

BIOTECHNOLOGIES

Durée : 3 heures

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le surveillant qui vérifiera et, éventuellement, remplacera le sujet.

Le sujet comprend au total 10 pages numérotées de 1 à 10.

Le sujet comporte 13 documents situés en pages 5 à 10.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

Avertissements :

- La plupart des questions sont indépendantes ou regroupées en parties indépendantes.

La question rédactionnelle (Q10) est clairement identifiée.

PARTIE 1.

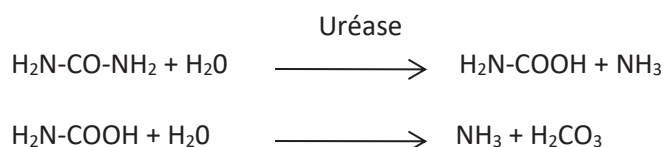
Un biocapteur à urée performant

Un biocapteur est un dispositif qui couple l'activité biologique d'un composant immobilisé à un transducteur qui convertit le signal biochimique en signal électrique facilement quantifiable. Les enzymes, du fait de la grande spécificité pour leur substrat, sont largement utilisées pour doser des molécules d'intérêt.

On se propose d'étudier un biocapteur clinique, à enzyme uréase immobilisée sur des dispositifs Chemical Field Effect Capacitance (ChemFEC), dédié au dosage de l'urée

1. Structure du biocapteur uréase/ChemFEC

L'uréase catalyse la réaction de dégradation de l'urée ($\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$) en ammoniac (NH_3) et acide carbamique ($\text{H}_2\text{N-COOH}$). L'acide carbamique se décompose ensuite spontanément en NH_3 et H_2CO_3 .



H_2CO_3 est un diacide faible: $\text{pK H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^- = 6,4$ et $\text{pK HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-} = 10,3$

NH_3 est une base faible : $\text{pK NH}_4^+/\text{NH}_3 = 9,2$

Il est possible d'associer cette enzyme à un transducteur sensible au pH et de construire ainsi un biocapteur permettant de doser l'urée. Le principe du biocapteur à urée étudié dans le sujet est le suivant :

- de l'uréase est immobilisée à la surface d'un capteur électronique sensible au pH appelé ChemFEC, (le sujet ne demande pas de connaissance à propos des structures semi-conductrices ChemFEC) ;
- en présence d'urée, la réaction catalysée par l'enzyme entraîne une variation locale de pH à l'interface uréase immobilisée/ChemFEC ;
- cette variation locale de pH provoque, sur la structure ChemFEC, une variation du potentiel électrique appelé potentiel de « bande plate ».

Ainsi, dans ce biocapteur qui se présente sous la forme d'une « électrode à urée », l'association d'uréase immobilisée à une structure ChemFEC permet d'associer la réaction catalysée à un signal final potentiométrique.

Le biocapteur à urée est utilisé pour doser l'urée en milieu très faiblement tamponné à $\text{pH} = 7,4$.

Banque « Agro-véto »

A TB – 0321

Q1. Expliquer pourquoi la dégradation de l'urée par l'uréase entraîne une variation locale de pH et donner le sens de variation.

Pour réaliser un film d'uréase immobilisée à la surface de la structure ChemFEC, on choisit la stratégie présentée dans les documents 1 et 2.

Q2. Représenter la structure ChemFEC/polymère polypyrrole-biotine/avidine/uréase-biotinylée à l'aide d'un schéma annoté.

2. Uréase biotinylée et choix du système avidine/biotine pour la réalisation du film enzymatique du biocapteur

La construction du biocapteur nécessite de disposer d'un conjugué uréase-biotine (uréase biotinylée).

Le document 3 présente le mode opératoire de fabrication de ce conjugué.

Q3. Présenter le principe de la chromatographie d'exclusion. La réponse devra inclure les termes exclusion, diffusion sélective, volume mort. Représenter l'allure de l'évolution de V_e (V_e : volume d'élution) en fonction de MM (MM : masse moléculaire) pour des protéines globulaires hydrosolubles.

Q4. Expliquer la séparation recherchée lors de l'étape de chromatographie présentée dans le document 3.

Le document 4 présente les caractéristiques de 3 gels pour chromatographie d'exclusion-diffusion.

Q5. Argumenter celui (ceux) le (les) mieux adapté(s) à la séparation recherchée. Choisir un support chromatographique adapté à la séparation recherchée.

Q6. Le même résultat aurait pu être obtenu par dialyse, définir ce terme et proposer un montage sous forme d'un schéma annoté.

Pour que le système d'immobilisation choisi soit pertinent, il faut que la liaison avidine/biotine soit quasi totale et quasi irréversible.

Q7. Justifier le caractère quasi total et irréversible de la liaison avidine/biotine à l'aide des données du document 2.

3. Étude de comportement du biocapteur

Les documents 5 et 6 présentent les résultats de :

- la réponse du bio capteur en fonction de la concentration en urée ;
- l'effet de la température sur le fonctionnement du biocapteur.

Q8. Analyser et interpréter les données du document 5.

Q9. Analyser et interpréter les données du document 6.

Q10. Question rédactionnelle : dosages de substances par méthode enzymatique en cinétique en phase homogène

Le biocapteur étudié réalise un dosage de substrat par méthode enzymatique en cinétique en phase hétérogène. Plus classiquement, de nombreux dosages de substrats sont réalisables par méthode enzymatique en cinétique en phase homogène : en présenter le principe général et discuter les contraintes techniques associées. L'utilisation de systèmes de réactions couplées sera traitée.

La réponse devra être soigneusement organisée et rédigée.

PARTIE 2.

Streptomyces ambofaciens et production de spiramycine

Le genre *Streptomyces* regroupe des bactéries filamenteuses à gram positif, immobiles, chimio organotrophes, sporulantes et aérobies strictes. Elles sont capables de cataboliser des molécules glucidiques très diverses dont le glucose, le maltose, le mannose, l'amidon mais aussi des molécules lipidiques grâce à un équipement enzymatique très varié.

Ces bactéries sont largement étudiées et exploitées du fait de la grande diversité des antibiotiques qu'elles produisent.

1. Cycle de vie de *Streptomyces ambofaciens* et conservation

Le cycle des bactéries filamenteuses du genre *Streptomyces*, décrit au [document 7](#), est organisé en 4 phases. La germination de la spore donne naissance à des hyphes végétatifs (dans la gélose ou le sol). La déplétion locale en nutriments du milieu déclenche une transduction du signal induisant l'apparition d'hyphes aériens non septés qui finalement donnent naissance à un chapelet de spores.

Le [document 8](#) présente trois méthodes de conservation d'une souche de *Streptomyces*.

Q11. Comparer les 3 méthodes en dégagant les avantages et les inconvénients de chacune.

Q12. En déduire la méthode la plus adaptée soit à une utilisation régulière, soit à une utilisation exceptionnelle de la souche.

Le [document 9](#), montre certaines caractéristiques des génomes de *Streptomyces ambofaciens* et d'*Escherichia coli*.

Q13. Expliquer le sens de l'expression « séquences codantes ».

Q14. Discuter des spécificités du génome de *Streptomyces* à l'aide du [document 9](#).

Une des particularités du chromosome de *Streptomyces* est une organisation linéaire ne disposant que d'une seule origine de réplication.

Q15. Présenter avec concision les différentes étapes de la réplication.

Q16. Expliquer le problème rencontré lors de la terminaison de réplication des ADNs linéaires pour le brin retardé.

2. Production industrielle de spiramycine

La production industrielle repose sur une culture en bioréacteur. La diversité des sources de carbone et d'énergie utilisables par *Streptomyces* permet aux industriels d'utiliser un milieu de culture à coût très modéré comme celui présenté au [document 10](#).

Q17. Après avoir analysé la composition du milieu de culture, argumenter son utilisation en accord avec les types trophiques de la souche : chimio organotrophe et hétérotrophe.

Banque « Agro-véto »

A TB – 0321

Une fermentation pilote en bioréacteur de 2 litres, sous aération, est mise en œuvre pour réaliser un suivi des paramètres de production : évaluation de la biomasse (X), disparition des substrats nutritifs amidon (S_A) et lipides totaux (S_L) et apparition de l'antibiotique produit la spiramycine (P).

Le pH est régulé à 6,5 et l'aération est régulée pour maintenir O_2 dissous au-dessus de la concentration critique de 10 % de saturation avec les actionneurs : rotation turbine et débit d'air.

Une préculture préparée à partir de spores conservées à -80°C , incubée sous agitation à 28°C pendant 72h, sert à inoculer le bioréacteur.

Q18. Montrer que le choix du terme « fermentation » est ambigu dans ce cas particulier.

Q19. Construire un tableau pour récapituler et ordonner les paramètres suivis en distinguant ceux simplement suivis de ceux régulés.

Q20. Schématiser et décrire la boucle de la régulation de la concentration en dioxygène dissous en cours de production en bio-réacteur.

Le document 11 montre l'évolution de la biomasse en fonction de la durée de fermentation, avec 2 types de représentation graphique.

Q21. Choisir une représentation graphique pour :

- évaluer la durée de la phase de croissance exponentielle ;
- déterminer la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle $\mu_{X\text{expo}}$ (crire les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques sans effectuer d'application numérique) ;
- déterminer graphiquement le temps de génération, en présentant la méthode.

Le document 12 présente l'évolution des concentrations en substrat.

Q22. Analyser, à l'aide d'une hypothèse inductions - répressions, les courbes de consommation des substrats utilisés. Les documents 10, 11 et 12 seront utilisés. On distinguera dans la réponse les phases d'adaptation, exponentielle, de ralentissement et le plateau de biomasse.

Les variations en cours de production des concentrations des activités amylasique et lipolytique sont présentées dans le document 13.

Q23. Mettre en relation les pics d'activité enzymatique et les différentes phases de la production.

Q24. Calculer :

- la productivité volumique horaire en spiramycine entre 0 et 100 h ;
- le rendement de conversion de l'huile de maïs en spiramycine entre 40 et 100 h.

Montrer l'intérêt de ces deux grandeurs.

Document 1

Structure et réalisation d'un biocapteur enzymatique à urée associant un semi-conducteur sensible au pH (ChemFEC) et un film d'uréase immobilisée

- Un dépôt homogène d'une solution de pyrrole-biotine (monomère de pyrrole* lié de façon covalente à une molécule de biotine**) est réalisé sur la partie active sensible au pH du ChemFEC.
- Le pyrrole est greffé et polymérisé sur le semi-conducteur par traitement oxydant au FeCl_3 en milieu acide suivi d'un rinçage à l'eau ultra pure. On obtient ainsi une couche de polypyrrole biotinylé à la surface active du ChemFEC.
- Un dépôt de solution d'avidine*** est alors réalisé.
- Après séchage, une solution de conjugué uréase-biotine est déposée pour former la « dernière couche » du biocapteur.

* : le pyrrole est une molécule organique qui est greffable/polymérisable par oxydation à la surface active du semi-conducteur ChemFEC

** : la biotine est présentée dans le document 2.

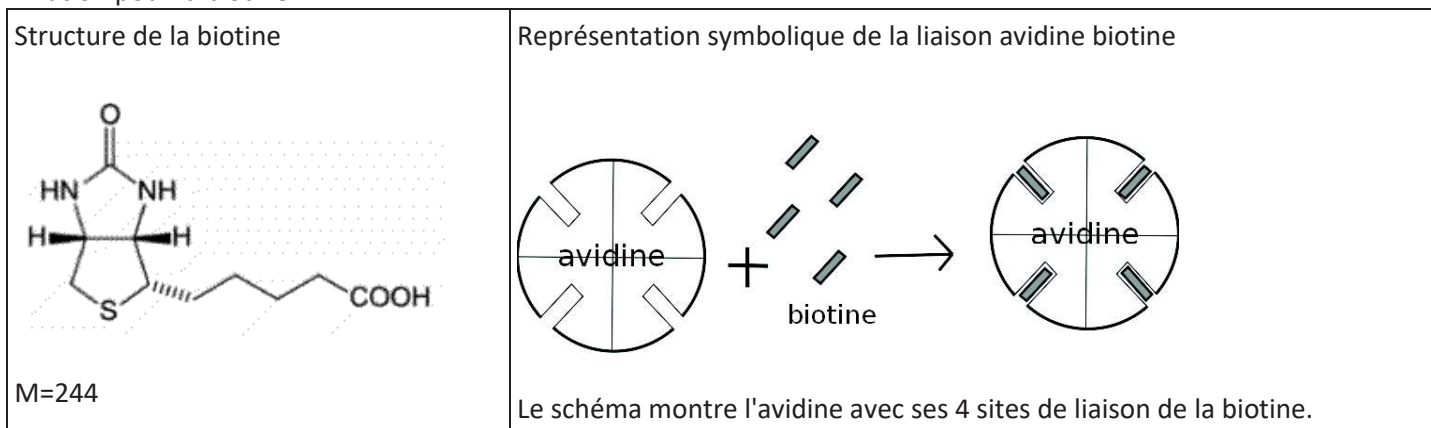
*** : l'avidine est présentée dans le document 2.

Document 2

Données à propos de la biotine et de l'avidine

L'avidine est une glycoprotéine du blanc d'œuf qui complexe spécifiquement, avec une très grande affinité, la molécule de biotine.

L'avidine est formée par l'association de 4 sous-unités identiques. La protéine possède finalement 4 sites de fixation pour la biotine.



En admettant que les 4 sites de liaison sont identiques et indépendants, la littérature donne pour la réaction de fixation d'une biotine sur un site de l'avidine :

- coefficient de vitesse de la réaction d'association

$$k_a = 7 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1};$$

- coefficient de vitesse de la réaction de dissociation

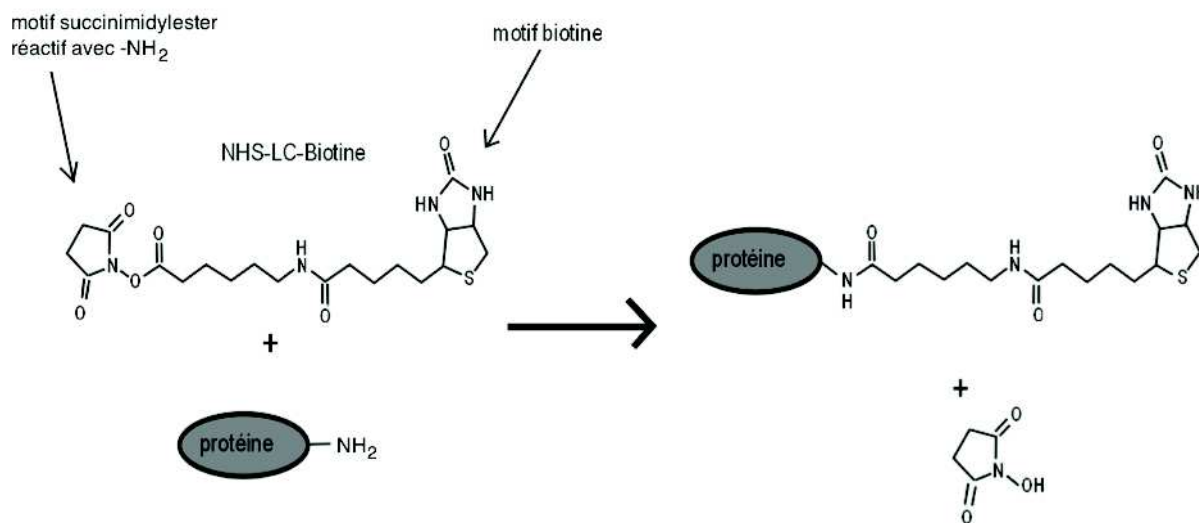
$$k_r = 9 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}.$$

Document 3

Préparation d'un conjugué uréase-biotine (uréase biotinylée)

Une suspension d'uréase de haricot jacquier (*Canavalia ensiformis*) à $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (EC 3.5.1.5 type III, MM 545 000 Da, 6 sous-unités de 91 000 Da) en tampon phosphate $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 7,5 est additionnée à une solution anhydre en diméthylformamide de 6-((biotinoyl)amino)hexanoic acid, succinimidylester (NHS-LC-biotin) en large excès molaire (10 pour 1).

La réaction est conduite à température ambiante sous agitation pendant 1 heure. De la glycine en excès est alors ajoutée et le milieu est laissé une heure sous agitation. Les divers réactants (de petite taille) sont alors séparés de l'uréase biotinylée par chromatographie d'exclusion.



Document 4

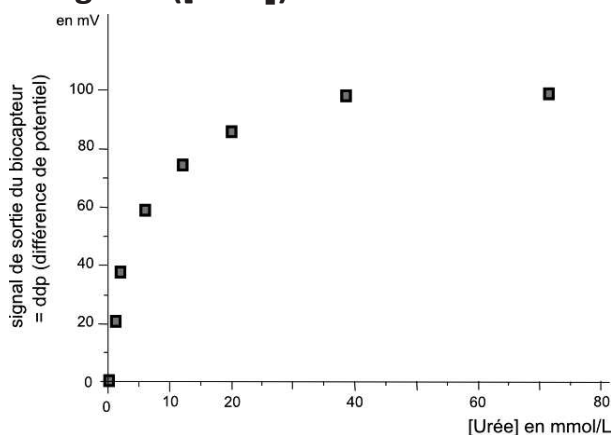
Caractéristiques de 3 gels pour chromatographie d'exclusion

Phase stationnaire (gel)	Limite d'exclusion (protéines globulaires) en Da	Intervalle de perméation sélective (protéines globulaires) en Da
X	> 5000	1000 - 5000
Y	> 80 000	3000 - 80 000
Z	> 150 000	1000 - 100 000

Document 5

Fonction de réponse signal=f([urée])

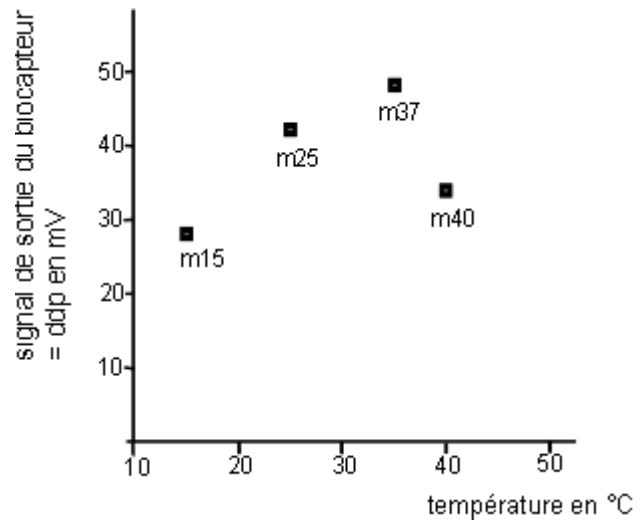
La figure ci-contre propose la fonction de réponse du biocapteur à l'urée dans un milieu à pouvoir tampon faible (phosphate sodique $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) et à pH = 7,4. En abscisse la concentration en urée dans le milieu mesuré, en ordonnée le signal de sortie (un potentiel électrique).



Document 6

Influence de la température sur la réponse du biocapteur

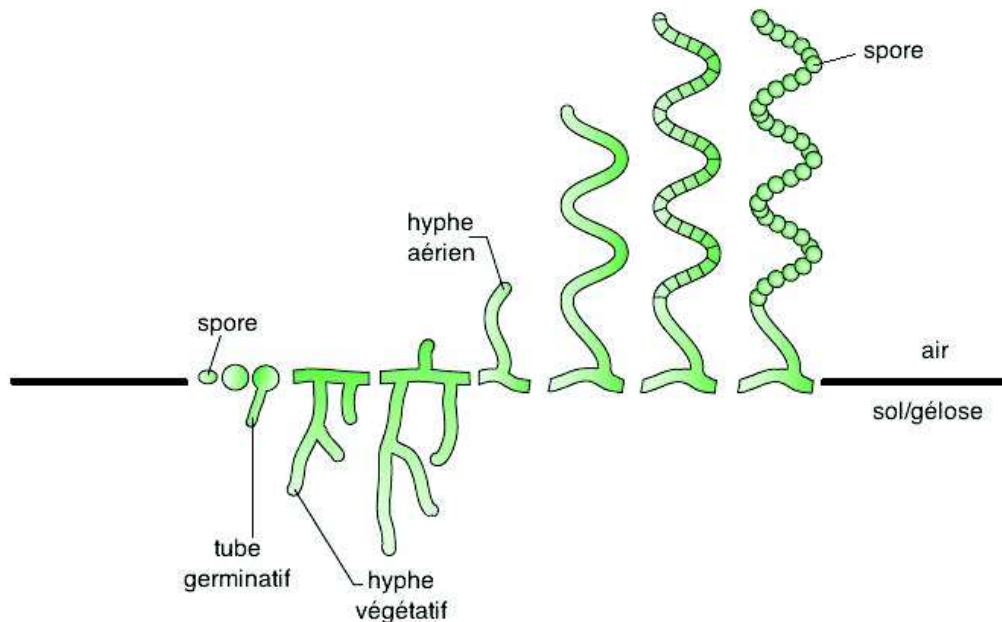
La figure ci-dessus montre l'influence de la température sur la réponse du biocapteur à une concentration en urée de $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Mesures effectuées dans un tampon phosphate $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{pH} = 7,4$. Les points expérimentaux sont dénommés m15, m25, m37 et m40 pour 15°C , 25°C , 37°C et 40°C respectivement.



(Les documents n°1, 5 et 6 sont adaptés de Houcine Barhouni, Elaboration et caractérisations de nouvelles membranes enzymatiques pour application "biocapteur" en hémodialyse rénale, Thèse en cotutelle Université de Monastir Ecole Centrale de Lyon, 2006)

Document 7

Cycle de vie des *Streptomyces*



Nature review, microbiology january 2009/ volume 7

Document 8

Mode de conservation des bactéries du genre *Streptomyces*

- Conservation sur milieu gélosé à 4°C et repiquage toutes les 2-8 semaines
- Conservation des mycéliums en stocks glycérolés à - 80°C, à partir d'une culture en milieu liquide et ajout de glycérol, pour une concentration finale de 25%.
- Conservation des spores en stocks glycérolés à - 80°C, à partir d'une culture « jeune », les chaînes de spores sont collectées dans de l'eau distillée stérile et les spores sont dissociées par agitation (très) vigoureuse. La suspension est alors filtrée, puis centrifugée, et spores sont mises en suspension dans une solution de glycérol à 25%.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950629/pdf/nihms234294.pdf>

Document 9

Caractéristiques du génome de *Streptomyces*

Critère	<i>Streptomyces</i>	<i>E. coli</i>	Organisation du chromosome de <i>Streptomyces</i>
Taille (pb)	8 667 507	4 639 675	
Séquences répétées inversées terminales (pb)	21 653	Absent	
C+G (%)	72,12	50,79	
Séquences codantes	7 825	4 466	
Pourcentage de séquences codantes (%)	88,9	87,8	
Longueur moyenne d'un gène (pb)	991	912	

<http://www.nature.com/nature/journal/v417/n6885/pdf/417141a.pdf>

http://microbes.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=eschColi_K12

Document 10

Composition d'un milieu de production

Composé	Concentration
Corn steep*	20,0 g · L ⁻¹
Amidon soluble	50,0 g · L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g · L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2,8 g · L ⁻¹
FeSO ₄	0,5 g · L ⁻¹
NaCl	10,0 g · L ⁻¹
	pH ajusté à 6,5
Huile de maïs	20 g · L ⁻¹

*Le corn steep, est un liquide concentré riche en **protéines hydrosolubles** et en **minéraux**.

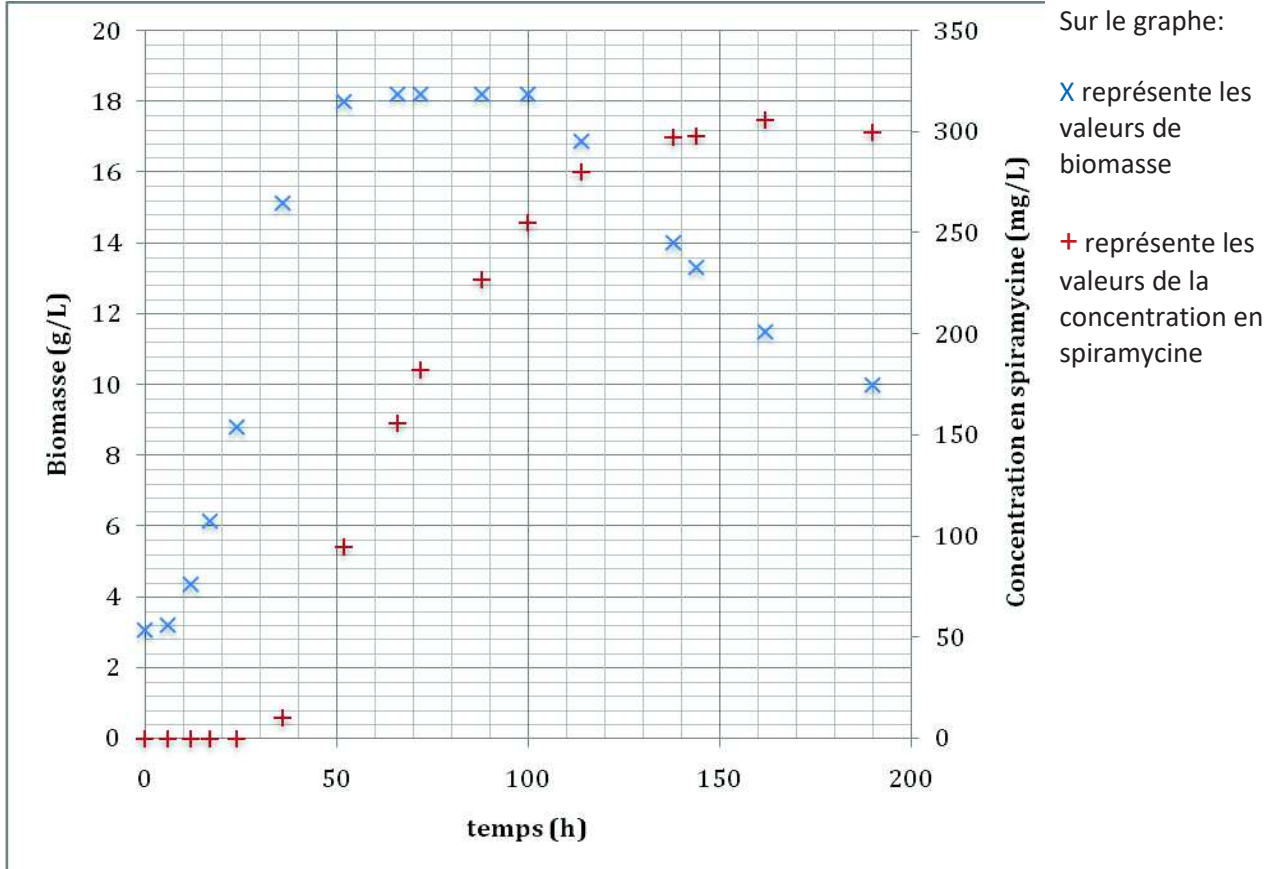
Il est obtenu par trempage des grains de maïs dans l'eau pendant 30 à 50 heures à une température de 47,8°C. De nombreuses molécules solubles du grain de maïs diffusent dans l'eau, mais l'amidon reste dans le grain de maïs. L'eau de trempage est ensuite évaporée pour former le corn steep.

http://www.arthomson.com/Literature/brochures/MechSeals/AESSEAL/IndustrySealingGuides/L_UK_CORN.pdf

Document 11

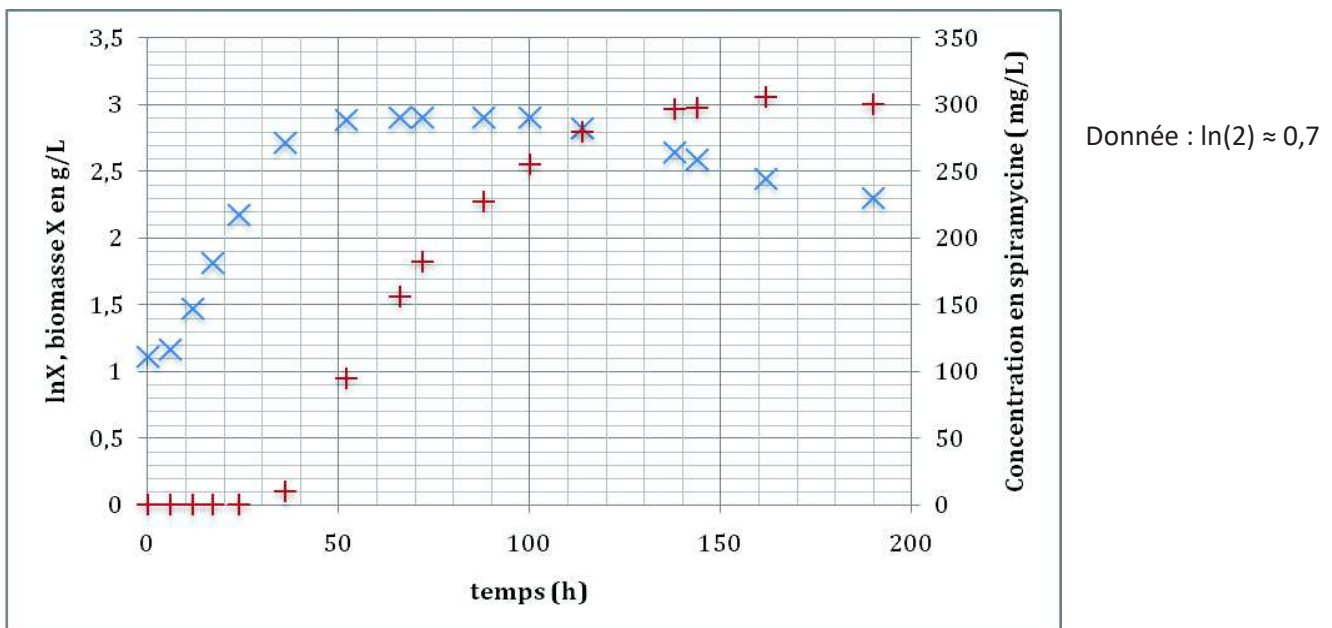
Evolution de la biomasse et de la concentration en antibiotique produit
 au cours de la fermentation

A. Représentation graphique des variations de la biomasse et de la concentration en spiramycine en fonction de la durée de fermentation.



B. Représentation du logarithme népérien de la biomasse X et de la concentration en spiramycine en fonction de la durée de fermentation.

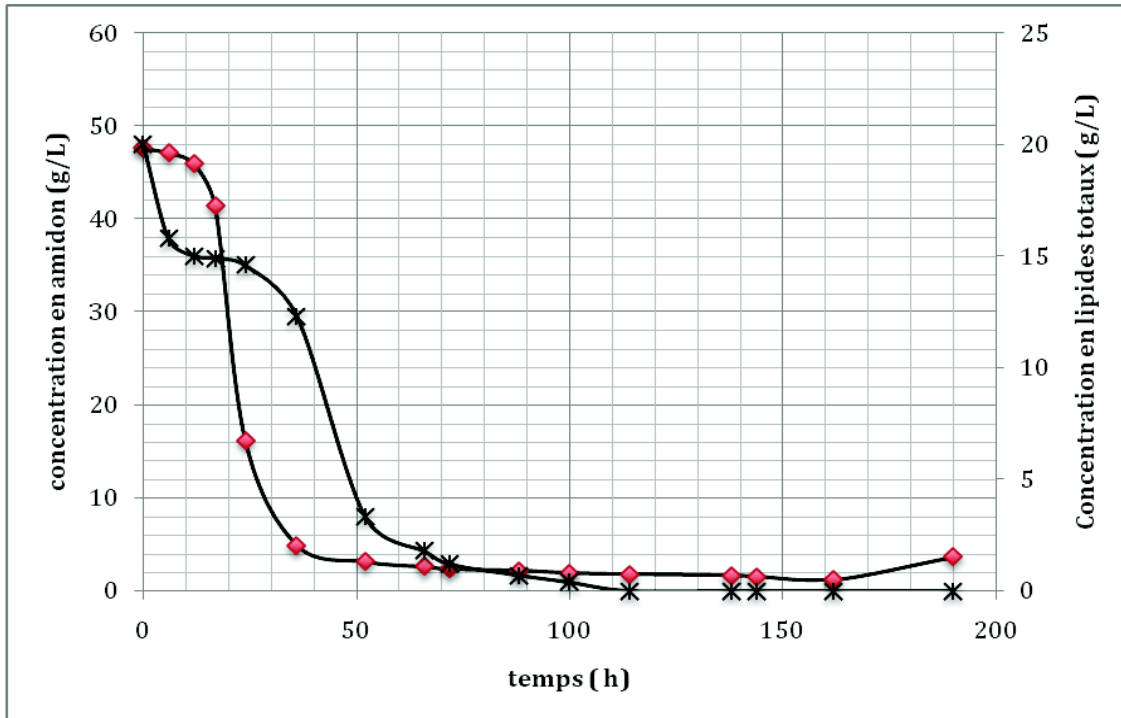
(X) : biomasse (+) : spiramycine



Données adaptées de : Improved production of spiramycin by mutant *Streptomyces ambofaciens*, Jin Z. H and Cen P. L., J Zhejiang Univ Sci. 2004 Jun;5(6):689-95.

Document 12

Suivi de concentration en substrat (lipides totaux et amidon) pendant la fermentation.

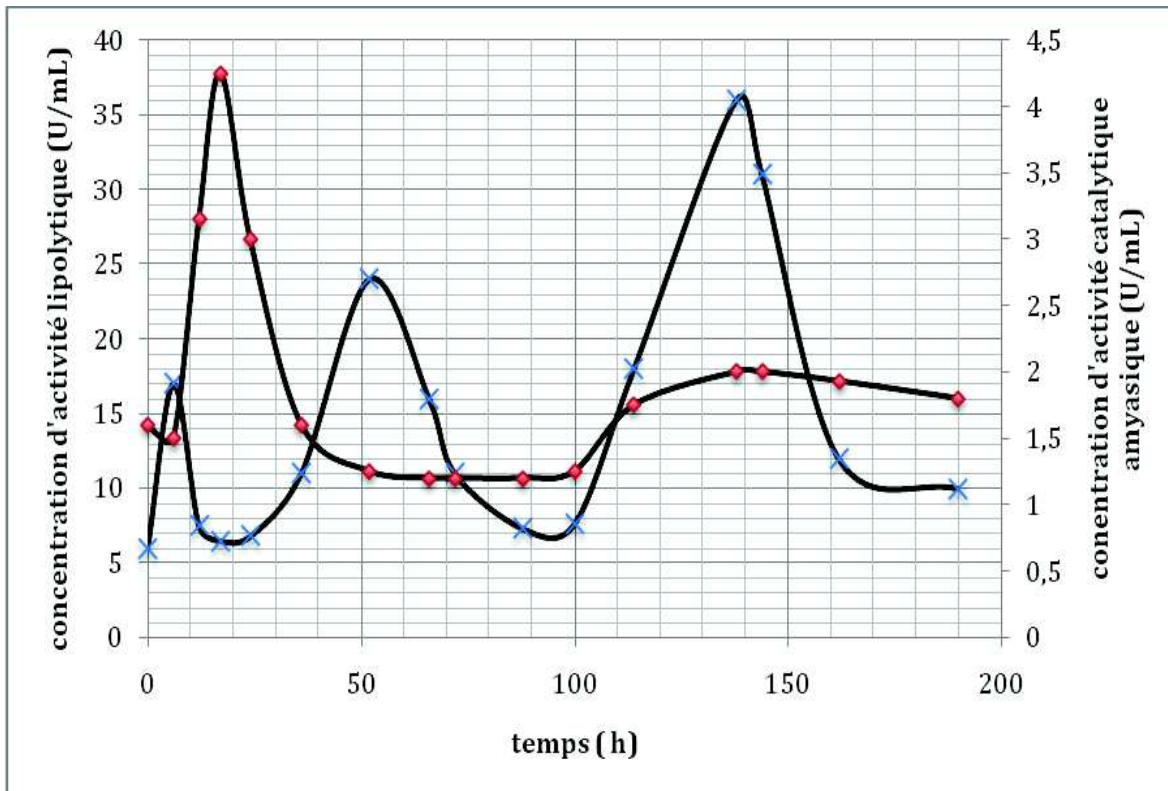


◆ : amidon X : lipides

Données adaptées de : Improved production of spiramycin by mutant *Streptomyces ambofaciens*, Jin Z. H and Cen P. L., J Zhejiang Univ Sci. 2004 Jun;5(6):689-95.

Document 13

Suivi des activités enzymatiques (lipase et amylase) pendant la fermentation



X : activité lipolytique ◆ : activité amyasi que