

Baccalauréat STL

Session 2025

Épreuve : **Biochimie-biologie-
biotechnologie**

Durée de l'épreuve : 3 heures

Coefficient : 16

PROPOSITION DE CORRIGÉ

DEGRADATION DES METAUX LOURDS PAR DES BACTERIES

PARTIE 1

1. Choix du modèle biologique en vue de la production de l'enzyme mercure-réductase

Q1. Pour *Cupriavidus metallidurans*, le milieu est trouble lorsque les nitrates sont source d'énergie, que le CO₂ (molécule minérale) est source de carbone, en anaérobiose. Cette espèce bactérienne cultive donc lorsque la source d'énergie est chimique et que la source de carbone est minérale: elle est donc chimio-autotrophes, anaérobie stricte et mésophile.

E coli cultive lorsque la source carbone et d'énergie est chimique et organique en présence ou en absence d'O₂. La souche est donc chimio-hétérotrophe aérobie anaérobie facultatif.

Q2. La phase exponentielle de croissance est la phase linéaire en représentation logarithmique donc elle débute à 75 minutes et finit à 135 minutes.

$$Q3. \mu_{expo} = \frac{\ln D2 - \ln D1}{t2 - t1} = \frac{0,90 - 0,45}{120 - 105} = 0,03 \text{ min}^{-1}$$

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{expo}} = 23 \text{ min}$$

Le temps de génération de la souche d'E coli est de 23 minutes, ce qui est beaucoup plus court que celui de *Cupriavidus metallidurans* qui est de 128h.

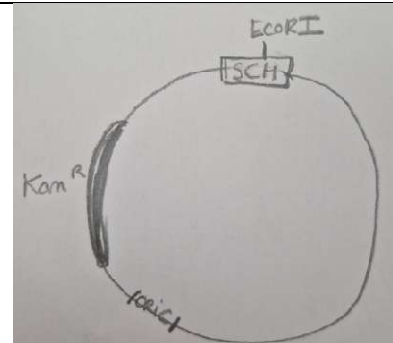
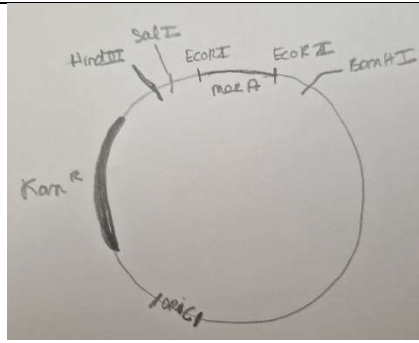
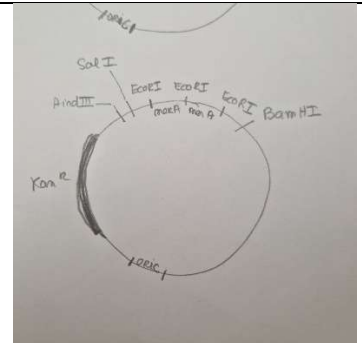
Q4. Le temps de génération est le temps nécessaire pour que la population double. Plus G est long, moins la souche cultive vite. La souche *Cupriavidus metallidurans* cultive très lentement car son temps de génération est de 128 h.

Il est donc intéressant de remplacer cette souche par une souche qui cultive plus vite. E coli ayant un temps de génération très court (23 minutes), la bactérie poussera plus vite et donc produira plus de mercure-réductase que la souche *Cupriavidus metallidurans*.

2. Mise au point d'une souche recombinante d'E coli productrice de mercure-réductase

Q5. Pour obtenir un plasmide recombinant, il est nécessaire d'avoir un plasmide et un insert qui ont des extrémités cohésives. En ajoutant les sites EcoR1 de part et d'autre du gène merA, après action de l'enzyme de restriction EcoR1, on aura le gène entier avec des extrémités cohésives et compatibles avec le plasmide pET-28a coupé par la même enzyme de restriction.

Q6. Schémas des 3 constructions de plasmides possibles :

Plasmide relinéarisé sur lui-même	Plasmide recombinant	Plasmide recombinant avec double insert ou insert merA dans autre sens
		

Q7. La souche E coli utilisée est sensible à la kanamycine. Le plasmide pET-28a contient un gène de sélection de résistance à la kanamycine, KAN^R. Les bactéries transformées par le plasmide pET-28a ou le plasmide recombinant deviendront donc résistantes à la kanamycine. Seules ces bactéries transformées pourront donc pousser sur un milieu supplémenté en kanamycine.

Q8. Dans le puits 5, aucune bande : cela signifie qu'il n'y a pas d'ADN amplifié et que le mélange réactionnel de la PCR n'est pas contaminé par de l'ADN exogène.

On observe une bande qui migre un peu en dessous du marqueur de taille 750 pb dans les puits 1 et 3 : cela signifie qu'on a de l'ADN d'un peu moins de 750 pb dans les colonies 1 et 3. Cette taille correspond à la taille de l'amplicon attendu qui est 741 pb. Donc les colonies 1 et 3 possèdent bien le gène merA. Ceci n'est pas le cas des colonies 2 et 4 qui ne possèdent pas le gène d'intérêt merA.

Q9. Certaines bactéries E coli ont pu être transformées par le plasmide pET-28e ne contenant pas la gène merA. Dans ce cas, elles deviennent résistantes à la kanamycine et donc peuvent pousser sur le milieu supplémenté mais comme ne possèdent pas merA, aucune bande n'apparaît après PCR et électrophorèse.

3. Purification et caractérisation de l'enzyme produite par E coli

Q10. Le surnageant provenant des colonies caractéristiques contient de multiples protéines et déchets cellulaires.

L'étape 1 permet la fixation de la mercure-réductase aux anticorps anti-mercure-réductase -> La fraction recueillie à l'issue de cette étape contiendra donc tous les contaminants sauf notre protéine d'intérêt, mercure-réductase.

L'étape 3 permet la libération de la mercure-réductase fixée spécifiquement aux anticorps en utilisant une molécule qui a encore plus d'affinité pour les anticorps. Les protéines d'intérêt se détachent -> la fraction recueillie à l'issue de cette étape contient les mercure-réductase.

Q11. A 340 nm, NADPH absorbe et le NADP+ n'absorbe pas. Pour suivre la réaction, il faut pouvoir différencier et doser les deux molécules différemment. C'est pour cela qu'on suit la réaction à 340 nm.

Q12. Lors du suivi de l'activité de la mercure-réductase, le NADPH est oxydé en NADP+ : la $c_{\text{(NADPH ; solution)}}$ va diminuer au cours de la réaction.

Comme le NADPH absorbe à 340 nm et pas le NADP+, on va donc avoir une diminution de l'absorbance à 340 nm au cours de réaction enzymatique.

Q13. La vitesse initiale est la vitesse de la réaction enzymatique qui est constante. On est en vi pendant environ 1,5 minutes.

Q14.

$$\text{EG : } v_i = \left| \frac{c_2 - c_1}{t_2 - t_1} \right|$$

$$\text{EU : } [mmol.L^{-1}min^{-1}] = \frac{[mmol.L^{-1}] - [mmol.L^{-1}]}{[min] - [min]}$$

$$\text{EVN : } v_i = \left| \frac{0,140 - 0,195}{1 - 0,5} \right| = 0,11 \text{ } mmol.L^{-1}min^{-1}$$

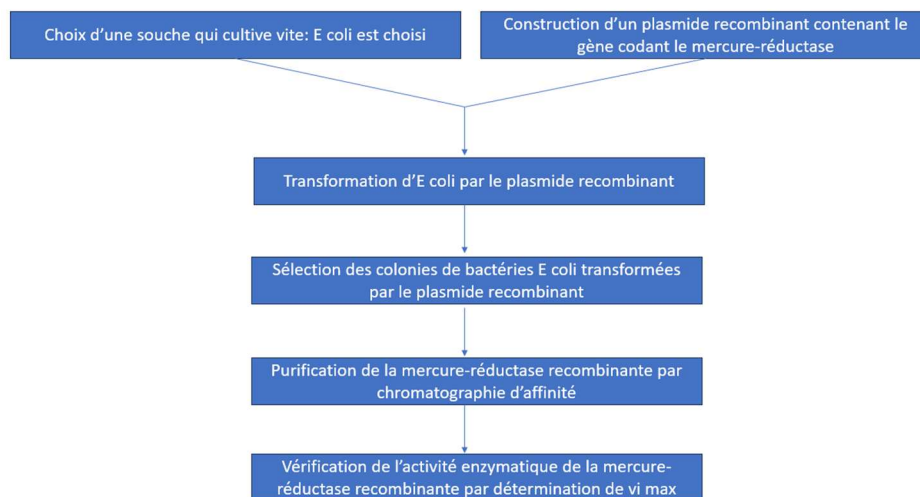
Q15. La $v_{i \text{ max}}$ de la mercure-réductase recombinante est d'environ $0,165 \text{ } mmol.L^{-1}min^{-1}$

La $v_{i \text{ max}}$ de la mercure-réductase issue de *Cupriavidus metallidurans* est de $0,144 \text{ } mmol.L^{-1}min^{-1}$

L'enzyme recombinante a donc une vitesse initiale maximale supérieure à l'enzyme normale. Elle est donc plus efficace.

Bilan

Q16.



PARTIE 2

Q17.

La bioremédiation est le processus qui utilise des êtres vivants comme les plantes, les champignons ou les bactéries pour dépolluer des sols.

Les méthodes conventionnelles qui consistent à confiner la pollution ou à prélever la terre pour la dépolluer chimiquement sont des approches très coûteuses.

Les méthodes de bioremédiation sont donc des approches qui sont privilégiées et étudiées actuellement. Les méthodes actuelles utilisent des associations symbiotiques de plantes et de champignons, comme c'est le cas depuis 40 ans aux Etats Unis. En Europe, l'utilisation des plantes était jusqu'alors contre-indiquée car on craignait une contamination pour la faune herbivore.

On utilisait en Europe essentiellement des bactéries pour dépolluer les sols, comme par exemple *Cupriavidus metallidurans* qui peut être utilisée pour dépolluer les sols du mercure.

Une approche combinée avec l'association de plantes, de champignons et de bactéries constitue la métaremediation; l'accumulation de données montre que les interactions entre les éléments d'un écosystème doivent être prises en compte pour une dépollution sans risque des sols. C'est donc une approche à privilégier car elle permet d'éliminer 50 % de métaux lourds et qu'elle permet une dégradation rapide et efficace des molécules polluantes plus complexes.