



MINISTÈRE
DE L'ÉDUCATION
NATIONALE

EDE BGB 2

SESSION 2019

CAPET
CONCOURS EXTERNE

Section : BIOTECHNOLOGIES
Option : BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE

SECONDE ÉPREUVE

Durée : 5 heures

Le dictionnaire anglais-français est autorisé.

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre dictionnaire et de tout matériel électronique (y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.

Si vous repérez ce qui vous semble être une erreur d'énoncé, vous devez le signaler très lisiblement sur votre copie, en proposer la correction et poursuivre l'épreuve en conséquence. De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, vous devez la (ou les) mentionner explicitement.

NB : Conformément au principe d'anonymat, votre copie ne doit comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé consiste notamment en la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de la signer ou de l'identifier.

Tournez la page S.V.P.

A

Apports des biotechnologies à la détection et la réduction de pollutions environnementales

Face à l'émergence de nouveaux contaminants dans les eaux et le sol, les méthodes de détection et d'élimination des polluants évoluent et recourent de plus en plus aux biotechnologies.

Les biotechnologies utilisées dans la protection de l'environnement exploitent les capacités d'organismes vivants à détecter des contaminants (biodétection), à les éliminer (bioremédiation) et à produire des matériaux biosourcés à faible impact environnemental (bioproduction).

Première partie :

A l'aide du dossier technologique fourni, vous montrerez l'évolution des méthodes mises en œuvre pour détecter des polluants et réduire leur présence dans l'environnement en présentant le principe de quelques techniques. Les intérêts et les limites des différentes méthodes seront clairement mis en évidence.

Deuxième partie :

Dans la perspective d'un enseignement en classe de terminale « Sciences et technologies de laboratoire spécialité biotechnologies », vous présenterez une démarche pédagogique permettant de montrer aux élèves l'importance de l'utilisation des micro-organismes dans le domaine de la protection de l'environnement, en développant en particulier l'intérêt des conditions de culture.

Votre démarche pédagogique s'appuiera sur les extraits de programmes présentés dans le document 10.

Liste des documents du dossier technologique

Document 1 : Évolution des méthodes de diagnostic environnemental

Source : d'après « *Micropolluants aquatiques : Quelle place pour la biodétection ?* », *Enerzine.com*, déc 2012

Document 2 : Évolution des méthodes de biodétection de pollutions environnementales : des animaux sentinelles à la biologie synthétique

Source : d'après « *A cocktail of biology : shakin'up the space with synthetic ingredients* », *JSTO March 2016*

Document 3 : Extraits de notices techniques de kit ELISA pour le dosage de la vitellogénine (VTG) chez un groupe de poissons sentinelles

Source : *Creative diagnostics, Cusabio*

Document 4 : Schéma de principe du test YES (Yeast Estrogen Screen)

Source : « *Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen* », *Environmental Toxicology and Chemistry March 1996*

Document 5 : Évaluation de la présence d'œstrogènes dans des eaux contaminées

Source : « *Removal of ecotoxicity of 17 α -ethinylestradiol using TAML/peroxide water treatment* », *Scientific Reports June 2015*

Document 6 : Schéma de principe de tests de biodétection sur papier

Source : « *Paper-Based Synthetic Gene Networks* », *Cell 159 November, 2014*

Document 7 : Avantages des techniques de biologie synthétique « cell-free » dans la biodétection et la bioremédiation environnementale

Source : d'après « *Cell-free synthetic biology for environmental sensing and remediation* », *David K Karig, Current Opinion in Biotechnology feb 2017*

Document 8 : Traitements de terres polluées par biolixiviation

Source : « *Traitabilité des sols pollués - Guide méthodologique pour la sélection des techniques et l'évaluation de leurs performances.* », *Agence de L'Environnement et de la maîtrise de l'Energie, 2009*

Document 9 : Apport des techniques « omics » pour étudier/identifier les souches microbiennes impliquées dans la bioremédiation

Source : « *Understanding and Designing the Strategies for the Microbe-Mediated Remediation of Environmental Contaminants Using Omics Approaches* », *Front Microbiol. 2018*

Document 10 : Évolution de la composition taxonomique microbienne de sols canadiens contaminés par des hydrocarbures

Source : « *Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel contaminated Canadian high arctic soils* », *Plos one, 2012 January*

Document 11 : Ingénierie de l'enzyme PETase et effet sur la dégradation du PEF

Source : d'après « *Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase* », *PNAS March 2018*

Document 12 : Analyse de mutants de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* pour la production de biodiésel

Source : d'après *Genome engineering empowers the diatom Phaeodactylum tricornutum for biotechnology, Nature Communications, 2014*

Document 13 : Extraits de programmes de la classe de terminale STL-Biotechnologies

INFORMATION AUX CANDIDATS

Vous trouverez ci-après les codes nécessaires vous permettant de compléter les rubriques figurant en en-tête de votre copie.

Ces codes doivent être reportés sur chacune des copies que vous remettrez.

► **Concours externe du CAPET de l'enseignement public :**

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EDE	7100E	102	5851

► **Concours externe du CAFEP/CAPET de l'enseignement privé :**

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EDF	7100E	102	5851

Document 1 : Évolution des méthodes de diagnostic environnemental

Sources : d'après « *Micropolluants aquatiques : Quelle place pour la biodétection ?* », *Energine.com*, 5 décembre 2012

Traditionnellement, les méthodes physico-chimiques sont employées [pour la détection de polluants]. Ces techniques classiques de chromatographie, de RMN ou de spectroscopie de masse permettent de mesurer la concentration de polluants donnés, mais ne peuvent détecter qu'une partie des polluants présents et ne peuvent pas prendre en compte « *l'effet cocktail* ». [...]

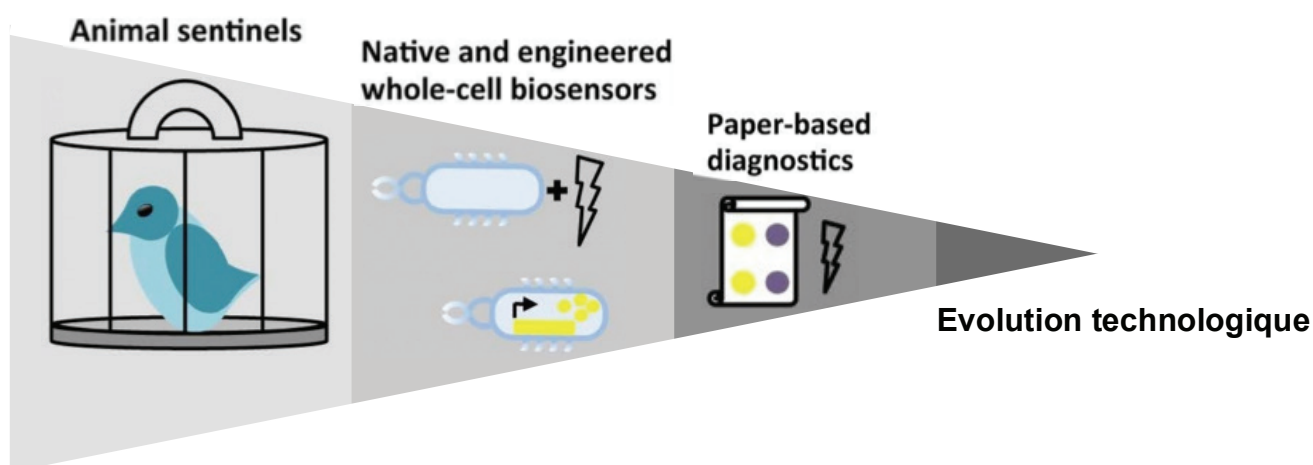
C'est pourquoi, à côté des méthodes physico-chimiques, se sont développées des méthodes plus sensibles faisant intervenir un élément biologique. Les tests de toxicité utilisant des modèles biologiques sont fondés sur la sensibilité d'organismes de la chaîne trophique et prennent en compte la modification de la qualité du milieu aquatique. Ainsi, les changements de comportement des poissons ou autres puces d'eau sont analysés et une pollution globale est détectée. [...]

[...] A côté des organismes vivants, la biodétection peut aussi utiliser des biocapteurs. Un biocapteur est constitué d'une partie biologique, enzymes, anticorps ou micro-organismes tels que des bactéries, et d'une partie électronique qui permet la transduction et l'amplification du signal. [...]

Aujourd'hui, les recherches sont réalisées sur le développement et l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés. [...] Cependant, malgré leur fort potentiel, le développement de ces outils génétiquement modifiés reste freiné par des questions d'acceptation sociétale et de gestion du risque.

Document 2 : Évolution des méthodes de biodétection de pollutions environnementales - Des animaux sentinelles à la biologie synthétique

Source : d'après « *A cocktail of biology : shakin'up the space with synthetic ingredients* », *JSTO March 2016, Vol 6 N°3*



Document 3 : Extraits de notices techniques de kit ELISA pour le dosage de la vitellogénine (VTG) chez un groupe de poissons sentinelles

Source : Creative diagnostics, Cusabio

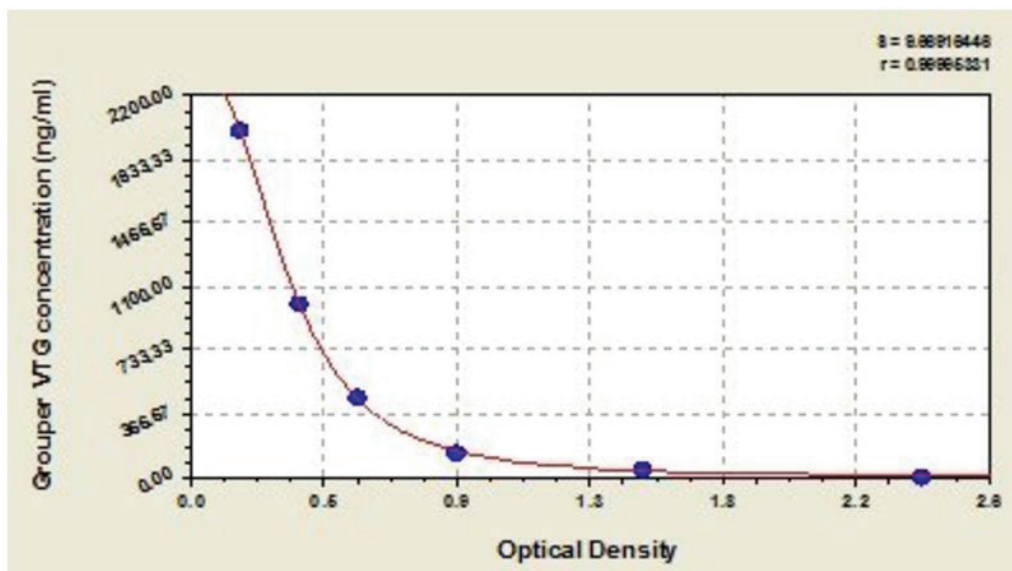
General Description

Detection of the egg yolk precursor vitellogenin (VTG) in blood and tissue samples of juvenile and male fish is a simple and sensitive biomarker for endocrine disrupting chemicals (edcs) with oestrogenic effects (arukwe & goksøyr, 2003; sumpter & jobling, 1995). Measurement of VTG has become an accepted routine screening test for oestrogenic and anti-androgenic effects of edcs in fish.

Principle of the assay

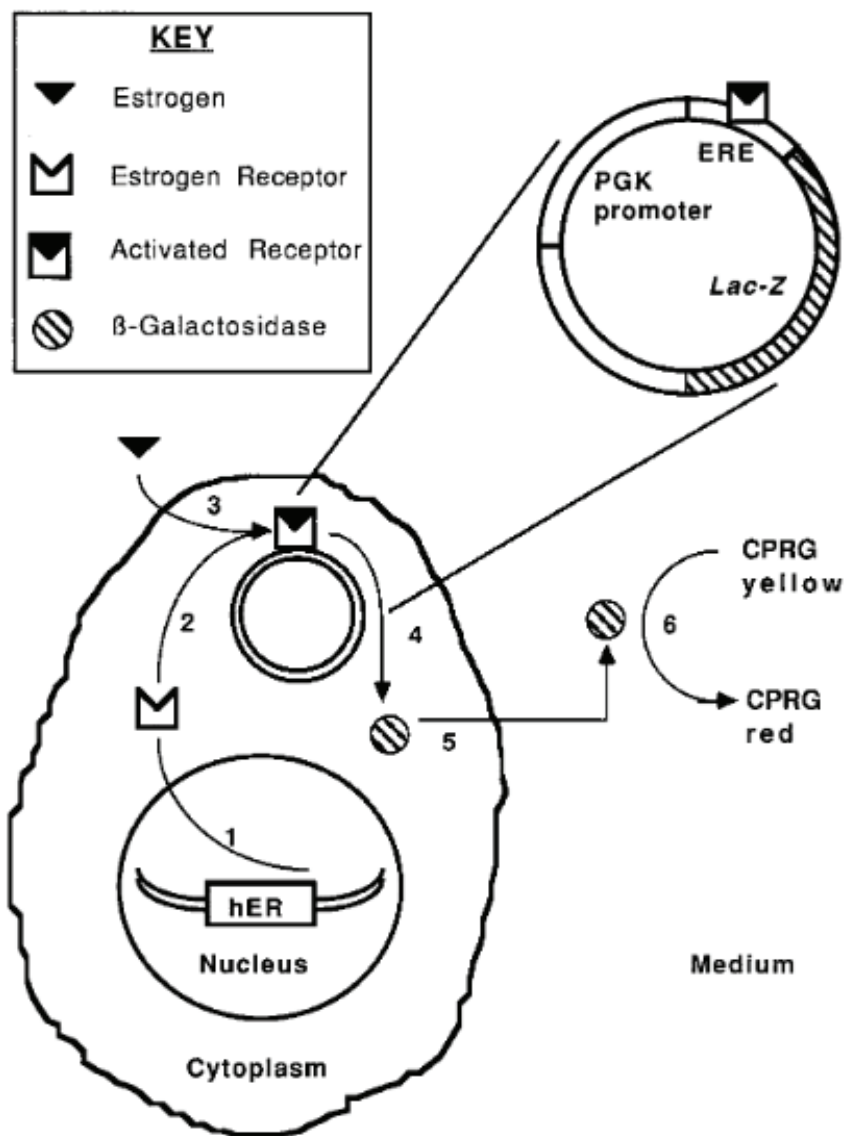
This assay employs the competitive inhibition enzyme immunoassay technique. The microtiter plate provided in this kit has been pre-coated with goat-anti-rabbit antibody. Standards or samples are added to the appropriate microtiter plate wells with an antibody specific for VTG and Horseradish Peroxidase (HRP) conjugated VTG. The competitive inhibition reaction is launched between with HRP labeled VTG and unlabeled VTG with the antibody. A substrate solution is added to the wells and the color develops in opposite to the amount of VTG in the sample. The color development is stopped and the intensity of the color is measured.

Typical standard curve :



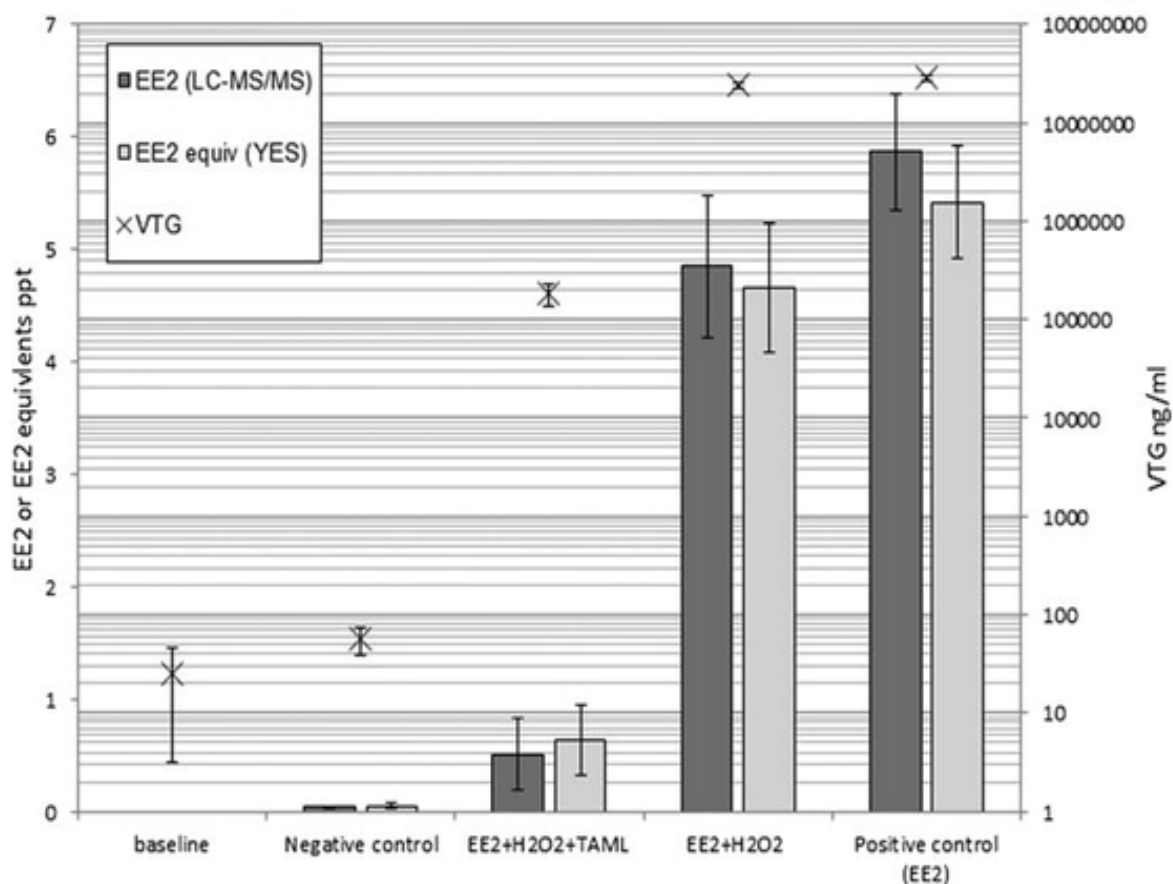
Document 4 : Schéma de principe du test YES (Yeast Estrogen Screen)

Source : "Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen", *Environmental Toxicology and Chemistry* March 1996 Vol. 15 No. 3 pp. 241-248



Document 5 : Évaluation de la présence d'œstrogènes dans des eaux contaminées

Source : "Removal of ecotoxicity of 17 α -ethinylestradiol using TAML/peroxide water treatment", Scientific Reports June 2015 vol 5 :10511



Les échantillons d'eau ont été exposés pendant 21 jours à un œstrogène (EE2) puis traités.

Les différents traitements ont consisté en l'ajout :

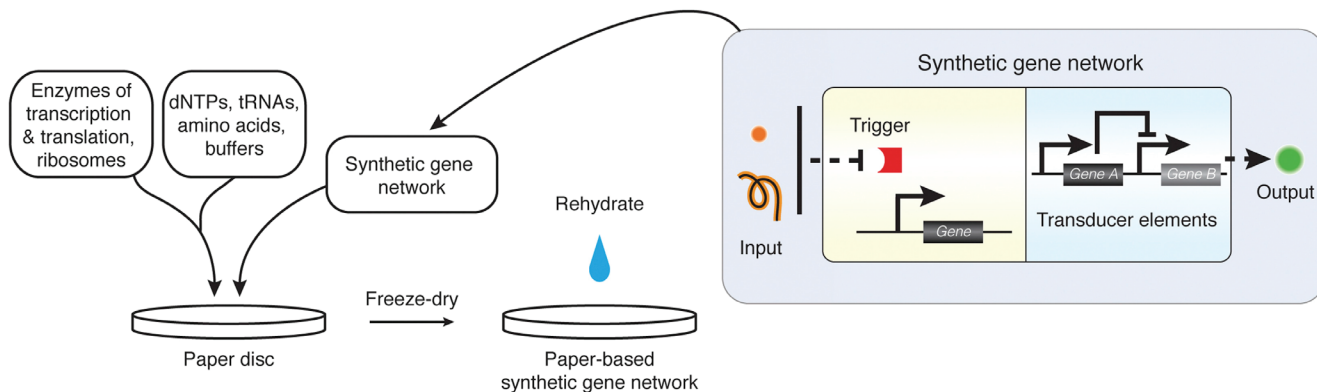
- d'eau (Positive control),
- d' H_2O_2 ,
- d' H_2O_2 et de peroxydase TAML.

Après traitement, la concentration en œstrogènes résiduels a été mesurée par chromatographie liquide couplée à de la spectroscopie de masse (LC-MS/MS), l'activité œstrogénique a été estimée par le test Yeast Oestrogen Screen (YES) et la concentration en vitellogénine plasmatique de poissons mâles (VTG) a été déterminée par ELISA. La vitellogénine et les œstrogènes ont été mesurés avant l'exposition (baseline) ou à partir d'échantillons issus d'eau non contaminée (Negative control).

ppt : part per trillion (équivalent à $1ng.L^{-1}$)

Document 6 : Schéma de principe de tests de biodétection sur papier

Source : "Paper-Based Synthetic Gene Networks", *Cell* 159 November, 2014



Document 7 : Avantages des techniques de biologie synthétique « cell-free » dans la biodétection et la bioremédiation environnementales

Source : d'après "Cell-free synthetic biology for environmental sensing and remediation", David K Karig, *Current Opinion in Biotechnology* 2017, 45 :69-75

« To date, most biosensors utilize either a small set of purified biological components interfaced with a transducer, or whole cells that are simply modified to express reporter genes inserted downstream of ligand-activated promoters. Most bioremediation efforts are similarly straightforward, focusing on either the use of natural cells or on the optimization of existing metabolic pathways. [...]

The emergence of cell-free synthetic biology offers a promising mechanism for circumventing GMO release, allowing deployment of gene networks and metabolic pathways without the risk of unbridled replication and spread of new microbial strains in the wild. Beyond safety, cell-free systems offer a host of other benefits as well. For instance, cell-free systems can operate in the presence of toxins that would inhibit or kill live cells. This means that key sensing and metabolic components, such as transcription factors and enzymes, can be produced in higher concentrations than in living cells, leading to improved sensitivity and efficiency. It also means that environmental chemicals are better tolerated, including those that are the target for sensing or remediation. In addition, in cell-free platforms, all energy resources can be devoted to the engineered application, as opposed to supporting self-replication. Finally, the potential for evolution, which can undermine or even abolish engineered function, is largely removed in cell-free contexts. »

Document 8 : Traitements de terres polluées par biolixiviation

Source : « *Traitabilité des sols pollués - Guide méthodologique pour la sélection des techniques et l'évaluation de leurs performances.* », Agence de L'Environnement et de la maîtrise de l'Energie, 2009 (Extraits)

La biolixiviation (ou bio-extraction) est une famille de traitements permettant l'extraction biologique des polluants inorganiques cibles initialement présents sous formes insolubles.

Biolixiviation anaérobie des métaux

Principe de la biolixiviation anaérobie directe

En absence d'oxygène (conditions anaérobies strictes), certaines bactéries sont capables d'utiliser certains polluants inorganiques comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire.

Pour certains métaux et métalloïdes, leur réduction peut s'accompagner d'une mobilisation du polluant lorsque la forme réduite est plus soluble que la forme oxydée dans les conditions de pH et de potentiel redox du sol. Il s'agit d'une réduction dissimilatrice par action directe sur les espèces polluantes cibles. Les exemples les plus documentés sont la réduction anaérobie du Fe (III) en Fe (II) et la réduction anaérobie du MnO₂ en Mn(II) qui font intervenir des micro-organismes hétérotrophes du genre *Clostridium* et *Bacillus*.

[...]

Principe de la biolixiviation anaérobie indirecte

- Métaux piégés dans les (oxy)-hydroxydes de fer, de manganèse ou d'aluminium :

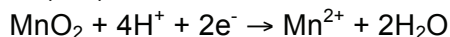
Le fer joue un rôle prépondérant dans la fixation des métaux lourds dans les sols.

Essentiellement sous la forme d'oxydes de fer, les multiples charges de surface négatives dans les conditions classiques de pH-Eh des sols facilitent l'adsorption ionique des métaux mobilisables. De nombreuses espèces métalliques ou métalloïdes sont également présentes au sein de la structure ferrique sous une forme co-précipitée avec les oxydes de fer.

La réduction du fer ferrique en fer ferreux peut alors entraîner indirectement la libération des métaux ou métalloïdes adsorbés ou co-précipités avec les oxydes de fer dans la mesure où les conditions de pH et de potentiel redox permettent de maintenir les espèces métalliques libérées en solution. On parle donc de biolixiviation anaérobie indirecte des polluants inorganiques. Signalons que la réduction du fer est plus lente lorsque qu'il est sous forme cristalline.

- Sources d'énergie : substrats organiques \rightarrow H⁺ + ATP + métabolites + e⁻

- Accepteurs d'électrons : $\text{Fe}(\text{OH})_3 + 3\text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 3\text{H}_2\text{O}$



Ce mécanisme de dissolution réductrice entraîne la libération des métaux associés aux oxydes de fer et de manganèse.

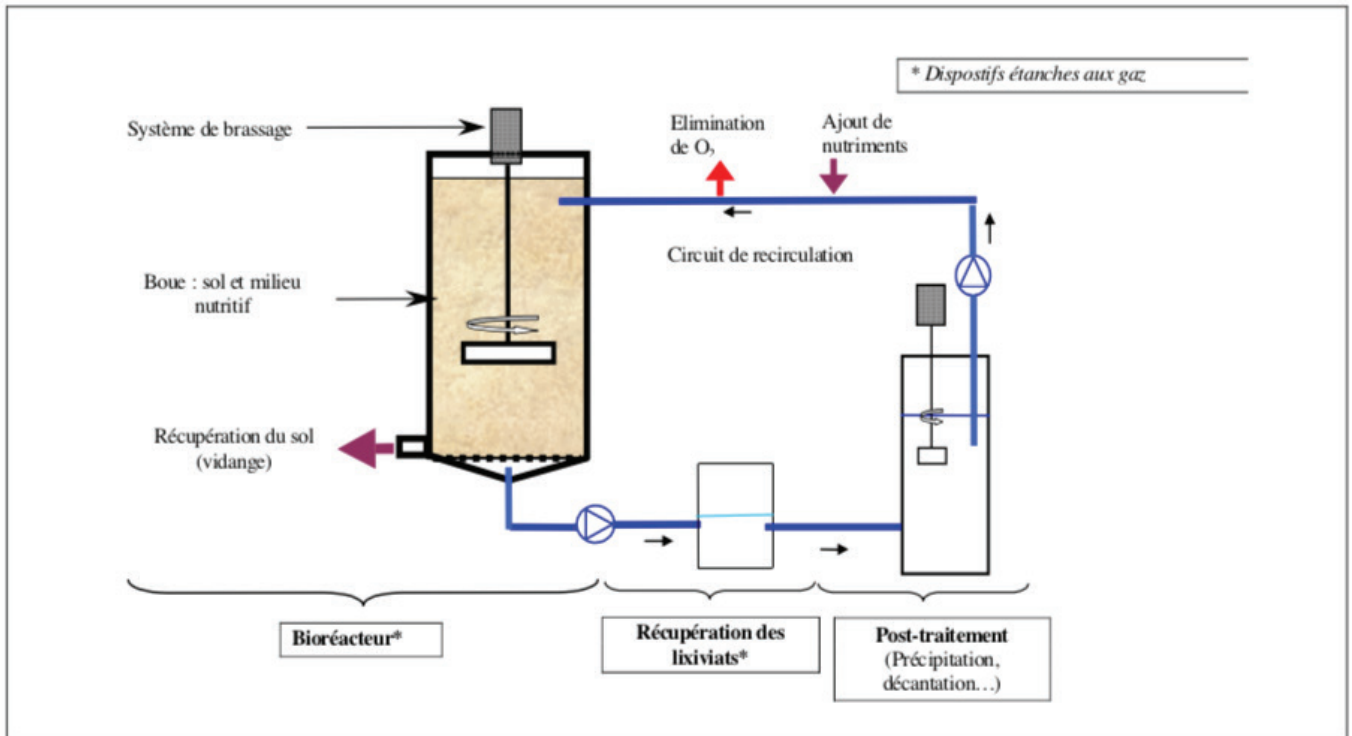
[...]

Dispositifs de traitement par bio-lixiviation anaérobie

[...]

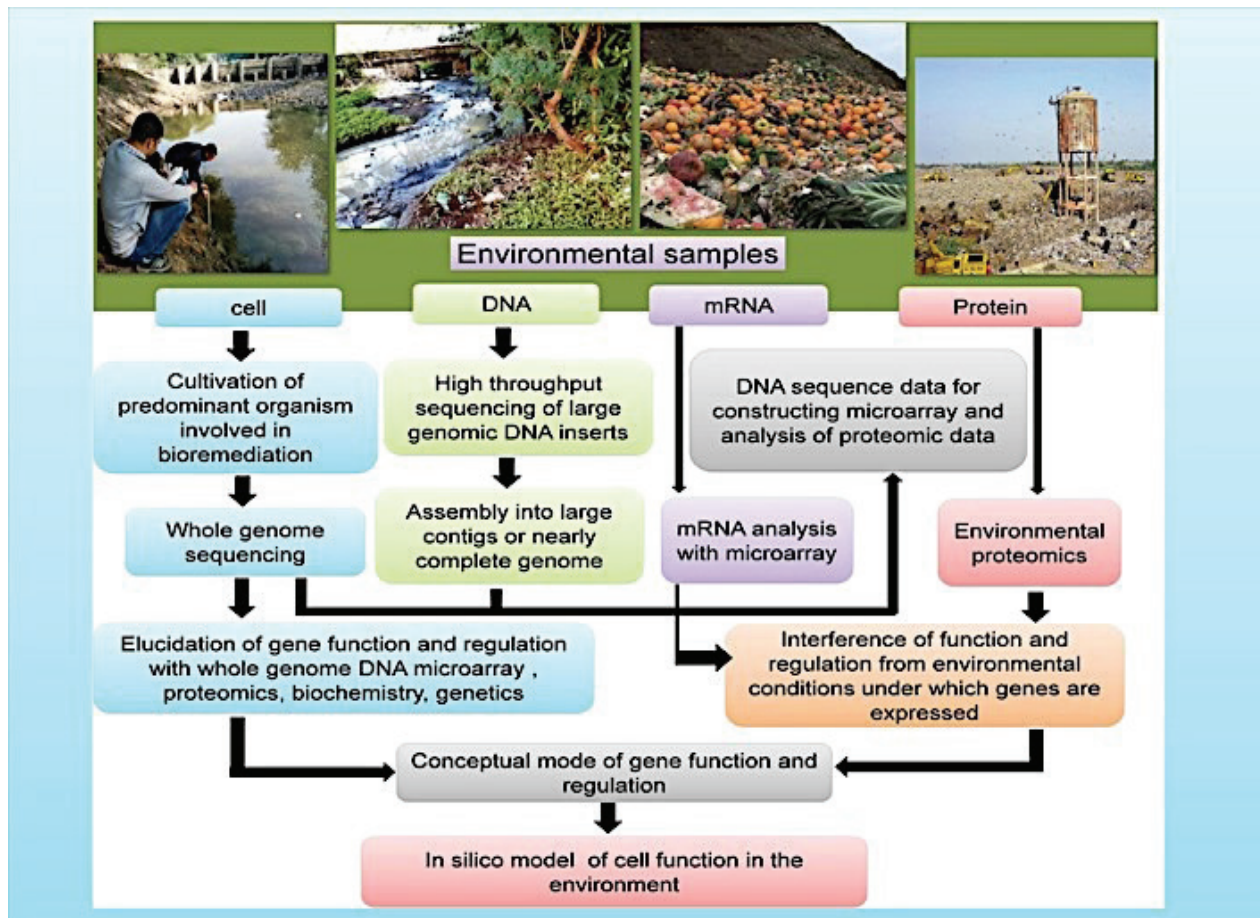
Traitements par agitation (traitements en bio-réacteurs)

Les terres polluées sont excavées et mises en pulpe dans des réacteurs étanches. Il peut être nécessaire d'éliminer les blocs et les particules grossières par des prétraitements physico-chimiques. La pulpe est additionnée de nutriments (éthanol, méthanol, acétate, glucose ou autre substrat), éventuellement d'un agent chélatant tel que l'EDTA, puis agitée de façon continue ou discontinue. Le traitement est suivi d'une séparation liquide/solide, puis du traitement de la phase liquide pour élimination des métaux dissous. Le traitement dynamique peut être réalisé en continu ou en discontinu.



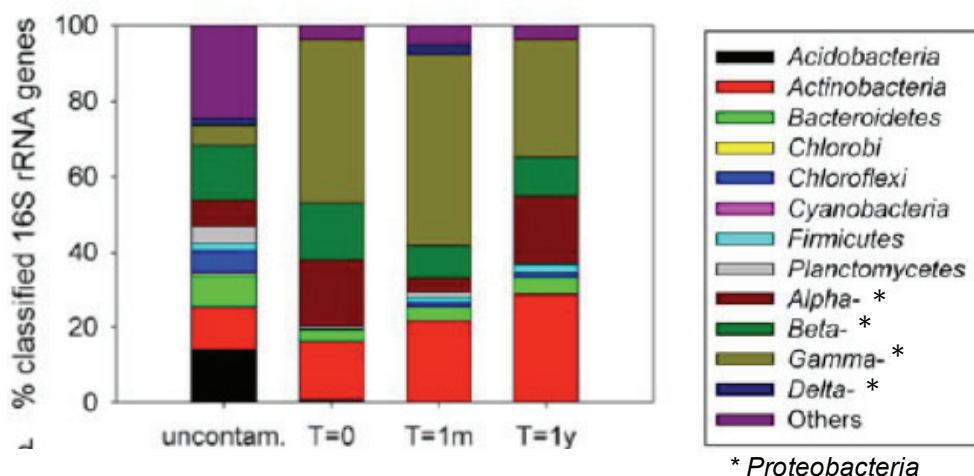
Document 9 : Apport des techniques «omics» pour étudier et identifier les souches microbiennes impliquées dans la bioremédiation

Source : “Understanding and Designing the Strategies for the Microbe-Mediated Remediation of Environmental Contaminants Using Omics Approaches”, *Front Microbiol.* 2018 Jun 4;9:1132



Document 10 : Évolution de la composition taxonomique microbienne de sols canadiens contaminés par des hydrocarbures

Source : “Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel contaminated Canadian high arctic soils”, *Plos one*, 2012 January, vol7 1:10



- Uncontam.: sol non contaminé directement adjacent au site pollué
- T= 0 : premier échantillonnage de sol contaminé après ajout de nutriments et aération
- T=1m : échantillonnage un mois plus tard
- T= 1y : échantillonnage un an plus tard

Document 11 : Ingénierie de l'enzyme PETase et effet sur la dégradation du PEF

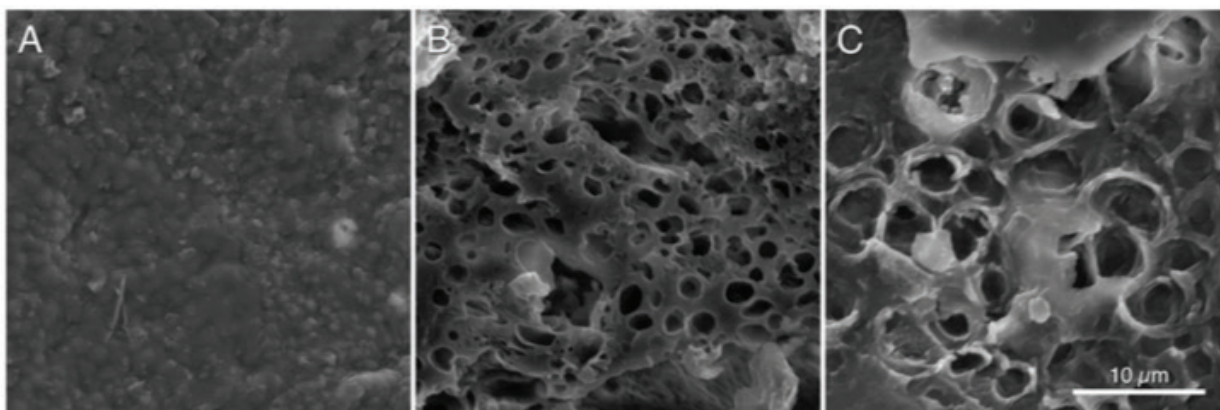
Source : d'après "Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase", PNAS March 2018

La PETase est une enzyme produite par *Ideonella sakaiensis* capable de dégrader certains polymères plastiques (polyéthylène téréphtalate PET, polyéthylène furanoate PEF).

Etapes de l'ingénierie de l'enzyme PETase :

1. Caractérisation de l'enzyme PETase et de son site catalytique
2. Alignement de séquences informatiques, design d'un nouveau site catalytique
3. Optimisation du gène de la PETase pour son expression chez *E.coli* et insertion dans le plasmide pET-21b(+) possédant le gène lacI et permettant de produire une protéine de fusion (C-terminal His-Tag)
4. Mutagenèse dirigée sur le plasmide afin d'obtenir les mutations W159H/S238F dans le site catalytique
5. Transformation de la souche *E.coli* C41(DE3) et induction de l'expression par addition d'IPTG
6. Lyse cellulaire et purification de la protéine par chromatographie d'affinité suivie d'une gel-filtration et d'une dialyse

Comparaison de l'activité des enzymes PETase sauvage et mutée W159H/S238F par observation de fragments de PEF au microscope électronique à balayage :



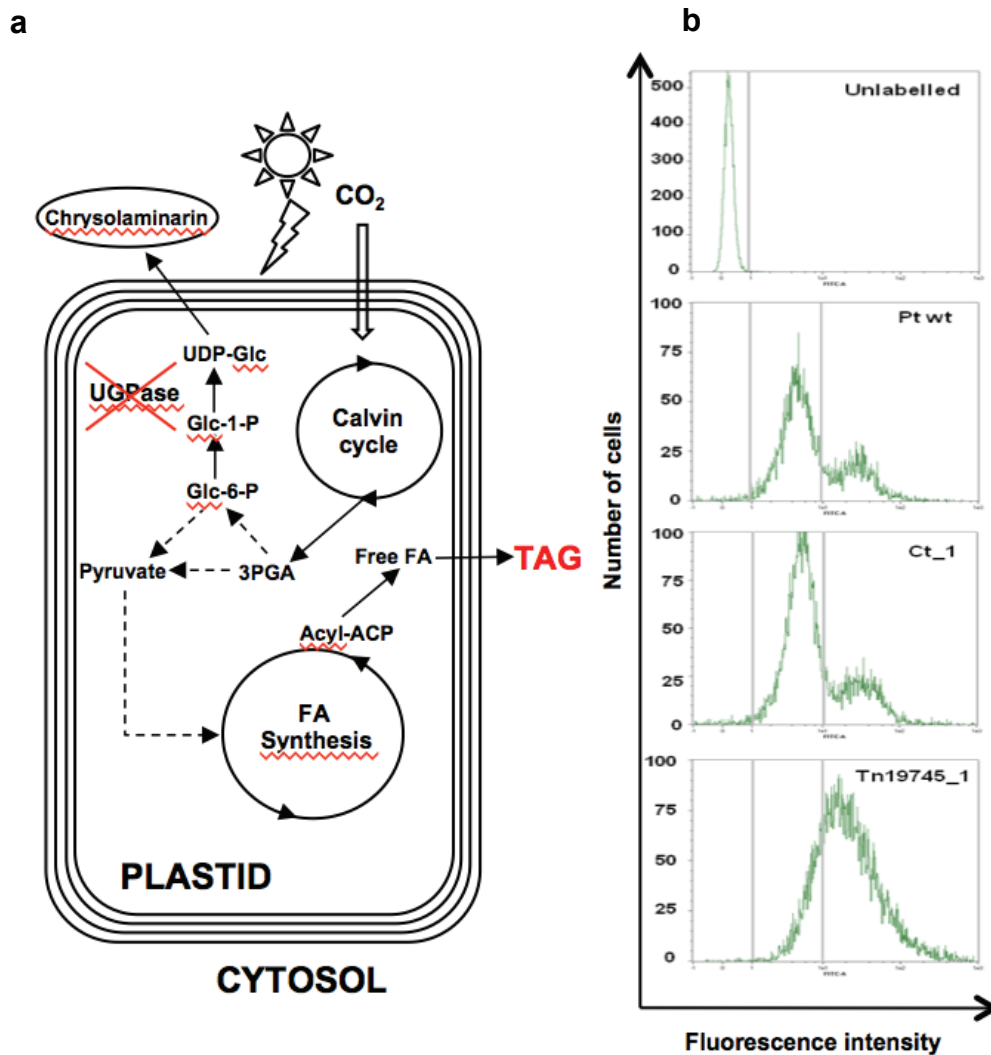
La même échelle est utilisée pour les images A, B et C.

- A. Fragment de PEF non traité
- B. Fragment de PEF après incubation avec l'enzyme PETase sauvage
- C. Fragment de PEF après incubation avec l'enzyme mutée W159H/S238F

Document 12 : Analyse de mutants de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* pour la production de biodiésel

Source : d'après *Genome engineering empowers the diatom Phaeodactylum tricornutum for biotechnology*, *Nature Communications*, 29 May 2014

Les diatomées produisent et accumulent une grande diversité d'acides gras utilisés dans la fabrication de biodiésel.



- a. Schéma simplifié des voies métaboliques impliquées dans la synthèse d'acides gras et de chrysolaminarine (polyholoside)
- b. Analyse par cytométrie en flux du contenu en lipides des souches de diatomées incubées avec un fluorochrome spécifique des acides gras :
- Pt wt : souche sauvage
 - Ct_1 : clone non muté transformé avec un plasmide de sélection
 - Tn19745_1 : clone ayant subi une mutagenèse ciblant l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase)

Document 13 : Extraits de programmes de la classe de terminale STL Biotechnologies

Extrait du programme de Biotechnologies

Croissance microbienne

Modélisation de la croissance en milieu non renouvelé

Objectifs de formation et supports théoriques	Compétences transversales et technologiques
<ul style="list-style-type: none"> - Courbe de croissance. - Phases de la croissance. - Paramètres cinétiques de la croissance. - Effecteurs de la croissance : <ul style="list-style-type: none"> . concentration en substrat, . température, . oxygénation, . pH. - Notion de croissance optimale. - Applications industrielles de la croissance en bioréacteurs. <p>La modélisation de la cinétique de croissance en milieu non renouvelé fera appel aux acquis de mathématiques sur les fonctions logarithmiques et exponentielles après intégration de l'équation différentielle de l'accroissement de la population bactérienne.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mettre en œuvre un suivi de croissance d'une bactérie ou d'une levure. - Exploiter une courbe de croissance. - Déterminer les paramètres cinétiques. - Identifier/étudier les paramètres d'influence ou effecteurs. <p>La mise en œuvre d'une croissance bactérienne constituera un support de modélisation mathématique d'un phénomène biologique et de l'influence des conditions expérimentales sur les résultats, en particulier les paramètres physico-chimiques ou nutritionnels.</p>

Microorganismes eucaryotes

Culture de cellules eucaryotes

Objectifs de formation et supports théoriques	Compétences transversales et technologiques
<ul style="list-style-type: none"> - Type trophique et conditions de culture : <ul style="list-style-type: none"> . métabolisme photosynthétique et autotrophie de cellules végétales et des microalgues, . métabolisme organotrophe et hétérotrophie des cellules animales. - Composition d'un milieu de culture cellulaire eucaryote. - Conditions de culture de cellules eucaryotes animales ou végétales. <p>Cette partie sera étudiée en lien avec le cours de CBSV. On s'attachera à mettre en évidence les caractères culturels des cellules eucaryotes par comparaison avec ceux exigés par la culture des bactéries. Le rôle particulier de la lumière dans le cas des organismes photosynthétiques sera étudié.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Étudier l'influence des paramètres de la culture cellulaire, éventuellement à partir de documents technologiques. - Mettre en évidence l'influence de la lumière sur la culture de cellules photosynthétiques. <p>Cette partie peut faire l'objet d'un projet conduit par les élèves, par exemple sur la mise au point d'une culture de microalgues en réinvestissant les connaissances et compétences acquises dans la culture de microorganismes.</p>

Extrait du programme de Chimie Biochimie Sciences du Vivant

5.4 Les organismes vivants sont utilisés par l'Homme comme agents de dépollution et de production

Connaissances	Capacités
<p>L'Homme exploite les voies métaboliques particulières d'organismes vivants dans certains procédés industriels, comme par exemple :</p> <ul style="list-style-type: none"> - épuration des eaux usées ; - production de carburants ou d'autres molécules de synthèse ; - esters issus d'huiles végétales (Diester ou EMHV) ; - alcools issus de la fermentation de l'amidon ou autres glucides ; - lipides issus des algues ; - gazéification des déchets. 	<p>Exploiter des ressources documentaires, une activité expérimentale, une étude de terrain pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> - dans les procédés épuration des eaux usées : <ul style="list-style-type: none"> . identifier les étapes mettant en œuvre des organismes vivants et préciser leur rôle ; - dans la production de carburants : <ul style="list-style-type: none"> . identifier les procédés mettant en œuvre des organismes vivants pour élaborer différents carburants ou molécules de synthèse, . analyser les critères de choix de production de carburants ou d'autres molécules, en termes environnemental et sociétal, . appréhender les aspects éthiques soulevés par l'utilisation de la biomasse pour produire les carburants.