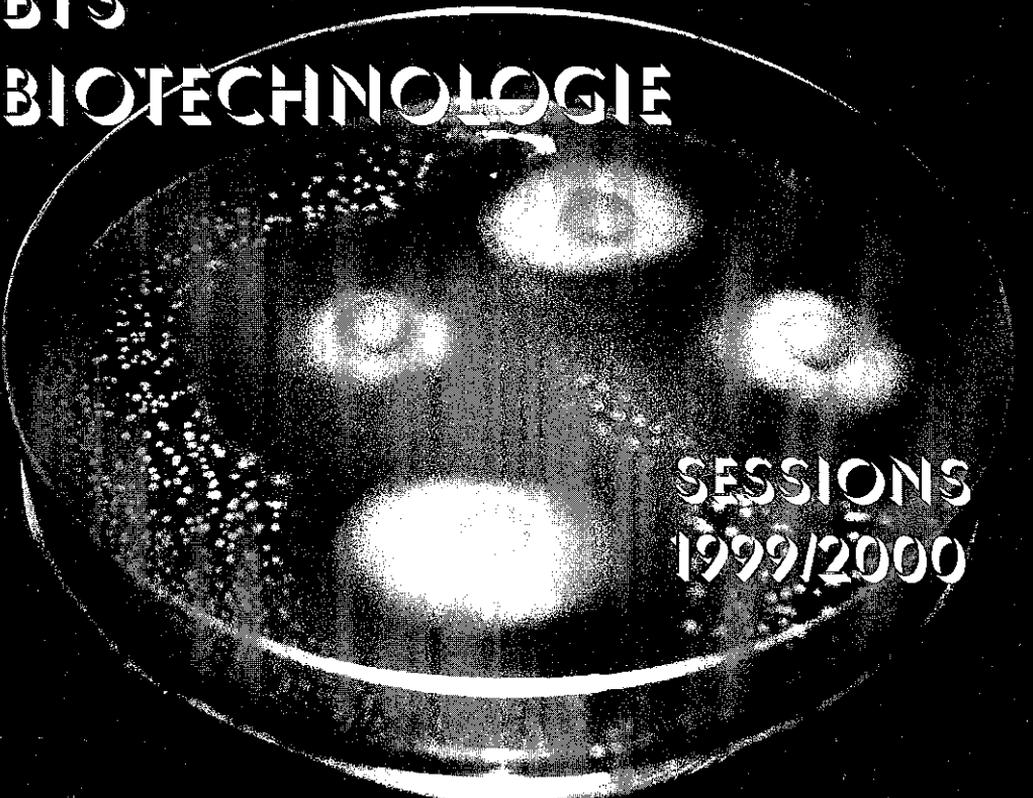


**ANNALES**  
**BTS**  
**BIOCHIMIMISTE**  
**BTS**  
**BIOTECHNOLOGIE**

A black and white photograph of a petri dish containing a bacterial culture. The culture shows several distinct colonies of varying sizes and textures, including a large, dense, and somewhat irregular colony on the left side. The background of the agar is dark, and the colonies are bright, creating a high-contrast image.

**SESSIONS**  
**1999/2000**

**UPBM - ÉDILION**

LYCÉE LA MARTINIÈRE 69338 LYON CÉDEX 9  
Publications de l'UPBM

Les annales du **BTS BIOCHIMISTE** ont été réalisées par **Michel VOL**, Professeur au Lycée Raoul DAUTRY à LIMOGES

Les annales du **BTS BIOTECHNOLOGIE**, ainsi que les propositions de corrigés des sujets de Sciences Biologiques et Fondamentales et d'Étude de Projet, ont été réalisées par **Sylvie BARDES**, professeur au Lycée de la Vallée de Chevreuse à Gif-sur-Yvette, et **Pascal MICHAUX**, professeur au Lycée Valentine Labbé à La Madeleine. Merci à **Dominique DEVRED**, **Françoise GUYOMARCH**, **Daniel LONCLE** et **Jacques THOMAS** pour la relecture des propositions de corrigés.

**Françoise ARTAUD**, Professeur au Lycée La Martinière de Lyon, assure, après **Guy BATTIER**, la gestion des expéditions.

**Dominique BINCHET**, professeur de mathématiques au Lycée Valentine Labbé à La Madeleine, a rédigé les éléments de corrigé de mathématiques.

*Certains sujets d'enseignement général, communs aux deux BTS, ont été publiés une seule fois, soit dans les annales du BTS BIOCHIMISTE, soit dans les annales du BTS BIOTECHNOLOGIE.*

Nous aurions souhaité une présentation plus soignée mais avons préféré rechercher un prix de vente aussi faible que possible.

### **Photographie de couverture de Pascal MICHAUX :**

Mise en évidence de la production d'antibiotique par *Penicillium chrysogenum* : inhibition de la culture d'une souche de *Streptococcus pyogenes* (A) sur une gélose de Mueller Hinton au sang

**ISBN 2-910069-31-1**



9 782910 069315

**ANNALES**

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR  
BIOTECHNOLOGIE**

**Sessions 1999-2000**

**Publications de l'UPBM**

UPBM ÉDILION

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 « Épreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques) » comprend plusieurs sujets différents.

### Sommaire :

#### **Année 1999 :**

	Français	99-01
	Anglais	99-06
	Mathématiques	99-07
	<i>Éléments de corrigé: 1/2+2/2</i>	
	Sciences physiques	99-11
	Biochimie-Biologie	99-15
	Épreuve professionnelle de synthèse 1° partie	99-22
	(Étude d'opérations techniques)	
Épreuve professionnelle de synthèse 2° partie	<b>SUJET 1</b>	99-35
	(Réalisation pratique d'opérations techniques)	
Épreuve professionnelle de synthèse 2° partie	<b>SUJET 2</b>	99-43
	(Réalisation pratique d'opérations techniques)	
Épreuve professionnelle de synthèse 2° partie	<b>SUJET 3</b>	99-51
	(Réalisation pratique d'opérations techniques)	
Épreuve professionnelle de synthèse 2° partie	<b>SUJET 4</b>	99-60
	(Réalisation pratique d'opérations techniques)	

#### **Année 2000 :**

	Français	00-01
	Anglais	00-01
	Mathématiques	00-01
	Sciences physiques	00-01
	Biochimie-Biologie	00-04
	Épreuve professionnelle de synthèse 1° partie	00-15
	(Étude d'opérations techniques)	
Épreuve professionnelle de synthèse 2° partie	<b>SUJET 1</b>	00-25
	(Réalisation pratique d'opérations techniques)	
Épreuve professionnelle de synthèse 2° partie	<b>SUJET 2</b>	00-33
	(Réalisation pratique d'opérations techniques)	
Épreuve professionnelle de synthèse 2° partie	<b>SUJET 3</b>	00-43
	(Réalisation pratique d'opérations techniques)	

# Annales du BTS Biochimiste :

## Définition de la nature des épreuves

### 1. Épreuve de français

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

#### 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 bien composé et qui se prête à une analyse d'idées.

1.2.2.—On proposera un texte de cinquante à cent lignes dactylographiées 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.—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.

Le candidat devra :

- résumer le texte en un nombre fixe 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. Épreuve d'anglais

- Épreuve 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. Épreuve de mathématiques - sciences physiques

- Épreuve écrite
- Durée : 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° 86-228 du 23 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 (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 substitutions 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 pose 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. Épreuve de biochimie - biologie

- Épreuve 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 comporte plusieurs questions indépendantes.

### 5. Épreuve professionnelle de synthèse

- Épreuve 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 et à l'informatique

## 6. Épreuve de soutenance du rapport de stage ou d'activité professionnelle

- Épreuve 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 ou 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'excèdera 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 (actylographiques (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 la mesure où il est essentiellement opportun ou refaire 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

***Épreuves de  
la session  
1999***



## SYNTHÈSE DE DOCUMENTS.

Vous ferez des documents suivants, consacrés à l'évolution des formes de délinquance, une synthèse concise, objective et ordonnée.

Dans une conclusion personnelle, vous donnerez votre opinion sur le sujet proposé.

- Document 1: Victor HUGO  
Les Misérables, 1862.
- Document 2: Denis SALAS  
"La délinquance d'exclusion impose une redéfinition des missions de l'Etat " *Le Monde* du 9 juin 1998.
- Document 3: Alain BAUER  
"Une pléthore d'oranges mécaniques"  
*Le Monde* du 2 juin 1998.
- Document 4: Dessin de PLANTU tiré de " *C'est le goulag* "  
Éditions *La Découverte / Le Monde*, 1983.

## DOCUMENT 1

## UN PEU D'HISTOIRE

À l'époque, d'ailleurs presque contemporaine (1), où se passe l'action de ce livre, il n'y avait pas, comme aujourd'hui, un sergent de ville à chaque coin de rue (bienfait qu'il n'est pas temps de discuter); les enfants errants abondaient dans Paris. Les statistiques donnent une moyenne de deux cent soixante enfants sans asile ramassés alors annuellement par les rondes de police dans les terrains non clos, dans les maisons en construction et sous les arches des ponts. Un de ces nids, resté fameux, a produit " les hirondelles du pont d' Arcole". C'est là, du reste, le plus désastreux des symptômes sociaux. Tous les crimes de l'homme commencent au vagabondage de l'enfant.

Exceptons Paris pourtant. Dans une mesure relative, et nonobstant le souvenir que nous venons de rappeler, l'exception est juste. Tandis que dans toute autre grande ville un enfant vagabond est un homme perdu, tandis que, presque partout, l'enfant livré à lui-même est en quelque sorte dévoué et abandonné à une sorte d'immersion fatale dans les vices publics qui dévore en lui l'honnêteté et la conscience, le gamin de Paris, insistons-y, si fruste, et si entamé à la surface, est intérieurement à peu près intact. Chose magnifique à constater et qui éclate dans la splendide probité de nos révolutions populaires, une certaine incorruptibilité résulte de l'idée qui est dans l'air de Paris comme du sel qui est dans l'eau de l'océan. Respirer Paris, cela conserve l'âme.[...]

Soit dit en passant, ces abandons d'enfants n'étaient point découragés par l'ancienne monarchie. Un peu d'Égypte et de Bohême dans les basses régions accommodait les hautes sphères, et faisait l'affaire des puissants. La haine de l'enseignement des enfants du peuple était un dogme. À quoi bon les "demi-lumières" ? Tel était le mot d'ordre. Or l'enfant errant est le corollaire de l'enfant ignorant.

D'ailleurs, la monarchie avait quelquefois besoin d'enfants, et alors elle écumait la rue.

Sous Louis XIV, pour ne pas remonter plus haut, le roi voulait, avec raison, créer une flotte. L'idée était bonne. Mais voyons le moyen. Pas de flotte si, à côté du navire à voiles, jouet du vent, et pour le remorquer au besoin, on n'a pas le navire qui va où il veut, soit par la rame, soit par la vapeur; les galères étaient alors à la marine ce que sont aujourd'hui les steamers. Il fallait donc des galères; mais la galère ne se meut que par le galérien; il fallait donc des galériens. Colbert faisait faire par les intendants de province et par les parlements le plus de forçats qu'il pouvait. La magistrature y mettait beaucoup de complaisance. Un homme gardait son chapeau sur sa tête devant une procession, attitude huguenote; on l'envoyait aux galères. On rencontrait un enfant dans la rue, pourvu qu'il eût quinze ans et qu'il ne sût où coucher, on l'envoyait aux galères. Grand règne; grand siècle.

HUGO V. Les Misérables  
3e partie, Livre I, Chapitre VI  
Éditions Garnier, tome 1.

(1) aux environs de la révolution de 1848.

## DOCUMENT 2

### LA DÉLINQUANCE "D'EXCLUSION" IMPOSE UNE REDÉFINITION DES MISSIONS DE L'ÉTAT

**- Vous parlez, dans le cas de la France, de délinquance d'exclusion. Pouvez-vous nous la définir ~**

- Il me paraît important de bien se démarquer de l'idée actuelle selon laquelle il y aurait un noyau dur de délinquants multi-récidivistes qui empoisonnerait nos quartiers et qu'il faudrait éradiquer. Je pense au contraire qu'il faut évaluer précisément les types de délinquance. Il y a d'abord la délinquance initiatique, transitoire, où l'adolescent a besoin de se confronter à la loi, et pour lequel l'ordonnance de 1945 a prévu l'audience de cabinet. Cette rencontre ponctuelle entre l'enfant et son juge marque la loi et sa ritualisation permet à l'enfant de rencontrer ses limites. Et puis il y a la délinquance pathologique, lourde, liée à des troubles de personnalité, pour laquelle l'ordonnance de 1945 prévoit un travail long et difficile de prise en charge dans le cadre du tribunal pour enfants.

Mais, depuis les années 90, émerge un nouveau profil de délinquance, que j'ai appelé la

délinquance d'exclusion, qui coexiste avec les deux modèles antérieurs. C'est une délinquance massive, territorialisée, liée aux quartiers de la relégation et chronicisée par le chômage de longue durée. Elle se caractérise par l'adaptation à des formes de survie, à la débrouille individuelle, aux lois du business et finit par former une manière de vivre. C'est la délinquance qui devient socialisante et non les institutions. Tout cela forme une "fabrique délinquante": une série de jeunes, dans ces cités, qui veulent lever la chape de déveine qui pèse sur eux, refusent de jouer le jeu dans les règles et cherchent une reconnaissance en embrassant une "carrière" délinquante. Parmi ces jeunes cependant, il est important de rappeler qu'il y a toujours des individus qui souffrent. Les problèmes liés à la délinquance initiatique et pathologique demeurent. Simplement ils se complexifient par la dimension collective que prend cette délinquance aujourd'hui.

**- Cette délinquance des mineurs semble tenir toujours plus en échec les institutions traditionnelles que sont la famille, l'école...**

- Il y a en effet une défaillance des institutions classiques dans leur mission éducative à l'égard des mineurs délinquants. La police a abandonné la spécialisation des brigades des mineurs pour les délinquants; les foyers d'hébergement de la Protection judiciaire de la jeunesse (PJJ) ne contiennent plus les adolescents les plus difficiles - en 1996, environ 1000 mineurs ont été hébergés dans les foyers de la PJJ alors que 3600 étaient incarcérés; la psychiatrie offre peu d'accueils spécifiques pour les mineurs de quatorze à dix-huit ans; les conseils généraux s'engagent inégalement dans leur mission d'aide sociale à l'enfance... N'oublions pas que beaucoup de ces jeunes sont suivis par des associations aux faibles moyens; peu reconnues, loin des institutions officielles. Tout cela fait peser sur la justice le poids d'attentes qui excèdent ses capacités.

**- Cette situation vous paraît-elle être de nature à réviser les principes de la justice des mineurs, fondés par l'ordonnance de 1945 ?**

- Je crois qu'il est important de rester attaché à un texte fondateur qui exige une priorité éducative à l'égard des mineurs. Ceci étant, il est clair que la justice des mineurs connaît une grave crise de légitimité. Ses fondements, basés sur l'enfant, son histoire et sa personnalité, ne mordent plus sur la délinquance d'exclusion. Cette justice suppose du temps, pour individualiser les mesures et pour permettre la maturation du jeune, or, aujourd'hui, c'est l'urgence qui domine - on le voit bien avec l'instauration des procédures en temps réel. Elle est centrée sur le mineur, l'auteur des faits, alors que c'est la victime qui a une place de choix dans notre société compassionnelle. Elle est fondée sur l'idée d'éducation alors que c'est l'insertion qui domine désormais le travail social. Au final, c'est au moment où cette délinquance des mineurs devient une catégorie de la responsabilité politique, que ses fondements éducatifs, que l'on croyait inébranlables, sont remis en cause. On est donc arrivé à une croisée des chemins où se joue l'avenir de la justice des mineurs.

Entretien avec Denis SALAS (\*)  
*Le Monde*, 9 juin 1998.

(\*) ancien juge des enfants

### DOCUMENT 3

#### " UNE PLETHORE D'ORANGES MECANQUES (1) "

Il n'est pas de jour qui ne connaisse sa moisson d'actes de violence touchant villes, réseaux de transports urbains, écoles, HLM... Mais ces événements ne sont pas nouveaux. La délinquance évolue, se répète, se déplace et se renouvelle. Durant quatre siècles, une véritable extinction des crimes de sang (de plus de cent pour cent mille habitants à moins de deux) a été enregistrée. La ville a civilisé le crime. Cependant, au fil des ans, des phénomènes récurrents apparaissent. Bandes de mineurs délinquants des faubourgs ("apaches" au début du siècle, "blousons noirs" ou "loubards" après la seconde guerre mondiale), criminalité sur la première ligne du métro dès son ouverture, en 1900, développement de la toxicomanie (100 000 cocaïnomanes à Paris en 1921).

La délinquance d'appropriation explose dès 1964, en pleine période de plein-emploi. La statistique des faits constatés passera ainsi de 500 000 faits dans l'après-guerre à 4 millions en 1994 pour retomber à 3,5 millions en 1997.

La déstructuration de la cellule familiale, le départ des retraités vers un univers séparé, la progression des familles monoparentales (1,3 million) créaient des espaces sans présence donc sans surveillance. En complément, l'arrivée sur le marché de nouveaux produits de consommation (véhicules, télévisions, autoradios...) engendrait une forte augmentation de la délinquance contre les biens, qui atteignait ensuite la voie publique, impliquant un retour aux agressions contre les personnes... pour atteindre les biens. Le tout combiné avec de nouvelles "offres" : téléphones portables, distributeurs de billets...

"Orphelins de 16 h 30", les scolaires se retrouvaient laissés à eux-mêmes, les parents travaillant de plus en plus tard, les grands-parents n'assurant plus le relais, l'école ne prodiguant plus les devoirs surveillés, expulsant les enfants les plus perturbants et connaissant un absentéisme scolaire rarement traité. Plus important: pour la première fois dans notre histoire, l'univers virtuel, moins celui de la télévision que celui des jeux vidéo, permet à des enfants de plus en plus jeunes et de plus en plus dépendants de leurs consoles de vivre dans un monde parallèle, imitant le plus possible le réel, ou les actions, même les plus meurtrières, n'ont jamais de conséquences. Chaque mort vaut des points, chaque partie permet la résurrection des victimes antérieures. [...]

Ce n'est donc pas de la nouveauté de ces phénomènes qu'il faut s'inquiéter, mais du renversement de tendance qu'ils démontrent. Le nombre de mineurs délinquants n'a jamais été aussi important (près de 20 % du total des mis en cause). Ils sont plus jeunes, plus récidivistes, plus violents. Les structures sociales et éducatives issues des ordonnances de 1945 et de 1958 ne semblent plus répondre aux actions de jeunes qui, suivant la logique du " *déni, défi, délit* ", attaquent désormais tous les représentants des institutions (policiers, pompiers, agents des sociétés HLM, agents EDF, postiers et même médecins). En même temps, le nombre de jeunes mineurs délinquants emprisonnés n'a jamais été aussi faible, même si les incriminations sont

de plus en plus fortes et les peines de plus en plus longues.

La délinquance est devenue un phénomène d'expression sociale, marqué par des tendances d'enfermement dans un univers fini, "le quartier", marqué par des modes d'appropriation qui vont des tags au contrôle territorial caractérisé par des passages de "frontières", sans oublier l'utilisation des téléphones portables ou des "pagers" pour l'organisation des trafics. Les bandes se féminisent, développent des dépendances à l'alcool, connaissent un niveau de troubles psychiatriques important. Près de 1100 quartiers sont "sensibles" en France, environ 200 présentent des signes tangibles de rejet des institutions et d'agressions récurrentes contre ses représentants. Les affrontements sont de plus en plus violents, homicides et tentatives sont en hausse constante et les saisies d'armes à feu sont loin d'être anecdotiques.

Pour autant, l'économie souterraine et le trafic organisé de produits stupéfiants sont, paradoxalement, des facteurs de stabilité interne, comme l'islamisme militant. Pour des raisons liées à la volonté de ne pas attirer l'attention de la police, un autre ordre se substitue à l'Etat républicain, mettant les autorités devant un dilemme complexe: choisir de rétablir l'ordre ou se contenter d'une absence de désordres visibles.

BAUER A. (2)

Le Monde, 2 juin 1998.

(1) Ce titre fait allusion au film Orange mécanique qui a dénoncé la violence au début des années 70.

(2) Alain BAUER est PDG d'AB Associates, conseil en sûreté urbaine, enseignant à l'IEP de Paris, à l'université Paris V et à la Sorbonne.

#### DOCUMENT 4



Dessin de PLANTU

Tiré de "C'est le goulag"

Édition La découverte /Le Monde, 1983.

**Tiny factory cleans up dirty water**

A FACTORY on a silicon chip <sup>(1)</sup>, complete with mixing vats and separation systems, could help water companies to detect dangerous microorganisms in the water supply.

Infections by water-borne parasites have been on the increase in Britain as water shortages force suppliers to use unfamiliar sources to refill reservoirs.

10 In 1989, for example, 500 people in Swindon suffered from chronic diarrhoea after drinking water that was contaminated with the parasite *Cryptosporidium*. Nearly 300 people in Devon suffered the same fate in August last year.

15 So far the parasite detection "factory" exists only as a collection of parts, but Ron Pethig and Julian Burt at the University of Wales at Bangor are embarking on a three 20 year research programme to put all the pieces together.

The mixers in the tiny factory use a phenomenon called dielectrophoresis to harness <sup>(2)</sup> the electrical charges generated 25 by every living thing. "We know quite a bit about the capacitance and resistance of a cell, and these properties govern how microorganisms respond in an electric field," says Pethig. [...]

30 If the researchers want to tag <sup>(3)</sup> a particular organism to distinguish it from any other particles in the sample they can label <sup>(4)</sup> it with a tiny polystyrene bead <sup>(5)</sup> coated with antibodies specific to that 35 organism. The bead changes the way the microorganism moves in an electric field and makes it easier to spot <sup>(6)</sup>. Pethig says that simple image-processing techniques will be used to spot whether particular parasites 40 are present by the way they spin or move. [...]

Pethig says the factory could have far wider applications. For example, cells that become cancerous often begin to respond 45 differently to electric fields long before other tests would single them out as cancerous.

Bangor's parasite detection factory is part of a wider trend towards miniaturising 50 chemical and biochemical processes. For example, a team at the Oak Ridge National Laboratory in Tennessee is developing a DNA analyser that fits on a chip.

The chip works with samples 55 100 000 times smaller than normal, and can perform an analysis using enzymes in five minutes rather than an hour.

**Mark Ward**  
**New Scientist- 13 Avril 1996**

- a) silicon chip: puce électronique
- b) to harness: to use the power of
- c) to tag: to mark for identification

- d) to label: to tag
- e) a bead: a very small ball
- f) to spot: to recognize

## QUESTIONS

### I - COMPREHENSION

- 1- Rendez compte en français des informations essentielles contenues dans cet article. (8 points)
- 2- Traduisez en français de la ligne 42 (Pethig says...) jusqu' à la dernière ligne (...rather than an hour). (5 points)

### II - EXPRESSION

Water as a natural element is more and more at risk; how can chemical and technical processes help save it for future generations? (80 - 100 mots) (7 points)

DICTIONNAIRE BILINGUE AUTORISÉ

### EPREUVE DE MATHÉMATIQUES.

DURÉE : 2 HEURES

COEFFICIENT : 1,5

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 .

Le formulaire de mathématiques est joint au sujet. (NDLR: il n'est pas joint dans ces Annales)  
2 feuilles de papier millimétré par candidat.

#### **Exercice I: (9 points)**

Une entreprise fabrique des pots de peinture.  
Elle les fait livrer habituellement par lots de 20 pots ou de 100 pots. On se propose d'étudier les variations de la quantité d'un certain produit A contenu dans chaque pot.

#### **Partie A**

On suppose que la production totale de l'entreprise est très importante et que 7,5 % des pots fabriqués contiennent plus de 110 g de substance A. On note X la variable aléatoire qui à tout tirage aléatoire de 20 pots (tirage considéré comme tirage avec remise) associe le nombre de pots contenant plus de 110 g de substance A. On note de même Y la variable associée dans le cas de tirages de 100 pots.

1 °) Préciser la loi de X.

2°) Calculer au millième le plus proche la probabilité de l'évènement "  $X = 1$  ".

3°) Préciser la loi de Y.

4°) On veut approcher la loi de Y par une loi de Poisson de même espérance mathématique. Préciser le paramètre de cette loi de Poisson.

5°) En supposant que Y suive effectivement la loi de Poisson ainsi définie, donner une approximation au millième le plus proche de la probabilité de l'événement " $Y \leq 6$ ".

### Partie B

On a contrôlé le dosage du produit A à la sortie de deux chaînes de fabrication.

Deux échantillons de 100 pots ont été analysés; l'un provient de la chaîne n°1, l'autre de la chaîne n°2.

Le tableau suivant donne la répartition de l'échantillon de la chaîne n°1 en fonction de la masse de produit A exprimée en grammes.

m (en g)	[100,102[	[102,104[	[104,106[	[106,108[	[108,110[	[110,112[
Effectifs	1	3	25	32	27	6
m (en g)	[112,114[	[114,116[				
Effectifs	4	2				

On donne des valeurs approchées de la moyenne  $m_2$  et de l'écart type  $\sigma_2$  de l'échantillon fabriqué par la chaîne n°2:  $m_2 = 107$  et  $\sigma_2 = 2$  (en grammes).

Dans les questions 1 et 2 les valeurs seront arrondies au dixième le plus proche.

1°) En prenant les centres des classes, calculer une approximation de la moyenne  $m_1$  et de l'écart type  $\sigma_1$  de l'échantillon issu de la chaîne n°1.

2°) En considérant les résultats obtenus dans la première question, donner les estimations ponctuelles:

- des quantités moyennes  $\mu_1$  et  $\mu_2$  de produit A pour les productions de ces deux chaînes,
- des écarts types  $s_1$  et  $s_2$  correspondants.

3°) On se propose de savoir si la différence des moyennes observées dans les deux échantillons est due à des fluctuations d'échantillonnage ou si la chaîne de fabrication n°1 produit des pots contenant davantage de produit A que la chaîne n°2.

On note  $X_1$  la variable aléatoire qui à tout échantillon aléatoire de 100 pots provenant de la chaîne n°1 associe la quantité moyenne de produit A dans cet échantillon.

On note  $X_2$  la variable aléatoire qui à tout échantillon aléatoire de 100 pots provenant de la chaîne n°2 associe la quantité moyenne de produit A dans cet échantillon.

On admettra que:

- $X_1$  suit une loi normale de paramètres  $m_1$  et  $\frac{s_1}{10}$ ;

10

- $X_2$  suit une loi normale de paramètres  $m_2$  et  $\frac{s_2}{10}$  ;
- $X_1$  et  $X_2$  sont des variables aléatoires indépendantes;
- $D = X_1 - X_2$  suit une loi normale.

On choisit l'hypothèse nulle  $H_0$ : " $\mu_1 = \mu_2$ " contre l'hypothèse alternative  $H_1$ : " $\mu_1 > \mu_2$ "

- Calculer la variance de la variable aléatoire  $D$ . On appelle  $\sigma(D)$  son écart type. Vérifier que  $\sigma(D) = 0,32$ .
- Calculer au centième le plus proche le réel  $a$  tel que  $P(D < a) = 0,99$ .
- L'hypothèse nulle  $H_0$  est-elle acceptée ou rejetée (au seuil de 1%) ?

**Exercice II: (11 points)**

Dans cet exercice, les quatre parties peuvent être traitées de façon indépendante. La partie A a pour objet la détermination d'une loi d'évolution à partir de données statistiques. Les parties B et C correspondent à des modélisations données du phénomène étudié. La partie D envisage l'évolution de la population dans un nouveau contexte.

**Partie A:**

On procède à une réimplantation d'écrevisses. On lâche 100 individus et on relève tous les six mois l'effectif  $n$  de la colonie d'écrevisses en fonction du temps écoulé  $t$  (exprimé en mois). On obtient ainsi huit effectifs  $n_i$  ( $i$  variant de 1 à 8):

Temps $t_i$ (en mois)	0	6	12	18	24	30	36	42
Effectifs $n_i$	100	160	350	900	2500	7500	22000	64000

- On pose  $y = \ln(3n - 200)$  où  $\ln$  représente la fonction logarithme népérien. Calculer les valeurs  $y_i = \ln(3n_i - 200)$  pour  $i$  variant de 1 à 8 (valeurs décimales arrondies au millième le plus proche). On donnera ces valeurs dans un tableau.
- Représenter le nuage de points  $M_j(t_i; y_i)$  dans un repère orthogonal (unités graphiques: 3 cm pour 6 mois sur l'axe des abscisses, 1 cm par unité sur l'axe des ordonnées).
- Donner une équation de la droite de régression de  $y$  en  $t$  (les coefficients seront donnés sous forme décimales, au centième le plus proche) et en déduire l'expression de  $n$  en fonction de  $t$  associée à cet ajustement.

### **Partie B:**

Dans cette partie, on considère que la fonction donnant le nombre d'individus en fonction du temps  $t$  (exprimé en mois) est représentée par une solution de l'équation différentielle (E):  $X' - 0,18 X = -12$ .

1°) Résoudre l'équation différentielle d'inconnue  $X$ :  $X' - 0,18 X = 0$ .

2°) Sachant que (E) admet une solution particulière  $X_0$  constante, donner la solution générale de (E).

3°) Déterminer la solution de (E) qui vérifie  $X(0) = 100$ .

### **Partie C:**

Soit  $(O, i, j)$  un repère orthogonal (unités graphiques: 1 cm pour 3 mois sur l'axe des abscisses et 1 cm pour 4000 unités sur l'axe des ordonnées).

1°) Soit  $N$  la fonction définie sur l'intervalle  $I = [0; 42]$  par  $N(t) = \frac{100}{3} e^{0,18t} + \frac{200}{3}$ .

Etudier le sens de variation de  $N$  sur  $I$ .

2°) Tracer la courbe représentative de  $N$  dans le repère  $(O, i, j)$ . On suppose que cette fonction représente correctement l'évolution du nombre d'écrevisses.

### **Partie D:**

A partir de  $t = 42$ , on décide d'autoriser la pêche aux écrevisses.

On admet que la population d'écrevisses est alors représentée par la fonction  $F$  définie sur l'intervalle  $[42; 72]$  par  $F(t) = 64\,000 e^{-0,043(t-42)}$ .

1°) Etudier  $F$  sur l'intervalle  $[42; 72]$  (variation et valeurs aux bornes).

2°) Tracer la courbe représentative de  $F$  dans le repère précédent (partie C), sur le même graphique qu'à la question C 2°).

3°) Déterminer graphiquement l'instant où la population devient inférieure à 32 000 individus.

## MATHEMATIQUES : éléments de corrigé

Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit ci-dessous d'éléments de corrigé, afin d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

### Exercice 1 :

#### Partie A

1. On répète 20 fois le même événement de manière indépendante.

Cet événement n'a que deux issues possibles:

- le pot contient plus de 110g de substance A avec une probabilité  $p = 0,075$
- le pot contient moins de 110g de substance A avec une probabilité  $q = 1 - p = 0,925$

X suit donc la loi binomiale  $\beta(20; 0,075)$

2.  $P(X=1) = C_{20}^1 p^1 (1-p)^{19} \approx 0,341$

3. Pour des raisons identiques, Y suit la loi binomiale  $\beta(100; 0,075)$

4. On approche la loi Y par la loi de Poisson de paramètre  $\lambda = 100 \times 0,075 = 7,5$

$$5. P(Y \leq 6) = e^{-7,5} \left( 1 + 7,5 + \frac{7,5^2}{2} + \frac{7,5^3}{6} + \frac{7,5^4}{24} + \frac{7,5^5}{120} + \frac{7,5^6}{720} \right) \\ \approx 0,378$$

#### Partie B

1. Les valeurs approchées de la moyenne  $m_1$  et de l'écart-type  $\sigma_1$  de l'échantillon issu de la chaîne 1 sont :  $m_1 \approx 107,5g$  et  $\sigma_1 \approx 2,5g$

2. a. estimation pour  $\mu_1 : 107,5g$  pour  $\mu_2 : 107g$

b. estimation pour  $\sigma_1 : 2,5 \sqrt{\frac{100}{99}} \approx 2,5$ ; pour  $\sigma_2 : 2 \sqrt{\frac{100}{99}} \approx 2$  (en gramme)

3. a. Les variables  $\bar{X}_1$  et  $\bar{X}_2$  sont indépendantes, donc :

$$V(D) = V(\bar{X}_1) + V(\bar{X}_2) = 0,25^2 + 0,2^2 = 0,1025$$

D'où :  $\sigma(D) \approx 0,32$

b. Sous l'hypothèse  $H_0$ , D suit la loi normale de moyenne 0 et d'écart-type 0,32.

D'où,  $P(D < a) = \Phi\left(\frac{a}{0,32}\right) = 0,99$ . On en déduit (lecture table) que :  $a \approx 0,75$

c. Comme  $m_1 - m_2 = 0,5$  et  $0,5 < 0,75$ , l'hypothèse nulle  $H_0$  est acceptée au seuil de risque de 1%.

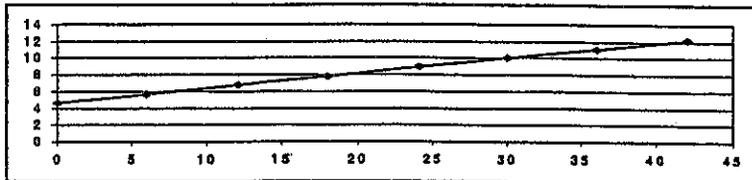
### Exercice 2 :

#### Partie A

1.

Temps $t_i$ (en mois)	0	6	12	18	24	30	36	42
Effectifs $n_i$	100	160	350	900	2500	7500	22000	64000
$y_i$	4,605	5,635	6,745	7,824	8,896	10,012	11,094	12,164

2. nuage de points



3. droite de régression de  $y$  en  $t$  (calculatrice)

$$y = 0.18t + 4.58$$

On en déduit que  $n(t) = 32.50 e^{0.18t} + 66.67$

**Partie B**

1.  $x(t) = C e^{0.18t}$  avec  $C$  constante réelle

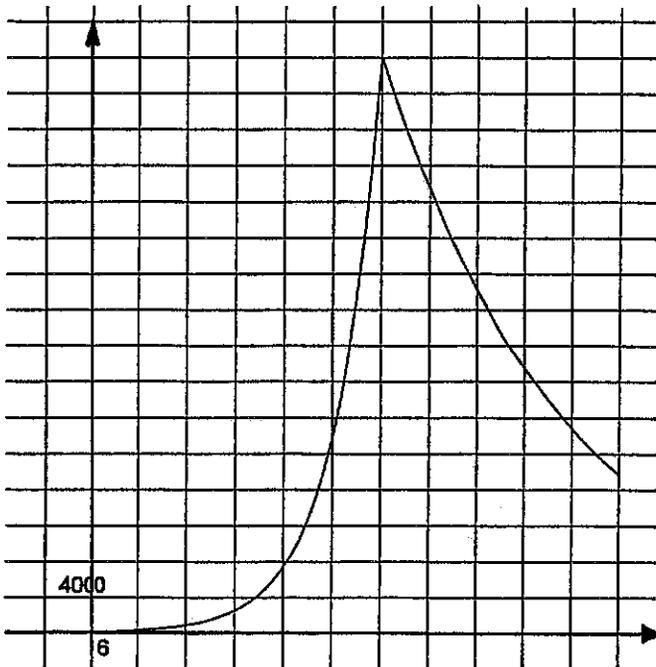
2.  $X_0 = \frac{200}{3}$ . La solution générale de l'équation (E) est :  $X(t) = C e^{0.18t} + \frac{200}{3}$

3.  $X(0) = C + \frac{200}{3}$ ; d'où :  $X(t) = \frac{100}{3} e^{0.18t} + \frac{200}{3}$

**Partie C**

1.  $N$  est croissante sur  $I$  (signe dérivée ou fonction exponentielle)

2. Courbe



**Partie D**

1.  $F'(t) = -0.043 \times 64\,000 e^{-0.043(t-42)}$ .  $F'(t)$  est négative sur  $[42; 72]$ ,  $F$  est décroissante sur cet intervalle.

$$F(42) \approx 64\,000 \text{ et } F(72) \approx 17\,617$$

2. courbe

3. Graphiquement, la population des écrevisses devient inférieure à 32 000, à partir de 58 mois.

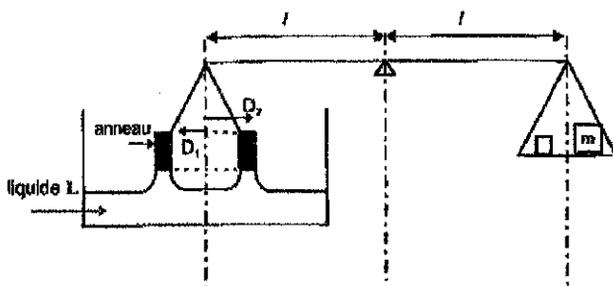
**EPREUVE DE SCIENCES PHYSIQUES.****DURÉE : 2 HEURES****COEFFICIENT : 2,5**

\*La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

\*L'usage de la calculatrice est autorisé.

**D) TENSION SUPERFICIELLE (12 points/50)**  
**LES TROIS QUESTIONS SONT INDEPENDANTES -**

1) Pour mesurer le coefficient de tension superficielle  $\sigma$  d'un liquide L parfaitement mouillant, on utilise un anneau circulaire, de section mince rectangulaire, dont les diamètres intérieur et extérieur sont respectivement:  $D_1 = 2,20$  cm et  $D_2 = 2,40$  cm. Cet anneau est suspendu à l'extrémité du fléau d'une balance (voir schéma ci-dessous).



Le poids de la surcharge de masse  $m = 426$  mg placée dans le plateau de droite est égal à la force  $F$  due à la tension superficielle, juste à l'arrachement.

- a) Montrer que l'expression de la force  $F$  en fonction de  $D_1$ ,  $D_2$  et  $\sigma$  s'écrit  $F = \sigma \pi (D_1 + D_2)$ .  
 b) Calculer la valeur de  $\sigma$ .

On donne :  $g = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$ .

2) Pour vérifier le résultat précédent, on mesure la hauteur  $h$  d'ascension capillaire du liquide L dans un tube vertical de diamètre intérieur  $d = 1$  mm. On obtient:  $h = 13,4$  mm.

Sachant que la masse volumique du liquide est  $\rho = 884 \text{ kg.m}^{-3}$ , déterminer la valeur du coefficient de tension superficielle  $\sigma$  obtenue par cette méthode.

On rappelle que la hauteur d'ascension capillaire est donnée par la loi de Jurin:

$$H = \frac{2\sigma}{\rho \cdot g \cdot r}$$

$\rho, g, r$

$h = 0,8$  où  $r$  est le rayon du tube capillaire.

3) Une autre vérification est possible: elle consiste à utiliser un compte-gouttes qui laisse s'écouler un volume  $V$  donné de liquide et à compter le nombre de gouttes correspondant avec un liquide étalon  $L_0$ , puis avec le liquide  $L$  à étudier.

La loi de Tate donne la relation entre la masse  $m$  d'une goutte et le coefficient de tension superficielle  $\sigma$  d'un liquide:

$$m = k \cdot 2 \cdot \pi \cdot R \cdot \sigma$$

où  $R$  est le rayon du compte-gouttes et  $k$  une constante.

Avec de l'eau utilisée comme liquide étalon, on compte  $n_0 = 25$  gouttes dans un volume  $V$ .

Avec le liquide étudié, on compte  $n = 56$  gouttes pour le même volume  $V$ .

En exprimant  $m$  en fonction de  $\rho$ ,  $n$  et  $V$  et  $m_0$  en fonction de  $\rho_0$ ,  $n_0$  et  $V$ , calculer le coefficient de tension superficielle  $\sigma$  du liquide étudié.

Conclure concernant la validité de ces trois méthodes.

On donne: \* pour l'eau, à la température considérée:  $\sigma_0 = 73 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$   
 $\rho_0 = 1000 \text{ kg.m}^{-3}$

**ID MICROSCOPE** (13 points/50)  
- LA QUESTION 2 EST INDEPENDANTE -

Un microscope réduit comporte un objectif et un oculaire de distances focales respectives

$f_1 = 5,000 \text{ mm}$  et  $f_2 = 20,00 \text{ mm}$ . Ils sont distants de  $20,00 \text{ cm}$ . L'oeil est placé au foyer image de l'oculaire et observe, à travers le microscope, l'image finale  $A'B'$  d'un objet  $AB$ . L'image intermédiaire sera appelée  $A_1B_1$ .

- 1)
  - a) Calculer la position de l'objet  $AB$  par rapport au centre optique  $O$ , de l'objectif quand l'oeil, supposé normal, n'accorde pas.  
 Faire un schéma clair et calculer la position de l'objet à  $1 \times 10^{-3} \text{ mm}$  près.
  - b) Quels sont, dans ces conditions, la puissance  $P_i$  et le grossissement  $G_c$  commercial de l'instrument ?
  - c) Lorsque l'oeil accommode au maximum, la position de l'objet  $AB$  par rapport au centre optique  $O$ , de l'objectif est telle que  $O_1A = -5,142 \text{ mm}$ .  
 À l'aide de la réponse à la question 1)a), en déduire la latitude de mise au point et conclure en ce qui concerne cette mise au point.
- 2) Le pouvoir séparateur d'un microscope est limité par le phénomène de diffraction.  
 La dimension  $AB$  du plus petit objet observable est donnée par la relation:  $AB = \frac{1,22 \lambda}{2n \sin u}$ 
  - a) Calculer  $AB$  lorsque l'objet est dans l'air, la longueur d'onde de la lumière utilisée étant  $\lambda = 555 \text{ nm}$  et l'angle  $u$  valant  $60^\circ$ .
  - b) Comment,  $u$  et  $\lambda$  étant maintenus constants, peut-on améliorer ce pouvoir séparateur ?

### III) CHIMIE GENERALE (11 points/50)

Dans un ballon vide à 25°C, on introduit du dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> et de l'ammoniac NH<sub>3</sub>. Il s'établit l'équilibre:



urée

- 1) Ecrire l'expression de la constante d'équilibre K<sub>p</sub> correspondant à cette réaction.
- 2) À partir des données thermodynamiques rassemblées dans le tableau ci-dessous, déterminer les valeurs Δ<sub>r</sub> H<sup>o</sup>, Δ<sub>r</sub> S<sup>o</sup>, Δ<sub>r</sub> G<sup>o</sup> d'enthalpie, d'entropie et d'enthalpie libre standards de réaction pour l'équilibre ci-dessus à 25°C.
- 3) En déduire la valeur de K<sub>p</sub> à 25°C.
- 4) Comment évolue l'équilibre:
  - a) si on augmente la température à pression constante ?
  - b) si on augmente la pression à température constante ?
  - c) si on introduit de l'urée solide dans le milieu réactionnel ?

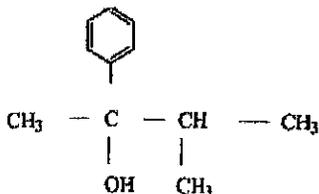
#### Données:

	Enthalpie standard de formation à 25°C Δ <sub>r</sub> H <sup>o</sup> kJ.mol <sup>-1</sup>	Entropie standard à 25°C S <sup>o</sup> J.k <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup>
1. CO <sub>2</sub> (g)	1. -392,92	1. 213,43
2. H <sub>2</sub> O (g)	2. -241,60	2. 188,56
3. NH <sub>3</sub> (g)	3. -46,15	3. 192,32
4. CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (s)	4. -332,85	4. 104,50

$$R = 8,31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$$

### IV) CHIMIE ORGANIQUE: SYNTHESE DU TRYPARANOL (14 points/50)

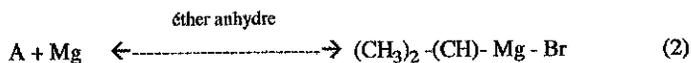
1. Le tryparanol ou 3-méthyl-2-phénylbutan-2-ol de formule semi-développée:



est un composé d'intérêt pharmaceutique.

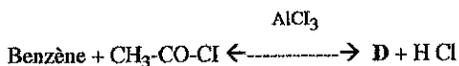
Il peut être obtenu par la séquence réactionnelle suivante:

1.1.



Donner la formule et le nom de A.

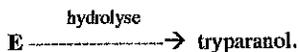
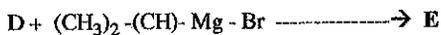
1.2.



Écrire l'équation bilan de la réaction et détailler son mécanisme.

Préciser le nom de D.

1.3.



Écrire les équations-bilans de ces deux réactions.

2. Le trypanol possède-t-il une activité optique ? Justifier votre réponse.

Représenter les stéréoisomères du trypanol selon la perspective de Cram (ou perspective cavalière) et les nommer en justifiant vos réponses.

## **EPREUVE DE BIOCHIMIE - BIOLOGIE.**

**DURÉE : 4 HEURES**

**COEFFICIENT : 6**

### REMARQUES PRELIMINAIRES:

- 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.  
Calculatrice autorisée.

### **ÉTUDE DE LA CONDUCTION ET DE LA TRANSMISSION DE L'INFLUX NERVEUX: EXEMPLE DE LA FIBRE CHOLINERGIQUE**

#### **1 - LES PHENOMENES ELECTRIQUES DE LA CONDUCTION NERVEUSE (29 points)**

1.1. Le document 1 est une représentation schématique de neurone. Nommer les structures numérotées de 1 à 6 .

1.2. Le neurone est une cellule excitable. Au repos, sa membrane est soumise à une différence de potentiel (ddp) entre les faces interne et externe.

1.2.1. Donner l'ordre de grandeur de cette ddp. Comment est-elle orientée ? Comment peut-on la mettre en évidence ?

1.2.2. Présenter les phénomènes ioniques expliquant cette ddp.

1.3. L'excitation du neurone se traduit par des variations de son potentiel de membrane.

1.3.1. Représenter sur un schéma les variations de la ddp lors du passage de l'influx nerveux en indiquant le potentiel électrique (mV) en ordonnée et le temps (ms) en abscisse.

1.3.2. Positionner sur le même schéma les phénomènes ioniques responsables de la naissance de l'influx nerveux. Commenter succinctement la chronologie des phénomènes.

1.4. L'influx nerveux se propage ensuite le long de l'axone. La sclérose en plaque présente les caractéristiques d'une maladie auto-immune qui se traduit par la démyélinisation des fibres nerveuses. Cette maladie est particulièrement fréquente chez la jeune femme. Elle est souvent associée à la présence de l'allèle HLA DR<sub>2</sub>

1.4.1. Comparer la conduction nerveuse le long d'une fibre myélinisée et amyélinisée.

1.4.2. Donner une définition brève de l'auto-immunité.

1.4.3. Pour quelle classe d'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) codent

les gènes HLA D(DP, DQ, DR) ?

1.4.4. Sur quelles cellules trouve-t-on cette classe d'antigène ?

1.4.5. Faire un schéma de la structure d'un antigène du CMH, en précisant la situation de cet antigène dans la cellule.

1.4.6. Les gènes HLA D sont-ils bi ou polyalléliques ? Définir les termes bi et polyalléliques.

1.4.7. Sachant que les allèles des gènes HLA D sont codominants, considérer le cas d'une femme de génotype HLA DR<sub>2</sub> /HLA DR<sub>3</sub> et de son mari de génotype HLADR<sub>2</sub>/HLADR<sub>5</sub>.

- Cette femme peut-elle être atteinte de sclérose en plaque ?

- Quelle est la probabilité pour qu'un enfant de ce couple hérite de l'allèle HLA DR<sub>2</sub> ?

## **2 - LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE (91 points).**

### **2.1. La synthèse d'acétylcholine (ACH) (27 points).**

2.1.1. L'acétylcholine est synthétisée dans les terminaisons axonales à partir d'acétyl CoA et de choline sous l'action de la choline acétyltransférase.

Ecrire sous forme chimique l'équation de la réaction catalysée par cette enzyme. (La formule du coenzyme A n'est pas exigée).

**Donnée:** formule de la choline:  $(\text{CH}_3)_3 - \text{N}^+ - (\text{CH}_2)_2 \text{OH}$

2.1.2. L'une des origines de l'acétyl CoA mitochondrial est la décarboxylation oxydative du pyruvate. Cette décarboxylation est catalysée par un complexe multienzymatique.

2.1.2.1. Donner la définition d'un complexe multienzymatique.

2.1.2.2. Ecrire l'équation globale de la décarboxylation oxydative du pyruvate.

Préciser les différentes étapes en soulignant les fonctions des enzymes et coenzymes impliqués (les structures chimiques des coenzymes ne sont pas exigées).

2.1.3. Une autre origine de l'acétyl CoA mitochondrial est la dégradation oxydative des acides gras (ou  $\beta$ -oxydation des acides gras).

2.1.3.1. Détailler la séquence réactionnelle (noms des enzymes, des coenzymes, structures chimiques des substrats et produits) convertissant un acylCoA à n carbones en un acylCoA à n-2 carbones.

2.1.3.2. À partir du laurylCoA, établir les bilans moléculaire et énergétique en ATP de l'oxydation de cet acylCoA en acétylCoA.

**Données:**

- l'acide laurique est un acide gras linéaire saturé à 12 atomes de carbone,

- la valeur du rapport P sur O en aérobiose pour NADH, H<sup>+</sup> est égale à 3; pour FADH<sub>2</sub>, elle est égale à 2.

## 2.2. La libération de l'acétylcholine (1 2 points).

*Clostridium botulinum* est un bacille Gram positif producteur d'une toxine ayant un effet sur la libération de l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire.

2.2.1. Rappeler le mode d'action, la nature et les propriétés de la toxine botulique.

2.2.2. Les jambons crus artisanaux et les conserves domestiques présentent les conditions de la toxinogénèse permettant d'être à l'origine de cas de botulisme. Expliquer.

2.2.3. Exposer en le justifiant le mode de traitement du botulisme.

## 2.3. Les récepteurs (52 points).

L'acétylcholine (ACH) se fixe au niveau des cellules cibles sur des récepteurs spécifiques.

2.3.1. Les récepteurs à l'ACH sont aussi des récepteurs de haute affinité pour le virus de la rage (22 points).

Ce virus comporte une nucléocapside à symétrie hélicoïdale. C'est un virus enveloppé à ARN monocaténaire négatif. L'ARN est associé dans la nucléocapside à la protéine L (ARN polymérase ARN dépendante d'origine virale). L'enveloppe est doublée intérieurement de protéines de matrice et couverte de spicules de glycoprotéines.

2.3.1.1. Nommer les structures numérotées 1 à 6 sur le document 2.

2.3.1.2. Expliquer, éventuellement à l'aide de schémas, l'origine de l'enveloppe virale et le mode de production du virus par la cellule infectée.

2.3.1.3. Expliquer l'expression ARN négatif et justifier l'importance de la protéine L.

2.3.1.4. Faire un schéma de la réplication de ce virus en faisant apparaître les formes répliquatives et les intermédiaires de réplication.

2.3.1.5. La multiplication du virus sur les cultures de cellules en lignées continues (cellules Vero) est très productive de virus. Ces préparations montrent peu d'effet cytopathique (ECP) mais permettent la fabrication de vaccins.

- Définir brièvement l'effet cytopathique.

- Citer un exemple d'ECP observable sur des cellules en culture.

2.3.1.6. L'interaction virus/cellule n'est pas toujours de type productif. Elle peut être de type abortif ou de type transformant (intégratif).

- Expliquer ces deux derniers types d'interaction.

I) Préciser leurs conséquences pour la cellule infectée.

II)

2.3.2. Apport du génie génétique à l'étude du récepteur nicotinique (14 points).

Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine est un oligomère formé de sous-unités différentes.

2.3.2.1. L'ADN complémentaire codant pour chaque sous-unité est cloné et sa séquence déterminée; à partir de cette séquence, on déduit la séquence primaire de chaque sous-unité.

- Définir l'ADN complémentaire.

2.3.2.2. On peut aussi faire produire les sous-unités protéiques par un système d'expression.

Les ARN messagers sont isolés et injectés dans les ovocytes de Xénope qui synthétisent alors les protéines correspondantes: il s'agit de la traduction des ARN messagers en chaîne polypeptidique.

- Citer les différentes étapes de la traduction.
- Etudier l'étape d'élongation de la chaîne à l'aide de schémas annotés.

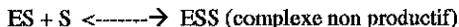
2.3.3. La dégradation de l'acétylcholine (16 points).

L'acétylcholine présente dans la fente synaptique est dégradée par l'acétylcholinestérase (ACHE) ou acétylcholine acétylhydrolase (EC 3.1.1.7.).

Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide éthanoïque.

2.3.3.1. Inhibition de l'enzyme par excès de substrat.

L'acétylcholinestérase présente la particularité de subir une inhibition par apport excédentaire de substrat. On peut admettre le schéma réactionnel simplifié suivant:



- Quel sera le profil de la courbe  $v = f([S])$  ?
- Sachant que le centre actif de l'enzyme comporte deux sites, un site anionique et un site estérasique, distants de 0,7 nanomètres, proposer, à l'aide d'un schéma explicite, une interprétation du phénomène d'inhibition par apport excédentaire de substrat.

2.3.3.2. Action de la prostigmine sur l'enzyme.

On réalise une étude cinétique à 25°C et à pH 7,8 de l'effet inhibiteur de la prostigmine sur l'acétylcholinestérase; les courbes  $v^{-1} = f([S]^{-1})$  figurent sur le document 3 (représentation de LINEWEAVER-BURK avec  $v =$  vitesse réactionnelle et  $[S] =$  concentration en substrat du milieu réactionnel).

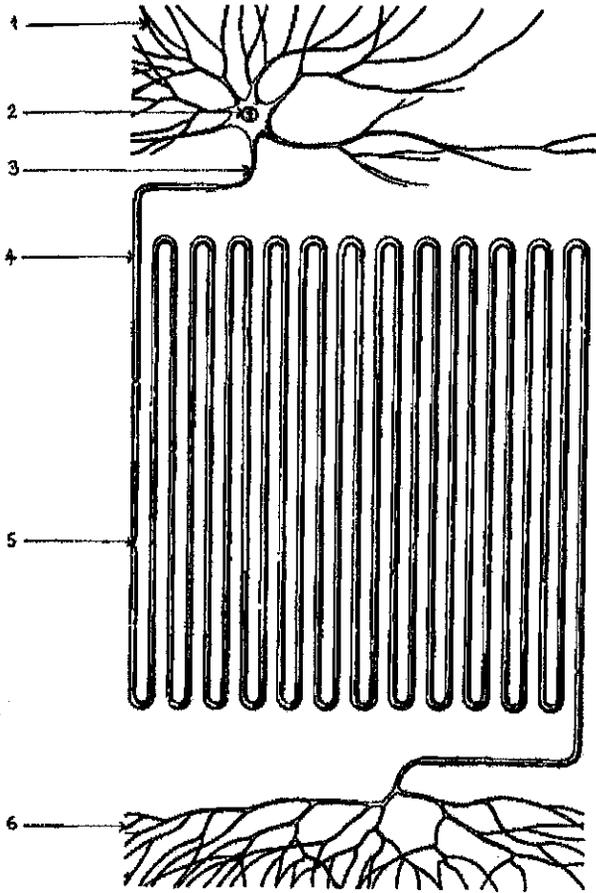
- En absence d'inhibiteur, que représentent le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine de la figure du document 3 ?
- Déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme en absence de prostigmine et préciser la signification de chaque paramètre.
- Caractériser l'effet inhibiteur de la prostigmine sur l'acétylcholinestérase sachant que  $c_2$  est supérieur à  $c_1$ . Justifier la réponse.

2.3.3.3. La prostigmine est un médicament utilisé pour traiter les constipations opiniâtres. Un de ses effets indésirables est la bradycardie.

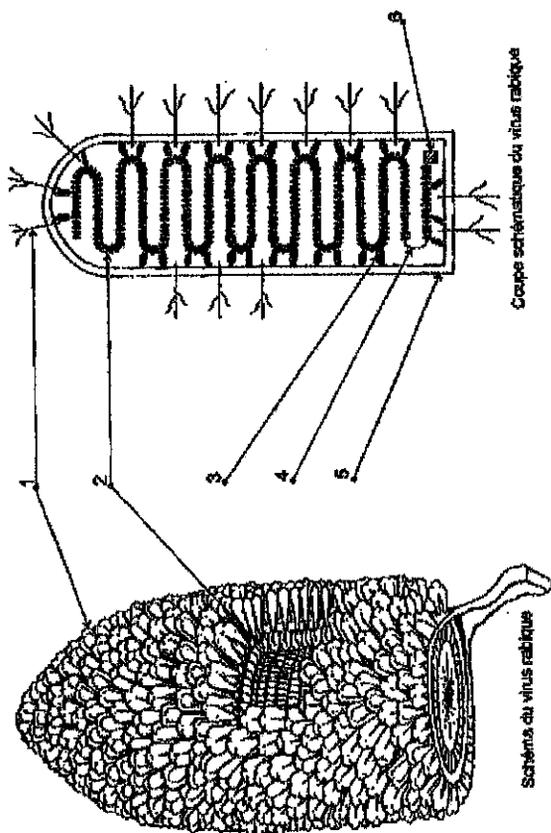
Rappeler l'effet de l'acétylcholine sur le cœur et sur l'intestin.

Expliquer l'effet de ce médicament sur le cœur et l'intestin.

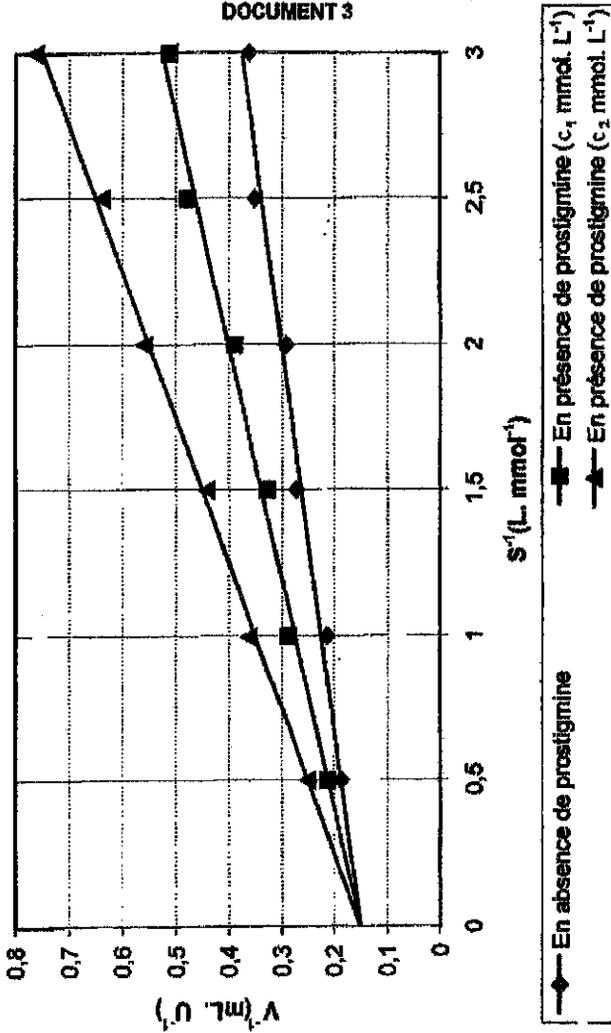
DOCUMENT 1



DOCUMENT 2



DOCUMENT 3



**EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.**

**Première partie : ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.**

**DURÉE : 4 HEURES**

**COEFFICIENT : 4**

**PROBLÈMES D'ACTUALITÉ DANS L'INDUSTRIE LAITIÈRE**

**Calculatrice autorisée**

**Les trois parties du sujet sont indépendantes**

**1) Recherche et dénombrement des bactériophages au cours de la fabrication d'un fromage de type Saint-Paulin (24 points)**

Dans un laboratoire de recherche laitière, une souche de *Lactococcus lactis* génétiquement modifiée est utilisée en tant que levain lactique dans la fabrication d'une pâte pressée de type Saint-Paulin dans le but d'améliorer les qualités organoleptiques de ce fromage.

Le laboratoire constate, au cours de la fabrication du fromage, un défaut d'acidification dû probablement à une contamination par un bactériophage.

Différents prélèvements P1 à P8 sont effectués pendant la fabrication (**voir document 1**).

1-1) Au cours de la transformation du lait une pasteurisation est réalisée à 74°C pendant 30 secondes ou à 82°C pendant 12 secondes, ces barèmes étant fonction de la propriété du lait. Présenter l'intérêt de la pasteurisation et ses conséquences sur la flore du lait cru.

1-2) Deux épreuves de recherche d'enzymes, la phosphatase alcaline et la peroxydase (**document 2**), permettent de contrôler les barèmes de pasteurisation du lait précisés en 1-1).

1-2-1) Pourquoi *Mycobacterium tuberculosis* est-il choisi comme référence dans les barèmes de pasteurisation ?

Justifier à l'aide du **document 2**.

1-2-2) Dégager l'intérêt des épreuves de recherche de la phosphatase alcaline et de la peroxydase pour contrôler chacun de ces barèmes.

1-3) La recherche des bactériophages peut être réalisée par la technique au lait tournesolé qui permet de déceler rapidement et simplement leur présence dans le lait.

Une fraction de chaque prélèvement P1 à P8 est testée. Les résultats obtenus sont groupés dans le **document 3**.

1-3-1) Donner la composition du tube correspondant au prélèvement P8 dans le test au lait tournesolé. Indiquer son rôle en le justifiant.

1-3-2) Analyser les résultats du tableau (**document 3**) et, à l'aide du **document 1**, émettre une hypothèse sur l'origine de la contamination par des bactériophages au cours du

processus de fabrication du fromage.

1-4) Sur une fraction de certains prélèvements (échantillons 5, 6, 7, 8), on effectue l'épreuve "des microgouttes de Hull " (**document 4**) par obtention de plaques de lyse.

1-4-1) Justifier la centrifugation et la filtration.

1-4-2) Présenter sous forme de tableau les résultats obtenus après incubation.

1-4-3) Calculer le nombre de bactériophages présents dans chaque prélèvement par mL.

1-4-4) Que penser des résultats obtenus ?

## **2) Valorisation des protéines du lactosérum (38 points)**

Le **document 5** résume les différentes étapes de fractionnement et de purification de deux protéines du lactosérum:

- la **lactoferrine** (LF), glycoprotéine de masse moléculaire 77 000 d, qui contient deux sites de fixation pour l'ion fer III, est utilisée pour compléter les laits maternisés;

- la **lactoperoxydase** (LP), métalloenzyme de masse moléculaire 82 000 d, exerce un effet antibactérien; on l'utilise comme additif dans l'industrie laitière pour la conservation du lait cru.

### **2-1) Déminéralisation du lactosérum et concentration des protéines : obtention d'un rétentat de lactosérum**

Le lactosérum (LS), obtenu après caillage du lait, est très riche en sels minéraux. Leur élimination est indispensable pour faciliter la purification des protéines.

Différentes méthodes sont utilisées par les industriels pour déminéraliser le lactosérum: l'osmose inverse, l'électrodialyse et l'ultrafiltration.

2-1-1) Préciser dans quel(s) cas la déminéralisation s'accompagne d'une concentration du rétentat. Justifier.

2-1-2) Déminéralisation du lactosérum par ultrafiltration.

On traite le lactosérum (LS) sur une unité pilote de surface membranaire de 8 m<sup>2</sup> et de seuil de coupure de masse moléculaire de 10 000 d. Cette opération conduit à l'obtention d'un rétentat (R) de lactosérum.

2-1-2-1) Commenter les caractéristiques de la membrane.

2-1-2-2) À l'aide du **document 6**, donner la composition qualitative du rétentat (R).

### **2-2) Purification de la lactoferrine et de la lactoperoxydase à partir du rétentat (R)**

La lactoferrine et la lactoperoxydase peuvent être purifiées à l'échelle industrielle de manière satisfaisante, en une seule étape, par chromatographie sur colonne d'échange d'ions.

La présence de lipides dans le rétentat (R) de lactosérum étant un obstacle à la bonne mise

en oeuvre de cette technique, on réalise une centrifugation.

On obtient le rétentat dégraissé (Rd).

La résine utilisée est une Carboxyméthyl-Sepharose CL6B fast flow.

Le **document 7** résume les principaux temps de la réalisation de la chromatographie.

Le **document 8** représente le profil d'élution obtenu.

2-2-1) À quel type de résine échangeuse d'ions appartient la Carboxyméthyl-Sepharose CL6B fast flow ? Justifier.

2-2-2) Indiquer les phénomènes qui caractérisent les étapes (1), (3), (4), (5) et (6), en précisant:

-le sens du mot "batch" et l'intérêt de cette technique,

- la composition du filtrat,

- le mode d'élution des deux protéines à purifier ; s'agit-il d'une élution en isocratique, en gradient continu ou en gradient discontinu ? (Justifier la réponse).

Indiquer dans quelles gammes de pH se situent les pHi de ces deux protéines.

2-2-3) Déterminer les volumes d'élution de la lactoferrine et de la lactoperoxydase.

### 2-3) Vérification de la pureté des fractions A et B par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS-PAGE)

Une SDS-PAGE est réalisée sur les fractions A et B afin de vérifier leur pureté.

Les conditions de la réalisation de l'électrophorèse, ainsi que l'électrophorégramme obtenu sont donnés dans le **document 9**.

2-3-1) À quoi correspondent les pourcentages mentionnés à propos des gels de concentration et de résolution ? (Justifier la réponse).

2-3-2) Indiquer les rôles:

\*de l'acrylamide et du bisacrylamide,

\*du SDS,

\*du Temed,

\*du persulfate d'ammonium,

\*du 2-mercaptoéthanol,

\*du glycérol,

\*du bleu de bromophénol.

2-3-3) En précisant les fonctions respectives des gels de concentration et de résolution, expliquer le principe de base permettant la séparation des protéines dans une SDS-PAGE.

2-3-4) Les fractions A et B sont-elles pures ? (Justifier la réponse).

2-3-5) Tracer sur papier millimétré la courbe de calibration du gel:

$$\log (\text{masse moléculaire}) = f (\text{distance de migration dans le gel de résolution}).$$

Données:

Protéines	Masses moléculaires (d)
$\beta$ -Galactosidase	116 000
Phosphorylase b	97 400
Sérumalbumine bovine	66 000
Ovalbumine	45 000
Anhydrase carbonique	29 000

2-3-6) En déterminant la masse moléculaire des protéines contenues dans les fractions A et B, vérifier leur nature.

**3) Validation d'un procédé de thermoprécipitation des protéines du rétentat de lactosérum par des méthodes immunologiques ( 18 points)**

La  $\beta$  lactoglobuline du lait de vache (masse moléculaire: 36 000 d, pHi = 5, 2) jouerait un rôle important dans les phénomènes allergiques dits "d'intolérance au lait", fréquents chez les nouveau-nés nourris au lait maternisé d'origine bovine. Un procédé de thermoprécipitation des protéines du rétentat de lactosérum (à pH 4, 2 et à 65°C) permettrait de sélectionner les protéines d'intérêt alimentaire dans le précipité et d'éliminer la  $\beta$  lactoglobuline indésirable dans le surnageant.

La technique d'immunodiffusion radiale (IDR) de Mancini est adaptée au dosage de la  $\beta$  lactoglobuline à condition de disposer d'anticorps anti  $\beta$  lactoglobuline spécifiques.

1er temps : production d'immunoglobulines chez le lapin

2eme temps : vérification de la spécificité des anticorps produits par immunoelectrophorèse

3eme temps: dosage de la  $\beta$  lactoglobuline par immunodiffusion radiale dans le rétentat de lactosérum et dans le surnageant obtenu après thermoprécipitation.

**3-1) Vérification de la spécificité des anticorps produits chez le lapin par immunoelectrophorèse.**

L'immunoelectrophorèse est une électrophorèse des protéines antigéniques d'un mélange suivie d'une immunodiffusion. La technique est réalisée dans les conditions décrites ci-dessous:

- milieu gélifié, pH 8, 2 (tampon barbital-barbital sodé)
- on introduit: - puits N°1: le lactosérum
- puits N°2: une solution de  $\beta$  lactoglobuline, sous un volume de 4  $\mu$ L
- la migration est effectuée à 100 V , 40 min
- après migration, la gouttière est remplie avec 80  $\mu$ L des immunoglobulines produites chez le lapin
- la diffusion dure 24 h en chambre humide
- après lavage en NaCl à 0, 85 %, on observe les arcs de précipitation.

Le résultat obtenu est présenté **document 10**.

3-1-1) Justifier le sens de migration de la  $\beta$  lactoglobuline.

3-1-2) Préciser l'intérêt du lavage en NaCl à 0, 85 %.

3-1-3) Les anticorps produits par le lapin sont-ils spécifiques de la  $\beta$  lactoglobuline ? Justifier.

### 3-2) Dosage de la $\beta$ lactoglobuline par immunodiffusion radiale

Pour valider le procédé de thermoprécipitation, on dose la  $\beta$  lactoglobuline par immunodiffusion radiale:

- d'une part sur le rétentat de lactosérum avant thermoprécipitation: R;
- d'autre part sur le surnageant obtenu après thermoprécipitation: S.

Les anticorps anti $\beta$ lactoglobuline produits chez le lapin sont inclus à concentration optimale dans un gel d'agarose coulé en boîte de Petri. Des puits sont creusés et remplis avec 8  $\mu$ L:

\*puits 1 à 3: solutions étalons de  $\beta$ lactoglobuline;

\*puits 4 : R;

\*puits 5 : S.

Après 2 jours d'incubation en chambre humide, on mesure le diamètre des anneaux obtenus. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous:

Puits N°	diamètre en mm (D)
1: solution étalon de $\beta$ lactoglobuline à 10 g.L <sup>-1</sup>	6
2: solution étalon de $\beta$ lactoglobuline à 20 g.L <sup>-1</sup>	8
3: solution étalon de $\beta$ lactoglobuline à 30 g.L <sup>-1</sup>	9,5
4: rétentat de lactosérum R	8,5
5: surnageant de thermoprécipitation S	7,5

3-2-1) Donner le principe de la formation des anneaux.

Que se passe-t-il si on diminue la concentration en anticorps dans le gel ?

3-2-2) D'après Mancini, le carré du diamètre de l'anneau est une fonction linéaire de la concentration C en antigène.

- Tracer, sur papier millimétré, la fonction  $D^2 = aC + b$  en utilisant les résultats du tableau.

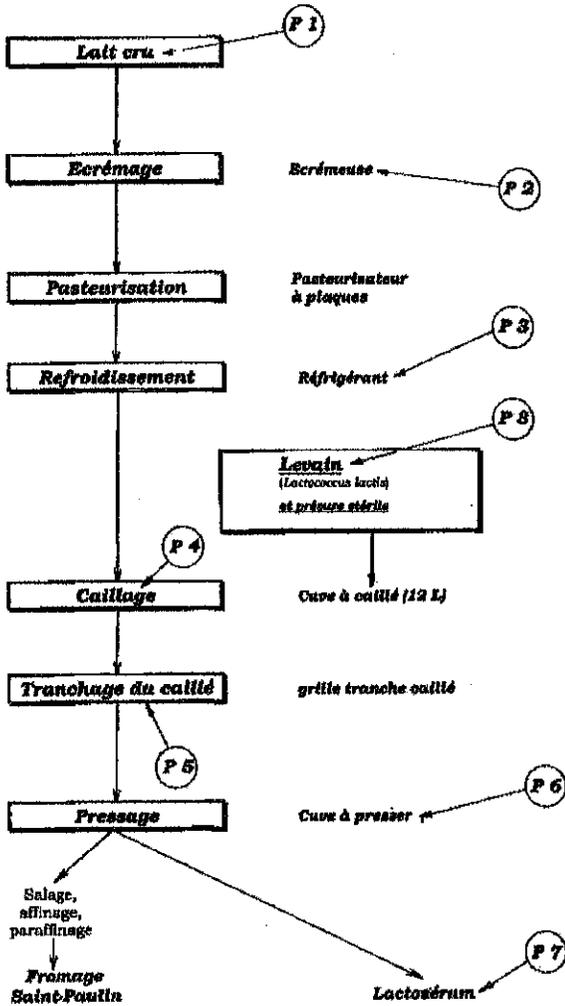
- Commenter le point du graphe pour lequel la concentration en antigène est égale à 0 g.L<sup>-1</sup>.

3-2-3) Déterminer graphiquement la concentration en  $\beta$  lactoglobuline de R et de S.

Le procédé de thermoprécipitation permet-il d'éliminer totalement la  $\beta$ lactoglobuline contenue dans le rétentat de lactosérum ?

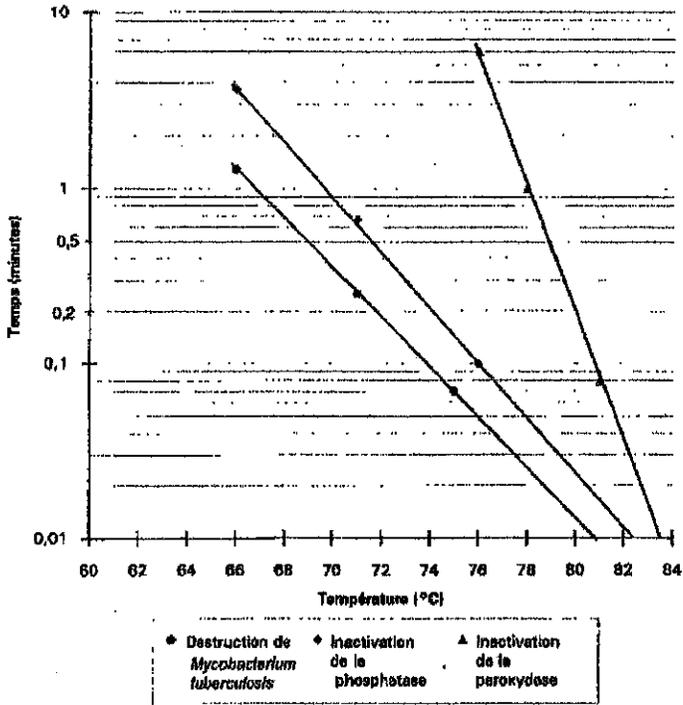
**DOCUMENT N°1:**

**Diagramme de fabrication des fromages à pâte pressée de type Saint-Paulin.**



**DOCUMENT N°2:**

**Le temps et la température nécessaires pour l'inactivation de *Mycobacterium tuberculosis* et de certaines enzymes du lait.**



### DOCUMENT N°3.

#### **le lait tournesolé**

##### Composition

Lait écrémé	1 L
Teinture de tournesol	20 mL
pH	7,2

Répartir en tube (10 mL par tube) et autoclaver à 110°C pendant 20 minutes.

Le tournesol est à la fois un indicateur de pH (zones de virage: pH inférieur à 6: rose, pH supérieur à 8: bleu) et un indicateur d'oxydo-réduction (réduit: incolore, oxyde: bleu-violacé).

##### Technique d'utilisation

Dans un tube de lait tournesolé, introduire 0,5 mL de levain (*Lactococcus lactis*) et 1 mL de prélèvement. Incuber 4 heures à 30°C.

##### Tableau de résultats

Prélèvement N°	□P 1	P 2	□P 3	□P 4	□P 5	□P 6	P 7	□P 8
Lecture après 2 heures	A	A	-	A	-	-	-	A
Lecture après 4 heures	CR	CR	-	CR	-	-	-	CR

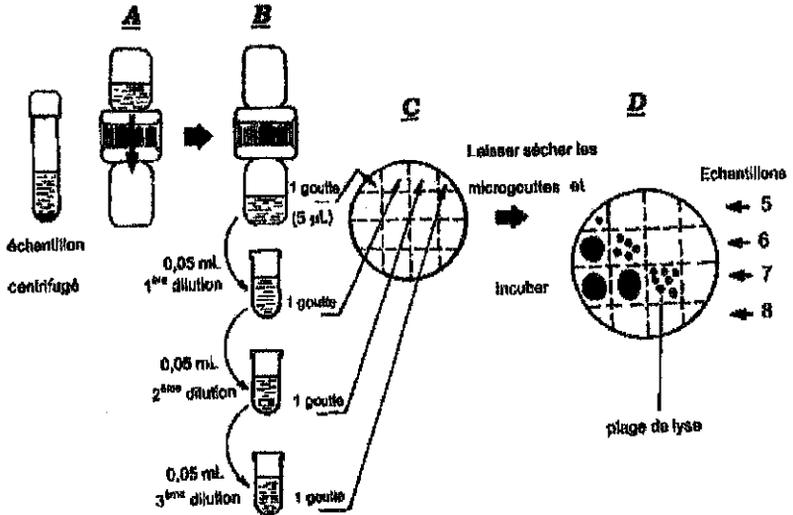
A = acidification

C = coagulation

R= réduction

- = absence d'acidification, de coagulation, de réduction.

## DOCUMENT N°4.



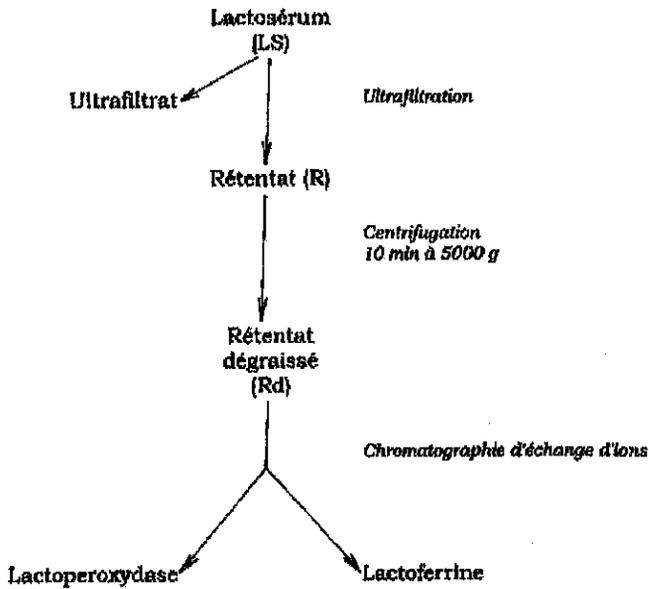
### Dénombrement des bactériophages par la technique des microgouttes de Hull

**A:** La filtration du surnageant de centrifugation est réalisée sur une membrane filtrante de porosité 0,45 µm.

**B:** Dilutions successives: le volume de diluant (lait écrémé à 0,1 %) est de 4,95 mL.

**C:** Le dépôt des gouttes est réalisé sur une gélose molle M17 préalablement ensemencée dans la masse avec *Lactococcus lactis* et l'incubation est de 30°C pendant 6 à 8 heures. Une goutte correspond à 5 µL.

**D:** Résultats obtenus après 6 à 3 heures d'incubation.



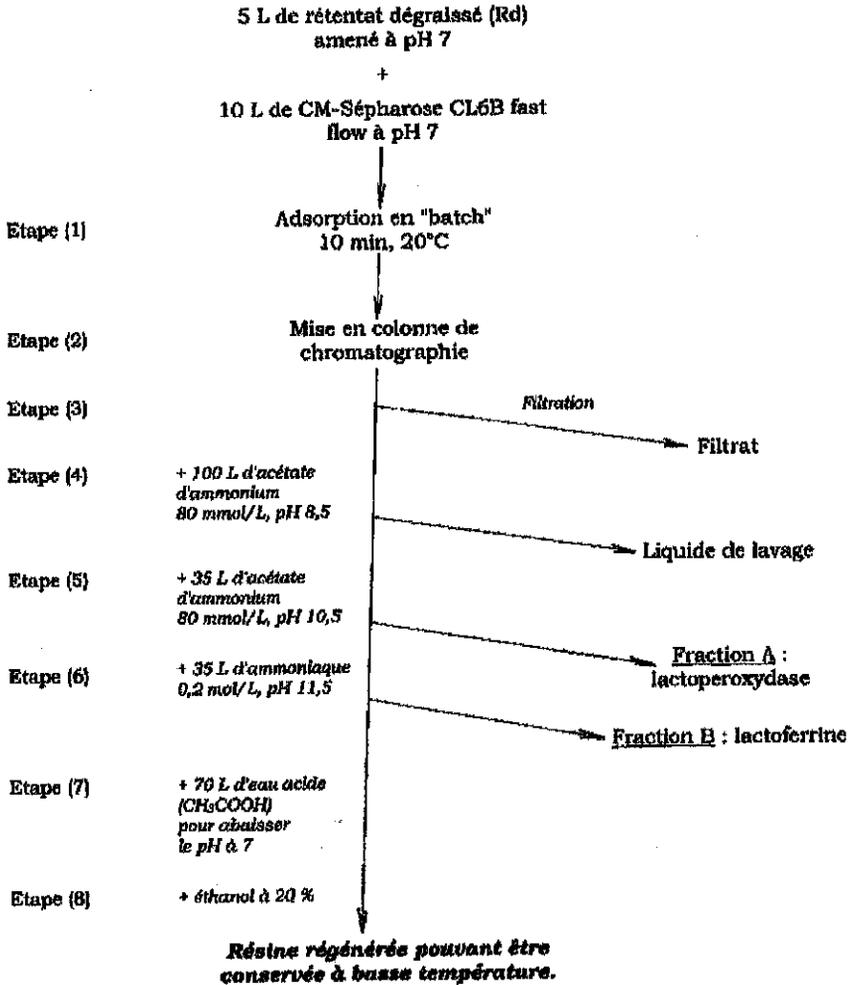
**DOCUMENT N° 5.**  
**DOCUMENT N° 6.**

**Composition moyenne du lactosérum en g/100 mL.**

	Lactosérum
Eau	93,0
Matières grasses	0,4
Caséines	traces
Protéines solubles	0,9
Lactose	5,0
Sels minéraux	0,6

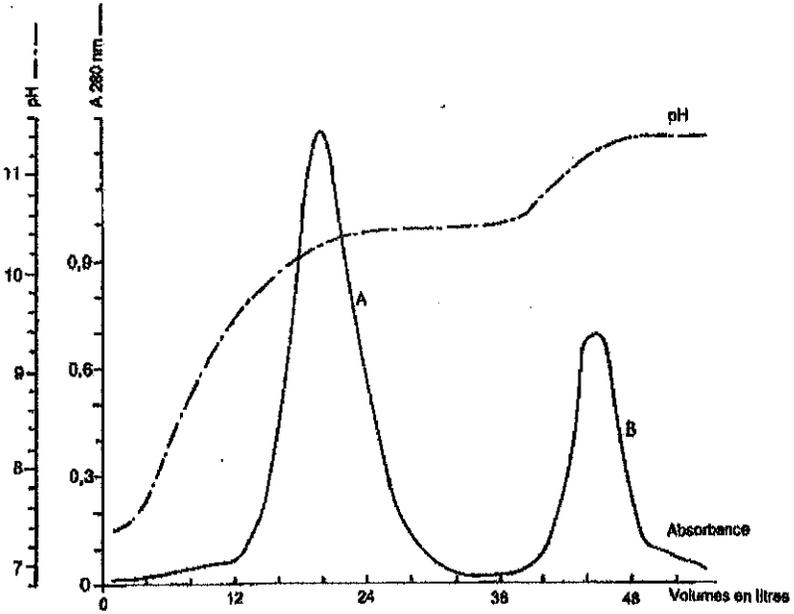
**DOCUMENT N° 7:**

**Étapes de purification de la lactoferrine et de la lactoperoxydase par chromatographie d'échange d'ions.**



**DOCUMENT N° 8:**

**Profil d'élution de la lactoperoxydase (fraction A) et de la lactoferrine (fraction B)  
obtenu par chromatographie d'échange d'ions  
sur CM-Sepharose CL6B fast flow.**



## DOCUMENT N°9:

### Conditions de réalisation de la SDS-PAGE et électrophorégramme obtenu

On utilise une solution stock d'acrylamide contenant 29,2 g d'acrylamide et 0,8 g de bisacrylamide pour 100 mL.

Deux gels sont préparés et coulés successivement entre deux plaques de verre:

	gel de concentration à 4,5 %	gel de résolution à 12,6 %
solution stock d'acrylamide	1,5 mL	4,2 mL
tampon pH 8,8	940 µL	2,5 mL
SDS	100 µL	100 µL
Eau	7,35 mL	3,12 mL
Temed (N,N,N'- tétraméthylènediamine)	10 µL	5 µL
persulfate d'ammonium	100 µL	75 µL

Tous les échantillons à déposer sont traités au bain-marie à ébullition pendant 5 minutes en présence de SDS, de 2-mercaptoéthanol, de bleu de bromophénol et de glycérol.

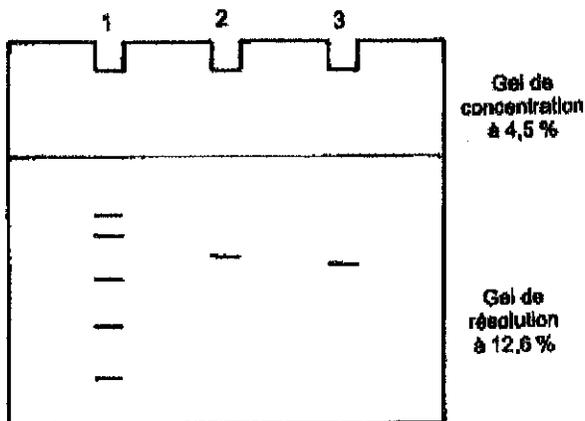
Trois dépôts sont effectués dans des puits aménagés dans le gel de concentration:

- puits 1: 2 µL de marqueurs de masses moléculaires connues,
- puits 2: 2 µL de fraction A,
- puits 3: 2 µL de fraction B.

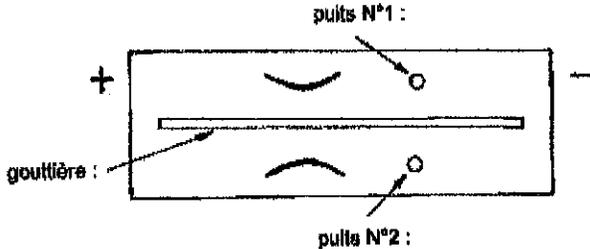
On laisse migrer pendant 1h30 à 150 V dans un tampon d'électrophorèse pH 8,3.

Le gel est alors démoulé, plongé dans un bain de coloration (bleu de Coomassie) et décoloré; on obtient

L'électrophorégramme suivant, représenté à l'échelle réelle obtenue:



**DOCUMENT N° 10.**



**ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.  
(ÉPREUVE E5. UNITÉ U52)**

**Deuxième partie : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.**

**DURÉE : 8 H 30**

**COEFFICIENT : 8**

**SUJET 1.**

**BIOCHIMIE (70 points)**

**Durée:3H30**

**L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.  
LA BIÈRE**

Les analyses biochimiques qualitatives et quantitatives de plusieurs constituants de la bière permettent d'apprécier sa qualité.

**1 - DOSAGE DU FER DANS LA BIÈRE. (34 points)**

Lorsque la bière présente une mousse grisâtre et une mauvaise stabilité colloïdale, on suspecte une pollution par le fer au cours de la fabrication.

La bière contient habituellement 0,1 mg de fer par litre.

Le dosage du fer (II) est réalisé par la méthode colorimétrique à l'orthophénanthroline.

**1.1 - Réactifs.**

\*Solution étalon mère de fer à 0,1 g.L<sup>-1</sup>.

\*Échantillon de bière dégazée étiqueté A.

\*Solution d'hydroquinone.

\*Réactif à l'orthophénanthroline.

## **1.2 - Réalisation de la gamme d'étalonnage et des dosages.**

### **Gamme d'étalonnage:**

À partir de la solution mère de fer à  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ , préparer par dilution une solution fille à  $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Avec cette solution fille, réaliser une **gamme d'étalonnage** contenant de 0 à  $50 \text{ } \mu\text{g}$  de fer par tube.

### **Dosages sur la bière dégazée:**

Les **essais** seront réalisés sur des prises d'essais de 2 et de 5 mL de la **bière A** (1 essai sur chaque prise).

Pour éliminer l'absorbance due à la couleur de la bière, il est nécessaire de réaliser, dans les mêmes conditions, des "témoins bière".

### **Mode opératoire de la colorimétrie:**

\*Dans chaque tube, introduire dans l'ordre:

-X mL de la solution contenant le fer

- $\text{H}_2\text{O}$  qsp 5 mL

-1 mL de solution d'hydroquinone

**Agiter et laisser reposer 10 minutes.**

-2 mL de réactif à l'orthophénanthroline.

**Agiter et laisser reposer 20 minutes.**

\*Lire toutes les absorbances à 490 nm contre le témoin réactif de la gamme.

## **1.3 - Compte rendu et résultats.**

Expliquer la préparation de la solution fille.

Justifier et rassembler dans un tableau les indications relatives à la préparation des tubes de gamme, des essais et de leurs témoins.

Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

Exploiter les résultats de colorimétrie à l'aide de l'ordinateur; valider les valeurs expérimentales retenues pour le calcul de la droite de régression; donner l'équation de cette droite de régression et le coefficient de corrélation.

Déterminer la concentration massique en fer dans la bière A analysée en  $\text{mg.L}^{-1}$ . Conclure.

La précision du dosage est évaluée à 3 %.

## **2 - RECHERCHE DES GLUCIDES DANS LA BIÈRE. (16 points)**

La bière "sans alcool" est une bière dans laquelle le processus de fermentation est réalisé par des levures issues du génie génétique et produisant peu d'alcool. Leur teneur en glucides est donc différente des bières "normales". L'analyse comparative de la teneur en glucides de ces deux types de bières sera réalisée par CCM.

### **2.1 - Matériel et réactifs.**

\* Plaque recouverte d'une couche mince de gel de silice ( $10 \times 10 \text{ cm}$ ).

\* Cuve à chromatographie

\* Solvant de chromatographie:

- méthyléthylcétone: 3 vol.

- acide acétique: 1 vol.
- méthanol: 1 vol.
- \* Solutions témoins de glucides à 2 g.L<sup>-1</sup>: glucose, maltose, saccharose, fructose, maltotriose.
- \* Echantillons de bières à analyser préalablement dégazées: "normale" étiquetée **B** et sans "alcool", étiquetée **BS**.
- \* Révélateur: mélange extemporané d'aniline et de diphenylamine en milieu acide phosphorique fourni prêt à l'emploi.

### 2.2 - Mode opératoire

Introduire le solvant dans la cuve et la laisser se saturer en vapeurs de solvant pendant 15 min (manipuler sous hotte).

Réactiver la chromatoplaque par passage à l'étuve à 100°C pendant 10min.

À l'aide de capillaires ou de cônes, faire 2 dépôts successifs de chaque solution, en séchant entre chaque dépôt.

Placer la plaque dans la cuve.

À l'issue de la migration, laisser sécher la plaque.

À l'aide de pinces, immerger un court instant la plaque dans le révélateur (précautions) et égoutter immédiatement en position verticale sur un papier filtre.

Mettre à l'étuve à 100°C (quelques minutes).

### 2.3 - Compte rendu et résultats

Analyser le chromatogramme obtenu. Comparer la composition en glucides des deux bières analysées. Conclusion.

Le chromatogramme sera laissé au poste de travail.

## 3 - DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE DANS LA BIÈRE. (20 points)

Les acides excrétés par la levure sont responsables de la saveur du breuvage. Le dosage de l'acide citrique de la bière B sera réalisé par une technique enzymatique en point final (test UV).

### 3.1 - Principe.

L'acide citrique (citrate) est transformé en oxalo-acétate et acétate dans une réaction (1) catalysée par la citrate lyase (CL).

CL

(1) Citrate  $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$  oxaloacétate + acétate

En présence de malate-déshydrogénase (MDH) et de lactate-déshydrogénase (LDH), l'oxaloacétate et son dérivé de décarboxylation, le pyruvate, sont réduits en L-malate et en L-lactate par le nicotinamide-adenine-dinucléotide réduit (NADH, H<sup>+</sup>) selon les réactions (2) et (3).

MDH

(2) Oxaloacétate + NADH, H<sup>+</sup>  $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$  L-malate + NAD<sup>+</sup>

LDH

(3) Pyruvate + NADH, H<sup>+</sup>  $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$  L-lactate + NAD<sup>+</sup>

La quantité de NADH, H<sup>+</sup> oxydé en NAD<sup>+</sup> dans les réactions (2) et (3) est proportionnelle à la quantité de citrate présent.

L'oxydation du NADH, H<sup>+</sup> est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.

### **3.2 - Réactifs.**

- \* solution 1: tampon pH 7, 8; MDH; LDH; NADH,H<sup>+</sup>
- \* solution 2: CL
- \* Echantillon de bière B.

### **3.3 - Mode opératoire.**

#### **3.3.1 - Conditions de mesure.**

- température ambiante
- longueur d'onde: 340 nm
- trajet optique: 1 cm
- lire contre l'air.

**3.3.2 - Opérer directement dans des microcuvés selon le tableau suivant.**

Réaliser 2 essais sur l'échantillon de bière B à analyser.

Introduire dans les cuves	Blanc	Essai
Solution 1	0,50 mL	0,50 mL
Echantillon		0,10 mL
Eau bidistillée	1,00 mL	0,90 mL
Mélanger. Après environ 5 min, lire l'absorbance des solutions (A <sub>1</sub> ).		
Déclencher la réaction par addition de:		
Solution 2	0,01 mL	0,01 mL
Mélanger. Attendre la fin de réaction (environ 5 min) et lire l'absorbance des solutions (A <sub>2</sub> ).		

### **3.4 - Valeurs de calcul.**

- Masse molaire de l'acide citrique: 192,1 g/mol.
- $\epsilon$ :  $6,3 \cdot 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour NADH,H<sup>+</sup> à 340 nm

### **3.5 - Compte rendu et résultats.**

Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

Établir la formule littérale et calculer la concentration massique de l'acide citrique dans la bière.

La précision du dosage est évaluée à 4 %.

## RELEVÉ DES VALEURS EXPERIMENTALES

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

### DOSAGE DU FER DANS LA BIÈRE.

N° tube	Étalons	Témoins	Essais
masse de fer par tube en µg			
A <sub>1</sub> (490 nm)			

### DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE

	Blanc	Essai 1	Essai 2
A <sub>1</sub>			
A <sub>2</sub>			

### MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE (90 points)

1er jour

Durée: 3 H 30

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

### LA BIÈRE

La plupart des bières sont préparées à partir d'orge. Lors du maltage, les grains d'orge sont mis à germer, il y a synthèse d'enzymes. L'orge malté est ensuite broyé et brassé dans de l'eau à 67°C pendant plusieurs heures. Les enzymes synthétisées lors du maltage catalysent l'hydrolyse de l'amidon et des protéines. La partie aqueuse, appelée moût, est séparée des restes des grains et additionnée de houblon. Le moût est alors stérilisé puisensemencé avec une souche de *Saccharomyces*, qui effectue la fermentation alcoolique. Après fermentation puis maturation la bière est filtrée, pasteurisée et conditionnée.

#### A - MICROBIOLOGIE (55 points)

##### 1-Contrôle de la viabilité et dénombrement du levain avant inoculation du moût. (14 points)

Pour la fermentation alcoolique, le volume d'inoculum doit être compris entre 5 et 10 % du volume total du moût et le nombre de levures doit être, en début de fermentation, de l'ordre de  $1,5 \cdot 10^6$  par mL.

Le contrôle de la viabilité et le dénombrement sont réalisés à partir d'une préculture **P** de *Saccharomyces* en cellule de Malassez.

Effectuer la dilution  $10^{-1}$  de la préculture **P**.

Dans un tube à hémostase stérile, introduire 0,5 mL de la dilution précédente et 0,5 mL de bleu de méthylène tamponné de Funk.

Monter la préparation en cellule de Malassez.

Effectuer les numérations.

Déterminer le pourcentage de viabilité ainsi que le nombre de levures viables par mL de préculture. Expliciter le calcul sur le compte rendu et en déduire le volume de préculture à introduire pour 1 litre de moût.

**NB: Montrer à un examinateur la mise en cellule de Malassez et la numération d'un rectangle.**

**DONNÉES:**

Le bleu de méthylène tamponné de Funk colore en bleu très foncé les cellules mortes. Les cellules vivantes sont peu ou pas colorées.

Un bourgeon est considéré comme une cellule si son diamètre est supérieur ou égal à la moitié du diamètre de la cellule dont il est issu.

Le pourcentage de viabilité de la préculture doit être supérieur ou égal à 80.

**2 - Dénombrement des micro-organismes du moût en fermentation. (19 points)**

Un moût M a été inoculé avec la préculture précédente.

Vérifier la concentration des levures par une numération en surface sur gélose YCG. Tester trois dilutions successives. Effectuer deux essais par dilution.

Sur le compte rendu, justifier les dilutions testées et préciser le temps et la température d'incubation.

**NB: Montrer à un examinateur la réalisation d'une dilution.**

**3 - Identification d'un contaminant isolé d'un moût en fermentation. (22 points)**

La souche de *Saccharomyces* utilisée étant généralement recyclée plusieurs fois, une contamination de la souche est possible.

Lors d'une précédente fermentation un contaminant bactérien C a été isolé. Une colonie de ce contaminant a été ensemencée sur gélose nutritive inclinée.

Réaliser le(s) examen(s) microscopique(s) et test(s) enzymatique(s) nécessaires à l'orientation de ce contaminant.

**Appeler un examinateur lors de la réalisation de ces examen(s) et test(s).**

Proposer sur le compte rendu une orientation de diagnostic.

**Faire viser par un examinateur.**

Poursuivre l'identification jusqu'au stade de l'espèce en ensemençant les milieux et la galerie distribués.

**B - IMMUNOLOGIE (35 points)**

**Dosage des protéines enzymatiques d'un extrait de malt par immunodiffusion simple radiale**

Les principales enzymes du maltage sont des glucanases, protéases et amylases.

On se propose de déterminer la concentration d'une protéine enzymatique du malt, l'amylase, pour contrôler la fabrication de la bière.

## **1 - Réactifs et matériels.**

- \* 1 petite boîte de Petri
- \* emporte-pièce
- \* 3 mL de solution étalon d'amylase à 1 g/L
- \* 0,2 mL d'immunsérum anti-amylase
- \* 1 tube contenant 7 mL d'agarose à 1 % au bain thermostaté à 56°C
- \* 4 mL de tampon PBS
- \* 2 mL d'extrait de malt

## **2 - Mode opératoire.**

### **2.1 - Préparation du gel.**

Incorporer dans le tube d'agarose, l'immunsérum à raison de 20  $\mu$ L par mL d'agarose.  
Couler immédiatement dans la boîte de Petri.  
Laisser solidifier le gel 15 min à 4°C.

### **2.2 - Réalisation des puits.**

Creuser dans le gel 7 puits de 3 mm de diamètre à l'aide de l'emporte-pièce (voir document en annexe).

### **2.3 - Réalisation de la gamme d'étalonnage et des dépôts.**

À partir de la solution étalon à 1 g/L, réaliser une gamme d'étalonnage de 200 à 600 mg/L dans le tampon PBS, sous un volume total de 1 mL.  
Déposer les solutions de la gamme d'étalonnage et de l'extrait de malt à raison de 5  $\mu$ L par puits.  
Laisser diffuser à température ambiante et en atmosphère humide (fixer une bande de papier filtre humidifié sur le couvercle de la boîte de Petri).  
Incuber 48 heures.

## **3 - Compte rendu.**

Expliquer la réalisation de la gamme d'étalonnage sous forme d'un tableau.  
Compléter le document en annexe.

---

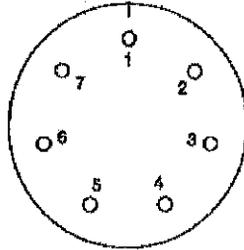
## **ANNEXE IMMUNOLOGIE**

### **DOCUMENT À COMPLÉTER ET À RENDRE À LA FIN DE LA PREMIÈRE SÉANCE.**

N° Poste:

	concentration déposée en mg.L <sup>-1</sup>	diamètre mesuré en mm
N° de puits	1er JOUR	2eme JOUR
1		
2		
3		

4		
5		
6		
7		



## MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

2ème jour

Durée: 1 H 30

### LA BIÈRE

#### A - MICROBIOLOGIE (55 points)

##### Dénombrement des micro-organismes du moût en fermentation.

Déterminer le nombre d'unités formant colonies par mL de moût. Le résultat est-il en accord avec celui attendu ?

##### Identification d'un contaminant isolé d'un moût en fermentation.

Après lecture de la galerie d'identification biochimique, identifier le contaminant (justification exigée).

#### B - IMMUNOLOGIE (35 points)

##### Dosage des protéines enzymatiques d'un extrait de malt.

Mesurer les diamètres des anneaux de précipitation et compléter le tableau de résultats (annexe premier jour).

Tracer la courbe  $D^2 = f(p)$  sur papier millimétré sachant que la précision du dosage est de 10 % (p est la concentration protéique en mg/L).

Déterminer graphiquement la concentration en amylase de l'extrait de malt en g/L.

**ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.**  
**(ÉPREUVE E5. UNITÉ U52)**

**Deuxième partie : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.**

**DURÉE : 8 H 30**

**COEFFICIENT : 8**

**SUJET 2.**

**BIOCHIMIE - IMMUNOLOGIE - 1er jour (70 points)**

**Durée : 4 H**

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

**QUELQUES ASPECTS DE LA MISE AU POINT  
D'UN DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE**

Afin d'améliorer le dosage immunoenzymatique d'une protéine antigénique P, dosage habituellement réalisé par une technique sur bille, on désire optimiser un nouveau test ELISA.

Pour la réalisation de ce test, on utilise:

\*un anticorps primaire anti-P (ou Ac I) de lapin,

\*l'antigène P,

\*un conjugué constitué par le même anticorps primaire couplé à une nouvelle peroxydase (POD), appelé anticorps secondaire ou Ac II.

En immunologie, on se propose de déterminer la quantité de conjugué à déposer pour optimiser le dosage d'une protéine P par technique ELISA.

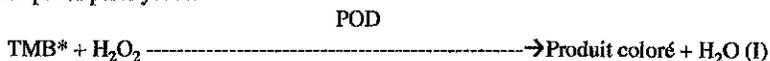
En biochimie, on se propose de:

1 - déterminer l'activité enzymatique de l'enzyme libre (POD) et celle du conjugué Ac II (enzyme liée),

2 - déterminer le pH optimum de la peroxydase libre (POD).

**Principe du test de révélation du dosage immunoenzymatique:**

Deux substrats, le TMB\* et le peroxyde d'hydrogène participent à la réaction enzymatique catalysée par la peroxydase:



\* TMB = 3,3', 5, 5'- Tétraméthylbenzidine = substrat chromogénique.

(I) Le produit obtenu, soluble, est bleu. Son apparition peut être suivie au spectrophotomètre à 655 nm.

La réaction peut être arrêtée à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 2 mol.L<sup>-1</sup>.

Le produit est alors jaune et son maximum d'absorption se situe à 450 nm.

**Données:**  $\epsilon_{655\text{nm}} = 4560 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{\cdot 1} \cdot \text{cm}^{-1}$        $\epsilon_{450\text{nm}} = 880 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{\cdot 1} \cdot \text{cm}^{-1}$

**Le candidat commence par l'immunologie.**

**A - IMMUNOLOGIE. (40 points) - 1er jour**

**Détermination de la quantité de conjugué à déposer pour optimiser le dosage d'une protéine P par technique ELISA.**

**1 - Matériel et réactifs.**

- \* Deux barrettes de 16 cupules placées sur cadre support (32 cupules au total).
- \* Un film autocollant.
- \* Une pipette automatique P200 + cônes.
- \* Un tube à hémolyse contenant une solution d'anticorps primaires anti-protéine P: tube marqué Ac I (5mL).

**2 - Mode opératoire.**

Déposer 150  $\mu$ L de la solution d'Ac primaires anti-protéine P dans les quatre rangées de cupules, à l'exception de la cupule A1. La cupule A1 servira de blanc pour la lecture au spectrophotomètre. Placer les cupules recouvertes d'adhésif à 4°C.

**B - BIOCHIMIE. (70 points)**

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

**1 - Contrôle de l'activité spécifique de l'enzyme avant et après liaison à l'anticorps.**

Une unité peroxydase catalyse la transformation d'une micromole de substrat TMB ou  $H_2O_2$  par minute dans les conditions de l'expérience.

**1.1 - Détermination de l'activité enzymatique par une méthode cinétique.**

On utilise le test de révélation décrit ci-dessus, après avoir préparé extemporanément la solution de substrats (TMB +  $H_2O_2$ ) appelée solution S.

**Préparation de 10 mL de solution S:**

- \* Utiliser un petit flacon brun enveloppé de papier d'aluminium.
- \* Dissoudre un comprimé TMB dans 10 mL de tampon phosphate citrate +  $H_2O_2$  (Tp +  $H_2O_2$ )
- \* Cette solution, à garder à l'obscurité, sera utilisée pour la cinétique et pour la recherche du pH optimum.

**Essai cinétique (un essai avec l'enzyme libre et un essai avec le conjugué):**

- \* Longueur d'onde: 655 nm.
- \* Cuve à usage unique 1 cm de trajet optique.
- \* Température de mesure constante: précisée au candidat en début d'épreuve. Dans une cuve, introduire successivement:
  - + solution S..... .1 mL,
  - + solution Tp de travail .....1 mL.

\*Déclencher la réaction en ajoutant 0,01 mL de la solution d'enzyme à tester

\*Homogénéiser. Mettre en place dans le spectrophotomètre.

N.B.: Une cinétique concernant l'enzyme libre appelée "POD cinétique" (déjà diluée au 1/1000) et une autre concernant le conjuguée Ac II (déjà diluée au 1/500) sont à effectuer dans les mêmes conditions.

\*Déclencher immédiatement le chronomètre et lire rapidement l'absorbance et le temps correspondant.

\*Mesurer ensuite les variations d'absorbance pendant 3 minutes.

Remarque: L'utilisation d'un système d'acquisition et d'exploitation de cinétiques enzymatiques est autorisée.

## **1.2 - Dosage des protéines.**

On utilise la méthode de Folin-Lowry pour déterminer la concentration protéique dans la solution d'enzyme libre.

### **1.2.1 - Gamme d'étalonnage.**

A partir d'une solution étalon mère de protéines à  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , préparer une solution fille permettant d'obtenir une gamme de tubes contenant entre 50 et 250  $\mu\text{g}$  de protéines. Compléter chaque tube à 1 mL avec de l'eau physiologique.

Ajouter 3 mL de réactif de Lowry (distributeur), agiter, attendre 10 minutes.

Ajouter 0,3 mL de réactif de Folin (prêt à l'emploi), agiter, attendre 30 minutes et lire l'absorbance à 700 nm.

### **1 2 2 - Deux essais sur la solution d'enzyme libre appelée "POD - protéines" (déjà diluée au 1/1000).**

Prise d'essai d'enzyme libre = 1 mL. Traiter ensuite comme la gamme.

## **2 - Contrôle du pH optimum de l'enzyme libre par mesure de l'activité enzymatique par une méthode "deux points".**

On dispose de différentes solutions tampon de travail dont les pH respectifs sont: 2; 3,5; 5; 5,65; 7 et 9.

Mesurer l'activité enzymatique de l'enzyme libre en utilisant successivement les différentes solutions tampon. On travaillera directement dans des cuves à usage unique en arrêtant la réaction à l'aide d'acide sulfurique à  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ .

CUVES							
V mL	T	A	B	C	D	E	F
Solution S (substrats)	1	1	1	1	1	1	1
Tp 2		1					
Tp 3,5			1				
Tp 5	1,010			1			
Tp 5,65					1		
Tp 7						1	
Tp 9							1
POD cinétique		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Incubation à la température du laboratoire: <b>exactement 2 minutes</b>							
Acide sulfurique 2 mol.L <sup>-1</sup>	1	1	1	1	1	1	1
Lecture des absorbances à 450 nm contre le tube T							

### 3 - Compte rendu

#### 3.1 - Concentration d'activité catalytique de l'enzyme libre et de l'enzyme liée à l'anticorps.

##### 3.1.1 - Enzyme libre.

\*Tracer le graphe  $A_{655nm} = f(\text{temps})$ . Calculer la vitesse initiale en UA par minute.

\*Calculer la concentration d'activité catalytique de la solution POD non diluée (l'exprimer en unité POD par litre de solution enzymatique).

##### 3.1.2 - Enzyme liée à l'anticorps (Ac II).

\*Tracer le graphe  $A_{655nm} = f(\text{temps})$ . Calculer la vitesse initiale en UA par minute.

\*Calculer la concentration d'activité catalytique de la solution Ac II non diluée (l'exprimer en unité POD par litre de solution).

#### 3.2 - Dosage colorimétrique des protéines.

\*Présenter, sous forme de tableau, la composition des tubes (gamme et essais) ainsi que les résultats expérimentaux du dosage des protéines.,

\*Exploiter les résultats de colorimétrie à l'aide de l'ordinateur. Valider les valeurs expérimentales retenues pour la détermination de la droite de régression; donner l'équation de cette droite.

\*Déterminer la concentration massique en protéine enzymatique de la solution d'enzyme libre.

### **3.3 - Activités spécifiques.**

\*Calculer l'activité spécifique de l'enzyme libre exprimée en unité POD par mg. Calculer l'activité spécifique de l'enzyme liée à l'anticorps, exprimée en unité POD par mg de protéine enzymatique sachant que pour préparer 1 mL de conjugué Ac II, on a employé:

- \* 20 mg de peroxydase,
- \* 5 mg d'anticorps Ac I,
- \* 0,05 mL de glutaraldéhyde à 1 %.

\*Comparer avec l'enzyme libre. Calculer le rendement d'immobilisation de l'enzyme sur l'anticorps. Interpréter le résultat.

### **3.4 - Contrôle du pH optimum.**

\*Donner un tableau des résultats expérimentaux.

\*Tracer le graphe représentant les variations d'absorbance  $\Delta A_{450\text{ nm}} = f(\text{pH})$ .

\*Déterminer le pH optimum.

## **MICROBIOLOGIE - 1er jour - IMMUNOLOGIE - 2eme jour**

**Durée:3H45**

### **QUELQUES ASPECTS DE LA MISE AU POINT D'UN DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE**

#### **A - IMMUNOLOGIE - 2eme jour (40 points)**

##### **1 - Matériel et réactifs.**

- \*Un cristalliseur pour rejeter le contenu des tubes + papier filtre.
- \*Une pipette automatique P200 + cônes.
- \*Une pipette automatique P1000 + cônes.
- \*10 tubes à hémolyse.
- \*Un tube à hémolyse de solution tampon PBS (5 mL).
- \*Une pissette de tampon PBS pour réaliser les lavages.
- \*Un tube à hémolyse marqué << P >> contenant la solution mère de protéine P à  $100\text{ mg.mL}^{-1}$  (0,5 mL).
- \*Un tube à hémolyse marqué Ac II au 1/5000: ce tube contient une dilution au 1/5000 du conjugué marqué à la peroxydase POD (3 mL).
- \*Un tube à hémolyse marqué Ac II au 1/10000: ce tube contient une dilution au 1/10000 du conjugué marqué à la peroxydase POD (3 mL).
- \*Etuve à 37°C.
- \*Film autocollant.

##### **2 - Mode opératoire.**

Préparer, en tubes à hémolyse, une gamme de 11 solutions de protéine P de  $100\text{ ng.mL}^{-1}$  à environ  $0,1\text{ ng.mL}^{-1}$ .

Réaliser pour cela 10 dilutions successives de raison 2, en tampon PBS sous un volume final de 300  $\mu\text{L}$ .

Vider par retournement le contenu des cupules contenant l'Ac I.

Réaliser cinq lavages à l'aide de la solution tampon PBS distribuée en pissette.

Déposer 100  $\mu\text{L}$  de chaque solution de la gamme de protéine P à doser dans les cupules B1 à D2 (première barrette).

Déposer à nouveau 100  $\mu\text{L}$  de chaque solution de la gamme de protéine P à doser dans les cupules A3 à C4 (deuxième barrette).

Réaliser les dépôts nécessaires pour la cupule A1 (blanc de lecture au spectrophotomètre) et pour les cupules H2 et H4: témoins de fixation non spécifique du conjugué.

Couvrir la plaque et incuber 1 heure à 37°C.

Vider le contenu des cupules.

Réaliser 4 lavages successifs avec la solution de PBS distribuée en pissette.

Déposer le conjugué dans les cupules de la gamme et éventuellement dans les cupules témoins:

\* 200  $\mu\text{L}$  de conjugué dilué au 1/5000 dans les cupules de la **première barrette**,

\* 200  $\mu\text{L}$  de conjugué dilué au 1/10000 dans les cupules de la **seconde barrette**.

Incuber 45 minutes à 37°C puis placer à 4°C.

### 3 - Compte rendu.

Donner sous forme d'un tableau la position des dépôts de la gamme de protéine P.

Indiquer et justifier les dépôts réalisés dans les cupules témoins.

### B - MICROBIOLOGIE - 1er jour (50 points)

Les anticorps primaires anti-protéine P, utilisés pour la détermination de la quantité de conjugué, sont produits chez le lapin.

Certains lots de lapins utilisés présentent des cas de toxi-infections récidivantes ce qui nécessite une étude épidémiologique sur les causes de ces infections ainsi que la recherche d'un traitement efficace.

#### Matériel spécifique disponible:

\*1 bouillon de 10 mL de Mueller Kaufmann ensemencé avec 1 mL de pré-enrichissement noté A,

\*1 souche sur gélose ordinaire inclinée notée B,

\*1 culture de 18 h de *Salmonella Paratyphi B* en bouillon ordinaire,

\*2 milieux d'isolement adaptés à la recherche des salmonelles en boîtes de Petri (les noms seront précisés),

\*6 x 13 mL gélose PCA en surfusion,

\*6 x 9 mL gélose PCA en surfusion,

\*5 x 9 mL de bouillon Mueller Hinton,

\*4 x 9 mL de tryptone-sel,

\*1 tube d'eau physiologique,

\*1 flacon de 5 mL de chloramphénicol à 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

\*antisérums OMA, OMB, 01,2; 04,5; 06,7,8; 09; 012,

- \*8 tubes à hémolyse stériles,
- \*6 boîtes de Petri,
- \*20 pipettes stériles de 1 mL.

## 1 - Contrôles de rations alimentaires.

Les rations alimentaires des lapins infectés sont soumises à des contrôles microbiologiques. En particulier, on recherche des salmonelles dans plusieurs échantillons représentatifs.

### 1.1 - Recherche de Salmonella.

Un échantillon A est soumis à une étape de pré-enrichissement en eau peptonée, puis à une étape d'enrichissement sélectif en bouillons sélénite et Mueller Kaufmann.

#### Manipulation:

À partir du bouillon Mueller Kaufmann ensemencé 24 h avant avec 1 mL de pré-enrichissement, réaliser des isoléments sur 2 milieux sélectifs appropriés.

### 1.2 - Identification sérologique d'une souche de Salmonella.

À partir d'un échantillon B, une souche suspecte a été purifiée sur gélose ordinaire. L'identification biochimique de cette souche a révélé qu'il s'agit d'une *Salmonella*.

#### 1.2.1 - Manipulation:

Pratiquer une identification sérologique de la bactérie (on se limitera à la caractérisation de l'antigène somatique).

Remarque: la réalisation d'une agglutination ainsi que les résultats de toutes les agglutinations devront être contrôlés par un examinateur.

#### 1.2.2 - compte rendu:

Présenter les différents tests réalisés dans l'ordre, leurs résultats ainsi que les conclusions issues de chaque test.

## 2 - Mise au point d'un traitement efficace.

Un des lots de lapins s'avère infecté par une souche de *Salmonella Paratyphi B* sensible au chloramphénicol.

Dans le but d'administrer des doses faibles d'antibiotique, on veut connaître la concentration minimale inhibitrice (CMI) du chloramphénicol vis-à-vis de cette souche.

### 2.1 - Manipulation.

2.1.1 - Diluer une culture de 18 h de *S. Paratyphi B* en bouillon Mueller Hinton afin de réaliser un inoculum de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

On rappelle que la densité d'une culture de 18 h d'un bacille Gram (-) est d'environ  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

2.1.2 - Vérifier la densité de l'inoculum utilisé grâce à un dénombrement dans la masse en double couche (les dilutions ensemencées seront testées en double). Incuber à 37°C.

2.1.3 - À partir d'une solution de chloramphénicol à 250 mg.L<sup>-1</sup>, réaliser 6 dilutions successives de raison 2 de l'antibiotique en bouillon Mueller Hinton (le volume final de chaque dilution devra être 1 mL).

**2.1.4** - Ajouter 1 mL de l'inoculum réalisé en **2.1.1** à chaque dilution de chloramphénicol et réaliser deux témoins pour valider la méthode. Incuber la gamme et les témoins.

**2.2 - Compte rendu.**

**2.2.1** - Justifier la réalisation de l'inoculum.

**2.2.2** - Expliquer quelles dilutions sont réalisées et ensemencées pour vérifier la densité de l'inoculum.

**2.2.3** - Présenter, sous forme de tableau, la gamme de dilutions de l'antibiotique en précisant les volumes de solution mère de chloramphénicol, de diluant et d'inoculum bactérien et en indiquant les concentrations finales de chloramphénicol pour chaque tube.

**2.2.4** - Justifier le rôle, la réalisation et l'incubation des tubes témoins.

**MICROBIOLOGIE - 2eme jour - IMMUNOLOGIE - 3eme jour**

**Durée : 2 H 15**

**QUELQUES ASPECTS DE LA MISE AU POINT D'UN DOSAGE  
IMMUNOENZYMATIQUE**

**A - IMMUNOLOGIE - 3eme jour (40 points)**

**1 - Matériels et réactifs.**

\*Un cristallisoir pour rejeter le contenu des tubes + papier filtre.

\*Une pipette automatique P100 + cônes.

\*Une pissette de tampon PBS pour réaliser les lavages.

\*Un tube à hémolyse contenant la solution de substrats étiquetée "substrats - POD" (TMB, tétraméthyl-benzidine + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (4 mL).

\*Un tube à hémolyse contenant une solution H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2 mol.L<sup>-1</sup> (1 mL).

\*Lecteur de microplaque (filtre: 450 nm).

**2 - Mode opératoire.**

Vider par retournement le contenu des cupules.

Laver les cupules 5 fois avec la solution de PBS.

Déposer 100 µL de la solution de substrats dans les cupules des deux gammes de protéine P et éventuellement dans les cupules témoins (A1: blanc lecture; H2 et H4: témoins conjugués). À la fin des dépôts, agiter délicatement le support.

Au bout de cinq minutes, déposer 20 µL de solution H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2 mol.L<sup>-1</sup>, en suivant le même ordre que pour le dépôt de la solution de substrats. Agiter délicatement le support.

Réaliser la lecture au spectrophotomètre à 450 nm.

**3 - Compte rendu.**

Indiquer et justifier les dépôts réalisés dans les cupules témoins. Commenter les valeurs d'absorbance de ces témoins. Présenter sous forme de deux tableaux les résultats d'absorbance

obtenus pour la gamme de protéine P:

- \* un tableau présentant les résultats obtenus avec le conjugué dilué au 1/5000,
- \* un tableau présentant les résultats obtenus avec le conjugué dilué au 1/10000.

Tracer sur une même feuille de papier millimétré les courbes:

$A_{450nm} = f[\log(\text{concentration P en ng.mL}^{-1})]$ , correspondant aux deux dilutions du conjugué. Comparer ces courbes. Quelle dilution du conjugué semble la mieux adaptée au dosage de la protéine P ? Justifier la réponse.

### **B-MICROBIOLOGIE (50 points)**

- 1 - Effectuer l'analyse macroscopique des isoléments. Indiquer les colonies suspectes.
- 2 - Construire le tableau des résultats du dénombrement. Calculer la densité de l'inoculum utilisé pour déterminer la CMI. Conclure.
- 3 - Donner les résultats de la détermination de la CMI.

## **EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.**

### **(ÉPREUVE E5. UNITÉ U52)**

#### **Deuxième partie : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.**

**DURÉE : 10 HEURES**

**COEFFICIENT : 8**

### **SUJET 3.**

### **BIOCHIMIE (70 points)**

**Durée: 3 H 30**

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

### **DETERMINATION DU BILAN D'UNE FERMENTATION**

La bactérie *Lactobacillus brevis* possède un métabolisme hétérofermentaire.

Elle fermente le glucose avec production d'acide lactique, d'éthanol et de dioxyde de carbone selon les réactions suivantes:

glucose -----→ 2 lactate

glucose -----→ 2 éthanol + 2 CO<sub>2</sub>

Il s'agit ici d'établir les proportions de ces deux voies lors d'une fermentation de trois heures de la bactérie étudiée.

Le milieu de départ possède les caractéristiques suivantes:

glucose (mol.L <sup>-1</sup> )	0,050
lactate (mol.L <sup>-1</sup> )	0,0
éthanol (mol.L <sup>-1</sup> )	0,0

Après trois heures, le milieu de fermentation a été refroidi puis centrifugé. Le surnageant a été récupéré, puis séparé en trois fractions:

\*La fraction G pour le dosage du glucose,

\*La fraction L pour le dosage du lactate,

\*La fraction E qui a subi une distillation puis un réajustement au volume de départ. La fraction E' ainsi obtenue servira à doser l'éthanol.

Le but des manipulations est d'établir le bilan carboné de la fermentation.

### **1 - Dosage du glucose, (26 points)**

La méthode utilisée est celle au 3 - 5 DNS.

#### **Produits:**

\*glucose étalon à  $0,500 \text{ g.L}^{-1}$ ,

\*fraction G du surnageant.

#### **Données:**

\*des expériences préliminaires permettent de prévoir que la concentration de glucose de la fraction G est comprise entre  $0,01$  et  $0,02 \text{ mol. L}^{-1}$ ,

\*la masse molaire du glucose est de  $180 \text{ g.mol}^{-1}$ .

#### **Manipulations:**

Réaliser dans des tubes à essais une gamme étalon de glucose de façon à avoir des quantités par tube comprises entre 0 et 1 mg de glucose. (Remarque: tous les volumes doivent être inférieurs ou égaux à 2 mL).

Réaliser 2 essais de concentrations différentes afin d'en avoir au moins un en milieu de gamme. (Remarque: les volumes doivent être inférieurs à 2 mL).

Suivre les étapes du protocole en **annexe 1**.

#### **Questions:**

1.1 - Représenter le tableau de colorimétrie. Justifier les volumes des prises d'essais choisies.

1.2 - Exploiter les résultats de la colorimétrie à l'aide de l'ordinateur. Valider les valeurs expérimentales retenues pour le calcul de la droite de régression. Donner l'équation de cette droite et le coefficient de corrélation.

1.3 - Calculer la concentration en glucose résiduel dans le milieu de fermentation en  $\text{mol.L}^{-1}$ .

1.4 - Calculer la concentration en glucose consommé dans le milieu de fermentation en  $\text{mol. L}^{-1}$ .

### **2 - Dosage de l'éthanol, (22 points)**

La méthode utilisée est la méthode chimique par chromimétrie. On effectue deux essais.

Le principe est une oxydation à froid au dichromate de potassium en excès et en milieu sulfurique. L'excès de dichromate de potassium est dosé par le sel de Mohr.

La manipulation nécessite de traiter en parallèle un essai et un témoin.

#### **Produits:**

\*distillat E',

\*solution de dichromate de potassium à  $42,572 \text{ g.L}^{-1}$ ,

\*solution de sel de Mohr,

\*acide sulfurique concentré en distributeur.

**Données:**

1 L d'une solution de dichromate de potassium à 42,572 g.L<sup>-1</sup> oxyde 10g d'éthanol pur.

**Manipulations:**

Doser l'éthanol en respectant le protocole en **annexe 2**.

**Questions:**

- 2.1 - Compléter la feuille de résultats.
- 2.2 - Quel pourcentage de dichromate de la solution de départ a réagi avec l'éthanol de l'échantillon ?
- 2.3 - Donner la concentration en éthanol forme dans le milieu de fermentation en mol. L<sup>-1</sup> et en g. L<sup>-1</sup>.
- 2.4 - Donner la concentration en CO<sub>2</sub> formé dans le milieu de fermentation. (On admettra qu'il se forme autant de moles de dioxyde de carbone que de moles d'éthanol).

**Données:**

\*Soit V<sub>1</sub> mL la chute de burette pour le témoin.

Soit V<sub>2</sub> mL la chute de burette pour l'essai éthanol.

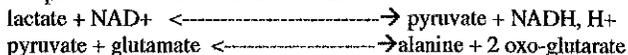
Le pourcentage de dichromate de potassium de la solution de départ ayant réagi avec l'éthanol de l'échantillon correspond à  $100 \% \frac{(V_1 - V_2)}{V_1}$

\*La masse molaire de l'éthanol est de 46 g.mol<sup>-1</sup>.

**3 - Dosage du lactate. (18 points)**

On utilise une méthode enzymatique.

Deux enzymes sont utilisées: la lactate deshydrogénase et la glutamate-pyruvate transaminase qui catalysent respectivement les réactions suivantes:



**Produits:**

\*surnageant L de concentration en lactate comprise entre 2 et 20 g.L<sup>-1</sup>

\*solutions enzymatiques et tampons.

**Manipulations:**

Doser le lactate en utilisant la fiche en **annexe 3**. La lecture s'effectue à 340 nm.

Faire deux essais.

**Questions:**

- 3.1 - Indiquer la dilution éventuelle de l'échantillon.
- 3.2 - Compléter la feuille de résultats.
- 3.3 - Calculer la concentration en lactate forme en mol.L<sup>-1</sup> dans le milieu de fermentation.

#### 4 - Conclusion. (4 points)

- 4.1 - Établir le bilan carboné de la fermentation réalisée par la bactérie en mmol de carbone des produits pour 100 mmol de carbone provenant du glucose.
- 4.2 - Conclure.

#### ANNEXE 1: DOSAGE DU GLUCOSE

- \* Compléter chaque tube à 2 mL avec de l'eau distillée.
- \* Ajouter 2 mL de réactif au 3 - 5 DNS.
- \* Boucher les tubes à l'aide de coton cardé et de papier d'aluminium.
- \* Placer les tubes au bain-marie 5 minutes exactement.
- \* Refroidir les tubes.
- \* Ajouter 10 mL d'eau distillée dans chacun des tubes.
- \* Attendre 10 minutes. Lire l'absorbance à 530 nm.

#### ANNEXE 2: DOSAGE DE L'ETHANOL

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL bouchant émeri, introduire successivement:

- \* 10 mL de solution de dichromate de potassium à  $42,572 \text{ g.L}^{-1}$ .
  - \* 10 mL d'acide sulfurique (les lunettes de protection sont obligatoires).
  - \* 20 mL du distillat E'.
- Boucher, agiter et attendre 15 minutes.
  - Ajouter 5 gouttes de diphényl-amino-sulfonate de baryum.
  - Ajouter 20 mL d'eau distillée bouillie et refroidie à l'abri de l'air.
  - Verser la solution de sel de Mohr à la burette jusqu'au virage de l'indicateur au vert émeraude franc.

Réaliser le témoin en parallèle en remplaçant le distillat E' par un volume équivalent d'eau distillée bouillie et refroidie à l'abri de l'air.

## Acide L-lactique

### Méthode UV

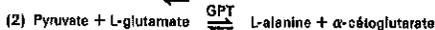
Pour la détermination de l'acide L-lactique dans les aliments

#### Principe

En présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD), l'acide L-lactique (L-lactate) est oxydé en pyruvate par la L-lactate-déshydrogénase (L-LDH) (1). L'équilibre de la réaction se situe du côté du lactate.

En éliminant le pyruvate du milieu réactionnel, on oriente la réaction (1) dans le sens lactate → pyruvate.

En présence du L-glutamate, le pyruvate est transformé en L-alanine grâce à la glutamate-pyruvate-transaminase (GPT) (2).



La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 334, 340 ou 365 nm, est proportionnelle à la quantité de L-lactate.

#### Composition du coffret

- Flacon 1 contenant env. 30 ml de solution composée de :  
Tampon glycyglycine — pH 10,0  
Acide L-glutamique — 440 mg  
Stabilisateurs.
- Flacon 2 contenant env. 210 mg de lyophilisat β-NAD
- Flacon 3 contenant 0,7 ml de glutamate-pyruvate-transaminase — 1100 U
- Flacon 4 contenant 0,7 ml de L-lactate-déshydrogénase — 3800 U

#### Préparation des solutions

- Utiliser le contenu des flacons 1, 3 et 4 sans diluer.
- Dissoudre le contenu du flacon 2 avec 6 ml d'eau bidistillée.

#### Stabilité des solutions

Le contenu des flacons 1, 3 et 4 se conserve au moins un an à +4° C.  
La solution 2 se conserve au moins 3 semaines à +4° C.

#### Mode opératoire

Longueur d'onde<sup>1</sup> : 340 nm, 334 nm (Hg) ou 365 nm (Hg)  
Cuve de verre<sup>2</sup> : 1 cm d'épaisseur  
Température : 20 à 25° C  
Volume du test : 2,24 ml  
Mesurer contre l'air (pas de cuve dans le trajet optique) ou contre l'eau.  
Solution d'essai : 2 à 35 μg de L-lactate/cuve<sup>3</sup>.

Introduire dans des cuves	Témoïn	Essai
Solution 1	1,0 ml	1,0 ml
Solution 2	0,2 ml	0,2 ml
Eau bidistillée	1,0 ml	0,9 ml
Suspension 3	0,02 ml	0,02 ml
Solution d'essai	—	0,1 ml
Mélanger, après env. 2 min., lire l'absorbance des solutions (A <sub>1</sub> ) Déclencher la réaction par addition de :		
Solution 4	0,02 ml	0,02 ml
Mélanger. En fin de réaction (10 minutes) lire l'absorbance des solutions (A <sub>2</sub> ).		

Déterminer 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 des essais :

$$\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$$

## Chimie alimentaire

### Boehringer Mannheim



#### Calcul

La formule générale pour le calcul des concentrations est la suivante :

$$c = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \quad (\text{mg/ml})$$

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 NADH :  
340 nm = 6,3 (l · mmole<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)  
Hg 365 nm = 3,4 (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 ainsi pour le L-lactate :

$$c = \frac{2,24 \times 80,01}{\varepsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times \Delta A = 2,018 \times \frac{\Delta A}{\varepsilon}$$

(g de L-lactate/l de solution d'essai)

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur de dilution F.

#### Recommandation

##### Pour la réalisation du test

La quantité de L-lactate dans la cuve doit être comprise entre 3 μg et 35 μg. Diluer la solution d'essai de manière que la concentration en L-lactate se situe entre 0,02 et 0,35 g/l.

#### Tableau de dilution

Quantité estimée de L-lactate par litre		Dilution avec de l'eau	Facteur de dilution F
Mesure à :			
340 ou 334 nm	365 nm		
< 0,2 g	< 0,35 g	—	1
0,2 à 2,0 g	0,35 à 3,5 g	1 + 9	10
2,0 à 20 g	3,5 à 35 g	1 + 99	100
> 20 g	> 35 g	1 + 999	1000

Si la concentration en L-lactate de la solution d'essai est inférieure à 0,02 g/l, le volume de l'essai peut être augmenté jusqu'à 1,0 ml. Dans ce cas, on réduit le volume de l'eau à ajouter, afin que les volumes totaux soient les mêmes dans les deux cuves. Tenir compte du nouveau volume de l'essai (v) pour le calcul.

**Remarque :** la sauer contient de l'acide lactique. Veillez à ne pas toucher les pipettes, les embouts de pipettes avec les doigts.

**FEUILLE DE RESULTATS**  
**À COMPLÉTER ET À RENDRE À VEC LA COPIE**

N° de poste:

**1 - Dosage de l'éthanol.**

	Témoin 1	Essai 1	Témoin 2	Essai 2
Chutes de burette (mL)				

**2 - Dosage du lactate.**

	Blanc	Essai 1	Essai 2
A <sub>1</sub> 340 nm			
A <sub>2</sub> 340 nm			

---

**IMMUNOLOGIE ~ MICROBIOLOGIE**

**1er jour**

**Durée: 4 H 15**

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

**A - IMMUNOLOGIE (35 points)**

Lors de l'étude de *Lactobacillus brevis*, on est parvenu à faire fabriquer à des hybridomes en culture des anticorps anti-*Lactobacillus brevis* qui sont de deux types: Ig G et Ig M. On souhaite titrer ces anticorps dans un surnageant de culture et différencier les Ig G et Ig M.

**1 - Principe.**

C'est une réaction d'hémagglutination indirecte.

Des hématies de mouton traitées par le glutaraldéhyde et sensibilisées par un lysat de *Lactobacillus* sont mises en présence des dilutions du surnageant de culture à titrer.

On différencie les IgG et IgM en traitant le surnageant de culture par le 2-mercaptoéthanol (2-ME) qui inhibe le pouvoir agglutinant des IgM.

**2 - Réactifs.**

- Hématies-antigène (hématies sensibilisées) : 280 µL noté "Hs".
- Hématies-témoin (hématies non sensibilisées) : 60 µL noté "H".

- Diluant: PBS  $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ : 1 mL.
- Surnageant de culture à analyser: tube A et tube B déjà traités comme indiqué dans le paragraphe 3.1: 150  $\mu\text{L}$  par tube.

### 3 - Mode opératoire.

**Attention:** les surnageants de culture sont à manipuler avec des gants.

#### 3.1 - Traitement du surnageant de culture.

Outre le traitement au 2-ME, le surnageant de culture à étudier est adsorbé par des hématies de mouton.

	tube A	tube B
Surnageant de culture.....	0,1 mL	0,1 mL
Solution a $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de 2-ME.....	-	0,1 mL
Diluant.....	0,1 mL	-
Laisser 1 heure au bain thermostaté à $37^\circ\text{C}$ , puis ajouter:		
Diluant.....	0,8 mL	0,8 mL
Hématies de mouton pour adsorption.....	2 gouttes	2 gouttes
Laisser une nuit à $2 - 8^\circ\text{C}$ . Centrifuger 10 minutes à 500 g.		

Récupérer les surnageants (tubes A et B).

#### 3.2 - Réaction immunologique.

Le candidat réalisera sa gamme de dilutions en présence d'un examinateur.

Exécuter la réaction en parallèle sur le tube A et le tube B.

Dans une microplaque, réaliser 6 dilutions du surnageant de culture (cupules 1 à 6) selon une progression géométrique de raison 2, avec un volume final de 50  $\mu\text{L}$ . La première cupule correspond au surnageant de culture diluée au 1/2.

Dans la 7<sup>ème</sup> cupule, distribuer 25  $\mu\text{L}$  de surnageant de culture et 25  $\mu\text{L}$  de diluant.

Dans la 8<sup>ème</sup> cupule, distribuer 50  $\mu\text{L}$  de diluant.

Déposer 16  $\mu\text{L}$  d'hématies sensibilisées dans les 6 premières cupules et dans la 8<sup>ème</sup> cupule.

Déposer 16  $\mu\text{L}$  d'hématies non sensibilisées dans la 7<sup>ème</sup> cupule.

Homogénéiser très soigneusement le contenu des cupules.

Laisser ensuite la plaque immobile à l'abri de toute vibration. Lire la réaction 2 h plus tard.

#### 3.3 - Lecture des résultats.

Le titre est donné par la première dilution présentant une sédimentation en anneau large et périphérique.

##### **Réaction positive:**

Voile tapissant au moins la moitié du fond de la cupule.

##### **Réactions négatives:**

- Voile occupant moins de la moitié du fond de la cupule entouré d'une ligne de sédimentation nette.
- Sédimentation en anneau ou en bouton.

#### 4 - Compte rendu.

- 4.1 - Calculer la dilution initiale du surnageant de culture lors de son traitement dans les tubes A et B.
- 4.2 - Noter dans un tableau la composition des différentes cupules, les repérer par leur position sur la microplaque et calculer les dilutions finales du surnageant dans chacune d'elles.
- 4.3 - Préciser le rôle des témoins réalisés.
- 4.4 - Dans le tableau, représenter chaque cupule, indiquer le résultat (positif ou négatif).
- 4.5 - En déduire les titres en anticorps totaux et en IgG anti-*Lactobacillus brevis* du surnageant analyse.

#### B - MICROBIOLOGIE (55 points)

Tous les examens microscopiques seront contrôlés après interprétation écrite sur le compte rendu. Avant la mise en route d'une fermentation lactique, quelques contrôles de la préculture d'une souche de *Lactobacillus brevis* sont entrepris.

##### 1 - Contrôle de la stabilité des caractères d'identification de la souche de *Lactobacillus* présentée sur milieu solide. tube noté *Lactobacillus brevis*. (17 points)

\*Contrôler les caractères morphologiques et réaliser le test enzymatique adapté.

\*Contrôler les caractères culturaux et biochimiques par:

- + isolement sur milieu MRS en boîte de Petri,
- + vérification du type respiratoire,
- + recherche des caractères biochimiques par ensemencement d'une galerie API 50 CHL.

##### 2 - Contrôle de la validité de données obtenues lors de fermentations précédentes. (25 points)

Les données suivantes ont été obtenues lors de la mise en oeuvre d'un suivi de croissance au cours duquel un grand nombre de prélèvements ont été analysés:

- coefficient de correspondance  $a$  entre l'unité d'absorbance à 600 nm ( $A_{600}$ ) et le nombre  $X$  d'UFC.mL<sup>-1</sup> de *Lactobacillus* en suspension en bouillon M.R.S. ( $a$  communiqué par le centre d'examen),
- vitesse spécifique de croissance (taux de croissance népérien):  $\mu_{x_{\text{expo}}} = 0,46 \text{ h}^{-1}$ .

Dans le cadre de ce contrôle seuls deux prélèvements ont été choisis car correspondant à des valeurs situées sur la droite de régression. Ainsi on dispose de deux échantillons d'une culture prélevée en phase exponentielle de croissance en bouillon M.R.S. et conservés à 4°C:

- échantillon C1, prélevé après 13 heures d'incubation à 37°C,
- échantillon C2 prélevé après 16 heures d'incubation à 37°C.

On se propose de:

- contrôler la correspondance entre  $A_{600}$  et  $X$  (UFC.mL<sup>-1</sup>),
- vérifier la vitesse spécifique de croissance.

##### 2.1 - Contrôle du coefficient de correspondance entre l'absorbance à 600 nm ( $A_{600}$ ) et le nombre d'UFC.mL<sup>-1</sup> de *Lactobacillus brevis* (X).

- Estimer par opacimétrie les populations cellulaires de C1 et C2 et reporter les valeurs

sur la feuille de résultats.

• Travail sur C1:

- Sur le compte rendu, calculer les dilutions à réaliser afin d'effectuer un dénombrement dans la masse avec trois dilutions correctement choisies.
- Présenter les résultats à un examinateur avant de réaliser le dénombrement.
- Réaliser le dénombrement.

**2.2 - Paramètres cinétiques de la souche de *Lactobacillus*.**

Vérifier par le calcul la vitesse spécifique de croissance à partir des résultats disponibles.  
En déduire le temps de génération de la souche en phase exponentielle de croissance.

**3 - Recherche d'éventuels contaminants dans deux échantillons A(x) et B(x) de précultures de *Lactobacillus*. (13 points)**

Après examen(s) microscopique(s), justifier sur le compte rendu la liste des milieux d'isolement nécessaires pour cette recherche.

Proposer la liste à un examinateur.

Ensemencer les milieux distribués.

---

**FEUILLE DE RÉSULTATS**

**À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE**

	C1	C2
A 600nm		

**MICROBIOLOGIE**

**2<sup>ème</sup> jour**

**Durée :1 H 15**

**En cas de test complémentaire, appeler un examinateur.**

- 1 - Les caractères d'identification de *Lactobacillus brevis* sont-ils vérifiés ? Justifier la réponse.
- 2 - Résultat du dénombrement et calcul de  $\mu$ .  
Comparer à la valeur  $\mu$  communiquée le 1<sup>er</sup> jour.
- 3 - Quel(s) contaminant(s) peut-on soupçonner dans les échantillons A(x) et B(x) ? Justifier la réponse.

## EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

### Deuxième partie : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES. (ÉPREUVE E5. UNITÉ U52)

DURÉE : 10 HEURES

COEFFICIENT : 8

#### SUJET 4.

#### BIOCHIMIE (75 points)

Durée : 4 H 00

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

#### **Contrôles dans l'industrie pharmaceutique Contrôles de quelques spécifications du produit fini**

Un comprimé à base d'extraits pancréatiques, utilisé en enzymothérapie digestive, possède les spécifications suivantes:

masse: 0,25g

protéines solubles: supérieures à 200 mg / g de comprimé

activité lipasique: supérieure à 12 unités / mg de protéines

activité trypsique: supérieure à 1,5 unité / mg de protéines

Au cours de cette manipulation, on se propose de contrôler les 3 derniers paramètres sur un échantillon (étiqueté "filtrat") préparé de la manière suivante:

on écrase très finement le comprimé dans le mortier; on dissout la poudre obtenue avec de l'eau physiologique et on transvase quantitativement cette solution dans une fiole jaugée de 100 mL, qu'on ajuste au trait de jauge avec les eaux de rinçage.

Après agitation douce, on filtre. Le filtrat obtenu conservé dans la glace contient les protéines solubles dont les enzymes.

#### **1 - DOSAGE DES PROTEINES SOLUBLES PAR LA METHODE DE FOLIN-LOWRY.** (33 points)

##### **1.1 - Etalonnage et validation de la méthode de dosage.**

À partir de la solution étalon de sérumalbumine bovine à 2,5g/L, préparer une solution fille permettant de réaliser une gamme d'étalonnage de 6 tubes allant régulièrement de 0 à 250 µg/tube (diluant: eau physiologique).

Dans chaque tube à essais, verser:

x mL de solution protéique fille avec  $x < 1$  mL,

(1 - x) mL d'eau physiologique,

5 mL de solution cuproalcaline.

Attendre 5 minutes puis introduire 0,5 mL de réactif de Folin dilué au 1/2.

Attendre 30 minutes exactement et lire l'absorbance à 700 nm contre le blanc-réactifs.

Réaliser un contrôle (1 essai) dans les mêmes conditions avec 1 mL de la solution de validation à 125 mg de protéines par litre.

### 1.2 - Dosage (2 essais).

Réaliser les essais sur 0,2 mL de filtrat.

### 1.3 - Compte rendu.

Préciser la dilution de la solution étalon et dresser le tableau de colorimétrie.

Tracer sur papier millimétré la courbe d'étalonnage.

Déterminer la concentration de la solution de validation. Peut-on valider le résultat ?

(Il est valide lorsqu'il est compris entre plus ou moins  $2\sigma$  encadrant la valeur cible; le coefficient de variation de la méthode est de 4 %).

Déterminer la concentration massique en protéines du filtrat et en déduire la masse de protéines solubles par gramme de comprimé. Conclure par rapport à la spécification.

## 2 - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA LIPASE. (20 points)

### 2.1 - Principe du dosage.

La lipase (E.C.3.1.1.3) hydrolyse les liaisons esters des triacylglycérols selon la réaction:  
 $\text{triacylglycérol} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{monoacylglycérol} + 2 \text{acides gras}$

Il s'ensuit une diminution de la turbidité de la solution qui peut être suivie à 340 nm.

### 2.2 - Réactifs et mode opératoire (un essai sera réalisé en présence d'un examinateur).

Réactif 1: lyophilisat contenant du trioléylglycérol, du tampon Tris pH 9,2, du chlorure de calcium et de la colipase: à dissoudre avec 3,3 mL d'eau déminéralisée (conservation: 5 jours à température ambiante).

"Etalon lipase" à 2 U /mL.

"Essai lipase": diluer le filtrat au 1/10 avec le tampon Tris pH 9,2 avant emploi.

Préincuber le réactif 1 et les solutions de lipase quelques minutes à 30 °C.

Régler le zéro du spectrophotomètre contre l'air.

Verser dans une microcuve spéciale U.V.:

1 mL de réactif 1 et 100  $\mu\text{L}$  de "lipase essai" (2 essais).

Mélanger, placer rapidement dans le spectrophotomètre thermostaté à 30°C.

Noter ou enregistrer la variation d'absorbance pendant 2 minutes.

Faire de même avec 1 mL de réactif 1 et 100  $\mu\text{L}$  de "lipase étalon" (1 essai).

### 2.3 - Compte rendu.

Déterminer les vitesses initiales des réactions exprimées en variation d'absorbance par minute.

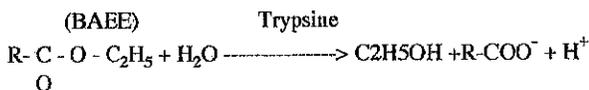
En déduire la concentration d'activité catalytique des essais en U / mL de filtrat dilué au 1/10; puis l'activité en U par gramme de comprimé et l'activité spécifique en U par mg de protéines.

Conclure par rapport à la spécification.

## 3 - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA TRYPSINE. (22 points)

### 3.1 - Principe.

En plus de son activité endopeptidase, la trypsine (E.C. 3.4.21.4.) possède également une activité estérasique; ceci permet une mesure simple de son activité, en présence d'un substrat synthétique tel que le N-Benzoyl-L-Arginyl-Ethyl-Ester ou BAEE. La réaction catalysée est alors:



Au pH 8, les groupements acides carboxyliques sont complètement ionisés, et, en absence de tampon dans le milieu réactionnel, l'hydrolyse du BAEE se traduit par une libération stoechiométrique de protons. L'activité peut être mesurée par pH-métrie: le pH est maintenu à la valeur 8 en neutralisant les protons formés, au fur et à mesure de leur apparition, par addition d'hydroxyde de sodium.

La vitesse initiale et/ou l'activité seront déterminées à partir du tracé de la courbe:

$$\text{Volume (ou nombre de } \mu\text{moles) de NaOH ajouté} = f(t)$$

$$t = \text{temps en minutes}$$

Une unité de trypsine sera définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant une micromole de BAEE (donc produisant une micromole de proton) par minute dans les conditions opératoires suivantes: BAEE saturant, pH voisin de 8 et température ambiante.

### 3.2 - Protocole.

#### 3.2.1 - Etalonnage du pH-mètre.

Etalonner le pH-mètre avec les solutions étalons fournies.

#### 3.2.2 - Suivi de l'avancement de la réaction (2 essais possibles dont un seul sera noté).

Placer 2,5 mL de filtrat à température ambiante, quelques minutes avant le début de la réaction. Remplir la burette avec la solution d'hydroxyde de sodium à 5 mmol/L.

Verser dans un bécher contenant un barreau aimanté:

- 25 mL de BAEE à 12 mmol/L;
- 25 mL de KCl à 0,2 mol/L

Placer les électrodes du pH-mètre dans cette solution, mettre en route l'agitation.

Ajouter 1 mL de filtrat.

Amener le pH à une valeur comprise entre 8 et 8,5 par addition de NaOH.

Noter le volume  $V_0$  correspondant au niveau de NaOH dans la burette.

La trypsine, en provoquant une libération de protons, va faire baisser le pH du milieu.

Quand le pH atteint exactement la valeur de 8,00 déclencher le chronomètre: soit  $t_0 = 0$

Avant que le pH ne soit descendu au-dessous de 7,90, verser un volume de NaOH

voisin de 0,2 à 0,3 mL (noter  $V_1$ , correspondant au niveau de NaOH dans la burette)

tel que le pH remonte à une valeur légèrement supérieure à 8. Lorsque le pH atteint à

nouveau la valeur 8,00, noter le temps  $t$ , sans arrêter le chronomètre.

Puis verser un volume de NaOH voisin de 0,2 à 0,3 mL (noter  $V_2$ ) tel que le pH

remonte à une valeur légèrement supérieure à 8. Noter le temps  $t_2$  lorsque le pH atteint à nouveau la valeur 8,00; poursuivre selon le même principe, jusqu'à obtenir une dizaine de mesures.

### 3.3 - Compte rendu.

Dresser le tableau des valeurs "V" et "t"; tracer sur papier millimétré la courbe "volume de NaOH versé = f(t)".

À partir du tracé de la courbe, déterminer la vitesse initiale de la réaction, exprimée en mol de NaOH versé par minute dans le milieu réactionnel.

La concentration en BAEE étant saturante, en déduire:

- la concentration d'activité catalytique en unités par mL de filtrat;
- l'activité en unités par gramme de comprimé;
- l'activité spécifique en unités par mg de protéines.

Conclure par rapport à la spécification.

## FEUILLE DE RÉSULTATS À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

### 1-Dosage des protéines.

	étalons						Filtrat	
							Solution validation	Essai 1
Quantité de protéines en g/tube	0					250		
Absorbance								

### 2-Mesure de l'activité lipase.

	Filtrat dilué		
	Lipase étalon	Essai 1	Essai 2
Variation d'absorbance par minute			

### 3-Mesure de l'activité trypsine.

	Filtrat
Descente de burette par minute (en mL/min)	

## MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

1<sup>er</sup> jour

Durée :4 H

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

### **Contrôles dans l'industrie pharmaceutique**

#### **A - MICROBIOLOGIE (55 points)**

##### **Contrôle d'un médicament non obligatoirement stérile**

Le médicament testé est un Iyophilisat de pancréas total utilisé en enzymothérapie digestive. Il se présente sous forme de poudre orale hydrosoluble et est conditionné en flacons de 5 grammes. Ce produit non obligatoirement stérile est habituellement de bonne qualité hygiénique; cependant il peut être occasionnellement contaminé par des germes sporulants.

##### **1 - Contrôle du produit fini en flacon. (21 points)**

Les échantillons prélevés dans les lots de fabrication sont mis en préculture soit en bouillon peptone, soit en bouillon de Sabouraud.

L'étude porte sur deux flacons-échantillons contaminés.

##### **1.1 - Étude de l'échantillon A.**

L'échantillon A a été mis en préculture en bouillon peptone pour l'enrichir en contaminants éventuellement présents.

Cette préculture présentée en fiole d'Erlenmeyer (étiquette: échantillon A) a été préparée comme suit: mise en suspension du contenu du flacon (5g) dans 45 mL d'une solution tampon peptonée au NaCl à pH 7, puis incubation à 30°C pendant 24 h.

**1.1.1 -** Effectuer une coloration de Gram à partir de la préculture.

**1.1.2 -** Isoler le (ou les contaminants) sur un milieu dont le choix sera justifié sur le compte rendu.

##### **1.2 - Étude de l'échantillon B.**

L'échantillon B a été mis en préculture en bouillon de Sabouraud à 30°C pendant 3 jours.

La préculture a été ensemencée à la surface d'une gélose de Sabouraud incubée également à 30°C pendant 3 jours (étiquette: échantillon B).

**1.2.1 -** Procéder à l'étude macroscopique du contaminant.

**1.2.2 -** Réaliser l'étude microscopique (la technique du montage est laissée à l'initiative du candidat). Un dessin légendé de l'observation microscopique sera présenté aux examinateurs.

Conclure quant à l'identité du microorganisme.

## 2 - Contrôle des Pratiques du Laboratoire de Contrôle Biologique. (34 points)

### 2.1 - Contrôle de l'efficacité des milieux et de la validité des méthodes de dénombrement des microorganismes.

La fertilité de la gélose de Sabouraud est contrôlée et évaluée par numération d'une suspension de la souche standard de *Candida albicans* ATCC 2091.

2.1.1 - Évaluer la concentration de la culture mère (étiquette: *C. albicans* ) par mesure de l'absorbance [une unité d'absorbance (1 UA) équivalent à environ  $1,3 \cdot 10^7$  UFC/mL; linéarité du spectrophotomètre de 0,1 UA à 0,6 UA].

2.1.2 - Mettre en oeuvre un protocole permettant de numérer 100 UFC sur gélose de Sabouraud.

Pour cela:

- réaliser les dilutions nécessaires en eau distillée stérile;
- ensemercer, en parallèle, 2 gammes de 3 dilutions successives: ensemencement en surface par 0,1 mL étalé à la pipette râteau (confection par les candidats) ou à l'aide de billes de verre.

### 2.2 - Contrôle d'une souche standard d'anaérobie sporulant.

La validité des méthodes de recherche des germes doit elle-même être conduite à l'aide de souches de référence dont il convient de contrôler les caractères.

Pour les *Clostridium* ces souches sont:

*Clostridium sporogenes* ATCC 19404, pour contrôle des conditions d'anaérobiose;

*Clostridium pefringens* ATCC 13124, pour contrôles de la sélectivité de la température de développement et de la sensibilité aux antibiotiques.

2.2.1 - Contrôler l'identité de la souche ATCC 13124: contrôle des caractères biochimiques après ensemencement d'une galerie API 20A, incubation à 37°C pendant 24 heures.

2.2.2 - Contrôler l'efficacité d'isolement sélectif de *Clostridium pefringens* par la gentamicine.

Sur la même gélose (Columbia + gentamicine) ensemercer par stries une demi-boîte avec *Clostridium sporogenes* et l'autre demi-boîte avec *Clostridium pefringens* ; incubation à 37°C pendant 24 heures.

## **B -IMMUNOLOGIE (30 points)**

### **Contrôle d'un lot de pancréatine**

Dans un lot de fabrication de pancréatine, on détecte des contaminations par *Clostridium botulinum* , bactérie commensale du tube digestif du porc. À partir d'un échantillon, on cherche à quantifier la neurotoxine A produite par la bactérie par une technique d'électro - immunodiffusion.

## **1 - Réalisation technique.**

On dispose d'une fraction de l'échantillon de médicament à analyser noté "échantillon".

### **Matériel et réactifs**

- une lame de verre préglacée
- 0,3 mL d'immunsérum antineurotoxine A en tube Eppendorf
- 1 mL de solution mère de neurotoxine à  $4 \text{ g.L}^{-1}$  en tube Eppendorf
- 0,25 mL d'échantillon en tube Eppendorf
- 4 mL de tampon véronal en tube à essai (conservé à  $56^{\circ}\text{C}$ )
- 4 mL d'agarose en tube à essai bouché (conservé à  $56^{\circ}\text{C}$ )
- 5 mL de tampon véronal en tube à essai (température ambiante)
- pipettes automatiques
- 4 tubes Eppendorf.

### **1.1 - Préparation de la plaque de gel.**

Les plaques ont été préalablement glacées.

#### **1.1.1 - Préparation du mélange gel-sérum.**

Transvaser 4 mL de tampon véronal conservé à  $56^{\circ}\text{C}$  dans un tube à essai dans 4 mL d'agarose en surfusion à 2%.

On obtient le mélange à 1 % d'agarose.

Ajouter alors 0,250 mL d'immunsérum antineurotoxine A et homogénéiser par retournement.

#### **1.1.2 - Coulage de la plaque.**

Placer la plaque sur une table parfaitement horizontale et répartir uniformément les 8 mL du mélange sur la plaque glacée. Laisser solidifier le gel au réfrigérateur à  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **1.1.3 - Perforation de la plaque.**

Percer 6 puits à 2 cm d'une extrémité de la plaque, selon la matrice préétablie (voir document annexe).

### **1.2 - Préparation des dépôts.**

#### **1.2.1 - Préparation de la gamme étalon.**

A partir d'une solution mère de neurotoxine A à  $4 \text{ g.L}^{-1}$ , réaliser 4 points de gamme à:  $0,8 \text{ mg.m L}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mg.m L}^{-1}$ ;  $0,4 \text{ mg.m L}^{-1}$  et  $0,2 \text{ mg.m L}^{-1}$  (dilution en tampon véronal).

#### **1.2.2 - Dépôts.**

Afin de limiter le phénomène de simple diffusion, les dépôts seront faits la plaque placée dans la chambre d'électrophorèse.

Déposer 5  $\mu\text{L}$  des 4 solutions de référence et doubler le dépôt de l'essai étiqueté "échantillon".

### 1.3 - Migration.

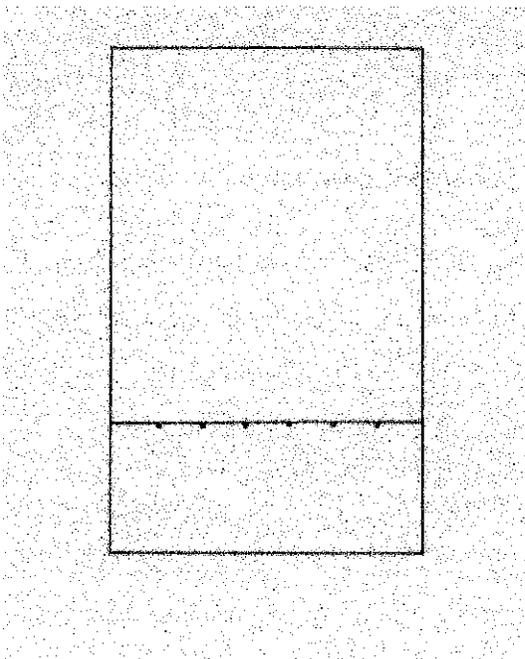
La migration électrophorétique est réalisée sous une tension constante de  $20 \text{ V.cm}^{-1}$  en tampon véronal pH = 8,6 durant 120 minutes au moins.

Mettre ensuite le gel dans une chambre humide, à  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 2 - Compte rendu.

2.1 - Présenter dans un tableau la réalisation de la gamme de dilution de la solution étalon.

2.2 - Faire un plan des dépôts et justifier à l'examineur l'orientation du gel lors de l'électrophorèse.



## MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

2<sup>ème</sup> jour

Durée :2 H 00

### **A - MICROBIOLOGIE (55 points)**

#### **1 - Contrôle du oproduit fini en flacon. (21 points)**

Étude de l'échantillon A: réaliser une orientation du diagnostic du contaminant.

#### **2 - Contrôle des Pratiques du Laboratoire de Contrôle Biologique. (34 points)**

##### **2.1 - Contrôle de la fertilité de la gélose de Sabouraud.**

- dénombrer les unités formant colonies,
- rassembler les résultats dans un tableau,
- exprimer le nombre d'UFC / mL de culture mère.
- conclure.

##### **2.2 - Contrôle de la souche anaérobie standard ATCC 13124.**

**2.2.1** - Lire la galerie API 20 A; conclure quant au contrôle des caractères et de l'identité de la souche de référence (expliquer la démarche).

**2.2.2** - Évaluer la spécificité de la gélose avec gentamicine: lecture, raisonnement et conclusion.

### **B - IMMUNOLOGIE (30 points)**

Mesurer la hauteur des pics obtenus.

Présenter les résultats sous forme de tableau.

Tracer, sur papier millimétré, la courbe:

hauteur = f (concentration en neurotoxine en  $\text{mg.mL}^{-1}$ ).

Déterminer graphiquement la concentration de la neurotoxine A de *Clostridium botulinum* dans l'échantillon.

Conclure quant à la possibilité de mise sur le marché du lot de médicament suite à cette analyse.

\*\_\*\_\*\_\*\_\*\_\*\_\*\_\*\_\*\_\*

***Épreuves de  
la session  
2000***



## EPREUVE DE FRANÇAIS.

**DURÉE : 4 HEURES**

**COEFFICIENT : 3**

Cette épreuve étant commune avec celle du BTS Biotechnologies on se reportera à la page 2000-1 du BTS Biotechnologies.

## EPREUVE D'ANGLAIS.

**DURÉE : 2 HEURES**

**COEFFICIENT : 2**

Cette épreuve étant commune avec celle du BTS Biotechnologies on se reportera à la page 2000-8 du BTS Biotechnologies.

## EPREUVE DE MATHÉMATIQUES.

**DURÉE : 2 HEURES**

**COEFFICIENT : 1,5**

Cette épreuve étant commune avec celle du BTS Biotechnologies on se reportera à la page 2000-9 du BTS Biotechnologies.

## EPREUVE DE SCIENCES PHYSIQUES.

**DURÉE : 2 HEURES**

**COEFFICIENT : 2,5**

- La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.
- L'usage de la calculatrice est autorisé.

### D) PILES ET COMPLEXES (15 points/50)

On réalise les deux électrodes suivantes:

- l'électrode n° 1 est constituée d'une lame de cuivre plongeant dans 100 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse de nitrate de cuivre: Cu (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> de concentration molaire égale à 2,00 x 10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>.
- l'électrode n° 2 est constituée d'une lame de zinc plongeant dans 100 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse de nitrate de zinc: Zn (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> de concentration molaire égale à 2,00 x 10<sup>-2</sup> mol. L<sup>-1</sup>

- 1) Donner l'expression du potentiel E1, de l'électrode 1. Calculer E1.
- 2) Donner l'expression du potentiel E2 de l'électrode 2. Calculer E2.
- 3) On relie les deux électrodes par un pont ionique.
  - 3-1) Représenter la pile ainsi constituée. Indiquer la polarité des électrodes et le sens de passage du courant lorsque la pile débite.
  - 3-2) Calculer la f.e.m. de la pile au début de son fonctionnement.
  - 3-3) Écrire l'équation-bilan de la réaction chimique mise en jeu lorsque la pile débite.
- 4) Dans l'électrode n° 2 on ajoute, aux 100 cm<sup>3</sup> de la solution de nitrate de zinc initialement présents, 100 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse d'ammoniac de concentration molaire égale à 2,00 x 10<sup>-1</sup> mol.L<sup>-1</sup>.
  - 4-1) Quelles seraient les concentrations en ions Zn<sup>2+</sup> et en ammoniac en l'absence de réaction ? On négligera l'hydrolyse de l'ammoniac.

4-2) Il se forme l'ion complexe  $Zn(NH_3)_4^{2+}$ . Ecrire l'équation-bilan de la réaction de formation de cet ion complexe.

4-3) Le potentiel de l'électrode n° 2 a pour valeur:  $E^{\circ} 2 = - 0,97 V$ .

- En déduire la concentration des ions  $Zn^{2+}$  libres dans la solution.

- Exprimer la constante de dissociation  $K_D$  de l'ion complexe. Calculer  $K_D$ .

(On considèrera le complexe comme parfait).

Données:

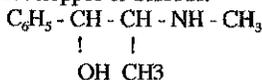
$$RT/F \ln x = 0,06 \lg x.$$

$$E^{\circ} Cu^{2+}/Cu = 0,34 V$$

$$E^{\circ} Zn^{2+}/Zn = - 0,76 V$$

## II ) CHIMIE ORGANIQUE (10 points/50)

L'éphédrine, molécule ayant une activité reconnue sur le système nerveux sympathique, a la formule semi-développée ci-dessous:



Elle peut être obtenue de la manière suivante:

1) Le benzène, soumis à l'action du chlorure de propanoyle  $CH_2CH_2COCl$ , en présence de chlorure d'aluminium, donne un produit A dont le spectre d'absorption I.R. présente un pic intense vers  $1700 \text{ cm}^{-1}$ , caractéristique d'une liaison  $C=O$ .

Donner la formule semi-développée de A et son nom en nomenclature systématique.

Donner le mécanisme de la réaction.

2) A, traité par le dibrome en milieu acide, donne B de formule  $C_6H_5COCHBrCH_3$ .

B peut exister sous la forme de deux énantiomères. Les représenter en utilisant la représentation de Cram (perspective cavalière) et leur attribuer les configurations R et S.

Les nommer en justifiant la réponse.

3) B, soumis à l'action de la méthylamine, donne C. Ecrire l'équation-bilan de la réaction.

4) C subit une hydrogénation par le borohydrure de sodium  $NaBH_4$  et donne D. D peut exister sous forme de plusieurs stéréo-isomères dont l'un est l'éphédrine.

À l'aide d'un schéma, identifier les carbones asymétriques de D.

Quel est le nombre de stéréo-isomères ?

Données: H:Z=1; C:Z=6; O:Z=8; Br:Z=80.

## III) RÉSEAUX (10 points/50)

Un réseau plan, par transmission, est gravé à 400 traits par millimètre.

1) Il est d'abord éclairé sous incidence normale par un laser He-Ne émettant une lumière de longueur d'onde  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ .

Combien de maxima de lumière peut-on observer sur un écran placé derrière le réseau ?

2) Le réseau est maintenant éclairé par un faisceau de lumière parallèle issu d'une lampe à hydrogène, toujours sous incidence normale.

Calculer, dans ce spectre d'ordre  $k=2$ , l'écart angulaire séparant les maxima correspondant aux

longueurs d'onde  $\lambda_1 = 656 \text{ nm}$  et  $\lambda_2 = 410 \text{ nm}$ .

- 3) Les réseaux de diffraction sont présents dans certains appareils utilisés lors des séances de travaux pratiques; citer l'un de ces appareils et préciser le rôle du réseau.

#### IV) MESURE DE VISCOSITÉ (15 points/50)

On veut mesurer le coefficient de viscosité  $\eta_{\text{éthanol}}$  de l'éthanol à  $20^\circ\text{C}$ , en utilisant un viscosimètre d'Ostwald.

On connaît le coefficient de viscosité de l'eau:  $\eta_{\text{eau}} = 1,02 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$ .

On connaît également les masses volumiques de l'eau  $\rho_{\text{eau}} = 9888,21 \text{ kg.m}^{-3}$  et de l'éthanol

- 1) Décrire rapidement les diverses opérations effectuées lors de la manipulation.

Quelle est la grandeur physique effectivement mesurée ?

- 2) On rappelle que le coefficient de viscosité est proportionnel à la masse volumique du liquide et à la durée d'écoulement, le coefficient de proportionnalité ne dépendant pas de la nature du liquide étudié. Exprimer le coefficient de viscosité de l'éthanol en fonction de celui de l'eau et des autres grandeurs.

- 3) Calculer la valeur numérique du coefficient de viscosité de l'éthanol à  $20^\circ\text{C}$ . On donne:

$$t_{\text{éthanol}} / t_{\text{eau}} = 410/275$$

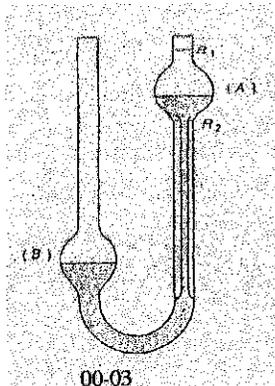
- 4) Il existe une formule empirique permettant de calculer le coefficient de viscosité de l'eau à une température  $t^\circ\text{C}$  connaissant sa valeur à  $20^\circ\text{C}$ :

$$\log \eta_t / \eta_{20} = \frac{1,3272(20-t) - 0,001053(t-20)^2}{t + 105}$$

Calculer le coefficient de viscosité de l'eau à  $50^\circ\text{C}$  sachant qu'il vaut  $1,02 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$  à  $20^\circ\text{C}$ .

Quelle est l'influence de la température sur le coefficient de viscosité de l'eau ? Quelle précaution opératoire ceci entraîne-t-il ?

- 5) Connaissez-vous un autre dispositif permettant de déterminer le coefficient de viscosité d'un liquide ? En faire un schéma et décrire sommairement son principe.



## EPREUVE DE BIOCHIMIE BIOLOGIE.

DURÉE : 4 HEURES

COEFFICIENT : 6

Calculatrice autorisée.

### REMARQUES PRÉLIMINAIRES:

1 - Le sujet propose 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 proposés.

### LES PLANTES TRANSGÉNIQUES

La mise au point des plantes transgéniques a permis l'étude des gènes et de leur fonctionnement au cours du développement des plantes. Les connaissances qui en résultent et la maîtrise progressive des techniques du génie génétique ouvrent des voies nouvelles pour l'amélioration des plantes. Le domaine agro-alimentaire est largement concerné; l'évaluation de la sécurité alimentaire des plantes transgéniques est une priorité; mais les impacts - positifs ou négatifs - de leur utilisation sur l'environnement et sur les pratiques agricoles doivent également être déterminés.

La transgénése végétale fait appel aux techniques du génie génétique.

#### 1) Quelques aspects du génie génétique (35 points)

La définition des plantes transgéniques ainsi que les différentes étapes permettant de les obtenir sont présentées dans le **Document I**.

Dans le cas d'un **maïs transgénique**:

- le gène d'intérêt est un gène qui code pour une substance toxique vis-à-vis d'un insecte ravageur, la pyrale. Ce gène provient de la bactérie *Bacillus thuringiensis*.

- le gène marqueur est un gène de résistance à un antibiotique, l'ampicilline.

1.1) Donner les principaux caractères morphologiques, culturels et biochimiques du genre *Bacillus*.

1.2) Cette substance toxique est de nature protéique. Donner les principales propriétés de ce type de toxine.

L'utilisation d'un gène de résistance à l'ampicilline comme gène marqueur a suscité une polémique. En effet, les associations de consommateurs et certains scientifiques craignent que ce caractère se transmette aux bactéries de la flore intestinale de l'homme ou aux bactéries de la panse des ruminants. Cette transmission pourrait se faire par une transformation.

1.3) Exposer les différents mécanismes expliquant la résistance des bactéries aux antibiotiques.

1.4) L'ampicilline étant une pénicilline A, quelle est la partie active de la molécule ? En donner sa formule développée.

1.5) À partir des différents mécanismes de résistance cités à la question 1.3, expliciter celui qui permet d'assurer la résistance à l'ampicilline.

1.6) Définir la transformation. Indiquer dans quelles conditions ce phénomène peut avoir lieu.

En génétique bactérienne, lors d'une transformation, il est également indispensable d'avoir un moyen de sélection du recombinant. Très souvent c'est un caractère de résistance à un antibiotique qui est utilisé. Par exemple, on réalise la transformation d' *Escherichia coli* sensible à l'ampicilline et à la tétracycline (Amp<sup>S</sup> et Tet<sup>S</sup>) avec différents plasmides (voir Document II).

Après avoir mis *Escherichia coli* en état de compétence, on réalise quatre essais:

- \*un essai sans plasmide
- \*un essai avec le plasmide pBR 322
- \*un essai avec le plasmide pBR 322 (Bam HI)
- \*un essai avec le plasmide pBR 322 (Eco RI)

Chaque essai est étalé sur une gélose nutritive à l'ampicilline, puis incubé 24 heures à 37°C.

1.7) Quel est l'intérêt du premier essai ? Indiquer ce que l'on observe sur chaque gélose si la transformation a bien eu lieu. Justifier.

1.8) Autour des colonies ampicilline résistantes, on observe la croissance de toutes petites colonies. Expliquer ce phénomène.

1.9) On réalise ensuite une réplique sur une gélose nutritive à la tétracycline. Indiquer ce que l'on observe, pour les quatre essais, au bout de 24 heures d'incubation à 37°C. Justifier.

## 2) Les plantes oléagineuses et la diversification des huiles végétales (20 points)

Les plantes oléagineuses telles que l'arachide, le colza, le tournesol, le soja produisent des huiles d'une grande importance commerciale, recherchées tant pour l'alimentation que pour les usages industriels ou pharmaceutiques.

Les huiles contiennent essentiellement des triacylglycérols dont la composition en acides gras est déterminée et spécifique de l'espèce végétale. Par hybridation et sélection variétale, il est déjà possible de jouer sur la composition en acides gras, mais la transgénèse végétale ouvre des perspectives bien plus importantes. La teneur des huiles en acides gras poly-insaturés tels que l'acide linoléique (C18:2  $\Delta^9,12$ ) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3  $D^9,12,15$ ) fait l'objet de recherches intensives.

### 2.1) Etude de la biosynthèse des acides gras saturés chez les végétaux (14 points)

L'acide stéarique (acide gras saturé C18:0) est le précurseur des acides gras poly-insaturés. Les étapes conduisant à sa biosynthèse se déroulent dans le stroma des chloroplastes et sont présentées dans le Document III.

2.1.1) Développer sous forme chimique l'étape 1 conduisant à la formation du malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA.

Préciser le nom de l'enzyme et des coenzymes intervenant au cours de cette étape.

2.1.2) Nommer le complexe polypeptidique assurant la biosynthèse de l'acide stéarique. En préciser les principales caractéristiques.

**N.B.:** Chez les animaux un complexe analogue conduit à la synthèse d'acide palmitique (C 16:0). Le chargement du complexe polypeptidique puis la première condensation qui s'effectue au cours de l'étape 2, conduisent à l'acétoacétyl-S-Enzyme.

2.1.3) À l'aide des données du Document III concernant l'étape 3, réécrire les trois réactions de cette étape en développant les formules chimiques des substrats et produits. Pour chaque réaction, préciser le nom de l'activité enzymatique ainsi que le nom du coenzyme nécessaire

## **2.2) Production des acides gras poly-insaturés chez les végétaux** (6 points)

La synthèse d'acides gras insaturés et poly-insaturés à partir de l'acide stéarique (C18:0) fait intervenir des désaturases:

\* la  $\Delta 9$  désaturase est présente aussi bien dans les cellules végétales que dans les cellules animales,

\* par contre, les  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  désaturases existent uniquement dans les cellules végétales.

**2.2.1)** Quelle est, en alimentation humaine, la notion fondamentale qui découle de ces observations ? Expliquer.

**2.2.2)** Construire un schéma simple (sans formules chimiques) de la biosynthèse des acides gras insaturés en C18 à partir de l'acide stéarique. Donner la chronologie des désaturations, puis nommer les acides gras insaturés obtenus, en précisant leur écriture biochimique conventionnelle.

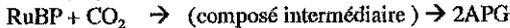
## **3) Amélioration du rendement de la photosynthèse - l'enzyme: Rubisco** (30 points)

La RUBISCO est la **ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase**, enzyme présent dans le stroma des chloroplastes des cellules végétales.

Des recherches tentent de rendre plus efficace, in vivo, l'activité de carboxylation de cet enzyme qui est directement responsable du rendement de la photosynthèse.

### **3.1) Etude cinétique de la Rubisco** (16 points)

Cet enzyme permet la fixation de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) sur son accepteur, le ribulose 1,5 biphosphate (RuBP) ce qui conduit à la synthèse d'acide phosphoglycérique (APG, composé à 3C), premier produit organique fabriqué dans la photosynthèse chez certaines plantes (blé, orge, tomate, pomme de terre, ...).



**3.1.1)** La **Figure A** du **Document IV** précise la formule du ribulose et indique la structure du composé intermédiaire forme lors de la réaction. Ecrire la réaction ci-dessus avec les formules chimiques développées.

Les caractéristiques cinétiques de l'activité de carboxylation de la Rubisco sont les suivantes:

$$K_{M1} (\text{CO}_2) = 7 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

$$K_{M2} (\text{RUBP}) = 40 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

$$V_{\max} = 200 \text{ Unités Arbitraires (UA)}$$

Par ailleurs, on désire étudier particulièrement l'interaction entre le substrat S, c'est-à-dire le  $\text{CO}_2$  et l'enzyme Rubisco. Or la réaction catalysée est une réaction à 2 substrats.

**3.1.2)** - Pour quel substrat l'enzyme a-t-il le plus d'affinité ? Expliquer.

- Afin d'étudier l'affinité du  $\text{CO}_2$  pour l'enzyme, comment doit-on procéder pour faire en sorte que l'enzyme fonctionne selon le schéma Michaëlien (utiliser les données du **3.1.1**) ?

On admettra que dans la suite du sujet ces conditions sont remplies.

On étudie l'influence du dioxygène ( $\text{O}_2$ ) sur l'activité de carboxylation de l'enzyme Rubisco. On constate alors que ce gaz entraîne une augmentation de la constante  $K_{M1}$  alors que la  $V_{\max}$  reste inchangée. Le **tableau B** présenté dans le **Document IV** fournit les résultats expérimentaux obtenus lors de cette étude.

**3.1.3)-** Quel rôle joue l' $\text{O}_2$  par rapport à l'activité de carboxylation de l'enzyme Rubisco ?

- La représentation graphique de  $K_{M1}$  apparent en fonction de la concentration en dioxygène est une droite:

- déterminer les paramètres de la droite de régression linéaire,

- en déduire la constante d'inhibition  $K_i$ ,
- expliquer la démarche utilisée ainsi que les calculs effectués.

**Donnée:** On appelle  $F_i$  le facteur d'inhibition. Ce facteur est le facteur multiplicatif affecté à  $K_M$  pour obtenir  $K_{M(\text{app})}$ . Ce facteur est également donné par la relation:

$$F_i = 1 + (C_i / K_i)$$

### 3.2) Fonctionnement de la Rubisco in vivo (8 points)

Dans les conditions naturelles, la Rubisco fonctionne dans une atmosphère dont la pression normale est 760 mm de mercure (1013 hPa) et dont la composition en gaz est donnée dans le **tableau C du Document IV**.

Si on estime que la solubilisation des gaz dans les différents compartiments cellulaires chez les végétaux se fait sans aucune contrainte comme dans un simple milieu aqueux, on peut rechercher, grâce aux constantes de solubilité, les concentrations respectives de chacun des gaz au contact de la Rubisco.

**Données:** - Solubilité de  $O_2 = 0,03 \text{ mL.L}^{-1} \text{ mm}^{-1} \text{ Hg}$ .

- Solubilité de  $CO_2 = 0,65 \text{ mL.L}^{-1} \text{ mm}^{-1} \text{ Hg}$ .

- Une mole de gaz correspond à 22,4 L dans les conditions normales de pression et de température.

**3.2.1)-** Calculer dans quelles conditions de concentrations en  $O_2$  et  $CO_2$  fonctionne normalement la Rubisco.

- Déterminer le facteur d'inhibition  $F_i$  due à la présence d' $O_2$  dans ces conditions de fonctionnement ainsi que le  $K_{M(\text{app})}$  de la Rubisco vis-à-vis de son substrat le  $CO_2$ .

On estime que la présence d' $O_2$  est préjudiciable à l'activité de carboxylation de la Rubisco c'est-à-dire en fait au rendement de la photosynthèse. Des pertes de 20 à 40 pour cent sont habituellement avancées.

**3.2.2)-** Rechercher la vitesse initiale ( $V_i$ ) correspondant à l'activité de carboxylation de la Rubisco dans les conditions naturelles évoquées ci-dessus.

- Quelle serait cette vitesse ( $V_j$ ) s'il n'y avait pas d' $O_2$  dans l'atmosphère ? En déduire le pourcentage d'inhibition de l'activité de carboxylation en raison de la présence d' $O_2$ .

### 3.3) Activité oxygénase de la Rubisco et Photorespiration (6 points)

La fixation de l' $O_2$  sur le même site catalytique que le  $CO_2$  correspond en réalité à une autre activité enzymatique de la Rubisco qui est l'activité d'oxygénation, à l'origine de ce que les physiologistes appellent la photorespiration.



**3.3.1)** Ecrire avec les formules chimiques la réaction ainsi catalysée.

**Donnée:** l'acide glycolique est  $\text{HOOC-CH}_2\text{OH}$ .

Les caractéristiques cinétiques de l'activité d'oxygénation de la Rubisco sont les suivantes:

$$K_{M1}(O_2) = 250 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

$$K_{M2}(\text{RuBP}) = 40 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

$$V_{\text{rmax}} = 80 \text{ Unités Arbitraires (UA)}$$

$$K_i^1(CO_2) = 7 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

**3.3.2)** Comparer les constantes cinétiques correspondant aux deux activités de la Rubisco. Quelle constatation intéressante peut-on faire ? Expliquer et conclure.

#### **4) Un exemple de "risque alimentaire" lie aux plantes transgéniques (35 points)**

Pour nourrir les animaux, on utilise surtout des végétaux riches en protéines, notamment le pois sec et le soja. Les tourteaux de soja sont pauvres en méthionine, un acide aminé soufré indispensable. L'addition de méthionine en poudre étant onéreuse, les chercheurs ont voulu pallier cette déficience en transférant au soja le gène d'une protéine de la noix du Brésil. Cette protéine est appelée S2, car riche en deux acides aminés soufrés: la méthionine et la cystéine.

Or la noix du Brésil est très allergisante et le soja "complémenté" par transgénèse a également intégré le gène d'un allergène de cette noix.

L'ingestion de soja contenant l'allergène de la noix du Brésil peut provoquer chez l'animal, porcelet ou veau, une réaction immunitaire d'hypersensibilité de type I.

##### **4.1) Origine des immunoglobulines (6 points)**

Au cours de cette réaction immunitaire humorale, des anticorps sont élaborés.

4.1.1) Quel type cellulaire est responsable de la synthèse des immunoglobulines ?

4.1.2) Quel est le précurseur de ce type de cellule ?

Une de ces cellules a été photographiée au M.E.T. (voir Document V).

4.1.3) Donner les légendes correspondant aux numéros 1 à 4.

4.1.4) Quelle classe d'immunoglobuline est synthétisée lors de ce type de réponse immunitaire ?

##### **4.2) Synthèse des immunoglobulines (18 points)**

Les immunoglobulines synthétisées par ces cellules sont destinées à être sécrétées.

4.2.1) Indiquer sur le Document VI les légendes correspondant aux numéros 1 à 11 et donner un titre au schéma présenté. (Ce document est à rendre avec la copie).

4.2.2) Décrire la succession des événements qui se produisent de A à E.

4.2.3) Quelles chaînes peptidiques de l'immunoglobuline sont synthétisées comme indiqué sur le schéma proposé ? Justifier la réponse.

4.2.4) Quelle transformation post-traductionnelle doivent-elles encore subir pour la formation des "domaines" ?

4.2.5) Faire un schéma légendé d'une immunoglobuline citée au 4.1.4, montrant les différents "domaines" .

##### **4.3) La réaction d'hypersensibilité immédiate ( 11 points)**

Les immunoglobulines formées lors de cette réaction sont homocytophiles. Elles ont la capacité de se lier à des cellules possédant un récepteur de haute affinité pour le fragment Fc.

4.3.1) Indiquer deux types cellulaires possédant ce type de récepteur.

4.3.2) Le Document VII montre une de ces cellules prises au M.E.T. à deux étapes différentes de la réaction d'hypersensibilité de type I. Que représentent les numéros 1 et 2 ? Quelle est la molécule principale des éléments cellulaires 1 ?

4.3.3) Présenter les différents événements qui se succèdent entre un contact avec l'allergène chez un sujet non sensibilisé et la manifestation ultérieure de l'hypersensibilité.

#### **DOCUMENT I (Extrait de BIOFUTUR N° 164 - février 1997)**

##### **La naissance d'une plante transgénique**

Une plante transgénique est une plante dont le patrimoine a été modifié par introduction d'un gène ayant des propriétés intéressantes (résistance à un herbicide, production d'un médicament...).

L'opération se déroule en plusieurs étapes:

1. Identifier dans une autre espèce (bactérie, champignon, plante, animal...) un gène codant un caractère recherché. C'est le "gène d'intérêt".

2. Inclure ce gène dans une "construction génique". Il s'agit d'une boucle d'ADN, ou plasmide, qui contient des séquences d'ADN (inducteurs, promoteurs...) destinées à "greffer" le gène d'intérêt dans le génome de la plante-hôte et à faciliter son expression future. Une construction génique peut aussi contenir un "gène marqueur" (voir plus loin).

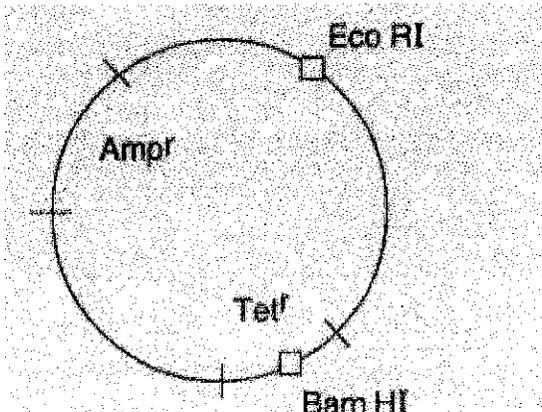
3. Au moyen d'un "vecteur", introduire cette construction dans une cellule de la plante-hôte, capable de régénérer une plante entière (cellule de méristème, protoplaste). Le vecteur peut être une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*, qui a la propriété naturelle d'induire des tumeurs chez certains végétaux en leur transférant un plasmide. Dans ce cas, les cellules de la plante-hôte sont infectées par des *A. tumefaciens* dont le plasmide contient la construction génique. On peut également bombardier, au moyen d'un "canon à gènes", les cellules de la plante-hôte avec de minuscules billes de tungstène porteuses de la construction génique.

4. Régénérer des plantes entières, puis sélectionner celles qui ont "retenu" la construction génique. Pour effectuer ce tri, le sélectionneur peut utiliser un gène marqueur qui code un caractère aisément reconnaissable. Il peut s'agir d'un gène de résistance à un antibiotique, comme dans le cas du maïs de Ciba.

5. Tester les plantes transgéniques en serre puis en parcelles.

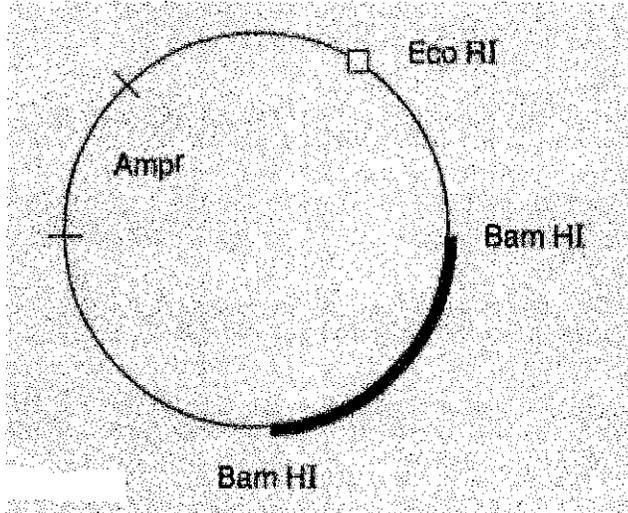
## DOCUMENT II

**pBR 322:** plasmide portant deux gènes de résistance,  $Amp^r$  et  $Tet^r$ , et deux sites de restriction Bam HI et Eco RI.



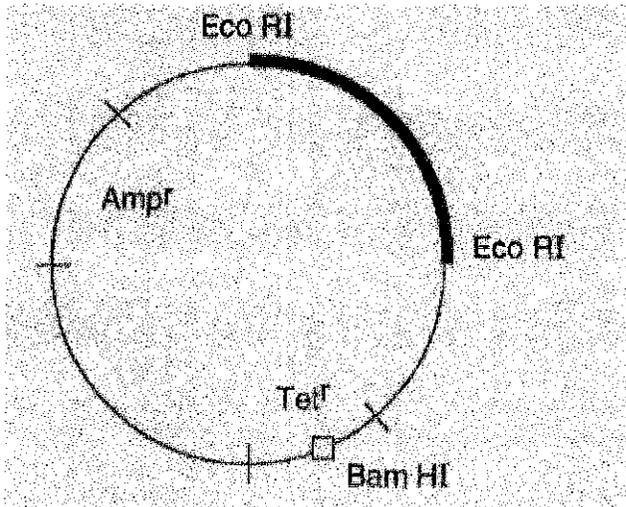
Plasmide pBR 322

**pBR 322 (Bam HI):** plasmide obtenu par digestion de pBR 322 avec l'enzyme de restriction Bam HI, puis addition d'un fragment d'ADN exogène au niveau de la coupure.



Plasmide pBR 322 (Bam HI)

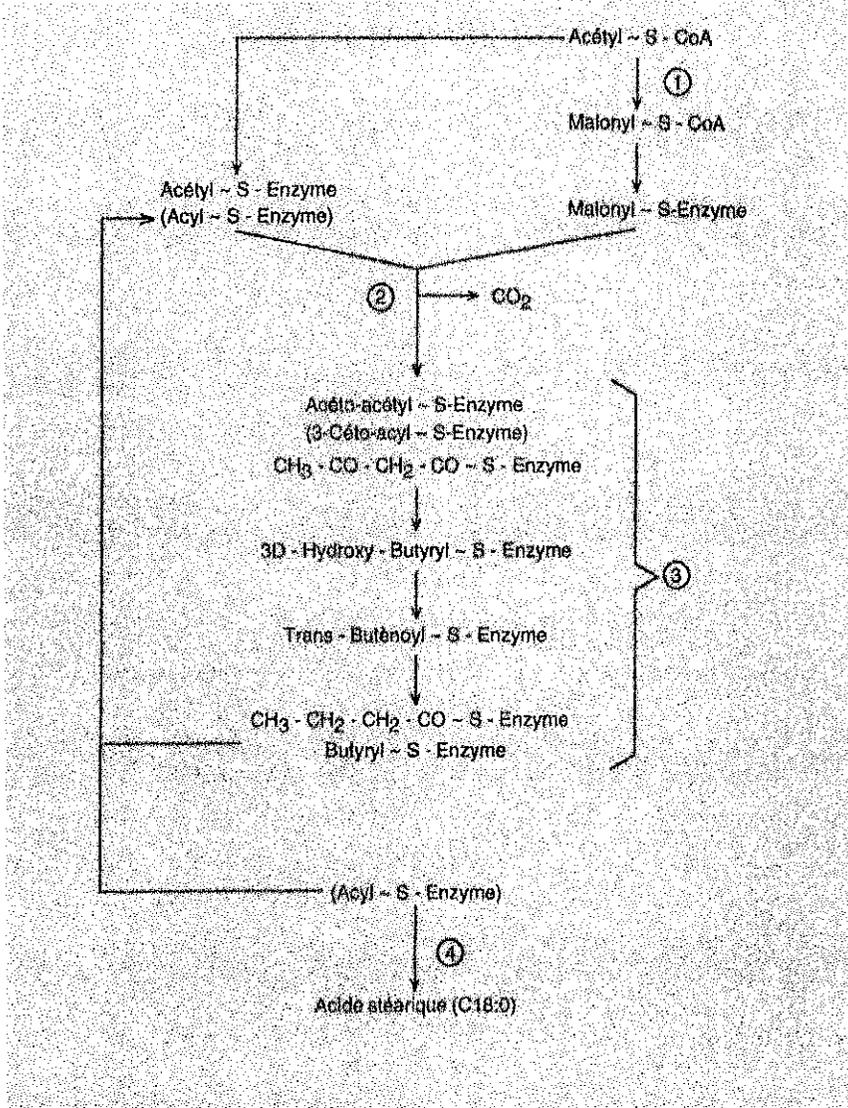
**pBR 322 (Eco RI):** plasmide obtenu par digestion de pBR 322 avec l'enzyme de restriction Eco RI, puis addition d'un fragment d'ADN exogène au niveau de la coupure



Plasmide pBR 322 (Eco RI)

### DOCUMENT III

#### Biosynthèse des acides gras saturés chez les végétaux



1-Formation du malonyl-CoA

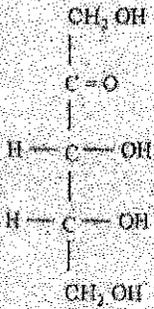
2-Chargement du complexe et condensation

3-Biosynthèse proprement dite

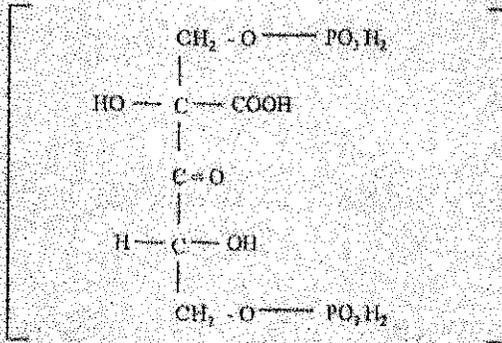
4-Sortie du complexe de biosynthèse

**DOCUMENT IV**

**Figure A**



ribulose



2-carboxy 3-céto-arabinitol 1,5 bis-phosphate

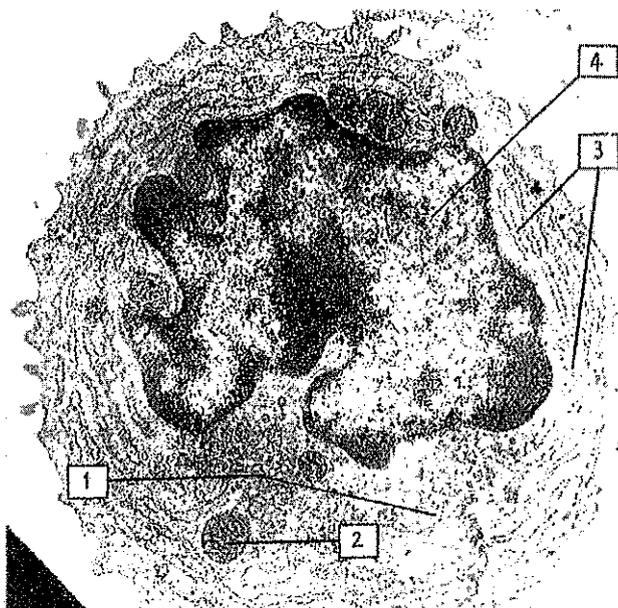
**Tableau B**

Conc. en dioxygène μmol.L <sup>-1</sup>	0	50	75	100	150	250
K <sub>a</sub> apparent μmol.L <sup>-1</sup>	7,0	8,4	9,2	9,8	11,1	14,0

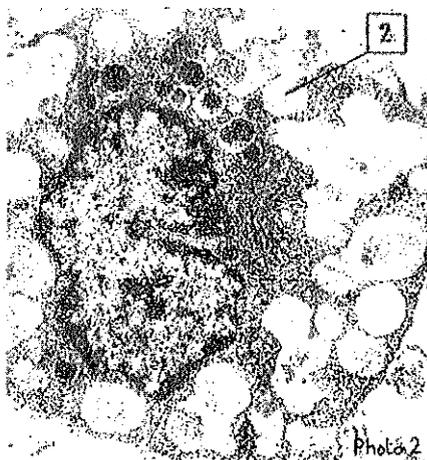
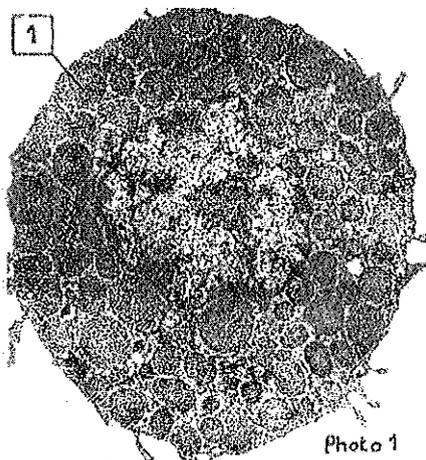
**Tableau C**

Gaz	Proportion en %	Pression partielle en mm Hg	Pression partielle en hPa
Azote	78	593	790
Dioxygène	21	160	213
Dioxyde de carbone	0,0325	0,25	0,33

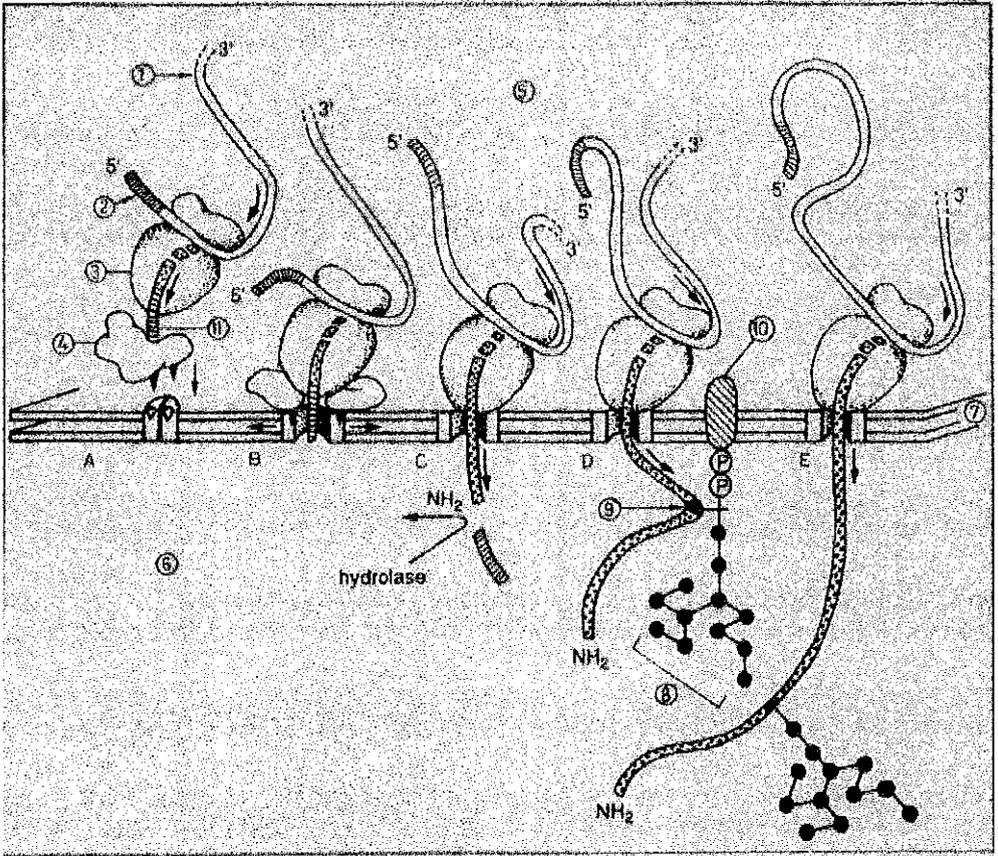
**DOCUMENT V**



**DOCUMENT VI**



**DOCUMENT VI**  
( à compléter et à rendre avec la copie)



**Légendes:**

- 1.....
- 2.....
- 3.....
- 4 Particule de reconnaissance du signal
- 5.....
- 6.....

- 7.....
- 8.....
- 9.....
- 10 Dolichol
- 11.....

# EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

## Première partie : ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

DURÉE : 4 HEURES

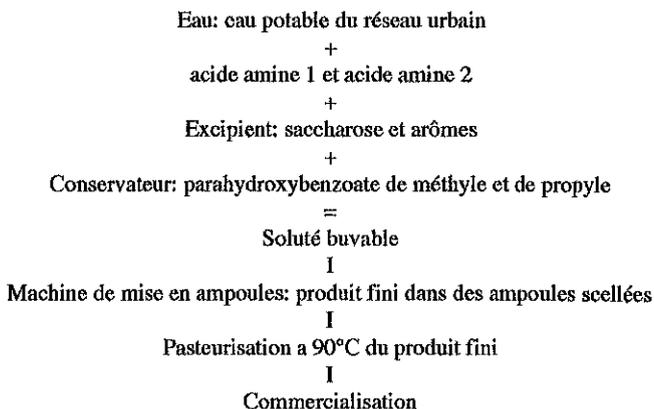
COEFFICIENT : 4

L'utilisation d'un dictionnaire anglais-français et de la calculatrice est autorisée.

### CONTROLE BIOCHIMIQUE, MICROBIOLOGIQUE ET PHARMACOLOGIQUE D'UN MÉDICAMENT "SOLUTÉ BUVABLE"

Chaque ampoule contient 5 mL de médicament. Le principe actif est un mélange équimolaire de deux acides aminés (ces deux acides aminés sont appelés "acide amine 1" et "acide amine 2" dans la suite du sujet).

La chaîne de production peut être schématisée très simplement comme suit:



#### **1) Contrôle des matières premières (35 points)**

##### **1-1) Photométrie d'absorption atomique (19 points)**

- L'un des excipients utilisés dans la fabrication du "Soluté Buvable" est le saccharose. Celui-ci doit satisfaire aux normes de la "Pharmacopée Européenne" qui précise: "*le saccharose satisfait à l'essai limite du plomb dans les sucres (0,5 ppm)*". La teneur en plomb est contrôlée par photométrie d'absorption atomique.

##### **1-1-1) Appareillage: (7 points)**

Faire un schéma de principe d'un photomètre d'absorption atomique, en donnant le nom et le rôle des principaux éléments constitutifs. Préciser la nature de la source de radiation.

Quel est le principal danger encouru lors de l'utilisation de cet appareil ? Quelles sont les précautions à mettre en oeuvre ?

### 1-1-2) Etalonnage de l'appareil: (6 points)

**Extraction du plomb:** à partir d'une solution mère, préparer 4 solutions de référence contenant respectivement 5, 10, 15 et 20 µg de plomb dans 100 mL d'acide éthanoïque dilué.

Ajouter alors 2 mL d'une solution de pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (à environ 1 % p/v) et 10 mL de méthylisobutylcétone. Agiter à l'abri d'une lumière vive, laisser séparer les deux couches et utiliser la couche méthylisobutylcétonique (N.B.: dans ces conditions opératoires, le plomb se concentre dans la couche méthylisobutylcétonique) .

\* Calculer la masse de nitrate de plomb à peser pour préparer 1 litre de solution mère. Indiquer la préparation des 4 solutions de référence à partir de cette solution mère.

**Mesures:** régler l'appareil au zéro, en utilisant la méthylisobutylcétone traitée dans les mêmes conditions que les solutions de référence.

\* Les moyennes des absorbances pour la gamme d'étalonnage, mesurées lors des essais de validation de la technique, sont rapportées dans le tableau ci-dessous:

masse de plomb en µg par 100 mL de solution de référence	0	5	10	15	20
absorbance	0	0,119	0,237	0,355	0,475

Calculer l'équation de la droite de régression linéaire et son coefficient de corrélation; commenter.

$$A = aM + b \text{ avec:}$$

A = absorbance;

M = masse de plomb en µg pour 100 mL de solution de référence;

a = coefficient directeur;

b = ordonnée à l'origine

**Données:** Plomb: masse molaire = 207,2 g.mol<sup>-1</sup>  
Nitrate de plomb: masse molaire = 331,21 g.mol<sup>-1</sup>

### 1-1-3) Dosage du plomb dans le saccharose: (6 points)

Des échantillons de saccharose sont prélevés dans plusieurs lots.

Le dosage du plomb est réalisé selon la technique décrite dans le **document 1**.

Les résultats de mesures d'absorbance de 3 lots sont rapportés dans le tableau suivant:

	Essai "5"	Essai "10"	Essai "15"
Lot n°1	0,148	0,267	0,386
Lot n°2	0,142	0,261	0,379
Lot n°3	0,274	0,390	0,513

Essai "5": essai dans lequel est ajouté 5 µg de plomb pour 100,0 mL, etc...

Calculer l'équation de la droite de régression linéaire pour chaque lot. À partir de la valeur des abscisses à l'origine, déduire la masse de plomb apporté par le saccharose, dans chaque série d'essai, puis la masse de plomb par kg de saccharose pour chaque lot. Conclure.

### I-2) Contrôles microbiologiques: tests préalables (16 points)

Les contrôles microbiologiques portent en particulier sur l'eau de fabrication (eau potable du réseau urbain). Avant d'effectuer ces contrôles, l'usine doit s'assurer par des tests préalables:

- 1 - des propriétés nutritives et sélectives des milieux de culture,
- 2 - de la validité de sa méthode d'analyse par filtration.

Ces tests sont effectués comme suit:

- Enterobacter cloacae* CIP 6085 / sur gélose Endo
- Escherichia coli* CIP 54127 / sur gélose Endo
- Enterococcus hirae* CIP 5855 / sur gélose Slanetz
- Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 / sur gélose à la cétrimide
- Clostridium sporogenes* CIP 79032 / sur gélose VF pour sulfite-réducteurs

### Protocole:

#### Premier test:

- a) Dans un flacon stérile introduire aseptiquement 100 mL d'eau déminéralisée stérile, puis 1 mL d'une suspension à  $10^2$ /mL d' *Enterobacter cloacae*.
- b) Filtrer puis déposer la membrane sur une gélose Endo.  
(répéter ce premier test avec chacune des 4 autres souches vis-à-vis de la gélose correspondante).

#### Deuxième test:

Opérer de la même façon, mais en remplaçant l'eau déminéralisée stérile par de l'eau potable. Effectuer ce deuxième test avec chacune des 5 souches vis-à-vis de la gélose correspondante.

### QUESTIONS:

#### **1-2-1)** (6 points)

- a) Quelles sont les informations recherchées par ces tests ?
- b) Quels résultats doit-on obtenir, après incubation, pour chaque test pour considérer que la méthode est valable ?

#### **1-2-2)** (4 points)

- a) Dans quelles hypothèses utilise-t-on une numération par dilution, une numération par filtration ?
- b) Quelle est la valeur du diamètre des pores d'un filtre ? Comparer par rapport à la taille des bactéries.

#### **1-2-3)** (6 points)

Donner les rôles:

- a) de l'azide de sodium et du chlorhydrate de triphényltétrazolium (T.T.C.) dans la gélose de Slanetz;
- b) du sulfite de sodium et du citrate de fer dans la gélose VF pour sulfite-réducteurs.

### **2) Contrôle du produit fini** (26 points)

#### **2-1) Contrôle de routine du principe actif: identification des deux acides aminés** (5 points)

L'identification des deux acides aminés du principe actif s'effectue par chromatographie ascendante sur couche mince. Le matériel et les réactifs utilisés sont décrits dans le **document n°2**.

Une ampoule de 5 mL de "Soluté buvable" contient 1 gramme d'acides aminés. Quelle dilution doit-on réaliser avant d'effectuer le dépôt de l'essai ?

Dans les conditions opératoires définies dans le **document n°2**, le Rf de l'acide aminé 1 est de 0,55 et celui de l'acide aminé 2 est de 0,4. Définir le Rf. Expliquer la différence de comportement des deux acides aminés.

## 2-2) Contrôle quantitatif du principe actif (9 points)

Le contrôle quantitatif du principe actif s'effectue par chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C.), qui permet de doser les deux molécules constituant le principe actif (cf. **document n°3**).

La détection des acides aminés se fait par mesure directe de l'absorbance à 200 nm.

### 2-2-1) Préparation de l'échantillon

Sachant que dans le principe actif les pourcentages massiques sont de 43,3 % pour l'acide aminé 1 et de 56,7 % pour l'acide aminé 2, quelle dilution du "Soluté buvable" doit-on réaliser pour effectuer le dosage d'un échantillon de "Soluté buvable" ?

### 2-2-2) Contrôle de qualité

Afin de tester la reproductibilité de la méthode sur le produit fini, des essais ont été réalisés sur une solution de "Soluté buvable" correctement diluée (cf. **document n°4**).

Définir les termes: précision d'une méthode, reproductibilité, exactitude.

La méthode est-elle précise, exacte, reproductible dans le temps ? Justifier les réponses.

## 2-3) Détermination du temps de pasteurisation (6 points)

Au cours des années d'utilisation de la machine de mise en ampoules des *Enterobacter cloacae* logés dans un joint inaccessible au désinfectant iodé ont développé une résistance au conservateur (parahydroxybenzoate). La pasteurisation des ampoules scellées a pour but de détruire ces bactéries.

Le **document n°5** donne les courbes de destruction.

**2-3-1)** Donner la définition du "temps de réduction décimale".

**2-3-2)** Déterminer ce temps pour une température de 90°C.

**2-3-3)** Sachant que la contamination d'une ampoule peut atteindre 10 bactéries, calculer la durée de la pasteurisation à 90°C pour atteindre la probabilité d'une ampoule contaminée par une bactérie pour un échantillonnage de 10<sup>15</sup> ampoules.

## 2-4) Contrôle microbiologique du produit fini (6 points)

Le produit fini doit satisfaire aux normes suivantes:

- flore totale (essentiellement des spores de *Bacillus*) < 100/mL
- *Staphylococcus aureus* < 1/mL
- *Pseudomonas aeruginosa* < 1 /mL
- *E. coli* < 1/mL
- *Clostridium* < 1/mL
- *Salmonella* < 1/mL

**2-4-1)** Les spores de *Bacillus* sont essentiellement apportées par une des matières premières (le saccharose). Expliquer leur persistance à une forte teneur dans le produit fini pasteurisé.

**2-4-2)** Donner les dispositions particulières d'un protocole permettant de dénombrer par filtration seulement les spores de *Bacillus* : préparation de l'échantillon de médicament et technique d'incubation.

**2-4-3)** Donner les dispositions particulières d'un protocole permettant de dénombrer par filtration seulement les spores de *Clostridium* : préparation de l'échantillon de médicament et technique d'incubation.

### **3) Etude de la toxicité du conservateur** (19 points)

Afin d'étudier la toxicité du conservateur, mélange de parahydroxybenzoate de méthyle et de parahydroxybenzoate de propyle, on effectue un test *in vitro* de cytotoxicité. On choisit d'utiliser le kit Cell Titer 96 Aqueous commercialisé par PROMEGA (cf. document n°6).

#### **3-1) Analyse du protocole expérimental** (12 points)

- 3-1-1) Donner le principe de lecture à la base de cet essai.
- 3-1-2) Bâtit un organigramme simplifié des manipulations à réaliser.
- 3-1-3) Quel témoin doit-on réaliser pour valider le test ?
- 3-1-4) Les cellules MS sont mises en culture sur le milieu DMEM + 10 % FCS. À partir du document 7, préciser les rôles des différents éléments ajoutés au milieu de culture.
- 3-1-5) Pourquoi doit-on laver le tapis cellulaire (étape 3 document n°6) avant d'envisager sa trypsination ?

#### **3-2) Détermination de l'effet cytotoxique du conservateur** (7 points)

Le tableau du document n°8 présente les essais réalisés pour différentes quantités de conservateur. On détermine l'effet cytotoxique en calculant le pourcentage de viabilité V du test par la relation suivante:

pour chaque quantité de conservateur,

$V = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes après incubation avec le conservateur}}{\text{Nombre de cellules vivantes après incubation sans conservateur}} \times 100$

- 3-2-1) Justifier la relation, pour chaque quantité de conservateur:

$$V = \frac{A(490 \text{ nm}) \text{ cupules avec conservateur}}{A(490 \text{ nm}) \text{ cupules sans conservateur}} \times 100$$

avec A = absorbance.

- 3-2-2) Tracer, sur papier millimétré, l'évolution de V en fonction de la quantité de conservateur par puits.
- 3-2-3) En déduire l'effet cytotoxique du conservateur dans ce médicament sachant qu'il est ajouté à raison de 1000 mg par litre de solution buvable.
- 3-2-4) Les tests *in vitro* réalisés suffisent-ils à l'homologation du conservateur utilisé ?

### **DOCUMENT N° 1: DOSAGE DU PLOMB DANS LES SUCRES**

#### **1) Mode opératoire:**

Utiliser un spectromètre d'absorption atomique conformément aux instructions accompagnant l'appareil et en opérant à la longueur d'onde de 283,3 nm. Les mesures s'effectuent par comparaison avec des solutions de référence de concentration connue en l'élément à doser, par la "méthode des ajouts doses".

#### **2) Méthode des ajouts dosés:**

Dans au moins 3 fioles jaugées identiques, introduire des volumes égaux de la solution de la substance à examiner, préparée comme prescrit. Ajouter à toutes les fioles des volumes croissants d'une solution de référence, de concentration exactement connue en l'élément à doser, de façon à

obtenir une série de solutions contenant des quantités croissantes de l'élément, choisies de manière à obtenir des réponses situées dans la partie linéaire de la courbe. Compléter au trait de jauge avec le solvant.

Introduire, à au moins 3 reprises, chacune des solutions dans le dispositif d'analyse et noter chaque fois la valeur obtenue après stabilisation. Rincer chaque fois le dispositif d'analyse avec le solvant et vérifier que la lecture revient à la valeur obtenue dans l'essai à blanc.

Calculer l'équation de régression linéaire du graphique en utilisant la méthode des moindres carrés et la résoudre de façon à obtenir la concentration de l'élément à doser dans l'échantillon, ou, à la rigueur, procéder de façon suivante:

sur un graphique, porter la moyenne des lectures en fonction de la quantité ajoutée de l'élément à doser. Joindre les points sur le graphique et extrapoler la droite jusqu'à l'intersection avec l'axe des concentrations. L'abscisse à l'origine représente la quantité de l'élément dosé dans l'échantillon examiné.

### **3) Plomb dans les sucres:**

#### **- Principe de l'extraction du plomb:**

Dissoudre 20,0 g de saccharose à examiner dans de l'acide éthanoïque dilué, puis compléter à 100,0 mL avec le même solvant. Ajouter alors 2 mL d'une solution de pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (à environ 1 % p/v) et 10 mL de méthylisobutylcétone. Agiter à l'abri d'une lumière vive, laisser séparer les deux couches et utiliser la couche méthylisobutylcétonique (N.B.: dans ces conditions opératoires, le plomb contenu initialement dans les 20,0 g de saccharose se concentre dans la couche méthylisobutylcétonique).

#### **- Préparation des essais:**

Préparer 3 solutions à analyser, contenant respectivement 5, 10 et 15 µg de plomb dans 100 mL d'acide éthanoïque dilué, en plus des 20,0 g de saccharose à examiner. Ajouter alors 2 mL d'une solution de pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (à environ 1 % p/v) et 10 mL de méthylisobutylcétone. Agiter à l'abri d'une lumière vive, laisser séparer les deux couches et utiliser la couche méthylisobutylcétonique.

Régler l'appareil au zéro, en utilisant la méthylisobutylcétone traitée dans les mêmes conditions que les solutions à examiner. Mesurer l'absorbance à 283,3 nm en utilisant une flamme air-acétylène.

## **DOCUMENT N°2: IDENTIFICATION DU PRINCIPE ACTIF PAR C.C.M.**

### **Matériel:**

Plaque de gel de silice  
Cuve à chromatographie  
Micropipette de 5 µL

### **Eluant:**

Propan- 1 -ol	64 mL
Ammoniaque à 27 %	36 mL

**Révélateur:**

Ninhydrine	2 g
Butan- 1 -ol	950 mL
Acide éthanoïque dilué	50 mL

**Solution témoin:**

Solution aqueuse d'acides aminés 1 et 2 à 0,2 % (p/v)

**Dépôts:**

Effectuer un dépôt de 5 µL de chacune des solutions soit:  
solution témoin,  
soluté buvable convenablement dilué.

**Technique:**

Après avoir séché les dépôts, laisser migrer sur environ 15 cm. Faire sécher la plaque à l'étuve à 100°C pendant 10 minutes, puis pulvériser le révélateur. Maintenir la plaque 5 min à 100°C.

**DOCUMENT N°3: Dosage du principe actif par H.P.L.C.****Conditions opératoires:**

Colonne:	Sphérisorb ODS 1 Longueur 25 cm; diamètre interne 4,6 mm
Détection:	Longueur d'onde: 200 nm Temps de réponse: 2 secondes
Éluant:	Dihydrogénophosphate de potassium a 0,004 mol.L <sup>-1</sup> et pH = 3,8
Débit:	0,8 mL/min
Volume injecté:	30 µL

**Solution étalon:**

Préparer une solution contenant 86,6 mg d' "acide aminé 1" et 113,4 mg d' "acide aminé 2" dans 100 mL d'éluant, puis effectuer une dilution extemporanée au 1/20 dans l'éluant.

**DOCUMENT N°4: REPRODUCTIBILITE DU DOSAGE DU PRODUIT FINI**

Concentrations théoriques:

- Acide aminé 1: 43,3 µg/mL
- Acide aminé 2: 56,7 µg/mL

Nombre d'injections par jour: 6

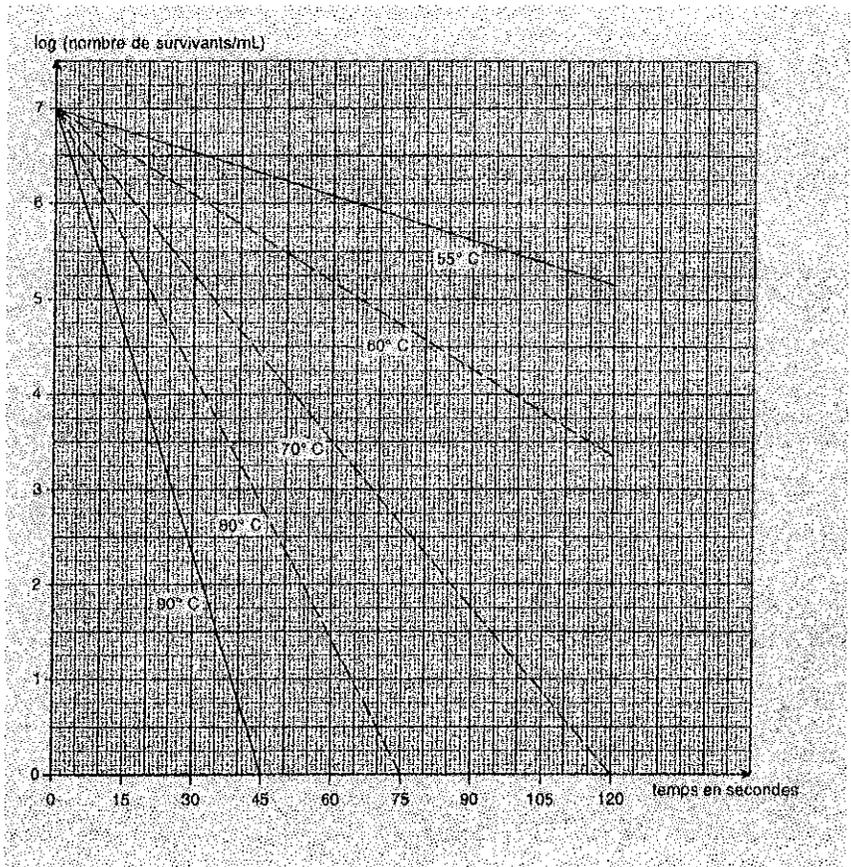
Durée de l'essai: 4 jours de JO à JO + 3

	VALEURS OBSERVEES							
	ACIDE AMINE 1				ACIDE AMINE 2			
	JO	JO+1	JO+2	JO+3	JO	JO+1	JO+2	JO+3
	42,16	43,15	41,41	42,10	55,06	56,24	53,68	54,98
	42,93	42,24	42,03	42,79	56,85	55,33	53,86	56,60
	42,49	44,04	42,18	42,61	54,85	56,76	55,0	54,93

	42,68	42,38	41,83	42,42	55,24	56,16	55,35	55,17
	42,91	42,56	42,65	42,87	56,30	55,31	55,87	56,13
	42,32	43,62	42,88	43,25	56,46	56,61	55,87	56,07
MOYENNE	42,58	43,00	42,16	42,67	55,79	56,07	54,94	55,64
ECART-TYPE	0,314	0,727	0,538	0,318	0,843	0,621	0,964	0,813
COEFFICIENT DE VARIATION	0,74%	1,69%	1,28%	0,75%	1,51%	1,11%	1,76%	1,46%

**DOCUMENT N°5: COURBE DE DESTRUCTION D'ENTEROBACTER.**

Courbe de destruction d' *enterobacter* en fonction du temps, à différentes températures du bain d'eau, dans lequel sont plongées les ampoules scellées.



**DOCUMENT N°6:**  
**CELL TITER 96 AQUEOUS CELL PROLIFERATION ASSAY (PROMEGA)**

**1) Description:**

The Cell Titer 96 Aqueous Cell proliferation assay is a colorimetric method for determining the number of viable cells in proliferation or chemosensitivity assay.

The Cell Titer 96 Aqueous assay is composed of solutions of a novel tetrazolium compound:

(3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) 2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium, inner salt; **MTS**) and an electron coupling reagent (phenazine methosulfate; **PMS**).

**MTS** is bioreduced by cells into a formazan that is soluble in tissue culture medium. The absorbance of the formazan at 490 nm can be measured directly from 96 well assay plates without additional processing. The conversion of **MTS** into the aqueous soluble formazan is accomplished by dehydrogenase enzymes found in metabolically active cells. The quantity of formazan product as measured by the amount of 490 nm absorbance is directly proportional to the number of living cells in culture.

**2) Products: ~**

One 96 wells assay plate,

PBS,

20 mL MTS solution (caution classified as irritants),

1 mL PMS solution (caution classified as a carcinogen),

Methyl hydroxybenzoate, propyl hydroxybenzoate solution 100 mg/mL

DMEM + 10 % FCS (foetal calf serum) medium,

Trypan blue 0,5 %,

Trypsin 0,25 % + EDTA solution,

and ELISA plate reader at 490 nm.

**3) Protocol:**

1) Maintain stock cultures of epithelial monolayer MS cells in DMEM medium containing 10 % of Foetal Calf Serum (FCS) in a 25 cm<sup>2</sup> flask.

2) Add 50 µL per well of hydroxybenzoate diluted in DMEM + 10 % FCS medium as described:

Quantity of hydroxybenzoate per well (µg)	Well
0	A1-->A4
20	B1-->B4
40	C1-->C4
60	D1-->D4
80	E1-->E4
100	F1-->F4
150	G1-->G4

3) Wash the MS cells with PBS. Add 1,5 mL Trypsin 0,25 % + EDTA solution. Incubated 1 min at 37°C to resuspend cells. Stop the enzyme action by adding 5 mL DMEM + 10 % FCS medium.

- 4) Determine cells number and trypan blue viability and resuspend the cells to a final concentration of  $1.10^5 \text{ mL}^{-1}$  in DMEM + 10 % FCS medium.
- 5) Dispense 50  $\mu\text{L}$  of the cell suspension (5000 cells) into all wells of the plate prepared in step 2. The total volume in each well should now be 100  $\mu\text{L}$ .
- 6) Incubate the plate for 48-72 hours at 37°C in humidified 5 %  $\text{CO}_2$  atmosphere.
- 7) Add 20  $\mu\text{L}$  per well of freshly prepared combined MTS/PMS solution (add 100  $\mu\text{L}$  PMS solution to 2,0 mL MTS solution: gently swirl the tube to ensure complete mixing of combined MTS/PMS solution).
- 8) Incubate the plate for 1-4 hours at 37°C in a humidified 5 %  $\text{CO}_2$  atmosphere.
- 9) Record the absorbance at 490 nm using an ELISA plate reader.

**DOCUMENT N°7:**  
**COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE DES CELLULES MS:**

**Milieu de base d'Eagle modifié par Dubelcco (DMEM)**

Composant	mg/L	Composant	mg/L
<b>Sels inorganiques</b>		L Ile	105,00
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	264,00	L Lys HCl	146,00
Fe(NO <sub>3</sub> ), 9 H <sub>2</sub> O	0,10	L Met	30,00
KCl	400,00	L Phe	66,00
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	200,00	L Ser	42,00
NaCl	6400,00	L Thr	95,00
NaHCO <sub>3</sub>	3700,00	L Trp	16,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	414,00	L Tyr	72,00
<b>Autres composants</b>		L Val	94,00
Dglucose	4500,00	<b>Vitamines</b>	
Rouge de phénol	15,00	Pantothénate de calcium	4,00
<b>Acides aminés</b>		Chlorure de choline	4,00
L Arg HCl	84,00	Acide folique	4,00
L Cys	48,00	Inositol	7,20
L Glu	580,00	Nicotinamide	4,00
Gly	30,00	Pyridoxal HCl	4,00
L His HCl, H <sub>2</sub> O	42,00	Riboflavine	0,40
L Leu	105,00	Thiamine HCl	4,00

**Éléments ajoutés stérilement pour 100 mL de DMEM:**

- L. Glu à 200 mmol/L: 1 mL,
  - Pénicilline 150000 UI/mL) et Streptomycine (250  $\mu\text{g/mL}$ ): 0,5 mL,
  - Fongizone (250  $\mu\text{g/mL}$ ): 1,6 mL,
- puis 10 mL de FCS.

**DOCUMENT N°8:**

**RESULTATS DE L'ESSAI DE CYTOTOXICITE IN VITRO DU CONSERVATEUR:**

Les valeurs données sont les absorbances mesurées à 490 nm par le lecteur ELISA.

	A	B	C	D	E	F	G
1	1,430	1,370	1,380	1,390	1,370	0,850	0,740
2	1,400	1,380	1,390	1,370	1,390	0,900	0,750
3	1,425	1,390	1,385	1,370	1,380	0,850	0,750
4	1,430	1,370	1,370	1,380	1,390	0,870	0,745
Moyenne par colonne	1,420	1,378	1,381	1,378	1,382	0,867	0,754
Quantité de conservateur en µg/puits	0	20	40	60	80	100	150

**EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.**

**Deuxième partie : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.  
ÉPREUVE E5. UNITÉ U52**

**DURÉE : 10 HEURES**

**COEFFICIENT : 8**

**SUJET 1.**

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

**LES ADDITIFS ALIMENTAIRES  
BIOCHIMIE (70 points)**

Durée: 3 H 45

**L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début de séance.**

Parmi les additifs les plus utilisés dans la nutrition humaine et animale on trouve:

- \*l'acide glutamique, utilisé comme agent aromatique (exhausteur de goût) sous la forme de son sel le glutamate de sodium;
- \*la cystéine, agent de texture pour le pain;
- \*l'acide lactique, acidifiant et conservateur (boissons, jus de fruit, confitures ...).

On se propose de doser ces additifs avant leur mise sur le marché.

**1 - Dosage de l'acide glutamique par pH-métrie (1 essai).**

**1.1 - Mode opératoire:**

Étalonner le pH-mètre avec les solutions tampons pH 4 et / ou pH 7.

Dosage pH-métrique:

- \*dans un bécher de 100 mL, introduire 25 mL de l'échantillon G d'additif alimentaire, y

plonger les électrodes et brancher l'agitateur magnétique;

\*titrer avec une solution d'hydroxyde de sodium à environ  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  (la concentration molaire précise de la solution sera indiquée en début de séance).

### **1.2 - Compte rendu et résultats:**

\*Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

\*Tracer la courbe de titrage:  $\text{pH} = f(\text{volume solution titrante versé})$ .

\*Déterminer le(s) point(s) d'équivalence.

\*Calculer la concentration molaire en acide glutamique de l'échantillon G.

## **2 - Dosage de la cystéine par la méthode colorimétrique d'Ellman**

### **2.1 - Principe:**

Le réactif d'Ellman ou acide 5,5'-dithio-bis-(2 nitro-benzoïque) (= D.T.N.B.) est un disulfure aromatique.

Le D.T.N.B. réagit sur le groupement fonctionnel des thiols des composés aliphatiques. Cela conduit à la formation d'un anion coloré qui absorbe la lumière avec un maximum à  $\lambda = 412 \text{ nm}$  (en suivant la loi Beer Lambert). La réaction est stoechiométrique.

### **2.2 - Mode opératoire:**

En raison de l'évolution de la coloration dans le temps, il est indispensable que la durée de développement de cette coloration soit identique pour les tubes de la gamme d'étalonnage et les essais. On indiquera en début de séance la durée de stabilité de la coloration.

#### **2.2.1- Dosage (2 essais):**

Diluer l'échantillon C d'additif alimentaire au 1/50 en eau distillée bouillie refroidie (à disposition).

Dans un tube à essais, introduire:

\*solution diluée au 1/50 de C : 1 mL;

\*solution tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,5) : qsp 4,5 mL;

\*solution de D.T.N.B. à  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  : 0,5 mL.

Mélanger. Lire l'absorbance à  $\lambda = 412 \text{ nm}$  après 10 à 20 minutes contre un témoin réactif.

#### **2.2.2- Etalonnage:**

L'étalonnage du spectrophotomètre se fait à l'aide d'une solution de cystéine à  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$

Effectuer une dilution convenable en eau distillée bouillie refroidie, puis préparer une gamme d'étalonnage comportant cinq tubes contenant de 0,05 à 0,25 micromoles de cystéine par tube.

#### **2.2.3- Compte rendu et résultats:**

\*Expliquer le calcul de la dilution de la solution étalon de cystéine.

\*Expliquer le calcul du volume de solution diluée de cystéine introduit dans les tubes de la gamme.

\*Établir le tableau de colorimétrie incluant: témoin réactifs, gamme d'étalonnage et dosage.

\*Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

\*Tracer la droite d'étalonnage à l'aide de l'ordinateur; indiquer les valeurs expérimentales retenues pour le calcul de la droite de régression; donner l'équation de cette droite de régression et le coefficient de corrélation.

\*Légender le graphique obtenu.

\*Déterminer la concentration molaire en cystéine de l'échantillon C en mmol.L<sup>-1</sup>. La précision du dosage est évaluée à 3 %.

### 3 - Dosage de l'acide lactique.

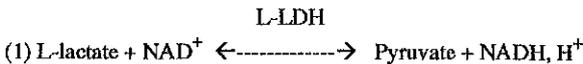
Le dosage de l'acide lactique d'un échantillon " L " d'additif alimentaire est réalisé par une méthode enzymatique en point final (test UV).

Les solutions d'additif alimentaire produit par *Lactobacillus delbrueckii* contiennent habituellement 18 g.L<sup>-1</sup> d'acide lactique.

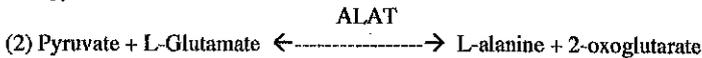
Pour ce dosage, la quantité d'acide lactique dans la cuve doit être comprise entre **10 et 20 µg**.

#### 3.1- Principe:

En présence de L-lactate deshydrogénase (L-LDH), l'acide L-lactique (L-lactate) est oxydé en pyruvate par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD):



Grâce à une seconde réaction qui piège le pyruvate, catalysée par l'alanine-amino-transférase (ALAT), en présence de glutamate, l'équilibre de la réaction (1) est déplacé dans le sens de la formation du pyruvate.



La quantité de NADH, H<sup>+</sup> formé est proportionnelle à la quantité de L-lactate présent dans l'additif.

La formation du NADH, H<sup>+</sup> est suivie par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 340 nm.

#### 3.2 - Réactifs:

- \*Solution 1: tampon glycyglycine pH 10,0; acide L-glutamique; stabilisateurs.
- \*Solution 2: NAD<sup>+</sup>
- \*Suspension 3: ALAT.
- \*Solution 4: L-LDH.
- \*Echantillon " L " d'additif alimentaire.

#### 3.3 - Mode opératoire:

##### 3.3.1- Conditions de mesure:

- \*température: 20 à 25 °C (température ambiante);
- \*longueur d'onde: 340 nm;
- \*trajet optique: 1 cm;
- \*lire contre l'air ou l'eau distillée.

##### 3.3.2- Opérer directement dans les cuves selon le tableau suivant.

Réaliser deux essais.

Introduire dans les cuves	Blanc	Essai
Solution 1	1,00 mL	1,00 mL
Solution 2	0,20 mL	0,20 mL
Suspension 3	0,02 mL	0,02 mL
Echantillon (éventuellement dilué)		0,10 mL
Eau bidistillée	1,00 mL	0,90 mL
Mélanger. Après environ 5 min, lire l'absorbance ( $A_1$ ) du blanc et des essais immédiatement les uns après les autres. Déclencher la réaction par addition de:		
Solution 4	0,02 mL	0,02 mL
Mélanger. En fin de réaction (20 min) lire l'absorbance ( $A_2$ ) du blanc et des essais immédiatement les uns après les autres.		

### 3.4 - Valeurs de calcul:

\*Masse molaire de l'acide lactique:  $90,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

\* $\epsilon_{\text{NADH, H}^+} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$  à 340 nm.

### 3.5 - Compte rendu et résultats:

\*Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

\*Expliquer la dilution éventuelle de l'échantillon.

\*Établir la formule littérale et calculer la concentration massique de l'acide lactique dans l'échantillon " L ". Conclure.

La précision du dosage est évaluée à 5 %.

## À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

### RELEVÉ DES VALEURS EXPÉRIMENTALES

#### 1-DOSAGE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE PAR pH-MÉTRIE:

$V_{\text{NaOH}} \text{ (mL)}$	
pH	
$V_{\text{NaOH}} \text{ (mL)}$	
pH	

#### 2-DOSAGE DE LA CYSTÉINE PAR LA MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE D'ELLMAN:

N° tube	Étalons	Essais
Quantité de cystéine en $\mu\text{mol}/\text{tube}$		
$A$ à $\lambda = 412 \text{ nm}$		

#### 3-DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE:

	Blanc	Essai 1	Essai 2
$A_1$			
$A_2$			

**A - MICROBIOLOGIE (55 points)**

**1 - Identification d'un contaminant dans un produit fini.**

De nombreux acides aminés sont produits dans l'industrie pour l'alimentation humaine ou animale. Une faible proportion est utilisée par les industries pharmaceutiques.

Un contaminant a été décelé dans un échantillon d'un lot destiné à l'industrie pharmaceutique. On soupçonne une levure, *Candida albicans*.

**1.1 - Manipulation:**

À partir d'une colonie réisolée sur gélose Sabouraud notée " C ", réaliser une identification à l'aide:

- du test de filamentation (ou test de blastèse): **présenter un champ microscopique à un examinateur;**
- du test de chlamydosporulation.

**1.2 - Compte rendu et résultat:**

Préciser les conditions d'incubation et l'intérêt de chaque test.  
Conclure sur le test de blastèse.

**2 - Mise au point d'une nouvelle technique de biosynthèse de L-cystéine.**

Afin d'augmenter la production de L-cystéine, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* hyperproductrice a été obtenue par mutagenèse. Différents essais de culture, en fioles d'Erlenmeyer, ont permis d'optimiser la croissance de la souche.

On se propose d'effectuer quelques vérifications avant de lancer la production.

**2.1 - Vérification de la stabilité et de la pureté de la souche:**

La souche obtenue par mutagenèse doit rester viable, pure et stable. On se propose de vérifier, après plusieurs repiquages successifs, la pureté et les caractères morphologiques et biochimiques de la souche.

**2.1.1 - Manipulation:**

- À partir de la culture présentée sur gélose ordinaire en boîte de Petri et notée " Ps ":
- \*effectuer un frottis coloré au Gram. **Présenter un champ microscopique à un examinateur.**
  - \*effectuer devant un examinateur le test enzymatique d'orientation,
  - \*réaliser un isolement sur gélose ordinaire,
  - \*ensemencer une galerie Api 20NE.

**2.1.2 - Compte rendu et résultats:**

Noter les descriptions macroscopique et microscopique de la souche et le résultat du test enzymatique.

Préciser le temps et la température d'incubation de la galerie et indiquer si l'ensemble des résultats du premier jour sont en accord avec ceux attendus.

**2.2 - Vérification de la croissance de la souche:**

**2.1.1 - Manipulation:**

Les différents essais de culture, en fioles d'Erlenmeyer, ont permis de choisir le milieu le plus adapté pour un meilleur rendement de production. Une culture en

fermenteur de 2 litres a confirmé les résultats des essais. On se propose de vérifier la vitesse spécifique de croissance ( $2,3 \text{ h}^{-1}$ ) lors d'une culture en fermenteur de volume utile de 10 litres.

A  $t = 0$ , le fermenteur a été ensemencé avec 1 litre d'inoculum issu d'une préculture en phase exponentielle de croissance. Après ensemencement, la concentration bactérienne  $X_0$  a  $t_0$  était de  $10^5$  UFC/mL.

**Remarques:** dans de telles conditions la phase de latence est inexistante ou négligeable, et la phase exponentielle a une durée de 4 à 5 heures.

On dispose d'un prélèvement au temps  $t = 3$  heures, présenté en tube à essais et noté " $t_3$ ". Après vérification des calculs préalables par un examinateur, dénombrer les microorganismes présents à  $t = 3$  heures par ensemencement de 3 dilutions, en double, sur gélose au cétrimide.

**Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution.**

### **2.2.2 - Compte rendu:**

Justifier les calculs préalables pour le choix des dilutions à tester.

## **2.3 - Vérification de la conservation du plasmide introduit chez la souche au cours de la mutagenèse:**

Le plasmide utilisé pour la mutagenèse est porteur du caractère de résistance à la kanamycine. Les *Pseudomonas* sont naturellement sensibles aux antibiotiques de la famille des aminosides (kanamycine, gentamicine, tobramycine ...).

On se propose de vérifier la persistance du plasmide dans la souche de *Pseudomonas aeruginosa*, à partir de la culture présentée sur gélose ordinaire en boîte de Petri et notée " $P_s$ ".

### **2.3.1 - Manipulation:**

Prélever 2 à 3 colonies et les émulsionner dans 5 mL de bouillon Mueller Hinton.

Mesurer l'opacimétrie de la suspension ainsi réalisée au spectrophotomètre réglé à 550 nm.

Ajuster éventuellement cette suspension à 0,1 UA. On obtient la suspension S.

Ensemencer par écouvillonnage une gélose Mueller Hinton à partir d'une dilution au 1/100 de la suspension S. Pour cela:

- \*plonger un écouvillon stérile dans la dilution,
- \*le sortir du tube en l'essorant doucement sur les parois,
- \*ensemencer en frottant l'écouvillon sur la surface et en tournant la boîte 3 fois de  $60^\circ$  afin d'assurer une bonne distribution de l' inoculum.

Appliquer 3 disques stériles sur la gélose Mueller Hinton ensemencée.

Déposer sur chaque disque 15  $\mu\text{L}$  d'une des solutions suivantes:

- \*solution de kanamycine à 2 UI/ $\mu\text{L}$ ,
- \*solution de gentamicine à 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,
- \*eau distillée stérile.

### **2.3.2 - Compte rendu:**

Justifier les dépôts de gentamicine et d'eau distillée.

## **B - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (35 points)**

### **Entretien d'une lignée continue**

Pour étudier la toxicité des additifs, il est possible de travailler sur des cellules eucaryotes tels des fibroblastes, dont il faut assurer l'entretien.

## **1 - Matériel et réactifs:**

### **Au poste de travail:**

- \*un flacon contenant une culture confluente de fibroblastes, en milieu DMEM additionné de 10 % de SVF (sérum de veau foetal),
- \*un hématimètre de Malassez avec une lamelle plane,
- \*un tube à hémolyse contenant du bleu Trypan à 0,4 %,
- \*un tube à hémolyse vide,
- \*pipettes automatiques, P 100, P 1000.

### **Au laboratoire de biologie:**

- \*un microscope inversé,
- \*une étuve à CO<sub>2</sub> à 37°C,
- \*un dispositif de lavage des mains,
- \*un flacon d'alcool et du papier absorbant.

### **Sous la hotte à flux laminaire:**

- \*un tube contenant 6 mL de tampon PBS stérile sans calcium,
- \*un flacon contenant 15 mL de milieu DMEM + 10 % SVF stériles,
- \*un tube à hémolyse contenant 2,5 mL de solution de trypsine à 0,25 % stérile (milieu complet),
- \*un tube à hémolyse stérile vide,
- \*pipettes stériles de 5 mL et de 2 mL,
- \*récipient pour pipettes et réactifs usagés,
- \*2 flacons stériles.

## **2 - Mode opératoire:**

### **2.1 - Observation microscopique:**

Observer les cellules en culture au microscope inversé.

### **2.2 - Entretien de la lignée de fibroblastes sous hotte à flux laminaire (le temps est limité à 20 minutes):**

La manipulation consiste à préparer deux nouveaux flacons de culture de fibroblastes à partir de la culture fournie.

Éliminer par retournement le milieu de culture.

Réaliser le lavage du tapis cellulaire avec 5 mL de tampon PBS sans calcium.

Introduire 2 mL de trypsine. Laisser agir quelques minutes à 37°C en surveillant son action à l'œil nu ou au microscope inversé.

Ajouter 5 mL de milieu DMEM + 10 % de SVF.

Prélever un aliquot de la suspension cellulaire dans un tube à hémolyse stérile qui servira à la numération cellulaire au poste de travail.

Introduire dans chacun des 2 flacons de culture 1,5 mL de cette suspension.

Compléter ces deux flacons à 5 mL avec du milieu DMEM + 10 % de SVF.

Placer les deux flacons correctement étiquetés dans l'incubateur.

### **2.3 - Numération cellulaire au poste de travail:**

Réaliser une numération de la suspension prélevée, après dilution au 1/2 dans du bleu Trypan. Présenter un champ microscopique à un examinateur.

### **3 - Compte rendu:**

Décrire les cellules observées au microscope inversé.

Déterminer la densité cellulaire ainsi que le pourcentage de viabilité de la suspension récupérée après action de la trypsine. Sachant que dans les conditions idéales, un flacon doit être ensemencé par  $10^6$  cellules viables, commenter le choix du volume de suspension remis en culture.

## **MICROBIOLOGIE - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**

2ème jour

Durée: 2 H

### **A - MICROBIOLOGIE (55 points)**

#### **1 - Identification d'un contaminant dans un produit fini:**

Effectuer la lecture du test de chlamydosporulation.

Montrer l'observation à un examinateur.

Conclure sur l'ensemble de l'étude de ce contaminant.

#### **2 - Mise au point d'une nouvelle technique de biosynthèse de L-cystéine:**

##### **2.1 - Vérification de la stabilité et de la pureté de la souche.**

Vérifier la pureté de la souche.

Effectuer la lecture de la galerie d'identification biochimique.

Conclure sur la pureté et sur la stabilité des caractères morphologiques et biochimiques.

##### **2.2 - Vérification de la croissance de la souche.**

Exploiter les résultats du dénombrement.

Calculer  $\mu_{x \text{ expo}}$  et G.

Conclure.

##### **2.3 - Vérification de la conservation du plasmide introduit chez la souche au cours de la mutagenèse.**

Effectuer la lecture de la gélose Mueller Hinton.

Conclure.

### **RAPPELS:**

Lors des essais précédents, la vitesse spécifique de croissance était de  $2,3 \text{ h}^{-1}$ .

Pour les essais en fermenteur de 10 litres, le nombre de bactéries à  $t = 0$  était de  $10^5 \text{ UFC/mL}$ .

Le plasmide utilisé pour la mutagenèse est porteur du caractère de résistance à la kanamycine.

*Pseudomonas* est naturellement sensible aux antibiotiques de la famille des aminosides (kanamycine, gentamicine, tobramycine).

## **B - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (35 points)**

### **Entretien d'une lignée continue**

Observer les cellules mises en culture au microscope inversé.

Reporter les observations sur le compte rendu.

## ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

ÉPREUVE E5.UNITÉ U52

DURÉE : 10 HEURES

COEFFICIENT : 8

### SUJET 2.

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

### ANALYSE ET CONTRÔLE DE PRODUITS LAITIERS BIOCHIMIE (75 points)

Durée : 4 H 15

#### ANALYSE D'UN TRIGLYCÉRIDE DU LAIT

Les lipides du lait entier représentent 30 à 50 g.L<sup>-1</sup> et sont constitués par:

- \*99 % de triglycérides;
- \*0,03 à 1 % de phospholipides;
- \*0,2 à 0,4 % de stérols.

Les acides gras constitutifs des lipides sont:

- \*des acides gras non saturés pour 30 %;
- \*du palmitate pour 28 %;
- \*du stéarate pour 12 %;
- \*des acides gras volatils à chaîne courte pour 10 %;
- \*des acides gras d'autre nature pour 20 %.

On se propose de déterminer la structure d'un triglycéride hétérogène saturé extrait du lait de vache.

La manipulation comprendra:

- \*le dosage du glycérol libéré après action d'une lipase, dans le but de déterminer la masse molaire du triglycéride;
- \*la détermination de l'indice d'acide d'un des acides gras dans un but d'identification;
- \*la détermination de l'activité spécifique de la lipase utilisée pour hydrolyser le triglycéride.

#### 1 - Détermination de la masse molaire du triglycéride

##### 1.1 - Mode opératoire:

On soumet une émulsion du triglycéride de concentration massique 2,54 g.L<sup>-1</sup> à l'action de la lipase: on obtient alors - sans dilution - la solution G, sur laquelle on va doser le glycérol libéré.

Réaliser un témoin et deux essais à l'aide de la fiche technique donnée en **annexe 1**.

##### 1.2 - Résultats:

Noter les valeurs des absorbances sur la feuille de résultats.

Calculer la concentration molaire en glycérol de la solution G.

En déduire la masse molaire moléculaire du triglycéride.

La précision du dosage est estimée à 3 %.

## **2 - Identification des acides gras constitutifs**

Une analyse par chromatographie en phase gazeuse effectuée après transestérification du triglycéride a montré que celui-ci contient deux types d'acide gras A1 et A2, A1 étant présent en plus grande quantité.

### **2.1- Détermination de l'indice d'acide de A1 (2 essais):**

L'indice d'acide correspond à la masse en milligramme de KOH qui neutralise l'acidité libre d'un gramme de corps gras.

Dans une fiole d'Erlenmeyer introduire:

\*10 mL de solution A1 en solvant éthanol-isobutanol;

\*10 mL de solution éthanolique de KOH à environ 0,2 mol.L<sup>-1</sup>;

\*2 gouttes de phénolphthaléine.

Titrer par une solution d'HCl à exactement 0,100 mol.L<sup>-1</sup> jusqu'à décoloration stable 30 secondes (agitation forte de la fiole en cours de titration car le milieu réactionnel est biphasique).

Réaliser un témoin et deux essais.

**Faire relever les chutes de burette par un examinateur.**

### **2.2 - Résultats:**

Donner la composition du témoin utilisé.

Compléter le tableau de la feuille de résultats.

Calculer l'indice d'acide de A1.

En déduire la masse molaire moléculaire et le nombre d'atomes de carbone de A1.

Compte tenu du résultat obtenu dans la partie 1, déterminer la masse molaire moléculaire et le nombre d'atomes de carbone de A2.

Proposer une formule semi-développée pour le triglycéride étudié.

Données:

\*concentration en acide gras de la solution de A1 = 10 g.L<sup>-1</sup>;

\*masse molaire moléculaire de KOH :56 g.mol<sup>-1</sup>;

\*masses molaires atomiques: C = 12 g.mol<sup>-1</sup>; O = 16 g.mol<sup>-1</sup>; H = 1 g.mol<sup>-1</sup>.

## **3 - Détermination de l'activité spécifique de la lipase**

On se propose de vérifier l'activité spécifique de l'extrait lipase du commerce utilisé précédemment.

### **3.1- Détermination de l'activité de la lipase par méthode titrimétrique:**

Une émulsion d'huile d'olive est hydrolysée en présence de lipase. Les acides gras libérés par la réaction enzymatique sont dosés par l'hydroxyde de sodium. On admettra qu'une unité d'activité enzymatique (U) correspond à la quantité d'enzyme capable de catalyser la libération d'une micromole d'acide gras par minute dans les conditions opératoires choisies.

#### **3.1.1- Mode opératoire (1 essai):**

Dans une fiole d'Erlenmeyer introduire:

\*5 mL d'émulsion d'huile d'olive;

\*2 mL de tampon phosphate 0,5 mol.L<sup>-1</sup> pH 6,8.

Préincuber à 37°C et mettre sous agitation.

Déclencher la réaction en ajoutant 20  $\mu\text{L}$  de solution enzymatique étiquetée " activité lipase ".

Maintenir l'agitation du milieu réactionnel durant toute la durée de la réaction.

Au bout de 20 minutes exactement, stopper la réaction par addition de 4 mL de solution d'arrêt (mélange v/v éthanol-acétone).

Doser ensuite l'acidité libérée par une solution d'hydroxyde de sodium à 0,050  $\text{mol.L}^{-1}$  en présence de thymolphthaléine jusqu'au virage au bleu.

Réaliser dans les mêmes conditions un témoin sans enzyme.

**Faire relever les chutes de burette par un examinateur.**

### **3.1.2- Résultats:**

Compléter le tableau de la feuille de résultats.

Calculer la concentration d'activité catalytique de la lipase utilisée en U/mL.

La précision du dosage est estimée à 5 %.

## **3.2 - Détermination de la concentration en protéines totales (méthode de Folin-Lowry):**

### **3.2.1- Essais (2 essais):**

Dans un tube à essais introduire:

\*1 mL de la solution de lipase " L " à diluer préalablement au 1/100 en eau physiologique;

\*3 mL de solution cuproalcaline;

Attendre 5 minutes;

Ajouter 0,3 mL de réactif de Folin dilué au 1/2;

Mettre 30 minutes à l'obscurité;

Lire l'absorbance à 700 nm contre un témoin convenable.

### **3.2.2- Étalonnage du spectrophotomètre:**

Préparer une gamme de 6 tubes allant de 0 à 100  $\mu\text{g}$  par tube à partir d'une solution étalon de sérum albumine bovine à 1  $\text{g.L}^{-1}$ .

### **3.2.3- Résultats:**

Établir le tableau complet de la gamme d'étalonnage.

À l'aide de l'ordinateur, exploiter les valeurs expérimentales, sélectionner les points retenus et tracer la courbe d'étalonnage. Rendre le graphique légendé.

En déduire la concentration massique en protéines de la solution de lipase " L ".

La précision est estimée à 2 %.

À l'aide des résultats obtenus en 3.1, calculer l'activité spécifique de l'extrait commercial en U/mg et la comparer à celle indiquée par le fournisseur (valeur donnée en début d'épreuve).

## DOCUMENT À RENDRE

### FEUILLE DE RÉSULTATS

POSTE N°: .....

#### 1-DOSAGE DU GLYCÉROL

	Témoin	Essai 1	Essai 2
$A_1$			
$A_2$			

#### 2-INDICE D'ACIDE

	Témoin	Essai 1	Essai 2
$V_{HCl}$ (mL)			

#### 3-ACTIVITÉ DE LA LIPASE

	Témoin	Essai
$V_{NaOH}$ (mL)		

#### 4-DOSAGE DES PROTÉINES

Masse dans les tubes ( $\mu\text{g}$ )								
$A_{700\text{ nm}}$								

## ANNEXE 1

# Glycérol

### Méthode UV

Pour la détermination du glycérol dans les aliments

Réf. 148270

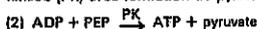
**Test-Combinaison**  
pour environ 3 x 10 déterminations

#### Principe

Le glycérokinaase (GK) catalyse la phosphorylation du glycérol en glycérol-3-phosphate par l'adénoïne-5'-triphosphate (ATP) (1).



L'adénoïne-5'-diphosphate (ADP) formé est à nouveau transformé en ATP par le phosphoénol-pyruvate (PEP) en présence de pyruvate-kinase [PK] avec formation de pyruvate (2).



Le pyruvate est réduit en lactate par le nicotinamide-adenine-dinucleotide 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 du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 334 nm, 340 nm ou 365 nm.

#### Composition du coffret

- 3 flacons contenant chacun 2 g du mélange tampon/coenzyme composé de :  
Tampon glycyglycine — pH 7,4  
NADH — 7 mg  
ATP — 22 mg  
PEP — 11 mg  
Sulfate de magnésium  
Stabilisateurs.
- Flacon 2 contenant 0,4 ml de suspension enzymatique composée de :  
Pyruvate-kinase — env. 240 U  
Lactate-déshydrogénase — env. 220 U.
- Flacon 3 contenant 0,4 ml de suspension de Glycérokinaase — env. 34 U.

#### Préparation des solutions pour 10 dosages

- Dissoudre le contenu d'un flacon 1 dans 11 ml d'eau bidistillée. Laisser la solution env. 10 min. à température ambiante avant utilisation.
- Utiliser le contenu du flacon 2 sans diluer.
- Utiliser le contenu du flacon 3 sans diluer.

#### Stabilité des solutions

La solution 1 se conserve au moins 2 semaines à + 4° C.  
Les suspensions des flacons 2 et 3 se conservent au moins un an à + 4° C.

#### Mode opératoire

Longueur d'onde<sup>1</sup> : 340 nm, 365 nm (Hg) ou 334 nm (Hg)  
Cuve de verre<sup>2</sup> : 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 : 3 à 50 µg de glycérol/cuve<sup>3</sup>.

**Chimie alimentaire**  
Boehringer Mannheim



Introduire dans des cuves	Témoin	Essai
Solution 1	1,00 ml	1,00 ml
Eau bidistillée	2,00 ml	1,90 ml
Essai	—	0,10 ml
Suspension 2	0,01 ml	0,01 ml

Mélanger, après env. 5 à 7 min, lire les absorbances des solutions (A<sub>1</sub>).  
Déclencher la réaction par addition de :

Suspension 3	0,01 ml	0,01 ml
--------------	---------	---------

Mélanger, attendre la fin de la réaction (environ 5 à 10 min.) et lire les absorbances des solutions (A<sub>2</sub>).  
Si la réaction n'est pas terminée après 15 min., continuer à lire les absorbances de 2 mn en 2 mn, jusqu'à ce que la diminution de l'absorbance soit constante sur 2 mn.

Si l'on observe pour A<sub>2</sub> des diminutions constantes d'absorbances, extrapoler l'absorbance au temps de l'addition de la suspension 3. 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.

$$\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$$

#### Calcul

La formule générale pour le calcul des concentrations est la suivante :

$$c = \frac{V \times \text{PM}}{e \times d \times v \times 1000 \times \Delta A (g/l)}$$

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 NADH :  
340 nm = 6,3 (l · mmole<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)  
Hg 365 nm = 3,4 (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 glycérol

$$c = \frac{3,02 \times 92,1}{e \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times \Delta A = 2,781 \frac{\Delta A}{e}$$

(g de glycérol/l de solution d'essai)

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur de dilution F.

#### Recommandations

##### 1. Pour la réalisation du test

La quantité de glycérol dans la cuve doit être comprise entre 3 µg et 50 µg. Diluer la solution d'essai de manière que la concentration en glycérol se situe entre 0,03 et 0,5 g/l.

1) L'absorption maximale du NADH et NADPH se situe à 340 nm. La mesure s'effectue à 340 nm avec un photomètre à spectre continu, et à 334 nm ou 365 nm avec un photomètre à spectre discontinu.

2) A la place des cuves de verre, on peut utiliser les cuves à usage unique du commerce.  
Voir les recommandations pour la réalisation du test et la préparation des échantillons.

**ANALYSE ET CONTROLE DE PRODUITS LAITIERS**  
**IMMUNOLOGIE - MICROBIOLOGIE**

1er jour

Durée: 3 H 45

**A - MICROBIOLOGIE (55 points)**

**Suivi de fabrication d'un yaourt a partir d'un lait cru.**

Lors de la fabrication du yaourt, le lait cru, après pasteurisation, est ensemencé avec un levain lactique. Après une incubation à 45°C on obtient le yaourt.

Des analyses de contrôle sont réalisées au cours de cette fabrication sur divers échantillons.

**1 - Contrôle du lait cru avant pasteurisation.**

**1.1 - Dénombrement de la flore totale du lait cru "L<sub>1</sub>":**

Critère de la norme pour la flore totale: moins de 10<sup>5</sup> UFC par mL.

**1.1.1 - Matériel:**

- échantillon à analyser: lait "L<sub>1</sub>" à conserver dans la glace;
- 6 tubes de 18 mL de gélose dénombrement notés "De" en surfusion à 55°C;
- 6 boîtes de Petri stériles;
- tubes contenant 9 mL d'eau distillée stérile;
- pipettes stériles de 1 mL.

**1.1.2 - Mode opératoire:**

Préparer les dilutions de L<sub>1</sub> nécessaires à ce dénombrement.

***Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution.***

Inoculer les boîtes de Petri. Incuber 24 h à 30°C.

**1.1.3 - Compte rendu:**

Justifier le choix des dilutions ensemencées.

**1.2 - Dosage de la pénicilline dans le lait cru:**

La pénicilline est l'antibiotique le plus souvent utilisé pour le traitement des mammites. Il se retrouve alors dans le lait de la vache traitée. Un lait contenant de la pénicilline est impropre à la fabrication du yaourt car il peut inhiber le développement des levains lactiques.

**1.2.1 - Matériel et réactifs:**

- 5 mL de milieu Mueller-Hinton en surfusion à 55°C;
- 1 flacon contenant 25 mL de lait UHT;
- 1 tube contenant 15 mL de lait étalon à 0,32 µg de pénicilline/mL noté "P";
- 1 tube de lait à tester noté "L<sub>2</sub>";
- 1 tube de suspension de *Bacillus stearothermophilus* noté "Bs";
- 1 tube d'eau distillée stérile;
- 1 gabarit;
- 1 boîte de Petri stérile;
- 1 pipette de 1 mL stérile;
- 5 pipettes de 5 mL stériles;

- 4 tubes à essai stériles;
- 6 petits disques de papier filtre stérile (diamètre 6 mm) dans une boîte de Petri stérile;
- 2 feuilles de papier filtre découpées à la dimension de la boîte de Petri;
- 1 feuille d'aluminium.

### **1.2.2 - Mode opératoire:**

#### **\*Ensemencement de la souche sensible:**

Ajouter 1 mL de la suspension de *Bacillus stearothermophilus* noté " Bs " à 5 mL de milieu Mueller-Hinton en surfusion à 55°C.

Homogénéiser et couler dans une boîte de Petri stérile.

#### **\*Préparation des solutions étalons de pénicilline:**

A partir de la solution " P " préparer, par dilution en lait UHT, quatre solutions étalons de concentrations finales allant de 0,16 à 0,02 µg de pénicilline/mL.

#### **\*Imprégnation des disques:**

Imprégner un disque de papier filtre stérile avec chacune des solutions étalons de pénicilline ou avec le lait à tester " L<sub>2</sub> ". Préparer un disque témoin.

Chaque disque de papier filtre stérile est imprégné comme suit:

- mettre le bord du disque au contact de la surface de la solution jusqu'à ce qu'il soit complètement imprégné;
- égoutter le disque par contact avec la paroi du tube;
- déposer chaque disque sur le milieu Mueller-Hinton ensemencé en respectant le gabarit fourni (**annexe 1**).

#### **\*Préparation de la chambre humide:**

Retourner la boîte de Petri sur les feuilles de papier filtre préalablement imprégnées d'eau et placées sur la feuille de papier d'aluminium.

Envelopper l'ensemble de papier d'aluminium (la boîte emballée doit être bien plane).

Incuber la boîte à 55°C pendant 24 heures.

### **1.2.3 - Compte rendu:**

Présenter, à l'aide d'un tableau, la réalisation de la gamme d'étalonnage d'antibiotique.

## **2 - Contrôle du lait pasteurisé:**

Lors d'un contrôle du lait pasteurisé, une contamination par des coliformes thermotolérants a été mise en évidence.

Un tube de BLBVB positif a été choisi afin de réaliser un isolement sur milieu EMB.

On se propose d'identifier les coliformes isolés sur le milieu EMB.

### **2.1 - Matériel et réactifs:**

- boîte de milieu EMB ensemencée;
- galerie API 10 E;
- gélose ordinaire coulée en boîte de Petri;
- 1 tube contenant 5 mL d'eau distillée stérile.

### **2.2 - Mode opératoire:**

A partir du milieu EMB fourni choisir une colonie suspecte.

Ensemencer les milieux nécessaires à l'identification.

### **2.3 - Compte rendu:**

Décrire l'aspect de la colonie choisie. Justifier ce choix.

### **3 - Numération directe des ferments du yaourt par la méthode de Breed:**

Un yaourt doit contenir au moins  $10^8$  bactéries lactiques par mL.

#### **3.1 - Matériel et réactifs:**

- un tube à hémolyse contenant 1 mL de yaourt dilué au 1/20 noté " Y/20 " ;
- une pipette automatique et un cône stérile.

#### **3.2 - Mode opératoire:**

Tracer un carré de 1 cm de côté au crayon marqueur sur une lame.

Retourner la lame.

Déposer 10  $\mu$ L de yaourt fourni dilué au 1/20 (noté " Y/20 " ) au centre du carré avec une pipette automatique. Repartir la goutte d'échantillon sur toute la surface du carré avec la pointe du cône.

Sécher le frottis à l'étuve à 55°C pendant 5 min environ.

Colorer en recouvrant le frottis de bleu de méthylène.

Laisser le colorant agir pendant 1 min .

Laver à l'eau distillée, puis sécher la lame.

Examiner le frottis à l'immersion à l'aide d'un microscope (le diamètre du champ aura été précisé par l'examineur).

**Présenter un champ microscopique à un examineur.**

Compter les germes dans 5 champs microscopiques.

Les petits amas de germes et les chaînes sont dénombrés comme un seul germe.

#### **3.3—Compte rendu:**

Décrire et nommer la flore observée.

Présenter les résultats des comptages effectués dans les 5 champs.

Déterminer n, moyenne du nombre de germes par champ.

Calculer le nombre de germes par mL de yaourt.

Conclure.

## **B - IMMUNOLOGIE (30 points)**

### **Détection de fraude sur un lait de brebis**

Une laiterie collecte des laits de vache et des laits de brebis. Le lait de brebis étant beaucoup plus cher que le lait de vache, il arrive que des producteurs peu scrupuleux ajoutent du lait de vache à leur lait de brebis. Différentes techniques permettent de détecter la fraude dont l'immunodiffusion radiale (ou technique de Mancini). Le seuil de sensibilité de la technique permet de détecter une proportion de 0,5 % de lait de vache dans le lait de brebis.

Les principales protéines du lait sont les caséines, les  $\beta$  lactoglobulines et des immunoglobulines. Compte tenu de leur spécificité, on se propose de rechercher les immunoglobulines bovines dans le lait de brebis.

#### **1 - Matériel et réactifs:**

\*1 grande boîte de Petri

\*1 tube contenant 12 mL d'agarose à 1 % en surfusion à 55°C noté " agarose 1 % "

- \*150  $\mu$ L d'anticorps anti immunoglobulines bovines noté " anti-Ig bovines "
- \*0,5 mL de lait de vache pur, noté " V ",
- \*0,5 mL de lait de brebis pur, noté " B "
- \*2 échantillons " B1 " et " B2 " de lait de brebis à tester
- \*barrette de 6 puits
- \*une pipette Pasteur
- \*vortex
- \*système de perforation et trompe à vide (puits d'environ 3 mm)
- \*quelques carrés de papier filtre

## **2 - Mode opératoire:**

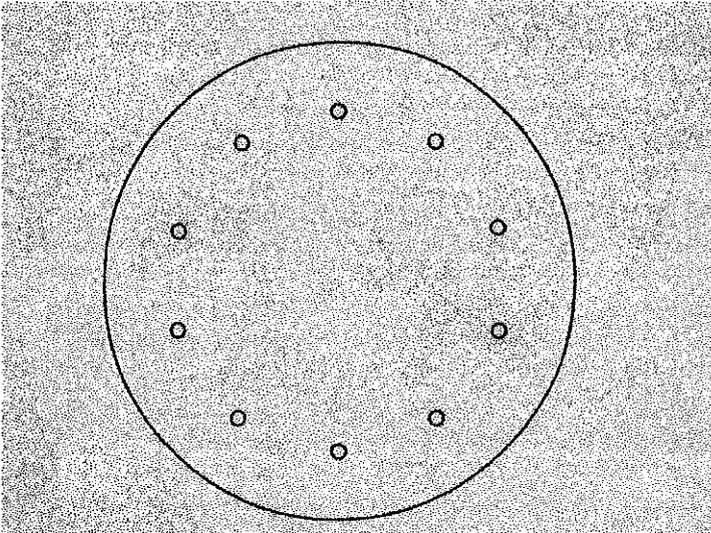
### **2.1 - Préparation du gel:**

#### **2.1.1 - Coulage:**

Ajouter 120  $\mu$ L d'anticorps anti-Ig bovines aux 12 mL d'agarose à 1 % en surfusion.  
Mélanger et couler rapidement dans la boîte de Petri.

#### **2.1.2 - Perforation du gel:**

Perforer le gel à l'aide du système mis à disposition selon le gabarit suivant:



### **2.2 - Préparation de la gamme:**

À partir du lait de vache et du lait de brebis fournis, réaliser dans la barrette de 6 puits, une gamme de concentration en lait de vache (dilué dans le lait de brebis) correspondant aux pourcentages volumiques suivants:

- 10 % de lait de vache
- 20 % de lait de vache
- 30 % de lait de vache
- 40 % de lait de vache
- 50 % de lait de vache
- 60 % de lait de vache

### **2.3- Dépôts:**

Déposer, dans les puits, 5  $\mu$ L des 6 solutions étalons et, en double essai, les 2 laits à tester B1 et B2.

### **2.4- Incubation en chambre humide:**

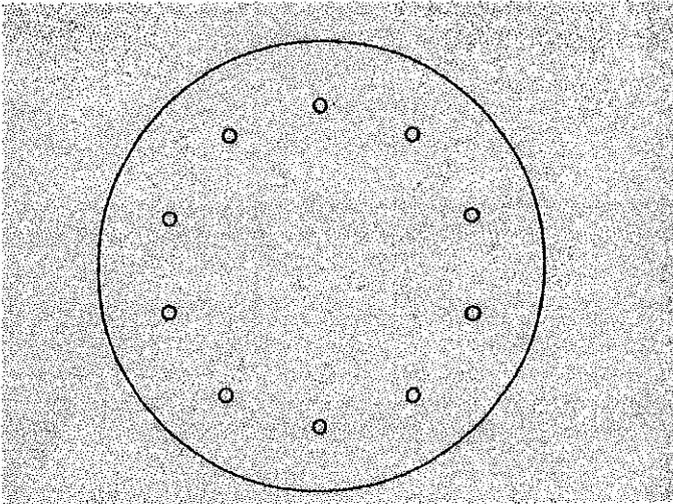
Mettre en chambre humide 24 heures à température ambiante (en déposant dans le couvercle 2 à 3 épaisseurs de papier filtre humidifié).

### **3 - Compte rendu:**

Présenter dans un tableau la réalisation précise de la gamme de lait de vache (dilué dans le lait de brebis).

## **ANNEXE 1**

### **MICROBIOLOGIE Gabarit de dépôt des disques**



## **IMMUNOLOGIE - MICROBIOLOGIE**

2ème jour

Durée: 2 H

### **A - MICROBIOLOGIE (55 points) SUIVI DE FABRICATION D'UN YAOURT À PARTIR D'UN LAIT CRU**

#### **1 - Dénombrement de la flore totale du lait cru:**

Compter les colonies.

Présenter les résultats sous la forme d'un tableau.

Conclure.

## ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

**Deuxième partie : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.**

**ÉPREUVE ES.UNITÉ U52**

**DURÉE : 10 HEURES**

**COEFFICIENT : 8**

### SUJET 3.

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

### LES PRODUITS PARAPHARMACEUTIQUES

#### BIOCHIMIE (70 points)

Durée:3H30

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

Les divers principes actifs d'un produit parapharmaceutique, *Force G*, commercialisé sous forme d'ampoules buvables de 10 mL et préconisé dans les cas d'asthénies, sont:

\*glucides :1 ,52 g;

\*protéines: 0,03 g;

\*caféine :19,8 mg.

L'essentiel des glucides est constitué par du "sirop de glucose" à haute teneur en fructose.

La manipulation consiste à vérifier la teneur en glucides et caféine du produit *Force G*.

#### 1 - Étude des glucides.

##### 1.1. Analyse de la composition en glucides de *Force G* par chromatographie sur couche mince:

###### 1.1.1- Solutions et réactifs:

\*plaque de gel de silice (5 x 7,5 cm);

\*cuve à chromatographie;

\*solvant de migration: méthyléthylcétone 3V / acide acétique 1 V / méthanol 1 V;

\*solutions témoins: glucose, fructose, saccharose;

\*échantillon à analyser de *Force G*: solution diluée au 1/20 notée G1;

\*réactif de révélation au naphtorésorcinol;

\*capillaires pour dépôt d'une goutte des différentes solutions.

###### 1.1.2- Réalisation pratique:

Introduire le solvant dans la cuve et la laisser se saturer en vapeurs de solvant pendant environ 15 minutes (manipuler sous hotte ventilée).

Réactiver la chromatoplaque par passage à l'étuve à 100°C pendant 10 minutes.

Réaliser les différents dépôts; placer la plaque dans la cuve.

À l'issue de la migration, la sécher sous hotte; puis, pulvériser la plaque avec le réactif au naphtorésorcinol.

Révéler à l'étuve à 100°C pendant 10 minutes.

###### 1.1.3- Compte rendu et résultats:

\*Joindre à la copie le chromatogramme obtenu.

\*Exploiter le chromatogramme et conclure.

## 1.2. Dosage enzymatique des glucides de Force G:

Le dosage du D-glucose et du D-fructose est réalisé par une méthode enzymatique en point final (test UV à 340 nm).

### 1.2.1- Principe du dosage:

À pH 7,6, en présence d'hexokinase (HK), le D-glucose et le D-fructose sont phosphorylés par l'ATP en glucose-6-phosphate et fructose-6-phosphate:

D-glucose + ATP -----> D-glucose-6-phosphate + ADP (1)

D-fructose + ATP -----> D-fructose-6-phosphate + ADP (2)

En présence de glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6P-DH), le D-glucose-6-phosphate formé est oxydé de façon spécifique par du NADP<sup>+</sup> en 6-phosphogluconate:

D-glucose-6-phosphate + NADP<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O -----> 6 phosphogluconate + NADPH, H<sup>+</sup> (3).

La quantité de NADPH formé est proportionnelle à la quantité de glucose.

Le NADPH formé est mesuré par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

Le dosage du D-fructose-6-phosphate est réalisé après transformation en D-glucose-6-phosphate par la phosphogluconase-isomérase (PGI):

D-fructose-6-phosphate -----> D-glucose-6-phosphate (4).

Le D-glucose-6-phosphate formé est oxydé selon la réaction (3) en 6-phosphogluconate, la quantité de NADPH formé est proportionnelle à la quantité de fructose.

### 1.2.2- Réalisation pratique:

#### A) Réactifs:

- solution 1: tampon pH 7,6; NADP<sup>+</sup>; ATP; sulfate de magnésium;
- suspension 2: HK; G6P-DH;
- suspension 3: PGI;
- solution G2 = solution G1 à diluer au 1/10 dans l'eau distillée.

#### B) Mode opératoire

##### 1 - Conditions de mesure:

- température: 20-25°C (température ambiante);
- longueur d'onde: 340 nm;
- trajet optique: 1 cm;
- lire contre l'air;
- réaliser deux essais sur G2.

##### 2 - Procédure du test:

Introduire directement dans les cuves à spectrophotomètre:

Cuves à spectrophotomètre	Témoin	Essai
solution 1 (mL)	1,0	1,0
solution G2 (mL)	-	0,1
eau distillé (mL)e	2,0	1,9

Mélanger - Après 3 min, lire les absorbances A<sub>1</sub>, des solutions.

Déclencher la réaction par addition de:

Suspension 2 (mL)	0,02	0,02
-------------------	------	------

Mélanger - Après 15 min, lire les absorbances A<sub>2</sub> des solutions.

Ajouter:

Suspension 3 (mL)	0,02	0,02
-------------------	------	------

Mélanger - Après 15 min, lire les absorbances A<sub>3</sub> des solutions.

Calculer les différences ( $A_2 - A_1$ ) du témoin et de l'essai. En déduire

$$DA \text{ (glucose)} = (A_2 - A_1)_{\text{essai}} - (A_2 - A_1)_{\text{témoin}}$$

Calculer les différences ( $A_3 - A_2$ ) du témoin et de l'essai. En déduire

$$DA \text{ (fructose)} = (A_3 - A_2)_{\text{essai}} - (A_3 - A_2)_{\text{témoin}}$$

### 1.2.3- Calculs:

Établir les expressions littérales donnant les concentrations massiques (g/L) en glucose et en fructose du produit *Force G*.

Exprimer numériquement les résultats.

Conclure quant aux pourcentages respectifs en glucose et fructose dans le " sirop de glucose ".

Données:  $M \text{ (glucose)} = 180 \text{ g.mol}^{-1}$      $M \text{ (fructose)} = 180 \text{ g.mol}^{-1}$ .

$$\epsilon_{\text{NADPH, II}} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}.$$

## 2 - Dosage de la caféine par une méthode spectrophotométrique.

On dispose d'un extrait  $EG_1$  de caféine obtenu selon le protocole fourni en annexe. Il est possible de doser par spectrophotométrie la caféine à  $\lambda = 273 \text{ nm}$  en comparant l'absorbance de l'extrait  $EG_1$  à celles obtenues à partir d'une gamme d'étalonnage.

### 2.1- Solutions et réactifs.

- Solution étalon de caféine à 200 mg/L
- Extrait  $EG_1$
- Méthanol.

### 2.2- Réalisation de la gamme d'étalonnage et du dosage:

#### 2.2.1- Gamme d'étalonnage:

À partir de la solution étalon de caféine à 200 mg/L, réaliser une dilution au 1/10 dans le méthanol.

À partir de la solution diluée, préparer une série de 6 tubes (diluant: méthanol) allant de 0 à 20 mg/L de caféine.

#### 2.2.2- Dosage sur l'extrait:

Réaliser deux essais directement sur l'extrait noté  $EG_1$ .

#### 2.2.3- Lectures au spectrophotomètre:

Lire l'absorbance des différentes solutions à  $\lambda = 273 \text{ nm}$ .

### 2.3- Compte rendu et résultats:

Expliquer, à l'aide d'un tableau, la préparation des tubes de la gamme d'étalonnage.

Exploiter les résultats de la gamme d'étalonnage par micro-ordinateur. Valider les valeurs expérimentales retenues pour le calcul de la droite de régression. Donner l'équation de cette droite de régression et son coefficient de corrélation, rendre un graphique légendé. En déduire la concentration massique en caféine dans l'extrait en mg/L.

Déterminer la masse de caféine en mg contenue dans une ampoule de 10 mL de *Force G*.

Comparer le résultat obtenu avec la valeur indiquée.

Conclure.

## ANNEXE:

### PROTOCOLE D'OBTENTION DE L'EXTRAIT EG<sub>1</sub> DE CAFÉINE

Introduire 5 mL de dilution au 1/20 de *Force G* dans une ampoule à décanter. Ajouter 10 mL d'eau, 1 mL de solution de carbonate de sodium et 20 mL de solvant organique. Agiter par retournement. Transférer la phase organique (inférieure) dans une fiole jaugée de 50 mL. Extraire à nouveau la phase aqueuse par 20 mL de solvant organique. Compléter la fiole au trait de jauge avec le solvant organique.

---

### À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE FEUILLE DE RÉSULTATS

**N° de poste:**

#### 1-Dosage enzymatique des glucides de "Force G"

Absorbances à 340 nm	Témoin	Essai 1	Essai 2
A <sub>1</sub>			
A <sub>2</sub>			
A <sub>3</sub>			

Exprimer:

$$\Delta A(\text{glucose}) =$$

$$\Delta A(\text{fructose}) =$$

#### 2-Dosage de la caféine de "Force G"

	Étalons	Essais	
		1	2
Concentration massique (mg/L)			
Absorbance à 273nm			

### MICROBIOLOGIE. BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

1er jour

Durée: 4 H 30

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

La propolis est un produit naturel complexe recueilli par les abeilles sur les bourgeons de végétaux. Sa composition lui confère des propriétés anti-microbiennes, anesthésiques, cicatrisantes et anti-inflammatoires.

Durant cette manipulation, nous contrôlerons le produit en cours d'élaboration et le produit fini avant commercialisation,

## **A- MICROBIOLOGIE (50 points).**

### **1 - Vérification de la stérilité de l'eau utilisée lors de la fabrication.**

Placer 1 mL d'eau à analyser notée A sur le test Pétrifilm pour numération de la flore totale aérobie en suivant les indications du document joint. Mettre à incuber 48 heures à 30°C en chambre humide.

### **2 - Contrôle de l'efficacité antimicrobienne de l'extrait de propolis.**

On utilise une souche test de *Staphylococcus aureus* présentée en bouillon de Chapman.

#### **2.1 - Vérification de la souche test.**

Vérifier l'aspect microscopique à la coloration de Gram (**présenter un champ microscopique à l'examineur**)

Isoler la souche sur gélose ordinaire et sur milieu de Baird-Parker+RPF (Rabbit Plasma Fibrinogène - la fiche milieu est fournie en annexe).

Incuber 48 heures à 37°C.

#### **2.2 - Réalisation du contrôle.**

Mesurer l'absorbance de la souche (en bouillon) à tester à 600 nm.

Ajuster la suspension microbienne à 0,25 unité d'absorbance en la diluant dans de l'eau distillée stérile.

Verser 1mL de la suspension ainsi préparée dans le tube contenant l'extrait de propolis noté B (cet extrait contient 1,4 % de propolis pure).

**2.2.1 -** Mélanger et préparer immédiatement une gamme de dilution de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ .

Effectuer le dénombrement, en double et en milieu PCA, sur les trois dernières dilutions.

Incuber les boîtes 48 heures à 37°C.

Laisser le tube d'extrait ensemencé sur le portoir.

**2.2.2 -** Après 2 heures de contact, préparer une nouvelle gamme de dilution de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ .

Effectuer un nouveau dénombrement comme précédemment.

### **3 - Contrôle de la stérilité des flacons d'emballage.**

Mettre le flacon noté C à l'étuve à 45°C pendant 15 minutes.

Le sortir et verser immédiatement les 2 mL de gélose pour dénombrement en surfusion.

Faire tourner horizontalement le flacon pour que la gélose se répartisse sur toute la paroi.

Laisser solidifier et incuber 48 heures à 30°C.

### **4 - Contrôle de l'efficacité du produit fini sur la souche test:**

Étaler 0,1 mL de la suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus* à la surface d'une gélose ordinaire.

Laisser sécher la boîte.

Déposer au centre de la boîte un disque stérile de papier Whatman de 6 mm de diamètre.

Imbibé le disque par 15 µL de sirop (contenant 1,3 % de propolis pure) noté D.

Laisser diffuser 15 minutes à la température du laboratoire puis incuber 48 heures à 37°C.

## **B- BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (40 points).**

Pour vérifier la non toxicité de la propolis, on peut être amené à la tester sur des cultures cellulaires animales. Afin de réaliser ces tests, on doit préparer les cultures de cellules et les répartir dans des puits d'une microplaque.

### **1 - Réactifs et matériels.**

Les réactifs et matériels sont disposés en partie au poste de travail et en partie dans la salle de culture cellulaire.

#### **Au poste de travail:**

- \*un tube contenant une fraction aliquote d'une culture de cellules en suspension en milieu RPMI + 10 % de SVF (sérum de veau foetal);
- \*un hématimètre de Malassez avec une lamelle optiquement plane;
- \*un tube à hémolyse contenant 500  $\mu$ L de bleu Trypan à 0,04 %;
- \*un tube à hémolyse vide;
- \*pipettes automatiques P 1000 et P 200.

#### **Dans la salle de culture cellulaire:**

- \*un tube contenant 2 mL de la culture de cellules en suspension;
- \*un flacon contenant 15 mL de milieu de base RPMI;
- \*un microtube contenant 0,2 mL de L glutamine à 200 mmol.L<sup>-1</sup>;
- \*un microtube contenant 0,2 mL du mélange d'antibiotiques;
- \*un tube contenant 2 mL de SVF;
- \*un flacon stérile;
- \*une pipette stérile de 25 mL;
- \*trois pipettes stériles de 1 mL ou 2 pipettes stériles de 1 mL et une pipette automatique P1000 avec cônes stériles;
- \*une pipette stérile de 2 mL;
- \*une pipette stérile de 10 mL;
- \*une plaque de culture stérile de 12 cupules;
- \*une étuve à CO<sub>2</sub>.

#### **Au voisinage des PSM:**

- \*un dispositif de lavage des mains;
- \*un flacon d'alcool et du papier absorbant.

### **2- Protocole.**

#### **2.1 - Au poste de travail: manipulation à réaliser dès le début de la séance.**

À partir d'une fraction aliquote d'une culture de cellules en suspension dense et homogène, réaliser une numération en présence de bleu Trypan comme suit:

- \*100  $\mu$ L de culture + 400  $\mu$ L de bleu Trypan à 0,04 %; mise en hématimètre à réaliser devant un examinateur;
- \*numérer en cellule de Malassez; présenter un champ microscopique à un examinateur.

#### **2.2-- Dans la salle de culture cellulaire, travail à réaliser sous PSM en présence d'un examinateur: l'ordre de passage sera indiqué ( temps limité à 20 minutes ).**

- Complémentation d'un milieu

Préparer, sous la hotte, 15 mL de milieu RPMI complet en introduisant dans un flacon stérile:

\*le milieu RPMI de base;

\*du sérum de veau foetal (SVF): 10 % du volume final;

\*de la L-glutamine à  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  (1), pour une concentration finale de  $292 \text{ mg.L}^{-1}$ ;

\*le mélange d'antibiotique: 10  $\mu\text{L}$  par mL de milieu final.

(1) La masse molaire de la L-glutamine est de:  $146 \text{ g.mol}^{-1}$ .

-Ensemencement du milieu

Dans ces 15 mL de milieu complet, introduire " x " mL de la culture numérotée précédemment pour avoir environ 20 000 cellules viables de cette nouvelle culture par puits de la plaque.

Répartir cette culture dans les 12 puits d'une plaque à raison de 1,2 mL par puits.

Identifier la plaque et la placer dans l'incubateur à  $\text{CO}_2$ .

Remarque: on admettra que le volume " x " est négligeable par rapport au volume de milieu.

### **3 - Résultats - Compte rendu.**

- 3.1-** Donner les résultats de la numération en présence de bleu Trypan; en déduire le pourcentage de mortalité cellulaire.
- 3.2-** Expliquer le calcul des volumes de RPMI, SVF, glutamine et antibiotique prélevés pour compléter le milieu.
- 3.3 -** Déterminer, en justifiant le calcul, le volume " x " de culture initiale (inoculum) introduit dans le milieu neuf.

(Français) a.

## MODE D'EMPLOI

### Préparation de l'échantillon

1. Utiliser les diluants stériles appropriés: tampon phosphate Butterfield (tampon phosphate IDF, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 0,0425 g/l, ajuster le pH à 7,2), eau peptonée 0,1%, peptone-sel (méthode ISO 6987), solution salée (0,85 à 0,90%), bouillon de Leifson sans thiosulfate et eau distillée. Ne pas utiliser de tampons contenant du citrate ou du thiosulfate de sodium avec les tests Petrifilm. Si un tampon au citrate est employé, le remplacer par un tampon phosphate Butterfield chauffé entre 40° C et 45° C.
2. Pour les produits acides, ajustez le pH de l'échantillon dilué entre 5,5 et 7,2 à l'aide de NaOH 1N. Ajustez le pH des produits alcalins à l'aide de HCl 1N.
3. Mélanger ou homogénéiser l'échantillon.

### Utilisation des tests Petrifilm

Inoculer et répartir l'échantillon sur un test Petrifilm avant d'inoculer le test Petrifilm suivant.

1. Placer le test Petrifilm pour la numération de la Flore Totale Aérobie sur une surface de travail plane (voir figure a).
2. Soulever le film supérieur et déposer 1 ml d'échantillon ou d'échantillon dilué au centre du film inférieur (voir figure b).
3. Recouvrir l'échantillon avec le film supérieur (voir figure c).
4. Placer le diffuseur en plastique côté creux vers le bas au centre du film supérieur (voir figure d).
5. Répartir l'échantillon uniformément en exerçant une légère pression au centre du diffuseur en plastique. Ne pas faire glisser le diffuseur sur le film.
6. Retirer le diffuseur et laisser reposer pendant ou moins une minute pour permettre la solidification du gel.

### Incubation

Incuber les tests Petrifilm à l'horizontale, le film transparent vers le haut, sans empiler plus de 20 unités.

L'incubateur doit être humidifié. La perte d'humidité du test Petrifilm (indiquée par la perte pondérale) ne doit pas dépasser 15% après incubation.

**AOAC® Official Method 5108 (1986.32) dénombrement bactérien et coliforme dans les lait, film sec réhydratable et 289.10 dénombrement bactérien et coliforme dans les produits laitiers, film sec réhydratable**  
Incuber les tests Petrifilm pour la numération de la Flore Totale Aérobie pendant 48 h ± 3 h à 32° C ± 1° C.

**AOAC® Official Method 5109 (1990.12) dénombrement de flore aérobie dans les aliments, film sec réhydratable**  
Incuber les tests Petrifilm pour la numération de la Flore Totale Aérobie pendant 48 h ± 3 h à 35° C ± 1° C.

**Méthode validée par l'AFNOR (numéro de certificat 3M 01/1/69289)**

Incuber les tests Petrifilm pour la numération de la Flore Totale Aérobie pendant 72 h ± 3 h à 30° C ± 1° C.

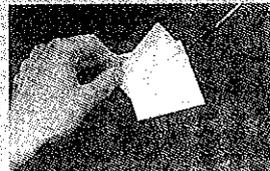
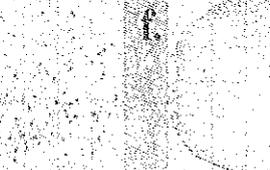
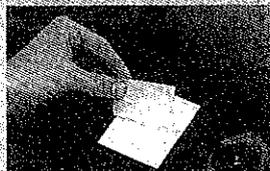
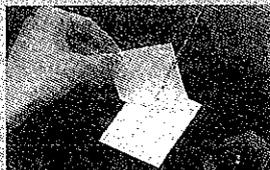
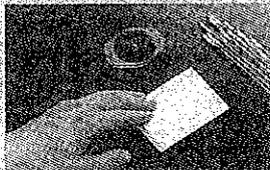
**Méthode NMKL (Nordic Committee on Food Analysis) (146.1992)**

Incuber les tests Petrifilm pour la numération de la Flore Totale Aérobie pendant 72 h ± 3 h à 30° C.

### Interprétation

1. Le dénombrement du test Petrifilm peut se faire à l'aide d'un compteur de colonies standard ou au moyen d'une autre source intense de lumière. Compter toutes les colonies rouges indépendamment de leur taille ou de leur densité (voir figure e).
2. La zone de croissance circulaire mesure environ 20 cm<sup>2</sup>. Des estimations peuvent être effectuées sur des tests Petrifilm contenant plus de 250 colonies en comptant le nombre de colonies dans un ou plusieurs carrés représentatifs et en déterminant le nombre moyen par carré. Multiplier le nombre moyen par 20 pour déterminer le nombre total par film.
3. La présence de forte concentration de colonies sur le test Petrifilm se traduit par une coloration rouge ou rose de l'ensemble de la zone de croissance. Il arrive également que des colonies ne soient pas visibles au centre de la zone de croissance alors qu'elles le sont sur le pourtour. Lorsque l'un de ces phénomènes se produit, diluer davantage l'échantillon pour obtenir un dénombrement plus précis (voir figure f).
4. Certains organismes peuvent liquéfier le gel, de ce fait s'étalent et masquent la présence d'autres colonies. Lorsque la liquéfaction du gel gêne le dénombrement, la numération peut être estimée à partir des zones non liquéfiées.
5. Les colonies peuvent être isolées pour effectuer une identification. Soulever le film supérieur et prélever la colonie du gel (voir figure g). Procéder au test en utilisant les procédures standard.
6. Après incubation, les tests Petrifilm peuvent être stockés congelés (-15° C) durant une semaine pour permettre une lecture différée. Cette recommandation ne s'applique que si le dénombrement ne peut pas avoir lieu juste après l'incubation.

Pour toute information complémentaire, se reporter au "Guide d'interprétation". Pour toute question sur des applications ou procédures spécifiques ou pour obtenir une liste des validations réglementaires et autres agréments, prière de contacter le représentant des produits de microbiologie 3M le plus proche.



g.

# Baird Parker RPF (gélose)

Pour contrôle microbiologique industriel exclusivement

Gélose pour le dénombrement sans confirmation des staphylocoques à coagulase positive.

## PRESENTATION

44 003 Coffret de 4 flacons de base Baird Parker  
90 ml ; R1  
et de 4 flacons de supplément RPF 10 ml  
(lyoph) : R2

## CONSERVATION

Conservation à 2-8°C.

## COMPOSITION

Formule théorique en g/l d'eau purifiée :  
Ce milieu peut être ajusté et/ou complété en fonction des critères  
de performances imposés.

R1	
Peptone .....	10
Extrait de levure .....	1
Extrait de viande .....	5
Chlorure de lithium .....	5
Pyruvate de sodium .....	10
Glycine .....	12
Agar .....	12,5

R2	
Fibrinogène bovin .....	3,75
Plasma de lapin .....	50 ml
Inhibiteur de trypsine .....	50 mg
Tellurite de potassium .....	25 mg

pH 7,8

## PRINCIPE

La gélose Baird Parker avec RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) est basée sur la formule de H.J. Beckers (1984). Elle est utilisée pour le dénombrement sans confirmation des staphylocoques à coagulase positive dans les denrées alimentaires. Sa formulation correspond à celle décrite dans les normes M.S.D.A. 5<sup>ème</sup> édition (1985), FIL 145 (1990), AFNOR V08-057-2 (1994) et le projet ISO/CD 6888-2 (1994).

Le milieu Baird Parker renferme une base nutritive riche, de la glycine, ainsi que du pyruvate de sodium qui a pour rôle de stimuler la croissance des souches ayant subi des altérations liées au processus d'élaboration des produits alimentaires. La sélectivité vis-à-vis des espèces autres que le *Staphylococcus aureus* est apportée par le chlorure de lithium ainsi que par le tellurite de potassium, qui entraîne le virage au noir des colonies le réduisant.

Le supplément RPF contient du plasma de lapin, du fibrinogène de boeuf, permettant de mettre en évidence l'activité de la coagulase, et un inhibiteur de trypsine pour éviter la fibrinolyse totale ou partielle des halos formés autour des colonies à coagulase positive.

## PREPARATION

1. Desserrer, au préalable, le bouchon du flacon de base R1.
2. Faire fondre au bain-marie bouillant le flacon de R1 et le laisser refroidir à 45°C +/- 0,5°C.
3. Reprendre par 10 ml d'eau distillée stérile un flacon de R2 et mélanger doucement jusqu'à dissolution complète.
4. Verser le contenu du flacon R2 dans le flacon R1, bien homogénéiser.
5. Le mélange obtenu doit être utilisé immédiatement.

## UTILISATION

Il est possible de travailler suivant un ensemencement en profondeur ou en surface selon les méthodologies habituelles. Incuber pendant 24h à 37°C +/- 1°C. Prolonger l'incubation jusqu'à 48 h, si nécessaire.

Remarque : Si on utilise la méthode d'ensemencement en surface, il est possible de préparer les boîtes à l'avance et de les conserver 2 semaines à 2-8 ° C à l'abri de la lumière et en sachet cellophane.

## LECTURE ET INTERPRETATION

Les colonies de staphylocoques à coagulase positive apparaissent entourées d'un halo opaque. Elle sont le plus souvent de couleur gris noir, les dénombrer et rapporter au nombre de staphylocoques coagulase positive par gramme d'aliment. D'autres microorganismes peuvent se développer en formant des colonies gris-noir, mais ils ne présentent pas de réaction positive à la coagulase (absence de halo opaque autour des colonies).

## PRECAUTIONS D'UTILISATION

Ce produit est réservé exclusivement au contrôle microbiologique des produits alimentaires.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Beckers H.J., Van Leusden F.M., Bindshedler O. and Guerraz D. Can J Microbiol (1984) 30 470-474
2. Manuel Suisse des Denrées Alimentaires - 5<sup>ème</sup> Edition - 1965
3. Norme Fil 145 : 1990 - Lait et produits à base de lait - Dénombrement des *Staphylococcus aureus* - Technique de comptage des colonies à 37°C.
4. Norme AFNOR V08-057-2 Nov. 1994 - Microbiologie alimentaire - Méthode de routine pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C - Partie 2 : Technique sans confirmation des colonies.
5. Projet ISO/CD 6888-2 1994 - Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des Staphylocoques coagulase positive par comptage des colonies à 35/37°C - Partie 2 - Technique sans confirmation.

## MICROBIOLOGIE- BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

2<sup>ème</sup> jour

Durée: 2 H

### **A - MICROBIOLOGIE (50 points)**

**1 - Vérification de la stérilité de l'eau utilisée lors de la fabrication:**

Lire les résultats du test sur Pétrifilm et conclure.

**2 - Vérification de la souche test:**

Identifier avec précision la souche en justifiant la démarche.

**3 - Contrôle de l'efficacité de l'extrait de propolis sur la souche test:**

Exploiter les résultats des dénombrements.

Conclure sur l'efficacité de l'extrait.

**4 - Contrôle de la stérilité des flacons d'emballage:**

Dénombrer les colonies éventuellement présentes et conclure.

**5 - Contrôle de l'efficacité du produit fini sur la souche test:**

Lire le test et conclure.

**6 - Conclusion:**

Conclure sur l'ensemble de la manipulation.

### **B - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (40 points)**

Observer la plaque de culture à l'œil nu et au microscope inversé. Noter les observations et les commentaires sur le compte rendu.

**ANNALES**

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR  
BIOTECHNOLOGIE**

**Sessions 1999-2000**

**Publications de l'UPBM**

UPBM ÉDILION

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.

Les sujets « Mathématiques », « Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique » et « Epreuve professionnelle de Synthèse : 1<sup>ère</sup> partie Etude de Projet » sont accompagnés d'éléments de corrigé.

### Sommaire :

#### Année 1999 :

Français	Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE	page 99-1
Anglais		1999-1
Mathématiques : sujet et <i>Eléments de corrigé</i>		
Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE		99-7
Sciences physiques		1999-3
Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique		1999-6
<i>Proposition de corrigé</i>		1999-10
Epreuve professionnelle de synthèse 1 <sup>ère</sup> partie (Etude de Projet / Académies Paris/Lille/Versailles)		1999-13
<i>Proposition de corrigé</i>		1999-22
(Etude de Projet / Autres académies)		1999-25
Epreuve professionnelle de synthèse 2 <sup>ème</sup> partie (Réalisation pratique d'opérations de Génie Biologique)		1999-32

#### Année 2000 :

Français		2000-1
Anglais		2000-8
Mathématiques		2000-9
<i>Eléments de corrigé</i>		2000-11
Sciences physiques		2000-12
Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique		2000-14
<i>Proposition de corrigé</i>		2000-19
Epreuve professionnelle de synthèse 1 <sup>ère</sup> partie (Etude de Projet)		2000-24
<i>Proposition de corrigé</i>		2000-32
Epreuve professionnelle de synthèse 2 <sup>ème</sup> partie (Réalisation pratique d'opérations de Génie Biologique)		2000-34

# Annales du BTS Biotechnologie :

## Définition de la nature des épreuves

### 1. Épreuve de français

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

#### Objet et contenu de l'épreuve

L'épreuve a pour but de vérifier l'aptitude du candidat à d'une part 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 50 à 100 lignes dactylographiées qui offrira par lui-même un sens assez complet, qui soit clair 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 tenant compte 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. Épreuve d'anglais

- Épreuve écrite 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 :

- 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 une 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.

### Épreuve facultative Langue vivante II

Épreuve orale de 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 min 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. Épreuve de mathématiques - sciences physiques

- Épreuve écrite
- Durée : 4 heures (2 h + 2 h)
- Coefficient : 4

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

#### 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 la main et 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 le circulaire n° 85-228 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 (coefficient 2,5)

Cette seconde partie de l'épreuve doit permettre d'apprécier le niveau de 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.

Il doit être vérifié que le candidat :

- analyse convenablement un problème pose 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. Épreuve de sciences biologiques fondamentale et génie biologique

- Épreuve 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 comporte plusieurs questions indépendantes.

## 5. Épreuve professionnelle de synthèse : étude de projet et réalisation pratique d'opérations de génie biologique

- Épreuve écrite et pratique
  - Durée maximale : 12 heures
  - Coefficient : 12
- Cette épreuve comporte deux parties obligatoires

### Première partie : Étude 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 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 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 et à l'informatique

## 6. Épreuve de soutenance du rapport de stage ou d'activité professionnelle

- Épreuve 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 ou 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 ou 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'excèdera 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 schématisée de l'établissement du 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, le fiche de stage sera jointe.

L'évaluation des aspects scientifiques et 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 comprend :

- un professeur de français,
- un professeur d'économie et gestion,
- 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 tient compte des situations rencontrées au cours de ce second stage et qui peut reprendre des observations rassemblées au cours du premier stage.

**Épreuves de  
la session  
1999**



## EPREUVE DE FRANÇAIS GROUPE 1 : SYNTHESE DE DOCUMENTS

Durée : 4 heures

Coefficient : 2

Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE dans ce même volume, page 99-1

## EPREUVE D'ANGLAIS

Durée : 2 heures

Coefficient : 1

L'usage d'un dictionnaire bilingue est interdit

### ELIXIR OF YOUTH

- 1 A protein that keeps people youthful also wards off<sup>(1)</sup> the ravages of old age in a single-celled yeast, American scientists have found. They suggest that such "longevity factors" may have come into being early on in evolution and still be common to a wide range of species.

- The researchers think that the protein prolongs life by protecting a compartment in the cell called the nucleolus<sup>(2)</sup>, where critical pieces of ribosomes – the protein factories of the cell – are copied from chromosomes. "This seems to be the Achilles heel of the cell," says the leader of the team, Leonard Guarente of the Massachusetts Institute of Technology near Boston.

- Guarente's work was inspired by studies of Werner's syndrome, a disease caused by a rare defect in a human gene called WRN. Patients without a working copy of WRN turn grey-haired in their twenties, their skin wrinkles, and they develop diseases usually associated with the elderly, such as cataracts and osteoporosis. Most die before the age of 50.

- Last year, researchers sequenced the WRN gene and discovered that it codes for a helicase, an enzyme that unwinds<sup>(3)</sup> the double helices of DNA or RNA. Since then, researchers have been keen to understand how WRN fends off<sup>(4)</sup> ageing in healthy people, since it might give some clue to the normal ageing process.

Meanwhile, Guarente's team had been studying how the humble brewer's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, grows old. This microorganism reproduces by budding,<sup>(5)</sup> in which a large "mother cell" sprouts a daughter cell containing a copy of its chromosomes. A healthy mother can produce a few dozen buds before perishing.

- 20 The researchers wanted to know if the yeast's version of the Werner's gene, known as SGS1, was also involved in ageing. They used standard genetic tricks to disrupt<sup>(6)</sup> the SGS1 gene in yeast and followed mother cells to see how many times each budded before dying. Without a functional SGS1 gene, the cells produced an average of 9.5 daughter cells. But yeasts with a healthy gene lived twice as long, budding 24.5 times.

- 25 Guarente's team has also found some hints to how the SGS1 protein slows ageing. First the researchers showed that the protein was concentrated in the nucleoli of yeast cells. When the gene for SGS1 was disrupted, the nucleolus broke into pieces as mother cells neared the premature end of their lives. Intriguingly, cells with normal SGS1 also had fragmented nucleoli as they neared the end of their days. That suggests to Guarente that SGS1 stalls<sup>(7)</sup> ageing by unwinding and stabilising DNA inside the nucleolus. Sooner or later, however, the cells die

- 30 when the nucleolus is smashed to pieces.

"This is first-rate science, beautifully executed," says George Martin of the University of Washington in Seattle, part of the team that cloned and sequenced WRN. He adds that the work is sure to focus attention on the nucleolus's role in ageing. But he warns that even though 35 human WRN and yeast SGS1 are similar, it is still unclear whether their function is the same. "The jury is still out"<sup>(8)</sup> on even that basic question," he says.

Guarente's group is planning to close the gap between mammals and microorganisms by seeing if nucleolar changes accompany the ageing of cells in Werner's syndrome patients.

**Philip COHEN,**  
*New Scientist*, 6 September 1997

**Footnotes :**

- (1) : *ℓ*.1 : to ward off : éviter.
- (2) : *ℓ*.5 : a nucleolus : un nucléole.
- (3) : *ℓ*.13 : to unwind : dérouler.
- (4) : *ℓ*.14 : to fend off : repousser.
- (5) : *ℓ*.17 : budding : bourgeonnement.
- (6) : *ℓ*.21 : to disrupt : perturber.
- (7) : *ℓ*.29 : to stall : retarder.
- (8) : *ℓ*.36 : "The jury is still out..." : le jury continue de débattre ...

**Part I (10 points)**

Vous rédigerez un compte rendu en français du texte en faisant ressortir les idées essentielles. (250mots)

**Part II (10 points)**

1. Philip Cohen alludes to a well-known genetic disease called « Werner's Syndrome ». Can you name another genetic disease and briefly describe it. (40 words max.)
2. According to G.Martin (/32), Guarente's research can be considered as « first-rate science ». State in your own words, and as precisely as you can, what his discovery consisted in. (80 words max.)
3. What are proteins ? Explain, as precisely as possible, their function in the human organism. (150 words max.)



**Données :**

- Masse du noyau  ${}^{99}_{42}\text{Mo}$  : 98,88437 u
- Masse du noyau  ${}^{99}_{43}\text{Tc}$  : 98,88235 u
- Masse de l'électron :  $55 \cdot 10^{-5}$  u
- Unité de masse atomique :  $1 \text{ u} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
- Célérité de la lumière :  $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$
- Constante de Planck :  $h = 6,662 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$
- Nombre d'Avogadro :  $N = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
- $1 \text{ eV} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$

**CHIMIE ORGANIQUE (15 points)**

Les deux parties sont indépendantes.

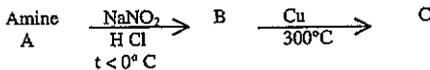
I. On donne les valeurs suivantes de pKa

- Ammoniac :  $\text{NH}_3$  pKa = 9,2
- Méthylamine :  $\text{CH}_3 - \text{NH}_2$  pKa = 10,6
- Phénylamine (Aniline) :  pKa = 4,6

- 1) En utilisant les effets inductifs, expliquer pourquoi la méthylamine est une base plus forte que l'ammoniac.
- 2) Ecrire les formes mésomères de la phénylamine et justifier sa très faible basicité.

II. On considère les 4 mono-amines saturées de formule brute  $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$ .

- 1) Donner les différentes formules semi-développées possibles. Indiquer le nom et la classe de chaque amine.
- 2) On donne la suite de réactions suivante :



- 2.1. Quelle est la classe de l'amine ainsi mise en évidence ?
- 2.2. Quel est le groupement fonctionnel du composé B ?
- 2.3. Le produit C réagit avec la 2,4 - DNPH (2,4-dinitrophénylhydrazine) mais ne réagit pas sur la liqueur de Fehling. Quelle fonction possède le produit C ?
- 2.4. Identifier parmi les 4 amines précédentes l'amine A, puis écrire les équations-bilans relatives au schéma proposé.

**Données masses molaires moléculaires :**

- N : 14 g. mol<sup>-1</sup>
- C : 12 g. mol<sup>-1</sup>
- H : 1 g. mol<sup>-1</sup>

## OXYDO-REDUCTION ET COMPLEXES (20 points)

On réalise les 2 demi-piles suivantes :

- La demi-pile n° 1 est constituée d'une lame de platine plongeant dans 100 mL d'une solution aqueuse contenant :  
0,01 mole de sulfate de fer (II) et  $10^{-3}$  mole de sulfate de fer (III)
- La demi-pile n° 2 est constituée d'une lame de zinc plongeant dans 100 mL d'une solution aqueuse de sulfate de :  
zinc (II) à  $10^{-2}$  mol. L<sup>-1</sup>.

- 1) Calculer les concentrations molaires en ions fer (II) et fer (III) dans la demi-pile 1 et en déduire le potentiel  $E_1$  pris par la lame de platine.
- 2) Calculer le potentiel  $E_2$  pris par la lame de zinc dans la demi-pile 2.
- 3) On associe les 2 demi-piles
  - 3.1. Faire le schéma de la pile ainsi réalisée
  - 3.2. Quelles sont les polarités des électrodes ?
  - 3.3. Ecrire l'équation –bilan de la réaction qui se produit lorsque la pile débite.
  - 3.4. Calculer la f.é.m. de la pile en début de fonctionnement.
- 4) Dans la demi-pile 2, on fait dissoudre  $10^{-2}$  mole d'ammoniac sans variation de volume. Il se forme le complexe :  $[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ .
  - 4.1. Calculer la nouvelle concentration en ions zinc (II) libres dans la demi-pile 2
  - 4.2. En déduire la valeur de la f.é.m. de la pile.

Données :

$$E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}} = 0,77 \text{ V}$$

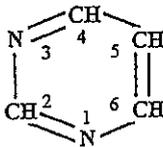
$$E^{\circ}_{\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}} = -0,76 \text{ V}$$

$$[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]^{2+} : K_d = 2.10^{-9}$$



### 1.3. La stabilité de l'ADN

- 1.3.1. L'ADN cellulaire est une macromolécule sensible à la température.  
♦ Indiquer comment évolue la structure de l'ADN en fonction de ce paramètre.  
Définir la température de fusion et dégager sa signification.
- 1.3.2. L'ADN des archaebactéries hyperthermophiles est très résistant aux températures extrêmes.  
♦ Expliquer pourquoi.
- 1.3.3. L'ADN de tous les organismes est également soumis à des agressions chimiques responsables d'altérations diverses comme notamment des désaminations.  
On trouve dans l'ADN deux bases pyrimidiques majeures la thymine ou 5 méthyl-2,4 dioxypyrimidine et la cytosine ou 4 amino-2 oxyypyrimidine ; par contre l'uracile ou 2,4 dioxypyrimidine est normalement absente de l'ADN.  
La formule de la pyrimidine est donnée ci-dessous.



- ♦ Ecrire les formules développées de la thymine et de la cytosine.  
♦ Montrer comment la désamination d'une base comme la cytosine peut conduire (par transition) à une mutation pouvant entraîner la substitution d'un acide aminé dans la protéine codée par le gène.

## 2. MÉTABOLISME DES ARCHAEBACTÉRIES (20 points)

- 2.1. Pour s'adapter à un environnement extrême, les archaebactéries ont développé des voies métaboliques particulières.  
Les halophiles extrêmes vivant dans les eaux salées comme la mer Morte possèdent une chaîne respiratoire aérobie qui leur permet de synthétiser leur ATP par couplage chimiosmotique. Elles possèdent de plus une protéine membranaire, la bactériorhodopsine, qui se comporte comme une pompe à protons « actionnée » par l'énergie lumineuse. Celle-ci constitue une source énergétique : dans un milieu où la concentration en oxygène dissous est faible à cause de la forte teneur en sels.
- ♦ Présenter, sous forme d'un schéma légendé et commenté, le mécanisme du couplage chimiosmotique de la formation d'ATP (le fonctionnement détaillé de la chaîne respiratoire n'est pas demandé). Placer l'intervention de la bactériorhodopsine dans ce schéma.
- 2.2. Dans les mers, les estuaires et les zones côtières à forte teneur en sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), et dans les zones d'activité volcanique à forte teneur en soufre élément ( $\text{S}^0$ ), les archaebactéries réalisent selon les disponibilités en substrat carboné et en oxygène :

• la réduction dissimilatrice des sulfates ou du soufre en sulfure ( $\text{S}^{2-}$ )

- en présence de substrats organiques comme le lactate

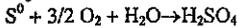
le bilan métabolique est :



- en absence de substrat organique, ces bactéries utilisent le  $\text{CO}_2$  et tirent leur énergie de la réaction bilan :



• l'oxydation dissimilatrice du soufre en sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ )



(cas C)

Dans ce cas, elles poussent sur carbone organique ou minéral, et en anaérobiose, l'oxygène peut être remplacé par le fer ferrique ou les nitrates.

La production d'ATP se réalise, pour ces trois exemples, par un mécanisme chimiosmotique.

- ♦ Pour chacun de ces trois modes de vie (A, B et C), indiquer sous forme d'un tableau le donneur d'électron, l'accepteur d'électron, la nature de la molécule source de carbone, les types trophiques vis à vis du carbone et de l'énergie.

### 3. LA PRODUCTION D'ENZYMES D'ARCHAEBACTERIES (45 points)

#### 3.1. La thermostabilité des enzymes

3.1.1. La thermostabilité des enzymes des archaebactéries suscite l'intérêt des industriels.

- ♦ Représenter la courbe décrivant la variation de l'activité d'une enzyme en fonction de la température. Justifier son allure.
- ♦ Proposer le principe d'une méthode permettant d'étudier la vitesse de dénaturation d'une enzyme à température élevée (par exemple 70°C).  
Si on considère que la cinétique d'inactivation est d'ordre 1 par rapport à l'enzyme, comment peut-on calculer :
  - la constante de vitesse de la réaction d'inactivation,  $k_m$  ?
  - le temps de demi-vie de l'enzyme exposée à 70°C,  $t_{1/2}$  ?

3.1.2. Certaines méthodes d'immobilisation des enzymes permettent également d'augmenter leur thermostabilité.

Citer les méthodes d'immobilisation les plus aptes à cette thermostabilisation ; proposer une explication à ce gain de stabilité.

#### 3.2. L'intervention du génie génétique

Du fait de leurs exigences très particulières, la culture des archaebactéries se prête difficilement à une production de masse. C'est pourquoi, une fois identifié, le gène codant l'enzyme d'intérêt est cloné chez une eubactérie, *Escherichia coli* généralement, dans un vecteur d'expression. Dans une première étape, on peut utiliser pour le clonage un système vecteur plasmidique/bactérie hôte permettant une sélection basée sur la complémentation  $\alpha$ -lacZ.

- ♦ Donner le principe de cette sélection en faisant appel au fonctionnement de l'opéron lactose et à la composition du milieu utilisé.

#### 3.3. Production d'enzymes par génie fermentaire

Les fortes concentrations en glucide orientent le métabolisme d'*E.coli* vers la voie fermentative (effet Crabtree). Le quotient respiratoire QR (% de  $\text{CO}_2$  produit / % de  $\text{O}_2$  consommé) est supérieur à 1. L'optimisation de la production d'enzyme par une souche d'*E.coli* transformée a conduit à l'installation d'un fermenteur de type "batch alimenté" (fed-batch) en lactose.

### 3.3.1. Intérêt du fed-batch par rapport au batch

- ◆ Définir le rendement global de conversion du substrat en biomasse.
- ◆ Relier chaque terme de ce rapport au métabolisme du glucose en proposant un schéma succinct des voies métaboliques empruntées.
- ◆ Quelle est la différence entre une installation de type " batch " et de type " batch " alimenté ?
- ◆ Dédire des réponses précédentes pourquoi le "batch" alimenté permet d'améliorer le rendement de conversion du substrat en biomasse et pourquoi la productivité volumique horaire en enzyme est améliorée.

### 3.3.2. Description du fermenteur

- ◆ Décrire les différents éléments d'une boucle de régulation de la concentration en  $O_2$  dissous dans un milieu de culture ; préciser la fonction de ces éléments.
- ◆ La présence d'un dispositif d'aération est indispensable : pourquoi ?

## 4. LES ADN POLYMÉRASES THERMOSTABLES ET LEURS APPLICATIONS (20 points)

Les ADN polymérases thermostables, dont fait partie la Taq polymérase, sont des enzymes de bactéries hyperthermophiles très utilisées au laboratoire. Leur utilisation a grandement contribué à la généralisation de la technologie d'amplification en chaîne par polymérase (ACP ou PCR).

### 4.1. Les cycles de la PCR

Un cycle d'amplification comporte trois étapes successives : la dénaturation, l'amorçage et l'élongation.

- ◆ Indiquer avec précision les éléments et les conditions opératoires propres à chaque étape. Relier les événements qui se produisent aux propriétés physicochimiques de l'ADN.

### 4.2. L'automatisation de la PCR

- ◆ Dégager l'intérêt de l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable dans la technologie PCR.

## PROPOSITION DE CORRIGE

Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

1.1 - Les  $\beta$ -lactamines sont des analogues structuraux d'un intermédiaire de la synthèse du peptidoglycane (le dipéptide DAla - DAla). Elles inhibent donc la transpeptidation. Dans la pseudomuréine, la LAla est présente, donc la transpeptidase n'est pas inhibée.

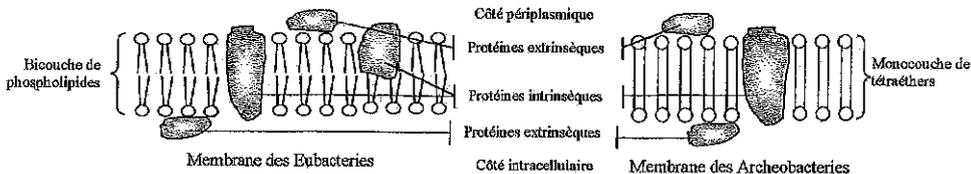
- Le lysozyme hydrolyse la liaison  $\beta$ -1-4 osidique entre NAG et NAM. Or, dans la pseudomuréine, les liaisons sont des  $\beta$ -1-3 osidiques entre l'acide Nacétylalosaminuronique et NAG : il n'y a pas d'action du lysozyme.

1.2

Analogies : deux extrémités hydrophiles et chaînes hydrophobes internes

Différences : bicouche « soudée », liaisons éther et non ester, acides gras ramifiés et saturés

Structure très rigide à température ordinaire mais fluide à température élevée à laquelle les membranes « normales » seraient désorganisées.



1.3.1 A basse température l'ADN est sous forme double brin, stabilisé par des liaisons hydrogènes.

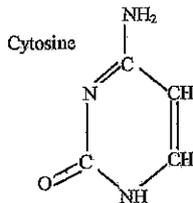
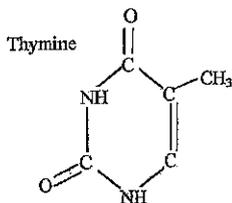
L'augmentation de température provoque la rupture des liaisons hydrogènes, donc la fusion, l'ADN devient monocaténaire.

Tm ou Tf : température de fusion ou demi-dénaturation. Plus Tm est élevée, plus l'ADN est stable.

L'augmentation du GC% provoque l'augmentation du Tm car il y a 3 liaisons H entre G et C (2 entre A et T)

1.3.2 Un GC % élevé, des bases modifiées provoquant une augmentation des liaisons de stabilisation interchaîne, la formation d'un « pseudonucléosome » par l'enroulement de l'ADN sur des protéines qui le stabilisent.

1.3.3



C — désamination  $\rightarrow$  U

U s'apparie avec A lors de la 1<sup>ère</sup> réplication, et il y a transition C $\equiv$ G / T=A lors de la 2<sup>ème</sup> réplication, ce qui provoque la modification du codon et une mutation faux-sens possible.

Remarque : la présence de U dans l'ADN est anormale, elle est reconnue par un système de réparation et ceci peut se faire avec ou sans erreur.

2.1

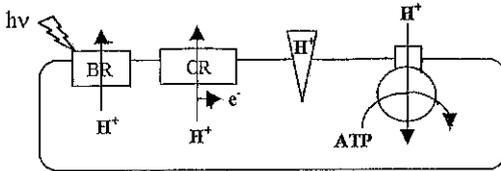
La chaîne respiratoire (CR) provoque une sortie active de protons, à condition que O<sub>2</sub> soit disponible.

L'imperméabilité de la membrane aux protons maintient un gradient de protons.

L'ATP synthétase est orientée : l'entrée passive de protons s'accompagne de la synthèse d'ATP.

La bactériorhodopsine (BR) est activée par la lumière qu'elle absorbe, elle assure le transport actif de protons vers l'extérieur de la cellule et participe donc à la création du gradient de protons.

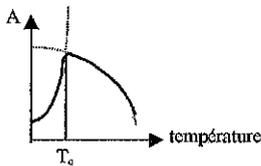
D'où le schéma page suivante :



## 2.2.

	Cas A	Cas B	Cas C
Donneur d'électrons	lactate	H <sub>2</sub>	S <sup>0</sup>
Accepteur d'électrons	sulfate	sulfate	O <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Fe <sup>3+</sup>
Source de carbone	lactate	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> ou C organique
Type trophique / source d'énergie	chimioorganotrophe	chimiolithotrophe	chimio-litho ou -organo-trophe
Type trophique / source de carbone	hétérotrophe	autotrophe	Auto ou hétérotrophe

### 3.1.1



Courbe de dénaturation thermique :

- augmentation de A : loi d'Arrhénius, agitation moléculaire
- diminution de A : dénaturation des molécules d'enzyme (protéines)

Méthode de mesure de la vitesse de dénaturation :

- dénaturation à une T°C fixée pendant des temps différents
- arrêt dans la glace
- mesure de l'activité résiduelle de l'enzyme à cette température

Les activités catalytiques (CAC) sont obtenues par la détermination des V<sub>i</sub> en conditions saturantes.

Si E d désigne la concentration en enzyme, la loi de dénaturation thermique est écrite :  $dE/dt = k_{in} E$ , soit  $\ln E = -k_{in} \cdot t + \text{constante}$ , et pour  $t=0$ , constante =  $\ln E_0$

La détermination de k<sub>in</sub> est obtenue en calculant la pente de la droite  $\ln E = f(t)$

Pour  $t = t_{1/2}$  on a  $E = E_0/2$ , soit  $\ln E = \ln E_0 - \ln 2 = -k_{in} \cdot t_{1/2} + \ln E_0$ , soit  $t_{1/2} = (\ln 2) / k_{in}$ .

3.1.2 - Réticulation ou fixation sur support insoluble par des liaisons covalentes stables : rigidification de la structure

- Inclusion dans des gels résistants à la température : pas de liaisons covalentes mais blocage de la structure spatiale

3.2 - La souche : (Δlac : peptide α seul et donc βgalactosidase inactive) et sensible à l'antibiotique qui permettra la sélection des clones bactériens après transformation

- Le plasmide : lac Z' (peptide α seul : βgal inactive) possédant un site multiple de clonage et un gène de résistance à l'antibiotique de sélection

D'où les situations suivantes :

- vecteur non recombiné : il y a complémentation α - α, la β galactosidase devient active, donc il y a hydrolyse du X-gal, substrat chromogénique incolore contenu dans la gélose : le clone est bleu, cette couleur est due au produit d'hydrolyse (chromophore) qui ne diffuse pas à l'extérieur de la cellule bactérienne
- vecteur recombiné : l'insert est dans lac Z', il n'y a pas de complémentation, la β galactosidase reste inactive donc il n'y a pas d'hydrolyse du X-gal : le clone est blanc

Le milieu doit contenir : X-gal (substrat de la β galactosidase)

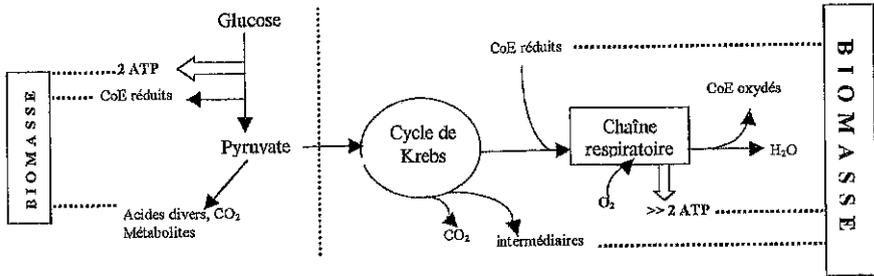
Antibiotique (sélection des transformants)

IPTG (inducteur) : si la souche et/ou le vecteur est/sont inducible(s), sa présence dans le milieu est indispensable à l'expression des gènes intervenant

Remarque : si souche et vecteur constitutifs l'IPTG n'est pas nécessaire

### 3.3.1

- Rendement global :  $Y_{F/S} = \Delta X / \Delta S = (X_f - X_0) / (S_0 - S_f)$  avec X : biomasse et S : substrat
- Voir le schéma page suivante



- **Batch** (culture en « milieu non renouvelé ») : la totalité des substrats est disponible au départ de la culture
- **Fed batch** : le(s) substrat(s) est(sont) ajouté(s) progressivement (parfois de manière exponentielle selon la croissance de la biomasse présente) : il est nécessaire de disposer d'une pompe d'alimentation et d'une réserve de milieu stérile, le volume initial de milieu (« pied de cuve ») est plus petit
  - lors du fed batch : introduction contrôlée de substrat à faible concentration résiduelle d'où l'absence de limitation par le substrat, et le métabolisme est oxydatif : le rendement énergétique est fort donc le rendement de croissance par rapport au glucide aussi
  - L'enzyme est produit par les corps cellulaires, donc la productivité volumique horaire en enzyme ( $\Delta \text{enzyme total produit} / \Delta t \text{ total}$ ) est proportionnelle à  $\Delta X / \Delta t$ .

### 3.3.2

- Le capteur : sonde (électrode) à O<sub>2</sub> qui mesure le pourcentage de saturation en O<sub>2</sub> du milieu
- Le régulateur : compare la mesure à la valeur de consigne et ajuste la commande de l'effecteur
- L'effecteur est une électrovanne (pour l'admission de l'air comprimé ou pour enrichir le milieu en O<sub>2</sub>) ou le moteur d'agitation, il y a différentes possibilités de régulation pour augmenter la capacité de transfert d'O<sub>2</sub> :
  - 1) réguler à débit d'air constant par augmentation de la vitesse d'agitation (inconvenient : ceci augmente le cisaillement, donc le stress cellulaire)
  - 2) réguler à vitesse constante par l'ouverture de l'électrovanne d'air, ce qui augmente le débit d'air entrant (inconvenient : risque de moussage et donc de débordement et d'engorgement du filtre de sortie)
  - 3) réguler à vitesse et à débit d'air constant par l'enrichissement en O<sub>2</sub> de l'air : l'électrovanne admet du dioxygène pur, ce qui augmente le gradient de dioxygène, et donc le transfert global (inconvenient : risque de stress oxydatif sur les cellules)

*Remarque : une régulation « en cascade » est possible, c'est-à-dire que si la concentration en dioxygène dissous mesurée est inférieure au point de consigne, le régulateur augmente d'abord, par exemple, le débit d'air, puis la vitesse d'agitation, puis l'apport en dioxygène pur.*

Le procédé nécessite l'obtention d'un maximum de biomasse, donc l'apport en dioxygène doit être non limitant.

#### 4.1 - 1 : dénaturation

- ADN cible bicaténaire  $\longrightarrow$  ADN monocaténaire par rupture des liaisons H
- Température  $\gg$  T<sub>f</sub> de l'ADN cible (ex : 95°C)

#### - 2 : Amorçage :

- Hybridation sur ADN monocaténaire
- 2 amorces qui encadrent la région à amplifier (taille 15 à 30 bases pour éviter les hybridations non spécifiques) et sont spécifiques des séquences qui la bordent
- choix : pas d'hybridation inter et intra-amorces, donc les amorces ont des T<sub>m</sub> proches
- T hybridation < T<sub>m</sub> la plus basse et comprise entre 45 et 55°C
- Amorces apportées en excès dans le mélange réactionnel, car elles sont consommées

#### - 3 : Elongation :

- 3'OH libre, sens 5'  $\longrightarrow$  3', dNTP, Taq polymérase
- création de liaisons phosphodiester, nucléotides complémentaires
- Température optimale : 72°C pour la Taq

4.2 La Taq est thermostable et donc « résiste » à la température de fusion : l'addition d'enzyme entre les cycles n'est pas nécessaire.

L'usage d'un dictionnaire anglais-français et d'une calculatrice est autorisé.

Deux feuilles de papier millimétré.

## LA PROLIFÉRATION ESTIVALE DU PLANCTON TOXIQUE

Depuis le début du siècle, des empoisonnements mortels, rares heureusement, ont pu être attribués à des coquillages tels que des moules, des huîtres et palourdes, contaminés par des micro-algues unicellulaires eucaryotes planctoniques marines appartenant à la classe des *Dinophyceae*.

En effet, ces coquillages « filtreurs » ont la capacité de concentrer ces cellules (et donc les toxines que celles-ci produisent) dans leur tube digestif : leur consommation par des vacanciers se traduit par des diarrhées ou des syndromes plus graves de paralysie neuro-musculaire.

Dans les deux cas, des toxines ont été isolées, puis identifiées : toxines « DSP » (diarrhetic shellfish poison) et « PSP » (paralytic shellfish poison) respectivement.

Selon les cas, les genres responsables (*Dinophysis*, *Gyrodinium*, *Alexandrium*) synthétisent des endotoxines ou des exotoxines, dont les effets peuvent aller de la simple démangeaison cutanée lors d'un bain jusqu'à la nécrose fulminante du foie.

### 1. - PRODUCTION DE MATÉRIEL D'ÉTUDE AU LABORATOIRE (30 points)

Un réseau national de surveillance des eaux a été mis en place en 1984 par l'IFREMER, afin d'assurer le comptage mensuel des algues planctoniques : le seuil d'alerte pour *Dinophysis* est de 200 cellules par litre d'eau, comptées dans une boîte de Pétri, contenant 20 mL d'échantillon, posée sur un microscope inversé.

L'identification est menée par microscopie électronique à balayage par comparaison de clichés avec des schémas de référence (**document 1**).

- 1.1. À partir de combien de microalgues dénombrées sur une boîte y a-t-il alerte ?
- 1.2. À l'aide des schémas figurant dans le **document 1**, identifier le microorganisme présenté sur la photographie. Justifier la réponse par une courte argumentation..

Les études menées par l'IFREMER portent notamment sur la mise au point de techniques de plus en plus sensibles permettant la détection des microalgues et des toxines produites dans les eaux et les coquillages suspects.

La culture de ces microalgues au laboratoire dans un milieu minéral contenant du glucose à 2,5 mg/L, telle que la présente le **document 2**, est donc une étape obligée de cette démarche. Elle donne des résultats variables selon les genres étudiés.

- 1.3. Proposer les légendes 1 à 4 du **document 2**.
- 1.4. Justifier le choix du mobile d'agitation.
- 1.5. De quel type de procédé de culture s'agit-il ? Justifier la réponse.

Le tableau du **document 3** et la courbe du **document 4** présentent les résultats du suivi d'une production de microalgue dans 1 litre de milieu minéral contenant du glucose. Il s'agit d'études au laboratoire destinées à déterminer les conditions d'obtention d'une productivité optimale.

- 1.6. Définir le taux de dilution. Après avoir délimité dans le temps les 5 phases de l'expérience, calculer les taux de dilution D appliqués correspondants.
- 1.7. Donner la définition d'un régime stationnaire. Dédire de la question 1.6 les valeurs des vitesses spécifiques de croissance de la souche lors des différents régimes stationnaires.
- 1.8. Estimer graphiquement, sur le document 4, les valeurs de biomasse X lors des 5 régimes stationnaires.
- 1.9. En déduire les productivités volumiques horaires D.X correspondantes et tracer, sur papier millimétré, l'évolution de celles-ci en fonction du taux de dilution D.
- 1.10. Estimer graphiquement la valeur du taux de dilution optimal. Justifier la réponse.

## 2. - ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE DE L'ALGUE *DINOPHYSIS* (20 points)

L'étude de la microalgue *Dinophysis* a montré qu'elle produisait de nombreuses substances antigéniques en particulier la toxine libérée dans le milieu extérieur et certaines glycoprotéines de surface dont deux apparaissent particulièrement intéressantes : la protéine DM 31m qui est apparue fortement immunogène et susceptible d'entraîner des réponses humorales et cellulaires et la protéine DI 5p dont la présence, chez certaines espèces, pourrait faciliter l'identification (en effet le genre *Dinophysis* comprend près de 200 espèces de caractéristiques voisines).

Pour obtenir un sérum capable de réagir avec la toxine, on réalise, chez un lot de souris, des injections répétées de toxine, traitée chimiquement, à intervalle de 1 mois, et on prélève le sérum des animaux 15 jours après chaque injection (IS1).

- 2.1. Afin d'étudier la production d'IgM au cours de la réponse on purifie les IgM à partir du sérum obtenu au premier prélèvement.  
La purification conduit à une première fraction F1 qui est à nouveau purifiée pour donner la fraction F2.
  - 2.1.1. Dans le document 5, on étudie le sérum initial (IS1) non dilué (réservoir a) ou dilué (réservoir b) et les fractions F1 (réservoir c) et F2 (réservoir d) par une technique d'immunoélectrophorèse en utilisant différents immunsérums spécifiques : sérum anti-sérum de souris total (gouttière 1), sérum anti-IgM de souris (gouttière 2) et sérum anti-Ig (IgG, IgA, IgM) (gouttière 3).  
Interpréter les résultats obtenus.
  - 2.1.2. Dans ce type d'électrophorèse, qu'appelle-t-on courant d'électroendosmose ?
- 2.2. On envisage l'utilisation d'un test d'immunofluorescence direct pour détecter *Dinophysis* dans un prélèvement d'eau de mer et pour repérer les espèces possédant l'antigène DI 5p (formes DI+) et/ou l'antigène DM 31m (formes DM+) On dispose de deux sérums spécifiques (anti-DM 31m et anti-DI 5p) non marqués et de différents fluorochromes (Hoechst 33342, FITC, Phycocérythrine, et allophycocyanine) qui peuvent être utilisés pour marquer les anticorps.  
Les spectres d'excitation et d'émission de ces fluorochromes sont fournis dans le document 6.

D'autre part le microscope utilisé pour la lecture doit être équipé d'un filtre d'excitation et d'un filtre d'arrêt qui peuvent être choisis dans la gamme suivante (bande passante indiquée en nm) :

BG 1 : 400 - 450.	BG 3 : 500 - 650.	BG 5 : 550 - 570.
BG 2 : 460 - 500.	BG 4 : 510 - 560.	BG 6 : 560 - 650.

- 2.2.1. Rappeler les rôles des filtres d'excitation et d'arrêt dans un microscope à fluorescence.

- 2.2.2. Quels fluorochromes est-il judicieux d'utiliser pour marquer les sérums spécifiques afin de déterminer les différentes catégories de cellules par une seule observation de la lame ? Justifier.

Quelle combinaison de filtres (excitation et arrêt) doit-on utiliser ?

- 2.2.3. Préciser comment apparaîtront, dans ces conditions, les différentes microalgues éventuellement présentes.

3. - **DÉTECTION DES MICROALGUES PLANCTONIQUES PAR LA TECHNIQUE DE PRINS (PRIMED IN SITU LABELING)** (30 points)

La technique de PRINS est une méthode cytogénétique de fluorescence qui permet d'identifier directement un organisme dans une préparation. Elle utilise l'hybridation d'oligosondes et la synthèse in situ d'amplimères conjugués à des fluorophores. La détection au microscope à fluorescence d'un organisme pathogène par cette méthode impose les recherches préliminaires suivantes :

- La sélection des séquences d'ADN spécifiques de l'organisme dans une banque.
- Le séquençage des séquences sélectionnées.
- La synthèse des amorces utilisées dans la technique de PRINS.

3.1. **Établissement d'une banque d'ADN génomique**

Les documents 7 et 8 décrivent la stratégie développée pour réaliser la banque d'ADN génomique d'une dinoflagellée toxique.

- 3.1.1. Quel est l'intérêt d'utiliser un vecteur phagique pour construire une bibliothèque génomique ?
- 3.1.2. L'ADN du vecteur doit être digéré par une enzyme de restriction. Quelle est cette enzyme ? Justifier la réponse.
- 3.1.3. Comment les clones infectés par le bactériophage recombiné apparaissent-ils ? Justifier.

3.2. **Séquençage enzymatique cyclique de type SANGER**

Le séquençage par thermocyclage est une méthode qui exploite l'enzyme Taq polymérase et le marquage des fragments d'extension en 5'. Un laser et une caméra permettent la détection d'amorces fluorescentes différentes. L'électrophorèse capillaire et la détection par fluorescence réalisent un séquençage très performant évalué à 200 bases/heure avec une sensibilité inférieure à 20 femtomoles.

- 3.2.1. Donner le principe du séquençage par la méthode de SANGER. Justifier l'emploi d'une amorce, de didéoxynucléotides (ddNTP) et d'un fragment monobrin.
- 3.2.2. Quels avantages apporte la réalisation du séquençage à haute température ?
- 3.2.3. Donner le principe de fractionnement électrophorétique des oligonucléotides.

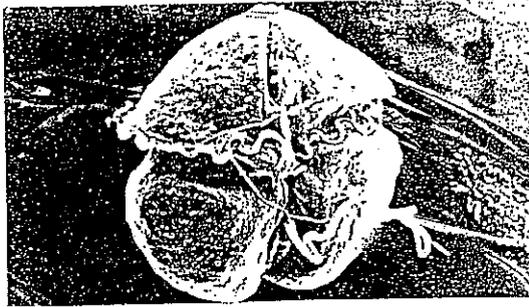
3.3. **Identification cytogénétique par la méthode PRINS**

Dans cette méthode sont utilisées de courtes amorces d'oligonucléotides de synthèse qui, une fois appariées in situ à leurs séquences complémentaires sur l'ADN cible vont servir à une réaction d'élongation. La visualisation des amplimères est engendrée par l'incorporation in situ de nucléotides conjugués fluorescents (document 9). L'efficacité est élevée pour la détection des séquences répétées (séquences canoniques ou consensus, télomériques et centromériques).

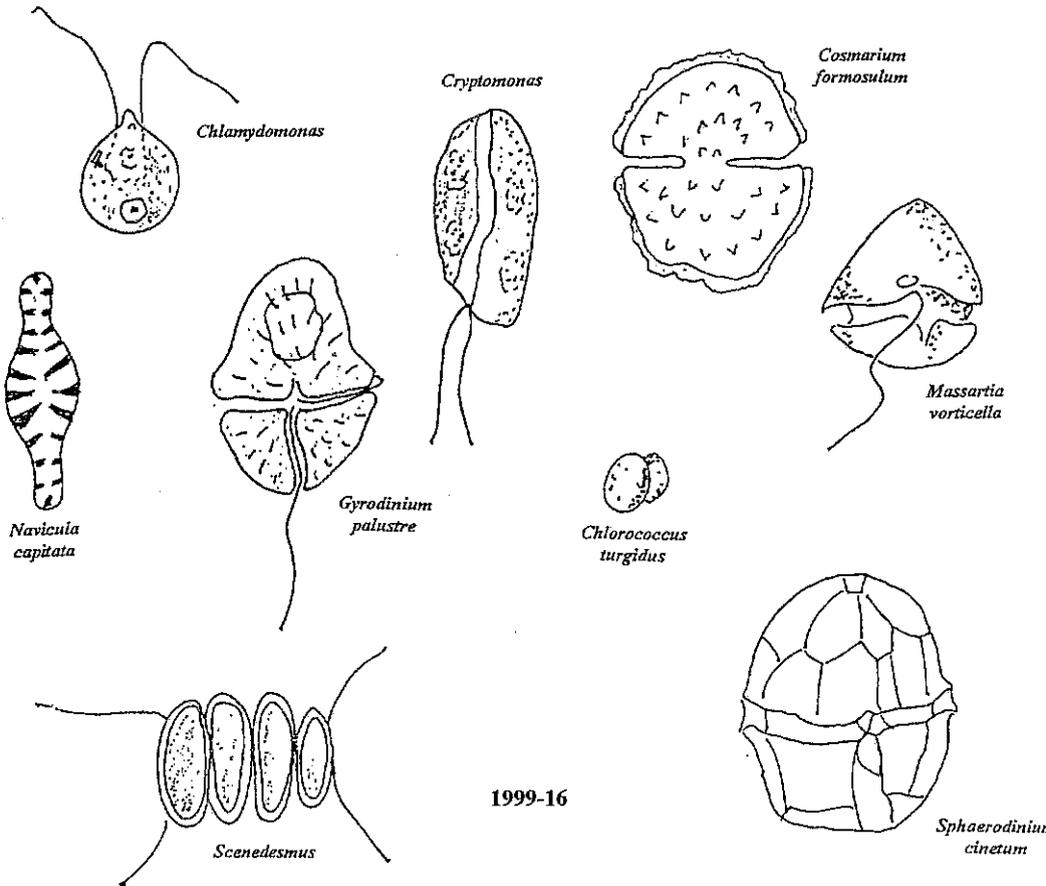
3.3.1. Définir les termes : télomère, centromère et séquence consensus.

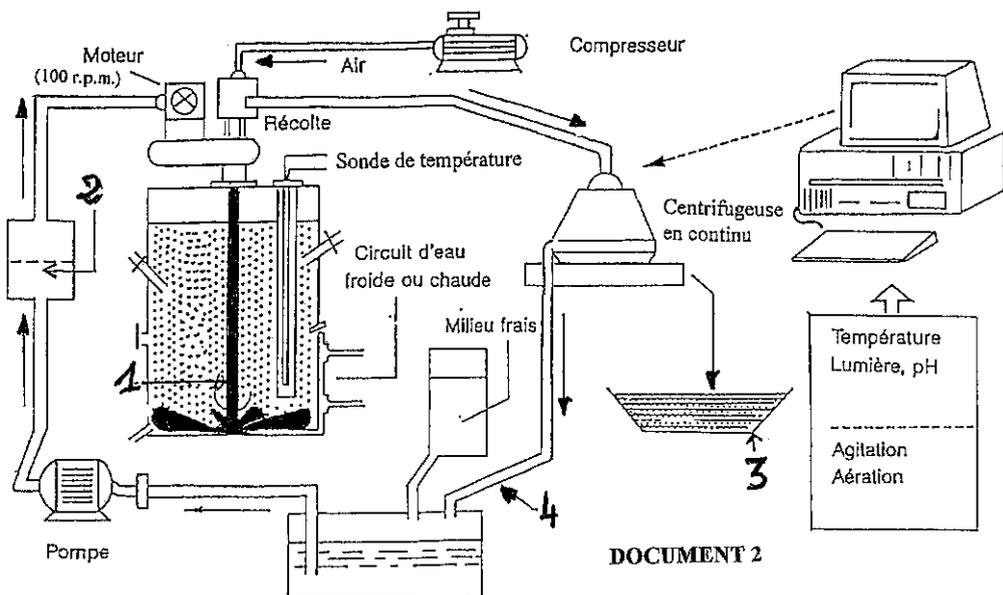
3.3.2. Reproduire deux champs observés au microscope de fluorescence, l'un contenant deux chromosomes interphasiques (G1), l'autre les chromosomes métaphasiques marqués.  
Annoter et commenter les dessins.

### DOCUMENT 1



Photographie : microscope électronique à balayage



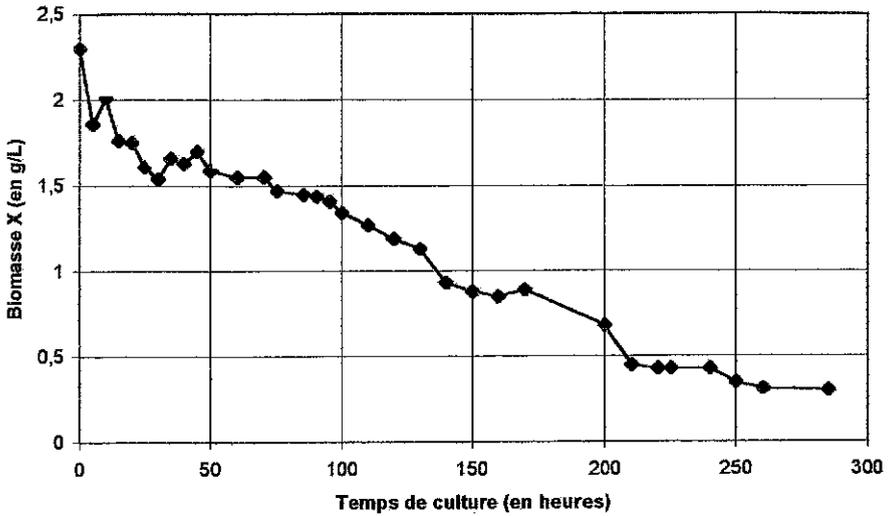


**DOCUMENT 3**

N°	TEMPS DE CULTURE (heures)	BIOMASSE X (g/L)	DEBIT D'ALIMENTATION (ml/h)
1	0	2,3	0,77
2	5	1,86	0,77
3	10	2,01	0,77
4	15	1,76	0,77
5	20	1,75	0,77
6	25	1,61	0,77
7	30	1,54	0,77
8	35	1,66	0,77
9	40	1,63	0,77
10	45	1,7	0,77
11	50	1,59	1,15
12	60	1,55	1,15
13	70	1,55	1,15
14	75	1,47	1,15
15	85	1,45	1,15
16	90	1,44	1,58
17	95	1,41	1,58
18	100	1,34	1,58
19	110	1,27	1,58
20	120	1,19	1,58
21	130	1,13	1,58
22	140	0,93	1,58
23	150	0,88	1,58
24	160	0,85	1,765
25	170	0,89	1,765
26	200	0,68	1,765
27	210	0,45	1,765
28	220	0,43	1,765
29	225	0,43	1,765
30	240	0,43	2,14
31	250	0,35	2,14
32	260	0,31	2,14
33	285	0,3	2,14

DOCUMENT 4

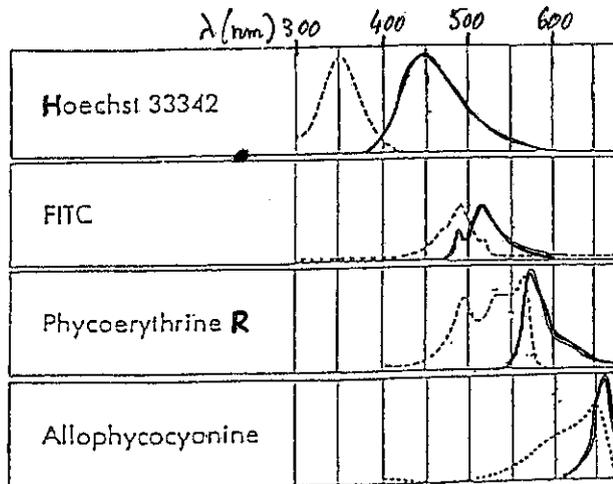
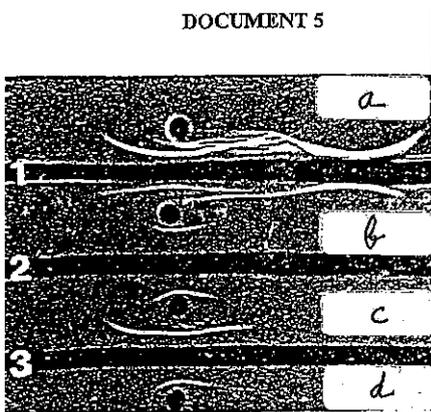
Production de biomasse par *Dinophysis*



DOCUMENT 6

Spectres d'excitation (---) et d'émission (—) des principaux fluorochromes utilisés

DOCUMENT 5

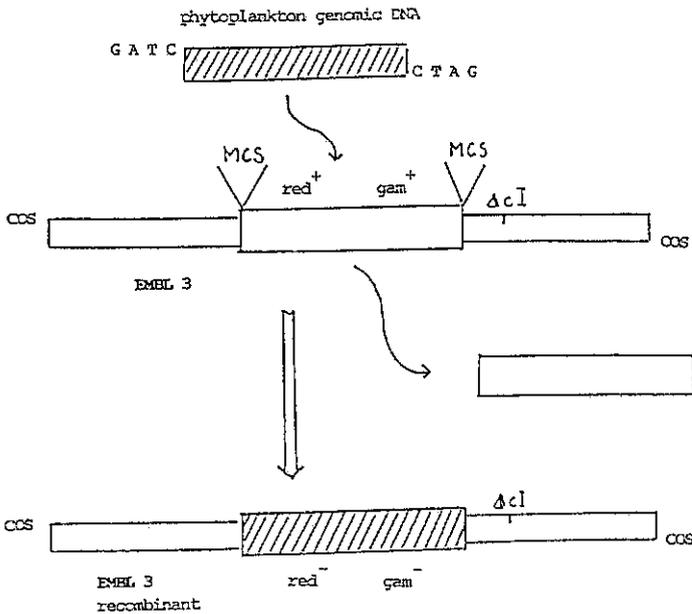


# DOCUMENT 7

## Lambda EMBL 3

The primary use of lambda cloning vectors is in constructing recombinant DNA libraries for isolation of clones. There are two primary types of lambda cloning vectors in common use : Insertion vectors and replacement vectors. Because of the geometry of the lambda head, the length of the recombinant lambda genome must be between about 38 and 52 Kbp. If the lambda genome is too long, it cannot be packaged. If too little DNA is packaged the lambda head collapses. A lambda replacement vector is  $\lambda$  EMBL 3, which stands for (1) the European Molecular Biology Laboratories where the vector originated. The EMBL 3 can package cloned inserts of 9 to 22 kilobase pairs. The vector has two multiple cloning sites (MCS) which contain *Sal*I, *Bam*HI, *Eco*RI and three significant phage genes that can run on the cloning strategy. The  $\lambda$  EMBL 3 is *cI* or  $\Delta cI$ , so it cannot form lysogens ; *red*<sup>+</sup> and *gam*<sup>+</sup> these two lambda genes which are not essential for bacteriophage growth can be deleted and inserts replace the *red*<sup>+</sup> and *gam*<sup>+</sup> genes, making recombinants *red*<sup>-</sup> *gam*<sup>-</sup>. The lambda phage that are *gam*<sup>+</sup> do not form plaques by infection of the *Escherichia coli* strains carrying a bacteriophage P2 lysogene. But the *gam*<sup>-</sup> phage are no longer sensitive to P2 interference and will form plaques on *E. coli* (P2 lysogen).

(1) to stand for = to represent, to mean.



Restriction  
endonuclease

*Sau* 3A  
*Sal* I  
*Eco* RI  
*Bam* HI

recognition  
sequence

G A T C  
G T C G A C  
G A A T T C  
G G A T C C

5' protruding ends

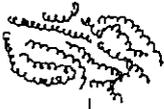
G A T C  
T C G A C  
A A T T C  
G A T C

DOCUMENT 8

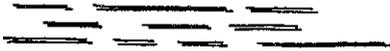
microalgae



lyse cells and extract  
from genomic DNA

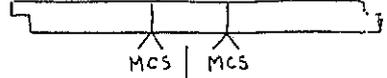


DNA is partially digested with  
the restriction endonuclease  
Sau 3AI

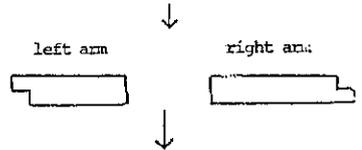


DNA vector

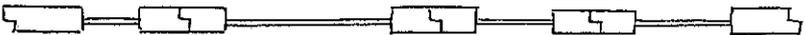
The order of restriction sites in the left  
polycoding site is SalI/BamHI/Eco RI and  
the order in the right polycoding site is  
Eco RI/BamHI/SalI.



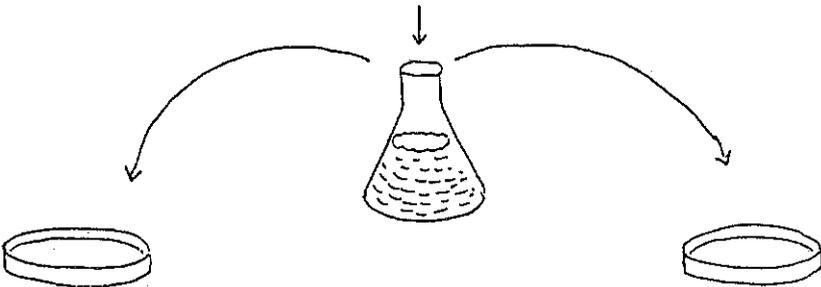
Digestion of vector DNA with an  
appropriate restriction enzyme



purification of bacteriophage  
Lambda arms



After ligation, the steps in the packaging process are the recognition of  
the COS sites on concatenated bacteriophage DNA and the insertion of re-  
combinant genomic into prehead. the packaging process then leads to the  
production of an infectious EMBL particle.



DOCUMENT 9

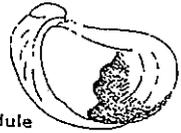
organismes filtreurs exemples:  
les bivalves ou lamellibranches



Pétoncle ou peigne  
*Chlamys varia*



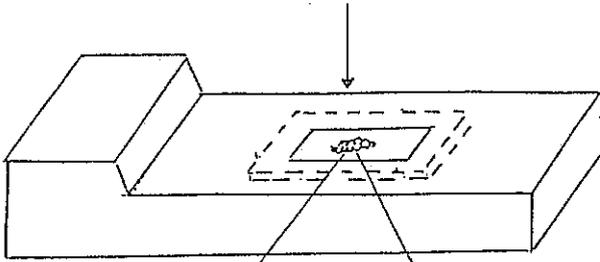
Bigorneau  
*Littorina littorea*



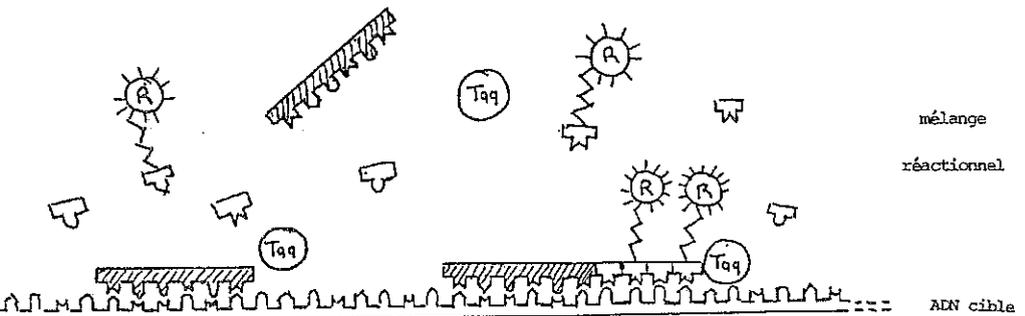
Crépidule  
*Crepidula fornicata*

prélèvement par le siphon inhalant du  
mucus fixateur des microorganismes

thermocycleur



PCR in situ



mélange  
réactionnel

ADN cible

mélange d'amorces s'hybridant avec  
les séquences répétitives téloméri-  
ques et centromériques

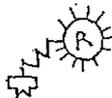
nucléotides triphosphates

rhodamine

dUTP conjugué



Taq ADN polymérase 1999-21

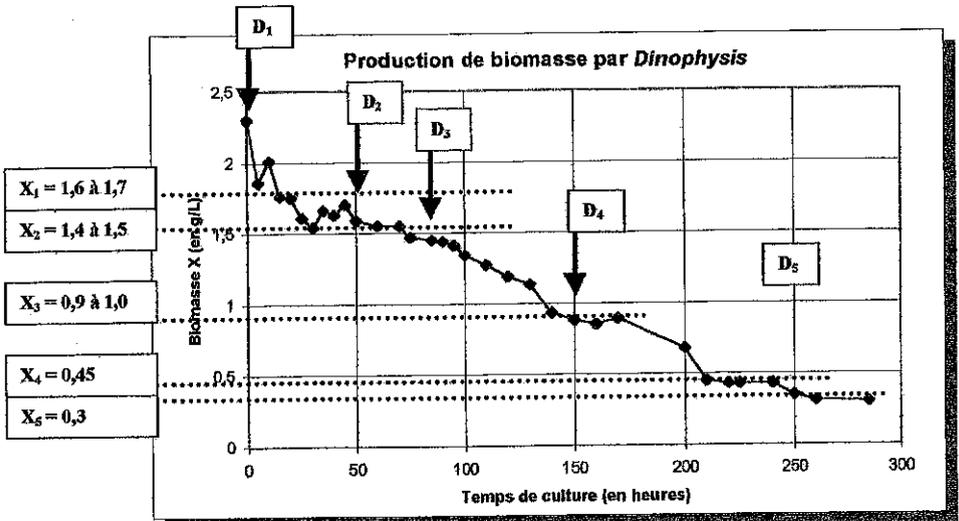


## PROPOSITION DE CORRIGE

**Avertissement important :** l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

- 1.1. Le seuil d'alerte est de  $200 \times 0,020 = 4$  cellules pour une boîte contenant 20 mL d'échantillon.
- 1.2. Le document 1 montre une cellule marquée profondément par un sillon horizontal et par un sillon vertical, dans lesquels on distingue le gros flagelle : il s'agit donc de *Gyrodinium palustre*.
- 1.3. 1 = axe d'agitation du bioréacteur      2 = cartouche de microfiltration stérilisante du milieu  
3 = récupération de la biomasse      4 = recirculation du milieu de culture et addition de milieu neuf stérile
- 1.4. Les cellules des micro-algues sont fragiles (car parfois dépourvues de paroi), donc il faut un mobile d'agitation ayant un débit axial pour éviter la sédimentation des cellules au fond du bioréacteur et présentant un faible cisaillement (hélice marine, par exemple).
- 1.5. Les nutriments sont apportés par le milieu « neuf » et il y a soutirage de la culture (avec ensuite récupération de la biomasse). Il s'agit donc d'un procédé de culture continue.
- 1.6. Le taux de dilution  $D$  (exprimé en  $h^{-1}$ ) correspond au taux de renouvellement horaire du milieu de culture dans le bioréacteur.  
 $D = F/V$      $F$  désigne (en  $L \cdot h^{-1}$ ) le débit d'alimentation (égal à celui du soutirage)  
 $V$  est le volume (en L) de culture dans le bioréacteur  

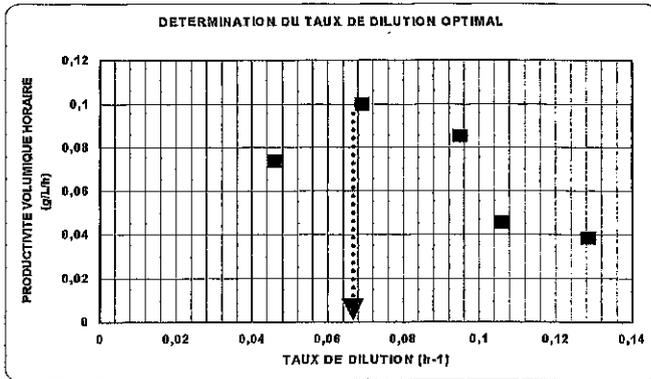
De $t=0$ à $t=45$ h	$D_1 = 0,77 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$= 0,0462 \text{ h}^{-1}$
De $t=50$ à $t=85$ h	$D_2 = 1,15 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$= 0,0690 \text{ h}^{-1}$
De $t=90$ à $t=150$ h	$D_3 = 1,58 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$= 0,0948 \text{ h}^{-1}$
De $t=160$ à $t=225$ h	$D_4 = 1,765 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$= 0,1059 \text{ h}^{-1}$
De $t=240$ à $t=285$ h	$D_5 = 2,14 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$= 0,1284 \text{ h}^{-1}$
- 1.7. Le régime stationnaire est obtenu lorsque le bioréacteur est alimenté en continu : la biomasse apparue par croissance à partir des constituants apportés par l'alimentation en milieu neuf stérile compense la biomasse ôté du bioréacteur par le soutirage. On a alors  $dX/dt = 0$ .  
Or l'équation différentielle de la culture continue s'écrit  $dX/dt = (\mu_x - D) \cdot X$  donc  $\mu_x = D$ . (voir question 1.6)
- 1.8. La lecture graphique permet de déterminer les valeurs de  $X$  (en g/L) en régime stationnaire ( $X$  constant).



1.9. A chaque valeur du taux de dilution D correspond une valeur de X, d'où les productivités volumiques horaires D.X (en g/L/h) :

Pour $D_1 = 0,0462 \text{ h}^{-1}$	$D_1 \cdot X_1 = 0,0739$ à $0,0785$
Pour $D_2 = 0,0690 \text{ h}^{-1}$	$D_2 \cdot X_2 = 0,0966$ à $0,1035$
Pour $D_3 = 0,0948 \text{ h}^{-1}$	$D_3 \cdot X_3 = 0,0853$ à $0,0948$
Pour $D_4 = 0,1059 \text{ h}^{-1}$	$D_4 \cdot X_4 = 0,0477$
Pour $D_5 = 0,1284 \text{ h}^{-1}$	$D_5 \cdot X_5 = 0,0385$

D'où le tracé :



1.10. Le taux de dilution optimal correspond au taux de dilution qui permet d'obtenir la productivité maximale, c'est-à-dire ici environ  $0,07 \text{ h}^{-1}$ .

2.1.1. Réservoir a : plusieurs arcs sont visibles, du fait que le sérum est un mélange antigénique mis en évidence par le sérum antisérum total de souris déposé dans la gouttière 1.

Réservoir b : diminution de l'épaisseur des arcs, du fait du nombre plus faible de molécules présentes, à cause de la dilution. Présence d'IgM dans le sérum, mises en évidence par le sérum anti-IgM déposé dans la gouttière 2.

Réservoir c : présence d'IgM dans la fraction F1, ainsi que d'autres Ig (IgA et/ou IgG) mises en évidence par le sérum anti-IgA/IgG/IgM déposé dans la gouttière 3.

Réservoir d : présence d'IgM dans la fraction F2. La position, près du puits, de l'arc d'IgM traduit une faible concentration de la fraction F2 et/ou une mauvaise migration lors de l'immunoélectrophorèse.

2.1.2. Rétention des anions par interaction avec le support, les cations non retenus se déplacent sous l'effet du champ électrique, ce qui entraîne un déplacement d'eau.

2.2.1. Le filtre d'excitation doit laisser passer les radiations excitatrices, mais arrêter les autres longueurs d'onde.

Le filtre d'arrêt stoppe les radiations excitatrices, mais laisse passer les radiations fluorescentes.

2.2.2. Il y a 2 antigènes (DI 5p et DM 31) à détecter, il faut donc 2 antisérums marqués par 2 fluorochromes différents. Leurs  $\lambda_{\text{excitation}}$  doivent être proches et leurs  $\lambda_{\text{émission}}$  différentes.

• Parmi les fluorochromes proposés dans le document 6, 2 sont inutilisables :

Hoechst 33342, car  $\lambda_{\text{excitation}} < 400 \text{ nm}$ , limite basse du filtre BG 1

Allophycocyanine, car  $\lambda_{\text{émission}} > 650 \text{ nm}$ , limite haute du filtre BG 6

• Couple de fluorochromes choisi : FITC et Phycocérythrine

• Filtre d'excitation : BG 2 car  $\lambda_{\text{excitation}}$  proches de  $490 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} > 500 \text{ nm}$

• Filtre d'émission : BG 3 car  $\lambda_{\text{émission}}$  proches de  $520 \text{ nm}$  pour FITC et de  $575 \text{ nm}$  pour la Phycocérythrine

2.2.3. Pas d'antigène présent : pas de fluorescence, les cellules sont donc invisibles.

1 antigène présent sur les cellules : 1 anticorps marqué sera fixé, donc 1 couleur sera visible

2 antigènes présents sur les cellules : 2 anticorps marqués seront fixés, donc 2 couleurs seront visibles

- 3.1.1. Un vecteur phagique permet d'insérer de gros fragments d'ADN, donc d'obtenir une banque de taille plus petite par diminution du nombre de clones nécessaires.
- 3.1.2. BamHI, puisque son site de coupure est placé dans le SMC (site multiple de clonage) et qu'il permet de former des extrémités cohésives compatibles avec celles de l'insert.
- 3.1.3. Les clones recombinants sont  $gam^-$ , insensibles à l'interférence avec le phage P2 et donnent des plages de lyse. Les allèles  $gam^+$  et  $red^+$  ne sont pas indispensables au cycle lytique.
- 3.2.1. Fixation d'une amorce sur l'ADN monocaténaire pour initier l'action de l'ADN polymérase.  
 Elongation de 5' en 3'.  
 Utilisation de 4 ddXTP avec des marquages par des fluorochromes différents ou placés dans des puits différents.  
 Arrêt aléatoire de l'élongation car absence de fonction -OH en 3'.  
 Séparation électrophorétique sur gel dénaturant, avec une résolution d'une base.  
 Lecture de la séquence du brin complémentaire.
- 3.2.2. On peut réaliser des cycles avec réutilisation de l'amorce, modification de la structure secondaire et augmentation de la longueur.
- 3.2.3. Les oligonucléotides sont chargés négativement et se déplacent vers l'anode (pôle +). La densité de charge (c'est-à-dire le rapport entre la charge électrique et la taille de la molécule) est constante, les molécules sont donc séparées uniquement selon leur taille, les plus petites se déplaçant le plus rapidement.
- 3.3.1. Télomère : séquence d'ADN située aux extrémités des chromosomes.  
 Centromère : point d'union des chromatides.  
 Séquence consensus : hautement conservée, elle est spécifique d'un chromosome, d'une espèce, c'est un signal de reconnaissance moléculaire intervenant comme dans l'activité d'un promoteur ou comme signal d'épissage.

3.3.2.

CHROMOSOME INTERPHASIQUE	CHROMOSOME METAPHASIQUE
	
<p>La fluorescence est observée seulement sur les télomères et le centromère</p>	<p>Lors de la métaphase, l'ensemble du chromosome présente une fluorescence visible (indiquée par les pointillés), accentuée sur les télomères et le centromère</p>

## EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE

1<sup>ère</sup> PARTIE : ETUDE DE PROJET

AUTRES ACADEMIES QUE LILLE/PARIS/VERSAILLES

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

L'usage d'un dictionnaire anglais-fançais et d'une calculatrice est autorisé.

### PRODUCTION DE FRAGMENTS D'ANTICORPS

La technologie des hybridomes permet la production d'anticorps monoclonaux. Il existe une autre technologie dérivée de celle-ci : production de fragments d'anticorps appelés scFV (single chain Fragment Variable). Les gènes des domaines variables réarrangés de la chaîne lourde ( $V_H$ ) et de la chaîne légère ( $V_L$ ) préparés à partir d'une population de lymphocytes B matures sont clonés dans un vecteur d'expression procaryote phagique dérivé du phage M13.

À partir de cette banque de phagemides recombinants, une banque de phages exposant à leur surface un type de paratope d'anticorps est formée.

Les phages spécifiques d'un antigène d'intérêt sont sélectionnés, isolés et amplifiés.

L'infection par les phages d'intérêt conduit à la production d'une forme soluble du fragment d'anticorps appelé scFV. Les scFV sont utilisables comme réactif spécifique d'un antigène pour la plupart des techniques immunologiques.

#### 1. - Assemblage des gènes $V_H$ et $V_L$ : constitution d'une banque de fragments scFV (17 points)

Le document 1 présente les étapes successives pour obtenir un répertoire des différentes combinaisons entre les gènes  $V_H$  et  $V_L$ .

Les gènes  $V_H$  et  $V_L$  sont amplifiés séparément puis mélangés avec un fragment de liaison qui recouvre les deux parties. Ce fragment de liaison (93 paires de bases) code le petit peptide qui lie  $V_H$  et  $V_L$  dans les scFV.

Des cycles de réappariement – dénaturation, suivis de réamplification, génèrent une banque de gènes  $V_H$  et  $V_L$  reliés en phase pour être exprimés.

- 1.1. - Décrire les différentes phases de la technique d'amplification utilisée dans l'étape a du document 1 (PCR à partir d'ADN de rate) sous forme d'un schéma en précisant ce qui se passe aux différentes températures utilisées.
- 1.2. - Quel est l'intérêt de l'étape c ?
- 1.3. - Parallèlement à la manipulation présentée sur le document 1, un témoin est réalisé en absence du fragment de liaison (-L).  
Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % permet de contrôler le résultat de la manipulation (+ L) et du témoin (-L).

Faire un schéma annoté de l'électrophorogramme attendu.

## 2. - Production de fragments d'anticorps par des bactéries (*Escherichia coli* TGI et HB) contenant le phagemide pHEN1 recombinant (30 points)

Lorsqu'on utilise un vecteur de type phagemide pour la production de fragments anticorps, il est nécessaire de mettre en œuvre un phage de complémentation fonctionnelle. Ce dernier apporte les éléments nécessaires aux fonctions de répllication et d'empaquetage.

Le phage de complémentation est aussi appelé phage assistant (phage helper). Dans ce cas précis, il s'agit du phage VCS M13.

- 2.1. Étude de la structure du phagemide pHEN1 : vecteur utilisé pour l'introduction des scFV (document 2).

Le produit d'expression du gène III appelé pIII est une des protéines de capsid du phage. myctag est la séquence « étiquette » traduite en protéine permettant la reconnaissance et la purification de la protéine de fusion.

Donner le rôle des séquences suivantes :

- colE1 ori
- M13 ori
- amp (ampicilline)
- P lacZ (P = promoteur)
- ApaL 1 et Not 1

- 2.2 Rôle de la séquence Ambre (Amber)

pHEN1 peut être utilisé directement pour la production de fragments d'anticorps solubles, car un codon STOP (ambre = TAG) est inséré au niveau de la jonction du gène VL et du gène III.

Quand la production est réalisée avec une souche suppresseur d'*E. coli* (TG1), le produit obtenu fait partie des protéines du phage, tandis que la production réalisée avec une souche non suppresseur de *E. coli* (HB) conduit à la sécrétion de fragments d'anticorps solubles dans le périplasme et par delà, dans le milieu de culture.

Il est précisé qu'un gène dit suppresseur, est un gène qui code un t ARN fixant Glu et ayant subi une mutation qui a pour résultat de changer l'anticodon de t ARN<sup>3'U</sup> en 5' AUC 3'.

Expliquer la nature des produits de l'expression des gènes clonés dans les deux souches de *E.coli* TG1 et HB.

- 2.3. Étude des conditions de culture (document 3).

2.3.1. Donner le mécanisme d'action de l'IPTG

2.3.2. En utilisant le document 3, décrire ce qui se passe dans la cellule bactérienne contenant le phagemide :

- dans la phase d'infection par le phage de complémentation
- dans la phase de production.

- 2.4. Contrôle de la production

Le document 4 présente un protocole de production et de contrôle d'une protéine biosynthétisée par *E. coli* transformée par un plasmide contenant le gène codant pour la protéine.

2.4.1. Donner la signification du sigle SDS.

Quels sont les rôles du SDS et les conséquences sur l'électrophorèse PAGE-SDS ?

2.4.2. Donner rapidement le principe de l'immunotransfert.

### 3. - Étude et utilisation d'un scFV (33 points)

Une banque phagique de fragment d'anticorps scFV est criblée contre le proto-oncogène c-Fos (un facteur de transcription ubiquitaire). Un vecteur pHEN1 recombinant codant un scFV spécifique de c-Fos a été isolé et la protéine correspondante a été préparée sous forme soluble.

#### 3.1. Étude des caractéristiques du peptide myctag – scFV produit

- 3.1.1. Annoter les représentations schématiques comparées d'une molécule d'immunoglobuline G (Ig G) et d'une molécule de scFV proposées dans le document 5.
- 3.1.2. En dehors de l'absence des régions constantes un scFV possède les mêmes propriétés qu'un anticorps monoclonal (AcM).  
Exposer la caractéristique fondamentale commune à un AcM et à un scFV.
- 3.1.3. Proposer sans le détailler un moyen simple et spécifique de détecter le myctag-scFV lors de dosages immuno-enzymologiques.

#### 3.2. Utilisation du peptide myctag-scFV : immunolocalisation de la protéine c-Fos dans des cellules embryonnaires de rat en culture.

Un tapis de cellules subconfluentes est utilisé et soumis au protocole d'immunomarquage décrit dans le document 6.

##### 3.2.1. Analyse du protocole.

- 3.2.1.1. Expliquer brièvement le rôle des 2 premières étapes A et B du protocole.
- 3.2.1.2. Pourquoi est-il préférable de réaliser l'incubation avec l'anticorps fluorescent à l'obscurité (étape E) ?
- 3.2.2. Représenter à l'aide d'un schéma récapitulatif la détection de l'antigène cellulaire c-Fos par cette méthode.
- 3.2.3. Pour toutes les expériences, il est indispensable de réaliser des témoins. Quel témoin négatif doit-on impérativement réaliser pour valider la spécificité du marquage obtenu ?

#### 3.3. Réglage du microscope à fluorescence

##### 3.3.1 Les spectres d'absorption et d'émission du FITC sont représentés sur le document 7.

- 3.3.1.1. Rappeler les caractéristiques d'un fluorochrome.
- 3.3.1.2. À l'aide du document 7, déterminer les longueurs d'ondes utilisées pour l'excitation et l'émission du FITC.
- 3.3.1.3. Le microscope à fluorescence utilisé propose différents types de filtres dont les caractéristiques sont résumées dans le document 8.  
Quel(s) filtre(s) peut-on choisir ? Justifier la réponse.

##### 3.3.2. Les résultats de la manipulation sont représentés dans le document 9. Analyser les résultats et conclure.

## DOCUMENT 1

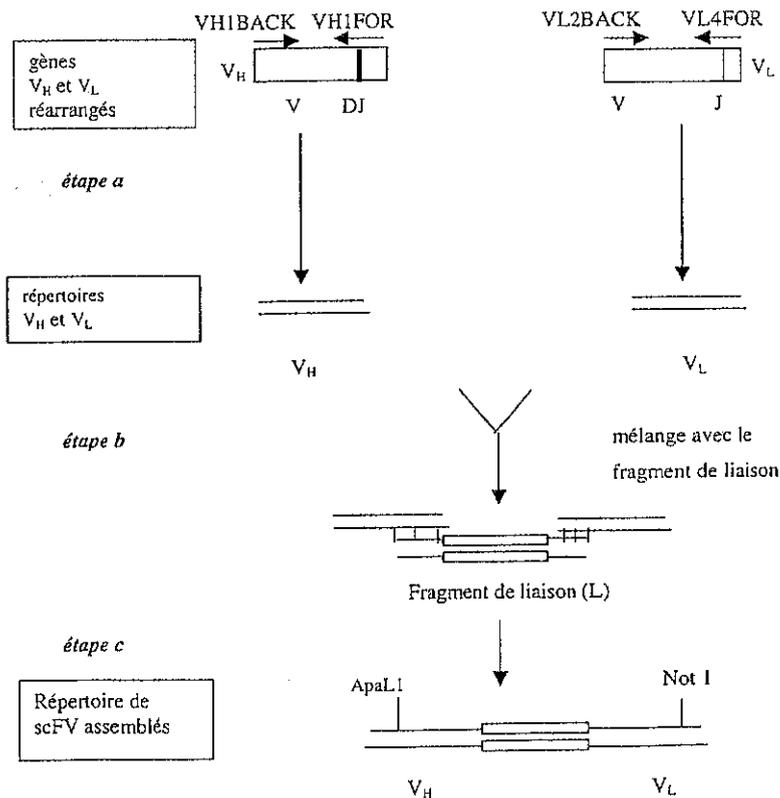
### Méthode :

Pour obtenir les banques de scFV, l'ARN cytoplasmique est isolé d'un pool de rates de souris. Le cDNA est réalisé en utilisant une transcriptase reverse. Les amorces qui encadrent les gènes recherchés sont VH1BACK et VH1FOR d'une part et VL2BACK et VL4FOR d'autre part.

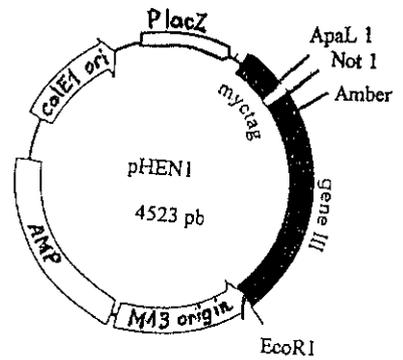
**étape a** : Les répertoires  $V_H$  et  $V_L$  sont amplifiés à partir des cDNA par 25 cycles de PCR (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 2 min)

**étape b** : Après purification sur gel les fragments amplifiés sont mélangés avec 300 ng de fragment de liaison dans 25  $\mu$ L de mélange réactionnel pour PCR sans amorces et subissent 7 cycles (94°C 2 min, 72°C 4 min) pour faire la jonction des fragments puis amplifiés pendant 20 cycles (94°C 1.5 min, 72°C 2.5 min) en utilisant les amorces VH1BACK et VL4FOR.

**étape c** : Finalement les produits obtenus sont purifiés sur gel et ré-amplifiés avec les amorces VH1BACKApaL1 et VL4FORNotI (versions « étiquetées » des amorces d'origine) pour faire apparaître des sites de restriction.



DOCUMENT 2



DOCUMENT 3

In pHEN1 the production of the pIII fusion is under the control of the lacZ promoter which is inhibited with glucose and induced with isopropyl  $\beta$ D thiogalactoside (IPTG) (de Bellis 1990). Because the expression of pIII prevents infection with helper phage, the bacteria harboring the phagmid vectors are grown in the presence of glucose. After infection with helper phage the bacteria are grown in the absence of glucose but with IPTG : sufficient antibody-pIII fusion is produced for packaging into phage.

DOCUMENT 4

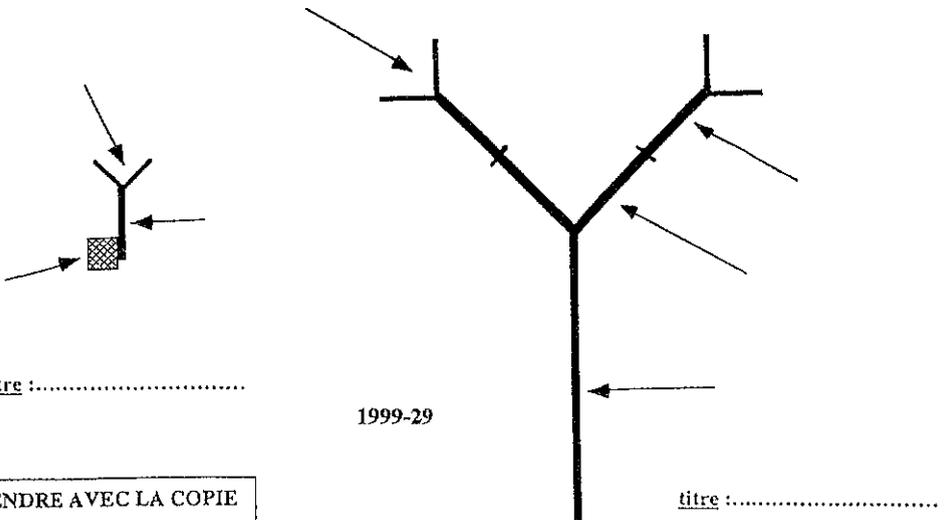
Méthode

250 mL de milieu L sont inoculés avec une suspension de *E. coli* transduite et placés à 37°C. Quand l'absorbance du milieu atteint 0,9 l'IPTG (0,4 mmol.L<sup>-1</sup>) est ajouté et la culture poursuivie pendant 3 heures. Les cellules sont collectées et placées dans un milieu permettant l'éclatement des parois. Le lysat est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. La recherche de la protéine produite est réalisée par immuno-transfert.

DOCUMENT 5

STRUCTURES COMPARÉES D'UN scFV myc tag SOLUBLE ET D'UNE IgG

Représentation à la même échelle



## DOCUMENT 6

### PROTOCOLE D'IMMUNOFLUORESCENCE

#### Vocabulaire :

coverslip = lamelle de verre circulaire utilisée comme support de culture pour les cellules adhérentes lors d'expériences d'immunofluorescence.

#### A. - Méthanol/Acétone Fixation and permeabilization.

- 1) Grow cells on glass coverslips.
- 2) Immerse coverslips in ice-cold methanol : acetone (1:1) ; incubate at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes.

#### B. - Blocking

Place the coverslips cells-side-up on a piece of filter paper inside a petri dish. Cover the cells with blocking buffer (1 % BSA in PBS) for 10 minutes to minimize non-specific adsorption of the antibodies to the coverslip (25-50  $\mu\text{l}$  is usually sufficient).

#### C. - Incubation with anti c-Fos myctag-scFv (Primary antibodies)

- 1) Remove the blocking buffer
- 2) Dilute primary antibody to  $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  in blocking buffer.
- 3) Distribute 40  $\mu\text{l}$  of the primary antibody on each coverslip and incubate for 45 minutes at room temperature.
- 4) Wash coverslips three times in PBS, 5 minutes each wash.

#### D. - Incubation with 9E10 monoclonal antibodies (Secondary Antibodies)

Myc epitope of myctag-scFv peptide is revealed by monoclonal antibodies which are produced by 9E10 hybridoma cell line.

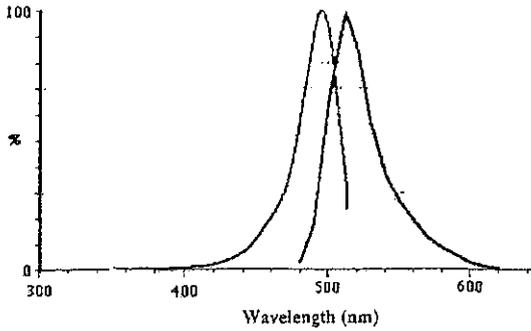
- 1) Add enough secondary antibody solution to cover the surface of each coverslip.
- 2) Incubate for 30 minutes at room temperature.
- 3) Wash coverslips three times in PBS, 5 minutes each wash.

#### E. - Incubation with anti-mouse antibodies conjugated to FITC fluorochrome (Ternary antibodies)

- 1) Add enough antibody solution to cover the surface of each coverslip (usually 10-25  $\mu\text{l}$ ).
- 2) Incubate for 30 minutes at room temperature in the dark.
- 3) Wash coverslips three times in PBS, 5 minutes each wash.

#### F. - Preparation for Microscopy

DOCUMENT 7 : SPECTRES D'EXCITATION ET D'ÉMISSION DU FITC



DOCUMENT 8 : FILTRES POUR MICROSCOPES À FLUORESCENCE

Filtres	Filtre d'excitation	Filtre de lecture
GFP fluorescence	425 ± 30 nm	475
GFP plus fluorescence	480 ± 20 nm	510
GFP - plant	470 ± 20 nm	525
UV fluorescence	360 ± 20 nm	420
Violet fluorescence	425 ± 20 nm	475
Blue fluorescence	470 ± 20 nm	515
Green fluorescence	545 ± 5 nm	590

DOCUMENT 9 : IMMUNOLocalISATION DE LA PROTEINE c-FOS ENDOGENE



Les cellules sub-confluentes ont été traitées selon le protocole d'immunofluorescence décrit dans le document 6.

- a. - Témoin négatif (proposé dans la partie 4-2-3).
- b. - Révélation de la protéine c-Fos par le fragment d'anticorps myctag-scFV spécifique de c-Fos.



## 1.2 - Détermination de la CMI de la gentamycine vis-à-vis du contaminant

Un antibiogramme a montré la sensibilité du contaminant à la gentamycine.

Pour éviter de nouvelles contaminations, il est envisagé d'ajouter cet antibiotique au milieu de culture des cellules. Afin de cibler la dose efficace de gentamycine, on détermine la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le contaminant X.

Chaque candidat dispose de :

- une culture de 24h du contaminant en gélose nutritive inclinée, tube noté "X contaminant" (même tube que 1.1)
- un tube contenant 5 mL de solution mère de gentamycine à  $1024 \text{ mg.mL}^{-1}$
- un flacon de 25 mL de bouillon Muller Hinton
- un tube de 5 mL d'eau physiologique
- trois tubes de 9 mL de bouillon Muller Hinton
- 20 tubes à hémolyse stériles
- 25 pipettes de 1 mL stériles

### Protocole :

- A partir de la solution mère de gentamycine, réaliser en bouillon Muller Hinton une gamme de dilution de 14 tubes selon une progression géométrique de raison 2 sous un volume final de 1 mL.
- Réaliser une suspension bactérienne en eau physiologique d'opacité 2 sur l'échelle de Mac Farland. Préparer l'inoculum standard en effectuant une dilution  $10^{-2}$  en bouillon Muller Hinton de cette suspension.
- Inoculer chaque tube de la gamme de gentamycine avec 1 mL d'inoculum standard.
- Réaliser le ou les témoin(s) nécessaires.
- Incuber 18-24h à  $37^{\circ}\text{C}$

### Compte-rendu :

- Réaliser un tableau récapitulatif de la composition des tubes.
- Justifier la composition et préciser le rôle du ou des témoin(s) réalisé(s).

## 1.3 - Vérification des flacons de cultures cellulaires à repiquer

Chaque candidat dispose de :

- 2 flacons de la culture cellulaire notés Xa et Xb : cellules animales adhérentes cultivant en monocouche dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium) additionné de 10% de sérum de veau foetal.
- 2 milieux d'isolement coulés en boîte de Pétri : une gélose nutritive et une gélose lactosée de Drigalski.

### Protocole :

- Décrire l'aspect des cultures observées au microscope inverse.
- Choisir un flacon afin d'effectuer le repiquage; justifier ce choix en énumérant les critères pris en compte.
- À partir de l'autre flacon, rechercher un éventuel contaminant. Procéder à son isolement sur les deux milieux mis à disposition  
*Tous les examens microscopiques réalisés doivent être présentés à un examinateur.*

### Compte-rendu :

- Justifier le choix des milieux d'isolement utilisés.

## 1.4 - Repiquage des cellules

Le repiquage est réalisé sur le flacon sélectionné en 1.3.

Chaque candidat dispose de :

- tampon PBS sans calcium, stérile : noté "PBS"
- solution de trypsine stérile : noté "trypsine"
- milieu MEM stérile additionné de glutamine et de 10% de sérum de veau foetal : noté "MEM+"
- solution de bleu Trypan : noté "bleu Trypan"

### Protocole :

La manipulation est effectuée sous hotte à flux laminaire (mise à part la numération) en présence d'un examinateur.

- Éliminer le milieu de culture et laver le tapis cellulaire avec 5 mL de PBS sans calcium.
- Introduire 2 mL de solution de trypsine. Laisser agir 30 secondes à température ambiante, puis rejeter la trypsine de manière à ne laisser qu'une fine couche de liquide sur le tapis cellulaire.
- Laisser agir à 37°C en surveillant l'action de la trypsine toutes les 2 minutes.
- Introduire 5 mL de milieu MEM+ et homogénéiser soigneusement.
- Prélever une partie aliquote de la suspension cellulaire afin de réaliser une numération ultérieure en cellule de Malassez sur 0,2 mL de suspension additionnée de 0,05 mL de bleu Trypan.  
Rappel : le quadrillage de la cellule de Malassez comporte 100 rectangles et délimite un volume de 1 $\mu$ L.
- Transférer 1,5 mL de suspension dans un nouveau flacon. Compléter à 5 mL avec le milieu MEM+.
- Placer le flacon à l'étuve à 37°C en atmosphère air + 5% CO<sub>2</sub>.
- Effectuer la numération cellulaire prévue.

### Compte-rendu :

- Donner le résultat de la numération : nombre de cellules totales par mL dans la suspension cellulaire.
- Calculer le pourcentage de viabilité.
- Calculer le nombre de cellules viables introduites dans le nouveau flacon de culture.

## 2 - ÉTUDE D'UNE NOUVELLE ENDOPEPTIDASE UTILISABLE POUR LE REPIQUAGE

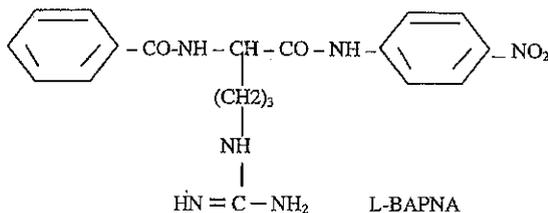
Afin de diminuer le prix de revient des manipulations, on a purifié une endopeptidase E d'origine bactérienne (*Bacillus*) qui pourrait remplacer la trypsine avantageusement.

Avant d'utiliser cette enzyme, on désire connaître le taux de purification entre l'extrait brut et l'extrait purifié.

### 2.1- Détermination de la concentration d'activité catalytique de chaque extrait

#### 2.1.1 Principe du dosage

Le substrat utilisé est un substrat de synthèse (N-benzo-arginyl paranitroanilide ou L-BAPNA) :



Il est hydrolysé en N-benzoyl-L-arginine (BA) et paranitroanilide (PNA) selon la réaction :



Le PNA est un composé coloré en jaune qui permet un dosage colorimétrique. On détermine la quantité de PNA formée par mesure de l'absorbance à 405 nm.

Donnée :  $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 11\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Remarque : À cause de sa faible solubilité, le substrat (L-BAPNA) est utilisé dans un milieu contenant du diméthylsulfoxyde (DMSO).

#### 2.1.2. Manipulation

Chaque candidat dispose de :

- un extrait brut d'enzyme  $E_1$ , noté «  $E_1$  cinétique »
- un extrait purifié  $E_2$ , noté «  $E_2$  cinétique »
- une solution de BAPNA-DMSO à  $0,025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
- une solution de TRIS  $\times 10$
- une solution de tampon TRIS dilué DMSO
- une solution de DMSO

#### Protocole :

- Préparation de la solution de travail « S » L-BAPNA-TRIS-DMSO

Cette solution est à préparer au moment de l'emploi, selon le protocole suivant :  
Introduire dans une fiole jaugée de 20 mL :

- 1 mL de L-BAPNA-DMSO 0,025 mol.L<sup>-1</sup>
- 3 mL de DMSO
- 2 mL de tampon TRIS x10
- Compléter à 20 mL avec de l'eau distillée.

● Dosage :

La vitesse de réaction est mesurée par méthode cinétique (2 essais avec E<sub>1</sub> et 2 essais avec E<sub>2</sub>)

- Longueur d'onde : 405 nm
- Cuve à usage unique : 1 cm de trajet optique
- Température de mesure constante précisée au candidat en début d'épreuve.

Dans une cuve, introduire successivement :

- solution de travail « S » ..... 1,5 mL
  - tampon TRIS-dilué DMSO ..... 0,5 mL
- Déclencher la réaction en ajoutant :
- l'extrait enzymatique à tester ..... 0,1 mL

Mesurer les variations d'absorbance en fonction du temps pendant 2 minutes.

## 2.2 - Détermination de la concentration en protéines de chaque extrait (méthode de Folin-Lowry)

Chaque candidat dispose de :

- un extrait brut E<sub>1</sub>, déjà dilué au 1/20 dans de l'eau physiologique, noté « E<sub>1</sub> protéine »
- un extrait purifié E<sub>2</sub>, déjà dilué au 1/10 dans de l'eau physiologique, noté « E<sub>2</sub> protéine »
- une solution étalon mère de protéines à 2,5 g.L<sup>-1</sup>
- une solution alcaline de CuSO<sub>4</sub> (distributeur)
- une solution de réactif de Folin diluée au 1/2 (prêt à l'emploi)

### Protocole :

● Gamme d'étalonnage :

À partir de la solution étalon mère de protéines à 2,5 g.L<sup>-1</sup>, préparer une solution fille permettant de réaliser une gamme de tubes contenant entre 50 et 250 µg de protéines. Compléter chaque tube à 1 mL avec de l'eau physiologique. Ajouter 3 mL de solution alcaline de CuSO<sub>4</sub> (distributeur) ; agiter ; attendre 10 minutes. Ajouter 0,3 mL de réactif de Folin (prêt à l'emploi) ; agiter ; attendre 30 minutes et lire l'absorbance à 700 nm.

● Dosage :

Réaliser 2 essais pour chaque extrait. La prise d'essai de l'extrait « E<sub>1</sub> protéine » ou « E<sub>2</sub> protéine » est de 1 mL. Traiter comme la gamme.

## 2.3 - Compte-rendu

### 2.3.1. Concentration d'activité catalytique des extraits

Tracer les graphes Absorbance = f(temps) et calculer la vitesse initiale en unité d'absorbance par minute pour chaque extrait.

Établir l'expression littérale donnant la concentration d'activité catalytique en UI par mL d'extrait puis calculer cette concentration d'activité catalytique pour chaque extrait.

### 2.3.2. Concentration protéique des extraits

Présenter sous forme de tableau, la composition des tubes (gamme et essais) Ainsi que les résultats expérimentaux du dosage des protéines.

Déterminer la concentration massique en protéines de chaque extrait

### 2.3.3. Bilan

Déterminer le taux de purification (ou enrichissement) de l'extrait E<sub>2</sub> par rapport à l'extrait E<sub>1</sub>.

## 3 - TITRAGE DU COMPLÉMENT UTILISÉ DANS LA TROUSSE

La mise au point de la réaction de fixation du complément nécessite un dosage préalable du complément, dans les conditions de son utilisation dans le « kit ».

On se propose de réaliser le dosage d'un lot de complément en microplaque.

Chaque candidat dispose de :

- un lot de complément à doser (volume fourni : 200 µL) noté « complément »
- tampon Véronal-Calcium-Magnésium noté « tampon véronal »
- une solution d'antigène viral, notée « Ag viral »
- système hémolytique = globules rouges de mouton (GRM) sensibilisés par des anticorps de lapin anti-GRM, noté « système hémolytique »

### Protocole :

Réalisation de la gamme :

- Diluer le complément au 1/10 en tampon véronal
- Réaliser en microplaque des dilutions en série de  $\frac{1}{2}$  à  $(\frac{1}{2})^7$  à partir du complément au 1/10, en tampon véronal. Le volume final est de 30 µL.
- Ajouter dans toutes les cupules 25 µL d'antigène viral.
- Recouvrir d'un film adhésif et incuber 15 minutes à 37°C.
- Ajouter dans toutes les cupules 60 µL de système hémolytique.
- Recouvrir d'un film adhésif et incuber 30 minutes à 37°C.

Réaliser en parallèle un témoin système hémolytique.

- Centrifuger 3 minutes à 1500 rpm.
- Effectuer la lecture : pour chaque cupule observer s'il y a ou non hémolyse.

Compte rendu :

- Réaliser un tableau donnant la composition des cupules et les résultats observés.
- Donner la composition et le rôle du témoin système hémolytique.
- Déterminer le titre du complément :
  - Rechercher la plus forte dilution produisant encore une hémolyse totale. Par définition, les 50  $\mu\text{L}$  de cette dilution contiennent une unité de complément.
  - Calculer le titre du lot de complément à doser, exprimé en unités par mL.

**DEUXIÈME JOUR (durée : 1 H 30)**

**1. Surveillance des contaminations : identification du contaminant**

- Procéder à la lecture des milieux ensemencés.
- Conclure.

**2. Détermination de la CMI de la gentamycine vis-à-vis du contaminant**

- Effectuer la lecture et rédiger les résultats en complétant le tableau fourni.
- Après avoir déterminé la CMI, calculer le volume d'une solution de gentamycine stock à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  à introduire dans 5 mL de milieu de culture cellulaire afin de prévenir les contaminations bactériennes.

**3. Vérification des flacons de culture à repiquer : isolement du contaminant**

- Procéder à l'observation des milieux d'isolement
- Effectuer les examens nécessaires afin de déterminer si le contaminant isolé peut être le même que celui identifié et reconnu responsable des contaminations déjà observées dans l'unité de cultures cellulaires.

**Épreuves de  
la session  
2000**



# EPREUVE DE FRANÇAIS GROUPE 1 : SYNTHÈSE DE DOCUMENTS

Durée : 4 heures

Coefficient : 2

## L'USAGE DES CALCULATRICES ÉLECTRONIQUES EST INTERDIT

Vous ferez des documents suivants, consacrés aux fonctions du jouet, une synthèse objective, concise et ordonnée. Dans une conclusion personnelle, vous donnerez votre opinion sur le thème proposé.

- Document 1 : **RABEQ et MAILLARD**  
« Jeux et jouets »  
*Histoire du jouet, 1962, Hachette*
- Document 2 : **Charles BAUDELAIRE**  
« Le joujou du pauvre »  
*Le Spleen de Paris, 1869*
- Document 3 : **Entretien avec Gilles BROUGÈRE**  
*50 Millions de Consommateurs, novembre 1995*
- Document 4 : **Catherine SIMON**  
« Le Père Noël ne fait pas de cadeau »  
*Le Monde, 23 décembre 1997*
- Document 5 : **Sommaire du catalogue de jouets TOY'R'US, Noël 1999**

### DOCUMENT 1

Les jeux et les jouets ont des origines multiples. L'instinct social, le désir de rencontrer leurs semblables et d'exercer avec eux une activité plaisante, le besoin de délasséments, plus agréables s'ils sont partagés, ont sans doute poussé les hommes à inventer, à partir d'objets divers, des règles où le hasard, le calcul, la mémoire tiennent une place dont l'importance varie selon les jeux. Le caractère collectif des jeux paraît indéniable.

Il semble pourtant que cette explication ne soit pas la seule valable. Si l'on en croit Pascal et La Bruyère, le jeu n'aurait d'autre source que le désir de fuir les soucis et de sortir de soi. De tout temps, les hommes, « pleins de causes essentielles d'ennui », ont éprouvé la même soif d'évasion, le même impérieux désir de divertissement ; c'est pourquoi sans doute tous les peuples, sur toute la surface du globe, ont inventé des jeux.

Mais d'où viennent les jouets ? Il se pourrait que les premiers d'entre eux aient une origine familiale, et que, à l'âge des cavernes déjà, des mamans excédées, en proie à des besoins divers, aient donné à leurs bébés, pour avoir la paix, des cailloux polis, des coquillages, de rudimentaires poupées semblables à celles que l'on trouve encore aujourd'hui chez les peuplades primitives. Comme le petit chat, auquel il ressemble encore par bien des côtés, le tout petit enfant joue avec un hochet, écoute tinter un grelot ; devenu plus grand, il s'enivre au bruit d'une crécelle, chevauche un cheval de bois, dorlote une poupée ou range des soldats en bataille suivant son âge et son sexe. Mais il reste seul en face de ses jouets.

On peut ainsi distinguer, en gros, le jeu, qui requiert plusieurs participants soumis à des lois bien déterminées, du jouet, objet individuel à partir duquel l'imagination enfantine crée des règles essentiellement momentanées, variables et fantaisistes. [...]

## DOCUMENT 1 (suite)

30 Si l'on envisage la question des jouets sous l'angle historique, on constate que, parmi tous ceux qui sont propres aux enfants, il en est d'immuables. Poupées, hochets, chariots, etc., remontent à la plus haute antiquité. Certains d'entre eux disparaissent pendant des siècles pour réparaître soudain sous leur forme primitive, sans que l'on sache trop bien pourquoi. Il en fut ainsi du yoyo, connu sous le nom d'émigrette pendant le Directoire et déjà représenté sur les vases grecs du V<sup>e</sup> siècle avant notre ère. Le diabolo, dont Watteau a laissé une si charmante image, après avoir fait la joie des Merveilleuses et celle de nos grand-mères, divertit encore aujourd'hui quelques adeptes.

35 A côté de ces jouets éternels, engendrés sans doute par de très profonds instincts, il en est d'autres qui naissent, meurent ou se transforment au gré d'une mouvante actualité, qu'elle soit politique, économique, sociale, artistique, scientifique ou technique. Ceux-là reflètent les grands événements de la vie d'un peuple.

40 Ils ont pour origine une guerre, un scandale politique ou financier, une invention nouvelle, une réalisation technique importante, une chanson. Essentiellement éphémères ou variables dans leur forme, ils connaissent, momentanément du moins, autant de succès que les jouets traditionnels qu'on abandonne parfois à leur profit mais auxquels, semble-t-il, on revient toujours.

## DOCUMENT 2

(1) fuligineux : noirci comme par la suie des cheminées

Sur une route, derrière la grille d'un vaste jardin, au bout duquel apparaissait la blancheur d'un joli château frappé par le soleil, se tenait un enfant beau et frais, habillé de ces vêtements de campagne si pleins de coquetterie.

5 Le luxe, l'insouciance et le spectacle habituel de la richesse rendent ces enfants-là si jolis, qu'on les croirait faits d'une autre pâte que les enfants de la médiocrité ou de la pauvreté.

A côté de lui, gisait sur l'herbe un joujou splendide, aussi frais que son maître, verni, doré, vêtu d'une robe pourpre, et couvert de plumets et de verroteries. Mais l'enfant ne s'occupait pas de son joujou préféré, et voici ce qu'il regardait.

10 De l'autre côté de la grille, sur la route, entre les chardons et les orties, il y avait un autre enfant, sale, chétif, fuligineux (1), un de ces marmots-parias dont un œil impartial découvrirait la beauté, si, comme l'œil du connaisseur devine une peinture idéale sous un vernis de carrossier, il le nettoyait de la répugnante patine de la misère.

15 A travers ces barreaux symboliques séparant deux mondes, la grande route et le château, l'enfant pauvre montrait à l'enfant riche son propre joujou, que celui-ci examinait avidement comme un objet rare et inconnu. Or, ce joujou, que le petit souillon agaçait, agitait et secouait dans une boîte grillée, c'était un rat vivant ! Les parents, par économie sans doute, avaient tiré le joujou de la vie elle-même.

20 Et les deux enfants se riaient l'un à l'autre fraternellement, avec des dents d'une égale blancheur.

*Quelle place occupe le jouet dans l'univers de l'enfant ? Le professeur Brougère, responsable du Département des sciences du jeu à l'université Paris-Nord, nous livre ses réflexions.*

« 50 » : Quel rôle le jouet tient-il dans le développement des enfants ?

**Gilles Brougère :** Sur ce sujet, j'essaie d'avoir une vision scientifique. Je ne suis pas lié à un lobby, par exemple celui des fabricants de jouets, qui a intérêt à défendre l'idée que le jeu ou le jouet contribuent au développement de l'enfant.

5 Aux États-Unis et en Grande-Bretagne, on a essayé de montrer que l'utilisation du jouet – ou que le jeu – pouvait, dans un certain contexte, rendre les enfants plus créatifs. C'est peut-être vrai, mais les études expérimentales ne le prouvent pas. Je suis persuadé, en revanche, que le jouet a un rôle social. Il intervient dans la relation entre parents et enfants. Le fait qu'il soit un cadeau, qu'il  
10 implique une relation entre le monde des petits et celui des adultes est très important. Des relations culturelles se nouent : le jouet apporte des contenus et des éléments de stimulations du jeu. Il est indéniable qu'un enfant qui joue va prendre du plaisir, se sentir mieux et être heureux. De même, le jeu a un bénéfice immédiat. Mais, de là à prétendre que le jouet est un facteur de maturation de l'enfant..., c'est  
15 éminemment contestable. Aujourd'hui, certains spécialistes de développement humain contestent l'idée que le jeu puisse avoir un bénéfice à long terme.

Dans l'immédiat, l'enfant développe une activité qui a un sens et qui lui fait plaisir. Mais je crois que l'on sous-estime beaucoup la dimension sociale de l'activité ludique. Dans les sociétés où les enfants travaillent, le jeu vient se greffer sur le  
20 cadre social ; dans nos sociétés, où l'enfant n'a pas d'autres activités, le jeu est important. Il n'est pas étonnant que le jeu soit une activité de faux-semblant. Il se développe d'autant plus que l'enfant ne fait pas du vrai. Si un enfant est non actif et qu'il s'ennuie, cela ne sera pas favorable à son bien-être immédiat. En revanche, une activité ludique qui le passionne est un élément important de son équilibre.

25 Le jouet est une composante de l'univers de l'enfant, qui lui permet d'exprimer des éléments culturels préalables. La différence culturelle entre filles et garçons, par exemple, n'est pas créée par le jouet : il n'est qu'un relais permettant aux petits d'exprimer des différences. Tout cela résulte d'un contexte social complexe. L'enfant recherche une identité et, parfois, à un moment où il a besoin de se distinguer de  
30 l'autre sexe, renforce ses différences alors que son entourage y accorde peu d'importance. Mais il faut savoir que le pôle masculin est, en général, plus valorisé par les adultes.

Le jouet contribue à forger l'identité culturelle. Il en est un relais et peut même la renforcer dans certains cas, mais ce n'est pas un isolat culturel.

### DOCUMENT 3 (suite)

35 **« 50 » : Quelle place tient le jeu dans la sociabilisation des enfants ?**

G.B. : Dans le présent, il tient une place importante. Mais la sociabilisation ne passe pas uniquement par le jeu – à cet égard, on le surestime. On pense généralement que le jeu est fondateur de sociabilité. Or, c'est l'inverse. Les enfants sont dans un cadre de sociabilisation potentielle : ils sont ensemble parce qu'on les a mis dans  
40 cette situation, sans leur demander leur avis. Le jeu sert plutôt à l'enfant à vivre cette sociabilisation, à lui donner un contenu. Il permet aussi de sélectionner, parmi les partenaires possibles, ceux avec lesquels il va développer des relations. La sociabilité enfantine est donc très déterminée par des organisations qui échappent à l'enfant.

45 **« 50 » : Comment analysez-vous le rôle de la télévision ?**

G.B. : A travers la publicité ou les dessins animés, il existe un relais qui fait que la culture de l'enfant a des sources multiples, dont le jouet n'est qu'un élément. Grâce à lui, l'enfant va entrer en relation active avec sa culture. Donc l'intérioriser de façon beaucoup plus forte et prendre plus de liberté. Ensuite, il va être créateur – ou  
50 recruteur – de sa culture dans son activité ludique. Le jeu et le jouet ont ainsi un statut important dans cette construction culturelle du présent. Stéphane Kline, chercheur à Vancouver, a publié des travaux sur les jouets issus de séries télévisées. On s'aperçoit que l'exposition à la télévision incite à reproduire les éléments tirés des séries et qui s'imposent comme règle du jeu. On sait également  
55 que ces jeux seront d'autant plus importants que le temps passé devant le petit écran sera long. Est-ce un bien ou un mal ? Stéphane Kline n'y est pas favorable, parce que la culture de nos enfants est entre les mains des fabricants de jouets. Mais, en chercheur honnête, il arrive à la conclusion qu'on ne peut pas prouver que c'est mal.

60 Autre exemple : on peut avoir été passionné de Barbie et avoir rompu culturellement avec ce passé. Cela ne veut pas dire que le jeu n'a pas contribué à la construction de la personnalité. Mais c'est généralement un élément qui intervient dans un contexte très complexe. Ce qui est important, ce n'est pas Barbie en tant que telle, mais la façon dont l'enfant l'interprète à la lumière de sa culture, de son  
65 entourage et de ce qu'il vit. Dans les milieux plus défavorisés, cette poupée est plus valorisée parce qu'on y apprécie le côté rêve.

**« 50 » : La tendance au développement du jeu (des jouets) solitaire est-elle une réponse à la moins grande disponibilité des parents ?**

70 G.B. : C'est un fait culturel : notre société a vu se développer les occupations solitaires, et je crois que le jouet rentre dans ce processus. Le jouet est sans doute constructeur de la capacité de l'enfant à avoir des activités culturelles solitaires, mais joue-t-il un rôle à long terme ? C'est une piste de réflexion.

## DOCUMENT 4

Assis à la sortie du magasin, le Père Noël prend son service. Il a des yeux tristes et une barbe synthétique qu'il caresse maladroitement, pour faire croire qu'elle est vraie. Les gosses s'agglutinent et se poussent du coude. Un blondinet hilare est finalement hissé sur les genoux du préposé au manteau rouge. Le gosse sourit au photographe, qui agite un hochet à la hauteur de l'objectif. L'éclair du flash crépite. Une petite bat des mains.

« *Il faut miser de l'argent, c'est le principe* », explique une adolescente de treize ans, essayant de convaincre son père d'acheter « Destins », le jeu de la vie. L'homme se penche sur le coffret pour lire la notice. « *Celui qui joue le mieux, il gagne le plus. C'est super bien !* », jubile la gamine. Le père hésite. « *Franchement, ils nous prennent pour des débiles* », soupire une jeune femme. « *Tous ces jeux avec de l'argent, toute cette compétition, c'est nul !* ». Le coffret convoité sous le bras, l'adolescente suit son père vers le rayon des jeux vidéo. « *Le pire, c'est la violence* », poursuit la jeune femme. « *Certains enfants, surtout les garçons, à force d'être baignés là-dedans, ils ne font plus la différence entre le jeu et la vraie vie. Ils ne voient même pas la limite. Vous avez vu, l'histoire du gosse qui s'est fait tuer à Saint-Priest ?* », ajoute-t-elle, en reposant un jeu éducatif dont le but est de sauver des trésors archéologiques. « *Ce qui inquiète, c'est de voir que la violence chez les jeunes, ça commence de plus en plus tôt, à dix, douze ans*, assure-t-elle. Dans ma cité, les gosses du quartier, on les appelle les Gremlins, comme dans le film. Parce qu'on ne sait plus si ce sont des enfants ou des monstres ». Elle saisit un nouveau coffret. C'est un jeu policier dont l'intrigue a lieu en Asie. « *Dans le fond, le gosse qui a tué, peut-être qu'il n'avait pas assez joué quand il était petit ?* », s'interroge-t-elle à voix haute.

« *Avec tous les morts qu'ils voient déjà à la télé ! Des armes, c'est hors de question qu'on en achète, les gosses sont assez bagarreurs comme ça. C'est pas la peine d'en rajouter* », décrète Janine, femme de ménage et mère de cinq enfants. Son mari, gardien de nuit, approuve. « *Les gens qui fabriquent ces trucs-là, ils donnent une image de la vie qui n'est pas belle* », ajoute Janine. Un avis assurément peu partagé par les professionnels du jouet. « *Se bagarrer et jouer à la guerre sont deux choses différentes. Quand des enfants jouent à la guerre, ils construisent une histoire : il y a les bons et les méchants, des règles à respecter et donc des limites à ne pas franchir* », estiment Cécile Velasco et Anne Doumenc, dirigeantes de la société lyonnaise d'experts-conseils Junior City. « *Un gosse qui se bagarre n'a pas cette distance, cette maîtrise : il sort de ses gonds, il agit par frustration, par colère, sous le coup d'une pulsion* », assurent-elles. Pour la majorité des spécialistes « *de la jeunesse* », le vieux débat sur l'inné et l'acquis n'a plus de raison d'être. « *Même si sa mère est une wonderwoman(1), la petite fille a besoin, à un moment de sa vie, de jouer à la maman et à la dinette. Pendant que le garçon, lui, va jouer à la guerre* », considère Mme Doumenc. Faut-il, pour autant, associer le laid et le brutal au sexe masculin ?

## DOCUMENT 4 (suite)

45 Ou parer de vertus (viriles) l'instinct de domination ? Au rayon Jouets garçons des hypermarchés, le pistolet Guerre des étoiles et la carabine Western se vendent moins de 90 francs pièce. Et les mercenaires d'Action Man, petites figurines masculines équipées de lance-bazookas qui « *tirent vraiment* » ou de grenades « *mega-explosion* », font un malheur. Il existe même un Action Man avec « *chien policier qui aboie* », d'un réalisme saisissant. Rien de tel chez les filles et ce n'est pas nouveau. La bagarre et la guerre restent le monopole des mâles. L'univers rose-paillettes de la poupée Barbie, la trousse d'infirmière et la kitchenette en plastique  
50 demeurent le royaume des filles.

Deux enquêtes réalisées, à dix ans d'intervalle, en 1985 puis en 1995, par l'Insee ont confirmé que « *le choix des articles donnés à l'occasion des fêtes de fin d'année est orienté en priorité par le sexe et l'âge du destinataire* ». Mais qui, des parents, des enfants ou des fabricants, fait réellement le choix ? « *Secrète alchimie !* »,  
55 répond Mme Velasco. « *De toute façon, dans ces prix-là, qu'est-ce qu'on nous offre d'autre ?* », grommelle un client d'hypermarché. « *On ne peut rien y faire, c'est dans les gênes !* » lâche une mère de famille, avec un soupir fataliste.

Ce clivage entre filles et garçons, ou, plus exactement, entre féminin et masculin, ne semble pourtant pas aussi immuable qu'on le croit. Les choix évoluent  
60 selon l'état de la structure familiale et de la société.

Catherine SIMON,  
*Le Monde*, 23 décembre 1997.

(1) wonderwoman : la femme d'action, parfaite.

# SOMMAIRE



## Des jouets testés et approuvés par un jury d'enfants.

Chez Toys'R'Us, ceux qui jouent sont aussi ceux qui jugent. Toys'R'Us donne la parole aux enfants et aux mamans des tout-petits.

Tout au long de ce catalogue, vous pourrez lire leurs commentaires sincères, parfois critiques, sur 450 produits testés avec l'aide du cabinet d'études spécialisé Junior-City.

## LES GEOFFREY D'OR

Les 9 jouets de l'année, plébiscités par les enfants et les mamans pour leur agrément d'utilisation, sont distingués par un Geoffrey d'Or.

Repérez-les grâce à ce trophée et vous serez sûrs de choisir le jouet ou le jeu qu'ils préfèrent.



**Premier âge**  
Peluches,  
Jouets d'activité et d'éveil,  
Porteurs.

**Filles**  
Poupées, Accessoires,  
Mini Mondes, Barbies.

**Garçons**  
Construction, Figurines,  
Garages et circuits,  
Radio commandes, Maquettes.

**Activités manuelles  
et scientifiques**

**Livres**

**Jeux de société  
et jeux LCD**

**Cassettes vidéo**

**Jeux éducatifs électroniques**

**Tricycles et Vélos**

**Plein air**  
Jeux d'extérieur,  
Véhicules électriques, Sport.

**Musique /Hi-fi**

**Multimédia et vidéo**  
Consoles et jeux,  
PC et logiciels.

**EPREUVE D'ANGLAIS**

Durée : 2 heures

Coefficient : 1

L'usage de la calculatrice est interdit.  
L'usage d'un dictionnaire bilingue est autorisé.

SPECIALITES	COEFFICIENT
Analyses biologiques	1
Biochimiste	2
Biotechnologie	1
Esthétique-cosmétique	1,5
Hygiène-propreté-environnement	2
Industries céréalières	2
Métiers de l'eau	2
Qualité dans les industries alimentaires et bioindustries	2

**Too-clean beaches « are destroying wildlife » by Charles Clover, Environment Editor**

Councils have agreed to reduce beach cleaning after it was shown to destroy wildlife and to contribute to sand erosion. Many of the best bathing beaches use workmen with tractor-drawn mechanical rakes to scoop up debris.

However, research has shown that removing the naturally occurring piles of dead seaweed, wood and broken shells from shores rapidly decreases the insect population and therefore the wading birds that live on them. There is also evidence that organic flotsam<sup>(1)</sup> and jetsam<sup>(2)</sup>, in particular seaweed, holds the dunes together.

North Cornwall district council and the city and county council of Swansea have both decided to clean beaches by hand-picking only man-made litter. They are responding to research by Paul Llewellyn, an environmental consultant, and Swansea University on the effects of mechanical beach-cleaning.

Mr Llewellyn said : "All over the globe the pressure of tourism is colossal and with it comes the desire for clean beaches. But the danger of clearing these beaches of everything is that whole ecosystems are destroyed. In some places the desire for clean beaches has reached ridiculous levels ; in the South of France some beaches are sprayed with perfume to make them smell nicer. Unfortunately, some people find dead seaweed distasteful but they should realise that seaweed is very good for you, full of vitamins and natural antiseptics – nothing to worry about and all perfectly natural".

Mr Llewellyn suspected mechanical raking was to blame when he discovered populations of two types of wader<sup>(3)</sup> had dropped by 90 % in Swansea Bay in the early 1990s. "The removal of organic material from the beach left the birds with nothing to feed on," he said. His studies showed that on uncleaned beaches there were about 5,000 insects per square metre of sand. On those that had been raked, researchers could find at best a few hundred. Bats, kestrels<sup>(4)</sup>, badgers<sup>(5)</sup>, foxes and shrews<sup>(6)</sup> also search the beach for insects or small animals and their numbers were being hit.

His work confirms research throughout the world, published by the World Wide Fund for Nature last week, which shows that the area between high and low tide is richer even than the rainforests or coral reefs(...). The natural breakdown of seaweed provides enough organic material for flowering plants to survive and help form dunes. A spokesman for Swansea council said it used six staff, seven days a week, to pick up the rubbish. He said : "We find that the current system works very well and may ultimately be more cost-effective than using machines."

David Evans, head of the leisure department at Swansea council, said there had been more birds using Swansea Bay since mechanical cleaning ended last summer. A spokesman for North Cornwall council said the move had been controversial with some wanting the seaweed left and others wanting it removed. "It got to the stage where if we didn't collect it, people were going to the beach and putting it in bin bags themselves. They said it was smelly, attracting flies and putting off tourists," she said. The Council has compromised by continuing with hand-picking but mechanically removing seaweed below the tide mark when it begins to rot.

Adapted from The Daily Telegraph 15 July 1999

Footnotes :

- (1) *ℓ.6* : flotsam : épaves flottantes.
- (2) *ℓ.6* : jetsam : détritit (jetés par dessus bord).
- (3) *ℓ.18* : wader : échassier.
- (4) *ℓ.21* : kestrel : sorte de faucon.
- (5) *ℓ.21* : badger : blaireau.
- (6) *ℓ.21* : shrew : musaraigne.

**Partie I : Compréhension (10 points)**

- 1. Vous ferez un compte rendu en langue française en mettant en évidence les idées essentielles.  
(environ 130 mots)  
(6 points)
- 2. Vous traduirez le texte en français à partir de  
« All over the globe ... » ( / 11) jusqu'à « ... perfectly natural » ( / 16)  
(4 points)

**Partie II : Expression en langue anglaise (10 points)**

Answer the following questions in English (150/200 words)

- 1. Why is it important to preserve wildlife ?
- 2. What efforts can be made to protect the environment and endangered species,
  - a. on an individual level ?
  - b. on a collective level ?

**EPREUVE DE MATHEMATIQUES ET SCIENCES PHYSIQUES**

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

**SOUS-EPREUVE : MATHEMATIQUES (durée 2 heures)**

SPECIALITES	COEFFICIENT
Analyses biologiques	1
Biochimiste	1,5
Biotechnologie	1,5
Hygiène-propreté-environnement	2
Métiers de l'eau	1,5
Peintures, encres et adhésifs	2
Plastiques et composites	2
Qualité dans les industries alimentaires et bioindustries	2

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.

Le formulaire de mathématiques est joint au sujet.

2 feuilles de papier millimétré par candidat.

**EXERCICE I 9 points**

**Etude du résultat de la pesée d'un objet de masse  $m$  (exprimée en grammes).**

On admet que la variable aléatoire  $X$  qui prend comme valeurs les résultats de la pesée d'un même objet donné suit la loi normale de moyenne  $m$  et d'écart type  $\sigma$ .

## PARTIE A

Dans cette partie, on suppose que  $m = 72,40$  et  $\sigma = 0,08$ .

- Calculer la probabilité des événements suivants (les résultats seront arrondis au millième le plus proche) :
  - «  $X > 72,45$  »
  - «  $X < 72,25$  »
  - «  $72,30 < X < 72,50$  ».
- Déterminer le réel strictement positif  $h$  (arrondi au centième) tel que la probabilité pour que  $X$  prenne une valeur dans l'intervalle  $[m - h, m + h]$  soit égale à 0,989.

## PARTIE B

Dans cette partie, on suppose que  $m$  et  $\sigma$  sont inconnus.

On a relevé dans le tableau suivant les résultats de 10 pesées d'un même objet :

masse en grammes	72,20	72,24	72,26	72,30	72,36	72,39	72,42	72,48	72,50	72,54
------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Les résultats seront arrondis au centième le plus proche.

- Calculer la moyenne et l'écart type de cet échantillon.
- En déduire des estimations ponctuelles de la moyenne  $m$  et de l'écart type  $\sigma$  de la variable  $X$ .
- Dans la suite, on admet que la variable aléatoire qui à tout échantillon de 10 pesées associe la moyenne de ces pesées suit une loi normale. En prenant pour écart type la valeur estimée en 2), donner un intervalle de confiance au seuil de 5% de la moyenne  $m$ .
- L'écart type de l'appareil de pesée, mesuré à partir de nombreuses études antérieures, est en réalité, pour un objet ayant environ cette masse, de 0,08. Dans cette question, on prend donc  $\sigma = 0,08$ 
  - Donner un intervalle de confiance au seuil de 5% de la moyenne  $m$ .
  - Déterminer  $\alpha$  (à l'unité près) pour que au seuil de  $\alpha\%$ , un intervalle de confiance de  $m$  soit  $[72,31 ; 72,43]$ .

## EXERCICE 2 11 points

### PARTIE A

Suite à un incident nucléaire, on a consigné dans le tableau suivant, heure par heure, les résultats fournis par un appareil de mesure de la radioactivité. Les  $N_i$  sont des nombres entiers représentant le nombre de particules recueillies par l'appareil pendant une seconde.

$t_i$ en heure	0	1	2	3	4	5	6
$N_i$	170	102	63	39	24	16	9

1) On pose  $z_i = \ln(N_i - 2)$  pour tout  $i$  variant de 0 à 6 (où  $\ln$  désigne le logarithme népérien).

Donner les valeurs de  $z_i$  arrondies au millième le plus proche.

Représenter le nuage  $(t_i ; z_i)$  dans un repère orthogonal (unités graphiques : 3 cm pour une heure en abscisse, 4 cm pour une unité en ordonnée).

2) Donner le coefficient de corrélation linéaire de la série  $(t_i ; z_i)$  et donner une équation de la droite de régression de  $z$  en  $t$  (les coefficients seront arrondis au millième le plus proche).

3) Donner l'expression de  $N$  en fonction de  $t$  déduite de cet ajustement.

4) En supposant que l'expression obtenue en 3) reste valable, déterminer à partir de quel relevé on obtiendra une valeur de  $N$  inférieure ou égale à 3.

## PARTIE B

Une étude plus approfondie amène à faire l'hypothèse que la fonction, qui au temps  $t$  (en heure), associe le nombre  $N(t)$  est une solution de l'équation différentielle :

$$y' = \alpha(y - 2) \text{ où } \alpha \text{ est une constante réelle.}$$

1) Déterminer la solution générale de l'équation différentielle ci-dessus.

2) En déduire la solution qui prend la valeur 170 pour  $t = 0$  et la valeur 9 pour  $t = 6$ .

## PARTIE C

Soit  $f$  la fonction définie sur  $[0 ; +\infty[$  par  $f(x) = 168e^{-0,53x} + 2$  et  $(C)$  sa courbe représentative dans un repère orthogonal (unités graphiques : 2 cm sur l'axe des abscisses, 1 mm sur l'axe des ordonnées)

1) Calculer  $\lim_{x \rightarrow +\infty} f(x)$  ; interpréter géométriquement le résultat obtenu.

2) Chercher les variations de la fonction  $f$  sur  $[0 ; +\infty[$

3) Construire la courbe  $(C)$ .

4) Résoudre l'équation  $f(x) \leq 30$  dans l'intervalle  $[0 ; +\infty[$  ; vérifier graphiquement.

5) Calculer la valeur moyenne de la fonction  $f$  sur l'intervalle  $[1 ; 6]$  ; on donnera la valeur exacte et une valeur décimale approchée à  $10^{-2}$  près.

## MATHEMATIQUES : éléments de corrigé

*Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit ci-dessous d'éléments de corrigé, afin d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.*

### Exercice 1:

#### Partie A

X suit la loi  $N(72.40 ; 0.08)$ . Soit T la variable réduite centrée associée à X :  $T = \frac{X - 72.40}{0.08}$ .

T suit la loi  $N(0 ; 1)$ .

$$\begin{aligned} 1. \quad P(X > 72.45) &= 1 - P(X \leq 72.45) \\ &= 1 - \Pi(0.625) \\ &\approx 0.266 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P(X < 72.25) &= P(T \leq -1.875) \\ &= 1 - \Pi(1.875) \\ &\approx 0.030 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P(72.30 < X < 72.50) &= 2 \Pi(1.25) - 1 \\ &\approx 0.789 \end{aligned}$$

2. On cherche h tel que :  $P(72.40 - h \leq X \leq 72.40 + h) = 0.989$ , c'est à dire :

$$P\left(-\frac{h}{0.08} \leq T \leq \frac{h}{0.08}\right) = 0.989 \quad \text{soit} \quad 2 \Pi\left(\frac{h}{0.08}\right) - 1 = 0.989$$

On en déduit que  $h \approx 0.20$ . (lecture table)

#### Partie B

1. La moyenne  $\bar{X}$  de cet échantillon est  $\bar{X} \approx 72.37g$ . L'écart-type est :  $\sigma \approx 0.11g$

2. L'estimation ponctuelle de la moyenne  $m$  de la variable X est :  $m \approx 72.37g$

L'estimation ponctuelle de l'écart-type  $\sigma = 0.11 \sqrt{\frac{10}{9}} \approx 0.12$  (en gramme)

3. L'intervalle de confiance de la moyenne  $m$  est donné par :  $\left[ 72.37 - t \frac{0.12}{\sqrt{10}} ; 72.37 + t \frac{0.12}{\sqrt{10}} \right]$

On veut un intervalle de confiance au seuil de 5% de  $m$ , donc on cherche t tel que :

$$2 \Pi(t) - 1 = 0.95 \quad \text{d'où} \quad t = 1.96$$

Alors, l'intervalle de confiance de la moyenne  $m$ , au risque de 5% est :  $[ 72.30 ; 72.44 ]$

4. On prend  $\sigma = 0.08$

a. En procédant de la même manière qu'à la question 3., on obtient un intervalle de confiance de la moyenne  $m$ , au seuil de 5% :  $[ 72.32 ; 72.42 ]$

b. On donne l'intervalle de confiance de la moyenne  $m$  :  $[ 72.31 ; 72.43 ]$

On a donc :  $72.37 - t \frac{0.08}{\sqrt{10}} = 72.31$  d'où  $t \approx 2.37$ .

D'où  $2 \Pi(2.37) - 1 = 0.9822$  (lecture table)

$$\begin{aligned} \text{Et } \alpha &= 1 - 0.9822 = 0.0178 \\ &\approx 0.02 \end{aligned}$$

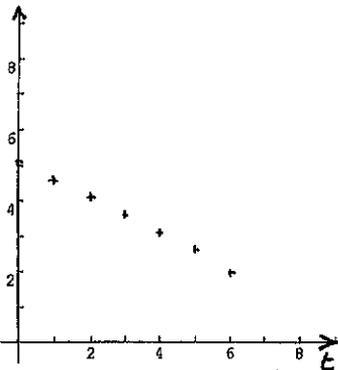
On en conclut que  $m$  appartient à l'intervalle  $[ 72.31 ; 72.43 ]$  au risque de 2%.

### Exercice 2 :

#### Partie A

1.

$t_i$ en heures	0	1	2	3	4	5	6
$z_i$	5.124	4.605	4.111	3.611	3.091	2.639	1.946



2. La calculatrice donne :  $r \approx -0,999$   
 et  $z = -0,517t + 5,142$

3. On a  $z = \ln(N-2)$ ,  
 d'où :  $N = e^z + 2$   
 soit  $N(t) = e^{-0,517t} e^{5,142} + 2$   
 $= 171,058 e^{-0,517t} + 2$

4. On cherche  $t$  tel que  $N(t) \leq 3$ ,  
 soit  $171,058 e^{-0,517t} \leq 1$   
 On trouve  $t \geq 9,946$  soit  $t \geq 10$ .  
 Au bout de 10 h,  $N$  sera inférieur ou égal à 3.

**Partie B**

1. Résolution de  $y' = \alpha(y-2)$  (E)  $\alpha$  constante réelle.  $\rightarrow$  Résolution de  $y' - \alpha y = 0$

La solution est donnée par :  $y = C e^{\alpha t}$  avec  $C$  constante réelle

$\rightarrow$  Recherche d'une solution particulière de l'équation (E)

On cherche une solution du type  $y = A$ ,  $A$  constante réelle

On obtient  $A = 2 \rightarrow$  La solution générale de (E) est donc :  $y = C e^{\alpha t} + 2$

2. On a :  $N(0) = 170$  et  $N(6) = 9$

D'où,  $\begin{cases} C + 2 = 170 \\ C e^{6\alpha} + 2 = 9 \end{cases}$

On en déduit  $C \approx 168$  et  $\alpha \approx -0,53$

Alors :  $N(t) = 168 e^{-0,53t} + 2$

**Partie C**

Soit la fonction  $f$  définie sur  $[0; +\infty[$  par  $f(x) = 168 e^{-0,53x} + 2$ .

1.  $\lim_{x \rightarrow +\infty} (-0,53x) = -\infty$   
 $\lim_{z \rightarrow -\infty} e^z = 0$  } d'où  $\lim_{x \rightarrow +\infty} e^{-0,53x} = 0$  Alors,  $\lim_{x \rightarrow +\infty} f(x) = 2$ .

La courbe (C) admet donc une asymptote horizontale d'équation  $y = 2$ .

$f(x) - 2 = 168 e^{-0,53x}$   $f(x) - 2 > 0$  soit  $f(x) > 2$

On en déduit que la courbe (C) se situe au dessus de son asymptote.

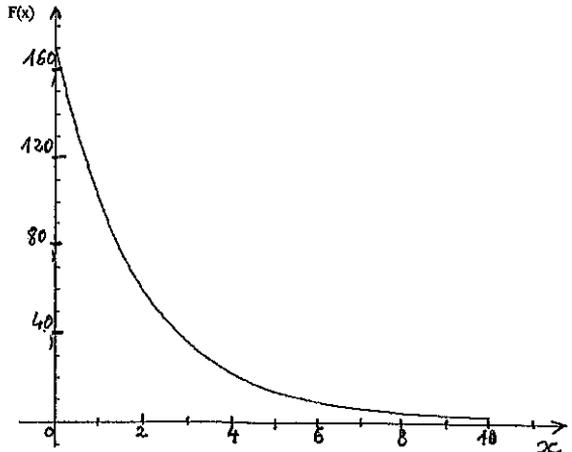
2. Pour étudier les variations de  $f$ , on étudie le signe de  $f'(x)$ .

$f'(x) = -0,53 \times 168 e^{-0,53x}$

$f'(x) < 0$  sur  $[0; +\infty[$ .  $f$  est décroissante sur cet intervalle.

En résumé :

$x$	$0$	$+\infty$
$f$	$170$	$2$



3. Courbe ci-contre

4.  $f(x) \leq 30 \Leftrightarrow 168 e^{-0,53x} + 2 \leq 30$

D'où  $x \geq 3,4$

5. La valeur moyenne de  $f$  sur  $[1; 6]$  est donnée par :

$$M = \frac{1}{5} \int_1^6 f(x) dx$$

$$= \frac{1}{5} \left[ -\frac{1}{0,53} \times 168 e^{-0,53x} + 2x \right]_1^6$$

$$= 2 + \frac{168}{2,65} (e^{-0,53} - e^{-3,18})$$

d'où  $M \approx 36,68$

## SOUS-EPREUVE : 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 autorisé pour cette épreuve.

### I. - CHIMIE ORGANIQUE (15 points)

- 1) On hydrate le 3-méthylbut-1-ène en présence d'acide sulfurique. Donner le nom et la formule développée de l'alcool que l'on obtient majoritairement ?
- 2) Cette molécule est-elle chirale ou achirale ? Représenter les énantiomères de cette molécule en représentation de Cram.
- 3) On fait passer cet alcool en phase vapeur sur de l'alumine  $Al_2O_3$  à  $350^\circ C$  et on obtient un composé A majoritaire. Donner la formule semi-développée de A ainsi que sa nomenclature systématique.
- 4) On réalise l'ozonolyse de A qui donne les composés B et C.
  - B et C donnent un précipité jaune avec la 2,4 DNP
  - B réduit la liqueur de Fehling et donne un précipité rouge vif, ce que ne fait pas C.Donner les formules développées de B et C ainsi que leur nom.
- 5) Écrire et équilibrer l'équation-bilan de la réaction d'oxydation du composé B par l'ion dichromate  $Cr_2O_7^{2-}$ , oxydant du couple  $Cr_2O_7^{2-}/Cr^{3+}$ , en milieu acide, qui conduit au composé D.
- 6) On fait réagir D sur le chlorure de propanoyle, ce qui conduit au composé E. Donner la formule du composé E. De quel type de composé s'agit-il ?

### II. - COMPOSÉ PEU SOLUBLE (20 points)

- 1) Le produit de solubilité du bromate d'argent  $AgBrO_3$  à  $25^\circ C$  est  $K_s = 5,8 \cdot 10^{-5}$ .
  - 1.1. Écrire l'équation de l'équilibre de solubilisation et exprimer le produit de solubilité en fonction des concentrations des espèces à l'équilibre.
  - 1.2. Calculer la solubilité de  $AgBrO_3$  dans l'eau pure à  $25^\circ C$ . En déduire la masse de ce solide que l'on peut dissoudre dans 1 L d'eau.
  - 1.3. On s'intéresse maintenant à la dissolution du bromate d'argent dans une solution de bromate de sodium de concentration molaire  $c = 0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Calculer la solubilité de  $AgBrO_3$  dans cette solution.  
En déduire la masse de  $AgBrO_3$  que l'on peut dissoudre dans 1 L de cette solution.
- 2) On veut ensuite déterminer la quantité de  $AgBrO_3$  que l'on peut dissoudre dans 1 L de solution d'ammoniaque de concentration  $0,50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Les ions  $Ag^+$  forment un complexe avec  $NH_3$  :  $Ag(NH_3)_2^+$  dont la constante de formation est  $K_f = 2,0 \cdot 10^7$ .
  - 2.1. Écrire l'équation de la réaction de complexation des ions  $Ag^+$  et exprimer la constante de formation en fonction des concentrations des espèces à l'équilibre.
  - 2.2. Calculer la constante de l'équilibre prépondérant dont l'équation s'écrit :



- 2.3. Compléter le tableau des concentrations suivant et en déduire la solubilité  $s$  de  $\text{AgBrO}_3$  dans la solution. Quelle est la masse maximale de  $\text{AgBrO}_3$  que l'on peut dissoudre dans 1 L de cette solution.

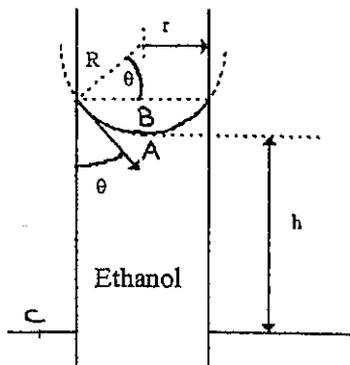
Concentration	$\text{AgBrO}_3$ (s)	+ $2\text{NH}_3$ (aq)	$\rightleftharpoons \text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ (aq)	+ $\text{BrO}_3^-$ (aq)
Initiale	excès	$0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	0	0
À l'équilibre				

**Données :** Masses molaires atomiques :

$$M_{\text{Ag}} = 108 \text{ g.mol}^{-1} ; M_{\text{Br}} = 80 \text{ g.mol}^{-1} ; M_{\text{O}} = 16 \text{ g.mol}^{-1}$$

### III. CAPILLARITE (15 points)

On veut déterminer le coefficient de tension superficielle  $\sigma$  de l'éthanol. On utilise un tube capillaire de longueur 10,0 cm et de rayon intérieur  $r = 0,10 \text{ mm}$  que l'on plonge dans ce liquide. On constate que l'éthanol monte par capillarité dans le tube d'une hauteur  $h$ . La surface libre du liquide dans le tube correspond à une calotte sphérique de rayon  $R$  :  $\theta$  est l'angle de raccordement entre la surface du liquide et le verre (voir figure ci-contre).



1. - Expliquer le phénomène de tension superficielle.
2. - Exprimer la différence de pression existant entre les points C et A, situé à l'interface air-éthanol, à l'intérieur de ce dernier.
3. - On sait que la différence de pression existant entre le point B situé à l'interface air-éthanol du côté de l'air et le point A s'écrit :

$$\Delta p = \frac{2\sigma}{R}$$

Montrer que la hauteur  $h$  dont s'élève le liquide dans le capillaire s'écrit :

$$h = \frac{2\sigma \cdot \cos \theta}{r \cdot \rho \cdot g}$$

où  $\rho$  représente la masse volumique de l'éthanol.

4. On constate que dans cette expérience l'éthanol mouille parfaitement le verre (ce qui signifie que l'angle  $\theta$  est nul) et qu'il monte de 6,2 cm dans le tube capillaire. En déduire la valeur de la tension superficielle  $\sigma$ . Préciser son unité.

**Données :** masse volumique de l'éthanol ;  $\rho = 785 \text{ kg.m}^{-3}$   
 $g = 9,8 \text{ m.s}^{-2}$ .

**EPREUVE DE SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES  
ET GENIE BIOLOGIQUE**

Durée : 4 heures

Coefficient : 6

Calculatrices non autorisées.

**BIOTECHNOLOGIES VÉGÉTALES**

L'homme utilise les végétaux depuis toujours, comme source de nourriture ou de médicaments, et cherche à améliorer les plantes qu'il cultive (augmentation des rendements de culture, amélioration de la qualité nutritionnelle...). Les techniques d'amélioration ont évolué grâce :

- à une meilleure connaissance de la biologie des plantes et de la microflore des sols,
- au développement des techniques *in vitro* et à l'apport de la biologie moléculaire.

De nouvelles perspectives se sont ainsi ouvertes.

**I. QUELQUES ASPECTS FONDAMENTAUX DE LA BIOLOGIE DES VÉGÉTAUX**  
(46 points)

**1.1. Etude structurale de la paroi**

La rigidité de la paroi des végétaux supérieurs est due à la présence de fibres longues et résistantes qui sont réunies par une matrice formée de protéines et polysides.

Les fibres sont généralement constituées d'un polyside, la cellulose, qui est la macromolécule organique la plus abondante sur terre.

La matrice est surtout composée de deux autres sortes de polysides, les hémicelluloses et les composés pectiniques.

1.1.1. La cellulose est un homopolymère. Donner le nom de l'ose qui la constitue et la nature de la liaison impliquée.

1.1.2. Les hémicelluloses sont des molécules complexes formées de courtes chaînes de polysides constituées de mannose, galactose, xylose, arabinose et acides uroniques.

Données : D-xylose



1.1.2.1. Ecrire sous forme pyranique les formules cycliques du D-galactose et du D-xylose

1.1.2.2. Ecrire la formule chimique d'un fragment de l'homopolymère  $\beta$ -1,4 du D-xylose rencontré dans l'hémicellulose.

## 1.2. Etude de l'activité photosynthétique

Chez les végétaux, la photosynthèse se déroule dans les chloroplastes.

- 1.2.1. Donner les légendes du document en annexe, en reportant les numéros sur votre copie.
- 1.2.2. Définir et présenter sous forme d'équations simples les deux phases de la photosynthèse.  
Faire le bilan chimique de la photosynthèse.
- 1.2.3. Les unités fonctionnelles dans le chloroplaste sont les photosystèmes.
  - 1.2.3.1. Donner leur localisation dans le chloroplaste.
  - 1.2.3.2. Préciser leur(s) rôle(s).
  - 1.2.3.3. Détailler la composition de ce photosystème.
  - 1.2.3.4. Présenter le principe de fonctionnement d'un photosystème.

## 1.3. Etude de la nutrition des plantes et des activités des bactéries de la biosphère

L'azote est l'élément, dont la carence restreint le plus la croissance des végétaux et le rendement des cultures.

L'azote atmosphérique ne devient assimilable par les végétaux que lorsqu'il subit une transformation en ion ammonium ou en ion nitrate.

- 1.3.1. A l'aide d'un schéma, montrer comment des bactéries du sol participent au cycle de l'azote.
- 1.3.2. Parmi les bactéries vivant au voisinage des plantes, on trouve des bactéries du genre *Rhizobium*. Ces dernières peuvent vivre soit à l'état libre, soit en établissant une relation symbiotique avec des plantes de la famille des légumineuses.
  - 1.3.2.1. Définir le terme de symbiose. Donner le rôle respectif des partenaires de cette association.
  - 1.3.2.2. Donner les grandes étapes de la mise en place de la symbiose *Rhizobium* - légumineuses.
  - 1.3.2.3. Quelle est l'enzyme, caractéristique de la symbiose, permettant l'assimilation de l'azote atmosphérique par la plante ?

## 2. LES MALADIES DES VEGETAUX ET QUELQUES MOYENS DE LUTTE

(18 points)

### 2.1. Maladies dues à des virus et moyens de lutte

- 2.1.1. La jaunisse nécrotique de la laitue est due à un Rhabdovirus (Lettuce Necrotic Yellow Virus). Il s'agit d'un virus enveloppé dont le génome est un ARN simple brin de polarité négative.  
Schématiser et légénder le cycle de réplication du génome d'un tel virus.

2.1.2. Pour soigner les plantes atteintes par des virus, la culture végétale *in vitro* fournit une solution possible : la culture de méristèmes permet de régénérer une plante saine à partir d'une plante virosée.

2.1.2.1. Définir le terme de « méristème » et indiquer leur rôle dans les plantes.

2.1.2.2. Expliquer pourquoi la culture de méristèmes permet de régénérer une plante saine à partir d'une plante virosée.

## 2.2. Les biopesticides

Ils sont utilisés contre des maladies dues à des insectes. Définir le terme de biopesticide. Donner un exemple en explicitant son mode d'action.

## 3. TRANSFORMATION GENETIQUE DES VEGETAUX (56 points)

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire chez les végétaux, des possibilités d'amélioration des plantes cultivées peuvent être envisagées.

Grâce au clonage des gènes, à l'introduction de matériel génétique étranger dans une cellule végétale, il est possible d'étudier la structure et le mode de régulation des gènes. La transformation génétique ouvre des perspectives : plantes insecticides, plantes résistantes à des herbicides ou à des virus.

### 3.1. Structure d'un gène

Faire un schéma général de la structure d'un gène de cellule eucaryote en précisant les différentes régions de ce gène.

### 3.2. Expression d'un gène

A l'aide d'un schéma annoté, faire apparaître les différentes étapes de l'expression d'un gène codant pour une protéine sécrétée par une cellule eucaryote.

### 3.3. Transfert de gène

Le transfert de gène dans une cellule végétale peut être réalisé selon deux approches différentes :

3.3.1. Première approche : un processus de transformation naturelle mettant en jeu une bactérie (*Agrobacterium tumefaciens*)

3.3.1.1. Expliquer les principales étapes de l'infection naturelle d'une cellule végétale par cette bactérie. Quel est le nom de la maladie engendrée par *Agrobacterium tumefaciens* ?

3.3.1.2. Quel(s) bénéfice(s) la bactérie retire-t-elle de cette infection ?

3.3.1.3. Décrire une méthode de génie génétique permettant de transférer un gène d'intérêt dans une cellule végétale grâce à *Agrobacterium tumefaciens*

- 3.3.2. Deuxième approche : un transfert direct sans intervention de bactérie, réalisé généralement soit par électroporation soit par biolistique (canon à particules ou shot gun).  
Donner le principe de ces deux techniques.

### 3.4. Régénération de la plante transformée

Le transfert de gène étant réalisé sur des cellules végétales d'un fragment de plante, une étape de régénération *in vitro* est nécessaire pour obtenir la plante modifiée entière à partir de ce fragment. Cette phase de régénération constitue souvent un obstacle pour l'application des techniques de transformation à un certain nombre de plantes.

- 3.4.1. Citer les principales catégories de constituants d'un milieu de culture pour végétaux.
- 3.4.2. Les milieux de culture sont souvent additionnés de phytohormones.
- 3.4.2.1. Citer les deux familles de phytohormones les plus utilisées *in vitro*.
- 3.4.2.2. Pourquoi utilise-t-on des phytohormones dans les cultures *in vitro* ?
- 3.4.3. Préciser les conditions environnementales nécessaires à la culture des végétaux *in vitro*.

### 3.5. Production de protéines recombinées

Les végétaux transgéniques pourraient permettre la production de protéines recombinées. Il a été montré que des antigènes exprimés par des plantes transgéniques sont capables d'induire une réponse immunitaire chez l'animal.  
Une réponse immunitaire spécifique commence par l'activation de lymphocytes par l'antigène vaccinant, selon le principe de la sélection clonale.

- 3.5.1. Dans le cadre d'une production de protéines vaccinales utilisables chez l'homme, quel est l'intérêt d'utiliser une cellule végétale par rapport à une bactérie ? Justifier votre réponse.
- 3.5.2. Expliquer le principe de la sélection clonale.
- 3.5.3. A l'aide d'un schéma légendé, représenter le déroulement de l'activation d'un lymphocyte T auxiliaire puis d'un lymphocyte B consécutives à l'entrée d'un antigène protéique thymodépendant dans l'organisme.

# ANNEXE

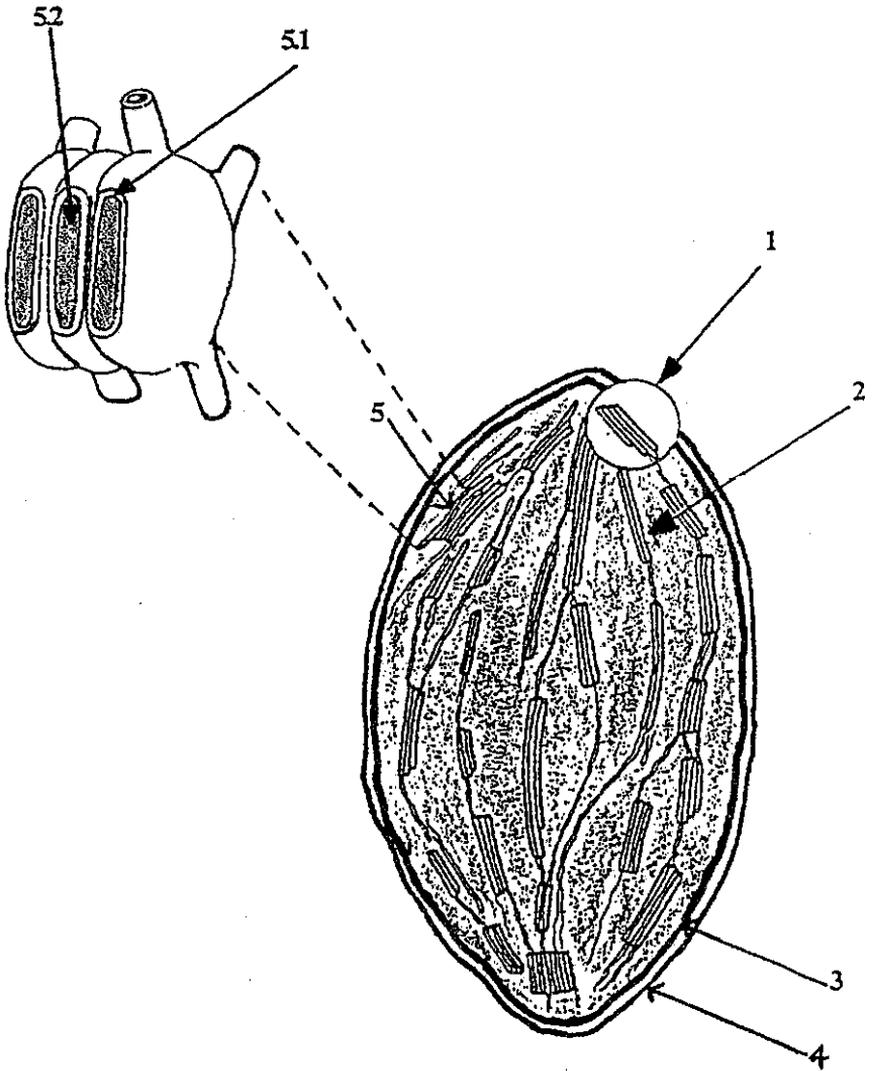


Diagramme schématique réalisé d'après une photographie en microscopie électronique d'un chloroplaste d'une feuille d'épinard

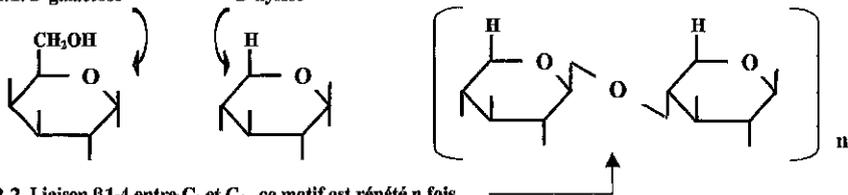
## PROPOSITION DE CORRIGÉ

*Avertissement important : L'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.*

1.1.1. Molécules de D-glucose (ou D-glucopyranose) reliées en  $\beta$  1-4

1.1.2.1. D-galactose

D-xylose



1.1.2.2. Liaison  $\beta$ 1-4 entre C<sub>1</sub> et C<sub>4</sub>, ce motif est répété n fois

1.2.1. Légendes :

1= granum    2= stroma (ou matrice)

3= membrane interne

4= membrane externe

5= thylacoïde (ou sac)    5.1. = membranc externe du thylacoïde    5.2. = espace interne du thylacoïde

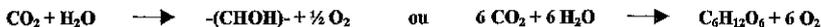
1.2.2. **Phase lumineuse** : nécessite la lumière, puisqu'elle assure la bioconversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique (stockée sous forme d'ATP) et en pouvoir réducteur (sous forme de NADPH + H<sup>+</sup>). Il y a photolyse de l'eau (qui joue le rôle de donneur d'électrons et d'ions H<sup>+</sup>) et libération de dioxygène, soit :



**Phase obscure** : a lieu en présence ou en absence de lumière, c'est la phase d'assimilation du carbone issu de la réduction du CO<sub>2</sub>, il y a consommation de l'ATP et du NADPH + H<sup>+</sup> formés pendant la phase lumineuse et formation de glucides (par exemple du glucose qui est stocké sous forme d'amidon) grâce au cycle de Calvin (d'autres processus existent) :



D'où le bilan chimique, qui peut s'écrire, selon que l'on indique la formation d'un « maillon glucidique » ou d'une molécule de glucose :



1.2.3.1. Les photosystèmes sont localisés dans la membrane des thylacoïdes du chloroplaste.

1.2.3.2. Leur rôle est d'assurer la bioconversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, par absorption des photons correspondant à des longueurs d'ondes particulières du spectre visible.

1.2.3.3. Un photosystème contient :

- des molécules « antennes » (chlorophylles et autres pigments photosynthétiques)
- un centre réactionnel (contenant une chlorophylle associée) qui est impliqué dans le transport des électrons

1.2.3.4. Il y a successivement :

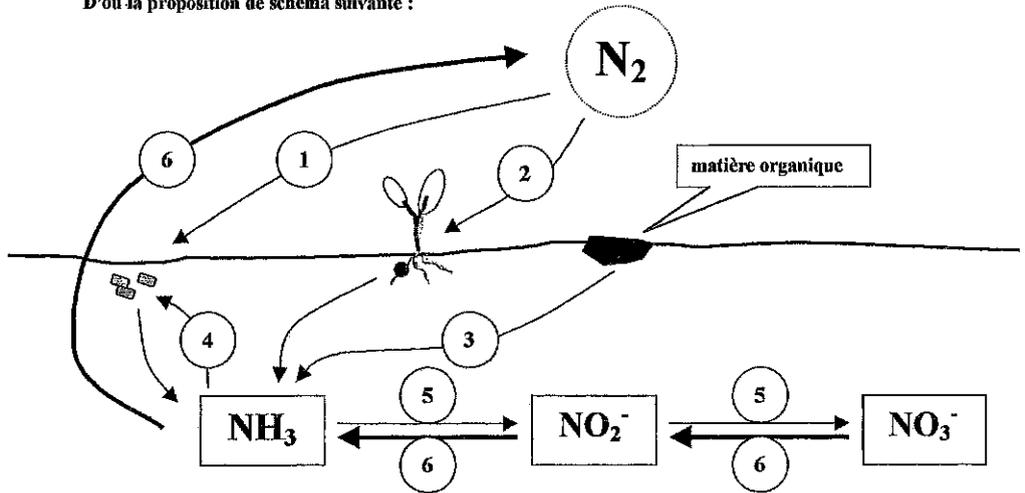
- captation de l'énergie lumineuse par les molécules « antennes »
- transmission de cette excitation moléculaire au centre réactionnel
- diminution du potentiel redox E<sup>o</sup> du centre réactionnel
- déclenchement de réactions d'oxydoréduction aboutissant au transfert des électrons le long d'une chaîne de transporteurs membranaires
- passage d'ions H<sup>+</sup> du stroma du chloroplaste vers la lumière (ou lumen ou espace interne, voir légende 5.2. de la question 1.2.1.) du thylacoïde et formation d'un gradient d'ions H<sup>+</sup> (théorie chimio-osmotique de Mitchell)

*Remarque : le fonctionnement du photosystème aboutit à la formation d'un gradient d'ions H<sup>+</sup> qui vont spontanément rentrer dans le stroma du chloroplaste via l'ATP-synthétase, celle-ci ne fait donc pas partie du photosystème.*

1.3.1. Le schéma devait comporter les éléments de réponse suivants (seules les 2 premières colonnes étaient exigées d'après le libellé du sujet) :

ETAPE (légendes au schéma)	BACTERIES INTERVENANT DANS LES TRANSFORMATIONS DES ESPÈCES CHIMIQUES DE L'AZOTE	COMPLÈMENTS DE REPONSE
FIXATION DU DIAZOTE ATMOSPHERIQUE	$N_2$ fixé en $NH_3$ par bactéries assurant une fixation libre (1) ou symbiotique (2)	Fixation libre : <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , cyanobactéries Fixation symbiotique : <i>Rhizobium</i> , <i>Frankia</i>
AMMONIFICATION (3)	dégradation de la matière organique d'origine végétale ou animale protéines hydrolysées en acides aminés subissant ensuite la désamination : libération de $NH_3$ par bactéries ammonifiantes	Entérobactéries, anaérobies
ASSIMILATION (4)	$NH_3$ sert de source d'azote qui est incorporé dans les protéines de la biomasse bactérienne des bactéries du sol	Toutes bactéries du sol
NITRIFICATION (5)	oxydation du $NH_3$ en $NO_2^-$ puis $NO_3^-$ par les bactéries nitrifiantes	Processus aérobie <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrobacter</i>
DENITRIFICATION (6)	réduction des $NO_3^-$ en $NO_2^-$ puis en $NH_3^+$ et en $N_2$ par les bactéries possédant une nitrate réductase	Processus anaérobie

D'où la proposition de schéma suivante :



1.3.2.1. Symbiose : association entre deux êtres vivants d'espèces différentes avec bénéfice mutuel pour les deux partenaires. Dans le cas de la symbiose légumineuse/*Rhizobium* :

- *Rhizobium* assure la fixation de  $N_2$  et la fourniture de  $NH_3$  à la plante
- la plante incorpore  $NH_3$  (assimilation) et fournit les glucides, issus de la photosynthèse, qui sont indispensables au métabolisme de *Rhizobium*, notamment pour la fixation de  $N_2$

1.3.2.2.

- Reconnaissance spécifique plante hôte/bactérie
- Pénétration des cellules bactériennes dans les poils absorbants des racines par formation d'un « cordon infectieux »

- Colonisation des cellules végétales, prolifération de celles-ci pour former des nodosités hébergeant les bactéroïdes (forme bactérienne capable de fixer  $N_2$ )
- Synthèse, par les cellules de la plante, d'un pigment (la leghémoglobine) capable de fixer  $O_2$  et de limiter sa concentration dans le cytoplasme de la cellule végétale car celui-ci inhibe la fixation de  $N_2$

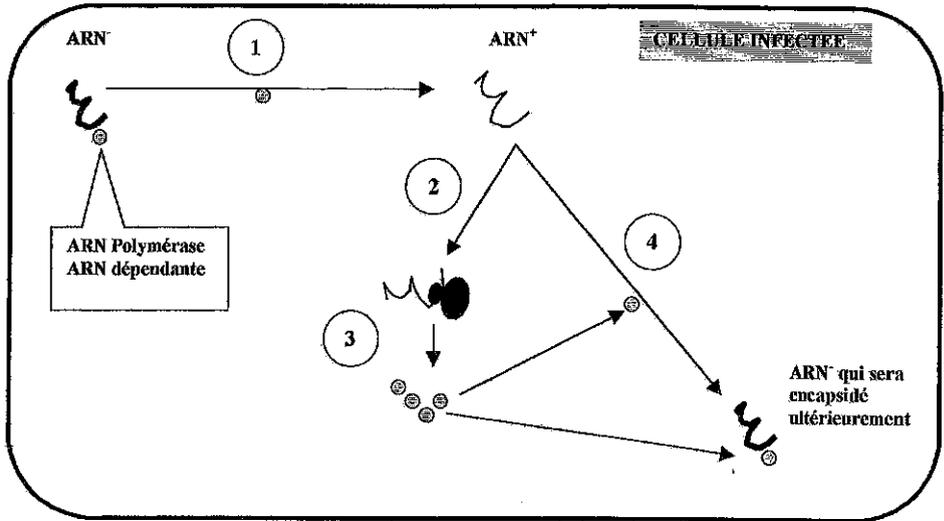
### 1.3.2.3. La nitrogénase

#### 2.1.1. Le virus est un virion enveloppé à ARN.

Le cycle devait faire apparaître les étapes de multiplication du génome, d'après le sujet : il n'était pas nécessaire de traiter l'intégralité du cycle de multiplication du virus.

1 <sup>ère</sup> ÉTAPE	apparition d'un ARN <sup>+</sup> à partir de l'ARN génomique viral grâce à l'ARN polymérase ARN dépendante virale contenue dans le virion infectant (1)
2 <sup>ème</sup> ÉTAPE	traduction des ARN <sup>+</sup> apparus précédemment grâce aux enzymes cellulaires (2) et synthèse de nouvelles molécules d'ARN polymérase ARN dépendante (3)
3 <sup>ème</sup> ÉTAPE	réplication des ARN <sup>+</sup> en ARN <sup>-</sup> destinés à l'encapsidation (4) grâce à l'ARN polymérase ARN dépendante apparue précédemment

D'où la proposition de schéma suivante :

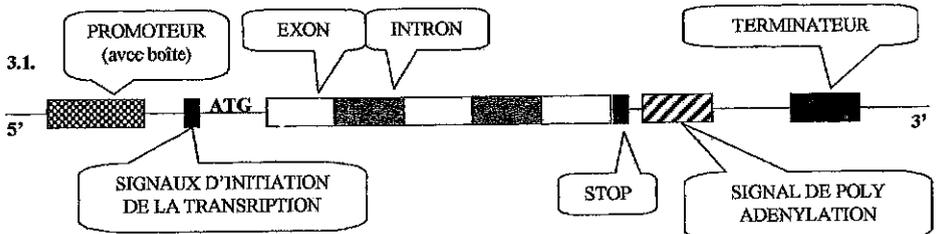


2.1.2.1. Ensemble de cellules non différenciées, en division et pouvant se différencier pour former des organes et des tissus

2.1.2.2. Les cellules méristématiques sont saines, même chez une plante virosée, la régénération est possible grâce à la totipotence de ces cellules.

2.2. Produit d'origine biologique destiné à protéger les plantes contre les insectes. Exemples (1 suffisait) :

<i>Bacillus thuringiensis</i>	bactérie synthétisant une toxine protéique agissant sur la muqueuse intestinale
<i>Baculovirus</i>	infection létale du tube digestif
<i>Beauveria</i>	moisissure dont le développement mycélien obstrue les canaux respiratoires thoraciques



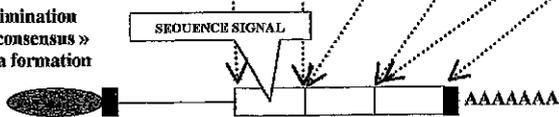
3.2. La transcription de l'ADN permet d'obtenir une molécule d'ARN pré-messager :



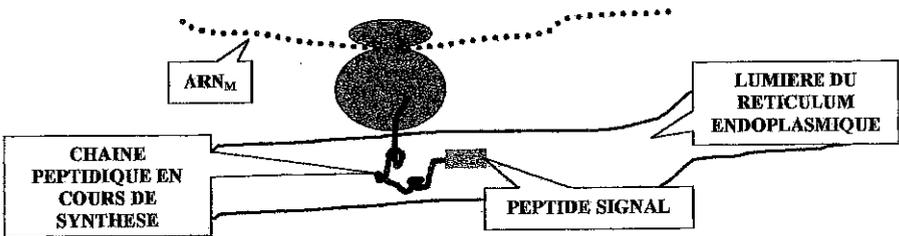
La maturation fait apparaître une coiffe (« capping ») en 5' et une « queue » poly-A en 3' :



L'épissage (« splicing ») assure l'élimination des introns grâce aux séquences « consensus » présentes à leurs extrémités et il y a formation de l'ARN<sub>m</sub> mature, qui va passer dans le cytoplasme



La protéine est sécrétée, elle contient donc un peptide signal qui permet son passage dans la lumière du réticulum endoplasmique lors de la traduction, avant de subir des modifications post-traductionnelles :



3.3.1.1. A la suite d'une blessure superficielle de la plante, il y a pénétration des bactéries dans les tissus végétaux. Le plasmide T<sub>1</sub> appartenant aux bactéries est transféré grâce aux gènes VIR, qui permettent de plus l'intégration dans le génome de la plante de la région T du plasmide, bordée par des séquences répétitives. Il y a alors production d'opines, tumorigénération et apparition de la galle du collet (« crown gall »).

3.3.1.2. Un gène intégré permet la synthèse d'opines par la cellule végétale, molécules azotées utilisées comme nutriments par les cellules bactériennes.

3.3.1.3.

MÉTHODES	PRINCIPE
système binaire	une souche d' <i>Agrobacterium</i> qui héberge un plasmide T <sub>1</sub> « désarmé » ne possédant que les gènes de transfert (il n'y a pas de tumorigénération car la région T est absente) reçoit un 2 <sup>ème</sup> plasmide possédant le transgène dans les séquences bordantes
méthode « historique »	la région T du plasmide T <sub>1</sub> recombinant contient le transgène à la place des gènes de tumorigénération
recombinaison homologue	un vecteur de clonage recombinant porte le transgène et échange ce transgène avec un plasmide T <sub>1</sub> avant transfert dans la cellule végétale

3.3.2. Electroporation : on soumet un mélange d'ADN et de protoplastes à des décharges électriques intenses et brèves, afin de créer des pores temporaires dans la membrane plasmique des cellules végétales, ce qui provoque l'entrée de l'ADN.

Biolistique : les cellules intactes sont « bombardées » par des particules métalliques sur lesquelles est adsorbé l'ADN.

3.4.1. Sels minéraux, glucides, vitamines et phytohormones

3.4.2.1. Auxines et cytokines

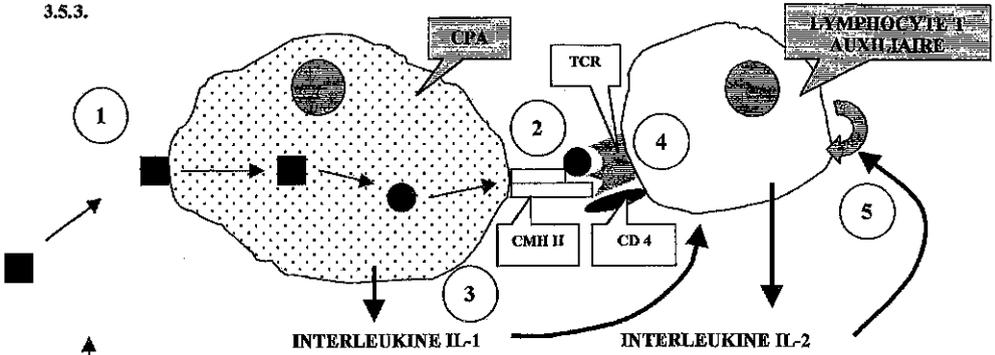
3.4.2.2. Pour favoriser la croissance des explants et orienter la différenciation cellulaire

3.4.3. Température (20 à 25°C), lumière (spectre, intensité, photopériode), hygrométrie élevée, asepsie

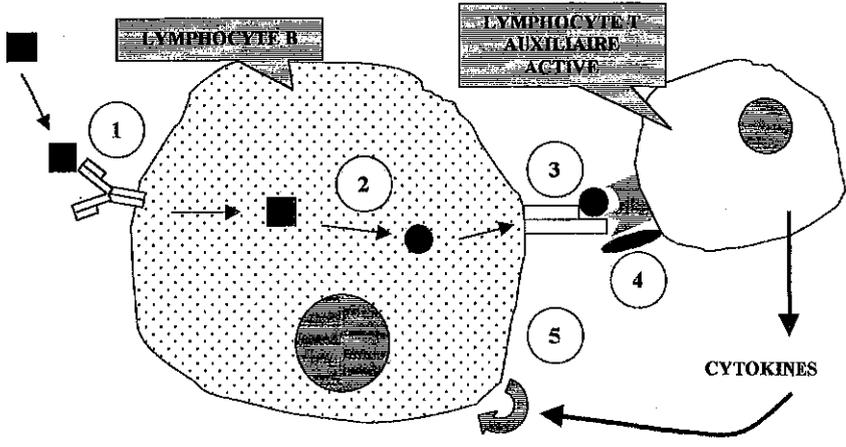
3.5.1. Une cellule végétale assure, en tant que cellule eucaryote, les modifications post-traductionnelles.

3.5.2. Il y a reconnaissance spécifique d'un épitope de l'antigène vaccinant par interaction avec un récepteur porté par un clone lymphocytaire, ce qui a pour conséquence la prolifération du clone activé.

3.5.3.



ACTIVATION D'UN LYMPHOCYTE T AUXILIAIRE	ACTIVATION D'UN LYMPHOCYTE B
1 fixation de l'antigène, puis dégradation partielle par la cellule présentatrice de l'antigène	1 fixation de l'antigène complet sur une immunoglobuline de surface
2 présentation de l'antigène avec le CMH II	2 le lymphocyte B se comporte comme une CPA
3 synthèse d'IL-1 par la CPA et activation du lymphocyte	3 présentation de l'antigène avec le CMH II
4 reconnaissance du complexe peptide/CMH II par TCR spécifique et reconnaissance CMH II/CD 4	4 interaction entre le lymphocyte B et un lymphocyte T auxiliaire déjà activé et produisant des cytokines
5 synthèse d'IL-2 par le lymphocyte, prolifération	5 activation et prolifération des lymphocytes B



# EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE

## 1<sup>ère</sup> PARTIE : ETUDE DE PROJET

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

L'usage d'un dictionnaire anglais-fançais est autorisé.

Calculatrice autorisée.

Une feuille de papier millimétré.

### QUELQUES UTILISATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES BACTERIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques sont depuis très longtemps utilisées dans de nombreuses fermentations à cause de leurs qualités propres : caractère non pathogène, absence de toxicité, stabilité et bonne viabilité, résistance au pH

L'étude proposée ici, concerne certaines de leurs applications :

- les probiotiques
- la production d'acide lactique
- l'amélioration du pouvoir protéolytique par mutagenèse
- le clonage d'un gène impliqué dans la production d'arôme

#### 1. Les probiotiques : influence des bactéries lactiques sur la production d'interféron (19 points)

On appelle probiotique, une préparation bactérienne, généralement à base de bactéries lactiques utilisées sous forme revivifiable, à des fins nutritionnelles et/ou thérapeutiques. Le yaourt peut être considéré lui même comme un probiotique.

Le système immunitaire peut être stimulé *in vivo* et *in vitro* par des agents alimentaires présents dans les produits de fermentation (yaourt).

On cherche à mettre en évidence l'effet des bactéries lactiques sur la production d'interféron *in vivo*.

Protocole : des groupes de 5 souris Swiss de 5 à 6 semaines ont été inoculées par voie intra - péritonéale avec différentes quantités de bactéries lactiques sous un volume de 0,5 mL de solution saline isotonique (SSI). Après prélèvement sanguin, les sérums de chaque groupe de souris sont rassemblés.

##### 1.1. Première expérience.

On réalise un mélange de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* selon un rapport 1:1. Différentes quantités de ce mélange sont injectées aux souris. Les prélèvements sanguins sont effectués 2, 4, 6, 8 et 24 heures après l'injection et un dosage d'interféron sérique est pratiqué.

Analyser les résultats rapportés dans le document 1.

##### 1.2. Deuxième expérience.

*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont injectés séparément, et en deux quantités différentes. Le document 2 présente les résultats obtenus.

Quelle est la bactérie lactique qui stimule la production d'interféron ? Justifier la réponse à l'aide des documents 1 et 2.

##### 1.3. Troisième expérience.

$5 \cdot 10^7$  *Lactobacillus bulgaricus* vivants sont injectés et les sérums prélevés et rassemblés 6 heures plus tard. La caractérisation de l'interféron produit est réalisée par une technique de neutralisation : on mesure l'activité antivirale résiduelle des sérums de souris, après mise en contact avec des anticorps spécifiques anti INF  $\alpha/\beta$  et anti INF  $\gamma$ .

En quoi la réaction employée est-elle une réaction de neutralisation ?

Analyser le document 3. Justifier les témoins.

Indiquer, en le justifiant, le type d'interféron présent dans l'échantillon de sérum de souris.

## 2. La production d'acide lactique (24 points)

2.1. Le document 4A présente les voies métaboliques de la production d'acide lactique.

2.1.1. D'après les voies métaboliques, quel type de bactéries lactiques choisir pour une telle production ? Argumenter la réponse.

2.1.2. En s'appuyant sur le document 4B, indiquer en quoi une production par procédé microbiologique est plus intéressante qu'une synthèse chimique.

2.2. D'après le document 5 :

2.2.1. Tracer sur la même feuille de papier millimétré les courbes

- courbe de croissance
- [acide L-lactique] =  $f(t)$
- $pH = f(t)$

2.2.2. Expliquer la baisse du pH.

2.2.3. A quel type de métabolite appartient l'acide L-lactique ? Justifier la réponse .

2.2.4. Déterminer la productivité volumique horaire finale en acide lactique.

2.2.5. Estimer la productivité horaire finale par cellule.

2.2.6. Calculer la quantité de substrat restant à la fin de la fermentation, sachant que le rendement de production en acide L-lactique par rapport au glucose consommé est de 95 % (m/m).

## 3. L'amélioration du pouvoir protéolytique (18 points)

La transduction phagique et la mutagenèse chimique sont des procédés envisageables pour améliorer l'activité protéolytique de la souche.

### 3.1. Transduction

On purifie les phages par centrifugation en gradient de chlorure de césium (CsCl).

Des particules phagiques sont observées en microscopie électronique à transmission. (document 6).

Le document 6A présente les résultats de la centrifugation et le document 6B l'observation au microscope électronique à transmission des différentes bandes obtenues.

Quelle bande choisir pour réaliser la transduction ? Justifier la réponse.

### 3.2. Mutagenèse chimique

Plusieurs agents mutagènes sont testés sur *Lactobacillus delbrueckii*. Un criblage préalable est réalisé pour sélectionner les souches sauvages ayant naturellement une activité protéolytique.

3.2.1. D'après le document 7A, comment réaliser l'étape de présélection du criblage (nature du milieu utilisé et lecture de ce milieu) ?

Quel intérêt présente la technique de mesure de l'activité protéolytique ?

3.2.2. Analyser les courbes du document 7B

3.2.3. Analyse du document 7C :

Calculer la moyenne (« average ») pondérée de l'activité protéolytique des mutants obtenus après action de l'EMS.

Quel est l'agent mutagène le plus intéressant ?

#### 4. Clonage d'un gène de protéase de bactérie lactique (19 points)

Certaines bactéries lactiques synthétisent des protéases qui génèrent des peptides impliqués dans l'arôme du produit de fermentation. Aussi, afin de maîtriser les qualités organoleptiques de ce dernier, le gène, codant une protéase importante dans ce processus et porté par un plasmide naturel (4 kb), est cloné. Il sera alors possible de produire la protéine intéressante en quantité importante et d'en étudier les propriétés.

Ce clonage commence par une extraction et une purification de l'ADN d'intérêt, suivie d'une restriction double et d'une ligature avec un vecteur adapté.

##### 4.1. Mini-préparation du plasmide naturel par lyse alcaline

###### 4.1.1. Réalisation des mini-préparations

L'extraction/purification de ce plasmide naturel est réalisée par lyse alcaline adaptée à des bactéries Gram<sup>+</sup>. Trois essais sont réalisés suivant le protocole présenté dans le document 8.

Expliquer le rôle des réactifs soulignés dans le texte.

###### 4.1.2. Résultats des mini-préparations

###### 4.1.2.1. Quantification UV des extraits

Une quantification UV des mini-préparations est réalisée selon le protocole présenté dans le document 9. Les résultats de la mini-préparation N°3 sont les suivants :

$$A_{260\text{nm}} = 0,132 \quad A_{280\text{nm}} = 0,08$$

Sachant que 1 UA<sub>260nm</sub> correspond à une concentration d'ADN double brin de 50 µg/mL, calculer la concentration en ADN plasmidique de la mini-préparation.

Calculer le rapport  $A_{260} / A_{280}$  de la mini-préparation.

Conclure sur la pureté de la préparation, justifier la réponse.

###### 4.1.2.2. Electrophorèse de contrôle

Une électrophorèse de contrôle en gel immergé d'agarose à 1,2 % (m/v) des trois mini-préparations d'ADN plasmidique est réalisée. Une reproduction du gel est présentée dans le document 10.

Sachant que la taille du plasmide est de 4 kb, analyser et interpréter le résultat du N° 3 (aucun graphe ni calcul n'est demandé).

Comment expliquer l'aspect du résultat du N° 2 ?

##### 4.2. Réalisation de la digestion double

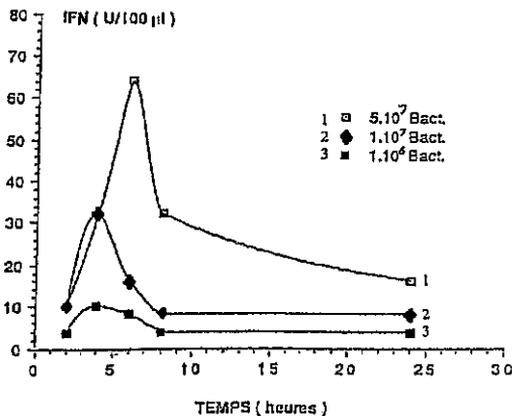
La digestion double de l'ADN d'intérêt est réalisée en utilisant *Bam* HI et *Not* I comme enzymes de restriction.

L'enzyme *Bam* HI fonctionne dans un milieu de concentration ionique moyenne ; l'enzyme *Not* I fonctionne à haute concentration ionique.

Expliquer pourquoi il est nécessaire de réaliser une digestion double successive en hydrolysant l'ADN par *Bam* HI puis par *Not* I.

### Document 1

Cinétique de la production de l'interféron sous l'effet des bactéries lactiques administrées par voie intrapéritonéale.



### Document 2

Induction de l'interféron par *L. bulgaricus* ou *S. thermophilus* (6h après injection intrapéritonéale).

Concentration des bactéries inoculées	5,0.10 <sup>7</sup> / 0,5 mL	2,5.10 <sup>7</sup> / 0,5 mL
	Interféron (U / 100 µL)	
<i>L. bulgaricus</i>	256	32
<i>S. thermophilus</i>	4	4
Témoin (SSI)	ND	ND

Note : - SSI : solution saline isotonique  
- ND = activité non détectable

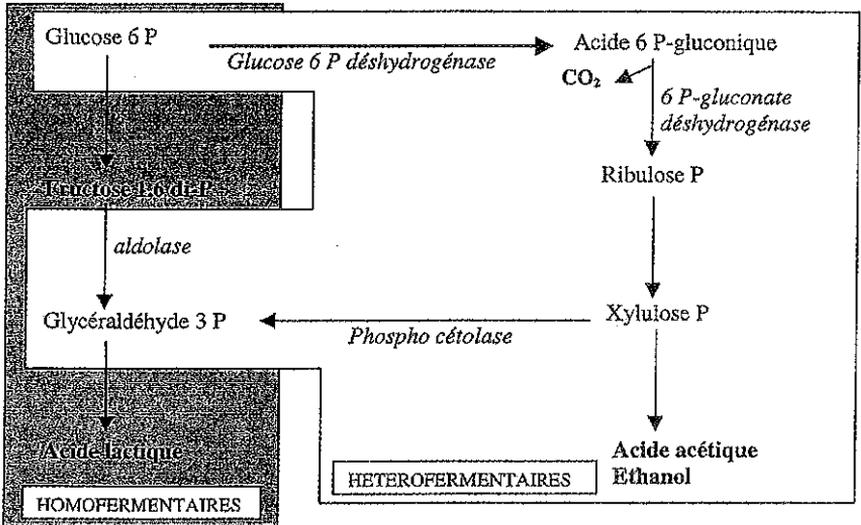
### Document 3

Activité résiduelle d'INF (U/100 µL) après incubation du sérum positif (100 unités d'interféron) avec des anticorps anti α/β ou anti γ.

	Anticorps bloquants utilisés		
	Néant	Anti α/β	anti γ.
	Activité résiduelle U d'INF/ 100 µL		
Echantillon du sérum de souris	256	ND	256
INF α/β étalon	1 024	ND	1 024
INF γ étalon	2 048	2 048	ND

## Document 4A

Les voies métaboliques de la production d'acide lactique

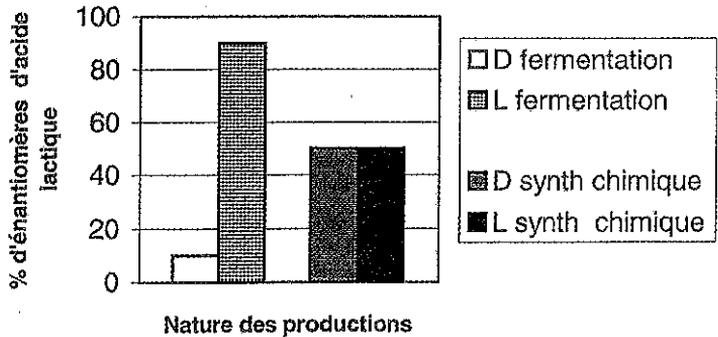


### FERMENTATIONS LACTIQUES

- Homofermentaires obligatoires : absence de glucose 6 P-déshydrogénase
- Homofermentaires facultatifs : présence des 4 enzymes
- Hétérofermentaires obligatoires : absence d'aldolase

## Document 4 B

Obtention d'acide lactique par deux procédés différents

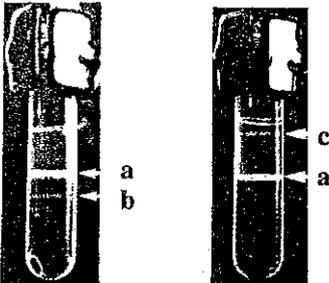


## Document 5

Croissance de *Lactobacillus delbrueckii* libre en milieu non renouvelé  
(glucose 4,8 % (m/v) ; fermenteur de 20L ; T : 43°C ; densité cellulaire finale :  $1,5 \cdot 10^9$  cellules/mL)

Temps (heure)	Biomasse (A à 600 nm)	Acide L-lactique (g/L)	pH
0	0,100	0	6,5
2	0,200	0,8	6
4	0,500	2,5	5,3
6	1,300	4,8	5
8	1,600	7,6	4,7
10	2,000	9,4	4,5
12	2,400	10,2	4,35
14	2,600	11	4,25
16	2,700	11,8	4,1
20	2,875	12,1	4
30	2,950	12,1	3,8

## Document 6A

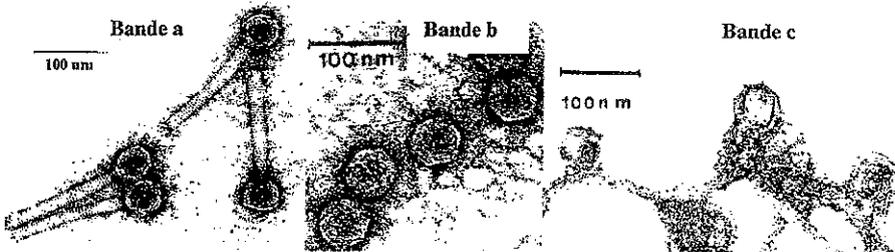


Centrifugation sur gradient de chlorure de césium  
préformé de deux suspensions phagiques

Les bandes obtenues sont indiquées par des pointes de flèche (a,b,c), la principale (a) ayant une densité de 1,5 dans les deux cas.

## Document 6B

Electromicrographies après coloration à l'acétate d'uranyle des éléments des différentes bandes.



## Document 7

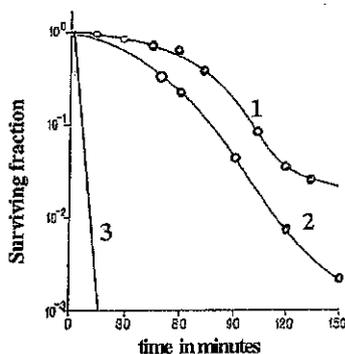
### Document 7A : Correlation between clearance zones and proteolytic activity in the untrated parentculture of *Lactobacillus delbrueckii*

Diameter of clearance zones (in mm)	Number of colonies examined	Number of colonies showing proteolytic activity (mg of tyrosine liberated/g)		
		Range 0,00-0,23	Range 0,24-0,31	Range 0,32-0,40
8 - 10	50	10	28	12
5 - 7	50	35	12	8
0 - 4	50	42	8	0

## Document 7 B

Survival curve of *Lactobacillus delbrueckii* after exposure to different chemical mutagens

- 1 : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)
- 2 : Ethylemine
- 3 : Ethyl-methane-sulfonate (EMS)



### Document 7C : Proteolytic activity of *L. delbrueckii* recovered after different treatment

mg of tyrosine liberated/g		Number of survivors after :		
range	average	EMS	Ethylemine	NTG
0,250-0,450	0,350	Control		
0,250-0,300	0,275	5	8	-
0,300-0,350	0,325	8	18	-
0,350-0,400	0,375	12	34	-
0,400-0,450	0,425	25	25	-
0,450-0,500	0,475	-	12	50
0,500-0,550	0,525	-	3	24
0,550-0,600	0,575	-	-	16
0,600-0,650	0,625	-	-	10

Moyenne de l'activité  
protéolytique :

	0,387	0,518
--	-------	-------

## Document 8

### Mini-préparation d'ADN plasmidique de bactéries Gram + lyse alcaline

Centrifuger 1,5 mL de culture pendant 30 secondes à 12 000 g et éliminer le surnageant. Remettre en suspension les bactéries dans 140  $\mu\text{L}$  de tampon TEG complété avec 10  $\mu\text{L}$  de la solution de lysozyme à 10 mg/mL. Agiter doucement par retournement. Incuber 5 à 10 minutes à 37°C.

Ajouter 200  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,2 M/SDS 1 % (m/v) et incuber 5 minutes dans la glace.

Ajouter 200  $\mu\text{L}$  d'acétate de potassium 3M à pH 4,8. Incuber 5 minutes dans la glace et centrifuger à 12 000 g pendant 15 minutes. Récupérer le surnageant.

Poursuivre par un traitement au PCI (phenol/chloroforme, alcool isoamylique), une précipitation à l'alcool et l'action d'une RNase.

Composition TEG :  
Tris 10 mM à pH 8  
EDTA à 1 mM  
Glucose à 1 % (m/v)

## Document 9

### Quantification UV d'une partie aliquote de la mini-préparation

Placer 4  $\mu\text{L}$  d'une mini-préparation d'ADN dans un tube cône contenant 996  $\mu\text{L}$  de tampon TE. Mélanger plusieurs fois par retournement.

Effectuer des mesures d'absorbance à 260 nm et 280 nm pour chacune des mini-préparations contre du TE.

## Document 10

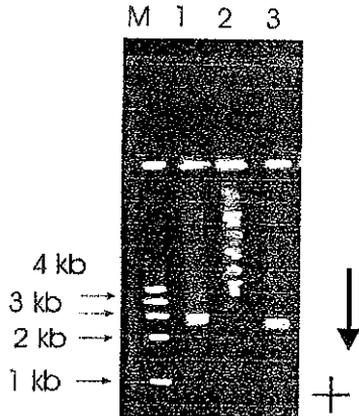
### Electrophorégramme de trois mini-préparations

agarose 1,2 % (m/v),

80 V, 30 min,  
coloration BEt

M = marqueur de taille

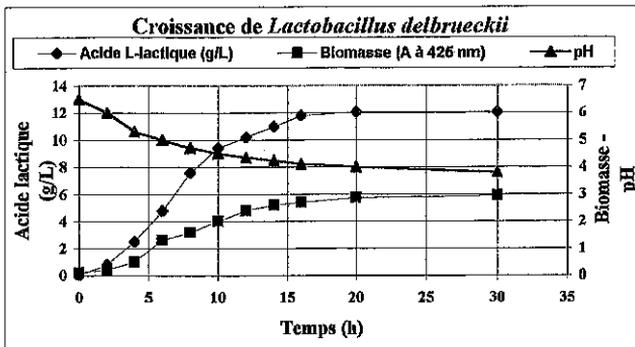
1,2,3 = mini-préparation



## PROPOSITION DE CORRIGE

Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

- 1.1 La production d'interféron varie : en fonction du temps et de la dose de bactéries injectée
- Pic transitoire : position à 4 et 6 h en fonction de la dose de bactéries injectée
  - Stimulation maximale de la production pour  $5.10^7$  bactéries (64 U d'interféron / 100  $\mu$ L)
- 1.2
- Témoin : injection de solution saline isotonique : absence de stimulation, activité non détectable
  - Avec *Lactobacillus bulgaricus*, on détecte 256 U d'interféron /100  $\mu$ L après inoculation de  $5.10^7$  bactéries et 32 U d'interféron /100  $\mu$ L après inoculation de  $2,5.10^7$  bactéries, on observe donc une stimulation de la production et il y a un effet dose.
  - Avec *Streptococcus thermophilus* aux deux concentrations testées, la production d'interféron est très réduite : 4 U / 100  $\mu$ L. La stimulation par rapport à celle obtenue avec les *L. bulgaricus* est très légère et on n'observe pas d'effet dose.
  - Pour une même dose de *L. bulgaricus* ( $2,5.10^7$  / 0,5 mL), la stimulation est plus importante en présence de *Streptococcus thermophilus* (document 1) :
    - 32 U d'interféron / 100  $\mu$ L : seul
    - 64 U d'interféron / 100  $\mu$ L : en association
- 1.3
- Neutralisation de l'activité antivirale de l'interféron par l'intervention d'anticorps spécifiques anti-interféron qui neutralisent cette activité biologique.
  - Les témoins sont les suivants :
    - Témoin interféron (1<sup>ère</sup> colonne) : activité de l'interféron en absence d'anticorps
    - Témoins réactifs anticorps :
      - INF  $\alpha/\beta$  étalon + anticorps anti  $\alpha/\beta$  : perte de l'activité de l'INF, cette activité est conservée avec les anticorps anti  $\gamma$  (2048 U/100 $\mu$ L)
      - INF  $\gamma$  étalon + anticorps anti  $\gamma$  : perte de l'activité de l'INF, cette activité est conservée avec les anticorps anti  $\alpha/\beta$  (1024 U/100 $\mu$ L)
  - Donc la neutralisation est efficace et il n'y a pas de réaction croisée.
  - L'échantillon de sérum positif testé présente une activité antivirale de 256 U/100 $\mu$ L. Cette activité reste la même si on préincube le sérum en présence d'anticorps anti  $\gamma$  mais est nulle si on préincube les anticorps en présence d'anticorps anti  $\alpha/\beta$ .  
Donc le sérum des souris contient des interférons  $\alpha/\beta$  mais on ne peut trancher entre ces deux types d'interféron.
- 2.1.1. Homofermentaire : uniquement de l'acide lactique sans acide acétique, ni éthanol ni CO<sub>2</sub>.  
Obligatoire car alors pas de glucose 6 phosphate déshydrogénase qui entraîne une consommation annexé inutile de glucose.
- 2.1.2 On synthétise majoritairement (90 %) du L-lactate par voie microbiologique, alors que par synthèse chimique on obtient un mélange racémique (autant de forme D que de L).
- 2.2.1.



2.2.2. Le pH diminue au cours de la fermentation, en raison de la production d'acide qui provoque l'augmentation de sa concentration en fonction du temps.

2.2.3. Métabolite primaire, corrélation entre courbe de production et courbe de croissance

$$2.2.4. PVHF = \frac{Pf - Pi}{tf - ti} = 12,1 / 30 = 0,40 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

$$2.2.5. \text{Productivité horaire par cellule libre} = PHCl = \frac{PVHF}{X} = 0,4 / 1,5 \cdot 10^9 \cdot 10^3 = 2,7 \cdot 10^{-13} \text{ g.cellule}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

2.2.6. Le rendement (ou taux de conversion) est appelé « yield factor »  $YF_{\text{lactate/glucose}} = \Delta P / \Delta S = 95 \% = 0,95$   
d'où  $\Delta P = 12,1 \times 20 = 242 \text{ g d'acide L-lactique produit}$   
Le fermenteur contenait  $S_0 = 4,8 \times 20 / 0,1 = 960 \text{ g de glucose initial}$   
La quantité de glucose consommé est donc  $\Delta S = S_f - S_0$   
D'où la quantité résiduelle  $S_f = (R S_0 - \Delta P) / R = (0,95 \times 960 - 242) / 0,95 = 705 \text{ g}$

- 3.1. **Bande b** : les « têtes » des phages sont pleines (l'ADN est présent) : la densité est supérieure car les particules sont plus compactes (la queue des virions est absente)  
**Bande c** : particules entières et vides : leur densité est plus faible que particules de la bande a car l'ADN a été perdu : il s'agit de phages après l'infection bactérienne, on parle aussi de « fantômes »  
**Bande a** : particules entières et intactes, or pour la transduction l'intégrité de ces deux éléments est indispensable (queue pour l'adsorption et tête pour l'ADN)

#### 3.2.1.

- Milieu opaque permettant de lire la protéolyse : milieu à la caséine, gélose au lait ou autre
- La protéolyse permet d'observer un halo d'éclaircissement (transparenciation) sur fond opaque, dont le diamètre sera proportionnel à l'activité protéolytique
- On sélectionnera des clones présentant de grands diamètres d'éclaircissement de la gélose
- Cela affine la présélection, sur 50 clones à large halo, 10 sont éliminés en raison de leur faible activité protéolytique exprimée en tyrosine libérée. Parmi les clones, 3 catégories sont distinguées, mais la corrélation n'est pas parfaite entre l'activité sur boîte et le résultat de l'analyse biochimique.

3.2.2. La courbe 3 (EMS) présente un trop fort taux de létalité, les deux autres mutagènes peuvent être utilisés.

$$3.2.3. \text{Moyenne pondérée} = ((5 \times 0,275) + (8 \times 0,325) + (12 \times 0,375) + (25 \times 0,425)) / 50 = 0,382 \text{ mg/g}$$

Les mutants obtenus avec le NTG présentent la plus grande activité protéolytique moyenne et la plus augmentée par rapport au témoin, c'est donc l'agent mutagène le plus intéressant.

#### 4.1.1.

- Le lysozyme est responsable de la lyse du peptidoglycane de paroi.
- NaOH / SDS : provoque la dénaturation des protéines membranaires (le SDS est un détergent) et la dénaturation des ADN plasmidique et chromosomique de double à simple brin
- Acétate de potassium : variation de pH provoquant la renaturation de l'ADN plasmidique. L'ADN chromosomique précipite, ainsi que les protéines (dénaturées par le SDS) à cause des variations de la force ionique.

$$4.1.2.1. \text{Concentration en ADN plasmidique} = A \times k \times f_4 = 0,132 \times 50 \times 250 = 1,65 \mu\text{g} / \text{mL ADN double brin}$$
$$A_{260} / A_{280} = 0,132 / 0,08 = 1,65 : \text{cette valeur est inférieure à } 1,7, \text{ donc il y a des traces protéiques.}$$

4.1.2.2. Piste n°3 : le plasmide a une taille de 4 kb, et on observe une bande d'ADN plasmidique à 2,3 kb : seule la forme superenroulée, qui migre plus vite, est présente

Piste n°2 : pas de plasmide, ni à 4 ni à 2,3 kb, on observe un « smear » d'ADN chromosomique hydrolysé.

4.2. La digestion double permettra d'insérer le fragment d'ADN d'intérêt dans la bonne orientation.  
Digestion double successive : les forces ioniques de travail des deux enzymes sont différentes, donc il est logique de procéder dans l'ordre suivant :

1 : force ionique moyenne, permettant le travail de *Bam* III

2 : addition de NaCl pour augmenter la force ionique, ce qui permet le travail de *Not* I



### 1.1.3. Résultats

- Montrer un état frais présentant des zygotes à l'examineur.
- Dessiner l'ensemble des morphologies particulières observées.
- Conclure sur le type sexuel de la souche H.

### 1.2. Contrôle de pureté de la souche H

- Isoler la souche H sur milieu YPD et incuber 24 h à 28°C.

## DEUXIEME PARTIE : (20 points)

### CONTRÔLE DE LA VIABILITE D'UNE SOUCHE BACTERIENNE NECESSAIRE A L'AMPLIFICATION D'UN VECTEUR NAVETTE

Une souche d'*Escherichia coli* est rendue compétente par un nouveau traitement au chlorure de calcium – chlorure de manganèse.

La suspension initiale est une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance à 0,4 d'absorbance (600 nm). Un volume de 20 mL de culture est centrifugé, puis le culot bactérien est repris dans 2 mL de solution de traitement.

On évalue la viabilité des cellules après traitement par dénombrement sur milieu gélosé, par la technique des « spots ».

#### 2.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 2 mL de suspension de bactéries traitées.
- 1 flacon d'eau physiologique stérile.
- Tubes à hémolyse stériles
- 2 géloses nutritives coulées en boîtes de Pétri.

#### 2.2. Mode opératoire

- Sachant qu'une unité d'absorbance correspond à  $5 \cdot 10^8$  cellules par mL., réaliser une gamme de 6 dilutions successives, judicieusement choisies.
- Un spot donne un résultat lisible s'il apparaît entre 10 et 20 colonies.
- Déposer 10  $\mu$ L de chaque dilution, en spot sur la gélose. Réaliser les essais en double.
- Laisser sécher les dépôts avant incubation, 18 h à 37°C.

#### 2.3. Compte-rendu

- Justifier le choix des dilutionsensemencées.

## TROISIEME PARTIE : (70 points)

### DETERMINATION DU POURCENTAGE DE GC D'UN ADN EU CaryOTE

On dispose d'une solution d'ADN que l'on se propose de doser, de concentrer, et dont on souhaite déterminer le pourcentage en GC.

#### 3.1. Matériel et réactifs

On dispose de :

- 10 mL de solution d'ADN à doser en tampon SSC
  - 20 mL de tampon SSC (Sodium saline citrate)  
*tampon citrate de sodium 0,015 moles par litre, pH 7, NaCl 0,15 moles par litre.*
  - 10 mL de solution étalon d'ADN de thymus de veau à 400  $\mu$ g/mL.
  - Réactif à la diphénylamine en flacon distributeur
  - 12 mL d'acide trichloroacétique (ATCA)
  - 20 mL de formamide
  - 5 mL d'éthanol à 95%
- 2000-35**

### 3.2. Dosage absorptiométrique de l'ADN dans l'U.V.

- Préparer en tube à hémolyse 2,1 mL de dilution au 1/21<sup>ème</sup> de la solution d'ADN, en tampon SSC.  
*Opérer en présence d'un examinateur*  
Mesurer les absorbances à 260 nm et à 280 nm de cette dilution contre du tampon SSC, en utilisant des cuves quartz.

#### Compte-rendu :

- Déterminer le rapport  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  : que peut-on en déduire quant à la pureté de cet ADN ?
- Sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond en moyenne à 50 µg d'ADN par mL, déterminer la concentration en ADN de la solution.

### 3.3. Dosage colorimétrique de l'ADN

Il est basé sur la réaction spécifique des 2-désoxyribose avec la diphenylamine, en milieu acide à chaud.

- On dispose d'une solution étalon d'ADN de thymus de veau à 400 mg/L.  
A l'aide de cette solution, réaliser une gamme d'étalonnage en tubes à essai selon le protocole ci-dessous :

Quantité en µg d'ADN par tube	0	200	400	600	800
ATCA	Qsp 2 mL				
Diphénylamine ( mL)	4	4	4	4	4

- Mélanger au vortex puis boucher les tubes avec du papier d'aluminium.
- Chauffer 10 minutes à 100°C puis refroidir rapidement sous un courant d'eau froide.
- Lire l'absorbance à 595 nm contre le tube 0.
- Doser la solution d'ADN inconnue en opérant selon le même protocole que pour la gamme d'étalonnage ; réaliser 2 essais. La prise d'essai à utiliser sera déduite du résultat obtenu en 3.2.

#### Compte-rendu :

- Tracer la courbe d'étalonnage et déterminer la concentration de la solution d'ADN de mammifère.
- Comparer le résultat obtenu avec celui trouvé en 3.2., puis discuter.

### 3.4. Concentration de l'ADN

A partir de la solution fournie, on souhaite préparer 250 µL de solution d'ADN à 600 µg/mL. Pour cela, un volume adéquat, à déterminer, de la solution fournie d'ADN est précipité par l'éthanol. Le précipité d'ADN est, après séchage, redissout et concentré dans 250 µL de tampon SSC.

- A partir de la valeur d'absorbance à 260 nm déterminée en 3.2., calculer le volume de solution d'ADN fournie à précipiter.
- Déposer ce volume dans un microtube. Ajouter 2,5 volumes d'éthanol à 95%. Laisser 15 minutes à 4°C. Centrifuger 15 minutes à vitesse maximale.
- Éliminer le surnageant et sécher le précipité obtenu pendant 15 minutes autour du bec.  
Le montrer à un examinateur.
- Ajouter 250 µL de tampon SSC.  
*Remettre ce tube à l'examineur ; la redissolution se fera pendant la nuit.*

#### Compte-rendu :

- Indiquer le calcul du volume de solution précipitée.

### 3.5. Etude de la fusion thermique de l'ADN en présence de formamide

- Préparer un "mix" en petit erlen en mélangeant :

15 mL	de formamide
10 mL	de tampon SSC
5 mL	de solution d'ADN inconnu

Ajouter les réactifs dans l'ordre et opérer dans la glace.

*Attention : la formamide est toxique : éviter tout contact avec la peau.*

- Déposer 2 mL de ce « mix » par tube dans 10 tubes à hémolyse marqués respectivement 0°C - 100°C - 30°C - 35°C - 40°C - 45°C - 50°C - 55°C - 60°C - 65°C
- Stocker ces tubes dans la glace, après les avoir bouchés hermétiquement avec du papier d'aluminium et du parafilm.
- Pour les tubes autres que 0°C et 100°C, opérer de la manière suivante :
  - Incuber chaque tube pendant 15 minutes, à la température correspondante (35° pour le tube 35° C,.....).
  - Le placer alors immédiatement dans la glace et l'y laisser 5 minutes.
  - Lire alors l'absorbance à 275 nm, en cuves spectrophotométriques UV semi-micro à usage unique, contre un blanc constitué de 1 mL de formamide et de 1 mL de tampon SSC.
- Laisser le tube dans la glace si le(s) spectrophotomètre(s) UV n'est pas disponible.

*Remarque : l'absorbance est lue à 275 nm et non à 260 nm car la formamide absorbe très fortement à cette dernière longueur d'onde, ainsi que la cuve UV à usage unique.*

- Le tube 0°C est laissé dans la glace jusqu'au moment de la lecture de l'absorbance à 275 nm.
- Le tube 100°C est placé 5 minutes dans un bain-marie bouillant puis refroidi immédiatement 5 minutes dans la glace avant la lecture de l'absorbance à 275 nm.

#### Compte-rendu :

- Tracer la courbe  $A_{275\text{ nm}} = f(\text{température d'exposition})$ .  
Décrire et interpréter son allure. Quel est le rôle des tubes 0°C et 100°C ?  
Déterminer graphiquement la  $T_m$  (température moyenne de fusion) de l'ADN eucaryote dans les conditions de l'expérience.
- En déduire le pourcentage en GC de cet ADN en utilisant la formule :
$$T_m = 81,5 + (16,6 \times \log [\text{Na}^+]) + (0,41 \times \% \text{GC}) - (0,65 \times \% \text{F}).$$
*Tampon citrate NaCl, pH7, 0,15 moles par litre.*

### QUATRIEME PARTIE : (50 points)

#### CONTRÔLE D'UN CARACTERE GÉNÉTIQUE D'UNE LIGNEE CELLULAIRE.

L'une des méthodes d'évaluation du pouvoir mutagène de substance génotoxique consiste à rechercher à partir de cellules en culture et après exposition à la substance à tester l'apparition de mutation au locus HGPRT. Les cellules HGPRT(-) deviennent sensibles à l'action cytotoxique de l'aminoptérine même en présence d'hypoxanthine et de thymidine ( mélange HAT).

On se propose, à l'aide d'une méthode colorimétrique d'évaluation de la viabilité d'une population cellulaire : méthode au MTT ( Bromure de diméthyl-thiazoldiphényl tétrazolium ), de déterminer la sensibilité au mélange HAT des cellules d'une lignée cellulaire ayant été soumise à l'action d'une substance mutagène.

## 4.1. Quantification colorimétrique des cellules

### 4.1.1 Matériel et réactifs

On dispose de :

- 1,5 mL d'une suspension de cellules à étudier cultivant en monocouche.
- 10 mL de milieu de culture complet
- 0,5 mL de solution bleu Trypan à 0,4%
- Hématimètre et compteur de cellules
- Plaque de culture de 96 puits
- 0,3 mL d'une solution de MTT à 10 mg par mL. ( distribuée à la demande )
- 5 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Solution de tampon phosphate salin ( PBS.)

### 4.1.2 Numération et ajustage de la suspension cellulaire

- Réaliser une numération de la suspension cellulaire en présence de bleu Trypan à 0,1 % final.  
*La numération sera montrée à un examinateur.*
- Préparer 1 500  $\mu\text{L}$  de suspension à  $5.10^5$  cellules par mL en milieu de culture complet.  
*Utiliser rapidement cette suspension cellulaire pour les deux manipulations suivantes.*

### 4.1.3 Mesure de la réduction du MTT

Les cellules vivantes sont capables de réduire le MTT jaune et hydrosoluble en un dérivé insoluble violet. L'intensité de la réduction révélée par l'intensité de la coloration est fonction du nombre de cellules vivantes.

- A partir d'une suspension préparée, distribuer dans la plaque de culture en double essai les quantités de cellules suivantes par puits : 10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 et 60 000 sous un volume final de milieu de culture de 120  $\mu\text{L}$ . Réaliser en A1 et B1 les tests témoins pouvant servir de blanc optique.
- Placer les cellules 2,5 heures à 37 °C dans l'étuve à CO<sub>2</sub> à 5 %.
- Distribuer 10  $\mu\text{L}$  de solution de MTT.
- Incuber les cellules 1 heure à 37 °C dans l'étuve à CO<sub>2</sub> à 5 %.
- Après ce délai, éliminer le milieu dans le bac de Javel.
- Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de DMSO et agiter 10 minutes.
- Remettre la plaque clairement identifiée à un membre du jury qui se chargera de la lecture de l'absorbance à 570 nm par référence aux témoins en A1 et B1.

### 4.1.4 Résultats

- Déterminer la concentration cellulaire.
- Présenter le protocole suivi, tracer la courbe représentative de la variation d'absorbance à 570 nm en fonction du nombre de cellules par puits et l'analyser.

## 4.2 Etude de la sensibilité de la lignée au réactif HAT

### 4.2.1 Matériel et réactifs

On dispose de :

- 250  $\mu\text{L}$  de solution stock de mélange HAT ( H : 10 mmol/L, A : 40  $\mu\text{mol/L}$ , T : 1,6 mmol/L ) en milieu de culture
- Plaque de culture utilisée en 4.1
- Barrettes de cupules

#### 4.2.2 Mode opératoire

- Distribuer 60  $\mu\text{L}$  de la suspension ajustée à 5.105 cellules par mL dans 12 cupules de la plaque.
- Laisser sédimenter les cellules 2 heures à 37 °C dans l'étuve à  $\text{CO}_2$ .
- A partir de la solution du mélange HAT concentré disponible, réaliser une série de dilutions successives de raison 1/3, en milieu de culture complet sous un volume de 100  $\mu\text{L}$ , de 1/3 à (1/3)<sup>10</sup>. Utiliser les barrettes de cupules pour ces dilutions.
- Incuber à 37 °C en présence de 5 % de  $\text{CO}_2$  jusqu'au lendemain.

#### 4.2.3 Résultats

Donner sous forme de tableau les dilutions réalisées et la composition des différentes cupules.  
Quel résultat caractériserait une lignée HGPRT (-) ?

**A LA FIN DE L'ÉPREUVE REMETTRE CE SUJET AVEC LA COPIE.**

## DEUXIEME JOUR

*Durée : 1 heure 30 minutes (L'épreuve débutera à 10 h 30)*

### PREMIERE PARTIE

**Contrôle de pureté de la souche H**

Lire le résultat de l'isolement et conclure.

### DEUXIEME PARTIE

**Contrôle de la viabilité de la souche d'*Escherichia coli***

- Lire les dénombrements et présenter les résultats.
- A partir de ces résultats et des données du premier jour, calculer le % de survivants dans la culture après traitement. Conclure sachant qu'un traitement habituel au chlorure de calcium permet d'obtenir au maximum 10% de survivants.

### TROISIEME PARTIE

**Concentration de l'ADN**

- Préparer en tube à hémolyse 2,1 mL de dilution au 1/21<sup>ème</sup> de la solution d'ADN concentré, en tampon SSC. Mesurer l'absorbance à 260 nm de cette dilution contre du tampon SSC, en utilisant des cuves en quartz.  
*Cette mesure d'absorbance doit être effectuée en présence de l'examineur.*
- Déterminer la concentration en ADN de la solution concentrée
- Conclure par rapport à l'objectif visé de 600 µg/mL.

### QUATRIEME PARTIE (SUITE)

**Contrôle du caractère HGPRT(-) d'une lignée cellulaire.**

- Pour visualiser l'action du réactif HAT sur la lignée étudiée, le MTT a été distribué dans les cupulesensemencées la veille. Après dissolution par apport de solvant, la lecture des absorbances a été réalisée.
- A partir des absorbances mesurées :
  - tracer la courbe représentative de la variation d'absorbance à 570 nm en fonction du logarithme décimal de l'inverse de la dilution finale du réactif HAT
  - en déduire la concentration finale du réactif à utiliser dans le cas où l'on voudrait sélectionner des cellules HGPRT (+) mélangées aux cellules de la lignée étudiée.

Achévé d'imprimer le 3<sup>e</sup> trimestre 2000  
Directeur de la publication : Jean-Noël JOFFIN

**ANNALES  
BTS BIOCHIMISTE  
BTS BIOTECHNOLOGIE**

**Sessions 1999-2000**

**UPBM-Édition  
Publications de l'UPBM**

consulter le site internet :  
<http://www.multimania.com/upbm>

**ISBN 2-910069-31-1**



9 782910 069315