

---

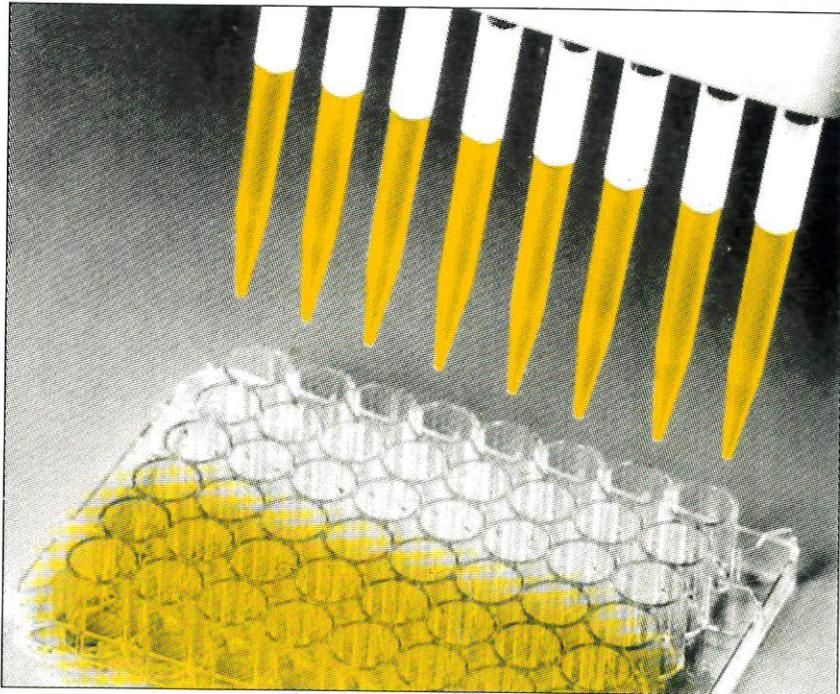
Annales

Brevet de Technicien Supérieur  
BIOCHIMISTE

Brevet de Technicien Supérieur  
BIOTECHNOLOGIE

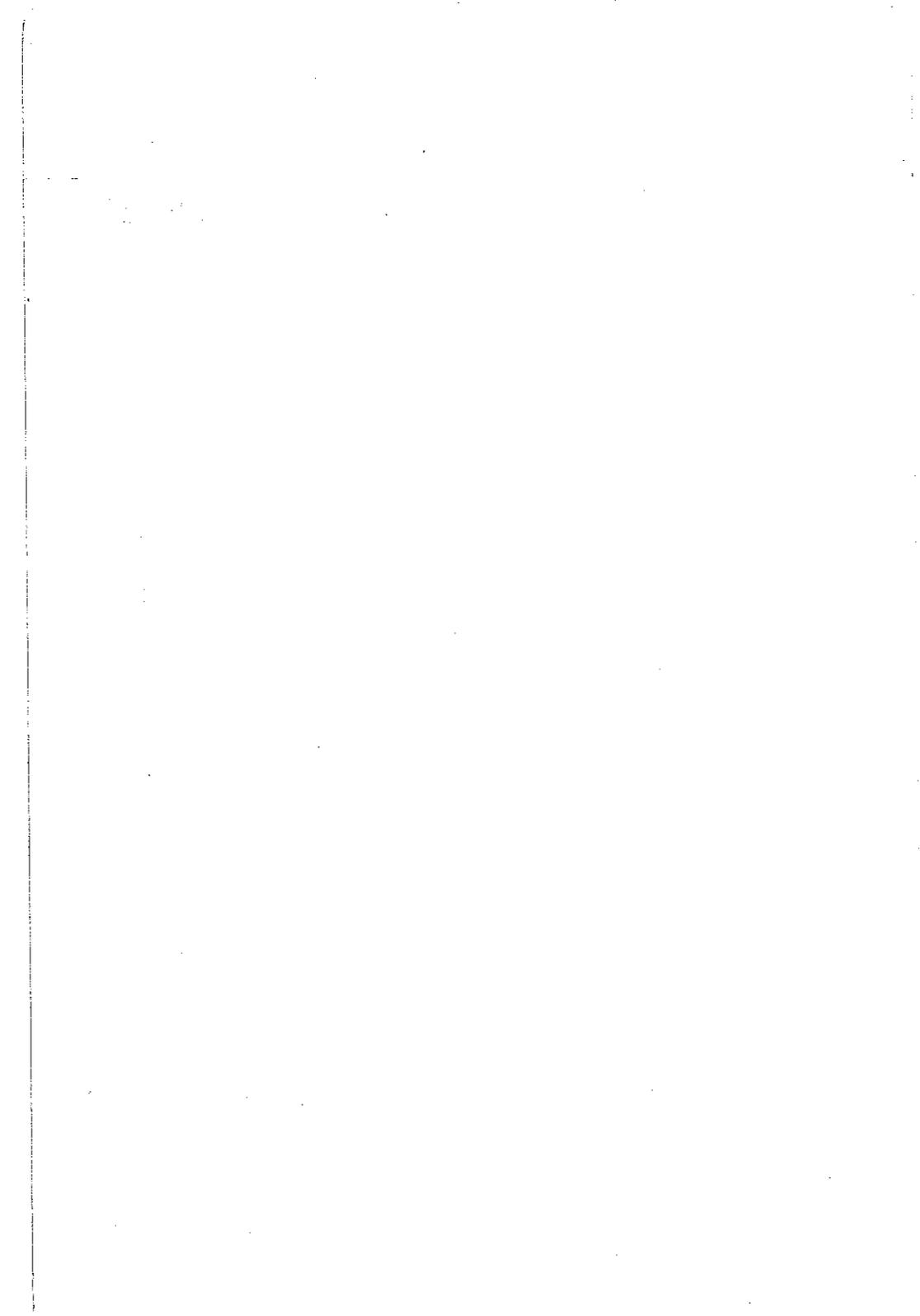
sessions 1992-1994

---



Publications de l'UPBM

UPBM Edition Lycée technique "La Martinière"  
La Duchère 69338 Lyon Cedex 9



---

Annales

Brevet de Technicien Supérieur  
BIOCHIMISTE

Brevet de Technicien Supérieur  
BIOTECHNOLOGIE

sessions 1992-1994

---

Publications de l'UPBM

UPBM Edilion Lycée technique "La Martinière"  
La Duchère 69338 Lyon Cedex 9

Les Annales du B.T.S. Biochimiste ont été réalisées par Guy BATTIER professeur au Lycée La Martinière à Lyon, Odile et Pierre CORNET professeurs au Lycée Valin à La Rochelle et Jean-Noël JOFFIN professeur au Lycée Paul Eluard à Saint Denis.

Les Annales du B.T.S. Biotechnologie ont été réalisées par Guy BATTIER professeur au Lycée La Martinière à Lyon, Odile et Pierre CORNET professeurs au Lycée Valin de La Rochelle, Gérard COUTOULY professeur au Lycée Jean Rostand à Strasbourg et Jean-Noël JOFFIN professeur au Lycée Paul Eluard à Saint Denis.

Nous aurions souhaité une présentation plus soignée mais son coût aurait été prohibitif et aurait considérablement élevé le prix de vente.

Nous espérons les erreurs de montage limitées. Merci de votre indulgence.

ISBN 2-910069-12-5



9 782910 069124

---

**Annales**  
**Brevet de Technicien Supérieur**  
**BIOCHIMISTE**  
**sessions 1992-1994**

---

Publications de l'UPBM

UPBM Edilion Lycée technique "La Martinière"  
La Duchère 69338 Lyon Cedex 9



# Annales du BTS Biochimiste

Les annales sont divisées en années. La numérotation est liée à chaque année. La partie «Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques)» comprend plusieurs sujets différents.

## Sommaire :

### Année 1992

	Français	92-1
	Anglais	92-7
	Mathématique	92-8
	Sciences physiques	92-10
	Biochimie-Biologie	92-13
Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etudes d'opérations techniques)		92-18
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques) SUJET 1		92-28
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques) SUJET 2		92-34
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques) SUJET 3		92-40

### Année 1993

	Français	93-1
	Anglais	93-2
	Mathématique	93-3
	Sciences physiques	93-6
	Biochimie-Biologie	93-9
Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etudes d'opérations techniques)		93-17
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques) SUJET 1		93-25
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques) SUJET 2		93-33
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques) SUJET 3		93-39

### Année 1994

	Français	94-1
	Anglais	94-7
	Mathématique	94-8
	Sciences physiques	94-11
	Biochimie-Biologie	94-13
Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etudes d'opérations techniques)		94-18
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques) SUJET 1		94-27
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques) SUJET 2		94-32
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations techniques) SUJET 3		94-38

# Annales du BTS Biochimiste

## Définition de la nature des épreuves

### 1. Epreuve de français

- Epreuve écrite
- Durée maximale : 3 heures
- Coefficient : 3

#### 1.1 But de l'épreuve

L'épreuve a pour but de vérifier l'aptitude du candidat à :

- saisir dans un texte les idées essentielles et leur organisation logique,
- s'exprimer avec simplicité et correction.

#### 1.2 Nature de l'épreuve

L'épreuve consiste en une contraction d'un texte, suivie de questions dont l'une invite à un travail de composition française.

1.2.1 — On proposera un texte d'environ 900 mots qui offrira par lui-même un sens assez complet, qui soit clair et bien composé et qui se prête à une analyse d'idées.

1.2.2 — On proposera un texte de cinquante à cent lignes dactylographées qui offre par lui-même un sens assez complet, qui soit clair et bien composé et qui se prête à une analyse d'idées.

1.2.3 — La texte proposé portera sur les problèmes de la vie moderne — problèmes de culture personnelle et de relations sociales — qui peuvent intéresser un futur technicien.

Le candidat devra :

- résumer le texte en un nombre fixé de mots,
- répondre à quelques questions destinées à lui faire préciser et expliquer le sens de notions et de mots importants du texte,
- exprimer dans un commentaire succinct et composé ses vues personnelles sur l'ensemble ou sur un aspect particulier du texte.

### 2. Epreuve d'anglais

- Epreuve écrite
- Durée : 2 heures
- Coefficient : 2

L'épreuve doit permettre de vérifier les capacités du candidat :

- d'exploiter correctement des documents à caractère technique (articles de presse ou extraits d'ouvrages spécialisés, notices et modes d'emploi, diagrammes et schémas, lettres, communications),
- de proposer des éléments de rédaction simples en anglais sur un sujet touchant à la spécialité.

Ceci implique la capacité :

- de rendre compte, en français, de manière pertinente des informations essentielles contenues dans le document,
- de traduire une partie de ce document,

— de rédiger en anglais quelques phrases selon les indications qui lui sont fournies.

### 3. Epreuve de mathématiques - sciences physiques

- Epreuve écrite
- Durées : 4 heures (2 h + 2 h)
- Coefficient : 4

L'épreuve comporte deux parties obligatoires, organisées en continuité :

#### Première partie : Mathématiques (coefficient : 1,5)

— Objectifs :

L'enseignement des Mathématiques a pour triple objectif de fournir un outil efficace pour les Sciences physiques et biologiques et la Technologie, de développer la formation scientifique et de contribuer à la formation personnelle et relationnelle. Par suite, cette première partie d'épreuve doit permettre :

- d'apprécier la solidité des connaissances des candidats et leur capacité à les utiliser dans des situations variées,
- de vérifier leur aptitude au raisonnement et leur capacité à analyser correctement un problème, à justifier les résultats obtenus et à apprécier leur portée,
- d'apprécier leurs qualités dans les domaines de l'expression écrite et de l'exécution soignée de tâches diverses (tracés graphiques, calculs à la main ou sur machine).

— *Nature de cette partie d'épreuve :*

Cette partie d'épreuve écrite est prévue pour une durée de deux heures.

Les sujets comportent deux exercices de Mathématiques recouvrant une part très large du programme. Les thèmes mathématiques qu'ils mettent en œuvre portent principalement sur les chapitres les plus utiles pour les Sciences physiques et biologiques. Le nombre de points affecté à chaque exercice est indiqué aux candidats.

L'épreuve porte sur des applications directes des connaissances de cours.

Il convient d'éviter toute difficulté théorique et toute technicité mathématique excessive.

La longueur et l'ampleur du sujet doivent permettre à un candidat moyen de traiter le sujet et de le rédiger posément dans le temps imparti.

L'utilisation des calculatrices pendant l'épreuve est définie par la circulaire n° 80-228 du 28 juillet 1986 publiée au *Bulletin officiel* n° 34 du 2 octobre 1986.

Les deux points suivants doivent être rappelés en tête des sujets :

- la clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante de l'appréciation des copies ;
- l'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

**Deuxième partie : Sciences physiques (physique et/ou chimie - coefficient : 2,5)**

Cette seconde partie de l'épreuve porte sur les programmes de physique et chimie (cours et travaux pratiques). Elle comporte plusieurs exercices indépendants. Toute question de cours en tant que telle est exclue, mais il peut être fait appel à des resitutions ponctuelles de connaissances. Les questions posées se rapportent de préférence à des applications concrètes en liaison avec le domaine professionnel du candidat.

Il doit être vérifié que le candidat :

-- analyse convenablement un problème posé en utilisant judicieusement ses connaissances,

-- propose une solution (qualitative ou quantitative) justifiée par un raisonnement logique,

-- fournit un résultat numérique exprimé avec des unités et la précision adéquates ; la plus grande attention sera accordée au nombre de chiffres significatifs.

**4. Epreuve de biochimie-biologie**

-- Epreuve écrite

-- Durée maximale : 4 heures

-- Coefficient : 6

Cette épreuve doit permettre d'apprécier le niveau des connaissances du candidat dans les domaines de la biochimie, de la microbiologie, de la biologie cellulaire et moléculaire et de la physiologie. Elle doit avoir un caractère pluridisciplinaire.

Elle comportera plusieurs questions indépendantes.

**5. Epreuve professionnelle de synthèse : étude et réalisation pratique d'opérations techniques**

-- Epreuve écrite et pratique

-- Durée maximale : 14 heures

-- Coefficient : 12

Cette épreuve comporte deux parties obligatoires.

**Première partie : étude d'opérations techniques**

-- Partie écrite

-- Durée : 4 heures

-- Coefficient : 4

Cette partie a pour but d'apprécier le niveau des connaissances technologiques générales, de vérifier les capacités de réflexion en vue de la résolution des problèmes techniques simples pouvant relever des domaines de la biochimie, de la microbiologie, de la biologie cellulaire et moléculaire et de la physiologie.

Elle doit permettre d'apprécier :

-- les capacités :

- d'analyse du problème,
- de conception et de définition d'une stratégie expérimentale,
- d'utilisation de documents, éventuellement, de langue anglaise,

• de prise en compte des aspects concernant la sécurité, la législation et la gestion,

• d'utilisation des techniques et du matériel, notamment informatique,

-- l'esprit d'initiative.

**Deuxième partie : réalisation pratique d'opérations techniques**

-- Partie pratique

-- Durée maximale : 10 heures

-- Coefficient : 8

Cette partie d'épreuve a pour but de vérifier les savoir-faire dans les domaines de la biochimie, et/ou de la microbiologie, et/ou de la biologie cellulaire et moléculaire, et/ou de la physiologie.

Elle est pluridisciplinaire.

Elle doit permettre de vérifier les capacités :

-- de mise en œuvre d'un protocole opératoire dans des conditions satisfaisantes de sécurité et d'efficacité,

-- d'organisation,

-- de rigueur et de précision dans l'exécution,

-- d'exploitation des résultats.

Elle peut se dérouler en plusieurs parties.

Elle comporte plusieurs questions liées ou indépendantes.

Elle a un caractère essentiellement pratique.

Elle donne lieu à un compte rendu et peut, éventuellement, faire appel aux techniques de l'informatique.

**6. Epreuve de soutenance du rapport de stage ou d'activité professionnelle**

-- Epreuve orale

-- Durée maximale : 0,5 heure

-- Coefficient : 3 (2 pour les compétences scientifiques et techniques, 1 pour les compétences en économie et gestion)

L'épreuve a pour but de vérifier :

1. En ce qui concerne la connaissance professionnelle et humaine de l'entreprise, si le candidat est capable de :

-- appréhender les données constitutives d'une entreprise ou d'un laboratoire,

-- comprendre le fonctionnement d'une entreprise ou d'un laboratoire sur les plans de la technique et de l'organisation,

-- présenter les activités d'un stage en analysant les problèmes techniques rencontrés et les démarches adoptées.

2. En ce qui concerne la communication et l'expression, si le candidat est capable de :

- dégager, ordonner et mettre en valeur les points essentiels d'un document à caractère technique,
- maîtriser les techniques de la communication orale devant un auditoire non familier,
- utiliser la langue française correctement et avec clarté.

Le candidat présentera et soutiendra oralement le rapport qu'il aura établi à l'issue de son stage de deuxième année en entreprise s'il s'agit d'un candidat scolarisé ou un rapport sur son activité professionnelle s'il s'agit d'un candidat dispensé de stage en raison d'un emploi salarié.

Il devra notamment faire apparaître le caractère spécifique de l'entreprise où il aura effectué son stage ou exercé son activité professionnelle, rendre compte de la visée, du déroulement et de l'aboutissement du stage lui-même, ou de l'activité professionnelle, exposer les réflexions en particulier d'ordre technique que le stage ou l'activité professionnelle lui aura inspirées.

La présentation n'excédera pas 20 minutes.

La seconde partie de l'épreuve pourra être consacrée à un dialogue entre le jury et le candidat.

Le rapport de stage ou d'activité professionnelle de dix à vingt pages dactylographiées (quinze à trente pages manuscrites), sans compter les documents techniques, comprendra :

- une présentation schématique de l'établissement de stage et du déroulement du stage de deuxième année ou de l'activité professionnelle exercée dans le domaine de la biochimie ou de la biologie,
- le compte rendu d'un travail personnel,
- une réflexion personnelle concernant l'activité professionnelle et un bilan sur ce stage ou sur cette activité professionnelle.

Ce travail devra prendre en compte les problèmes de sécurité et de législation.

Les documents indispensables à la compréhension de ce rapport pourront figurer en annexe.

Pour les candidats scolarisés, la fiche de stage sera jointe.

L'évaluation des aspects scientifiques et techniques se fera selon la répartition suivante :

- dossier écrit : coefficient 1,
- présentation orale et entretien : coefficient 1.

La commission de jury pour cette épreuve comprend :

- un professeur d'économie et gestion,
- un professeur chargé d'enseignement technologique,
- un professionnel.

Les candidats autorisés ayant échoué à l'examen peuvent :

- soit présenter de nouveau le rapport soutenu lors de la session à laquelle ils ont échoué,
- soit, s'ils le jugent nécessaire, modifier celui-ci dans le sens qu'ils estiment opportun ou relaire un nouveau stage et rédiger un nouveau rapport qui tient compte des situations rencontrées au cours de ce second stage et qui peut reprendre des observations rassemblées au cours du premier stage.

Pour cette épreuve de soutenance de rapport de stage, il convient de tenir compte du caractère secret de certains domaines de la biochimie et de la biologie et de l'obligation pour les candidats de ne pas divulguer des faits confidentiels appris au cours de leur stage ou lors de leur activité professionnelle.

Le jury veillera à ne pas mettre les candidats en difficulté sur cet aspect de leur formation en milieu professionnel.

Pour ce qui concerne les informations contenues dans leur rapport écrit, les candidats doivent avoir obtenu l'accord du responsable de leur stage ou de leur activité professionnelle au sein de l'entreprise. Il leur sera en outre rappelé que cette épreuve ne saurait les libérer de l'obligation de respecter les secrets professionnels.

De plus, il sera indiqué au responsable de l'entreprise dans laquelle le candidat a effectué son stage ou est employé qu'il peut, s'il le juge utile, désigner une personne qui sera autorisée à assister, en tant qu'observateur, à la soutenance du rapport et qui pourra, éventuellement, intervenir pour préserver le caractère confidentiel de certains éléments et pour éviter que ne s'instaure de ce fait une situation préjudiciable au candidat.

## Epreuve de Français : synthèse de documents Durée 4 heures Coefficient 3

Dans une synthèse concise et organisée, vous rendrez compte des cinq documents suivants qui posent le problème du bizutage, puis vous exprimerez en conclusion un avis personnel.

### Documents joints :

1. "Rites de passage en Afrique." Pierre Héreau dans - Histoire des Moeurs tome II page 351 - Encyclopédie de la Pléiade 1991
2. "Un rite d'initiation humiliant et pervers ?" Anne Fohr Le Nouvel Observateur - 10/16 octobre 1991
3. "Les excès du bizutage." Courrier des lecteurs du Monde Novembre 1989
4. Absurde bizutage" - François Fricker - Le Monde 1990
5. "Archaïque ? Non, Postmoderne !" Michel Maffesoli Le Nouvel Observateur - 10/16 octobre 1991

### DOCUMENT 1

#### Rites de passage en Afrique

(Dans l'extrait suivant de l'Histoire des Moeurs, l'auteur évoque les modes de socialisation et d'éducation des enfants africains)

A douze ans, ils sont au fait de la vie sous tous ses aspects, rien n'ayant été caché. Mais ils ne sont pas encore capables d'accéder à la condition humaine dans toute sa plénitude. Cette possibilité arrive avec la puberté. Avec la maturité sexuelle et la capacité de procréer, ils pourront assurer la pérennité du groupe, renforcer les alliances familiales par le mariage, créer cette richesse essentielle que constituent les enfants et donc prolonger et accroître le lignage.

Le camp d'initiation, sorte de stage intensif pour la classe d'âge de même sexe, est la seule institution éducative reconnue comme telle. L'initiation couronne la formation et introduit au nouveau statut et aux nouvelles fonctions sociales. A tous les points de vue, elle marque une nouvelle rupture : il faut mourir à l'enfance et se métamorphoser pour renaître pleinement à la collectivité et y adhérer de manière irréversible et indissoluble. Les moyens employés eux-mêmes rompent avec les habitudes : à l'atmosphère bienveillante et à l'organisation informelle dans laquelle baigne d'ordinaire la formation se substitue une période faite d'épreuves épuisantes, de veilles, de privations, de souffrances, que les jeunes appréhendent et vivent dans l'angoisse sinon la terreur, le mystère et la surexcitation. A un apprentissage en rapport étroit avec la vie succède un

temps de réclusion, à l'écart, dirigé par des inconnus qui remplacent les familiers. Même si des savoirs et des secrets sont transmis à cette occasion, la fonction est plus de synthétiser les acquis antérieurs, de rendre officiellement légitime leur possession et leur usage et d'en faire apercevoir les dimensions mythiques et religieuses. Mais surtout, il s'agit d'amener à une expérience spirituelle qui façonne profondément la sensibilité, qui dépouille la personnalité individuelle pour la fondre dans la communauté.

Pierre Héraux  
dans Histoire des Moeurs  
Tome II - p. 351  
La Pléiade 1991

## DOCUMENT 2

### UN RITE D'INITIATION HUMILIANT ET PERVERS ?

[Le bizutage serait-il...]  
... un exorcisme collectif ? On comprend que les carabins, soldats, gens des Beaux-Arts puissent devenir bouffons au moment d'entrer dans un monde d'émotions fortes. Mais les futurs spécialistes de thermodynamique ou de gestion financière ?

Plus sérieusement, le bizutage, ce serait d'abord une fête chic ! "C'est une stratégie de distinction d'une élite, dit Olivier Galland, sociologue, spécialiste de l'adolescence au CNRS. Il est logique qu'elle se répande à une époque de massification scolaire. Il faut, plus que jamais, se démarquer du commun des mortels. Voyez toutes ces petites et fausses grandes écoles qui se dépêchent d'instaurer cette pratique." Sans compter l'Université qui se laisse gagner, elle aussi, par ce souci de distinction : Paris IX-Dauphine, des filières professionnalisées haut de gamme et même quelques IUT ont désormais leurs bizuts ! A croire que le label de qualité d'une école se mesure désormais à la dureté de son bizutage. Les ingénieurs des Arts et Métiers, par exemple, revendiquent haut et fort leurs "usinages" - appellation maison du bizutage -, réputés pour être particulièrement longs, bêtes et méchants : ils forment, selon eux, des "honnêtes hommes", fraternels et solidaires. (...)

Ce mois-ci, des professeurs de terminale du lycée privé [X...] ont sommé les autorités des facultés catholiques de Lille de mettre fin aux "tracasseries", "brimades", "attitudes sadiques" dont auraient été victimes certains de leurs anciens élèves à l'école d'ingénieurs et à la fac de médecine. L'un d'eux aurait eu des troubles rénaux graves après avoir avalé des déjections canines.

Le bizutage n'est pourtant pas toujours une farce funèbre. Nous n'en sommes pas, tant s'en faut, aux "28 morts dans les universités américaines" qu'aime à citer, en guise de cri d'alarme, Jean-Claude Delarue, le bouillant président de l'Association pour la Défense des Usagers de l'Administration (ADUA), qui a eu le mérite d'attaquer un tabou en faisant du bizutage son dernier cheval de bataille : "On laisse le champ libre à de petits groupes de "bébés tortionnaires" qui agissent suivant leurs instincts suivant leurs instincts les plus pervers et bafouent impunément la dignité humaine." Du calme ! S'il s'agissait, tout simplement, de garçons et de filles ordinaires, dont quelques-uns parfois, dans le feu de l'action, dérapent. Est-il vrai qu'un jeune homme est mort un jour, ficelé entre deux matelas et jeté par une fenêtre ? En tout cas pas dans tous les lycées et écoles que la rumeur cite avec certitude comme étant le lieu de l'accident. Il n'en reste pas moins que ce chahut-bahut étudiant a ses bavures et ses zones d'ombre.

Faut-il l'interdire purement et simplement, comme le demande l'ADUA, au nom d'une loi de 1928 ? Des écoles s'y essaient en pure perte. Le prendre en main ? Madame le doyen d'une fac de médecine lyonnaise, d'autorité, l'a remplacé par "un baptême de promotion" baignant dans "un peu de décorum et une ambiance familiale". Mais il n'est pas sûr que les potaches aient toujours le bon goût, comme les Lyonnais, d'apprécier le spectacle de leurs professeurs en robe...

Même les spécialistes de l'adolescence ne sont pas d'accord sur la manière d'intervenir. "Cela ne regarde pas les adultes, dit le psychanalyste Alain Braconnier. Ce passage de l'enfance au monde adulte est un rite d'initiation, avec des cérémonies, des souffrances, toujours un peu humiliantes et perverses, préfigurant les épreuves à venir."

"Bien sûr, les adolescents ont besoin de rites d'initiation à la vie, avec des épreuves au cours desquelles ils veulent retrouver les angoisses humaines, s'insurge Tony Anatrella, ethnopsychanalyste. Mais le bizutage est un faux rite, vide de sens, purement narcissique, ne s'inscrivant dans aucune dimension philosophique ou mystique. Il met aussi en œuvre une sexualité primitive, qui masque un non-dit, la volonté de puissance des aînés sur les plus jeunes, à un moment où ceux-ci redoutent de ne pas être dignes de la caste où ils entrent. C'est de l'ordre du sacrifice humain."

La solution ne viendra pas sans doute que des intéressés eux-mêmes. Chez eux, les modes chassent vite les traditions ! De grands fiefs, écoles de commerce en tête, commencent à s'affranchir et à se démarquer. Sans doute par stratégie de distinction. Chez elles, on a laissé tomber depuis deux ou trois ans le bizutage hard pour une version soft, sobrement baptisé "séminaire d'intégration" : 350 petits ESSEC sont partis cette semaine dans un train-discothèque pour des bungalows dans les dunes de Capbreton. Concours de lambada, raft, VTT et pétanque. Quand ils jouent à un jeu de stratégie, le skirmich, ils enfilent une tenue de camouflage et les balles de leur fusil à pompe sont des boules de peinture biodégradables ! En bons G.O. (1), les aînés qui dirigent les opérations depuis un an n'ont même pas oublié de lister cinq veinards dont l'anniversaire est tombé un de ces jours-là. Au poil, le nouveau bizutage.

(1) G.O. : "gentils organisateurs" :  
appellation utilisée pour désigner  
les animateurs de certains clubs de  
vacances.

Anne FOHR

Le Nouvel Observateur  
10-16 octobre 1991

DOCUMENT 3

C O U R R I E R

Le Monde

Novembre 1989

### LES EXCES DU BIZUTAGE

L'article intitulé "L'humour douteux" du bizutage" paru dans Le Monde du 9 novembre a suscité de nombreuses lettres de lecteurs. En voici des extraits.

#### Des pratiques déplorables

Il ne saurait être question qu'un enseignant à l'École nationale supérieure d'arts et métiers (ENSAM) depuis quinze ans je cautionne cette opinion qui veut faire des bizutages déguisés en "usines" une partie intégrante de la formation d'un ingénieur Arts et métiers. Les programmes définis par les autorités administratives de l'école ont fixé un nombre d'heures considéré comme suffisant

pour assurer la formation humaine d'un ingénieur Arts et métiers. Un enseignant à l'ENSAM peut concevoir que les élèves de deuxième année ou que les membres de l'association des anciens de l'école ne soient pas de cet avis, mais il n'admet pas de recevoir des directives venant d'un autre lieu que le ministère de l'éducation nationale. Lorsque je participe à la remise de son diplôme à un élève, je ne sais pas et n'ai pas à savoir s'il a été ou non "usiné".

Il est donc faux de prétendre que les bizutages font pratiquement partie des enseignements, mais il est vrai que les enseignants se trouvent totalement isolés face à ces pratiques qui empoisonnent le

déroulement des cours pendant plus de six semaines et donnent une image déplorable des élèves de l'école à l'occasion de pratiques quotidiennes qui n'ont rien à voir avec un quelconque chahut et que seuls les initiés peuvent apprécier à leur juste valeur. Aucun ministre de

l'éducation nationale n'a eu jusqu'à présent l'envie ou le courage de se préoccuper publiquement de ce problème : les enseignants en sont réduits à n'être que des spectateurs désabusés ou exaspérés. La formation des ingénieurs français n'a rien à attendre de ces pratiques qui ont pour seule conséquence de retarder le début des cours efficaces.

**René DE VOS**

Professeur de sciences économiques et humaines au centre ENSAM de Cluny.

### **Une expérience formatrice**

Quel est, brièvement l'esprit qui anime ces "usinages" ? Il consiste à faire vivre à des jeunes gens, avant qu'ils n'entrent dans la vie dite active, une expérience particulière de vie en communauté où ils expérimentent en vraie grandeur les lois de la dynamique des groupes, ce qui les conduit à une connaissance d'eux-mêmes et des autres. Cette expérience humaine est spécialement formatrice pour des étudiants sortant des classes préparatoires, encore étourdis par le gavage théorique subi, et constitue une composante essentielle et reconnue de la formation Arts et métiers.

**Eric LE ROUX**

Ingénieur ENSAM (Courbevoie)

### **Autour d'une table**

Je propose donc que les aînés ne bizutent plus leurs nouveaux camarades, mais les accueillent fraternellement autour d'une table bien garnie. N'est-ce pas plus aimable et plus digne de la part de la future élite de la France ?

**M. HATHUAN**  
(Strasbourg).

### **Un très bon souvenir**

J'ai eu trois fils (Véto, médecine et école de commerce) qui ont été bizutés très gentiment et qui en gardent un très bon souvenir : j'avais pris soin de prévenir toute personne responsable, et de le faire savoir, que je porterais immédiatement plainte devant toute exagération. Et, comme par hasard, cette année-là, les bizutages ont été gentils !

**Dr P. HERBERT**  
(Paris).

### **Sadisme collectif**

Si l'on veut appeler les choses par leur nom, il faut dire que le bizutage est, trop souvent, une manifestation de sadisme collectif qui mériterait d'être étudiée de près par des spécialistes en sociologie et en psychopathologie. (...) La lâcheté accompagne le sadisme, car les bizutés les plus visés sont toujours les plus faibles physiquement.

**R. ANTOINE**  
Censeur honoraire  
(Héricy-sur-Seine).

### **Une vie insupportable**

En fait, le bizutage a lieu dans plusieurs universités trois ou quatre fois par an, ce qui rend souvent la vie des étudiants de première année quasi insupportable. De plus, et bien que la première année soit réputée difficile, les étudiants prévenus à l'avance des jours de bizutage n'hésitent pas à sécher les cours, quitte à devoir les rattraper ultérieurement.

**Boris RENAUDIN**  
Etudiant (Troyes).

### **Des actions judiciaires**

Il est légitime que les étudiants menacés par les bizuteurs utilisent les actions judiciaires civiles et pénales que les lois mettent à leur disposition, dans le cadre du droit commun. Il leur suffirait de former un groupe pour limiter la participation aux frais et de consulter un conseil juridique.

**Joseph CRISAFULLI**  
(Paris)

## Imbéciles et dégradants (\*)

Quand on badigeonne d'éther les parties génitales, quand on introduit dans la gorge une cuillerée de sel en empêchant de boire, cela porte-t-il un autre nom que torture ? (...) Sans doute tous les bizutages n'atteignent-ils pas les sommets de l'horrible (...). Mais les traitements infligés sont toujours imbéciles,

presque toujours dégradants lorsqu'ils se donnent en spectacle dans la rue (...). D'où vient que nous nous accommodions de l'insoutenable ? (...) On ne voit guère d'espoir que dans la prévention : parents et enseignants seuls ont le pouvoir de convaincre leurs enfants, leurs élèves, qu'on ne grandit pas d'accepter d'être avili pour rien.

Jean-Louis LAURENT  
Enseignant, Ethe (Belgique).

\* NB : les coupures sont celles du journal

DOCUMENT 4

Enseignement

Le Monde  
1990

# Absurde bizutage

par François Fricker

**L**E bizutage, pratiqué au mois de septembre lors de la rentrée des classes préparatoires et des grandes écoles, est choquant et révélateur d'une certaine violence sociale et d'un mode de fonctionnement hiérarchique inadmissible dans une société qui se veut ouverte et démocratique. C'est une humiliation collective infligée par une partie d'une communauté scolaire sur une autre partie à la seule raison de l'ancienneté de la première par rapport à la seconde...

Le bizutage est souvent présenté comme un moyen d'intégrer les plus jeunes au corps des anciens et d'assurer la cohésion de l'école. Cela appelle une triple remarque.

D'abord, dans le bizutage, la communauté scolaire en question

se considère comme une caste, c'est-à-dire comme classe fermée ayant l'initiative de l'inclusion et de l'uniformisation des comportements. Il est donc postulé que le groupe domine et contrôle les personnes qui s'y agrègent. Cela est d'autant plus inquiétant qu'il s'agit, dans la plupart des cas, d'écoles chargées de former les cadres de la société. Comment se considèrent-ils alors ? Ensuite, les humiliations infligées sont aussi absurdes qu'impératives.

La volonté des soumis est remise tout entière au caprice des anciens. L'autonomie de la personne est abolie, elle doit plier sans que les ordres aient, bien sûr, la moindre apparence de justification. Le pouvoir s'affirme là pour lui-même, dans sa jouissance cynique. L'arbitraire n'est pas autre

chose. Ici encore est-ce la meilleure préparation à l'exercice de l'autorité dans les entreprises et les organes de l'Etat ?

Enfin, le bizutage se perpétue d'année en année, les nouveaux élèves deviennent des anciens qui, à leur tour, infligent ce qu'ils ont subi. La chaîne se maintient comme si les pratiques sociales qui la sous-tendent demeuraient également. Le rite conservé est conservateur. Les élèves ont intégré les normes et les objectifs de la société telle qu'elle est. Ils en seront, pour beaucoup, les fidèles exécutants.

Le bizutage est le dur miroir de notre société. Faut-il se contenter de le regarder ?

► François Fricker est professeur de philosophie à Paris.

DOCUMENT 5

ARCHAÏQUE ? NON, POSTMODERNE !

PAR MICHEL MAFFESOLI\*

Une manifestation du retour au tribal qui s'esquisse sous nos yeux

Alors qu'il est de bon ton de proclamer le retour de l'individualisme ou autre forme de narcissisme, il est frappant d'observer que la réalité, d'une manière têtue, nous donne quotidiennement des exemples qui contredisent du tout au tout une telle opinion. Le bizutage est du nombre, qui traduit ce que j'ai appelé le "tribalisme postmoderne", où il est moins question de distinction, entre les individus et entre les groupes, que de fusion, de perte de soi dans l'autre, et ce afin de former ces petits corps sociaux où prévalent le "sentiment d'appartenance" et la conviction d'une destinée commune.

Ainsi le grand retour du bizutage peut être considéré comme un apprentissage de la solidarité communautaire. Paradoxe ? Pas forcément, car c'est toujours dans et par la douleur que se façonnent les liens de divers ordres qui résistent à l'usure du temps, et qui font qu'un "corps" est autre chose qu'une simple métaphore mais bien une interrelation forte où l'ordre et le désordre se conjuguent en une organicité des plus solides. La souffrance en effet, c'est une manière homéopathique d'affronter la mort. Je veux dire ici la mort de soi, la mort à soi, qui permet de renaître dans le collectif. Il en est de même du sexe : le fait de le jouer, de le théâtraliser ou même de le tourner en dérision, tout cela rappelle qu'avant d'être quelque chose de privé le sexe doit "circuler" afin de conforter la communauté. Mimer la copulation, pratique la plus répandue du bizutage, est bien une manière de faire corps, de dire symboliquement la socialisation qui commence avec la vie universitaire. Dans tous les cas, il s'agit bien d'un rite de passage qui, à l'image des bacchantales\*\* d'antique mémoire, "sait" bien, d'un savoir incorporé en quelque sorte, que pour "faire corps", pour faire du social, pour aboutir à un ordre, il est nécessaire d'intégrer du désordre. C'est la "part maudite" (Georges Bataille), la part d'ombre qui est présente dans toute société, et il n'est pas inutile qu'elle trouve une expression rituelle, donc canalisée, plutôt que de devenir perverse, donc inmaîtrisable.

Il n'est donc pas étonnant que le bizutage fasse mal, à l'image du traumatisme de la naissance, il introduit à une nouvelle vie : la vie de groupe, qui est d'autant plus forte qu'il aura su, ne fût-ce qu'un instant, canaliser l'agressivité, la violence dont tout un chacun est pétri, et par là même assurer une ossature des plus solides à l'être-ensemble que vont être ces années passées en commun. Pour cela il faut du conformisme, de la conformité, toutes choses qui s'atteignent en brisant la carapace individuelle, en niant les particularités spécifiques.

Pour inverser l'opinion commune sur l'époque, je dirais que l'on assiste à une multiplication de "narcissismes de groupe", où ensemble l'on s'emploie à se regarder le nombril les uns des autres. Le bizutage serait ainsi la forme exacerbée d'une telle pratique. Il dit, en majeur, ce qui se vit sans y prêter attention dans la vie courante. En effet prendre un poste de travail, être admis dans un groupe d'amis, devenir membre d'un clan politique, d'une coterie intellectuelle, d'un réseau sexuel, tout cela nécessite une sortie de soi, stricto sensu une "extase". Le bizutage est là pour nous rappeler une telle nécessité. Il ne fait, à un moment particulier, que caricaturer ces "entrées" dans le corps collectif dont est ponctuée la vie de tous les jours.

Cela, on l'avait oublié, et seule une conception rationnelle, contractuelle des rapports sociaux avait prévalu durant toute la modernité. On peut dire que dans le mouvement cyclique du monde cette chose archaïque qu'est le besoin de "reliance", la pulsion d'être avec l'autre, revient sur le devant de la scène. En ce sens, le bizutage est bien l'une des manifestations de la tribalisation du monde qui s'esquisse sous nos yeux, en cette postmodernité naissante.

H.M.

t) Professeur à la Sorbonne, directeur du Centre d'Etudes sur l'Actuel Quotidien (Paris-V), auteur de "Au temps des tribus" (Livre de Poche).

Le Nouvel Observateur 10-16 oct. 1991

(\*\*) Fêtes que les Anciens célébraient en l'honneur de Bacchus avec danses et jeux et initiations.

## Epreuve d'Anglais

### Durée 2 heures Coefficient 2

#### ALGAE (1) GET GREENER

Some micro-organisms come equipped with a micromop (2) and microbucket (3). Scientists have become fond of turning to them for jobs like cleaning up water that has been polluted by oil spills and industrial waste. Some types of soil bacteria, primarily strains of the pseudomonas family, can grow almost entirely on oil. They split the heavy hydrocarbons into lighter gases like methane, which then evaporate. They also let out an enzyme that binds to the oil globules and forms a stable emulsion of oil and water. The enzyme also turns the oil into fatty acids that sea life can eat. Other types of bacteria turn toxic chemicals into less hazardous substances.

When it comes to heavy metals, though, the microscrubbers meet their match. Heavy metal ions, such as mercury and uranium, bind to the cell walls of bacteria, do serious damage to their lifestyles and eventually kill them. Alternatives are needed.

One ruse is to add resins that form bonds with the ions. The metal muck (4) then separates out as a solid. But there are two problems with this : the water often contains plenty of calcium and magnesium ions which compete with heavy-metal ions for the binding sites in resins and usually win. They quickly clog up (5) the resin, leaving little room for the heavy metals. And the bond that forms between the resins and heavy-metal ions is weak. As a result the metals leak back into the water. Using this method it is hard to reduce the concentration of heavy metals to less than several hundred parts per billion.

Where bacteria have failed, their cousins the algae may succeed. Dennis Darnall and his colleagues at New Mexico State University in Las Cruces have come up with an algae-based material, known as AlgaSORB, to remove heavy metals from water. They stuffed algae into columns of solid silica gel and let water pass down the columns. Packing algae in silica gel kills the micro-organisms (their services to nature are, alas, performed posthumously). But their cell walls still provide many binding sites that can hook the ions out of water. Recent tests have proved to be successful : AlgaSORB can cut back the concentration of mercury and uranium in ground water to less than one part per billion.

The material may have plenty of work to do. Toxic metals from old dumping sites often leach into ground water, which is especially nasty in the case of nuclear waste containing uranium and plutonium. Dr Darnall thinks that AlgaSORB can help.

"The Economist " June 22nd 1991

- (1) alga : algue.
- (2) mop : balai laveur.
- (3) bucket : seau.
- (4) metal muck : familiar for metal in a degraded state.
- (5) to clog up : engorger.

QUESTIONS :

- 1 - Faire un résumé en français, de manière ordonnée, des informations essentielles contenues dans l'article. (7 points).
- 2 - Traduire le titre de l'article et le premier paragraphe jusqu'à "... that sea life can eat." (ligne 9). (7 points).
- 3 - Show from the text and from your own practical experience how biochemistry and bacteriology contribute to fighting water and soil pollution. (6 points) 120 mots environ.

<b>Epreuve de Mathématique</b> <b>Durée 2 heures Coefficient 1,5</b>
---

EXERCICE 1

Le but de cet exercice est l'étude statistique d'une population d'individus hospitalisés.

On a prélevé au hasard un échantillon de 100 personnes parmi la population des malades d'un hôpital donné.

On a mesuré la pression artérielle diastolique (P.A.D.)  $p$  de chacune des 100 personnes.

On a obtenu le tableau de résultats suivant :

$p$ en mm de Hg	effectifs
[ 4 ; 6[	4
[ 6 ; 8[	20
[ 8 ; 10[	41
[10 ; 12[	23
[12 ; 14[	12

Les résultats numériques sont demandés à  $10^{-2}$  près.

1) Calculer les valeurs approchées de la moyenne  $\bar{p}$  et de l'écart type  $s$  de la pression artérielle diastolique de cet échantillon.

2) Donner une estimation de la moyenne  $M$  et une estimation de l'écart type  $\sigma$  de la pression artérielle diastolique de la population concernée.

3) On appelle  $X$  la variable aléatoire qui, à chaque individu de la population associe sa pression artérielle diastolique.  $X$  suit une loi normale de moyenne  $M$  et d'écart type  $\sigma$ .

a) Donner un intervalle de confiance de la moyenne  $M$  de la pression artérielle diastolique au risque de 1 %.

b) On prend dans cette question 9,4 pour valeur approchée de  $M$  et 2 pour valeur approchée de  $\sigma$ .

Calculer les probabilités suivantes :

$$P(X < 7) \text{ et } P(8 < X < 12).$$

### EXERCICE 2

Le but de cet exercice est l'étude de la concentration de micro-organismes dans une culture.

#### PARTIE A :

La concentration  $x$ , en  $\text{g.l}^{-1}$ , de micro-organismes dans une culture en continu varie en fonction du temps  $t$  exprimé en heures ( $t \geq 0$ ) et vérifie l'équation différentielle linéaire :

$$\frac{dx}{dt} + 0,70 x = 2,35 \cdot e^{0,35t} \quad (1)$$

1) Résoudre dans  $\mathbb{R}^+$  l'équation différentielle sans second membre associée à l'équation (1).

2) On pose  $x(t) = K(t) \cdot e^{-0,70t}$

où  $K$  est une fonction numérique dérivable de la variable  $t$ . Déterminer  $K$  pour que la fonction  $x$  définie ci-dessus soit une solution de (1) dans  $\mathbb{R}^+$ .

3) En déduire la solution générale de l'équation (1) dans  $\mathbb{R}^+$ .

4) Donner la solution particulière de (1) correspondant à une concentration initiale de  $4,70 \text{ g.l}^{-1}$  (autrement dit :  $x(0) = 4,70$ ).

Commentaire : La fonction obtenue est telle que  $\lim_{t \rightarrow \infty} x(t) = +\infty$

En fait, il s'agit d'une solution théorique ; dans la pratique, des perturbations dues en particulier aux déchets empêchent le phénomène de se prolonger indéfiniment.

**PARTIE B :**

Soit  $x$  la fonction définie sur  $[0 ; 6]$  par :

$$x(t) = 2,46 \cdot e^{-0,70t} + 2,24 \cdot e^{0,35t}$$

- 1) Calculer les dérivées première et seconde  $x'$  et  $x''$  de  $x$ .
- 2) Démontrer que, pour tout  $t$  positif ou nul,  $x''(t) > 0$ .

Dans les questions suivantes, les calculs approchés seront effectués au centième près.

- 3) Dresser le tableau de variations de la fonction  $x'$  sur  $[0 ; 6]$ .
- 4) a) Calculer  $x'(0,7)$  et  $x'(0,8)$  et vérifier que  $x'(0,7)$  et  $x'(0,8)$  sont de signes contraires.  
b) En admettant que l'équation  $x'(t) = 0$  admet une racine unique  $\alpha$  dans  $[0 ; 6]$  et que  $0,7 < \alpha < 0,8$ , déterminer alors le signe de  $x'(t)$  sur  $[0 ; 6]$  (on ne demande pas de calculer  $\alpha$ ).
- 5) En déduire le sens de variation de la fonction  $x$  sur  $[0 ; 6]$ .
- 6) Le plan est rapporté à un repère orthogonal d'unités graphiques  
2 cm sur l'axe des abscisses  
1 cm sur l'axe des ordonnées
  - a) Tracer la courbe représentative de la fonction  $x$ .
  - b) Déterminer graphiquement le temps au bout duquel la concentration est le double de la concentration initiale.

<b>Epreuve de Sciences physiques</b> <b>Durée 2 heures Coefficient 2,5</b>
---

**I - Radioactivité (12 points)**

1°) Le radium  $^{226}_{88}\text{Ra}$  est radioactif  $\alpha$ . Sa période de désintégration est  $T = 1620$  ans.

a) Ecrire l'équation de désintégration du radium. Préciser les lois utilisées pour expliquer la formation du noyau de radon (Rn).

b) Quelle masse de radium a une activité de  $10^{11}$  becquerels ?

c) Combien de temps s'est-il écoulé lorsque l'activité d'une source de radium a diminué de 10 %.

2°) L'exercice consiste à déterminer si une source radioactive est constituée d'un ou de deux éléments radioactifs différents. Pour cela, l'activité de cette source est mesurée à différents moments. Les mesures sont données dans le tableau suivant :

Activité exprimée en $10^{11}$ Bq	1,70	0,88	0,65	0,53	0,50
Temps écoulé exprimé en heures	0	0,25	0,50	0,75	1

En expliquant la démarche suivie, dire si la source contient un ou deux éléments.

Donnée : nombre d'Avogadro :  $N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ .

## II - Conductimétrie (13 points)

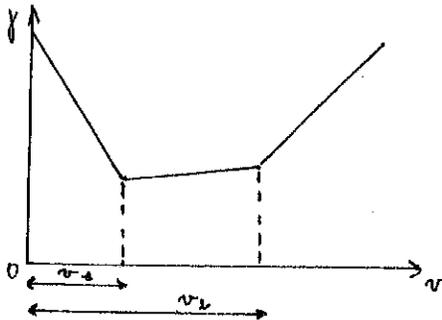
1°) Dosage d'un mélange d'acides chlorhydrique et acétique.

a) La conductivité d'une solution ionique est donnée par la relation :

$$\chi = \sum_{i=1}^n \Lambda_i \cdot c_i \cdot z_i$$

Préciser la signification de chaque terme et les unités S.I. correspondantes.

b) Le graphe ci dessous représente la variation de la conductivité d'une solution d'acides chlorhydrique et acétique en fonction du volume de soude versé. La prise d'essai est de  $100 \text{ cm}^3$  et la concentration de la soude est  $C_{\text{NaOH}} = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .



Donner une interprétation de la courbe.

Données : conductivités molaires limites en unités S.I. :

$$\Lambda_{\text{H}^+} = 0,0350 ; \Lambda_{\text{Na}^+} = 0,0050 ; \Lambda_{\text{OH}^-} = 0,0200$$

$$\Lambda_{\text{Cl}^-} = 0,0076 ; \Lambda_{\text{CH}_3\text{COO}^-} = 0,0041$$

c) Calculer la concentration de l'acide chlorhydrique et de l'acide acétique sachant que  $v_1 = 10,0 \text{ cm}^3$  et  $v_2 = 18,0 \text{ cm}^3$ .

2°) Détermination du produit de solubilité du sulfate de baryum. La conductivité d'une solution aqueuse saturée de sulfate de baryum est de  $2,8 \cdot 10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$  (la conductivité de l'eau est négligée). Calculer la concentration  $c$  en ions  $\text{Ba}^{2+}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  (en  $\text{mol.m}^{-3}$ ).

En déduire la valeur du produit de solubilité du sulfate de baryum.

Données :  $\Lambda_{\text{Ba}^{2+}}^{\circ} = 0,0064$

$\Lambda_{\text{SO}_4^{2-}}^{\circ} = 0,0080$  (en unités S.I.)

### CHIMIE GENERALE

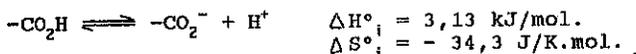
Toutes les données sont relatives à la température de 25°C.

1°) Sachant qu'en solution aqueuse l'alanine donne lieu aux équilibres acido-basiques suivants :

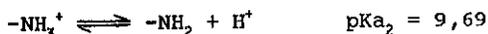


et connaissant les données relatives :

- à l'acidité du groupement acide carboxylique.



- à l'acidité du groupement ammonium.



a) Calculer la constante  $\text{pK}_a$ , de cet acide aminé ( $R = 8,31 \text{ J/K.mol}$ ).

b) Etablir le diagramme des domaines de prédominance des trois formes en fonction du pH ; en déduire l'espèce majoritaire en milieu neutre.

2°) La combustion de l'alanine qui fournit du dioxyde de carbone (gaz) de l'eau (liquide) et de l'azote (gaz) conduit à une variation d'enthalpie libre  $\Delta H^{\circ} = -1616 \text{ kJ/mol}$ .

Connaissant par ailleurs les enthalpies standard de formation :

- du dioxyde de carbone gazeux :  $-393 \text{ kJ/mol}$ .
- de l'eau liquide :  $-285 \text{ kJ/mol}$ .

Calculer l'enthalpie de formation de l'alanine.

### CHIMIE ORGANIQUE

#### Synthèse de la valine

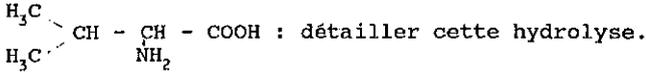
1°) Le 2-méthyl propan-1-ol subit une oxydation et donne un composé B qui réduit la liqueur de Fehling.

Ecrire la réaction ; donner la formule développée et le nom de B.

2°) L'action de HCN sur B donne C ; écrire l'équation de cette réaction. De quel type de réaction s'agit-il ?

3°) L'action de l'ammoniac sur C conduit à D + H<sub>2</sub>O : écrire le bilan réactionnel.

4°) L'hydrolyse de la fonction nitrile de D conduit à la valine



5°) Combien la valine présente-t-elle de stéréoisomères ? Les représenter selon Cram (perspective cavalière). Les nommer en justifiant les réponses.

On donne les masses molaires atomiques en g.mol<sup>-1</sup>.

$$M(\text{H}) = 1$$

$$M(\text{C}) = 12$$

$$M(\text{N}) = 14$$

$$M(\text{O}) = 16$$

## Epreuve de Biologie-Biochimie

Durée 4 heures Coefficient 6

### Remarques préliminaires :

- 1 - Le sujet proposé a un caractère pluridisciplinaire. Le candidat devra veiller à répondre de manière concise aux questions posées.
- 2 - Il est suggéré de consacrer à chaque question un temps tenant compte du nombre de points attribués.
- 3 - Les trois parties du sujet peuvent être traitées de manière indépendante.

## Les membranes biologiques

L'examen de toute cellule au microscope électronique met en évidence l'importance du système membranaire.

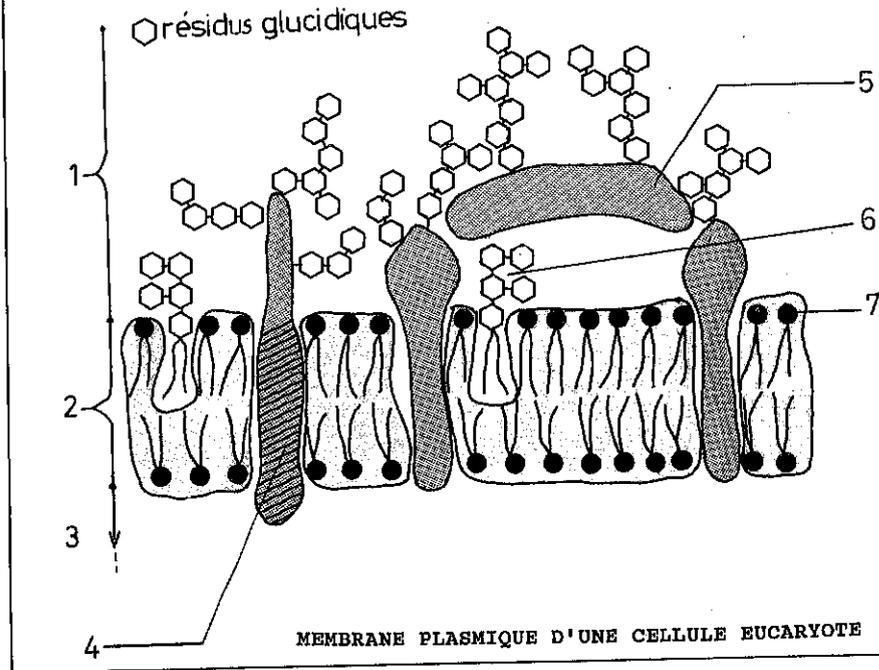
On peut définir une membrane biologique comme une association moléculaire active, capable notamment :

- d'assurer des échanges de matière et d'énergie,
- de contrôler l'information entre les cellules et leur environnement.

On se propose d'étudier quelques aspects de la STRUCTURE et des FONCTIONS des membranes biologiques.

### 1 - ARCHITECTURE ET COMPOSITION CHIMIQUE (17 points)

- 1.1. Le document I représente la membrane plasmique d'une cellule eucaryote. Indiquer sur la copie les légendes correspondant à la numérotation.
- 1.2. Expliquer les trois caractéristiques suivantes des membranes :
  - assemblage non covalent,
  - assemblage non symétrique,
  - structure fluide.
- 1.3. Donner un exemple de formule générale des molécules symbolisées par  Expliquer le rôle joué par ce type de molécules dans la structure membranaire.
- 1.4. La partie hachurée de la molécule 4 (document I) correspond à la séquence:  
ILE - THR - LEU - ILE - ILE - PHE - VAL - MET - ALA - GLY - MET  
Discuter la composition en acides aminés de cette partie de chaîne protéique.



## 2 - MEMBRANE PLASMIQUE ET RECEPTEURS ( 62 points)

- 2.1. En présentant sommairement trois exemples empruntés à différents domaines, illustrer la notion générale de récepteur membranaire (6 points).
- 2.2. Action d'hormones sur des récepteurs plasmiques (20 points).
  - 2.2.1. Présenter le mécanisme responsable de la synthèse d'AMPC et préciser comment l'AMPC peut moduler l'activité de différentes protéines cellulaires.
  - 2.2.2. Montrer l'importance de ce mécanisme dans le métabolisme glucidique au cours de la contraction musculaire.
- 2.3. Action de toxines bactériennes (14 points).
  - 2.3.1. Définir le terme de toxine.
  - 2.3.2. Il existe deux types de toxines bactériennes de nature chimique différente ; dresser un tableau comparatif de leurs propriétés et donner un exemple de chaque type.
- 2.4. Application au choléra (22 points).

La toxine cholérique produite par *Vibrio cholerae* est une entérotoxine qui provoque une diarrhée massive et une déshydratation ; elle agit au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse de l'intestin grêle en provoquant une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC. L'AMPC inhiberait une protéine membranaire de transport responsable de l'absorption de chlorure de sodium (flux dans le sens lumière intestinale ---> entérocyte) et stimulerait une seconde protéine de transport responsable de la sécrétion d'ions chlorures dans la lumière intestinale.

- 2.4.1. Expliquer, dans le cas du choléra, comment les variations d'activité des protéines de transport engendrées par l'AMPC peuvent être responsables d'une perte hydrique.
- 2.4.2. La toxine cholérique a divers effets sur le système immunitaire, entre autres :
- effet modulateur de la réponse immunitaire humorale in vivo chez la souris,
  - altération de la fonction "helper" (auxiliaire) des lymphocytes T.
- 2.4.2.1. Donner les principales caractéristiques de la réponse immunitaire humorale, en distinguant réponse primaire et réponse secondaire.
- 2.4.2.2. Expliquer en quoi l'altération de la fonction "helper" des lymphocytes T peut avoir des répercussions sur la réponse immunitaire humorale dans ce cas.

### 3 - MEMBRANES ET PHENOMENES DE TRANSPORT DE MOLECULES (41 points)

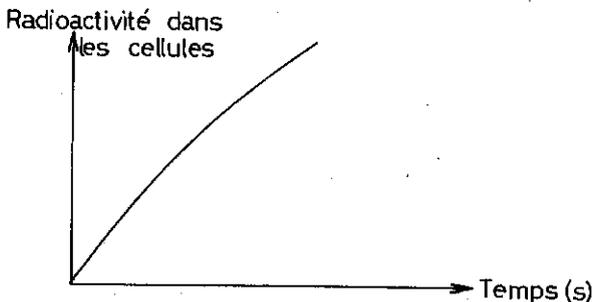
3.1. La membrane plasmique et le transport de solutés (23 points).

3.1.1. Définir les termes suivants :

- diffusion libre,
- transport facilité,
- transport actif.

3.1.2. Etude expérimentale du transport d'un soluté.

Pour mesurer le taux de transport d'un soluté vers l'intérieur d'une cellule, on utilise le marquage radioactif du soluté. Une suspension de cellules est incubée dans un milieu contenant le soluté radioactif, puis on prélève des parties de la suspension à des temps différents et on mesure la radioactivité des cellules filtrées et lavées. La figure ci-dessous présente la variation de la radioactivité de cellules lavées en fonction du temps. Le coefficient directeur du segment initial de la courbe donne la vitesse d'absorption du soluté correspondant à une concentration  $S_0$  de soluté au temps 0.



On traite des suspensions cellulaires identiques avec différentes quantités de leucine radioactive et on mesure dans chaque cas le taux initial d'absorption de la leucine. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous.

concentration $S_0$ de leucine ( $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	taux initial d'absorption (dpm) *
0,5	55
1	110
5	480
10	830
20	1300
30	1700
50	2100
100	2600

\* dpm : signifie "désintégrations par minute".

3.1.2.1. Expliquer pourquoi il existe un taux maximal d'absorption.

3.1.2.2. Par une représentation graphique judicieusement choisie ou par un calcul (régression linéaire) déterminer ce taux. On précise que la vitesse d'absorption du soluté obéit à la relation :

$$V_i = \frac{V_m \cdot (S_0)_{\text{ext}}}{(S_0)_{\text{ext}} + C}$$

où C est la constante de perméabilité.

3.1.2.3. Déterminer également C.

3.1.3. On réalise la même expérience en présence d'ions cyanure ; on trouve une vitesse maximale plus faible avec une même constante de perméabilité. Quel peut être le rôle des ions cyanure ?

En déduire à quel type de transfert correspond le système d'entrée de la leucine.

3.2. Protéines et systèmes membranaires intracellulaires (18 points).

Les protéines à DESTINÉE NON CYTOPLASMIQUE sont synthétisées au niveau des ribosomes liés au réticulum endoplasmique.

3.2.1. Initiation de la biosynthèse protéique.

3.2.1.1. Définir cette étape. Indiquer les différents composants qui y participent.

3.2.1.2. Au cours de l'étude de la synthèse des protéines, on mesure souvent la proportion des différents ARN-t spécifiques, au sein des ARN-t totaux, par des méthodes isotopiques. Ainsi un échantillon contenant 20  $\mu\text{g}$  d'ARN-t est traité par un excès de  $^{14}\text{C}$ -L-Alanine d'activité spécifique 90 Ci.mol $^{-1}$  en présence des enzymes et cofacteurs appropriés.

Le complexe L-Ala-ARN-t<sup>Ala</sup> est séparé et sa radioactivité mesurée donne 60 000 désintégrations par minute.

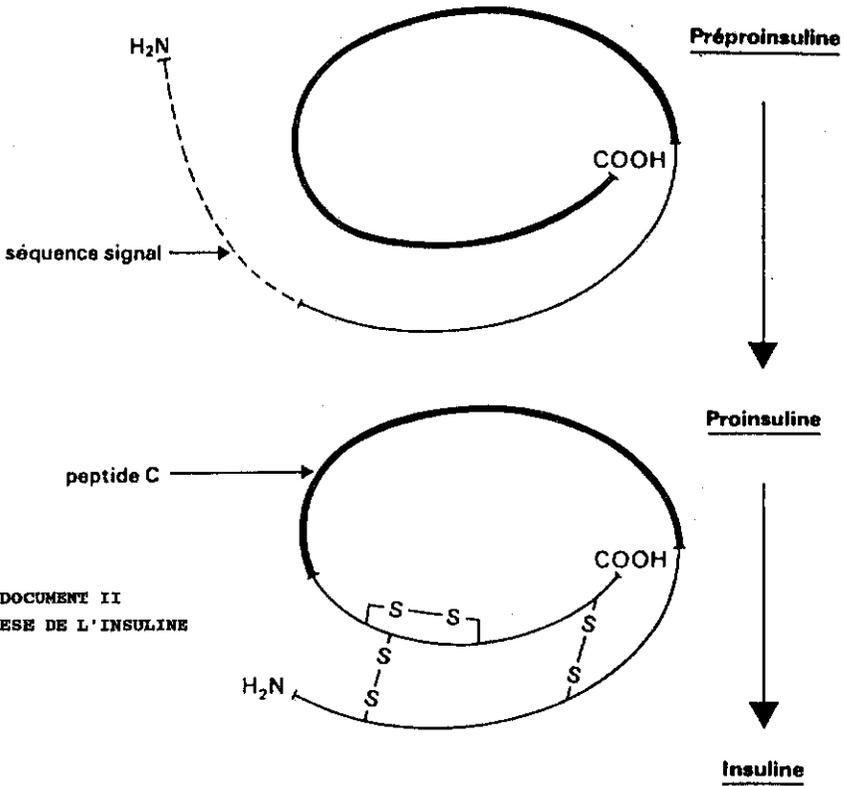
Calculer le pourcentage d'ARN-t<sup>Ala</sup> dans l'échantillon de départ.

Données 1 Ci = 3,7 10 $^{10}$  désintégrations par seconde  
M M ARN-t = 25 000 g.mol $^{-1}$

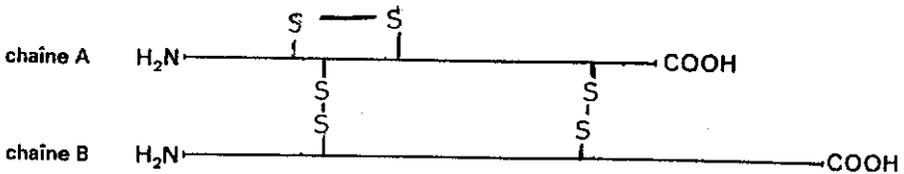
3.2.2. Les protéines à destinée non cytoplasmique ont en début de chaîne, au moment de leur synthèse, une séquence signal.  
 - Définir ce terme.

- Quel est le rôle de cette séquence ?

3.2.3. Dans le cas particulier de la synthèse de l'insuline (voir document II), préciser les modifications post-traductionnelles qui permettent le passage de la préproinsuline à l'insuline.



DOCUMENT II  
 SYNTHÈSE DE L'INSULINE



**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**première partie : étude d'opérations techniques**  
**Durée 4 heures coefficient 4**

Remarques préliminaires :

- 1 - L'usage d'un dictionnaire "Anglais-Français" est autorisé.
- 2 - La lecture préalable de l'ensemble des documents n'est pas nécessaire avant d'aborder le sujet. Des précisions, quant à leur utilisation, sont fournies dans les questions.

## Les mycotoxines dans l'industrie agroalimentaire

Les mycotoxines sont des contaminants fréquents des produits alimentaires. Elles sont responsables de nombreuses intoxications chez l'homme. Le nombre de métabolites toxiques produits par les moisissures est considérable ; quelques uns seulement ont fait l'objet de recherches ayant abouti à la mise au point de méthodes d'identification et de dosage fiables et reproductibles.

Leur présence dans certaines matières premières peut entraver un processus de transformation au sein d'industries agro-alimentaires.

### A - ETUDE DES AFLATOXINES, (60 points)

Les aflatoxines sont des mycotoxines produites par certaines souches d'*Aspergillus flavus*. Le caractère hautement toxique des aflatoxines, associé au fait qu'elles peuvent contaminer de nombreuses denrées, pose un problème d'hygiène alimentaire. Ces substances sont cancérogènes, mutagènes et tératogènes. L'homme y est relativement sensible ; quelques mg par kg de poids corporel produisent des effets toxiques aigus.

Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration a estimé que la consommation moyenne des Américains en aflatoxines était de 2,7 à 9 ng par kg de poids corporel et par jour, pour des contaminations allant de 0,1 à 0,3 µg par kg d'aliment. Cette consommation constituerait un risque de 161 tumeurs pour 100 000 personnes.

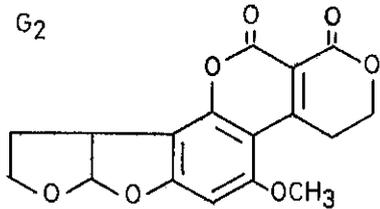
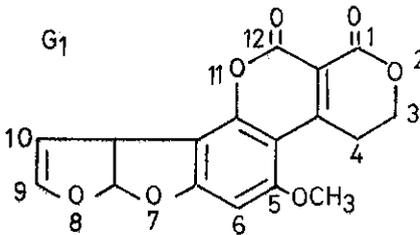
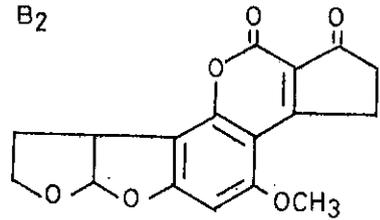
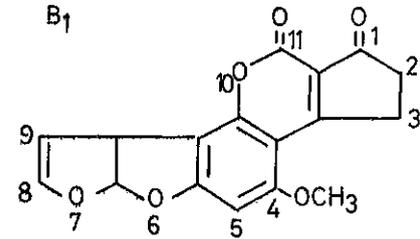
La fixation de concentrations maximales admissibles dans les aliments nécessite des méthodes d'analyse sensibles, rapides et spécifiques.

#### 1 - Méthode d'analyse C.E.E. (12 points)

Les pays de la C.E.E. ont adopté, depuis 1976, une méthode de dosage des aflatoxines B1, B2, G1, G2. Les formules chimiques sont données dans le document 1. Les grandes étapes du protocole sont fournies dans le document 2.

- 1.1. Après la purification sur colonne de silice, une concentration de l'éluat est nécessaire (étape n°6). Comment cette concentration peut-elle être réalisée ?
- 1.2. La mise en évidence et le dosage des aflatoxines font appel à une technique chromatographique (étape n° 7).
  - 1.2.1. Qu'est-ce qu'une chromatographie ?
  - 1.2.2. A l'étape n° 7, que signifie C.C.M. ?
  - 1.2.3. L'utilisation de cette technique suppose une régénération préalable du support ; quel est le but de cette régénération ? Comment la pratique-t-on ?
  - 1.2.4. La lecture de la C.C.M. (étape n° 8) doit aboutir à des résultats quantitatifs. Comment analyser quantitativement une C.C.M. ?

DOCUMENT N° 1



FORMULES CHIMIQUES DES AFLATOXINES B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>.

Document n°2

Méthodes d'analyse CEE (7° directive 76/372 - JOLE 1/03/1976)

Etape n°1 : PREPARATION DE L'ECHANTILLON :

Prise d'essai        50 g  
                          25 g d'hyfloupercel  
                          25 cm<sup>3</sup> d'eau  
                          250 cm<sup>3</sup> de chloroforme

Etape n°2 : AGITATION 30 MINUTES

Etape n°3 : FILTRATION

Etape n°4 : PURIFICATION SUR COLONNE DE SILICE

                          100 cm<sup>3</sup> d'hexane  
                          100 cm<sup>3</sup> d'éther diéthylique

Etape n°5 : ELUTION 150 cm<sup>3</sup> de méthanol-chloroforme (3v/97v)

Etape n°6 : CONCENTRATION

Etape n°7 : SEPARATION PAR CCM

Etape n°8 : LECTURE

Ces dernières années, des travaux ont été réalisés pour produire des anticorps spécifiques en vue de développer des techniques immunologiques. Les plus répandues sont les dosages immunoenzymatiques ainsi que, plus récemment, la purification sur colonne d'immunoaffinité (I.A.C.) suivie d'un dosage par chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C.). On se propose d'étudier ces deux méthodes.

## 2 - Méthode immunoenzymatique : Kit Transia (20 points)

Le dosage envisagé est celui de l'aflatoxine B1.

- 2.1. A partir du document 3, expliquer les différentes étapes en précisant le rôle des réactifs utilisés.
- 2.2. Justifier la réalisation du contrôle témoin négatif.
- 2.3. Indiquer le sens de variation de l'absorbance (A) mesurée en fonction de la concentration en aflatoxine de l'échantillon. Justifier la réponse.
- 2.4. Résultats :

- 2.4.1. Courbe d'étalonnage :  
Pour chacun des étalons, on détermine le pourcentage d'inhibition (% I) :

$$\% I = \frac{A (\text{témoin négatif}) - A (\text{étalon})}{A (\text{témoin négatif})}$$

Concentration des étalons $\mu\text{g}/\text{kg}$	0	0,5	1	2	5
Absorbance puits impairs	0,80	0,66	0,56	0,46	0,32
Absorbance puits pairs	0,80	0,65	0,55	0,44	0,32

- 2.4.1.1. Justifier le terme inhibition.

- 2.4.1.2. Les absorbances mesurées sont regroupées dans le tableau suivant :

Construire sur papier millimétré la courbe d'étalonnage :  
pourcentage d'inhibition = f (concentration en aflatoxine B1)

Echelles : 0,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  = 1 cm.  
5 % = 1 cm.

- 2.4.2. Extrait à doser :  
L'absorbance moyenne lue pour l'extrait testé est A = 0,60. En déduire la teneur en aflatoxine B1 de cet extrait.

- 2.5. Pourquoi n'est-il pas envisageable d'utiliser, pour le dosage d'aflatoxines, une méthode immunoenzymatique faisant appel à une plaque de microtitration sensibilisée par un anticorps ?

Donnée : document 1.

DOCUMENT N° 3

Dosage de l'aflatoxine B 1. Méthode opératoire.

Réactifs :

- Solutions étalons d'aflatoxine B1 prêtes à l'emploi :
  - solution à 0,5 µg/kg
  - solution à 1 µg/kg
  - solution à 2 µg/kg
  - solution à 5 µg/kg
- Témoin négatif
- Conjugué : anticorps monoclonal couplé à la peroxydase : prêt à l'emploi
- Tampon de lavage
- Substrat
- Chromogène
- Solution d'acide sulfurique
- Plaque de microtitration sensibilisée par l'aflatoxine B1 : 8 barettes de 12 puits

Mode opératoire :

Afin de réaliser le test dans les conditions optimales, il faut ramener les réactifs à température ambiante.

1 : Distribution des solutions étalons de l'extrait à doser  
Contrôle témoin négatif :

- déposer 50 µl de témoin négatif dans les puits A1, A2.

Etalons :

- déposer :
  - 50 µl de la solution étalon à 0,5 µg/kg dans les puits A3, A4,
  - 50 µl de la solution étalon à 1 µg/kg dans les puits A5, A6,
  - 50 µl de la solution étalon à 2 µg/kg dans les puits A7, A8,
  - 50 µl de la solution étalon à 5 µg/kg dans les puits A9, A10.

Extrait :

- déposer 50 µl de l'extrait à doser dans les puits A11, A12.

2 : Distribution du conjugué :

Déposer dans chaque puits 50 µl de la solution de conjugué.  
Laisser incubé 20 minutes à température ambiante.

3 : Lavage :

Laver chaque puits 4 fois avec 300 µl de solution de lavage.  
Retourner la plaque et la secouer sur un papier filtre.

4 : Révélation :

Distribuer : 50 µl de substrat puis  
50 µl de chromogène dans chaque puits.

Laisser incubé 20 minutes à température ambiante, puis ajouter 50 µl de solution d'acide sulfurique. Homogénéiser en tapotant légèrement la microplaque.

5 : Lecture :

Lire l'absorbance obtenue dans chaque puits à la longueur d'onde 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque de microtitration.

3 - Dosage par chromatographie d'immunoaffinité (I.A.C.) suivi du dosage par H.P.L.C. (28 points)

3.1. Extraction et purification des aflatoxines : (10 points)

3.1.1. Protocole d'extraction :

20 g d'échantillon préalablement broyé sont extraits par 60 cm<sup>3</sup> d'un mélange méthanol-eau (80v/20v). Après agitation de 2 minutes dans un homogénéiseur tournant à grande vitesse, l'extrait est filtré.

Au cours de cette étape, quelles seront les règles de sécurité particulières à respecter ?

3.1.2. Purification par chromatographie d'immunoaffinité :

L'immunopurification est effectuée à l'aide de colonnes prêtes à l'emploi. Leur utilisation nécessite une équilibration préalable avec l'éluant utilisé lors de la chromatographie.

On choisit d'équilibrer la colonne avec un tampon phosphate sodique PBS. Aussi est-il nécessaire de modifier la composition de l'extrait de façon à abaisser la teneur en méthanol à 5 % (v/v).

3.1.2.1. Combien faut-il ajouter de tampon PBS à 9 cm<sup>3</sup> d'extrait ?

3.1.2.2. Résumer par des schémas les différentes étapes de cette chromatographie d'immunoaffinité (les schémas seront légendés pour montrer les molécules mises en jeu au cours de la chromatographie).

3.2. Dosage par H.P.L.C. quantitative (18 points)

L'éluat obtenu contenant les aflatoxines a été dilué au cours de la purification ; une concentration de celui-ci est donc nécessaire.

3.2.1. Le dosage de l'extrait concentré est effectué par H.P.L.C.

3.2.1.1. La colonne utilisée est une "Lichrosorb RP 18". A l'aide du document n° 4, déterminer s'il s'agit d'une chromatographie en phase normale ou inverse. Justifier.

3.2.1.2. Le catalogue du fournisseur (document n° 4) propose trois qualités de "Lichrosorb RP 18". Dans un souci de précision du dosage, laquelle doit-on préférer ? Justifier.

3.2.1.3. En sortie de colonne, la détection utilisée est de type fluorimétrique. A quoi correspondent les longueurs d'onde  $\lambda_1$  et  $\lambda_2$  précisées sur le document 5 ?

3.2.2. Analyse qualitative du chromatogramme obtenu :

Le chromatogramme obtenu est présenté en annexe (document n° 5).

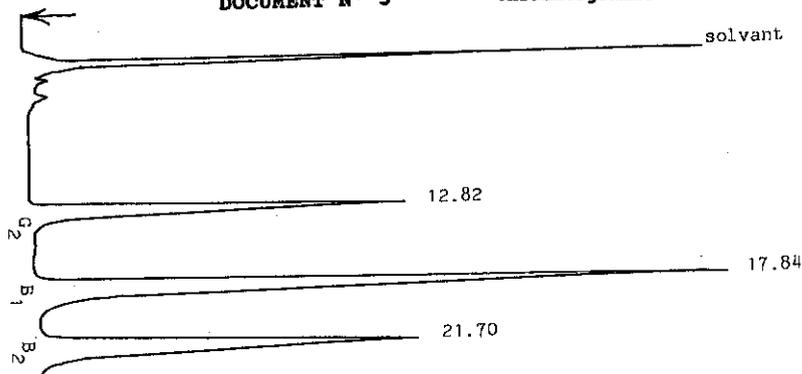
3.2.2.1. A quoi correspondent les valeurs attribuées à chaque pic ?

3.2.2.2. Peut-on considérer, en examinant ce chromatogramme, que la purification préalable par I.A.C. est une méthode efficace ? Justifier.

## LiChrosorb® – Supports analytiques irréguliers

- Support entièrement poreux.
- Particules de forme irrégulière.
- Domaine de granulométrie finement gradué de 5, 7, 10 ou 15 µm avec une répartition granulométrique particulièrement étroite.
- Reproductibilité adaptée à la routine, car production en lots importants de 100 kg environ.
- Gamme complète comprenant:
  - des dérivés polaires (Si 60, Si 100, Alex T),
  - des dérivés semi-polaires (CN, DIOL, NH<sub>2</sub>),
  - des dérivés apolaires (RP-8, RP-18, RP Select B).
- Recouvrement de surface contrôlé.

Article	Désignation	Granulométrie	Quantité	Prix FF HT
13967	LiChrosorb® CN	5 µm	10 g	1 035,00
13969	LiChrosorb® CN	7 µm	10 g	972,00
			100 g	8 185,00
13953	LiChrosorb® CN	10 µm	10 g	945,00
			100 g	7 902,00
9399	LiChrosorb® DIOL	5 µm	10 g	1 035,00
			100 g	8 700,00
13972	LiChrosorb® DIOL	7 µm	10 g	972,00
			100 g	8 185,00
9330	LiChrosorb® DIOL	10 µm	10 g	945,00
			100 g	7 902,00
9376	LiChrosorb® NH <sub>2</sub>	5 µm	10 g	1 035,00
			100 g	8 700,00
13971	LiChrosorb® NH <sub>2</sub>	7 µm	10 g	972,00
			100 g	8 185,00
9331	LiChrosorb® NH <sub>2</sub>	10 µm	10 g	945,00
			100 g	7 902,00
9332	LiChrosorb® RP-8	5 µm	10 g	1 035,00
			100 g	8 700,00
9341	LiChrosorb® RP-8	7 µm	10 g	972,00
			100 g	8 185,00
9318	LiChrosorb® RP-8	10 µm	10 g	945,00
			100 g	7 902,00
9333	LiChrosorb® RP-18	5 µm	10 g	1 035,00
			100 g	8 700,00
9394	LiChrosorb® RP-18	7 µm	10 g	972,00
			100 g	8 185,00
9334	LiChrosorb® RP-18	10 µm	10 g	945,00
			100 g	7 902,00
19634	LiChrosorb® RP Select B	10 µm	10 g	1 024,00
			100 g	8 700,00



- Colonne Lichrosorb RP 18 : 250 x 4 mm Merck
- Phase mobile : eau-méthanol, acétonitrile (60-22-18)
- Débit : 0,7 ml/min
- Dérivation post-colonne par l'iode en solution saturée, débit d'iode 0,4 ml/min, réaction à 60°C dans un tube Téflon de 4 000 x 0,5 mm
- Détection fluorimétrique :  $\lambda_1 = 330 \text{ nm}$  ;  $\lambda_2 = 430 \text{ nm}$ .

### 3.2.3. Analyse quantitative.

On se propose de doser l'aflatoxine B1. Dans un souci de précision des résultats, on effectue un étalonnage interne.

L'analyse qualitative précédente du chromatogramme n'ayant pas révélé la présence d'aflatoxine G1 dans l'extrait purifié, l'étalon interne choisi est donc l'aflatoxine G1.

On dispose

- de l'extrait purifié,
- d'une solution étalon d'aflatoxine G1 de concentration égale à  $4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ,
- d'une solution étalon d'aflatoxine B1 de concentration égale à  $6 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

#### Première injection :

On mélange exactement 500  $\mu\text{l}$  de la solution étalon d'aflatoxine G1 avec 500  $\mu\text{l}$  de la solution étalon d'aflatoxine B1. On injecte ce mélange ; l'intégrateur donne les résultats suivants :

aire du pic correspondant à l'aflatoxine B1 = 101651  
aire du pic correspondant à l'aflatoxine G1 = 153317

#### Seconde injection :

On mélange exactement 500  $\mu\text{l}$  de la solution étalon d'aflatoxine G1 avec 500  $\mu\text{l}$  de la solution d'extrait purifié. On injecte ce mélange ; l'intégrateur donne les résultats suivants :

aire du pic correspondant à l'aflatoxine B1 = 34982  
aire du pic correspondant à l'aflatoxine G1 = 164804

A partir de ces résultats, déterminer la concentration de l'extrait purifié en aflatoxine B1.



2.1. Préciser le rôle des constituants du milieu de Wikerham modifié et justifier son utilisation à l'aide du document n° 7.

2.2. Comparer l'action du D.O.N. et du D.A.S. sur la fermentation alcoolique en analysant le document n° 8.

**DOCUMENT N° 7**

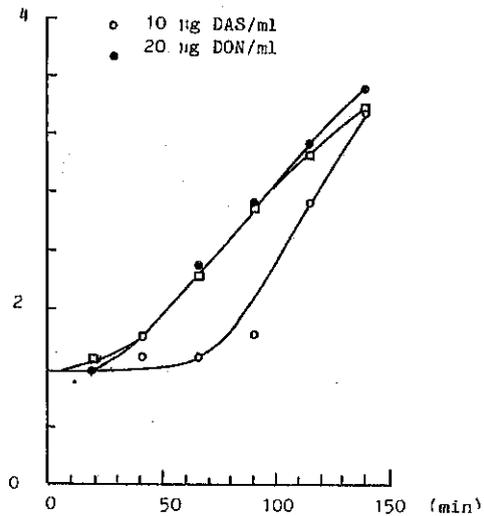
Formula Ingredients per Liter	Bacto Yeast Nitrogen Base
Ammonium Sulfate	5 g
Bacto-Asparagine	None
Bacto-Dextrose	None
l-Histidine Monohydrochloride	10 mg
dl-Methionine	20 mg
dl-Tryptophane	20 mg
Biotin	2 mcg
Calcium Pantothenate	400 mcg
Folic Acid	2 mcg
Inositol	2 000 mcg
Niacin	400 mcg
p-Aminobenzoic Acid, Difco	200 mcg
Pyridoxine Hydrochloride	400 mcg
Riboflavin	200 mcg
Thiamine Hydrochloride	400 mcg
Boric Acid	500 mcg
Copper Sulfate	40 mcg
Potassium Iodide	100 mcg
Ferric Chloride	200 mcg
Manganese Sulfate	400 mcg
Sodium Molybdate	200 mcg
Zinc Sulfate	400 mcg
Potassium Phosphate Monobasic	1 g
Magnesium Sulfate	0,5 g
Sodium Chloride	0,1 g
Calcium Chloride	0,1 g
Bactor-Agar	None
Amount of final medium from 100 grams dehydrated medium	14.9 liters

Milieu de Wikerham modifié.

1 mcg = 10<sup>-5</sup> g

DOCUMENT N° 8

- Control
- 10 µg DAS/ml
- 20 µg DON/ml



Effect of DON and DAS on production of ethanol from glucose-amended Wickerham medium (Initial ethanol concentration 1.0 %).

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**deuxième partie : réalisation pratique d'opérations**  
**techniques                   Sujet 1**  
**Durée 9,5 heures           coefficient 8**

**Biochimie 5 heures (80 points, 4 h 30)**

Afin de mieux maîtriser et d'améliorer la fabrication de la bière, un certain nombre de paramètres biochimiques peuvent être mesurés, au cours de la fabrication.

Note : l'ordre des opérations sera indiqué aux candidats en début de séance.

**I - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ALPHA-AMYLASE DANS UN EXTRAIT DE MALT**

**I.1. Obtention de l'extrait enzymatique.**

On pèse une masse de 2,00 g ± 0,01 g de mouture de malt qu'on introduit dans une fiole d'Erlenmeyer ; la mise en solution est réalisée à l'aide d'une solution de chlorure de sodium à 5 g.dm<sup>-3</sup>. Le récipient est porté à une température de 20°C ; on laisse l'extraction se poursuivre pendant 60 minutes. On ajuste le volume à 100 cm<sup>3</sup> avec la solution de chlorure de sodium précédente. On filtre ; on obtient l'extrait E1. On dilue E1 100 fois ; on obtient l'extrait E2 (fourni au candidat), sur lequel se fera la détermination de l'activité amylasique.

**I.2. Principe de la détermination de l'activité enzymatique de l'alpha-amylase.**

**I.2.1.** L'alpha-amylase est une endoglycosidase qui coupe les liaisons Glc α 1 → 4 Glc en donnant différents oligomères du glucose, du maltose, des dextrines limites.

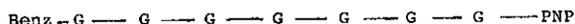
Elle ne clive pas les liaisons Glc α 1 → 6 Glc ; elle ne produit pas de glucose libre.

**I.2.2.** Le substrat utilisé est un substrat synthétique :

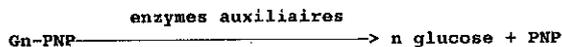
**Benz-G7-PNP**

C'est un dérivé du maltoheptaoside (G7), dont l'extrémité non réductrice est protégée de l'action des exoenzymes par un groupement benzylidène (Benz) et dont l'autre extrémité est liée à une molécule de PNP.

**Schéma :**



Les différentes réactions se déroulant sont :



n = 2 à 5

Les enzymes auxiliaires sont : glucoamylase et α-glucosidase  
 L'activité de l'amylase sera donc évaluée en mesurant la vitesse d'apparition du PNP.

### I.3. Technique

#### A) Réactifs.

1. Extrait E2.
2. Réactif 1 = R1 (tampon pH 7,15 + ions)
3. Réactif 2 = R2 (substrat-enzymes auxiliaires)
4. Solution enzymatique de validation.

#### B) Mode opératoire. (1 essai)

1. Préparation du réactif de travail : reprendre le contenu d'un flacon R2 par  $2 \text{ cm}^3$  de R1. Stabilité : un jour à 20-25°C.
2. Conditions de mesure :
  - température = 30°C
  - longueur d'onde = 405 nm
  - trajet optique = 1 cm.Lire contre de l'eau distillée.
3. Dans le flacon R2 repris, introduire 100  $\mu\text{l}$  de la solution enzymatique E2 à  $t = 0$ . Mélanger, transférer dans une cuve, mettre en place dans le spectrophotomètre thermostaté. Commencer les mesures à  $t_1 = 2$  minutes (début de cinétique linéaire). Enregistrer la variation d'absorbance pendant 3 minutes (ou lire toutes les 30 secondes).

Notes : (1) La salive contenant une amylase, il faut utiliser soit :

- des pipettes de verre cotonnées,
- des pipettes automatiques.

(2) Si la variation d'absorbance par minute est supérieure ou égale à 0,17, il faut diluer avec une solution de chlorure de sodium à  $9 \text{ g.dm}^{-3}$ .

4. On fera un essai identique sur une solution enzymatique calibrée (validation) de concentration catalytique connue.

## II - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES GLUCIDES DANS UN MOÛT

- II.1. Les moûts contiennent environ 12 à 15 g de glucides réducteurs pour  $100 \text{ cm}^3$ . Ces glucides proviennent de l'action des amylases, mais peuvent aussi avoir été ajoutés après le brassage. La solution à analyser et à doser (moût dilué) a été diluée au préalable au 1/10.
- II.2. L'analyse de la composition qualitative sera réalisée par mini-CCM. (2 plaques par candidat)

#### A) Réactifs.

1. Solvant de chromatographie :
  - méthyléthylcétone : 3 vol.
  - acide acétique : 1 vol.
  - méthanol : 1 vol.
2. Solution témoins de glucides à  $2 \text{ g.dm}^{-3}$  : glucose, maltose, saccharose, fructose, maltotriose.
3. Moût dilué à analyser étiqueté A.
4. Révélateur :
  - \* mélange extemporané d'aniline et de diphénylamine en milieu acide phosphorique, fourni prêt à l'emploi
  - \* ou réactif au thymol.

### B) Mode opératoire.

1. Réactiver les couches minces par passage à l'étuve à 100°C.
2. Réaliser 2 dépôts successifs de chaque solution, à l'aide de capillaires. Sécher.
3. Placer les couches minces dans les béciers de 400 cm<sup>3</sup> préalablement saturés en vapeur de solvant. Laisser migrer. Laisser sécher.
4. A l'aide d'un pinceau, passer une couche de révélateur sur le chromatogramme (ou pulvériser).
5. Mettre à l'étuve à 105°C ; surveiller la révélation (quelques minutes).

### II.3. Dosage du glucose dans le moût par la méthode à la glucose-oxydase (Méthode de TRINDER).

#### A) Réactifs.

1. Glucose, solide, pur.
2. Réactif de travail délivré prêt à l'emploi contenant :
  - les enzymes GOD, POD,
  - le tampon,
  - le "chromogène".
3. Le moût dilué à doser étiqueté B.
4. Solution glucosée de contrôle.

#### B) Mode opératoire.

1. Préparer un étalon-glucose de concentration exactement connue et voisine de 1g.dm<sup>-3</sup>.
2. Protocole d'un essai (semi-microcuve) :
  - étalon ou échantillon 10 μl
  - réactif de travail 1 cm<sup>3</sup>Incuber : 20 min à 20-25°C.  
Lire l'absorbance à 505 nm contre un "blanc-réactif".  
(2 essais sur le moût B après dilution éventuelle).  
Note : limite de linéarité 4g.dm<sup>-3</sup>.
3. Valider la méthode à l'aide d'une solution glucosée de contrôle (1 essai) ; (titre fourni au candidat).

### COMPTE RENDU

## I - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ALPHA-AMYLASE DANS UN EXTRAIT DE MALT.

1. Présenter les enregistrements obtenus pour l'extrait E2 et pour la solution enzymatique de validation, après les avoir annotés, ou tracer sur papier millimétré les courbes A(405 nm) = f(temps) pour les différents essais.
2. Déterminer la concentration catalytique (CAT.CONC.) en U.dm<sup>-3</sup> :
  - pour la solution enzymatique de validation. Evaluer le pourcentage d'inexactitude de la méthode.
  - pour l'extrait E2.

#### Données :

- (1) Une unité U correspond à la quantité d'enzyme qui produit 1 μmol de PNP par minute.
  - (2) Pour ce calcul, on prendra  $\xi$  (PNP à pH 7,15) = 10<sup>4</sup>dm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.
3. Calculer l'activité de l'alpha-amylase en U. par mg de malt.

## II - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES GLUCIDES DANS UN MOÛT.

### II.1. Analyse de la composition qualitative par mini-CCM.

1. Coller le chromatogramme, convenablement annoté, sur la feuille distribuée à cet effet.
2. Déterminer la composition qualitative du moût en glucides.

- II.2. Dosage du glucose dans le moût par la méthode à la glucose-oxydase (Méthode de TRINDER).
1. Calculer la concentration massique en glucose de la solution étalon.
  2. Calculer les concentrations massiques en glucose de la solution glucosée de contrôle et du moût.
  3. Evaluer le pourcentage d'inexactitude de la méthode.

## Microbiologie Biologie cellulaire et moléculaire (80 points, 4 h 30)

### 1<sup>o</sup> jour

La chronologie des manipulations sera indiquée aux candidats en début d'épreuve.  
**MICROBIOLOGIE** (55 points)

La microbiologie des boissons alcoolisées porte essentiellement :

- sur les processus microbiens de fabrication,
- sur les altérations de qualité dues à des germes banaux.

La présente étude se propose d'aborder ces deux aspects à partir de la bière.

Les altérations peuvent intervenir à divers niveaux de la fabrication :

- contamination du malt broyé et humidifié,
- développement de moisissures, de levures "sauvages" et de bactéries en surface du moût.

Un contrôle des circuits de fabrication et des conditionnements vides est particulièrement important dans le cadre des industries brassicoles : de nombreuses contaminations causant des accidents de fabrication sont provoquées et entretenues par le matériel ou les appareils qui peuvent se comporter comme des "nids" microbiens.

#### **I - CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DU PROCESSUS FERMENTAIRE**

Le moût M a été ensemencé par environ 15 millions de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* par  $\text{cm}^3$ . La population maximum en fin de croissance est de l'ordre de 60 millions de cellules par  $\text{cm}^3$ .

- I-1. Vérifier les caractères morphologiques de la souche.
- I-2. Rechercher par examen microscopique les éventuels contaminants du moût.
- I-3. Effectuer la numération des levures par un comptage hématimétrique et déterminer la population des cellules mortes et vivantes par une coloration au bleu Trypan.  
Préciser, sur le compte rendu, les observations ou résultats.  
Interpréter éventuellement et conclure.

#### **II - CONTROLE DU PRODUIT FINI**

- II-1. Contrôle de stérilité d'un récipient prélevé sur une chaîne d'embouteillage

Une étude récente, réalisée sur un lot de bouteilles vides, a révélé la présence de bactéries coliformes et a conduit l'usine à modifier son procédé de nettoyage des emballages.

Afin de contrôler l'efficacité du traitement de décontamination, une bouteille prélevée sur la chaîne d'embouteillage est rincée à l'aide d'un volume connu d'eau physiologique stérile additionnée de 0,05 % de Tween 80.

Le liquide de rinçage est récolté dans une fiole d'Erlenmeyer E : volume total 50 cm<sup>3</sup>. Contrôler l'efficacité du traitement de décontamination par la technique de filtration sur membrane.

#### Remarques :

1. La technique sera réalisée en présence d'un examinateur.
2. Deux filtrations seront effectuées :
  - un essai sur V1 = 20 cm<sup>3</sup> et incubation du milieu à 37°C
  - un essai sur V2 = 20 cm<sup>3</sup> et incubation du milieu à 44°C.

#### II.2. Identification d'un coliforme C présenté sur gélose nutritive inclinée.

Procéder à la détermination de l'espace sur galerie miniaturisée.

### III - IDENTIFICATION D'UN MICROORGANISME CONTAMINANT, ISOLE A LA SURFACE DU MOUT

Le contaminant a été isolé sur gélose Sabouraud-Chloramphénicol et incubé durant 4 jours à 28°C : boîte A.

Identifier ce contaminant.

Conclure.

On désire étudier l'effet de l'ingestion de bière sur la production de prolactine.

La mesure du taux de prolactine est effectuée par une méthode immunoenzymatique.

#### Manipulation :

Réaliser le titrage d'un sérum S (2 essais) en utilisant le protocole joint en annexe (Biotrol - Tandem E prolactine)

#### Compte rendu :

- Présenter les valeurs d'absorbance mesurées sous forme de tableau.
- Exprimer les résultats obtenus en ng.cm<sup>-3</sup> et les commenter.

## 2° jour

MICROBIOLOGIE

### CONTROLE DU RECIPIENT D'EMBOUTEILLAGE

- Dénombrement des coliformes à 37°C et 44°C.
- Identification de la souche C.
- Conclusions.

# TANDEM® E PROLACTINE

## présentation

**B 01303**  
Tandem E Prolactine  
100 déterminations

## principe

Le sérum est mis simultanément en contact avec :

- un anticorps monoclonal, marqué à la phosphatase alcaline (conjugué PAL), dirigé contre un premier site antigénique de la molécule de prolactine.
- une bille recouverte d'un anticorps monoclonal dirigé contre un second site de la molécule (différent du premier site).

Après la formation du complexe bille-prolactine-conjugué PAL, un lavage élimine l'excès de conjugué PAL.

L'activité enzymatique restant liée à la bille est proportionnelle à la quantité de prolactine introduite dans le tube.

## réactifs

### Composition :

E<sub>0</sub> : 4 ml sérum négatif.

E : 2 ml étalon (La valeur exacte de l'étalon E est indiquée sur l'étiquette du flacon).

C<sub>1</sub> : 2 ml contrôle positif à environ 20 ng/ml.

C<sub>2</sub> : 2 ml contrôle positif à environ 150 ng/ml.

1 : 100 billes recouvertes d'un anticorps monoclonal anti prolactine.

2 : 20 ml conjugué PAL : anticorps monoclonal anti prolactine lié à la Phosphatase alcaline.

3 : 20 ml solution de lavage concentrée.

4<sub>a</sub> : substrat 3 ml  
P. nitro phényl phosphata).

4<sub>b</sub> : diluant pour substrat. 30 ml

5 : 250 ml solution de blocage (EDTA).

### Préparation

Réactif 3 : à diluer dans 2000 ml d'eau distillée.

Réactif 4 : Mélanger dans un tube à hémolyse

réactif 4<sub>a</sub> ..... 1 volume  
réactif 4<sub>b</sub> ..... 10 volumes

L'étalon E et les contrôles C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> sont à reconstituer avec chacun 2 ml d'eau distillée.

## mode opératoire

1 Dans 3 tubes à hémolyse, introduire, dans l'ordre :

	Témoin	Étalon	Dosage
Réactif 1 .....	1 bille	1 bille	1 bille
Sérum négatif .....	25 µl	-	-
Étalon .....	-	25 µl	-
Échantillon .....	-	-	25 µl

Agiter énergiquement le portoir.

Réactif 2 .....	200 µl	200 µl	200 µl
-----------------	--------	--------	--------

Laisser incuber 2 heures en agitation continue \* à température ambiante.

2 Laver très soigneusement les billes et les parois des tubes avec environ 4 ml de solution de lavage.  
Effectuer 3 fois cette opération.

3 Ajouter dans chaque tube :

Réactif 4 .....	200 µl	200 µl	200 µl
-----------------	--------	--------	--------

Incuber 30 minutes au bain-marie à 37°C.

4 Ajouter :

Réactif 5 .....	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
-----------------	--------	--------	--------

Lire à 405 nm les D.O. du dosage et de l'étalon contre le témoin.  
La coloration est stable au moins 30 minutes.

Remarques : • Il est recommandé de faire les dosages en double.

- Le coffret contient 2 sérums positifs (C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>) qui peuvent servir de contrôle de reproductibilité intersérie.

\* Utiliser un agitateur horizontal (V = 170 t/nm).

## Conservation

A 2-8°C jusqu'à la date de péremption.

Le réactif 3 dilué se conserve jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. L'étalon E et les contrôles C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> reconstitués se conservent 2 mois à +4°C.

Le réactif 4 reconstitué se conserve 7 jours à 2-8°C.

## prélèvement

Sérum ou plasma hépariné.  
(EDTA ne doit pas être utilisé).

## résultats

Les densités optiques obtenues sont proportionnelles aux concentrations : un seul point d'étalonage suffit.

Concentration =  $\frac{D.O. \text{ dosage}}{D.O. \text{ étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon}$

Minimum détectable : 1,5 ng/ml

Pour les taux supérieures à 150 ng/ml recommencer le dosage sur une dilution appropriée de l'échantillon dans l'étalon zéro. Multiplier le résultat par le facteur de dilution appliqué.

## valeurs usuelles

La prolactine a été déterminée chez 281 personnes. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

	Moyenne géométr. (ng/ml)	Intervalle à 97,5 %	Nombre d'observations
Femmes	5,01	2,3 - 17,2	163
Hommes	6,62	1,5 - 16,2	128
TOTAL	6,34	1,5 - 17,2	281

## Spécificité :

Aucune réaction croisée n'a pu être détectée avec les hormones suivantes : LH, FSH, TSH, GH, hPL.

## bibliographie

Frantz A.G., Physiology in Medicine: Prolactin. MEJM 198;201, 1978.  
Antunes J.L., Housepian E.M., Frantz A.G., Holub D.A., Hui R.M., Carmel P.W., and Quest, D.O. Prolactin-secreting Pituitary Tumors. Ann Neurol. 2:148, 1977.  
Bard J.A. and Bhatnagar A.S., Serum Prolactin Levels in Galactorrhea. Ann. J. Obstet. Gynecol. 123:41, 1976.

Procédé déposé par

**Hybritech**  
LABORATORIES

Liège 1 Belgium

**Biobtrol**

1, rue du Foin, 75140 PARIS Cedex 03  
Tél. (1) 42.77.81.10 - Téléc. 670736  
COMMANDES CLIENTS : Tél. (1) 34.72.67.22  
Télex 697659

Laboratoires BIOTROL  
S.A. Capital 4.930.500 F  
R.C. PARIS 6 57202280 F

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**deuxième partie : réalisation pratique d'opérations**  
**techniques      Sujet 2**  
**Durée 10 heures      coefficient 8**

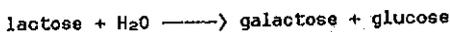
**Biochimie 5 heures (85 points, 5 h)**

Le lait et les produits laitiers sont des éléments importants de l'alimentation humaine.

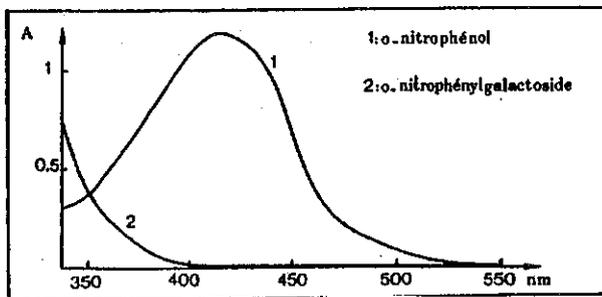
La  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, E.C 3.2.1.23, lactase) est une enzyme utilisée dans l'industrie laitière pour transformer le lactose, assez peu digeste, peu soluble et de goût peu sucré en un mélange de sucres plus intéressants sur les plans gustatif et nutritif. L'une des voies prometteuses en industrie agro-alimentaire est l'emploi d'enzymes immobilisées.

La manipulation se propose de comparer les paramètres cinétiques de l'enzyme immobilisée (activité spécifique, constante de MICHAELIS) à ceux de l'enzyme soluble. La connaissance de ces paramètres est, en effet, fondamentale dans la modélisation de l'activité enzymatique.

La réaction catalysée par la  $\beta$ -galactosidase est la suivante :



Le substrat utilisé ici est un substrat synthétique : l'ortho-nitrophényl  $\beta$ -D-galactoside (ONPG). Son hydrolyse permet d'obtenir de l'ortho-nitrophénol (ONP). Un suivi spectrophotométrique de la réaction enzymatique est aisé, dans la mesure où l'ONPG et l'ONP possèdent des spectres d'absorption différentiels. (Voir ci-dessous).



La longueur d'onde choisie est de 410 nm ; l'ONPG n'absorbe pas ou peu et l'ONP a un coefficient d'absorption molaire de 3300 l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

**1 - DOSAGE DES PROTEINES DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE (technique de LOWRY). (30 points)**

Le réactif de FOLIN-CIOCALTEU (phosphotungstomolybdique) utilisé pour doser les phénols donne une coloration bleue avec la plupart des protéines. Cette méthode permet de doser les protéines dans les milieux dilués.

**1.1. Réactifs.**

- solution de sérumalbumine bovine (BSA) à 0,2 g.l<sup>-1</sup>
- réactif A de LOWRY : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2 % dans NaOH 0,1 mol.l<sup>-1</sup>
- réactif B de LOWRY : mélange CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O à 5 g.l<sup>-1</sup> et tartrate Na-K à 10 g.l<sup>-1</sup>
- réactif C de LOWRY : mélange extemporané des réactifs A et B dans un rapport de 1 volume de B pour 50 volumes de A.
- réactif de FOLIN dilué au 1/2.

### 1.2. Matériel.

- Les prises d'essai de la solution de BSA, de la solution enzymatique diluée, ainsi que la dilution de la solution enzymatique sont à réaliser à la pipette manuelle.
- Les volumes de réactif C de LOWRY et de réactif de FOLIN sont respectivement délivrés au distributeur et à la pipette automatiques.

### 1.3. Etalonnage.

- Dans 5 tubes à essais, introduire la solution de BSA à raison de 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 ml.
- Compléter à 1 ml avec de l'eau distillée.
- Ajouter 5 ml de réactif C prêt à l'emploi.
- Mélanger le contenu des tubes et laisser au repos pendant 10 minutes. Ajouter rapidement 0,5 ml de réactif de FOLIN dilué au 1/2 et mélanger.
- Laisser 30 minutes à l'obscurité et lire l'absorbance à 650 nm.

### 1.4. Dosage.

- Procéder comme pour l'étalonnage à partir de 1 ml de solution enzymatique diluée au 1/5. Deux essais sont demandés.

### 1.5. Résultats.

- Tracer la courbe absorbance = f (mg de BSA).
- Déterminer la concentration en protéines de l'extrait enzymatique.

## 2 - DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ENZYME SOLUBLE. (40 points)

On détermine la vitesse initiale par une méthode en 2 points en présence de différentes concentrations en substrat.

### 2.1. Réactifs.

- tampon phosphate de sodium 100 mmol.l<sup>-1</sup>, pH 7,2, contenant MgSO<sub>4</sub> 1 mmol.l<sup>-1</sup>
- substrat : ONPG 20 mmol.l<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate pH 7,2
- enzyme
- Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 1 mol.l<sup>-1</sup> pour bloquer la réaction.

### 2.2. Matériel.

- pipettes automatiques de 100 et 1000  $\mu$ l
- pipette graduée de 2 ml

### 2.3. Mesure de la vitesse initiale.

- Dans 6 tubes à essais, introduire la solution de substrat à raison de 0,01 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 et 0,3 ml.
- Compléter à 0,9 ml avec le tampon phosphate pH 7,2.
- Mettre les tubes au bain thermostaté à 30°C et laisser la température se stabiliser pendant 5 minutes.
- Déclencher la réaction en ajoutant 0,1 ml d'enzyme.
- Après exactement 3 minutes de réaction, arrêter cette réaction par addition de 2 ml de solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
- Lire l'absorbance à 410 nm contre un témoin convenablement réalisé à partir de 0,1 ml de solution de substrat (la réalisation d'un témoin pour chaque dilution de substrat ne se justifiant pas dans ce cas).

### 2.4. Résultats.

- Déterminer Km en mol.l<sup>-1</sup> et V<sub>MAX</sub> en U par ml d'enzyme.
- En déduire l'activité spécifique de l'enzyme soluble.

Donnée : 1 unité (U) correspond à la quantité d'enzyme qui produit une micromole d'ONP par minute.

### 3 - DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ENZYME IMMOBILISEE. (15 points)

L'enzyme est piégée dans la gélatine, une réticulation étant réalisée à l'aide de glutaraldéhyde.

L'activité de l'enzyme immobilisée est réalisée dans des conditions identiques à celles du paragraphe 2.3.

#### 3.1. Réactifs.

- gélatine à 5 % dans le tampon et maintenue à 45°C
- glutaraldéhyde à 1 % dans le tampon (manipuler avec des gants ; **DANGER**)
- réactifs nécessaires à la détermination de l'activité enzymatique. (voir paragraphe 2.1.).

#### 3.2. Immobilisation.

- Introduire successivement dans 6 fioles à usage unique 0,4 ml de solution enzymatique, 1 ml de gélatine et 0,5 ml de glutaraldéhyde (à la pipette automatique). Agiter doucement de manière à éviter la formation de bulles d'air.
- Placer les fioles à 4°C pendant 10 minutes, puis les remettre 15 minutes à la température du laboratoire.
- Rincer soigneusement la surface du gel et les parois de la fiole avec 2 fois 5 ml de tampon. Egoutter les fioles.
- Placer les fioles au bain thermostaté à 30°C et attendre 5 minutes.

#### 3.3. Mesure de la vitesse initiale.

- Introduire respectivement 1 ; 0,9 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 et 0 ml de tampon.
- Laisser les fioles à 30°C pendant 5 minutes.
- Démarrer ensuite les cinétiques enzymatiques en ajoutant le substrat dans les fioles à raison de 0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 ml. La durée de réaction est exactement de 3 minutes. L'arrêt de la réaction s'effectue à l'aide de 2 ml de solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
- Transvaser le surnageant des fioles dans des tubes à hémolyse. En cas d'apparition d'un trouble ou de particules en suspension, filtrer.
- Lire l'absorbance à 410 nm.

#### 3.4. Résultats.

- Déterminer  $K_m$  observé (ou  $K_{50}$ ) en  $\text{mol.l}^{-1}$  et l'activité spécifique de l'enzyme immobilisée (dans les calculs, on ne tiendra pas compte du volume de la phase solide).
- Comparer les paramètres cinétiques de l'enzyme soluble et de l'enzyme immobilisée.

## Microbiologie (75 points, 3,5 h)

### Le lait : contrôle bactériologique et transformation industrielle

#### 1° jour

Le tableau des normes ci-dessous rassemble pour chaque type de lait les différentes analyses légalement réalisées. Sauf précision contraire, les normes sont données pour un volume de lait de 1  $\text{cm}^3$ .

Normes pour 1 cm <sup>3</sup>	LAIT CRU		LAIT PASTEURISÉ CONDITIONNÉ	
	au jour de conditionnement	à date limite de consommation	4 jours après conditionnement	à date limite de consommation
Micro organismes aérobies à 30° C	90 000	300 000	30 000	—
Coliformes 30° C	—	—	10	100
Coliformes fécaux			absence dans 250 cm <sup>3</sup>	absence dans 250 cm <sup>3</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	Absence dans 250 cm <sup>3</sup>	Absence dans 250 cm <sup>3</sup>
<i>Salmonella</i>	absence dans 1 000 cm <sup>3</sup>	absence dans 1000 cm <sup>3</sup>	absence dans 250 cm <sup>3</sup>	absence dans 250 cm <sup>3</sup>
<i>Streptococcus - β - hémolytique</i> dans 0,1 cm <sup>3</sup>	absence	absence		
Phosphatase	—	—	négative	négative
Peroxydase	—	—	positive	positive
Stabilité à rébullition	—	stable	—	stable
Acidité (mmol/dm <sup>3</sup> )		15,5 à 19,5		15,5 à 19,5
Nombre de cellules somatiques inférieur à :	400 000	400 000		

Le contrôle complet ne sera pas réalisé et le tableau ci-dessus précise surtout le cadre dans lequel s'inscrivent les travaux ci-après.

### 1 - RECHERCHE ET DENOMBREMENT DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DANS UN LAIT PASTEURISÉ. (20 points) MANIPULATION.

Deux laits pasteurisés conditionnés notés A et B sont analysés. A partir de chaque lait ont été réalisés les ensemencements suivants :

- 0,1 ml de lait étalé sur BAIRD-PARKER,
- 10 ml de lait inoculé en bouillon CHAPMAN double concentration,
- 1 ml de lait inoculé en bouillon CHAPMAN simple concentration.

A partir de ces milieux incubés 24 h à 37°C, poursuivre les analyses.

#### Remarques :

- L'identification des colonies suspectes sera réalisée à l'aide d'une technique rapide sur lame proposée en début d'épreuve.

- Parmi les colonies testées, déterminer celles identifiées comme *Staphylococcus aureus*.

- Rapporter le résultat en nombre de *Staphylococcus aureus* par ml de lait.  
- Conclure.

### 2 - IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXIGÈNES DANS UN LAIT CRU. (35 points)

Le protocole officiel (J.O. du 19.01.80) indique qu'il faut soumettre aux tests de la coagulase et de la thermonucléase les colonies suspectes sur BAIRD-PARKER avant de conclure à la présence de *Staphylococcus aureus*.

En effet, seules les souches entérotoxigènes intéressent le contrôle alimentaire et une relation semble exister entre la présence d'une thermonucléase et la production d'entérotoxine.

Une étude systématique des souches isolées à partir de lait pasteurisé et identifiées comme *Staphylococcus aureus* grâce aux caractères coagulase ⊕ et thermonucléase ⊕ a été entreprise afin de préciser la relation "présence d'une thermonucléase - production d'entérotoxine".

## 2.1. Recherche de la thermonucléase.

Cette recherche sera réalisée sur une souche de *Staphylococcus aureus* présentée en bouillon coeur-cerveau incubé 24 h à 37°C.

La technique officielle (incubation de 4 h à 37°C de la gélose ADN - bleu de toluidine) étant irréalisable dans le temps imparti à l'épreuve, on incubera 24 h à 37°C.

### MANIPULATION.

- Découper dans la gélose ADN - bleu de toluidine 4 cupules selon les indications données en début d'épreuve.
- Introduire dans un tube stérile une fraction de culture de *Staphylococcus aureus*.
- Porter ce prélèvement 15 minutes au bain-marie à 100°C.
- Remplir une cupule avec la culture chauffée.
- Remplir une autre cupule avec la culture non chauffée.
- Pratiquer de la même façon avec la culture témoin (la souche témoin possède une DNase thermosensible).
- Incuber la gélose ADN - bleu de toluidine 24 h à 37°C.

## 2.2. Recherche des entérotoxines staphylococciques A, B, C et D, par agglutination passive réverse de particules de latex.

A partir d'une fraction de la culture de *Staphylococcus aureus* précédente qui a été filtrée sur membrane de 0,22  $\mu$ m, réaliser la recherche des entérotoxines selon le mode opératoire ci-après.

### 2.2.1. Matériel et réactifs.

- plaque de microtitration en V et couvercle,
- pipette de 25  $\mu$ l,
- suspensions de latex sensibilisé par des Ig de lapin anti-entérotoxine A, B, C et D,
- entérotoxines A, B, C, D,
- diluant : PBS.

### 2.2.2. Mode opératoire.

Remarque préliminaire : bien mélanger les réactifs au latex avant utilisation pour obtenir une suspension homogène.

L'échantillon de filtrat de culture de *Staphylococcus aureus* nécessite l'utilisation de 5 rangées de 8 puits de la plaque de microtitration plus une rangée pour les contrôles positifs.

- Répartir 25  $\mu$ l de diluant dans les 8 puits de chacune des 5 rangées
- Ajouter 25  $\mu$ l de filtrat de culture dans le premier puits de chacune des 5 rangées et effectuer des dilutions successives sous un volume de 25  $\mu$ l, à l'exception du dernier puits qui ne doit contenir que du diluant.
- Dans la 6<sup>ème</sup> rangée introduire :
  - \* 25  $\mu$ l d'entérotoxine staphylococcique A dans le 1<sup>er</sup> puits,
  - \* 25  $\mu$ l d'entérotoxine staphylococcique B dans le 2<sup>ème</sup> puits,
  - \* 25  $\mu$ l d'entérotoxine staphylococcique C dans le 3<sup>ème</sup> puits,
  - \* 25  $\mu$ l d'entérotoxine staphylococcique D dans le 4<sup>ème</sup> puits.
- Ajouter, ensuite :
  - \* 25  $\mu$ l de latex anti-entérotoxine A dans les 8 puits de la 1<sup>ère</sup> rangée et dans le 1<sup>er</sup> puits de la 6<sup>ème</sup> rangée,
  - \* 25  $\mu$ l de latex anti-entérotoxine B dans les 8 puits de la 2<sup>ème</sup> rangée et dans le 2<sup>ème</sup> puits de la 6<sup>ème</sup> rangée,
  - \* 25  $\mu$ l de latex anti-entérotoxine C dans les 8 puits de la 3<sup>ème</sup> rangée et dans le 3<sup>ème</sup> puits de la 6<sup>ème</sup> rangée,
  - \* 25  $\mu$ l de latex anti-entérotoxine D dans les 8 puits de la 4<sup>ème</sup> rangée et dans le 4<sup>ème</sup> puits de la 6<sup>ème</sup> rangée,

- Mélanger le contenu de chaque puits par rotation de la plaque à la main en évitant les débordements.
- Recouvrir la plaque d'un couvercle et incuber 20 à 24h à la température ambiante à l'abri de toute vibration.

### 3 - RECHERCHE DES ENTEROBACTERIES ET DES COLIFORMES COMME INDICATEURS DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DU LAIT CRU. (20 points)

La recherche des coliformes comme indicateurs de la qualité microbiologique d'un aliment est discutable pour 3 raisons :

- les coliformes constituent un groupe mal défini et le nombre de coliformes varie selon les techniques de dénombrement employées,
- les populations de bactéries lactose ⊕ (coliformes) peuvent être dominées par des bactéries lactose ⊖.

Le rapport  $\xi_c = \frac{\text{UFC/ml Enterobacteriaceae}}{\text{UFC/ml coliformes}}$  est variable et dépend de l'écologie microbienne de l'aliment, (UFC = unité formant colonie)

- la plupart des entérobactéries pathogènes sont lactose ⊖, alors que les coliformes sont lactose ⊕.

Il en résulte que l'utilisation des coliformes comme indicateurs dans un aliment pour lequel le rapport  $\xi_c$  est élevé semble moins justifié que celle des Enterobacteriaceae, groupe mieux défini et plus représentatif.

MANIPULATION : détermination du rapport  $\xi_c$  dans le lait cru.

Réaliser le dénombrement des coliformes et des entérobactéries en milieu solide selon la technique en double couche à partir du lait cru non dilué et dilué au 1/10 et au 1/100 (diluant : tryptone sel)

Milieus utilisés :

- gélose VRBL (violet cristal, rouge neutre, bile, lactose).
- gélose VREB (violet cristal, rouge neutre, bile, glucose).

Incubation à 30°C.

## 2° jour (1,5 h)

### I - RECHERCHE ET DENOMBREMENT DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DANS UN LAIT PASTEURISE.

- Résultats expérimentaux et conclusions.

### 2 - IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXIQUES DANS UN LAIT CRU.

#### 2.1. Recherche de la thermonucléase.

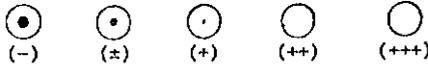
- Résultat pour la souche de Staphylococcus aureus.
- Résultat pour la souche témoin.
- Conclusion.

#### 2.2. Recherche des entérotoxines staphylococciques.

- Analyse qualitative des résultats.
- Analyse quantitative des résultats : la sensibilité de ce test étant de 0,5 ng.ml<sup>-1</sup>, donner, dans le cas de résultat(s) positif(s), la teneur en entérotoxine(s) de l'échantillon testé. Expliquer le calcul.

- Validation des résultats :
  - lecture des témoins,
  - discussion.

Le degré d'agglutination s'obtient par comparaison avec les figures ci-après :



Les résultats classés de + à +++ sont considérés comme positifs.

### 3 - RECHERCHE DES ENTEROBACTERIES ET DES COLIFORMES COMME INDICATEURS DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DU LAIT CRU.

Dénombrement : résultats expérimentaux et exploitation:

- Calcul du rapport:  $\xi_c^e$
- Conclusion

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**deuxième partie : réalisation pratique d'opérations**  
**techniques      Sujet 3**  
**Durée 10 heures      coefficient 8**

## Biochimie 5 heures (85 points 5 h)

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve

L'oeuf de poule est un aliment complet de très haute qualité. Son apport est indispensable dans maintes recettes alimentaires familiales et industrielles.

Une industrie des ovoproduits s'est développée depuis quelque temps et met sur le marché des produits pasteurisés et congelés destinés aux boulangeries, pâtisseries, traiteurs, restaurants.

La composition sommaire des oeufs entiers est la suivante :

matières sèches	23 %
matières grasses	11 %
protéines	11,5 %
sucres réducteurs	0,8 %

Le pH est de 7,5.

Le jaune est riche en lipides et la quantité importante de cholestérol pose un problème diététique.

Le blanc est exempt de matières grasses et contient de nombreuses protéines dont l'ovalbumine.

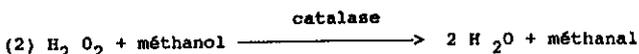
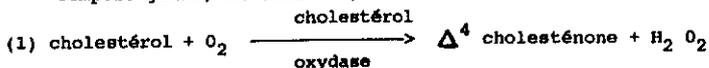
L'étude portera sur :

- le dosage du cholestérol dans le jaune d'oeuf,
- l'analyse des protéines du blanc d'oeuf :
  - \* électrophorèse,
  - \* détermination de la teneur en albumine d'un extrait obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.

# 1 - DOSAGE ENZYMATIQUE DU CHOLESTEROL DANS LE JAUNE D'OEUF.

## 1 - Principe :

- saponification des stérides par la potasse méthanolique à chaud et extraction du cholestérol
- dosage :
  - (1) en présence de cholestérol oxydase, le cholestérol est oxydé en cholesténone.
  - (2) le peroxyde d'hydrogène formé oxyde le méthanol en méthanal sous l'action de la catalase.
  - (3) le méthanal réagit avec l'acétylacétone et l'ammonium pour donner un composé jaune, la lutidine, dont on mesure l'absorbance à 405 nm.



## 2 - Mode opératoire :

### \* Saponification et extraction : 1 essai

Dans un ballon rodé de 250 ml, peser exactement une masse *m* de jaune d'oeuf comprise entre 1,2 et 1,4g. Ajouter 20 ml de potasse méthanolique à 1 mol/l, 10 ml de propan-2-ol (isopropanol) et quelques billes de verre. Agiter. Chauffer 30 min à reflux (chauffe ballon électrique ou bain-marie) ; agiter 2 ou 3 fois au cours de cette opération.

Laisser refroidir la solution trouble. Transvaser dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter avec du propan-2-ol. Mélanger. Filtrer une fraction et utiliser cette solution limpide pour le dosage.

### \* Dosage du cholestérol : 2 essais

Réactif I : tampon pH 7,0 (phosphate d'ammonium 0,8 mol/l)  
méthanol  
catalase  
acétylacétone

Réactif II : suspension de cholestérol oxydase

Introduire dans 3 tubes à hémolyse

	Témoin	Essai 1	Essai 2
Réactif I (ml)	2,50	2,50	2,50
Solution limpide à doser (ml)	0,20	0,20	0,20
Réactif II (ml)	-	0,02	0,02

Bien mélanger, boucher les tubes et les laisser 60 min au bain thermostaté à 37°C.

Laisser refroidir à température ambiante et transvaser dans des cuves.

Lire l'absorbance des essais contre le témoin à 405 nm.

### 3 - Résultats :

Calculer la concentration massique en cholestérol dans la solution limpide dosée.

En déduire la masse moyenne de cholestérol par gramme de jaune d'oeuf.

#### Données :

coefficient d'absorption de la lutidine à 405 nm :  $\epsilon = 7,4 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

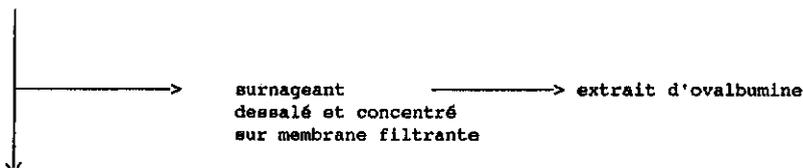
masse molaire du cholestérol :  $386,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

## 2 - ANALYSE DES PROTEINES DU BLANC D'OEUF

Préparation de l'extrait d'ovalbumine :

blanc d'oeuf

+ sulfate d'ammonium à  $\frac{1}{2}$  saturation pH = 7



précipité de protéines

### 2.1. Mise en évidence des protéines par électrophorèse sur gel d'acétate de cellulose : 1 essai

#### 2.1.1. Mode opératoire :

Suivre la fiche technique donnée par le centre d'examen, en fonction du matériel utilisé.

- Electrophorèse en tampon véronal pH = 8,6 ;  
force ionique =  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
- Dépôt de 3 échantillons différents au centre de la bande :
  - \* blanc d'oeuf dilué au demi dans du NaCl à 9g/l
  - \* extrait d'ovalbumine
  - \* sérum animal servant de témoin
- Migration
- Coloration par le rouge Ponceau
- Transparensation

#### 2.1.2. Résultats :

Annoter la plaque d'électrophorèse.

Comparer la migration des protéines du blanc d'oeuf à celle des protéines sériques.

Comparer la composition de l'extrait préparé à celle du blanc d'oeuf.

### 2.2. Dosage des protéines dans l'extrait purifié.

L'extrait d'ovalbumine est dosé par la méthode du biuret ; il est susceptible de contenir 25 à 35 g/l de protéines.

#### 2.2.1. Essais :

Effectuer 3 essais avec des volumes différents d'extrait purifié. Suivre le même mode opératoire que pour l'étalonnage.

2.2.2. Étalonnage :  
Préparer une gamme de 6 tubes à essais contenant de 0 à 1 ml de solution étalon d'ovalbumine à 20 g/l. Compléter à 1 ml avec NaCl à 9 g/l. Ajouter 4 ml de réactif de Gornall. Agiter, attendre 30 min minimum à l'obscurité et lire au spectrophotomètre à 540 nm.

2.2.3. Résultats :  
Présenter sous forme de tableau la composition des tubes (gamme et essais) ainsi que les résultats expérimentaux. Tracer la courbe d'étalonnage et mettre en évidence la concentration d'ovalbumine à partir de laquelle la loi de BEER-LAMBERT n'est plus respectée.  
Déterminer la concentration massique en protéines de cet extrait purifié.

## Immunologie-Microbiologie (5 h, 75 points)

### 1<sup>o</sup> jour (3 h)

#### Remarques préliminaires :

Les deux parties du sujet sont indépendantes. Les manipulations ne seront pas forcément réalisées dans l'ordre indiqué. Le candidat, après lecture de l'ensemble du sujet, doit adopter l'organisation de travail la plus judicieuse.

La production des ovoproducts nécessite la mise en oeuvre de différentes techniques de contrôle :

- contrôles vétérinaires des élevages de poules,
- contrôles microbiologiques des ovoproducts.

#### I - CONTROLES VETERINAIRES AVICOLES (40 points).

Des affections virales, parfois très graves, peuvent être observées chez la poule.

C'est le cas de la maladie de Marek - provoquée par un virus présentant des analogies avec celui de l'Herpès humain - dans laquelle on observe une prolifération lymphocytaire avec infiltration dans le système nerveux, entraînant une paralysie de l'animal.

Un vaccin, assurant une certaine protection dans les élevages, a pu être mis au point contre cette maladie d'autant plus redoutable qu'elle est fortement contagieuse.

Il s'avère parfois nécessaire de mettre en oeuvre des techniques immunologiques pour diagnostiquer la maladie ou contrôler une immunité.

La réaction de fixation de complément (R.F.C) est l'une des méthodes utilisées.

#### Sérodiagnostic : réaction de fixation du complément.

On dispose de 3 sérums inconnus, d'antigène viral et de complément titré (sérum de cobaye) contenant 5 CH 50 dans un volume de 50 µl.

Les dilutions seront réalisées en tampon véronal Ca-Mg.

On se propose de réaliser un test qualitatif (dilution 1/4) sur deux des trois sérums inconnus ("Sa" n°... et "Sb" n°...) et un test quantitatif (dilutions 1/4 au 1/256) sur le troisième ("Sc" n°...).

On souhaite, d'autre part, vérifier le titre d'un autre lot de complément ("Cx" n°...) fourni.

1.1. Manipulations. Premier temps

1.1.1. R.F.C. : Tests qualitatifs et quantitatifs.

- Les sérums étudiés ont été préalablement inactivés par chauffage.
- Diluer au 1/4 chacun des sérums purs fournis.
- Réaliser pour le sérum inconnu "Sc" des dilutions du 1/8 au 1/256. Ces dilutions seront faites en plaque dans un volume de 25 µl.
- Effectuer la réaction selon le protocole suivant :
  - sérum dilué : 25 µl,
  - antigène viral : 25 µl,
  - complément (5 CH 50) : 50 µl.

1.1.2. R.F.C. : Témoins

- Préparer les témoins suivants :
  - témoins sérums (sans antigène),
  - témoin antigène (sans sérum),
  - témoin système hémolytique (sans sérum ni antigène).

1.1.3. Contrôle du titre d'un complément.

- Réaliser des dilutions du complément étudié fourni ("Cx") du 1/2 au 1/16.
- Effectuer le titrage (avec le complément pur et chacune des dilutions précédentes) en utilisant le protocole de la réaction (1.1.1.) mais en remplaçant le sérum par du tampon.

1.1.4. Incubation de la plaque.

- Mélanger (agitateur rotatif - 3 min).
- Recouvrir d'une feuille adhésive et incuber la plaque à 4 - 6°C. jusqu'au lendemain.

1.2. Compte rendu.

Préciser :

- la disposition des différents essais sur la plaque,
- la composition des témoins,
- la technique de réalisation des dilutions.

II - CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DES OVOPRODUITS (35 points)

Le contrôle microbiologique des ovoproduits pasteurisés consiste généralement à effectuer le dénombrement de la flore aérobie mésophile, des coliformes fécaux, des *Staphylococcus aureus*, et la recherche des *Salmonella*.

Le contrôle complet d'un échantillon A de jaune d'oeuf pasteurisé ne sera pas réalisé ; seule la recherche des *Salmonella* sera envisagée.

2.1. Recherche et identification de Salmonella

Opérations préalablement effectuées :

- Préenrichissement :  
25 grammes de jaune d'oeuf pasteurisé ont été mélangés à 225 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée tamponnée. Le milieu ensemencé a été incubé 4 h à 37°C.
- Enrichissement :  
10 cm<sup>3</sup> de bouillon au sélénite de sodium ont été ensemencés par 1 cm<sup>3</sup> de bouillon de préenrichissement et incubés 24 h à 42°C.

- Isolement :

Un isolement sur milieu DCL selon Hynes (5g de désoxycholate de sodium par dm<sup>3</sup>) a été réalisé à partir du bouillon au sélénite, puis incubé 36 h à 37°C.

On dispose de cet isolement noté DCL A.

2.1.1. Discrimination des colonies "suspectes".

Après observation macroscopique de l'isolement et repérage des colonies "suspectes", réaliser une discrimination rapide (2 h) des colonies à identifier.

5 colonies, dont le choix sera justifié sur le compte rendu, seront testées par la technique proposée.

2.1.2. Identification

Procéder à l'identification d'une colonie présentant une forte suspicion de Salmonella, et à son repiquage sur gélose nutritive.

2.2. Antibiogramme d'une souche de Salmonella

Une analyse portant sur un autre échantillon (noté B) de jaune d'oeuf pasteurisé a permis de révéler la présence de Salmonella enterica sous-espèce enterica sérotype typhimurium.

Réaliser, à l'aide des disques d'antibiotique fournis, un antibiogramme de cette souche présentée en bouillon de Muller-Hinton de 18 h noté M.H.B.

## 2° jour (2 h)

### I - CONTROLES VETERINAIRES AVICOLES (40 points)

1.1. R.F.C. et titrage de complément : 2ème temps de la réaction

- On dispose d'une suspension de globules rouges sensibilisés ("GR-S") préparés en mélangeant, à volumes égaux, une suspension de globules rouges de moutons à 2 % et un sérum hémolytique convenablement dilué.
- Une solution d'hémoglobine obtenue par hémolyse totale d'une suspension de globules rouges à 1 % est également fournie ("GR-H").
- La plaque a été remise à la température ambiante depuis 15 min.
- Ajouter 50 µl d'hématies sensibilisées dans les cupules "réaction", "titrage de complément" et "témoins".
- Mélanger et incuber la plaque 30 minutes au bain thermostaté à 37°C, en agitant toutes les 10 minutes.

1.2. Gamme de lecture :

- Préparer, dans la plaque, une gamme de lecture selon le protocole suivant (volumes en µl) :

GR-H	-	12,5	25	37,5	50
GR-S	50	37,5	25	12,5	0
tampon	100	100	100	100	100

- Préciser, dans le compte rendu, l'emplacement de cette gamme sur la plaque.

1.3. Lecture et conclusions :

- Centrifuger la plaque 3 minutes à 1 300 t/min.
- Déterminer les pourcentages d'hémolyse de chaque cupule.
- Indiquer pour chaque dilution des sérums l'intensité de la réaction de - à ++++ .
- Déterminer le titre du sérum "Sc" (on prendra comme critère une hémolyse inférieure ou égale à 25 %).
- Donner les conclusions relatives aux sérums "Sa" et "Sb".
- Préciser si le complément testé "Cx" pourrait être utilisé pour la R.F.C.

Remarque : la plaque sera laissée sur la pailasse en fin de séance.

**II - CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DES OVOPRODUITS (35 points).**

Les critères microbiologiques relatifs aux ovoproduits stipulent l'absence de Salmonella dans 25 grammes d'échantillon.

- 2.1. Procéder aux tests complémentaires permettant l'identification de la souche suspecte (sérotypage compris).

Conclure.

- 2.2. Lire l'antibiogramme.  
Conclure.

# Epreuves de la session 1993

## Epreuve de Français Durée 4 heures Coefficient 3

### Les conditions de production de l'information.

Il n'y a pas que le médium et le message, il y a, nous l'avons vu, le récepteur. Il y a aussi les centres qui produisent, choisissent, contrôlent, commandent l'information. Le contrôle de ces centres de contrôle pose un problème obsédant : peut-on le laisser aux intérêts privés, c'est-à-dire au contrôle de l'argent, faut-il le soumettre au contrôle de l'Etat ?

D'où le dilemme : presse d'argent ? presse d'Etat ?

Examinons la notion de "presse d'argent". A un premier regard, elle signifie "presse pour gagner de l'argent". Presse donc qui traite l'information comme une denrée marchande, sélectionnant l'information rentable et éliminant l'information non rentable. Selon ce critère, l'extraordinaire, le surprenant, le nouveau d'une part, mais aussi l'obsédant, le passionnant, l'adorable, le haïssable sont hautement valorisés. D'où une presse à "sensation", qui choisit et produit ce qui crée des sensations ; d'un côté, la grande presse d'information mettant en relief tout ce qu'il y a de surprenant, happant *in extremis* l'information de dernière heure, de l'autre, la presse qui raconte des histoires archétypiques - amours divins, sacrés-profanes entre olympiens modernes (vedettes de cinéma, têtes couronnées, etc.) - et qui, pour cela, produit des pseudo-informations se conformant aux besoins mythologiques.

La presse d'argent est donc soumise à cette double tendance, et c'est à cette double tendance qu'essaie d'échapper la presse d'opinion, qui vend non tant de l'information que le sertissage idéologique de l'information, ce qui nous ramène aux problèmes précédemment examinés de la relation idéologie/information.

A un second regard, la notion de "presse d'argent" signifie non seulement "presse pour gagner de l'argent", mais aussi presse sélectionnant l'information selon l'utilité qu'elle comporte à l'égard du pouvoir de l'argent, c'est-à-dire le système capitaliste. Ici, il ne s'agit plus seulement de faire de l'argent par l'information, il s'agit aussi de soumettre l'information au pouvoir de l'argent.

Cette tendance se développe naturellement dans la presse d'argent. Mais il faut remarquer qu'elle peut se heurter à la tendance à "faire de l'argent" ; en effet, une information "sensationnelle", qui fait de l'argent, peut être contraire à l'intérêt du pouvoir de l'argent (scandale financier), mais elle ne peut être tue, s'il y a concurrence.

Il y a donc une contradiction interne dans la presse d'argent, et cette contradiction, vitale pour l'information, ne peut être maintenue que dans et par la concurrence.

La concurrence entre journaux, radios, télévisions, la concurrence des sources d'information donne des chances à l'information que l'argent ou l'Etat veulent étouffer. Une feuille marginale commence à lancer la "révélation" : il devient alors possible, et tôt ou tard, probable, que là où il y a concurrence, l'information sortira et se répandra dans l'ensemble des médias. Ainsi, c'est dans le système le plus capitaliste, mais aussi le plus concurrentiel en matière de presse, radio, télévision, le système américain, que les "scandales" de My Lay et du Watergate ont pu finalement envahir la vie politique et avoir les effets que l'on sait\*.

C'est parce que l'information vaut de l'argent que finalement l'argent lui-même concourt à diffuser l'information dont le sens conteste le pouvoir de l'argent. Par contre, là où l'information est dénuée de la valeur marchande, là où peut jouer une censure, c'est-à-dire là où il y a monopole d'Etat, alors l'information contestataire est chassée des médias.

Ainsi, sous le problème presse d'argent/presse d'Etat s'en cache un autre qui ne le recouvre pas entièrement : concurrence/monopole.

Pour qu'il y ait concurrence, il faut qu'il y ait pluralité véritable des sources d'information. Et c'est dans et par la pluralité des sources que peut surgir l'information dans ce qu'elle a de *dérangeant*.

En fait, il peut y avoir concurrence au sein des systèmes sous contrôle d'Etat, quand il y a institutionnellement et socialement relative autonomie des sources. Les media d'Etat, en France, sont inscrits dans un système de concurrence comprenant la presse nationale, les radios périphériques, les grandes agences internationales. Il faut surcontrôler les media et clore hermétiquement la société pour occulter les grands événements nationaux et internationaux. Mais, même dans les pays clos, des informations étrangères filtrent à travers le brouillage des ondes radios. La planète subit mille contraintes, mille censures, mille déformations locales et nationales dans l'information, mais, plus ou moins mal, lentement, difficilement, l'information circule. L'hégémonie des grandes agences anglo-saxonnes sur une partie du globe contient en elle-même l'antidote au monopole : la concurrence.

Edgar MORIN, *Pour sortir du XX<sup>e</sup> siècle*, NATHAN Points, 1981 pp.44-46

\* Le massacre de My Lay a lieu en mars 1968. L'information est étouffée dans/par l'armée U.S. L'obstination d'un journaliste finit par la faire marginalement percer. En novembre-décembre 1969, elle remplit tous les journaux américains.

### QUESTIONS

1. Vous résumerez cet extrait en 220 mots. Une marge de plus ou moins 10% sera tolérée. (8 points)
2. Expliquez les expressions suivantes :
  - "des histoires archétypiques"
  - "sertissage idéologique de l'information." (2 points)
3. Commentez et discutez l'affirmation d'Edgar MORIN : "La concurrence entre journaux, radios, télévisions, la concurrence des sources d'information donne des chances à l'information que l'argent ou l'Etat veut étouffer." (10 points)

## Epreuve d'Anglais

### Durée 2 heures Coefficient 2

#### SPACE QUEST FOR PERFECT PROTEIN CRYSTAL

Susan Katz Miller, Washington DC

5 A PROTEIN derived from a deadly toxin found in castor beans (1) floated in space aboard the shuttle Columbia last week, as part of an experiment that could lead to new treatments for diabetes, arthritis and other diseases. Scientists hope that the protein, unhampered by gravity, will form more perfect crystals than it does on Earth.

10 The crystals should help them to understand the structure of the protein and subsequently design better versions of a class of drugs known as immunotoxins.

15 The castor-bean derivative, known as recombinant ricin A chain, is one of 34 proteins grown on Columbia by Lawrence DeLucas, a protein crystallographer from the University of Alabama at Birmingham.

25 Researchers can determine the structure of molecules by looking at the X-ray diffraction patterns produced by crystals. On Earth, gravity causes the crystals to deform as they settle. "The main problem that plagues (2) all these biological crystals is molecular disorder," says Charles Bugg, principal investigator for the shuttle's crystallography experiments. "If a certain percentage of the molecules are out of alignment the picture you get on the X-ray is fuzzy."

30 One scientist impatient for the shuttle to land is Arthur Frankel of the University of Florida at Gainesville, who submitted the application to send recombinant ricin A chain into space. "In order to modify the molecules to make better

immunotoxins we need to know the exact structure," says Frankel.

An immunotoxin is a molecular chimera formed by joining a bacterial toxin or a toxin from a plant to an antibody or hormone. The toxin is harmless until it is introduced into a target cell, and the antibody or hormone binds only to specific receptors, making immunotoxins potent and selective killers.

Immunotoxins have been made with poisons derived from the diphtheria and pseudomonas bacteria, and from carnations (3) and oorn. The drug most likely to reach the market first is CD5 Plus, a ricin A chain joined to a monoclonal antibody targeted to the white blood cells known as T lymphocytes.

A year ago, an advisory panel to the Food and Drug Administration recommended the approval of CD5 Plus for people with acute graft-versus-host (4) disease which does not respond to treatment with steroids. Graft-versus-host disease is an immune reaction that develops in about half of all patients who have received bone marrow (5)

70 transplants. It is fatal in 50 per cent of cases. The reaction is caused by T lymphocytes in the donor's marrow.

Xoma Corp., the Californian-based biotechnology company that developed CD5 Plus, is also testing it against rheumatoid arthritis and diabetes. In Britain, ICI is testing another immunotoxin made from ricin A chain as a treatment for bowel cancer.

80 The results from the shuttle experiments are eagerly awaited. But they are only a first step. "This mission is considered a precursor to what we might be able to do on the 85 space station," says Bugg. The station, if it ever gets off the ground, will have an entire laboratory for growing crystals.

New Scientist - 11 July 1992

- (1) castor bean(s) : graine(s) de ricin
- (2) to plague : to cause persistent trouble
- (3) carnation : oeillet
- (4) graft : transplant
- (5) marrow : moëlle

#### QUESTIONS :

- 1 - Faire un résumé en français, de manière ordonnée, des informations essentielles contenues dans le texte (7 points).
- 2 - Traduire en français depuis : ligne 43 ("An immunotoxin is a molecular chimera...") jusqu'à ligne 60 (...T lymphocytes"). (7 points)
- 3 - What are the medical applications of ricin A chain ? (6 points) 100-120 mots.

## Epreuve de Mathématique Durée 2 heures Coefficient 1,5

### EXERCICE 1

Les individus d'une population donnée peuvent être atteints de deux maladies A et B :

La probabilité pour qu'un individu pris au hasard dans la population soit malade de A est 0,03.

La probabilité pour qu'un individu pris au hasard dans la population soit malade de B est 0,05.

1) On sait que la probabilité pour qu'un individu pris au hasard dans la population soit malade de B sachant qu'il est malade de A est 0,60 et on choisit au hasard un individu dans cette population :

a) Calculer la probabilité pour que cet individu soit malade à la fois de A et de B.

b) Calculer la probabilité pour que cet individu soit malade de A sachant qu'il est malade de B.

c) Calculer la probabilité pour que cet individu soit malade de A ou de B.

2) Dans cette question, on considère un échantillon de la population constitué de 10 000 personnes.

Soit X la variable aléatoire ayant pour valeur le nombre de malades de A dans cette population.

a) Déterminer la loi de probabilité de X : préciser ses paramètres.

b) Par quelle loi normale peut-on approcher cette loi de probabilité ?

c) En déduire  $P(X < 250)$ .

### EXERCICE 2

Dans cet exercice les parties A et B peuvent être traitées indépendamment l'une de l'autre.

#### PARTIE A

On considère la réaction de l'acide éthanoïque et du propanol 1 à 25°C, en présence d'acide chlorhydrique. Le solvant est le propanol 1 lui-même.

La concentration initiale de l'acide éthanoïque est 0,2 mole l<sup>-1</sup>.

La réaction est du premier ordre, c'est-à-dire que la concentration x d'éthanoate de propyle formé ( $0 \leq x < 0,2$ ), nulle à l'instant initial  $t = 0$ , est une fonction du temps t, solution de l'équation différentielle :

$$t \in [0 ; +\infty[, \quad \frac{dx}{dt} = k(0,2 - x)$$

c'est-à-dire :

$$t \in [0 ; +\infty[, \quad x'(t) + k x(t) = 0,2k \quad (1)$$

où k est une constante réelle strictement positive.

1)a) Déterminer la constante  $\lambda$  telle que la fonction définie dans  $[0 ; +\infty[$  par  $x(t) = \lambda$  soit solution de l'équation différentielle (1).

b) Résoudre dans  $[0 ; +\infty[$  l'équation différentielle (1).

c) Déterminer la solution particulière vérifiant la condition initiale  $x(0) = 0$  (cette solution, fonction de  $t$ , dépend du paramètre  $k$ ).

2) Soit  $t_1$  le temps au bout duquel la concentration  $x$  d'éthanate de propyle formé atteint  $0,1$  mole  $l^{-1}$ . Calculer  $t_1$  en fonction de  $k$ .

Sachant que, en secondes,  $t_1 = 300$ , déterminer  $k$ . En déduire que dans ce cas :

$$x(t) = 0,2(1 - e^{-0,00231t}) \text{ (approximativement).}$$

### PARTIE B

La solution d'éthanate de propyle est amenée à  $pH = 7$  et à la concentration de  $0,01$  mole  $l^{-1}$ .

Pour cette seconde partie de l'expérience, on fixe l'origine des temps au moment où on ajoute de la soude centimolaire.

La réaction de saponification évolue, elle est du second ordre, c'est-à-dire que la concentration  $y$  en éthanate de sodium formé est une fonction du temps  $t$  qui :

\* vérifie  $0 \leq y < 0,01$

\* vérifie  $y(0) = 0$

\* est solution de l'équation différentielle :

$$t \in [0 ; +\infty[, \quad \frac{dy}{dt} = \alpha(0,01 - y)^2 \quad (2)$$

où  $\alpha$  est une constante réelle strictement positive.

1) En résolvant dans  $[0 ; +\infty[$  l'équation différentielle (2) déterminer la concentration  $y$  en éthanate de sodium formé.

2) On pose  $z = \frac{1}{0,01 - y}$ .

Démontrer que l'on a :  $z = \alpha t + \beta$ , où  $\beta$  est une constante réelle que l'on déterminera.

3)a) Les résultats de l'expérience permettent d'établir le tableau ci-dessous que l'on reproduira et que l'on complètera par les valeurs correspondantes de  $z$  arrondies à l'unité la plus proche,  $t$  étant exprimé en secondes et  $y$  en moles  $l^{-1}$ .

t	0	180	360	480	600	900	1200
y	0	$2,60 \cdot 10^{-3}$	$4,11 \cdot 10^{-3}$	$4,81 \cdot 10^{-3}$	$5,36 \cdot 10^{-3}$	$6,37 \cdot 10^{-3}$	$6,99 \cdot 10^{-3}$

b) On désigne par  $z = a_0 + a_1 t$  une équation de la droite d'ajustement de  $z$  en  $t$  obtenue par la méthode des moindres carrés. Déterminer les coefficients  $a_0$  et  $a_1$ . En déduire une estimation de  $\alpha$ .

**Epreuve de Sciences physiques**  
**Durée 2 heures Coefficient 2,5**

PHYSIQUE

**I) OPTIQUE** (14 points)

Les fibres optiques les plus simples sont constituées par deux solides transparents, homogènes, isotropes, d'indice de réfraction différent (voir ci-dessous fig.1).

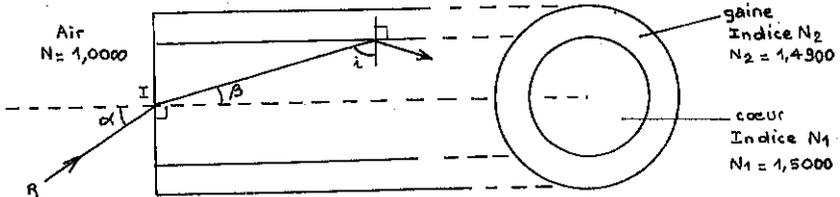


Fig. 1

I-1) Montrer que le rayon lumineux R entrant en I sur l'axe de la fibre ne peut se propager dans le coeur que si l'angle  $i$  (voir fig.1) est supérieur à une valeur limite  $i_0$  que l'on déterminera.

I-2) Calculer les valeurs correspondantes  $\alpha_0$  et  $\beta_0$  des angles  $\alpha$  et  $\beta$  (voir fig.1).

I-3) Dans la fibre optique, la propagation d'une radiation électromagnétique de longueur d'onde  $\lambda$  suit la loi :

$$P = P_0 e^{-\tau x}$$

dans laquelle :  $P$  = puissance transmise  
 $P_0$  = puissance incidente  
 $\tau$  = coefficient d'atténuation linéique  
 $x$  = longueur de la fibre

I-3-1) La puissance transmise par une fibre de 3,00 km vaut 50,0 % de la puissance initiale. Calculer le coefficient d'atténuation linéique  $\tau$ .

I-3-2) Quelle est la longueur d'une fibre pour laquelle la puissance transmise est le dixième de la puissance incidente.

**II) VISCOSIMETRIE** (11 points)

Dans la détermination du coefficient de viscosité dynamique  $\eta$  d'un liquide de masse volumique  $\rho$  par un viscosimètre à capillaire, on mesure le temps d'écoulement  $t$  d'un volume donné de liquide. On a la relation :

$$\eta = K \cdot \rho \cdot t$$

$K$  est la constante caractéristique du tube capillaire.

II-1) A 293 K, on a relevé pour l'eau et un solvant organique les valeurs suivantes pour le temps d'écoulement  $t$  :

eau  $t = 342,5$  s                      solvant organique  $t = 271,4$  s

Déterminer  $\eta$  pour le solvant.

Données :  $\eta$  pour l'eau = 0,00101 Pa.s  
 masse volumique du solvant : 984 kg.m<sup>-3</sup>  
 masse volumique de l'eau : 1000 kg.m<sup>-3</sup>

II-2) La viscosité de l'eau a été mesurée à différentes températures. Les résultats suivants ont été obtenus :

T(K)	273	293	310	373
$\eta$ (Pa.s)	0,001787	0,00101	0,000719	0,000283

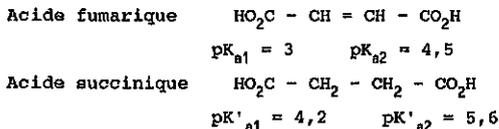
Montrer que l'on a, entre  $\eta$  et T, la relation empirique :

$$\ln \eta = A + \frac{1}{T} \cdot B ; \text{ déterminer A et B.}$$

### CHIMIE

#### III) CHIMIE GENERALE (12 points)

On considère les deux acides carboxyliques suivants :



III-1) Calculer le pH d'une solution aqueuse d'acide succinique de concentration initiale  $c_0 = 0,01$  mol/dm<sup>3</sup>, en ne tenant compte que de la première acidité. Justifier les approximations utilisées et le fait de négliger la seconde acidité.

III-2) On s'intéresse maintenant au couple rédox fumarate/succinate. Pour ce couple, la valeur du potentiel rédox standard biologique est :

$$E'_1 = +0,031 \text{ V à pH} = 7 \text{ et à } 298\text{K}$$

Ecrire la demi équation rédox correspondant à ce couple ; justifier sans calcul qu'à pH = 7, les espèces fumarate et succinate sont prédominantes.

III-3) L'oxydation du succinate en fumarate peut être réalisée en milieu biologique par le cytochrome c (noté cyt<sup>3+</sup>) dont le couple rédox s'écrit :



III-3-1) Ecrire l'équation bilan correspondante.

III-3-2) Calculer  $\Delta G^\circ$  à 298 K et à pH = 7 pour la réaction globale. En déduire la constante d'équilibre correspondante. Conclure.

Données :  $1F = 96500 \text{ C.mol}^{-1}$        $R = 8,31 \text{ J.K}^{-1}$

IV) CHIMIE ORGANIQUE (13 points)

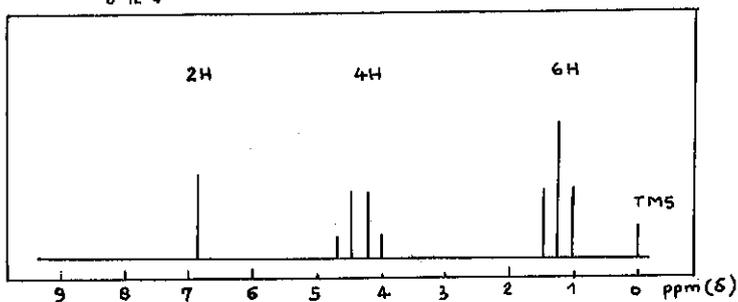
L'acide fumarique et l'acide maléique sont les noms usuels des deux acides carboxyliques correspondant à la formule  $\text{HO}_2\text{C} - \text{CH} = \text{CH} - \text{CO}_2\text{H}$ .

IV-1) Quel est l'état d'hybridation de chaque atome de carbone ?

Quelle géométrie en résulte-t-il pour la molécule au niveau de la double liaison carbone-carbone ?

IV-2) Donner le nom systématique et la formule développée de chaque isomère.

IV-3) 145g d'acide fumarique (isomère E) sont traités par 185g d'éthanol en présence d'acide sulfurique concentré, à reflux dans le benzène. Après extraction, lavage, séchage de la phase organique, on obtient par distillation (plateau à 213-215°C) 150g d'un produit auquel l'analyse centésimale donne la formule brute  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_4$  et dont le spectre de RMN a l'allure schématisée suivante :



IV-3-1) Ecrire l'équation bilan de la réaction.

IV-3-2) Interpréter le spectre R.M.N. en ce qui concerne la position relative et la multiplicité des signaux.

IV-3-3) Calculer le rendement de la réaction.

Données : (en  $\text{g.mol}^{-1}$ )       $\text{H} = 1$        $\text{C} = 12$        $\text{O} = 16$

# Epreuve de Biochimie-Biologie

## Durée 4 heures Coefficient 6

### Remarques préliminaires :

1 - Le sujet proposé a un caractère pluridisciplinaire. Le candidat devra veiller à répondre de manière concise aux questions posées afin de pouvoir traiter l'ensemble du sujet.

2 - Il est suggéré de consacrer à chaque question un temps tenant compte du nombre de points attribués.

## LES ANTIBIOTIQUES

### PREMIERE PARTIE : BIOSYNTHESE DES ANTIBIOTIQUES (65 points)

#### 1 - ASPECTS BIOCHIMIQUES (36 points)

La griséofulvine, produit de la fermentation de la moisissure *Penicillium griseofulvum*, est un antibiotique provenant de la polymérisation d'unités acétyl. L'initiateur de cette biosynthèse est l'acétyl-coenzyme A.

#### 1.1 Synthèse d'acétyl-CoA à partir d'acide pyruvique

1.1.1 Préciser la localisation cellulaire de cette transformation.

1.1.2 La réaction est catalysée par un complexe multi-enzymatique.

Ecrire sous forme chimique son équation globale et nommer le complexe multi-enzymatique.

Schématiser son mécanisme en décrivant les étapes intermédiaires ; justifier la notion de complexe multi-enzymatique.

1.1.3 La valeur de  $\Delta G^{\circ}$  de cette réaction est de  $-33,44 \text{ kJ. mol}^{-1}$ .

Donner la signification de cette grandeur thermodynamique en précisant les conditions de définition.

Interpréter le signe de cette grandeur.

Calculer la constante d'équilibre apparente  $K'_{eq}$  à  $25^{\circ}\text{C}$  et à pH 7. Conclure.

Donnée :  $R : 8,32 \text{ J.mol}^{-1}. \text{K}^{-1}$

#### 1.2 Synthèse cytoplasmique de griséofulvine par condensation d'unités acétyl

Les mécanismes et les enzymes responsables sont similaires à ceux intervenant dans la biosynthèse extra-mitochondriale des acides gras. (DOCUMENT I)

Etape A = carboxylation de l'acétyl-CoA.

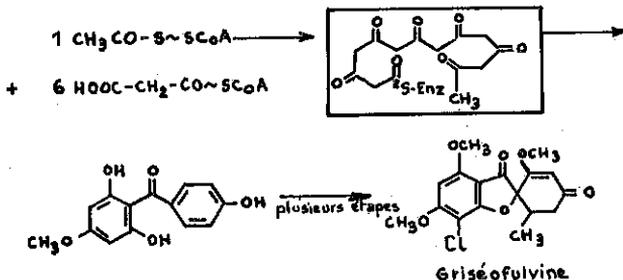
Etape B = transfert de l'acétyl-CoA sur un complexe multi-enzymatique  $\text{Enz} - \text{SH}$ .

Etape C = transfert du malonyl-CoA sur le même complexe multi-enzymatique  $\text{Enz} - \text{SH}$ .

Etape D = condensation des unités acétyl.

DOCUMENT I Biosynthèse de GRISEOFULVINE

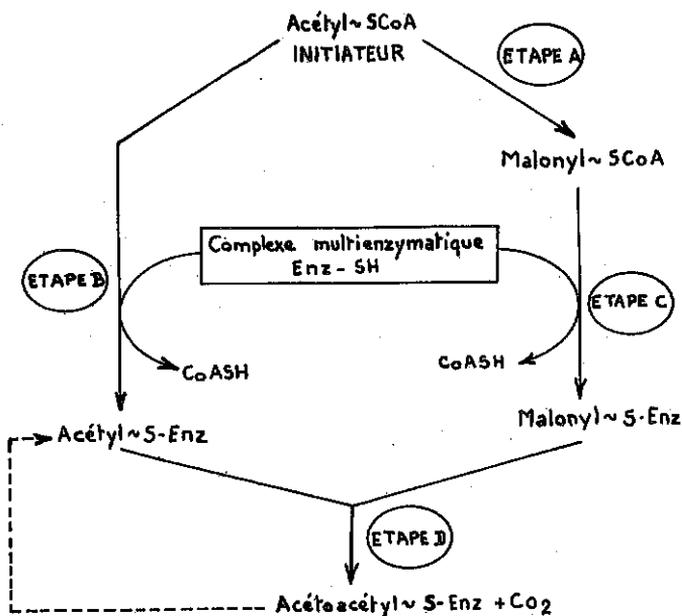
1- Schéma général



Légende   3,5,7,9,11,13-hexaoxotétradécanoyl  $\sim$  S-Enz  
noté A-C  $\sim$  S-Enz

||  
O

2- Condensation d'unités acétyl



1.2.1 Etape A

Ecrire la réaction chimique de carboxylation de l'acétyl-CoA, en précisant l'enzyme et les coenzymes qui interviennent.

1.2.2 Etape D

Etablir l'équation bilan pour la synthèse de la molécule A-COOH, précurseur de griséofulvine.

1.3 Régulation de cette biosynthèse

Le citrate est un activateur intervenant uniquement sur la vitesse maximale apparente de l'enzyme allostérique catalysant la carboxylation de l'acétyl-CoA.

Représenter, pour cette enzyme, l'allure des courbes théoriques suivantes :

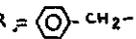
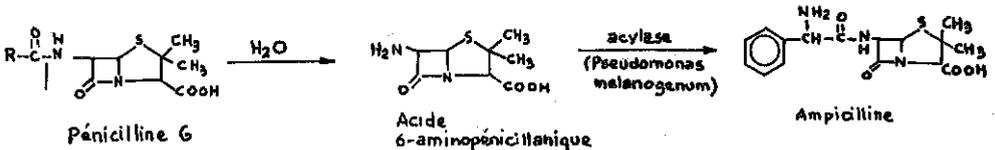
- Vitesse initiale = f([acétyl-CoA]) en absence et en présence de citrate (graphe a).
- Vitesse initiale = f ([citrate]) à concentration constante en acétyl-CoA (graphe b).

Commenter et analyser les courbes de ces deux graphes.

2 - BIOCONVERSIONS (11 points)

2.1 L'ampicilline, comme beaucoup d'antibiotiques utilisés actuellement, est un antibiotique semi-synthétique ; il est obtenu à partir de la pénicilline G, métabolite naturel de *Penicillium chrysogenum* (DOCUMENT II).

DOCUMENT II



+ RCOOH  
Acide carboxylique

Définir ce qu'est un antibiotique semi-synthétique.

Rappeler à quelle famille d'antibiotique appartient l'ampicilline et préciser dans quel but cet antibiotique a été mis au point.

2.2 La transformation catalysée par la pénicilline-acylase peut être réalisée de deux façons :

- \* par l'enzyme extraite et purifiée, utilisée sous forme immobilisée ;
- \* par le micro-organisme entier, par exemple *Pseudomonas melanogenum*, en fermenteur.

Comparer ces deux procédés (avantages et inconvénients).

Quels sont les avantages recherchés dans l'immobilisation des enzymes ?

Citer une technique d'immobilisation d'enzyme.

### 3 - PRODUCTION INDUSTRIELLE (18 points)

3.1 Pour la plupart des micro-organismes producteurs d'antibiotiques, une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose exerce une action négative dénommée répression catabolique ou "effet glucose" sur la biosynthèse des antibiotiques. Représenter schématiquement le mécanisme de la répression catabolique glucidique.

3.2 Pour permettre une bonne production d'antibiotique, on substitue au glucose une source glucidique lentement métabolisée, telle que le saccharose, exerçant un "effet glucose" réduit.

Afin d'optimiser la production industrielle, une étude cinétique de la  $\beta$ -fructosidase est réalisée dans différentes conditions. Les résultats sont consignés (DOCUMENT III).

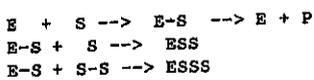
3.2.1 La vitesse initiale ( $v_i$ ) de la réaction est mesurée en fonction de différentes concentrations de saccharose ( $S_0$ ).

La figure I représente les courbes  $\frac{1}{v_i} = f \frac{1}{[S_0]}$

- Courbe A : en l'absence d'effecteur
- Courbe B : en présence de glucose
- Courbe C : en présence de fructose

Analyser les influences respectives du glucose et du fructose sur la cinétique de la  $\beta$ -fructosidase.

3.2.2 Dans les solutions de concentrations élevées en saccharose, les molécules de saccharose s'associent entre elles par l'établissement de liaisons hydrogènes intermoléculaires. On aboutit à un schéma du type suivant :



E-S = complexe enzyme-substrat  
S-S = dimère de saccharose  
ESS et ESSS = formes inactives

3.2.2.1 On peut définir trois zones sur la courbe  $v_i = f \{[S_0]\}$  représentée sur la figure II - Délimiter ces zones.

Indiquer pour chaque zone les différentes formes de l'enzyme totale et justifier le tracé obtenu.

A quel phénomène assiste-t-on ici ?

3.2.2.2 Déterminer le pourcentage d'enzyme efficace pour une concentration en saccharose de 1 mol.  $l^{-1}$ . Justifier le calcul et conclure.

#### **DEUXIEME PARTIE : UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES (30 points)**

Le chloramphénicol reste un antibiotique très employé dans la lutte contre la fièvre typhoïde.

#### 1 - MECANISME D'ACTION DU CHLORAMPHENICOL (8 points)

$$\frac{1}{v_i} (0^{-1})$$

Figure I. Etude cinétique de la  $\beta$ -fructofosfate

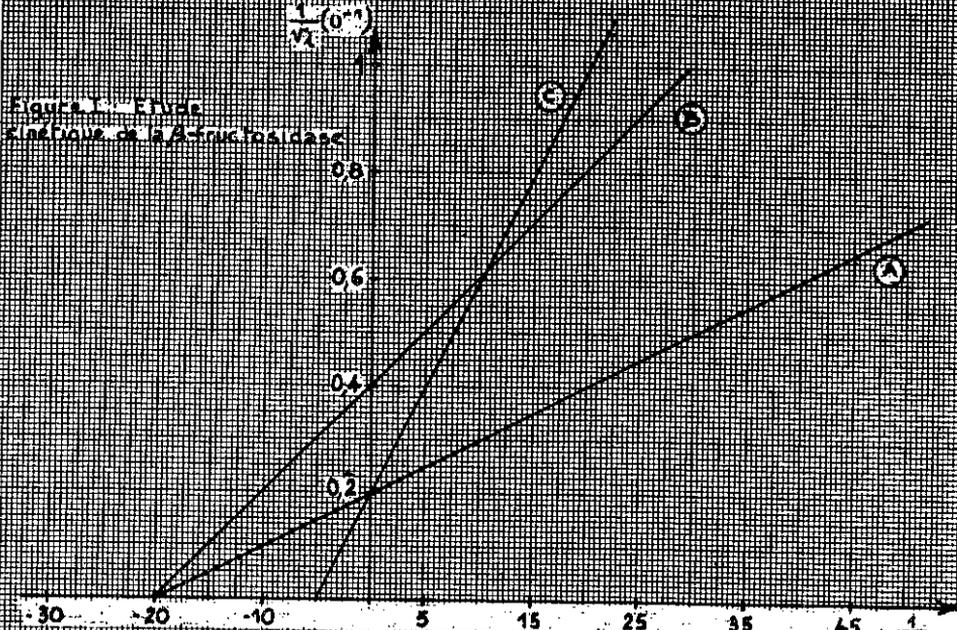
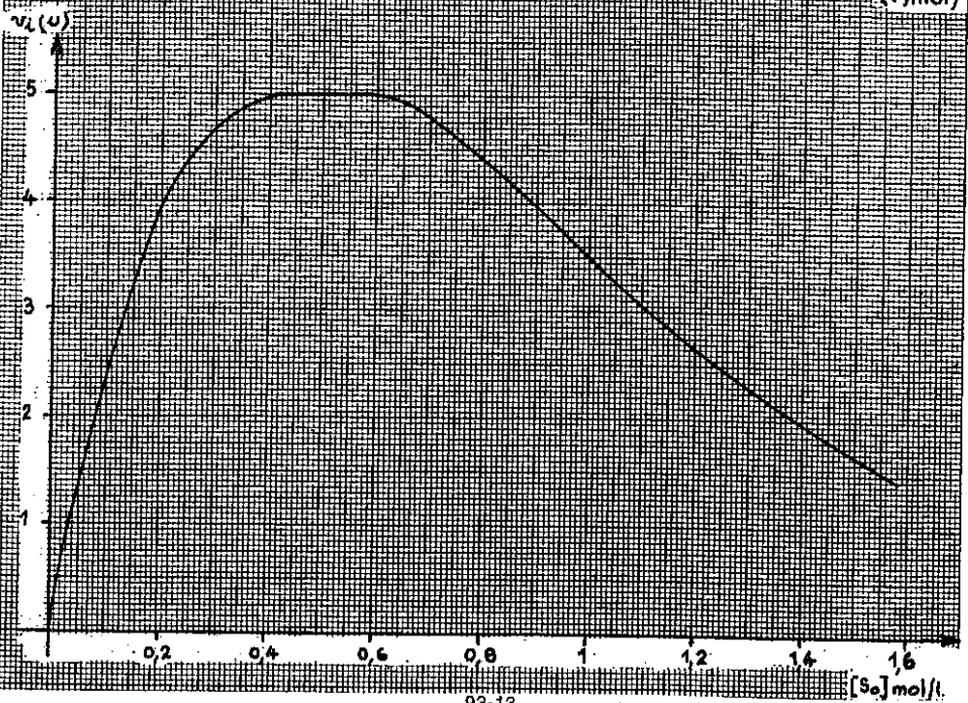


Figure II. Influence de la concentration en substrat  $[S_0]$  (l/mol)



Il se fixe au niveau du site amino-acyl de la grande sous-unité du ribosome bactérien.

Décrire à l'aide de schémas l'étape traductionnelle perturbée par la présence de cet antibiotique. Quelles en sont les conséquences pour la cellule bactérienne ?

## 2 - RESISTANCE AU CHLORAMPHENICOL (22 points)

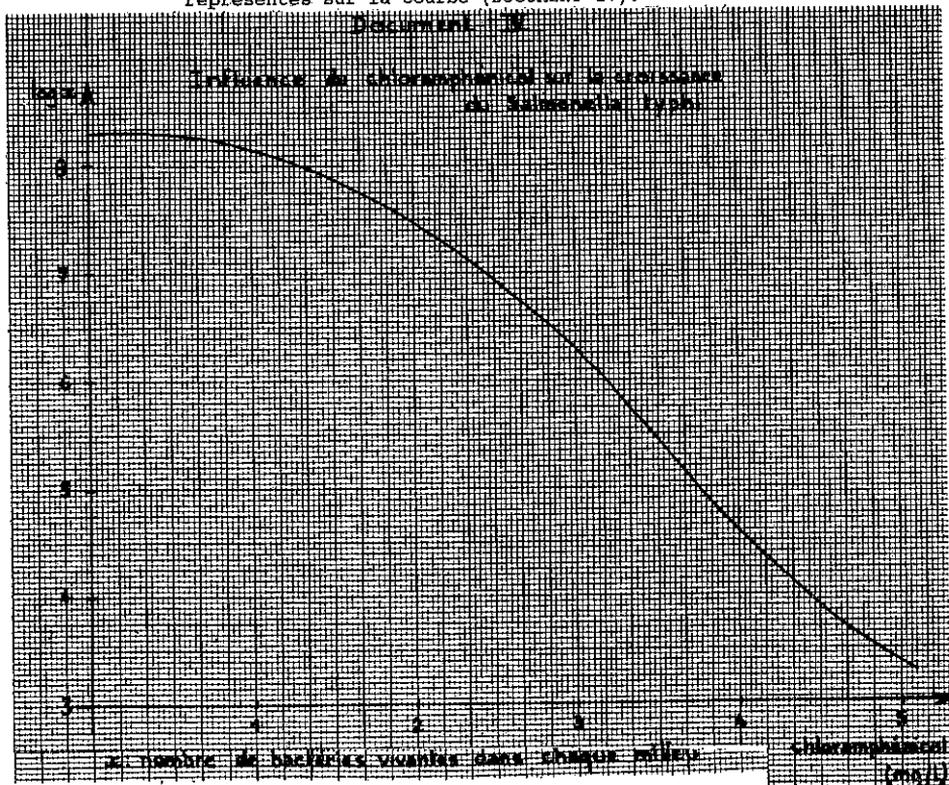
- 2.1 Des épidémies dues à des *Salmonella typhi* multi-résistantes aux antibiotiques, dont le chloramphénicol, sont fréquemment rapportées.

Quels sont les éléments qui confèrent à certaines souches ce caractère de multi-résistance ?  
Exposer succinctement leurs propriétés.

Donner les mécanismes biochimiques pouvant être utilisés par les bactéries pour exprimer leur résistance.

- 2.2 Traitement par le chloramphénicol : étude de l'activité in vitro.

On ensemence une série de tubes contenant le même milieu nutritif avec un inoculum de  $10^5$  *Salmonella typhi*. Les tubes ne diffèrent que par leur concentration en chloramphénicol. Après incubation convenable, les bactéries sont dénombrées. Les résultats sont représentés sur la courbe (DOCUMENT IV).



TROISIEME PARTIE : ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'UN ANTIBIOTIQUE (25 POINTS)

Répartition dans l'organisme (8 points)

On injecte par voie intramusculaire 300 000 unités d'une solution aqueuse de pénicilline G (1 unité = 0,6 µg). Les résultats de l'étude de sa concentration plasmatique P chez un adulte à fonction rénale normale sont consignés dans le tableau suivant :

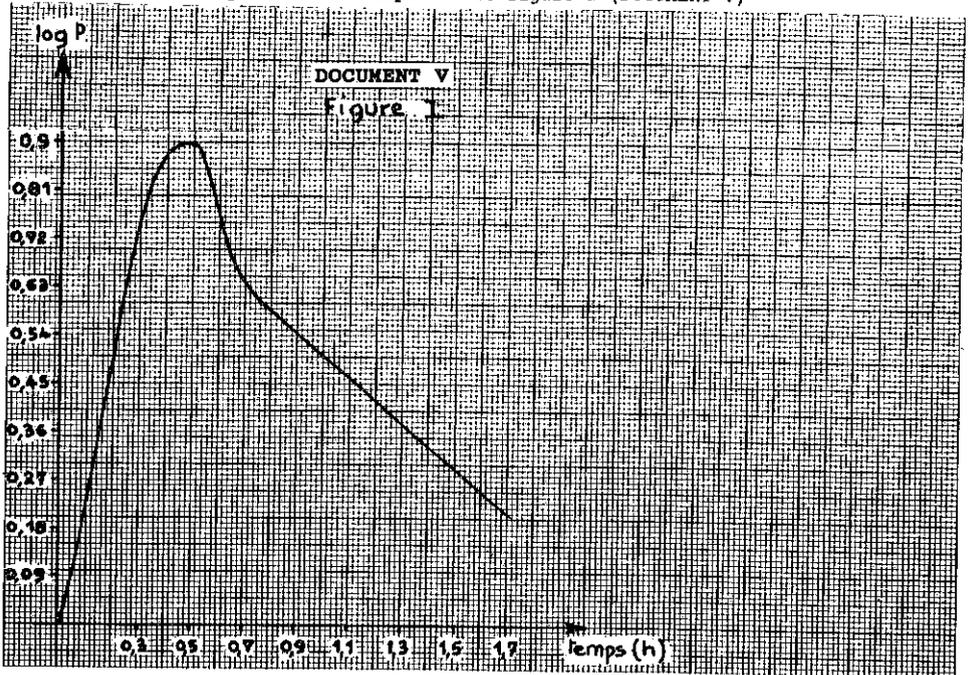
Définir et déterminer graphiquement la concentration minimale inhibitrice vis à vis de cette souche.

Comment évolue la concentration minimale inhibitrice chez une souche qui devient résistante ? Quelles en sont les conséquences thérapeutiques ?

Le chloramphénicol employé à fortes doses peut provoquer un choc endotoxinique. Pourquoi ?

TEMPS (h)	p (µg.ml <sup>-1</sup> )	log P
0,14	2,3	0,36
0,22	3,7	0,57
0,32	6,0	0,78
0,40	7,8	0,89
0,50	8,1	0,91
0,70	4,3	0,63
1,05	3,2	0,50
1,40	2,2	0,35
1,80	1,6	0,20

La courbe correspondante est représentée figure I (DOCUMENT V)



1.1 Délimiter les différentes phases de la courbe et commenter la pharmacocinétique de la répartition de l'antibiotique dans l'organisme.

1.2 Calculer la demi-vie d'élimination.

1.3 En cas d'utilisation du probénécide, qui diminue l'excrétion rénale de la pénicilline, la demi-vie d'élimination de celle-ci est de 4 heures. Comment peut-on adapter la posologie de l'antibiotique ? Justifier la réponse.

2 - **Elimination (17 points)**

La pénicilline est totalement excrétée au niveau rénal sans processus de modification moléculaire ; une faible partie est librement filtrée au niveau du glomérule, la plus grande partie est sécrétée au niveau du tubule.

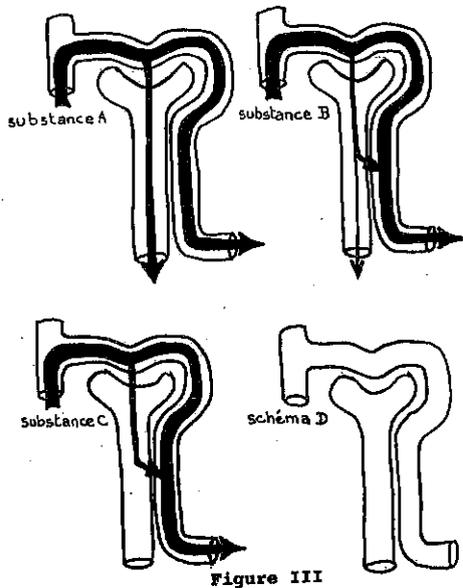
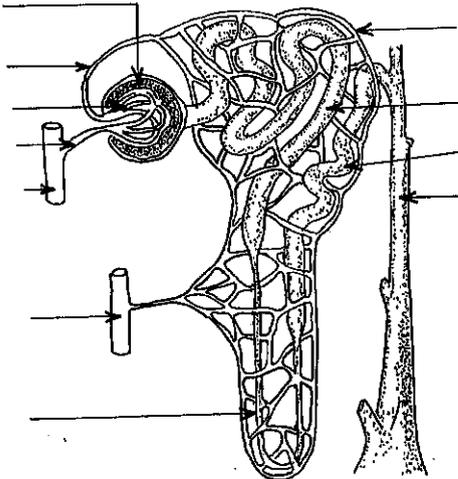
2.1 Légender la figure II du DOCUMENT V.

2.2 La figure III présente les différents mécanismes (symbolisés par les flèches) qui interviennent lors de l'élimination urinaire des substances A, B, C ; nommer ces mécanismes pour A, B, C.

En complétant le schéma D, représenter ceux intervenant pour la pénicilline G.

**DOCUMENT V Figure II**

A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE



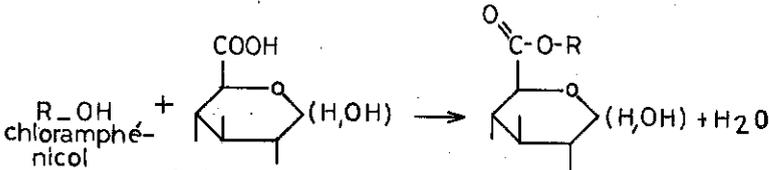
2.3 Connaissant les mécanismes d'élimination de la pénicilline G, représenter sur un même graphique :

- son débit de filtration glomérulaire en  $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$
  - son débit de sécrétion tubulaire en  $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$
  - son débit d'élimination urinaire en  $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$
- en fonction de sa concentration plasmatique P en  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Noter sur le graphique le taux maximum de sécrétion tubulaire ( $T_m$ ) ainsi que la concentration plasmatique minimale correspondante.

Par quel type de transport la pénicilline G est-elle sécrétée ? Justifier la réponse.

2.4 - D'autres antibiotiques tels que le chloramphénicol, subissent avant élimination, la transformation suivante :



2.4.1 Où s'effectue cette réaction dans l'organisme ?

2.4.2 De quel type de bio-transformation s'agit-il ?

Sous cette forme, que deviennent les propriétés pharmacodynamique et pharmacocinétique de l'antibiotique ?

## Epreuve professionnelle de synthèse

### première partie : étude d'opérations techniques

Durée 4 heures coefficient 4

Remarques préliminaires :

1- L'usage d'un dictionnaire "Anglais-Français" est autorisé.  
2- La lecture préalable de l'ensemble des documents n'est pas nécessaire avant d'aborder le sujet. Des précisions, quant à leur utilisation, sont fournies dans les questions.

3- Les trois parties du sujet sont indépendantes.

#### UTILISATION DE CULTURES CELLULAIRES

L'utilisation des cultures cellulaires permet d'étudier les actions physiologiques de nombreuses molécules :

- hormones
- seconds messagers.

I - REALISATION D'UNE CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES THYROIDIENNES DE PORC EN VUE D'UNE ETUDE DE L'ACTION DE LA THYRÉOSTIMULINE (T.S.H.) (22 points)

1.1 - Préparation des solutions :

Les différentes solutions nécessaires à la culture figurent sur le document 1.

DOCUMENT 1

1 - Solution de Earle : Solution S

Sels	masse pour 1 litre
NaCl	6,8 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1,58 g
KCl	0,4 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,3 g
Glucose	1,5 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g
Rouge de phénol	0,01 g

Dissoudre, ajuster à pH 7 avec NaOH 1 mol.l<sup>-1</sup>.  
Compléter à 1 litre avec de l'eau.

2 - Solution de trypsine : Solution S.T.

trypsine à 5,8 nkat.mg<sup>-1</sup>  
Dissoudre dans la solution S.  
Ajuster à pH 7.

3 - Solution d'EGTA : Solution S.E.

2,28 g d'EGTA par litre de solution S.  
Ajuster à pH 7 avec NaOH 1 mol.l<sup>-1</sup>

4 - Solution de Eagle :

Un lyophilisat de milieu de Eagle et 2,2 g de NaHCO<sub>3</sub> sont mis en solution. Le pH est 7,4 - 7,5.  
Compléter à 1 litre avec de l'eau.

5 - Solution d'hormone :

Dissoudre 1 mg de thyroestimuline bovine (TSH) à 30 UI.mg<sup>-1</sup>  
dans 2 ml de milieu de Eagle - sérum.  
Filtrer stérilement.

Prélever 1 ml, ajouter 29 ml de milieu de Eagle-sérum pour réaliser une solution mère de TSH.

1.1.1. - Calculer la masse de trypsine à peser pour réaliser un litre de solution de trypsine à 17,4 pkat.l<sup>-1</sup>.

1.1.2. - Calculer l'activité de la solution mère d'hormone TSH en UI.ml<sup>-1</sup>.

Déterminer le volume de solution mère à introduire par boîte de 10 ml pour avoir une concentration finale de 0,1 mUI.ml<sup>-1</sup>.

1.1.3. - Donner les techniques utilisables pour la stérilisation des solutions 1 à 3.

1.2 - Primo-explantation et cultures des cellules thyroïdiennes

Les glandes thyroïdes fraîchement prélevées sont placées dans la solution S. Les tissus adipeux et mésenchymateux entourant la glande sont retirés. Le tissu thyroïdien est séparé des autres tissus, haché et pesé.

### 1.2.1. - Traitement du tissu par la trypsine

La technique et les principaux réactifs figurent sur les documents 2, 3, 4.

- a) Quelle action a la trypsine sur le tissu ?
- b) Quelle autre technique pourrait-on utiliser ?
- c) Justifier l'utilisation du milieu S. E. lors de la trypsination.

#### DOCUMENT 2

Introduire le tissu thyroïdien haché dans une fiole de 1 litre et ajouter la solution S préalablement chauffée à 37°C.

Laver le tissu avec 2 litres de S chaud : 250 ml par lavage.

Bien agiter la fiole manuellement et laisser décanter.  
Enlever le surnageant qui contient les corps gras.

Après les lavages, introduire le tissu dans une deuxième fiole cylindroconique de 1 litre.

Ajouter 100 ml de S.E.

100 ml de S.T.

1 ml de solution d'antibiotique chauffé à 37°C

, 1 barreau magnétique stérile

Agiter 30 minutes à 37°C

Passer l'ensemble des phases sur une grosse passoire métallique.

Rincer le tissu avec du S chaud et le placer dans un béccher de 250 ml

Jeter le premier filtrat.

Hacher finement le tissu dans le béccher et le réintroduire dans la fiole cylindroconique de 1 litre.

Ajouter 100 ml de S.E.

100 ml de S.T.

Agiter 30 minutes à 37°C

Recommencer 4 fois depuis le passage dans la passoire mais en récupérant le filtrat dans 4 à 5 tubes de 100 ml que l'on place dans la glace. Compléter les tubes avec du S froid.

#### DOCUMENT 3

### Trypsin (from bovine pancreas) EG 3.4.21.4

#### Catalysed reaction :

Hydrolyses proteins, peptides, amides and esters specifically at the carboxyl groups of the basic amino acids L-arginine and L-lysine.

#### Characteristics :

Molecular weight : ca. 23 000

Isoelectric point : 10.5

pH-optimum : 8.0

Inhibitors : Natural inhibitors from pancreas, soybean, limabean and egg with ; organophosphorus compounds such as diisopropyl fluorophosphate ; several amines and amidines ; calcium.

Stability :

Store dry at 4°C ; no considerable loss of activity over a period of 12 months.

DOCUMENT 4

E G T A

Ethylene glycol-bis (  $\beta$ -aminoethylether) N, N, N', N' -tetra acetic acid. A chelating agent useful for the determination of calcium in the presence of magnesium.

1.2.2. - Préparation des suspensions cellulaires

Le filtrat précédent est centrifugé 7 min à 200 g. Le culot est repris par la solution S froide.

Les cellules sont lavées ensuite plusieurs fois, puis rassemblées dans 2 tubes contenant un mélange de milieu de Eagle, de sérum de veau foetal (10 %), d'antibiotiques et de fongizone, le volume étant ajusté à 100 ml.

Cette suspension est soumise à deux contrôles :

- un contrôle quantitatif : détermination du nombre de cellules.
- un contrôle qualitatif : détermination du nombre de cellules vivantes.

a) Pourquoi est-il préférable de caractériser la centrifugation par le nombre de g plutôt que par le nombre de tours par minute ?

b) Pour chaque type de contrôle, donner le principe d'une technique utilisable.

c) Quels sont les rôles du sérum de veau foetal ajouté au milieu de culture ?

d) La suspension cellulaire est diluée pour obtenir une suspension à  $2 \cdot 10^6$  cellules par ml.

Préciser les précautions à prendre lors de ce type de manipulation.

II - PROBLEMES POSES PAR LA CONTAMINATION DES CULTURES CELLULAIRES : (22 points)

2.1 - Contamination par un mycoplasme (bactérie dépourvue de paroi et cultivant difficilement).

Une culture cellulaire est contaminée par un mycoplasme, suite à une faute d'asepsie. Ce mycoplasme est isolé et cultivé en milieu convenable.

On désire tester la sensibilité de la souche à différents antibiotiques :

- doxycycline DOX
- minocycline MIN
- érythromycine ERY

2.1.1 - Les solutions-mères d'antibiotiques sont à la concentration de  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Elles sont utilisées après dilution, à trois concentrations différentes notées :

DOX 1, DOX 2, DOX 3  
 MIN 1, MIN 2, MIN 3  
 ERY 1, ERY 2, ERY 3

Expliquer la préparation de ces trois dilutions pour la doxycycline :

DOX 1 solution à  $80 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  ; volume final 2 ml.  
 DOX 2 solution à  $8 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  ; volume final 1 ml.  
 DOX 3 solution à  $0,8 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  ; volume final 1 ml.

2.1.2 - On réalise la microplaque schématisée sur le document 5.

	1	2	3	4	5	6
A	DOX1	DOX1	DOX2	DOX2	DOX3	DOX3
B	MIN1	MIN1	MIN2	MIN2	MIN3	MIN3
C	ERY1	ERY1	ERY2	ERY2	ERY3	ERY3
D						
E	/ / / / / /	/ / / / / /	/ / / / / /	/ / / / / /	/ / / / / /	/ / / / / /
F	/ / / / / /	/ / / / / /	/ / / / / /	/ / / / / /	/ / / / / /	/ / / / / /

DOCUMENT 5  
Schéma de  
la microplaque

témoins

2.1.2.1 - Les cupules des lignes A, B, C reçoivent :

- 50  $\mu\text{l}$  de suspension de mycoplasme
- 100  $\mu\text{l}$  de milieu pour antibiogramme
- 50  $\mu\text{l}$  de solution d'antibiotique.

Calculer les concentrations finales en  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de doxycycline dans les cupules A<sub>1</sub> à A<sub>6</sub>.

2.1.2.2 - Parmi les témoins réalisés :

- la cupule E reçoit 150  $\mu\text{l}$  de milieu pour antibiogramme et 50  $\mu\text{l}$  de suspension de mycoplasme
- la cupule F reçoit 50  $\mu\text{l}$  de DOX à  $2 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ , 100  $\mu\text{l}$  de milieu pour antibiogramme et 50  $\mu\text{l}$  de suspension de mycoplasme.

Discuter la nécessité de ces témoins dans les cupules E<sub>1</sub> et F<sub>1</sub>.

2.1.3. - La microplaque est observée chaque jour.

La lecture est possible lorsque le changement de couleur du milieu est stabilisé pendant deux jours consécutifs. La valeur de la C.M.I. (concentration minimale inhibitrice) correspond à la dernière dilution pour laquelle un changement de couleur est observé :

- présence de mycoplasme : coloration jaune
- absence de mycoplasme : coloration rouge.

Proposer un aspect de la microplaque pour une souche dont la C.M.I. vis à vis de la doxycycline est de  $2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ . Justifier la réponse.

## 2.2 - Contamination bactérienne :

On veut déterminer la C.M.I., vis à vis de la streptomycine, d'une souche bactérienne Z trouvée dans le filtre de la hotte à flux laminaire.

Proposer un plan de travail pour la détermination de la C.M.I. (méthode en milieu liquide) de cette souche Z.

Faire apparaître le matériel, les milieux, l'inoculum, les réactifs et les différentes étapes.

III - ETUDE STRUCTURALE D'UNE MOLECULE INFORMATIVE X INTERVENANT DANS UNE VOIE DE COMMUNICATION INTRACELLULAIRE : (36 points)

Extraction du constituant X :

On traite le tissu par un mélange de chloroforme, méthanol, acide chlorhydrique à  $0,45 \text{ mol.l}^{-1}$  (20 V : 40 V : 13 V).

On homogénéise.

On extrait par du chloroforme.

On recueille la phase organique que l'on concentre sous azote.

Le concentrat est traité par chromatographie sur colonne. On regroupe les fractions contenant X. Après hydrolyse enzymatique de ces fractions par une phospholipase C, on isole deux molécules X1 et X2.

Donnée : La phospholipase C est une hydrolase qui scinde les phosphoglycérolipides en diacylglycérol et ester phosphorique.

3.1 - Analyse de X1 :

3.1.1 - On soumet une solution organique de X1 à une transestérification (document 6).

DOCUMENT 6

PREPARATION D'ESTERS METHyliQUES

A PARTIR D'UN CORPS GRAS NEUTRE (TRANSESTERIFICATION)

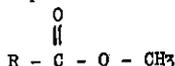
PREPARATION

- 1) Dans un tube de verre, introduire :  
2 gouttes (environ 40 mg) de corps gras,  
ajouter 1 ml d'hexane,  
agiter 2 s environ.
- 2) Introduire ensuite à l'aide d'une pipette :  
0,2 ml d'hydroxyde de sodium à  $2 \text{ mol.l}^{-1}$  dans du méthanol,  
boucher le tube,  
agiter 10 s environ,  
porter 20 s au bain-marie à  $50^\circ\text{C}$ ,  
agiter encore 10 s.
- 3) Ajouter :  
0,2 ml d'acide chlorhydrique à  $2 \text{ mol.l}^{-1}$  dans du méthanol.  
Agiter et laisser décanter.

Le prélèvement pour injection dans le chromatographe se fera dans la phase surnageante.

RESULTAT :

Les glycérides sont hydrolysés.  
Les acides gras passent sous la forme :



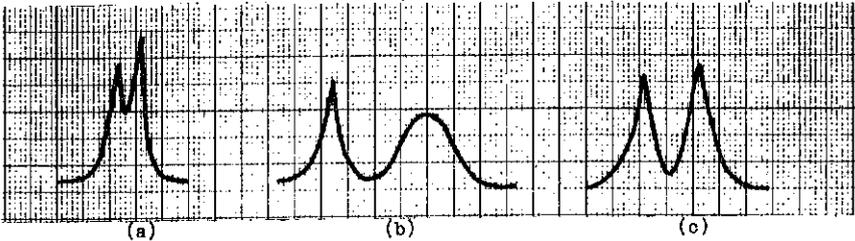
Les esters d'acides gras de la phase surnageante sont étudiés par chromatographie en phase gazeuse.

- Donner brèvement le principe de cette analyse chromatographique.
- Expliquer l'importance de la méthylation des acides gras pour la chromatographie en phase gazeuse.

3.1.2 - Le document 7 regroupe différents résultats. Faire une étude critique des enregistrements (a), (b) et (c). Quels facteurs a-t-on pu modifier pour passer de (a) à (b) et de (b) à (c) ?

**DOCUMENT 7**

Enregistrements obtenus en chromatographie phase gazeuse.



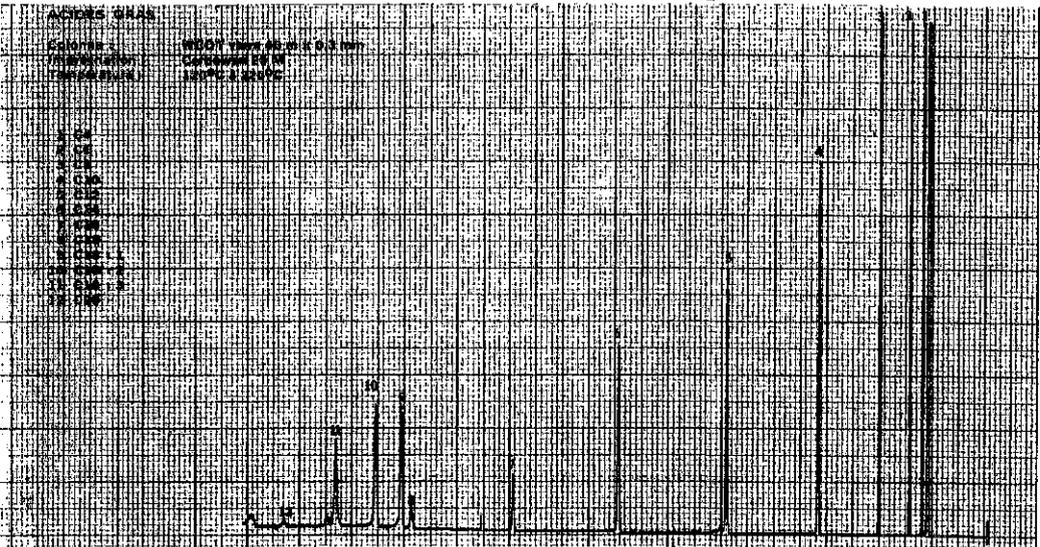
**3.1.3 - Identification des pics :**

Le document 8 est un enregistrement obtenu à l'aide d'un mélange étalon.

L'analyse du mélange provenant de X1 permet d'identifier deux pics dont les temps de rétention sont respectivement de 7,50 min et 9,25 min. Sachant que la vitesse de défilement du papier est de  $1,2 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ , identifier les deux pics.

**DOCUMENT 8**

**SEPARATION D'UN MELANGE ETALON D'ESTERS METHILIQUES D'ACIDES GRAS**



← Sens du déroulement du papier

3.1.4 - Dosage du glycérol dans la phase inférieure neutralisée obtenue après la transestérification.

On dispose de la fiche technique correspondante (document 9)

- Dégager les caractéristiques de ce type de dosage du substrat.

- Lorsqu'on utilise une formule permettant d'exprimer la concentration à partir d'une variation d'absorbance, quel contrôle de qualité important doit-on faire subir régulièrement au spectrophotomètre ? Comment procède-t-on ?

DOCUMENT 9

# Glycerol

## UV-method

for the determination of glycerol in foodstuffs and other materials

Cat.No. 148270

**Test-Combination**  
for 3 x 10 determinations

### Principle

In the reaction catalyzed by glycerokinase (GK), glycerol is phosphorylated by adenosine-5'-triphosphate (ATP) to glycerol-3-phosphate (1).

(1) Glycerol + ATP  $\xrightarrow{GK}$  glycerol-3-phosphate + ADP  
The adenosine-5'-diphosphate (ADP) formed in the above reaction is reconverted by phosphoenolpyruvate (PEP) with the aid of pyruvate kinase (PK) into ATP with the formation of pyruvate (2).

(2) ADP + PEP  $\xrightarrow{PK}$  ATP + pyruvate  
In the presence of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) pyruvate is reduced to lactate by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH) with the oxidation of NADH to NAD (3).

(3) Pyruvate + NADH + H<sup>+</sup>  $\xrightarrow{LDH}$  lactate + NAD<sup>+</sup>  
The amount of NADH consumed in the above reaction is stoichiometric with the amount of glycerol. NADH is determined by means of its absorption at 334, 340 or 365 nm.

### Each Test-Combination Contains

- Three bottles 1 with 2 g coenzyme/buffer mixture each, consisting of glycolylglycine buffer - pH 7.4  
NADH - 7 mg  
ATP - 22 mg  
PEP - 11 mg  
magnesium sulphate stabilizers
- Bottle 2 with 0.4 ml enzyme suspension, consisting of pyruvate kinase - ca. 240 U  
lactate dehydrogenase - ca. 220 U
- Bottle 3 with 0.4 ml enzyme suspension glycerokinase - ca. 34 U

### Preparation of Solutions for 10 Determinations

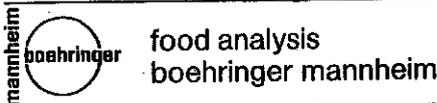
- Dissolve contents of one bottle 1 with 11 ml redist. water. Before use let the solution stand for about 10 min at room temperature.
- Use contents of bottle 2 undiluted.
- Use contents of bottle 3 undiluted.

### Stability of Solutions

Solution 1 is stable for 4 days at +4°C.  
Suspensions of bottles 2 and 3 are stable for 1 year at +4°C.

### Procedure

Wavelength: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm  
Glass cuvette: 1 cm light path  
Temperature: 20 - 25°C



Recommendations to methods and standardized procedures see references.

Final volume: 3.02 ml  
Read against air (without cuvette in the light path) or against water.  
Sample solution: 3-50 µg glycerol/cuvette<sup>2</sup> (In 0.1-2.0 ml sample volume).

pipette into cuvettes	blank	sample
solution 1	1.00 ml	1.00 ml
redist. water	2.00 ml	1.90 ml
sample solution	-	0.10 ml
suspension 2	0.01 ml	0.01 ml
mix, after completion of the reaction (ca. 6-7 min) read absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ). Start reaction by addition of		
suspension 3	0.01 ml	0.01 ml
Mix, wait for the completion of the reaction (ca. 5-10 min) and read the absorbances of the solutions (A <sub>2</sub> ). If the reaction has not stopped after 15 min, continue to read the absorbances at 2 min intervals until the absorbance decreases constantly.		

If the absorbance at A<sub>2</sub> decreases constantly, extrapolate the absorbances to the time of the addition of suspension 3.

Calculate the absorbance differences (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) for the blank and the sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = \Delta A_2 - \Delta A_1$$

### Calculation

According to the general formula for calculating the concentration the equation is:

$$c = \frac{V \times MW}{e \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

where V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed

d = light path [cm]

c = absorption coefficient of NADH at:

340 nm = 6.3 [l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]

Hg 365 nm = 3.4 [l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]

Hg 334 nm = 6.18 [l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]

It follows for glycerol

$$c = \frac{3.02 \times 92}{e \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta A = 2.701 \times \frac{\Delta A}{c} \text{ [g glycerol/l sample solution]}$$

If the sample was diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

1 The absorption maximum of NADH is at 340 nm. With spectrophotometers, measurements are made at the absorption maximum; when employing spectrum line photometers equipped with a mercury vapour lamp, measurements are made at a wavelength of 365 nm or 334 nm.

2 Disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes, if desired.

3 See instructions for performance of assay and sample preparation.

- Les résultats obtenus avec un spectrophotomètre à spectre continu donnent une variation d'absorbance de 0,790 à partir de 4,4 mg de X1 dans un volume de 2 ml de phase inférieure.

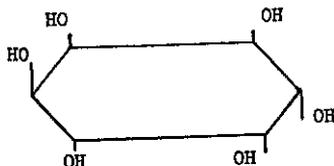
- La cuve utilisée a un trajet optique de 1 cm.

En déduire la masse molaire de X1. Ces résultats sont-ils concordants avec ceux obtenus en 3.1.3 ?

### 3.2 - Analyse de X2

Une analyse par chromatographie sur couche mince a permis de montrer que X2 contient de l'inositol.

#### Formule de l'inositol



La masse molaire de X2 est égale à  $420 \text{ g.mol}^{-1}$

Un dosage colorimétrique de phosphore sur un minéralisat de X2 a donné les résultats suivants : 183  $\mu\text{g}$  de X2 renferment 41  $\mu\text{g}$  de phosphore.

Faire une synthèse de tous les résultats expérimentaux et proposer un schéma structural possible pour X.

Données : C = 12  $\text{g.mol}^{-1}$     H = 1  $\text{g.mol}^{-1}$     O = 16  $\text{g.mol}^{-1}$     P = 31  $\text{g.mol}^{-1}$

## Epreuve professionnelle de synthèse

### deuxième partie : réalisation pratique d'opérations techniques

Sujet 1

Durée 10 heures    coefficient 8

UTILISATION DE CULTURES CELLULAIRES :  
PRODUCTION D'UNE PROTEINE P PAR FERMENTATION

#### A - BIOCHIMIE - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Durée : 4 H 30

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

#### BIOCHIMIE (80 points)

La production d'une protéine P par une bactérie transformée est envisagée par fermentation.

Deux fermentations pilotes ont été réalisées au laboratoire :

- la fermentation A donne les résultats attendus ; on procédera à une purification de la protéine P par chromatographie d'échange d'ions.
- la fermentation B présente une anomalie. Plusieurs hypothèses sont émises : présence d'une contamination microbienne, insuffisance en substrat énergétique. Un dosage du glucose dans le moût de fermentation est donc envisagé.

## 1 - PURIFICATION DE LA PROTEINE P PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

A l'issue de la fermentation A (croissance bactérienne en phase stationnaire), on procède à une filtration stérilisante du moût de fermentation ; le filtrat obtenu est un mélange M des constituants du milieu de culture (peptones, oses, sels minéraux) et de la protéine P recherchée.

Il s'agit d'obtenir une fraction purifiée en protéine P à partir du mélange M. Les caractéristiques physico-chimiques bien différentes entre les constituants du milieu de culture et la protéine P permettent d'envisager une purification par chromatographie d'échange d'ions.

### 1.1. Chromatographie :

#### Données préalables

L'échangeur d'ions utilisé est une cellulose DEAE dont le groupement fonctionnel est une amine quaternaire.

Les tampons proposés sont les suivants :

- tampon B1 : Tris HCl 0,025 mol/l pH 8,8 NaCl 0,035 mol/l,
- tampon B2 : Tris HCl 0,05 mol/l pH 8,0 NaCl 0,75 mol/l.

#### Matériel disponible

- colonne pour chromatographie complète,
- système d'arrêt d'écoulement et de régulation du débit,
- agitateur de verre,
- bécher contenant 5 g de l'échangeur d'ions prégonflé dans environ 50 ml de tampon de B1.

#### Mode opératoire

Préparer la colonne : couler la totalité de la suspension d'échangeur d'ions disponible.

Conditionner l'échangeur d'ions : faire passer un volume de tampon B1 double de celui du gel.

Déposer 2 ml du mélange M. Faire pénétrer. Rincer les parois de la colonne avec 2 ml de tampon B1.

Eluer avec un volume de tampon B1 double ou triple de celui du gel et recueillir l'éluat dans une fiole jaugée de 100 ml.

Dans ces conditions, tous les constituants protéiques du milieu de culture sont retenus, seuls la protéine P est filtrée.

Ajuster la fiole au trait de jauge avec de l'eau physiologique en évitant la formation de "mousse" ; on obtient la solution P.

Régénérer l'échangeur d'ions en faisant passer environ 50 ml de tampon B2. Recueillir l'éluat dans une fiole jaugée de 100 ml.

Ajuster au trait de jauge avec de l'eau physiologique en évitant la formation de "mousse" ; on obtient la solution S.

## 1.2 - Dosage protéique par la méthode de Folin-Lowry

### 1.2.1 Réalisation de la gamme d'étalonnage

- A partir d'une solution étalon de sérum albumine bovine (S.A.B.) à 500 mg/l, introduire des quantités croissantes de 50 à 250 µg de S.A.B. par tube dans un volume maximal de 1 ml.
- Compléter à 1 ml avec de l'eau physiologique (solution de NaCl à 9 g/l).
- Ajouter 5 ml de réactif C et homogénéiser le contenu des tubes.
- Attendre 10 minutes.
- Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (à diluer juste avant emploi au 1/2 dans de l'eau distillée).
- Attendre au moins 30 minutes à l'obscurité le développement de la coloration.
- Lire l'absorbance de chaque tube à 660 nm.

### 1.2.2 Dosages (2 essais par solution testée)

On effectuera un dosage sur :

- 1 ml d'une dilution en eau physiologique au 1/200 du mélange M.
- 1 ml de la solution P.
- 1 ml d'une dilution au 1/2 de la solution S.

Remarque : la coloration, après développement, est stable plusieurs heures.

## 1.3 - COMPTE RENDU

Donner les conditions de la chromatographie : volumes d'éluant utilisés.

Dresser le tableau de colorimétrie.

Tracer, sur papier millimétré, la courbe d'étalonnage : on rappelle que les résultats obtenus ne conduisent pas systématiquement à l'obtention d'une droite.

Déterminer les concentrations massiques des solutions M, P et S.

Conclure quant à l'efficacité de la séparation chromatographique.

## 2 - DOSAGE DU GLUCOSE DANS UN MOUT DE FERMENTATION

En cours de fermentation B, un prélèvement a subi une filtration stérilisante. On effectue un dosage de glucose par une technique standardisée.

A l'aide de la fiche technique jointe, réaliser ce dosage : 2 essais, sur le moût B (sans dilution préalable) et un témoin. Les réactifs nécessaires sont fournis prêts à l'emploi.

Compte rendu :

Donner la concentration massique en glucose du moût de fermentation.

# D-Glucose



chimie  
alimentaire

## Méthode UV

Pour la détermination du D-glucose dans les aliments.

Réf. 716 251

Test-combination pour environ 3 x 40 déterminations

## Principe (Réf. 1-2)

Le D-glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G-6-P) en présence d'hexokinase (HK) et d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) (1).



En présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH), le glucose-6-phosphate est oxydé par le nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate (NADP) en gluconate-6-phosphate. Il se forme du nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate réduit (NADPH) (2).



La quantité de NADPH formée au cours de la réaction est proportionnelle à la quantité de D-glucose. On la mesure par l'augmentation de l'absorption à 334 nm, 340 nm, ou 365 nm.

## Composition du coffret

1 - 3 flacons 1 contenant env. 7,2 g de lyophilisat, composé de Tampon triéthanolamine - pH 7,6

NADP - 110 mg

ATP - 260 mg

Sulfate de magnésium

Stabilisateurs

2 - 3 flacons 2 contenant env. 1,1 ml de suspension enzymatique composée de :

Hexokinase - env. 320 U

Glucose-6-phosphate déshydrogénase - env. 160 U

3 - Solution aqueuse, stabilisée de D-glucose (standard)

## Préparation des solutions

1 - Dissoudre le contenu d'un flacon 1 avec 45 ml d'eau bidistillée.

2 - Utiliser le contenu d'un flacon 2 sans diluer.

3 - Utiliser le contenu du flacon standard tel quel (la concentration est indiquée sur l'étiquette).

## Stabilité des solutions

La solution 1 est stable 4 semaines à +4 °C et 2 mois à -20 °C.

Le contenu des flacons 2 est stable 1 an à +4 °C.

Ramener les solutions réactionnelles à 20-25 °C avant utilisation.

## Mode opératoire

Longueur d'onde : 340 nm, 365 nm (Hg) ou 334 nm (Hg)

Cuve de verre : 1 cm d'épaisseur

Température : 20 à 25 °C

Volume du test : 3,02 ml

### IMMUNOLOGIE (42 points)

#### Première partie : Sensibilisation d'une plaque de microtitration

Distribuer dans chaque cupule de la barrette représentée ci-dessous 100 µl de solution d'anticorps anti-protéine P (étiquetée AC) à 5 µg/ml sauf dans la cupule C<sub>2</sub> dans laquelle on introduit 100 µl de tampon carbonate-hydrogénéocarbonate.

Recouvrir la barrette avec une feuille autocollante ; Incuber 2 h à 37°C puis placer à 4°C.

Mesure contre l'air (pas de cuve dans le trajet optique) ou contre l'eau.

Solution d'essai : 4 - 100 µg de D-glucose/cuve (dans 0,1-2,0 ml d'échantillon).

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai
Solution 1	1,0 ml	1,0 ml
Solution échantillon	—	0,1 ml
Eau bidistillée	2,0 ml	1,9 ml

Mélanger . Après env. 3 min. lire l'absorbance des solutions (A<sub>1</sub>). Déclencher la réaction par addition de :

Suspension 2	0,02 ml	0,02 ml
--------------	---------	---------

Mélanger , attendre la fin de la réaction (env. 10 à 15 min.) et lire l'absorbance des solutions (A<sub>2</sub>).  
Si la réaction n'est pas terminée après 15 min. continuer à lire les absorbances de 5 min. en 5 min. jusqu'à ce que l'augmentation d'absorbance soit constante sur 5 min.

Si l'on observe pour A<sub>2</sub> des augmentations d'absorbance constantes, extrapoler les absorbances au temps de l'addition de la suspension 2. Calculer les différences d'absorbance (A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub>) du témoin et de l'essai.

Déduire la différence d'absorbance du témoin de celle de l'essai.

On obtient :  $\Delta A_{(\text{glucose})}$

Afin d'obtenir des résultats exacts et valables, il est nécessaire que la différence d'absorbance mesurée pour les essais soit d'au moins 0,100.

## Calcul

La formule générale pour le calcul des concentrations est la suivante :

$$c = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = volume du test (ml)

v = volume de l'essai (ml)

PM = poids moléculaire de la substance à doser

d = épaisseur de la cuve (cm)

ε = coefficient d'absorption du NADPH :

340 nm = 6.3 (l. mmole<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>)

Hg 365 nm = 3.5 (l. mmole<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>)

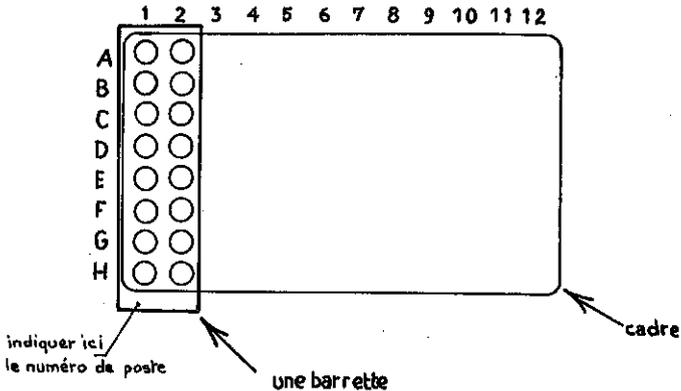
Hg 334 nm = 6.18 (l. mmole<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>)

On obtient pour le glucose :

$$c = \frac{3,02 \times 180,16}{\epsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times \Delta A_{(\text{glucose})}$$

$$= 5,441 \times \frac{\Delta A_{(\text{glucose})}}{\epsilon} \quad (\text{g de glucose/l de solution d'échantillon})$$

Ne pas oublier de noter le n° de poste sur la barrette.



**B - MICROBIOLOGIE - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (80 points) Durée : 2 H 15**

Les manipulations seront réalisées selon l'ordre précisé sur le lieu de l'épreuve.

Deux fermenteurs ont été ensemencés par une souche d'*Escherichia coli* transformée par un plasmide pour la synthèse industrielle d'une protéine P. Des contrôles sont effectués en cours de production.

**MICROBIOLOGIE (38 points)**

**PREMIER JOUR**

**1 - CONTROLE DE LA PURETE DE LA SOUCHE**

- 1.1 La présence de micro-organismes contaminants est révélée dans un fermenteur par un isolement sur gélose TS incubée à 37°C pendant 24 h (étiquetée M).
  - Réaliser une coloration de Gram sur les colonies suspectes.
- 1.2 L'utilisation d'un antibiotique est envisagée pour éliminer le contaminant. Pour des raisons économiques, on utilise une concentration minimale efficace en antibiotique. Celle-ci est déterminée par la mesure de la concentration minimale inhibitrice. On dispose d'une culture pure du contaminant en bouillon de Mueller-Hinton (étiquetée S).

- A partir d'une solution d'antibiotique à 2 000 U par ml, réaliser des dilutions de l'antibiotique, en progression géométrique de raison 10, en bouillon de Mueller-Hinton jusqu'à  $2 \cdot 10^{-6}$  U par ml.

- Diluer la culture bactérienne au 1/1 000 : 0,1 ml dans 100 ml de bouillon de Mueller-Hinton.

- Dans une série de tubes à hémolyse introduire :

- 1 ml de chacune des dilutions,
- 1 ml de la suspension bactérienne diluée.

- Incuber à 37 °C pendant 24 h.

**2 - RECHERCHE DE L'ORIGINE DE LA CONTAMINATION**

Le milieu nutritif de base utilisé pour la culture de la souche productrice est contrôlé.

- Réaliser le dénombrement des micro-organismes revivifiants à 30 °C, selon la technique de la double couche, dans ce milieu nutritif de base non dilué et dilué au 1/10 et au 1/100.

La gélose dénombrement est conservée en surfusion.

## IMMUNOLOGIE (42 POINTS)

### DEUXIEME PARTIE

#### DOSAGE DE LA PROTEINE P PAR METHODE IMMUNO-ENZYMATIQUE

On se propose de doser la protéine P produite dans le milieu de fermentation par la technique E.L.I.S.A..

Le dosage est réalisé sur 2 échantillons 1 et 2 prélevés respectivement dans chaque fermenteur.  
On réalise en parallèle, dans une barrette de plaque de microtitration à fond plat, un étalonnage à partir d'une solution étalon de la protéine P et un dosage sur 2 dilutions de chacun des échantillons.

#### 1 - REACTIFS ET ECHANTILLONS UTILISES

P.B.S. - gélatine  
P.B.S. - Tween  
P.B.S. - Tween - gélatine  
Solution étalon de protéine P à 1,6 µg/ml dans le P.B.S.  
- Tween - gélatine  
Echantillons 1 et 2 à doser : dilutions fournies dans le P.B.S. - Tween - gélatine.

##### \* échantillon 1 :

- dilution au 1/10 000 : P1
- dilution au 1/40 000 : P'1

##### \* échantillon 2 :

- dilution au 1/10 000 : P2
- dilution au 1/40 000 : P'2

En première partie, la barrette a été traitée, selon le protocole suivant :

- Dépôt dans chaque cupule de la microplaque de 100 µl de solution d'anticorps anti-protéine P à 5 µg/ml sauf dans la cupule C2 dans laquelle on a introduit 100 µl de tampon.
- Incubation 2 heures à 37°C. Stockage à 4°C.

#### 2 - MODE OPERATOIRE

##### 2.1 Saturation des sites de fixation non spécifiques

Vider, par retournement, la barrette de la solution sensibilisante.  
Laver 1 fois avec 200 µl de P.B.S..  
Saturer les sites de la barrette avec 100 µl d'une solution de P.B.S. - gélatine à 5 g/l.  
Recouvrir la barrette avec une feuille autocollante et incuber 30 min à 37°C.

Vider la barrette par retournement, la sécher par tapotement sur une feuille de papier filtre.  
Rincer 3 fois avec du P.B.S. - Tween.

## 2.2 Dilutions de la solution étalon

Dans la microplaque vierge fournie, réaliser des dilutions en série (progression géométrique de raison 2) de la solution étalon de protéine P dans le P.B.S. - Tween - gélatine (sous un volume final de 200  $\mu$ l).

## 2.3 Etalonnage

Déposer ces dilutions sous un volume de 100  $\mu$ l par cupule dans les cupules B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, A2, B2 de la barrette (cf schéma ci-dessous).

## 2.4 Témoins

Dans les cupules A1 et C2, introduire 100  $\mu$ l de solution étalon de protéine P.

Dans la cupule D2, introduire 100  $\mu$ l de P.B.S. - Tween - gélatine.

## 2.5 Dosage

Réaliser un essai sur 100  $\mu$ l de chacune des dilutions des échantillons 1 et 2 : cupules E2, F2, G2, H2.

Recouvrir la plaque avec la feuille autocollante et incuber 1 heure à 37°C, puis à 4°C jusqu'au lendemain.

Donnée :

Identification des cupules de la barrette.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Blanc	Et1	Et2	Et3	Et4	Et5	Et6	Et7
2	Et8	Et9	T	T'	P1	P1'	P2	P2'

## B - MICROBIOLOGIE-BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (80 points) Durée : 3 H 15

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

### MICROBIOLOGIE (38 points)

DEUXIEME JOUR

#### 1 - CONTROLE DE LA PURETE DE LA SOUCHE

- Déterminer la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique vis à vis du contaminant.
- Conclure.

#### 2 - RECHERCHE DE L'ORIGINE DE LA CONTAMINATION

- Dénommer les micro-organismes revivifiables à 30°C.
- Conclure.

IMMUNOLOGIE (42 points)

TROISIEME PARTIE

DOSAGE DE LA PROTEINE P PAR METHODE IMMUNO-ENZYMATIQUE

1 - REACTIFS UTILISES

Solution de conjugué (anti-protéine P marqué par la phosphatase alcaline) à 1µg/ml.

Solution de substrat : paranitrophénylphosphate (P.N.P.P.) à 1 mg/ml en tampon Tris pH = 9,8.

Solution de NaOH à 1 mol/l.

P.B.S. - Tween.

2 - ETAPES OPERATOIRES

- Laver la plaque 5 fois avec le P.B.S. - Tween.
- Distribuer 100 µl de la solution de conjugué dans toutes les cupules sauf le blanc (cupule A1).
- Recouvrir la plaque et incuber 1 heure à 37°C.
- Laver la plaque 5 fois avec le P.B.S. - Tween.
- Distribuer 100 µl de solution de substrat dans toutes les cupules.
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Arrêter la réaction par 50 µl de solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l.
- Lire l'absorbance filtre 410 nm contre le blanc.

3 - COMPTE RENDU

Construire un tableau des résultats expérimentaux.

Tracer sur papier millimétré la courbe d'étalonnage :

$$A = f [\log(C \text{ protéine P en ng/ml})]$$

Justifier la réalisation des différents témoins. Conclure sur les résultats obtenus pour chacun d'eux.

Calculer la concentration en protéine P de chaque échantillon. Conclure.

Donnée : Identification des cupules de la Barrette :

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Blanc	Et1	Et2	Et3	Et4	Et5	Et6	Et7
2	Et8	Et9	T	T'	P1	P'1	P2	P'2

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**deuxième partie : réalisation pratique d'opérations**  
**techniques      Sujet 2**  
**Durée 9,5 heures      coefficient 8**

**UTILISATION DE CULTURES CELLULAIRES**

**A - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE (80 points)**

**Durée : 5 H**

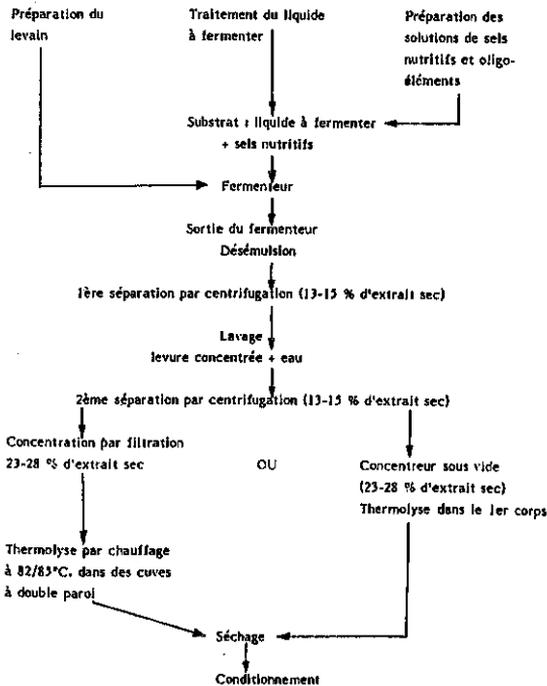
**PREMIER JOUR**

**Durée : 3 H 30**

Les manipulations seront réalisées selon l'ordre précisé sur le lieu de l'épreuve.

Les levures peuvent être cultivées et récoltées afin d'obtenir de la biomasse.

Le diagramme de production des levures cultivées est le suivant :



Lors d'une telle production, différents contrôles sont indispensables. Les normes microbiologiques pour l'alimentation humaine sont les suivantes :

germes totaux	50 000/g
Escherichia coli	absence dans 0,1 g
salmonelles	absence dans 25 g
staphylocoques	absence dans 0,1 g
moisissures	inférieures à 100/g

### 1 - IDENTIFICATION DE LA LEVURE DIETETIQUE (10 points)

La levure diététique a été isolée sur une gélose Sabouraud et incubée pendant 4 jours à 28°C : boîte A.

- Identifier la levure diététique à l'aide d'une microméthode : galerie API20C.

### 2 - CONTROLES AU NIVEAU DE LA FERMENTATION (30 points)

On dispose :

- d'un tube (B) contenant un prélèvement du liquide à fermenter avant ensemencement.
- de trois fioles (C1- C2 - C3) contenant chacune une préculture de la levure.
- d'un tube (D) contenant un prélèvement réalisé en cours de fermentation.

- 2.1 Effectuer un contrôle de stérilité du liquide à fermenter. Préciser dans le compte-rendu la technique d'ensemencement utilisée.
- 2.2 A partir de l'examen d'une coloration de Gram et d'une observation réalisée en hématimètre, choisir, parmi les trois précultures, celle qui servira à l'ensemencement. Justifier le choix effectué.
- 2.3 Effectuer un contrôle de pureté de la souche de levure au cours de la fermentation par ensemencement de milieux appropriés.

### 3 - CONTROLE MICROBIOLOGIQUE APRES CONDITIONNEMENT (15 points)

Le contrôle complet ne sera pas envisagé, seule la recherche de staphylocoques sera réalisée.

A partir d'une suspension de levure diététique à  $10^{-1}$  en eau peptonée (E), réaliser la recherche de staphylocoques sur milieu de Baird Parker.

Indiquer la technique d'ensemencement utilisée.

### 4 - CONTROLE DE SERUMS ANTI CANDIDA ALBICANS PAR ELECTROSYNERESE (25 points)

#### 4.1 Introduction

On a préparé deux sérums anti Candida albicans par immunisation de lapin. On se propose de contrôler leur activité. Candida albicans possède deux types d'antigènes :

- des antigènes somatiques obtenus à partir d'un broyat de culture en milieu de Sabouraud,
- des antigènes métaboliques obtenus à partir de filtrat de culture en milieu liquide de Sabouraud.

Les sérums seront testés vis à vis de ces deux types d'antigènes.

#### 4.2 Technique

On dispose d'une plaque d'électrosynérèse comportant deux fois deux rangées de puits.

Tester deux sérums Sa et Sb vis à vis des deux antigènes, antigène somatique et antigène métabolique ; ces antigènes seront utilisés purs, dilués au 1/2, au 1/4 et au 1/8 en PBS.

Les antigènes et les sérums sont placés sous un volume de 10 µl par puits.

La cuve à électrophorèse est remplie de tampon pH 8,2 dans chaque compartiment.

Placer la plaque dans la cuve convenablement ; orienter la plaque en réalisant un repérage (exemple : coupure d'un coin) qui sera indiqué dans le compte-rendu.

Laisser migrer 35 minutes en maintenant une tension constante de 150 volts.

#### 4.3 Résultats

Indiquer la technique de réalisation des dilutions de l'antigène.

Faire un schéma précisant la nature et la position des différents dépôts.

Justifier la position de la plaque dans la cuve à électrophorèse.

Lire la plaque directement ; conclure.

#### A - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

##### DEUXIEME JOUR

Durée : 1 H 30

##### 1 - IDENTIFICATION DE LA LEVURE DIETETIQUE

Lecture de la galerie. Identification.

##### 2 - CONTROLES AU NIVEAU DE LA FERMENTATION

Résultats expérimentaux. Conclusion.

##### 3 - CONTROLE MICROBIOLOGIQUE APRES CONDITIONNEMENT

L'identification des colonies suspectes sera réalisée à l'aide d'une technique rapide sur lame (Staphyslide ou Pastorex). Conclusion.

On se limitera à un seul test ; le résultat obtenu sera généralisé.

#### B - BIOCHIMIE (80 points)

Durée : 4 H 30

Les manipulations seront réalisées selon l'ordre précisé sur le lieu de l'épreuve.

#### LEVURES ET GLUTATHION

Les levures peuvent être cultivées et récoltées afin d'obtenir de la biomasse.

Les levures utilisées en alimentation, ou levures diététiques, tuées et séchées, possèdent des qualités nutritionnelles remarquables ; grande richesse en protéines (45 %), en vitamines du groupe B et, en glutathion (à raison d'environ 500 mg pour 100 grammes de levures sèches).

Le glutathion est un tripeptide de masse molaire :  $M = 307,30 \text{ g/mol}$ , intervenant dans les réactions d'oxydo-réduction, les processus de détoxication hépatique, la protection des membranes cellulaires.

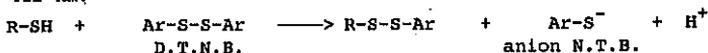
La manipulation comporte trois parties :

- 1 - Dosage du glutathion.
- 2 - Etude de la structure du glutathion.
- 3 - Rôle du glutathion dans l'activité de l'alcool déshydrogénase (A.D.H.).

**1 - DOSAGE DU GLUTATHION DANS LES LEVURES DIETÉTIQUES PAR LA METHODE COLORIMETRIQUE AU REACTIF D'ELLMAN. (26 points)**

**1.1 Principe :**

Le réactif d'ELLMAN ou acide 5,5' (di) thio-2,2'nitro-benzoïque ou D.T.N.B. est un disulfure aromatique réagissant avec les groupements thiols des composés aliphatiques. Grâce à une réaction d'échange entre D.T.N.B. et fonction thiol, il y a formation de nitro-thio-benzoate ou N.T.B., anion coloré en jaune qui absorbe la lumière à 412 nm.



Le glutathion réduit porte une fonction thiol. Son dosage est donc possible en comparant la coloration obtenue à partir d'un extrait de levures à celle résultant d'une gamme d'étalonnage réalisée à l'aide de l'acide aminé cystéine.

**1.2 Obtention d'une solution de glutathion à partir de levures :**

On pèse exactement 0,5230 g de levures sèches.

Après différentes étapes opératoires, on obtient 10 cm<sup>3</sup> d'une solution S de glutathion.

On considère que tout le glutathion présent dans les levures a été récupéré dans les 10 cm<sup>3</sup>.

**1.3 Mode opératoire :**

A partir de la solution mère de cystéine à 10 mmol/dm<sup>3</sup>, préparer une solution fille diluée au 1/10 en eau distillée bouillie et refroidie en vue d'obtenir une gamme contenant entre 0,1 et 0,5 micromole de cystéine par tube.

Compléter chaque tube de la gamme à 5 cm<sup>3</sup> avec le tampon phosphate à 0,1 mol/dm<sup>3</sup> et à pH = 7,5.

A partir de la solution S, préparer directement deux tubes essais contenant la quantité appropriée de produit à doser. Compléter chaque tube à 5 cm<sup>3</sup> à l'aide du tampon phosphate pH = 7,5.

La réaction de coloration sera obligatoirement réalisée en même temps sur les tubes de la gamme et les tubes essais, en raison de l'évolution possible de la coloration.

Ajouter dans chaque tube 0,5 cm<sup>3</sup> de solution tamponnée de D.T.N.B.. Agiter. Lire les absorbances à 412 nm entre 10 et 20 minutes après l'addition du réactif de coloration.

**1.4 Compte-rendu et résultats :**

Indiquer, sous forme de tableau, la composition des tubes (gamme et essais) ainsi que les résultats expérimentaux.

Déterminer le teneur en glutathion des levures analysées en mg de glutathion pour 100 grammes de levures sèches.

**2 - ETUDE DE LA STRUCTURE DU GLUTATHION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (C.C.M.) (20 points)**

L'analyse chromatographique portera sur trois solutions :

- solution de glutathion (GT), fournie
- hydrolysat de glutathion (H), fourni
- mélange réactionnel (R) obtenu après action de l'iodo-acétamide sur la fonction thiol du glutathion selon la réaction :



à préparer suivant le protocole indiqué en 2.1.

**2.1 Réaction glutathion / iodo-acétamide :**

Dans le tube à hémolyse étiqueté "R", introduire :

- 2 cm<sup>3</sup> de solution de glutathion (GT),
- 0,2 cm<sup>3</sup> de solution d'iodo-acétamide.

Agiter. Le mélange réactionnel ainsi réalisé est appelé R.

**2.2 Réalisation de la chromatographie :**

**Réactifs :**

- solvant de chromatographie :
  - n butanol : 3 vol.
  - acide acétique : 1 vol.
  - eau distillée : 1 vol.
- solutions témoins d'acides aminés à 1 g/dm<sup>3</sup> :  
cystéine (C), lysine (K), glycine (G), leucine (L), glutamate (E).
- solutions à tester :
  - GT : solution de glutathion.
  - H : hydrolysat de glutathion.
  - R : mélange réactionnel réalisé en 2.1.
- révélateur :  
réactif à la ninhydrine.

**Mode opératoire :**

Réactiver deux plaques de gel de silice de 5 cm sur 10 cm par passage à l'étuve à 100 °C.  
Réaliser deux dépôts successifs de chaque solution à l'aide de capillaires. Sécher.

Placer les couches minces dans des béciers de 400 cm<sup>3</sup> préalablement saturés en vapeur de solvant.  
Laisser migrer. Sécher, puis révéler avec le réactif à la ninhydrine, et placer à l'étuve à 100°C pendant 10 minutes.

**2.3 Analyse des résultats :**

Présenter les plaques de chromatographie sur la paillasse en fin de manipulation.  
Discuter les différents résultats obtenus et proposer une composition possible en acides aminés pour le glutathion.

### **3 - ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ALCOOL DESHYDROGENASE (A.D.H.) (34 points)**

L'A.D.H. est un enzyme souvent extrait des levures.

A partir d'un extrait P de cet enzyme, on a réalisé le mélange M (fourni), selon le protocole suivant :

- un volume d'extrait P,
- un volume de solution d'iodo-acétamide,
- un volume de solution de glutathion.

La manipulation consiste à déterminer la concentration d'activité catalytique de l'A.D.H. dans les 2 solutions suivantes : extrait P, mélange M.

On a par ailleurs constaté une perte de 80 % de l'activité enzymatique de l'A.D.H. dans l'extrait P en mélangeant volume à volume l'extrait P et une solution d'iodo-acétamide.

#### **3.1 Principe :**

La réaction catalysée par l'A.D.H. est la suivante :



#### **3.2 Réactifs :**

- R1 : Tampon pyrophosphate de sodium à pH = 8,7.
- R2 : Solution d'éthanol à 5 mol/dm<sup>3</sup>.
- R3 : Solution de NAD<sup>+</sup> à 15 mmol/dm<sup>3</sup>.

On utilisera un réactif unique (monoréactif MR) obtenu par mélange avec de l'eau distillée, dans des proportions convenables, des 3 réactifs précédents.

#### **3.3 Mode opératoire :**

Conditions de mesure :

- température : 30°C.
- longueur d'onde : 340 nm.
- trajet optique : 1 cm.

Protocole :

- Dans une cuve de spectrophotomètre, introduire 2,9 cm<sup>3</sup> de monoréactif MR qui seront préincubés pendant au moins 5 minutes à 30°C.
- Déclencher la réaction en ajoutant 100 µl de la solution à doser dans la cuve. Agiter, puis remettre en place afin de pouvoir effectuer la lecture de l'absorbance.
- Enregistrer ou noter la variation d'absorbance pendant 2 minutes.

Essais :

- Un essai est réalisé sur l'extrait P.
- Un essai est réalisé à partir du mélange M.

#### **3.4 Compte-rendu et résultats :**

Présenter les enregistrements obtenus pour l'extrait P et pour le mélange M en les annotant ou en les commentant si nécessaire, ou tracer sur papier millimétré les courbes  $A(340 \text{ nm}) = f(\text{temps})$  pour les deux essais.



On dispose :

- d'une solution aqueuse H provenant de l'hydrolyse de X par une phosphodiesterase C, suivie d'une saponification sur laquelle on réalisera un dosage enzymatique de glycérol par le "test UV". L'exactitude de l'absorbance délivrée par le spectrophotomètre à 340 nm sera contrôlée. La solution H correspond à une solution à  $10^{-2}$  mol.dm<sup>-3</sup> de X.

- d'un minéralisat M de X correspondant à une solution à 10 mmol.dm<sup>-3</sup> de X.

Les opérations suivantes sont à réaliser selon l'ordre précisé sur le lieu de l'épreuve.

## 1. VERIFICATION DU SPECTROPHOTOMETRE UTILISE

### 1.1 Réactifs

- réactif 1 = diluant,
- réactif 2 = solution de NADH à  $317 \pm 8$   $\mu$ mol.dm<sup>-3</sup>.

### 1.2 Mode opératoire

Dans un tube à hémolyse, pipeter :

- 2 ml du réactif 1,
- 3 ml du réactif 2.

Lire l'absorbance à 340 nm en faisant le zéro de l'appareil avec le réactif 1.

### 1.3 Calculs

Calculer l'absorbance linéique molaire  $\epsilon_m$  du NADH à partir de l'absorbance délivrée par le spectrophotomètre. Conclure sur l'exactitude de l'absorbance lue (on admettra qu'on se trouve dans la zone de linéarité), sachant que  $\epsilon_m$  du NADH à 340 nm =  $630$  m<sup>2</sup>.mol<sup>-1</sup>.

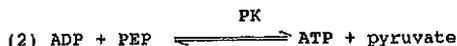
## 2. DOSAGE DU GLYCEROL DE H

### 2.1 Principe du dosage

La glycérokinase (GK) catalyse la phosphorylation du glycérol en glycérol-3-phosphate par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) (1).



L'adénosine-5'-diphosphate (ADP) formé est à nouveau transformé en ATP par le phosphoenol-pyruvate (PEP) en présence de pyruvate-kinase (PK) (2).



Le pyruvate obtenu est réduit en lactate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH) en présence de lactate-déshydrogénase (LDH) (3).



La quantité de  $\text{NAD}^+$  formé durant la réaction est proportionnelle à la quantité de glycérol. L'oxydation de NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à 340 nm.

## 2.2 Réactifs

- solution 1 : mélange réactionnel contenant tampon, NADH, ATP, PEP et  $\text{Mg}^{2+}$ ,
- suspension 2 : pyruvate kinase et lactate déshydrogénase,
- suspension 3 : glycérokinase.

## 2.3 Mode opératoire

- Opérer directement dans les cuves de 1 cm de trajet optique.
- Réaliser deux essais.

Introduire dans les cuves	témoin	essai
solution 1	1,00 ml	1,00 ml
eau bidistillée	2,00 ml	1,90 ml
solution H diluée 5 fois	—	0,10 ml
suspension 2	0,01 ml	0,01 ml
Mélanger. Après environ 5 à 7 minutes, lire les absorbances des solutions ( $A_1$ )		
suspension 3	0,01 ml	0,01 ml

Mélanger, attendre environ 5 à 10 minutes et lire les absorbances des solutions ( $A_2$ ).

Contrôler la fin de la réaction par une seconde lecture de  $A_2$ .

- Déterminer les variations d'absorbance corrigée :

$$\Delta A = \Delta A \text{ essai} - \Delta A \text{ témoin}$$

## 2.4 Calcul

Exprimer la concentration de H en  $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  de glycérol.

$$\text{Donnée : } C = \frac{\Delta A \cdot V \cdot D}{\epsilon \cdot m \cdot l \cdot p} \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

avec  $V$  = volume final en  $\text{cm}^3$

$p$  = volume d'échantillon en  $\text{cm}^3$

$l$  = largeur de la cuve en m

$D$  = facteur de dilution

$\epsilon$  m = absorbance linéique molaire de NADH calculé au 1.3.

## 3. DOSAGE DU PHOSPHORE DE M

### 3.1 Réactifs

- solution étalon à  $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- réactif sulfomolybdique (**dangereux**),
- solution de sulfite de sodium à  $200 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,
- solution d'hydroquinone à  $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

### 3.2 Dosage de M (2 essais)

Introduire dans un tube à essais :

- 2 ml de M dilué 50 fois,
- 5 ml d'eau distillée,
- 2ml de réactif sulfomolybdique,
- 1 ml de solution de sulfite de sodium,
- 1 ml de solution d'hydroquinone.

Laisser reposer 30 minutes à l'obscurité. Lire l'absorbance à 700 nm.

### 3.3 Étalonnage du spectrophotomètre

Préparer à l'aide d'une solution mère de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à  $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  une solution fille à  $0,4 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ .

Réaliser une gamme étalon de cinq tubes renfermant de 0 à  $2 \mu\text{mol}$  de P par tube.

### 3.4 Calculs

Traçer la courbe d'étalonnage du spectrophotomètre ou calculer la droite de régression  $a = f(\mu\text{mol de phosphore par tube})$ .  
Exprimer la concentration de M en  $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  de P.

## 4. COMPTE RENDU

- 4.1 La concentration en glycérol de H correspond-elle à la valeur attendue ? Conclure.
- 4.2 La concentration en phosphore de M vérifie-t-elle le schéma structural proposé ?

### UTILISATION DE CULTURES CELLULAIRES

On peut réaliser des cultures de lymphocytes sanguins humains pour :

- \* caractériser, typer ceux-ci d'après la nature de leurs récepteurs membranaires ;
- \* identifier les seconds messagers libérés après stimulation de certains de ces récepteurs ;
- \* contrôler
  - la qualité microbienne des milieux utilisés,
  - l'efficacité des additifs utilisés dans les milieux de culture.

## B - MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (80 points)

### PREMIER JOUR :

Durée : 4 H

L'ordre de déroulement des manipulations est impératif :

- 1 - BIOLOGIE CELLULAIRE
- 2 - MICROBIOLOGIE

### 1- BIOLOGIE CELLULAIRE (30 points)

A partir du sang humain circulant, on veut séparer les lymphocytes pour les mettre en culture. En dehors d'une stimulation par un antigène, les lymphocytes B et T sont difficilement distinguables morphologiquement. Par contre, à leur surface, ancrées dans leur membrane, des glycoprotéines différentes permettent de les différencier grâce à des marqueurs de surface.

Chez l'homme, seuls les lymphocytes T possèdent un marqueur facile à mettre en évidence : un récepteur pour les hématies de mouton. On peut ainsi, après une

séparation lymphocytaire, connaître le nombre de lymphocytes T que nous placerons en culture au temps  $t_0$ , en dénombrant ceux capables d'être entourés de globules rouges de mouton, c'est-à-dire formant rosette.

1.1 Pratiquer une séparation lymphocytaire sur du sang circulant recueilli sur anticoagulant.

On se placera en champ stérile (sans obligation de travail sous hotte à flux laminaire).

La centrifugation se déroulera en présence de coussin de densité intermédiaire  $d = 1,077$  (type Ficoll) en suivant le protocole fourni avec le produit distribué.

1.2 Recueillir la suspension lymphocytaire dans 1 ml de milieu R P M I.

1.3 Dénombrer en hématimètre les cellules vivantes recueillies en pratiquant un test de viabilité en présence d'un colorant type bleu Trypan (fiche technique n° 1).

**FICHE TECHNIQUE N°1 : TEST DE VIABILITE AVEC BLEU TRYPAN**

**(FICHE TECHNIQUE BIOMERIEUX)**

Bleu Trypan solution à 0,4 % (référence 89 691). Flacon compte-gouttes de 5 ml.

Conservation à la température du laboratoire.

**Présentation**

Le Bleu Trypan à 0,4 % est un colorant utilisé pour la numération de cellules. Le colorant est exclu des cellules vivantes, alors qu'il pénètre dans les cellules mortes qui se colorent en bleu. La solution de Bleu Trypan à 0,4 % est isotonique et tamponnée ; elle contient du méthyl-p-hydroxybenzoate comme antiseptique.

**Utilisation**

Les cellules à dénombrer doivent être mises en suspension dans une solution isotonique à pH 7,5 et sans protéines (tel que sérum de veau).

À 0,5 ml de suspension cellulaire à étudier, ajouter 0,05 ml de solution de Bleu Trypan à 0,4 % (soit 1 goutte distribuée au compte-gouttes tenu verticalement).

Homogénéiser à la pipette Pasteur.

La numération devra être faite entre la 5ème et la 15ème minute après mélange avec le colorant.

Déposer 1 goutte de la suspension colorée dans l'hématimètre et laisser sédimenter quelques instants avant de compter les cellules.

Le pourcentage de cellules viables ne sera établi qu'après avoir compté un nombre suffisant de cellules (une centaine au moins).

Exprimer les résultats en nombre de lymphocytes vivants par ml.

1.4 Préparer à partir d'une suspension HMO d'hématies de mouton (nombre par ml indiqué) une suspension HM, contenant 10 fois plus de globules rouges de mouton que de lymphocytes vivants.

Le protocole conseille un nombre de lymphocytes de l'ordre de  $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$  ; on pourra, si nécessaire, concentrer la suspension lymphocytaire par une centrifugation supplémentaire de 5 min à  $1500 \text{ t. min}^{-1}$ .

## 2 - MICROBIOLOGIE (50 points)

### 1.5 Préparer le test des rosettes de lymphocytes-GRM :

Dans un tube à hémolyse de plastique stérile placer :

- 0,8 ml de milieu RPMI,
- 0,1 ml de suspension lymphocytaire,
- 0,1 ml de suspension d'hématies de mouton 10 fois plus concentrées que la suspension lymphocytaire.

Homogénéiser doucement ; centrifuger à  $500 \text{ t. min}^{-1}$  pendant 3 min.

Remettre en suspension très doucement par rotation lente.  
Placer à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Le milieu de culture lymphocytaire est fréquemment sujet à des contaminations microbiennes.

Après avoir isolé et identifié un contaminant on ajoutera au milieu un antibiotique et un antifongique.

On déterminera la concentration minimale efficace sur une souche bactérienne de référence.

Le choix de l'antifongique résultera de l'antibiogramme effectué sur une souche fongique.

### 2.1 Isolement

Une gélose à l'oeuf est fournie coulée en boîte de Pétri. Ensemencer cette gélose avec un échantillon de milieu de culture M contaminé de façon à isoler le microorganisme.  
Incuber ce milieu à  $30^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Etude de l'action du chloramphénicol

On veut étudier l'action de différentes concentrations du chloramphénicol sur une souche bactérienne test (Micrococcus luteus).

Effectuer les opérations en suivant le protocole ci-dessous.

#### 2.2.1 Préparation de l'inoculum

- A l'aide d'un témoin dont l'opacité est égale au point 0,5 de l'échelle de MAC FARLAND, ajuster la densité d'une culture en phase exponentielle de la souche-test en ajoutant du bouillon nutritif stérile. La concentration de cette suspension est alors de  $10^8$  bactéries par ml.

- A partir de cette suspension, ajuster la concentration à  $10^5$  bactéries par ml.

#### 2.2.2 Gamme de dilutions de l'antibiotique

- On dispose d'un tube à hémolyse contenant 1 ml de solution d'antibiotique à la concentration de  $128 \mu\text{g}$  par ml. C'est le tube n°1.

- Ajouter 1 ml de bouillon nutritif trypticase-soja stérile et mélanger.

- Réaliser la gamme dans une série de 10 tubes à hémolyse :

- \* Effectuer des dilutions successives au 1/2, en bouillon nutritif trypticase-soja stérile, jusqu'au tube n°10.

- \* On n'oubliera pas de prélever et de jeter 1 ml du contenu de ce tube n°10.

### 2.2.3 Ensemencement - Incubation - Lecture

Ajouter 1 ml d'inoculum (culture ajustée à  $10^5$  bactéries par ml) dans les tubes n° 1 à 10 de la gamme d'antibiotique. Mélanger et incuber à 37°C pendant 24 heures.

### 2.3 Choix d'un antifongique

Utiliser une suspension de Saccharomyces cerevisiae en eau distillée stérile dont la concentration est ajustée à  $10^5$  cellules par ml. Cette suspension est ensemencée sur une gélose pour l'étude de la sensibilité des levures. Procéder selon le protocole ci-dessous.

#### Milieu

Le milieu a été coulé en boîte de Pétri sur une épaisseur de 2,4 mm. La surface a été séchée par un séjour de 15 minutes à 37°C dans l'étuve.

#### Inoculum

Suspension à  $10^5$  cellules par ml.

#### Ensemencement

Réaliser un ensemencement par inondation.

Sécher la boîte pendant 15 minutes à l'étuve à 37°C.

#### Application des disques

Réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques sur le milieu gélosé fourni (6 disques d'antifongiques sont fournis).

#### Incubation

Une prédiffusion de 30 minutes à la température du laboratoire est effectuée avant de placer les boîtes à 30°C. Incuber 24 heures.

## B - MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (80 points)

### DEUXIEME JOUR

Durée : 1 H 30

#### 1. BIOLOGIE CELLULAIRE (30 points)

##### Manipulation

- Remettre les lymphocytes délicatement en suspension et les monter en hématimètre.
- Présenter une rosette (lymphocyte entouré d'au moins 3 hématies de mouton).
- Compter les rosettes.

##### Résultats

Calculer le nombre de lymphocytes T vivants de la suspension lymphocytaire préparée la veille. En déduire la proportion de lymphocytes T.

2. MICROBIOLOGIE (50 points)

2.1 Isolement et identification d'un contaminant

A partir de la gélose ensemencée le premier jour, effectuer les examens macroscopiques, microscopiques et enzymatiques. Rédiger le compte rendu et orienter l'identification de ce contaminant.

2.2 Action du chloramphénicol

Lire la gamme contre un fond clair, après agitation des tubes. Déterminer la C.M.I. (concentration minimale inhibitrice) de l'antibiotique pour la souche bactérienne testée. Présenter les résultats sous forme de tableau.

2.3 Choix d'un antifongique

Mesurer les diamètres des zones d'inhibition sur la gélose. Consulter la fiche de lecture de l'antibiogramme Mycologie. Quel est l'antifongique qui semble le plus efficace vis à vis de la souche testée ?

# Epreuves de la session 1994

## Epreuve de Français Durée 4 heures Coefficient 3

### SYNTHESE DE DOCUMENTS

Vous ferez une synthèse objective, concise et ordonnée de ces documents relatifs à l'idée de défense nationale puis dans une brève conclusion vous exprimerez vos réflexions personnelles sur la question.

#### DOCUMENTS

- 1) P. GARRIGUE : extrait d'une conférence, 16.2.1988
- 2) Victor HUGO : "Ô soldats de l'An Deux !" Les Châtiments, 1853
- 3) G. de PUYMEGE : Le fanatisme, histoire et psychanalyse, p.p. 172-174, Stock 1980
- 4) H. HAENEL, R. PICHON, La Défense nationale, p.p. 121-123, P.U.F. 1989
- 5) A. JACQUARD : Abécédaire de l'ambiguïté, Seuil, 1989

#### DOCUMENT 1

Pourquoi nous combattons ? La question mérite d'être aussi brutalement posée à nos sociétés de la fin du XXème siècle qu'elle le fut dans la célèbre série de Frank CAPRA à l'Amérique au seuil de la seconde Guerre Mondiale. Certes nous ne sommes pas à la veille d'un conflit mais la guerre, sous ses formes les plus insidieuses, est revenue sur notre horizon : déstabilisation et désinformation de nos sociétés, conflits "localisés", montée des tensions dont certaines mettent en jeu nos forces de défense, rivalités religieuses, culturelles ou économiques. Faut-il rappeler que nos valeurs, à commencer par celles qui constituent l'armature de nos régimes démocratiques et sont l'âme de notre vie quotidienne, ne sont pas aussi largement partagées que le laissent entendre les déclarations de principes des Organisations internationales ? Elles sont même le privilège - le mot est lourd de sens - d'une minorité.

On peut donc être tenté de fonder l'esprit de défense sur un simple inventaire des valeurs dont nous avons le sentiment qu'elles nous sont communes. Certaines de ces valeurs - l'indépendance nationale, la paix, la sécurité - sont explicitement liées à la volonté de défense ; d'autres - la démocratie, la liberté, le patrimoine et l'art de vivre - supposent que les premières soient assurées dans un monde dangereux. L'énoncé du programme d'Education Civique de la classe de 3ème est ici parfaitement clair : l'indépendance nationale, condition de la démocratie, et l'esprit de défense, garant de la paix.

Ce que l'on a appelé le grand retour, je préfère parler de renouveau, de l'Education Civique, constituait en effet le préalable indispensable à la prise de conscience par les jeunes générations des problèmes touchant la défense. Voici reconstitué le couple éducation civique/esprit de défense dans lequel s'est incarné, nous l'avons vu, l'âge d'or de la Troisième République. Mais si nous pouvons légitimement en attendre avec le temps les mêmes effets, devons-nous pour autant vivre ce retour comme une restauration ?

Le système d'éducation civique - on parlait alors, d'instruction civique - de la Troisième République triomphante reposait sur un double consensus : un accord profond sur la conception de la patrie comme le lieu privilégié d'expression de toutes les valeurs universelles, une absence de conflits sur les valeurs inspirant les comportements quotidiens. On sait comment les grandes mutations du XXe siècle ont brisé la cohérence et l'unité de ce système.

La patrie ? Faut-il éviter les vicissitudes du patriotisme depuis un demi siècle, rappeler l'évolution profonde de la conscience nationale en face de réalités qui font de notre pays une puissance "moyenne", de sa société une société divisée, traversée de conflits idéologiques et sociaux, de sa culture une culture parmi d'autres et non plus une référence universelle ? Quel civisme quand la nation apparaît à beaucoup comme un espace trop vaste pour y trouver des racines -cf. la recherche de l'identité régionale, la montée des aspirations individuelles - trop étroit pour contenir l'universalité de l'esprit et permettre de résoudre des problèmes désormais mondialisés ? Que reste-t-il quand triomphe la différence de ces similitudes collectives dans lesquelles DURCKHEIM voyait la racine de tout esprit civique ?

Les valeurs ? Dans des sociétés modernes complexes et changeantes les valeurs - ne faudrait-il pas plutôt parler de modes idéologiques ? - s'affrontent ou se succèdent, perdant ainsi de leur crédibilité et de leur force de conviction. En l'absence de consensus sur les valeurs, quels repères, quelles références pour l'éducateur ? Je me permettrai de citer ici une phrase éclairante du document sur Enseignement et valeurs modernes élaboré en 1981 par notre Inspection Générale : "Il est facile d'inviter l'École à remettre à l'honneur les valeurs fondamentales de notre civilisation (nous sommes ici au cœur de notre problème...). Il l'est moins de dresser un inventaire ordonné de ces dernières en des termes qui aient pour tous même sens et même force d'incitation".

Le pessimisme comme la lucidité sont un appel à l'action. Ces quelques réflexions peuvent paraître moroses, voire décourageantes, même si de plus ou moins récents sondages viennent les corroborer. Si j'en fais ici état c'est parce qu'elles amorcent l'essentiel de mon propos : en premier lieu dans une société moderne les choses bougent et elles sont, me semble-t-il, précisément en train d'évoluer ; en second lieu, il ne s'agit pas de reproduire un modèle, quelles qu'aient pu être ses vertus, mais de définir les fondements d'un esprit de défense adaptés à l'état de notre société et à celui du monde.

Les choses sont en train de bouger. Un enseignement civique cohérent et continu apparaît comme un besoin de la société moderne. La société industrielle isole l'individu dans la masse, remet en cause les institutions, affaiblit l'action des structures intermédiaires (la famille, l'école, la justice, l'armée), distend les liens sociaux, privilégie l'intégration professionnelle par rapport à l'intégration sociale. Au delà du consensus c'est le tissu social lui-même qui est atteint dans nos sociétés conflictuelles. Dans un contexte différent l'école retrouve aujourd'hui la mission qui était la sienne à l'âge d'or de la IIIe République : créer, pour reprendre l'expression de DURCKHEIM, les similitudes essentielles que réclame toute vie collective, enseigner en formant l'esprit de chacun les solidarités sans lesquelles nos sociétés se désunissent et s'atomisent. Tandis qu'apparaissent ces nouveaux besoins se manifestent de nouvelles aspirations. N'assiste-t-on pas aujourd'hui à un regain, notamment dans la jeunesse, des valeurs de la vie collective ? Les signes en sont divers et concordants : développement du mouvement associatif, du sentiment de solidarité à l'égard du Tiers Monde comme des pauvres dans nos sociétés industrialisées, recherche à travers le patrimoine et la mémoire collective de racines communes, regain enfin des valeurs religieuses et du sentiment national. Il est significatif que le renouveau de l'éducation civique dans notre enseignement ait coïncidé avec celui de l'histoire et notamment de l'histoire nationale.

A quelles conditions l'esprit de défense pourra-t-il s'inscrire dans ce paysage ?

Une première évidence s'impose. Une volonté de défense est indissociable du concept d'indépendance nationale et donc de celui de nation. Ce n'est pas un hasard si le thème de l'identité nationale est devenu un problème majeur de la société française. Qu'est-ce qu'une nation et quelle est sa place dans le monde d'aujourd'hui ? A cette question fondamentale historiens, géographes, sociologues, ethnologues s'efforcent d'apporter une réponse scientifique et rationnelle. Les plus grands historiens français rivalisent désormais sur ce champ d'investigation privilégié qu'est devenue la réalité nationale : BRAUDEL, GOUBERT, DUBY, LEROY-LADURIE, AGULHON, FAVIER... Que des fervents de l'histoire des civilisations se passionnent pour la construction politique de l'Etat français, que des spécialistes des grands espaces maritimes et de l'économie mondiale explorent l'identité de la France est à la fois le signe d'une inquiétude intellectuelle et d'un regain d'intérêt et d'attachement de tous pour le passé national. Je me bornerai à citer cette phrase de Fernand BRAUDEL dans L'Identité de la France : "Qu'il soit entendu que pour aucune nation le dialogue obligatoire et de plus en plus pesant avec le monde n'entraîne une expropriation, un effacement de sa propre histoire".

Quelle image de la nation se dégage d'une recherche dont l'ampleur n'a d'égale que celles des grandes oeuvres historiques du XIXe siècle ?

En premier lieu la notion d'un espace privilégié dans lequel se projettent le passé revêtu par une mémoire collective et le futur d'une meilleure organisation des rapports entre les hommes comme avec leur environnement proche. Entre la région, lieu de notre enracinement familial, et l'espace mondial, théâtre des échanges et des stratégies, s'affirme à nouveau la nation comme le lieu des solidarités forgées par l'histoire. "C'est le souvenir de la communauté des joies et des deuils qui donne la conscience d'appartenir à un peuple solidaire". Sans la requête de

cette mémoire collective qu'évoque ici Ernest RENAN il n'est pas de civisme, ni ancien ni moderne. Telle est la première mission du professeur d'histoire. "Je crois que l'enseignement de l'histoire a pour objet essentiel d'éveiller la mémoire collective dans les mémoires individuelles, de susciter une certaine solidarité des consciences dans le présent par l'évocation du passé commun". Cette affirmation d'Anatole de MONZIE dans Pétition pour l'histoire mérite sans doute d'être discutée : d'une part l'enseignement de l'histoire a d'autres finalités, notamment intellectuelles, d'autre part nos sociétés pluralistes intègrent des collectivités qui ne sauraient se réclamer de ce passé commun. N'en a-t-il pas toujours été ainsi au cours de notre histoire qui a été celle du rassemblement des terres qui constituent aujourd'hui l'espace français ? Il n'en reste pas moins que l'appartenance à la collectivité nationale suppose l'acceptation et la reconnaissance de ce passé et des valeurs dont il est porteur. L'indifférence à l'égard des valeurs de notre civilisation résulte moins d'un choix conscient que de l'ignorance.

Conférence de M. P. GARRIGUE,  
Doyen de l'inspection générale d'Histoire-Géographie,  
le 16.2.1988, à l'Institut des Hautes Etudes de la Défense Nationale.

"L'an II", selon le calendrier révolutionnaire, correspond à l'année 1794 : la France de la Révolution affronte une coalition de diverses puissances européennes.

#### DOCUMENT

- 1 O SOLDATS DE L'AN DEUX I
- O soldats de l'an deux ! Ô guerres ! épopées !  
Contre les rois tirant ensemble leurs épées,  
Prussiens, autrichiens,
- 5 Contre toutes les Tyrans (1) et toutes les Sodomes (1)  
Contre le czar du Nord, contre ce chasseur d'hommes,  
Suivi de tous ses chiens,
- Contre toute l'Europe avec ses capitaines,  
Avec ses fantassins couvrant au loin les plaines,  
10 Avec ses cavaliers,  
Tout entière debout comme une hydre (2) vivante,  
Ils chantaient, ils allaient, l'âme sans épouvante  
Et les pieds sans souliers !
- 15 Au levant, au couchant, partout, au sud, au pôle,  
Avec de vieux fusils sonnans sur leur épaule,  
Passant torrents et monts,  
Sans repos, sans sommeil, coudes percés, sans vivres,  
Ils allaient, fiers, joyeux, et soufflant dans des cuivres,  
Ainsi que des démons !
- 20 La liberté sublime emplissait leurs pensées.  
Flottes prises d'assaut, frontières effacées  
Sous leur pas souverain,  
O France, tous les jours c'était quelque prodige,  
Chocs, rencontres, combats ; et Joubert sur l'Adige,
- 25 Et Marceau sur le Rhin !
- On battait l'avant-garde, on culbutait le centre ;  
Dans la pluie et la neige et de l'eau jusqu'au ventre  
On allait ! en avant !  
Et l'un offrait la paix et l'autre ouvrait ses portes,
- 30 Et les trônes, roulant comme des feuilles mortes,  
Se dispersaient au vent !
- Oh ! que vous étiez grands au milieu des mêlées,  
Soldats ! L'oeil plein d'éclairs, faces échevelées  
Dans le noir tourbillon,
- 35 ils rayonnaient, debout, ardents, dressant la tête ;  
Et comme les lions aspirent la tempête  
Quand souffle l'aiglon,

- 40 Eux, dans l'emportement de leurs luttes épiques,  
Ivres, ils savouraient tous les bruits héroïques,  
Le fer heurtant le fer,  
La Marseillaise ailée et volant dans les balles,  
Les tambours, les obus, les bombes, les cymbales,  
Et ton rire, ô Kléber !
- 45 La révolution leur criait : - Volontaires,  
Mourez pour délivrer tous les peuples vos frères ! -  
Contents, ils disaient oui.  
- Allez, mes vieux soldats, mes généraux imberbes ! -  
Et l'on voyait marcher ces va-nu-pieds superbes  
Sur le monde ébloui !
- 50 La tristesse et la peur leur étaient inconnues,  
Ils eussent, sans nul doute, escaladé les nues,  
Si ces audacieux,  
En retournant les yeux dans leur course olympique  
Avaient vu derrière eux la grande République
- 55 Montrant du doigt les cieux.

Victor HUGO, Les Châtiments, 1853

(1) Ces deux villes antiques représentent la richesse et la corruption, en face de la pauvreté et de l'austérité républicaines.

(2) Le monstre de Lerne à plusieurs têtes, détruit par Hercule.

### DOCUMENT 3

Brave parmi les braves, obscur parmi les obscurs, le soldat Chauvin allait donner son nom au fanatisme nationaliste.

On ne trouvera peut-être jamais avec précision pourquoi Chauvin est devenu le synonyme d'un état d'esprit à tel point que l'homme disparut pour devenir un adjectif. La transformation s'explique par le besoin d'un symbole nouveau dans la mentalité de l'époque. Et cette attente, qui transformera Chauvin en chauvin, importe plus que la biographie du personnage.

Né à Rochefort, Nicolas Chauvin, héros des champs de bataille de la République et de l'Empire, reçut dix-sept blessures - toutes, comme il se doit, par-devant. Défiguré, amputé de plusieurs doigts, remercié de ses sacrifices par l'octroi d'un sabre d'honneur et d'une pension, il se serait fait remarquer - même de ses compagnons d'armes ! - par son exaltation patriotique maladive et sa "naïveté". Renvoyé à la vie civile en 1815, sa passion sans bornes pour tout ce qui touchait à Napoléon devait, grâce à une propagande habile, faire de lui un symbole. Immortalisé par les gravures satiriques de Charlet, il est l'archétype de cette figure héritée de l'imagerie antique et qui allait faire fureur dans les années 1820-1830 : le soldat-laboureur.

Encadré dans les salons bourgeois, piqué au mur sous forme d'image d'Epinal chez les humbles, porté à la scène par Dumersan et Francis en 1821, puis par Scribe et bien d'autres, il entraîne la vénération au foyer, l'enthousiasme et les crises de larmes au théâtre et jusque dans les cirques. Selon la formule d'Alexandre Dumas, la France chauvine peut ainsi "venger Leipzig et Waterloo sur le champ de bataille du Gymnase et des Variétés (1)", en vibrant au récit des exploits de ce guerrier pacifique et décoré qui exalte ses combats et ses blessures dans une atmosphère d'idylle. On se sent transporté quand le héros de Dumersan et Francis récite avec ferveur :

*Les champs qui nourrissent ma mère  
Je dois savoir, en bon Français  
Les défendre pendant la guerre  
Les labourer en temps de paix.*

Par une piquante antonomase (2), Chauvin devient donc un qualificatif dont on se targue : "Je suis français, je suis chauvin !" s'écrit un personnage d'un vaudeville de Cogniard écrit en 1831, époque où le mot est devenu à la mode au point qu'on le raille. Les frères Théodore et Hippolyte Cogniard, vaudevillistes pléthoriques, obtinrent un triomphe aux Folies-Dramatiques en 1831 avec leur pièce *La Cocarde tricolore, épisode de la guerre d'Alger*, dans laquelle figure un conscrit nommé Chauvin, auquel la réplique est donnée par le vétéran la Cocarde et la vivandière Catin. D'une platitude et d'une ineptie rares, ce vaudeville transporta les foules — le livret eut plusieurs éditions — et fut surtout rendu célèbre par le couplet de Chauvin, tombé malade pour avoir mangé du chameau :

*J'ai mangé du chameau  
J'ai l'ventr' comme un tonneau  
J'verrai pus mon hameau,  
ça m'brûl' dans chaqu' boyau.*

L'expression *chauvinisme* apparaît dans *Les Guêpes* de Bayard et Dumanoir en 1840 et, en 1841, Bayard écrit un vaudeville en un acte, *Les Aides de camp*, qui ridiculise ce fanatisme. Enfin, le Dictionnaire de l'Académie française reçut le terme en 1878. Fanatisme napoléonien, puis passion nationaliste belliqueuse, le chauvinisme était appelé à une longue carrière linguistique, utilisé en Allemagne, puis dans les pays anglo-saxons pour désigner un parti pris de clocher aussi excessif que belliqueux — jusqu'à l'injure féministe contemporaine de *chauviniste mâle* ou *male chauvinist pig*. En fustigeant la "démence patriotique des chauvins", Roger Martin du Gard exprime la spécificité du chauvinisme.

De même que le fanatisme en général apparaît comme le fardeau des religions, de même le chauvinisme qui, selon la formule de Noriac, "fait faire de plus grandes choses que l'amour de la patrie dont il est la charge(3)", est bien celui du nationalisme, sa forme extrême, la plus absurde, la plus dangereuse.

Gérard de PUYMEGE, Le Fanatisme, histoire et psychanalyse

(Stock, 1980)

(1) nom de salles de théâtre parisiennes.

(2) figure de style, par laquelle un nom propre devient un nom commun. Ex. "Don juan" : un don juan.

(3) exagération comique

#### DOCUMENT 4

La liberté se conquiert et se préserve ; elle ne constitue pas un don du ciel, mais résulte d'efforts constants et opiniâtres dont le succès même peut masquer la nécessité. Ces efforts ont une ambition commune : la défense du pays. Celle-ci s'inscrit dans un double cadre politique et juridique qui recueille l'adhésion d'une large majorité des citoyens.

La défense du pays est tout d'abord nationale. Elle trouve son origine en même temps que sa justification dans la sauvegarde des intérêts vitaux de la France. Cette défense est celle d'un pays indépendant qui entend rester maître de sa destinée nationale ; elle est également nucléaire. La France ne se connaît pas d'adversaire et ne poursuit aucun dessein hégémonique. Dans un monde dominé par la force militaire des "deux grands" (1), elle entend développer une stratégie de dissuasion du faible au fort. Cette dissuasion, fondée sur le pouvoir égalisateur de l'atome, "vise à éviter la guerre en persuadant un éventuel agresseur qu'une action menée contre la France présenterait au regard des buts politiques qu'il poursuit des risques inacceptables". Il est donc indispensable que même après une première frappe adverse le pays puisse infliger à l'adversaire des dommages supérieurs au potentiel démographique et économique que représente l'hexagone. Pour autant, cette défense ne peut se réduire à sa seule dimension nucléaire car des conflits limités ou périphériques peuvent se produire qui ne mettent pas en péril l'indépendance ou la survie de la Nation. C'est pourquoi l'appareil de défense comprend des forces nucléaires et des forces classiques qui se complètent et se valorisent mutuellement. Ces forces classiques tiennent une place essentielle dans la stratégie militaire du pays car elles portent témoignage de sa nature profonde, non l'égoïsme mais la solidarité, celle que commande la double appartenance à l'Europe et à l'Alliance atlantique, ainsi que la fidélité aux accords d'assistance conclus avec nombre de jeunes Etats. Souveraine et solidaire au regard de l'univers, cette défense se définit comme globale et populaire pour ceux qui la servent.

Il est clair aujourd'hui que la menace revêt d'autres aspects que frontaux. Idéologique parfois, économique plus souvent, militaire à l'occasion, la menace est multiforme et insidieuse. La réponse doit être globale et permanente. Le dispositif juridique mis en place souligne ce double caractère et cantonne le militaire dans son juste rôle, celui

d'un collaborateur spécialisé du service public. Si la menace vise chacun des citoyens, la défense doit les concerner tous. Tel est en effet le cas, puisqu'en France la dissuasion présente un caractère populaire que consacre l'attachement du corps social à la conscription (2).

Pourtant, quelles qu'en soient la pertinence et les qualités, cette politique de défense demeure perfectible. Elle gagnerait sans doute à faire une plus large place aux formes non militaires d'action. Le caractère populaire de la dissuasion s'en trouverait renforcé. Même s'ils sont significatifs, les moyens financiers qui lui sont consacrés seront demain insuffisants car les équipements modernes sont désormais à la mesure des continents. Une nouvelle solidarité est donc à découvrir, qui dans la péninsule européenne sauvegardera l'âme de tous les Etats et l'intérêt de chacun.

Ce formidable défi est d'ores et déjà relevé. Enfin, à l'intérieur même du pays, un effort d'information doit être inlassablement poursuivi, celui qui vise à stimuler les esprits engourdis par le bien-être pour leur rappeler cette vérité paradoxale qu'aujourd'hui la politique de défense, et donc la politique militaire, visent à rendre la guerre impossible et non pas à la gagner.

#### La Défense Nationale

Hubert HAENEL, René PICHON  
(P.U.F., coll. Que sais-je ?, 1989)

- (1) Les Etats-Unis d'Amérique et l'ex-URSS.  
(2) conscription : enrôlement des appelés du contingent.

#### DOCUMENT 5

Bien sûr, ma nation c'est la France. Lorsque je lis Montaigne, Pascal ou Voltaire, je me sens français, du moins autant qu'eux-mêmes se sentaient français, c'est-à-dire bien peu. Lorsque je lis *Faust*, ou *La Guerre et la Paix*, lorsque j'écoute le *Requiem* ou lorsque je contemple le *Moïse* de Saint-Pierre-aux-Liens, je me sens de la patrie de Goethe, de Tolstoï, de Mozart, de Michel-Ange, je me sens "terrien", autant qu'eux-mêmes le sentaient, c'est-à-dire beaucoup. Parmi ceux qui nous ont enrichis de leurs visions ou de leurs oeuvres, bien peu ont célébré la nation où ils sont nés, fragment de territoire dont les limites arbitraires et fluctuantes résultent plus des hasards des guerres ou des mariages princiers que de réalités humaines durables. Rappelons cette déclaration de Montesquieu : "Si je savais une chose utile à ma nation qui fût ruineuse à une autre, je ne la proposerais pas à mon prince, parce que je suis homme avant d'être français."

L'entêtement borné de quelques puissants a transformé en réalités concrètes, en "nations", ce qui n'était au départ que concepts bien abstraits, Allemagne, France ou Italie. Le processus est plus absurde encore pour les nations africaines issues de la décolonisation et dont les limites résultent de traits tirés plus ou moins au hasard sur une carte par quelques fonctionnaires de Paris ou de Londres. La pauvreté même des objets ou des rites qui les symbolisent montre à l'évidence combien ces concepts sont creux. Quelques couleurs élémentaires brutalement associées, quelques accords assez simples pour être joués par des musiques militaires, quelques paroles assez dépourvues de sens pour pouvoir être répétées sans jamais concerner l'intelligence, voilà de quoi fabriquer drapeaux et hymnes patriotiques qui justifieront, par leur seule évocation, tous les abandons de la raison.

Notre propre nation en est un exemple type. Vraiment, ne faut-il pas avoir abandonné tout bon sens, toute raison, tout contact avec la réalité, pour appeler aujourd'hui les petits Français à abreuver les sillons de leurs campagnes du sang impur de ceux qui viennent égorgé leurs compagnes (sans compter la mauvaise leçon de versification apportée par ces rimes trop riches) ? Le folklore patriotique de nos voisins n'est guère plus sérieux. Quelle idée peut bien occuper la cervelle des jeunes Britanniques chantant *God save the King*, c'est-à-dire priant Dieu de sauver leur roi (ou leur reine) ?

On raconte qu'un célèbre mathématicien anglais a tenté de mesurer l'efficacité de cette requête faite régulièrement à Dieu par des millions de patriotes. Il a appliqué des tests statistiques très subtils pour comparer la probabilité de se retrouver *safe* (1) après une maladie, pour un roi, objet de tant de prières, et pour un citoyen ordinaire, qui n'est protégé que par les prières de sa famille. La conclusion aurait été que l'écart est, comme disent les statisticiens, "non significatif" : l'accumulation des implorations ne semble avoir aucun effet décelable. La conclusion logique aurait dû être un changement des paroles de l'hymne national anglais. Tel n'a évidemment pas été le cas.

La réponse à ces critiques est, bien sûr, que les paroles des chants patriotiques sont dites sans que personne n'ait plus conscience de leur signification. Certes ; mais est-il de bonne pédagogie de faire comprendre à des jeunes que les mots ne sont que des sons, que des phrases entières peuvent être dites sans que l'intelligence y prenne la moindre part ? Il peut sembler plus formateur de leur répéter le précepte ancien : "Que ton oui soit oui, que ton non soit non." C'est-à-dire pense ce que tu dis. Est-ce trop demander qu'espérer une société où le réflexe devant une affirmation soit d'admettre qu'elle a du sens, et que celui qui l'a énoncée sait ce qu'elle signifie et la croit juste ?

Drapeaux et hymnes ont été à l'origine, c'est vrai, d'extraordinaires sacrifices, d'admirables héroïsmes et parfois de merveilleuses solidarités. Mais le processus réellement en action est à l'opposé de celui qui est présenté : ce n'est pas parce qu'ils se sentaient solidaires dans la défense de la France que Bretons, Picards et Gascons se sont battus à Verdun ; c'est parce qu'ils se sont battus ensemble à Verdun qu'ils se sont sentis, après coup, solidaires. Ne pourrait-on se sentir solidaires à un moindre prix ? Ne pourrait-on surtout étendre cette solidarité à des "terriens" habitant au-delà des frontières ? Celles-ci selon une belle définition de Georges Bidault, sont les "cicatrices de l'histoire" ; vivement que ces cicatrices disparaissent et, avec elles, les nationalismes !

Albert JACQUARD,  
Abécédaire de l'ambiguïté  
( Seuil, 1989)

1. safe (anglais) : sain et sauf, en bonne santé.

## Epreuve d'Anglais Durée 2 heures Coefficient 2

### YOU WON'T FEEL A THING

BIOLOGISTS have a bad habit of sticking needles into things. To get under your skin, they use a hypodermic. Crude (1), but effective—and even a blunt (2) needle will do. To get inside a cell, however, they need a very fine needle indeed. Raoul Kopelman, of Michigan University, has just the thing. His needle is a mere 20 molecules thick.

Dr Kopelman's needle is an optical probe (3) — a device that investigates chemical goings-on by measuring the changes in colour that happen during particular reactions. Its claim to fame is that it has a diameter a thousandth the size of its nearest rival—one ten-millionth of a metre, or, if you prefer, 100 nanometres. Dr Kopelman is quite likely to prefer that alternative term : a diameter of 100 nanometers gives his device some claim to be part of the fashionable field of "nanotechnology".

The probe is made by drawing out an optical fibre made of glass to a fine tip. Dr Kopelman then coats the tip with aluminium to prevent light escaping, leaving just the end of the tip transparent. This unadorned end is dipped into a mixture of chemicals which can join up to

make a plastic, and into a dye (4). The chemicals assemble themselves into an ultra-fine tip made of a bunch of only 20 or 30 molecules. The choice of dye determines the use this finest of quills (5) can be put to. Some dyes change colour in the presence of particular chemicals. Others fluoresce. Different dyes can be chosen to measure acidity, oxygen levels, carbon-dioxide levels, or various important elements such as calcium or potassium. Whatever the specifics, the optical signal can be seen from the other end of the optical fibre, where the observer eagerly awaits it.

Dr Kopelman is still dissatisfied with the size of his needle. He hopes to make one even smaller—ideally a single molecule thick. Such a machine might be able to probe individual molecules.

The Economist - Dec. 19th 1992

- (1) crude : rough, primitive
- (2) blunt : not sharp
- (3) a probe : une sonde
- (4) a dye : un colorant
- (5) a quill : a needle

### QUESTIONS :

- 1 - Faire un résumé en français, de manière ordonnée, des informations essentielles contenues dans le texte. (7 points)
- 2 - Traduire en français le 1<sup>er</sup> paragraphe. (7 points)
- 3 - Justify the interest of biochemists, or more generally, of scientific researchers for the extremely small. (6 points) 100-120 mots.

**Epreuve de Mathématique**  
**Durée 2 heures Coefficient 1,5**

La qualité de la rédaction ainsi que la clarté et la précision des raisonnements entreront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des calculatrices réglementaires et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

**EXERCICE 1** (9 points)

Les valeurs décimales approchées des résultats numériques seront données à  $10^{-2}$  près.

On effectue des contrôles d'alcoolémie d'automobilistes dans une région donnée, un jour donné, pendant une période horaire donnée.

Les statistiques permettent d'établir que la probabilité pour qu'un automobiliste choisi au hasard dans les conditions précédentes présente un contrôle positif est  $\frac{1}{50}$ .

Les parties A et B peuvent être traitées indépendamment l'une de l'autre.

**PARTIE A :**

Dans cette question, on considère un échantillon de la population constitué de 2000 automobilistes dont on veut contrôler le taux d'alcoolémie dans les conditions précédentes.

On appelle X la variable aléatoire prenant pour valeur le nombre possible de contrôles positifs parmi ces 2000.

- 1) X suit une loi binomiale : en donner l'espérance mathématique et la variance.
- 2) Par quelle loi peut-on approcher la loi de X ? Justifier.
- 3) En utilisant la loi normale de moyenne 40 et d'écart type 6,26 :
  - a) Calculer les probabilités :  
 $P(X \geq 36)$   
 $P(33 \leq X \leq 43)$
  - b) Déterminer une valeur approchée du réel a tel que :  
 $P(X \leq a) = 0,99$ .  
Quelle est la plus grande valeur de l'entier naturel n que l'on peut en déduire, tel que :  $P(X \leq n) \leq 0,99$ .

## PARTIE B :

Dans une ville donnée de cette région, on effectue au hasard 200 contrôles de taux d'alcoolémie d'automobilistes, dans les conditions précédentes.

Les taux d'alcoolémie mesurés ont donné les résultats suivants :

Taux d'alcoolémie $\tau$ , en g/l	$]0; 0,2[$	$]0,2; 0,4[$	$]0,4; 0,6[$	$]0,6; 0,8[$	$]0,8; 1[$	$]1; 1,2[$	$]1,2; 1,5[$	$]1,5; 2[$
Effectifs	42	78	52	19	4	2	2	1

- 1) Calculer les valeurs approchées de la moyenne  $\bar{T}$  et de l'écart type  $s$  du taux d'alcoolémie de cet échantillon.
- 2) Un contrôle est considéré comme positif si le taux d'alcoolémie mesuré est supérieur ou égal à 0,8 g/l.  
Calculer la fréquence de contrôles positifs de cet échantillon.
- 3) Cette fréquence permet-elle de conclure que l'échantillon est représentatif au risque de 5 % de l'ensemble des contrôles de la région, où l'on considère que la proportion des contrôles positifs est  $\frac{1}{50}$ .

## EXERCICE 2 (11 points)

Les valeurs décimales approchées des résultats numériques seront données à  $10^{-2}$  près.

On étudie la croissance d'un type de végétal à partir d'un instant considéré comme initial.

On admet que le diamètre de la tige principale est alors une fonction  $D$  du temps  $t$ , telle que :

$$D : [0 ; +\infty[ \longrightarrow \mathbb{R}$$

$$t \longmapsto \frac{K}{1 + Ce^{-at}}$$

où  $K$ ,  $C$  et  $a$  sont des réels strictement positifs.

$D(t)$  et  $t$  s'expriment respectivement en centimètres et en semaines.

Les parties A et B peuvent être traitées indépendamment l'une de l'autre.

## PARTIE A :

Dans cette partie,  $K = 15$ ,  $C = 20$  et  $a = 0,5$ .

On appelle  $(\Gamma)$  la courbe représentative, dans le plan  $(P)$  rapporté à un repère orthonormal d'unité graphique 1 cm, de la fonction  $D_1$  ainsi obtenue :

$$D_1 : [0 ; +\infty[ \longrightarrow \mathbb{R}$$

$$t \longmapsto \frac{15}{1 + 20e^{-0,5t}}$$

1) Calculer  $\lim_{t \rightarrow +\infty} D_1(t)$

En déduire l'existence d'une droite  $(\Delta)$  asymptote à la courbe  $(\Gamma)$  et en donner une équation.

2) Etudier le sens de variation de la fonction  $D_1$ , et dresser son tableau de variation.

3) Préciser la tangente  $(T)$  à la courbe  $(\Gamma)$  en son point d'abscisse 0.

4) a) Compléter le tableau :

t	0	1	3	5	7	10	15	20
$D_1(t)$								

b) Tracer les droites  $(\Delta)$  et  $(T)$  et la courbe  $(\Gamma)$  dans le plan  $(P)$ .

### **PARTIE B :**

On effectue des mesures du diamètre de la tige principale d'une autre plante.

On obtient les résultats suivants :

Temps $t_i$ , en semaines	0	2	6	10	14	20	24
Diamètre de la tige principale en cm	0,4	1,2	5,4	6,4	7,8	8,0	8,0

On admet que, dans ce cas,  $K = 8$ .

On a alors, à chaque instant  $t$  de  $[0 ; +\infty[$  :

$$D_2(t) = \frac{8}{1 + Ce^{-at}}$$

1) Exprimer  $Ce^{-at}$  en fonction de  $D_2(t)$ .

On pose  $u(t) = \ln \left[ \frac{8}{D_2(t)} - 1 \right]$ . En déduire que  $u(t)$  s'écrit sous la

forme  $u(t) = at + \beta$ , où  $\alpha$  et  $\beta$  sont des réels à déterminer en fonction de  $C$  et  $a$ .

2) En utilisant le tableau des données expérimentales ci-dessus, on obtient :

$t_i$	0	2	6	10	14
$u(t_i)$	2,94	1,73	-0,73	-1,39	-3,66

Les valeurs de  $u(t)$  sont approchées à  $10^{-2}$  près.

- Représenter le nuage des cinq points ci-dessus, dans le plan rapporté à un repère orthogonal d'unités graphiques :  
1 cm sur l'axe des abscisses.  
2 cm sur l'axe des ordonnées.
- Calculer le coefficient de corrélation linéaire de cette série statistique.
- Déterminer, par la méthode des moindres carrés une équation de la droite d'ajustement de  $u$  en  $t$ .
- En déduire, pour cette plante, les valeurs numériques estimées de  $C$  et  $a$ .  
Ecrire la formule approchée donnant alors le diamètre de sa tige principale en fonction du temps.

Epreuve de Sciences physiques  
Durée 2 heures Coefficient 2,5

#### I-OPTIQUE: Le réseau de diffraction

On considère un réseau de diffraction utilisé en transmission. Ce réseau constitue la partie principale du monochromateur d'un spectrophotomètre d'absorption travaillant de 190 à 800 nm ( zone utilisable du spectre continu émis par la lampe ) .

Ce réseau comporte 1200 traits par mm, il est éclairé sous incidence normale. Dans ces conditions l'angle d'émergence  $i'$  correspondant à un maximum d'intensité pour une radiation donnée répond à la formule :

$$\sin i' = \frac{k \cdot \lambda}{a}$$

$k$  : ordre du maximum ( nombre entier )

$\lambda$  : longueur d'onde de la radiation

$a$  : pas du réseau.

Deux filtres peuvent être intercalés entre le réseau et la fente de sortie. Un seul filtre est utilisé à la fois :

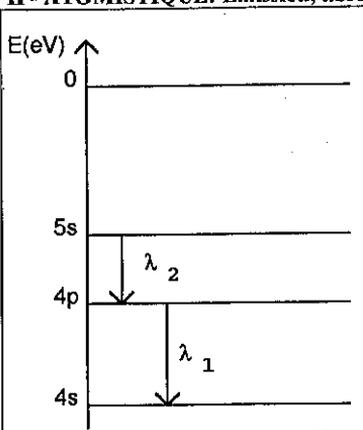
- le filtre B laisse passer les radiations de longueurs d'onde supérieures à 360 nm.
- le filtre A laisse passer les radiations de longueurs d'onde supérieures à 700 nm

1) Définir les termes suivants :

- spectre continu , spectre d'absorption
- monochromateur
- pas du réseau.

- 2) En considérant deux rayons issus de deux traits consécutifs du réseau dans la direction définie par l'angle  $i'$  démontrer la formule donnée ci-dessus .
- 3) Quels sont les angles d'émergence correspondant aux limites du spectre pour l'ordre 1 et pour l'ordre 2 ? Commenter les résultats obtenus.
- 4) En considérant les résultats de la question 3 , expliquer pourquoi on utilise le filtre B si l'angle  $i'$  est compris entre  $26^\circ$  et  $65^\circ$  et le filtre A pour  $i' > 65^\circ$  .

## II - ATOMISTIQUE: Emission, absorption d'un atome de potassium



La figure ci-contre représente les premiers niveaux d'énergie de l'atome de potassium (rappel : par convention l'énergie d'un électron est nulle à l'infini).

Le niveau 4s correspond à l'état fondamental.

Dans cet état l'énergie d'ionisation  $E_i$  de l'atome de potassium est de 4,34 eV.

Les raies d'émission ont pour longueur d'onde :

- $\lambda_1 = 768 \text{ nm}$
- $\lambda_2 = 1250 \text{ nm}$ .

Données numériques :

- constante de Planck :  $h = 6,62 \times 10^{-34} \text{ J.s}$
- charge élémentaire :  $e = 1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$
- célérité de la lumière dans le vide :  $c = 3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ .

- 1) Expliquer le mécanisme d'émission des radiations de longueur d'onde  $\lambda_1$  et  $\lambda_2$  .
- 2) Déterminer en eV les énergies des niveaux 4s, 4p et 5s de l'atome de potassium.
- 3) Un photon d'énergie 1,62 eV peut-il être absorbé par un atome de potassium dans son état fondamental ? Si oui, expliquer le mécanisme.

## III - CHIMIE GENERALE : pH et précipitation

Le pKa de couple acide benzoïque / benzoate est égal à 4,2.

On symbolisera l'acide benzoïque par **HB** et l'ion benzoate par **B<sup>-</sup>** .

1) Calculer le pH d'une solution **S** de benzoate de sodium de concentration molaire 0,050 mol.L<sup>-1</sup> . On justifiera les approximations faites lors du calcul du pH .

2) On ajoute dans un litre de solution **S**, sans variation de volume, 0,020 mol de chlorure de magnésium solide. Y a-t-il précipitation d'hydroxyde de magnésium ? Justifier votre réponse. Calculer la concentration molaire de chacun des ions présents dans la solution. On donne le produit de solubilité de l'hydroxyde de magnésium  $\text{Mg(OH)}_2$  :  $K_s = 8,9 \times 10^{-12}$

3) On souhaite préparer un litre de solution à pH = 4,0 en utilisant :

- de l'acide benzoïque à 0,100 mol.L<sup>-1</sup>,
- de la solution **S** .

- a - : Calculer les volumes d'acide benzoïque et de solution **S** à mélanger.
- b - : Quelles sont les propriétés de la solution obtenue?

## IV - CHIMIE ORGANIQUE : Synthèse de la benzocaïne (4-amino benzoate d'éthyle)

La benzocaïne est couramment employée comme anesthésique local à usage externe ; elle constitue l'agent actif des pommades utilisées pour le traitement des brûlures et des coups de soleil.

Cette molécule est obtenue par la séquence réactionnelle suivante :

1) Monoalkylation du benzène par action du monochlorométhane en présence de chlorure d'aluminium : soit *A* le produit obtenu.

1-1 : Ecrire l'équation globale de la réaction.

1-2 : Préciser la nature de la réaction et détailler son mécanisme réactionnel .

2) Mononitration de *A* par action de l'acide nitrique fumant en présence d'acide sulfurique concentré : obtention de deux isomères *B* et *B'* ; *B* est le plus abondant.

2-1 : Justifier l'obtention de deux isomères et la plus grande abondance de l'un par rapport à l'autre.

2- 2 : Ecrire l'équation de réaction conduisant à *B*.

3) Oxydation de *B* par une solution concentrée de permanganate de potassium en milieu sulfurique : obtention du produit *C* de formule  $\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH}$ .

Ecrire les demi-équations relatives aux deux couples rédox mis en jeu et l'équation globale de la réaction .

4) Action du chlorure de thionyle  $\text{SOCl}_2$  sur *C* : obtention du produit *D*.  
Ecrire l'équation globale de la réaction.

5) Action de l'éthanol sur *D* : obtention du produit *E*.

5-1 : Ecrire l'équation globale de la réaction.

5-2 : Pourquoi passe-t-on par l'intermédiaire du chlorure d'acyle plutôt que de faire réagir l'éthanol directement sur *C*.

6) Réduction du groupement nitro de *E* par action du zinc en présence d'éthanol conduisant à la benzocaïne.

Donner la formule semi-développée de la benzocaïne.

## Epreuve de Biochimie-Biologie Durée 4 heures Coefficient 6

Remarques préliminaires :

1 - Le sujet proposé a un caractère pluridisciplinaire. Le candidat devra veiller à répondre de manière concise aux questions posées afin de pouvoir traiter l'ensemble du sujet.

2 - Il est suggéré de consacrer à chaque question un temps tenant compte du nombre de points attribués.

INTERACTIONS PROTEINES - LIGANDS :

BASES MOLECULAIRES ET IMPORTANCE

BIOLOGIQUE

1 - STRUCTURE DES PROTEINES ET INTERACTIONS PROTEINES - LIGANDS (43 points).

1.1. Structure et synthèse des protéines (18 points).

1.1.1. Préciser les différents niveaux d'organisation structurale d'une

protéine. Dans chaque cas, nommer et définir les principales liaisons mises en jeu dans le maintien des niveaux d'organisation.

- 1.1.2. La chaîne polypeptidique est élaborée pendant la traduction au niveau du complexe ARN messager - ribosome.
- 1.1.2.1. Nommer les différentes étapes de la traduction.
- 1.1.2.2. Donner, à l'aide de schémas précis et annotés, le mécanisme de l'initiation de la traduction chez les procaryotes.
- 1.1.2.3. Expliquer comment la chaîne polypeptidique naissante prend sa structure spatiale définitive.

1.2. Interactions protéines - ligands (25 points).

L'activité des protéines est en général liée à la formation d'un complexe spécifique (transitoire) avec un ligand : "complexe protéine - ligand".

- 1.2.1. Quelles sont les différentes interactions intervenant dans la fixation du ligand ?
- 1.2.2. Le complexe protéine - ligand est caractérisé par sa spécificité et son affinité. Définir ces deux termes.
- 1.2.3. La mise en évidence du complexe spécifique est difficile. Cependant, dans certaines conditions, il est possible d'obtenir ce complexe. On utilise, par exemple, la technique dite de dialyse à l'équilibre qui répond à la relation de SCATCHARD (document 1).

**DOCUMENT 1**

Relation de SCATCHARD

- P = protéine  
 S = ligand  
 R = site récepteur de la protéine  
 n = nombre de sites récepteurs par molécule de protéine.

Formation du complexe protéine - ligand :



$$[R]_{\text{total}} = [RS] + [R]_{\text{libre}}$$

$$[R]_{\text{libre}} = [R]_{\text{total}} - [RS]$$

$$[R]_{\text{total}} = n [P]$$

On obtient la relation de Scatchard

$\frac{[RS]}{[S]} = K_a n [P] - K_a [RS]$
---

avec  $K_a$  = constante d'association du complexe

1.2.3.1. Présenter cette technique de dialyse à l'équilibre.

1.2.3.2. Justifier la relation donnée dans le document 1.  
Montrer comment cette relation permet de déterminer la constante d'association ( $K_a$ ) et le nombre de sites récepteurs par molécule de protéine ( $n$ ).  
Quelle signification peut-on donner à la constante  $K_a$  ?

1.2.3.3. Application.

On étudie, par dialyse à l'équilibre, la liaison du colorant p-lac (p-lac = p [p-diméthylamino-benzène azo] -phényl lactoside) avec un anticorps de lapin "anti p-lac". La concentration de l'anticorps dans le compartiment I d'un récipient à dialyse est de  $1,17 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pour différentes concentrations initiales du colorant p-lac, on mesure à l'équilibre la concentration molaire de p-lac dans le compartiment I et dans le compartiment II.

Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Compartiment I [p-lac] mol/dm <sup>3</sup>	Compartiment II [p-lac] mol/dm <sup>3</sup>
$1,277 \cdot 10^{-5}$	$0,359 \cdot 10^{-5}$
$1,620 \cdot 10^{-5}$	$0,514 \cdot 10^{-5}$
$1,920 \cdot 10^{-5}$	$0,677 \cdot 10^{-5}$
$2,248 \cdot 10^{-5}$	$0,871 \cdot 10^{-5}$
$3,040 \cdot 10^{-5}$	$1,450 \cdot 10^{-5}$

- Déterminer graphiquement (papier millimétré) la constante d'association du complexe p-lac - anti p-lac.

- Calculer le nombre  $n$  de sites récepteurs de l'anticorps anti p-lac pour le colorant p-lac.

**Donnée :** On considérera que toute molécule d'anticorps peut lier le même nombre de molécules de colorant, avec la même affinité.

## 2 - EXEMPLES D'INTERACTIONS ENZYMES - LIGANDS (29 points).

2.1. Le complexe enzyme - substrat. Relation de MICHAELIS - MENTEN (9 points).

2.1.1. Définir et décrire le site actif d'une enzyme.

2.1.2. Donner (sans la démontrer) l'équation de vitesse de la réaction enzymatique à un seul substrat. Définir les paramètres  $K_M$  et  $V_{\max}$  et indiquer leurs unités.

2.1.3. Simplifier l'équation précédente pour des concentrations de substrat très inférieures, puis pour des concentrations de substrat très supérieures à  $K_M$ .

2.2. Les isoenzymes et les voies métaboliques (20 points).

2.2.1. Définir et donner les principales caractéristiques des isoenzymes.

2.2.2. Ecrire la réaction catalysée par la LDH, lactate déshydrogénase (E.C. 1.1.1.27) - formules développées exigées.

- 2.2.3. La constante  $K_M$  de la LDH pour le pyruvate est beaucoup plus élevée dans le muscle cardiaque que dans le muscle squelettique. Commenter cette observation en terme d'affinité enzyme - substrat. En montrer les conséquences physiologiques.
- 2.2.4. Grâce à des enzymes spécifiques, le pyruvate peut participer à d'autres réactions que celle catalysée par la LDH. Il est situé à un carrefour des voies métaboliques.
- 2.2.4.1. Dans un schéma général, montrer la participation du pyruvate au métabolisme glucidique (anabolisme et catabolisme oxydatif et fermentaire) chez les animaux. Donner le nom des enzymes qui catalysent les réactions impliquant le pyruvate.
- 2.2.4.2. Indiquer une voie (faisant intervenir le pyruvate) entre le métabolisme des glucides et le métabolisme des acides aminés.

### 3 - EXEMPLES D'INTERACTIONS PROTEINES MEMBRANAIRES - LIGANDS (48 points).

#### 3.1. Exemples d'interactions dans la réponse immunitaire spécifique (14 points).

Lorsqu'un antigène pénètre dans l'organisme, sauf élimination par les défenses non spécifiques, il déclenche l'activation de cellules immunocompétentes qui lui sont spécifiques. Cette activation, qui fait intervenir une interaction antigène - récepteur à l'antigène, suit la théorie de la sélection clonale et conduit à une réponse polyclonale.

- 3.1.1. Préciser dans quel(s) tissu(s) ou organe(s) cette étape d'activation apparaît.
- 3.1.2. Expliquer, à l'aide de schémas détaillant les mécanismes et interactions mis en jeu, le déroulement de cette phase d'activation, en se limitant aux lymphocytes T.
- 3.1.3. Expliquer l'expression "sélection clonale" et justifier le caractère polyclonal de la réponse.
- 3.1.4. Représenter la structure quaternaire d'un récepteur à l'antigène, à la surface d'une cellule immunitaire au choix. Situer sur le schéma les sites de fixation de l'antigène.
- 3.2. Exemple d'interaction neurotransmetteur - récepteur membranaire : cas de l'acétylcholine (8 points).

Les neurotransmetteurs libérés par l'extrémité de fibres nerveuses assurent la transmission du message nerveux véhiculé par les fibres aux cellules cibles post-synaptiques.

- 3.2.1. Donner deux exemples de fibres nerveuses libérant de l'acétylcholine.
- 3.2.2. Dans le cas de cellules musculaires squelettiques, la fixation d'acétylcholine sur des récepteurs post-synaptiques entraîne localement une augmentation de la perméabilité au  $Na^+$  ; cette variation de perméabilité ionique peut ensuite déclencher l'apparition d'un potentiel d'action post-synaptique.

Représenter les deux variations du potentiel transmembranaire qui en résultent et détailler les mécanismes et mouvements ioniques mis en jeu.

3.3. Interaction antibiotique - cible : cas des bêta-lactamines (12 points).

Les bêta-lactamines sont des antibiotiques connus pour inhiber la synthèse du peptidoglycane bactérien.

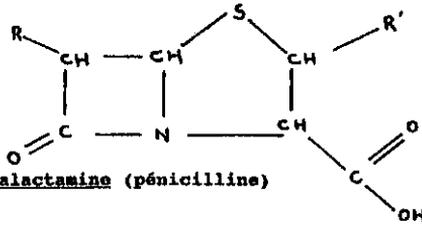
Elles se fixent sur des protéines communément appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Ces protéines sont les transpeptidases impliquées dans la synthèse du peptidoglycane.

3.3.1. Préciser le rôle naturel de ces transpeptidases.

3.3.2. Montrer comment les bêta-lactamines peuvent se fixer spécifiquement sur leurs cibles.

**Donnée :** Formule d'une bêta-lactamine (document 2).

**DOCUMENT 2**



Formule générale d'une bêta-lactamine (pénicilline)

3.3.3. Quelles sont les conséquences de la fixation des bêta-lactamines sur les transpeptidases bactériennes ?

3.3.4. Certaines bactéries produisent des enzymes capables d'empêcher l'action des bêta-lactamines. Nommer ces enzymes. Quel est leur rôle ?

3.3.5. Pour lutter contre la présence de ces enzymes, on peut associer deux bêta-lactamines : l'une active, l'autre dépourvue d'activité antibactérienne (Exemple (respectivement) : amoxicilline + acide clavulanique).  
Proposer une hypothèse pour expliquer l'efficacité d'une telle association.

3.4. Adsorption d'un virus sur sa cellule-cible (14 points).

La fixation d'un virus sur sa cible résulte en général de deux phénomènes conjoints :

- attraction électrostatique entre des charges portées par les structures virales et des charges complémentaires de la membrane de la cellule-hôte ;
- affinité spécifique du virus pour une structure cellulaire qui joue le rôle de récepteur.

3.4.1. Définir la sensibilité et la permmissivité d'une cellule vis-à-vis d'un virus.

3.4.2. Les virus appartenant à la famille des Retroviridae sont des virus à ARN de polarité positive, enveloppés, à symétrie hélicoïdale. Décrire le mode de pénétration d'un rétrovirus dans une cellule-cible. Représenter la stratégie utilisée par le virus pour réaliser son cycle de multiplication (schéma de synthèse souhaité).

3.4.3. Certains rétrovirus peuvent être à l'origine de la tumorigénèse des cellules infectées. Expliquer brièvement ce phénomène.

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**première partie : étude d'opérations techniques**  
**Durée 4 heures coefficient 4**

L'usage d'un dictionnaire "Anglais-Français" est autorisé.

**PREPARATION D'UN TEST DE DEPISTAGE DES ENTEROTOXINES**  
**STAPHYLOCOCCIQUES DANS LES ALIMENTS**

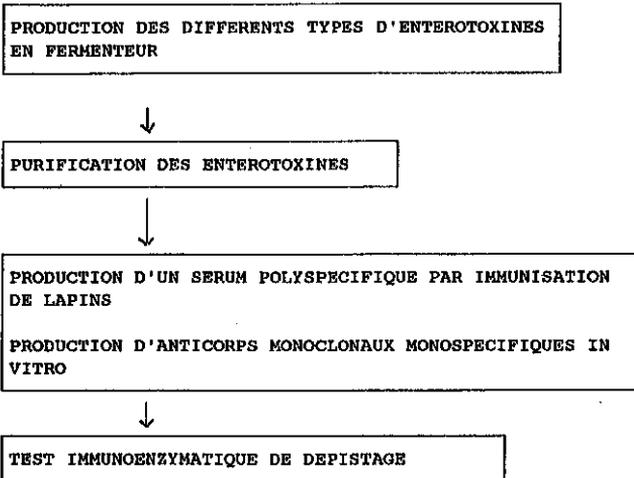
La recherche des entérotoxines staphylococciques revêt un grand intérêt en microbiologie alimentaire.

Produites au cours de la croissance dans les aliments par certaines souches de staphylococcus aureus entérotoxino-gènes, ces toxines, dont il existe sept sérotypes (A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E), sont à l'origine de toxi-infections alimentaires (TIA).

Leur recherche est intéressante quand l'analyse microbiologique est mise en défaut, qu'il s'agisse d'un produit impliqué dans une TIA ou de l'étude de la qualité hygiénique d'un produit à diverses étapes de sa fabrication.

Le test de dépistage qu'on se propose de préparer est un test immunoenzymatique.

Les étapes principales de son élaboration sont les suivantes :



**1.- PRODUCTION DES ENTEROTOXINES EN FERMENTEUR (12 points)**

Elles sont produites, in vitro, en quantité appréciable dans des conditions particulières indiquées dans le document 1.

- 1.1. Justifier l'étape préalable à l'inoculation du fermenteur.
- 1.2. Quelle est la nature des deux composés niacine (acide nicotinique) et thiamine ? Quel rôle jouent-ils ?
- 1.3. Quelles sont les régulations assurées dans ce procédé ?

## DOCUMENT 1

### **ENTEROTOXIN PRODUCTION**

The *Staphylococcus aureus* strain used for the production was preserved on porcelain beads.

Step 1. One bead was placed in each of four 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of sterile medium composed of :

- 3 % aminoacide
- 3 % protein hydrolysate powder
- 10 mg/l niacin
- 0,5 mg/l thiamin
- carbohydrate = none

The medium is adjusted to pH 6,8.

Cultures were incubated at 37°C without shaking for 18 h.

Step 2. These cultures were aseptically inoculated into a fermenter containing 20 l of sterilized medium.

The culture was agitated at 500 rpm with an air flow of 20 l/min.

It was incubated at 37°C, pH 6,8, for 12-18 h.

Antifoam (Dow Corning Silicone B diluted 1 to 10) was added automatically by peristaltic pump to control foaming.

The culture was centrifuged in a continuous flow centrifuge, at rate of approximately 200 ml/min.

- 1.4. Quelle fraction sera récupérée lors de l'étape terminale ? Justifier la réponse.
- 1.5. Des expériences préliminaires au choix du milieu de production ont été réalisées en fermenteur, sous conditions contrôlées de pH et d'aération, en présence et en absence de glucose.
  - 1.5.1. Commenter les résultats présentés sur le document 2.
  - 1.5.2. Justifier la composition du milieu de production de l'entérotoxine.

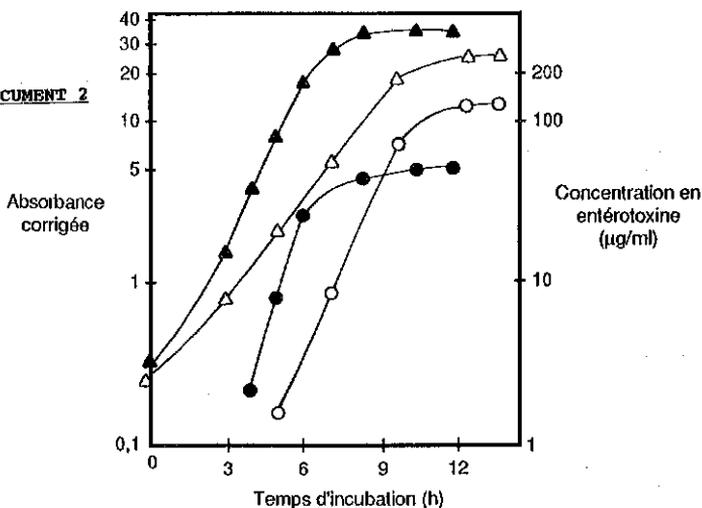
### 2 - PURIFICATION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES (32 points)

Ce sont des holoprotéines thermostables, de masse molaire comprise entre 26000 et 30000 daltons, de pHi compris entre 7 et 8,6.

Le suivi de la purification de l'entérotoxine est réalisé par une méthode d'immunodiffusion. Dans les fractions où elle a été ainsi détectée, sa concentration est déterminée par la méthode de LAURELL.

- 2.1. Les étapes de la purification de l'entérotoxine D sont indiquées sur le document 3.
  - 2.1.1. Quelle masse d'entérotoxine est obtenue en fin de purification ?
  - 2.1.2. Que représentent, à chaque étape, les paramètres suivants :
    - pureté,
    - rendement par rapport à la solution I.
  - 2.1.3. Quelle est l'étape de purification la plus performante ? Justifier.

**DOCUMENT 2**



Effet d'une concentration constante de glucose à 0,1 mol/l sur la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxine en fermenteur à pH 6,8, dans un milieu complètement défini en acides aminés, sous des conditions contrôlées de pH et d'aération.

Absorbance corrigée = Absorbance mesurée x facteur de dilution.

- Courbes en présence de glucose à 0,1 mol/l : Absorbance ▲  
Concentration entérotoxine ●
- Courbes en l'absence de glucose : Absorbance △  
Concentration entérotoxine ○

**DOCUMENT 3**

**ETAPE 1.**

Le produit de fermentation est mélangé à de l'Amberlite CG 50 permettant la fixation de l'entérotoxine sur la résine, puis son élution.

L'éluat est ensuite concentré : on obtient la solution I qui contient 1840 mg de protéines, dont 2 % d'entérotoxine.

**ETAPE 2.**

La solution I, après équilibrage à pH 5,6 en tampon phosphate 0,02 mol/l, est chromatographiée sur une colonne de carboxyméthylcellulose (CM cellulose).

L'élution est réalisée avec un gradient linéaire de phosphate de sodium (mélange à égal volume de tampon phosphate 0,03 mol/l à pH = 6,1 et de tampon phosphate 0,06 mol/l à pH = 6,8).

Le diagramme d'élution est présenté sur le document 4.

La fraction contenant l'entérotoxine est concentrée :

- pureté : 30 %,
- rendement par rapport à la solution I : 62 %.

### ETAPE 3.

Purification sur Séphadex G 75.

Elution par du tampon phosphate de sodium 0,02 mol/l à pH = 6,8.

Pureté 80 %. Rendement par rapport à la solution I : 28 %.

### ETAPE 4.

Deuxième passage sur une colonne de Séphadex G 75 dans les mêmes conditions d'élution.

Pureté de la fraction contenant l'entérotoxine : 99 %.

Rendement par rapport à la solution I : 20 %.

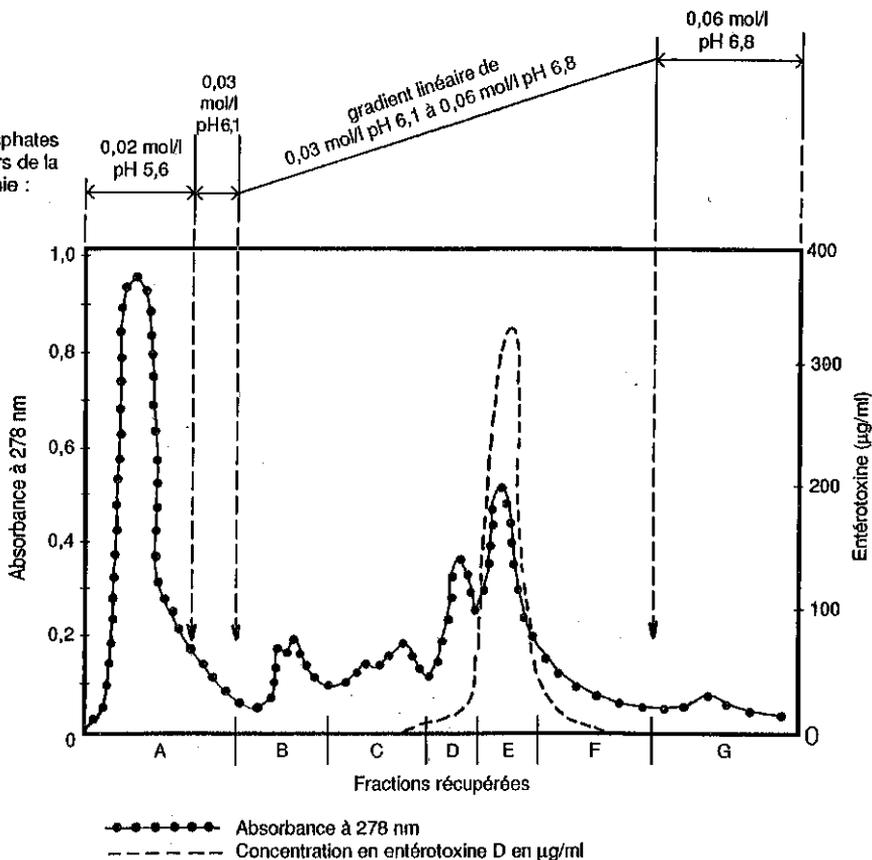
#### 2.2. Etude de l'étape II de purification.

2.2.1. Ecrire la formule semi-développée d'une carboxyméthylcellulose. A quelle catégorie de résine appartient-elle ?

2.2.2. Interprétation du diagramme d'élution (document 4).

#### DOCUMENT 4

Etape 2 de purification : élution de la solution I sur colonne de CM cellulose.



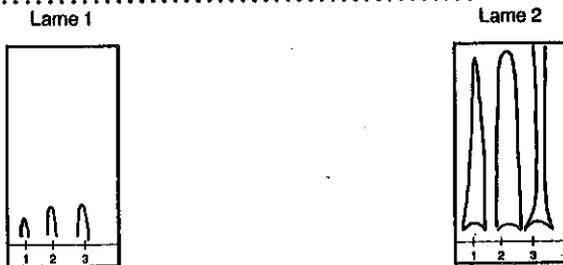
- 2.2.2.1. Quel est l'intérêt de la mesure de l'absorbance à 278 nm ?
- 2.2.2.2. A quoi correspond la fraction A ? Dans quelle(s) fraction(s) se trouve l'entérotoxine ?
- 2.2.2.3. Quels sont les facteurs mis en jeu pour séparer les diverses fractions ?
- 2.2.2.4. L'entérotoxine D a un pHi égal à 7,4. Comment expliquer son élution de la résine ?

2.3. Dosage de l'entérotoxine obtenue en fin de purification.

- 2.3.1. Indiquer brièvement le principe de la méthode de LAURELL (électro-immunodiffusion).
- 2.3.2. Afin de préciser les conditions opératoires, des essais préalables ont été réalisés sur deux lames d'agarose (document 5, figure 1). Dans le même temps des courbes standards ont été établies pour différentes concentrations d'anticorps (document 5, figure 2). A l'aide de ces données, analyser les résultats de la figure 1.

DOCUMENT 5

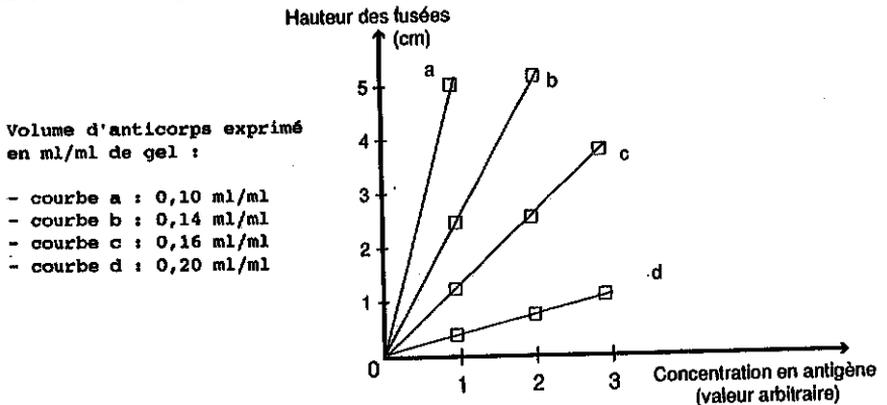
Figure 1 : Essais préalables réalisés sur gel d'agarose



Volume de gel coulé par lame = 3,5 ml  
 Ag = entérotoxine à différentes concentrations (1,2 et 3)

Figure 2 : Courbes standards (méthode de LAURELL)

Chaque courbe correspond à une concentration d'anticorps déterminée dans le gel.



2.3.3. Préparation d'une lame d'agarose.

Déterminer le volume d'immunsérum à incorporer dans la gélose pour être dans de bonnes conditions de lecture lors du dosage de ces solutions antigéniques 1, 2 et 3.

On considère que la méthode est quantitative pour des fusées dont la hauteur est comprise entre 1 et 5 cm.

2.3.4. Exploiter le tableau ci-dessous et déterminer la concentration massique de l'entérotoxine contenue dans la fraction analysée.

	Etalonnage				Dosage
Hauteur des fusées (mm)	12	24	36	46	31
Quantité d'entérotoxine ( $\mu\text{g}$ par puits)	2	4	6	8	X

Donnée : le volume d'entérotoxine déposé par puits est de 10  $\mu\text{l}$ .

**3 - DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES ET INTERET EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE (36 points)**

A partir des principaux sérotypes d'entérotoxines (A, B, C<sub>1</sub> et D), des anticorps monoclonaux monospécifiques sont élaborés in vitro et un sérum polyspécifique (anticorps polyclonaux) est produit chez le lapin.

Ces anticorps permettent de développer une méthode ELISA indirecte de type sandwich.

3.1. Etude du document 6.

3.1.1. A l'aide de ce document, schématiser les étapes du dosage.

3.1.2. Ecrire l'équation de la réaction enzymatique utilisée.

**DOCUMENT 6**

**Réactifs utilisés dans la méthode ELISA indirecte de type sandwich.**

- Plaque de microtitration sensibilisée par un anticorps monoclonal monospécifique.
- Sérum de lapin polyspécifique contenant des anticorps polyclonaux anti A, B, C<sub>1</sub>, D.
- Tampon de lavage.
- Conjugué : IgG de chèvre anti IgG de lapin couplé à la peroxydase.
- Solution 1 : solution à pH 6 d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de chromogène réduit (ABTS = sel d'ammonium du 2-2' azino-di-(3 éthyl-benzothiazolidine-6-acide sulfonique)).
- Solution 2 : solution d'arrêt = solution de fluorure de sodium à 12,5 g/l.

3.2. Intérêt de la méthode ELISA sandwich indirecte par rapport à la méthode ELISA sandwich directe.

3.2.1. Schématiser le principe de la méthode ELISA sandwich directe.

3.2.2. De la technique directe ou indirecte, quelle est la plus sensible ? Justifier la réponse.

3.2.3. Du point de vue des réactifs utilisés, quel est l'avantage de la technique indirecte ?

3.3. Lors de la mise au point de la méthode ELISA, le rapport enzyme/anticorps pour le conjugué est important.  
La concentration d'activité catalytique du conjugué est de  $4 \text{ U.l}^{-1}$  de milieu réactionnel.

Le conjugué enzyme-anticorps est obtenu à partir d'un anticorps purifié (Ig G) et d'une préparation de peroxydase lyophilisée dont l'activité spécifique est de  $1050 \text{ U/mg}$ .

3.3.1. En fonction des données précédentes et du mode opératoire utilisé (document 7), déterminer la concentration massique en peroxydase de la solution de conjugué.

#### DOCUMENT 7

#### Technique de mesure de l'activité peroxydasique du conjugué.

- Réactifs

.....

\* Solution 1 = solution à pH 6 d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et de chromogène réduit (ABTS).

\* Solution 2 = solution d'arrêt = solution de fluorure de sodium à  $12,5 \text{ g/l}$ .

- Solutions à analyser

.....

Les solutions de conjugué étudiées (anticorps couplé à la peroxydase) sont préparées de telle sorte que leur concentration en anticorps soit de  $1 \text{ g/l}$ .

- Mode opératoire

.....

\* Préparer, dans un tube à hémolyse, le mélange suivant :  
à  $3 \text{ ml}$  de solution 1 préalablement portée à la température de  $25^\circ\text{C}$ , ajouter  $20 \mu\text{l}$  de solution de conjugué diluée au 1/1000 dans du tampon citrate  $0,1 \text{ mol/l}$  à pH = 6. Agiter.

\* Effectuer 7 dépôts de  $200 \mu\text{l}$  du mélange précédent sur une microplaque de titration.  
Chaque dépôt correspondra aux durées d'action de l'enzyme : 0, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes.  
Température de mesure :  $25^\circ\text{C}$ .  
La réaction est arrêtée aux temps indiqués en ajoutant  $25 \mu\text{l}$  de solution 2.

Lire l'absorbance de ces milieux réactionnels à  $405 \text{ nm}$  après avoir réglé le zéro de l'appareil avec la solution de substrat.

\* Réaliser sur cette même plaque de titration un dépôt supplémentaire : dépôt témoin de  $25 \mu\text{l}$  de solution 2 auquel on ajoute  $200 \mu\text{l}$  du mélange précédent à  $25^\circ\text{C}$ .

Lire l'absorbance de ce milieu aux temps : 0, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes.

3.3.2. Calculer le rapport massique enzyme/Ig G dans ce conjugué.

Donnée : 1 unité (U) = 1  $\mu$ mol de produit formé/min.

3.4. Intérêt du dosage en microbiologie alimentaire.

3.4.1. Méthode microbiologique : dénombrement des *Staphylococcus aureus* dans un produit alimentaire.

3.4.1.1. 0,1 ml d'une crème non pasteurisée ont été étalés sur milieu de BAIRD-PARKER mis à incuber 24 h à 37°C.

28 colonies noires sont dénombrées.

Trois colonies sur cinq donnent un résultat positif pour la recherche de la coagulase.

- Donner le principe de la recherche de la coagulase et les conditions opératoires de sa réalisation.
- Déterminer le nombre de *Staphylococcus aureus* présents dans la crème.

3.4.1.2. Le critère appliqué à la plupart des denrées alimentaires est de  $10^2$  *Staphylococcus aureus* /g ou ml.

Quels sont les résultats du dénombrement sur milieu de BAIRD-PARKER lorsque le nombre de *Staphylococcus aureus* dans l'échantillon est inférieur à  $10^2$  germes / g ou ml ?

On envisagera le cas d'un produit pur et d'un produit devant d'abord être homogénéisé et dilué au 1/10.

3.4.2. Corrélation entre le dosage des entérotoxines dans les aliments et la méthode microbiologique.

Le tableau présenté dans le document 8 rassemble des résultats d'investigations faites à la suite de TIA dont les symptômes correspondent à ceux provoqués par les entérotoxines staphylococciques.

L'analyse microbiologique a été menée parallèlement à une recherche directe des entérotoxines dans l'aliment (dosage immunoenzymatique).

Lorsque l'analyse microbiologique est pratiquée seule, on considère qu'un nombre supérieur à  $10^5$  germes/g suffit à confirmer la responsabilité des *Staphylococcus aureus* dans la TIA (production d'entérotoxine suffisante).

3.4.2.1. Quels sont les cas où il existe une corrélation entre analyse microbiologique et recherche de l'entérotoxine ? Justifier la réponse.

3.4.2.2. Quel est le cas où l'analyse microbiologique est mise en défaut ?

3.4.2.3. Quelle(s) explication(s) peut-on proposer aux résultats du cas d ?

Etude de produits laitiers suspects d'être responsables d'une TIA

DIFFERENTS CAS AYANT DONNE LIEU A ENQUETE	PRODUITS TESTES	S. aureus (Baird Parker) germes/g d'aliment	entérotoxines dans l'aliment A B C D
<p>a) 15 personnes malades après un repas dans un restaurant, vomissements, douleurs abdominales, pas de fièvre, symptômes de 2 à 4 h après le repas</p>	<p>fromage de chèvre frais n°1 " " affiné n°2 " " affiné n°3</p>	<p>&lt; 10<sup>2</sup> &lt; 10<sup>2</sup> &lt; 10<sup>2</sup></p>	<p>- - - - - - - - + - - -</p>
b) Plaintes dispersées	<p>fromage de brebis (type Pyrénées)</p>	10 <sup>6</sup>	- + - -
c) Vomissements, diarrhées dans plusieurs familles	<p>tomme crue avant affinage pour préparation régionale (servie chaud)</p>	10 <sup>8</sup>	- + - -
d) Vomissements, diarrhées dans plusieurs familles	autre lot tomme crue	10 <sup>6</sup>	- - - -



Placer la plaque dans un b cher contenant le solvant.

Laisser migrer. Sécher, puis révéler avec le réactif à la ninhydrine et placer à l'étuve à 100 C pendant quelques minutes.

### 1.3. Analyse des résultats.

Calculer les  $R_F$  et identifier les acides aminés présents dans le milieu de fermentation.

## 2 - CONSOMMATION DE TYROSINE AU COURS DE LA FERMENTATION (35 points)

Le dosage de la tyrosine est effectué au temps initial et au temps final, soit après 18 heures de culture en fermenteur.

### 2.1. Principe du dosage par la méthode d'ANSON.

Le réactif de Folin Ciocalteu réagit en milieu alcalin sur la tyrosine et le tryptophane en donnant une coloration bleue permettant un dosage colorimétrique.

### 2.2. Réalisation de la gamme d'étalonnage.

Diluer la solution étalon de tyrosine à 400 mg/l dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,2 mol/l.

Introduire des quantités croissantes de 8 à 40  $\mu$ g de tyrosine par tube dans un volume maximal de 1 ml.

Compléter à 1 ml avec la solution d'acide chlorhydrique à 0,2 mol/l.

Ajouter 5 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 0,2 mol/l.

Puis, introduire 0,6 ml de réactif de FOLIN CIOCALTEU dilué au demi (effectuer cette dilution dans l'eau distillée, juste avant l'emploi).

Attendre 5 minutes et lire l'absorbance à 750 nm.

### 2.3. Dosages (2 essais par solution testée).

Effectuer un dosage sur :

- 1 ml de solution 1 = milieu de fermentation initial d j dilué au 1/25 et filtré.
- 0,5 ml de solution 2 = surnageant de centrifugation du milieu en fin de fermentation.

### 2.4. Compte rendu et résultats.

Présenter le tableau de colorimétrie ; tracer, sur papier millimétré, la courbe d'étalonnage.

Déterminer les concentrations massiques des solutions 1 et 2.

Calculer la masse de tyrosine apportée dans le fermenteur, sachant que l'ensemencement s'est effectué dans 20 litres de milieu de culture.

Vingt grammes de masse sèche sont obtenus en fin de fermentation ; évaluer la quantité de tyrosine consommée exprimée en masse de tyrosine par unité de masse sèche.

On considère que le volume de milieu ne change pas au cours de cette fermentation.

### 3 - DETERMINATION DE L'ACTIVITE LIPASIQUE (25 points)

#### 3.1. Principe du dosage.

Il est basé sur la réaction :



La diminution de la turbidité est mesurée dans l'UV à 340 nm.

#### 3.2. Réactifs.

Réactif 1 = réactif lipase = lyophilisat contenant : trioléïne, tampon pH = 9,2, Ca Cl<sub>2</sub>, colipase.

Solution enzymatique standard.

Echantillon = milieu en fin de fermentation présenté dilué au 1/200 dans une solution de chlorure de sodium à 9 g/l.

#### 3.3. Mode opératoire.

##### 3.3.1. Préparation de la solution réactionnelle :

dissoudre le contenu du flacon "réactif lipase" avec 2,5 ml d'eau bidistillée.

Stabilité : 5 jours entre 15°C et 25°C.

##### 3.3.2. Conditions de mesure :

température 30°C,  
longueur d'onde 340 nm,  
trajet optique 1 cm.

Lire contre l'air dans des microcuvettes spéciales UV.

##### 3.3.3. Placer directement dans une microcuvette (1 essai) :

1 ml de solution réactionnelle + 40 µl d'échantillon.

Mélanger en évitant la formation de mousse.

Commencer la mesure à t = 30 secondes ; enregistrer la variation d'absorbance pendant 3 minutes (ou lire toutes les 30 secondes).

##### 3.3.4. Recommencer cette opération avec une solution enzymatique standard (étiquetée lipase standard) de concentration d'activité catalytique connue (1 essai).

#### 3.4. Résultats.

Présenter les enregistrements obtenus après les avoir annotés, ou tracer sur papier millimétré les courbes A (340 nm) = f (temps).

Déterminer la concentration d'activité catalytique de l'échantillon en U/l.

Exprimer l'activité lipasique du milieu de fermentation en U/ml.

### IMMUNOLOGIE (40 points)

#### Première partie : Coulage d'un gel d'agarose sur lame.

- Placer une lame de verre sur une surface parfaitement horizontale.
- Verser environ 8,5 ml du mélange agarose-immunsérum anti-entérotoxine sur cette lame (le mélange est maintenu dans un bain-marie à 56°C).
- Laisser solidifier le gel, puis placer la lame à + 4°C au réfrigérateur pendant 24 heures.

Ne pas oublier de noter le numéro de poste sur la lame.

#### B - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE (80 points)

Durée : 5 H

PREMIER JOUR

Durée : 4 H

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

Un fermenteur a été ensemencé par une souche de Staphylococcus aureus productrice d'un type d'entérotoxine. Cette entérotoxine, après purification, va permettre la production d'anticorps en vue de réaliser un test de dépistage.

Des contrôles sont effectués au cours de la production et lors de la purification.

### MICROBIOLOGIE (40 points)

#### 1 - ETUDE DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (22 points)

La durée de la phase exponentielle de croissance de la souche, pendant laquelle l'entérotoxine est produite, a été déterminée en suivant l'absorbance du milieu sur des prélèvements effectués toutes les 15 minutes. Des dénombrements de germes ont été d'autre part réalisés.

- Détermination du taux de croissance de la souche par une numération en milieu gélosé.

On dispose de :

- 2 prélèvements effectués pendant la phase exponentielle, l'un noté M1 effectué au temps  $t_1$  et le deuxième noté M2 effectué au temps  $t_1 + 1$  h. Les deux tubes sont conservés dans la glace afin de stopper la croissance bactérienne jusqu'à réalisation de l'analyse ;

- diluant : tryptone sel (9 ml/tube),
- pipettes graduées stériles 1 ml,
- boîtes de Pétri stériles,
- milieu gélosé PCA en surfusion à 55°C,
- gélose blanche en surfusion à 55°C.

On utilisera la technique classique de numération dans la masse, double couche.

Les dilutions étudiées seront :  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ .

## 2 - IDENTIFICATION D'UN CONTAMINANT DÉCELÉ AU COURS D'UNE PRÉCÉDENTE PRODUCTION (18 points)

Le contaminant décelé sur une boîte d'isolement a été réisolé sur gélose trypticase soja (GTS) incubée à 37°C.

- Procéder à l'identification de la souche par :

- \* examens macroscopique et microscopique,
- \* tests et ensemencements nécessaires à l'orientation et l'identification.

Les résultats des examens et tests, l'orientation de l'identification seront rédigés sur la copie à rendre en fin de séance.

IMMUNOLOGIE (40 points)

### Deuxième partie

On se propose de doser l'entérotoxine produite en fermenteur, après purification, par électro-immunodiffusion (technique de LAURELL). A cet effet, on réalise en parallèle un étalonnage à partir d'une solution étalon d'entérotoxine et un dosage sur une fraction de purification notée F.

#### 1. Réactifs et matériel utilisé

- lame de verre recouverte du mélange (agarose + immunosérum anti-entérotoxine) coulé le premier jour.
- Tampon véronal pH 8,6 : diluant.
- Solution étalon d'entérotoxine à 4,8 mg/ml dans le tampon véronal.
- Fraction de purification : F.

#### 2. Mode opératoire

- Creuser sur la lame d'agarose 6 réservoirs de 3 mm de diamètre à l'aide d'emporte-pièces.

La ligne de dépôt doit se situer à 1,5 cm du bord de la plaque.

- Réaliser les dilutions de la solution étalon en tampon véronal (gamme de 320 µg/ml à 960 µg/ml).
- Déposer les solutions étalons et la solution F à raison de 8 µl par réservoir.
- Placer la lame convenablement dans la cuve à électrophorèse. Celle-ci est préalablement remplie de tampon véronal.

- Placer les ponts de papier Whatman.

Laisser migrer sous une tension de 40 V/lame pendant au moins 2 heures.

### 3. Résultats

- Indiquer la technique de réalisation de la gamme d'étalonnage.
- Faire un schéma précisant la position des différents dépôts.
- Justifier la position de la plaque dans la cuve à électrophorèse.
- Mesurer la hauteur des pics de précipitation.
- Construire un tableau de résultats expérimentaux.
- Tracer sur papier millimétré la courbe d'étalonnage : hauteur = f (concentration en entérotoxine).
- Déterminer la concentration en entérotoxine de la fraction de purification F.

DEUXIEME JOUR

Durée : 1 H

#### MICROBIOLOGIE

#### 1 - ETUDE DE LA CROISSANCE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

- Donner les résultats des numérations en milieu solide des prélèvements effectués en phase exponentielle à 1 h d'intervalle.
- Déterminer le taux de croissance et le temps de génération de la souche.

#### 2 - IDENTIFICATION DU CONTAMINANT DECELE LORS D'UNE FERMENTATION PRECEDENTE

- Lire les milieux.
- Présenter les caractères de famille, genre et espèce.
- Conclure.

Epreuve professionnelle de synthèse  
deuxième partie : réalisation pratique d'opérations  
techniques      Sujet 2  
Durée 10 heures      coefficient 8

IMMUNOGLOBULINES : STRUCTURE ET ACTIVITE  
BIOCHIMIE (80 points) ; durées : 4 H 15

#### STRUCTURE D'UNE IMMUNOGLOBULINE

On dispose d'une immunoglobuline monoclonale, qui a été purifiée par traitement au sulfate d'ammonium (60 % de saturation), suivi d'une dialyse et d'une étape chromatographique (DEAE-cellulose).

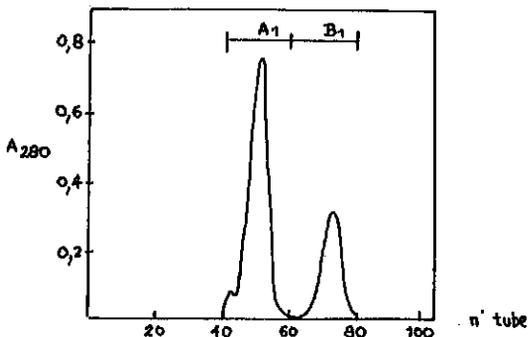
Cette immunoglobuline, classiquement constituée de deux chaînes lourdes (H) identiques et de deux chaînes légères (L) identiques a été traitée par ultracentrifugation à l'équilibre. L'étude a donné une constante de sédimentation de 6,6 S correspondant à une masse molaire de  $154\ 000 \pm 8\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , la partie glucidique étant évaluée à  $4\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

On se propose de préciser quelques aspects structuraux complémentaires de cette immunoglobuline.

### I. REDUCTION PARTIELLE DE L'IMMUNOGLOBULINE (44 points)

La réduction (en présence de dithiothréitol) coupant les ponts disulfures interchaînes a été réalisée dans des conditions ne permettant pas leur régénération.

5 milligrammes des chaînes ainsi obtenues ont été séparées par gel-filtration sur Sephadex G-100. Le profil d'élution obtenu figure ci-après.



La fraction A1 a été obtenue à partir des tubes 40 à 60 (20 ml).

La fraction B1 a été obtenue à partir des tubes 61 à 80 (20 ml).

#### 1.1. Détermination de la masse molaire des chaînes H et L de l'immunoglobuline (16 points)

La détermination sera effectuée après dosage des protéines des fractions A1 et B1 par la méthode de BRADFORD.

Le bleu de Coomassie présent dans le réactif de BRADFORD se lie aux protéines et donne une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la teneur en protéines.

La composition d'un tube de mesure est la suivante : 0,1 ml de solution protéique et 5 ml de réactif de BRADFORD.

Lire l'absorbance à 595 nm contre un blanc réactif entre 2 et 30 minutes après réalisation du tube (2 essais pour A1 et B1).

A l'aide d'une solution de protéines à  $0,3\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , préparer une gamme étalon sachant que, dans les conditions de la mesure, la limite de linéarité est atteinte avec  $30\ \mu\text{g}$  de protéines par tube.

#### 1.2. Détermination des groupements -SH interchaînes (28 points).

Les groupements -SH de la cystéine réduisent l'hexacyanoferrate III en hexacyanoferrate II qui est transformé en bleu de Prusse et dosé colorimétriquement.

Compte tenu du seuil de détectabilité de la méthode de dosage utilisée, 2 nouvelles fractions A2 et B2 ont été préparées dans des conditions similaires à celles de A1 et B1 à partir d'une solution d'immunoglobuline à  $51,3\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 1.2.1. Etalonnage

Dans 5 tubes à essais, introduire respectivement 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 ml de solution étalon de cystéine à 200 mg.l<sup>-1</sup>.

Compléter à 3 ml avec de l'eau distillée.  
Ajouter dans chaque tube 0,05 ml d'hexacyanoferrate III de potassium à 0,1 mol.l<sup>-1</sup> et 0,05 ml de tampon phosphate à 1 mol.l<sup>-1</sup>, pH 6,7.

Laisser reposer 20 minutes à la température du laboratoire, puis ajouter 0,4 ml d'acide sulfurique à 0,5 mol.l<sup>-1</sup> et compléter à 20 ml avec de l'eau distillée.

Prendre 5 ml, ajouter 0,1 ml d'hexacyanoferrate III de potassium à 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, 1 ml de sulfate ferrique et 7 ml d'eau distillée.

Attendre 5 minutes et lire l'absorbance à 725 nm.

### 1.2.2. Dosages

Procéder comme pour l'étalonnage en opérant sur 1 ml de fraction A2 et 2 ml de fraction B2 (2 essais pour A2 et B2).

## 2 - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINÉS N-TERMINAUX et C-TERMINAUX DES CHAINES LÉGERES (16 points)

L'identification sera effectuée par chromatographie en couche mince (CCM).

L'acide aminé N-terminal (fraction C) et C-terminal (fraction D) d'une chaîne légère ont été isolés par des techniques enzymatiques.

Réactiver une petite plaque de gel de silice prête à l'emploi par un séjour de 10 minutes à l'étuve à 100°C.

A l'aide de tubes capillaires, déposer sur la plaque chacune des 5 solutions témoins (noms inscrits sur les tubes) ainsi que les fractions C et D.

Sécher. Placer la plaque dans un béccher contenant le solvant de migration : n-butanol, acide acétique, eau distillée (3, 1, 1).

Recouvrir et laisser migrer.

Après séchage, révéler par pulvérisation de ninhydrine et séjour à l'étuve à 100°C.

## 3 - COMPTE RENDU (20 points)

### 3.1. Masse molaire des chaînes H et L.

Donner le tableau de préparation des tubes.

Calculer la concentration en protéines des fractions A1 et B1 en g.l<sup>-1</sup> (incertitude 5 %).

En déduire la masse molaire d'une chaîne lourde (H) et d'une chaîne légère (L) de l'immunoglobuline.

### 3.2. Groupements -SH interchaines.

Tracer la courbe d'étalonnage ou établir l'équation de la droite.

Calculer la concentration en cystéine des fractions A2 et B2 en mg.l<sup>-1</sup> (incertitude 5 %).

En déduire le nombre de résidus cystéine par chaîne lourde et par chaîne légère ainsi que le nombre de ponts disulfures interchaines.

Donnée : masse molaire de la cystéine : 121 g.mol<sup>-1</sup>.

3.3. Chromatographie.

Calculer les Rf des acides aminés des fractions C et D.  
Identifier ces acides aminés.

3.4. Conclusion.

Proposer un schéma simple de l'immunoglobuline étudiée compatible avec les résultats précédemment obtenus.

IMMUNOLOGIE-MICROBIOLOGIE (80 points) ; durée : 5 H 45

STREPTOCOQUES ET ANTISTREPTOLYSINES

1ER JOUR

Durée : 3 H 30

1 - IMMUNOLOGIE : ACTIVITE DE L'ANTISTREPTOLYSINE O (30 points).

Réaliser sur l'échantillon fourni d'une préparation purifiée d'immunoglobulines le dosage des antistreptolysines O.

1. Matériel et réactifs

- Tubes à hémolyse.
- Une microplaque vierge à fond rond.
- Pipettes automatiques avec pointes : P100 et P1000.
- Etuve à 37°C.
- Echantillon à tester (environ 0,3 ml) étiqueté P.
- Tampon ASO pH 6,5 à 6,7.
- Streptolysine O à 2,5 USL.ml<sup>-1</sup>, fournie au moment de la demande car stabilité limitée à 15 min.
- Hématies de lapin à 3 % en tampon ASO à préparer à partir d'une suspension à 50 % fournie (environ 0,2 ml).

2. Mode opératoire

2.1. Préparer 2 dilutions initiales de la préparation d'immunoglobulines (échantillon à tester) en tampon ASO.

- dilution A au 1/10.
- dilution B au 1/50.

2.2. Dosage des antistreptolysines O.

Prévoir les témoins nécessaires.

2.2.1. Répartition et dilution de la préparation en série à partir des 2 dilutions initiales selon le tableau ci-dessous :

CUPULES	Rangée A : dilution au 1/10								Rangée B : dilution au 1/50					
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6
tampon (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	-	50	50	50	50	50
dilution au 1/10 (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	-	-	-	-	-	-
dilution au 1/50 (µl)	-	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50	50	50	50

Rejet : 50 µl

Rejet : 50 µl

- 2.2.2. Ajouter dans chaque cupule 25  $\mu$ l de streptolysine O. Agiter 1 minute. Incuber 15 minutes à 37°C (plaque couverte).
- 2.2.3. Ajouter 25  $\mu$ l de la suspension d'hématies à 3 % préparée par le candidat. Agiter une minute. Incuber 45 minutes à 37°C (plaque couverte).
- 2.2.4. Centrifuger la plaque 2 minutes à 500 g.
- 2.2.5. Lire les résultats.

### 3. Compte rendu

Expliquer la réalisation de la suspension d'hématies à 3 %.

Donner la composition quantitative et le rôle des témoins.

Conclure sur les résultats obtenus.

Construire un tableau des résultats expérimentaux faisant apparaître les dilutions finales et l'aspect des cupules.

Exprimer le titre en antistreptolysines par millilitre (USA.ml<sup>-1</sup>).

Rappel : la streptolysine titre à 2,5 USL.ml<sup>-1</sup>.

#### - MICROBIOLOGIE (50 points).

La mise au point de la méthode immunologique de dosage de l'antistreptolysine a nécessité l'utilisation de suspensions étalonnées de streptocoques dont la concentration était évaluée par mesure de l'absorbance à 620 nm, puis estimée par calcul à partir d'une relation de la forme :

"0,1 unité d'absorbance à 620 nm correspond à n UFC.ml<sup>-1</sup>."

Le but de la manipulation est d'établir cette relation.

Pour des raisons de sécurité, on opérera à partir d'une souche de streptocoques du groupe D.

#### 1ère partie : établissement de la relation (26 points).

A partir de la suspension S :

- 1.1. Réaliser en bouillon ordinaire des dilutions au 1/2, au 1/4 et au 1/8 (bien homogénéiser, de préférence au vortex) ; prévoir, pour chaque dilution, un volume final d'au moins 5 ml ; mesurer l'absorbance à 620 nm des suspensions S, S/2, S/4, S/8.
- 1.2. Réaliser en eau physiologique des dilutions de raison géométrique 10, jusqu'à 10<sup>-6</sup>, à partir de chacune des suspensions S, S/2, S/4, S/8 (volume final 10 ml).  
Ensemencer par étalement 100  $\mu$ l des dilutions 10<sup>-6</sup> et 10<sup>-5</sup> de S, S/2, S/4, S/8 sur gélose de Slanetz (2 boîtes par dilution, soit 16 boîtes).  
Incuber 24 h à 37°C.

#### 2ème partie : isolement des contaminants (24 points).

Au cours d'un essai préalable, la suspension de streptocoques a été contaminée ; il s'agit de la suspension E.

Après observation d'une coloration de Gram de E, procéder à des isolements sur une gélose ordinaire, une gélose Sabouraud au chloramphénicol et une gélose de Drigalski.

Les géloses seront laissées sur la paillasse en fin de séance, avec indication des températures d'incubation.

**MICROBIOLOGIE (50 points)**

2EME JOUR

Durée : 2 H 15

1ère partie : établissement de la relation :

"0,1 unité d'absorbance à 620 nm correspond à n UFC.ml<sup>-1</sup>".

Compléter le tableau de résultats joint.

Tracer sur papier millimétré la courbe  $A = f(\text{UFC.ml}^{-1})$  en tenant compte des marges d'incertitude habituellement admises ( $\log n \pm 0,5$ ).

En déduire la relation cherchée.

2ème partie : isolement des contaminants.

Lire les résultats des isolements ; interpréter.

A partir de colonies isolées sur la gélose de Drigalski, réaliser un test d'orientation rapide permettant en fin de séance d'affiner le diagnostic.

**DOCUMENT A JOINDRE A LA COPIE**

	S		S/2		S/4		S/8	
A 620 nm								
Nombre de colonies dilution 10 <sup>-5</sup>								
Nombre de colonies dilution 10 <sup>-6</sup>								
n (UFC.ml <sup>-1</sup> )								
log n								
(log n) - 0,5								
(log n) + 0,5								
n mini								
n maxi								

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**deuxième partie : réalisation pratique d'opérations**  
**techniques                   Sujet 3**  
**Durée 10 heures           coefficient 8**

**BIOCHIMIE (80 points)**

**Durée : 4 H 30**

**CULTURE DE CELLULES EUCARYOTES**

La mise en culture de cellules eucaryotes nécessite divers contrôles biochimiques.

On se propose de contrôler un lot de trypsine utilisé au cours de la phase d'explantation et de suivre la consommation d'acides aminés lors des repiquages des cellules effectués à différents temps.

**I - CONTROLE D'UN LOT DE TRYPSINE AVANT UTILISATION (52 POINTS).**

La trypsine est utilisée dans la phase d'explantation, au cours de laquelle on extrait les cellules d'un organe par dissociation mécanique et enzymatique avant la première mise en culture.

Un nouveau lot commercial de trypsine à 2,5 % doit être ouvert. Avant de l'utiliser pour la maintenance de la culture, on se propose de déterminer sa teneur en protéines et son activité enzymatique.

**1.1. Détermination de la concentration en protéines par la méthode de Folin-Lowry (20 points).**

**1.1.1. Etalonnage du spectrophotomètre :**

A partir d'une solution étalon mère de protéines à 4 g/l, préparer une gamme de tubes contenant entre 0 et 400 µg/tube.

Compléter chaque tube à 1 ml avec de l'eau physiologique.

Ajouter 5 ml de solution alcaline de sulfate de cuivre ; agiter et attendre 5 minutes.

Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin, agiter, attendre 30 minutes et lire à 650 nm.

**1.1.2. Essais : (2 essais)**

Opérer sur une prise d'essai de 1 ml de la solution commerciale de trypsine correctement diluée.

**1.1.3. Résultats :**

Présenter, sous forme de tableau, la composition des tubes (gamme et essais) ainsi que les résultats expérimentaux.

Déterminer la concentration en protéines, soit par tracé de la courbe, soit par utilisation de la calculette (coefficient de variation analytique 5 %).

**1.2. Détermination de l'activité estérasique de la trypsine (32 points).**

**1.2.1. Principe :**

La trypsine (EC 3.4.21.4.) est une protéase qui possède aussi une activité estérase, laquelle est utilisée pour la détermination de l'activité trypsique.

Le substrat synthétique utilisé est le N-alpha-benzoyl-L-arginyl-éthyl-ester (BAEE). La réaction catalysée s'écrit :



En milieu non tamponné, à pH alcalin, l'hydrolyse d'une mole de BAEF libère une mole de proton. On neutralise au fur et à mesure les protons formés, par addition d'hydroxyde de sodium de concentration connue, de telle sorte que le pH reste constant (méthode du pH-stat).

### 1.2.2. Mode opératoire :

Étalonner le pH-mètre.

On travaille à pH 8 et à température ambiante.

Dans un bécher introduire :

- 25 ml de solution de BAEF à 20 mmol/l

- 25 ml de solution de KCl à 0,2 mol/l

Agiter à l'aide d'un barreau aimanté et verser la solution d'hydroxyde de sodium de concentration voisine de 1 mmol/l à l'aide d'une burette jusqu'à atteindre pH 8,2.

Ajouter :

- 0,2 ml de solution commerciale de trypsine.

Déclencher le chronomètre quand le pH est revenu exactement à 8,0 (temps  $t_0$ ).

Avant que le pH ne soit descendu à 7,9, ajouter un volume  $V_1$  de NaOH pour ramener le pH à une valeur comprise entre 8,0 et 8,2.

Noter le temps  $t_1$ , nécessaire pour que le pH revienne exactement à 8,0. Répéter ces opérations pendant 10 minutes.

Faire au minimum 3 essais (1 préliminaire, 2 définitifs). On pourra considérer comme "normal" un coefficient de variation analytique inférieur ou égal à 9 %.

### 1.2.3. Résultats :

Tracer sur papier millimétré la courbe  $V_{\text{NaOH}} = f(\text{temps})$ .

Déterminer la relation entre le volume d'hydroxyde de sodium versé et l'activité de la trypsine.

Calculer en unités BAEF l'activité de cette préparation (l'unité BAEF de trypsine est la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1  $\mu$ mole de BAEF en une minute au pH et à la température considérés).

## II - CONTRÔLES EFFECTUÉS SUR LE MILIEU DE CULTURE (28 POINTS).

Le milieu de culture utilisé contient du glucose, des acides aminés, des vitamines, des éléments minéraux et un indicateur de pH.

Des essais opérés sur des cultures à différents temps permettent de suivre la consommation d'acides aminés par chromatographie sur couche mince.

### 2.1. Chromatographie sur couche mince des acides aminés.

#### 2.1.1. Mode opératoire :

Réactiver le gel de silice par passage à l'étuve à 100°C.

À l'aide de capillaires déposer une goutte de chaque acide aminé témoin (proline, lysine, valine, leucine, arginine, acide glutamique) et une goutte des solutions M0, M48 ET M96 (concentrées par osmose inverse) correspondant aux temps d'incubation 0h, 48h et 96h.

Sécher.

Placer la (les) plaque (s) dans la cuve contenant le solvant (n-butanol 3V, acide éthanoïque 1 V, eau 1 V).  
Laisser migrer. Sécher, puis révéler avec le réactif à la ninhydrine et placer à l'étuve à 100°C pendant 10 minutes.

**2.1.2. Résultats :**

Calculer les Rf des acides aminés témoins et identifier les acides aminés présents aux temps 0,48 et 96 heures.

**2.2. Conclusion.**

Les cellules ont été mises en culture dans des flacons contenant 7,5 ml de milieu.  
Des numérations ainsi que des tests de viabilité au bleu Trypan effectués aux différents temps ont donné les résultats suivants :

Temps de culture (h)	Nombre de cellules par millilitre	Pourcentage de cellules viables
0	50 000	
24	125 000	
48	$1,1 \cdot 10^6$	90 %
96	$1,2 \cdot 10^6$	50 %

Compte tenu de l'ensemble des résultats, déterminer le temps de culture optimal (justifier la réponse).

**MICROBIOLOGIE - BIOLOGIE CELLULAIRE (30 points).**

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

**1ER JOUR**

**DUREE : 3 H 30**

**CULTURE DE CELLULES EUCARYOTES**

Dans le cadre d'un travail avec des cultures cellulaires, on doit périodiquement réaliser un certain nombre de contrôles.

On se propose ici d'envisager la réalisation de quelques uns de ces contrôles lors du repiquage d'une lignée en suspension.

**1 - BIOLOGIE CELLULAIRE : REPIQUAGE D'UNE CULTURE (25 points).**

**1.1. Numération préalable : test de viabilité au bleu Trypan.**

A partir d'un flacon de culture dense et homogène, prélever stérilement sous la hotte 100 µl de culture qu'on introduit dans un tube à hémolyse. Remettre le flacon dans l'incubateur.

Réaliser le test de viabilité comme suit :

- 50 µl de culture + 450 µl de bleu Trypan à 0,04 %,
- numérer en cellule de Malassez après homogénéisation.

**1.2. Complémentation d'un milieu.**

Sous la hotte, disposer le plan de travail avec les réactifs donnés et préparer 7,5 ml de milieu RPMI complet en introduisant dans un flacon neuf :

- le milieu RPMI de base,
- du sérum de veau foetal (SVF) : 10 % du volume final,
- de la glutamine (GLU-NH<sub>2</sub>) : 1 % du volume final,
- le mélange d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine) : 0,4 % du volume final.

1.3. Ensemencement.

Dans ces 7,5 ml introduire sous la hotte "x"  $\mu$ l de la culture numérotée précédemment pour avoir environ 50 000 cellules vivantes par millilitre de cette nouvelle culture.

Identifier le flacon ; le ranger dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>.

1.4. Résultats - Compte rendu.

- 1.4.1. Donner le décompte du test de viabilité ; en déduire le pourcentage de cellules vivantes.
- 1.4.2. Expliquer le calcul des volumes de RPMI, SVF, GLU-NH<sub>2</sub> et antibiotiques prélevés pour compléter le milieu.
- 1.4.3. Déterminer, en justifiant le calcul, le volume "x" de culture initiale (inoculum) introduit dans le milieu neuf.

2 - MICROBIOLOGIE (55 points).

2.1. Dosages microbiologiques d'un antibiotique : la pénicilline (35 points).

On ajoute au milieu RPMI deux antibiotiques, la pénicilline et la streptomycine, afin d'éviter des contaminations bactériennes.

On va doser la solution mère de pénicilline utilisée par deux méthodes microbiologiques de diffusion en milieux gélosés :

- méthode des puits,
- méthode des disques.

2.2.1. Réalisation de la gamme étalon de pénicilline.

Elle comportera 4 tubes de 500, 1000, 1500, 2000  $\mu$ g/ml, sous un volume total de 400  $\mu$ l.

On dispose de :

- 1 ml de solution de pénicilline à exactement 2g/l, marquée "Pen 2g/l",
- diluant : eau distillée stérile,
- tubes à hémolyse stériles.

2.1.2. Dosages.

Chaque point de la gamme ainsi que l'échantillon seront testés en triple.

La solution mère de pénicilline ajoutée au milieu RPMI est à environ 15 g/l.

Pour les dosages, elle est fournie diluée au 1/12, soit à environ 1250  $\mu$ g/ml (solution marquée "Pen X").

Les puits ou les disques devront être distants au minimum de 15 mm du bord de la boîte, et de 30 mm de centre à centre.

#### 2.1.2.1. Méthode des puits.

La souche test utilisée, (sensible aux 2 antibiotiques), est E.coli ATCC 10536, culture de 18 h à 37°C en bouillon de Mueller Hinton.

Introduire 2 ml d'une dilution  $10^{-3}$  en eau physiologique stérile de cette culture dans un flacon de milieu de Mueller Hinton ramené à 45°C (les milieux maintenus en surfusion à 60°C peuvent être ramenés à 45°C, par passage dans l'étuve à 45°C durant 15 minutes).

Couler le milieu ensemencé dans une boîte carrée de 120 mm de côté.

Creuser dans la gélose au maximum 16 puits à l'aide d'un emporte-pièce. Déposer au fond de chaque puits une petite goutte de gélose en surfusion.

Faire des dépôts de 40 µl.

Laisser diffuser 30 minutes à température ambiante, puis incubé 18 h à 37°C, boîte non retournée.

#### 2.1.2.2. Méthode des disques.

La souche test utilisée est la même que ci-dessus.

Ensemencer la surface d'un milieu de Mueller Hinton coulé en boîte carrée de 120 mm de côté (technique de l'antibiogramme), de façon à obtenir des colonies juste confluentes.

Sécher 20 minutes.

Déposer au maximum 16 disques de papier stérile pour antibiogramme ; faire des dépôts de 5 µl.

Laisser diffuser 30 minutes à température ambiante, puis incubé 18 h à 37°C, boîte retournée.

### 2.2. Identification d'un contaminant (20 points).

Au cours d'une culture précédente, on a isolé un contaminant. Ce dernier est présenté sur gélose trypticase soja inclinée.

Effectuer les tests nécessaires à l'orientation, puis ensemencer la galerie adéquate à l'identification.

### 2.3. Résultats - Compte rendu.

#### 2.3.1. Réalisation de la gamme étalon de pénicilline.

Indiquer comment sont réalisées les dilutions en justifiant les calculs.

#### 2.3.2. Dosages.

Donner le diagramme de répartition des dépôts.

#### 2.3.3. Identification d'un contaminant.

Donner les résultats de l'orientation.

MICROBIOLOGIE - BIOLOGIE CELLULAIRE (80 points).

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

2EME JOUR

DUREE : 2 H

1 - BIOLOGIE CELLULAIRE (25 points).

Observation de la culture.

Sortir le flacon de culture de l'incubateur.

Observer au microscope inversé et conclure.

Laisser le flacon sur la pailasse, à disposition des examinateurs.

2 - MICROBIOLOGIE (55 points).

2.1. Dosages microbiologiques d'un antibiotique : la pénicilline (35 points).

Regrouper l'ensemble des résultats expérimentaux dans un tableau récapitulatif.

Tracer, pour chaque méthode, la droite d'étalonnage : diamètres d'inhibition en fonction du logarithme décimal des concentrations de pénicilline.

En déduire la concentration de la solution de pénicilline employée et discuter les résultats obtenus par chaque méthode.

Remarques : les diamètres d'inhibition pris en compte seront la moyenne des résultats de chaque point de la gamme et de l'échantillon.

2.2. Identification d'un contaminant (20 points).

Procéder à l'identification du contaminant.



---

Annales

Brevet de Technicien Supérieur  
**BIOTECHNOLOGIE**

sessions 1992-1994

---

Publications de l'UPBM

UPBM Edition Lycée technique "La Martinière"  
La Duchère 69338 Lyon Cedex 9



# Annales du BTS Biotechnologie

Les annales sont divisées en années. La numérotation est liée à chaque année.

## Sommaire

### Année 1992

Français	92-1
Anglais	92-7
Mathématique et Sciences physiques	92-8
Sciences biologiques fondamentales et Génie biologique	92-13
Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etude de projet)	92-16
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations de génie biologique)	92-24

### Année 1993

Français	93-1
Anglais	93-2
Mathématique et Sciences physiques	93-3
Sciences biologiques fondamentales et Génie biologique	93-6
Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etude de projet)	93-10
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations de génie biologique)	93-19

### Année 1994

Français	94-1
Anglais	94-7
Mathématique et Sciences physiques	94-8
Sciences biologiques fondamentales et Génie biologique	94-15
Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etude de projet)	94-17
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations de génie biologique)	94-24

# Annales du BTS Biotechnologie

## Définition de la nature des épreuves

### 1. Epreuve de français

Modalités de l'épreuve :

- Epreuve écrite
- Durée : 3 heures
- Coefficient : 2

Objet et contenu de l'épreuve

L'épreuve a pour but de vérifier l'aptitude du candidat, d'une part à saisir dans un texte les idées essentielles et leur organisation logique, d'autre part à s'exprimer correctement et avec simplicité.

On proposera un texte de cinquante à cent lignes dactylographiées qui offrira par lui-même un sens assez complet, qui soit clair et bien composé et qui se prête à une analyse d'idées.

Le texte proposé portera sur les problèmes de la vie moderne, problèmes de culture personnelle et de relations sociales qui peuvent intéresser un futur technicien. On tiendra compte dans le choix du texte des caractéristiques particulières du domaine professionnel auquel le candidat se destine.

Le candidat devra :

- résumer le texte en un nombre limité de mots ;
- répondre à quelques questions destinées à lui faire préciser et expliquer le sens de notions et de mots importants du texte en témoignant de la culture générale qu'il a reçue ;
- exprimer dans un commentaire succinct et composé ses vues personnelles sur l'ensemble ou sur un aspect particulier du texte.

### 2. Epreuve d'anglais

- Ecrit : durée = 2 heures
- Oral : durée maximale = 30 min
- Coefficient : 2.

L'épreuve écrite entrera pour deux tiers et l'épreuve orale pour un tiers.

*Partie écrite*

L'épreuve doit permettre de vérifier les capacités du candidat à :

- lire une lettre à caractère technique et en rendre compte ;
- comprendre des articles de revues spécialisées ;
- utiliser des notices, modes d'emploi, diagrammes et schémas en anglais concernant des matériels étrangers.

Cette épreuve comprendra d'abord la traduction ou le compte rendu d'un texte extrait d'un document technique ; lui fera suite la rédaction d'un texte se rapportant au sujet étudié précédemment.

*Partie orale*

L'épreuve consistera en un entretien avec le jury, destiné à vérifier la maîtrise des structures essentielles de la langue.

### Epreuve facultative

*Langue vivante II*

Epreuve orale : durée maximale : 30 min  
Coefficient : 1

Seuls les points au-dessus de 10 seront pris en compte pour le total obtenu par le candidat.

L'épreuve doit permettre d'apprécier les capacités du candidat :

- à lire, analyser et commenter succinctement un document se rapportant au domaine professionnel et écrit dans la langue choisie ;
- à s'exprimer convenablement dans les domaines de ses futures activités, dans cette langue.

Cette épreuve, qui pourra être précédée par une préparation de 30 minutes au maximum, consistera en un entretien avec le jury et pourra comporter la lecture et le résumé du texte par le candidat et une conversation sur ce texte.

### 3. Epreuve de mathématiques - Sciences physiques

- Epreuve écrite
- Durée = 4 heures
- Coefficient = 4

L'épreuve comporte deux parties obligatoires, organisées en continuité.

Première partie : Mathématiques (coefficient = 1,5)

*Objectifs :*

L'enseignement des mathématiques a pour triple objectif de fournir un outil efficace pour les sciences physiques et biologiques et la technologie, de développer la formation scientifique et de contribuer à la formation personnelle et relationnelle. Par suite, cette première partie d'épreuve doit permettre :

- d'apprécier la solidité des connaissances des candidats et leur capacité à les utiliser dans des situations variées ;
- de vérifier leur aptitude au raisonnement et leur capacité à analyser correctement un problème, à justifier les résultats obtenus et à apprécier leur portée ;
- d'apprécier leurs qualités dans les domaines de l'expression écrite et de l'exécution soignée de tâches diverses (tracés graphiques, calculs à la main ou sur machine).

*Nature de cette partie d'épreuve :*

Cette partie d'épreuve écrite est prévue pour une durée de deux heures.

Les sujets comportent deux exercices de mathématiques recouvrant une part très large du programme. Les thèmes mathématiques qu'ils mettent en œuvre portent principalement sur les chapitres les plus utiles pour les sciences et techniques biologiques.

L'épreuve porte sur des applications directes des connaissances de cours.

Il convient d'éviter toute difficulté théorique et toute technicité mathématique excessive.

La longueur et l'ampleur du sujet doivent permettre à un candidat moyen de traiter le sujet et de le rédiger posément dans le temps imparti.

Les deux points suivants doivent être rappelés en tête des sujets :

— La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante de l'appréciation des copies.

— L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

**Deuxième partie : Sciences physiques** (physique et/ou chimie - coefficient : 2,5)

Cette seconde partie de l'épreuve doit permettre d'apprécier le niveau des connaissances en sciences physiques du candidat et son aptitude à les utiliser dans des situations concrètes proches du domaine technique où il est appelé à intervenir.

Elle comporte plusieurs questions indépendantes ou exercices indépendants.

Les questions posées se rapportent à des applications concrètes dont la compréhension ne doit faire appel qu'à des notions fondamentales du programme.

Cette épreuve doit permettre de vérifier que le candidat :

— analyse convenablement un problème posé en utilisant judicieusement ses connaissances scientifiques ;

— prend en compte l'ensemble des données et des hypothèses ;

— propose une solution justifiée par un raisonnement logique, élaborée en faisant appel au contenu du programme.

**4. Epreuve de sciences biologiques fondamentales et génie biologique**

— Epreuve écrite

— Durée : 4 heures

— Coefficient : 6

Cette épreuve doit permettre d'apprécier le niveau des connaissances du candidat dans les domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique. Elle doit avoir un caractère pluridisciplinaire.

Elle comporte plusieurs questions indépendantes.

**5. Epreuve professionnelle de synthèse : étude de projet et réalisation pratique d'opérations de génie biologique**

— Epreuve écrite et pratique

— Durée maximale : 12 heures

— Coefficient : 12

Cette épreuve comporte deux parties obligatoires.

**Première partie : Etude de projet**

— Partie écrite

— Durée : 4 heures

— Coefficient : 4

Cette partie a pour but de vérifier les capacités de réflexion en vue de la résolution d'un problème biotechnologique simple pouvant relever des domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique.

Elle doit permettre d'apprécier :

— les capacités :

• d'analyse du problème ;

• de conception d'un simple projet et de définition d'une stratégie expérimentale ;

• d'utilisation de documents, éventuellement, de langue anglaise ;

• de prise en compte des aspects concernant la sécurité, la législation et la gestion ;

• d'utilisation des techniques et du matériel, notamment informatique ;

— l'esprit d'initiative.

**Deuxième partie : Réalisation pratique d'opérations de génie biologique**

— Partie pratique

— Durée maximale : 8 heures

— Coefficient : 8

Cette partie a pour but de vérifier les savoir-faire en biotechnologie, notamment dans les domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique.

Elle est pluridisciplinaire.

Elle doit permettre de vérifier les capacités :

— de mise en œuvre d'un protocole opératoire dans des conditions satisfaisantes de sécurité et d'efficacité ;

— d'organisation ;

— de rigueur et de précision dans l'exécution ;

— d'exploitation des résultats.

Elle peut se dérouler en plusieurs parties.

Elle comporte plusieurs questions liées ou indépendantes.

Elle a un caractère essentiellement pratique.

Elle donne lieu à un compte rendu et peut, éventuellement, faire appel aux techniques de l'informatique.

## 6. Epreuve de soutenance du rapport de stage ou d'activité professionnelle

### — Epreuve orale

— Durée maximale = 1 heure

— Coefficient = 4 (2 pour les compétences scientifiques, technologiques et professionnelles, 1 pour les compétences en français, 1 pour les compétences en économie et gestion).

L'épreuve a pour but de vérifier :

1. en ce qui concerne la connaissance professionnelle et humaine de l'entreprise, si le candidat est capable de :

— saisir les données constitutives d'une entreprise ou d'un laboratoire ;

— comprendre le fonctionnement d'une entreprise ou d'un laboratoire sur les plans de la technique et de l'organisation ;

— présenter les activités d'un stage en analysant les problèmes techniques rencontrés et les démarches adoptées.

2. en ce qui concerne la communication et l'expression, si le candidat est capable de :

— dégager, ordonner et mettre en valeur les points essentiels d'un document à caractère technique ;

— maîtriser les techniques de la communication orale devant un auditoire non familier ;

— utiliser la langue française correctement et avec clarté.

Le candidat présentera et soutiendra oralement le rapport qu'il aura établi à l'issue de son stage de deuxième année en entreprise, s'il s'agit d'un candidat scolarisé ou un rapport sur son activité professionnelle s'il s'agit d'un candidat dispensé de stage en raison d'un emploi salarié.

Il devra notamment faire apparaître le caractère spécifique de l'entreprise où il aura effectué son stage ou exercé son activité professionnelle, rendre compte de la visée, du déroulement et de l'aboutissement du stage lui-même ou de l'activité professionnelle, exposer ses réflexions en particulier d'ordre technique que le stage ou l'activité professionnelle lui aura inspirées.

La présentation n'exoèdera pas 20 minutes.

La seconde partie de l'épreuve pourra être consacrée à un dialogue entre le jury et le candidat.

Le rapport de stage ou d'activité professionnelle de dix à vingt pages dactylographiées (ou quinze à trente pages manuscrites), sans compter les documents techniques, comprendra :

— une présentation schématique de l'établissement de stage et du déroulement du stage de deuxième année ou de l'activité professionnelle exercée dans le domaine de la biotechnologie ;

— le compte rendu d'un travail personnel ;

— une réflexion personnelle concernant l'activité professionnelle et un bilan sur ce stage ou sur cette activité professionnelle.

Ce travail devra prendre en compte les problèmes de sécurité et de législation.

Les documents indispensables à la compréhension de ce rapport pourront figurer en annexe.

Pour les candidats scolarisés, la fiche de stage sera jointe.

L'évaluation des aspects scientifiques, techniques et professionnels se fera selon la répartition suivante :

— dossier écrit : coefficient 1 ;

— présentation orale et entretien : coefficient 1.

La commission de jury pour cette épreuve doit comprendre :

— un professeur de français ;

— un professeur d'économie et gestion ou de sciences et techniques économiques ;

— un professeur chargé d'enseignement technologique.

Les candidats autorisés ayant échoué à l'examen peuvent :

— soit présenter de nouveau le rapport soutenu lors de la session à laquelle ils ont échoué ;

— soit, s'ils le jugent nécessaire, modifier celui-ci dans le sens qu'ils estiment opportun ou refaire un nouveau stage et rédiger un nouveau rapport qui tienne compte des situations rencontrées au cours de ce second stage et qui peut reprendre des observations rassemblées au cours du premier stage.

## Epreuve de Français : synthèse de documents

### Durée 4 heures Coefficient 2

Dans une synthèse concise et organisée, vous rendrez compte des cinq documents suivants qui posent le problème du bizutage, puis vous exprimerez en conclusion un avis personnel.

#### Documents joints :

1. "Rites de passage en Afrique." Pierre Héraux dans - Histoire des Moeurs tome II page 351 - Encyclopédie de la Pléiade 1991
2. "Un rite d'initiation humiliant et pervers ?" Anne Fohr Le Nouvel Observateur - 10/16 octobre 1991
3. "Les excès du bizutage." Courrier des lecteurs du Monde Novembre 1989
4. Absurde bizutage" - François Fricker - Le Monde 1990
5. "Archaïque ? Non, Postmoderne !" Michel Maffesoli Le Nouvel Observateur - 10/16 octobre 1991

#### DOCUMENT 1

#### Rites de passage en Afrique

(Dans l'extrait suivant de l'Histoire des Moeurs, l'auteur évoque les modes de socialisation et d'éducation des enfants africains)

A douze ans, ils sont au fait de la vie sous tous ses aspects, rien n'ayant été caché. Mais ils ne sont pas encore capables d'accéder à la condition humaine dans toute sa plénitude. Cette possibilité arrive avec la puberté. Avec la maturité sexuelle et la capacité de procréer, ils pourront assurer la pérennité du groupe, renforcer les alliances familiales par le mariage, créer cette richesse essentielle que constituent les enfants et donc prolonger et accroître le lignage.

Le camp d'initiation, sorte de stage intensif pour la classe d'âge de même sexe, est la seule institution éducative reconnue comme telle. L'initiation couronne la formation et introduit au nouveau statut et aux nouvelles fonctions sociales. A tous les points de vue, elle marque une nouvelle rupture : il faut mourir à l'enfance et se métamorphoser pour renaître pleinement à la collectivité et y adhérer de manière irréversible et indissoluble. Les moyens employés eux-mêmes rompent avec les habitudes : à l'atmosphère bienveillante et à l'organisation informelle dans laquelle baigne d'ordinaire la formation se substitue une période faite d'épreuves épuisantes, de veilles, de privations, de souffrances, que les jeunes appréhendent et vivent dans l'angoisse sinon la terreur, le mystère et la surexcitation. A un apprentissage en rapport étroit avec la vie succède un

temps de réclusion, à l'écart, dirigé par des inconnus qui remplacent les familiers. Même si des savoirs et des secrets sont transmis à cette occasion, la fonction est plus de synthétiser les acquis antérieurs, de rendre officiellement légitime leur possession et leur usage et d'en faire apercevoir les dimensions mythiques et religieuses. Mais surtout, il s'agit d'amener à une expérience spirituelle qui façonne profondément la sensibilité, qui dépouille la personnalité individuelle pour la fondre dans la communauté.

Pierre Héraux  
dans Histoire des Mœurs  
Tome II - p. 361  
La Pléiade 1991

## DOCUMENT 2

### UN RITE D'INITIATION HUMILIANT ET PERVERS ?

[Le bizutage serait-il...]

... un exorcisme collectif ? On comprend que les carabins, soldats, gens des Beaux-Arts puissent devenir bouffons au moment d'entrer dans un monde d'émotions fortes. Mais les futurs spécialistes de thermodynamique ou de gestion financière ?

Plus sérieusement, le bizutage, ce serait d'abord une fête chic ! "C'est une stratégie de distinction d'une élite, dit Olivier Galland, sociologue, spécialiste de l'adolescence au CNRS. Il est logique qu'elle se répande à une époque de massification scolaire. Il faut, plus que jamais, se démarquer du commun des mortels. Voyez toutes ces petites et fausses grandes écoles qui se dépêchent d'instaurer cette pratique." Sans compter l'Université qui se laisse gagner, elle aussi, par ce souci de distinction : Paris IX-Dauphine, des filières professionnalisées haut de gamme et même quelques IUT ont désormais leurs bizuts ! A croire que le label de qualité d'une école se mesure désormais à la dureté de son bizutage. Les ingénieurs des Arts et Métiers, par exemple, revendiquent haut et fort leurs "usinages" - appellation maison du bizutage -, réputés pour être particulièrement longs, bêtes et méchants : ils forment, selon eux, des "honnêtes hommes", fraternels et solidaires. (...)

Ce mois-ci, des professeurs de terminale du lycée privé [X...] ont sommé les autorités des facultés catholiques de Lille de mettre fin aux "tracasseries", "brimades", "attitudes sadiques" dont auraient été victimes certains de leurs anciens élèves à l'école d'ingénieurs et à la fac de médecine. L'un d'eux aurait eu des troubles rénaux graves après avoir avalé des déjections canines.

Le bizutage n'est pourtant pas toujours une farce funèbre. Nous n'en sommes pas, tant s'en faut, aux "28 morts dans les universités américaines" qu'aime à citer, en guise de cri d'alarme, Jean-Claude Delarue, le bouillant président de l'Association pour la Défense des Usagers de l'Administration (ADUA), qui a eu le mérite d'attaquer un tabou en faisant du bizutage son dernier cheval de bataille : "On laisse le champ libre à de petits groupes de "bébés tortionnaires" qui agissent suivant leurs instincts suivant leurs instincts les plus pervers et bafouent impunément la dignité humaine." Du calme ! S'il s'agissait, tout simplement, de garçons et de filles ordinaires, dont quelques-uns parfois, dans le feu de l'action, dérapent. Est-il vrai qu'un jeune homme est mort un jour, ficelé entre deux matelas et jeté par une fenêtre ? En tout cas pas dans tous les lycées et écoles que la rumeur cite avec certitude comme étant le lieu de l'accident. Il n'en reste pas moins que ce chahut-bahut étudiant a ses bavures et ses zones d'ombre.

Faut-il l'interdire purement et simplement, comme le demande l'ADUA, au nom d'une loi de 1928 ? Des écoles s'y essaient en pure perte. Le prendre en main ? Madame le doyen d'une fac de médecine lyonnaise, d'autorité, l'a remplacé par "un baptême de promotion" baignant dans "un peu de décorum et une ambiance familiale". Mais il n'est pas sûr que les potaches aient toujours le bon goût, comme les Lyonnais, d'apprécier le spectacle de leurs professeurs en robe...

Même les spécialistes de l'adolescence ne sont pas d'accord sur la manière d'intervenir. "Cela ne regarde pas les adultes, dit le psychanalyste Alain Braconnier. Ce passage de l'enfance au monde adulte est un rite d'initiation, avec des cérémonies, des souffrances, toujours un peu humiliantes et perverses, préfigurant les épreuves à venir."

"Bien sûr, les adolescents ont besoin de rites d'initiation à la vie, avec des épreuves au cours desquelles ils veulent retrouver les angoisses humaines, s'insurge Tony Anatrella, ethnopsychanalyste. Mais le bizutage est un faux rite, vide de sens, purement narcissique, ne s'inscrivant dans aucune dimension philosophique ou mystique. Il met aussi en oeuvre une sexualité primitive, qui masque un non-dit, la volonté de puissance des aînés sur les plus jeunes, à un moment où ceux-ci redoutent de ne pas être dignes de la caste où ils entrent. C'est de l'ordre du sacrifice humain."

La solution ne viendra pas sans doute que des intéressés eux-mêmes. Chez eux, les modes chassent vite les traditions ! De grands fiefs, écoles de commerce en tête, commencent à s'affranchir et à se démarquer. Sans doute par stratégie de distinction. Chez elles, on a laissé tomber depuis deux ou trois ans le bizutage hard pour une version soft, sobrement baptisé "séminaire d'intégration" : 350 petits ESSEC sont partis cette semaine dans un train-discothèque pour des bungalows dans les dunes de Capbreton. Concours de lambada, raft, VTT et pétanque. Quand ils jouent à un jeu de stratégie, le skirmich, ils enfilent une tenue de camouflage et les balles de leur Fusil à pompe sont des boules de peinture biodégradables ! En bons G.O. (1), les aînés qui dirigent les opérations depuis un an n'ont même pas oublié de lister cinq veinards dont l'anniversaire est tombé un de ces jours-là. Au poil, le nouveau bizutage.

(1) G.O. : "gentils organisateurs" :  
appellation utilisée pour désigner  
les animateurs de certains clubs de  
vacances.

Anne FOHR

Le Nouvel Observateur  
10-16 octobre 1991

DOCUMENT 3

C O U R R I E R

Le Monde  
Novembre 1989

LES EXCES DU BIZUTAGE.

L'article intitulé "L'humour douteux" du bizutage" paru dans Le Monde du 9 novembre a suscité de nombreuses lettres de lecteurs. En voici des extraits.

### **Des pratiques déplorables**

Il ne saurait être question qu'un enseignant à l'École nationale supérieure d'arts et métiers (ENSAM) depuis quinze ans je cautionne cette opinion qui veut faire des bizutages déguisés en "usines" une partie intégrante de la formation d'un ingénieur Arts et métiers. Les programmes définis par les autorités administratives de l'école ont fixé un nombre d'heures considéré comme suffisant

pour assurer la formation humaine d'un ingénieur Arts et métiers. Un enseignant à l'ENSAM peut concevoir que les élèves de deuxième année ou que les membres de l'association des anciens de l'école ne soient pas de cet avis, mais il n'admet pas de recevoir des directives venant d'un autre lieu que le ministère de l'éducation nationale. Lorsque je participe à la remise de son diplôme à un élève, je ne sais pas et n'ai pas à savoir s'il a été ou non "usiné".

Il est donc faux de prétendre que les bizutages font pratiquement partie des enseignements, mais il est vrai que les enseignants se trouvent totalement isolés face à ces pratiques qui empoisonnent le

déroulement des cours pendant plus de six semaines et donnent une image déplorable des élèves de l'école à l'occasion de pratiques quotidiennes qui n'ont rien à voir avec un quelconque chahut et seules les initiés peuvent apprécier à leur juste valeur. Aucun ministre de

l'éducation nationale n'a eu jusqu'à présent l'envie ou le courage de se préoccuper publiquement de ce problème : les enseignants en sont réduits à n'être que des spectateurs désabusés ou exaspérés. La formation des ingénieurs français n'a rien à attendre de ces pratiques qui ont pour seule conséquence de retarder le début des cours efficaces.

**René DE VOS**

Professeur de sciences économiques et humaines au centre ENSAM de Cluny.

### **Une expérience formatrice**

Quel est, brièvement l'esprit qui anime ces "usinages" ? Il consiste à faire vivre à des jeunes gens, avant qu'ils n'entrent dans la vie dite active, une expérience particulière de vie en communauté où ils expérimentent en vraie grandeur les lois de la dynamique des groupes, ce qui les conduit à une connaissance d'eux-mêmes et des autres. Cette expérience humaine est spécialement formatrice pour des étudiants sortant des classes préparatoires, encore étourdis par le gavage théorique subi, et constitue une composante essentielle et reconnue de la formation Arts et métiers.

**Eric LE ROUX**

Ingénieur ENSAM (Courbevoie)

### **Autour d'une table**

Je propose donc que les aînés ne bizutent plus leurs nouveaux camarades, mais les accueillent fraternellement autour d'une table bien garnie. N'est-ce pas plus aimable et plus digne de la part de la future élite de la France ?

**M. HATHUAN**  
(Strasbourg).

### **Un très bon souvenir**

J'ai eu trois fils (Véto, médecine et école de commerce) qui ont été bizutés très gentiment et qui en gardent un très bon souvenir : j'avais pris soin de prévenir toute personne responsable, et de le faire savoir, que je porterais immédiatement plainte devant toute exagération. Et, comme par hasard, cette année-là, les bizutages ont été gentils !

**Dr P. HERBERT**  
(Paris).

### **Sadisme collectif**

Si l'on veut appeler les choses par leur nom, il faut dire que le bizutage est, trop souvent, une manifestation de sadisme collectif qui mériterait d'être étudiée de près par des spécialistes de sociologie et de psychopathologie. (...) La lâcheté accompagne le sadisme, car le bizuté les plus visés sont toujours le plus faibles physiquement.

**R. ANTOIN**

Censeur honoraire  
(Héricy-sur-Seine)

### **Une vie insupportable**

En fait, le bizutage a lieu dans plusieurs universités trois ou quatre fois par an, ce qui rend souvent la vie des étudiants de première année quasi insupportable. De plus, et bien que la première année soit réputée difficile, les étudiants prévenus à l'avance des jours de bizutage n'hésitent pas à sécher les cours, quitte à devoir les rattraper ultérieurement.

**Boris RENAUDIN**  
Etudiant (Troyes).

### **Des actions judiciaires**

Il est légitime que les étudiants menacés par les bizuteurs utilisent les actions judiciaires civiles et pénales que les lois mettent à leur disposition, dans le cadre du droit commun. Il leur suffirait de former un groupe pour limiter la participation aux frais et de consulter un conseil juridique.

**Joseph CRISAFULLI**  
(Paris)

## Imbéciles et dégradants (\*)

Quand on badigeonne d'éther les parties vitales, quand on introduit dans la soupe une cuillerée de sel en empêchant de boire, cela porte-t-il un autre nom que la torture ? (...) Sans doute tous les bizutages n'atteignent-ils pas les sommets de l'horrible (...). Mais les traitements infligés sont toujours imbéciles,

presque toujours dégradants lorsqu'ils se donnent en spectacle dans la rue (...). D'où vient que nous nous accommodions de l'insoutenable ? (...) On ne voit guère d'espoir que dans la prévention : parents et enseignants seuls ont le pouvoir de convaincre leurs enfants, leurs élèves, qu'on ne grandit pas d'accepter d'être avili pour rien.

Jean-Louis LAURENT  
Enseignant, Ethe (Belgique).

\* NB : les coupures sont celles du journal

DOCUMENT 4

Enseignement

Le Monde  
1990

# Absurde bizutage

par François Fricker

**L**é bizutage, pratiqué au mois de septembre lors de la rentrée des classes préparatoires et des grandes écoles, est choquant et révélateur d'une certaine violence sociale et d'un mode de fonctionnement hiérarchique inadmissibles dans une société qui se veut ouverte et démocratique. C'est une humiliation collective infligée par une partie d'une communauté scolaire sur une autre partie à la seule raison de l'ancienneté de la première par rapport à la seconde.

Le bizutage est souvent présenté comme un moyen d'intégrer les plus jeunes au corps des anciens et d'assurer la cohésion de l'école. Cela appelle une triple remarque.

D'abord, dans le bizutage, la communauté scolaire en question

se considère comme une caste, c'est-à-dire comme classe fermée ayant l'initiative de l'inclusion et de l'uniformisation des comportements. Il est donc postulé que le groupe domine et contrôle les personnes qui s'y agrègent. Cela est d'autant plus inquiétant qu'il s'agit, dans la plupart des cas, d'écoles chargées de former les cadres de la société. Comment se considèrent-ils alors ? Ensuite, les humiliations infligées sont aussi absurdes qu'impératives.

La volonté des soumis est remise tout entière au caprice des anciens. L'autonomie de la personne est abolie, elle doit plier sans que les ordres aient, bien sûr, la moindre apparence de justification. Le pouvoir s'affirme là pour lui-même, dans sa jouissance cynique. L'arbitraire n'est pas autre

chose. Ici encore est-ce la meilleure préparation à l'exercice de l'autorité dans les entreprises et les organes de l'Etat ?

Enfin, le bizutage se perpétue d'année en année, les nouveaux élèves deviennent des anciens qui, à leur tour, infligent ce qu'ils ont subi. La chaîne se maintient comme si les pratiques sociales qui la sous-tendent demeureraient également. Le rite conservé est conservateur. Les élèves ont intégré les normes et les objectifs de la "société telle qu'elle est." Ils en seront, pour beaucoup, les fidèles exécutants.

"Le bizutage est le dur miroir de notre société. Faut-il se contenter de le regarder ?

► François Fricker est professeur de philosophie à Paris.

DOCUMENT 5

ARCHAÏQUE ? NON, POSTMODERNE !

PAR MICHEL MAFFESOLI\*

Une manifestation du retour au tribal qui s'esquisse sous nos yeux

Alors qu'il est de bon ton de proclamer le retour de l'individualisme ou autre forme de narcissisme, il est frappant d'observer que la réalité, d'une manière têtue, nous donne quotidiennement des exemples qui contredisent du tout au tout une telle opinion. Le bizutage est du nombre, qui traduit ce que j'ai appelé le "tribalisme postmoderne", où il est moins question de distinction, entre les individus et entre les groupes, que de fusion, de perte de soi dans l'autre, et ce afin de former ces petits corps sociaux où prévalent le "sentiment d'appartenance" et la conviction d'une destinée commune.

Ainsi le grand retour du bizutage peut être considéré comme un apprentissage de la solidarité communautaire. Paradoxe ? Pas forcément, car c'est toujours dans et par la douleur que se façonnent les liens de divers ordres qui résistent à l'usure du temps, et qui font qu'un "corps" est autre chose qu'une simple métaphore mais bien une interrelation forte où l'ordre et le désordre se conjuguent en une organicité des plus solides. La souffrance en effet, c'est une manière homéopathique d'affronter la mort. Je veux dire ici la mort de soi, la mort à soi, qui permet de renaître dans le collectif. Il en est de même du sexe : le fait de le jouer, de le théâtraliser ou même de le tourner en dérision, tout cela rappelle qu'avant d'être quelque chose de privé le sexe doit "circuler" afin de conforter la communauté. Mimer la copulation, pratique la plus répandue du bizutage, est bien une manière de faire corps, de dire symboliquement la socialisation qui commence avec la vie universitaire. Dans tous les cas, il s'agit bien d'un rite de passage qui, à l'image des bacchanales\*\* d'antique mémoire, "sait" bien, d'un savoir incorporé en quelque sorte, que pour "faire corps", pour faire du social, pour aboutir à un ordre, il est nécessaire d'intégrer du désordre. C'est la "part maudite" (Georges Bataille), la part d'ombre qui est présente dans toute société, et il n'est pas inutile qu'elle trouve une expression rituelle, donc canalisée, plutôt que de devenir perverse, donc immaîtrisable.

Il n'est donc pas étonnant que le bizutage fasse mal, à l'image du traumatisme de la naissance, il introduit à une nouvelle vie : la vie de groupe, qui est d'autant plus forte qu'il aura su, ne fût-ce qu'un instant, canaliser l'agressivité, la violence dont tout un chacun est pétri, et par là même assurer une ossature des plus solides à l'être-ensemble que vont être ces années passées en commun. Pour cela il faut du conformisme, de la conformité, toutes choses qui s'atteignent en brisant la carapace individuelle, en niant les particularités spécifiques.

Pour inverser l'opinion commune sur l'époque, je dirais que l'on assiste à une multiplication de "narcissismes de groupe", où ensemble l'on s'emploie à se regarder le nombril les uns des autres. Le bizutage serait ainsi la forme exacerbée d'une telle pratique. Il dit, en majeur, ce qui se vit sans y prêter attention dans la vie courante. En effet prendre un poste de travail, être admis dans un groupe d'amis, devenir membre d'un clan politique, d'une coterie intellectuelle, d'un réseau sexuel, tout cela nécessite une sortie de soi, stricto sensu une "extase". Le bizutage est là pour nous rappeler une telle nécessité. Il ne fait, à un moment particulier, que caricaturer ces "entrées" dans le corps collectif dont est ponctuée la vie de tous les jours.

Cela, on l'avait oublié, et seule une conception rationnelle, contractuelle des rapports sociaux avait prévalu durant toute la modernité. On peut dire que dans le mouvement cyclique du monde cette chose archaïque qu'est le besoin de "reliance", la pulsion d'être avec l'autre, revient sur le devant de la scène. En ce sens, le bizutage est bien l'une des manifestations de la tribalisation du monde qui s'esquisse sous nos yeux, en cette postmodernité naissante.

M.M.

(\*) Professeur à la Sorbonne, directeur du Centre d'Etudes sur l'Actuel Quotidien (Paris-V), auteur de "Au temps des tribus" (Livre de Poche).

Le Nouvel Observateur 10-16 oct. 1991

(\*\*) Fêtes que les Anciens célébraient en l'honneur de Bacchus avec danses et jeux et initiations.

# Epreuve d'Anglais

## Durée 2 heures Coefficient 2

(L'usage de la calculatrice et du dictionnaire sont interdits)

### A Bumper Crop of Biotech

- 1 - Imagine a cow that produces skim milk or a naturally decaffeinated coffee bean. Such curios may sound like science fiction, but they are real possibilities in the brave new world being created by the marriage of biotechnology and agriculture. In scores of experiments, scientists are changing the genetic endowments\* of plants and animals, and the result could spawn\* a revolution in farm fields and dairy barns.
- 5 - So far this year, the U.S. Department of Agriculture has approved nearly 100 test plantings of crops that have been genetically altered to give them traits such as pest resistance and tolerance to weed killers. More ambitious projects are envisioned, among them adding protein to staples\* like corn and changing the type of oil produced by soybeans. Pigs that grow faster and leaner and cows that manufacture medicine in their milk are other goals. [...]
- 10 - It was only in 1983 that scientists inserted the first foreign genes into tobacco and petunias, the "white mice" of the plant world. In the years since, similar work has been done on about 50 species of fruits, vegetables and grains. [...]
- 15 - In the past, desirable properties were introduced into plants and animals through simple crossbreeding, but for the most part scientists merely reshuffled\* genes within a particular species. Corn could not be crossed with soybeans, nor cows with pigs. Now plants as diverse as tomatoes and cotton have been equipped with genes that scientists have borrowed from bacteria. [...] Eventually, crops and farm animals may be raised to produce not just food and clothing but also a wide array of chemical compounds and human proteins like insulin. [...]
- 20 - Industry enthusiasts say bioengineered animals and plants could become commercially available within the next five years. First, however, they must pass muster\* with federal regulators. That may be tricky\*, given the concerns raised by some environmental and animal -rights groups. [...]
- 25 - Even bioengineered plants are not immune to criticism, particularly those that have been designed to tolerate herbicides. [...]
- 30 - Only the most naive booster\* would argue that the bioengineering of farm animals and plants poses no risks. With plants, for instance, there is always the possibility that new traits could be accidentally transferred to wild relatives of domestic species. Theoretically, experiments with genes that confer resistance to disease or herbicides could create hardier\* weeds. Food safety is another legitimate concern. Products from genetically altered crops and livestock will require rigorous testing to ensure that they are harmless.
- On balance\*, however, bioengineering is likely to be more a benefit than a bane\*. [...] The discovery that plants can be "vaccinated" against disease by equipping them with viral genes ought to reduce reliance\* on chemical insecticides. [...] Genetic engineering could also be used to give livestock more resistance to bacteria, reducing the need to feed antibiotics to farm animals.
- It is to the hungry Third World that biotechnology offers the greatest hope. [...] Before the middle of the next century, experts warn, world population may reach 10 billion, and agriculture had better keep up. By that time, the planet's crop and livestock growers will probably have new environmental challenges to meet, among them a changing climate and increasingly salty soils. Asserts Beachy : "Some argue that it is irresponsible to use biotechnology. To me it seems irresponsible not to use it."

#### Footnotes :

- \* endowment : patrimoine
- \* to spawn : engendrer, susciter
- \* a staple : produit de base
- \* to reshuffle : redistribuer
- \* to pass muster : obtenir l'agrément de
- \* tricky : délicat, épineux

Madeleine NASHI . Time - October 1, 1990

- \* a booster : un partisan, défenseur.
- \* hardy : résistant, robuste.
- \* on balance : tout compte fait.
- \* a bane : fléau.
- \* reliance : dépendance

## I. Traduction en Français (10 points)

Traduire de "Industry enthusiasts" (ligne 16) jusqu'à "farm animals" (ligne 27)

## II. Rédaction en Anglais (10 points)

"Some argue that is irresponsible to use biotechnology. To me it seems irresponsible not to use it" says Beachy.

Find arguments to illustrate both points of view, then state and justify your own position.

# Epreuve de Mathématiques et Sciences physiques Durée 4 heures Coefficient 4

**Rappel :** La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.  
L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

## 1° partie : Mathématiques (durée 2 heures, coefficient 1,5)

### EXERCICE 1 - (8 points)

*Le but de cet exercice est l'étude du contrôle d'une fabrication de comprimés dans l'industrie pharmaceutique.*

Une société de produits pharmaceutiques fabrique en très grande quantité un type de comprimés.

On admet que la masse d'un comprimé (en grammes) est une variable aléatoire qui suit une loi normale de moyenne  $1,26$  et d'écart-type  $0,02$ .

1. 1.1. Quelle est la probabilité pour que la masse d'un comprimé pris au hasard appartienne à l'intervalle  $[1,2 ; 1,3]$  ?
- 1.2. Trouver le nombre réel  $d$  tel que la proportion de comprimés ayant une masse comprise entre  $1,26 - d$  et  $1,26 + d$  soit  $34\%$ .

2. Un comprimé est conforme si sa masse appartient à l'intervalle  $[1,2 ; 1,3]$ . La probabilité pour qu'un comprimé soit conforme est  $0,98$ .

On prélève au hasard un échantillon de 10 comprimés. On désigne par  $X$  le nombre de comprimés conformes dans cet échantillon.

- 2.1. Montrer que  $X$  suit une loi binomiale  $B(n, p)$ .  
Déterminer  $n$  et  $p$ .

- 2.2. Calculer  $p(X \leq 9)$ .

3. On contrôle tous les comprimés, mais le mécanisme de contrôle est aléatoire :

- Un comprimé conforme est accepté avec une probabilité de  $0,98$  ;
- Un comprimé qui n'est pas conforme est refusé avec une probabilité de  $0,99$ .

On note : A l'événement : "un comprimé est conforme"

B l'événement : "un comprimé est refusé".

On a, comme à la seconde question :  $p(A) = 0,98$ .

3.1. Déterminer  $p(B/A)$ , puis  $p(B \cap A)$  et  $p(B \cap \bar{A})$ .

3.2. Calculer :

3.2.a. La probabilité qu'un comprimé soit refusé.

3.2.b. La probabilité qu'un comprimé soit conforme sachant qu'il est refusé.

**EXERCICE 2 - (12 points)** *Le but de cet exercice est l'étude du coefficient de transfert de dioxygène.*

On étudie la capacité d'oxygénation d'un milieu dans un fermenteur.

Soit  $C$  la concentration de dioxygène dans ce milieu à l'instant  $t$ .

Soit  $C_M$  la concentration maximale en dioxygène que l'on peut obtenir dans ce milieu.

$C$  et  $C_M$  s'expriment en  $g.l^{-1}$ .

**Partie I : Etude expérimentale**

Un appareil mesure, toutes les trente secondes, le rapport  $x = \frac{C}{C_M}$ , pourcentage de saturation en dioxygène.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

temps $t_i$ (en secondes)	0	30	60	90	120	150	180	210
$x_i = \frac{C_i}{C_M}$	0,180	0,392	0,569	0,690	0,784	0,838	0,879	0,908

I.1. On pose  $y = \ln(1-x)$ .

I.1.1. Calculer les valeurs de  $y_i$  arrondies au dixmillième le plus proche. Présenter les résultats sous forme de tableau.

I.1.2. Représenter le nuage de points de coordonnées  $(t_i, y_i)$  dans le plan rapporté à un repère orthogonal, où

1 cm en abscisse représente 10 secondes,  
1 cm en ordonnée représente 0,2 unités.

I.2. Déterminer par la méthode des moindres carrés, une équation de la droite d'ajustement linéaire de  $y$  en  $t$ .

I.3. Exprimer  $x$  en fonction de  $t$ .

**Partie II : Etude théorique**

On admet que la concentration  $C$  en dioxygène vérifie :

$$\frac{dC}{dt} = KC_M \left( 1 - \frac{C}{C_M} \right)$$

où  $K$ , coefficient de transfert volumétrique, dépend du milieu ( $K$  est une constante qui s'exprime en  $s^{-1}$ ).

Soit  $x(t) = \frac{C(t)}{C_M}$

- II.1. Ecrire l'équation différentielle (E) que vérifie la fonction  $x$ .
- II.2. Donner la solution générale de cette équation différentielle (E) lorsque  $x(t)$  appartient à l'intervalle  $]0; 1[$  et  $t \geq 0$ .
- II.3. II.3.1. Déterminer, en fonction de  $K$ , la solution vérifiant  $x(0) = 0,18$ .
- II.3.2. Calculer  $K$  sachant que  $x(120) = 0,784$ .
- II.3.3. Exprimer alors  $x$  en fonction de  $t$ .

### Partie III : Etude de la fonction $x$ .

Soit la fonction  $x$  définie pour  $t \in ]0; +\infty[$  par :  $x(t) = 1 - 0,82e^{-0,011t}$

- III.1. Calculer  $\lim_{t \rightarrow +\infty} x(t)$  et interpréter graphiquement le résultat.
- III.2. Etudier les variations de  $x$ .
- III.3. Le plan est rapporté à un repère orthogonal avec les unités graphiques suivantes :

1 cm pour 10 secondes en abscisse,  
10 cm pour unité en ordonnée.

Construire la représentation graphique de la fonction  $x$  : préciser notamment son asymptote, et sa tangente au point d'abscisse zéro.

## 2° partie : Sciences physiques (durée 2,5 heures, coefficient 2,5)

### LE SUJET COMPORTE 3 QUESTIONS INDEPENDANTES

**Rappel :** La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

Seul l'usage d'une calculatrice électronique, autonome, non imprimante, à entrée unique par clavier est autorisé pour cette épreuve.

#### 1. CHIMIE ORGANIQUE (6 points)

- 1.1. En présence de chlorure d'aluminium anhydre le chlorure d'acétyle réagit sur le benzène. Il se forme A.
- 1.1.1. Ecrire le bilan de la réaction
- 1.1.2. Donner le nom de A
- 1.1.3. Quel est le mécanisme de la réaction ?
- 1.2. Le composé A subit une chloration en présence de  $\text{FeCl}_3$ . On obtient essentiellement un dérivé B substitué en position 3 par rapport au premier substituant (méta).
- 1.2.1. Ecrire le bilan de réaction

- 1.2.2. Quel est le mécanisme ?  
Justifier l'orientation de cette réaction.

## 2. CINÉTIQUE (6 points)

Soit la réaction  $A + B \rightarrow C$  dont on mesure la vitesse initiale à 25 °C pour différentes concentrations de A et B dans le mélange de départ. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

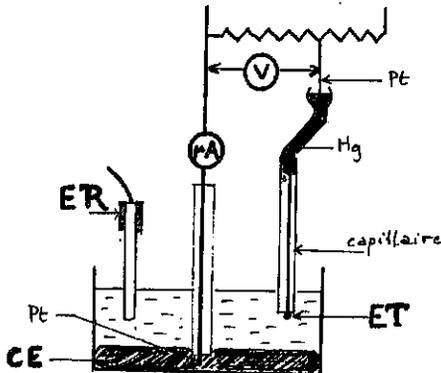
Expérience	1	2	3	4	5
$[A]_0$ en mol.L <sup>-1</sup>	0,6	0,6	0,6	0,4	0,2
$[B]_0$ en mol.L <sup>-1</sup>	0,2	0,4	0,6	0,6	0,6
$v_0 \times 10^8$ en mol.L <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	1,45	5,8	13	8,65	4,31

- 2.1. Déterminer l'ordre partiel p par rapport à A.
- 2.2. Déterminer l'ordre partiel q par rapport à B
- 2.3. Déterminer la valeur de la constante de vitesse à 25 °C
- 2.4. La réaction est-elle simple ? Justifier la réponse.
- 2.5. Quel est l'ordre global de la réaction ?

## 3. - POLAROGRAPHIE : (8 points)

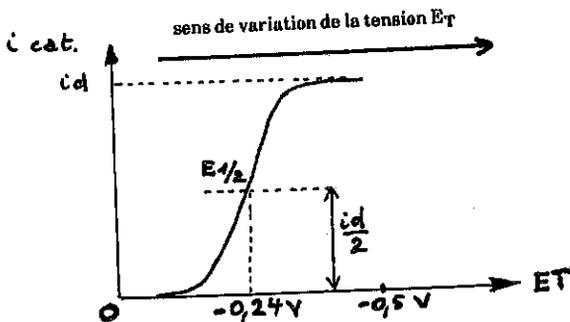
### 3.1. Principe

Un polarographe est constitué par une cellule d'électrolyse dans laquelle se trouvent notamment une électrode de référence  $E_R$  et une électrode de travail  $E_T$ . Cette dernière est constituée par une goutte de mercure qui s'échappe d'un capillaire. Grâce à un dispositif approprié, il est possible de faire varier le potentiel de l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence et de mesurer l'intensité  $i$  du courant qui traverse la cellule. La contre-électrode CE représentée dans le schéma ci-dessous n'intervient pas dans la compréhension du phénomène.



Les électrodes plongent dans une solution qui contient des ions  $Pb^{2+}$  en présence d'un sel de fond ( $K^+ + Cl^-$ ) dont la concentration est 50 à 100 fois supérieure à celle des ions  $Pb^{2+}$  en vue de limiter l'effet des phénomènes de migration.

Lorsque l'on fait varier la tension de l'électrode de travail de 0 à - 0,5 V (valeurs prises par rapport à l'électrode normale à hydrogène), l'intensité  $i$  varie selon la courbe suivante.



Il est rappelé que par convention les courants cathodiques sont comptés comme positifs et que l'on porte les potentiels croissant négativement vers la droite.

3.1.1 Quelle est la réaction qui se produit à l'électrode de travail  $E_T$  lorsque le potentiel atteint  $E_{1/2}$  et des valeurs comprises entre  $E_{1/2}$  et  $-0,5V$ . Ecrire l'équation correspondante.

3.1.2. Pour quelle raison utilise-t-on comme électrode de travail une électrode à goutte de mercure plutôt qu'une électrode fixe et constante dans sa forme.

3.1.3. A quoi correspond le potentiel  $E_{1/2}$  dans le cas étudié ici ? De quelle donnée relative à la solution le courant de diffusion limite  $i_d$  dépend-il ? Ecrire la relation générale montrant cette dépendance.

### 3.2. Dosage des ions sulfates d'une eau minérale

Bien qu'ils ne soient pas réductibles à l'électrode à goutte de mercure, les ions  $SO_4^{2-}$  présents dans une solution peuvent être dosés indirectement par polarographie en utilisant des ions  $Pb^{2+}$ , introduits sous la forme de nitrate de plomb.

On introduit dans la cellule du polarographe  $50\text{ cm}^3$  d'eau minérale contenant des ions sulfate,  $20\text{ cm}^3$  d'éthanol pour diminuer la solubilité de  $PbSO_4$  et on acidifie le milieu avec quelques gouttes d'acide très concentré afin d'éviter la précipitation des ions carbonates. On verse goutte à goutte la solution de nitrate de plomb de concentration molaire  $c = 0,1\text{ mol.L}^{-1}$  et on suit les variations de  $i$  en fonction du volume  $v$  de nitrate de plomb versé, à potentiel constant.

3.2.1. Ecrire l'équation-bilan traduisant la réaction chimique entre les ions provenant de l'eau minérale d'une part, et de la solution de nitrate de plomb, d'autre part.

3.2.2. Expliquer le choix du potentiel constant appliqué à l'électrode de mesure. Dans quel domaine doit-il se situer ? Quelle est alors la nature du courant d'électrolyse dont on mesure l'intensité ?

3.2.3. Donner l'allure de la courbe représentant l'intensité mesurée  $i$ , en fonction de  $v$ .

3.2.4. Sur la courbe  $i(v)$  on observe une variation de pente lorsque l'on a ajouté un volume  $v = 5,47\text{ cm}^3$  de la solution de nitrate de plomb. En déduire la teneur en ions sulfates de l'eau minérale.

**Epreuve de Sciences biologiques fondamentales et génie  
biologique    Durée 4 heures    Coefficient 6**

Les membranes biologiques

Les membranes biologiques délimitent les cellules et les divisent en compartiments. Tout à la fois barrière et lieu d'échanges, les membranes maintiennent la composition intracellulaire, participent à l'approvisionnement en énergie nécessaire à la vie cellulaire, assurent les communications entre cellules...

Ce sujet propose d'étudier quelques aspects des membranes biologiques.

**1 - Structure des membranes biologiques (32 points)**

Les membranes sont des édifices composites comprenant des lipides qui forment la structure de base et des protéines insérées dans les lipides.

**1.1. A propos des lipides (7 points)**

Chez les Eucaryotes les lipides constitutifs peuvent être le cholestérol, les sphingolipides et les glycérophospholipides ; ces derniers sont très souvent les composants majeurs.

1.1.1. Ecrire la formule d'un glycérophospholipide et donner son nom.

1.1.2. Indiquer les propriétés physiques de cette catégorie de molécules et en déduire l'agencement des lipides dans la membrane. Préciser les propriétés qu'ils confèrent aux membranes.

**1.2. A propos des protéines (25 points)**

Des protéines aux fonctions très diverses sont enchassées dans la structure lipidique. Comme toutes les protéines cellulaires, elles sont l'objet d'un renouvellement permanent. Si la synthèse des protéines membranaires obéit au mécanisme classique, leur mise en place au sein de la membrane est une particularité qui a été bien étudiée chez les Eucaryotes.

1.2.1. Résumer sous forme d'un schéma commenté les différentes étapes de la traduction chez les Eucaryotes en précisant les structures et les principaux systèmes enzymatiques impliqués.

1.2.2. Dans le cas des protéines destinées à la membrane plasmique, le peptide en cours de synthèse est dirigé vers le réticulum endoplasmique.

Exposer le mécanisme de cette insertion en cours de traduction.

1.2.3. Représenter schématiquement le cheminement intracellulaire qui conduit une protéine du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique.

**2 - Membranes et énergétique cellulaire (38 points)**

**2.1. Membranes et respiration (28 points)**

Dans les cellules des organismes Eucaryotes qui oxydent les substrats dont ils disposent au moyen de l'oxygène de l'air, une population d'organites, les mitochondries, joue un rôle clef. C'est en effet de part et d'autre de la membrane que s'établit l'équilibre métabolique de la cellule. La complexité des mécanismes énergétiques qui se déroulent dans les mitochondries justifie l'intérêt qu'on leur porte encore.

2.1.1. Organisation structurale des mitochondries :

- Faire un schéma détaillé et clairement annoté d'une mitochondrie.
- Localiser avec précision les principales activités mitochondriales.

2.1.2. La chaîne respiratoire :

La chaîne de transport des électrons comporte quatre complexes énumérés dans le tableau suivant :

COMPLEXES	FONCTIONS ENZYMATIQUES
I	NADH/CoQ réductase
II	succinate/CoQ réductase
III	CoQ/cytochrome c oxydo réductase
IV	cytochrome c oxydase

- Donner un schéma succinct de la chaîne assurant le transfert des électrons du NAD réduit jusqu'à l'oxygène.
- Quel est l'intérêt de cette cascade d'étapes ?

### 2.1.3. La phosphorylation oxydative :

L'ATP synthétase est un complexe transmembranaire présent dans toutes les membranes transductrices d'énergie.

- Donner sa structure générale et sa disposition dans la mitochondrie.
- Expliquer rapidement la coopération entre la chaîne de transport des électrons et l'ATP synthétase.

### 2.2. Membranes et photosynthèse (10 points)

La capture de l'énergie solaire par les organismes phototrophes, qu'ils soient Eucaryotes ou Procaryotes, est toujours associée à des structures membranaires.

- 2.2.1. Quelles sont les différences importantes entre la photosynthèse des bactéries et la photosynthèse des végétaux ?
- 2.2.2. Quels sont les deux groupes de bactéries phototrophes par rapport au donneur d'ions  $H_3O^+$  et d'électrons ?

### 3- Membranes et identité cellulaire (20 points)

Les protéines et les glucides de la membrane plasmique sont responsables de l'identité antigénique de la cellule.

Dans la lutte contre les cellules étrangères, anormales ou infectées par un parasite intracellulaire, figure l'altération de leur membrane par la mise en jeu spécifique d'effecteurs cytotoxiques.

#### 3.1. Le complément (7 points)

Le système du complément, quand il est activé, peut provoquer des perforations de la membrane plasmique des cellules.

- 3.1.1. Rappeler ce qu'est le complément.
- 3.1.2. Le complément peut être mis en jeu de 2 façons différentes. Lesquelles ?
- 3.1.3. Dans la phase finale d'activation, un complexe d'attaque lytique est formé. Préciser la façon dont ce complexe provoque les perforations de la membrane.

#### 3.2. Les lymphocytes T cytotoxiques (13 points)

L'altération de la membrane plasmique est également mise en cause dans la mort cellulaire provoquée par les lymphocytes T cytotoxiques. Ceux-ci interviennent par exemple lors d'une infection virale en détruisant les cellules de l'organisme infecté par le virus.

- 3.2.1. Quel marqueur membranaire distingue les lymphocytes T cytotoxiques des autres lymphocytes ?
- 3.2.2. Avant de devenir des cellules tueuses, les lymphocytes T cytotoxiques sont à l'état de précurseurs quiescents. Montrer quels sont les événements qui induisent la transformation d'un lymphocyte T précurseur quiescent en un clone de cellules tueuses. Répondre sous forme d'un schéma général commenté à chaque étape.
- 3.2.3. Expliquer précisément quelles sont les structures membranaires mises en jeu lors de la reconnaissance de la cellule cible par un lymphocyte T cytotoxique.

#### 4 - Membranes et biotechnologies (30 points)

##### 4.1. Liposomes (5 points)

Au laboratoire, dans des conditions bien contrôlées, on peut préparer en milieu aqueux, des vésicules dont la membrane est constituée de phospholipides : les liposomes. A l'intérieur de ces vésicules, il est possible d'inclure des composés variés, ce qui permet de les utiliser comme transporteurs.

4.1.1. Faire le schéma d'un liposome.

4.1.2. Dans les domaines biotechnologique et pharmacologique les liposomes prennent de plus en plus d'importance. Proposer un exemple précis d'utilisation possible des liposomes dans un de ces domaines.

##### 4.2. Fusion des protoplastes (12 points)

La fusion des protoplastes permet l'obtention de nouvelles cellules hybrides. Cette hybridation peut être faite avec des cellules animales, végétales ou microbiennes ; elle est cependant plus facile à réaliser dans le cas de cellules animales car la fusion s'effectue au niveau des membranes. Dans tous les autres cas, il faut préparer des protoplastes pour pouvoir réaliser l'hybridation.

Appliquée aux Streptomyces producteurs d'antibiotiques, ce procédé est efficace ; il permet la production de nouveaux antibiotiques et l'amélioration des rendements de production.

4.2.1. Quels sont les caractéristiques essentielles des micro-organismes du genre Streptomyces ?

4.2.2. Donner le protocole général d'obtention et de fusion des protoplastes à partir de Streptomyces en justifiant chaque étape.

##### 4.3. Enzymes membranaires immobilisées (13 points)

Les enzymes de la chaîne respiratoire sont des enzymes membranaires. L'immobilisation de ces enzymes dans la gélatine présente :

- un intérêt théorique : elle permet de reproduire leur fonctionnement in situ.

- un intérêt pratique : l'obtention d'un biocapteur par immobilisation de la chaîne respiratoire dans la gélatine sous forme d'un film tanné (activé) au glutaraldéhyde et adaptation sur la partie sensible d'une électrode de Clark (sonde à oxygène) en est un exemple.

4.3.1. Définir le terme de biocapteur.

4.3.2. Du point de vue technologique, les biocapteurs possèdent certaines caractéristiques générales ; en citer trois en les commentant brièvement.

4.3.3. Indiquer les réactions électrochimiques qui se produisent au niveau de l'électrode de Clark. Dire quel est le type de détection et donner le principe de fonctionnement de cet électrode.

# Epreuve professionnelle de synthèse

## A : étude de projet

### Durée 4 heures coefficient 4

La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

## La symbiose actinorhizienne et la fixation de l'azote atmosphérique

Différents microorganismes possèdent la capacité de réduire et fixer l'azote atmosphérique. Certains peuvent établir une symbiose avec des plantes.

C'est le cas de FRANKIA, bactérie filamenteuse, ramifiée et sporulante. Les arbres et arbustes qui forment les nodules fixateurs d'azote atmosphérique en symbiose avec l'actinomycète FRANKIA sont appelés plantes actinorhiziennes. Parmi celles-ci, on trouve les aulnes (Aulnus) des pays tempérés et les filaos (Casuarina) des pays tropicaux.

Ces arbres poussent souvent dans des sites défavorables, notamment dans des sols déficients en azote. Ils peuvent être utilisés pour régénérer la fertilité des sols appauvris et pour restaurer des sols érodés.

La symbiose FRANKIA-plantes actinorhiziennes est donc importante tant à cause de son rôle écologique que par ses applications potentielles en agronomie.

On se propose d'étudier un ensemble de documents concernant les méthodes d'étude des deux symbiotes et leur amélioration éventuelle.

### 1. L'ISOLEMENT DE FRANKIA - (5 points)

Le document 1 présente 2 techniques d'isolement de Frankia à partir de nodules de Casuarina. Les techniques d'isolement sont-elles sélectives ? Justifier la réponse. Quel est l'intérêt d'utiliser de la chloramine T ou de l'hypochlorite de calcium ?

### 2. LA CROISSANCE DE FRANKIA ET L'ACTIVITE REDUCTRICE D'ACETYLENE - (30 points)

La quantification de la biomasse d'une culture de Frankia peut être faite par le dosage des protéines totales.

L'étude de la croissance de Frankia est réalisée dans différentes conditions (document 2).

#### 2.1. Cinétique de croissance

2.1.1. A partir des résultats du document 2, évaluer les paramètres de croissance en présence d'air.

2.1.2. Interpréter la courbe expérimentale obtenue en atmosphère argon-oxygène (Ar-O<sub>2</sub> : Argon 80 % - Oxygène 20 %).

#### 2.2. Suivi de croissance

La turbidimétrie est actuellement peu utilisée dans le cas de microorganismes filamenteux qui comme Frankia donnent des cultures très hétérogènes en milieu liquide. La fiabilité de cette méthode peut cependant être améliorée si l'absorbance à 570 nanomètres est lue après sonication de la culture, dans des conditions standardisées.

On veut étudier la corrélation entre l'absorbance de la culture et le taux de protéines totales ; pour ceci on dispose d'une culture-mère de Frankia.

- Préciser la suite des opérations à mettre en œuvre pour étudier cette corrélation

- Présenter graphiquement les résultats attendus dans l'hypothèse d'une bonne corrélation.

#### 2.3. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène

- Donner le schéma d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse.

- Faire un schéma du protocole expérimental décrit dans le document 4.2 et préciser les conditions d'utilisation du chromatographe.

- Quel est le principe de l'utilisation d'un étalon interne ?

**Document 1 : Isolement de Frankia à partir de nodules de Casuarina**

**Technique 1**

- Mettre les nodules dans de la chloramine T (à 3% dans l'eau) pendant 5 minutes.
- Broyer les nodules.
- Diluer les préparations
- l'ensemencement des diverses dilutions est effectué en milieu Qmod liquide ou solide
- Incuber à 28-30°C
- après 15 à 20 jours, des colonies visibles (à la loupe binoculaire) de Frankia apparaissent.
- une subculture est effectuée en Qmod liquide.

**Technique 2**

- peler les nodules
- mettre les nodules dans l'hypochlorite de calcium
- rincer
- couper les nodules
- mettre 5 à 10 pièces dans une couche de Qmod solide sans lécithine
- Verser en surface 3 ml du même milieu pour recouvrir les pièces
- Incuber à 25-28°C
- Observer pendant 2 mois les cultures

**Milieu Qmod (composition en g l<sup>-1</sup>)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
extrait de levure	0,5
bactopeptone	5
Glucose	10
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2
KCl	0,2
lécithine	0,005
solution oligoéléments 1 ml	

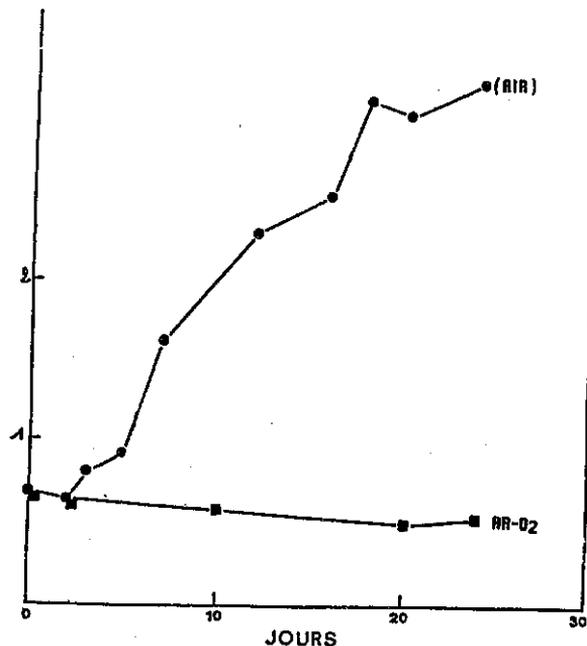
**Solution d'oligoéléments : en g.l<sup>-1</sup>**

FeNaEDTA	0,01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5
MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,8
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,8
CuSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1
NaMoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25
CoSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,01

**DOCUMENT 2**

**CROISSANCE DE FRANKIA ORS 02 06 02 en milieu minimum (MM) sous AIR ou atmosphère AR-02 (argon 80 %-oxygène 20 %)**

Les cultures ont été effectuées dans 25 ml de milieu MM.



**Composition du Milieu minimum (g par litre)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 - MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O : 0,1 -
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O : 0,01	
Succinate de sodium : 1,2	
NaMoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O : 0,005	
FeSO <sub>4</sub> : 0,01 - Glucose : 1	
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O : 0,025 -	
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O : 0,007 -	
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O : 0,00125 -	
CoSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O : 0,0014 -	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> : 0,0003 -	
pH 6,8	

## 2.4. Croissance et fixation d'azote

### A l'aide du document 3

- Préciser l'influence de la pression partielle en oxygène et de la source d'azote du milieu sur la fixation biologique de l'azote par *Frankia*.
- Indiquer s'il existe une relation entre la fixation d'azote et la croissance bactérienne.

### DOCUMENT 3

Souches de <i>Frankia</i>	Activité réductrice d'acétylène (ARA) nmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> (mg protéine) <sup>-1</sup>					
	Tension d'oxygène (kPa)					
	0	2	5	10	15	20
<i>Frankia</i> de type I isolés de <i>Casuarina</i> :						
ORS020602 (syn. D11)	0	10	15	33	18	15
ORS020601 (Syn D1)	0	8	11	17	12	4
ORS020603 (Syn G1)	0	12	10	36	30	32
ORS020604 (Syn G2)	0	5	20	15	15	12
ORS020605 (Syn P1)	0	7	10	15	18	16
ORS020610 (Syn S1)	0	12	20	42	37	25
<i>Frankia</i> isolés de Rhamnales						
ORS140101 (H13)	0	25	40	58	29	32
ORS060501	0	17	2	27	32	18

- (1) Les différentes souches de *Frankia* ont été cultivées sur milieu QMOD pendant 15 à 30 jours à 30°C, puis centrifugées et resuspendues dans un milieu MM. 25 ml de suspension de *Frankia* ont été incubés, dans un flacon sérum d'un volume de 145 ml, sous divers atmosphères gazeuses constituées de mélange argon-oxygène contenant 10 % d'acétylène. L'ARA a été estimée par la production d'éthylène pendant 5 jours par chromatographie en phase gazeuse.
- Remarque : 1 kPa d'O<sub>2</sub> - 1 % d'O<sub>2</sub>.

### Etude faite sur *Frankia* OR S 02 06 02

Source d'azote (1)	ARA <sup>(2)</sup> nmol.h <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>	ARA %	Protéine <sup>(3)</sup> (mg)	Protéine %
0	61,2	100	3,7	100
Citrulline	0	0	4,4	119
Arginine	0	0	4,2	112
Sérine	73,3	120	2,7	72
Alanine	123,6	200	2,0	55
Méthionine	57,6	96	2,0	55
Glutamate	67,2	110	2,9	79
Aspartate	70	114	3,2	86
NH <sub>4</sub> Cl	0	0	2,0	55
Extrait de levure	48	80	2,7	55

- (1) Les sources d'azote ont été ajoutées à raison de 1 g.l<sup>-1</sup> au milieu de MM.
- (2) Les activités réductrices d'acétylène spécifiques ont été mesurées après 15 jours de croissance sous atmosphère d'air : ce sont les moyennes de 5 flacons de 145 ml contenant 25 ml de milieu MM.
- (3) Quantité cumulée de 5 flacons de 145 ml contenant 25 ml de milieu de culture. Inoculum estimé à 0,2 mg protéine.

### 3. RECHERCHE D'ELEMENTS DE TAXONOMIE DE FRANKIA - (30 points)

#### 3.1. Spectre d'hôte

Actuellement la taxonomie de Frankia est essentiellement basée sur les relations symbiotiques et la classification effectuée par l'établissement d'un spectre d'hôte, en déterminant l'inféctivité et l'effectivité d'une souche de Frankia donnée pour différents hôtes végétaux. Sur différentes souches isolées selon la méthode décrite dans le document 1, les tests sont réalisés selon les protocoles du document 4.

3.1.1. A partir du document 4, définir les termes "inféctivité" "effectivité" et discuter l'intérêt de ces tests.

#### DOCUMENT 4

4.1.

#### *Infectivity tests*

Infectivity tests were performed on *Alnus glutinosa*, *Myrica gale*, *Elaeagnus angustifolia* L., and *Hippophaë rhamnoides* L. in Super Cell® containers (Ray Leach "Cone-Tainer" Nursery, OR, U.S.A. 97013) containing about 160 cm<sup>3</sup> of Turface® (International Minerals and Chemicals Corp., Mundelein, IL). The *A. glutinosa* and *M. gale* seeds were sterilized in 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min and *M. gale* seeds were treated with 50 mg · 100 mL<sup>-1</sup> gibberellic acid (Torrey and Callahan 1979). The *H. rhamnoides* seeds were treated 10 min with 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and *E. angustifolia* seeds were treated with concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min (Hartmann and Kester 1983). All seeds were pre-germinated on wet, sterile Turface®. After germination, one seedling was placed in each container; 20 mL of nitrogen-free Crone's solution (Lalonde 1979b) was added immediately and thereafter every 2 weeks. The plants were placed in a mist 1 week for acclimatization and later in a greenhouse (July to October, temperature 23 ± 2°C). Twelve strains that had sufficient growth were used to inoculate the various host plants. The seedlings were inoculated twice with strains from *M. gale* 2 and 3 weeks after their transfer to containers, with a dense inoculum of *Frankia* isolates which had been washed and fragmented in Crone's nutrient solution. To examine infectivity between host plants and *Frankia* endophytes from members of their own possible infectivity group, four other strains were also used, two from hosts of the *Elaeagnus* group, TX31eHB (Bertrand and Lalonde 1985) and EUN1f (Lalonde *et al.* 1981), and two others from the *Alnus-Myrica* group, ACN1A<sup>0</sup> (Lalonde 1979a) and Cp11 (Callahan *et al.* 1978). All infectivity tests have been verified at least twice using growth pouches (Scientific Products, Evanston, IL). Moreover, some strains from the newly formed nodules of these infectivity tests were isolated and tested for infectivity a second time to confirm results of infection. For each treatment, seven seedlings were used. After 18 weeks, number of nodules, dry weight of the aerial part, and height of the plants were recorded.

4.2.

#### *Effectivity test by acetylene reduction assay*

On the 18-week-old inoculated seedlings from the infectivity test, the effectivity test was performed using acetylene reduction and ethylene production according to Koch and Evans (1966). The root system was introduced into a 20 × 150 mm glass test tube and sealed with a rubber serum cap. About 10% (3 mL) of the atmosphere was removed and replaced by acetylene. Methane (20 µL) was added as an internal standard and the tube was incubated at room temperature. Two samples were taken at different times (approximately 5 and 40 min) after addition of acetylene. By using a 26-gauge needle, about 0.5 mL of sample was injected into a gas chromatograph (Perkin-Elmer, model Sigma 2000) equipped with a flame ionization detector for detection of ethylene and a 2 × 18 mm Porapak-N (80 to 100 mesh) filled column. The injection port, column, and detector temperature was 150, 135, and 150°C, respectively, and the flow rate of helium carrier gas was 45 mL · min<sup>-1</sup>. The results were computer analysed on a Perkin-Elmer 3600 data station.

Seeds : graines  
seedling : plantule  
mist : gaze  
green house : serre  
pouches : poches

suite du Document 4 en page suivante

3.1.2. Dégager sous forme d'un organigramme les principales étapes du test d'inféctivité.

3.2. Un grand nombre de souches de Frankia provenant de différents hôtes a été isolé. Pour élaborer leur taxonomie de nouveaux critères de classification ont été recherchés.

#### 3.2.1. Composition en bases

Comme l'explique le document 5, la composition en bases de l'ADN ne peut être retenue pour définir des classes dans le genre Frankia.  
Expliquer avec précision comment les techniques citées dans ce document permettent de déterminer le pourcentage en (G + C) d'un ADN.

## Document 4 (suite)

### 4.3 - Infectivity and effectivity\* of *Frankia* strains on four host plants

Frankia strains	<i>A. glutinosa</i>		<i>M. gale</i>		<i>E. angustifolia</i>		<i>H. rhamnoides</i>	
	Infectivity	Effectivity	Infectivity	Effectivity	Infectivity	Effectivity	Infectivity	Effectivity
<i>Alnus</i> group								
ACN1a <sup>g</sup>	+	+	+	-	-	-	-	-
Cpl1	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Myrica</i> group								
MGX35a	+	+	+	+	-	-	-	-
MGX35b	+	+	+	+	-	-	-	-
MGX39b	+	+	+	+	-	-	-	-
MGX39c	+	+	+	+	-	-	-	-
MGX40a	+	+	+	+	-	-	-	-
MGX40b	+	+	+	+	-	-	-	-
MGX31a	+	+	+	+	+	+	+	+
MGX34a	+	-	+	+	+	+	+	+
MGX34b	+	-	+	+	+	+	+	+
MGX34c	+	-	+	+	+	+	+	+
MGX34d	+	-	+	+	+	+	+	+
MGX34e	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Elaeagnus</i> group								
TX31e <sup>BB</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+
EUN1f	+	-	+	+	+	+	+	+
Controls	-	-	-	-	-	-	-	-

\*As measured by acetylene reduction assay.

#### *DNA base composition (G + C%)*

One of the most easily determined parameters of a given genome is its overall DNA base composition, in other words, the proportion of guanine and cytosine residues. An *et al.* determined the G + C% of 12 *Frankia* strains isolated from widely different host plants. They found their G + C% to lie between 68 and 72% depending on which method was used, either thermal denaturation kinetics, buoyant density in CsCl gradients or direct nucleoside analysis by HPLC, the three methods yielding slightly different values for the same DNA. All strains tested yielded similar values indicating that the G + C% could not be used to identify classes within the genus. This was to be expected since organisms with G + C% values differing by more than about 20% are not considered as belonging to the same genus. Similar G + C% values do not necessarily, however, indicate a close relatedness between strains.

## DOCUMENT 5

### 3.2.2. Carte polypeptidique

Le document 6 évoque une possible différenciation en classes de différentes souches de *Frankia* d'après leur carte polypeptidique, obtenue en SDS-PAGE.

Donner sous forme d'un schéma légendé et commenté le résultat attendu pour le puits correspondant au mélange de protéines de référence, en précisant la position exacte de chaque protéine.

Donnée: la protéine qui migre le plus loin se trouve à 12,2 cm de la protéine qui migre le moins loin.

### 3.2.3. "Plasmidotypie"

La "plasmidotypie" est également une méthode possible pour définir des sous-groupes dans un genre ou une espèce bactérienne. Document 7.

- Indiquer les étapes expérimentales qui ont été nécessaires pour l'établissement de la "plasmidotypie".

- Analyser dans une perspective taxonomique les résultats figurant dans ce document.

Polypeptide patterns of soluble proteins from 35 *Frankia* strains from different plants of various geographical origins, belonging to *Alnus* and *Elaeagnus* host-specificity groups were determined by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The polypeptide pattern was qualitatively the same for each strain whatever the number of subcultures or the age. Two gel electrophoresis groups A and E were observed which matched with the *Alnus* and *Elaeagnus* host-specificity groups, but with some exceptions. The polypeptide patterns of the 35 *Frankia* strains tested were separated into 13 gel electrophoresis subgroups.

#### Protein extraction

For each of the 35 *Frankia* strains tested, extracts were prepared from 3-week to 3-month-old cultures. When available, cultures up to 1-year-old were also used. The cultures were harvested with Pasteur pipette and washed 3 times in 2 ml plastic microtubes. The cells were finally suspended in 180  $\mu$ l of 162 mM Tris-HCl, pH 6.8. The suspension was sonicated at 4°C using the

medium probe of a Fisher Sonic Dismembrator model 300 for 1.5 min at full output. The extracts were centrifuged at 10 000 g for 5 min at 4°C. To obtain clear samples, the supernatant was centrifuged at 80 000 g for 10 min using the A-10V18 rotor of a Beckman airfuge ultracentrifuge. The supernatants were then stored at -80°C until analysis. Prior to electrophoresis, the samples were boiled for 3 min with 2.3% (w/v) SDS and 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol.

#### SDS-PAGE

Twenty samples per gel were run on a discontinuous slab gel as described by Laemmli (1970). The stacking gel was composed of 3% (w/v) polyacrylamide, pH 6.8 and the running gel was of 10% (w/v) polyacrylamide, pH 8.9. Gels of 0.75 mm thickness were used. Approximately 50  $\mu$ g of protein, estimated by the Bio-Rad protein microassay procedure (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), was loaded in each well. Electrophoresis was run at 4°C and 15 mA until the tracking dye had reached the bottom of the running gel.

The gels were stained with 0.1% (w/v) Coomassie

Blue R (Sigma) in a methanol:water:glacial acetic acid (5:5:1, v/v) mixture for 1 to 2 h. The gels were destained with the same mixture until the background was suitably clear and dried in vacuo using a Bio-Rad model 483 slab dryer. A mixture of the following reference proteins (BRL cat. 6001SA Bethesda Research Laboratories, Inc) was used as standard: myosin (H-chain) (200 kDa); phosphorylase b (97.4 kDa); bovine serum albumin (66 kDa); ovalbumin (43 kDa);  $\alpha$ -chymotrypsinogen (25.7 kDa);  $\beta$ -lactoglobulin (18.4 kDa); cytochrome c (12.3 kDa).

#### 4. LA CULTURE IN VITRO DE PLANTES ACTINORHIZIENNES - (15 points)

Le document 8 présente deux résumés d'articles concernant la production de protoplastes et la micropopagation in vitro de plantes actinorhiziennes.

##### 4.1. Techniques de culture

Quel est l'intérêt des techniques présentées, en vue de l'étude d'une symbiose plante-bactérie, d'une part, et d'un point de vue général d'autre part.

##### 4.2. Composition des milieux

Les milieux utilisés dans les deux cas contiennent des régulateurs de croissance. Caractériser ces composés et justifier leur emploi.

##### 4.3. Mise en oeuvre d'un protocole

Proposer un calendrier des manipulations tenant compte de la préparation du matériel et des milieux pour la propagation de *Casuarina equisetifolia*.

##### 4.4. Constitution d'une base de données bibliographiques

L'article sur les protoplastes d'*Alnus incana* doit être intégré dans une base de données informatisée ; caractériser le par 5 mots (ou termes) clefs qui permettront d'y accéder.

DOCUMENT 7

Summary of restrictions analysis of Frankia plasmids

Plasmid	Strain	M.W. <sup>a</sup>	Restriction enzymes (with size of fragments expressed in Kb)							
			Bgl II	Eco RI	Bcl I	Sst I	Sph I	Pst I	Bam HI	
<b>8 Kb class plasmids</b>										
pFQ11	Cp11	8/8,3	4,3,4,0	8,3	8,3	8,3	8,3	3,4,2,7,2,1	— b	— b
pFQ31	Ar13	8/8,3	4,3,4,0	8,3	8,3	8,3	8,3	3,4,2,7,2,1	— b	— b
pFQ56	ACoN24d	8/8,1	4,2,3,9	n.d. <sup>c</sup>	8,1	— b	— b	5,2,3,0	8,1	— b
<b>18 Kb class plasmids</b>										
pFQ12	Cp11	18/21	18,3,6	— b	5,2,4,1,3,7,2,4	4,4,3,7,3,1,2,0	1,6,1,5,1,4,0,5	10,6,3,3,2,3,0	10,6,3,5,0,1,6	5,5,4,7,4,7,2,9, 2,6,1,9
pFQ32	Ar13	18/21	18,3,6	— b	5,2,4,1,3,7,2,4	4,4,3,7,3,1,2,0	1,6,1,5,1,4,0,5	10,6,3,3,2,3,0	10,6,3,5,0,1,6	5,5,4,7,4,7,2,9, 2,6,1,9

- a) The molecular weights are given in Kilobase pairs throughout. Before the slash is the figure obtained by comparing the migration rate of the *ccc* form (covalently closed circular DNA form) with standards, after the slash is the average of the sums of the restriction fragments obtained with all enzymes used.
- b) No site for this enzyme.
- c) Not determined.

## DOCUMENT 8

# Propagation of *Casuarina equisetifolia* through axillary buds of immature female inflorescences cultured in vitro

E. Duhoux<sup>1</sup>, B. Sougoufara<sup>2</sup>, and Y. Dommergues<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences, Dakar, Sénégal

<sup>2</sup> Laboratoire de Microbiologie des sols, ORSTOM, Dakar, Sénégal

<sup>3</sup> BSSFT (CTFT/ORSTOM/CNRS), 45bis Avenue de la Belle Gabrielle, F-94736 Nogent-sur-Marne Cedex, France

Received January 3, 1986 / Revised version received March 17, 1986 - Communicated by A. M. Boudet

### Abstract

The study of the actinorhizal symbiosis in *Casuarina equisetifolia* requires an homogenous plant material. Consequently, we devised a method of micropropagation based on the use of immature female inflorescences (IFI) as explants. IFI excised from an adult tree formed multiple buds after 4-week incubation on Murashige and Skoog medium with 0.05  $\mu\text{mol l}^{-1}$  NAA and 11.1  $\mu\text{mol l}^{-1}$  BAP. The axillary buds evolved into 5-6 cm long shoots 5 weeks after the transfer of IFI on a similar medium except for the addition of activated charcoal. Rooting of the shoots was obtained on a third medium, without BAP or charcoal, but with 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$  NAA. The plantlets were transferred into soil. Their growth was satisfactory and no plagiotropic tendency was observed.

### Abbreviations

BAP : 6-benzylaminopurine ; 2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid ; IAA : 3-indoleacetic acid ; IFI : immature female inflorescences ; NAA :  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid.

## CALLUS REGENERATION FROM *ALNUS INCANA* PROTOPLASTS ISOLATED FROM CELL SUSPENSIONS

FRANCINE M. TREMBLAY\*, J. BRIAN POWER\*\* and MAURICE LALONDE

Département des Sciences Forestières, Faculté de Foresterie, Université Laval, Ste-Foy, P. Québec G1K 7P4 (Canada)

(Received April 10th, 1985)

(Revision received July 22nd, 1985)

(Accepted August 7th, 1985)

Nagata and Takebe's (NT) medium, supplemented with 2.5  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), induced development of friable calluses from leaves of axenic shoot cultures of *Alnus incana*. Fast-growing cell suspensions were established in the same medium without agar. Suspensions gave high yields of viable protoplasts after an overnight incubation in an enzyme mixture consisting of 1% (w/v) Onozuka R-10, 0.5% (w/v) Rhozyme HP-150, 0.03% (w/v) Macerase, CPW salts, and 13% (w/v) mannitol (pH 5.8). Protoplasts cultured on K8p medium underwent cell wall regeneration within 24 h. The optimum protoplast-derived colony formation and growth was obtained on the NT medium supplemented, as was the K8p medium, with glucose as the osmoticum, growth regulators, coconut milk and casein hydrolysate. Compared with other culture techniques, the agarose bead technique of Shillito et al. (Plant Cell Reports, 2 (1983) 244) improved cell division and colony formation frequency. Protoplast-derived macrocalluses grew under the same conditions as those used for leaf calluses.

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**B : réalisation pratique d'opérations de génie biologique**  
**Durée : 8 heures coefficient 8**

**DOCUMENTS PERSONNELS NON AUTORISÉS**  
Le barème est donné à titre indicatif

**Premier jour** : (durée : 7 h + 1 h pour repas pris sur place)

**QUELQUES OPERATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE**

On se propose de réaliser 2 séries de manipulations de génie biologique indépendantes concernant d'une part la trypsine, de l'autre de phage  $\lambda$ .

**1- UTILISATION DES PROPRIETES CATALYTIQUES DE LA TRYPSINE (110 points)**

La trypsine est une enzyme utilisée dans le domaine des biotechnologies.

La trypsine (EC 3. 4. 21. 4.) est une enzyme protéolytique hydrolysant des liaisons peptidiques où le - C - provient des acides aminés basiques (Arg. et Lys.)



Dans un premier temps on verra l'application de cette propriété lors de la réalisation de cultures cellulaires.

Dans un second temps, on envisagera la détermination des paramètres cinétiques et la réalisation d'un bioréacteur à lit fixe avec l'enzyme immobilisée.

**1.1. Utilisation de la trypsine en cultures cellulaires (40 points)**

La trypsine est utilisée en cultures cellulaires lors de la réalisation de cultures en monocouche de cellules adhérentes. Pour le maintien de ces cultures, il est nécessaire de réaliser régulièrement des repiquages sur support et milieu neufs. Au cours de ces opérations il faut détacher les cellules de leur support avant de les transférer. Pour ce faire, on utilise l'activité peptidasique de la trypsine qui rompt les ponts protéiques entre le support et les cellules.

Un flacon de culture est remis à chaque candidat (le nom de la lignée sera précisé). Il contient une culture en milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) + 10 % de SVF (sérum de veau foetal).

Chaque candidat dispose également :

- \* de Tampon PBS (phosphate buffer saline) stérile,
- \* de milieu DMEM + 10 % SVF stérile,
- \* de la trypsine en solution stérile à 0,25 %,
- \* de bleu trypan à 0,4 %.

Réaliser un repiquage de cette culture dans deux nouveaux flacons.

Le protocole utilisé sera le suivant :

- Observer la culture remise au microscope inversé.  
Noter les observations sur le compte-rendu.
- Eliminer le milieu et réaliser un lavage avec 5 ml de PBS.
- Introduire 2 ml de trypsine à 0,25 % et laisser agir (la durée d'action de la trypsine sera indiquée au candidat). Suivre le détachement des cellules au microscope inversé.
- Ajouter 5 ml de milieu neuf pour arrêter l'action de la trypsine.
- Réaliser une numération en cellule sur 0,9 ml de suspension auquel sera ajouté 0,1 ml de bleu trypan à 0,4 % (2 comptages).
- Réaliser la dilution adéquate de manière à pouvoir préparer les deux flacons demandés à  $0,5 \cdot 10^6$  cellules/flacon ; volume par flacon 5 ml. Tous les calculs seront transcrits sur le compte-rendu.
- Exécuter la préparation des trois flacons.

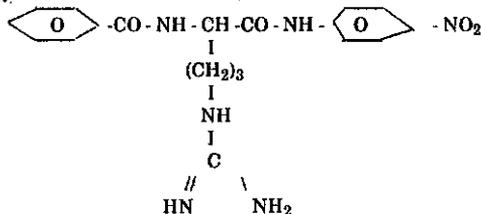
- Mettre à incuber dans l'étuve réglée à 37°C, avec un mélange air/CO<sub>2</sub> 5 %.

N.B. : - Toutes les opérations techniques seront réalisées en présence de l'examinateur.

- Les cultures seront examinées le lendemain par le jury.

## 1.2. Paramètres cinétiques de la trypsine (40 points)

On se propose ici de déterminer les paramètres cinétiques de la trypsine. Le substrat utilisé est le N-benzoyl-L-arginyl paranitroanilide (LBAPNA) de formule :



Il est hydrolyse en N-benzoyl-L-arginine (BA) et paranitroanilide (PNA) selon la réaction :



On détermine la quantité de PNA formée par mesure de l'absorbance à 405 nm. Le coefficient d'absorption molaire est de 9200 l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

La vitesse de réaction sera mesurée par méthode cinétique.

### 1.2.1. Mode opératoire

Vu sa faible solubilité, le substrat (BAPNA) est utilisé en solution dans un tampon TRIS-HCl 50 mM, Ca Cl<sub>2</sub> 20 mM, pH 8,4 contenant du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Ce substrat, "BPNA TRIS DMSO", sera à préparer extemporanément par le candidat selon le protocole suivant :

Au moment de l'emploi introduire dans une fiole jaugée de 50 ml :

- 2,5 ml de "BAPNA DMSO 25 mM".

- 7,5 ml de DMSO

- 5 ml de tampon X10.

Compléter à 50 ml avec de l'eau distillée. Cette solution sera utilisée pour la détermination des paramètres cinétiques et comme substrat pour le bioréacteur.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

Tampon "TRIS dilué + DMSO"                    β ml

Enzyme à 1,2 mg/ml                                0,1 ml

Substrat "BAPNA TRIS DMSO"                α ml

-----  
Volume total                                        2 ml

Les mélanges réactionnels seront réalisés directement dans une cuve de spectrophotomètre ; l'enzyme sera ajoutée au dernier moment.

Réaliser une série de 4 mesures de vitesse initiale avec divers volumes de substrat (α compris entre 0,4 ml et 1,5 ml).

Les conditions précises de mesure et une notice technique permettant d'effectuer le réglage du spectrophotomètre seront fournies par le jury. Le réglage de l'appareil sera noté : il faudra le faire valider par le jury. Durée de la cinétique : 120 s.

### 1.2.2. Compte-rendu

\* Tableau de préparation des tubes avec indication des compositions des tubes, des concentrations des substrats et des valeurs des vitesses initiales exprimées en variation de l'absorbance par minute (ΔA/min).

\* Représentation graphique manuelle ou à l'aide d'un logiciel, en double inverse (LINEVEAWER et BURK).

\* des paramètres cinétiques :

- V<sub>max</sub> en A / min et K<sub>M</sub> en mol.l<sup>-1</sup> de S

- V<sub>max</sub> en UI/mg                                    92-25

### 1.3. Immobilisation de la trypsine par liaison covalente ; réalisation d'un bioréacteur (30 points).

On se propose de réaliser la fixation de la trypsine sur un support (SEPHAROSE CL 4B activé par le bromure de cyanogène) par liaisons covalentes et d'utiliser l'enzyme fixée dans un bioréacteur. On déterminera le taux de conversion du substrat dans les conditions expérimentales utilisées.

La fixation des protéines enzymatiques se fait par mise en contact pendant un certain temps avec le support..

Le support ayant fixé l'enzyme est ensuite utilisé pour réaliser un réacteur enzymatique colonne à l'aide d'un corps de seringue. On détermine alors, pour un débit donné, le taux de conversion du substrat, défini comme le rapport de la concentration du substrat transformé à la concentration initiale. Il sera exprimé en pourcentage du substrat initial transformé.

$$T (\%) = \frac{(S)_0 - (S)}{(S)_0} \cdot 100$$

avec (S)<sub>0</sub> : concentration du substrat à l'entrée du réacteur

(S) : concentration du substrat à la sortie.

#### 1.3.1. Mode opératoire

- 1 g de SEPHAROSE CL 4B activé par le bromure de cyanogène a été hydraté et lavé pendant 15 minutes avec 200 ml de HCl à 10-3 M ; on a obtenu environ 3,5 ml de gel qui se trouve dans le petit flacon fourni. NE PAS AGITER. Ce gel sera utilisé comme support solide pour la fixation de la trypsine.
- Eliminer avec précaution le liquide au-dessus du support sans remettre le gel en suspension et ajouter 10 ml de la solution d'enzyme. Mélanger doucement avec un petit agitateur et laisser au contact durant 30 minutes en agitant de temps en temps.
- On utilisera le corps d'une seringue plastique de 5 ml comme bioréacteur. Introduire un peu de laine de verre au bas de la colonne et vérifier avec le tampon TRIS DMSO dilué que le liquide coule bien.
- Introduire le contenu du flacon dans la colonne.

**NE JAMAIS LAISSER LA COLONNE A SEC.  
FERMER LE ROBINET AU BAS DE LA COLONNE**

- Laver la colonne avec un volume de tampon "TRIS dilué DMSO" correspondant à 3 fois le volume du gel. Introduire un peu de laine de verre en tête de colonne au-dessus du gel afin d'éviter que le liquide ajouté perturbe la partie supérieure du gel.
- Régler le débit à environ 1 goutte chaque 10 s. Ne plus le modifier par la suite. Le déterminer en ml.mn-1.
- Conserver une fraction d'effluent qui servira de témoin pour le dosage.
- Lorsque le liquide affleure le gel, ajouter le substrat.
- Recueillir, dans des cuves de spectrophotomètre, 5 échantillons de 3 ml d'effluent.
- Mesurer l'absorbance à 405 nm. La limite de validité de la loi de Beer-Lambert sera précisée pendant l'épreuve et une dilution à titre indicatif.

#### 1.3.4. Compte-rendu

- Indiquer comment a été mesuré le débit de la colonne et sa valeur exprimée en ml/min.
- Indiquer sous forme de tableau les diverses valeurs de l'absorbance mesurée à 405 nm.
- Représenter graphiquement la variation d'absorbance à 405 nm en fonction de la fraction d'effluent après introduction du substrat
  - \* Interpréter la courbe obtenue en introduisant les termes d'état pré-stationnaire et stationnaire.
  - \* Calculer le taux de conversion du substrat exprimé en pourcentage. Justifier.

## 2. MISE EN EVIDENCE DE LA LYSOGENIE (50 points)

### 2.1. Principe général

Une souche lysogène, soumise aux rayons ultraviolets dans certaines conditions, produit des phages. Ceux-ci sont mis en évidence en présence d'une souche bactérienne sensible à ces phages par la technique des plages de lyse.

### 2.2. Protocole expérimental

On dispose de 2 souches d'*Escherichia coli* en phase exponentielle de croissance cultivées à 37°C en milieu liquide :

- *E. coli* K<sub>12</sub> λ<sub>f</sub> : bactéries lysogènes possédant le prophage λ
- *E. coli* C<sub>600</sub> λ<sub>S</sub> : bactéries sensibles au bactériophage λ.

#### 2.2.1. Préparation de la suspension d'*E. coli* K<sub>12</sub> λ<sub>f</sub>

(La densité microbienne de cette suspension sera communiquée au moment de l'épreuve)

Réaliser un dénombrement des bactéries dans la masse (2 dilutions successives et essais par dilution). Conserver les tubes de dilutions sériées dans la glace.

Réaliser parallèlement à partir d'un de ces tubes une dilution de manière à obtenir une suspension à 5.10<sup>6</sup> bactéries pour 0,1 ml. Transcrire sur le compte-rendu, les calculs effectués.

#### 2.2.2. Réalisation du mélange à étaler à la surface de chaque boîte de gélose à 12 g.ℓ<sup>-1</sup> d'agar (3 boîtes)

Dans un tube (3 tubes en tout) contenant 3 ml de gélose molle en surfusion ajouter :

- 0,1 ml de la suspension d'*E. coli* K<sub>12</sub> λ<sub>f</sub> + à 5.10<sup>6</sup> bactéries pour 0,1 ml
- 0,2 ml de la suspension d'*E. coli* C<sub>600</sub> λ<sub>S</sub>

Homogénéiser rapidement le mélange à l'aide d'un vortex.

#### 2.2.3. Etalement du mélange

Etaler en versant les mélanges à la surface des géloses précoulées ; incliner les boîtes dans différents sens de manière à ce qu'elles soient inondées de façon homogène.

Laisser solidifier.

#### 2.2.4. Irradiation aux rayons ultra-violet

Une boîte sera incubée à 37°C sans avoir été irradiées (boîte 0).

Soumettre les autres cultures aux radiations (couvercle retiré) selon le tableau suivant :

Boîte	0	1	2
Temps d'irradiation en secondes	0	30	60

**LE PORT DE LUNETTES EST OBLIGATOIRE PENDANT  
CETTE MANIPULATION**

Incuber à 37°C

## Deuxième jour : (durée : 1 h)

### 2- MISE EN EVIDENCE DE LA LYSOGENIE

#### 2.1. Numération de bactéries sur boîtes

#### 2.2. Numération des phages

Compter les plages de lyse sur chaque boîte.

#### 2.3. Calcul des taux d'induction. Utiliser le résultat obtenu ci-dessus.

- Taux d'induction spontanée (pourcentage de bactéries lysogènes ayant produit des phages en l'absence d'induction)
- Taux d'induction provoquée pour chaque temps (pourcentage de bactéries lysogènes ayant produit des phages sous l'action des UV)
- Commenter les résultats obtenus.

# Epreuves de la session 1993

## Epreuve de Français Durée 4 heures Coefficient 2

### *Les conditions de production de l'information.*

Il n'y a pas que le medium et le message, il y a, nous l'avons vu, le récepteur. Il y a aussi les centres qui produisent, choisissent, contrôlent, commandent l'information. Le contrôle de ces centres de contrôle pose un problème obsédant : peut-on le laisser aux intérêts privés, c'est-à-dire au contrôle de l'argent, faut-il les soumettre au contrôle de l'Etat ?

D'où le dilemme : presse d'argent ? presse d'Etat ?

Examinons la notion de "presse d'argent". A un premier regard, elle signifie "presse pour gagner de l'argent". Presse donc qui traite l'information comme une denrée marchande, sélectionnant l'information rentable et éliminant l'information non rentable. Selon ce critère, l'extraordinaire, le surprenant, le nouveau d'une part, mais aussi l'obsédant, le passionnant, l'adorable, le haïssable sont hautement valorisés. D'où une presse à "sensation", qui choisit et produit ce qui crée des sensations ; d'un côté, la grande presse d'information mettant en relief tout ce qu'il y a de surprenant, happant *in extremis* l'information de dernière heure, de l'autre, la presse qui raconte des histoires archétypiques - amours divins, sacrés-profanes entre olympiens modernes (vedettes de cinéma, têtes couronnées, etc.) - et qui, pour cela, produit des pseudo-informations se conformant aux besoins mythologiques.

La presse d'argent est donc soumise à cette double tendance, et c'est à cette double tendance qu'elle essaie d'échapper la presse d'opinion, qui vend non tant de l'information que le sertissage idéologique de l'information, ce qui nous ramène aux problèmes précédemment examinés de la relation idéologie/information.

A un second regard, la notion de "presse d'argent" signifie non seulement "presse pour gagner de l'argent", mais aussi presse sélectionnant l'information selon l'utilité qu'elle comporte à l'égard du pouvoir de l'argent, c'est-à-dire le système capitaliste. Ici, il ne s'agit plus seulement de faire de l'argent par l'information, il s'agit aussi de soumettre l'information au pouvoir de l'argent.

Cette tendance se développe naturellement dans la presse d'argent. Mais il faut remarquer qu'elle peut se heurter à la tendance à "faire de l'argent" ; en effet, une information "sensationnelle", qui fait de l'argent, peut être contraire à l'intérêt du pouvoir de l'argent (scandale financier), mais elle ne peut être tue, s'il y a concurrence.

Il y a donc une contradiction interne dans la presse d'argent, et cette contradiction, vitale pour l'information, ne peut être maintenue que dans et par la concurrence.

La concurrence entre journaux, radios, télévisions, la concurrence des sources d'information donne des chances à l'information que l'argent ou l'Etat veulent étouffer. Une feuille marginale commence à lancer la "révélation" : il devient alors possible, et tôt ou tard, probable, que là où il y a concurrence, l'information sortira et se répandra dans l'ensemble des media. Ainsi, c'est dans le système le plus capitaliste, mais aussi le plus concurrentiel en matière de presse, radio, télévision, le système américain, que les "scandales" de My Lay et du Watergate ont pu finalement envahir la vie politique et avoir les effets que l'on sait\*.

C'est parce que l'information vaut de l'argent que finalement l'argent lui-même concourt à diffuser l'information dont le sens conteste le pouvoir de l'argent. Par contre, là où l'information est dénuée de la valeur marchande, là où peut jouer une censure, c'est-à-dire là où il y a monopole d'Etat, alors l'information contestataire est chassée des media.

Ainsi, sous le problème presse d'argent/presse d'Etat s'en cache un autre qui ne le recouvre pas entièrement : concurrence/monopole.

Pour qu'il y ait concurrence, il faut qu'il y ait pluralité véritable des sources d'information. Et c'est dans et par la pluralité des sources que peut surgir l'information dans ce qu'elle a de *dérangeant*.

En fait, il peut y avoir concurrence au sein des systèmes sous contrôle d'Etat, quand il y a institutionnellement et socialement relative autonomie des sources. Les media d'Etat, en France, sont inscrits dans un système de concurrence comprenant la presse nationale, les radios périphériques, les grandes agences internationales. Il faut surcontrôler les media et clore hermétiquement la société pour occulter les grands événements nationaux et internationaux. Mais, même dans les pays clos, des informations étrangères filtrent à travers le brouillage des ondes radios. La planète subit mille contraintes, mille censures, mille déformations locales et nationales dans l'information, mais, plus ou moins mal, lentement, difficilement, l'information circule. L'hégémonie des grandes agences anglo-saxonnes sur une partie du globe contient en elle-même l'antidote au monopole : la concurrence.

Edgar MORIN, Pour sortir du XX<sup>e</sup> siècle, NATHAN Points, 1981 pp.44-46

\* Le massacre de My Lay a lieu en mars 1968. L'information est étouffée dans/par l'armée U.S. L'obstination d'un journaliste finit par la faire marginalement percer. En novembre-décembre 1969, elle remplit tous les journaux américains.

### QUESTIONS

1. Vous résumerez cet extrait en 220 mots. Une marge de plus ou moins 10% sera tolérée. (8 points)
2. Expliquez les expressions suivantes :
  - "des histoires archétypiques"
  - "sertissage idéologique de l'information." (2 points)
3. Commentez et discutez l'affirmation d'Edgar MORIN : "La concurrence entre journaux, radios, télévisions, la concurrence des sources d'information donne des chances à l'information que l'argent ou l'Etat veulent étouffer." (10 points)

## Epreuve d'Anglais

Durée 2 heures Coefficient 2

(L'usage de la calculatrice et du dictionnaire sont interdits)

### The Perils of Treading on Heredity

... The possibilities for gene therapy will be limited for the near future. If gene transplants are performed on tissue cells – bone - marrow cells, for instance – the altered genes will die with the patient ; they cannot be passed on to any children the patient might subsequently have. Someday, however, it may be possible to change genes in germ cells, which give rise to sperm or eggs. If that feat is accomplished, the new genes would be transmitted to one generation after another. 1

That is what most frightens the foes \* of genetic engineering. If biologists can change the course of heredity, they can try to play God and influence destiny.... 5

No geneticist is currently planning to transfer genes to human germ cells. Even though mankind has been playing God since biblical times, rearranging the germ lines of crops and farm animals to suit human needs, researchers do not advocate extending such genetic tinkering \* to people. But medical scientists have an obligation to protect humanity against disease and pestilence. Once it becomes possible to eradicate a gene that causes a fatal disorder, and thus keep it from passing to future generations, it will be criminal not to do so. As director of the Human Genome Project , James Watson contends that the research has a crucial humanitarian mission. Says he : "The object should not be to get genetic information per se \* , but to improve life through genetic information." 10

Fortunately, the most ardent supporters of genetic research are the first to admit the potential for abuse and see the need for ground rules \*. Many ethicists and scientists who have studied the issues agree on certain basic principles : 15

- Individuals should not be required to submit to genetic testing against their will.
- Information about people's genetic constitution should be used only to inform and never to harm. 20
- The results of a genetic assay \* should be held in strict confidence.
- Genetic engineering in humans should be used to treat diseases, not to foster \* genetic uniformity. Knowledge is power, the saying goes. It can be dangerous, but it can just as easily be used wisely. "I do have faith", says Case Western's Murray. "Not that the judgment of people is always right, but that eventually we will preserve a good measure of fairness and justice. If we can absorb Copernicus and Galileo, if we can absorb Darwin and Freud, we can certainly absorb mapping the human genome". 25

**FOOTNOTES:**

Reported by Andrea Dorman/New York  
and J. Madeleine Nash/San Francisco  
Time - March 1989

- £6 \* a foe : un ennemi
- £10 \* to tinker : bricoler
- £15 \* per se : en soi
- £17 \* ground rule: règle de base
- £22 \* assay : analyse - essai - test -
- £23 \* to foster : favoriser - encourager

**Traduction en français : (10 points)**

Traduire de "No geneticist" (£ 8) – titre non inclus, jusqu'à "genetic uniformity" (£ 23).

**Rédaction en anglais : (10 points)**

One sentence in the text alludes to what man has already changed in Nature (£ 9 crops – farm animals). Illustrate some of these changes with precise examples. Then, say why, when genetic engineering is applied to human beings the issues become completely different.

**Epreuve de Mathématiques et Sciences physiques**  
**Durée 4 heures Coefficient 4**

**1° partie : Mathématiques (durée 2 heures, coefficient 1,5)**

**Rappel:** La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

**EXERCICE 1 - (8 points)**

On considère que la valeur  $X$  de la fluorescence de la "chlorophylle  $\alpha$ " en milieu océanique (exprimée en millivolts) suit une loi normale de moyenne  $m$  et d'écart type  $\sigma$ .

1. Une étude expérimentale a permis d'établir que :  
 $P(X < 37) = 0,9332$  et  $P(X < 23,5) = 0,2266$ .

1.1. Montrer que  $m$  et  $\sigma$  vérifient le système :

$$m + 1,5 \sigma = 37$$

$$m - 0,75 \sigma = 23,5$$

1.2. En déduire les valeurs de  $m$  et de  $\sigma$ .

2. On suppose désormais que  $m = 28$  mV et  $\sigma = 6$  mV.

Une série de 80 mesures de la fluorescence dans un océan a donné :

fluorescence en mV	[15;20[	[20;25[	[25;30[	[30;35[	[35;40[	[40;45[
effectif	8	13	21	20	14	4

2.1. Calculer la moyenne de cette série de mesures.

2.2. La différence observée entre la moyenne calculée à la question 2.1. et la valeur théorique de 28 mV est-elle significative au risque de 5% ? au risque de 1% ?

Rappel : si la variable aléatoire  $T$  suit une loi normale  $N(0;1)$  alors on a :

$$P(|T| > 1,96) = 0,05$$

$$P(|T| > 2,58) = 0,01.$$

## EXERCICE 2 - (12 points)

*Croissance d'une population dans un environnement limité.*

On note  $x$  le nombre des individus de cette population à l'instant  $t$  exprimé en jours.  
Dans un environnement limité, l'effectif de la population tend vers une limite finie  $K$ .

### Partie A : Etude expérimentale

Une culture de crustacés planctoniques donne les résultats suivants :

$t$ (en jours)	0	2	4	6	8	10	12	14	16
$x$ effectifs de la population	15	59	199	448	631	697	715	720	720

La population se stabilise à partir du 14<sup>ème</sup> jour et donc, dans cette expérience,  $K = 720$ .

A-1 Le plan est rapporté à un repère orthogonal avec les unités graphiques suivantes :

1 cm pour 1 jour en abscisse ;

1 cm pour 50 individus en ordonnée.

Représenter le nuage des 9 points de coordonnées  $(t, x)$  sur une feuille de papier millimétré.

A-2 Dans toute cette question, les valeurs numériques seront arrondies au centième le plus proche.

On pose :

$$y = \ln\left(\frac{x}{720 - x}\right)$$

A-2.1. Etablir le tableau de valeurs  $(t, y)$  pour :

$$t \in \{0, 2, 4, 6, 8, 10, 12\}$$

A-2.2. Déterminer par la méthode des moindres carés une équation de la droite d'ajustement de  $y$  par rapport à  $t$ .

A-2.3. Dédire de la question précédente  $x$  en fonction de  $t$ .

A-3 Dans cette question, pour  $t \geq 0$ , on prend :

$$x = f(t) = \frac{720}{1 + e^{-0,73t + 3,88}}$$

A-3.1. Calculer

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t)$$

$$t \rightarrow +\infty$$

A-3.2. Calculer  $f'(t)$ . En déduire le tableau de variation de  $f$  sur  $[0; +\infty[$ .

Tracer la courbe représentative de  $f$  sur la même feuille de papier millimétré (employer deux couleurs différentes).

### Partie B : Etude théorique

On suppose que le nombre d'individus  $x$  vérifie pour  $t \in [0; +\infty[$  l'équation différentielle :

$$(E) \quad \frac{K dx}{x(K-x)} = r dt \quad \text{avec } 0 < x < K,$$

et la condition initiale  $x(0) = x_0$ , où  $x_0$  est un entier positif donné et  $r$  un nombre réel strictement positif.

B-1 Vérifier que sur  $]0, K[$  on a :

$$\frac{1}{x} + \frac{1}{K-x} = \frac{K}{x(K-x)}$$

En déduire une primitive de la fonction  $h$  définie sur  $]0, K[$  par :

$$h(x) = \frac{K}{x(K-x)}$$

B-2 Résoudre l'équation différentielle (E) en tenant compte de la condition initiale.

B-3 En prenant  $K = 720$  et  $x_0 = 15$ , trouver l'expression de  $x$  en fonction de  $t$ .

Comparer avec l'expression trouvée dans la partie A.

En déduire une valeur approchée de  $r$ .

## 2° partie : Sciences physiques (durée 2 heures, coefficient 2,5)

**Rappel :** La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

Seul l'usage d'une calculatrice électronique, autonome, non imprimante, à entrée unique par clavier, est autorisée pour cette épreuve.

### LE SUJET COMPORTE TROIS QUESTIONS INDEPENDANTES.

#### 1. - Radioactivité (6 points)

1. L'isotope 14 du carbone ( $^{14}\text{C}$ ) est émetteur  $\beta^-$  ;

- Préciser la nature de la particule  $\beta^-$ .
- Ecrire l'équation de désintégration de  $^{14}\text{C}$ .
- Énoncer les lois de conservation utilisées.

2. Il existe un équilibre dynamique dans tout organisme vivant entre l'apport de  $^{14}\text{C}$  et la disparition de ce radio isotope par désintégration. Par suite tout organisme vivant a, du fait de la présence de  $^{14}\text{C}$ , une activité radioactive par unité de masse de carbone, notée  $A$ , constante et égale à 285 Bq/kg.

- Donner la définition du becquerel (Bq).

La demi-vie du carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ) est de 5715 ans.

- Définir la demi-vie d'un radio isotope.

3. Déterminer le nombre d'atomes de  $^{14}\text{C}$  contenus dans 1 kg de l'élément carbone provenant d'un échantillon végétal contemporain.

4. Un échantillon végétal fossile ne présente plus qu'une activité massique de 85 Bq/kg de carbone.

- Déterminer le nombre d'atomes  $^{14}\text{C}$  résiduels par kg de carbone de cet échantillon.
- En déduire l'âge approximatif de l'échantillon fossile.

Données : - Extrait de la classification périodique.

$^2\text{He}$ ;  $^3\text{Li}$ ;  $^4\text{Be}$ ;  $^5\text{B}$ ;  $^6\text{C}$ ;  $^7\text{N}$ ;  $^8\text{O}$ ;  $^9\text{F}$ ;  $^{10}\text{Ne}$

## 2. Cinétique (6 points)

1. Préciser brièvement le rôle d'un catalyseur lors d'une réaction chimique.  
Définir la catalyse homogène et citer un exemple de ce type de catalyse sans préciser le mécanisme mis en jeu.
2. Ecrire la relation montrant l'influence de la température  $T$  sur la constante de vitesse  $k$  d'une réaction chimique. Cette relation, dite relation d'ARRHÉNIUS fera apparaître l'énergie d'activation  $E_a$ .
3. Une réaction chimique a une énergie d'activation de  $170 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  que l'on supposera indépendante de la température. A  $800 \text{ K}$ , l'emploi d'un catalyseur multiplie sa vitesse par un facteur  $10^4$ . Calculez l'énergie d'activation avec catalyseur à cette température.  $R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ .
4. A quelle température la vitesse de la réaction sans catalyseur serait-elle la même que la vitesse de la réaction avec catalyseur à  $800 \text{ K}$  ?

## 3. Chimie organique (8 points)

1. On fait réagir du benzène et du chloroéthane en présence de chlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  anhydre.
  - a) Donner le nom et la formule brute et semi-développée du corps A obtenu.
  - b) De quel type de réaction s'agit-il ?
2. A réagit à son tour avec du chlorure d'éthanoyle  $\text{CH}_3\text{COCl}$ , également en présence de  $\text{AlCl}_3$  anhydre, pour donner majoritairement un corps B.
  - a) Donner la formule semi-développée et la fonction oxygénée présente dans B.
  - b) Quel est l'intermédiaire réactionnel qui réagit avec A ?
  - c) Aurait-on obtenu le même corps B si, en partant toujours du benzène, on avait interverti l'ordre des réactions décrites en a) et b) ? Justifier la réponse.  
On rappelle que le groupe éthyle est donneur alors que le groupe éthanoyle est accepteur.
3. Proposer la succession de réactions qui, à partir de l'éthanol, permettrait d'obtenir le chlorure d'éthanoyle. Il est demandé d'indiquer les réactifs nécessaires sans qu'il soit besoin de préciser les conditions opératoires.

Epreuve de Sciences biologiques fondamentales et génie  
biologique Durée 4 heures Coefficient 6

### LES LEVURES

"Depuis les époques sumérienne, babylonienne et probablement depuis beaucoup plus longtemps encore, les levures, champignons ascomycètes unicellulaires, jouent un rôle important dans les activités humaines, fournissant notamment, par leurs fermentations, le pain, la bière et le vin. Actuellement, les levures représentent toujours le premier groupe de micro-organismes au plan industriel, avec des chiffres d'affaires

exprimés en milliards de dollars. Mais, parallèlement à leur importance économique, les levures se sont aussi affirmées comme des objets privilégiés de recherches biologiques : récemment, des succès éclatants ont été enregistrés dans le domaine des biotechnologies..."

(*Biofutur "Spécial Génomes"*, N°94, Octobre 1990).

## 1 - L'anatomie, les besoins nutritionnels et la reproduction des levures (25 points)

### 1.1. Anatomie structurale (5 points)

Préciser la (les) différence(s) structurale(s) fondamentale(s) qui existe(nt) entre une levure et une bactérie.

### 1.2. Types trophiques (5 points)

La levure se développe bien sur le milieu liquide de SABOURAUD (Composition : peptone pepsique de viande, hydrolysat tryptique de caséine, glucose), à l'obscurité ou à la lumière, en présence d'air. On n'observe aucune culture sur milieu minéral avec atmosphère enrichie de CO<sub>2</sub>. Dans certaines conditions "d'asphyxie" quelques levures développent un pouvoir fermentaire très exploité dans l'industrie.

Préciser, en les justifiant, le type trophique énergétique, le type trophique par rapport à la source de carbone et le type respiratoire de la levure.

### 1.3. Cycle de reproduction (15 points)

La levure *Saccharomyces cerevisiae* présente une phase de reproduction végétative par bourgeonnement. Si les nutriments viennent à manquer, le noyau cellulaire diploïde de cette cellule végétative est le siège d'une méiose et donne quatre spores dans un asque (deux spores de type  $\alpha$  et deux spores de type  $\beta$ ). Une spore de type  $\alpha$  et une spore de type  $\beta$  peuvent fusionner pour former un zygote qui se multipliera par bourgeonnement.

1.3.1. Représenter sous la forme d'un schéma clair et précis le cycle biologique (cycle de reproduction) de cette levure.

1.3.2. Pendant un cycle cellulaire aboutissant à une méiose, présenter à l'aide de schémas ou de courbes commentés, l'évolution :

- de la quantité totale d'ADN par cellule,
- du nombre de chromosomes par cellule,
- du nombre de chromatides par chromosome.

## 2 - Les levures et la viticulture (50 points)

De nombreux glucides sont susceptibles d'être dégradés par les levures. Le glucose est le point de départ de voies métaboliques essentielles (figure 1) dont certaines, comme la fermentation éthanolique, ont d'importantes applications pratiques.

### 2.1. Les sources de glucose (15 points)

Certains osides peuvent être utilisés comme source de carbone si la levure possède les enzymes permettant leur hydrolyse.

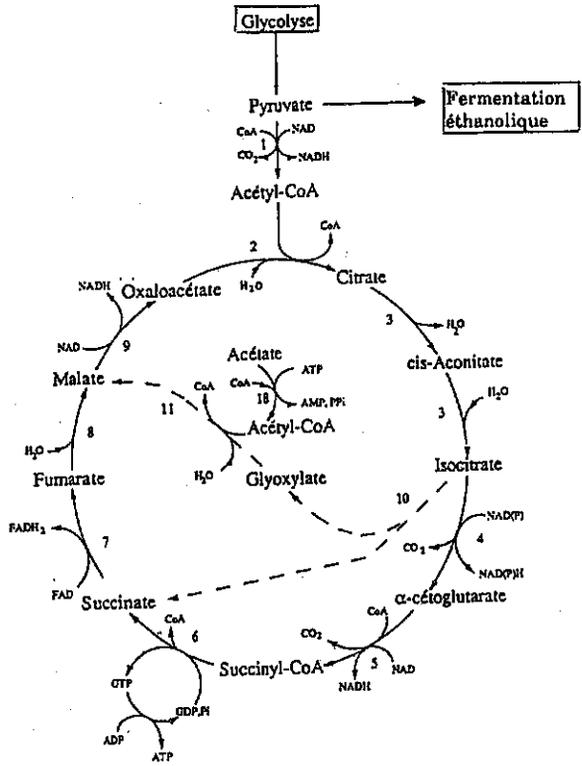
2.1.1. *S. cerevisiae* possède, entre autres, une amyloglucosidase (glucoamylase) extracellulaire et une invertase ( $\beta$ -fructofuranosidase) périplasmique. L'amyloglucosidase hydrolyse principalement les liaisons  $\alpha$ -1,4 de l'amidon et des dextrines en commençant par les extrémités non réductrices mais elle a aussi une activité secondaire sur les liaisons  $\alpha$ -1,6. Représenter une partie de la molécule d'amidon et indiquer les points d'action de l'amyloglucosidase.

2.1.2. Chez *S. cerevisiae*, l'absorption du glucose se fait par un mécanisme de "diffusion facilitée" avec un "système constitutif". Donner la signification de ces deux expressions.

2.1.3. Le saccharose est généralement hydrolysé par l'invertase à l'extérieur de la membrane plasmique. Donner la formule du saccharose et écrire l'équation de la réaction catalysée par l'invertase.

2.1.4. Le saccharose peut cependant aussi traverser cette membrane par un mécanisme de "transport actif de type symport-H<sup>+</sup> avec échange parallèle d'ions K<sup>+</sup>". Expliquer ce mécanisme.

Figure 1



2.2. La dégradation du glucose en pyruvate (13 points)

2.2.1. Phosphorylation préalable : citer les enzymes qui peuvent catalyser cette phosphorylation et justifier le fait que cette réaction soit irréversible.

2.2.2. Principale voie de dégradation du glucose phosphorylé : la glycolyse

2.2.2.1. Distinguer les deux grandes phases de la glycolyse.

2.2.2.2. Préciser la principale étape qui régule la vitesse de la voie glycolytique et indiquer sommairement par quel mécanisme s'exerce cette régulation.

2.2.2.3. Expliquer, à partir d'un exemple précis la notion de couplage énergétique.

2.3. Les destinées du pyruvate formé (22 points)

Elles sont différentes selon que la levure croit en aérobiose ou en anaérobiose.

2.3.1. En aérobiose

Le pyruvate est d'abord décarboxylé en acétyl-CoA grâce au système pluri-enzymatique de la pyruvate déshydrogénase (pyruvate DH). Ce complexe enzymatique a été étudié chez *Saccharomyces carlsbergensis* et chez *S. cerevisiae*.

	<i>S. carlsbergensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Km pour le pyruvate à pH 8,1 =	250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	650 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
à pH 6,5 =	180 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	130 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
Km pour le Coenzyme A	11 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	14 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

(données extraites de : Biotechnologies des levures - LARPENT).

Pour les deux espèces de *Saccharomyces*, la pyruvate DH est inhibée par l'acétyl-CoA de façon  
- compétitive vis-à-vis du coenzyme A  
- non compétitive vis-à-vis du pyruvate.

2.3.1.1. Comparer, en les discutant, les valeurs des  $K_m$  données.

2.3.1.2. Donner l'allure des courbes des inhibitions observées (représentation linéaire au choix). Préciser les caractéristiques de chaque type d'inhibition.

2.3.2. En anaérobiose

*S. cerevisiae* produit de l'éthanol.

2.3.2.1. Ecrire les équations des réactions conduisant à l'éthanol.

2.3.2.2. Souligner les intérêts de ce métabolisme :

- pour la levure,
- pour le viticulteur.

2.3.3. Effet PASTEUR

Chez la levure, la fermentation alcoolique est ralentie en présence d'oxygène : c'est l'effet PASTEUR.

Expliquer ce phénomène en présentant un bilan énergétique du catabolisme du glucose en présence et en absence d'oxygène.

### 3 - Les performances des levures dans la production de biomasse (30 points)

Du fait de leur richesse en protéines et vitamines B, les levures sont utilisées pour couvrir les besoins dans l'alimentation animale, voire humaine.

3.1. Critères de choix des microorganismes (7 points)

Préciser les critères utilisés pour choisir un micro-organisme producteur de protéines. Indiquer si les levures correspondent à un bon choix par rapport aux autres micro-organismes.

3.2. Substrats de fermentation (3 points)

Donner des exemples de substrats utilisés préférentiellement en fermentation pour que cette production soit économiquement intéressante.

3.3. Procédé de fermentation (8 points)

Ce sont les systèmes de cultures continues en fermenteur type "gas-lift" ("gasosiphon") ou en fermenteur à boucle ("deep-jet") qui sont essentiellement retenus. On choisit un taux de dilution voisin de la vitesse spécifique de croissance maximum (mais légèrement inférieur).

- Définir le taux de dilution d'une culture continue, et exprimer sa relation avec la vitesse d'accroissement de la biomasse.

- En déduire, en justifiant la réponse, le principe de culture continue sur lequel s'appuie le procédé,

- Schématiser le principe de fonctionnement de chacun des deux types de fermenteurs mentionnés.

3.4. Suivi de production (4 points)

Exposer une méthode permettant de mesurer la biomasse en cours de fermentation. Quels sont les paramètres utiles à la description de la cinétique de production ?

3.5. Intérêt économique des productions microbiennes (8 points)

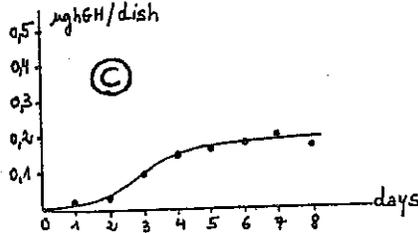
3.5.1. Les "P.O.U" correspondent à des productions lourdes à faible valeur ajoutée.

Donner la signification de "P.O.U.", et définir les expressions "production lourde", "valeur ajoutée".

3.5.2. Donner un exemple de production à forte valeur ajoutée. Justifier la différence entre ces deux types de production.

3.5.3. La production de biomasse n'a pas toujours comme finalité la production de protéines. Citer une autre perspective de production.

Document 2  
(suite)



Rate of growth of VEH 1 cells and accumulation of hGH in the culture medium and in the cells.  $2 \times 10^7$  cells were seeded in 6-cm dishes and were cultured with 5 ml of modified HAT medium (Mulligan and Berg, 1981) containing 5% dialysed foetal calf serum. After different periods of time, the number of cells was determined (A) and the amount of hGH in the medium estimated (B). A separate culture was used to determine the amount of intracellular hGH (C).

## DEUXIEME PARTIE: PRODUCTION DE L'HORMONE DE CROISSANCE PAR DES CELLULES BACTERIENNES (61 points)

### 1. Production par une souche de *Bacillus subtilis* transformée (32 points)

Grâce à la technique de l'ADN recombinant, on a pu faire sécréter l'hormone de croissance par *B. subtilis*.

#### 1.1. Sélection de la souche productrice

La souche utilisée, appelée souche MT400, est un mutant présentant une double déficience en protéase alcaline et neutre ( $apr^- npr^-$ ). Montrer l'importance de ce choix.

#### 1.2. Optimisation des performances

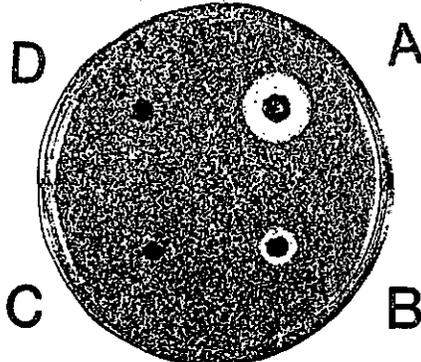
Des chercheurs ont tenté d'améliorer génétiquement le *Bacillus* MT 400 avant de lui faire produire l'hormone de croissance.

Dans ce but, ils ont introduit dans la souche MT 400 un gène provenant d'une autre espèce de *Bacillus*, le gène Sac Q. Ils ont obtenu deux souches nouvelles :

- la souche MT400 (p NP 181) dans laquelle le gène supplémentaire est porté par un plasmide,
- la souche MT430 dans laquelle le gène est inséré dans le chromosome bactérien.

L'efficacité des différentes souches est comparée par l'étude de leur activité caséinolytique (doc. 3).

DOCUMENT 3



Halo formation on a casein plate. A, 207-21( $apr^+ npr^+$ ) which is a parent strain of MT400; B, MT400; C, MT400(pNP181); D, MT430. These strains were inoculated onto a casein plate and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 60 h.

- 1.2.1. Présenter le principe et le mode opératoire de la méthode proposée dans le document 3.
- 1.2.2. Comparer les résultats obtenus. Quelle(s) souche(s) peut-on choisir en vue de la production de l'hormone de croissance ?

1.3. Etude de la production de l'hormone de croissance

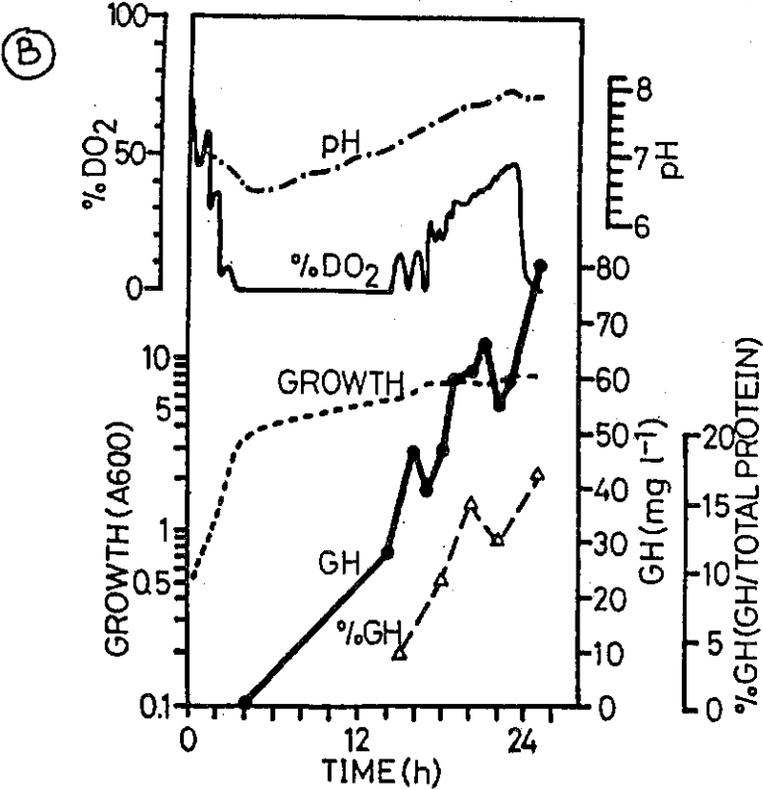
L'optimisation des performances de la bactérie réceptrice étant réalisée, le vecteur d'expression portant le "gène" de l'hormone de croissance (plasmide ph GH 427) est introduit dans les bactéries par transformation de protoplastes.

- 1.3.1. Quel est le mode d'obtention du "gène" de l'hGH à intégrer dans le vecteur d'expression ?
- 1.3.2. A l'aide du calcul de la productivité spécifique (exprimée en  $\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1} \text{UA}^{-1}$ ), déterminer quelle est la souche la plus performante pour la production de l'hormone de croissance (doc. 4A)

(A) Secretion of hGH

DOCUMENT 4

The plasmid phGH427 was introduced into *B. subtilis* MT430 and MT400 by protoplast transformation. Both transformants were cultured for 15 h at 30°C and the accumulated hGH in each medium was measured. The strain MT430 harboring phGH427 secreted  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  hGH whereas MT400(phGH427) secreted  $11 \text{ mg.l}^{-1}$ . As for growth, the cell density was the same in both cultures (A600, 8,5). Since this indicated that the hGH productivity in MT430(phGH427) was improved 4.5-fold, We examined the feature of hGH secretion from the transformant using a 7-l reactor.



Secretion of hGH from MT430(phGH427) using a 7-l bioreactor. Cells were grown in 4000 ml of medium at 30°C. An aliquot of the culture was withdrawn at indicated times and cells were removed by centrifugation. The obtained culture supernatant was used for assays of hGH and total extracellular protein.

1.3.3. La production de l'hGH est réalisée, au laboratoire, dans un fermenteur de 7 litres.

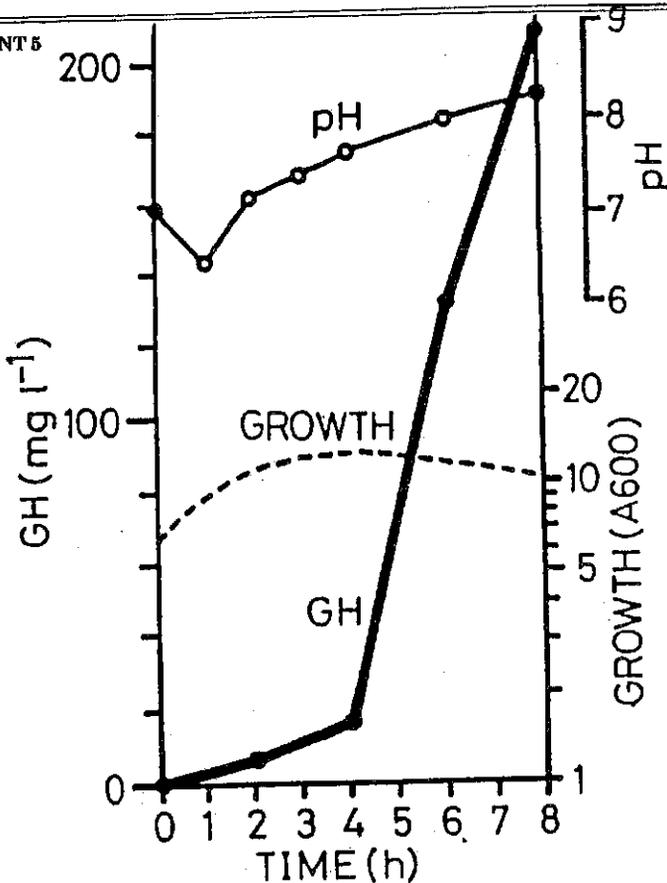
1.3.3.1. Le document 4B montre l'évolution de différents paramètres :

- Analyser les courbes de croissance et de production d'hormone de croissance.
- Déterminer les paramètres d'état de la croissance et de la production.
- Commenter l'allure des courbes de pH et d'oxygène dissous (% DO<sub>2</sub>).

1.3.3.2. A partir de l'analyse des courbes des documents 4B et 5, déduire un moyen d'améliorer la productivité en hormone de croissance.

1.3.4. Afin de déterminer si l'hormone produite par génie génétique est bien strictement identique à l'hormone hypophysaire, le surnageant de culture est soumis à une double immunodiffusion selon le modèle figurant dans le document 6.

Quels résultats peut-on prévoir pour A, B et C, si l'hormone est bien conforme ? Représenter ces résultats sous forme schématique et les justifier.



Secretion of hGH by medium exchange method. The strain MT430 (phGH427) was cultured at 30°C in 150 ml of medium. After 18 h, cells were harvested and transferred into the same volume of fresh medium. The cultivation was then continued under the same conditions as first culture.

**DOCUMENT 6**

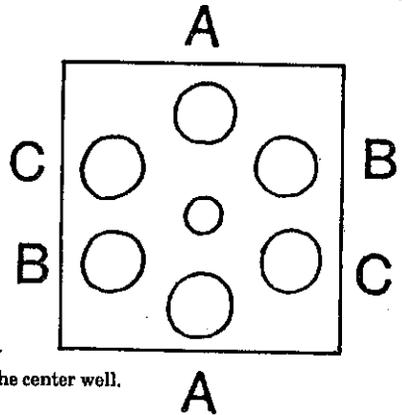
Double immunodiffusion test of hGH.

(A) pituitary derivated hGH ;

(B) culture supernatant of *B.subtilis* MT430 ;

(C) culture supernatant of *B. subtilis* MT430 (phGH427).

Antiserum against human pituitary GH was applied in the center well.



**2. Production par une souche d'*Escherichia coli* transformée** (29 points)

Comme pour *Bacillus subtilis*, des techniques du génie génétique ont permis de transformer une souche d'*Escherichia coli* K12 en une souche productrice d'hormone de croissance : *E. coli* K12 RV308.

**2.1. Obtention de l'hormone**

L'hormone produite par les bactéries transformées s'accumule dans l'espace périplasmique bactérien. Pour obtenir l'expulsion de l'hormone dans le milieu extérieur, on utilise la technique du choc osmotique en plongeant successivement les bactéries dans une solution hypertonique puis dans une solution hypotonique.

- A l'aide du document 7A, montrer quel peut être l'intérêt de procéder ainsi plutôt que d'effectuer une lyse des cellules bactériennes ?

**2.2. Purification de l'hormone**

L'extrait obtenu par choc osmotique, doit subir plusieurs étapes de purification.

La purification a pour but d'obtenir une hormone très pure et de structure identique à celle de l'hormone naturelle en éliminant les contaminants liés à la bactérie productrice.

2.2.1. A partir du document 7A, retrouver les différentes étapes de la purification. Montrer l'efficacité de cette purification d'hGH.

2.2.2. Quelle est la signification du sigle SDS et quel est le rôle du SDS dans ce type d'électrophorèse ?

2.2.3. Quels types de chromatographie réalise-t-on avec le Q-sépharose\* Fast Flow et avec le Séphaeryl S-200 ?

(\*Q comme quaternary)

2.2.4. Expliquer pourquoi le Séphaeryl S-200 est utilisé ici plutôt que le Séphaeryl s-400. (documents 7A et 7B).

**2.3. Vérification de la conformité structurale de l'hormone sécrétée** : par étude comparative des "cartes tryptiques" (document 8).

2.3.1. Quel est le mode d'action de la trypsine ?

2.3.2. Combien obtient-on de fragments après hydrolyse tryptique ?

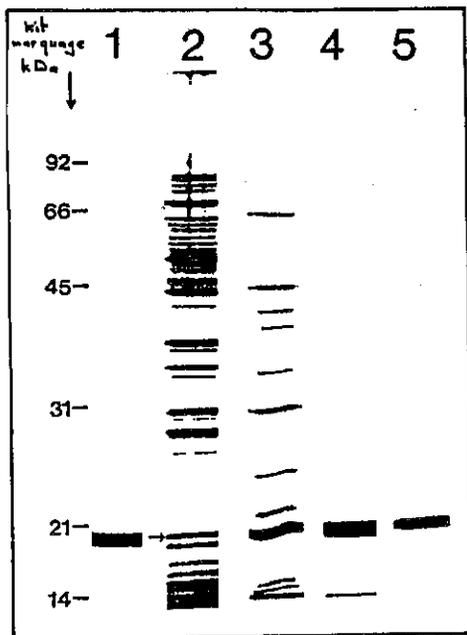
2.3.3. La chromatographie HPLC réalisée sur colonne Aquapore RP-300 est dite de phase réverse. Donner la signification de l'expression "phase réverse".

2.3.4. Que peut-on conclure d'une comparaison rapide ? Justifier brièvement.

(A)

**Analysis of hGH purified fractions**

**DOCUMENT 7**



Analysis of hGH purification by SDS-PAGE. The purity of hGH after each purification step was assessed on a non-reducing SDS-polyacrylamide gel. The gel was 12% acrylamide and was run at 20 W constant power. Following electrophoresis the gel was stained with Coomassie blue R-250. Lanes: ① hGH standard; ② hGH total cell lysate; ③ hGH periplasmic fraction (13  $\mu$ g); ④ Q Sepharose Fast Flow pool (60  $\mu$ g); ⑤ Sephacryl S-200 pool (25  $\mu$ g).

The total cell lysates were prepared by centrifuging an aliquot of the cell culture and adding SDS sample buffer to the cell pellet. An amount equivalent to approx. 0.05  $A_{600}$  was loaded into each of lanes 3

Molecular mass markers are indicated and the arrow points to hGH in the total cell lysate.

**Table**

Purification of hGH from the periplasmic fraction of *E. coli* RV308/ hGH

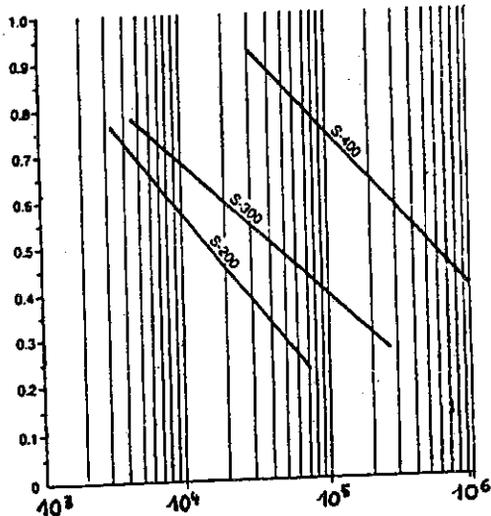
Step	Protein (mg)	hGH (mg)	Specific activity (%)	Purification (-fold)	Yield (%)
Total cell lysate	ND	ND	6*	1	-
Periplasmic fraction	93.4	28.4	30.4	5	100
Q Sepharose Fast Flow	24.6	22.3	90.6	15	78
Sephacryl S-200	ND	20.2	> 90*	> 15	71

Human growth hormone was purified from the periplasmic fraction derived from 1.0 l of culture grown to a cell density of  $A_{600} = 1.6$ . ND, not determined.

\*The specific activities of the total cell lysate and of the Sephacryl S-200 pool were estimated by densitometric scanning of an SDS-polyacrylamide gel

**K<sub>av</sub>**

**Globular proteins**

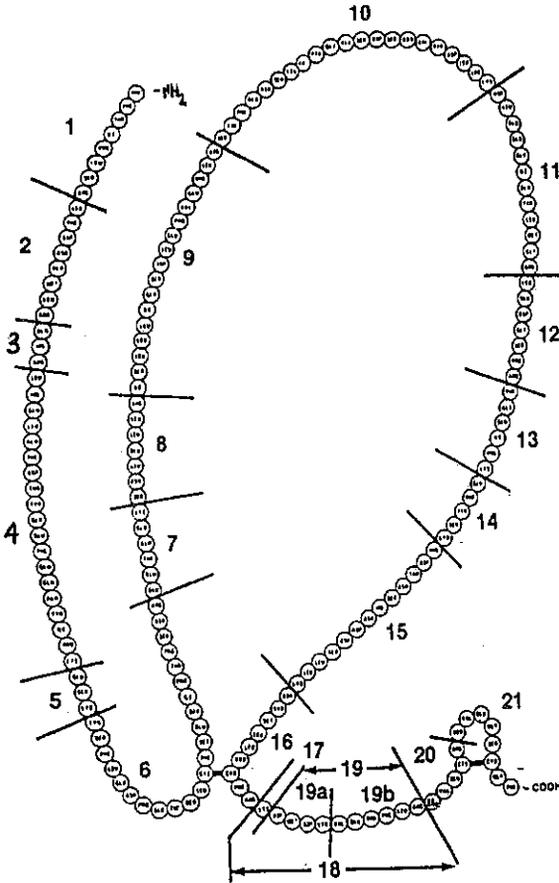


(B)

**Selectivity curves.**

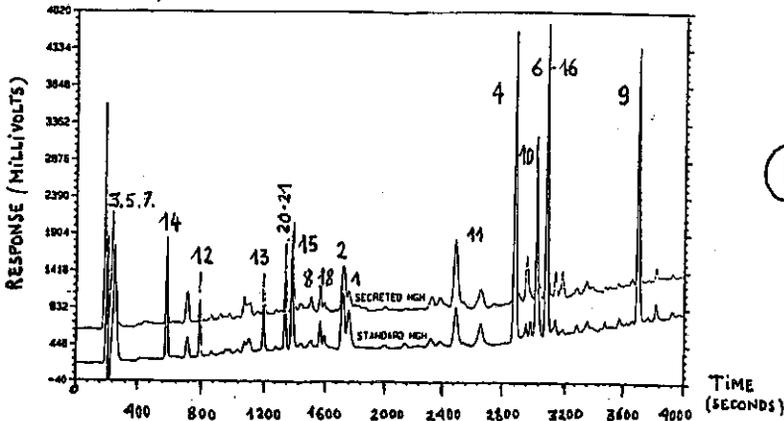
**Globular proteins in aqueous buffer.**

A



Tryptic maps comparing secreted hGH with hGH standard.

The tryptic peptides were separated by reversed-phase HPLC on an Aquapore RP-300 column (0.45x25 cm, Brownlee Labs) using a gradient generated from two solvents: a, 0.1% trifluoroacetic acid in water; and b, 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile. The gradient was 0-20% b in 20 min, 20-25% b in 20 min, and 25-50% b in 25 min. The flow rate was 1.0 ml/min. A 100  $\mu$ l aliquot of each digest was injected onto the column and the elution of the peptides was monitored spectrophotometrically at 220 nm. Panel A shows the hGH primary structure and the tryptic peptides derived from this sequence. Panel B shows the tryptic map of secreted hGH superimposed on the tryptic map of standard hGH. The numbers correspond to the numbered peptides shown in panel A.



2.4. Production industrielle de l'hormone :

Actuellement, en France, seule la production par une souche d'*Escherichia coli* transformée est exploitée industriellement, en fermenteurs de 500 litres.

Au cours des différentes étapes de la production, des contrôles sont réalisés.

- Citer trois exemples de tels contrôles.

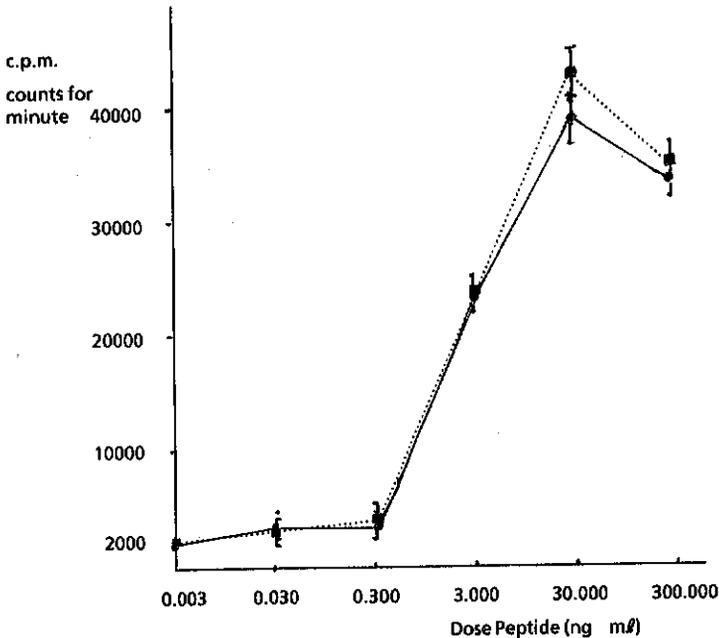
**TROISIEME PARTIE: TEST BIOLOGIQUE DE CONTROLE DE L'EFFICACITE DE L'HORMONE DE CROISSANCE RECOMBINEE (rhGH) (6 points)**

On procède à une étude comparée de l'incorporation de thymidine tritiée par une lignée de cellules lymphomateuses de rat Nb2, en fonction de la teneur du milieu en rhGH et en hGH. Les résultats sont présentés par le document 9.

1. Justifier l'utilisation de la thymidine tritiée.
2. Que penser de l'efficacité de la rhGH ?
3. Quelle est la concentration optimale de la rhGH dans ce type de test biologique ?

**DOCUMENT 9**

The rhGH form was tested on Nb2 cells, a rat lymphoma cell line that responds to human growth hormone with an increased rate of proliferation.



Dose dependent stimulation of Nb2 cells. The cells were incubated in the presence of indicated concentrations of rhGH (—●—), hGH (---●---) (from TANAKA).

rhGH : hormone de croissance humaine recombinée.

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**B : réalisation pratique d'opérations de génie biologique**  
**Durée : 8 heures coefficient 8**

**Documents personnels non autorisés**  
**Quelques opérations de génie biologique**

**Premier jour : (durée : 6 h 30)**

Le sujet comporte 3 parties indépendantes qui peuvent être réalisées dans un ordre différent de celui de leur présentation.

**1ère partie :** Titrage de la lactoferrine par électro-immunodiffusion

**2ème partie :** Etude de la croissance d'une souche de *E. coli*

**3ème partie :** Etude d'une enzyme soluble et immobilisée.

Les candidats sont invités après lecture du sujet et avant toute manipulation, à élaborer une organisation chronologique du travail demandé.

Ils tiendront compte des temps d'attente des différentes opérations et des indications données en début de séance.

**PREMIERE PARTIE : TITRAGE DE LA LACTOFERRINE**

La lactoferrine est une protéine présente dans le lait. Son dosage est réalisé ici par électro-immunodiffusion (technique de Laurell).

**1. Préparation des lames :** préparer deux lames selon le protocole suivant :

- ajouter, à l'aide d'une pipette chaude, 0,12 ml de sérum anti-lactoferrine (préchauffé à 56°C) dans 3,5 ml de solution tamponnée d'agarose à 1% dans le tampon Véronal maintenue au bain thermostaté à 56°C.
- mélanger
- placer une lame de verre préalablement glacée et séchée (fournie) sur une surface parfaitement horizontale et verser le contenu du mélange agarose-immunsérum sur cette lame, en le répartissant bien.
- laisser solidifier le gel puis placer les lames à 4°C pendant 1/2 heure (ou plus). (remarque : ne pas omettre de repérer les lames de façon indélébile).
- creuser sur chaque lame 3 réservoirs de 2,5 mm de diamètre. Les réservoirs sont placés à 1,5 cm d'une extrémité de la lame et la distance entre le réservoir central et les réservoirs latéraux est de 7 mm.

**2. Dilution des solutions de lactoferrine**

On dispose d'une solution de lactoferrine de référence à 4 g/l et d'une solution inconnue :

- préparer, à partir de la solution de référence, des dilutions 1/5, 1/7,5, 1/10 et 1/15 dans le tampon véronal.
- diluer la solution inconnue au 1/8.

**3. Dépôts et migration :**

- placer les lames sur les supports de cuve et déposer judicieusement les échantillons dilués à raison de 7 µl par réservoir.  
(remarque : il est primordial de commencer la migration le plus rapidement possible après le dépôt des échantillons).
- laisser migrer sous une tension de 35 à 40 volts/lame pendant au moins 2 heures.  
(remarque : la migration pourra se prolonger après la fin de l'épreuve).
- Indiquer aux examinateurs le temps de migration déjà écoulé. Ceux-ci se chargeront de retirer les lames et de les garder en chambre humide.

## DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE LA CROISSANCE D'UNE SOUCHE D' E. COLI

Vérification de la corrélation entre l'absorbance ( $A_{600}$ ) et le nombre de bactéries (N) dans un milieu.

### 2.1. Suivi de la croissance et détermination du taux de croissance.

- Ensemencer l'Erlenmeyer contenant déjà 90 ml de milieu, avec 10 ml de préculture de la souche fournie.
- Homogénéiser soigneusement et placer au bain-marie agité à 37°C.
- Suivre la croissance par mesure de l'absorbance à 600 nm toutes les 20 minutes.

Effectuer un nombre suffisant de mesures pour déterminer le taux de croissance.

**Remarque :** fournir les mesures au fur et à mesure aux examinateurs.

- à partir de l'équation de croissance, calculer les paramètres cinétiques de la souche et donner brièvement leurs définitions et unités,
- donner le tableau des valeurs expérimentales,
- tracer les graphes  $A_{600} = f(t)$  et  $\ln A_{600} = f(t)$
- calculer les paramètres cinétiques de la souche en justifiant brièvement le choix des points expérimentaux utilisés pour ces calculs.

### 2.2. Vérification de la corrélation $A_{600}/N$ par numération en milieu solide.

- Au cours du suivi de croissance de la souche, prévoir un prélèvement pour réaliser des dilutions en vue d'une numération en milieu solide. Sachant qu'à une absorbance de 1 à 600 nm correspond environ  $2,5 \cdot 10^8$  UFC/ml, réaliser les dilutions nécessaires pour effectuer le dénombrement. Ensemencer, en double, 3 dilutions dans la masse.
- Donner l'absorbance du prélèvement avant dilution et indiquer l'heure de prélèvement,
- Justifier les dilutions réalisées et ensemencées et donner l'ordre de grandeur des numérations attendues sur les boîtes.

## TROISIEME PARTIE : ETUDE D'UNE ENZYME SOLUBLE ET IMMOBILISEE

La  $\beta$ -fructosidase de levure E.C.3.2.1.26. (ou invertase ou saccharase) catalyse l'hydrolyse du saccharose en un mélange équimolaire de fructose et de glucose appelé souvent sucre inverti.

Une unité de  $\beta$ -fructosidase est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'une micromole de saccharose par minute à 30°C et à pH = 4,7.

La détermination de l'activité fait appel au dosage du sucre inverti formé par la méthode absorptiométrique utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (3,5 - DNS).

Les opérations à réaliser sont les suivantes :

1. Réalisation d'une gamme d'étalonnage pour le dosage du sucre inverti.
2. Détermination de l'activité enzymatique de la préparation de  $\beta$ -fructosidase fournie.
3. Immobilisation de l'enzyme en billes d'alginate et détermination de l'activité enzymatique de la préparation obtenue.

### 3.1. Gamme d'étalonnage

Le 3,5 DNS (acide hydroxy- 3,5 - dinitrobenzoïque ou acide 3,5 - dinitrosalicylique) forme quantitativement avec les sucres réducteurs un dérivé rouge orangé (l'acide 2-hydroxy, 3-amino, 5-nitrobenzoïque) dont on mesure l'absorbance à 530 nm.

#### 3.1.1. Réactifs

- Tampon acéto-acétique (éthanoïque/éthanoate) pH = 4,7
- Solution étalon de sucre inverti à 5,0 mmol.ℓ<sup>-1</sup> (Glucose 5 mmol.ℓ<sup>-1</sup> et Fructose 5 mmol.ℓ<sup>-1</sup>)
- Solution de saccharose à 0,5 mol.ℓ<sup>-1</sup>
- Réactif au 3,5 - DNS

### 3.1.2. Mode opératoire

Réaliser en tubes à essais la gamme suivante :

mℓ de solution étalon de sucre inverti	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
mℓ d'eau déminéralisée	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
mℓ de saccharose *	<-----1----->					
mℓ de tampon pH 4,7	<-----1----->					
mℓ de réactif ou 3,5 - DNS (en burette ou distributeur)	<-----2----->					

\*Remarque : l'addition de saccharose permet d'obtenir un tracé de courbe d'étalonnage passant par le zéro.

Boucher les tubes avec du papier d'aluminium et les placer au bain-marie bouillant à gros bouillons pendant 5 minutes exactement. Puis, refroidir dans l'eau glacée et ajouter 15 mℓ d'eau distillée. Agiter, attendre environ 15 minutes.

Lire l'absorbance à 530 nm contre le témoin.

### 3.2. Mesure de l'activité de la $\beta$ -fructosidase soluble

#### 3.2.1. Réactifs

- Tampon acéto-acétique (éthanoïque/éthanoate) pH = 4,7
- Solution d'enzyme à 0,25 mg.mℓ<sup>-1</sup>
- Solution de saccharose à 0,5 mol.ℓ<sup>-1</sup>
- Réactif au 3,5 - DNS

#### 3.2.2. Mode opératoire

Préparer 10 mℓ de dilution au 1/20ème en tampon pH 4,7 de la solution d'enzyme fournie. La détermination de l'activité et l'immobilisation seront effectuées avec cette dilution.

Préparer 3 tubes à essais marqués respectivement E<sub>2</sub>, E<sub>7</sub> et T<sub>0</sub>.

Dans ces tubes, introduire :

1,00 mℓ de solution de saccharose à 0,5 mol.ℓ<sup>-1</sup>

1,90 mℓ de tampon pH = 4,7.

Préincuber environ 5 minutes à 30°C.

Déclencher la réaction enzymatique par addition de 100  $\mu$ ℓ de dilution de la solution enzymatique.

Arrêter la réaction enzymatique par addition de 2 mℓ de réactif au 3,5 DNS, après respectivement 2 minutes (E<sub>2</sub>) et 7 minutes (E<sub>7</sub>) d'incubation à 30°C.

Dans le tube T<sub>0</sub>, ajouter le réactif au 3,5 - DNS avant l'enzyme.

Traiter ensuite les tubes comme la gamme d'étalonnage.

### 3.3. Immobilisation de l'enzyme par inclusion

La méthode d'immobilisation utilisée consiste à emprisonner l'enzyme dans le réseau d'un gel d'alginate. Un mélange de solution enzymatique et d'alginate de sodium est dispersé goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium : en présence de calcium, l'alginate se gélifie sous forme de billes.

La détermination de l'activité de l'enzyme immobilisée est effectuée dans des conditions identiques à celles du paragraphe 3.2.2.

#### 3.3.1. Réactifs

- Tampon acéto-acétique (éthanoïque /éthanoate) pH = 4,7
- Alginate de sodium à 3% dégazé
- Chlorure de calcium à 150 mmol.ℓ<sup>-1</sup>
- Solution de saccharose à 0,5 mol.ℓ<sup>-1</sup>
- Réactif au 3,5 - DNS

### 3.3.2. Mode opératoire

#### 3.3.2.1. Immobilisation

Dans un flacon à prélèvement, ajouter :

- 0,5 ml de solution d'enzyme diluée au 1/20ème
- 2,5 ml d'alginate de sodium

Mélanger le plus complètement possible avec un agitateur de verre en évitant d'introduire de l'air.

Disperser la totalité du mélange dans environ 50 ml de chlorure de calcium en laissant tomber les gouttes de 10 cm de hauteur avec une pipette graduée de 5 ml.

Laisser séjourner les billes formées pendant 30 minutes dans le chlorure de calcium puis les rincer rapidement à l'eau déminéralisée et les égoutter sur papier filtre.

Compter le nombre de billes obtenues.

#### 3.3.2.2. Réaction enzymatique avec l'enzyme immobilisée.

Préparer 2 tubes à essai (ou petits flacons) marqués respectivement A2 et A7 avec :

- solution tampon pH : 4,7      1 ml
- eau distillée                      1 ml

Préincuber 5 minutes à 30°C.

Ajouter 10 billes dans chaque tube (ou flacon).

Déclencher la réaction en ajoutant le substrat = 1 ml et déclencher IMMEDIATEMENT LE CHRONOMETRE.

Agiter fréquemment ; incuber les essais A2 et A7 respectivement 2 et 7 minutes EXACTEMENT (arrêter la réaction en transvasant les phases liquides respectivement dans 2 tubes à essais, contenant déjà obligatoirement 2 ml de réactif au 3,5-DNS).

Mélanger, porter immédiatement au bain-marie bouillant à gros bouillons pendant 5 minutes exactement.

Refroidir dans l'eau glacée et ajouter 15 ml d'eau distillée.

Laisser reposer environ 15 minutes.

Lire l'absorbance à 530 nm.

### 3.4. Compte-rendu

3.4.1. Présenter sous forme de tableaux les absorbances obtenues pour la gamme et pour les déterminations d'activités.

Tracer la courbe d'étalonnage.

3.4.2. Déterminer le nombre de micromoles de sucre inverti formé par minute dans le milieu réactionnel en présence d'enzyme soluble et en présence d'enzyme immobilisée.

3.4.3. Calculer l'activité enzymatique de la solution d'enzyme fournie en UI.ml<sup>-1</sup>. Calculer l'activité spécifique en UI.mg<sup>-1</sup>.

3.4.4. Calculer :

- l'activité initiale totale de l'enzyme soluble.
- l'activité totale après immobilisation.

En déduire le pourcentage d'activité immobilisée.

## Déuxième jour : (durée : 1 h 30)

1ère partie : Etude de la croissance d'une souche de E. coli (suite)

2ème partie : Dosage de la lactoférine (suite)

**1ère partie : Etude de la croissance d'une souche d'E.coli**

**Vérification de la corrélation  $A_{600}/N$  par numération en milieu solide.**

- Effectuer les comptages sur les boîtes.
  - Laisser les boîtes sur la pailasse en fin d'épreuve.
- 2.1. Présenter le tableau des résultats des numérations.
  - 2.2. Calculer la corrélation trouvée entre  $A_{600}$  et la population viable.
  - 2.3. Comparer avec la corrélation donnée le premier jour.

**2ème partie : Titrage de la lactoferrine (Electro-Immunodiffusion) : résultats - conclusions**

- 3.1. Mesurer la hauteur des pics obtenus.

(Remarque : la solution de lactoferrine n'ayant pas été purifiée, il est possible que certains précipités contiennent plusieurs pics emboîtés. On ne tiendra compte, dans ce cas, que du pic le plus haut).

- 3.2. Tracer la courbe des hauteurs en fonction des concentrations en lactoferrine.
- 3.3. Déterminer la concentration en lactoferrine de la solution inconnue.



# Epreuves de la session 1994

## Epreuve de Français Durée 4 heures Coefficient 2

### SYNTHESE DE DOCUMENTS

Vous ferez une synthèse objective, concise et ordonnée de ces documents relatifs à l'idée de défense nationale puis dans une brève conclusion vous exprimerez vos réflexions personnelles sur la question.

#### DOCUMENTS

- 1) P. GARRIGUE : extrait d'une conférence, 16.2.1988
- 2) Victor HUGO : "Ô soldats de l'An Deux !" Les Châtiments, 1853
- 3) G. de PUYPEGE : Le fanatisme, histoire et psychanalyse, p.p. 172-174, Stock 1980
- 4) H. HAENEL, R. PICHON, La Défense nationale, p.p. 121-123, P.U.F. 1989
- 5) A. JACQUARD : Abécédaire de l'ambiguïté, Seuil, 1989

### DOCUMENT 1

Pourquoi nous combattons ? La question mérite d'être aussi brutalement posée à nos sociétés de la fin du XXème siècle qu'elle le fut dans la célèbre série de Frank CAPRA à l'Amérique au seuil de la seconde Guerre mondiale. Certes nous ne sommes pas à la veille d'un conflit mais la guerre, sous ses formes les plus insidieuses, est venue sur notre horizon : déstabilisation et désinformation de nos sociétés, conflits "localisés", montée des tensions dont certaines mettent en jeu nos forces de défense, rivalités religieuses, culturelles ou économiques. Faut-il rappeler que nos valeurs, à commencer par celles qui constituent l'armature de nos régimes démocratiques et sont à l'âme de notre vie quotidienne, ne sont pas aussi largement partagées que le laissent entendre les déclarations de principe des Organisations internationales ? Elles sont même le privilège - le mot est lourd de sens - d'une minorité.

On peut donc être tenté de fonder l'esprit de défense sur un simple inventaire des valeurs dont nous avons le sentiment qu'elles nous sont communes. Certaines de ces valeurs - l'indépendance nationale, la paix, la sécurité - sont explicitement liées à la volonté de défense ; d'autres - la démocratie, la liberté, le patrimoine et l'art de vivre - s'apposent que les premières soient assurées dans un monde dangereux. L'énoncé du programme d'Education Civique de la classe de 3ème est ici parfaitement clair : l'indépendance nationale, condition de la démocratie, et l'esprit de défense, garant de la paix.

Ce que l'on a appelé le grand retour, je préfère parler de renouveau, de l'Education Civique, constituait en fait le préalable indispensable à la prise de conscience par les jeunes générations des problèmes touchant la défense. Voici reconstitué le couple éducation civique/esprit de défense dans lequel s'est incarné, nous l'avons vu, le geste d'or de la Troisième République. Mais si nous pouvons légitimement en attendre avec le temps les mêmes effets, devons-nous pour autant vivre ce retour comme une restauration ?

Le système d'éducation civique - on parlait alors, d'instruction civique - de la Troisième République triomphante reposait sur un double consensus : un accord profond sur la conception de la patrie comme le lieu privilégié d'expression de toutes les valeurs universelles, une absence de conflits sur les valeurs inspirant les comportements citoyens. On sait comment les grandes mutations du XXe siècle ont brisé la cohérence et l'unité de ce système.

La patrie ? Faut-il éviter les vicissitudes du patriotisme depuis un demi siècle, rappeler l'évolution profonde de la conscience nationale en face de réalités qui font de notre pays une puissance "moyenne", de sa société une société divisée, traversée de conflits idéologiques et sociaux, de sa culture une culture parmi d'autres et non plus une référence universelle ? Quel civisme quand la nation apparaît à beaucoup comme un espace trop vaste pour y trouver des racines -cf. la recherche de l'identité régionale, la montée des aspirations individuelles - trop étroit pour contenir l'universalité de l'esprit et permettre de résoudre des problèmes désormais mondialisés ? Que reste-t-il quand triomphe la différence de ces similitudes collectives dans lesquelles DURCKHEIM voyait la racine de tout esprit civique ?

Les valeurs ? Dans des sociétés modernes complexes et changeantes les valeurs - ne faudrait-il pas plutôt parler de modes idéologiques ? - s'affrontent ou se succèdent, perdant ainsi de leur crédibilité et de leur force de conviction. En l'absence de consensus sur les valeurs, quels repères, quelles références pour l'éducateur ? Je me permettrai de citer ici une phrase éclairante du document sur Enseignement et valeurs modernes élaboré en 1981 par notre Inspection Générale : "Il est facile d'inviter l'École à remettre à l'honneur les valeurs fondamentales de notre civilisation (nous sommes ici au cœur de notre problème...). Il l'est moins de dresser un inventaire ordonné de ces dernières en des termes qui aient pour tous même sens et même force d'incitation".

Le pessimisme comme la lucidité sont un appel à l'action. Ces quelques réflexions peuvent paraître moroses, voire décourageantes, même si de plus ou moins récents sondages viennent les corroborer. Si j'en fais ici état c'est parce qu'elles amorcent l'essentiel de mon propos : en premier lieu dans une société moderne les choses bougent et elles sont, me semble-t-il, précisément en train d'évoluer ; en second lieu, il ne s'agit pas de reproduire un modèle, quelles qu'aient pu être ses vertus, mais de définir les fondements d'un esprit de défense adaptés à l'état de notre société et à celui du monde.

Les choses sont en train de bouger. Un enseignement civique cohérent et continu apparaît comme un besoin de la société moderne. La société industrielle isole l'individu dans la masse, remet en cause les institutions, affaiblit l'action des structures intermédiaires (la famille, l'école, la justice, l'armée), distend les liens sociaux, privilégie l'intégration professionnelle par rapport à l'intégration sociale. Au delà du consensus c'est le tissu social lui-même qui est atteint dans nos sociétés conflictuelles. Dans un contexte différent l'école retrouve aujourd'hui la mission qui était la sienne à l'âge d'or de la IIIe République : créer, pour reprendre l'expression de DURCKHEIM, les similitudes essentielles que réclame toute vie collective, enseigner en formant l'esprit de chacun les solidarités sans lesquelles nos sociétés se désunissent et s'atomisent. Tandis qu'apparaissent ces nouveaux besoins se manifestent de nouvelles aspirations. N'assiste-t-on pas aujourd'hui à un regain, notamment dans la jeunesse, des valeurs de la vie collective ? Les signes en sont divers et concordants : développement du mouvement associatif, du sentiment de solidarité à l'égard du Tiers Monde comme des pauvres dans nos sociétés industrialisées, recherche à travers le patrimoine et la mémoire collective de racines communes, regain enfin des valeurs religieuses et du sentiment national. Il est significatif que le renouveau de l'éducation civique dans notre enseignement ait coïncidé avec celui de l'histoire et notamment de l'histoire nationale.

A quelles conditions l'esprit de défense pourra-t-il s'inscrire dans ce paysage ?

Une première évidence s'impose. Une volonté de défense est indissociable du concept d'indépendance nationale et donc de celui de nation. Ce n'est pas un hasard si le thème de l'identité nationale est devenu un problème majeur de la société française. Qu'est-ce qu'une nation et quelle est sa place dans le monde d'aujourd'hui ? A cette question fondamentale historiens, géographes, sociologues, ethnologues s'efforcent d'apporter une réponse scientifique et rationnelle. Les plus grands historiens français rivalisent désormais sur ce champ d'investigation privilégié qu'est devenue la réalité nationale : BRAUDEL, GOUBERT, DUBY, LEROY-LADURIE, AGULHON, FAVIER... Que des fervents de l'histoire des civilisations se passionnent pour la construction politique de l'Etat français, que des spécialistes des grands espaces maritimes et de l'économie mondiale explorent l'identité de la France est à la fois le signe d'une inquiétude intellectuelle et d'un regain d'intérêt et d'attachement de tous pour le passé national. Je me bornerai à citer cette phrase de Fernand BRAUDEL dans L'identité de la France : "Qu'il soit entendu que pour aucune nation le dialogue obligatoire et de plus en plus pesant avec le monde n'entraîne une expropriation, un effacement de sa propre histoire".

Quelle image de la nation se dégage d'une recherche dont l'ampleur n'a d'égale que celles des grandes oeuvres historiques du XIXe siècle ?

En premier lieu la notion d'un espace privilégié dans lequel se projettent le passé revêtu par une mémoire collective et le futur d'une meilleure organisation des rapports entre les hommes comme avec leur environnement proche. Entre la région, lieu de notre enracinement familial, et l'espace mondial, théâtre des échanges et des stratégies, s'affirme à nouveau la nation comme le lieu des solidarités forgées par l'histoire. "C'est le souvenir de la communauté des joies et des deuils qui donne la conscience d'appartenir à un peuple solidaire". Sans la requête de

cette mémoire collective qu'évoque ici Ernest RENAN il n'est pas de civisme, ni ancien ni moderne. Telle est la première mission du professeur d'histoire. "Je crois que l'enseignement de l'histoire a pour objet essentiel d'éveiller la mémoire collective dans les mémoires individuelles, de susciter une certaine solidarité des consciences dans le présent par l'évocation du passé commun". Cette affirmation d'Anatole de MONZIE dans Pétition pour l'histoire mérite sans doute d'être discutée : d'une part l'enseignement de l'histoire a d'autres finalités, notamment intellectuelles, d'autre part nos sociétés pluralistes intègrent des collectivités qui ne sauraient se réclamer de ce passé commun. N'en a-t-il pas toujours été ainsi au cours de notre histoire qui a été celle du rassemblement des terres qui constituent aujourd'hui l'espace français ? Il n'en reste pas moins que l'appartenance à la collectivité nationale suppose l'acceptation et la reconnaissance de ce passé et des valeurs dont il est porteur. L'indifférence à l'égard des valeurs de notre civilisation résulte moins d'un choix conscient que de l'ignorance.

Conférence de M. P. GARRIGUE,  
Doyen de l'inspection générale d'Histoire-Géographie,  
le 16.2.1988, à l'Institut des Hautes Etudes de la Défense Nationale.

"L'an II", selon le calendrier révolutionnaire, correspond à l'année 1794 : la France de la Révolution affronte une coalition de diverses puissances européennes.

#### DOCUMENT

#### 1 O SOLDATS DE L'AN DEUX !

- O soldats de l'an deux ! Ô guerres ! épopées !  
Contre les rois tirant ensemble leurs épées,  
Prussiens, autrichiens,
- 5 Contre toutes les Tyr (1) et toutes les Sodomes (1)  
Contre le czar du Nord, contre ce chasseur d'hommes,  
Suivi de tous ses chiens,
- Contre toute l'Europe avec ses capitaines,  
Avec ses fantassins couvrant au loin les plaines,  
10 Avec ses cavaliers,
- Tout entière debout comme une hydre (2) vivante,  
Ils chantaient, ils allaient, l'âme sans épouvante  
Et les pieds sans souliers !
- 15 Au levant, au couchant, partout, au sud, au pôle,  
Avec de vieux fusils sonnans sur leur épaule,  
Passant torrents et monts,  
Sans repos, sans sommeil, coudes percés, sans vivres,  
Ils allaient, fiers, joyeux, et soufflant dans des cuivres,  
Ainsi que des démons !
- 20 La liberté sublime emplissait leurs pensées.  
Flottes prises d'assaut, frontières effacées  
Sous leur pas souverain,  
O France, tous les jours c'était quelque prodige,  
Chocs, rencontres, combats ; et Joubert sur l'Adige,
- 25 Et Marceau sur le Rhin !
- On battait l'avant-garde, on culbutait le centre ;  
Dans la pluie et la neige et de l'eau jusqu'au ventre  
On allait ! en avant !  
Et l'un offrait la paix et l'autre ouvrait ses portes,
- 30 Et les trônes, roulant comme des feuilles mortes,  
Se dispersaient au vent !
- Oh ! que vous étiez grands au milieu des mêlées,  
Soldats ! L'oeil plein d'éclairs, faces échevelées  
Dans le noir tourbillon,
- 35 Ils rayonnaient, debout, ardents, dressant la tête ;  
Et comme les lions aspirent la tempête  
Quand souffle l'aiglon,

- 40 Eux, dans l'emporment de leurs luttes épiques,  
Ivres, ils savouraient tous les bruits héroïques,  
Le fer heurtant le fer,  
La Marseillaise ailée et volant dans les balles,  
Les tambours, les obus, les bombes, les cymbales,  
Et ton rire, ô Kléber !
- 45 La révolution leur criait : - Volontaires,  
Mourez pour délivrer tous les peuples vos frères ! -  
Contents, ils disaient oui.  
- Allez, mes vieux soldats, mes généraux imberbes ! -  
Et l'on voyait marcher ces va-nu-pieds superbes  
Sur le monde ébloui !
- 50 La tristesse et la peur leur étaient inconnues,  
Ils eussent, sans nul doute, escaladé les nues,  
Si ces audacieux,  
En retournant les yeux dans leur course olympique  
Avaient vu derrière eux la grande République
- 55 Montrant du doigt les cieux.

Victor HUGO, Les Châtiments, 1853

(1) Ces deux villes antiques représentent la richesse et la corruption, en face de la pauvreté et de l'austérité républicaines.

(2) Le monstre de Lerne à plusieurs têtes, détruit par Hercule.

### DOCUMENT 3

Brave parmi les braves, obscur parmi les obscurs, le soldat Chauvin allait donner son nom au fanatisme nationaliste.

On ne trouvera peut-être jamais avec précision pourquoi Chauvin est devenu le synonyme d'un état d'esprit à tel point que l'homme disparut pour devenir un adjectif. La transformation s'explique par le besoin d'un symbole nouveau dans la mentalité de l'époque. Et cette attente, qui transformera Chauvin en chauvin, importe plus que la biographie du personnage.

Né à Rochefort, Nicolas Chauvin, héros des champs de bataille de la République et de l'Empire, reçut dix-sept blessures - toutes, comme il se doit, par-devant. Défiguré, amputé de plusieurs doigts, remercié de ses sacrifices par l'octroi d'un sabre d'honneur et d'une pension, il se serait fait remarquer - même de ses compagnons d'armes ! - par son exaltation patriotique maladive et sa "naïveté". Renvoyé à la vie civile en 1815, sa passion sans bornes pour tout ce qui touchait à Napoléon devait, grâce à une propagande habile, faire de lui un symbole. Immortalisé par les gravures satiriques de Charlet, il est l'archétype de cette figure héritée de l'imagerie antique et qui allait faire fureur dans les années 1820-1830 : le soldat-laboureur.

Encadré dans les salons bourgeois, piqué au mur sous forme d'image d'Epinal chez les humbles, porté à la scène par Dumersan et Francis en 1821, puis par Scribe et bien d'autres, il entraîne la vénération au foyer, l'enthousiasme et les crises de larmes au théâtre et jusque dans les cirques. Selon la formule d'Alexandre Dumas, la France chauvine peut ainsi "venger Leipzig et Waterloo sur le champ de bataille du Gymnase et des Variétés (1)", en vibrant au récit des exploits de ce guerrier pacifique et décoré qui exalte ses combats et ses blessures dans une atmosphère d'idylle. On se sent transporté quand le héros de Dumersan et Francis récite avec ferveur :

*Les champs qui nourrissent ma mère  
Je dois savoir, en bon Français  
Les défendre pendant la guerre  
Les labourer en temps de paix.*

Par une piquante antonomase (2), Chauvin devient donc un qualificatif dont on se targue : "Je suis français, je suis chauvin !" s'écrie un personnage d'un vaudeville de Cogniard écrit en 1831, époque où le mot est devenu à la mode au point qu'on le raille. Les frères Théodore et Hippolyte Cogniard, vaudevillistes pléthoriques, obtinrent un triomphe aux Folies-Dramatiques en 1831 avec leur pièce *La Cocarde tricolore, épisode de la guerre d'Alger*, dans laquelle figure un conscrit nommé Chauvin, auquel la réplique est donnée par le vétéran la Cocarde et la vivandière Catin. D'une platitude et d'une ineptie rares, ce vaudeville transporta les foules – le livret eut plusieurs éditions – et fut surtout rendu célèbre par le couplet de Chauvin, tombé malade pour avoir mangé du chameau :

*J'ai mangé du chameau  
J'ai l'ventr' comme un tonneau  
J'verrai pus mon hameau,  
ça m'brûl' dans chaqu' boyau.*

L'expression *chauvinisme* apparaît dans *Les Guêpes* de Bayard et Dumaïnoir en 1840 et, en 1841, Bayard écrit un vaudeville en un acte, *Les Aides de camp*, qui ridiculise ce fanatisme. Enfin, le Dictionnaire de l'Académie française reçut le terme en 1878. Fanatisme napoléonien, puis passion nationaliste belliqueuse, le chauvinisme était appelé à une longue carrière linguistique, utilisé en Allemagne, puis dans les pays anglo-saxons pour désigner un parti pris de clocher aussi excessif que belliqueux – jusqu'à l'injure féministe contemporaine de *chauviniste mâle* ou *male chauvinist pig*. En fustigeant la "démence patriotique des chauvins", Roger Martin du Gard exprime la spécificité du chauvinisme.

De même que le fanatisme en général apparaît comme le fardeau des religions, de même le chauvinisme qui, selon la formule de Noriac, "fait faire de plus grandes choses que l'amour de la patrie dont il est la charge(3)", est bien celui du nationalisme, sa forme extrême, la plus absurde, la plus dangereuse.

Gérard de PUYMEGE, Le Fanatisme, histoire et psychanalyse

(Stock, 1980)

(1) nom de salles de théâtre parisiennes.

(2) figure de style, par laquelle un nom propre devient un nom commun. Ex. "Don Juan" : un don Juan.

(3) exagération comique

#### DOCUMENT 4

La liberté se conquiert et se préserve ; elle ne constitue pas un don du ciel, mais résulte d'efforts constants et opiniâtres dont le succès même peut masquer la nécessité. Ces efforts ont une ambition commune : la défense du pays. Celle-ci s'inscrit dans un double cadre politique et juridique qui recueille l'adhésion d'une large majorité des citoyens.

La défense du pays est tout d'abord nationale. Elle trouve son origine en même temps que sa justification dans la sauvegarde des intérêts vitaux de la France. Cette défense est celle d'un pays indépendant qui entend rester maître de sa destinée nationale ; elle est également nucléaire. La France ne se connaît pas d'adversaire et ne poursuit aucun dessein hégémonique. Dans un monde dominé par la force militaire des "deux grands" (1), elle entend développer une stratégie de dissuasion du faible au fort. Cette dissuasion, fondée sur le pouvoir égalisateur de l'atome, "vise à éviter la guerre en persuadant un éventuel agresseur qu'une action menée contre la France présenterait au regard des buts politiques qu'il poursuit des risques inacceptables". Il est donc indispensable que même après une première frappe adverse le pays puisse infliger à l'adversaire des dommages supérieurs au potentiel démographique et économique que représente l'hexagone. Pour autant, cette défense ne peut se réduire à sa seule dimension nucléaire car des conflits limités ou périphériques peuvent se produire qui ne mettent pas en péril l'indépendance ou la survie de la Nation. C'est pourquoi l'appareil de défense comprend des forces nucléaires et des forces classiques qui se complètent et se valorisent mutuellement. Ces forces classiques tiennent une place essentielle dans la stratégie militaire du pays car elles portent témoignage de sa nature profonde, non l'égoïsme mais la solidarité, celle que commande la double appartenance à l'Europe et à l'Alliance atlantique, ainsi que la fidélité aux accords d'assistance conclus avec nombre de jeunes Etats. Souveraine et solidaire au regard de l'univers, cette défense se définit comme globale et populaire pour ceux qui la servent.

Il est clair aujourd'hui que la menace revêt d'autres aspects que frontaux. Idéologique parfois, économique plus souvent, militaire à l'occasion, la menace est multiforme et insidieuse. La réponse doit être globale et permanente. Le dispositif juridique mis en place souligne ce double caractère et cantonne le militaire dans son juste rôle, celui

d'un collaborateur spécialisé du service public. Si la menace vise chacun des citoyens, la défense doit les concerner tous. Tel est en effet le cas, puisqu'en France la dissuasion présente un caractère populaire que consacre l'attachement du corps social à la conscription (2).

Pourtant, quelles qu'en soient la pertinence et les qualités, cette politique de défense demeure perfectible. Elle gagnerait sans doute à faire une plus large place aux formes non militaires d'action. Le caractère populaire de la dissuasion s'en trouverait renforcé. Même s'ils sont significatifs, les moyens financiers qui lui sont consacrés seront demain insuffisants car les équipements modernes sont désormais à la mesure des continents. Une nouvelle solidarité est donc à décoller, qui dans la péninsule européenne sauvegardera l'âme de tous les Etats et l'intérêt de chacun.

Ce formidable défi est d'ores et déjà relevé. Enfin, à l'intérieur même du pays, un effort d'information doit être inlassablement poursuivi, celui qui vise à stimuler les esprits engourdis par le bien-être pour leur rappeler cette vérité paradoxale qu'aujourd'hui la politique de défense, et donc la politique militaire, visent à rendre la guerre impossible et non pas à la gagner.

### La Défense Nationale

Hubert HAENEL, René PICHON  
(P.U.F., coll. Que sais-je ?, 1989)

(1) Les Etats-Unis d'Amérique et l'ex-URSS.

(2) conscription : enrôlement des appelés du contingent.

#### DOCUMENT 5

Bien sûr, ma nation c'est la France. Lorsque je lis Montaigne, Pascal ou Voltaire, je me sens français, du moins autant qu'eux-mêmes se sentaient français, c'est-à-dire bien peu. Lorsque je lis *Faust*, ou *La Guerre et la Paix*, lorsque j'écoute le *Requiem* ou lorsque je contemple le *Moïse* de Saint-Pierre-aux-Liens, je me sens de la patrie de Goethe, de Tolstoï, de Mozart, de Michel-Ange, je me sens "terrien", autant qu'eux-mêmes le sentaient, c'est-à-dire beaucoup. Parmi ceux qui nous ont enrichis de leurs visions ou de leurs oeuvres, bien peu ont célébré la nation où ils sont nés, fragment de territoire dont les limites arbitraires et fluctuantes résultent plus des hasards des guerres ou des mariages princiers que de réalités humaines durables. Rappelons cette déclaration de Montesquieu : "Si je savais une chose utile à ma nation qui fût ruineuse à une autre, je ne la proposerais pas à mon prince, parce que je suis homme avant d'être français."

L'entêtement borné de quelques puissants a transformé en réalités concrètes, en "nations", ce qui n'était au départ que concepts bien abstraits, Allemagne, France ou Italie. Le processus est plus absurde encore pour les nations africaines issues de la décolonisation et dont les limites résultent de traits tirés plus ou moins au hasard sur une carte par quelques fonctionnaires de Paris ou de Londres. La pauvreté même des objets ou des rites qui les symbolisent montre à l'évidence combien ces concepts sont creux. Quelques couleurs élémentaires brutalement associées, quelques accords assez simples pour être joués par des musiques militaires, quelques paroles assez dépourvues de sens pour pouvoir être répétées sans jamais concerner l'intelligence, voilà de quoi fabriquer drapeaux et hymnes patriotiques qui justifient, par leur seule évocation, tous les abandons de la raison.

Notre propre nation en est un exemple type. Vraiment, ne faut-il pas avoir abandonné tout bon sens, toute raison, tout contact avec la réalité, pour appeler aujourd'hui les petits Français à abreuver les sillons de leurs campagnes du sang impur de ceux qui viennent égorger leurs compagnes (sans compter la mauvaise leçon de vérification apportée par ces rimes trop riches) ? Le folklore patriotique de nos voisins n'est guère plus sérieux. Quelle idée peut bien occuper la cervelle des jeunes Britanniques chantant *God save the King*, c'est-à-dire priant Dieu de sauver leur roi (ou leur reine) ?

On raconte qu'un célèbre mathématicien anglais a tenté de mesurer l'efficacité de cette requête faite régulièrement à Dieu par des millions de patriotes. Il a appliqué des tests statistiques très subtils pour comparer la probabilité de se retrouver *safe* (1) après une maladie, pour un roi, objet de tant de prières, et pour un citoyen ordinaire, qui n'est protégé que par les prières de sa famille. La conclusion aurait été que l'écart est, comme disent les statisticiens, "non significatif" : l'accumulation des implorations ne semble avoir aucun effet déceivable. La conclusion logique aurait dû être un changement des paroles de l'hymne national anglais. Tel n'a évidemment pas été le cas.

La réponse à ces critiques est, bien sûr, que les paroles des chants patriotiques sont dites sans que personne n'ait plus conscience de leur signification. Certes ; mais est-il de bonne pédagogie de faire comprendre à des jeunes que les mots ne sont que des sons, que des phrases entières peuvent être dites sans que l'intelligence y prenne la moindre part ? Il peut sembler plus formateur de leur répéter le précepte ancien : "Que ton oui soit oui, que ton non soit non." C'est-à-dire pense ce que tu dis. Est-ce trop demander qu'espérer une société où le réflexe devant une affirmation soit d'admettre qu'elle a du sens, et que celui qui l'a énoncée sait ce qu'elle signifie et la croit juste ?

Drapeaux et hymnes ont été à l'origine, c'est vrai, d'extraordinaires sacrifices, d'admirables héroïsmes et parfois de merveilleuses solidarités. Mais le processus réellement en action est à l'opposé de celui qui est présenté : ce n'est pas parce qu'ils se sentaient solidaires dans la défense de la France que Bretons, Picards et Gascons se sont battus à Verdun ; c'est parce qu'ils se sont battus ensemble à Verdun qu'ils se sont sentis, après coup, solidaires. Ne pourrait-on se sentir solidaires à un moindre prix ? Ne pourrait-on surtout étendre cette solidarité à des "terriens" habitant au-delà des frontières ? Celles-ci selon une belle définition de Georges Bidault, sont les "cicatrices de l'histoire" ; vivement que ces cicatrices disparaissent et, avec elles, les nationalismes !

Albert JACQUARD,  
Abécédaire de l'ambiguïté  
(Seuil, 1989)

1. safe (anglais) : sain et sauf, en bonne santé.

Epreuve d'Anglais  
Durée 2 heures Coefficient 2

L'usage de la calculatrice et du dictionnaire sont interdits)

## Who's afraid of biotechnology ?

How can we most sensibly regulate biotechnology, asks Joyce Tait

REGULATIONS designed to protect the environment often seem to be stamped\* with the risky hallmark\* of a last-minute reaction. In the 1960s, for example, when British farmers began using organochlorine insecticides widely, they threatened the existence of peregrine falcons\*, golden eagles and sparrowhawks\*. These predatory birds were only saved from extinction by regulations enacted\* at the very last moment. 1

In the past few years a new approach has emerged in the writing of regulations to protect the environment : the so-called "precautionary principle". Both the European Commission and the British government are now busy drawing up legislation aimed at avoiding future problems just in case they should arise. The US, however, is sticking\* to the just-in-time approach, under the forceful guidance\* of Vice-President Quayle's Council on Competitiveness. 5

The release of a new range of living genetically modified organisms into the environment is providing some of the first test cases for the precautionary approach. New techniques of genetic manipulation have enabled biotechnologists to develop a wide range of agricultural products, ranging from plants that are resistant to herbicides to microorganisms that can be used to control pests. 10

Apart from a host\* of ethical issues about the manipulation *per se\** of living things, and concerns about science and scientists being "out of control", the public seems most worried that the organisms themselves could spread uncontrollably, just as did, for example, myxomatosis and Dutch elm\* disease. Public concern is probably just as strong in the US as it is in Europe but the regulators there seem to be more prepared to take the risk of ignoring it. 20

At first, most of the companies involved in genetic engineering or biotechnology accepted the just-in-case approach, partly to reassure the public of the safety of their new products. But now lobbyists\* for the industry in the Senior Advisory Group for Biotechnology (SAGB) have accused the European Community of being hostile to biotechnology. The lobbyists claim that this is reflected in the community's regulations, which, they feel, are too restrictive. 25

While this new view may not be shared\* across industry, there is no doubt that many individual companies are now far less happy with regulations based on the precautionary principle. 30

What has prompted\* this change ? While regulation usually adds to industry's costs, these are rarely so significant as to stop the development of a new product. Indeed, for multinational companies, regulation has had the benefit of discouraging small competing firms from entering the market. It has also presented opportunities for new products to replace those that are banned or become obsolete\*. For large companies, the benefits of the previous regulatory systems introduced "just-in-time" may possibly have outweighed\* the costs.

New Scientist - 27 June 1992

**FOOTNOTES :**

- £ 1 to be stamped : être marqué
- £ 2 hallmark : estampille - marque
- £ 3 peregrine falcon : faucon pèlerin
- £ 4 sparrowhawk : épervier
- £ 5 to enact : promulguer
- £ 9 to stick to : s'attacher à, s'en tenir à ...
- £ 10 forceful guidance : conduite énergique
- £ 17 host : multitude
- £ 17 per se : en soi
- £ 20 Dutch elm disease : maladie de l'orme
- £ 24 lobbyist : membre d'un groupe de pression
- £ 28 to share : partager
- £ 31 to prompt : susciter
- £ 35 obsolete : démodé, désuet
- £ 36 to outweigh : dépasser

Le candidat traitera les deux sujets.

**I - Compte-rendu en langue française - (10 points)**

Vous rédigerez un compte rendu du texte en faisant ressortir les idées principales.  
(maximum de 250 mots)

**II - Rédaction en anglais - (10 points)**

According to the text, governments, scientists, ethicists and even ordinary citizens appear to be afraid of the incessant evolution of biotechnology.  
Do you think their fears are justified ?  
Say why or why not.

**Epreuve de Mathématiques et Sciences physiques**  
**Durée 4 heures Coefficient 4**

Rappel : La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.  
L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

**1° partie : Mathématiques (durée 2 heures, coefficient 1,5)**

## EXERCICE - (8 points) -

Un laboratoire pharmaceutique commercialise des sachets de bicarbonate de soude. L'ensachage est fait par une machine automatique en très grande série.

Les trois parties peuvent être traitées indépendamment les unes des autres. Les résultats seront donnés au centième le plus proche.

### 1ère Partie :

On tire un échantillon de 50 sachets dont on mesure la masse exprimée en grammes. On rassemble les résultats dans le tableau suivant :

masse en g	effectif
[9,82 ; 9,88 [	2
[9,88 ; 9,94 [	3
[9,94 ; 10,00 [	6
[10,00 ; 10,06 [	10
[10,06 ; 10,12 [	14
[10,12 ; 10,18 [	12
[10,18 ; 10,24 [	2
[10,24 ; 10,30 [	1

- 1.1. Proposer des valeurs approchées de la moyenne et de l'écart-type de cette série de mesures.
- 1.2. On suppose que la masse d'un sachet suit une loi gaussienne de moyenne  $\mu$  et d'écart-type  $\sigma$ , et que les 50 tirages sont indépendants.  
Donner au vu des résultats précédents une valeur approximative d'un intervalle de confiance pour  $\mu$  au risque de 5%.

### 2ème Partie :

On tire un sachet au hasard dans la production totale.

On appelle  $X$  la variable aléatoire qui à un sachet associe sa masse, exprimée en grammes.

On considère que  $X$  suit une loi normale de moyenne  $m$  et d'écart-type  $\sigma$ .

Un réglage de la machine amène à considérer que  $m = 10$  et  $\sigma = 0,08$ .

Calculer le pourcentage, à l'unité près, de sachets de la reproduction dont la masse appartient à l'intervalle  $[9,87 ; 10,23]$

### 3ème Partie :

Un sachet est déclaré conforme aux normes de fabrication si sa masse appartient à l'intervalle  $[9,87 ; 10,23]$

On considère que la probabilité pour qu'un sachet soit conforme est 0,95.

On contrôle la masse de 100 sachets prélevés au hasard, avec remise, dans la production d'une journée.

Soit  $Y$  la variable aléatoire donnant le nombre de sachets hors -norme.

- 3.1. Quelle est la loi suivie par  $Y$ ? Donner ses paramètres.
- 3.2. Justifier l'approximation de cette loi par une loi de Poisson dont on déterminera le paramètre.

3.3. En déduire une valeur approchée de  $P(Y \leq 4)$ .

**PROBLEME (12 points)**

La destruction des micro-organismes par la chaleur peut être mise en évidence en chauffant à une température donnée, pendant des durées variables, une suspension de cellules bactériennes et en dénombrant les survivants.

On admet que le nombre  $N$  de survivants vérifie l'équation différentielle :

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{2,3}{D} N \quad (\varepsilon)$$

avec la condition initiale  $N(0) = 10^8$

où  $t$  désigne le temps écoulé en minutes et où  $D$  est une constante strictement positive qui dépend de la température de l'expérience.

*Les deux parties peuvent être traitées indépendamment l'une de l'autre.*

**PARTIE A : Etude théorique**

1. Résoudre l'équation différentielle  $(\varepsilon)$  en tenant compte de la condition initiale.
2. Etudier les variations de  $N$  sur  $[0; +\infty[$
3. Montrer que pour tout  $t \in [0; +\infty[$   $N(t+D) = \frac{1}{10} N(t)$

En déduire une interprétation expérimentale de  $D$

4. Détermination de  $D$ .

On admet que  $D$  est une fonction de la température qui vérifie :

$$\frac{dD}{d\Theta} = -kD \quad (1)$$

$k$  est une constante et  $\Theta$  désigne la température, en degrés

- 4.1. Résoudre l'équation différentielle (1)
- 4.2. L'expérience donne  $D(121) = 3$  et  $D(115) = 7,9$ 
  - 4.2.a. Calculer  $k$
  - 4.2.b. En déduire la valeur de  $D(104,6)$  arrondie à l'entier le plus proche.
5. La température est fixée à  $104,6^\circ$ 
  - 5.1. Vérifier que  $N(t) = 10^8 \exp\left(\frac{-2,3}{42}t\right)$

- 5.2. Au bout de combien de temps peut-on estimer qu'il ne restera qu'un millier de survivants ?

**PARTIE B : Etude expérimentale**

On réalise l'expérience à  $104,6^\circ$ . On relève les résultats suivants :

$t_i$ (minutes)	0	40	120	180	240	300
$N_i$	$10^8$	$10^7$	$10^5$	3182	177	10

1. On pose  $y_i = \left( \frac{\ln N_i}{\ln 10} \right)$

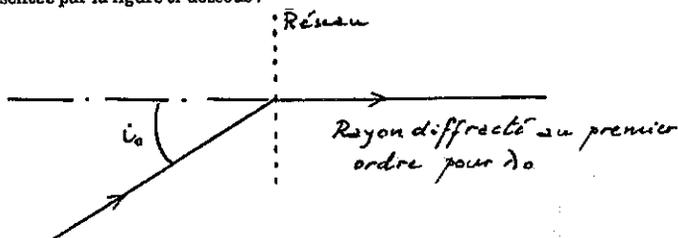
Calculer les valeurs de  $y_i$  arrondies au centième le plus proche. Présenter les résultats sous forme de tableau.

2. Utiliser les valeurs calculées au 1 pour déterminer une équation de la droite d'ajustement linéaire de  $y$  en  $t$  par la méthode des moindres carrés. Donner le coefficient de corrélation linéaire et conclure.
3. En déduire une expression de  $N$  en fonction de  $t$ .

## 2° partie : Sciences physiques (durée 2 heures, coefficient 2,5)

### I. - RESEAUX : (10 points)

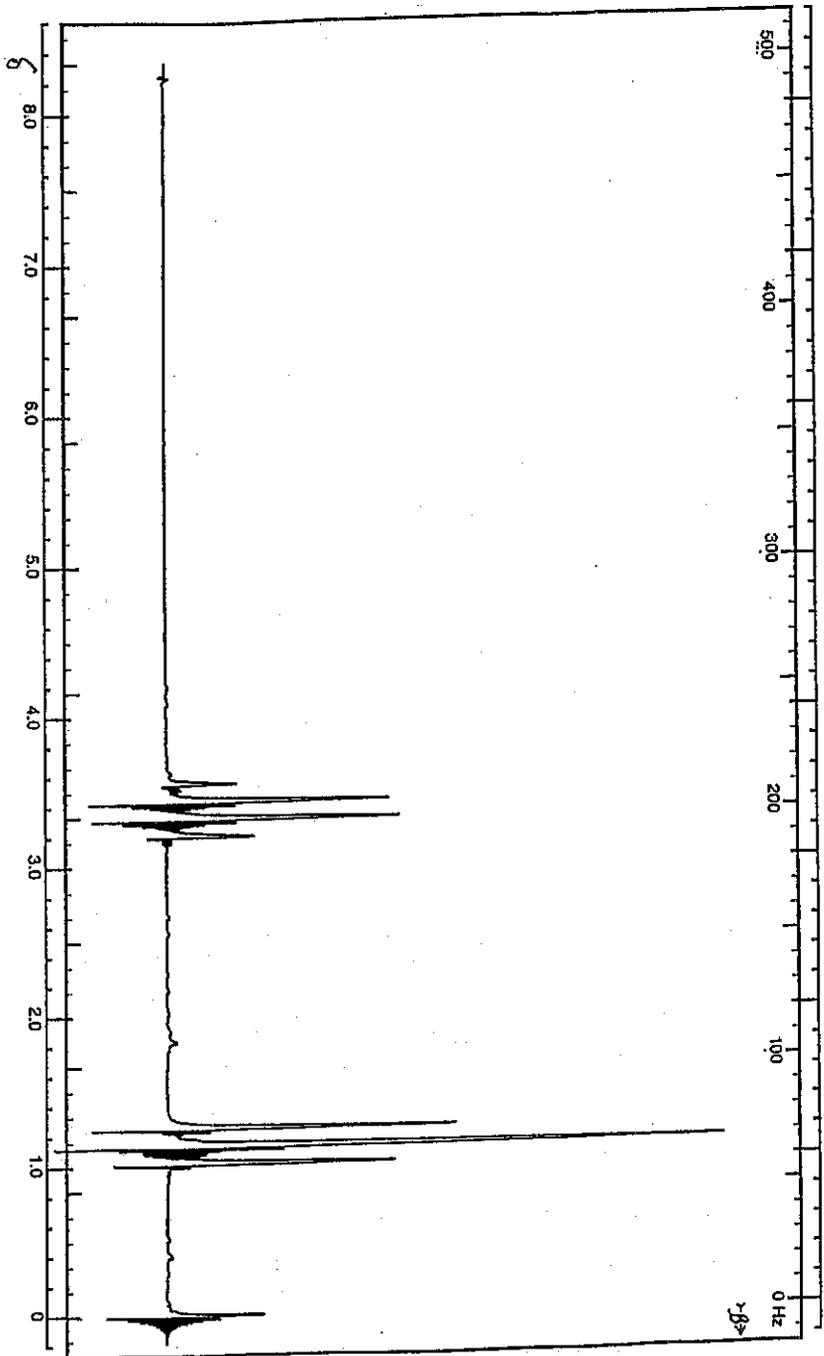
Un réseau plan par transmission portant  $n = 1250$  traits par millimètre est éclairé par un faisceau de lumière parallèle provenant d'une lampe à vapeur de sodium. Il est disposé de la manière représentée par la figure ci-dessous :



1. Quel devrait être l'angle d'incidence  $i_0$  qui permettrait d'obtenir un spectre d'ordre 1 normal (angle de diffraction  $i' = 0$ ) pour la raie D du sodium de longueur d'onde  $\lambda_0 = 589,0 \text{ nm}$  ? On comptera positivement les angles d'incidence et de diffraction à partir des demi-normales au plan du réseau dans le sens direct.
2. On place sur la trajectoire du faisceau ainsi diffracté une lentille mince convergente de distance focale image  $1,0 \text{ m}$  dont l'axe optique principal est perpendiculaire au plan du réseau. Dans le plan focal image de cette lentille  $L$ , on place un écran plan parallèle au réseau. Faire un schéma clair du montage et calculer, en mm, la distance  $x_1$  qui séparera sur l'écran la raie diffractée de longueur d'onde  $\lambda_0$  de l'autre raie du doublet D du sodium de longueur d'onde  $\lambda_1 = 589,6 \text{ nm}$ .

### II. - SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (5 points)

1. Déterminer la formule semi-développée du composé  $C_4H_{10}O$  à partir de sa formule brute et de son spectre RMN enregistré à  $60 \text{ MHz}$  joint en annexe en vous aidant de la table de corrélation jointe.
2. Justifier la présence d'un triplet et d'un quadruplet.



B:  $C_4H_{10}O$

## TABLE DE CORRELATION

Déplacements chimiques de quelques protons. Les zones hachurées donnent la plage la plus fréquente. Ar signifie cycle aromatique.

$\delta/TMS$	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
$CH_3$ , cyclopropane											[hatched]
$CH_3-C-$ (saturé)											[hatched]
$CH_3-C-C-X$											[hatched]
$CH_2$ (saturé)											[hatched]
$CH$ (saturé)											[hatched]
$CH_2-C-X$											[hatched]
$CH_2-C=C$											[hatched]
$CH_2-C=O$											[hatched]
$CH_2-Ar$											[hatched]
$CH_2-N$											[hatched]
$H-C\equiv C-$ non conjugué											[hatched]
$H-C\equiv C-$ conjugué											[hatched]
$-OCH_3$											[hatched]
$H_2C=C-$ non conjugué											[hatched]
$H-C=C-$ acyclique, non conjugué											[hatched]
$H-C=C-$ cyclique, non conjugué											[hatched]
$H_2C=C-$ conjugué											[hatched]
$H-C=C-$ conjugué											[hatched]
$H-C=C-$ acyclique conjugué											[hatched]
ArH benzénoïde											[hatched]
RCHO											[hatched]
ArCHO											[hatched]
RCOOH: 11-12 ppm											[hatched]
Enols: 15-16 ppm (H du OH)											[hatched]

### CHIMIE

#### I. CHIMIE ORGANIQUE (10 points)

On considère le 3,4 - diméthylhex-3-ène.

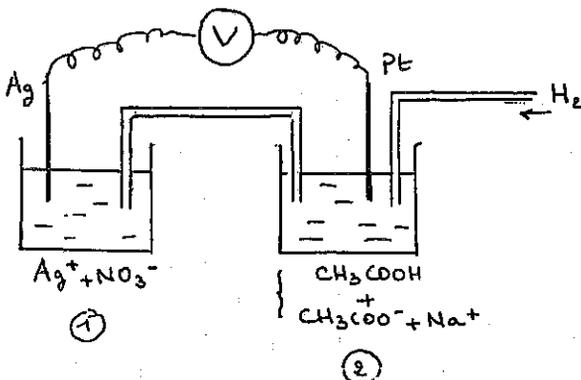
1. Représenter et nommer les deux stéréoisomères de cet alcène.
2. On hydrogène un seul de ces deux isomères.

2.1. Donner le mécanisme de cette hydrogénation catalytique et citer un catalyseur utilisé fréquemment.

2.2. La molécule du produit obtenu contient 2 atomes de carbone asymétriques. Il s'agit exclusivement du 3,4-diméthylhexane (3R, 4S).  
Quelle était la configuration de l'alcène de départ ? (Justifier la réponse à l'aide de schémas utilisant la projection de Newman).

## II - CHIMIE GENERALE (25 points)

1. On considère les deux demi-piles suivantes (voir figure) :



1.1. Une électrode d'argent trempant dans  $100 \text{ cm}^3$  d'une solution de nitrate d'argent de concentration  $c = 0,1 \text{ mol/L}$ .  
Ecrire l'équation de l'équilibre de la demi-pile.  
Calculer le potentiel  $E_1$  de cette électrode.

1.2. Une électrode de platine trempant dans  $100 \text{ cm}^3$  d'un mélange d'acide éthanóique ( $C_A = 0,1 \text{ mol/L}$ ) et d'éthanoate de sodium ( $C_B = 0,1 \text{ mol/L}$ ) dans lequel on fait barboter du dihydrogène à la pression  $P = 1 \text{ Bar}$ .  
Ecrire l'équation de l'équilibre de la demi pile en fonction de la constante  $K_a$  du couple  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ .  
Donner l'expression du potentiel  $E_2$  de l'électrode de platine.

1.3. On relie les deux demi-piles par un pont salin et on mesure la force électromotrice de la pile ainsi constituée.

$$e = E_1 - E_2 = 1,028 \text{ V. En déduire le } pK_a \text{ de l'acide éthanóique.}$$

2. On dissout 2 g de sulfate de sodium dans la solution de nitrate d'argent. La f.e.m de la pile ainsi formée est maintenant 975 mV.

Ecrire l'équation de la réaction chimique produite par cette addition. Ecrire l'expression de la f.e.m. de la pile en fonction du produit de solubilité  $K_s$  du sulfate d'argent. Calculer  $K_s$ .

**Données:**  $E^\circ(\text{Ag}^+/\text{Ag}) = 0,80 \text{ V}$

Masse molaire moléculaire de  $\text{Na}_2\text{SO}_4 = 142 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

# Epreuve de Sciences biologiques fondamentales et génie biologique

Durée 4 heures Coefficient 6

Calculatrices non autorisées

## PRODUCTION DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE PAR VOIE MICROBIOLOGIQUE

Actuellement de nombreuses molécules produites industriellement le sont pour leur intérêt thérapeutique, qu'il s'agisse d'antibiotiques, d'hormones, d'immunosuppresseurs etc...

Malgré certaines contraintes, les techniques de production par voie microbiologique de ces molécules présentent de nombreux avantages :

- Elles permettent la production rapide de produits finis ou intermédiaires,
- La quantité de matériel biologique élaboré par voie microbiologique est quasiment illimitée tant du point de vue de la production que des approvisionnements,
- On peut modifier et améliorer de nombreux caractères des souches productrices et ainsi jouer sur divers aspects de la synthèse moléculaire,
- Elles peuvent présenter une sécurité accrue par rapport à une obtention par une méthode extractive traditionnelle.

Cependant, ce mode de production impose un certain nombre de contraintes concernant en particulier la sélection des souches productrices, leur production en fermenteur et surtout la purification des molécules intéressantes.

### 1 - Production d'antibiotiques (65 points)

#### 1.1. Mode d'action et activité (28 points)

Les antibiotiques constituent les principaux métabolites secondaires produits industriellement. Depuis leur découverte en 1929, leur utilisation a révolutionné les traitements thérapeutiques qui ont ainsi gagné en efficacité et en fiabilité.

1.1.1. Représenter sur un schéma simplifié les différents sites d'action des antibiotiques. Citer un exemple pour chaque cas et détailler le mécanisme d'action de l'un d'entre eux.

1.1.2. Un antibiotique donné n'est pas toujours actif sur une souche, en particulier, si sa concentration est insuffisante ou si il y a résistance bactérienne.

1.1.2.1. Définir la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique. Présenter le principe d'une méthode permettant de la déterminer.

1.1.2.2. Rappeler les origines et mécanismes de la résistance d'une souche vis à vis d'un antibiotique.

#### 1.2. Sélection et amélioration de souches productrices (20 points)

1.2.1. Définir les termes sélections directe et indirecte. Préciser et comparer les objectifs recherchés par ces deux modes de sélection.

1.2.2. Amélioration génétique par mutagenèse. Donner la nature et le mode d'action de deux agents mutagènes utilisables.

1.2.3. Amélioration génétique par fusion de protoplastes  
- A l'aide de schémas illustrer cette technique permettant d'obtenir des recombinants producteurs intéressants  
- A quels types de micro-organismes cette technique est-elle plus particulièrement applicable ?

#### 1.3. Production en fermenteur (17 points)

La production des métabolites secondaires en fermenteur par une souche sélectionnée est une opération complexe dont les paramètres ne sont pas tous contrôlables scientifiquement. Certains d'entre eux revêtent cependant une importance considérable dans l'efficacité de la production. C'est le cas de l'apport en oxygène, les fermentations industrielles d'antibiotiques étant des cultures aérobies.

- 1.3.1. Rappeler les rôles de l'aération en génie fermentaire.
- 1.3.2. La demande en oxygène de la culture microbienne doit être satisfaite par le transfert de la phase gazeuse introduite dans le milieu vers les sites d'utilisation cellulaire.  
Décrire les modalités de ce transfert d'oxygène.
- 1.3.3. Réaliser deux schémas de bioréacteurs à agitation d'air.

## 2 - Production d'hormones (55 points)

Destinée au traitement du nanisme, l'hormone de croissance (hGH), peptide de 191 acides aminés, était jusqu'à ces dernières années extraites de l'hypophyse de cadavres. Ce mode d'obtention pose cependant de graves problèmes : d'une part la production est insuffisante pour répondre à tous les besoins, d'autre part des patients, traités par cette hormone, ont été contaminés par un agent provoquant la maladie de Creutzfeldt-Jacob (maladie dégénérative des cellules nerveuses). On s'est donc orienté vers la production microbiologique de l'hormone. Cette voie nécessite évidemment l'emploi des techniques du génie génétique.

### 2.1. Obtention d'une souche productrice (25 points)

La construction d'un vecteur d'expression recombiné impose la synthèse d'un ADN<sub>C</sub> codant pour l'hormone.

- 2.1.1. Comment fabriquer l'ADN<sub>C</sub>? Préciser l'origine du matériel biologique et les enzymes utilisées.
- 2.1.2. L'ADN<sub>C</sub> spécifique est isolé d'une banque. Comment identifier le clone contenant le vecteur d'expression approprié?
- 2.1.3. L'hormone produite par la bactérie transformée présente quelques différences de structure avec l'hormone naturelle.  
Quels sont les événements post-traductionnels qui expliqueraient ces différences?

### 2.2. Purification de l'hormone (18 points)

Après culture de la souche recombinée, l'hormone extraite du milieu doit être purifiée en vue d'un usage thérapeutique. L'une des méthodes les plus efficaces de purification est la chromatographie d'affinité.

- 2.2.1. Donner le principe de la chromatographie d'affinité en définissant le rôle des éléments propres à ce type de chromatographie.
- 2.2.2. Pour les hormones, on utilise en particulier l'immuno-affinité. Donner les avantages de ce type de purification.
- 2.2.3. L'emploi de cette technique d'immuno-affinité nécessite de disposer d'anticorps monoclonaux.  
Quelles sont les étapes de l'obtention de ces anticorps par hybridation cellulaire?

### 2.3. Contrôles (12 points)

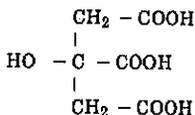
Le suivi d'une purification d'hormone nécessite la mise au point de méthodes de dosage et de contrôles de pureté.

- 2.3.1. Les méthodes immuno-enzymatiques sont parmi les plus employées pour le dosage d'hormones. Illustrer le principe de la technique ELISA "sandwich", en l'appliquant à ce type de dosage.
- 2.3.2. Citer une technique de vérification de pureté d'un peptide et en rappeler brièvement le principe.

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**A : étude de projet**  
**Durée 4 heures coefficient 4**

**PRODUCTION INDUSTRIELLE D'ACIDE CITRIQUE**

L'acide citrique a pour structure :



La masse molaire du produit monohydraté est de  $210 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Le sel de calcium (citrate de calcium) est plus soluble que l'oxalate de calcium.

La production industrielle d'acide citrique revêt une importance de plus en plus grande en raison du grand nombre d'utilisations possibles.

On se propose ici d'étudier quelques aspects de cette production :

- le dosage de l'acide citrique,
- la souche utilisée,
- la fermentation elle-même.

**1. DOSAGES DE L'ACIDE CITRIQUE (20 points)**

Le suivi de la fermentation nécessite l'utilisation d'une méthode de dosage. On cherche à comparer le titrage pHmétrique et le dosage par méthode enzymatique à  $340 \text{ nm}$  (Test UV à  $340 \text{ nm}$ ).

**1.1. Dosage spectrophotométrique de l'acide citrique**

Le document 1 concerne une technique de dosage de l'acide citrique par méthode UV.

- 1.1.1. Justifier la composition de la solution 1.
- 1.1.2. Justifier l'attente de  $5 \text{ mn}$  entre l'addition de la solution 1 et celle de la solution 2.
- 1.1.3. Justifier le domaine spectral de mesure de l'absorbance indiqué dans le document 1.
- 1.1.4. Proposer un protocole (traitement du prélèvement effectué, dilution éventuelle) permettant de doser l'acide citrique présent dans un milieu de fermentation à une concentration de l'ordre de  $50 \text{ g}$  d'acide citrique (forme monohydratée) par litre. L'absorbance sera mesurée à  $340 \text{ nm}$  dans une cuve de  $1 \text{ cm}$  de trajet optique.

On donne la valeur de l'absorbance linéique molaire du  $\text{NADH} + \text{H}^+$  à  $340 \text{ nm}$ ,

$$\epsilon = 6300 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

**1.2. Titration pHmétrique**

On introduit dans un vase à réaction  $20 \text{ ml}$  d'une solution  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  d'acide citrique. Cette solution est titrée par de l'hydroxyde de sodium  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Calculer le volume équivalent et donner l'allure de la courbe de titrage de l'acide citrique. (Données  $\text{pK}_a$  :  $3,14 - 4,77 - 6,39$  des 3 fonctions acides).

# ACIDE CITRIQUE

## Méthode UV

Pour la détermination de l'acide citrique dans les aliments

Réf. 139076

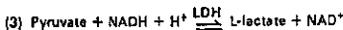
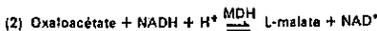
### Test-Combinaison pour environ 3 x 10 déterminations

#### Principe

L'acide citrique (citrate) est transformé en oxaloacétate et acétate dans une réaction (1) catalysée par la citrate-lyase (CL).



En présence de la malate-déshydrogénase (MDH) et de la lactate-déshydrogénase (LDH), l'oxaloacétate et son dérivé de décarboxylation, le pyruvate, sont réduits en L-malate et en L-lactate par le nicotinamide-腺嘌呤-二核苷酸 réduit (NADH) (2), (3).



La quantité de NADH oxydé en NAD<sup>+</sup> dans les réactions (2) et (3) est proportionnelle au citrate présent.  
L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 334 nm, 340 nm ou 366 nm.

#### Composition du coffret

- 3 flacons contenant chacun env. 1,4 g de lyophilisat composé de :
  - Tampon glycylglycine - pH 7,8
  - Malate-déshydrogénase - env. 136 U
  - Lactate-déshydrogénase - env. 284 U
  - NADH - 6,0 mg
  - Stabilisateurs
- 3 flacons contenant chacun 6 mg de lyophilisat de citrate-lyase - 12 U

#### Préparation des solutions pour 10 dosages

- Dissoudre le contenu d'un flacon 1 dans 12 ml d'eau bidistillée.
- Dissoudre le contenu d'un flacon 2 dans 0,3 ml d'eau bidistillée.
- Standard aqueux, stabilisé d'acide citrique.

#### Stabilité des solutions

- La solution 1 se conserve au moins 2 semaines à +4° C.  
La solution 2 se conserve au moins 1 semaine à +4° C.

#### Mode opératoire

Longueur d'onde :  
340 nm, 366 nm ou 334 nm  
Cuve de verre\* : 1 cm d'épaisseur  
Température : 20 à 25° C  
Volume du test : 3,02 ml

Mesurer contre l'air (pas de cuve dans le trajet optique) ou contre l'eau.

Solution d'essai : 5 à 80 µg de citrate/cuve

Introduire dans des cuves	Témoïn	Essai
Solution 1	1,0 ml	1,0 ml
Eau bidistillée	2,0 ml	4,8 ml
Essai	—	0,2 ml
Mélanger, après env. 5 min., lire l'absorbance des solutions (A <sub>1</sub> ). Déclencher la réaction par addition de		
Solution 2	0,02 ml	0,02 ml
Mélanger, attendre la fin de la réaction (env. 5 min.) et lire l'absorbance des solutions (A <sub>2</sub> ).		

Déterminer les différences d'absorbance (A<sub>1</sub> — A<sub>2</sub>) du témoin et de l'essai.

Déduire la différence d'absorbance du témoin de celle de l'essai.

$$\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$$

#### Utilisation du standard

Le standard est à utiliser comme contrôle de la méthode (matériel utilisé, réactifs et manipulation).  
Dans le mode opératoire, on remplace 0,2 ml d'essai par 0,2 ml de standard.

#### Recommandations Pour la réalisation du test

Validité de la mesure :  $\Delta a < 0,8$

A la place des cuves de verre, on peut utiliser les cuves à usage unique du commerce.

Indiquer quels sont les avantages et inconvénients de cette méthode et de la méthode spectrophotométrique.

Dans le cas présent, l'une de ces méthodes paraît-elle préférable à l'autre ? Justifier la réponse.

## 2. LA SOUCHE UTILISEE EN FERMENTATION : *Aspergillus niger* (20 points)

- Reconnaître l'*Aspergillus* parmi les figures du document 2. Justifier le choix. Reproduire succinctement le schéma choisi et l'annoter.
- Décrire brièvement les différentes opérations permettant la mise en évidence de ses caractères morphologiques et cultureux.
- Choisir, parmi les milieux figurant sur le document 3, le milieu le mieux adapté à cette étude morphologique. Justifier le choix.

**DOCUMENT 2**

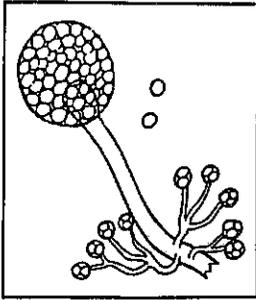


Fig. 1

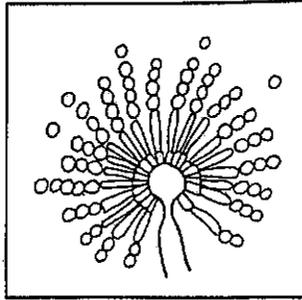


Fig. 2

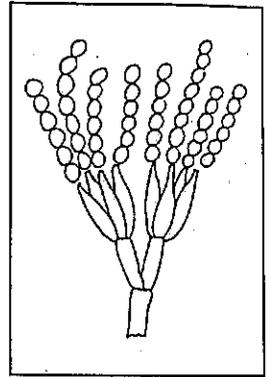


Fig. 3

**DOCUMENT 3 : Milieux de culture pour Aspergillus**

**Milieu A**

peptones	10	g
glucose	1	g
agar	15	g
eau distillée	1	litre
pH	6 à 6,5	

**Milieu B**

peptones	10	g
glucose	20	g
agar	15	g
eau distillée	1	litre
pH	6 à 6,5	

**Milieu C**

peptones	10	g
glucose	20	g
agar	15	g
eau distillée	1	litre
pH	7,5	

**Milieu D**

peptones	10	g
glucose	20	g
agar	15	g
eau distillée	1	litre
chloramphénicol	0,5	g
pH	6 à 6,5	

**Milieu E**

peptones	10	g
glucose	20	g
agar	1	g
eau distillée	1	litre
pH	7,5	

2.4. Les champignons permettent la production de nombreuses substances telles que les antibiotiques. Lors de leur culture en fermenteur, ils présentent cependant des inconvénients ; citer 3 inconvénients.

2.5. Métabolisme du glucose ; accumulation d'acide citrique

La biosynthèse de l'acide citrique s'effectue par l'intermédiaire de la glycolyse et du cycle de KREBS. Cette biosynthèse s'accompagne de celle de quantités plus ou moins importantes d'acide oxalique.

A l'aide du document 4, et en reproduisant de façon simplifiée le schéma de ce document, indiquer (en respectant le code figurant dans la légende) le rôle régulateur du citrate et de l'oxalo-acétate. Justifier le ou les symboles utilisés.

DOCUMENT 4 :

Extrait de Biotechnology  
 A comprehensive treatise in 8 volumes  
 Edited by H.J. REHM and G. REED Volume 3  
 VERLAG CHEMIE

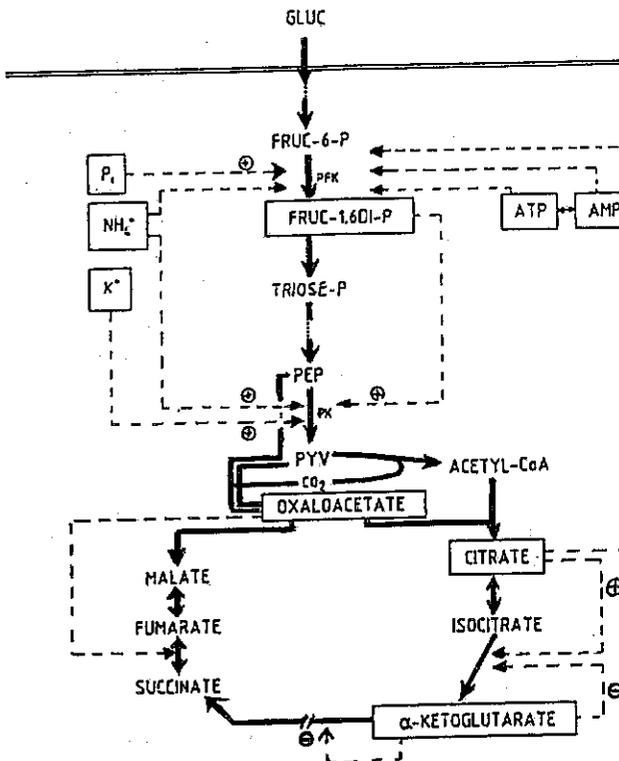
The regulation of glycolysis is most important for citric acid production and will be discussed here in more detail (Fig. 1: RÖHR and KUBICEK, 1981; RÖHR et al., 1981a; KUBICEK and RÖHR, 1982).

By means of measurement of glycolytic intermediates and conventional determination of "cross-over points" and "far-from-equilibrium reactions" in a citric acid producing strain (*A.niger* B 60) phosphofructokinase has been identified as a regulatory enzyme (HABISON et al., 1979, 1982). This enzyme

shows the common regulatory properties of a typical eukaryotic phosphofructokinase (PFK) and - most important - is inhibited by citrate within the normal physiological range of concentrations ( $K_i = 0.25$  mM). Thus, although the enzyme from *A.niger* NRRL 233 in crude extracts was reported to be insensitive to citrate (BOWES, 1980) - a mechanism must be operating which makes the enzyme insensitive to citrate during citric acid production which should be dependent on specific changes in the nutrients (i. e., manganese limitation, oxygen supply). This will be discussed in detail later in this section.

The dicarboxylic acid part of the cycle seems not to be regulated by metabolites other than substrates and products. The only exception is succinate dehydrogenase which is also strongly inhibited by low concentrations of oxalacetate. Viewed together, these findings show that under conditions of unlimited flow through glycolysis, a "spill-over" of citrate is very likely to occur and the extent of citrate accumulation is mainly dependent on the supply of oxalacetate.

It is reasonable to assume that the environmental conditions, which are a prerequisite for citric acid accumulation should exert their influence by stimulating glycolysis or by contributing to most of the influencing factors. This has never been studied on a biochemical basis. Only recently have the action of manganese and some aspects of regulation by oxygen been studied in more detail.



Metabolic regulation of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*.  
 ⊕ activation ⊖ inhibition ⊙ NONE

The critical influence of oxygen has been studied with special reference to the operation of oxidative mechanisms. From the equation



it is evident that oxygen is theoretically a substrate which is metabolically needed for the reoxidation of glycolytic NADH during citric acid fermentation.

### 3. LA FERMENTATION (32 points)

#### 3.1. Le milieu de fermentation

En utilisant le document 5, répondre aux questions suivantes :

- 3.1.1. Quelle est la concentration optimale des ions ferriques et cuivriques dans le milieu de fermentation ?
- 3.1.2. Quelle est l'influence des ions  $Mn^{2+}$  sur la production d'acide citrique ?
- 3.1.3. Conclure en comparant les effets de ces différents ions métalliques et justifier le traitement des mélasses par l'hexacyanoferrate (HCF), complexant des ions divalents selon la réaction (argumenter soigneusement la réponse) :



DOCUMENT 5 : Tableau de l'influence de :

- l'effet du fer et du cuivre sur la production d'acide citrique
- l'effet des métaux sur la production d'acide citrique.

Extrait de Biotechnology  
A comprehensive treatise in 8 volumes  
Edited by H.J. REHM and G. REED Volume 3 page 426  
VERLAG CHEMIE

Table 2. Effect of Copper and Iron on Citric Acid Production - Data from NOYES (1969)

Fe <sup>+++</sup> (mg/L)	Cu <sup>++</sup> (mg/L)	Acidity (g)	Initial Sugar (g)	Conversion (%)
10.0	50.0	393.0	505.0	77.8
50.0	50.0	349.0	505.0	69.1
100.0	50.0	256.0	505.0	50.7
150.0	50.0	62.0	505.0	14.2
10.0	100.0	380.0	505.0	77.4
50.0	100.0	317.0	500.0	65.4
100.0	100.0	272.0	505.0	53.9
150.0	100.0	149.0	500.0	29.8
10.0	200.0	375.0	500.0	75.0
50.0	200.0	341.0	500.0	68.2
100.0	200.0	181.0	500.0	36.2
150.0	200.0	68.0	500.0	13.6
10.0	300.0	378.0	500.0	75.6
50.0	300.0	344.0	500.0	68.8
100.0	300.0	274.0	500.0	54.8
150.0	300.0	133.0	500.0	26.6
10.0	500.0	370.0	500.0	74.0
50.0	500.0	327.0	500.0	65.4
100.0	500.0	298.0	500.0	60.6
150.0	500.0	138.0	500.0	27.6

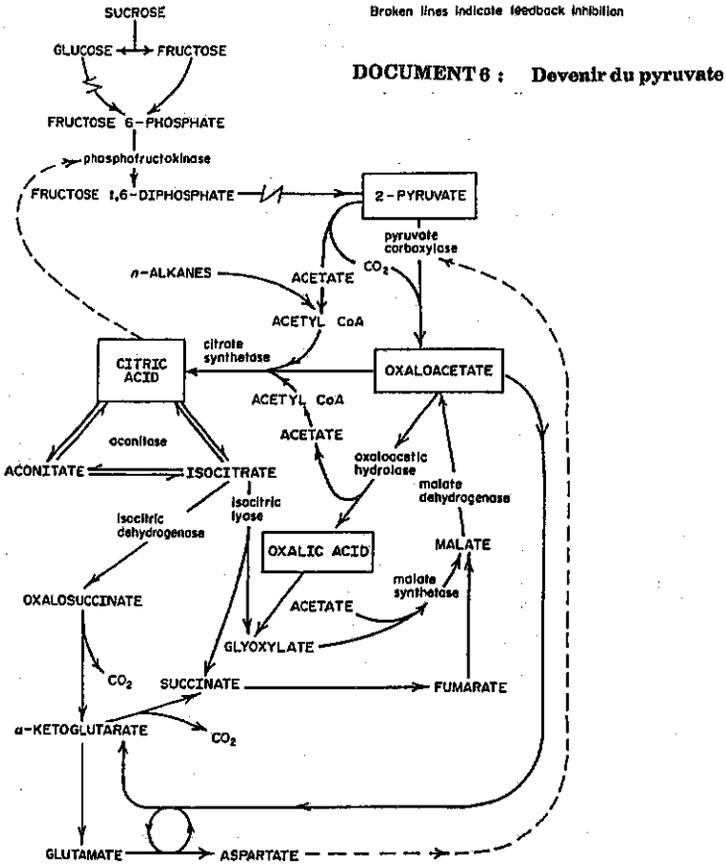
Table 3. Effect of Metals on Production of Citric Acid - Data from CLARK et al. (1966)

Metals Added	Amounts Added (mg/L)	Citric Acid (% after 96 h)
None (optimal médium)	—	8.8
Al <sup>3+</sup>	5.0	7.3
Ca <sup>2+</sup>	80.0	9.0
Co <sup>2+</sup>	0.1	9.0
Cu <sup>2+</sup>	3.0	8.6
Fe <sup>2+</sup>	100.0	7.5
Mg <sup>2+</sup>	20.0	8.8
Ni <sup>2+</sup>	0.1	8.6
Zn <sup>2+</sup>	5.0	7.5
Mn <sup>2+</sup>	1.0	1.5
Mixture of all metals	Concentrations shown above	1.4
Mixture of all metals except Mn <sup>2+</sup>	Concentrations shown above	7.4

### 3.2. La production d'acide citrique

3.2.1. Dans des conditions normales, l'acide citrique n'est pas excrété en grande quantité. Une telle excrétion en quantité appréciable, doit être considérée comme le résultat d'irrégularités du métabolisme causées par des déficiences du métabolisme ou un déséquilibre important du milieu nutritionnel.

Sachant que l'aconitase est une enzyme contenant du fer inhibée par la présence du  $\text{Cu}^{2+}$ , à partir des documents 4 et 6 fournis, expliquer les conditions de la production d'acide citrique.



A simplified metabolic scheme showing citric acid production from carbohydrates and *n*-alkanes

3.2.2. Dans des conditions optimales (absence de formation de métabolites secondaires), on peut utiliser l'équation (non équilibrée) de production de l'acide citrique figurant au bas du document 4.

Équilibrer cette réaction et calculer le rendement théorique de la fermentation en kg d'acide citrique monohydraté produit pour 100 kg de glucose.

### 3.3. Caractéristiques générales de fermentation :

Forte concentration initiale en sucres (150 g environ/l),  
 pH très acide (de l'ordre de 1,5 à 2),  
 aération forte.

Des résultats expérimentaux sont représentés sous forme de tableau dans le document 7.  
 Sur un même graphe, tracer les deux courbes Biomasse =  $f(t)$  et Acide citrique =  $f(t)$ . Les analyser  
 et en déduire à quel type de métabolite appartient l'acide citrique.

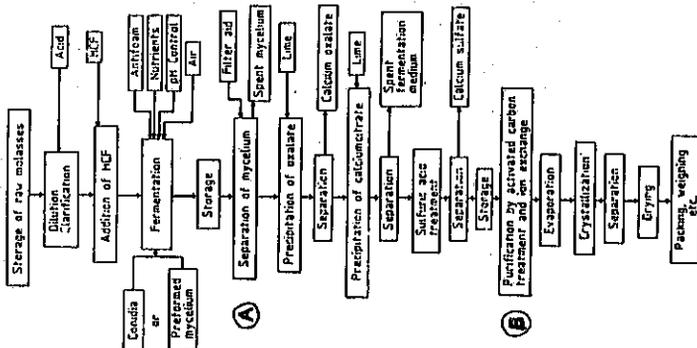
**DOCUMENT 7 : Tableau de valeurs expérimentales**

Temps	Biomasse	Acide citrique
h-1	g/l	g/l
0	0,3	0
4	0,5	0
6	0,6	0
8	1,0	0
10	1,5	0
12	2,0	0
14	2,4	0
15	2,7	0
20	3,8	0
22	4,8	0
24	5,6	0
26	5,8	0
28	6,0	0
32	6,4	0
36	6,7	2
40		6
41		7
43		8
46		12
50	7,2	22
55		31
56		32,5
68		52
75	8,2	62
80		70,7
88		76
92		78,4
100	8,8	83,1
103		84,8

**4. L'EXTRACTION ET LA PURIFICATION DE L'ACIDE CITRIQUE (8 points)**

Le document 8 montre les grandes étapes dans le traitement du moût.  
 Schématiser les équipements nécessaires pour la réalisation des opérations A et B.

**DOCUMENT 8 :**  
**Schéma général du procédé**



Citric acid production flow chart.  
 HCF hexacyanoferrate.

**Epreuve professionnelle de synthèse**  
**B : réalisation pratique d'opérations de génie biologique**  
**Durée : 8 heures coefficient 8**

**Documents personnels non autorisés**  
**Quelques opérations de génie biologique**

**Premier jour :** (durée : 6 h 00 + 1 h pour repas pris sur place)

Le sujet comporte deux parties indépendantes qui doivent être réalisées dans l'ordre de présentation :

1ère partie : Minipréparation de plasmide

2ème partie : Dosage microbiologique de la vitamine B12 dans des comprimés pharmaceutiques

**1ère partie : (80 points)**

**MINIPRÉPARATION D'UN PLASMIDE**

On dispose d'une culture de la nuit d'une souche d'*Escherichia coli* transformée par un plasmide.

Le candidat réalisera la minipréparation d'ADN plasmidique par la technique rapide par ébullition (adaptée d'après HOLMES et QUIGLEY).

La minipréparation sera contrôlée sur minigel après digestion de l'ADN obtenu par une endonucléase de restriction.

**1.- Minipréparation du plasmide par la technique rapide avec ébullition.**

- Transvaser 1,5 ml de culture dans un microtube et centrifuger 1 min dans une microcentrifugeuse. Eliminer le surnageant. Recommencer l'opération dans le même tube sur à nouveau 1,5 ml de culture et éliminer soigneusement la totalité du surnageant.
- Agiter au vortex le culot bactérien puis le remettre en suspension dans 350 µl de STET. (TRIS, EDTA, TRITON)
- Ajouter 25 µl d'une solution de lysozyme fraîchement préparée (10 mg.ml<sup>-1</sup> dans du tampon Tris/HCl, pH 8,0, 10 mmol.l<sup>-1</sup>). Mélanger au vortex pendant 3 secondes. Laisser 5 min à température ambiante.
- Placer le tube dans l'eau bouillante pendant exactement 45 secondes.
- Centrifuger le lysat bactérien 10 min dans une micro-centrifugeuse, à la vitesse maximum.
- Récupérer le surnageant dans un nouveau tube, sans le contaminer avec le culot.
- Précipiter l'ADN par 40 µl d'acétate de sodium 2,5 mol.l<sup>-1</sup> (pH 5,2) et 420 µl d'isopropanol.
- Agiter au vortex et incubé au minimum 10 min à température ambiante.
- Centrifuger 15 min à vitesse maximum. Eliminer soigneusement la totalité du surnageant.
- Rincer sans remettre en suspension le culot avec 500 µl d'éthanol à 70 %. Recentrifuger 5 min. Eliminer soigneusement l'alcool de rinçage.
- Sécher le culot.
- Redissoudre les acides nucléiques dans 50 µl d'eau contenant de la RNAase.
- Effectuer une digestion par une endonucléase de restriction sur 10 µl de cette solution et analyser sur minigel (voir 2).

**2.- Digestion de contrôle et analyse sur minigel**

Marquer un microtube et introduire les réactifs comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Eau distillée (µl)	Tampon ×10 (µl)	ADN * (µl)	Enzyme Ex. : Eco RI (5 u.µl <sup>-1</sup> ) (µl)
6	2	10	2

- Centrifuger les tubes quelques secondes puis incubé à 37°C pendant 1h 30.
- Centrifuger les tubes quelques secondes et ajouter 5 µl de solution de charge × 5
- Déposer 10 – 20 µl du contenu de chaque tube dans un puits du gel d'agarose à 0,8 %.  
Prévoir par gel un ou deux dépôts d'environ 1 µg d'un marqueur de taille (ADN lambda digéré par Hind III), par exemple 8 µl à 0,1 µg.µl<sup>-1</sup> + 2 µl de solution de charge.
- Réaliser l'électrophorèse à 80 Volts pendant 2 heures.
- Colorer le gel au BET, observer sous rayons U.V. et photographier .
- La photographie sera remise à un examinateur.

## 2ème partie : (80 points)

### DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE LA VITAMINE B<sub>12</sub> DANS DES COMPRIMES PHARMACEUTIQUES

#### 1. PREPARATION DE L'INOCULUM. (*Lactobacillus leichmanii*)

La culture fournie sous forme de culot de centrifugation a été lavée trois fois avec de l'eau physiologique stérile.

Reprenre le culot final par 10 ml d'eau physiologique , puis diluer de manière à obtenir une suspension d'absorbance 0.1 (toujours dans l'eau physiologique).

La valeur d'absorbance sera montrée à un examinateur .

Consigner le protocole de préparation de cette suspension dans le compte rendu .

Une goutte (50 µl) de cette suspension est utilisée pour ensemenecer chaque tube.

#### 2. PREPARATION DE LA SOLUTION ESSAI DE CYANOCOBALAMINE (VITAMINE B<sub>12</sub>)

Des précautions seront prises pour limiter les contaminations de la préparation avant autoclavage.

##### SOLUTION A :

Dans un erlenmeyer stérile de 100 ml, introduire 4 comprimés pharmaceutiques.

Ajouter à l'éprouvette stérile 50 ml de la solution tampon pH = 4.5.

Tiédier la solution à 40° C au bain marie et agiter jusqu'à dissolution des dragées.

Ajouter à nouveau 50 ml du même solvant.

Filter sur filtre sans cendres en utilisant l'entonnoir, le filtre, le bécher prévus à cet effet.

##### SOLUTION B :

Solution A		5 ml
Eau purifiée stérile	ajouter	245 ml

##### SOLUTION C :

Solution B		5 ml
Eau purifiée stérile	ajouter	145 ml

#### 3. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE

Bacto B <sub>12</sub> essay medium	8,5 g
Eau purifiées	100 ml

Dissoudre à l'ébullition (2 à 3 min) . Refroidir dans l'eau.

Le milieu sera utilisé le plus rapidement possible ; dans le cas contraire il sera conservé à + 4°C minimum.

#### 4. PREPARATION DE LA GAMME ETALON ET DES ESSAIS

Marquer les tubes de manière indélébile.

La stérilisation de la gamme étalon et des essais est prévue avant l'inoculation. Les solutions utilisées ne seront donc pas nécessairement stériles.

La solution étalon de cyanocobalamine est fournie à la concentration de  $0,04 \text{ ng.ml}^{-1}$ .

##### 4.1. Gamme étalon

Réaliser 1 tube pour chaque concentration de cyanocobalamine. Tous les volumes sont en ml.

	Témoin non ensemencé	Blanc	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Solution étalon à $0,04 \text{ ng.ml}^{-1}$	-	-	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5
Eau purifiée	5	5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	-
Milieu de dosage	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

##### 4.2. Essais

Réaliser les 3 tubes essais  $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$ , avec respectivement 1, 2, 3 ml de solution essai C, dans les mêmes conditions que la gamme étalon.

En attente de stérilisation, les tubes seront conservés à  $+ 4^\circ \text{C}$ .

#### 5. STERILISATIONS DE LA GAMME ETALON ET DES ESSAIS

Le candidat se conformera obligatoirement à l'heure indiquée par les examinateurs.

Stérilisation à l'autoclave 6 min à  $120^\circ \text{C}$ . En fin de stérilisation, plonger le plus vite possible tous les tubes dans l'eau froide.

#### 6. ENSEMENCEMENT DES GAMMES

Introduire 50  $\mu\text{l}$  d'inoculum préparé en 1 dans tous les tubes sauf dans le témoin non ensemencé.

#### 7. INCUBATION DES GAMMES

Incuber tous les tubes 15 à 17 heures à  $37^\circ \text{C}$ .

## Deuxième jour : (durée : 2 h 00)

### 1ère partie :

#### MINIPREPARATIONS D'UN PLASMIDE

- La digestion de la minipréparation par l'endonucléase de restriction est-elle complète ? Justifier la réponse.
- Déterminer la taille du plasmide linéarisé à l'aide du marqueur de taille (en construisant le graphe log. taille = f(distance de migration).

Donnée : taille des fragments du standard de taille : 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125.

### 2ème partie :

#### DOSAGE CYANOCOBALAMINE

##### 1. LECTURE DE LA GAMME ET DES ESSAIS

Stopper la culture en ajoutant dans chaque tube (sauf dans le tube témoin non ensemencé) 4 gouttes de formaldéhyde.

Lire à 600 nm après agitation et repos dans la cuve 1 à 2 min (zéro optique sur le témoin non ensemencé), ce tube de milieu stérile peut servir de diluant si besoin est.

Montrer les relevés d'absorbance à un examinateur.

##### 2. RESULTATS

- Tracer la courbe  $A_{600\text{ nm}} = f(\text{concentration de cyanocobalamine en ng.ml})$ .
- Déterminer la quantité de cyanocobalamine par comprimé.







Achevé d'imprimer le 20 Novembre 1994  
Dépôt légal 4<sup>e</sup> Trimestre 1994  
Directeur de la publication : J. N. JOFFIN

ISBN 2-910069-12-5



9 782910 069124