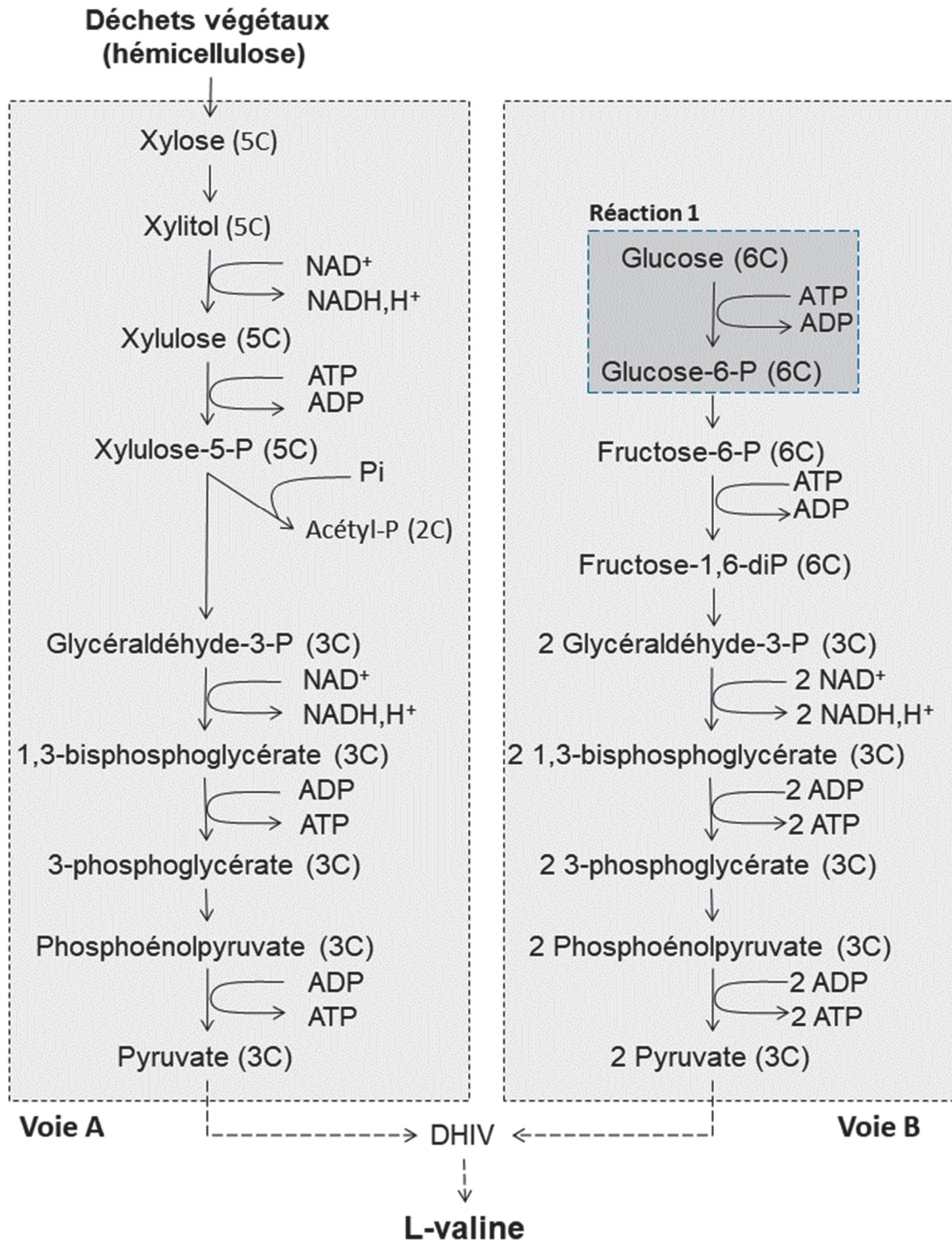
Données :

Équations aux grandeurs	
Vitesse spécifique de croissance (h ⁻¹)	Temps de génération
$\mu_{\text{expo}} = \frac{\ln D_2 - \ln D_1}{t_2 - t_1}$	$G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{expo}}}$

DOCUMENT 5 - Schéma simplifié du métabolisme de *C. glutamicum*

La souche de *C. glutamicum* est capable d'utiliser les deux voies métaboliques A et B : voie de dégradation du glucose (B) et voie de dégradation du xylose (A).

En présence de xylose, la souche *C. glutamicum* GM ne peut pas réaliser la réaction 1. De ce fait, seule la voie de dégradation du xylose est utilisée chez la souche GM.



DOCUMENT 6 - Risques dus à l'utilisation des OGM

Les organismes génétiquement modifiés (OGM)

D'après : *Les organismes génétiquement modifiés (OGM)*, Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des territoires, 11 Avril 2022. <https://www.ecologie.gouv.fr/>

La culture d'OGM de manière non contrôlée comporte des risques environnementaux significatifs. Par exemple, les plantes génétiquement modifiées (GM) peuvent se croiser avec des variétés sauvages et disséminer leurs gènes de manière incontrôlée dans la nature. À titre d'exemple, une plante GM tolérante à un herbicide risque de transmettre cette tolérance à des plantes sauvages de la même famille.

Les plantes GM qui produisent une protéine insecticide peuvent ne pas être nocives uniquement pour les insectes cibles mais peuvent aussi affecter d'autres espèces d'insectes (dites non cibles) qui jouent un rôle dans l'équilibre écologique global en étant, par exemple, prédateurs de parasites. Enfin, l'utilisation en continu de ces plantes GM pour sécréter des insecticides favorise l'apparition, chez les insectes cibles, de mécanismes de résistance à la molécule insecticide. [...]

Utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés

Adapté du *Manuel du Haut Conseil des Biotechnologies pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés* (p4, p177) – 4 juillet 2019 <http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr>

Selon le Code de l'environnement, les organismes (micro-organismes et plantes génétiquement modifiés GM) sont classés en quatre groupes distincts en fonction des risques qu'ils présentent pour la santé publique ou l'environnement, et notamment de leur pathogénicité.

Le groupe I comprend les organismes GM réunissant les conditions suivantes : ni l'organisme parental, ni le vecteur et l'insert, ni l'organisme récepteur, ni l'organisme GM entier, ne sont susceptibles de provoquer une maladie chez l'être humain, les animaux ou les végétaux, ni de causer des effets négatifs sur l'environnement.

Les installations mettant en œuvre des microorganismes GM de groupe I dans un processus de production industrielle sont soumises à la réglementation prévue pour la protection de l'intervenant et de l'environnement.

Les principes de bonnes pratiques microbiologiques sont appliqués au sein de l'établissement. Les fermenteurs sont équipés de dispositifs permettant d'assurer l'étanchéité. Ils sont munis d'un système de prise d'échantillon stérilisable à la vapeur. La mise en culture doit être réalisée en système clos. Une analyse des effluents aqueux permettant de rechercher la présence de microorganismes GM viables doit être réalisée au minimum une fois par trimestre. Les déchets, les emballages où subsistent des microorganismes GM et la biomasse des fermenteurs doivent être inactivés par des moyens validés avant élimination. En cas de bris de verre ou de fuite de cuve, les débris et produits sont inactivés au moyen d'un produit désinfectant approprié.

Démarche de prévention des risques

D'après le site du 3RB – consulté le 20-10-2022. <https://www.esst-inrs.fr/>

La démarche de prévention des risques biologiques suit une logique simple :

- analyse / évaluation *a priori* des risques ;
- mise en place de mesures de prévention.

L'analyse des risques nécessite l'observation d'une situation de travail à partir de laquelle sont repérés les dangers, les personnes exposées et les modes d'exposition des personnes.

Cette analyse conduit à proposer des mesures de prévention

1. Danger : propriété intrinsèque du produit, source potentielle d'atteinte à la santé.
2. Situation exposante : toute situation dans laquelle une personne est exposée à un ou plusieurs dangers pouvant entraîner une atteinte à la santé.
3. Évènement déclencheur : il est susceptible de causer une atteinte à la santé.
4. Atteinte à la santé.