



VOIE TECHNOLOGIQUE

STL : sciences et technologies de laboratoire

2^{DE}

1^{RE}

T^{LE}

Biochimie-biologie-biotechnologies

ENSEIGNEMENT

SPECIALITE

ANALYSE DU SUJET SPÉCIMEN « PRODUCTION ET PURIFICATION D'UNE ENZYME, LA TAQ POLYMÉRASE » MIS À DISPOSITION DANS LE CADRE DE L'ÉVALUATION EN CONTRÔLE CONTINU

Note d'intention

Cette ressource a pour objectif d'accompagner les professeurs à former et évaluer en contrôle continu par compétences. Elle contribue à l'appropriation de chacune des 5 compétences spécifiques à l'épreuve : à travers une analyse du sujet de baccalauréat, ce document explicite les compétences mobilisées dans chaque question, ainsi que les savoir-faire et concepts associés issus des programmes de « Biochimie, biologie et biotechnologies » de terminale STL-biotechnologies et de « Biotechnologies » de première STL-biotechnologies. La démarche de réflexion suivie par l'élève lors de l'évaluation, ainsi explicitée, permet au professeur d'attribuer la compétence mobilisée et de choisir le verbe de consigne associé.

En formation, le professeur peut travailler avec les élèves l'acquisition d'une démarche de réflexion rigoureuse et élaborer ainsi des évaluations en continuité de la construction des compétences.

Question et éléments de l'énoncé	Identification de la compétence et explicitation de la démarche suivie par l'élève	Savoir-faire...	...et concepts associés
Q1. (C1) Argumenter l'utilisation du milieu LB additionné avec de l'ampicilline pour sélectionner spécifiquement les bactéries transformées.	Il s'agit d'une compétence C1 « analyser » car l'élève peut répondre en exploitant les informations données dans le sujet. Il doit intégrer des éléments présents dans plusieurs sources du sujet en mobilisant sa culture de biotechnologies : • L'élève relève, dans le paragraphe introductif, que les bactéries <i>E. coli</i> sont sensibles à l'ampicilline. La compréhension de ce paragraphe lui permet d'associer l'expression « transformation bactérienne » à l'introduction du plasmide recombiné. • L'élève repère, sur le schéma du plasmide recombiné du document 1, le gène de résistance à l'ampicilline. Il fait alors le lien avec la caractéristique du milieu de culture utilisé qui contient de l'ampicilline.	T9-4 Clonage d'un fragment d'ADN Décrire les étapes d'un clonage.	Transformation Sélection
Élément de corrigé : les bactéries <i>E. coli</i> sont sensibles à l'ampicilline. Elles sont transformées avec un plasmide contenant un gène conférant la résistance à l'ampicilline. Les bactéries recombinées sont donc résistantes à l'ampicilline. Le milieu LB additionné d'ampicilline permet de sélectionner les bactéries recombinées.			
Q2. (C2) Calculer l'atténuation minimale à atteindre pour arrêter la culture avant de réaliser l'extraction. <u>Données :</u> $D_{\text{suspension à 550 nm}} = 0,1$ pour la concentration $C_{N(E.coli; \text{suspension})} = 6,0 \cdot 10^7$ bactéries·mL⁻¹ Limite de linéarité $D_{\text{suspension à 550 nm}} = 0,5$	Il s'agit d'une compétence C2 mobilisant les savoir-faire calculatoires dans le contexte d'une croissance bactérienne. L'élève s'approprie les données de la question Q2 pour déterminer l'atténuation par relation de proportionnalité. Cette relation n'est possible que dans la partie linéaire de la courbe (notion d'ensemble de définition). L'élève vérifie que l'atténuation est inférieure à la limite de linéarité pour exploiter le résultat.	T2.2 Modélisation de la croissance en milieu non renouvelé Faire le lien entre l'atténuation et la biomasse. 1^{re} STL / 8 – Déterminer la concentration d'une biomolécule dans un produit biologique.	Atténuation Loi de Beer Lambert (limite de linéarité)
Élément de corrigé : pour $1,2 \cdot 10^8$ bactéries·mL⁻¹, $D_{\text{suspension à 550 nm}} = 0,2$ (inférieur à la limite de linéarité). Il est possible d'arrêter la culture à $D_{\text{suspension à 550 nm}} = 0,2$.			

Q3. (C2) Vérifier en calculant la concentration bactérienne précise si l'extraction de la Taq polymérase est possible.	Il s'agit d'une compétence C2 enrichie mobilisant les savoir-faire calculatoires et l'appropriation de la procédure présentée dans le document 2 : l'élève doit mettre en œuvre le calcul de façon adaptée et conclure à l'aide d'une valeur de référence. L'élève analyse le document pour sélectionner les deux boîtes à retenir. <i>Il peut s'assurer que le nombre de colonies de chaque boîte est exploitable car PCA est un milieu sans agent de différenciation.</i> Il applique l'équation aux grandeurs donnée dans le document 2 en mobilisant les différentes grandeurs, notamment la dilution de la boîte « contenant l'inoculum le moins dilué ». Il effectue le calcul et l'exprime en respectant les données métrologiques du document. Il compare le résultat à la valeur donnée dans le paragraphe précédant la Q2 pour pouvoir conclure.	T4.2 Réaliser un dénombrement après culture en milieu solide Choisir une méthode de dénombrement en milieu solide adaptée au contexte.	Dénombrement en surface
Élément de corrigé : soit $3.14 \cdot 10^8$ bactéries $\cdot \text{mL}^{-1}$. Donc l'extraction de la Taq polymérase est possible.			
Q4. (C1) Expliquer la rétention de l'enzyme dans la colonne.	Il s'agit d'une compétence C1 « analyser », car les informations permettant à l'élève de répondre sont données dans les documents. Une culture en biotechnologies est indispensable à la compréhension fine du document. L'élève relève dans le document 3 que l'enzyme est chargée négativement et dans le document 4 que la colonne est constituée de cations. Le terme de « rétention » est explicité dans le document 4.	1^{re} STL / 7 – Séparer les composants d'un mélange • Séparation des biomolécules par chromatographie d'échanges d'ions dans le but de les purifier Expliquer l'établissement de liaisons ioniques entre les molécules à séparer et les constituants des phases.	Phase fixe chargée/ phase mobile
Élément de corrigé : l'enzyme est chargée négativement. La résine est chargée positivement et retient les anions. L'enzyme se fixe donc sur les cations de la colonne.			

Q5. (C1) Après avoir comparé la composition du tampon A et du tampon B, expliquer l'élution de la Taq polymérase par le tampon B.	Il s'agit d'une compétence C1 « analyser », car les informations permettant à l'élève de répondre doivent être extraites des documents, texte et illustration, en mobilisant sa culture et articulées dans une réponse construite.	1^{re} STL / 7 – Séparer les composants d'un mélange Séparation des biomolécules par chromatographie d'échanges d'ions dans le but de les purifier Expliquer l'établissement de liaisons ioniques entre les molécules à séparer et les constituants des phases.	Force de rétention / force d'entraînement Fixation / lavage / élution
Élément de corrigé : le tampon B contient, en plus du tampon Tris en même concentration, du NaCl. Les ions Cl⁻ se fixent sur les cations de la colonne et déplacent l'enzyme qui est alors éluée.			
Q6. (C1) Reporter sur la copie les lettres (A) (B) (C) de légende du document 5 puis compléter avec les termes manquants.	Il s'agit d'une compétence C1 « analyser », car l'élève doit identifier, dans le schéma du document 5, les éléments lui permettant de nommer les différentes étapes de la PCR : - séparation des 2 brins d'ADN pour la dénaturation ; - liaison de l'amorce au brin d'ADN pour l'hybridation ; - polymérisation par la Taq polymérase pour l'élongation.	T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR Repérer les étapes des réactions d'un cycle de PCR à partir d'une procédure.	Dénaturation. Hybridation Élongation
Élément de corrigé : (A) : dénaturation (B) : hybridation (fixation des amorces) (C) : polymérisation (élongation)			
Q7. (C4) Expliquer en quoi la PCR est un test qui permet de mettre en évidence que la Taq polymérase produite est bien fonctionnelle.	Il s'agit d'une compétence C4 « argumenter », car l'élève doit transposer ses connaissances et savoir-faire sur l'activité enzymatique dans le contexte de l'activité Taq polymérase lors d'une PCR. Il mobilise de nombreuses ressources internes et il doit notamment comprendre que l'ADN matrice joue le rôle de substrat de la Taq polymérase dans ce contexte et que l'on teste la fonctionnalité de l'enzyme Taq polymérase.	T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR Déterminer le rôle de chaque composant du réactif de PCR en lien avec les mécanismes de réplication. S1.7 Les enzymes du métabolisme et la régulation Identifier les différents acteurs d'une réaction catalysée par une enzyme.	Contrôle positif Activité enzymatique Réaction enzymatique Substrat
Élément de corrigé : au cours de la PCR, c'est la Taq polymérase qui polymérise l'ADN à partir d'un ADN matrice. Si la Taq polymérase ne fonctionne pas, il n'y aura pas de production d'amplicon. Après une PCR à partir d'un mélange réactionnel complet, l'absence ou la présence d'amplicons révélée par électrophorèse permet de vérifier l'activité de la Taq polymérase.			

Q8. (C2) Calculer les T _m (températures de fusion) des amorces choisies.	Il s'agit d'une compétence C2 mobilisant les savoir-faire calculatoires. L'élève s'approprie les données du document 6 (formule de Wallace)	S3.1 Propriétés et structure des acides nucléiques Déduire de la structure de l'ADN ses propriétés physico-chimiques.	Température de fusion (T _m)
Élément de corrigé : application de la formule de Wallace Pour l'amorce sens soit 62 °C Pour l'amorce anti-sens soit 60 °C			
Q9. (C4) Sachant que la température d'hybridation doit être inférieure d'au moins 4 °C au T _m , discuter du choix d'utiliser la température de 56 °C comme température d'hybridation pour l'amplification du gène de référence.	Il s'agit d'une compétence C4 « argumenter », car l'élève doit confronter les résultats obtenus précédemment à la règle rappelée dans la question pour valider la proposition indiquée dans la question. Il organise ces éléments dans un raisonnement construit.	S3.1 Propriétés et structure des acides nucléiques Déduire de la structure de l'ADN ses propriétés physico-chimiques.	Température de fusion (T _m)
Élément de corrigé : choix de la température d'hybridation : il faut que les deux amorces se fixent. Choix de la température la plus faible à laquelle on ôte 4 °C.			
Q10. (C1) Vérifier l'absence d'ADN détectable en l'absence de Taq polymérase.	Il s'agit d'une compétence C1 « analyser », car l'élève doit exploiter les données du document 6 pour faire le lien entre la composition du témoin T- et l'absence d'amplification du gène sur le résultat de d'électrophorèse pour le puits correspondant.	T7.2 Séparation des biomolécules par électrophorèse Interpréter un électrophorégramme pour identifier les biomolécules séparées.	Distance de migration
Élément de corrigé : repérer la composition du témoin négatif : mélange réactionnel sans Taq polymérase. Pas de bande vers 1363 pb pour le témoin négatif.			
Q11. (C3) Expliquer la différence d'intensité de fluorescence obtenue pour les différentes conditions réalisées avec la Taq polymérase commerciale.	Il s'agit d'une compétence C3 « expliquer », car l'élève doit élaborer une réponse rigoureuse à l'aide d'un lexique de termes techniques précis, en s'appuyant sur ses ressources internes et sa compréhension d'une technique inédite pour lui, qu'il doit d'abord s'approprier.	T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR Vérifier le résultat et la qualité de la PCR par électrophorèse.	Amplicon
Élément de corrigé : plus il y a de la Taq polymérase dans le mélange réactionnel, plus la quantité d'amplicons est importante.			

Q12. (C3) Analyser le gel d'électrophorèse obtenu pour montrer que le protocole de production de la Taq polymérase est efficace.	Il s'agit d'une compétence C3 «expliquer», car l'élève doit élaborer une réponse rédigée en choisissant le vocabulaire adapté. Il s'appuie sur ses ressources internes et sa compréhension d'une technique inédite pour lui, dont il doit interpréter les résultats.	T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR Vérifier le résultat et la qualité de la PCR par électrophorèse.	Amplicon
Élément de corrigé : la Taq polymérase produite est fonctionnelle car présence d'amplicons de la séquence amplifiée dans les puits correspondants. Le nouveau protocole de production proposé par les scientifiques est satisfaisant.			
Q13. (C1) Déterminer la dilution de l'extrait de Taq polymérase purifiée à utiliser pour obtenir un résultat équivalent à celui de la Taq commerciale diluée au 1/40.	Il s'agit d'une compétence C1 «analyser», car la démarche à mener pour déterminer la valeur attendue est explicitée dans la question. L'élève doit s'adapter à une démarche inédite pour un élève de terminale : il doit repérer, sur la photographie du résultat d'électrophorèse, le puits correspondant à la dilution de Taq commerciale diluée au 1/40 et comparer l'intensité de fluorescence aux différentes bandes des puits de Taq produite par génie génétique pour sélectionner le puits adapté.	T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR Vérifier le résultat et la qualité de la PCR par électrophorèse.	
Élément de corrigé : la Taq extraite diluée au 1/1 280 est aussi active que la Taq commerciale diluée au 1/40 (bandes de taille équivalente).			
Q14. (C5) Rassembler sous la forme d'un organigramme la succession des étapes ayant conduit à la production d'une Taq polymérase à partir d'une bactérie <i>E. coli</i> transformée avec un plasmide contenant le gène codant l'enzyme.	Il s'agit d'une compétence C5, de type synthèse récapitulative. L'élève montre qu'il a compris le fil du sujet et reprend l'ensemble des étapes en utilisant un vocabulaire scientifique et technologique adapté dans une formalisation imposée.		
Élément de corrigé : organigramme avec transformation/ culture/ (filtration) /chromatographie échangeuse d'ions (récupération de l'éluat)/ PCR / électrophorèse.			

Q15. (C5) Montrer que la démarche menée dans le laboratoire évoqué en partie I relève d'une démarche de développement de produit en vue d'une production mais pas d'une démarche de recherche, contrairement aux exemples présentés dans le **document 7**.

Il s'agit d'une compétence C5, de type synthèse argumentative. L'élève s'approprie les contenus des deux textes du document 7 et sélectionne les arguments pertinents qui lui permettent d'élaborer une réponse structurée pour répondre à la question posée. Ici, l'élève doit comprendre la distinction entre la notion d'invention et la notion d'innovation. Pour cela, il doit analyser les deux documents pour repérer des caractéristiques d'une démarche de recherche. Il confronte ces caractéristiques à celles de la démarche utilisée dans le sujet.

Élément de corrigé : démarche de recherche :

- invention d'une technique;
- découverte d'une nouvelle enzyme.

Ici : développement et mise au point d'un procédé technique déjà existant qui est adapté à l'enzyme étudiée.