

Annales du Brevet de Technicien Supérieur

BIOTECHNOLOGIES

2011-2012-2013

Éditions UPBM-ÉDILION

Les Annales du BTS **Biotechnologies Sessions 2011-2012** ont été réalisées par Sylvain André, Laurent Desfarges, Sandrine Doucet et Marie Pantaloni.

Nous remercions les collègues qui ont bien voulu collaborer à la réalisation de ces annales, en collectant des sujets ou en rédigeant des corrigés, parmi lesquels :

Jean-Louis Brun (sciences physiques), Jean-Michel Dagoury, Paul Gendra et Isabelle Minier (Mathématiques).

Des erreurs se sont, sans aucun doute, glissées dans les textes. Veuillez nous en excuser et n'hésitez pas à nous les signaler. Des correctifs pourront alors être diffusés sur le site de l'UPBM. (<http://www.upbm.org>)

Les remarques des fautes d'un ouvrage se feront avec modestie et civilité, et la correction en sera soufferte de la mesme sorte » (Statuts & Reglemens de l'Academie française du 22 février 1635, art. XXXIV).

Illustration de couverture :

1ère page : marquage de fibroblastes embryonnaires de poulet par des anticorps anti- α tubuline couplés au FITC, et marquage de l'ADN au DAPI.

4^e page : observation au microscope à épifluorescence de cellules HEK 293 transfectées avec un plasmide exprimant le gène de la YFP.

Manipulations réalisées au lycée Jacques Monod, St jean de Braye.

ISBN 978-2-910069-73-5



Éditions UPBM – ÉDILION Lycée la Martinière – Duchère
Avenue Andreï Sakharov – 69338 LYON Cedex 9

Table des matières

BTS Biotechnologies : Définition de la nature des épreuves.....	5
Session 2011 : sujets et éléments de corrigé.....	6
2011 – U11 : Mathématiques.....	7
2011 – U12 : Sciences physiques et chimiques.....	11
2011 – U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	17
2011 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	23
2011 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire.....	29
2011 – U42 : Biologie cellulaire.....	35
2011 – ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ.....	40
U11 : Mathématiques.....	41
U12 : Sciences physiques et chimiques.....	46
U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	51
U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	56
U41 : Microbiologie et génie fermentaire.....	58
U42 : Biologie cellulaire.....	61
Session 2012 : sujets et éléments de corrigé.....	64
2012 – U11 : Mathématiques.....	65
2012 – U12 : Sciences physiques et chimiques.....	68
2012 – U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	73
2012 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	79
2012 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire.....	85
2012 – U42 : Biologie cellulaire.....	91
2012 – ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ :	98
U11 : Mathématiques.....	99
U12 : sciences physiques et chimiques.....	104
U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	109
U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	115
U41 : Microbiologie et génie fermentaire.....	118
U42 : Biologie cellulaire.....	123
Session 2013 : sujets et éléments de corrigé.....	127
2013 – U11 : Mathématiques.....	128
2013 – U12 : Sciences physiques et chimiques.....	132
2013 – U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	138
2013 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	146
2013 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire.....	154
2013 – U42 : Biologie cellulaire.....	161

2013 – ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ.....	168
U11 : mathématiques.....	169
U12 : sciences physiques et chimiques.....	173
U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	179
U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	184
U41 : Microbiologie et génie fermentaire.....	187
U42 : Biologie cellulaire.....	191
Travaux pratiques de biotechnologies.....	195
U51 : TP de biologie moléculaire et génie génétique.....	196
U52 : TP de biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	198
U53 : TP de microbiologie – génie fermentaire.....	200
U54 : TP de biologie et technologies cellulaires.....	202
U6 : Rapport de stage et soutenance.....	204
PUBLICATIONS DE L'UPBM.....	206

BTS Biotechnologies : Définition de la nature des épreuves

TABLEAU DES ÉPREUVES

Désignation		Coefficients	Nature de l'épreuve	Durée
<i>Épreuves écrites</i>				
E1 : mathématiques et sciences physico- chimiques	Mathématiques	1	écrite	
	Sciences physiques et chimiques	1	écrite	
E 2 : biologie moléculaire et génie génétique		1	écrite	
E 3 : biochimie structurale et fonctionnelle des protéines		1	écrite	
E4 : Biologie des procaryotes et des eucaryotes	Microbiologie et génie fermentaire	1	écrite	
	Biologie cellulaire	1	écrite	
<i>Épreuves pratiques</i>				
E5 : travaux pratiques de biotechnologies :	Biologie moléculaire et génie génétique	1	CCF / ponctuelle	
	Biochimie des protéines	1	CCF / ponctuelle	
	Microbiologie et génie fermentaire	1	CCF / ponctuelle	
	Biologie cellulaire	1	CCF / ponctuelle	
<i>Épreuves orales</i>				
Rapport de stage et soutenance		4	Orale	
TOTAL				
<i>Épreuve facultative</i>				
La.gue vivante étrangère (épreuve orale, seuls les points au dessus de la moyenne sont pris en compte)		1	Orale	20 min

Session 2011 : sujets et éléments de corrigé

2011 – U11 : Mathématiques

Durée 2 h – coefficient 1

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.

1. EXERCICE 1 (11 points)

Les parties A et B de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

1.1. Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) : $5y' + y = e^{-0,2t}$,

où y est une fonction de la variable réelle t , définie et dérivable sur l'intervalle $[0, +\infty[$, et y' la fonction dérivée de la fonction y .

1. Déterminer les solutions sur l'intervalle $[0; +\infty[$ de l'équation différentielle (E_0) : $5y' + y = 0$.
2. Soit h la fonction définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par : $h(t) = at e^{-0,2t}$, où a est une constante réelle.
Déterminer a pour que la fonction h soit une solution particulière de l'équation différentielle (E).
3. En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E).
4. Déterminer la solution f de l'équation différentielle (E) qui vérifie la condition initiale : $f(0) = 0$.

1.2. Étude d'une fonction

Soit la fonction f définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par : $f(t) = 0,2 t e^{-0,2t}$

On note C la courbe représentative de la fonction f dans le plan muni d'un repère orthogonal.

1. Déterminer la limite de la fonction f en $+\infty$.
Que peut-on en déduire pour la courbe C ?
2. On désigne par f' la fonction dérivée de la fonction f .
Montrer que pour tout t de l'intervalle $[0; +\infty[$: $f'(t) = (-0,04 t + 0,2) e^{-0,2t}$.
3. Étudier les variations de la fonction f sur l'intervalle $[0; +\infty[$ et donner son tableau de variations. On précisera les valeurs remarquables de t et $f(t)$.
- 4.

a) Recopier et compléter le tableau de valeurs ci-dessous. On arrondira les résultats à 10^{-2} .

X	0	2,5	5	10	15	20	25
f(x)							

b) Tracer la courbe C sur la feuille de papier millimétrée fournie.

Sur l'axe des x, 2 cm représentent 5 unités. Sur l'axe des y, 2 cm représentent 0,05 unités.

1.3. Application

À l'aide d'une perfusion, on injecte pendant cinq minutes un médicament antalgique à un patient. Après l'injection, l'organisme élimine peu à peu le médicament.

On s'intéresse à la quantité de médicament présente dans l'organisme du patient au cours du temps. L'instant $t = 0$ correspond au début de l'injection.

On fait l'hypothèse qu'à l'instant t , exprimé en minute (min), la quantité de médicament, exprimée en millilitre (mL), est égale à $f(t) = 0,2 t e^{-0,2t}$, où f est la fonction étudiée dans la partie B.

1. Déterminer graphiquement, à une minute près, l'instant à partir duquel la quantité de médicament **redevient** inférieure à 0,05 mL.

On fera apparaître les traits de construction utiles sur le graphique.

2.

a) On considère la fonction F définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par $F(t) = (-t - 5) e^{-0,2t}$.

Montrer que la fonction F est une primitive de la fonction f .

b) En déduire la valeur moyenne de la fonction f sur l'intervalle $[0; 23]$. On donnera la valeur exacte puis une valeur approchée arrondie à 10^{-2} .

c) Que représente la valeur moyenne calculée au b) dans le contexte de l'exercice?

2. EXERCICE 2 (9 points)

Les trois parties de cet exercice sont indépendantes.

Une usine fabrique des tubes en polyéthylène pour le chauffage géothermique.

On s'intéresse à trois types de tubes appelés tubes de type 1, tubes de type 2 et tubes de type 3.

2.1. Loi normale

Un tube de type 1 est accepté au contrôle si son épaisseur est comprise entre 1,35 millimètres et 1,65 millimètres.

1. On désigne par X la variable aléatoire qui à chaque tube de type 1 prélevé au hasard dans la production d'une journée associe son épaisseur exprimée en millimètre.

On suppose que la variable aléatoire X suit la loi normale de moyenne 1,5 et d'écart type 0,07.

Calculer la probabilité qu'un tube de type 1 prélevé au hasard dans la production de la journée soit accepté au contrôle. On donnera le résultat arrondi à 10^{-2} .

2. L'entreprise désire améliorer la qualité de la production des tubes de type 1: il est envisagé pour cela de modifier le réglage des machines produisant ces tubes.

On note X_1 la variable aléatoire qui, à chaque tube de type 1 prélevé dans la production future, associe son épaisseur. On suppose que la variable aléatoire X_1 suit une loi normale de moyenne 1,5 et d'écart type σ_1 .

Déterminer σ_1 pour que la probabilité qu'un tube de type 1 prélevé au hasard dans la production future soit accepté au contrôle soit égale à 0,99.

On donnera le résultat arrondi à 10^{-2} .

2.2. Loi binomiale

On considère un lot de tubes de type 2.

On note E l'événement: « un tube prélevé au hasard dans ce lot de tubes de type 2 est défectueux. ». On suppose que $P(E) = 0,02$.

On prélève au hasard 20 tubes de type 2 dans ce lot pour vérification.

Le lot est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement de 20 tubes de type 2 à un tirage avec remise.

On considère la variable aléatoire Y_1 qui, à tout prélèvement de 20 tubes de type 2, associe le nombre de tubes défectueux de ce prélèvement.

1. Justifier que la variable aléatoire Y_1 suit une loi binomiale dont on donnera les paramètres.

2. Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement, au plus un tube soit défectueux. On donnera le résultat arrondi à 10^{-2} .

2.3. Test d'hypothèse

Un client a passé une commande de tubes de type 3. La longueur de ces tubes doit être de 300 millimètres. On se propose de construire un test d'hypothèse bilatéral pour contrôler, au moment de la livraison, la moyenne μ de l'ensemble des longueurs, en millimètres, des tubes de type 3.

On note Z la variable aléatoire qui, à chaque tube de type 3 prélevé au hasard dans la livraison, associe sa longueur en millimètre. La variable aléatoire Z suit la loi normale de

moyenne inconnue μ et d'écart type $\sigma = 1$.

On désigne par \bar{Z} la variable aléatoire qui, à chaque échantillon aléatoire de 100 tubes de type 3 prélevés dans la livraison, associe la moyenne des longueurs, en millimètre, des tubes de cet échantillon. La livraison est assez importante pour que l'on puisse assimiler ces prélèvements à des tirages avec remise.

L'hypothèse nulle est $H_0 : \mu = 300$. L'hypothèse alternative est $H_1 : \mu \neq 300$.

Le seuil de signification du test est fixé à 0,05.

1. Sous l'hypothèse H_0 , on admet que la variable aléatoire \bar{Z} suit la loi normale de

moyenne 300 et d'écart type $\frac{1}{\sqrt{100}} = 0,10$.

Déterminer sous cette hypothèse le nombre réel positif h tel que :

$$P(300 - h \leq \bar{Z} \leq 300 + h) = 0,95$$

On donnera le résultat arrondi à 10^{-2} .

2. En déduire la règle de décision permettant d'utiliser ce test.

3. On prélève un échantillon de 100 tubes de type 3 dans la livraison et on observe que, pour cet échantillon, la moyenne des longueurs des tubes est : $\bar{z} \approx 299,90$, valeur arrondie à 10^{-2} .

Peut-on, au seuil de 5 %, conclure que la livraison est conforme pour la longueur?

2011 – U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée 2 h – coefficient 1

Calculatrice autorisée.

La correction de l'épreuve tiendra le plus grand compte de la clarté dans la conduite de la résolution et dans la rédaction de l'énoncé des lois, de la comptabilité de la précision et des résultats numériques avec celle des données de l'énoncé (nombre de chiffres significatifs), du soin apporté aux représentations graphiques éventuelles et de la qualité de la langue française dans son emploi scientifique.

1. PHYSIQUE (16 points)

Le phosphore 32, radioélément émetteur β^- , est souvent utilisé en biochimie pour étudier les acides nucléiques ou la phosphorylation des protéines. En radiothérapie, il est aussi utilisé sous forme de phosphate de sodium pour le traitement des polyglobulies ou maladie de Vaquez.

Données : extrait de la classification périodique :

$_{13}Al$	$_{14}Si$	$_{15}P$	$_{16}S$	$_{17}Cl$	$_{18}Ar$
-----------	-----------	----------	----------	-----------	-----------

Célérité de la lumière dans le vide : $c = 3,00 \times 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$

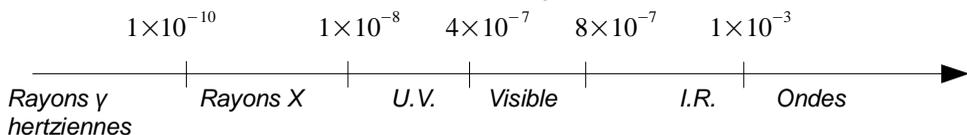
Constante de Planck : $h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$

Unité de masse atomique : $1u = 1,66 \times 10^{-27} \text{ kg}$

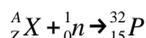
Électronvolt : $1 \text{ eV} = 1,60 \times 10^{-19} \text{ J}$

Masse de certains noyaux et particules	$_{15}^{32}P$	β^-	$_{Z}^A Y$
	31,98408 u	$5,485 \times 10^{-4} \text{ u}$	31,98220 u

Domaines usuels du spectre des ondes électromagnétiques :



1.1. Le phosphore $_{15}^{32}P$ est obtenu par la réaction suivante :



1.1.1. Donner la composition du noyau de phosphore 32.

1.1.2. Que représentent les nombres A et Z ? identifier le noyau X en justifiant votre raisonnement.

1.2. Le phosphore 32 (${}^{32}_{15}\text{P}$) est émetteur β^- .

1.2.1. Quelle est la nature de la particule émise ? Écrire son symbole utilisé en radioactivité.

1.2.2. Soit le ${}^A_Z\text{Y}$ noyau fils du phosphore 32. Écrire la réaction de désintégration du radioélément ${}^{32}_{15}\text{P}$. Identifier ${}^A_Z\text{Y}$.

1.3. Aspect énergétique de la désintégration.

1.3.1. Calculer l'énergie libérée E par cette désintégration. Exprimer le résultat dans le système international d'unités puis en MeV.

1.3.2. On suppose que cette énergie est exclusivement émise sous forme de rayonnement électromagnétique. Quelle est la longueur d'onde associée à ce rayonnement ? À quel domaine appartient-il ?

1.4. Le temps de demi-vie (ou période radioactive) du phosphore 32 est $T = 14,3$ jours. En radiothérapie, le phosphore 32 est injecté en intraveineuse au patient. La solution injectée a une activité initiale de $2,60 \times 10^9 \text{ Bq}$.

1.4.1. Donner la définition du temps de demi-vie (ou période radioactive).

1.4.2. Définir une activité de 1 Becquerel (1 Bq).

1.4.3. Calculer la constante de désintégration radioactive du phosphore 32. Exprimer ce résultat en s^{-1} .

1.4.4. Connaissant la valeur de l'activité initiale, en déduire le nombre de noyaux de phosphore 32 contenus dans la solution injectée au patient.

1.4.5. On suppose que le phosphore 32 n'est pas éliminé par les voies naturelles.

1.4.5.1 Donner l'expression de la loi de décroissance radioactive de l'activité.

1.4.5.2 En utilisant cette loi, calculer le temps nécessaire, exprimé en jours, pour que le patient ne présente plus qu'une activité égale à 20 % de l'activité initiale.

2. CHIMIE GÉNÉRALE (17 points)

2.1. Structure d'un édifice covalent.

Données : numéros atomiques : $Z(\text{H}) = 1$; $Z(\text{O}) = 8$; $Z(\text{Cl}) = 17$

2.1.1. Écrire la structure électronique des atomes d'hydrogène, d'oxygène et de chlore.

2.1.2. En déduire le schéma de Lewis des molécules d'eau et de chlorure d'hydrogène puis celui de l'ion oxonium H_3O^+ .

2.1.3. En déduire par la méthode de Gillespie (V.S.E.P.R.) le type et le nom de la géométrie pour la molécule d'eau et l'ion oxonium, puis représenter ces molécules dans l'espace.

2.2. Dosage acido-basique.

Données : à 25°C

$\text{p}K_{\text{A}} (\text{CH}_3\text{COOH}(\text{aq}) / \text{CH}_3\text{COO}^-(\text{aq})) = 4,8$

$\text{p}K_{\text{e}} = 14$

2.2.1.

On dose, par pH-métrie, un volume $V_A = 50,0$ mL d'un mélange d'une solution aqueuse d'acide acétique (ou acide éthanoïque de formule $\text{CH}_3\text{COOH}(\text{aq})$) et d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique ($\text{H}_3\text{O}^+ + \text{Cl}^-(\text{aq})$), de concentration molaire respective C_{AH} et C_{HCl} , à l'aide d'une solution aqueuse de soude (ou hydroxyde de sodium) de formule $\text{Na}^+(\text{aq}) + \text{HO}^-(\text{aq})$ de concentration molaire $C_B = 0,500$ mol.L⁻¹. Les résultats du titrage ont permis de tracer la courbe $\text{pH} = f(V_B)$ fournie en **feuille annexe 2 à rendre avec la copie** ; V_B étant le volume de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ajoutée.

2.2.1.1 Écrire les équations chimiques correspondantes aux deux réactions de titrage.

2.2.1.2 Calculer les constantes d'équilibre de ces deux réactions de titrage. En déduire quel est l'acide dosé en premier. Justifier la réponse.

2.2.1.3 Sur la feuille **annexe 2 à rendre avec la copie**, déterminer graphiquement les coordonnées des points d'équivalence E_1 et E_2 .

2.2.1.4 Calculer en justifiant la concentration molaire de chacun des deux acides dans le mélange.

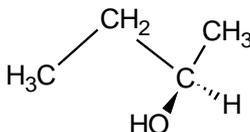
2.2.2. Justifier que le volume à la demi-équivalence du deuxième dosage est égal à 10 mL. Retrouver graphiquement la valeur expérimentale du pK_A du couple $\text{CH}_3\text{COOH}(\text{aq}) / \text{CH}_3\text{COO}^-(\text{aq})$.

2.2.3. Faire l'inventaire des espèces chimiques ioniques majoritairement présentes à la deuxième équivalence. Justifier, sans calcul, le fait que le pH soit supérieur à 7 à cette équivalence.

3. CHIMIE ORGANIQUE (17 points)

Données : numéros atomiques : $Z(\text{H}) = 1$; $Z(\text{C}) = 6$; $Z(\text{O}) = 8$

3.1. Soit **A**, la molécule organique suivante :



3.1.1. Donner le nom de **A**.

3.1.2. Donner la configuration absolue de l'atome de carbone asymétrique de la molécule **A**. Justifier la réponse.

3.2. **A** est traité à chaud par une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré. On obtient un composé majoritaire **B**.

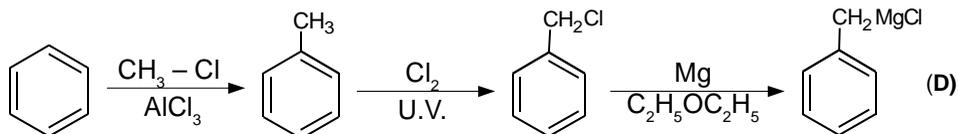
3.2.1. Écrire l'équation de la réaction conduisant à **B** en énonçant la règle utilisée.

3.2.2. **B** Présente deux stéréoisomères **B₁** et **B₂**. Donner le nom et la formule semi-développée de **B₁** et de **B₂** sachant que **B₁** est de configuration (Z).

3.3. Le mélange de **B₁** et **B₂** est traité à chaud par une solution aqueuse concentrée de permanganate de potassium. On obtient le composé **C** de formule brute $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$. Donner le

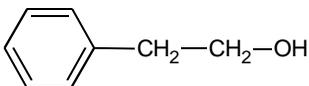
nom et la formule semi-développée de **C**.

3.4. On réalise la succession d'étapes suivantes :



Préciser le type (élimination, substitution, addition) et la nature (électrophile, nucléophile ou radicalaire) des deux premières étapes de cette succession de réactions.

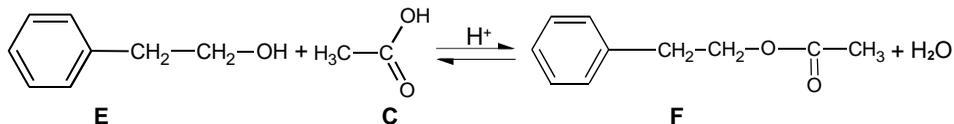
3.5. Le chlorure de benzyl magnésium **D** réagit avec un aldéhyde pour donner l'alcool **E** de formule semi-développée : **E** :



3.5.1. Donner la formule semi-développée de l'aldéhyde nécessaire et son nom.

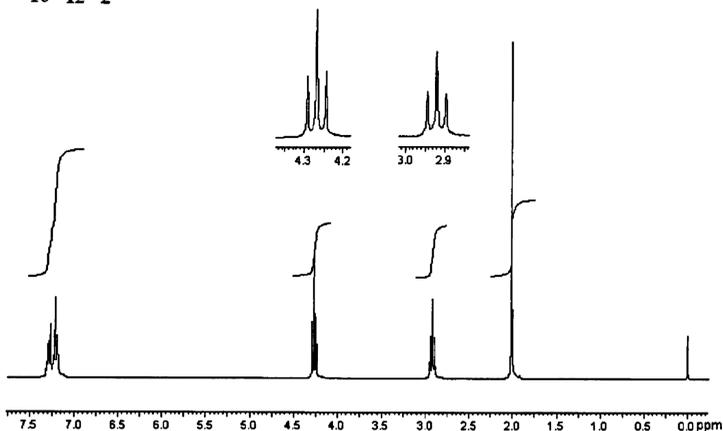
3.5.2. Préciser le nom de l'alcool **E**.

3.6. Le composé **C** obtenu à la question III.3. réagit avec le composé **E**. On obtient le produit organique **F** selon l'équation de réaction :



3.6.1. Comment se nomme cette réaction ? Quelles sont ses caractéristiques ?

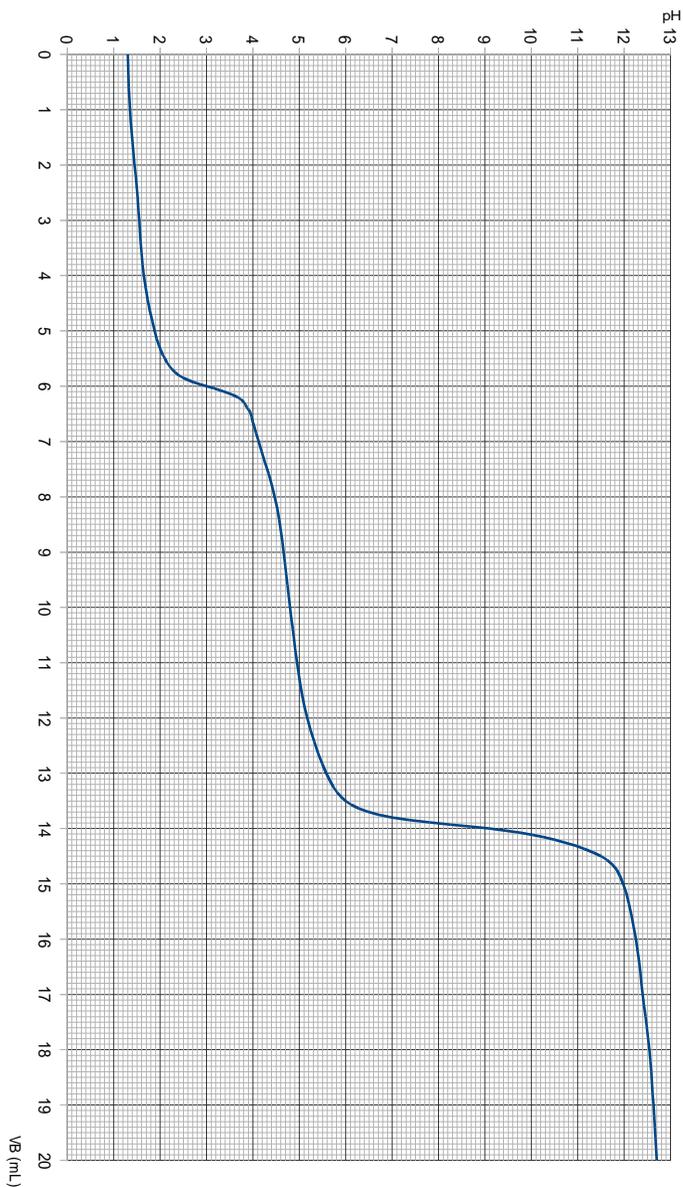
3.6.2. Le produit organique **F** est analysé en RMN ^1H . Le spectre RMN est donné en **annexe 1**. À l'aide de la table RMN fournie en **annexe 1**, attribuer les signaux des noyaux d'hydrogène du noyau benzénique et du groupe méthyle de la molécule **F** en justifiant à l'aide d'une démarche claire. Justifier le fait que les deux signaux des noyaux d'hydrogène des groupes $-\text{CH}_2-$ apparaissent sous la forme d'un triplet dans le spectre.

ANNEXE 1Spectre RMN ^1H du composé organique F dans le TMS (triméthylsilane) **$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$** 

Remarque : des agrandissements des signaux à 4,27 ppm et à 2,92 ppm sont donnés.

Table des déplacements chimiques dans le TMS en RMN ^1H

Groupe fonctionnel	Déplacement chimique
$\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	~1.0
$\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} \\ \diagdown \end{array}$	~2.0
$\text{CH}_3 - \text{C} - \text{O} -$	~3.5
$-\text{C} \equiv \text{CH}$	~2.0
$\text{CH}_3 - \text{C} - \text{O} -$ O	~3.5
$\text{CH}_3 - \text{N} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	~3.0
$\text{R} - \text{CH}_2 - \text{N} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	~3.0
$\text{R} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{O} -$ O	~3.5
$\text{CH}_3 - \text{O} -$	~3.5
$\text{R} - \text{CH}_2 - \text{O} -$	~3.5
$\text{R} - \text{OH}$	~3.5
$\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C} = \text{CH}_2 \\ \diagdown \end{array}$	~4.5
$-\text{CH} = \text{CH}-$	~5.5
	~7.0
	~8.5
$\text{R} - \text{C} = \text{O}$ H	~9.5
$\text{R} - \text{C} - \text{OH}$ O	~10.5

ANNEXE 2 (à rendre avec la copie)

2011 – U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français
- l'utilisation de la calculatrice est interdite

Les vecteurs plasmidiques

Les plasmides bactériens naturels ont été utilisés à l'origine pour construire les premiers plasmides artificiels utilisés en génie génétique.

Le plasmide pBR322 constitue un jalon historique dans cette élaboration.

Il a été créé en 1977 au Mexique par Bolivar et Rodriguez à partir des plasmides pColE1 d'*Escherichia coli* et pSC101 de *Salmonella enterica*.

Ensuite, des vecteurs de clonage et d'expression artificiels plus performants ont pu être conçus à partir de pBR322.

Par ailleurs, les plasmides ont constitué des modèles d'étude, dans le domaine de la réplication et de son contrôle chez les procaryotes. Ces études ont également permis de découvrir l'existence des ARN antisens.

1. Le plasmide pBR322 (10,5 points)

1.1. La séquence et la carte du plasmide pBR322

La séquence complète de pBR322 et les annotations correspondantes sont référencées dans la banque de données GenBank sous le numéro d'accès J01749.

Le **document 1** fournit un extrait des annotations de cette séquence.

Le **document 2** présente quelques enzymes de restriction utilisables dans le cadre d'un clonage.

1.1.1. Définir les termes « brin codant » et « brin transcrit » d'un gène.

Pour le gène *bla*, expliciter la notion de « complément » (ou « reverse complément ») figurant dans le **document 1** et préciser si la séquence du fichier GenBank correspond au brin codant ou au brin transcrit de ce gène.

1.1.2. Le promoteur du gène *bla* est qualifié de promoteur « fort » « constitutif ».

Après avoir rappelé la fonction d'une séquence d'ADN promotrice, préciser les notions de promoteur fort et de promoteur constitutif.

1.1.3. Schématiser le plasmide pBR322 à partir des données du **document 1, en y figurant les séquences fonctionnelles orientées ainsi que la position des sites de coupure par les enzymes de restriction répertoriées dans le **document 2**.**

Le **document 3** présente le code utilisé pour désigner deux bases azotées ayant un paramètre en commun.

1.1.4. Nommer sur la copie les deux bases concernées dans chacun des cas présentés dans le tableau du **document 3.**

- 1.1.5. Pour le traitement informatique de séquences, on utilise souvent le format FASTA. Donner les caractéristiques de ce format.
- 1.1.6. Le site de restriction *Sal*I (dont la séquence est donnée dans le **document 2**) peut être qualifié de « palindromique ». Expliciter cette notion à partir de cet exemple.
- 1.1.7. Le **document 2** précise pour ce site *Sal*I : « Cleavage affected by C methylation ». Préciser en quoi consiste cette caractéristique.
- 1.1.8. Les sites de restriction *Bam*H I et *Bgl* II sont dits « compatibles ».

Représenter, en utilisant deux couleurs différentes et en écrivant les séquences concernées, la réassociation de deux fragments d'ADN hydrolysés respectivement par *Bam*H I et *Bgl* II.

1.2. Le plasmide pBR322, vecteur de clonage

Un clonage dans pBR322 nécessite :

- de « digérer » vecteur et ADN source par les enzymes *Bam*H I et *Sal*I,
- de procéder à la ligature de l'insert et du vecteur,
- de transformer une souche appropriée d'*Escherichia coli* avec le produit de cette ligature,
- de sélectionner les bactéries transformées,
- de repérer (d'identifier) les bactéries transformées et recombinées, c'est-à-dire possédant un plasmide avec insert.

- 1.2.1. Citer les deux intérêts majeurs de la double digestion du vecteur et de l'insert par les enzymes *Bam*H I et *Sal*I.

Le **document 4** présente les activités des enzymes de restriction dans différents tampons commerciaux.

- 1.2.2. Choisir un tampon pour réaliser une double digestion *Bam*H I – *Sal*I en une seule étape. Justifier ce choix et préciser les conditions opératoires liées à l'utilisation de ce tampon.

Historiquement, le repérage des clones recombinés était effectué par une méthode « de repiquage (ou réplique) des clones ». De nos jours, ce repérage est plus fréquemment réalisé par PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne).

- 1.2.3. Dans le cadre de la procédure de clonage définie ici, présenter la logique du repérage par PCR en précisant une des manières de choisir la localisation des amorces et le résultat attendu lors de l'analyse de l'amplicon en gel d'agarose.

La préparation d'un stock de plasmide recombiné purifié commence par une étape d'extraction par lyse alcaline. Le **document 5** décrit l'étape cruciale de cette extraction.

- 1.2.4. À partir des indications de ce document, relever les précautions à respecter pour cette étape et les justifier.

2. Les plasmides pUC18 et pEGFP-C (3,5 points)

Les plasmides pUC18 et pEGF-C sont deux exemples de vecteurs plus perfectionnés que le plasmide pBR322.

Le **document 6** présente la carte du vecteur pUC18.

2.1. Expliquer les deux rôles de la région 146-469 dans le cadre d'un clonage.

2.2. Ce vecteur est aussi un vecteur d'expression.

Préciser les séquences directement en amont du gène lacZalpha, qui ne sont pas représentées dans le **document 6** et qui permettent une expression inductible de ce gène.

Le vecteur pEGFP-C est un vecteur navette permettant la synthèse de protéines étiquetées dans des cellules de mammifères. Sa carte est fournie dans le **document 7**.

2.3. Justifier que ce vecteur est un vecteur navette.

2.4. Donner les rôles respectifs des séquences P_{CMV} et SV40 polyA.

2.5. Préciser en quoi consiste l'étiquetage de la protéine synthétisée. Citer un intérêt possible de cet étiquetage.

3. La réplication des plasmides (5 points)

3.1. La réplication du plasmide pColE2

Le plasmide naturel pColE1 d'*Escherichia coli*, présente une réplication unidirectionnelle de type θ (théta), initiée à partir d'une origine de réplication unique. La synthèse d'ADN est continue sur un brin et discontinue sur l'autre brin. Cette synthèse est catalysée essentiellement par l'ADN polymérase III ; elle nécessite l'action préalable d'une primase.

3.1.1. Préciser l'action de la primase et le produit résultant de cette action. Pourquoi l'action préalable de la primase est-elle indispensable ?

3.1.2. L'ADN polymérase III possède une activité 3'→5' exonucléase. Préciser en quoi consiste cette activité et indiquer son intérêt.

3.2. Le contrôle de la réplication du plasmide pColE2

Le nombre de copies du plasmide pColE2 présent dans les cellules bactériennes varie peu, ce qui implique une régulation au niveau de l'initiation de la réplication.

Cette initiation nécessite la fixation d'une protéine REP sur une séquence d'ADN spécifique (ori). La fréquence d'initiation de la réplication est donc déterminée par la quantité de protéine REP disponible.

La région du plasmide pColE2 nécessaire à l'initiation de sa réplication est schématisée dans le

document 8.

Pour déterminer expérimentalement s'il existe une interaction entre un ARN particulier de 115 nucléotides, l'ARN I, et la partie 5' de l'ARN messager du gène *rep* (205 nucléotides), on réalise une étude cinétique avec ces ARN purifiés au préalable.

Le principe de l'expérience et son résultat sont présentés dans le **document 9**.

- 3.2.1. Interpréter le résultat de cette expérience.
Conclure.
- 3.2.2. Traduire et expliciter les termes en gras dans la phrase suivante : « *Trans-acting antisense RNAs permit the silencing of specific genes by pairing to mRNA molecules* ».
- 3.2.3. En utilisant les réponses aux questions 3.2.1 et 3.2.2, proposer une explication moléculaire du contrôle de la réplication qui conduit à la limitation du nombre de copies du plasmide pColE2 dans les cellules d'*E.coli*.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1 : Extrait des annotations de la séquence J01749

LOCUS	SYNPBR322 4361 bp DNA circular			SYN 30-SEP-2008
DEFINITION	Cloning vector pBR322, complete sequence.			
ACCESSION	J01749			
COMMENT	The ampicillin resistance gene (<i>amp-r</i>) is a penicillin beta-lactamase. Promoter P1 is for the beta-lactamase gene. P1 is artificially created by the ligation of two different DNA fragments to create pBR322. P2 is in the same region as P1, but it is on the opposite strand and initiates transcription in the direction of the tetracycline resistance gene.			
FEATURES	Location/Qualifiers			
source	1..4361	organism = "Cloning vector pBR322"		
promoter	complement(27..33)	="promoter P1"		
promoter	43..49	="promoter P2"		
gene	86..1276	gene="tet", product="tetracycline resistance protein"		
rep origin	2535			
gene	complement(3293..4153)	gene="bla", product="beta-lactamase"		

Document 2 : Extrait de la carte de restriction du plasmide pBR322

Enzyme	Site de restriction et de coupure	Position de coupure dans pBR322
<i>Bam</i> H I	G/GATCC	375
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	none
<i>Eco</i> R V	GAT/ATC	187
<i>Sal</i> I	G/TCGAC (Cleavage affected by C methylation)	651

Document 3 : Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences (extraits)

Single Letter Code	Justification du code	Noms des deux bases concernées
R	Bases avec noyau puRique	
Y	Bases avec noyau pYrimidique	
W	Bases interagissant faiblement (<i>Weak</i>)	
S	Bases interagissant fortement (<i>Strong</i>)	

Document 4 : Activités d'enzymes de restriction dans différents tampons

Enzyme	A	B	C	D	E	H	Multi-Core
<i>Bam</i> H I	75-100%	75-100%	75-100%	50-75%	75-100%	100%	50-75%
<i>Bgl</i> II	10-25%	25-50%	75-100%	100%	25-50%	75-100%	100,00%
<i>Eco</i> R V	10-25%	25-50%	50-75%	100%	25-50%	50-75%	100%
<i>Sal</i> I	<10%	10-25%	25-50%	100%	<10%	25-50%	25-50%

Remarque : la température d'incubation pour toutes ces enzymes est de 37°C.

Document 5 : Cell lysis in Alkaline extraction protocol (Extraits)

Lyse the resuspended cells by adding 200 µL of the Lysis Buffer. Immediately mix the contents by gentle inversion (6-8 times) until the mixture becomes clear and viscous.

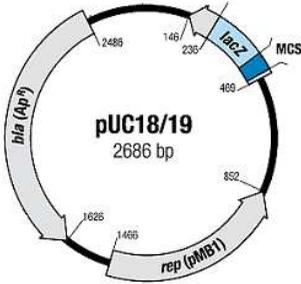
Do not vortex. Harsh mixing will shear genomic DNA, resulting in chromosomal DNA contamination in the final recovered plasmid DNA. Do not allow the lysis reaction to exceed 5 minutes.

Prolonged alkaline lysis may permanently denature supercoiled plasmid DNA that may render it unsuitable for most downstream applications.

...

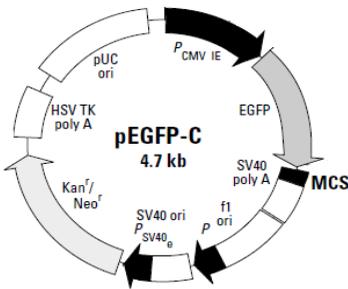
Composition of Lysis Solution S2 : NaOH 200 mM ; SDS 1%

Document 6 : pUC18 Map



lacZ représente plus exactement le gène « lacZ alpha »

Document 7 : Mammalian expression vectors pEGFP-C

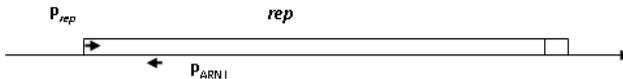


SV40 : Simian Virus 40

CMV : CytomégaloVirus

EGFP : human codon-optimized gene coding for enhanced Green Fluorescent Protein which produces fluorescence 35 times more intense than wild-type GFP.

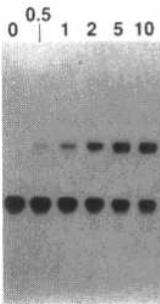
Document 8 : Schéma de la région rep du plasmide pColE2



Le promoteur P_{rep} dirige la synthèse de l'ARN messenger rep codant la protéine REP.

Le promoteur P_{ARN I} dirige la synthèse de l'ARN messenger ARN I dont la séquence est le complément réverse de l'extrémité 5' de l'ARN messenger rep.

Document 9 : Mise en évidence de l'interaction entre l'ARN I et l'ARNm rep.



L'ARN I marqué au ³²P (115 nucléotides) et la partie 5' de l'ARN REP non marqué (205 nucléotides) sont mis en présence et puis déposés en gel de polyacrylamide après un temps d'incubation variant de 0 à 10 minutes.

Le document ci-contre représente le résultat de l'autoradiographie du gel de polyacrylamide à 8% (m/v) après migration.

La zone de dépôt se situe en haut du gel.

2011 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée : 2 h – coefficient 1

Etude de l'enzyme glucose oxydase GOD ou GOx, enzyme extrait d'*Aspergillus niger*, utilisé pour le dosage enzymatique du glucose

L'enzyme glucose oxydase a été hautement purifié pour être utilisé :

Dans le domaine de la biochimie analytique : pour doser le glucose libre aussi bien en industrie agro alimentaire qu'en laboratoire de biologie médicale pour le suivi du diabète.

Le plus souvent, dans les kits de dosage du glucose, l'action de cet enzyme est couplée à une réaction catalysée par la peroxydase (POD, HRP) qui visualise la formation d' H_2O_2 .

Le dosage du glucose peut être aussi réalisé par des méthodes nano technologiques, avec des bio senseurs ou biocapteurs dans lesquels l'enzyme glucose oxydase est immobilisé.

Comme additif alimentaire: en boulangerie, l'enzyme rend la pâte plus ferme, remplaçant des oxydants comme le bromate et l'acide ascorbique.

La glucose oxydase sert aussi à éliminer l'oxygène en emballage alimentaire, et le D-glucose du blanc d'œuf pour éviter le brunissement.

1. Etude de la structure et des propriétés de la glucose oxydase (6 points)

La glucose oxydase (β -D-glucose : O2 oxydoreductase, EC 1.1.3.4) catalyse l'oxydation du glucose par l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène et de la D gluconolactone qui est spontanément hydrolysée en acide D gluconique.

1.1. Citer les différentes classes d'enzymes.

1.2. Ecrire la réaction catalysée par la glucose oxydase : la structure développée des composés n'est pas exigée.

Le **document 1** présente les caractéristiques structurales et la structure tridimensionnelle de la glucose oxydase.

1.3. Relever les caractéristiques structurales essentielles de cette protéine.

1.4. Définir le terme apo-enzyme.

La O-glycosylation affecte la thréonine et la sérine.

1.5. Schématiser une liaison O-glycosidique en faisant apparaître la structure semi développée d'un des deux amino acyls.

1.6. Donner la signification des lettres FAD et une représentation simplifiée de ce

cofacteur.

1.7. Expliciter le mode d'intervention de ce coenzyme dans la réaction catalysée par la glucose oxydase.

2. Extraction et purification de la glucose oxydase (2,5 points)

Le **document 2** présente les différentes étapes et les résultats d'une purification de glucose oxydase à partir d'*Aspergillus niger*.

2.1. Donner les caractéristiques des phases stationnaires des chromatographies utilisées à l'étape 2 et à l'étape 4.

2.2. Expliquer le phénomène de précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et justifier la nécessité de dialyser la solution obtenue après solubilisation du précipité.

2.3. Evaluer la contribution de l'étape 2 à l'enrichissement de la solution enzymatique : calculer le facteur d'enrichissement ou le taux de purification obtenu lors de cette étape.

3. Utilisation de la GOD dans les kits de dosage du glucose (6,5 points)

Le **document 3a** présente un extrait de la fiche technique du « kit : Glucose GOD-PAD » pour le dosage du glucose dans les liquides biologiques : ce même kit est utilisé en industrie agro alimentaire notamment pour le dosage du glucose dans les milieux de fermentation.

3.1. Présenter le principe du dosage du glucose utilisé dans ce kit.

3.2. Préciser le type de méthode enzymatique utilisée. Justifier.

3.3. Les deux enzymes présents dans le réactif R1 ont une concentration exprimée en UI/L. Définir cette unité.

3.4. Préciser le rôle des différents composants présents dans les réactifs R1, R2 et R3.

Lors de la production de biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de la mélasse, sous produit de l'industrie sucrière, la concentration en saccharose et en glucose du milieu de fermentation est régulièrement mesurée.

Le dosage du glucose est réalisé à l'aide du kit de dosage présenté précédemment.

Le **document 3b** précise les conditions de réalisation et les résultats du dosage du glucose dans le milieu de fermentation une heure après le début de la production.

3.5. Sachant que la concentration de glucose dans le milieu de fermentation varie habituellement de 5 à 30 g/L au cours de la production et que l'échantillon est fortement coloré, justifier les conditions de réalisation du dosage présenté dans le **document 3b**.

3.6. Calculer la concentration massique en glucose dans le milieu de fermentation au temps 60 minutes (expression littérale et application numérique).

4. Utilisation de la glucose oxydase immobilisée dans l'électrode à glucose (4 points)

Le **document 4** présente un type d'électrode à glucose, l'électrode ABL 800.

Dans ce type d'électrode, la glucose oxydase est immobilisée sur une matrice carbonée à l'aide d'un agent de pontage : le glutaraldéhyde.

4.1. Présenter trois méthodes d'immobilisation d'enzymes fondées sur des principes différents.

4.2. Préciser les avantages et inconvénients des enzymes immobilisés par rapport aux enzymes natifs.

4.3. Indiquer le type d'immobilisation choisi pour la glucose oxydase dans l'électrode ABL 800 et décrire le mode de fixation des enzymes par le glutaraldéhyde.

4.4. A l'aide du **document 4**, préciser les différentes étapes permettant la détection et le dosage du glucose par l'électrode à glucose.

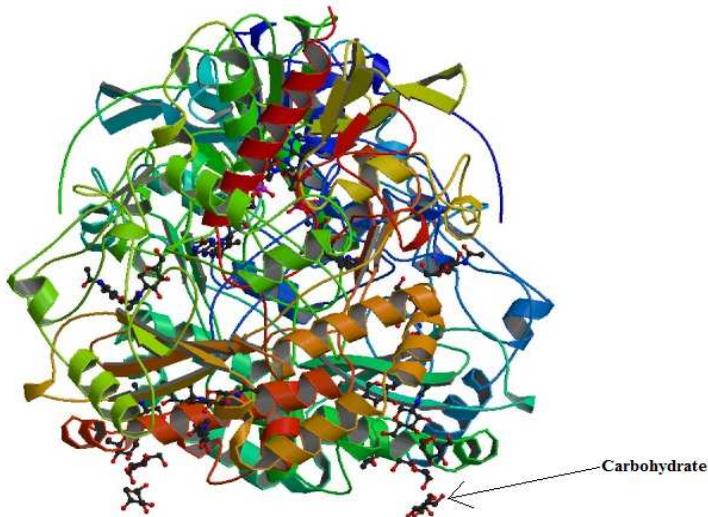
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1Structure de la glucose oxydase

GOx is a dimeric protein with a molecular weight of 160 kDa, containing one tightly bound FAD per monomer as cofactor (actually two FAD-sites per the enzyme). The FAD is not covalently bound and can be released from the protein. This process can be performed under mild conditions preventing full denaturation of the protein. The respective GOx apo-enzyme can be produced by the FAD extraction. The apo-enzyme missing the FAD cofactor is not biocatalytically active, but it can be reconstituted with native or artificially modified FAD cofactor. The enzyme is glycosylated with a carbohydrate content of 16% (w/w). The carbohydrate moiety is designated as high mannose type with 80% (w/w) of the carbohydrate being mannose. The mannose is N and O glycosidically linked to Asn, Thr and Ser.

**Document 2**Purification de la glucose oxydase

The starting material for this preparation was 50 g of *A.niger* extract with a specific activity of 13,9 μmoles per minute per mg of protein.

Step	Procedure	Volume mL	Specific activity $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protein	Total units $\mu\text{moles}/\text{min}$
1	After dialysis	374	20	100000
2	Carboxyméthyl cellulose chromatography	2000	80	60000
3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and dialysis	88	82	56000
4	DEAE-cellulose chromatography	500	92	34000
5	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and dialysis	30	92	32600

DEAE ou Diéthylaminoéthyl : $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$

Document 3Dosage enzymatique du glucose**3a. Extrait de la fiche technique****GLUCOSE
GOD-PAP**

Réactif pour le dosage quantitatif du glucose dans le plasma, le sérum et le liquide céphalorachidien (LCR) humains, ou les urines

PRINCIPE (4) (5)

Méthode de Trinder. Le glucose est oxydé par la GOD en acide gluconique et H₂O₂ qui réagit en présence de POD avec le chloro-4-phénol et le PAP pour former une quinonéimine rouge. L'absorbance du complexe coloré, proportionnelle à la concentration en glucose dans le spécimen est mesurée à 500 nm.

REACTIFS

flacon R1	TAMPON ENZYMES	
	Tampon phosphate	150 mmol/L
	Glucose oxydase (GOD)	≥ 20 000 U/L
	Péroxydase (POD)	≥ 1000 U/L
	4-Amino-antipyrine (PAP)	0,8 mmol/L
flacon R2	CHROMOGENE	
	Chloro-4-phénol	2 mmol/L
flacon R3	ETALON	
	Glucose	1 g/L (5,55 mmol/L)

PREPARATION DES REACTIFS

Flacon R1 et R2 : si nécessaire, utiliser un objet non coupant pour enlever la capsule aluminium.

Mesurer le volume d'eau déminéralisée indiqué sur l'étiquette du flacon R1 (Tampon-Enzymes) à l'aide d'un récipient gradué.

Verser le contenu du flacon R1 dans le récipient et mélanger doucement jusqu'à complète dissolution (environ 2 minutes). Ajouter ensuite le contenu du flacon R2 et mélanger doucement. Stocker à l'abri de la lumière dans un flacon plastique exempt de toute contamination.

LIMITE DE LINEARITE

La réaction est linéaire jusqu'à 5 g/L (28 mmol/L).

Au-delà, diluer le spécimen avec une solution NaCl à 9 g/L et refaire le dosage en tenant compte de la dilution dans le calcul du résultat. La limite de linéarité dépend du rapport de volume spécimen/réactif.

MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)

Ramener les réactifs et spécimens à température ambiante.

Mesurer dans des tubes à essais bien identifiés :	Blanc	Etalon	Dosage
Réactif	1 mL	1 mL	1 mL
Eau déminéralisée	10 µL		
Etalon		10 µL	
Spécimen			10 µL

Bien mélanger. Incuber 10 minutes à 37°C ou 20 minutes à température ambiante.

Lire les absorbances à 500 nm (460-560) contre le blanc réactif. La coloration est stable 15-20 minutes à 37°C, puis décroît lentement.

Remarque : des procédures spécifiques sont disponibles pour les analyseurs automatiques. Contacter le service technique BIOLABO.

Source : fiche Biolabo SA.

3b. Dosage du glucose dans le milieu de fermentation au temps 60 min

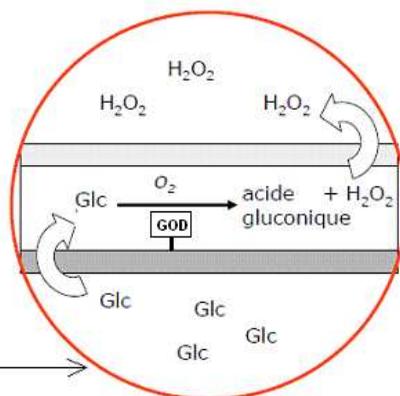
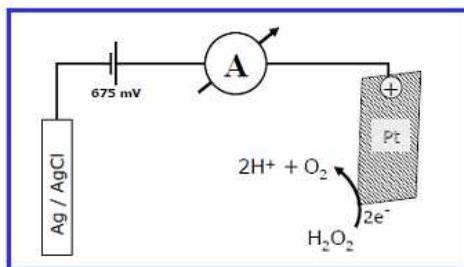
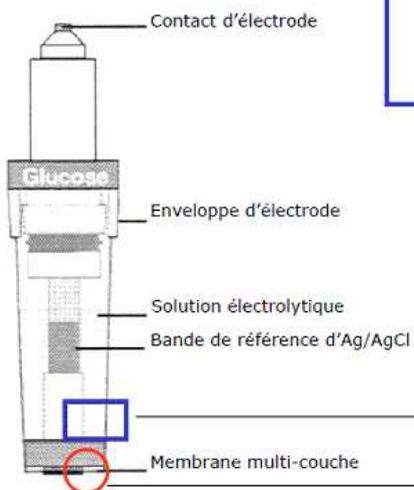
	Blanc	Etalon	Dosage	Blanc dosage
Réactif µL	1000	1000	1000	-
ED µL	10	-	-	1000
Etalon µL	-	10	-	-
Milieu de fermentation dilué 1/10 µL	-	-	10	10
Absorbance à 500 nm	0	0,150	0,340	0,040

Remarque : la mélasse et le milieu de fermentation ont une couleur brun foncé plus ou moins intense.

Document 4Electrode à glucose ABL 800

ABL-800

Electrode à glucose



2011 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée : 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français
- l'utilisation de la calculatrice n'est pas autorisée

Des virus pour combattre les infections : la phagothérapie

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages lytiques afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne. Bien qu'elle ait été progressivement abandonnée par les pays occidentaux séduits par les avantages de l'antibiothérapie, la phagothérapie traditionnelle est toujours employée et développée dans les pays de l'ancienne Union Soviétique.

On constate un renouveau d'intérêt de l'occident pour les phages depuis 1994, lorsqu'il a été démontré (dans un modèle animal) que l'utilisation de phages pouvait améliorer le succès des greffes de peau en réduisant l'infection sous-jacente par *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Les bactériophages (5 points)

1.1. Donner les caractéristiques qui permettent de définir un virus.

Le **document 1** représente la structure d'un bactériophage T4.

1.2. Ce bactériophage présente une symétrie mixte : justifier cette affirmation.

1.3. Préciser les rôles respectifs des éléments 3 et 4.

Les bactériophages peuvent être lytiques ou tempérés.

1.4. A l'aide de schémas annotés, présenter les étapes caractéristiques d'un cycle lysogène.

1.5. Préciser pourquoi les bactériophages tempérés ne sont pas utilisés en phagothérapie.

Les bactériophages tempérés peuvent permettre dans certains cas le transfert horizontal de l'information génétique.

1.6. Nommer et définir ce phénomène.

1.7. Citer et définir brièvement les autres modes de transferts horizontaux.

2. Études expérimentales (10 points)

L'action thérapeutique potentielle de bactériophages, purifiés et caractérisés, a été évaluée sur une souche de *Klebsiella pneumoniae*. Des plaies de souris, résultant de brûlures, ont été infectées par cette souche.

L'obtention et la préparation des bactériophages ayant pour cible cette bactérie sont décrites dans le **document 2**.

2.1. À partir du **document 2**, préciser les procédés d'élimination des bactéries lors de la préparation des suspensions phagiques.

2.2. Déterminer le titre de la suspension phagique Kpn5.

L'effet du bactériophage Kpn5 est mis en évidence en réalisant un suivi de croissance de la souche *Klebsiella pneumoniae* en présence ou non de ce bactériophage.

Le **document 3** présente les résultats de croissance ainsi que la composition des milieux utilisés.

2.3. Calculer la vitesse spécifique exponentielle de croissance pour chacune des conditions, en indiquant la démarche suivie. Utiliser le tableau pour l'application numérique.

2.4. Comparer les valeurs obtenues. Montrer que l'écart relatif est significatif.

2.5. Proposer une hypothèse expliquant la différence entre ces deux valeurs.

Pour obtenir ces courbes de croissance, la souche bactérienne est cultivée dans un bioréacteur de 2 litres, à agitation mécanique, pourvu de sondes autoclavables, et contenant le milieu A. La souche cultive également sur le milieu B mais elle ne cultive pas sur le milieu B sans glucose.

2.6. Indiquer le rôle des constituants dont les noms sont soulignés.

2.7. Qualifier les milieux A et B.

2.8. En déduire le type trophique de la souche vis-à-vis de chacune des sources utilisées. Justifier les réponses.

2.9. Réaliser un schéma correctement légendé mettant en évidence les éléments essentiels du bioréacteur préparé pour l'autoclavage.

L'action des phages est ensuite testée sur des plaies de souris infectées par la bactérie *Klebsiella pneumoniae*. Le **document 4** présente ces essais de phagothérapie et les résultats correspondants.

2.10. Donner la signification des valeurs présentées dans le document.

2.11. Indiquer l'effet de l'infection des souris par *Klebsiella pneumoniae*, pour le groupe contrôle.

2.12. Interpréter globalement les résultats observés pour les groupes traités.

2.13. Identifier le phage le plus intéressant pour cette phagothérapie. Justifier la réponse.

3. Phagothérapie et antibiothérapie (4 points)

Un phénomène de « synergie phages-antibiotiques » a été observé chez plusieurs espèces de phages virulents : l'addition de faibles doses de certains antibiotiques augmente de façon significative la production de phages.

Le **document 5** présente les résultats d'antibiogrammes (action des antibiotiques sur la croissance bactérienne après diffusion en milieu gélosé) en absence ou en présence de phages.

3.1. Donner une définition d'un antibiotique.

3.2. Indiquer deux cibles cellulaires possibles et les conséquences de l'effet des antibiotiques chez les bactéries.

3.3. Préciser l'élément structural commun entre les antibiotiques 2 et 6.

A l'aide du **document 5**, montrer que l'action du phage sur les bactéries est modifiée en présence de certains antibiotiques. Proposer une hypothèse reliant la classe d'antibiotique active à l'effet observé.

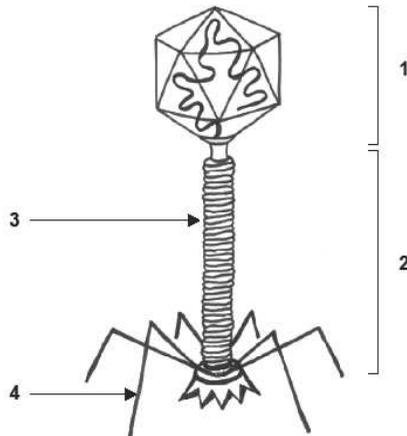
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1

Schéma d'un bactériophage



Document 2

Phage isolation and preparation

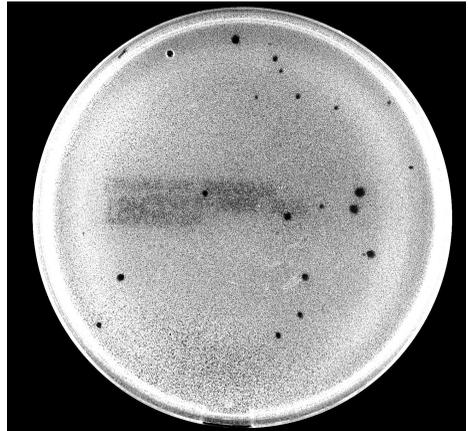
Five *Klebsiella* bacteriophages were isolated from sewage samples from different sources in and around Chandigarh area. Phage titer was determined by the soft agar overlay method. The phages were named Kpn5, Kpn12, Kpn13, Kpn17, and Kpn22 and characterized on the basis of morphological, genomic, and structural analysis. High titer was prepared by adding phages to host culture at an MOI (multiplicity of infection) of 0.1 and incubating at 37°C, until complete clearance was achieved. The clear phage suspensions were centrifuged (10,000 rpm for 10 min) and filtered through a 0.45-µm pore size Millipore filter to remove any bacterial contaminants. High titer of these phages was estimated and expressed as plaque forming unit (PFU)/ml. Phage suspensions were stored at 4°C for routine use.

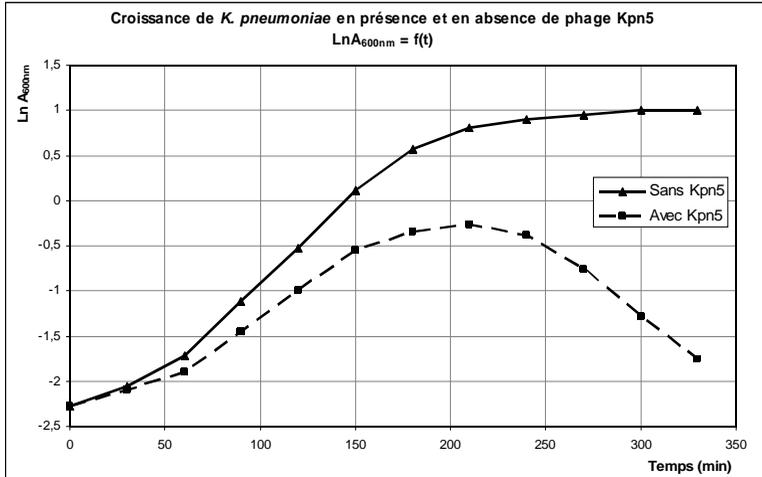
Titration des suspensions phagiques.

Mode opératoire :

- Réaliser des dilutions décimales de la suspension phagique.
- Introduire dans une série de tubes à hémolyse :
 - 100 µL de la suspension phagique diluée
 - 200 µL de suspension de *Klebsiella pneumoniae* à $5 \cdot 10^8$ bactéries.mL⁻¹
 - 3 mL de gélose LB6 en surfusion
- Couler très rapidement dans des boîtes de Petri contenant de la gélose LB15 bien sèche.
- Incuber à 37°C pendant 48 h.

Résultat obtenu après incubation pour la dilution 10^{-7} de la suspension phagique Kpn5.



Document 3Données de croissance de *K. pneumoniae* en présence et en absence de phage Kpn5

	Sans Kpn5	Avec Kpn5
Temps (min)	Ln A _{600nm}	Ln A _{600nm}
0	-2,28	-2,28
30	-2,05	-2,1
60	-1,72	-1,9
90	-1,12	-1,45
120	-0,52	-1,00
150	0,12	-0,55
180	0,57	-0,34
210	0,81	-0,26
240	0,9	-0,38
270	0,95	-0,76
300	1	-1,29
330	1	-1,76

Tableau de valeurs des suivis de croissance

Milieu A : composition pour 1 L de milieu

Extrait de viande	1 g
<u>Extrait de levure</u>	2 g
Peptones	5 g
NaCl	5 g

Milieu B : composition pour 1 L de milieu.

<u>K₂HPO₄ / KH₂PO₄</u>	1 g
<u>KNO₃</u>	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,1 g
NaCl	0,1 g
FeCl ₃	0,01 g
<u>Glucose</u>	1 g

Milieus utilisés pour la culture de *Klebsiella pneumoniae* en bioréacteur.

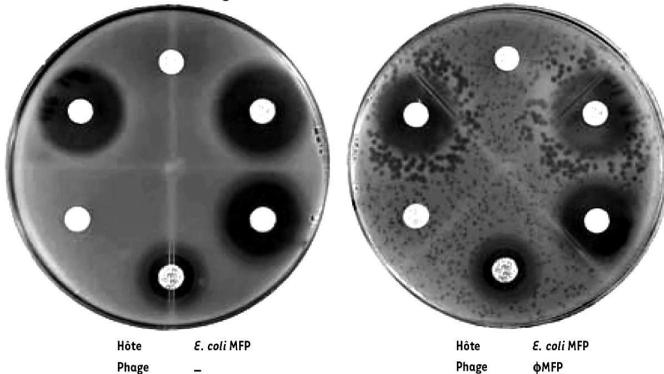
Document 4
Treatment with phage

The survival rate of burned and bacterial challenged mice after treatment with different phages, individually as well as in cocktail, was evaluated. In the control group, all burned mice were challenged with bacterial inoculum and received no phage. The health of these animals was monitored for 10 days and survival rates for control and phage-treated groups were recorded.

Groups	Survival rate (percentage ^a)		
	24 h	48 h	72 h
Control	55.8 ± 9.3	19.4 ± 4.8	05.5 ± 9.6
Kpn5-treated group	100.0 ± 0	97.2 ± 4.8	97.2 ± 4.8
Kpn12-treated group	97.2 ± 4.8	94.4 ± 4.8	88.8 ± 4.8
Kpn13-treated group	94.4 ± 4.8	88.8 ± 9.6	83.2 ± 8.1
Kpn17-treated group	88.8 ± 4.8	88.8 ± 4.8	80.5 ± 9.6
Kpn22-treated group	91.6 ± 8.3	86.1 ± 9.6	86.1 ± 9.6
Cocktail	97.2 ± 4.8	94.4 ± 4.8	94.4 ± 4.8

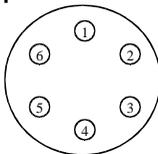
^(a)The average percent survival of animals in three experiments was determined as mean ± standard deviation.

Document 5
Antibiogramme d'une souche de *E. coli*



À gauche, un antibiogramme montrant la sensibilité de la souche uropathogène *E. coli* MFP à différents antibiotiques. À droite, le même antibiogramme avec l'addition de phages virulents ϕMFP dans le tapis bactérien.

Matrice des dépôts :



- 1 : amoxicilline
- 2 : β-lactames aztreonam
- 3 : gentamicine
- 4 : tétracycline
- 5 : triméthoprime/sulfaméthoxazole
- 6 : céphalosporine C

2011 – U42 : Biologie cellulaire

Durée : 2 h – coefficient 1

Biotechnologie vaccinale : application à l'élaboration d'un nouveau vaccin contre l'hépatite B

La vaccination contre l'hépatite B peut prévenir les hépatites B aiguës et chroniques, ainsi que les conséquences à long terme de l'infection due à ce virus que sont la cirrhose et le cancer primitif du foie. L'objectif de l'OMS est l'administration la plus large possible du vaccin contre l'hépatite B au niveau mondial.

Une équipe de recherche a étudié la faisabilité de la production d'un vaccin contre l'hépatite B par voie orale avec des cherry tomatillos. Ce type de vaccin permettrait une vaccination à grande échelle avec un coût de production réduit et une administration facilitée. Le tomatillo (*physalis ixocarpa* Brot.) est une plante du Mexique de la famille des Angiospermes, dicotylédone et annuelle. Consommé cru, le fruit est plus sucré que la tomate et son goût ressemble à celui de la pomme verte.

1. Production des plantes transgéniques exprimant l'Ag HBs (11 points).

L'antigène HBs est un antigène d'enveloppe du virus de l'hépatite B. Très immunogène, il est utilisé à l'état purifié dans les vaccins actuellement commercialisés.

Le gène S codant l'Ag HBs a été inséré dans un vecteur d'expression végétal pour constituer le plasmide p1301 HBs. Celui-ci contient un gène de résistance à l'hygromycine, un gène de résistance à la kanamycine et le gène rapporteur GUS.

1.1. Morphologie générale des Angiospermes.

- 1.1.1. Annoter le **document 1** qui représente la morphologie de base d'une Angiosperme. Reporter les annotations de « a » à « g » sur la copie et indiquer les légendes correspondantes.

Les méristèmes sont des tissus caractéristiques des organismes végétaux.

- 1.1.2. Définir un méristème.

- 1.1.3. Préciser la localisation et le rôle des méristèmes primaires.

Réalisé à partir de différentes électronographies, le **document 2** représente l'ultrastructure d'une cellule végétale.

- 1.1.4. Exposer le principe de fonctionnement d'un microscope électronique à transmission.

- 1.1.5. Annoter le **document 2**. Reporter les numéros de 1 à 12 sur la copie et indiquer les légendes correspondantes.

- 1.1.6. Indiquer les numéros des éléments absents des cellules animales.

1.2. Transformation et régénération des cherry tomatillos.

La culture *in vitro* des plantes transformées nécessite l'utilisation de milieux de culture adaptés.

- 1.2.1. A l'aide d'un tableau, présenter la liste des composants d'un milieu de culture cellulaire végétale solide classique de base et donner un exemple pour chaque constituant.
- 1.2.2. Les milieux de base sont additionnés de phytohormones. Préciser le rôle de ces molécules.
- 1.2.3. A partir des indications fournies par le **document 3** :
 - Calculer le rapport auxine / cytokinine utilisé dans le milieu (a). En déduire le rôle de ce milieu.
 - A partir de sa composition, donner le rôle du milieu (b) .
 - Expliquer le rôle des molécules suivantes :hygromycine et cefotaxime

Les plantules transformées sont cultivées en chambre de culture ou phytotron avant d'être acclimatées en serre.

- 1.2.4. Inventorier les paramètres régulés dans une chambre de culture végétale.

2. Utilisation des plantes transformées : tests d'immunisation des animaux par voie orale (5 points).

Dix lignées de Cherry tomatillos transgéniques exprimant le gène S ont été obtenues. Parmi les différents organes de la même plante transgénique, le niveau d'expression de l'Ag HBs était le plus élevé dans les feuilles avec un rendement supérieur à 300 ng/g de masse sèche. Des tests d'immunisation sont envisagés sur des souris BALB/c âgées de quatre semaines afin de tester l'efficacité vaccinale des plantes transgéniques.

Des expériences d'immunisation primaire par voie orale ont été effectuées sans donner de résultat probant. Des expériences d'immunisation secondaire par voie orale ont été réalisées et sont résumées dans le **document 4a**. Les résultats sont consignés dans le **document 4b**.

- 2.1. Donner la signification des termes : « dose immunogène » , « réponse primaire » et « réponse secondaire ».
- 2.2. Analyser le graphique obtenu pour la souris A en commentant ses différentes phases et indiquer la nature des anticorps produits.
- 2.3. Comparer les résultats obtenus pour la souris B avec les résultats précédents ; indiquer la nature des anticorps produits et préciser le nom du phénomène immunitaire permettant d'expliquer ces résultats.

3. Apport des biotechnologies dans la vaccination (3 points).

Les résultats obtenus dans les expériences décrites laissent un espoir de réussite de mise au point d'un vaccin par voie orale utilisant des cherry tomatillos transgéniques. Des améliorations devront être apportées notamment au niveau de la quantité d'antigène HBs produit par les tissus.

Les biotechnologies offrent des outils indispensables à la mise au point de vaccins modernes destinés à la prévention mais aussi à la thérapeutique. Si les technologies évoluent, le principe de la vaccination reste inchangé depuis les travaux d'Edward Jenner et de Louis Pasteur.

- 3.1. Définir les différentes catégories de vaccins classiques.

Parmi les améliorations apportées par les Biotechnologies, on peut citer les vaccins à ADN nu.

3.2. Présenter cette stratégie vaccinale.

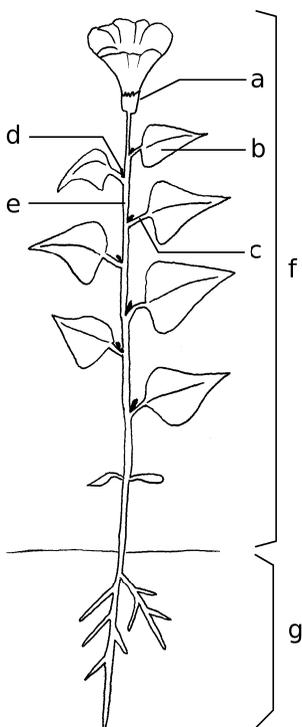
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

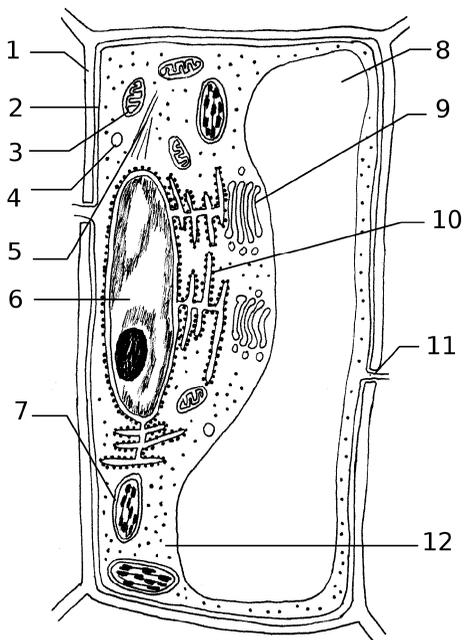
Document 1

Morphologie de base d'une angiosperme



Document 2

Ultrastructure d'une cellule végétale



Document 3

plant transformation and regeneration.

p1301HBs was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 directly by the freeze-thaw method. Subsequently, *Agrobacterium tumefaciens* carrying p1301HBs was used to transform cherry tomatillo cotyledons disks.

Ten days post germination, cotyledons were excised from *in vitro*-germinated seedlings, and co-cultivated for 48-72 h with an overnight-grown culture of *Agrobacterium tumefaciens* carrying p1301HBs on a shooting medium (a) containing 2 mg/L 6-benzyladenine (6-BA) and 0.2 mg/L indole-3-acetic acid (IAA). Cotyledons were then rinsed with sterilized water to which 500 mg/l cefotaxime had been added to kill the *A. tumefaciens* on the surface of explants, blotted dry on a sterilized paper towel, and placed onto a shooting medium with an addition of 500 mg/L cefotaxime for recovery. After a seven day recovery period, the explants were transferred onto a shooting medium added 300 mg/L cefotaxime and 25 mg/L hygromycin to select transgenic progeny. About eight weeks later, hygromycin-resistant shoot regenerants were removed to be placed in a rooting medium (b) containing 0.2 mg/L IAA and 25 mg/L hygromycin. Rooted plantlets were acclimatized and transferred to a greenhouse for fruiting.

Data:

IAA (indole -3- acetic acid) = auxin

6- BA (6 - benzyl adenin) = cytokinin.

Document 4

Document 4a : expériences d'immunisation secondaire par voie orale

Quatre souris ont subi une primovaccination par voie parentérale (2µg d'Ag HBs) à l'aide d'un vaccin commercial pour réaliser l'immunisation primaire (**prime**). Trois de ces souris (B, C, D) ont ensuite été nourries chaque jour par voie orale avec 20g de tissus de tomatillos transgéniques contenant l'équivalent de 1 µg d'AgHBs (**boost**).

Une souris A témoin a été nourrie avec des tissus sauvages de tomatillos.

Chaque semaine, les anticorps spécifiques de l'AgHBs ont été recherchés et dosés par méthode immunoenzymatique dans le sérum des quatre souris.

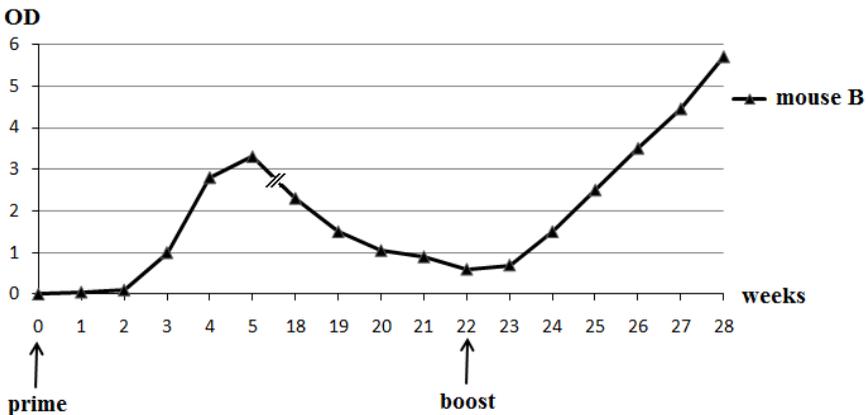
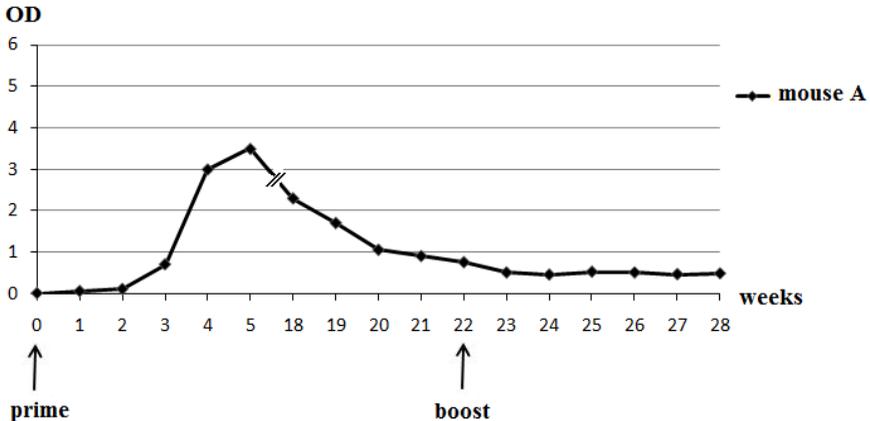
Donnée : dose immunogène par voie parentérale chez la souris = 2 µg d'Ag HBs.

Document 4b : résultats des expériences d'immunisation secondaire par voie orale

Serum antibody response elicited by oral boost with transgenic cherry tomatillo.

Mouse A was primed parenterally with 2 μg commercial HBsAg, and when its serum antibody level reached $\text{OD} < 1.0$, this mouse was fed untransformed tissues;

B.C.D mice were primed parenterally with 2 μg commercial HBsAg, and when their serum antibody levels reached $\text{OD} < 1.0$, they were fed transformed tissues as boost. Similar results were obtained for the three mice. You are only given the results of mouse B.



Data: OD = optical density.

2011 – ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

Ces quelques corrigés sont proposés pour vous aider dans la résolution des épreuves proposées au BTS.

Ils ne seront d'aucune utilité si vous vous contentez de lire les solutions sans avoir fait l'effort personnel de la réflexion et de la recherche des réponses aux questions proposées.

Ces corrigés sont parfois succincts, en particulier sur des parties de cours, parfois certaines remarques et compléments de cours sont ajoutés pour faciliter la compréhension et peuvent aller au delà de ce qui est exigible à l'examen.

Ce ne sont pas des modèles imposés, d'autres solutions, d'autres démarches sont possibles. *Des imprécisions, des erreurs ont pu se glisser dans les textes, veuillez nous en excuser.*

Pour certaines questions des liens Internet peuvent être proposés en complément.

U11 : Mathématiques

1. Exercice 1 :

1.1. Résolution d'une équation différentielle

1. (E_0) est une équation différentielle du premier ordre sans second membre, les solutions sur $[0; +\infty[$ sont :

$$y(t) = k e^{\frac{1}{5}t} = k e^{-0,2t} \quad \text{où } k \in \mathbb{R}.$$

2. $h(t) = at e^{-0,2t}$ $h'(t) = a e^{-0,2t} + at(-0,2e^{-0,2t}) = a e^{-0,2t} - 0,2at e^{-0,2t}$ (de la forme uv).

$$\begin{aligned} h \text{ est solution particulière de } (E) &\Leftrightarrow 5h'(t) + h(t) = e^{-0,2t} \\ &\Leftrightarrow 5(a e^{-0,2t} - 0,2at e^{-0,2t}) + at e^{-0,2t} = e^{-0,2t} \\ &\Leftrightarrow 5ae^{-0,2t} - ate^{-0,2t} + ate^{-0,2t} = e^{-0,2t} \\ &\Leftrightarrow 5ae^{-0,2t} = e^{-0,2t} \\ &\Leftrightarrow 5a = 1 \quad \text{car pour tout } t \in [0; +\infty[\quad e^{-0,2t} \neq 0 \\ &\Leftrightarrow a = \frac{1}{5} \end{aligned}$$

Soit $h(t) = \frac{1}{5}t e^{-0,2t} = 0,2t e^{-0,2t}$.

Pour $a = 0,2$, la fonction h est bien une solution particulière de (E) .

3. Les solutions de (E) sont formées des solutions de l'équation homogène (E_0) et d'une solution particulière de (E) . Donc : $y(t) = k e^{-0,2t} + 0,2t e^{-0,2t}$ où $k \in \mathbb{R}$.

4. $y(0) = k e^{-0,2 \times 0} + 0,2 \times 0 \times e^{-0,2 \times 0} = k e^0 = k$ Or $y(0) = 0$ donc $k = 0$ et par conséquent :

$$\text{pour tout } t \in [0; +\infty[\quad f(t) = 0,2t e^{-0,2t}.$$

1.2. Étude d'une fonction

1. C'est une forme indéterminée « $+\infty \times 0$ », mais : $f(t) = 0,2t e^{-0,2t} = \frac{0,2t}{e^{0,2t}}$.

Or $\lim_{t \rightarrow +\infty} 0,2t = +\infty$ et $\lim_{X \rightarrow +\infty} \frac{e^X}{X} = +\infty$ donc $\lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{e^{0,2t}}{0,2t} = +\infty$ d'où $\lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{0,2t}{e^{0,2t}} = 0$

soit $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 0$.

Comme $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 0$, la courbe C possède une asymptote horizontale d'équation $y = 0$ (l'axe des abscisses).

2. La fonction f est dérivable sur $[0; +\infty[$ comme produit et composée de fonctions dérivables sur $[0; +\infty[$. f est un produit, on utilise la forme $(uv)' = u'v + v'u$

où $u(t) = 0,2t$ $u'(t) = 0,2$

$v(t) = e^{-0,2t}$ $v'(t) = -0,2e^{-0,2t}$

$f'(t) = 0,2e^{-0,2t} + 0,2t(-0,2e^{-0,2t}) = 0,2e^{-0,2t} - 0,04te^{-0,2t}$ donc $f'(t) = e^{-2t}(0,2 - 0,04t)$.

3.

t	0	5	$+\infty$
$e^{-0,2t}$		+	+
$-0,04t + 0,2$		+	-
$f'(t)$		+	-
$f(t)$	0	e^{-1}	0

Pour tout $t \in [0; +\infty[$, $e^{-0,2t} > 0$ et $0,2 - 0,04t \geq 0 \Leftrightarrow -0,04t \geq -0,2$

$$\Leftrightarrow t \leq \frac{-0,2}{-0,04}$$

$$\Leftrightarrow t \leq 5$$

$$f(0) = 0$$

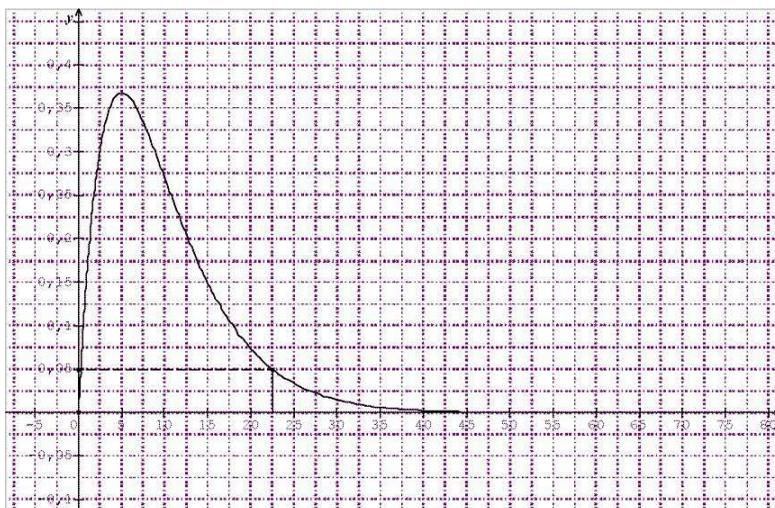
$$f(5) = 0,2 \times 5 e^{-0,2 \times 5} = e^{-1} \approx 0,368$$

La fonction f possède un maximum égal à e^{-1} atteint pour $t = 5$.

4. a)

t	0	2,5	5	10	15	20	25
f(t)	0	0,30	0,37	0,27	0,15	0,07	0,03

4.b)



1.3. Application

1. Graphiquement, au bout de 23 minutes, la quantité de médicament redevient inférieure à 0,05 mL.

2.

a)

F est dérivable sur $[0; +\infty[$:

$$F'(t) = (-1)e^{-0,2t} + (-t-5)(-0,2e^{-0,2t}) = -e^{-0,2t} + 0,2te^{-0,2t} + e^{-0,2t} = 0,2te^{-0,2t} = f(t)$$

Comme $F' = f$, F est une primitive de f sur $[0; +\infty[$.

b)

$$Vm = \frac{1}{23-0} \int_0^{23} f(t) dt = \frac{1}{23} [F(x)]_0^{23} = \frac{1}{23} (F(23) - F(0))$$

$$\text{Or } F(23) = (-23-5)e^{-0,2 \times 23} = -28e^{-4,6} \quad \text{et} \quad F(0) = (-0-5)e^{-0,2 \times 0} = -5.$$

$$\text{Donc : } Vm = \frac{1}{23} (-28e^{-4,6} + 5) \approx 0,21 \text{ à } 10^{-2} \text{ près.}$$

c)

La valeur moyenne sur l'intervalle $[0; 23]$ (les 23 premières minutes) est de 0,21 mL.

2. Exercice 2

2.1. Loi normale

1. X suit une loi normale de paramètres 1,5 ; 0,07.

$$P(1,35 \leq X \leq 1,65) = P(-0,15 \leq X - 1,5 \leq 0,15) = P\left(\frac{-0,15}{0,07} \leq \frac{X - 1,5}{0,07} \leq \frac{0,15}{0,07}\right) = P\left(\frac{-15}{7} \leq \frac{X - 1,5}{0,07} \leq \frac{15}{7}\right)$$

Et $Y = \frac{X - 1,5}{0,07}$ suit une loi $\mathcal{I}(0;1)$ donc :

$$P\left(\frac{-15}{7} \leq Y \leq \frac{15}{7}\right) = 2\pi\left(\frac{15}{7}\right) - 1 \approx 2 \times 0,9838 - 1 \approx 0,97 \text{ à } 10^{-2} \text{ près.}$$

2. X_1 suit une loi normale de paramètres 1,5 ; σ_1 . On a donc :

$$P(1,35 \leq X_1 \leq 1,65) = 0,99 \Leftrightarrow P(1,35 - 1,5 \leq X_1 - 1,5 \leq 1,65 - 1,5) = 0,99$$

$$\Leftrightarrow P\left(\frac{-0,15}{\sigma_1} \leq \frac{X_1 - 1,5}{\sigma_1} \leq \frac{0,15}{\sigma_1}\right) = 0,99$$

Et $Y_1 = \frac{X_1 - 1,5}{\sigma_1}$ suit une loi $\mathcal{I}(0;1)$, donc :

$$P\left(\frac{-0,15}{\sigma_1} \leq Y_1 \leq \frac{0,15}{\sigma_1}\right) = 0,99 \Leftrightarrow 2\pi\left(\frac{0,15}{\sigma_1}\right) - 1 = 0,99 \Leftrightarrow \pi\left(\frac{0,15}{\sigma_1}\right) = \frac{1+0,99}{2} = 0,995$$

Par lecture de la table : $\frac{0,15}{\sigma_1} = 2,58$ d'où $\sigma_1 = \frac{0,15}{2,58} \approx 0,06$ à 10^{-2} près.

2.2. Loi binomiale

1. Le tirage est assimilé à un tirage avec remise, les événements sont donc indépendants.

Il y a 2 issues possibles : un tube est soit défectueux, soit non défectueux.

Y_1 compte le nombre de tubes défectueux dans le prélèvement de 20 tubes, la variable aléatoire Y_1 suit donc une loi binomiale de paramètres : $n=20$ et $p=p(E)=0,02$.
 $Y_1 \sim B(20;0,02)$

$$2. p(Y_1 \leq 1) = p(Y_1 = 0) + p(Y_1 = 1) = \binom{20}{0} (0,02)^0 (0,98)^{20} + \binom{20}{1} (0,02)^1 (0,98)^{19} \approx 0,94 \text{ à } 10^{-2} \text{ près.}$$

2.3. Test d'hypothèse

1. Sous l'hypothèse H_0 : \bar{Z} suit une loi normale de paramètres $\mu=300$ et d'écart type $\sigma = \frac{1}{\sqrt{100}} = \frac{1}{10} = 0,1$.

$$P(300 - h \leq \bar{Z} \leq 300 + h) = 0,95 \Leftrightarrow P(-h \leq \bar{Z} - 300 \leq h) = 0,95 \Leftrightarrow P\left(\frac{-h}{0,1} \leq \frac{\bar{Z} - 300}{0,1} \leq \frac{h}{0,1}\right) = 0,95$$

La variable aléatoire $\frac{\bar{Z} - 300}{0,1}$ suit une loi $\mathcal{N}(0;1)$. On a alors :

$$P\left(\frac{-h}{0,1} \leq \frac{\bar{Z} - 300}{0,1} \leq \frac{h}{0,1}\right) = 0,95 \Leftrightarrow 2\pi\left(\frac{h}{0,1}\right) - 1 = 0,95 \Leftrightarrow \pi\left(\frac{h}{0,1}\right) = \frac{1 + 0,95}{2} = 0,975$$

Par lecture de la table : $\frac{h}{0,1} = 1,96$, soit $h = 1,96 \times 0,1 = 0,196 \approx 0,20$ à 10^{-2} près.

2. Si la moyenne d'un échantillon est dans l'intervalle $[300 - 0,20; 300 + 0,20]$, soit $[299,80; 300,20]$, on accepte la commande avec un risque d'erreur de 5%.

Si la moyenne d'un échantillon n'est pas dans l'intervalle $[299,80; 300,20]$.on n'accepte pas la commande avec un risque d'erreur de 5%.

3. Comme $299,90 \in [299,80; 300,20]$, on peut, au seuil de 5%, conclure que la livraison est conforme pour la longueur.

U12 : Sciences physiques et chimiques

1. PHYSIQUE

1.1.1. Le noyau de ${}_{15}^{32}P$ est constitué de 15 protons et 17 neutrons.

1.1.2. A représente le nombre de nucléons (protons + neutrons) ou nombre de masse. Z est le nombre de protons ou nombre de charges. Par conservation de A et de la charge électrique totale :

$$A+1 = 32 \text{ donc } A = 31 \text{ et } Z+0 = 15 \text{ donc } Z = 15. \quad {}_{Z}^A X = {}_{15}^{31}P$$

1.2.

1.2.1. La particule β^- est un électron : ${}_{-1}^0e$

1.2.2. ${}_{15}^{32}P \rightarrow \beta^- + {}_{Z'}^{A'}Y + h\nu$

$$32 = A' + 0 \text{ donc } A' = 32 \text{ et } 15 = -1 + Z' \text{ donc } Z' = 16. \quad {}_{Z'}^{A'}Y = {}_{16}^{32}S$$

1.3.

1.3.1. $E_{lib} = |\Delta m| \times c^2$

$$\Delta m = m_e + m_{\beta^-} - m_{\beta^+} = (5,485 \cdot 10^{-4} + 31,98220 - 31,98408)u$$

$$\Delta m = -1,3315 \cdot 10^{-3}u \text{ ou } \Delta m = -2,21 \cdot 10^{-30}kg$$

$$\text{donc } E_{lib} = 2,21 \cdot 10^{-30} \times (3,00 \times 10^8)^2$$

$$E_{lib} = 1,989 \cdot 10^{-13}J \text{ (unité SI)}$$

$$\text{EN MeV : } E_{lib} = \frac{1,989 \cdot 10^{-13}}{1,6 \cdot 10^{-19} \times 10^6} = 1,24 \text{ MeV}$$

1.3.2. Longueur d'onde : $E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$ donc $\lambda = \frac{h \cdot c}{E}$

$$\lambda = \frac{6,63 \cdot 10^{-34} \times 3,00 \cdot 10^8}{1,989 \cdot 10^{-13}} = 1,00 \cdot 10^{-12}m$$

Il s'agit donc de rayonnement gamma.

1.4.

1.4.1. Le temps de demi-vie ou période radioactive est la durée au bout de laquelle la moitié des noyaux radioactifs de l'échantillon sont désintégrés.

1.4.2. Une activité de 1 Becquerel correspond à une désintégration par seconde.

1.4.3. $\lambda = \frac{\ln 2}{T}$ donc $\lambda = \frac{\ln 2}{1,3 \times 24 \times 3600}$ donc $\lambda = 5,61 \cdot 10^{-7} s^{-1}$

1.4.4. $A_0 = \lambda \times N_0$ donc $N_0 = \frac{A_0}{\lambda}$ donc $N_0 = \frac{2,60 \cdot 10^9 Bq}{5,61 \cdot 10^{-7} s^{-1}}$
 $n_0 = 4,63 \cdot 10^5$ noyaux

1.4.5.

1.4.5.1 Loi de décroissance radioactive de l'activité : $A(t) = A_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$

1.4.5.2 On cherche t tel que : $A(t) = 0,20 \times A_0$

$$0,20 \times A_0 = A_0 \times e^{-\lambda \cdot t}$$

$$0,20 = e^{-\lambda \cdot t}$$

$$\ln(0,20) = -\lambda \cdot t \text{ donc } t = \frac{\ln(0,20)}{-\lambda}$$

$$t = \frac{-1,61}{5,61 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}} = 2,87 \cdot 10^6 \text{ s}$$

$$t \approx 33,2 \text{ jours}$$

2. CHIMIE GÉNÉRALE (17 points)

2.1.

2.1.1. Hydrogène : $Z = 1$

Oxygène : $Z = 8$

Chlore : $Z = 17$

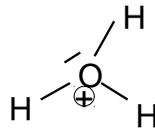
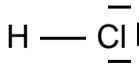
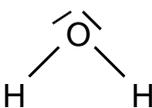
$1s^1$

$1s^2 2s^2 2s^4$

$z = 17$

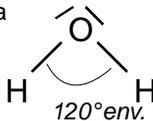
$1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^5$

2.1.2. schémas de Lewis :

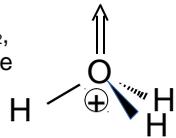


2.1.3.

H_2O est de type AX_2E_2 , la molécule est coudée :



H_3O^+ est de type AX_3E_2 , c'est donc une pyramide à base triangulaire :

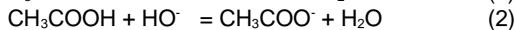


2.2.

2.2.1. Espèces en présence :

H_3O^+	CH_3COOH	H_2O
0	4,8	14
H_2O	CH_3COO^-	HO^-

2.2.1.1 Équations :



2.2.1.2 Constantes d'équilibre :

$$K_1 = \frac{1}{[H_3O^+][HO^-]} = \frac{1}{K_e} = \frac{1}{10^{-14}} = 14 \text{ et}$$

$$K_2 = \frac{[CH_3COO^-]}{[CH_3COOH][HO^-]} = \frac{[CH_3COO^-][H_3O^+]}{[CH_3COOH][HO^-][H_3O^+]} = \frac{K_A}{K_e} = \frac{10^{-4,8}}{10^{-14}} = 10^{9,8}$$

$K_1 \gg K_2$: l'acide chlorhydrique est dosé en premier, et les deux acidités sont distinctes.

2.2.1.3 détermination graphique :

E1 : V = 6 mL, pH = 3

E2 : V = 14 mL, pH = 9

2.2.1.4

Première équivalence :

$$n_{OH \text{ versés}} = n_{HCl \text{ départ}}$$

donc $C_B \times V_{E1} = C_{HCl} \times V_A$

$$\text{soit } C_{HCl} = \frac{C_B \times V_{E1}}{V_A}$$

Application numérique :

$$C_{HCl} = \frac{0,500 \times 6}{50}$$

$$C_{HCl} = 0,06 \text{ mol} \cdot L^{-1}$$

Deuxième équivalence :

$$n_{OH \text{ versés}} = n_{AH \text{ départ}}$$

donc

$$C_B \times (V_{E2} - V_{E1}) = C_{AH} \times V_A$$

$$\text{soit } C_{AH} = \frac{C_B \times (V_{E2} - V_{E1})}{V_A}$$

Application numérique :

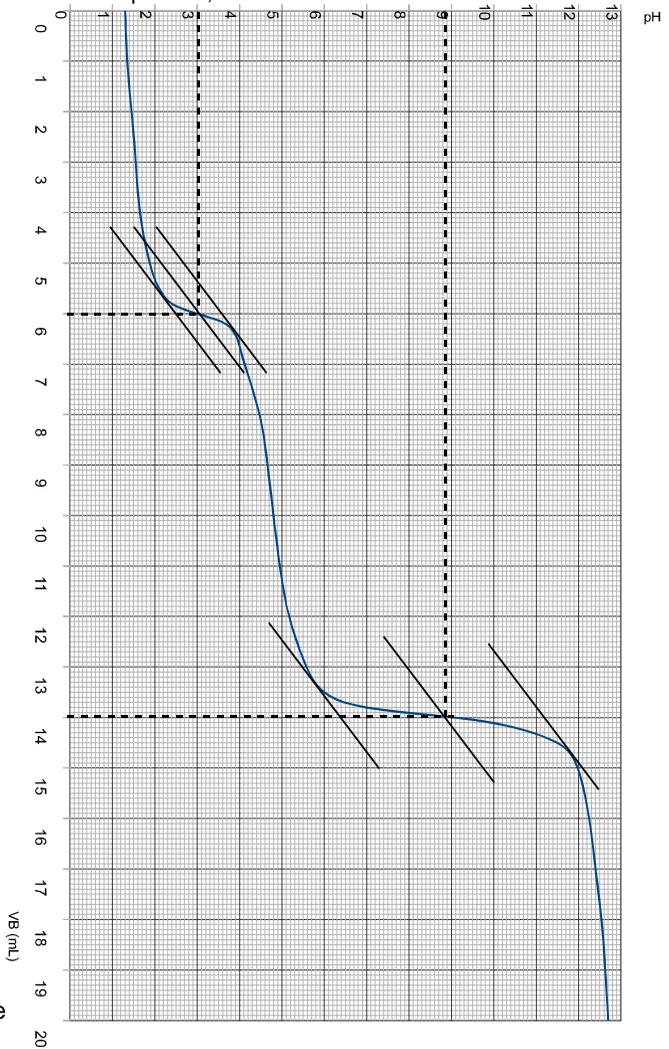
$$C_{HCl} = \frac{0,500 \times (14 - 6)}{50}$$

$$C_{HCl} = 0,08 \text{ mol} \cdot L^{-1}$$

2.2.2. La seconde neutralisation

nécessite le versement de $14 - 6 = 8$ mL de soude, soit 4 mL seulement pour la demi-équivalence. En tenant compte des 6 mL versés pour la première neutralisation, on retrouve bien un volume de 10 mL. Pour $V = 10$ mL, on lit

$$pH = 4,8 = pK_{A(CH_3COOH)}$$



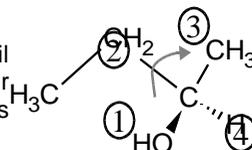
- 2.2.3. À la seconde équivalence, la solution ne contient plus d'ions H_3O^+ ni de CH_3COOH . Il ne reste que les ions spectateurs Cl^- et Na^+ , ainsi que l'ion CH_3COO^- produit par la réaction (2). Or CH_3COO^- est une base faible, la solution aura donc un pH supérieur à 7.

3. CHIMIE ORGANIQUE (17 points)

3.1.

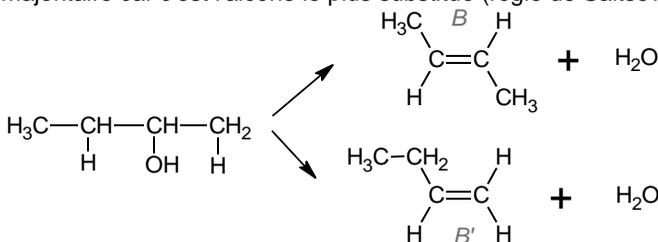
3.1.1. A est le butane-2-ol.

3.1.2. Ordre des substituants : $\text{OH} > \text{C}_2\text{H}_5 > \text{CH}_3 > \text{H}$ et l'œil observe du carbone asymétrique vers le dernier substituant (H). Les groupements sont ordonnés dans le sens horaire donc la configuration est R.



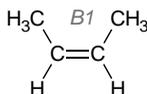
3.2.

3.2.1. La réaction est une déshydratation intramoléculaire conduisant à un alcène. La réaction peut donner deux alcènes possibles, B et B', mais B est majoritaire car c'est l'alcène le plus substitué (règle de Saytsev).

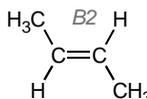


3.2.2.

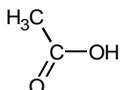
B1 : Z but-2-ène



B2 : E but-2-ène



3.3. C est l'acide éthanoïque :



3.4. La première étape est une **substitution électrophile** caractérisée par l'attaque du carbocation CH_3^+ sur le noyau aromatique du benzène. La deuxième étape est une **substitution radicalaire**, l'alcane est attaqué par les radicaux libres $\text{Cl}\cdot$ issus du clivage de Cl_2 en présence d'UV.

3.5.

3.5.1. L'aldéhyde nécessaire ne comporte qu'un atome de carbone : c'est le méthanal de formule $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$.

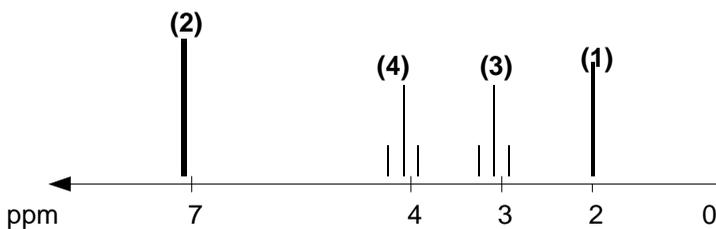
3.5.2. L'alcool **E** est le 2-phényléthanol.

3.6.

3.6.1. C'est une estérification, une réaction lente, athermique et limitée.

3.6.2. La molécule **F** comporte :

- (1) 3 protons appartenant au $-CH_3$ terminal, sans voisin : **singulets**
- (2) 5 protons portés par le noyau benzénique, sans voisin et très déblindés (signal de forte amplitude)
- (3) 2 protons avec 2 voisins appartenant au premier $-CH_2-$ après le benzène : 3 pics
- (4) 2 protons avec 2 voisins appartenant au second $-CH_2-$ après le benzène : 3 pics.



U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Eléments de corrigé

Les vecteurs plasmidiques

1. Le plasmide pBR322 (10,5 points)

I.1.1. Brin codant : brin d'ADN complémentaire au brin transcrit. C'est le brin sur lequel on peut lire directement la séquence traduite en protéine pour les procaryotes (dont le génome ne contient pas d'introns). Pour les eucaryotes, il faut « éliminer » les séquences introniques pour reconstituer le cadre ouvert de lecture. La séquence du brin codant est identique à celle de l'ARN (sauf T de l'ADN correspondent à U dans l'ARN).

Brin transcrit : brin servant de matrice lors de la transcription, sa séquence est complémentaire à celle de l'ARN.

Le terme « complément » indique que le cadre ouvert de lecture du gène bla est repéré sur brin complémentaire de la séquence fournie .

La séquence GenBank fournie correspond donc pour ce gène au brin transcrit ou matrice.

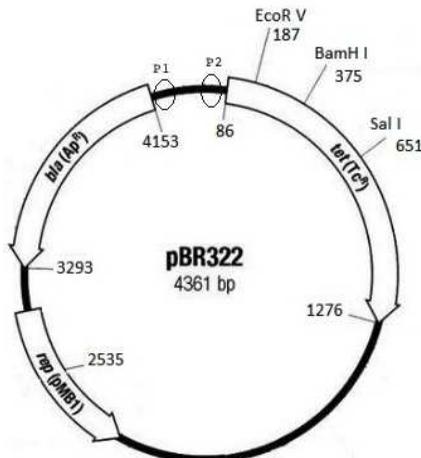
I.1.2. Promoteur fort constitutif, 3 mots à définir.

Promoteur : séquence nucléique localisée à proximité en amont du site initiateur de la transcription (+1 de transcription), sur laquelle se fixe l'ARN polymérase et impliquée dans l'initiation de la transcription.

Fort : se dit d'un promoteur ayant une initiation de transcription très efficace et donc permettant la synthèse de très nombreux ARN.

Constitutif : se dit d'un promoteur dont l'activité est non régulée, la synthèse d'ARN est donc constante. (Remarque : Les promoteurs régulés sont inductibles ou répressibles)

I.1.3.



I.1.4.

Code	R	Y	W	S
bases	Adénine Guanine	Cytosine Thymine	Adénine Thymine	Guanine Cytosine

I.1.5. FASTA , est à l'origine un algorithme d'alignement de séquences protéiques ou nucléiques « FAST-All » développé par Pearson (à partir d'un programme existant pour l'alignement de protéine FASTP).

FASTA fait référence maintenant à un format de présentation des séquences protéiques ou nucléiques utilisé pour réaliser les analyses de séquences (alignement, annotation...). Une séquence au format FASTA contient 2 données :

- une première ligne commençant par « > » décrivant la séquence (80 caractères max.)
- suivi d'un paragraphe montrant la totalité de la séquence utilisant un code à une lettre sans espace.

I.1.6. Le site de restriction de Sal I est palindromique, en effet les séquences lues sur les 2 brins en respectant la même orientation (de 5'--> 3') sont identiques.

I.1.7. « Cleavage affected by C methylation » signifie que si une ou plusieurs bases cytosine de la séquence cible de Sal I sont méthylées, l'enzyme ne reconnaît plus la séquence et donc il n'y a pas d'hydrolyse.

I.1.8. On parle d'enzyme compatibles quand les extrémités générées par l'hydrolyse de fragments d'ADN par 2 enzymes différentes peuvent être reliées.

BamH I	Bgl II	Produit de ligation obtenu
$5' \text{---} \text{G} \text{---} + 5' \text{---} \text{GATCC} \text{---} 3'$ $3' \text{---} \text{CCTAG} \text{---} 3'$	$5' \text{---} \text{A} \text{---} + 5' \text{---} \text{GATCT} \text{---} 3'$ $3' \text{---} \text{TCTAG} \text{---} 5'$	$5' \text{---} \text{GGATCT} \text{---} 3'$ $3' \text{---} \text{CCTAGA} \text{---} 5'$

I.2. Le plasmide pBR322, vecteur de clonage

I.2.1. Le clonage utilisant 2 enzymes de restriction permet :

- de connaître le sens d'insertion du fragment cloné dans le vecteur et donc de réaliser un clonage orienté
- d'éviter la re-circularisation du vecteur (double digéré par des enzymes non compatibles) et donc de réduire considérablement le bruit de fond du clonage (colonies de bactéries ayant intégré le vecteur « vide »)

I.2.2. Choix du tampon D, car Sal I y a 100% d'activité et BamH I y a entre 50-75% d'activité.

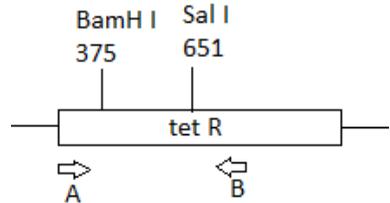
La diminution d'activité de BamH I dans ce tampon D est compensée en introduisant plus d'enzyme BamH I (1,5 à 2 fois plus).

I.2. 3. Vérification du clonage par PCR

Le choix des amorces définit la présence ou l'absence de produit d'amplification et la taille attendue du produit d'amplification obtenu, facilement repérable après électrophorèse en gel d'agarose par comparaison à des marqueurs de masse moléculaire.

1er cas : Choix d'amorces situées sur le vecteur encadrant les sites de restriction utilisés. Elles peuvent être choisies dans l'ORF Tet^R ou hors de l'ORF Tet^R (dans ce cas tous les clonages utilisant des enzymes de l'ORF Tet^R sont analysables par ce couple d'amorces).

Amorce sens **A** localisée à « **a** » pb du site BamH I
Amorce antisens **B** localisée à « **b** » pb du site Sal I.



Tailles attendues du produit d'amplification :

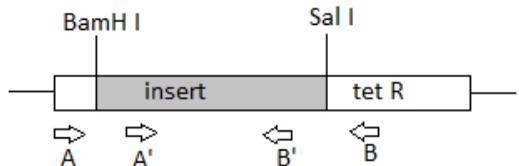
- Vecteur non recombiné (natif)
 $a + (651-375) + b = a+b+276$ en pb
- Vecteur recombiné avec insert de taille X
 $a - (651-375) + X + b = a+b+X-276$ en pb

2ème cas : l'insert en connu et une ou plusieurs amorces spécifiques de la séquence clonée sont disponibles, notées A' et B' sur le schéma. L'amplification sera obtenue exclusivement pour les vecteurs recombinés. Pour le vecteur vide, on n'observe pas de bande d'amplification.

Amorce sens **A'** localisée à « **a'** » pb du site BamH I
Amorce antisens **B'** localisée à « **b'** » pb du site Sal I.

Tailles attendues du produit d'amplification :

- Amorces A' et B'
 $X - a' - b'$ en pb
- Amorces A et B'
 $a + X - (651 - 375) - b' = a + X - b' - 276$ en pb
- Amorces A' et B
 $X - a' - (651 - 375) + b = X + b - a' - 276$ en pb



1.2.4. Points critiques de la préparation d'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline :

* Ne pas vortexer après addition de la solution de lyse alcaline, pour éviter de fragmenter le chromosome bactérien dont les fragments de petite taille obtenus contamineraient la préparation d'ADN plasmidique.

* Ne pas dépasser une durée de lyse de 5 minutes qui dénaturerait de façon irréversible l'ADN plasmidique superenroulé et le rendrait inutilisable pour les applications ultérieures.

2. Les plasmides pUC18 et pEGFP-C (3,5 points)

Les plasmides pUC18 et pEGFP-C sont deux exemples de vecteurs plus perfectionnés que le plasmide pBR322.

Le **document 6** présente la carte du vecteur pUC18.

2.1. Expliquer les deux rôles de la région 146-469 dans le cadre d'un clonage.

La région comprise entre les nucléotides 146-469 correspond à la séquence LacZ α /MCS.

MCS : Multi-cloning site (polylinker) ou site multiple de clonage, séquence du plasmide contenant de nombreux sites uniques de restriction permettant le clonage d'un fragment d'ADN (

insert)

LacZ α : permet l' α -complémentation fonctionnelle appelé aussi test blanc/bleu.

- LacZ α est une séquence nucléique qui code le fragment α (N-terminal) de la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur inducible par l'IPTG (IsoPropylThio β -galactoside), un analogue structural non hydrolysable du lactose.

- Les bactéries utilisées pour le clonage avec des vecteurs pUC, synthétisent le fragment LacZ ω sous le contrôle d'un promoteur inducible par l'IPTG.

- Les bactéries transformées par un vecteur pUC « vide », natif ou non recombiné ET induites par l'IPTG, → synthétisent les 2 fragments de LacZ α et ω qui reconstituent une β -galactosidase active dont l'activité est révélée par l'addition d'un substrat chromogène (X-gal), → apparaissent sous forme de colonies bleues

- Les bactéries transformées par un vecteur pUC recombiné (contenant l'insert) ET induites par l'IPTG, → ne peuvent plus synthétiser LacZ α dont le cadre de lecture est interrompu par l'insert, on parle de mutagenèse par insertion

→ synthétisent le fragments de LacZ ω mais ne reconstituent pas l'activité une β -galactosidase

→ apparaissent sous forme de colonies blanches, en présence de substrat chromogène X-gal

2.2. En amont de la séquence LacZ α , se trouve le promoteur lac, permettant l'induction de la transcription en présence d'IPTG. (promoteur minimal et opérateur)

2.3. Un vecteur navette est un vecteur fonctionnant dans 2 hôtes différents :

→ *E. coli* est un hôte obligatoire , car permet de mettre en œuvre le clonage. Les séquences indispensables sont une origine de réplication pour *E. coli*: ORI (ici pUC ORI) et un gène marqueur de sélection sous le contrôle d'un promoteur bactérien (ici Kan^R).

→ cellules de mammifères, car il s'agit d'un vecteur d'expression eucaryote pour transfections stables. On distingue la région permettant l'expression dans les cellules de mammifère d'une protéine de fusion avec l'eGFP (pCMV/eGFP/MCS/SV40 polyA), et un gène de résistance à la généticine (NéoR) sous le contrôle d'un promoteur viral SV40.

2.4. pCMV : promoteur viral du cytomégalovirus, permet l'initiation de a-la transcription dans les cellule de mammifères

SV40polyA : séquence consensus de poly-adénylation du virus SV40, permettant l'arrêt de transcription et la poly-adénylation des ARN transcrits dans les cellules de mammifères.

2.5. Etiqueter une protéine d'intérêt consiste en la faire synthétiser sous forme d'une protéine fusion (en phase) avec une protéine ou un peptide ayant des propriétés physico-chimiques particulières. L'étiquette peut être fusionnée en N-term ou en C-term de la protéine d'intérêt (ici fusion en N-term de la protéine d'intérêt)

L'étiquetage par la GFP ou les autres protéines naturellement fluorescentes facilite l'observation de la protéine d'intérêt par microscopie à fluorescence et de connaître sa localisation subcellulaire (il faut que le partenaire de fusion n'interfère pas avec la procédure d'adressage de la protéine d'intérêt).

L'étiquetage peut être choisi pour faciliter les procédure de purification des protéines d'intérêt, l'exemple le plus courant est l'étiquette 6 Histidines (purification sur support chromatographique IMAC).

L'étiquetage permet aussi de détecter/ doser facilement la protéine d'intérêt surexprimée en utilisant un réactif (par exemple un anticorps) spécifique de l'étiquette.

3. La réplication des plasmides (5 points)

3.1. La réplication du plasmide pColE2

3.1.1. La primase est une ARN polymérase ADN dépendante, elle permet la synthèse *de novo* d'une amorce ARN à partir d'une matrice ADN.

L'action de la primase est indispensable lors de l'initiation de la réplication pour former l'amorce nécessaire à la synthèse d'ADN. Les ADN polymérases exigent une amorce leur fournissant un 3'OH libre pour permettre leur activité pol (5'→3').

3.1.2. L'activité 3'→5' exonucléase ou activité de relecture (proofreading) permet d'éliminer le dernier nucléotide incorporé en cas de mésappariement. Elle permet d'augmenter la fidélité de la réplication.

3.2. Le contrôle de la réplication du plasmide pColE2

3.2.1. On réalise une cinétique d'association entre l'ARN I marqué et l'ARN REP non marqué. A $t=0$ on observe une seule bande correspondant à l'ARN I non hybridé. A partir de $t=0,5$ min, on voit apparaître une bande ayant migré moins loin que l'ARN I non hybridé. L'intensité de cette bande augmente avec la durée d'association alors que celle correspondant à l'ARN I non hybridé diminue.

Donc en présence de l'ARN REP, la mobilité électrophorétique de l'ARN I diminue, la migration sur gel de l'ARN I est retardée. L'hybridation moléculaire entre l'ARN REP et l'ARN I,

3.2.2. Un ARN anti-sens est un ARN dont la séquence est complémentaire à celle d'un ARNm.

« silencing » : l'hybridation d'un ARNm avec un ARN antisens inhibe la synthèse protéique et donc éteint l'expression du gène concerné.

3.2.3. La protéine REP se lie à la séquence ORI pour initier la réplication du plasmide pColE2. Plus la quantité de protéine REP est importante, plus la fréquence d'initiation de réplication est grande et donc plus le nombre de copie du plasmide est grand. La présence d'ARN I permet l'apparition d'un hybride ARN REP/ARN I. L'ARN REP n'est donc plus disponible pour la traduction, la quantité de protéine REP traduite diminue, conduisant à une moindre initiation de réplication donc limitant le nombre de copie du plasmide.

U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

1.1 oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérase, ligases

1.2 $\text{Glucose} + \text{O}_2 \longrightarrow \beta\text{-gluconolactone} + \text{H}_2\text{O}_2$
 $\beta\text{-gluconolactone} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{acide gluconique}$

$\text{Glucose} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{acide gluconique} + \text{H}_2\text{O}$

1.3 La GOD est une protéine globulaire dimérique, présentant des éléments de structure secondaire de type feuillets bêta et hélices alpha
 Elle est glycosylée par un oside riche en mannose.

1.4 L'apoenzyme correspond à la partie purement protéique de l'enzyme, c'est à dire sans le coenzyme (FAD)

1.5 $\text{ose} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}$  (sérine)

1.6 FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

Structure simplifiée :



1.7 Le FAD prend en charge 2 H⁺ et 2 e⁻ :

$\text{Glucose} + \text{FAD} \longrightarrow \text{gluconolactone} + \text{FADH}_2$

$\text{FADH}_2 + \text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{FAD}$

2.1. Etape 2 : résine échangeuse de cations (groupements carboxyliques chargés négativement au pH de travail)

Etape 4 : résine échangeuse d'anions (groupements amines chargés positivement au pH de travail)

2.2. A forte concentration, le sulfate d'ammonium accapare les molécules d'eau, alors moins « disponibles » pour la solvation des protéines, qui précipitent.

Le précipité peut être récupéré et resolubilisé dans l'eau mais la concentration en sulfate d'ammonium reste élevée, ce qui pourrait perturber les étapes ultérieures de purification. La dialyse permet donc l'élimination du sulfate d'ammonium (dessalage).

2.3. Le facteur d'enrichissement correspond au rapport de l'activité spécifique après l'étape 2 et de l'activité spécifique avant l'étape 2.

$$E = \frac{Z_{sp\text{étape } 2}}{Z_{sp\text{étape } 1}} = \frac{80}{20} = 4$$

3.1. Réaction principale : $\text{Glucose} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{gluconolactone} + \text{H}_2\text{O}_2$

Réaction indicatrice : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{PAP} + \text{chloro-4-phénol} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{quinonéimine rouge}$
 Le glucose est transformé quantitativement en gluconolactone et par la GOD, puis l'H₂O₂ est dégradée quantitativement par la peroxydase en un composé rouge (réactions totales).

Il y a donc proportionnalité entre la concentration en glucose dans l'échantillon et l'intensité de la coloration.

- 3.2.** Méthode en point final.
On attend (10 min à 37°C ou 20 min à 20°C) que tout le glucose ait été consommé.
- 3.3.** U/L : quantité d'enzyme qui transforme 1 µmole de substrat par minute et par L de réactif R1
- 3.4.** R1 contient : - tampon permettant le maintien d'un pH compatible avec l'activité de
 la GOD et de la POD
 - la GOD permettant la transformation du substrat à doser
 - la POD permettant la réaction indicatrice
 - un des substrats chromogène de la POD
 R2 contient le deuxième substrat chromogène de la POD
 R3 est la solution étalon de glucose à 1 g/L ; elle permet de faire un étalonnage en un point par comparaison.
- 3.5.** La limite de linéarité de la méthode de dosage est de 5 g/L.
 Comme on attend une concentration comprise entre 5 et 30g/L, donc il faut diluer le moût de fermentation au 1/10 pour passer en dessous de cette limite de linéarité (tout en restant au dessus du seuil de détectabilité).
 Par ailleurs, la mélasse étant fortement colorée, il faut réaliser un blanc contenant 1 mL d'eau distillée et 10 µL de mélasse diluée au 1/10.
- 3.6.**
$$\frac{(A_{dosage} - A_{blanc\ dosage})}{A_{étalon}} \times C_{étalon} \times Fd = \frac{0,340 - 0,04}{0,150} \times 1 \times 10 = 20 \text{ g/L}$$
- 4.1.** Inclusion dans un gel: l'enzyme est piégée dans un polymère (alginate, polyacrylamide)
 Adsorption sur une membrane par interaction de faible énergie (liaisons ioniques par ex)
 Coréticulation : formation de liaisons covalentes entre molécules enzymatiques et protéines non enzymatiques (gélatine, sérum albumine bovine)
- 4.2.** Avantages : les enzymes immobilisées peuvent être réutilisées et sont plus stables (meilleure résistance à la chaleur)
 Inconvénients : perte d'activité lors de l'immobilisation, complexité de la mise en œuvre
- 4.3.** Les fonctions aldéhyde du glutaraldéhyde (2 par molécule) réagissent avec les fonctions amine de la Gox et du support. Des liaisons covalentes sont ainsi créées entre molécules enzymatiques et entre enzyme et support.
 Le glutaraldéhyde est appelé agent pontant.
- 4.4.** - le glucose présent dans le milieu traverse la membrane semi perméable et est transformé par la Gox en acide gluconique + H₂O₂
 - le potentiel imposé entre l'électrode de platine et l'électrode de référence (Ag/AgCl) provoque l'oxydation de l'H₂O₂, ce qui génère un courant d'intensité proportionnelle à la concentration de glucose : ce biocapteur est dit ampérométrique.

U41 : Microbiologie et génie fermentaire

1. Les bactériophages

- 1.1. Les virus ont une structure acellulaire, un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et sont des parasites intracellulaires obligatoires sans métabolisme autonome.
- 1.2. La symétrie est mixte car il présente deux parties distinctes : une tête à symétrie icosaédrique ou cubique (élément 1) et queue à symétrie hélicoïdale (élément 2).
- 1.3. élément 3 = gaine contractile qui permet la perforation de la paroi et de la membrane plasmique et l'injection de l'ADN dans la bactérie hôte
- 1.4. élément 4 = fibres caudales qui permet l'adsorption spécifique sur le récepteur bactérien
- 1.5. les schémas doivent faire apparaître les étapes caractéristiques suivantes : l'Adsorption/fixation spécifique, la décapsidation (injection de l'ADN phagique dans la bactérie), blocage du cycle lytique et intégration de l'ADN phagique dans le chromosome (nommé prophage) et réplication du prophage lors de la division bactérienne.
- 1.6. La phagothérapie est basée sur la lyse bactérienne par un phage. Les phages lysogènes n'induisent pas la lyse bactérienne.
- 1.7. C'est la transduction localisée/restrainte : transfert partiel d'ADN bactérien excisé en même temps que le prophage lors de la réactivation du cycle lytique. (Généralement, le phage transductant est déficient.)
- 1.8. Transformation : incorporation par une cellule compétente d'un ADN libre dans le milieu. Conjugaison : transfert par contact étroit d'un plasmide d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse qui ne possède pas ce plasmide.

2. Études expérimentales

- 2.1. Centrifugation 10 minutes à 10 000 rpm suivi d'une filtration (pores 0,45 µm).
- 2.2. On compte 20 UFP sur la boîte pour un étalement de 0,1 mL (v = volume) de la dilution 10^{-7} (d = dilution) ce qui fait :
- 2.3. titre = nombre UFP/volume * $1/d$ soit $20/0,1 * 10^7 = 2.10^9$ UFP/mL
- 2.4. Repérer la phase exponentielle qui est la même pour les deux conditions tester : entre 60 et 150 minutes, $\mu_{\text{expo}} = (\text{Ln } A_{600,150} - \text{Ln } A_{600,60}) / (150 - 60)$
- 2.5. Soit $\mu_{(\text{expo_sans_Kpn5})} \approx 0,02 \text{ min}^{-1}$ soit $1,2 \text{ h}^{-1}$ et $\mu_{(\text{expo_avec Kpn5})} \approx 0,015 \text{ min}^{-1}$ soit $0,9 \text{ h}^{-1}$
- 2.6. L'écart relatif entre les 2 valeurs est de $= (0,02 - 0,015) / (0,02)$ soit 25 % (N.B. : prendre 0,02 comme dénominateur pour faciliter le calcul).
- 2.7. En présence du phage Kpn5, des bactéries sont lysées et ne sont pas prises en compte dans la mesure du trouble par rapport à la croissance sans phage. La pente est donc inférieure.
- 2.8. Pour le milieu A : l'extrait de levure apporte essentiellement les facteurs de

croissance/vitamines par rapport aux autres composants.

- 2.9. Pour le milieu B : (K_2HPO_4/KH_2PO_4) est le système tampon ; KNO_3 source d'azote minéral et le glucose est la source primaire de carbone et d'énergie.*
- 2.10. Le milieu A est un milieu complet empirique tandis que le milieu B est un milieu minimum synthétique.*
- 2.11. Le type trophique de la souche est : Chimiotrophe (source énergie chimique : glucose), organotrophe (source électrons organique : glucose), hétérotrophe (source carbone organique : glucose) et prototrophe (pousse sur B sans facteur de croissance).*
- 2.12. Schéma d'un bioréacteur prêt pour l'autoclavage. Le schéma doit faire ressortir les éléments essentiels suivant : le système d'agitation (axe + pâles), les sondes de température et de pH, le système d'aération sous les pales, le système d'inoculation le système de prélèvement et le système de sortie (avec condenseur) des gaz. De plus, tous les tubes plongeurs doivent être clairement indiqués comme fermés (pince de Mohr) ainsi que tous les tubes non plongeurs sauf un (éventuellement le tube de sortie des gaz). Enfin, les extrémités des tubes et connections doivent être protégés (coton + aluminium).*
- 2.13. On détermine un taux de survie des souris après infection par des bactéries et en présence ou non de phages.*
- 2.14. Le groupe contrôle montre que les souris meurent. Le taux de survie est de 55,8 % à 24 h, 19,4 % à 48 h et de 5,5 % à 72 h.*
- 2.15. Pour l'ensemble des souris traitées par les bactériophages, le taux de survie est toujours supérieur à 80 % à 72 h contre 5,5 %. Conclusion, les phages permettent de combattre l'infection par cette bactérie.*
- 2.16. C'est le phage Kpn5, car il donne le meilleur taux de survie quel que soit le temps d'incubation.*

3. Phagothérapie et antibiothérapie

- 3.1. Molécule chimique, naturelle ou synthétique, ayant une toxicité sélectivement antibactérienne, via un mécanisme biospécifique (action sur le métabolisme procaryote). L'antibiotique agit à faible dose et a un spectre d'action (il est efficace seulement sur un groupe de bactérie).*
- 3.2. La paroi avec l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane (transpeptidations). Les ribosomes avec l'inhibition de la synthèse protéique...*
- 3.3. Les antibiotiques 2 (Aztréonam) et 6 (céphalosprine) possèdent un noyau β -lactame et appartiennent à la famille des β -lactamines.*
- 3.4. La lecture de la boîte témoin (antibiogramme sans phage) met en évidence l'activité des antibiotiques 2, 3, 4, 6 sur la bactérie, tandis que les antibiotiques 1 et 5 sont inactifs sur la bactérie.*
- 3.5. La lecture de la boîte essai (antibiogramme avec phage) met en évidence des plages*

de lyse identiques pour les 2 antibiotiques inactifs et autour du halo d'inhibition des antibiotiques actifs 3 et 4. Par contre, on observe des plages de lyse beaucoup plus grandes près des halos des antibiotiques 2 et 6. Hypothèse pour expliquer cet effet : ces antibiotiques de la famille des β -lactamines fragilisent la paroi et facilitent l'action lytique des phages.

U42 : Biologie cellulaire

1. Production des plantes transgéniques exprimant l'HBs

1.1.1. Morphologie de base d'une Angiosperme :

a : fleur b : limbe ou feuille c : pétiole d : bourgeon
e : tige f : système caulinaire ou aérien g : système racinaire

1.1.2. **Méristème** : zone de prolifération des cellules végétales conservant un caractère indifférencié tout au long de la vie. Site de mitoses, de différenciation et d'organogenèse végétale.

1.1.3. **Méristèmes primaires** : ils sont situés à l'apex des tiges et des racines, ou au niveau des bourgeons axillaires. Ils constituent les méristèmes responsables de la croissance en longueur / hauteur de la plante, et de la formation de nouveaux organes (feuilles...).

1.1.4. Principe d'un microscope électronique à transmission : il est calqué sur celui d'un microscope photonique. La lumière (photons) y est remplacée par un faisceau d'électrons, les lentilles par des champs électromagnétiques, l'œil de l'observatoire par un écran fluorescent ou une plaque photo.

La préparation est préalablement déshydratée, coupée à l'ultramicrotome (épaisseur $<1\mu\text{m}$) et traitée par des métaux lourds. Elle est placée dans le vide sur une grille métallique, les électrons ne pouvant traverser ni l'air, ni l'eau, ni le verre.

1.1.5. Ultrastructure d'une cellule végétale :

1 : paroi pectocellulosique 2 : membrane plasmique 3 : mitochondrie 4 : vésicule ou peroxysome
5 : cytosquelette 6 : noyau 7 : chloroplaste 8 : vacuole
9 : dictyosome / appareil de Golgi 10 : réticulum endoplasmique rugueux 11 : plasmodesme 12 : hyaloplasme / cytosol.

1.1.6. La paroi (1), les chloroplastes (7), la vacuole (8) et les plasmodesmes (11) sont absents d'une cellule animale.

1.2.

1.2.1.

Constituant	exemples
macroéléments	Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^- , NH_4^+ ...
microéléments	Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ...
molécules organiques	glucides (saccharose), vitamines (vitamines B
eau, Agar agar.	

1.2.2. Les phytohormones sont des messagers chimiques entre les cellules végétales. Elles contrôlent la croissance, le développement, l'organogenèse de la plante. Leur production est modulée par l'environnement (lumière, eau, température...)

1.2.3.

- Rapport Auxine / cytokinine : $\frac{0,2}{2}=0,1$. Les cytokinines sont majoritaires, ce qui permet le développement prioritaire des organes aériens (feuilles, tiges).
- Le milieu (b) ne contient que de l'auxine. Il va donc favoriser l'enracinement des plants.
- L'hygromycine est un agent de sélection (« antibiotique » eucaryote) qui provoque la mort des cellules végétales non transformées par le plasmide comportant un gène de résistance. Le cefotaxime est un antibiotique qui tue la bactérie *Agrobacterium* et évite son développement dans le milieu de culture d'explant.

1.2.4. Les paramètres régulés sont au minimum la température et la durée d'éclairage. Sont également maîtrisés l'intensité lumineuse, ainsi que le degré d'hygrométrie (humidité de l'enceinte de culture).

2. Utilisation des plantes transformées : tests d'immunisation

2.1.

- dose immunogène : quantité d'antigène permettant, par administration à un organisme, de déclencher une réponse immunitaire adaptative.
- réponse primaire : réponse immunitaire adaptative consécutive à la première mise en contact de l'organisme avec l'antigène.
- réponse secondaire : réponse immunitaire adaptative déclenchée par un nouveau contact avec l'antigène, dans les semaines ou les années suivant la réponse primaire.

2.2. La souris A est une souris témoin : elle reçoit uniquement le vaccin commercial et déclenche une réponse primaire. Suite à l'injection, le taux d'anticorps augmente pendant trois semaines : ce sont les IgM produits lors de la réponse primaire. Le taux d'anticorps diminue ensuite lentement, un taux faible persiste au bout de 23 semaines. L'injection de tomatillos sauvages n'a aucun effet sur le taux d'anticorps – le témoin est donc validé.

2.3. La souris B présente la même réponse immunitaire primaire à l'injection du vaccin commercial. En revanche, l'ingestion de tomatillos transgénique provoque une réponse anticorps secondaire, sans phase de latence à partir de la 23^e semaine. Les anticorps produits sont alors probablement des IgG (plasmatisques) ou des IgA.

Le mécanisme impliqué est celui de la mémoire immunitaire : des lymphocytes-mémoires activés lors de la réponse primaire sont ré-activés très rapidement lors de la réponse secondaire.

3. Apport des biotechnologies dans la vaccination

3.1. Vaccins classiques :

- Vaccins contenant les microorganismes inactivés (ou tués) sans pouvoir pathogène,
- Vaccins contenant les microorganismes atténués par exemple par des cultures successives : pouvoir pathogène réduit
- Vaccins « sous-unités », comme les anatoxines ou la protéine HBs : un seul constituant du pathogène, séparé du microorganisme ou de la partie toxique.

3.2. Les vaccins à ADN constituent une stratégie reposant sur l'injection d'ADN nu à l'organisme à immuniser. L'ADN va être transcrit dans des cellules de l'organisme, et conduire à la production de protéines immunogènes sécrétées qui déclencheront la réponse immunitaire. Peu concluante dans la production de vaccins anti-infectieux, cette stratégie a été réactualisée pour la recherche de vaccins anti-cancéreux.

Session 2012 : sujets et éléments de corrigé

2012 – U11 : Mathématiques

Durée 2 h – coefficient 1

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.

I EXERCICE 1 (11 points)

Cet exercice propose l'étude de la contamination accidentelle d'un cours d'eau par un polluant. La partie B est consacrée à l'étude d'une fonction qui permet d'exprimer, dans la partie C, la concentration de polluant dans l'eau en fonction du temps.

Les deux premières parties de l'exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

I.1 Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle $(E) : y' + 0,25y = 3e^{-t}$, où y est une fonction de la variable réelle t , définie et dérivable sur l'intervalle $[0; +\infty[$ et y' la fonction dérivée de la fonction y .

1.1.1 Déterminer les solutions sur l'intervalle $[0; +\infty[$ de l'équation différentielle :
 $(E_0) : y' + 0,25y = 0$

1.1.2 Soit h la fonction définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par : $h(t) = -4e^{-t}$. Démontrer que h est une solution particulière de l'équation différentielle (E) .

1.1.3 En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E) .

1.1.4 Déterminer la solution f de l'équation différentielle (E) qui vérifie la condition initiale : $f(0) = 75$

I.2 Étude d'une fonction et calcul intégral

Soit f la fonction définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par : $f(t) = 79e^{-0,25t} - 4e^{-t}$

On désigne par C la courbe représentative de la fonction f dans un repère orthogonal $(O; \vec{i}; \vec{j})$.

Sur l'axe des x l'unité est : 0,5 cm. Sur l'axe des y l'unité est : 0,25 cm.

1.2.1 Déterminer la limite de la fonction f en $+\infty$. Que peut-on en déduire pour la courbe C ?

1.2.2

1.2.2.1 Démontrer que pour tout t appartenant à l'intervalle $[0; +\infty[$:

$$f'(t) = e^{-0,25t} (-19,75 + 4e^{-0,75t})$$

1.2.2.2 Justifier que pour tout t appartenant à l'intervalle $[0; +\infty[$:
 $-19,75 + 4e^{-0,75t} < 0$

1.2.2.3 En déduire le signe de $f'(t)$ et le sens de variation de la fonction f sur l'intervalle $[0; +\infty[$.

I.2.3

I.2.3.1 Compléter, après l'avoir reproduit sur la copie, le tableau de valeurs suivant dans lequel **les valeurs de $f(t)$ seront arrondies au dixième.**

t	0	5	10	15	20	25
$f(t)$		22,6		1,9	0,5	

I.2.3.2 Construire la courbe C sur une feuille de papier millimétré.

I.2.4

I.2.4.1 Démontrer que la valeur moyenne de la fonction f sur l'intervalle $[0, 20]$

$$\text{est : } V_m = \frac{1}{20}(-316e^{-5} + 4e^{-20} + 312)$$

I.2.4.2 Donner la valeur approchée de V_m arrondie au dixième.

I.3 Exploitation des résultats de la partie **1.2.**

On admet que, t semaines après la contamination, la concentration de polluant dans l'eau, exprimée en milligramme par litre, est $\frac{1}{3} \cdot f(t)$, ou f est la fonction étudiée dans la partie 2.

I.3.1 La baignade est sans danger lorsque la concentration de polluant dans l'eau est inférieure ou égale à 2,5 milligrammes par litre. En utilisant la courbe C construite au **1.2.3.2**, déterminer au bout de combien de semaines la baignade peut être autorisée. Laisser apparents les traits utiles sur le graphique.

I.3.2 Quelle est la valeur moyenne, au cours des 20 semaines suivant la contamination, de la concentration de polluant dans l'eau ?

II EXERCICE 2 (9 points)

Toutes les parties de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

II.1 Probabilités conditionnelles

On rappelle que la probabilité qu'un événement E se réalise sachant qu'un événement F (de probabilité non nulle) est réalisé se note $P_F(E)$ et vérifie $P_F(E) = \frac{P(E \cap F)}{P(F)}$.

À la suite d'une campagne de vaccination lancée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour lutter contre une pandémie, on estime que, dans une population donnée, il ne reste plus 1% de personnes non vaccinées.

D'après une étude, on estime également que 95% des personnes vaccinées sont immunisées contre le virus de la pandémie et que 20% des personnes non vaccinées sont naturellement immunisées contre ce virus.

On choisit au hasard une personne dans la population concernée.

On note A l'événement « la personne choisie est vaccinée »,

et B l'événement « la personne choisie est immunisée contre le virus ».

II.1.1 Montrer que la probabilité que la personne choisie soit immunisée contre le virus est égale à 0,9425.

- II.1.2** Calculer la probabilité que la personne choisie ait été vaccinée sachant qu'elle est immunisée contre le virus. Arrondir au millième.

II.2 Loi binomiale et approximation d'une loi binomiale par une loi de Poisson

On admet que 1% des personnes d'une population donnée n'a pas été vacciné.

On prélève au hasard 400 personnes de cette population. L'effectif de la population est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 400 personnes.

On considère la variable aléatoire X qui, à tout prélèvement de - 400 personnes, associe le nombre de personnes de ce prélèvement n'ayant pas été vaccinées.

- II.2.1** Justifier que la variable X suit une loi binomiale et préciser les paramètres de cette loi.

- II.2.2** Calculer la probabilité qu'un prélèvement de 400 personnes contienne au plus une personne non vaccinée. Arrondir au millième.

- II.2.3** On admet que la loi de X peut être approchée par une loi de Poisson.

II.2.3.1 Déterminer le paramètre λ de cette loi de Poisson.

II.2.3.2 On désigne par X_1 une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre λ , où λ a la valeur obtenue au 1.

Calculer une valeur approchée de $P(X_1 > 5)$ arrondie au millième.

Interpréter le résultat obtenu dans le contexte de l'exercice.

II.3 Approximation d'une loi binomiale par une loi normale

On estime que 20% des personnes non vaccinées sont naturellement immunisées contre le virus. Parmi les personnes non vaccinées, on prélève au hasard 200 personnes.

On considère la variable aléatoire Y qui, à tout prélèvement de 200 personnes parmi les personnes non vaccinées, associe le nombre de personnes de ce prélèvement qui ne sont pas immunisées contre le virus.

On admet que Y suit la loi binomiale de paramètres 200 et 0,8.

- II.3.1** On considère que la loi suivie par Y peut être approchée par une loi normale.

Montrer que les paramètres de cette loi normale sont :

$m = 160$ et $\sigma \approx 5,66$ (valeur de σ arrondie au centième).

- II.3.2** On désigne par Y_1 une variable aléatoire suivant la loi normale de paramètres $m = 160$ et $\sigma = 5,66$

On souhaite calculer la probabilité qu'il y ait, dans un prélèvement de 200 personnes, entre 155 et 165 personnes non immunisées contre le virus en utilisant la loi de Y_1 et en tenant compte de la correction de continuité.

Pour cela, calculer une valeur approchée de $P(154,5 \leq Y_1 \leq 165,5)$ arrondie au centième.

2012 – U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée 2 h – coefficient 1

L'usage des calculatrices est autorisé

La correction de l'épreuve tiendra le plus grand compte de la clarté dans la conduite de la résolution et dans la rédaction de l'énoncé des lois, de la compatibilité de la précision des résultats numériques avec celle des données de l'énoncé (nombre de chiffres significatifs), du soin apporté aux représentations graphiques éventuelles et de la qualité de la langue française dans son emploi scientifique.

1. OPTIQUE (15 points) Le microscope

Données :

Formule de conjugaison des lentilles minces : $\frac{1}{OA_1} - \frac{1}{OA} = \frac{1}{f'}$, O est le centre optique de la lentille, A désigne un point objet, A₁ son image donnée par la lentille de distance focale f'. A et A₁ sont sur l'axe optique.

Grandissement d'une lentille : $\gamma = \frac{A_1B_1}{AB} = \frac{OA_1}{OA}$.

La puissance intrinsèque d'un microscope, notée P_i, est donnée par la relation :

$$P_i = \frac{\Delta}{f'_1 \cdot f'_2} .$$

Le grossissement commercial d'un microscope, noté G_c, est donné par la relation :

$$G_c = \frac{\Delta}{4f'_1 \cdot f'_2}$$

Un microscope est constitué :

- d'un objectif L₁ considéré comme une lentille mince convergente de centre optique O₁, de distance focale f'₁ = + 0,500 cm.
- D'un oculaire L₂ considéré comme une lentille mince convergente de centre optique O₂, de distance focale f'₂ = + 2,00 cm.

1.1. Un objet AB plan est placé perpendiculairement à l'axe optique du microscope, le point A étant sur l'axe optique. Quelle doit être la position de l'image intermédiaire A₁B₁ de l'objet AB donnée par l'objectif L₁ pour qu'un observateur puisse utiliser le microscope sans accommodation (c'est-à-dire pour que l'œil observe l'image finale A'B', donnée par le microscope, à l'infini?)

1.2. Pour illustrer la situation précédente, on utilise le schéma, qui ne respecte pas d'échelle, représenté **en feuille annexe 6**.

1.2.1. Construire l'image intermédiaire A₁B₁ de AB à travers l'objectif (L₁).

1.2.2. Représenter l'oculaire (L₂) sur le schéma, sans souci d'échelle, en faisant apparaître le foyer objet F₂ et le foyer image F'₂.

1.2.3. Construire l'image définitive A'B'.

1.3. L'objet AB est à 0,514 cm devant l'objectif.

1.3.1. Déterminer par le calcul la position de A₁ par rapport au centre optique O₁.

1.3.2. Calculer le grandissement $|Y_1|$ de cet objectif.

Dans la suite de l'exercice on considérera que l'image finale A'B' donnée par le microscope est à l'infini.

1.4. Calculer l'intervalle optique $\Delta = F'_1 F_2$ (distance entre le foyer image de l'objectif et le foyer objet de l'oculaire).

1.5. Calculer la puissance intrinsèque P_i en dioptries en prenant une valeur de l'intervalle optique égale à 18 cm.

1.6. Calculer le grossissement commercial, noté G_C, du microscope.

1.7. Les valeurs 36 et 12,5 sont gravées respectivement sur l'objectif et sur l'oculaire du microscope. Quelles grandeurs représentent ces valeurs ? Ces données sont-elles compatibles avec les résultats des questions 3.2 et 6 ?

1.8. D'une manière plus générale, la puissance d'un microscope notée P est donnée par la

relation $P = \frac{\alpha'}{AB}$ avec α' (en rad), angle sous lequel l'œil, placé au foyer F'₂ de l'oculaire, voit l'image définitive donnée par le microscope, et AB dimension de l'objet observé au microscope (en m). Le pouvoir de résolution de l'œil est $\theta = 3,0 \times 10^{-4} \text{ rad}$.

Une bactérie dont la taille est de 0,20 μm s'apprête à pénétrer dans une cellule. Peut-on la distinguer à travers le microscope ? On justifiera toute affirmation.

1.9. Quel autre type de microscope permettrait l'observation d'objets encore plus petits ?

2. CHIMIE GÉNÉRALE (18 points)

2.1. On prépare une solution aqueuse S₁ en dissolvant 0,10 mole de nitrate d'argent (AgNO₃(s)) et 0,30 mol de cyanure de potassium (KSCN(s)) par litre de solution. Faire l'inventaire des espèces chimiques dissoutes en solution. Donner la formule et le nom de chacune.

2.2. Le numéro atomique du potassium est Z = 19. Donner la structure électronique de l'ion potassium. Justifier que cet ion est plus stable que l'atome de potassium.

2.3. Dans la solution aqueuse S₁, il se forme le complexe dicyanoargentate (I) de formule [Ag(CN)₂](aq). Écrire l'équation de la réaction de formation du complexe.

2.4. Écrire l'expression littérale de la constante de formation du complexe, notée K_f.

2.5. On plonge dans la solution aqueuse S_1 une électrode d'argent dont on mesure le potentiel $E_1 = -0,40$ mV par rapport à l'électrode normale à hydrogène.

- 2.5.1. Écrire la demi-équation de la réaction se produisant à l'électrode d'argent.
- 2.5.2. Montrer par un calcul, en utilisant la relation de Nernst, que la concentration des ions argent restés libres après la formation du complexe est négligeable devant la concentration apportée. Conclure quant à la stabilité du complexe.
- 2.5.3. Établir un tableau d'avancement de la réaction de formation du complexe. **Le raisonnement se fera pour un litre de solution.**
- 2.5.4. En déduire les concentrations en ion cyanure et en ion complexe à l'équilibre. En déduire la valeur de la constante de formation K_f . La valeur obtenue est-elle en accord avec la conclusion du 2.5.2. ?

2.6. On forme une pile en associant les deux demi-piles suivantes :

- Demi-pile 1 : électrode d'argent plongeant dans la solutions aqueuse S_1 .
- Demi-pile 2 : électrode de platine plongeant dans une solution aqueuse S_2 obtenue en dissolvant par litre de solution $5,0 \cdot 10^{-3}$ moles de sulfate de chrome (III) de formule $Cr_2(SO_4)_3(s)$, $2,0 \cdot 10^{-2}$ mole de dichromate de potassium de formule $K_2Cr_2O_7(s)$ et de l'acide sulfurique pour que le pH soit égal à 2.

- 2.6.1. Faire le schéma annoté de la pile débitant dans une résistance.
- 2.6.2. Pour la demi-pile 2 on considère le couple $Cr_2O_7^{2-}(aq)/Cr^{3+}(aq)$. Écrire la demi-équation de la réaction se produisant à l'électrode de platine.
- 2.6.3. En utilisant la relation de Nernst, donner l'expression littérale du potentiel d'électrode E_2 de la demi-pile 2. La valeur de E_2 est égale à 1,10 V.
- 2.6.4. Connaissant les valeurs de E_1 et E_2 , indiquer sur le schéma de la question 2.6.1. les polarités de la pile ainsi que le sens du courant quand elle débite.
- 2.6.5. Calculer la force électromotrice de la pile.

3. CHIMIE ORGANIQUE (17 points)

On souhaite réaliser la synthèse du composé **D** dont la formule semi-développée est la suivante : $C_6H_5-CH(NH_2)-CH_3$.

Cette synthèse nécessite trois étapes :

3.1. Étape n°1 :

On fait réagir le benzène de formule brute C_6H_6 avec le monochloroéthane en présence de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ (catalyseur et acide de Lewis).

- 3.1.1. Donner le type de réaction.
- 3.1.2. Écrire la formule semi-développée du monochloroéthane.
- 3.1.3. Écrire l'équation de la réaction ci-dessus sachant qu'il se forme un composé **A** de formule brute C_8H_{10} .
- 3.1.4. Dans le mécanisme de cette réaction intervient le composé électrophile E^+ : $CH_3-CH_2^+$. Expliquer sa formation.

- 3.1.5. Le composé électrophile **E**⁺ s'additionne sur le benzène pour donner un intermédiaire réactionnel **B** instable. Écrire la formule semi-développée de **B**.
- 3.1.6. Expliquer comment l'intermédiaire réactionnel **B** se stabilise pour donner le composé **A**.

3.2. Étape n°2 :

Données : numéros atomiques : C : Z = 6 ; Cl : Z = 17 ; H : Z = 1

Le composé **A** (C₈H₁₀) réagit avec le dichlore en présence de lumière ultra-violette. On obtient majoritairement le composé **C** de formule **C₆H₅-CHCl-CH₃**.

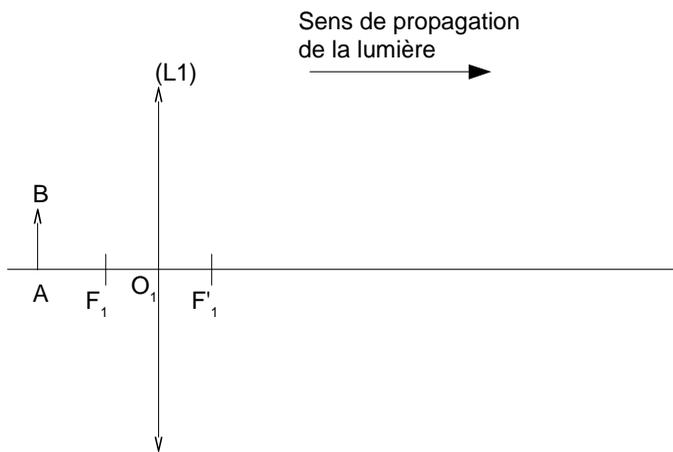
- 3.2.1. Écrire l'équation de cette réaction.
- 3.2.2. Indiquer de quel type de réaction il s'agit.
- 3.2.3. Donner, en justifiant, la représentation de Cram de l'isomère R du composé **C**.
- 3.2.4. Les deux isomères R et S du composé **C** forment un couple d'énantiomères. Définir ce terme.
- 3.2.5. Un des isomères de **C** est dextrogyre ; quelle propriété optique possède cet isomère ?
- 3.2.6. Un mélange équimolaire des deux isomères possède-t-il la même propriété ? Justifier.

3.3. Étape n°3 :

Données : numéros atomiques : N : Z = 7 ; H : Z = 1.

Le composé **C** (C₆H₅-CHCl-CH₃) réagit avec l'ammoniac de formule brute NH₃ pour donner le composé attendu **D**. (Rappel : la formule de **D** est donnée au début de cet exercice).

- 3.3.1. À quelle famille de composés organiques appartient **D** ? Donner sa classe.
- 3.3.2. Écrire l'équation de la réaction conduisant à **D**.
- 3.3.3. Donner le schéma de Lewis de la molécule d'ammoniac. En justifiant à l'aide de la méthode VSEPR, donner le type de la structure de la molécule d'ammoniac NH₃. Représenter cette molécule dans l'espace.
- 3.3.4. Dans une molécule, qu'appelle-t-on un site nucléophile ? Pourquoi dit-on que la molécule d'ammoniac est nucléophile ?
- 3.3.5. Indiquer, sans justification, sur quel site du composé C aura lieu l'attaque de NH₃ pour la réaction conduisant à **D**.

Annexe à rendre avec la copieI. le microscope

Le schéma est représenté sans souci d'échelle.

2012 – U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français, tout autre matériel est interdit.

Un système double hybride chez la levure

La société Invitrogen commercialise le système « Hybrid HunterTM Yeast Two-Hybrid System » permettant de détecter d'éventuelles interactions entre deux protéines chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le principe général du système repose sur l'utilisation de deux vecteurs :

- **pHybLex/Zeo** qui permet de sous-cloner le gène codant pour une protéine d'intérêt X appelée « appât »,
- **pYESTrp2** qui permet de sous-cloner un gène Y ou une banque d'ADNc codant pour une protéine Y, appelée « proie » pouvant éventuellement interagir avec la protéine X.

1. Le vecteur pHybLex/Zeo (4 points)

pHybLex/Zeo est un « vecteur de clonage » et d'expression et un vecteur navette. La carte de ce vecteur est présentée dans le **document 1a**.

1.1. Définir l'expression soulignée et justifier cette appellation à l'aide des informations extraites du **document 1a**.

Dans son site multiple de clonage (MCS), le vecteur pHybLex/Zeo possède 9 sites de restriction.

1.2. Définir une enzyme de restriction.

1.3. Citer les propriétés qui caractérisent généralement un site de restriction.

1.4. Nommer les deux types de coupures effectuées par les enzymes de restriction.

Présenter un exemple dans chaque cas en précisant les produits de digestion obtenus.

1.5. Définir un promoteur fort.

2. Le vecteur pYESTrp2 (4 points)

Le vecteur pYESTrp2 permet de sous-cloner les nombreux ADNc d'une banque d'ADNc. La carte de ce vecteur est présentée dans le **document 1b**.

2.1. À partir du **document 1b**, démontrer que ce vecteur est un vecteur navette et un vecteur d'expression.

2.2. Préciser les rôles des séquences « NLS » et « V5 epitope » de ce vecteur.

- 2.3. Indiquer la signification du sigle « ADNc » et en donner une définition.
- 2.4. À l'aide d'un schéma légendé, présenter le principe d'une technique d'obtention d'un ADNc (double brin).
- 2.5. Lister la succession des principales étapes opératoires nécessaires à la constitution d'une banque d'ADNc par clonage dans un vecteur plasmidique.

3. Recherche d'interactions de protéines par la méthode double hybride (8 points)

La protéine LexA joue un rôle central dans le système double hybride, dont le principe est indiqué dans le **document 2**.

- 3.1. Préciser la fonction *in vivo* de la protéine LexA.

Schématiser sa structure en faisant apparaître les domaines essentiels à son activité.

- 3.2. Citer un exemple de motif protéique assurant une interaction avec l'ADN.

Des protéines de fusion sont obtenues à partir des vecteurs pHybLex/Zeo et pYESTrp2.

- 3.3. Rappeler la définition d'une protéine de fusion.

Schématiser la protéine de fusion obtenue à partir de chacun des deux vecteurs.

(Document 2).

Le **document 2** indique: "*a library of cDNA encoding potential interactors is cloned in frame with the B42 AD*".

- 3.4. Donner la signification d'un « clonage en phase »

Les levures cotransformées par les deux vecteurs sont sélectionnées et criblées sur un milieu adapté.

Le gène *lacZ* codant la β -galactosidase est utilisé comme gène rapporteur dans la levure cotransformée par les deux vecteurs. Ce gène *lacZ* provient de l'opéron lactose d'*Escherichia coli*.

Une solution de X-Gal est incorporée dans le milieu de sélection des levures cotransformées.

- 3.5. Indiquer les caractéristiques du milieu qui permettent de sélectionner uniquement les levures cotransformées par ces deux vecteurs. Justifier.

- 3.6. Représenter l'organisation générale de l'opéron lactose à l'aide d'un schéma légendé.

- 3.7. Préciser les intérêts fonctionnels d'un opéron bactérien.

- 3.8. Définir un gène rapporteur.

3.9. Définir une séquence « enhancer ». (Document 2)**3.10. Indiquer la couleur des colonies de levure lorsque les protéines X et Y interagissent.**

Justifier par un schéma explicatif.

4. Analyse des protéines de fusion (3 points)

Une étape importante lors de la réalisation d'un criblage double hybride consiste à vérifier l'expression des protéines de fusion chez les levures transformées.

Dans ce but, les protéines sont séparées par SDS-PAGE, puis analysées par Western-blot. Le **document 3** présente un exemple de résultats obtenus.

Northern-blot et Western-blot sont des techniques historiquement dérivées du Southern-blot.

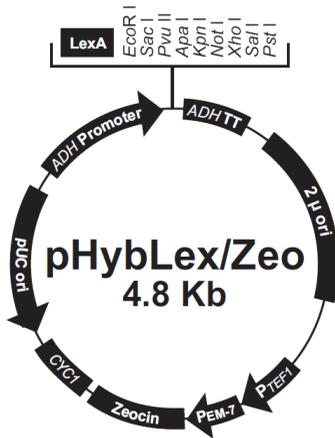
4.1. Rappeler dans chaque cas la nature des molécules analysées.

Citer les trois étapes communes à ces trois techniques.

4.2. Analyser et interpréter les résultats du document 3b. Conclure.**4.3. Proposer deux anticorps primaires permettant de vérifier par western-blot l'expression de chacune des protéines de fusion chez les levures cotransformées.****Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)**

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

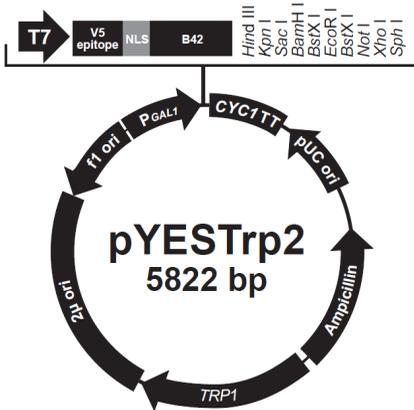
Document 1**Document 1a : cartographie simplifiée du vecteur pHybLex/Zeo**

LexA : LexA DNA Binding Domain open reading frame

ADH TT : ADH Transcription Terminator

PEM-7, PTEF1 : promoters

CYC1 : CYC1 Transcription Termination region

Document 1b : cartographie simplifiée du vecteur pYESTrp2

PGAL1 : GAL1 promoter region

NLS : Nuclear localization signal

B42 : activation domain

CYC1 TT : CYC1 Transcription Termination

TRP1 : gene of the tryptophan synthesis

Document 2 : The Hybrid Hunter™ Yeast Two-Hybrid System

The Hybrid Hunter™ Yeast Two-Hybrid System exploits the fact that transcription factors like LexA are composed of two domains, a DNA binding domain (DBD) and a domain involved in transcriptional activation (AD).

In The Hybrid Hunter™ Yeast Two-Hybrid System, two separate hybrid proteins are constructed:

- a known gene, X, is cloned into pHybLex/Zeo (**document 1a**) and expressed as a fusion protein LexA DBD/protein X known as the "bait". Zeocin resistance gene in this vector can be used for selection in both *S.cerevisiae* and *E.coli*.
- a second gene, Y, or a library of cDNA encoding potential interactors is **cloned in frame** with the B42 AD in the vector pYESTrp2 (**document 1b**) to give by translation the fusion protein B42 AD/protein Y known as the "prey".

These two vectors are transformed into a yeast strain that contains the reporter gene *lacZ*. Upstream this reporter is located the LexA DNA binding site that acts as an **enhancer** sequence.

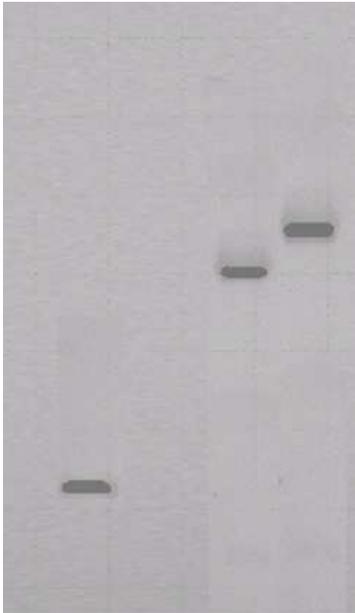
If protein X doesn't interact with protein Y, there is no expression of the reporter.

If protein X interacts with protein Y in the nucleus, this will bring the activation domain (AD) together with the DNA-binding domain (DBD) to reconstitute transcriptional factor LexA and result in expression of the reporter gene. Positive interactions can thus be detected by a screening for β -galactosidase expression.

Document 3 : Analyse des protéines de fusion

Les protéines ont été extraites des levures transformées, séparées par électrophorèse SDS-PAGE, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Celle-ci a été révélée avec un anticorps anti épitope V5.

1 2 3 4 5

**Légende**

Piste 1: extrait de levures transformées par pHybLex/Zeo

Piste 2: extrait de levures transformées par pYESTrp2

Piste 3: extrait de levures transformées par pHybLex/Zeo exprimant la protéine X

Piste 4: extrait de levures transformées par pYESTrp2 exprimant une protéine Y1 d'un clone 1

Piste 5: extrait de levures transformées par pYESTrp2 exprimant une protéine Y2 d'un clone 2

WESTERN-BLOT

Révélation avec anticorps anti V5

2012 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée 2 h – coefficient 1
L'usage des calculatrices est interdit

Caractérisation et purification de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger*

Les époxydes sont des intermédiaires clés pour la synthèse des composés pharmaceutiques, agrochimiques et phytosanitaires. Les époxyde hydrolases sont abondants dans la nature, chez les mammifères, les invertébrés, les plantes et les microorganismes. En effet, ils sont impliqués dans les phénomènes de détoxification notamment chez les mammifères et les insectes. Ils peuvent également intervenir dans la biosynthèse d'acides gras hydroxylés chez les plantes entrant notamment dans la composition de la cuticule ou jouant un rôle dans la protection contre certains champignons parasites.

L'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* est particulièrement intéressant en termes d'activité et de spécificité de substrat mais aussi en terme de production facilitée par des souches recombinantes.

1. Caractéristiques de l'enzyme époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* (6 points)

L'époxyde hydrolase d'*A. niger* est un enzyme michaelien qui catalyse l'hydrolyse des époxydes en diols à l'aide d'un mécanisme enzymatique en deux étapes (document 1).

1.1. Indiquer la classe de ces enzymes dans la classification internationale.

1.2. Définir le site actif d'un enzyme.

A l'aide du document 1a, indiquer le ou les aminoacyls participant à ce site.

Préciser le rôle de chaque chaîne latérale de ces aminoacyls lors de la catalyse.

Chez les organismes supérieurs, les époxydes hydrolases subissent des modifications post traductionnelles et notamment des N-glycosylations.

1.3. Indiquer deux rôles possibles des modifications post traductionnelles des protéines.

1.4. Indiquer la localisation cellulaire de ces N-glycosylations.

1.5. Légender les éléments structuraux numérotés de 1 à 3 sur le document 1b.

Préciser le niveau d'organisation de ces éléments structuraux ainsi que les liaisons mises en jeu.

Le séquençage de la partie N terminale de l'époxyde hydrolase d'*A. niger* a été réalisé par dégradation d'Edman à l'aide d'un séquenceur automatisé.

1.6. Présenter le principe de cette technique (la formule du réactif n'est pas demandée).

1.7. A l'aide du document 1c, indiquer les paramètres physico chimiques optimaux

d'activité de l'enzyme.

2. Préparation d'extrait soluble brut de l'enzyme (4 points)

L'extrait soluble brut est obtenu à partir d'un réacteur de 5 litres d'une culture d'*Aspergillus niger* recombinante. Trois étapes sont nécessaires:

- Lyse des cellules et centrifugation.
- Récupération de la fraction soluble.
- Concentration par microfiltration et ultrafiltration tangentielle.

Le dosage de l'activité époxyde hydrolase et le dosage des protéines ont été réalisés sur ces différentes fractions. Les résultats sont présentés dans le **document 2**.

2.1. Préciser la différence entre la microfiltration et l'ultrafiltration.

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Folin-Lowry. La courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution étalon de sérum d'albumine bovine étalon à 0,5 mg/mL. Elle permet de couvrir une gamme de masse allant de 0 à 400 µg de protéines pour un volume maximal de solution protéique de 0,4 mL.

2.2. A l'aide des résultats du **document 2**, indiquer le volume de fraction soluble à prélever pour avoir une masse de protéine se situant au milieu de la gamme étalon. Préciser si une dilution préalable est nécessaire. Justifier la réponse

2.3. À partir du **document 2**, calculer les activités spécifiques des trois fractions en précisant préalablement la formule littérale employée.

2.4. Définir et calculer le taux de purification global ou l'enrichissement global.

3. Purification de l'époxyde hydrolase d'*A. niger* (9 points)

La purification de l'époxyde hydrolase d'*A. niger* recombinante est réalisée en quatre étapes successives, décrites dans le **document 3**.

3.1. A l'aide du **document 3**, indiquer le type de phase stationnaire utilisé dans les chromatographies de la 1^{ère} et de la 3^{ème} étape. Justifier la réponse.

3.2. A l'aide de l'étape 1 du **document 3**, présenter, sous forme d'un schéma chronologique, le mouvement des molécules ionisées entre les deux phases de la chromatographie.

3.3. Qualifier la méthode d'éluion utilisée lors de cette étape 1.

Le **document 4** présente le profil d'éluion des différentes protéines ainsi que l'activité époxyde hydrolase après séparation sur DEAE-Sépharose.

3.4. Identifier les fractions contenant l'époxyde hydrolase.

Justifier la réponse et préciser l'intervalle de concentration en KCl permettant son éluion.

Dernière étape de la purification, la chromatographie d'exclusion a également permis la

détermination de la masse moléculaire de l'époxyde hydrolase native, ceci grâce à un étalonnage de la colonne. Le résultat obtenu est de 187 kDa.

L'électrophorèse de contrôle de pureté par SDS-Page (**document 5**) permet également de déterminer des caractéristiques structurales.

3.5. A l'aide du **document 5a**, calculer les concentrations en acrylamide-bisacrylamide (T %) et en Tris-HCl utilisés pour le gel de séparation.

3.6. Préciser le rôle de chaque constituant dans le tampon d'échantillon.

3.7. A partir du **document 5b**, conclure sur la qualité de la purification et préciser la structure de l'enzyme.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

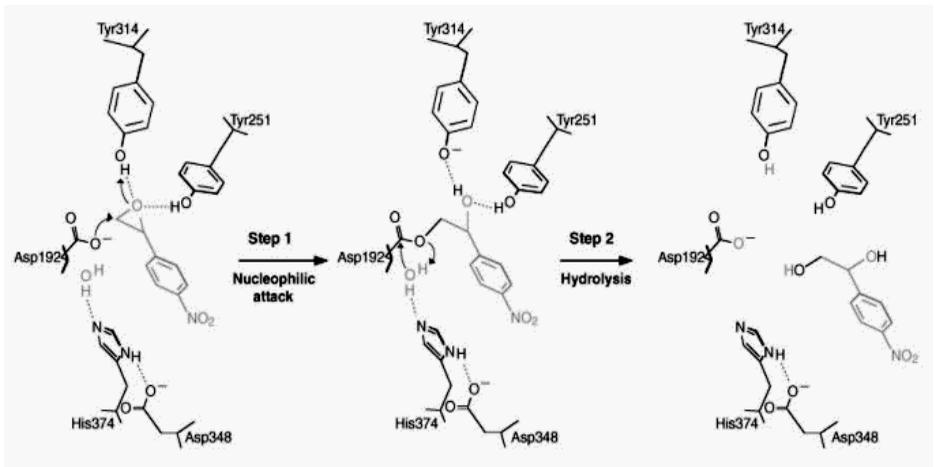
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1

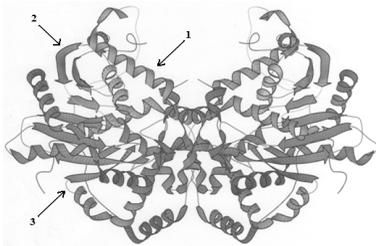
Structure et mécanisme de catalyse de l'époxyde hydrolase d'*A. Niger*

1a. Réaction catalysée par l'époxyde hydrolase d'*A. niger*

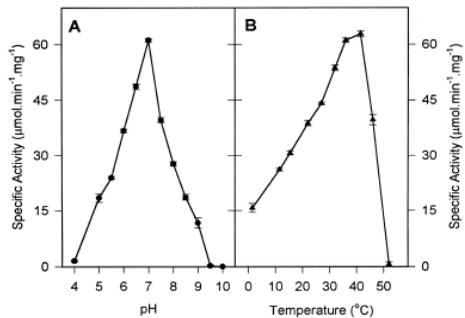
Mechanism of 4-nitrostyrene oxide hydrolysis by EH; residues are shown as close as possible to their actual relative orientation and position. Initial binding and positioning of the substrate in the active center of the enzyme is thought to be directed by hydrogen bonding between the epoxide ring oxygen and the hydroxyl groups of Tyr251 and Tyr314. In the first step of the enzymatic reaction, the carboxylate sidechain of the catalytic nucleophile Asp192 attacks the unsubstituted carbon atom of the oxirane ring, forming an ester bond and opening the ring. The process is facilitated through simultaneous proton donation by one of the tyrosine residues. The second step of the reaction consists of the hydrolysis of the ester intermediate via the attack of a water molecule. This water is activated through proton abstraction by the His374/Asp348 charge-relay system, possibly further assisted by Glu123 (not shown).



1b. Structure de l'époxyde hydrolase d'*A. niger*.



1c. Caractérisation de l'époxyde hydrolase d'*A. niger*



Document 2Détermination de la concentration catalytique de l'époxyde hydrolase et de la quantité de protéines

Etapes	Volume récupéré en mL	Concentration catalytique en U/mL	Protéines totales en mg
Fraction soluble	1000	6,0	2000
Microfiltration	4000	1,6	1000
Ultrafiltration	380	15,0	380

Document 3Les différentes étapes permettant la purification de l'époxyde hydrolase d'*A. niger*.

- **Etape 1 :** chromatographie échangeuse d'ions, DEAE-Sépharose *

380 mL d'extrait soluble brut sont déposés sur une colonne de DEAE Sépharose équilibrée avec le tampon Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,1 additionné de 1 mM d'EDTA, 1mmol/L de cystéine et de 0,5 mmol/L de PMSF appelé tampon A. Les protéines retenues sont éluées par un gradient linéaire de 0 à 0,35 mol/L de KCl dans le tampon A. Les fractions actives sont rassemblées et concentrées par un système d'ultrafiltration jusqu'à un volume de 25 mL. Après avoir ajouté le sulfate d'ammonium à 60% de saturation et agité, la solution est centrifugée à 15000 trs/min pendant 30 min. Le culot est resuspendu dans 5 mL de tampon A contenant 0,5 mol/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

- **Etape 2 :** chromatographie d'interaction hydrophobe, Phényl-Sépharose

Les 5 mL de concentrat précédemment obtenu sont déposés sur la colonne de Phényl-Sépharose équilibrée avec le tampon Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,1 additionné de 0,5 mol/L de sulfate d'ammonium, les protéines retenues sont éluées avec le tampon A. L'enzyme est éluée dans les fractions 1 à 20, rassemblées et concentrées par ultrafiltration. Ce pool est dialysé et le volume obtenu de 11,5 mL qui constitue la charge de la colonne mono Q.

- **Etape 3 :** chromatographie échangeuse d'ions, Mono-Q *

Le dialysat est déposé sur la colonne mono Q équilibrée avec du tampon A. Les protéines retenues sont éluées par un gradient linéaire de 0 à 0,25 mol/L de KCl dans le tampon A. Les fractions actives sont rassemblées et concentrées jusqu'au volume de 200 μL .

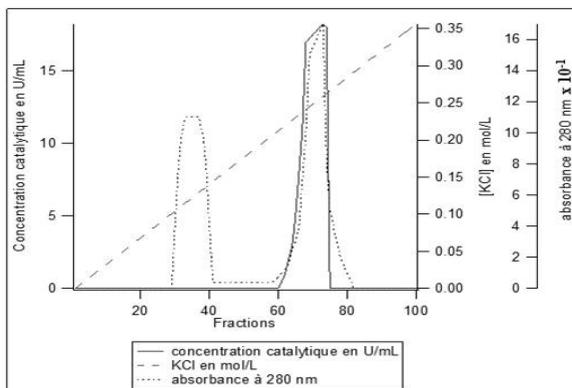
- **Etape 4 :** chromatographie d'exclusion ou gel filtration, Supérose 12

Le concentrat (200 μL) est injecté dans la colonne de Supérose 12 équilibrée avec du tampon A. Les fractions actives sont rassemblées puis conservées dans 20% de glycérol à - 80°C. Une fraction aliquote est prélevée pour faire la caractérisation de l'enzyme.

*Remarque :

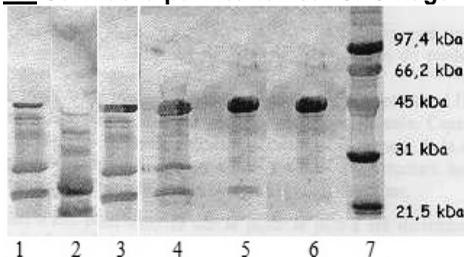
DEAE ou Diéthylaminoéthyl : $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$

Mono-Q ou ammonium quaternaire : $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$

Document 4Suivi de l'éluion après injection de l'extrait brut sur DEAE-Séparose**Document 5**Suivi de la purification par SDS-PAGE**5a. Conditions utilisées pour la réalisation du SDS-Page**

	Gel de séparation	Gel de concentration
Tris-HCl pH 8,8 (1 mol/L)	3,75 mL	/
Tris-HCl pH 6,8 (0,5 mol/L)	/	1,25 mL
Eau ultrapure	1,09 mL	3 mL
SDS (10 %)	100 µL	50 µL
Acrylamide-bisacrylamide (30 % T)	5 mL	0,65 mL
Persulfate d'ammonium (10 %)	50 µL	40 µL
TEMED	10 µL	10 µL

- Le tampon d'électrophorèse est composé de Tris-HCl pH 8,3, de glycine et de SDS.
- Le tampon d'échantillon contient du Tris-HCl pH 6,8, du SDS, du β -mercaptoéthanol, du glycérol et du bleu de bromophénol.

5b. Suivi de la purification sur SDS-Page

Préparation de l'extrait brut soluble :

1 : Rétentat obtenu après ultrafiltration ou extrait brut soluble

2 : Perméat obtenu après ultrafiltration

Purification de l'époxyde hydrolase d'*A. niger*.

3 : Après étape 1

4 : Après étape 2

5 : Après étape 3

6 : Après étape 4

7 : Marqueur de taille

2012 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français, tout autre matériel est interdit.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* et « genres apparentés »

Le genre *Pseudomonas* correspond à des bacilles à Gram négatif, non sporulés, le plus souvent mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires, chimio-organotrophes et hétérotrophes, aérobies, à métabolisme strictement respiratoire, catalase positive, oxydase positive et ne cultivant pas à un pH inférieur à 4,5.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* montrent une grande adaptabilité nutritionnelle leur permettant de jouer un rôle important pour la dégradation des composés organiques dans le sol et les environnements aquatiques.

À la suite d'études de l'ARNr 16S, certaines espèces de *Pseudomonas* ont été reclassées dans les genres *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*...

1. Taxonomie des « *Pseudomonas* » (6 points)

La taxonomie permet de caractériser, nommer et organiser en groupes des organismes vivants. Ainsi classés, ils pourront être identifiés.

1.1. Classification

1.1.1. Présenter brièvement une approche possible de classification des micro-organismes.

1.1.2. Donner les critères moléculaires permettant d'affirmer que deux souches appartiennent à la même espèce.

1.2. Identification d'un *Pseudomonas* isolé du sol

Après avoir mis en évidence les caractères morphologiques microscopiques, macroscopiques et la présence éventuelle d'une oxydase, l'identification de l'espèce d'un *Pseudomonas* peut être menée après ensemencement d'une galerie miniaturisée API 20 NE.

Document 1 : Extraits de la notice API 20 NE.

1.2.1. Citer deux avantages d'utiliser une galerie miniaturisée par rapport à une « macrogalerie ».

La galerie API 20 NE comporte entre autres 12 microtubes inoculés avec un milieu ensemencé par la suspension de la souche à identifier.

1.2.2. Citer le type de voie métabolique globale mis en évidence. Justifier la réponse en précisant l'origine de la source de carbone et en indiquant les rôles des constituants du milieu d'inoculation dont les noms sont soulignés (**document 1**).

1.2.3. Expliquer le principe de lecture de ces tests dans les deux cas possibles.

Après ensemencement et incubation, une souche de *Pseudomonas* isolée du sol donne les résultats consignés dans le **document 2**.

Pseudomonas stutzeri peut alors être identifié.

- 1.2.4. À l'aide du tableau d'identification, déterminer les deux caractères discriminants de l'espèce *stutzeri* au sein du genre *Pseudomonas*.
- 1.2.5. À l'aide des **documents 1 et 2**, expliquer le principe du calcul de la probabilité d'identification de l'espèce *Pseudomonas stutzeri*.
Illustrer la réponse en se limitant aux résultats des caractères NO³ et TRP.

2. Enveloppes cellulaires des bactéries du genre *Pseudomonas* (6 points)

Les *Pseudomonas* sont des bacilles Gram négatifs possédant une membrane cytoplasmique bactérienne et une paroi caractéristique.

2.1. La membrane cytoplasmique

- 2.1.1. Nommer les principaux composants d'une membrane cytoplasmique bactérienne.
- 2.1.2. Donner un exemple de rôle nutritionnel et de rôle métabolique de la membrane cytoplasmique d'une bactérie telle que *Pseudomonas*.

2.2. La paroi

La paroi des *Pseudomonas* participe entre autres à la reconnaissance de l'environnement car elle est le support de récepteurs.

- 2.2.1. Réaliser le schéma légendé de l'organisation macromoléculaire d'une paroi de *Pseudomonas*.

On se propose de localiser les récepteurs pariétaux de *Pseudomonas aeruginosa* pour le bactériophage E79 : des expériences d'adsorption du phage sont menées et les résultats de ces manipulations sont exposés sur le **document 3**.

- 2.2.2. Sous la forme d'un tableau, indiquer pour chaque souche : son nom, son aspect macroscopique, sa caractéristique pariétale et son comportement vis-à-vis du phage.
- 2.2.3. Présenter les quatre étapes d'un protocole usuel de titrage d'une suspension phagique, depuis le traitement du prélèvement jusqu'à l'obtention des résultats.
- 2.2.4. Justifier l'étape de filtration réalisée au cours de la détermination de la concentration en phages non adsorbés.
- 2.2.5. Analyser les résultats du graphe et les interpréter en localisant précisément les récepteurs pariétaux au bactériophage E79.

3. Croissance et métabolisme (7 points)

Les bactéries du genre *Pseudomonas* et certains genres apparentés dégradent les glucides comme source de carbone et d'énergie en utilisant un métabolisme dit « respiratoire ».

- 3.1. Nommer les différentes voies empruntées au cours de ce métabolisme énergétique, et préciser le donneur initial et l'accepteur final d'électrons.

Expliquer en quoi chacune de ces voies est énergétique en en précisant le mécanisme biochimique.

Le **document 4** présente les résultats de la croissance d'une souche de *Stenotrophomonas maltophilia* dans un milieu synthétique contenant du glucose et du lactose comme unique source de carbone et d'énergie, en conditions aérobies. La vitesse spécifique de croissance pendant la phase de consommation du glucose est $\mu_{\text{expo glu}} = 0,9 \text{ h}^{-1}$ et celle du lactose est $\mu_{\text{expo lac}} = 0,3 \text{ h}^{-1}$.

3.2. Analyser en détail les courbes du graphe et nommer le phénomène observé en l'expliquant.

3.3. Expliciter le calcul de μ_{expo} (ou Q_{xexpo}).

3.4. Commenter les valeurs des vitesses spécifiques de croissance.

La souche ne cultive pas en anaérobiose, lorsque l'air est remplacé par du diazote. Par contre des résultats similaires à ceux du **document 4** sont obtenus en travaillant en anaérobiose et en ajoutant du nitrate de potassium (KNO_3) dans le milieu.

3.5. Indiquer le(s) changement(s) métabolique(s) permettant d'expliquer ces résultats.

3.6. Démontrer que ces résultats sont compatibles avec ceux des microtubes NO_3 , GLU, GLUa et pNPG présentés dans l'extrait du tableau d'identification API 20 NE (**document 1**).

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1Extraits de la notice API 20 NE

API 20 NE est un système standardisé combinant 8 tests conventionnels (réduction des nitrates, formation d'indole à partir du tryptophane, fermentation du glucose, arginine dihydrolase, uréase, esculinase, gélatinase et β -galactosidase) et 12 tests d'assimilation (glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acétyl-glucosamine, maltose, gluconate, caprate, adipate, malate, citrate et phényl-acétate) pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* ...).

Composition du milieu AUX Medium permettant l'ensemencement des 12 tests d'assimilation

AUX Medium 7 mL pH final : 7,0 - 7,2	Sulfate d'ammonium	2,0 g
	Agar	1,5 g
	Base minérale	82,8 mg
	Amino-acides	250,0 mg
	Vitamines	35,9 mg
	Tampon phosphate 0,04 mol.L-1 pH = 7,1	qsp 1000 mL

Extrait du tableau d'identification (% de réactions positives après 24-48 heures à 30°C)

API 20 NE	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	pNPG	GLUa	ARa	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADLa	MLTa	CITa	PACa	OX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas mendocina</i>	100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas putida</i>	3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Burkholderia cepacia</i>	39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	37	1	0	0	0	96	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7

NO3 : réduction des nitrates, TRP : formation d'indole à partir du tryptophane, GLU : fermentation du glucose, ADH : arginine dihydrolase, URE : uréase, ESC : esculinase, GEL : gélatinase et pNPG : (p-nitrophényl- β -D-galactopyranoside) β -galactosidase.

GLUa : assimilation du glucose, ARa : assimilation de l'arabinose, MNEa : assimilation du mannose, MANa : assimilation du mannitol, NAGa : assimilation de la N-acétyl-glucosamine, MALa : assimilation du maltose, GNTa : assimilation du gluconate, CAPa : assimilation du caprate, ADLa : assimilation de l'adipate, MLTa : assimilation du malate, CITa : assimilation du citrate et PACa : assimilation du phényl-acétate.

OX : oxydase.

Document 2

Résultats obtenus à partir d'une souche de Pseudomonas isolée du sol

NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUs	ARAs	MNEs	MANs	NAGs	MALs	GNTs	CAPs	ADIs	MLTs	CITs	PACs	OX
+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+

Document 3

D'après "Identification of the Cell Wall Receptor for Bacteriophage E79 in Pseudomonas aeruginosa Strain PAO" (Ken Jarrel and Andrew Kropinski, Journal of Virology, 1977)

MATERIALS AND METHODS**1. Phage and bacterial strains**

- **Phage E79** was also obtained from B.W. Holloway.
- *P. aeruginosa* PAO 307, originally obtained from B.W. Holloway and now referred to in this laboratory as *P. aeruginosa* **AK-2**, was used in this study. This strain forms smooth type colonies on agar plates.
- A spontaneous E79-resistant strain, designated *P. aeruginosa* **AK-43**, was derived from AK-2 by plating 0.1 mL of an overnight culture of AK-2 with 0,1 mL of a high-titer E79 lysate (10^{11} PFU/mL). After overnight incubation, a resistant colony was picked and subjected to several single-colony isolations. AK-43 colonies are small and nonspreading and possess a granular consistency typical of LPS-defective (rough) strains.

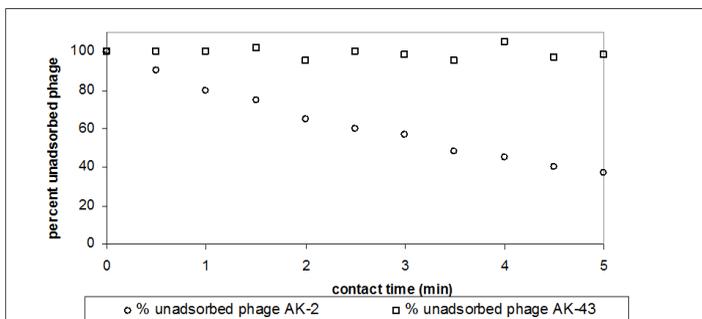
2. Titration of phages

Phage plaque assays were made by the agar overlay technique :

- the top and bottom layers consisted of tryptic soy broth (Difco) containing 0.6 and 1.5 (wt/vol) agar, respectively.
- 200 μ L of overnight culture of AK-2 were added to 3 mL of top layer before plating.

3. Determination of unadsorbed phage concentration

- Mix a volume of phage suspension with an appropriate volume of bacterial suspension,
- Incubate at 30°C before sampling, for a specific contact time (from 0 to 5 minutes),
- Filtrate samples on 0.22 μ m membrane,
- Determine phage concentration in the filtrate as explained on « **2. Titration of phages** ».

RESULTS

Adsorption of phage E79 to *P. aeruginosa* strain AK-2 and AK-43.

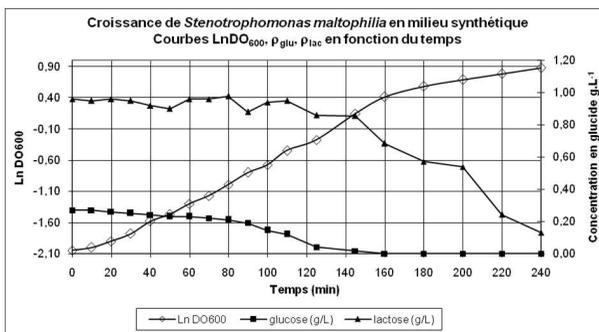
Document 4Étude de la croissance de *Stenotrophomonas maltophilia* en milieu synthétique**Milieu synthétique :**

Sulfate d'ammonium	2,0 g
Base minérale	82,8 mg
Amino-acides	250,0 mg
Vitamines	35,9 mg
Glucose	0,3 g
Lactose	1,0 g
Tampon phosphate 0,04 mol.L ⁻¹ pH = 7,1	qsp 1000 mL
Stérilisation 20 minutes à 120°C, pH final = 7,0 - 7,2	

Conditions de la croissance : en bioréacteur de 2 L, 200 rpm, 2 vvm d'air, T = 30°C

Tableau de résultats :

Temps (min)	Ln DO ₆₀₀	P _{glucose} (g.L ⁻¹)	P _{lactose} (g.L ⁻¹)
0	- 2,05	0,27	0,96
10	- 2,00	0,27	0,95
20	- 1,90	0,26	0,96
30	- 1,78	0,25	0,95
40	- 1,58	0,24	0,92
50	- 1,47	0,23	0,90
60	- 1,30	0,23	0,96
70	- 1,17	0,22	0,96
80	- 0,99	0,21	0,98
90	- 0,80	0,19	0,88
100	- 0,67	0,14	0,94
110	- 0,45	0,12	0,95
125	- 0,27	0,04	0,86
145	0,15	0,02	0,86
160	0,42	0,00	0,68
180	0,59	0,00	0,57
200	0,69	0,00	0,54
220	0,79	0,00	0,24
240	0,88	0,00	0,13

Graphe :

2012 – U42 : Biologie cellulaire

Durée : 2 h – coefficient 1

Aspects cellulaires de l'organogenèse du système nerveux

Lors du développement embryonnaire, les organes se forment, s'individualisent et se différencient. L'organogenèse du système nerveux repose sur différents processus cellulaires :

- la prolifération des cellules souches,
- la différenciation en précurseurs neuronaux,
- leur migration dans les futures aires cérébrales,
- la mise en place de nombreuses connexions,
- l'élimination apoptotique des neurones non utilisés.

1. Obtention des souris transgéniques GAD65-eGFP (4,5 points)

La transgénèse est un outil qui a largement facilité les études sur l'organogenèse. Un laboratoire a obtenu des souris transgéniques exprimant l'eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) exclusivement dans certains neurones. L'expression exclusive de l'eGFP dans le cytoplasme des neurones synthétisant le neuromédiateur GABA (neurones GABA-ergiques) est sous le contrôle du promoteur du gène GAD (Glutamic Acid Decarboxylase). Ce gène code pour une enzyme essentielle de la voie de synthèse du GABA (Acide γ -aminobutyrique).

1.1. Justifier le choix du promoteur GAD pour l'obtention d'animaux transgéniques pour cette étude.

L'expérimentation animale est soumise aux lois de la bio-éthique. Le **document 1** présente la règle dite des trois R (« Reduce, Refine, Replace »).

1.2. Indiquer la correspondance entre les trois termes anglo-saxons et les recommandations A, B et C.

1.3. Citer deux méthodes classiques d'obtention de souris transgéniques.

La qualité de la transgénèse est vérifiée par l'observation de coupes de tissus cérébraux en microscopie à fluorescence. Un extrait du protocole est donné dans le **document 2**.

1.4. Indiquer le rôle des composés suivants : paraformaldéhyde, DAPI.

1.5. Définir les propriétés spectrales d'un fluorochrome.

1.6. Préciser l'intérêt de l'observation des deux types de fluorescence : eGFP et DAPI.

1.7. Justifier l'utilisation de deux couples de filtres lors des observations.

2. Prolifération et différenciation (6 points)

2.1. Réaliser un schéma du cycle cellulaire présentant l'enchaînement des différentes phases. Préciser brièvement le rôle de chaque phase.

2.2. Le « MPF » est un élément clé de la régulation du cycle cellulaire.

2.2.1. Donner la signification du sigle « MPF ».

2.2.2. Nommer les composants du couple de protéines qui régule les transitions de phase du cycle cellulaire.

2.2.3. Expliciter le type de réaction catalysée par ce couple de protéines.

2.3. Le « NGF » (*Nerve Growth Factor*) est un facteur de croissance protéique majeur des neurones. Il permet leur survie, leur différenciation et agit après liaison au récepteur TrkA. La voie de transduction est donnée dans le **document 3**.

2.3.1. Reporter sur la copie les lettres de A à F représentant des étapes et les numéros de 1 à 5 du **document 3**, et indiquer les légendes correspondantes.

La structure de la molécule du phosphatidyl inositol diphosphate (PIP2), substrat de la phospholipase C (PLC) s'apparente à celle d'un phospholipide.

2.3.2. Donner une représentation schématique et légendée du PIP2. Localiser le site de coupure de la phospholipase C.

3. Étude de la migration neuronale *ex vivo* (8,5 points)

La migration neuronale est testée sur une suspension cellulaire préparée à partir de cerveaux de souris transgéniques. Le système innovant présenté ici permet de tester le pouvoir chimiotactique ou inhibiteur de molécules pharmaceutiques. Le **document 4** présente le test de migration et le matériel utilisé.

La chambre de migration est représentée dans le **document 4a**.

La membrane poreuse en PET (polyéthylène téréphtalate) présente la particularité d'arrêter les longueurs d'onde comprises entre 490 et 700 nm. Elle stoppe donc les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des deux fluorochromes utilisés : eGFP et DAPI.

3.1. Indiquer ce que mesure la fluorescence dans le compartiment situé en dessous de la membrane en PET.

3.2. Compléter le tableau de la manipulation présentée dans le **document 4b** en donnant le titre des étapes I, II, III et l'objectif des étapes IIa, IIb, IIIa, IIIb, IIIc (répondre sur la copie).

3.3. Justifier l'ajout de pénicilline et de streptomycine.

La manipulation réalisée et les résultats obtenus sont présentés dans le **document 4c**.

3.4. Le **document 4c** montre que « les résultats de mesure de fluorescence sont normalisés ». Donner la signification de cette expression.

3.5. Indiquer la composition du puits contrôle. Préciser son rôle.

3.6. Analyser les résultats des expériences **A** et **B**, et conclure.

La mobilité cellulaire est dépendante du cytosquelette.

La migration cellulaire débute par l'émission de prolongements cytoplasmiques (lamellipodes) comme événement initiateur de la migration, et le déplacement est sous la dépendance d'un mécanisme contractile.

3.7. Citer les trois types de filaments du cytosquelette en précisant la ou les protéine(s) constitutive(s).

3.8. Indiquer lequel des trois filaments est majoritairement impliqué dans la mobilité cellulaire. Préciser la propriété de ce filament.

4. Apoptose des neurones sous utilisés ou non utilisés (1 point)

Au cours de l'organogenèse du système nerveux central, après migration neuronale et établissement des connexions entre cellules nerveuses, les neurones sous ou pas utilisés sont éliminés par apoptose. L'apoptose repose sur l'apparition d'activité caspase.

4.1. Définir l'apoptose.

4.2. Donner un exemple concret illustrant le rôle de l'apoptose dans l'organisme.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1

Règle des « 3 R »

Russel et Burch formulèrent en 1952 un ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour réduire l'utilisation des animaux.

Recommandation A :

Chaque fois que cela est possible, remplacer les expériences sur animal par des expériences *in vitro* ou sur cellules ; remplacer les expériences sur des animaux "sensibles" (primates, chien, chat) par des expériences sur des animaux "moins sensibles" (rongeurs, poissons, insectes).

Recommandation B :

Par l'amélioration des techniques opératoires, prendre en compte la souffrance et le stress de l'animal tout en obtenant des résultats de meilleure qualité qui n'auront pas à être répétés ; le développement des techniques d'exploration fonctionnelle *in vivo* (PETscan, scanner, IRM, mesures télémétriques), encore freiné par le coût des installations, devrait limiter la pénibilité des expériences subies par l'animal de laboratoire.

Recommandation C :

Par une planification rigoureuse des expériences, réduire au minimum indispensable le nombre d'animaux utilisés ; par exemple, en utilisant des lots d'animaux homogènes (animaux consanguins) ou en utilisant un animal comme son propre témoin, on réduira la variabilité interindividuelle et donc la taille du lot à étudier.

Document 2

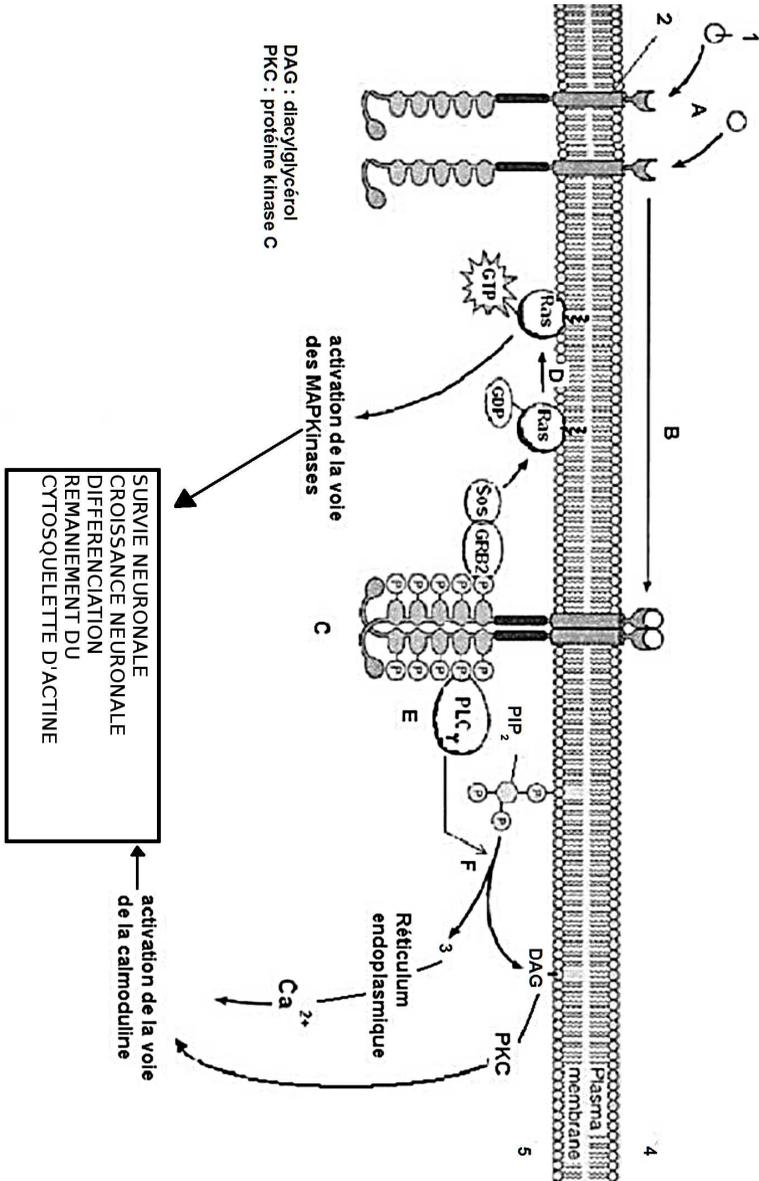
Histology and fluorescence

Brains were removed from mice at postnatal day (PN) 7 and PN14. Brains were block fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hr and a Vibratome® series 1000 was used to cut 50 µm parasagittal sections. Sections were counterstained with DAPI (0.5 µg/mL) for 20 min in Phosphate-Buffered Saline, 0.2% Triton X-100 (PBS-T), rinsed and [...] mounted in aqueous mounting medium.

Two images were obtained with both a 350 nm excitation and 460nm emission and a 485 nm excitation filter and a 525 nm emission filter on a Zeiss Axiovert microscope with ACHROMAT 5X, NA 0.12 objective.

Document 3

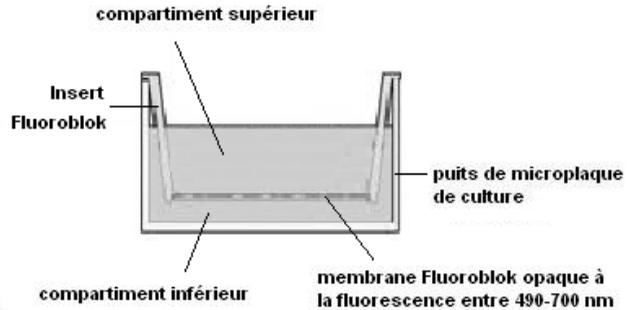
Transduction du signal de NGF dans les cellules neuronales



Document 4 :
Test de migration cellulaire

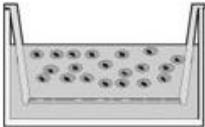
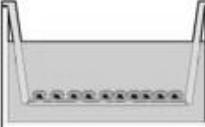
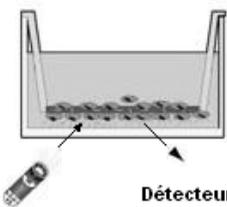
Document 4a : Chambre de migration : BD falcon fluoroblok™

Le système de mobilité cellulaire « BD BioCoat FluoroBlok » s'adapte sur des plaques de culture et se compose d'inserts portant une membrane de porosité connue (8 µm de diamètre) en PET (polyéthylène téréphtalate) traitée pour bloquer la transmission des longueurs d'onde comprises entre 490 et 700 nm.



La suspension de cellules fluorescentes est introduite dans le compartiment supérieur, une substance chimiotactique est ensuite placée dans le compartiment inférieur, la boîte est alors incubée. Les cellules adhèrent sur la face supérieure de la membrane puis colonisent la face inférieure en franchissant les pores.

La fluorescence est mesurée sous les cupules par un lecteur de microplaques.

Introduction de cellules marquées	Adhésion cellulaire	Migration cellulaire et détection
		 <p>Détecteur</p>

Document 4b :

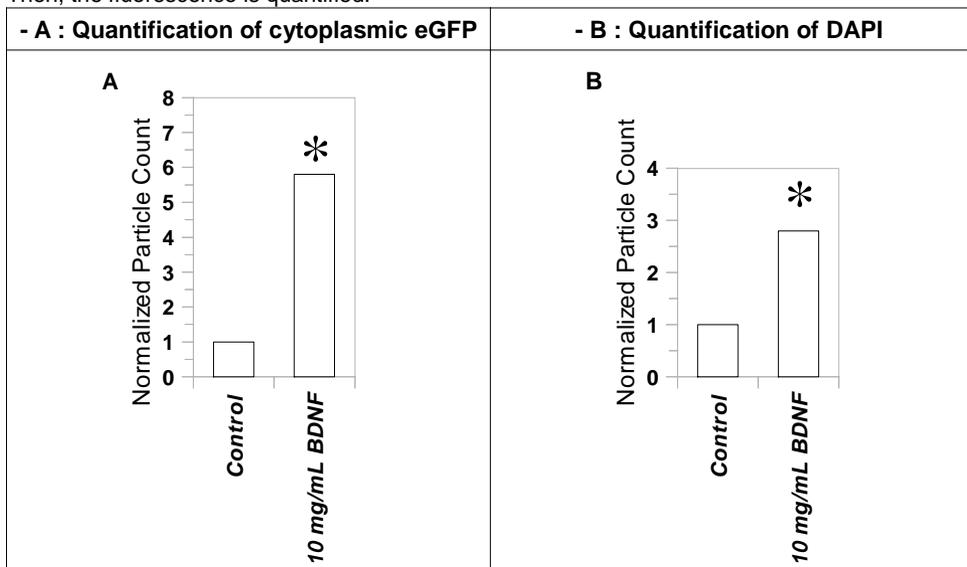
Title	Protocol	Role
I.	Postnatal mice (PN6-7) were euthanized with Fluorane®, cerebella removed and collected in Minimum Essential Medium on ice.	
II.	The tissue was rinsed and placed in 0.25% trypsin, 10 mM EDTA. Cells were dissociated for 20 min at 37°C in a shaking water bath.	II.a
	Cells were centrifuged at 800g for 5 min and resuspended in DMEM (25 mM glucose, pyruvate), 2 mM glutamine, 1% fetal bovine serum, 2% B27 supplement, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (all from Invitrogen, Carlesbad, CA).	II.b
III.	Cells were diluted to 2.5 to 5 × 10 ⁵ in 300 µL and this suspension was plated in the upper chamber. Plating medium (700 µL) was added to the bottom chamber and cells were allowed to recover in the incubator at 37°C, 5% CO ₂ and incubated for 2 hours.	III.a
	After 2 hrs, the medium in the bottom chamber was replaced with the same medium formulation containing the motogen*	III.b
	Migrating cells were examined by quantification of fluorescence over the first several hours or at 24 and 48 hr; 48 hr data are presented	III.c

*Motogen : substance chimiotactique pour cellules neuronales

Document 4c : Quantification of fluorescence.

The motogen (BDNF) is added or not (control) to the bottom chamber.

Then, the fluorescence is quantified.



2012 – ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ :

Ces quelques corrigés sont proposés pour vous aider dans la résolution des épreuves proposées au BTS.

Ils ne seront d'aucune utilité si vous vous contentez de lire les solutions sans avoir fait l'effort personnel de la réflexion et de la recherche des réponses aux questions proposées.

Ces corrigés sont parfois succincts, en particulier sur des parties de cours, parfois certaines remarques et compléments de cours sont ajoutés pour faciliter la compréhension et peuvent aller au delà de ce qui est exigible à l'examen.

Ce ne sont pas des modèles imposés, d'autres solutions, d'autres démarches sont possibles. *Des imprécisions, des erreurs ont pu se glisser dans les textes, veuillez nous en excuser.*

Pour certaines questions des liens Internet peuvent être proposés en complément.

U11 : Mathématiques

1. EXERCICE 1

1.1. Résolution d'une équation différentielle

$$a(t) = 1 \quad b(t) = 0,25 \quad \text{donc} \quad \frac{b(t)}{a(t)} = 0,25 \quad \text{de primitive} \quad F(t) = 0,25t$$

Les solutions de (E₀) sont de la forme : $y_0(t) = Ce^{-0,25t}$ où C est une constante.

2. Pour tout $t \in [0; +\infty[$: $h(t) = -4e^{-t}$ donc $h'(t) = -4(-e^{-t}) = 4e^{-t}$.

$$h'(t) + 0,25h(t) = 4e^{-t} + 0,25 \times (-4e^{-t}) = (4-1)e^{-t} = 3e^{-t}$$

Donc **h est solution de l'équation (E)**.

3. Les solutions de (E) sont de la forme : $y(t) = y_0(t) + h(t) = Ce^{-0,25t} - 4e^{-t}$ où $C \in \mathbb{R}$

4. f est solution de (E), donc : $f(t) = Ce^{-0,25t} - 4e^{-t}$.

$$f(0) = 75 \Leftrightarrow Ce^{-0,25 \times 0} - 4e^0 = 75 \Leftrightarrow C - 4 = 75 \Leftrightarrow C = 79$$

D'où $f(t) = 79e^{-0,25t} - 4e^{-t}$ pour tout $t \in [0; +\infty[$.

1.2. Étude d'une fonction et calcul intégral

1.

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} -0,25t = -\infty \quad \lim_{T \rightarrow -\infty} e^T = 0 \quad \text{donc : } \lim_{t \rightarrow +\infty} 79e^{-0,25t} = 0$$

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} -t = -\infty \quad \lim_{T \rightarrow -\infty} e^T = 0 \quad \text{donc : } \lim_{t \rightarrow +\infty} -4e^{-t} = 0$$

D'où $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 0$.

La courbe C admet une **asymptote horizontale d'équation $y = 0$** (l'axe des abscisses) en $+\infty$.

2.

a) Pour tout $t \in [0; +\infty[$: $f'(t) = 79(-0,25e^{-0,25t}) - 4(-e^{-t}) = -19,75e^{-0,25t} + 4e^{-t}$

Or $e^{-0,25t}(-19,75 + 4e^{-0,75t}) = -19,75e^{-0,25t} + 4e^{-0,25t-0,75t} = -19,75e^{-0,25t} + 4e^{-t}$

Donc : $f'(t) = e^{-0,25t} (-19,75 + 4e^{-0,75t})$.

b) Pour tout $t \in [0; +\infty[$: $e^{-0,75t} < 1$ car $-0,75t < 0$
 Donc $4e^{-0,75t} < 4$ et $-19,75 + 4e^{-0,75t} < -15,75 < 0$

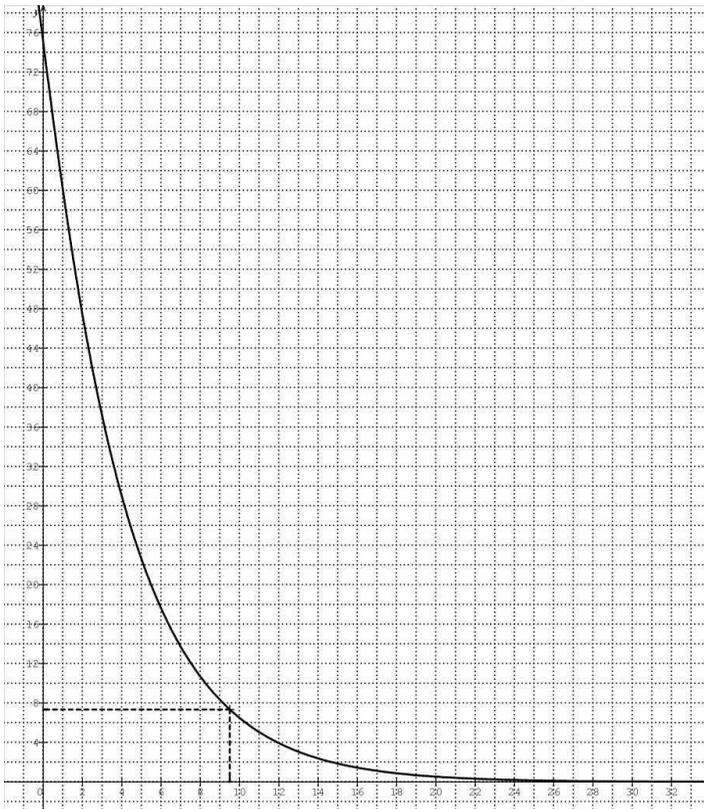
c) Pour tout $t \in [0; +\infty[$: $e^{-0,25t} > 0$ et $-19,75 + 4e^{-0,75t} < 0$ donc $f'(x) < 0$.

f est donc strictement **décroissante** sur $[0; +\infty[$.

3. a)

t	0	5	10	15	20	25
$f(t)$	75	22,6	6,5	1,9	0,5	0,2

b) graphe



4.

a)

$$V_m = \frac{1}{20} \int_0^{20} f(t) dt = \frac{1}{20} \left[-\frac{79}{0,25} e^{-0,25t} + 4e^{-t} \right]_0^{20}$$

$$V_m = \frac{1}{20} (-316e^{-5} + 4e^{-20} + 316 - 4) = \frac{1}{20} (-316e^{-5} + 4e^{-20} + 312)$$

b) $V_m ; 15,5$.

1.3. Exploitation des résultats de la partie 1.2

$$1. \frac{1}{3} f(t) \leq 2,5 \Leftrightarrow f(t) \leq 7,5$$

On peut donc autoriser la baignade après 9 semaines et demi.

$$2. V = \frac{1}{3} V_m ; \frac{15,5}{3} ; 5,2.$$

La valeur moyenne de la concentration du polluant est environ 5,2 milligrammes par litre.

2. EXERCICE 2

2.1. Probabilités conditionnelles

A est l'évènement : « la personne choisie est vaccinée » avec $p(A) = 0,99$.

B est l'évènement : « la personne choisie est immunisée contre le virus ».

1. Les évènements A et \bar{A} forment une partition de l'univers, d'où, d'après la formule des probabilités totales :

$$B = (B \cap A) \cup (B \cap \bar{A})$$

$$p(B) = p(B \cap A) + p(B \cap \bar{A})$$

$$p(B) = p_A(B) \times p(A) + p_{\bar{A}}(B) \times p(\bar{A})$$

$$p(B) = 0,95 \times 0,99 + 0,20 \times 0,01$$

$$p(B) = 0,9405 + 0,002 = \mathbf{0,9425}$$

$$2. p_B(A) = \frac{p(A \cap B)}{p(B)} = \frac{0,9405}{0,9425} = \mathbf{0,998} \text{ au millième près.}$$

La probabilité que la personne choisie ait été vaccinée sachant qu'elle est immunisée contre le virus est de **0,998** au millième près

2.2. Loi binomiale et approximation d'une loi binomiale par une loi de Poisson

1.

- Chaque prélèvement est constitué par **400** épreuves élémentaires indépendantes puisque le prélèvement est assimilé à un tirage avec remise.
- Chaque épreuve élémentaire a deux issues possibles:
Soit la personne n'a pas été vaccinée et on admet que $p = \mathbf{0,01}$.
Soit la personne a été vaccinée et on pose $q = 1 - p = 0,99$.
- La variable aléatoire X qui à tout prélèvement de 400 personnes associe le nombre de personnes n'ayant pas été vaccinées suit la loi binomiale **$B(400; 0,01)$** .

2. On demande : $p(X \leq 1)$

$$p(X \leq 1) = p(X = 0) + p(X = 1) \text{ et on sait que } p(X = k) = \binom{n}{k} \times p^k \times q^{n-k}, \text{ d'où :}$$

$$p(X \leq 1) = 1 \times (0,01)^0 \times (0,99)^{400} + 400 \times 0,01 \times (0,99)^{399} = \mathbf{0,090} \text{ au millième près.}$$

La probabilité qu'un prélèvement de 400 personnes contienne au plus une personne non vaccinée est de **0,090** au millième près.

3. On admet que X peut être approchée par une loi de Poisson.

a) Le paramètre λ de cette loi de Poisson est $\lambda = np$, ce qui donne $\lambda = 400 \times 0,01 = 4$

b) $p(X_1 > 5) = 1 - p(X_1 \leq 5)$

$$p(X_1 > 5) = 1 - (p(X_1 = 0) + p(X_1 = 1) + p(X_1 = 2) + p(X_1 = 3) + p(X_1 = 4) + p(X_1 = 5))$$

$$p(X_1 > 5) = 1 - (0,784) \text{ d'après le tableau de la loi de Poisson de paramètre } 4$$

$$p(X_1 > 5) = \mathbf{0,216} \text{ au millième près.}$$

La probabilité qu'un prélèvement de 400 personnes contienne plus de 5 personnes non vaccinées est de **0,216** au millième près.

2.3. Approximation d'une loi binomiale par une loi normale

1. On admet que Y suit la loi binomiale de paramètres 200 et 0,8 et on considère que la loi

suivie par Y peut être approchée par une loi normale.

$$m = n \times p = 200 \times 0,8 = 160 \quad \text{et} \quad \sigma = \sqrt{npq} = \sqrt{200 \times 0,8 \times 0,2} = \sqrt{32} ; 5,66.$$

2. On désigne par Y_1 une variable aléatoire suivant la loi normale $N(160 ; 5,66)$.

Soit $T = \frac{Y_1 - 160}{5,66}$, alors T suit la loi normale $N(0 ; 1)$.

$$p(154,5 \leq Y_1 \leq 165,5) = p\left(\frac{-5,5}{5,66} \leq T \leq \frac{5,5}{5,66}\right) = 2\Pi\left(\frac{5,5}{5,66}\right) - 1 \approx 2\Pi(0,97) - 1$$

On lit $\Pi(0,97) = 0,8340$, ce qui nous donne $p(154,5 \leq Y_1 \leq 165,5) = 0,67$ au centième près.

En tenant compte de la correction de continuité, la probabilité qu'il y ait, dans un prélèvement de 200 personnes, entre 155 et 165 personnes non immunisées contre le virus est de **0,67** au centième près..

U12 : sciences physiques et chimiques

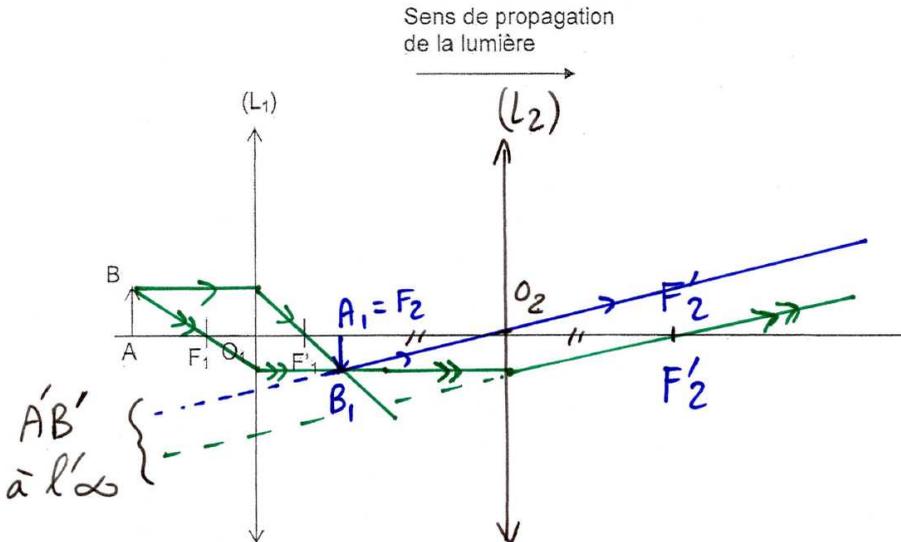
3. OPTIQUE

3.1.

Il faut que $A_1 = F_2$: A_1B_1 doit être dans le plan focal objet de la lentille L_2 .

3.2. Cf Annexe :

Question 2. :



3.3.

$$3.3.1. \quad \frac{1}{O_1A_1} - \frac{1}{O_1A} = \frac{1}{f'_1} \quad \text{et} \quad \overline{O_1A} = -0,514 \text{ cm}$$

$$\text{donc} \quad \frac{1}{O_1A_1} - \frac{1}{-0,514} = \frac{1}{0,500}$$

$$\frac{1}{O_1A_1} + \frac{1}{0,514} = \frac{1}{0,500}$$

$$\frac{1}{O_1A_1} = \frac{1}{0,500} - \frac{1}{0,514} = 0,05447$$

$$\text{et donc} \quad \overline{O_1A_1} = 18,36 \text{ cm}$$

$$3.3.2. \quad |y_1| = \left| \frac{\overline{O_1A_1}}{\overline{O_1A}} \right| = \left| \frac{1,8359}{-0,514} \right| = 35,7$$

$$3.4. \quad \Delta = \overline{F'_1 F_2} = \overline{O_1 F_2} - \overline{O_1 F'_1}$$

Or $F_2 = A_1$ donc $\Delta = \overline{O_1 A_1} - \overline{O_1 F'_1} = 18,36 - 0,500 = 17,86 \text{ cm}$

$$3.5. \quad P_i = \frac{\Delta}{f'_1 f'_2}$$

$$P_i = \frac{18 \times 10^{-2}}{0,5 \times 10^{-2} \times 2 \times 10^{-2}} = 1800 \quad \delta$$

$$3.6. \quad G_c = \frac{P_i}{4} \text{ donc } G_c = 450$$

3.7.

Sur l'objectif : Grandissement $|Y_i| = 35,7$ donc la valeur de 36 est compatible.

Sur l'oculaire : grossissement G_{ocu} et $G_c = |Y_i| \times G_{ocu}$ donc $G_{ocu} = \frac{G_c}{|Y_i|} = \frac{450}{36} = 12,5$, donc la valeur indiquée est la bonne.

$$3.8. \quad \alpha' = P_i \times AB \text{ donc } \alpha' = 1800 \times 0,20 \times 10^{-6}$$

$$\alpha' = 360 \times 10^{-6} = 3,60 \times 10^{-4} \text{ rad}$$

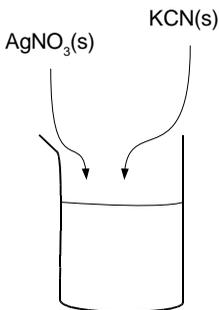
$$\alpha' > \theta$$

Donc l'œil pourra distinguer la bactérie.

3.9. Pour observer des objets plus petits, il faut que la longueur d'onde utilisée soit plus courte : on pourra utiliser un microscope UV ou un microscope électronique.

4. CHIMIE GÉNÉRALE

4.1.



Se trouvent en solution :

- K^+ ion potassium I
- CN^- ion cyanure
- Ag^+ ion argent I
- NO_3^- ion nitrate

ainsi que :

- H_3O^+ ion hydronium
- OH^- ion hydroxyde
- H_2O eau.

4.2.

$Z_K = 19$ $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^0$ ion K^+ , 18 électrons.

K^+ est plus stable que K car toutes ses sous-couches sont complètes (structure de l'Argon, gaz « rare » le plus proche).



4.4. $K_F = \frac{[Ag(CN)_2^-]}{[Ag^+][CN^-]^2}$

4.5.



4.5.2. $E = E_{(Ag^+/Ag)}^0 + \frac{0,059}{1} \times \log[Ag^+]$ donc

$$-0,40 = 0,80 + 0,059 \times \log[Ag^+]$$

$$\frac{-1,2}{0,059} = \log[Ag^+] = -20,3 \text{ donc } [Ag^+] = 10^{-20,3}$$

Ce qui est effectivement négligeable devant $[Ag^+]_0 = 0,10 \text{ mol} \cdot L^{-1}$

Le complexe est donc particulièrement stable puisque la quasi-totalité des ions argent I y est incluse.

4.5.3.

	$Ag^+ + 2CN^- = Ag(CN)_2^-$		
t=0	0,10	0,30	0
t _{eq}	0,10 - x	0,30 - 2x	x

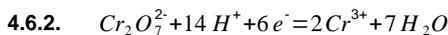
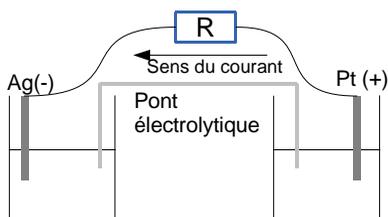
4.5.4. La question 2 vient de montrer que $x = 0,10 \text{ mol} \cdot L^{-1}$

Et donc $[CN^-] = 0,10 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, et $[Ag(CN)_2^-] = 0,10 \text{ mol} \cdot L^{-1}$

$$K_F = \frac{0,1}{10^{-20,3} \times (0,1)^2} = \frac{1}{10^{-21,3}} = 10^{21,3} \text{ soit une valeur } \gg 1 : \text{ le complexe est très stable.}$$

4.6.

4.6.1.



4.6.3. $E_2 = E_{(Cr_2O_7^{2-}/Cr^{3+})}^0 + \frac{0,059}{6} \cdot \log \frac{[Cr_2O_7^{2-}] \cdot [H^+]^14}{[Cr^{3+}]^2}$

4.6.4. $E_2 = 1,10V > E_1 = 0,40V$ Donc E_2 (électrode de platine) est le pôle + et E_1 , électrode d'argent, est le pôle -.

Le courant va du + vers le -, soit du platine vers l'argent.

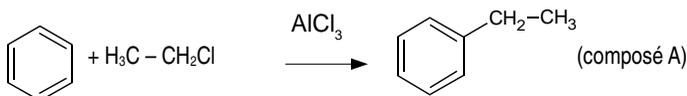
4.6.5. Force électron motrice : $E_{pile} = E(+)-E(-)$
 $E_{pile} = 1,10 - (-0,40) = 1,50 \text{ V}$

5. CHIMIE ORGANIQUE

5.1.

5.1.1. Il s'agit d'une substitution électrophile.

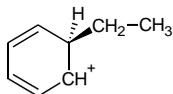
5.1.2. $\text{H}_3\text{C} - \text{CH}_2\text{Cl}$



5.1.3. Le composé E^+ provient de :

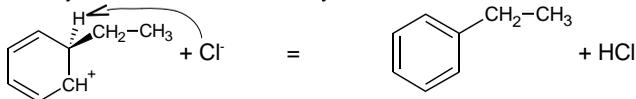


5.1.4. Intermédiaire de Wheland B :

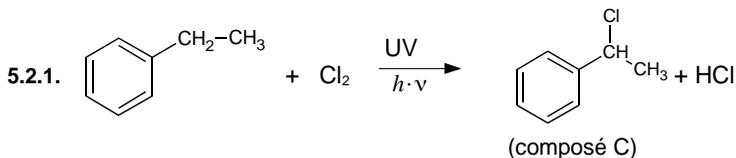


5.1.5. Le catalyseur se régénère : $\text{AlCl}_4^- = \text{AlCl}_3 + \text{Cl}^-$

Puis il y a réaromatisation du noyau benzène :



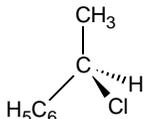
5.2.



5.2.2. C'est une substitution radicalaire.

5.2.3. Classement CIP des constituants : $\text{Cl} > \text{C}_6\text{H}_5 > \text{CH}_3 > \text{H}$

Isomère R :



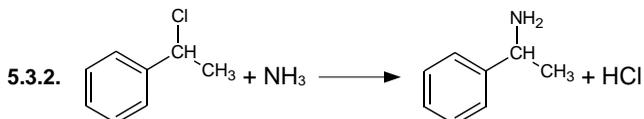
5.2.4. énantiomères : molécules non superposables à leur image dans un miroir.

5.2.5. Dextrogyre : composé déviant vers la droite dans une lumière polarisée.

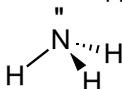
5.2.6. Un mélange racémique ne dévie pas une lumière polarisée : il est optiquement inactif.

5.3.

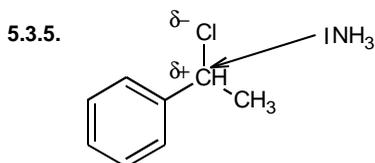
5.3.1. D est une amine de classe I.



5.3.3. NH_3 : structure AX_3E_1 , il forme une pyramide à base triangulaire :



5.3.4. Site nucléophile : site avide de noyau, attiré par des charges (partielles) positives. Le doublet d'électrons non liant présent sur l'atome d'azote explique la nucléophilie de NH_3 .



U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Un système double hybride chez la levure

1.

1.1. Vecteur de clonage : plasmide utilisé pour produire une grande quantité d'ADN intégré (insert) par sa propriété de réplication autonome après transformation et culture bactérienne.

Un vecteur de clonage contient différentes boîtes fonctionnelles :

- une origine de réplication fonctionnant chez *E. coli* (pUC ori),
- un marqueur de sélection de bactéries transformées : un gène de résistance à un antibiotique, ici Zeo sous le contrôle du promoteur bactérien pEM7, et Amp^R)
- et un site multiple de clonage (MCS, permettant le choix d'enzymes de restriction pour insérer l'ADN d'intérêt).

1.2. Enzyme de restriction : endonucléase catalysant l'hydrolyse de la liaison phosphodiester entre 2 nucléotides d'une séquence en général palindromique (pour les enzymes de type II), et donc permettant d'obtenir une coupure double brin.

1.3. Les sites de reconnaissance et de coupure des enzymes de restriction de type II sont confondus et palindromiques, la séquence est identique sur les 2 brins lus avec la même orientation (5'--> 3').

1.4. Différents types d'extrémités générées par l'action des enzymes de restriction : extrémités franches ou bouts francs et extrémités cohésives (3' sortants ou 5' sortants)

bouts francs	extrémités cohésives 5' sortant	extrémités cohésives 3' sortant
5'... GAT [↓] ATC...3' 3'... CTA [↑] TAG...5' EcoRV	5'...G [↓] AATTC...3' 3'...CTTAA [↑] G...5' EcoRI	5'...CGAT [↓] CG...3' 3'...GCTAGC [↑] ...5' PvuII

1.5. Promoteur fort. Le promoteur est la boîte située (en général) en amont de l'unité de transcription, sur laquelle se fixe l'ARN polymérase et les facteurs d'initiation de la transcription. On parle de promoteur fort quand l'initiation de transcription est très efficace et donc le niveau de transcription est élevé.

2. Le vecteur pYESTrp2

2.1. Un vecteur navette peut être hébergé par 2 hôtes différents dans lesquels il peut se répliquer, cet état est conditionné à la présence

- de 2 origines de réplication, la première pUC ori pour *E. coli* (hôte obligatoire pour l'étape de clonage et de production en quantité du plasmide) et la seconde 2 μ ori pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* (pour réaliser le test d'interaction par la méthode de double hybride).

- de marqueurs de sélection des transformants adaptés à chaque hôte:

* Pour sélectionner les *E. coli* transformées :

La boîte Amp^R ou la région pEM7-Zeocin, sont les gènes marqueurs de sélection, sous le contrôle d'un promoteur constitutif bactérien. Ils permettent de sélectionner les *E. coli* transformées l'un ou l'autre plasmide par culture sur milieu contenant l'antibiotique correspondant (ampicilline ou zéocine).

* Pour sélectionner les levures transformées :

Les marqueurs de sélection sont sous le contrôle de promoteurs constitutifs de levure.

La boîte TRP1, gène impliqué dans la voie de biosynthèse du tryptophane, marqueur d'auxotrophie, permet de sélectionner les levures transformées, par culture sur un milieu dépourvu de tryptophane.

La région pTEF1-Zeocin, codant la protéine de résistance à la zéocine sous le contrôle d'un promoteur de levure, permet de sélectionner les levures transformées par culture sur un milieu additionné d'antibiotique zéocine.

Vecteur d'expression dans l'hôte levure : la carte du vecteur montre que le polylinker (MCS) est encadré de séquences de levure permettant la transcription de la séquence clonée, en amont le promoteur gal et en aval le site de terminaison de la transcription CYC1.

2.2. NLS: séquence signal de localisation nucléaire. Les protéines des eucaryotes portant cette séquence dans leur structure primaire sont adressées au noyau. La protéine synthétisée à partir de ce vecteur sera donc envoyée vers le compartiment nucléaire.

V5 épitope : est la séquence nucléique codant un peptide antigénique reconnu par un anticorps spécifique (Ac anti-V5) permettant de visualiser la protéine produite par ce vecteur. Il s'agit du étiquette de détection.

2.3. ADNc = Acide DésoxyriboNucléique complémentaire. Il s'agit d'un ADN complémentaire à un ARN, obtenu par transcription inverse.

2.4. Obtention d'ADNc double brin :

* synthèse du premier brin :

- hybridation de l'amorce de reverse transcription (oligodT ou aléatoire)

- élongation de l'amorce à partir de son extrémité 3' par la transcriptase inverse (RTase) , ADN polymérase ARN dépendante, par incorporation successive des dNTP complémentaires à la matrice ARN.

* Elimination du brin matrice ARN (activité de type RNaseH ou dénaturation)

* Synthèse du 2ème brin par une ADN polymérase ADN dépendante à partir d'un 3'OH (obtenu par la synthèse du 1er brin ou par amorçage spécifique)

2.5. Etapes à la constitution d'une banque d'ADNc

- Obtention des ARN totaux
- Synthèse d'ADNc double brin (paragraphe 2.4.)
- Clonage dans un vecteur adapté :

Ajout par ligation de séquences adaptatrices portant des sites de restriction (facultatif)

Restriction de l'ADNc et du vecteur plasmidique par les mêmes enzymes ou des enzymes compatibles

- Ligation
- Transformation des bactéries hôtes et sélection des transformants

3. Recherche d'interactions

3.1. LexA : facteur de transcription, stabilisant la liaison de l'ARN polymérase sur la boîte promotrice et permettant ainsi d'augmenter l'efficacité d'initiation de la transcription. LexA est composée de 2 domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain) et un domaine de transactivation (AD : Activation Domain).

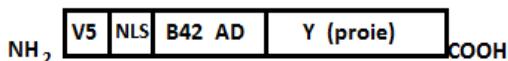
3.2. Les domaines de liaison à l'ADN portent des motifs caractéristiques impliqués dans l'association avec la double hélice d'ADN : fermeture éclair à leucines (leucine zipper), doigts de zinc (zinc fingers), hélice-boucle-hélice (Helix-Loop-helix).

3.3. Une protéine de fusion est obtenue après clonage en phase de 2 (ou plus) ORFs pour former une seule chaîne polypeptidique associant plusieurs peptides ou protéines différents.

Le vecteur pHybLex/Zeo-X (X est l'ORF de la protéine appât (« bait ») permet la synthèse de la protéine de fusion :



Le vecteur pYESTrp2-Y (Y est une ORF de protéine proie (« prey ») permet la synthèse de la protéine de fusion :

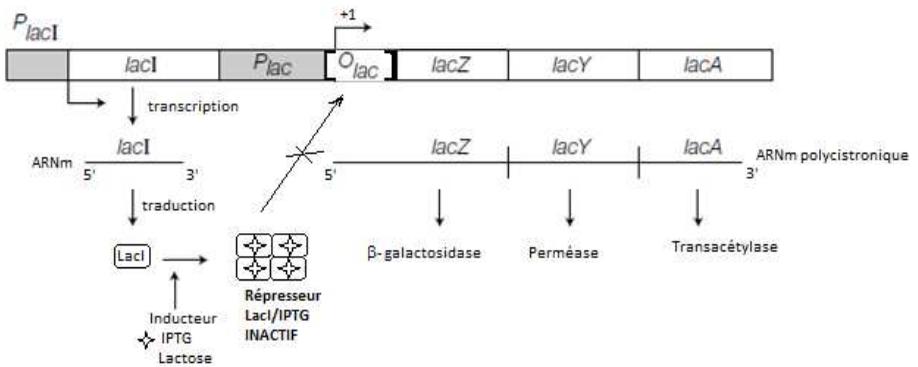


Les protéines X et Y sont fusionnées par leur extrémité N terminale.

3.4. Clonage en phase : consiste en la ligation de 2 séquences nucléiques portant des cadres ouverts de lecture (ORF) et de telle sorte que le 2^{ème} cadre de lecture ne soit pas décalé (il doit être séparé de 3n nucléotides du 1er cadre ouvert) pour créer une seule unité de traduction.

3.5. Les levures transformées par le vecteur pHybLex/Zeo deviennent résistantes à l'antibiotique zéocine et celles transformées par pYESTrp2 deviennent prototrophes pour le tryptophane. Les levures co-transformées cultiveront sur un milieu de culture sélectif sans tryptophane et contenant la zéocine.

3.6. Opéron lactose



$lacI$: synthèse du répresseur LacI

Promoteur lac /opérateur liant le répresseur LacI

3 gènes de structure (Z, Y, A)

3.7. L'organisation en opéron permet une synthèse coordonnée de différentes enzymes ou autres protéines impliquées dans une même voie métabolique. Il peut s'agir d'un opéron inductible ou répressible.

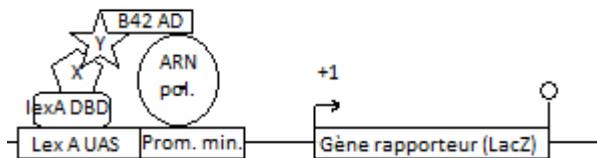
3.8. Un gène rapporteur code une protéine facilement détectée et dosée. La quantification de la protéine « rapporteur » est corrélée à l'activité du promoteur qui contrôle son expression. La plupart des gènes rapporteur codent des enzymes comme la β -galactosidase, la chloramphénicol acétyl transférase (CAT), la luciférase.

3.9. Une séquence enhancer est une séquence nucléique activatrice de la transcription, située en amont, en aval et parfois même dans l'unité de transcription. En se fixant sur la boîte « enhancer », le facteur de transcription activateur stabilise l'interaction entre l'ARN polymérase et la séquence promotrice

et augmente donc l'efficacité d'initiation de la transcription.

3.10. L'interaction entre les protéines appât (X) et proie (Y), permet de rapprocher les domaines de liaison à l'ADN et de transactivation et donc de reconstituer un facteur de transcription fonctionnel (actif). Le facteur de transcription se lie à sa séquence cible LexA UAS (upstream activating sequence) et donc active la transcription des gènes cibles, ici le gène rapporteur codant la β -galactosidase. La β -galactosidase est révélée grâce à l'addition dans le milieu de culture d'un substrat chromogène X-gal, formant un produit coloré bleu.

Les colonies « bleues » sont positives et présentes donc une interaction entre X et Y.



4. Analyse des protéines de fusion

4.1.

Méthode	Southern blot	Northern blot	Western blot
Molécule détectée	ADN	ARN	Protéines

Étapes communes :

- électrophorèse
- transfert sur membrane
- révélation spécifique

4.2. Analyse du résultat obtenu à l'aide d'un anticorps anti-épitope V5.

L'épitope V5 est l'étiquette de détection des protéines proies (Y), la protéine appât ne peut donc être détectée.

Les pistes 1 et 3 peuvent être considérées comme des témoins de spécificité. L'absence de bande permet de conclure que l'anticorps anti-V5 ne reconnaît spécifiquement ni les protéines de levure, ni les protéines codées par le vecteur pHybLex/Zeo recombiné ou non. La protéine appât en particulier n'est pas détectée par l'anticorps antiV5.

Piste 2 : témoin de validité des réactifs et de la manipulation, la révélation est conforme, en effet, on observe une bande de faible masse moléculaire correspondant à la protéine V5-NLS-B42AD (synthétisée par le vecteur non recombiné « vide »)

Pistes 4 et 5 : On observe une bande spécifique par piste, de MM supérieure à celle du témoin (piste 2), les clones 1 et 2 expriment des protéines de fusion différentes V5-NLS-

B42AD-Y1 et V5-NLS-B42AD-Y2, la masse moléculaire de Y2 est supérieure à celle de Y1.

4.3. On peut vérifier par western blot la présence des protéines appât et proie en utilisant des anticorps primaires spécifiques :

- pour les protéines proie : anticorps anti V5
- pour la protéine appât : soit un anticorps anti-protéine appât soit un anticorps anti-Lex DBD.

U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

- 1.1 Hydrolase – Classe 3
- 1.2 Le site actif d'un enzyme est la région au niveau de laquelle se fixe(nt) le ou les substrats. Il contient des résidus d'acides aminés (éloignés dans la structure primaire mais rapprochés dans la structure tridimensionnelle) participant à la fixation du substrat et au mécanisme de catalyse.
Les aminoacyles participant au site actif sont: Asp 192, Tyr 251, Tyr314, Asp 348, His 374.
Les groupes hydroxyles des Tyr 251 et 314 permettent la liaison et le positionnement du substrat dans le site actif de l'enzyme par liaison hydrogène.
Le groupement carboxylique de Asp 192 permet l'attaque nucléophile.
Les chaînes latérales d'His 374 et Asp 348 permettent d'activer une molécule d'eau.
- 1.3 Rôles possibles des modifications post traductionnelles:
- Rôle régulateur (modulation de l'activité des protéines)
 - Signal de reconnaissance
 - Ancrage membranaire (ex: palmitoylation, isoprénylation, glypiation)
 - Adressage vers un compartiment cellulaire (ex: mannose 6 phosphate pour adresser aux lysosomes)
- 1.4 RER et appareil de Golgi
- 1.5 1: Hélice α 2: feuillet β 3: coude β
Ce sont des éléments de structure secondaire. Ils impliquent des liaisons hydrogène entre les CO et les NH des liaisons peptidiques.
- 1.6 Le phényl isothiocyanate réagit avec le NH_2 terminal du peptide.
En modifiant les conditions de pH, un dérivé phénylthiohydantoïne de l'acide aminé (PTH-AA) est libéré, le reste de la chaîne polypeptidique restant intact.
Ce PTH-AA est séparé puis identifié par chromatographie haute performance en phase inverse (comparaison du temps de rétention à des PTH-AA témoins).
L'opération est renouvelée (processus cyclique), ce qui permet d'obtenir la séquence du peptide à partir de son extrémité NH_2 terminale.
- 1.7 Dans les conditions testées, le pH optimal est égal à 7 et la température optimale à 40°C.
- 2.1 Les techniques diffèrent par leur seuil de séparation.
En microfiltration, le diamètre des pores est de l'ordre de 0,1 à 8 μm ; le filtre retient donc les cellules intactes et les débris cellulaires (**particules**).
Une membrane d'ultrafiltration a des pores de plus petit diamètre (5 à 100 nm); elle permet donc de séparer les **macromolécules** des petites molécules. On l'utilise donc pour dessaler des solutions, concentrer des macromolécules.
- 2.2 La concentration massique en protéines dans la fraction soluble est le rapport de la masse de protéines sur le volume soit $\rho = 2000/1000 = 2 \text{ mg/mL}$.
Le milieu de gamme correspond à une masse protéique de 200 μg soit 0,2 mg.
Ainsi, le volume de fraction soluble à prélever est de $V = m/\rho = 0,2/2 = 0,1 \text{ mL}$
Ce volume étant inférieur au volume maximal de 0,4 mL, il n'est pas nécessaire d'effectuer une dilution.
- 2.3 L'activité spécifique (Z_{sp}) en U/mg est le rapport entre la concentration d'activité catalytique (b) en U/mL et la concentration massique en protéine (ρ) en mg/mL:

- 3.3. Il s'agit d'une élution en gradient continu de concentration en Cl⁻.
- 3.4. La présence d'un pic d'activité époxyde hydrolase montre qu'elle est récupérée dans les fractions 60 à 75. L'époxyde hydrolase est éluée pour une concentration en KCl comprise entre 0,22 et 0,26 mol/L.
- 3.5. Lors de la fabrication du gel de séparation, la solution mère d'acrylamide-bisacrylamide est diluée. Le pourcentage en acrylamide-bisacrylamide du gel de séparation est donc :

$$T\%_{\text{final}} = \frac{T_{\text{solution mère}} \times V_{\text{solution mère}}}{V_{\text{total gel}}} = \frac{30 \times 5}{10} = 15\%$$

De même, le tampon Tris-HCl est dilué. Sa concentration finale est :

$$C_{\text{finale}} = \frac{C_{\text{solution mère}} \times V_{\text{solution mère}}}{V_{\text{total gel}}} = \frac{3,75 \times 5}{10} = 0,375 \text{ mol/L}$$

- 3.6. **Tris-HCl**: maintien du pH
SDS: - linéarisation des chaînes polypeptidiques
 - masque la charge intrinsèque des protéines et les charge négativement
 - confère la même densité de charge à toutes les protéines (répartition régulière des molécules de SDS le long du squelette polypeptidique)

β- mercaptoéthanol: agent réducteur permettant la coupure des ponts disulfure

glycérol: alourdit l'échantillon pour faciliter son dépôt dans les puits

bleu de bromophénol: marqueur de migration qui permet de visualiser l'avancée de l'électrophorèse

- 3.7. Lors de la purification, on observe la disparition progressive des bandes contaminantes et une intensification de la bande à 45 kDa correspondant à la protéine d'intérêt.
 Sur la piste 6, il n'y a qu'une seule bande, ce qui indique une purification correcte. La SDS-PAGE ayant lieu en conditions dénaturantes et réductrices, la présence d'une seule bande dans la fraction purifiée indique que l'époxyde hydrolase est constituée d'un seul type de sous-unités de masse moléculaire 45 kDa.
 La chromatographie d'exclusion se fait en conditions non dénaturantes. Elle permet donc de conclure que la protéine native a une masse moléculaire de 187 kDa. L'époxyde hydrolase est donc tétramérique (45 x 4 = 187).

U41 : Microbiologie et génie fermentaire

1. Taxonomie des *Pseudomonas*

1.1. Taxonomie

1.1.1. plusieurs réponses possibles :

- classification phénotypique : classification basée sur des caractères qui s'expriment (morphologiques, culturels, biochimiques, CPG...)
- classification génotypique : classification basée sur des critères génétiques (RFLP, pourcentage d'hybridation...)
- classification phylogénétique : classification selon l'histoire évolutive des espèces
- classification mixte consensuelle : basée sur une combinaison de la classification phylogénétique et phénotypique par exemple.

1.1.2. Plusieurs critères moléculaires peuvent être utilisés pour caractériser une espèce génomique (genomospecies) : le pourcentage d'hybridation supérieur ou égal à 70 % et un $\Delta T_m \leq 5^\circ\text{C}$ (avec un pourcentage d'homologie de séquence $\geq 95\%$).

1.2. Identification d'un *Pseudomonas* isolé du sol.

1.2.1. exemples de réponse :

- meilleure standardisation pour la micro-galerie
- économie en coût sur les milieux, réactifs, espace de stockage, espace d'incubation par l'utilisation de petits volumes.
- économie en temps de technicien : préparation, ensemencement et élimination rapides.
- possibilité d'effectuer un plus grand nombre de test

1.2.2. Auxanogramme du carbone : Mise en évidence de l'assimilation d'un seul substrat carboné présent dans la cupule. Ce substrat est l'unique source de carbone et d'énergie utilisé par métabolisme respiratoire aérobie à l'exclusion des vitamines et acides aminés présents en trop petites quantités pour permettre une croissance visible.

rôle des différents constituants :

- sulfate d'ammonium : source d'azote minéral et de soufre,
- base minérale : apport des minéraux nécessaires aux réactions métaboliques (K^+ , Cl^- , Na^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} ...)
- vitamines : intermédiaires métaboliques (co-enzymes, acides aminés...) que la souche ne peut pas synthétiser et dont l'apport exogène en petite quantité est nécessaire pour permettre la croissance.

1.2.3.

L'inoculum correspond à un trouble non visible à l'œil nu. Après incubation, soit la molécule testée est assimilée et elle permet la croissance en donnant un trouble visible à l'œil nu, soit la molécule testée n'est pas assimilée, il n'y a pas de croissance et pas de trouble visible à l'œil nu.

1.2.4. *Pseudomonas stutzeri* est la seule espèce de *Pseudomonas* à être ADH- et à pouvoir assimiler le maltose (MALa+)

1.2.5. principe du calcul de la probabilité d'identification :

Le tableau donne pour chaque caractère la probabilité de l'espèce type d'être positive pour le caractère donné :

Pour NO_3^- : 0,94 signifie que 94 % des *P. stutzeri* sont NO_3^- positives.

Pour TRP : 0 signifie que *P. stutzeri* est toujours TRP- (0 % positifs)

Le calcul se fait en calculant la probabilité de chaque taxon du tableau d'avoir le profil de la souche à identifier, ce qui donne pour la souche à identifier qui est NO_3^- + et TRP - :

Pour NO_3^- : 0,94 positives.

Pour TRP : 0 signifie que *P. stutzeri* est toujours TRP-, comme la souche à identifier est 100 % négative, la valeur à prendre en compte est 1.

Pour ces deux premiers caractères la probabilité est de $0,94 * 1 = 0,94$.

Pour calculer de %id, il faut faire ce calcul pour l'ensemble de la base de donnée, faire la somme de toutes les fréquences calculées et pour chaque taxon diviser sa fréquence par la somme des fréquences

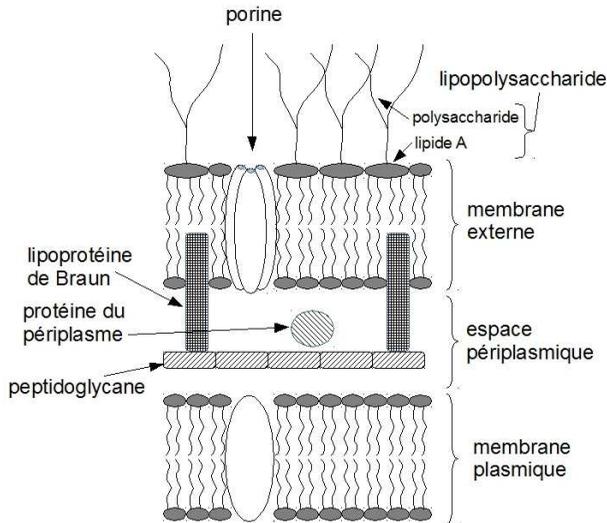
2. Enveloppes cellulaires des bactéries du genre *Pseudomonas***2.1. La membrane cytoplasmique**

2.1.1. Les phospholipides et les protéines.

2.1.2. rôle nutritionnel : les transporteurs de nutriments ; glucose, acides aminés... et rôle métabolique : lieu des transporteurs membranaires d'électrons de la chaîne respiratoire...

2.2. La paroi

2.2.1. Les *Pseudomonas* sont des bacilles Gram- (Diderme) Le schéma doit faire apparaître la membrane externe.



2.2.2. Tableau :

Nom	macroscopie	caractéristique pariétale	comportement vis-à-vis du phage E79
<i>P.a.</i> AK2	colonies de type S (lisses)	présence de lipopolysaccharide (LPS)	sensible
<i>P.a.</i> AK43	colonies plus petites, de type R (rugueuses) et non envahissantes	absence de LPS	résistant

2.2.3. 4 étapes d'une technique classique de dénombrement phagique :

• Méthode de la double couche :

- Dilutions successives au 1/10 du filtrat phagique pour avoir au moins une boîte avec des unités formant plaque (UFP) dénombrable,
- Ensemencement d'un volume précis et connu de chaque dilution phagique dans un volume précis d'agar à 0,6 % contenant la bactérie sensible AK2,
- Coulage du mélange à la surface d'une gélose classique,
- Incubation et dénombrement des plages de lyse (UPF)

• Autre technique possible : technique des spots :

- Dilutions successives au 1/10 du filtrat phagique pour avoir au moins une boîte avec des unités formant plaque (UFP) dénombrable,
- Coulage à la surface d'une gélose classique d'une suspension de la bactérie sensible AK2 en suspension dans de l'agar à 0,6 %
- Dépôt d'un volume précis et connu (5 µL par exemple) de chaque dilution phagique à la surface de la surcouche contenant les bactéries sensibles.
- Incubation et dénombrement des plages de lyse (UPF)

2.2.4. La filtration permet d'éliminer les bactéries.

2.2.5.

Pour la souche contrôle AK2 : on observe une diminution des phages non adsorbés au cours de temps. le pourcentage passe de 100 % à environ 40 % en 5 minutes.

Pour la souche AK43 : il n'y a pas d'adsorption du phage car le pourcentage de phage non adsorbé reste constant au cours du temps.

3. Croissance et métabolisme

3.1. Le métabolisme dit "respiratoire".

Le donneur d'électrons est un glucide dégradable comme le glucose. Les différentes voies sont :

- Glycolyse ou voie similaire : il y a une production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat et une production de NADH, H⁺ (coenzyme réduit ou pouvoir réducteur).
- Décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA : il y a une production de NADH, H⁺ (coenzyme réduit ou pouvoir réducteur).
- Cycle de Krebs : il y a une production de GTP par phosphorylation au niveau du substrat et une production de NADH, H⁺ et FADH₂ (coenzymes réduits ou pouvoir réducteur).
- Chaîne respiratoire « aérobie » : L'accepteur final d'électrons est le dioxygène. La chaîne respiratoire permet la réoxydation des coenzymes réduits (NADH, H⁺ et FADH₂) et la régénération d'ATP par l'ATP-synthase via un gradient de proton. C'est la phosphorylation oxydative.

3.2. Analyse du graphe

On distingue plusieurs phases :

- La phase d'accélération de 0 à 20 minutes.
- Une première phase de croissance exponentielle de 20 à 150 minutes car $\ln A = f(t)$ proportionnelle au temps. Il y a consommation totale du glucose (0,27 à 0 g·L⁻¹) et absence de consommation du lactose (stable ≈ 0,95 g·L⁻¹) montrant que cette phase exponentielle est due à la dégradation du glucose.
- Une seconde phase de croissance exponentielle de 150 à 240 minutes car $\ln A = f(t)$ proportionnelle au temps. On note que la pente est plus faible que celle de la première phase exponentielle. Il y a consommation du lactose de (0,95 à 0,13 g·L⁻¹) montrant que cette phase exponentielle est due à la dégradation du lactose.
- Le phénomène mis en évidence est la diauxie : consommation séquentielle de plusieurs glucides : d'abord le glucose directement assimilable puis le lactose.

3.3. Calcul de μ_{expo}

$$\mu_{\text{expo}} = Q_{\text{X expo}} = \frac{\Delta \ln(DO)}{\Delta t} \text{ heure}^{-1}.$$

Avec les points retenus en phase exponentielle de croissance.

3.4. Commentaires des vitesses spécifiques de croissance

La deuxième vitesse spécifique de croissance est plus faible que la première. La

croissance sur glucose est plus rapide que sur lactose.

3.5. Changement métabolique.

Le glucose et le lactose ne peuvent pas être fermentés par la souche en anaérobiose. La souche n'est pas capable de fermenter et est aérobie stricte.

Par contre le glucose et le lactose peuvent être dégradés par voie « respiratoire » en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons en anaérobiose. La souche est capable de respirer les nitrates. L'accepteur final de la chaîne membranaire de transporteur d'électron est le nitrate.

3.6. Cohérence des différents résultats obtenus présentés **document 1**.

La souche est :

- **NO₃+** : c'est à dire capable de réduire les nitrates. Elle possède une nitrate réductase qui peut être dissimilatrice (respiration nitratée) ou assimilatrice.
- **GLU -** : c'est à dire qu'elle ne peut pas fermenter le glucose.
- **GLUa +** : c'est à dire qu'elle assimile le glucose comme source de carbone et d'énergie par voie oxydative.
- **pNPG +** : c'est à dire qu'elle hydrolyse le pNPG par une β-galactosidase. Il y a donc confirmation d'une dégradation possible du lactose.

U42 : Biologie cellulaire

Durée : 2 h – coefficient 1

Aspects cellulaires de l'organogenèse du système nerveux

1. Obtention de souris transgéniques GAD65-eGFP (4,5 points)

1.1. Le promoteur GAD contrôle la synthèse du GABA, un neuromédiateur, qui n'est exprimé que dans le système nerveux. La GFP dans les animaux transgénique ne sera donc exprimée que dans le système nerveux.

1.2. Recommandation A : Replace. Recommandation B : Refine. Recommandation C : Reduce.

1.3. Obtention d'animaux transgéniques : on peut procéder par modification génétique (transfection stable) de la cellule-oeuf, ou par transfection stable de cellules souches embryonnaires qui seront incorporés à un embryon pour établir une chimère, dont la lignée germinale inclura des cellules modifiées.

1.4. Paraformaldéhyde : fixateur. DAPI : fluorochrome qui fluoresce lorsqu'il est intercalé dans l'ADN cellulaire.

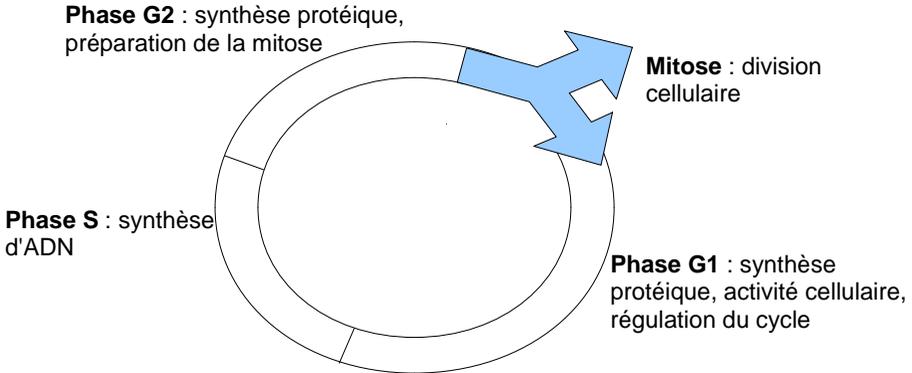
1.5. Un fluorochrome possède un spectre d'absorption, puis un spectre d'émission. Lorsqu'il est excité par une lumière dont la longueur d'onde est dans le spectre d'absorption, il émet une lumière d'une longueur d'onde supérieure (incluse dans le spectre d'émission).

1.6. L'intérêt d'observer deux types de fluorescence est, pour le DAPI, la localisation de l'ensemble des cellules nucléées de la coupe (marquage ADN) et pour l'eGFP, la localisation des cellules exprimant le gène de l' eGFP.

1.7. Les spectres d'excitation et d'émission des deux fluorochromes sont différents – à partir d'une source lumineuse unique, chaque fluorochrome nécessite une lumière excitatrice différente et émet une lumière différente. Les jeux de filtre (excitation + émission) sont adaptés à la visualisation successive des deux fluorescences.

2. Prolifération et différenciation (6 points)

2.1. Schéma du cycle cellulaire :



2.2. Le MPF :

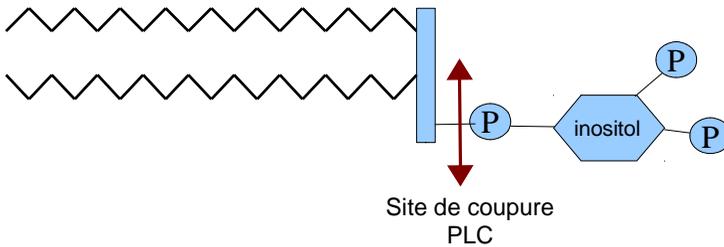
- 2.2.1.** MPF : Mitosis Promoting Factor. C'est la molécule permettant le déclenchement de la mitose.
- 2.2.2.** Le MPF est constitué d'une protéine synthétisée de façon cyclique : la cycline B1, et d'une kinase dépendante des cyclines : la protéine CDK1.
- 2.2.3.** Ce couple de protéines catalyse des réactions de phosphorylations sur d'autres protéines.

2.3. Le NGF :

2.3.1.

A :	Fixation du messager	B :	Dimérisation du récepteur	C :	Auto-phosphorylation du récepteur
D :	Activation de la protéine G « Ras »	E :	Activation de la PLC par phosphorylation	F :	Hydrolyse du PIP2 et formation du second messager
1 :	NGF	2 :	Récepteur TrkA	3 :	Inositol triphosphate (IP3)
4 :	Milieu extracellulaire	5 :	Milieu intracellulaire		

- 2.3.2.** Le PIP2 est apparenté à un phospholipide et s'appelle « inositol diphosphate ». Sa structure est donc celle d'un phosphatidyl inositol auquel deux phosphates supplémentaires sont attachés.



3. Étude de la migration neuronale *ex vivo* (8,5 points)

3.1. La fluorescence mesurée dans le compartiment inférieur sera proportionnelle au nombre de cellules (modifiées pour eGFP, totales pour DAPI) ayant traversé les pores sous l'effet du chimiotactisme.

3.2. Titres et objectifs des étapes :

Titres	Objectifs
I : Nécropsie	
II : Culture primaire de cellules du cervelet	II.a : dissociation enzymatique des cellules
	II.b : mise en culture des cellules
III : étude de la migration neuronale	III.a : mise en culture des cellules dans le compartiment supérieur
	III.b. : mise en contact des cellules avec la substance chimiotactique
	III.c : suivi de la migration cellulaire par mesures de fluorescence

3.3. L'ajout de pénicilline et de streptomycine vise à éviter les contaminations bactériennes pouvant se produire lors d'une culture primaire.

3.4. Les résultats sont normalisés : cela signifie qu'une valeur de 1 unité arbitraire est attribuée au contrôle, ce qui permet d'évaluer le résultat de l'essai par rapport au contrôle.

3.5. Le puits contrôle ne comporte pas de substance chimiotactique. Il permet d'évaluer la migration spontanée des cellules sans attraction particulière.

3.6. La migration des cellules marquées à l'eGFP est 6 fois plus importante en présence de motogen qu'en conditions contrôle. La migration des cellules totales est 3 fois plus importante en présence de motogen qu'en conditions contrôle. Ainsi, les cellules dont le promoteur GAD est actif sont plus mobiles, ou plus sensibles au chimiotactisme que la moyenne des cellules du cervelet.

3.7. Filaments du cytosquelette :

- microfilaments d'actine
- microtubules de tubuline
- filaments intermédiaires constitués de diverses protéines fibreuses (vimentine, kératine,...)

3.8. La mobilité cellulaire est essentiellement dépendante de la polymérisation des microfilaments d'actine.

4. Apoptose des neurones sous utilisés ou non utilisés (1 point)

4.1. L'apoptose est une mort cellulaire programmée impliquant des mécanismes actifs de la cellules (intervention des lysosomes) et s'effectuant sans inflammation ni libération de contenu intracellulaire dans l'environnement (fragmentation de la cellule en corps apoptotiques phagocytés par les cellules voisines).

4.2. L'apoptose intervient dans de nombreuses modifications de l'organisme au cours du développement : disparition des palmures interdigitales, ouverture des paupières et du prépuce... mais également lors de de la sélection clonale des lymphocytes dans la moelle et le thymus.

Session 2013 : sujets et éléments de corrigé

2013 – U11 : Mathématiques

Durée 2 h – coefficient 1

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.

La calculatrice (conforme à la circulaire n°99-186 du 16-11-99) est autorisée.

1. EXERCICE 1 (10 points)

Les bordures d'autoroute possèdent parfois des bassins de décantation dont le rôle est de recueillir les eaux pluviales ruisselant sur l'asphalte et les éléments polluants qu'elles peuvent drainer.

À la suite d'un accident de la circulation, un camion-citerne déverse une partie de son contenu sur la chaussée d'une autoroute. La réglementation en vigueur impose l'isolation, par fermeture de vannes, du bassin de décantation proche de l'accident, de façon à ce que la concentration en matières polluantes dans le bassin ne dépasse pas $15 \mu\text{g/L}$. Cette concentration est de $1,3 \mu\text{g/L}$ au moment où les matières polluantes provenant du camion-citerne commencent à se déverser dans le bassin.

Dans cet exercice, on cherche à prévoir au bout de combien de temps la concentration en matières polluantes dans le bassin atteindra $15 \mu\text{g/L}$ si on n'isole pas le bassin et à quel moment les capteurs installés dans le bassin déclencheront la fermeture des vannes.

On mesure en minute le temps t écoulé à partir de l'instant où les matières polluantes provenant du camion-citerne commencent à se déverser dans le bassin de décantation. On admet que, tant que le bassin n'est pas isolé par fermeture des vannes, la concentration à l'instant t en matières polluantes dans le bassin, exprimée en $\mu\text{g/L}$, peut être modélisée par $f(t)$, où f est solution de l'équation différentielle (E) : $y' + 0,03y = 0,75$. On a donc $f(0) = 1,3$.

Les parties 1.1 et 1.2 peuvent être traitées de façon indépendante.

1.1. Résolution sur l'intervalle $[0; +\infty[$ de l'équation différentielle

$$(E) : y' + 0,03y = 0,75$$

- 1.1.1. On considère l'équation différentielle $(E_0) : y' + 0,03y = 0$, où y est une fonction de la variable t , définie et dérivable sur l'intervalle $[0 ; +\infty [$, et y' la fonction dérivée de la fonction y . Déterminer les solutions de l'équation différentielle (E_0) sur l'intervalle $[0 ; +\infty [$.
- 1.1.2. Soit g la fonction définie sur l'intervalle $[0 ; +\infty [$ par $g(t) = a$, où a est une constante réelle. Déterminer a pour que la fonction g soit une solution particulière de l'équation différentielle (E).
- 1.1.3. En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E).
- 1.1.4. Démontrer que la solution f de l'équation différentielle (E) qui vérifie la condition initiale $f(0) = 1,3$ est la fonction définie sur l'intervalle $[0 ; +\infty [$ par : $f(t) = 25 - 23,7 e^{-0,03t}$.

1.2. Étude de la fonction f

f est définie sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$ par: $f(t) = 25 - 23,7 e^{-0,03t}$.

On note C sa courbe représentative dans le plan muni d'un repère orthogonal.

1.2.1. Déterminer la limite de la fonction f quand t tend vers $+\infty$

1.2.2. On désigne par f' la fonction dérivée de la fonction f .

1.2.2.1 Calculer $f'(t)$ pour tout t de l'intervalle $[0 ; +\infty[$.

1.2.2.2 Expliquer le signe de $f'(t)$ pour tout t de l'intervalle $[0 ; +\infty[$.

1.2.3. Dresser le tableau de variations complet de la fonction f .

1.2.4.

1.2.4.1 Recopier et compléter le tableau de valeurs ci-dessous. Arrondir les résultats au dixième.

t	0	10	20	30	40	50	60
$f(t)$	1,3						

1.2.4.2 Tracer la courbe C sur la feuille de papier millimétré jointe au sujet ou visualiser cette courbe sur l'écran de la calculatrice et indiquer sur la copie les caractéristiques de la fenêtre utilisée (valeurs de X min, X max, Y min et Y max et des « pas ») et l'allure de la courbe obtenue.

1.2.5.

1.3. Traitement de la problématique

On rappelle que $f(t)$ modélise la concentration (exprimée en $\mu\text{g/L}$) en matières polluantes dans le bassin à l'instant t (exprimé en minute) tant que le bassin n'est pas isolé par fermeture des vannes.

1.3.1. Si le bassin n'était pas équipé d'un dispositif d'isolation par fermeture de vannes, quelle serait la valeur autour de laquelle se stabiliserait la concentration en matières polluantes ? Justifier.

1.3.2. A l'aide de la courbe C obtenue à la question **1,2,4,2**, sur papier millimétré ou sur écran de la calculatrice, déterminer graphiquement une valeur approchée à l'unité du temps t_0 (exprimé en minute) au bout duquel la concentration en matières polluantes dans le bassin atteindrait $15 \mu\text{g/L}$ si le bassin n'était pas isolé par fermeture de vannes. Expliquer la démarche.

1.3.3. La concentration en matières polluantes dans le bassin est relevée par un capteur dont les mesures sont légèrement instables.

Pour prendre en compte cette instabilité, on met en place un dispositif associant la fermeture des vannes à l'instant t ($t \geq 2$) à la valeur moyenne de la concentration en matières polluantes mesurée par le capteur entre les instants $t - 2$ et t . La fermeture des vannes est déclenchée lorsque cette valeur moyenne atteint $14 \mu\text{g/L}$.

La valeur moyenne de la concentration (exprimée en $\mu\text{g/L}$) en matières polluantes entre les

instants $t - 2$ et t est modélisée par :

$$V(t) = \frac{1}{2} \int_{t-2}^t f(u) du = \frac{1}{2} (F(t) - F(t-2)) \quad , \text{ où } F \text{ est une primitive de la fonction } f.$$

1.3.3.1 Donner une primitive F de la fonction f sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$.

1.3.3.2 Calculer $V(t)$ et vérifier que: $V(t) = 25 + Ae^{-0,03t}$ avec $A \approx -24,4$.

1.3.3.3 Résoudre l'équation: $25 - 24,4e^{-0,03t} \approx 14$. Donner une valeur approchée au dixième de la solution T de cette équation.

1.3.3.4 Que représente T dans le contexte de l'exercice ?

2. EXERCICE 2 (10 points)

Une coopérative est spécialisée dans la récolte de la fleur de sel. Elle utilise une machine automatique pour remplir des sachets de fleur de sel dont la masse théorique doit être de 250 grammes. Un sachet est dit conforme si sa masse m , exprimée en gramme, vérifie : $240 \leq m \leq 260$

Les probabilités demandées dans cet exercice peuvent être calculées en utilisant le formulaire joint au sujet ou la calculatrice. Quelle que soit l'option retenue on fera figurer sur la copie quelques étapes de la démarche suivie. Les résultats des calculs de probabilités seront arrondis

Les parties 2.1, 2.2 et 2.3 de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

2.1. Loi normale

L'étude statistique de la production permet d'admettre que la variable aléatoire M qui mesure, en gramme, la masse d'un sachet suit une loi normale de moyenne $\mu = 250$ et d'écart type $\sigma = 5,3$.

2.1.1. On choisit au hasard un sachet dans la production. Calculer la probabilité que le sachet soit conforme.

2.1.2.

2.1.2.1 Calculer $P(M \geq 245)$.

2.1.2.2 Un gros client exigeant souhaite qu'au moins trois quarts des sachets qu'il achète aient une masse supérieure à 245 grammes. Sera-t-il satisfait? Justifier.

2.2. Loi binomiale et loi de Poisson

On considère dans cette partie que la probabilité qu'un sachet ne soit pas conforme est: $p = 0,06$

La coopérative constitue des lots de 50 sachets pour la vente et étudie le nombre de sachets non conformes contenus dans un lot.

La production de la coopérative est suffisamment importante pour que l'on puisse assimiler la constitution d'un lot à un tirage au hasard et avec remise de 50 sachets. On note X la variable aléatoire qui associe à chaque lot de 50 sachets le nombre de sachets non conformes de ce lot.

2.2.1. Justifier que la variable aléatoire X suit une loi binomiale et préciser ses paramètres.

2.2.2. Que représente la probabilité $P(X = 1)$ dans le contexte de l'exercice? Calculer $P(X = 1)$.

2.2.3. On approche la loi de probabilité de X par une loi de Poisson.

2.2.3.1 Justifier que cette loi de Poisson a pour paramètre $\lambda = 3$.

2.2.3.2 On note Y une variable aléatoire qui suit une loi de Poisson de paramètre $\lambda = 3$. En utilisant la variable aléatoire Y , estimer la probabilité qu'il y ait au plus cinq sachets non conformes dans un lot de 50 sachets.

2.3. Test d'hypothèse

Après la révision annuelle de la machine utilisée pour remplir les sachets de fleur de sel, le responsable qualité de la coopérative veut contrôler la valeur de la masse moyenne m (exprimée en gramme) d'un sachet de fleur de sel. Il construit pour cela un test d'hypothèse bilatéral au seuil de signification de 5%. L'hypothèse nulle H_0 est: $m = 250$. L'hypothèse alternative H_1 est: $m \neq 250$.

On note la variable aléatoire qui, à chaque échantillon aléatoire de 50 sachets prélevés dans la production de la coopérative, associe la masse moyenne (en gramme) d'un sachet de l'échantillon. La production est suffisamment importante pour qu'on puisse assimiler la constitution d'un échantillon à un tirage au hasard et avec remise de 50 sachets.

On suppose que la variable aléatoire suit une loi normale de moyenne m et d'écart type .

2.3.1. Sous l'hypothèse nulle H_0 , déterminer le nombre réel positif a tel que

$$P(250-a \leq M \leq 250+a) = 0,95 .$$

Arrondir au centième.

2.3.2. Énoncer la règle de décision du test.

2.3.3. On prélève au hasard 50 sachets dans la production.

Les masses en gramme de ces sachets se répartissent de la façon suivante :

Masse en gramme	[236;240 [[240;244 [[244;248 [[248;252 [[252;256 [[256;260 [[260;264 [
Nombre de sachets	5	6	9	13	8	7	2

2.3.3.1 En utilisant les centres des intervalles, calculer une valeur approchée de la masse moyenne d'un sachet de cet échantillon.

2.3.3.2 Quelle va être la conclusion du responsable qualité?

2013 – U12 : Sciences physiques et chimiques

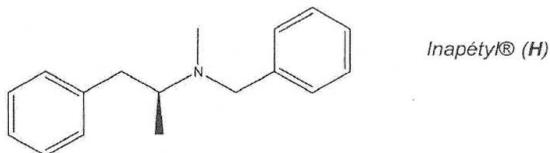
*Durée 2 h – coefficient 1
L'usage des calculatrices est interdit*

1. Synthèse de l'Inapétyl® (18points)

La plupart des questions sont indépendantes. Toutes les équations de réaction demandées doivent être équilibrées (nombres stoechiométriques ajustés).

Données :

Inapétyl® (noté H) est le nom commercial de la (2S)-N-benzyl-N-méthyl-1-phénylpropan-2-amine, dérivé de l'amphétamine, utilisé pour restreindre l'appétit chez les personnes souffrant d'obésité. Sa formule est la suivante :



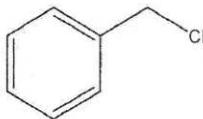
Une synthèse de cette molécule est proposée ci-dessous :

Étape 1 :

Le benzène réagit avec le monochlorométhane en présence de trichlorure d'aluminium AlCl_3 (s) pour former un composé **A** monosubstitué.

Étape 2 :

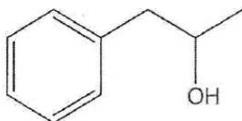
Le composé **A**, traité par le dichlore en présence d'un rayonnement ultraviolet, est transformé en un produit monohalogéné noté **B**.



B

Étape 4 :

Le composé **C** réagit avec un aldéhyde pour former, après hydrolyse acide, le composé **D** ci-dessous :



D

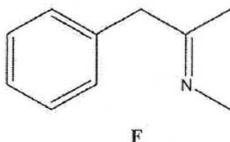
Étape 5 :

L'oxydation du composé **D** par le dichromate de potassium conduit à un produit **E** qui réagit

positivement à la 2,4-dinitrophénylhydrazine mais négativement à la liqueur de Fehling.

Étape 6 :

La méthylamine réagit avec le composé **E** ; on obtient le produit **F** ci-dessous et de l'eau.



Étape 7 :

Le composé **F** est traité par du dihydrogène sur nickel de Raney. On observe une hydrogénation de la liaison double C=N. On obtient une amine secondaire notée **G** de formule brute C₁₀H₁₅N.

Étape 8 :

Le composé **G** réagit avec le 1-chloro-1-phénylméthane en présence d'une base pour donner l'Inapétyl® noté **H**.

1.1. Etape 1

- 1.1.1. Écrire l'équation de la réaction conduisant au composé **A**.
- 1.1.2. Donner le mécanisme de cette réaction en expliquant le rôle du trichlorure d'aluminium AlCl₃(s)

1.2. Etape 2

- 1.2.1. Écrire l'équation de la réaction conduisant au composé **B**.
- 1.2.2. Caractériser cette réaction à l'aide d'un ou plusieurs des mots suivants : addition, substitution, élimination, radicalaire, électrophile, nucléophile.

1.3. Etape 3

- 1.3.1. Écrire la formule semi-développée du composé **C**.
- 1.3.2. Citer au moins l'une des précautions à prendre pendant cette synthèse.

1.4. Etape 4

- 1.4.1. Écrire la formule semi-développée et le nom de l'aldéhyde que l'on doit faire réagir avec le composé **C** pour obtenir après hydrolyse l'alcool **D**.
- 1.4.2. L'alcool **D** existe sous forme de deux énantiomères
Écrire une représentation de Cram pour chacun d'eux.
Indiquer la configuration absolue du carbone asymétrique en donnant sans justifier, l'ordre de priorité des différents groupements.

1.5. Etape 5

- 1.5.1. Quelle information apporte le test à la 2,4-dinitrophénylhydrazine ?
Quelle information apporte le test à la liqueur de Fehling ?
En déduire le groupe fonctionnel présent dans le composé **E**.
- 1.5.2. Écrire la formule semi-développée du composé **E**.

1.6. Etape 6

Écrire l'équation de la réaction entre le composé **E** et la méthylamine.

1.7. Etape 7

Écrire la formule semi-développée du composé **G**.

1.8. Etape 8

1.8.1. Caractériser la réaction permettant le passage du composé **G** au produit **H** à l'aide d'un ou plusieurs des mots suivants : addition, substitution, élimination, radicalaire, électrophile, nucléophile.

1.8.2. La vitesse de la réaction à l'étape 8 ne dépend pas de la concentration en composé **G**. Quelle précision d'ordre cinétique peut-on apporter sur la nature du mécanisme ?

2. Dosage des ions $\text{Ca}_{2+}(\text{aq})$ dans une eau d'Evian (18points)

Les trois parties de cet exercice sont indépendantes.

2.1. Le numéro atomique du calcium vaut $Z=20$

2.1.1. Donner la configuration électronique de l'atome de calcium dans son état fondamental.

2.1.2. Justifier la formation de l'ion Ca^{2+} .

2.2. Sur l'étiquette d'une eau d'Evian, on trouve l'information suivante :

Teneur en Ca^{2+} : 78 mg.L^{-1}

On souhaite vérifier cette information en effectuant un dosage complexométrique des ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ par l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA)

Données :

α Produit de solubilité : $\text{Ca}(\text{OH})_2(\text{s}) : pK_{s1} = 5,2$

$\text{Mg}(\text{OH})_2(\text{s}) : pK_{s2} = 8,7$

α Produit ionique de l'eau : $K_e = 10^{-14}$ à 25°C

2.2.1. Choix du pH de travail

L'eau d'Evian contient également des ions $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$ qui réagissent avec l'EDTA. Pour déterminer la concentration en ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$, il faut éliminer les ions $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$ afin de doser seulement les ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$. On procède par précipitation sélective. En effet, les ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ et $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$ forment avec les ions OH^- (aq) des précipités d'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2(\text{s})$ et d'hydroxyde de magnésium $\text{Mg}(\text{OH})_2(\text{s})$. Ces précipités apparaissent à des valeurs de pH différentes.

Il est donc nécessaire de déterminer un pH pour lequel les ions $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$ ont précipité alors que les ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ sont libres.

On travaillera avec les concentrations molaires suivantes :

α $[\text{Ca}^{2+}(\text{aq})] = c_1 = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

α $[\text{Mg}^{2+}(\text{aq})] = c_2 = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

2.2.1.1 Écrire l'équation de la réaction de précipitation de l'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2(\text{s})$.

Calculer le pH du début de précipitation d'une solution aqueuse d'ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ à la concentration molaire $c_1 = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

- 2.2.1.2** Écrire l'équation de la réaction de précipitation de l'hydroxyde de magnésium $\text{Mg}(\text{OH})_2(\text{s})$.

Calculer le pH du début de précipitation d'une solution aqueuse d'ions $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$ à la concentration molaire $c_2 = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

- 2.2.1.3** On choisit de travailler à un pH = 12,5

Calculer la concentration molaire en ions $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$ restant libres à ce pH.

- 2.2.1.4** Expliquer le choix de cette valeur de pH pour séparer les ions $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$ et les ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$.

2.2.2. Dosage des ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ par l'EDTA

En milieu basique, l'EDTA, noté $\text{Y}^{4-}(\text{aq})$, donne avec les ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ un complexe $[\text{CaY}]^{2-}(\text{aq})$ dont la constante de formation vaut $\beta = 5 \times 10^{10}$.

Les trois ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$, $\text{Y}^{4-}(\text{aq})$ et $[\text{CaY}]^{2-}(\text{aq})$ sont incolores. Pour repérer l'équivalence, on utilise un indicateur coloré noté $\text{Ind}^{4-}(\text{aq})$ bleu quand il est libre et qui donne avec les ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ un complexe $[\text{CaInd}]^{2-}(\text{aq})$ de couleur rose.

Le protocole de dosage est le suivant :

Dans un bécher, on introduit un volume $V = 50,0 \text{ mL}$ d'eau d'Evian et on ajoute une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (soude) jusqu'à obtenir un pH égal à 12,5. On filtre de manière à éliminer le solide $\text{Mg}(\text{OH})_2(\text{s})$. On récupère le filtrat qui contient les ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$. On ajoute au filtrat l'indicateur coloré. On dose le filtrat avec une solution aqueuse de d'EDTA de concentration molaire $C_0 = 0,0250 \text{ mol.L}^{-1}$. L'équivalence, caractérisée par le changement de couleur de la solution rose au bleu, est obtenue pour un volume de solution aqueuse d'EDTA $V_{\text{eq}} = 3,9 \text{ mL}$.

Donnée :

Masse molaire atomique du calcium $M(\text{Ca}) = 40,1 \text{ g.mol}^{-1}$

- 2.2.2.1** Écrire l'équation de réaction de la formation du complexe $[\text{CaY}]^{2-}(\text{aq})$. Donner l'expression de sa constante de formation β .
- 2.2.2.2** En repérant les espèces colorées présentes avant et après l'équivalence, expliquer en détail le rôle de l'indicateur coloré. Commenter la stabilité du complexe $[\text{CaInd}]^{2-}(\text{aq})$ par rapport au complexe $[\text{CaY}]^{2-}(\text{aq})$.
- 2.2.2.3** Donner en la justifiant l'expression de la quantité de matière d'ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ dosés en fonction de C_0 et V_{eq} . Calculer cette quantité de matière d'ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ dosés.

3. Spectroscopie UV-visible (14 points)

On veut déterminer par spectroscopie UV-visible la concentration d'une solution aqueuse de permanganate de potassium ($\text{K}^+(\text{aq}) + \text{MnO}_4^-(\text{aq})$)

3.1. Donner les quatre éléments principaux d'un spectrophotomètre.

3.2. Un laboratoire possède un spectrophotomètre de haute qualité, dont le monochromateur peut être utilisé dans l'ultraviolet, le visible et l'infrarouge. Il comprend un jeu de plusieurs

réseaux en fonction de la longueur d'onde de travail. Pour ce dosage, on choisit un réseau gravé ayant 500 traits par mm. Le réseau est éclairé sous incidence normale par des radiations de longueur d'onde comprises entre $\lambda_1=400\text{nm}$ et $\lambda_2=800\text{nm}$.

3.2.1. Définir et calculer le pas du réseau utilisé.

3.2.2. La formule fondamentale des réseaux plans est $\sin \theta = \sin i + k.(\lambda / a)$.

A l'aide de l'**annexe 1**, donner la signification des différents termes figurant dans cette formule en précisant les unités.

3.2.3. Calculer dans le spectre d'ordre 1, les angles θ_1 et θ_2 pour les radiations de longueur d'onde λ_1 et λ_2 , le réseau étant éclairé sous incidence normale. En déduire l'écart angulaire entre les deux radiations.

3.3. En **annexe 2** dont donnés :

▣ Le spectre d'absorption d'une solution aqueuse de permanganate de potassium ($\text{K}^+(\text{aq}) + \text{MnO}_4^-(\text{aq})$)

▣ Le tableau associant couleur et longueur d'onde dans le vide correspondante

▣ Le tableau associant la couleur des radiations absorbées par une solution aqueuse et la couleur perçue par l'œil de la solution aqueuse.

La couleur de la solution aqueuse de permanganate de potassium est magenta. Justifier cette affirmation à l'aide des documents de l'**annexe 2**.

3.4. A la longueur d'onde de travail ($\lambda=525\text{ nm}$), le coefficient d'extinction molaire vaut $\epsilon=2160\text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. La longueur l de la cuve est égale à $1,00\text{ cm}$. La solution aqueuse inconnue de permanganate de potassium a une absorbance $A=0,540$.

3.4.1. La relation liant l'absorbance à la transmittance T est $A = -\log T$

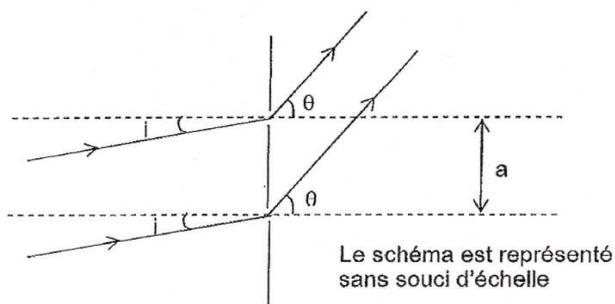
Calculer la transmittance de cette solution aqueuse de permanganate de potassium.

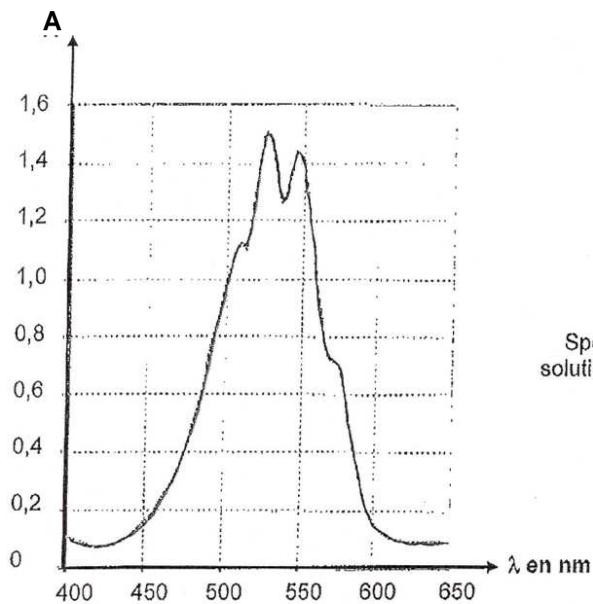
3.4.2. Énoncer la loi de Beer-Lambert en définissant les grandeurs introduites et en précisant leur unité.

3.4.3. Calculer la concentration molaire de cette solution aqueuse de permanganate de potassium.

Annexe 1

Schéma de principe d'un réseau plan



Annexe 2

Spectre d'absorption visible d'une solution aqueuse de permanganate de potassium

Couleur	Longueur d'onde en nm
Infrarouge	> 740
Rouge	≈ 615-740
Orange	≈ 590-615
Jaune	≈ 565-590
Vert	≈ 510-565
Bleu	≈ 446-510
Violet	≈ 380-446
Ultraviolet	<380

Couleur des radiations absorbées par une solution aqueuse éclairée en lumière blanche	Couleur perçue par l'œil de la solution aqueuse
Bleu	Jaune
Vert	Magenta
Jaune	Bleu
Rouge	Cyan

2013 – U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français

- l'utilisation de la calculatrice est interdite

Souris KO : un exemple d'inactivation utilisé dans l'étude de la mucoviscidose.

En 2007, le prix Nobel de Médecine a été décerné aux chercheurs Mario Capecchi, Martin Evans et Oliver Smithies pour leurs travaux qui avaient conduit à l'obtention des premières souris transgéniques « Knock Out » (KO) dans les années 1990. Il s'agissait des premiers mammifères chez lesquels un gène était invalidé spécifiquement et de manière stable. Cette biotechnologie d'une nouvelle ère a ouvert un champ d'étude nouveau en médecine puisqu'il était dès lors possible d'étudier les effets d'un seul gène sur la physiologie de l'animal. Depuis, de très nombreuses souris KO ont été réalisées. Certaines ont servi d'animaux modèles pour l'étude des maladies génétiques comme la mucoviscidose.

1. Le gène *Cftr* et son expression (5,5 points)

La mucoviscidose est une maladie génétique monogénique consécutive à une mutation du gène *Cftr*. Ce gène code la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), une protéine canal perméable aux ions chlorure. Chez l'homme, le gène *Cftr* a été identifié sur le chromosome 7, il comprend 27 exons. La protéine CFTR est constituée de 1476 acides aminés.

1.1. Organisation des gènes eucaryotes

1.1.1. Présenter sous forme d'un schéma légendé l'organisation générale d'un gène eucaryote du type de *Cftr*, en précisant les différents signaux nécessaires à son expression.

1.1.2. Compléter ce schéma en représentant de façon simple l'ARN messager issu de la transcription, après maturation, ainsi que le polypeptide issu de la traduction. Indiquer l'orientation de chacune de ces molécules.

1.2. Mutations pathologiques du gène *Cftr* humain

Chez l'homme, plus de 200 mutations de *Cftr* ont été répertoriées. Deux d'entre elles, $\Delta F508$ et I511X, sont portées sur l'exon 10 de *Cftr*.

La séquence ci-dessous correspond aux codons 507 à 512 du transcrit mature du gène *Cftr*.

AUC UUU GGU GUU IAUA AAA
507 508 509 510 511 512

La mutation $\Delta F508$ est une délétion portant sur les trois nucléotides soulignés de la séquence nucléotidique.

1.2.1. Écrire, sur la copie, la séquence nucléotidique délétée. À l'aide du code génétique représenté dans le **document 1**, traduire cette séquence en précisant le nom complet de chaque acide aminé. En déduire la conséquence de la délétion $\Delta F508$ sur la séquence peptidique.

La mutation I511X est une délétion portant sur le nucléotide encadré sur la séquence.

1.2.2. Déduire la conséquence de cette délétion ponctuelle sur la séquence peptidique.

2. Obtention de souris transgéniques invalidées pour l'exon 10 du gène *Cftr* (7,5 points)

Les souris KO pour l'exon 10 du gène *Cftr* (souris homozygotes *Cftr* $\Delta 10/\Delta 10$) sont obtenues à partir du croisement de souris homozygotes *Cftr* fl10neo/fl10neo et de souris productrices de recombinaison (souris homozygotes *Cre* +/+).

2.1. Construction des allèles *Cftr* fl10neo et *Cftr* $\Delta 10$

Le **document 2** décrit le principe d'obtention des allèles *Cftr* fl10neo et *Cftr* $\Delta 10$. Pour obtenir l'allèle *Cftr* fl10neo, un vecteur est nécessaire. Il porte l'exon 10 du gène *Cftr* associé à une cassette Néomycine. L'ensemble est encadré par deux sites LoxP ; il est alors qualifié de « floxé ». fl10neo peut ainsi être éliminé « à la demande » par une recombinaison *Cre*, afin de produire l'allèle invalidé $\Delta 10$.

2.1.1. A partir du **document 2a**, expliquer l'obtention de l'allèle *Cftr* fl10neo.

2.1.2. A l'aide des **documents 2a et 2b**, expliquer l'obtention de l'allèle *Cftr* $\Delta 10$

2.2. Obtention des souris transgéniques

La méthode suivie se compose des étapes suivantes :

- Transfection de cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES) par électroporation en présence du vecteur linéarisé contenant l'exon 10 floxé associé à une cassette Néomycine.
- Sélection des cellules ES recombinées par croissance sur milieu de culture contenant de la Néomycine et du Gancyclovir.
- Obtention de souris chimères par transfert de cellules ES sélectionnées dans un blastocyste puis implantation dans une mère porteuse.
- Croisement des souris chimères entre elles et obtention de souris homozygotes (*Cftr* fl10neo/fl10neo).
- Croisement avec des souris productrices de recombinaison (souris *Cre* +/+).
- Sélection des souris homozygotes *Cftr* $\Delta 10/\Delta 10$ dans la descendance.

2.2.1. Exposer le principe général de l'électroporation.

2.2.2. Expliquer l'intérêt des deux marqueurs de sélection décrits dans le **document 2**.

2.3. Criblage des souris homozygotes *Cftr* fl10neo/fl10neo

Le criblage a été effectué par Southern Blot.

Pour cette analyse, l'ADN génomique est extrait, digéré par l'enzyme *SphI*, puis les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.

La sonde utilisée, pour identifier les différents allèles *Cftr*, est marquée radioactivement au ^{32}P . Elle est appelée « 3'probe ». Elle est représentée sur le **document 2a** ainsi que les sites « S » de restriction de l'enzyme *SphI*.

Le protocole de Southern blot mis en œuvre est résumé dans le **document 3**.

- 2.3.1. La séquence sonde 3'probe est comparée avec le logiciel BLAST à une banque génomique de souris. Expliquer l'intérêt de cette vérification.
- 2.3.2. Noter sur la copie la signification des repères 1 à 5 du montage de transfert présentés sur le **document 4**.
- 2.3.3. Préciser l'intérêt de la solution D utilisée à l'étape 1 du protocole (**document 3**).

Lors de l'étape 9 (**document 3**), la membrane est lavée dans des conditions de stringence croissante.

- 2.3.4. Identifier les conditions de stringence, et préciser le rôle de cette étape.

L'ADN de trois souris A, B et C a été analysé par Southern blot.

- 2.3.5. Caractériser ces trois génotypes à partir du **document 5**.

3. Etude du taux d'expression du gène de la *recombinase Cre* par RT-qPCR (6 points)

Les souris homozygotes *Cre* +/+, possèdent le gène *Cre* sous contrôle d'un promoteur tissu-spécifique. Elles permettent après croisement avec des souris *Cftr* fl10neo/fl10neo d'obtenir des souris homozygotes *Cftr* $\Delta 10/\Delta 10$, uniquement dans le tissu considéré.

Le promoteur tissu-spécifique utilisé pour contrôler la recombinaison *Cre* est celui de la Villine. L'ARNm de la recombinaison *Cre* a été dosé dans différents tissus d'une souris *P villine-Cre* +/- par RT-qPCR en temps réel.

3.1. Dosage des ARNm de la recombinaison *Cre*

Le **document 6** est le résultat d'une RT-qPCR faite à partir des extraits d'ARNm standardisés de trois tissus d'une même souris *P villine-Cre* +/- : le cerveau, l'intestin et le poumon. Il présente plusieurs courbes d'amplification.

- 3.1.1. Décrire succinctement l'activité de la Transcriptase Inverse et préciser son utilité dans la technique de RT-PCR.
- 3.1.2. Reporter sur la copie l'allure générale d'une courbe d'amplification. Identifier et commenter les différentes phases de cette courbe.
- 3.1.3. Placer le cycle seuil (Ct) sur cette courbe et donner sa définition.
- 3.1.4. Expliquer le lien entre la valeur du cycle seuil et le nombre initial de séquence cible.

- 3.1.5. Analyser les résultats obtenus pour les ARNm du « gène de ménage » *hsp90* et pour les ARNm du gène *Cre* extraits des trois tissus, présentés dans le **document 6**.

Conclure sur l'expression « tissu-spécifique » du gène de la recombinase *Cre* chez la souris *Pvilline-Cre +/+*.

3.2. Etude des souris *Cftr* $\Delta 10/\Delta 10$

Certains embryons ont été sacrifiés et l'ADN de différents tissus a été testé par la technique de Southern blot préalablement décrite avec la sonde 3'probe (**document 2**).

Décrire les résultats attendus (nombre de bande(s) et taille de la (des) bande(s) en kb) pour les cellules de cerveau, d'intestin et de poumon.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

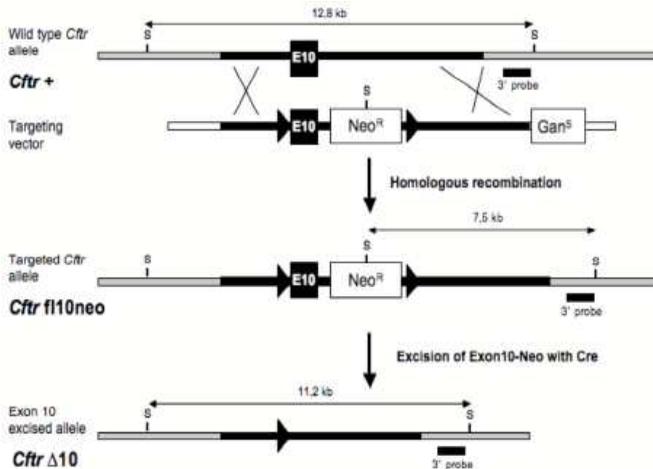
Document 1 : Le code génétique

		nucléotide en n°2							
		U	C	A	G				
nucléotide n°1	U	UUU	Phe	UCU	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC		UCC	UAC		UGC		C
		UUA	Leu	UCA	UAA	*	UGA	*	A
		UUG		UCG	UAG		UGG	Trp	G
	C	CUU		CCU	CAU	His	CGU		U
		CUC	Leu	CCC	CAC		CGC	Arg	C
		CUA		CCA	CAA	Gln	CGA		A
		CUG		CCG	CAG		CGG		G
	A	AUU		ACU	AAU	Asn	AGU	Ser	U
		AUC	Ile	ACC	AAC		AGC		C
		AUA		ACA	AAA	Lys	AGA	Arg	A
		AUG	Met	ACG	AAG		AGG		G
G	GUU		GCU	GAU	Asp	GGU		U	
	GUC	Val	GCC	GAC		GGC	Gly	C	
	GUA		GCA	GAA	Glu	GGA		A	
	GUG		GCG	GAG		GGG		G	

* codon stop

Document 2 : Principe d'obtention des allèles *Cftr* fl10 neo et *Cftr* Δ10

Document 2a : Extraits de l'article de Drumm et al. : « Generation of the *Cftr* conditional null allele »

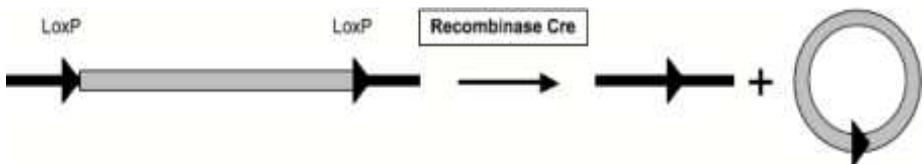


The wildtype *Cftr* allele contains exon 10 of *Cftr* (black box). The vector contains selectable markers for both positive (Neo^R : neomycin resistance cassette) and negative (Gan^S : herpes thymidine kinase gene, HTK, responsible of Gancyclovir sensitivity) selection of mouse embryonic stem (ES) cells. The targeting vector contains 2 *loxP* sites (triangles) that flank exon 10 and the Neo^R cassette. Both arms of the targeting vector have homologous sequence to *Cftr*.

S : site de restriction pour *SphI*.

Document 2b : Principe du système de recombinaison spécifique « Cre-LoxP »

Les sites LoxP sont des séquences de 30 nucléotides reconnues spécifiquement par une recombinaise phagique : la recombinaise Cre. La recombinaise Cre catalyse l'excision spécifique du fragment d'ADN floxé, c'est à dire encadré par deux sites LoxP orientés dans le même sens.

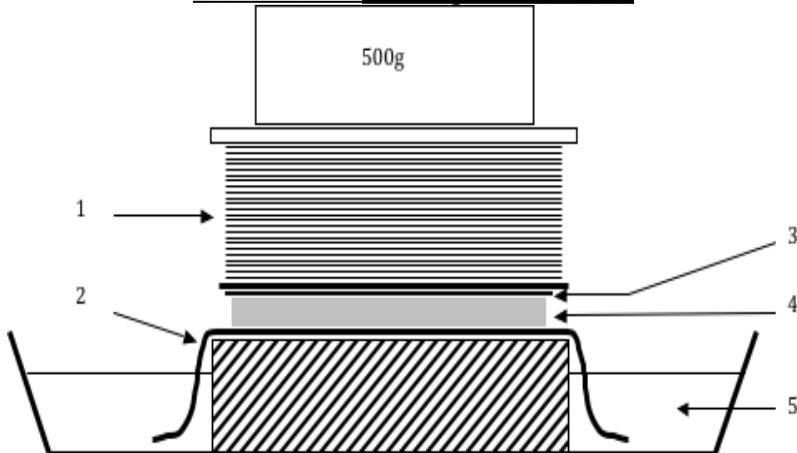


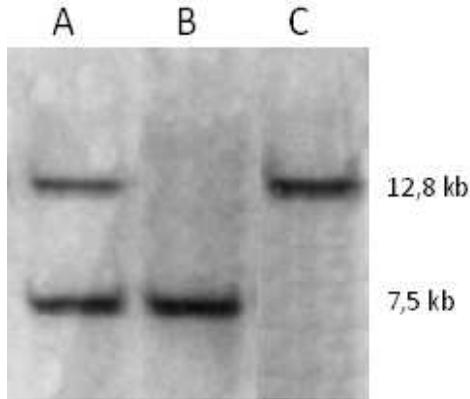
Document 3 : Southern Blot protocol

1. Wash the gel for 15 minutes at room temperature in solution D (0,2M NaOH ; 0,6 M NaCl).
2. Cut nylon membrane and two sheets of Whatman paper to the size of the gel. Pre-wet the membrane into 10X SSC.
3. Prepare a rectangular pyrex dish for transfer as described in **Document 5**. Add hybridization buffer (10X SSC) to the bottom of the pyrex dish. Allow the 10X SSC to wet the ends of the Whatman paper. Allow the DNA to transfer overnight.
4. Disassemble the transfer device.
5. Crosslink the DNA by UV irradiation.
6. Prehybridize the membrane in the hybridization buffer for at least 1 hour.
7. Add the denatured labeled probe to fresh hybridization buffer.
8. Hybridize in a hybridization oven overnight at 42 °C.
9. **The following day, wash the blot in:**
 - 2X SSC ; 0,1% SDS at room temperature for 15 minutes. Repeat.
 - 0.1X SSC ; 0,1% SDS at room temperature for 15 minutes. Repeat.
 - 0.1X SSC ; 0,1% SDS at 65 °C for 15 minutes. Repeat.
10. Wrap the washed membrane in plastic wrap, and place in a X-ray film cassette. Place x-ray film next to the wrapped membrane, and a single intensifying screen. Close the film cassette holder and store overnight to several days at -80 °C to expose the film.
11. Develop the exposed X-ray film.

20X SSC: 701,2 g NaCl and 352,8 g of sodium citrate into 4 liters of water. Adjust pH to 7,0.

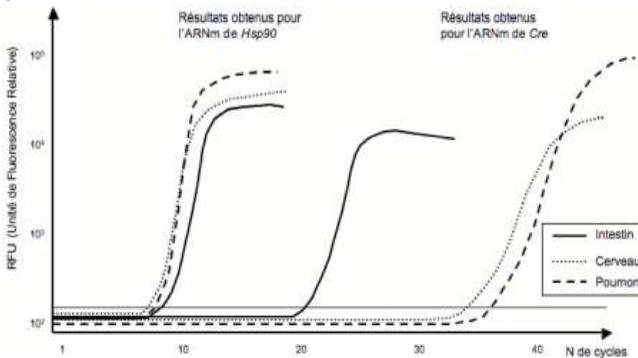
Document 4 : Montage de transfert



Document 5 : Analyse par Southern blot de l'ADN des souris A, B et C**Document 6 : Courbes d'amplification de RT-qPCR**

Analyse portant sur les ARNm de poumon, de cerveau et d'intestin grêle d'une souris *Pvilline-Cre^{+/+}*.

Chaque courbe présentée est obtenue en moyennant les résultats de plusieurs courbes expérimentales. Les trois courbes de gauche concernent l'ARNm du gène *hsp90*, un « gène de ménage », servant de référence. Les trois courbes de droite concernent l'ARNm de la recombinase Cre.

**Références bibliographiques :**

- . Snouwaert et al. « An animal model for Cystic Fibrosis made by gene targeting », Science, 1992 August 21.
- . Hodges et al. « Generation of a conditional null allele for *Cftr* in mice », Genesis, 2009 July 16.

2013 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée 2 h – coefficient 1

Les lectines: une histoire d'affinité

Le terme « lectine » vient du latin « legere » qui signifie « sélectionner ». Les lectines sont des protéines qui ont la propriété de se lier à des glucides. Cette propriété leur permet notamment de provoquer l'agglutination des hématies, d'où le terme « hémagglutinine », employé si la spécificité glucidique de la protéine n'est pas connue. Un grand nombre de lectines ayant des affinités pour des oses ou des oligosides spécifiques ont pu être isolées de différents organismes vivants, en particulier des plantes. Leur utilisation en biotechnologie est croissante.

1. Extraction et purification d'une lectine (4,5 points)

C'est à partir des plantes que sont obtenus les meilleurs rendements d'extraction des lectines. Le **document 1** présente l'étape d'extraction et les premières étapes de purification d'une lectine nommée lectine A.

- 1.1. Expliquer le rôle du sulfate d'ammonium dans cette première étape de purification.
- 1.2. Indiquer les principes respectifs de la dialyse et de la lyophilisation.

Pour purifier la lectine A, une étape de chromatographie est réalisée. Le chromatogramme obtenu est présenté en **document 2**. L'activité de la lectine A dans les fractions recueillies a été mise en évidence par des tests d'hémagglutination.

- 1.3. Préciser le type de chromatographie réalisée et nommer la partie réactive de la phase stationnaire utilisée.
- 1.4. Citer les différentes étapes de cette chromatographie.
- 1.5. Préciser les volumes d'élution correspondant aux fractions riches en lectine A. Justifier la réponse.
- 1.6. Conclure quant à l'efficacité de cette étape de purification.

2. Estimation de la taille et de la structure d'une lectine (4 points)

La masse molaire de la lectine A purifiée a été estimée par chromatographie d'exclusion stérique sur gel de sephacryl S200. Les résultats sont présentés en **document 3**.

- 2.1. Expliquer le principe de la séparation par chromatographie d'exclusion
 - 2.2. Déterminer la masse moléculaire de la lectine A en kDa. Détailler les étapes du raisonnement mené.

Pour connaître la structure globale de la lectine A, une SDS-PAGE est réalisée. L'électrophorégramme est présenté **document 4**.

2.3. A partir des résultats des **document 3 et 4**, déduire la structure quaternaire de la lectine A. Justifier la réponse en explicitant la démarche d'analyse.

3. La concanavaline A et son utilisation dans les capteurs de glucose (8 points)

3.1. Structure de la concanavaline A

La concanavaline A est une glycoprotéine de la famille des lectines. Produite par le haricot sabre (*Canavalia ensiformis*), c'est la première lectine à avoir été identifiée et extraite. Elle se lie spécifiquement au D-mannose et au D-glucose.

La concanavaline A est un homotétramère. Sa structure tertiaire a été élucidée et les bases moléculaires de son affinité pour le mannose et le glucose sont connues.

- 3.1.1.1** Expliquer le terme « homotétramère ».
- 3.1.1.2** Expliquer la notion de « structure tertiaire » et préciser les interactions impliquées dans le maintien de sa conformation.
- 3.1.1.3** A partir de la représentation de la concanavaline A en **document 5**, préciser le type de structure secondaire principalement retrouvée dans les sous-unités.

3.2. Utilisation de la concanavaline A dans la mise au point d'un biocapteur de glucose

Les biocapteurs de glucose permettent le suivi des variations de la glycémie afin d'adapter la libération d'insuline (hormone hypoglycémisante) chez les diabétiques.

Différents axes de recherche sont développés pour améliorer la sensibilité des biocapteurs, en particulier l'utilisation de la technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou fluorescence resonance energy transfer (FRET).

De nombreux modèles en développement comprennent des biocapteurs à fibres optiques avec de la concanavaline immobilisée. L'exemple du biocapteur FAS est présenté dans le **document 6**.

- 3.2.1.1** Expliquer le principe général de la technique FRET
- 3.2.1.2** Citer deux méthodes d'immobilisation de protéines basées sur des principes physico-chimiques différents.
- 3.2.1.3** Décrire le fonctionnement du biocapteur FAS présenté en **document 6** en absence, puis en présence de glucose.

Avant commercialisation, il faut s'assurer de la réponse efficiente de ces biocapteurs vis à vis des variations de la glycémie in vivo. Les résultats d'essais chez le rat, présentés **document 7**, permettent de comparer les performances du biocapteur FAS et d'un biocapteur nommé X.

- 3.2.1.4** Décrire et analyser les résultats.

4. Les lectines: de potentiels candidats anti-VIH (2,5 pints)

Une voie de recherche pour lutter contre la propagation du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est d'empêcher la pénétration du virus dans les cellules hôtes. La fixation du virus sur les cellules humaines se fait, notamment, par interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH et le récepteur cellulaire CD4. Les lectines, en interagissant avec la gp120, pourraient empêcher cette fixation. Elles sont donc des candidats sérieux à la prévention de la maladie.

La lectine BanLec, isolée de la banane (*Musa acuminata* cultivars), présente une affinité pour les structures riches en mannose.

L'objectif est de mettre en évidence une éventuelle interaction spécifique entre BanLec et gp120. Cette interaction a été étudiée selon le protocole fourni en **document 8**.

4.1. Réaliser un schéma du contenu d'un puits au moment de la mesure d'absorbance dans le cas où l'interaction entre BanLec et gp120 est effective. Effectuer en parallèle le schéma du contenu d'un puits en absence de gp120.

4.2. Préciser le site de fixation de l'anticorps anti-mouton conjugué sur l'anticorps anti-gp120. Justifier la réponse.

<p>Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)</p>
--

<p>Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)</p>

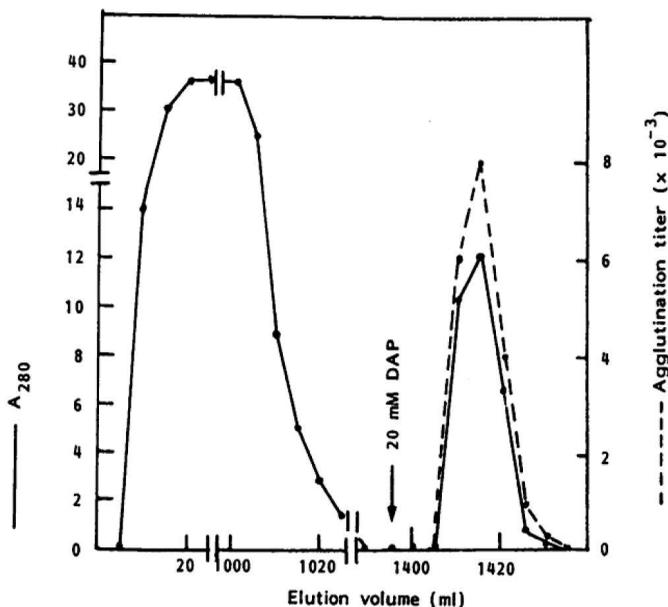
<p>Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture</p>

Document 1Isolation of lectin A

Lectin A was isolated from the crude extract of bulbs of spring flowering crocus. The peeled bulbs were homogenized with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 6.8) containing 0.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution overnight at 10 °C, and the PBS extract was centrifuged. To the supernatant of the extract was added $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 30% saturation, and the precipitate was collected, dialyzed against distilled water, and lyophilized.

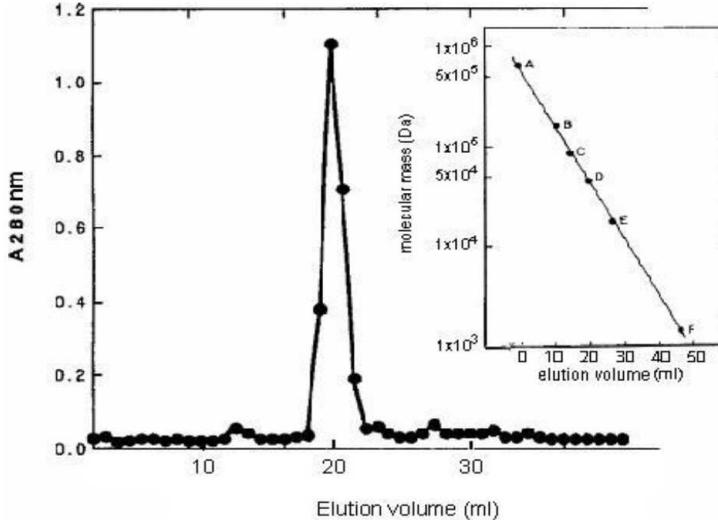
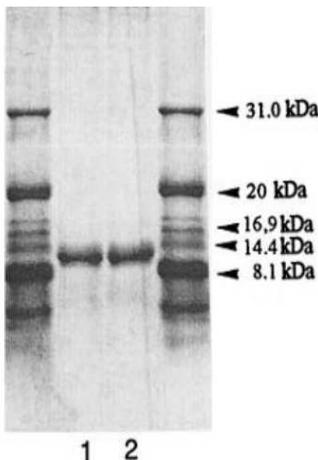
Document 2Chromatographie de la lectine A sur mannose immobilisé

L'extrait brut de lectine (100 mg de protéines totales contenant environ 20% de lectine A) obtenu par précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a été dissous dans un volume minimal de PBS et déposé sur une colonne de mannose immobilisé, équilibrée avec du NaCl 1 M. Les protéines non fixées sont éluées par du NaCl 1 M jusqu'à obtenir un effluent ayant une A_{280} inférieure à 0.01. Puis, la lectine est désorbée avec une solution de diaminopropane (DAP) 20 mM. Des fractions de 5 ml sont collectées et l' A_{280} et le titre d'agglutination sont déterminés (en utilisant des érythrocytes de lapin traités à la trypsine). 10 mg de lectine A sont récupérés.



Document 3Gel filtration of lectin A on Sephacryl S200

The column (1.5 x 120 cm) was loaded with 2 mg of the purified lectin and eluted with 0.05 M PBS (pH 6.8). The molecular mass standards were thyroglobulin (670 kDa) (A); gamma globulin (158 kDa) (B); bovine serum albumin (66.2 kDa) (C); ovalbumin (45 kDa) (D); myoglobin (17 kDa) (E); and vitamin B12 (F). Fractions of 1 ml were collected, and proteins were assayed by absorbance at 280 nm.

**Document 4**SDS- PAGE of purified lectin A

Left and right lanes, standards: carbonic anhydrase (31 kDa); soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa); myoglobin (16.9 kDa); lysozyme (14.4 kDa); and CNBr-cleaved myoglobin (8.1 – 6.2 kDa).

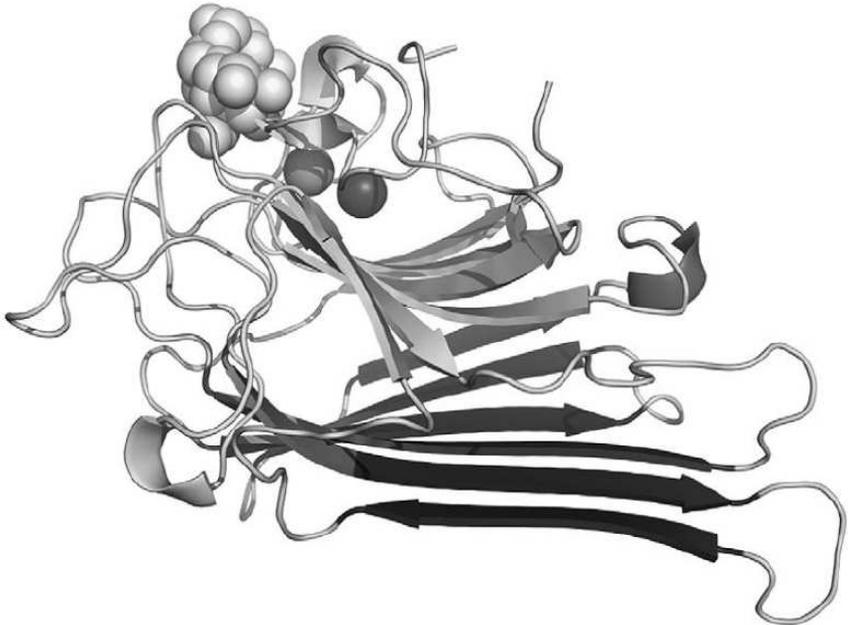
Lane 1, lectin A in the absence of β mercaptoethanol.

Lane 2, lectin A in the presence of β mercaptoethanol.

Document 5

Monomeric Concanavalin A representation

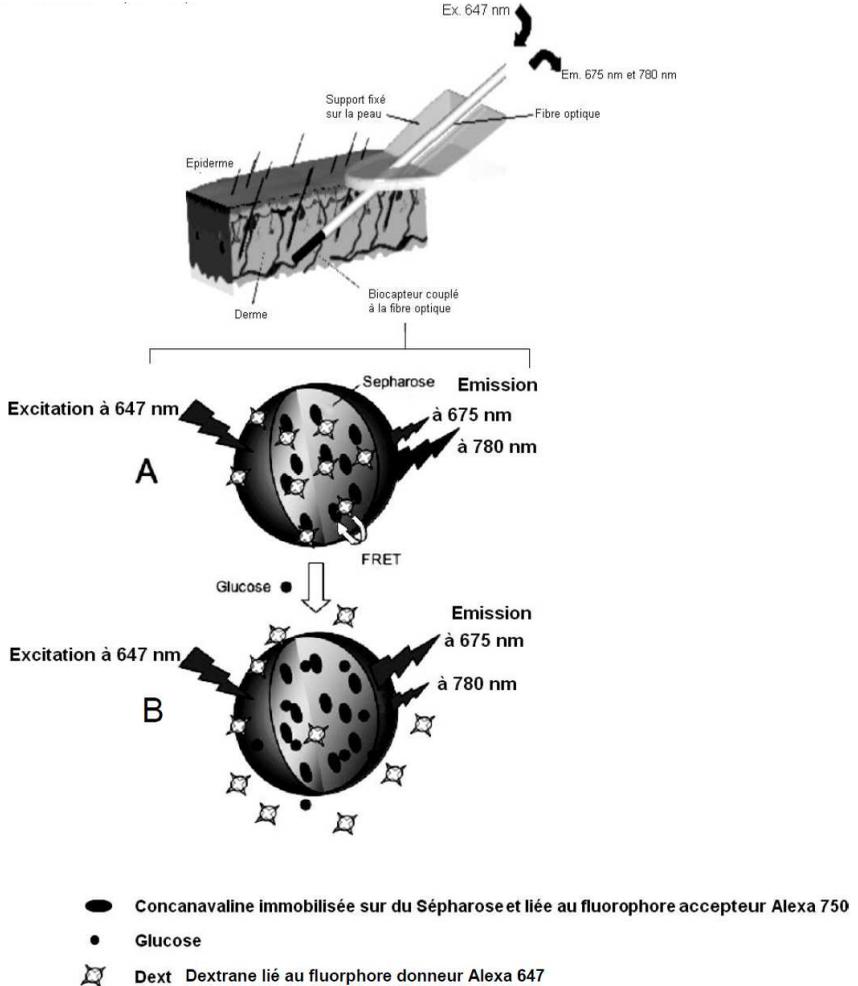
The light-colored spheres depict the trimannoside molecule, and the adjacent dark spheres represent the calcium and manganese ions.

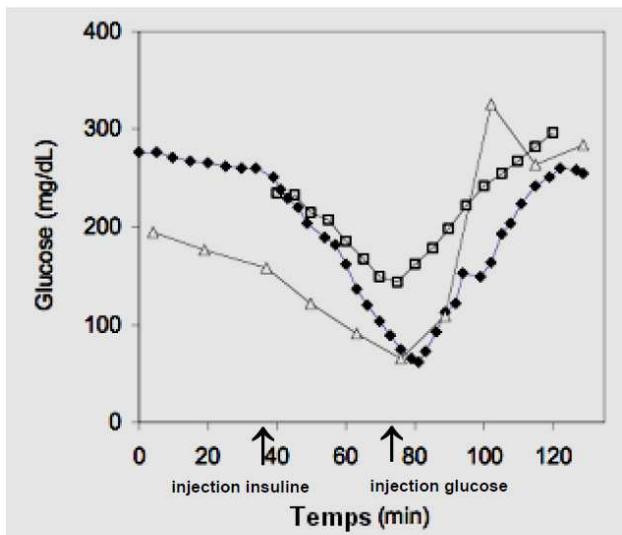


Document 6**Mécanisme de l'émission du signal de fluorescence dans les capteurs FAS**
(Fluorescence Affinity Sensors)

Le spectre d'absorption du chromophore accepteur Alexa 750 recouvre partiellement le spectre d'émission de fluorescence du donneur Alexa 647.

Quand le chromophore donneur lié à l'analogue du glucose (dextrane) est à proximité du chromophore accepteur lié à la concanaviline A immobilisée, l'émission de fluorescence à 675 nm diminue et celle à 780 nm augmente à cause du phénomène de FRET (voir A). Lorsque le dextrane fluorescent se dissocie de la concanaviline A suite à un phénomène de compétition avec le glucose, l'émission de fluorescence à 675 nm augmente et celle à 780 nm diminue (voir B).



Document 7Performance in vivo de deux capteurs à fibres optiques chez le rat

- ◆ capteur FAS.
- ◻ capteur X.
- △ Concentration en glucose déterminée *ex-situ* par une méthode de référence (prélèvements sanguins).

Le temps 0 min sur l'axe des ordonnées correspond au moment de l'implantation des capteurs X et FAS sur l'animal. Les flèches indiquent l'introduction de modulateurs de la glycémie (insuline ou glucose).

Document 8Study of BanLec and Glycosylated HIV-1 gp120 Interaction by ELISA

96 wells ELISA plates were coated by adding 50 μ l of 5 μ g/ml BanLec per well and incubated overnight at room temperature. The next day plates were blocked for 1.5 h at room temperature with PBS containing 1 % bovine serum albumin and 0.05 % sodium azide and then rinsed with wash buffer (PBS containing 0.05 % Tween 20, pH7.4) 3 times before the addition of recombinant, glycosylated gp120 protein diluted in blocking buffer (different concentrations of gp120 are tested). After a 1 h incubation at room temperature, the plates were washed 3 times before the addition of the detection antibodies. A sheep anti-gp120 anti-body (AIDS Research and Reference Reagent Program) was diluted 1:2000 in dilution buffer (wash buffer containing 0.1% bovine serum albumin) and added to the wells and incubated for 1 h. The plate was washed again before a 1 h incubation with an anti-sheep antibody conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) diluted 1:40,000 in dilution buffer. After the plate was washed, p-nitrophenyl phosphate (Sigma) was added for colorimetric analysis, and the absorbance was measured at 405 nm.

2013 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire français/anglais.

Tout autre matériel est interdit.

Production de nisine par *Lactococcus lactis*

La nisine est une bactériocine, de nature protéique produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Elle présente des propriétés bactéricides et/ou bactériostatiques.

La nisine inhibe la synthèse de la paroi des bactéries à Gram positif et empêche la germination des spores chez de nombreux *Bacillus*.

La nisine est utilisée dans les industries de transformation des fromages, viandes, boissons comme conservateur alimentaire (E234).

La production de cet additif ne peut pas être réalisée par voie chimique mais seulement par voie microbiologique.

1. Caractéristiques physiologiques et métaboliques de *Lactococcus lactis* (7 points)

1.1. *Lactococcus lactis* : agent probiotique

Les informations sur *Lactococcus lactis* sont présentées dans le **document 1**.

- 1.1.1. Représenter, sous la forme d'un schéma simple, le constituant principal de la paroi de *Lactococcus lactis*.
- 1.1.2. Préciser les types trophiques énergétique et carboné de cette bactérie. Justifier la réponse.
- 1.1.3. Préciser une condition de culture particulière de *Lactococcus lactis*.

1.2. *Lactococcus lactis* : bactérie homofermentaire

- 1.2.1. Expliquer la différence entre les fermentations homolactique et hétérolactique.
- 1.2.2. Proposer les légendes 1 à 3 du **document 2**. Écrire la formule de la molécule 4.
- 1.2.3. Préciser, à l'aide **du document 1**, la localisation et les conditions de réalisation des voies métaboliques 1 et 2 du **document 2**.

1.3. Culture sur milieu MRS

Le milieu MRS est un milieu adapté pour la croissance des bactéries lactiques. Il peut être utilisé pour la production de nisine.

- 1.3.1. Indiquer le rôle des constituants soulignés et préciser la nature du milieu MRS présenté dans le **document 3**.
- 1.3.2. *Lactococcus* est un micro-organisme poly-auxotrophe. Expliquer ce terme.

2. Optimisation des paramètres de croissance de *Lactococcus lactis* pour la production de nisine (10,5 points)

2.1. Procédé de fermentation en discontinu

La production de nisine est réalisée en bioréacteur de laboratoire, en milieu complexe, non aéré, sous agitation à 100 rpm et sans régulation du pH dans un premier temps, pour établir son influence sur les paramètres d'état du micro-organisme. Puis, dans un second temps, la production de nisine est effectuée dans les mêmes conditions expérimentales, mais en mettant en œuvre une régulation pH. Les **documents 4A** et **4B** présentent les profils de fermentation avec et sans régulation du pH.

- 2.1.1. Expliquer, à l'aide d'un schéma, le fonctionnement de la boucle de régulation de pH mise en jeu pour cette culture de *Lactococcus lactis*.
- 2.1.2. Analyser, dans le **document 4A**, la variation de biomasse, la consommation de saccharose (sucrose) et la variation du pH.
- 2.1.3. Émettre une hypothèse pouvant expliquer l'arrêt de croissance à 8 h alors qu'il reste environ $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de saccharose.
- 2.1.4. Calculer, lors d'une production sans régulation de pH, le rendement de production global final exprimé en g de nisine produite par g de saccharose consommé.
Donnée : 10^6 UI de nisine correspondent à 1 g de nisine brute.
- 2.1.5. Calculer, à l'appui du **document 4A**, la productivité volumique horaire finale et la productivité volumique horaire maximale en nisine.
- 2.1.6. Indiquer à quel moment il faudrait arrêter la fermentation dans le cadre d'une production industrielle. Justifier la réponse en liens avec les valeurs précédemment calculées.
- 2.1.7. Discuter de la stabilité de la nisine en présence et en absence de régulation de pH.

2.2. Amélioration de la production de nisine

Les **documents 5A** et **5B** présentent les différentes conditions expérimentales testées et les résultats de l'optimisation de la production de nisine.

- 2.2.1. Justifier, à l'aide du **document 5A**, l'intérêt de se placer à 30°C.
- 2.2.2. Expliquer, à l'aide du **document 5B**, l'intérêt de compléter les milieux en lait. En déduire les conditions optimales pour la production de nisine.

2.3. Risques d'échec de production de nisine à grande échelle

Sur une culture prolongée en batch, régulée à pH = 6,8, après un pic élevé de biomasse et

de nisine à 7 h, une décroissance rapide est observée. Plusieurs hypothèses ont été soulevées, notamment :

- une attaque possible de la souche productrice par un bactériophage externe pendant la fermentation ;
- une induction lytique possible de la souche productrice naturellement lysogène, par des facteurs inconnus.

2.3.1. Nommer et décrire succinctement les étapes de l'infection d'une cellule bactérienne par un bactériophage virulent à ADN.

2.3.2. Citer les principales caractéristiques d'un phage tempéré.

3. Mode d'action de la nisine (1,5 points)

Le mécanisme d'inhibition de la germination des *Bacillus* par la nisine est encore mal compris. Le **document 6** présente l'étude de l'action de la nisine sur la germination des spores de **Bacillus anthracis**.

3.1. Interpréter les courbes à partir du temps 25 minutes :

- valider l'expérience ;
- indiquer la concentration minimale en nisine inhibant totalement la germination des spores.

3.2. Établir une corrélation entre la concentration en nisine et les observations microscopiques réalisées.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

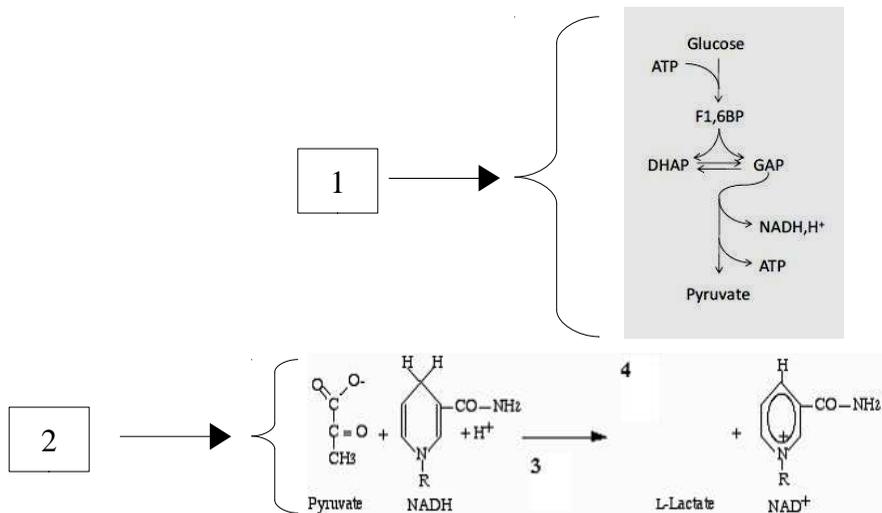
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1 : *Lactococcus lactis* et production de nisine

Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology. "The Good, the Bad, and the Deadly".
 (SCIENCE Magazine- June 4, 2004 - Vol 304 : p. 1421).

Lactococcus lactis is a strictly fermentative microbe classified informally as a Lactic Acid Bacterium because it ferments milk sugar (lactose) to lactic acid. Lactococci are typically spherical or ovoid cells, about 1.2 µm by 1.5 µm, occurring in pairs and short chains. They are Gram-positive, non motile, and do not form spores. *Lactococcus lactis* produces lactic acid, D L or DL. 5 to 10 % of CO₂, can stimulate Lactococci growth. [...]

Hence, they are found normally in milk and *Lactococcus lactis* subspecie, *lactis* is essential in manufacture of many varieties of cheese and other fermented milk products.

Document 2 : Voie métabolique**Document 3 : Composition du milieu MRS (BIOKAR)**

FORMULE – TYPE (pour 1 litre de milieu)

Pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales

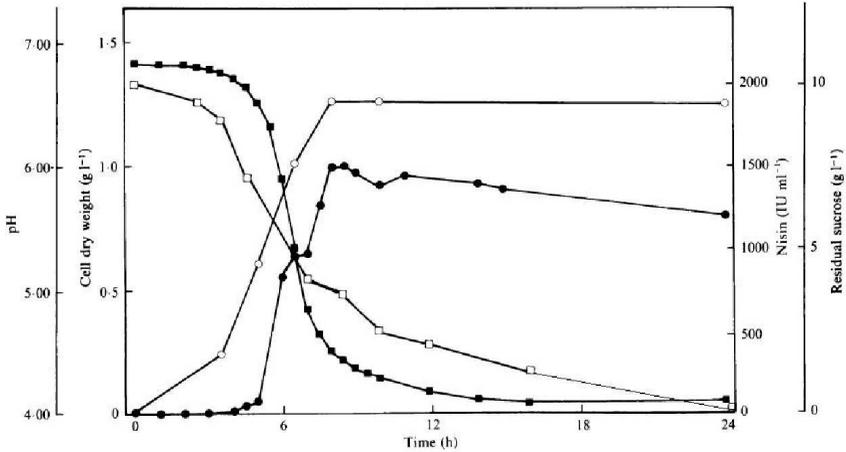
- Peptones végétales.....20,00 g
- Extrait autolytique de levure..... 5,00 g
- Glucose20,00 g
- Tween 80.....1,08 g
- Phosphate dipotassique.....2,00 g
- Acétate de sodium.....5,00 g
- Citrate d'ammonium2,00 g
- Sulfate de magnésium0,20 g
- Sulfate de manganèse0,05 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6,0 ± 0,5.

Document 4 : Profil de production de nisine en procédé discontinu en milieu complexe

Journal of General Microbiology (1992), vol138, p 571-578

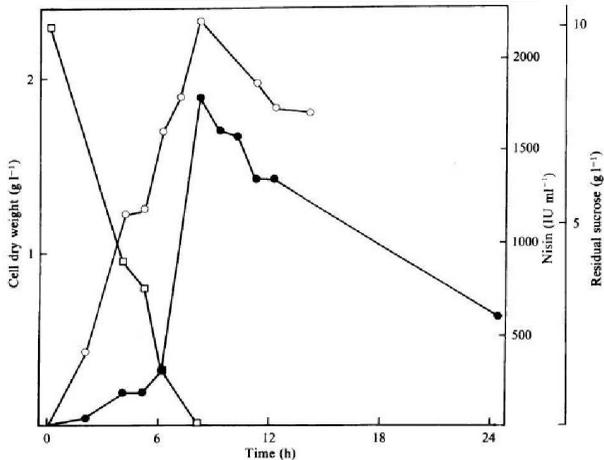
Document 4A : Sans régulation pH



Batch fermentation profile of *Lactococcus lactis subsp. lactis* NIZO 22186 microbial growth and nisin production at uncontrolled pH. Cells were grown in a fermenter containing 5 L nisin production medium with 10 g sucrose·L⁻¹ as carbon source.

Cell dry weight (g·L⁻¹), ○; volumetric nisin titre (IU·mL⁻¹), ●; residual sucrose concentration (g·L⁻¹), □; pH, ■.

Document 4BA : Avec régulation pH = 6,8



Batch fermentation profile of *Lactococcus lactis subsp. lactis* NIZO 22186 microbial growth and nisin production at controlled pH 6-8. Cells were grown in a fermenter containing 5 L nisin production medium with 10 g sucrose·L⁻¹ as carbon source.

Cell dry weight (g·L⁻¹), ○; volumetric nisin titre (IU·mL⁻¹), ●; residual sucrose concentration (g·L⁻¹), □.

Document 5 : Production de nisine par *Lactococcus lactis* dans différentes conditions de culture

Braz. Arch. Biol. Technol. Vol 53 n°1, pp 203-209; jan/feb 2010.

Document 5A : Méthodologie

The influence of various physiochemical parameters on the growth of *Lactococcus lactis sub sp. lactis* was studied at shake flask level. Media optimization (MRS broth) was studied to achieve enhanced growth of the organism and also nisin production. Bioassay of nisin was done with agar diffusion method using *Streptococcus agalactiae* NCIM 2401 as indicator strain. MRS broth (6%, w/v) supplemented with 0.5% (v/v) skimmed milk was found to be the best for nisin production as well as for growth of *L. lactis*. The production of nisin was strongly influenced by the presence of skimmed milk. The production of nisin was affected by the physical parameters and maximum nisin production was at 30°C while the optimal temperature for biomass production was 37°C.

Document 5B : Résultats

Nisin activity, productivity and specific production for every culture, each incubated at 100 rpm/30°C, with *Lactococcus lactis* cultures transferred to fresh media with either MRS or M17 (M17 is a minimal medium), pH was not regulated.

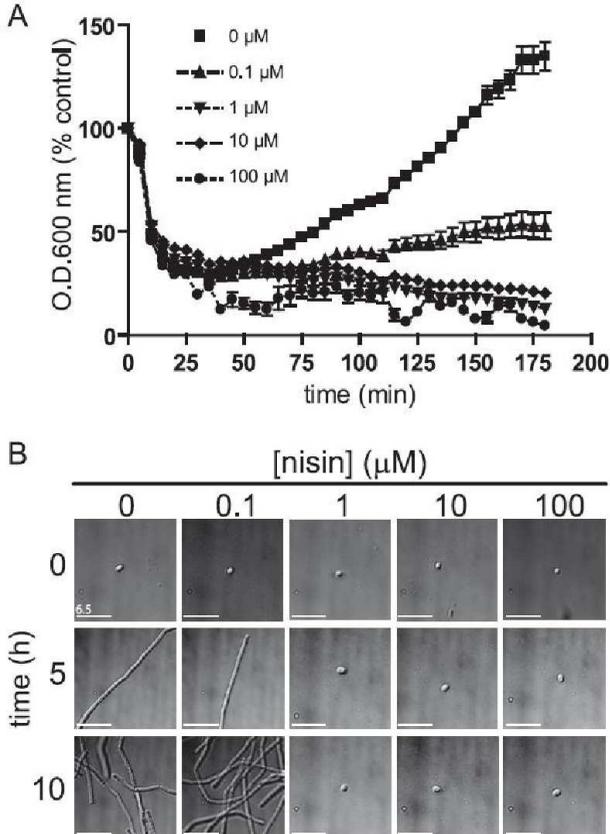
N°	Media composition	Growth conditions	pH at end of culture	Nisin at end of culture ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Specific productivity ($\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{DCWg}^{-1}$)
1	100 % MRS	30°C, 100 RPM	6.15	0.325	0.01
2	100 % M17	30°C, 100 RPM	6.80	0.120	0.01
3	50 % MRS + 0.13 % vitamin solution	30°C, 100 RPM	4.80	231	6.42
4	50 % M17 + 0.13 % vitamin solution	30°C, 100 RPM	6.10	187	5.90
5	25 % MRS + 25 % milk	30°C, 100 RPM	6.10	884	66.10
6	25 % M17 + 25 % milk	30°C, 100 RPM	6.20	408	30.20

DCW = dry cell weight

Document 6 : Étude de l'action de la nisine sur la germination des spores de *Bacillus anthracis*

Antimicrobiol agents and chemotherapy, dec 2008, vol 52 N°12, p 4281-4288.

Les 25 premières minutes de l'expérience correspondent aux modifications initiales des spores qui ne sont pas affectées par la présence de nisine.



B. anthracis spores do not develop into vegetative bacilli in the presence of nisin.

(A) The data are expressed as the percentage of OD₆₀₀ at each time point relative to the OD₆₀₀ of each culture at time zero, which was the control in these experiments. The data are expressed as the means of a single experiment conducted in triplicate and are representative of those from three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

(B) At time zero and 5 and 10 h, samples were removed and visualized by DIC microscopy. For each panel, a single spore is shown for clarity but is representative of all other *B. anthracis* spores within that sample. Bars, 6.5 μm. The data are representative of those from three independent experiments.

2013 – U42 : Biologie cellulaire

Durée : 2 h – coefficient 1

Quelques aspects de l'apport des biotechnologies dans le diagnostic et le traitement du cancer du sein

La protéine human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), récepteur du facteur de croissance EGF, est hyper-exprimée dans environ 20% des carcinomes invasifs du sein. C'est un récepteur tyrosine-kinase dont l'hyper-expression est liée à l'amplification du gène codant la protéine HER2 situé sur le chromosome 17.

Le développement d'un anticorps monoclonal humanisé anti-HER2 et son introduction en thérapeutique en association avec d'autres chimiothérapies, ont permis des progrès significatifs dans la survie des patientes métastatiques présentant un cancer qui provoque une hyper-expression de la protéine HER2.

1. Le récepteur membranaire HER2 (4,5 points)

Le **document 1** représente un schéma de l'ultrastructure de la membrane cytoplasmique dans l'espace.

1.1. Légender le **document 1** après avoir reporté les numéros sur la copie.

Le récepteur HER2 appartient à la famille de récepteurs à activité enzymatique de type tyrosine kinase.

1.2. Construire un schéma annoté et orienté dans l'espace, de ce type de récepteur, en représentant ses différents domaines fonctionnels.

1.3. Expliquer comment ce récepteur permet la transduction du signal en réponse à la fixation de son ligand : le facteur de croissance EGF.

2. Diagnostic du cancer du sein associé à une hyper-expression de la protéine HER2 (9,5 points)

Le gène HER2 appartient à une famille de molécules appelées « proto-oncogènes » cellulaires. Le dérèglement du cycle cellulaire associé à la prolifération non contrôlée des cellules est très souvent en relation avec la transformation d'un proto-oncogène en oncogène cellulaire.

2.1. Expliquer le terme « proto-oncogène ».

2.2. Proposer un mécanisme génétique pouvant être responsable de la transformation d'un proto-oncogène en oncogène.

L'immunohistochimie (IHC) est une technique histologique qui permet de détecter la présence d'une molécule d'intérêt dans un tissu. Dans le diagnostic du cancer du sein, l'IHC est utilisée en première intention pour évaluer le niveau d'expression de la protéine HER2. Cette technique se pratique sur des coupes fixées de biopsies de tumeurs et permet de les classer en quatre catégories correspondant au niveau d'expression de la protéine (0, 1+, 2+, 3+).

La mise en œuvre de cette technique nécessite :

- une solution de sérumalbumine bovine ;
- une solution tampon PBS-tween ;
- des anticorps primaires ;
- des anticorps secondaires marqués ;
- un substrat chromogénique dont la transformation enzymatique produit un précipité coloré visible au microscope photonique ;
- un microscope photonique.

2.3. Présenter un organigramme des étapes du protocole de la recherche de l'antigène HER2 par immunohistochimie à partir d'une biopsie de tumeur mammaire. Expliquer le rôle de chaque étape.

2.4. Décrire l'aspect d'un résultat 0 et d'un résultat 3+.

La polysomie du chromosome 17 porteur du gène HER-2 est retrouvée dans un pourcentage non négligeable de cancer du sein hyper-exprimant HER-2.

Pour confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une polysomie du chromosome 17, la réalisation d'un caryotype peut être envisagée. La technique et un résultat sont présentés dans les **documents 2a et 2b**.

2.5. Expliquer le rôle de la colchicine utilisée dans l'étape 2.

2.6. Citer les critères utilisés pour classer les chromosomes.

2.7. Conclure sur la présence ou l'absence de polysomie du chromosome 17.

Dans le cas des tumeurs mammaires avec hyper-expression de la protéine HER2, l'origine génétique de la maladie c'est-à-dire le statut du gène codant la protéine HER2 peut être précisé grâce à une autre technique : la technique FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) dont le protocole est décrit dans le **document 3a**.

Cette technique se réalise sur des coupes fixées de tissus. Elle utilise ici deux sondes : une sonde spécifique du locus HER2 marquée par le rouge-Texas et une sonde du centromère du Chromosome 17 marquée par la fluorescéine. Le résultat de l'analyse microscopique est présenté sur le **document 3b**.

2.8. À la lumière du protocole présenté dans le **document 3a**, justifier le rôle des étapes du FISH.

2.9. Indiquer la signification d'un spot vert et d'un spot rouge sur le **document 3b**.

L'image obtenue en microscopie à fluorescence prouve clairement une amplification du gène HER2.

2.10. Justifier la conclusion d'amplification du gène codant la protéine.

3. Traitement du cancer du sein lié à une hyper expression du récepteur HER-2 (5 points)

Des anticorps monoclonaux « humanisés » sont utilisés dans le traitement des tumeurs

mammaires, associés à des agents chimiothérapeutiques classiques.

3.1. Expliquer le terme « anticorps monoclonaux ».

3.2. Préciser les particularités structurales d'un anticorps monoclonal humanisé.

3.3. Indiquer l'intérêt du choix d'un anticorps monoclonal « humanisé » en thérapeutique.

Le **document 4** présente un système de production d'anticorps monoclonaux : « Le Bioréacteur à Fibres Creuses ». Ce réacteur est constitué d'un faisceau de fibres perfusées dans lesquelles circulent les fluides.

3.4. Indiquer le compartiment du bioréacteur dans lequel les hybridomes sont cultivés.

3.5. Préciser le sens de passage des molécules suivantes à travers la membrane semi-perméable des fibres creuses : CO₂, glutamine, lactate, O₂, glucose, NH₄⁺. Justifier la réponse.

Le **document 5** présente la production d'anticorps monoclonal (Mab) en fonction du temps pour deux systèmes de culture différents : le procédé de culture discontinue en milieu non renouvelé et le procédé de culture continue par perfusion en fibres creuses présenté précédemment.

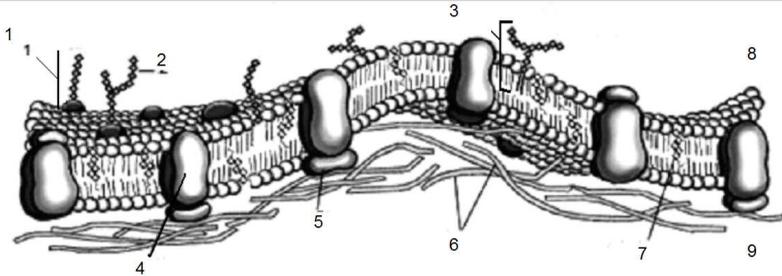
3.6. Calculer la productivité massique journalière en anticorps monoclonaux pour chacun des deux procédés.

3.7. En déduire le principal avantage du système de perfusion en fibres creuses par rapport à la culture en milieu non renouvelé.

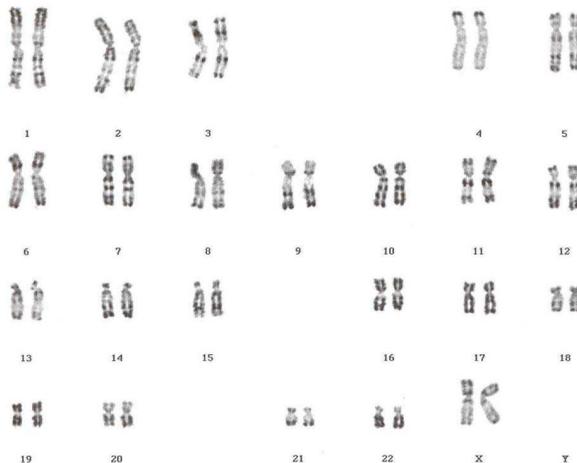
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1Schéma de l'ultrastructure de la membrane cytoplasmique dans l'espace**Document 2**Caryotype d'une cellule de tumeur mammaire**Document 2a : protocole**

1. Après un prélèvement sur l'individu, les cellules sont mises en culture *in-vitro*.
2. La culture est réalisée en présence de colchicine.
3. Les cellules sont récoltées et incubées dans un milieu hypotonique.
4. Les cellules sont centrifugées et mises en contact d'un fixateur, puis étalées sur une lame de verre.
5. Cette préparation est ensuite colorée par un bain de Giemsa qui entraîne l'apparition de bandes sombres et claires alternées sur les chromosomes : le « G-banding ».

Document 2b : résultat**Document 3**

Diagnostic d'une surexpression de HER2 par FISH

Document 3a : protocole du FISH

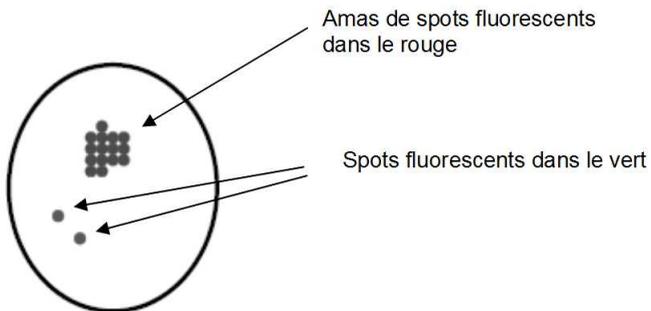
Pretreated tissue sections and labeled probes were denatured at 78°C for 5 min and hybridized overnight at 37°C.

Samples were washed for 2 min at 72°C in a solution of 2 x SSC/0.3%.

Tissue sections were counterstained with 10 µL of 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI counterstain).

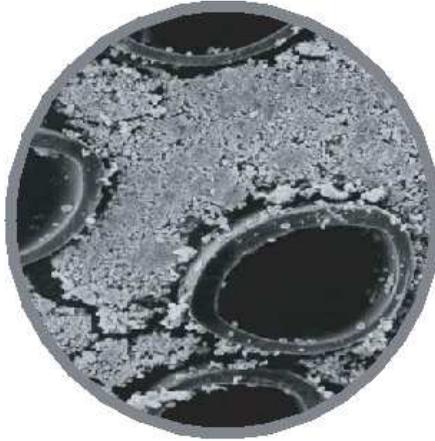
Results were analyzed with a fluorescent microscope.

Document 3b : Représentation schématique du noyau d'une cellule d'une coupe de tumeur mammaire HER2+++ marquée par FISH, observée en microscopie à fluorescence

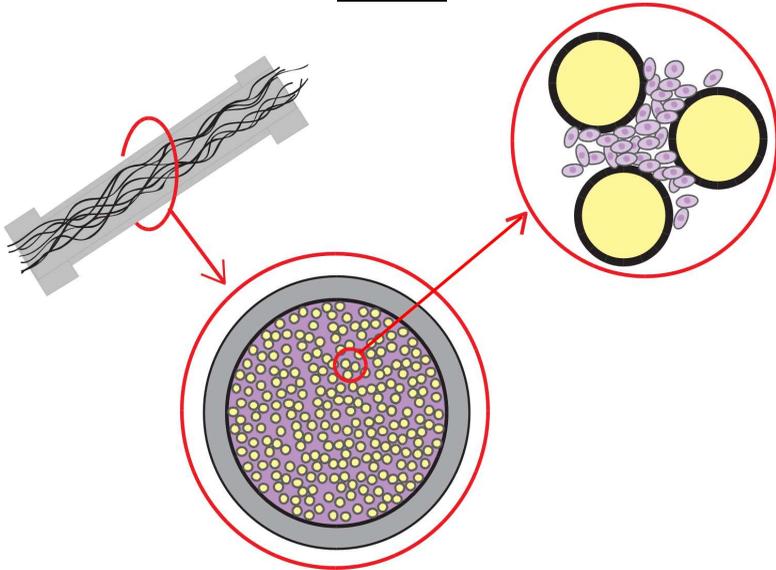


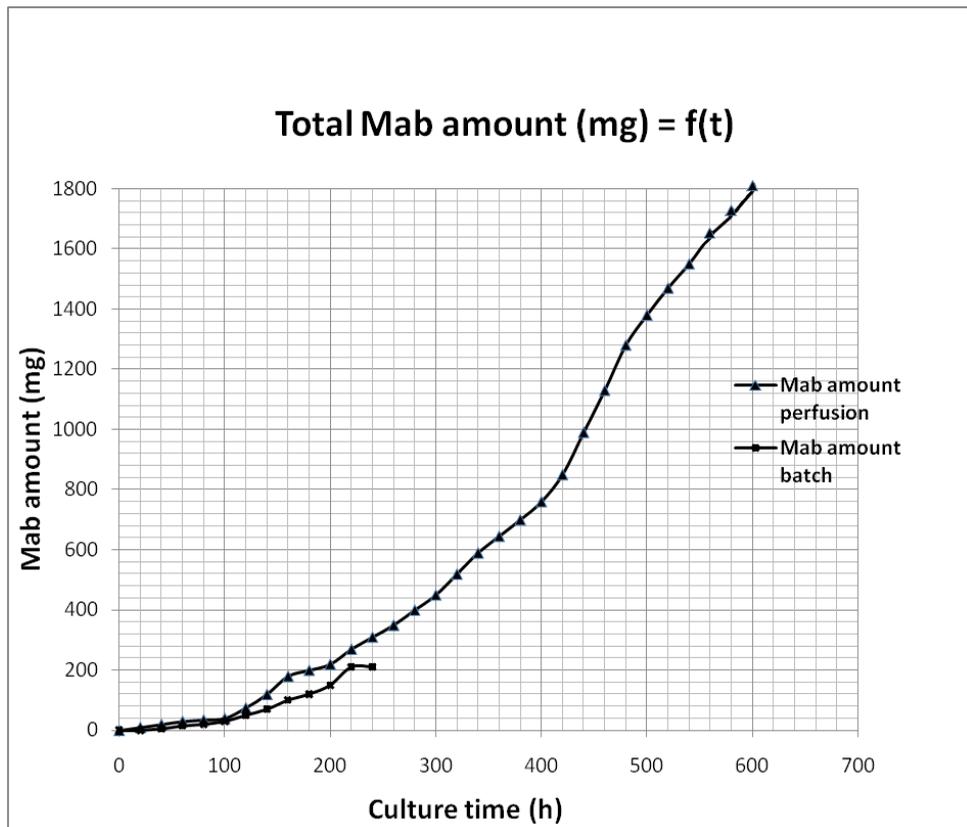
Document 4 :
bioréacteur à fibres creuses

Document 4a : photographie d'une coupe des fibres creuses du bioréacteur correspondant au plus fort grossissement



Document 4b : schéma du bioréacteur à fibres creuses avec deux grossissements différents



Document 5 :*Production d'anticorps monoclonaux en bioréacteur*

2013 – ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

Ces quelques corrigés sont proposés pour vous aider dans la résolution des épreuves proposées au BTS.

Ils ne seront d'aucune utilité si vous vous contentez de lire les solutions sans avoir fait l'effort personnel de la réflexion et de la recherche des réponses aux questions proposées.

Ces corrigés sont parfois succincts, en particulier sur des parties de cours, parfois certaines remarques et compléments de cours sont ajoutés pour faciliter la compréhension et peuvent aller au delà de ce qui est exigible à l'examen.

Ce ne sont pas des modèles imposés, d'autres solutions, d'autres démarches sont possibles. *Des imprécisions, des erreurs ont pu se glisser dans les textes, veuillez nous en excuser.*

Pour certaines questions des liens Internet peuvent être proposés en complément.

U11 : mathématiques

1. EXERCICE 1

A- 1) Les solutions de (E₀) sont de la forme : $y_0(t) = Ce^{-0,03t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$.

$$\begin{aligned}
 2) \quad \forall t \in [0; +\infty[\quad g(t) = a, \quad \text{donc} \quad g'(t) = 0. \quad g \text{ est solution de (E)} &\Leftrightarrow g'(t) + 0,03g(t) = 0,75 \\
 &\Leftrightarrow 0,03a = 0,75 \\
 &\Leftrightarrow a = \frac{0,75}{0,03} = 25
 \end{aligned}$$

D'où, $\forall t \in [0; +\infty[\quad g(t) = 25$.

3) Les solutions de (E) sont de la forme : $y(t) = y_0(t) + g(t) = Ce^{-0,03t} + 25 \quad \forall t \in [0; +\infty[$.

4) f est solution de l'équation (E), donc $f(t) = Ce^{-0,03t} + 25 \quad \forall t \in [0; +\infty[$.

$$f(0) = 1,3 \Leftrightarrow C + 25 = 1,3 \Leftrightarrow C = -23,7$$

D'où, $f(t) = 25 - 23,7e^{-0,03t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$.

$$\mathbf{B- 1) } \left. \begin{array}{l} \lim_{t \rightarrow +\infty} -0,03t = -\infty \\ \lim_{T \rightarrow -\infty} e^T = 0 \end{array} \right\} \text{ donc } \lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-0,03t} = 0$$

D'où : $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 25$.

2) a-

$$f'(t) = -23,7(-0,03e^{-0,03t}) = 0,711e^{-0,03t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$$

b- $\forall t \in [0; +\infty[\quad e^{-0,03t} > 0$, donc : $f'(t) > 0 \quad \forall t \in [0; +\infty[$.

3)

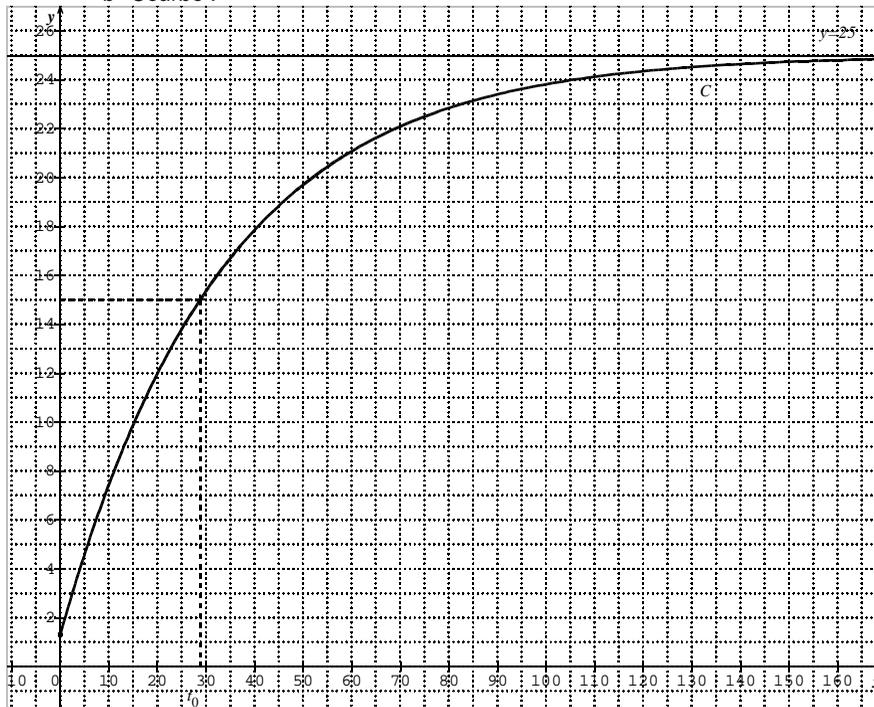
t	0	$+\infty$
$f'(t)$	+	
$f(t)$	1,3	25



4) a-

t	0	10	20	30	40	50	60
f(t)	1,3	7,4	12	15,4	17,9	19,7	21,1

b- Courbe :



C- 1) On a vu que : $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 25$, donc la concentration en matières polluantes, devrait se stabiliser autour de 25 µg/L.

2) Pour résoudre graphiquement l'équation $f(t) = 15$, on cherche l'abscisse du point de la courbe C d'ordonnée 15. On lit : $t_0 ; 29$. La concentration en matières polluantes atteindrait 15µg/L au bout d'environ 29 minutes.

3) a-
$$F(t) = 25t + \frac{23,7}{0,03} e^{-0,03t} = 25t + 790e^{-0,03t} \quad \forall t \in [0, +\infty[.$$

$$b- \quad V(t) = \frac{1}{2} (25t + 790e^{-0,03t} - 25(t-2) - 790e^{-0,03(t-2)})$$

$$V(t) = \frac{1}{2} (25t + 790e^{-0,03t} - 25t + 50 - 790e^{-0,03t+0,06})$$

$$V(t) = \frac{1}{2} (+790e^{-0,03t} + 50 - 790e^{-0,03t} e^{0,06})$$

$$V(t) = 25 + \frac{790 - 790e^{0,06}}{2} e^{-0,03t}$$

$$V(t); 25 - 24,4e^{-0,03t}$$

$$c- \quad 25 - 24,4e^{-0,03t} = 14 \Leftrightarrow -24,4e^{-0,03t} = -11 \Leftrightarrow e^{-0,03t} = \frac{11}{24,4}$$

$$\Leftrightarrow -0,03t = \ln\left(\frac{11}{24,4}\right) \Leftrightarrow t = -\frac{\ln\left(\frac{11}{24,4}\right)}{0,03}$$

Donc : $T ; 26,6$.

d- T représente le temps au bout duquel la fermeture des vannes est déclenchée.

2. EXERCICE 2

A- M suit la loi normale de moyenne $\mu = 250$ et d'écart-type $\sigma = 5,3$.

On pose $T = \frac{M - 250}{5,3}$, T suit la loi centrée réduite.

$$1) P(240 \leq M \leq 260) = P(-1,89 \leq T \leq 1,89) = 2P(T \leq 1,89) - 1; 2 \times 0,9706 - 1; 0,941.$$

$$2) \quad a- P(M \geq 245) = P(T \geq -0,94) = P(T \leq 0,94); 0,825.$$

b- La probabilité que la masse d'un sachet soit supérieure à 245g est égale à environ 0,825, valeur supérieure à trois quart, donc le client sera satisfait.

Valeurs obtenues en utilisant directement la calculatrice :

$$P(240 \leq M \leq 260); 0,941 \text{ et } P(M \geq 245); 0,827$$

B-

1) On répète 50 fois de manière indépendante (constitution du lot assimilée à un tirage avec remise) une épreuve de Bernoulli dont le succès est l'événement « le sachet n'est pas conforme », et sa probabilité $p = 0,06$. La variable aléatoire X égale au nombre de sachets non conformes dans un lot de 50 sachets, suit donc la loi binomiale de paramètres $n = 50$ et $p = 0,06$.

2) $P(X=1)$ est la probabilité d'avoir un sachet non conforme dans un lot.

$$P(X=1) = \binom{50}{1} \times 0,06^1 \times 0,94^{49} ; 0,145$$

3) a- $\lambda = n \times p = 50 \times 0,06 = 3$.

b- Y suit la loi de Poisson de paramètre $\lambda = 3$.

$$P(Y \leq 5) = P(Y=0) + P(Y=1) + P(Y=2) + P(Y=3) + P(Y=4) + P(Y=5) ; 0,916$$

C- 1) \bar{M} suit la loi normale de moyenne $m = 250$ (sous l'hypothèse nulle H_0) et d'écart-type $\sigma = \frac{5,3}{\sqrt{50}}$.

On pose $\bar{T} = \frac{\bar{M} - 250}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}}$, \bar{T} suit la loi centrée réduite.

$$P(250 - a \leq \bar{M} \leq 250 + a) = 0,95 \Leftrightarrow P\left(-\frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}} \leq \bar{T} \leq \frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}}\right) = 0,95$$

$$\Leftrightarrow 2P\left(\bar{T} \leq \frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}}\right) - 1 = 0,95 \Leftrightarrow P\left(\bar{T} \leq \frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}}\right) = 0,975$$

D'après la table : $\frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}} = 1,96$, donc $a = 2,61$.

2) D'après la question précédente, on sait que la probabilité d'avoir une masse moyenne comprise dans l'intervalle $I = [247,39 ; 252,61]$ est égale à 0,95.

On donne alors la règle de décision suivante :

Si $m \in I$, alors on accepte l'hypothèse H_0 , au risque de 5%.

Si $m \notin I$, alors on rejette l'hypothèse H_0 , au risque de 5%.

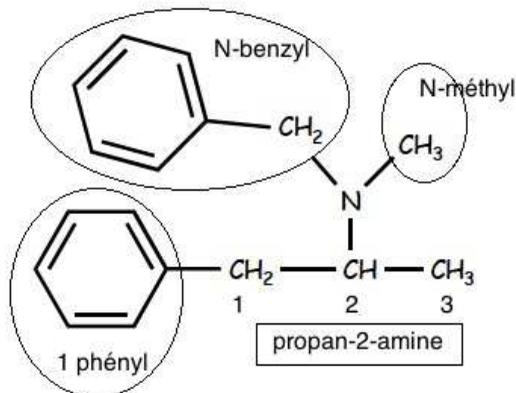
3) a- $m = \frac{238 \times 5 + 242 \times 6 + 246 \times 9 + 250 \times 13 + 254 \times 8 + 258 \times 7 + 262 \times 2}{50} ; 249,36$

b- $m \in I$, alors on accepte l'hypothèse H_0 , au risque de 5%. Le responsable qualité peut estimer, au seuil de 5%, que la machine est correctement réglée.

U12 : sciences physiques et chimiques

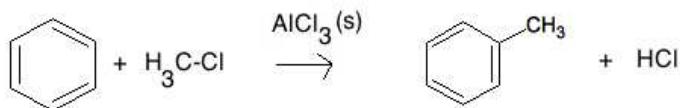
I .Synthèse de l'Inapétyl ® (18points)

Compréhension du nom commercial de la (2S)-N-benzyl-N-méthyl-1-phénylpropan-2-amine :



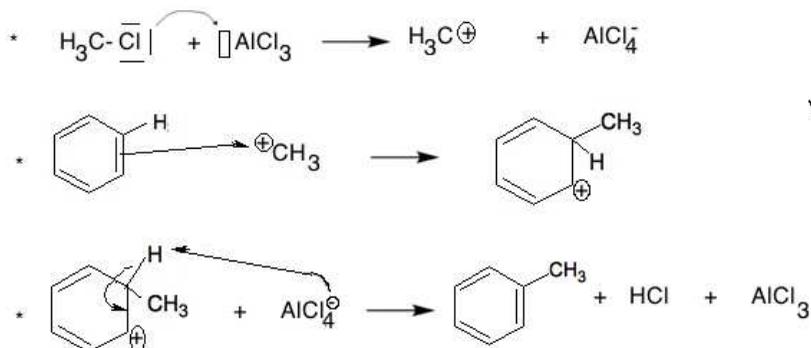
I.1 Etape 1

I.1.1



composé A

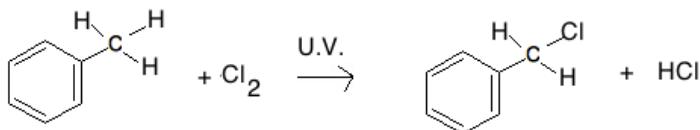
I.1.2 Mécanisme de réaction



AlCl_3 est un acide de Lewis, catalyseur de la réaction de méthylation.

I.2 Etape 2

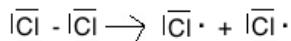
I.2.1



composé A

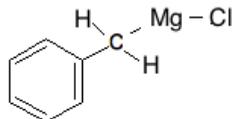
composé B

I.2.2 Il s'agit d'une substitution (Cl remplace H) radicalaire.



I.3 Etape 3

I.3.1 Composé C

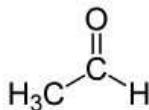


I.3.2 Précautions à prendre pendant cette synthèse :

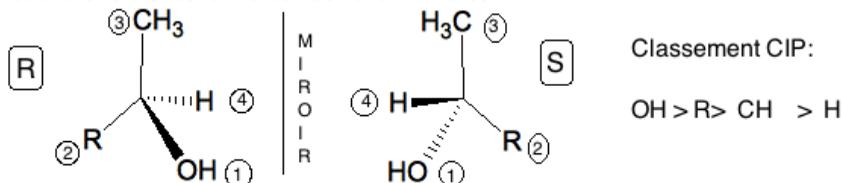
- Absence totale d'eau : verrerie sèche, solvants et réactifs, atmosphère de montage inerte
- Refroidissement du montage par réfrigérant car la réaction est exothermique.

I.4 Etape 4

I.4.1 Il y a réduction de l'aldehyde en alcool secondaire, donc l'aldehyde est l'éthanal.



I.4.2 Alcool D existe sous forme de deux énantiomères



I.5 Etape 5

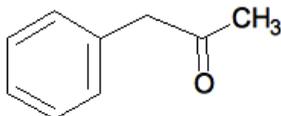
I.5.1 Le test à la 2,4-dinitrophénylhydrazine montre qu'il existe un groupement carbonyle

(aldéhyde ou cétone)

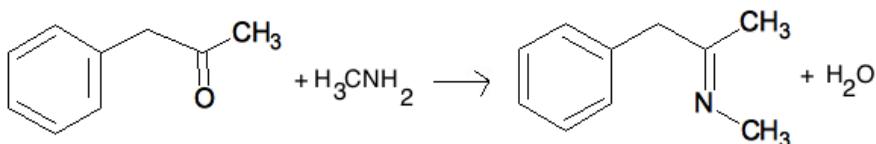
Le résultat négatif du test à la liqueur de Fehling montre qu'il ne s'agit pas d'un aldéhyde.

Le composé **E** est donc une cétone.

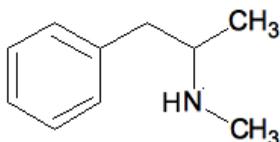
I.5.2 Composé **E**.



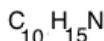
I.6 Etape 6



I.7 Etape 7 : composé **G**.



Le composé **G** est une amine secondaire.



I.8 Etape 8

I.8.1 Il s'agit d'une substitution nucléophile.

Substitution : le H de l'amine secondaire est remplacé par le R de R-Cl/

Nucléophile : du à l'attaque de l'amine

I.8.2 Lorsque la vitesse d'une substitution nucléophile ne dépend pas de la concentration du nucléophile, il s'agit d'une réaction d'ordre 1 (SN1).

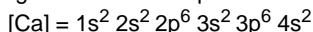
Première étape :



II .Dosage des ions $Ca_{2+}(aq)$ dans une eau d'Evian (18points)

II.1 Le numéro atomique du calcium vaut $Z=20$

II.1.1 Configuration électronique de l'atome de calcium , Z=20



II.1.2 $[\text{Ca}] = [\text{Ar}] 4s^2$, l'argon est très stable car ses couches électroniques sont saturées. La perte des 2 électrons périphériques (4s2) donc de plus faible énergie par l'atome de calcium conduit à une forme très stable Ca^{2+} .

II.2 Sur l'étiquette d'une eau d'Evian, on trouve l'information suivante :

II.2.1 Choix du pH de travail

II.2.1.1 Réaction de précipitation : $\text{Ca}^{2+} + 2\text{OH}^- = \text{Ca}(\text{OH})_2 (\text{s})$

$$K_{S1} = [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{OH}^-]^2 \text{ donc } [\text{OH}^-] = \sqrt{\frac{K_{S1}}{[\text{Ca}^{2+}]}} = \sqrt{\frac{10^{-5,2}}{2 \times 10^{-3}}} = 5,62 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$\text{or } K_e = [\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{OH}^-] \text{ donc } [\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{K_e}{[\text{OH}^-]} = \frac{10^{-14}}{[\text{OH}^-]} \text{ et } \text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+]$$

$$\text{D'où } \boxed{\text{pH}_1 = -\log\left(\frac{10^{-14}}{5,62 \times 10^{-2}}\right) = 12,7}$$

II.2.1.2 Réaction de précipitation : $\text{Mg}^{2+} + 2\text{OH}^- = \text{Mg}(\text{OH})_2 (\text{s})$

$$K_{S2} = [\text{Mg}^{2+}] \cdot [\text{OH}^-]^2 \text{ donc } [\text{OH}^-] = \sqrt{\frac{10^{-8,7}}{10^{-3}}} = 1,41 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$\text{or } K_e = [\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{OH}^-] \text{ donc } [\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{K_e}{[\text{OH}^-]} = \frac{10^{-14}}{[\text{OH}^-]} \text{ et } \text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+]$$

$$\text{D'où } \boxed{\text{pH}_2 = -\log\left(\frac{10^{-14}}{1,41 \times 10^{-3}}\right) = 11,1}$$

II.2.1.3 $\text{pH} = 12,5$. On utilise les mêmes relations que pour la question précédente

$$[\text{Mg}^{2+}] = \frac{K_{S2}}{[\text{OH}^-]^2} \text{ et } [\text{OH}^-] = \frac{K_e}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = \frac{K_e}{10^{-\text{pH}}},$$

$$\text{donc } [\text{Mg}^{2+}] = \frac{10^{-8,7}}{\left(\frac{10^{-14}}{10^{-12,5}}\right)^2} = 10^{(28-8,7-25)} = 10^{-5,7} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

II.2.1.4 A $\text{pH}=12,5$, presque tout le magnésium présent est précipité (une fraction très minoritaire reste libre). De plus $12,5 < 12,7$ (K_{S1}), les ions Ca^{2+} restent solubles. A ce pH on peut doser sélectivement le Ca^{2+} après filtration pour éliminer le précipité de $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

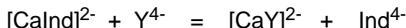
II.2.2 Dosage des ions $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ par l'EDTA

II.2.2.1 $\text{Ca}^{2+} + \text{Y}^{4-} = [\text{CaY}^{2-}](\text{aq})$

$$\text{Constante de formation } \beta = \frac{[CaY^{2-}]}{[Ca^{2+}] \cdot [Y^{4-}]}$$

II.2.2.2 Espèces colorées

- avant l'équivalence, reste en solution des cations Ca^{2+} libres qui se lient à l'indicateur (Ind) pour former un complexe $[CaInd]^{2+}$ (aq) coloré en rose
- A l'équivalence, tout le Ca^{2+} libre a été consommé et l'EDTA déplace le Ca^{2+} complexé à l'indicateur par la réaction suivante :



La réaction impliquant l'EDTA est prépondérante sur la réaction impliquant l'indicateur.

L'indicateur se trouve alors sous la forme Ind^{4-} coloré en bleu.

II.2.2.3 A l'équivalence :

le nombre de mole d'EDTA introduit est égal au nombre de mole initial de Ca^{2+} (de la prise d'essai)

$n_{Ca^{2+} \text{ au départ}} = n_{Y^{4-} \text{ ajouté}}$ donc $n_{Ca^{2+}} = C_0 \cdot V_{eq}$ ou C_0 est la concentration en EDTA et V_{eq} , le volume versé à l'équivalence

$$n_{Ca^{2+}} = 0,025 \cdot 3,90 \cdot 10^{-3} = 9,75 \cdot 10^{-5} \text{ moles}$$

4. Concentration molaire en calcium

$$[Ca^{2+}] = \frac{n_{Ca^{2+}}}{V} = \frac{9,75 \times 10^{-5}}{50 \times 10^{-3}} = 1,95 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1}$$

Concentration massique en calcium

$$C_{Ca^{2+}} = [Ca^{2+}] \cdot M_{Ca^{2+}} = 1,95 \cdot 10^{-3} \times 40,1 = 0,078 \text{ g} \cdot L^{-1}$$

Le résultat est conforme avec l'indication de l'étiquette : 78 mg.L⁻¹.

III .Spectroscopie UV-visible (14 points)

O veut déterminer par spectroscopie UV-visible la concentration d'une solution aqueuse de permanganate de potassium (K^+ (aq) + MnO_4^- (aq))

III.1 Un spectrophotomètre est composé d'une source lumineuse, d'un monochromateur, d'un support pour placer l'échantillon, d'un détecteur.

III.2 Un laboratoire possède un spectrophotomètre de haute qualité, dont le monochromateur peut être utilisé dans l'ultraviolet, le visible et l'infrarouge. Il comprend un jeu de plusieurs réseaux en fonction de la longueur d'onde de travail. Pour ce dosage, on choisit un réseau gravé ayant 500 traits par mm. Le réseau est éclairé sous incidence normale par des radiations de longueur d'onde comprises entre $\lambda_1 = 400\text{nm}$ et $\lambda_2 = 800\text{nm}$.

III.2.1 Le pas (a) du réseau est la distance entre 2 traits successifs.

$$\text{Or il y a } 500 \text{ traits par mm, donc } a = \frac{1000 \mu\text{m}}{500 \text{ traits}} = 2 \mu\text{m}$$

III.2.2 La formule fondamentale des réseaux plans est $\sin \theta = \sin i + k \cdot (\lambda / a)$.

θ	i	k	λ	a
Angle de diffraction en O	angle d'incidence en O	Ordre de diffraction (sans unité)	longueur d'onde (m)	pas du réseau (m)

III.2.3 Incidence normale donc $i=0$, donc $\sin i = 0$, et spectre d'ordre 1, donc $k=1$

$$\sin \theta_1 = \sin i + k \cdot (\lambda_1 / a) \text{ d'où } \sin \theta_1 = 0 + 1 \times \frac{0,4 \mu\text{m}}{2 \mu\text{m}} = 0,2 \quad , \text{ donc } \theta_1 = 11,5^\circ$$

$$\sin \theta_2 = \sin i + k \cdot (\lambda_2 / a) \text{ d'où } \sin \theta_2 = 0 + 1 \times \frac{0,8 \mu\text{m}}{2 \mu\text{m}} = 0,4 \quad , \text{ donc } \theta_2 = 23,6^\circ$$

Écart angulaire entre les deux radiations : $\theta_2 - \theta_1 = 12,1^\circ$

III.3 En annexe 2 sont donnés :

Le permanganate de potassium absorbe dans la zone de longueurs d'onde comprises entre 510 et 565 nm. Cet intervalle de longueur d'onde correspond aux radiations vertes (1^{er} tableau). D'après le 2^{ème} tableau, une solution aqueuse qui absorbe préférentiellement les radiations vertes sera perçue de couleur magenta par l'œil.

III.4 A la longueur d'onde de travail ($\lambda = 525 \text{ nm}$), le coefficient d'extinction molaire vaut $\epsilon = 2160 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La longueur l de la cuve est égale à 1,00 cm. La solution aqueuse inconnue de permanganate de potassium a une absorbance $A = 0,540$.

III.4.1 La relation liant l'absorbance à la transmittance T est $A = -\log T$

$$T = 10^{-A} = 10^{-0,540} = 0,288 \quad \text{soit } T = 28,8\%$$

III.4.2 Loi de Beer-Lambert

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot C$$

A_λ : absorbance à la longueur d'onde de travail (pas d'unité)

l : chemin optique (cm), distance parcourue par le rayon lumineux au contact de la solution dosée.

C : concentration molaire de la molécule dosée dans la cuve de mesure ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

ϵ : Coefficient d'extinction molaire caractéristique de la molécule dosée et fonction de la longueur d'onde ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

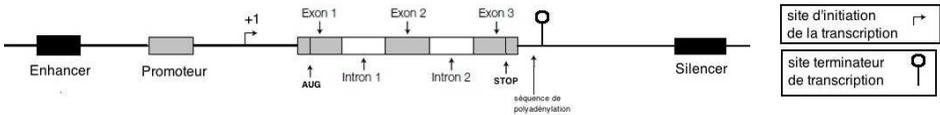
$$\text{III.4.3 } C = \frac{0,540}{2160 \times 1,00} = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

1. Le gène Cfr et son expression

1.1. Organisation des gènes eucaryotes

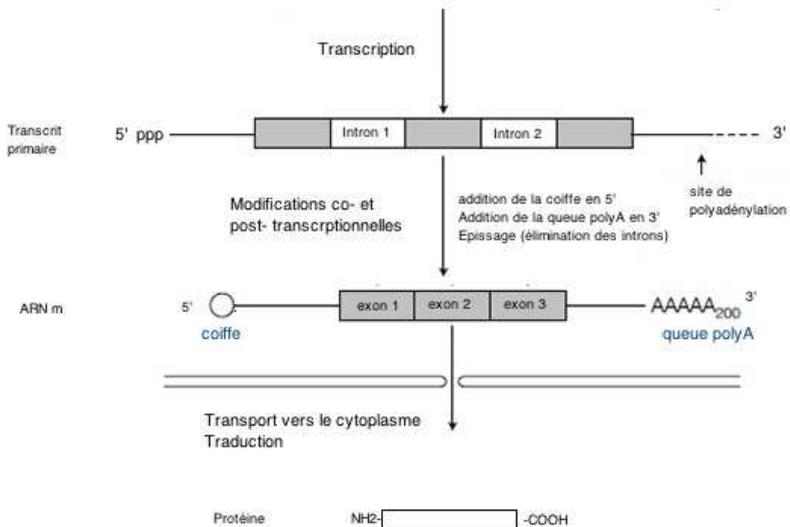
1.1.1.



Un gène eucaryote est composé :

- de séquences permettant d'initier et réguler la transcription : le promoteur (TATA box et CAAT box) et de boîtes régulatrices (enhancer ou silencer)
- de l'unité de transcription, séquence copiée en ARN entre le +1 de la transcription et le site terminateur de transcription. L'unité de transcription est organisée en introns et exons.

1.1.2. Expression génétique eucaryote



1.2. Mutations pathologiques du gène Cfr humain

1.2.1. Mutation ΔF508

	Séquence de départ	Délétion F508
Séquence nucléique	AUC UUU GGU GUU AUA AAA 507 508 509 510 511 512	AUU GGU GUU AUA AAA 507 508 509 510 511
Séquence protéique	Ile – Phe – Gly – Val – Ile – Lys 507 508 509 510 511 512	Ile – Gly – Val – Ile – Lys 507 508 509 510 511

Isoleucine (Ile)-Glycine (Gly)- Valine (Val)- Isoleucine (Ile)- Lysine (Lys), Phénylalanine (Phe)
La délétion élimine l'acide aminé phénylalanine (F en code à une lettre) en position 508 sans modifier les autres acides aminés, justifiant son appellation Δ F508.

1.2.2. Mutation I511X

La 2^{ème} mutation (I511X) est une délétion ponctuelle, l'élimination d'un nucléotide qui conduit à un décalage du cadre de lecture.

Apparition d'un codon STOP en phase (UAA en position 511), provoquant l'arrêt de la traduction et donc l'apparition d'une protéine tronquée de 510 acides aminés. Il s'agit d'une mutation non-sens.

2. Obtention de souris transgéniques invalidées pour l'exon 10 du gène cftr

2.1. Construction des allèles Cftr fl10 neo et Cftr Δ 10

2.1.1. Obtention de l'allèle Cftr fl10 neo.

- Obtention d'un vecteur de ciblage de l'exon 10 en clonant différents fragments d'ADN:

- o L'exon 10 cloné en tandem avec un gène marqueur de sélection (Neo^R) puis ajout de part et d'autre des séquences lox (►) formant une cassette Lox/E10/NeoR/Lox.

- o Autour de cette cassette sont clonées les séquences flanquantes de l'exon 10, ces séquences sont suffisamment longues pour permettre la recombinaison homologue.

- Le vecteur de ciblage est transfecté dans les cellules ES, et les cellules transfectées et ayant subi la recombinaison homologue sont sélectionnées (deviennent résistantes à la néomycine et au gancyclovir ; les cellules transfectées n'ayant pas subi la recombinaison homologue sont sensibles au gancyclovir).

- Les cellules sélectionnées portent donc l'allèle floxé Cftr fl10neo.

2.1.2. L'induction de l'expression de la recombinase Cre dans les cellules portant l'allèle cftr fl10 néo conduit à un événement de recombinaison à sites spécifiques (sites lox) qui conduit à l'élimination des séquences entre les 2 boîtes lox, donc l'exon 10 (E10) et néo^R. On obtient donc des mutants Δ E10.

2.2. Obtention des souris transgéniques

2.2.1. L'électroporation est une méthode physique d'introduction d'un fragment d'ADN dans une cellule. Une suspension cellulaire dense est mise en contact avec de l'ADN et placée entre les 2 plaques d'un condensateur (cuve d'électroporation), qui sont chargées par l'appareil. La décharge rapide du condensateur crée des électro-pores transitoires par lesquels l'ADN accède au cytoplasme des cellules.

2.2.2. Le plasmide de ciblage contient 2 marqueurs de sélection pour distinguer les cellules transfectées par le plasmide ayant subi ou non les événements de recombinaison homologue pour floxer l'exon 10 (Cftr fl10neo).

cellules	Non transfectées	Transfectées et non recombinées	Transfectées et recombinées
Marqueur Néo ^R	Absent	Présent	Présent
Marqueur Gan ^S	Absent	Présent	Absent

La néomycine (G418) est une drogue qui tue les cellules sensibles, donc ici non transfectées. Le gancyclovir est une drogue qui devient toxique après modification par le produit du gène Gan^S et donc tue les cellules ayant gardé ce marqueur et donc n'ayant pas subi la recombinaison homologe souhaitée.

La double sélection permet de choisir exclusivement les cellules ayant subi la recombinaison homologe.

2.3. Criblage des souris homozygotes *Cftr* fl10neo/fl10neo

2.3.1. Cette vérification permet de connaître le nombre de séquences identiques à la séquence cible(ici la séquence de la sonde), si une seule séquence identique est trouvée, on s'assure de la spécificité de la sonde choisie.

2.3.2. 1- feuilles de papier absorbant 2 - Feuilles de papier Whatman
3 - Membrane de nylon 4 - gel d'agarose après électrophorèse
5 - tampon de transfert SSC 10X

2.3.3. La solution D (0,2M NaOH; 0,6 M NaCl) permet de dénaturer l'ADN dans le gel pour qu'il soit simple brin et permettre l'hybridation ultérieure avec la sonde.

2.3.4. Après l'étape d'hybridation, la membrane est lavée en condition de stringence croissante en jouant sur 2 critères, en baissant la force ionique et en augmentant la température. Ces lavages permettent d'éliminer la sonde non fixée et la sonde partiellement hybridée sur des séquences non complètement complémentaires. Ces lavages augmentent la spécificité de la révélation.

2.3.5. Souris C: 1 seule bande 12,8 kpb → 2 allèles identiques correspondant à la forme recombinée de *Cftr* . Donc souris homozygote à génotype *Cftr*+/*Cftr*+ .

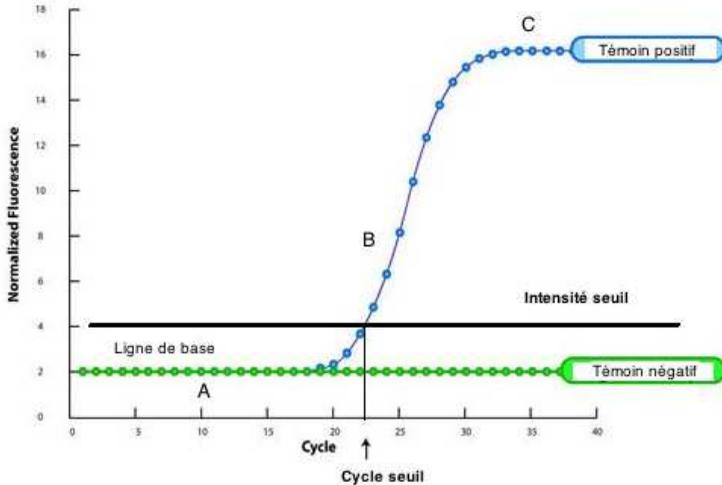
Souris B : seule bande 6,5 kpb → 2 allèles identiques correspondant à la forme sauvage de *Cftr* . Donc souris homozygote à génotype *Cftr* fl 10neo+/*Cftr* fl 10neo+ .

Souris A : 2 bandes 7,5 et 12,8 kpb → 2 allèles différents, un allèle sauvage et un allèle muté. Donc souris hétérozygote à génotype *Cftr*+/*Cftr* fl 10neo+.

3. Etude du taux d'expression du gène de la *recombinase Cre* par RT-qPCR (6 points)

3.1. Dosage des ARNm de la recombinase *Cre*

- 3.1.1. **Activité Transcriptase Inverse** : ADN polymérase ARN dépendante. Elle allonge une amorce fournissant un 3'OH, et hybridée sur une matrice ARN pour synthétiser un ADN dit complémentaire (ADNc). L'ADNc simple brin ainsi obtenu est utilisable comme matrice pour une réaction d'amplification par PCR.
- 3.1.2. **Ligne de base** : intensité de fluorescence correspondant au bruit de fond mesurée pour une amplification sans matrice.



Pour une amplification avec matrice, on observe 3 phases :

- une phase confondue avec la ligne de base (A), la quantité de fragments amplifiés n'est pas détectable.
- une phase exponentielle (B), pour laquelle l'intensité de fluorescence mesurée double à chaque cycle.
- une phase de plateau (C), où l'intensité de fluorescence reste constante, correspondant à l'épuisement des réactifs et donc plus d'amplification possible.

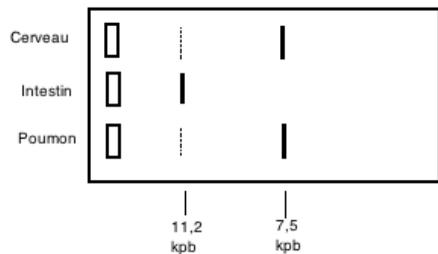
- 3.1.3. **Le cycle seuil** est la valeur du cycle correspondant à l'intensité seuil placée sur le graphe d'amplification. L'intensité seuil correspond une intensité arbitraire de fluorescence marquant le début de la phase exponentielle, elle représente une valeur significative de fluorescence (comparée à celle de la ligne de base) .
- 3.1.4. Plus la quantité de matrice initiale est grande plus le Ct est petit.

3.1.5. hsp90 : hsp90 est un gène de ménage choisi car son niveau d'expression est identique dans tous les types cellulaires. Les résultats montrent que le Ct obtenu pour hsp90 est très proche pour les trois tissus testés. Le témoin est donc validé, hsp90 peut donc être utilisé comme étalon interne pour cette quantification. **cre** : On observe que l'amplification est détectable beaucoup plus rapidement dans l'intestin (à partir du cycle 20 environ) que dans le cerveau et le poumon (à partir du cycle 35 environ). Le gène cre est donc plus transcrit dans l'intestin que dans les autres organes testés. Il présente donc une expression tissu-spécifique.

3.2. Etude des souris *Cftr* $\Delta 10/\Delta 10$

Dans l'intestin, la recombinaise Cre est produite en quantité, l'exon 10 floxé est excisé par la recombinaise, on observe donc une seule bande à 11,2 kpb et pas de bande à 7,5 kpb.

Dans le cerveau et le poumon, la recombinaise est très peu exprimée, il n'y a donc pas de recombinaison au niveau de l'exon 10 floxé, donc une seule bande à 7,5 kpb. (On peut cependant voir une bande de faible intensité à 11,2 kpb correspondant aux rares événements de recombinaison par la recombinaise Cre présente en très faible quantité).



U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

1.1 Le sulfate d'ammonium permet la précipitation "sélective" des protéines : en élevant la concentration en sels, certaines protéines précipitent (phénomène de relargage), tandis que d'autres restent solubles.

A 30 % de saturation en sulfate d'ammonium, la lectine A précipite, ce qui permet de la séparer physiquement des protéines restant solubles dans cette condition.

1.2 Lors d'une dialyse, deux solutions sont séparées par une membrane semi-perméable (pores de diamètre de l'ordre du nanomètre, identiques et connus). Ainsi, les petites molécules (solvant et solutés de taille inférieure à la taille des pores) peuvent diffuser à travers la membrane contrairement aux macromolécules.

Schéma appliqué lectine/ sels

La lyophilisation consiste à éliminer l'eau d'un échantillon (dessiccation). L'échantillon est congelé puis la glace est sublimée sous vide (passage direct de l'état solide à l'état gazeux).

1.3 La chromatographie mise en jeu est une chromatographie d'affinité. La partie réactive de la matrice est le mannose immobilisé, sur lequel la lectine A peut se fixer de manière réversible. (La lectine A ayant une affinité pour le mannose se lie réversiblement sur la matrice.)

1.4 Étape 1 : dépôt de l'extrait brut

Étape 2 = étape de lavage : élimination des protéines non retenues

Étape 3 = étape d'élution : décrochage de la lectine A fixée grâce au DAP (augmentation du pH ce qui perturbe les interactions de faible énergie, type ioniques)

Les fractions obtenues sont analysées au fur et à mesure de l'avancement de la chromatographie (dosage des protéines, activité lectine)

1.5 Les fractions contenant la lectine A sont celles présentant une activité d'hémagglutination (et une absorbance à 280 nm élevée). et l'activité d'hémagglutination). Ceci correspond à des volumes d'élution compris environ entre 1405 ml et 1430 ml.

1.6 La chromatographie d'affinité a permis de purifier la lectine d'intérêt puisque le pic d'élution correspond au pic d'activité.

Cette purification a un rendement de :

$$R = \frac{\text{masse lectine récupérée}}{\text{masse lectine déposée}} = \frac{10}{100 \times 20\%} = 0,5 = 50\%$$

2.1. La chromatographie d'exclusion- diffusion est une technique de séparation des molécules selon leur taille (donc selon leur masse molaire si l'on admet avoir affaire à des molécules globulaires).

Elle utilise une résine constituée de grains poreux dont la porosité est strictement définie.

La phase liquide externe aux grains détermine le volume mort V_0 .

La phase liquide interne aux grains a un volume V_i .

3 comportements sont possibles :

α les molécules trop grosses ne peuvent accéder à l'intérieur des grains. Leur volume d'élution correspond au volume mort. Elles sont éluées les premières.

α Les molécules très petites ont accès à tout le volume interne des grains. Leur volume

d'éluéon est donc $V_0 + V_i$. Elles sont éluées les dernières.

▫ Les molécules de taille intermédiaire n'accèdent qu'à une partie du volume interne. Leur volume d'éluéon est $V_E = V_0 + K.V_i$ (avec K le coefficient de distribution dans les grains, $0 < K < 1$). Ce volume d'éluéon est d'autant plus grand que la masse molaire est faible.

2.2. La lectine A a un volume d'éluéon de 20 mL.

On utilise la droite d'étalonnage du gel ($\log(\text{Masse Molaire}) = f(V_E)$) pour en déduire la masse molaire.

Noter qu'on a ici la droite Masse Molaire = $f(V_E)$ mais avec une échelle semi-logarithmique en ordonnée, ce qui génère une imprécision sur la lecture de la masse molaire correspondant à un volume d'éluéon de 20 mL.

On lit en ordonnée une valeur environ égale à 45 kDa.

2.3. Lors de la SDS-PAGE, on observe une bande unique se situant aux alentours de 11 kDa que l'on soit en conditions réductrices (présence de β mercaptoéthanol) ou non. On rappelle que :

- la SDS-PAGE est une électrophorèse en conditions dénaturantes

- le β mercaptoéthanol a ici pour rôle la rupture des éventuels ponts disulfure présents dans la protéine.

On conclut donc que la lectine A est constituée d'un seul type de sous-unités (de masse molaire 11 kDa) reliées entre elles par des liaisons faibles.

La masse molaire de la protéine native obtenue grâce à la chromatographie d'exclusion est de 45 kDa. On peut donc supposer que la lectine A est constituée de 4 sous-unités identiques (homotétramère).

3.1.1. Homotétramère : macromolécule composée de 4 sous-unités identiques (protomères)

3.1.2. *La structure tertiaire correspond au repliement global d'une chaîne polypeptidique dans l'espace. Elle correspond donc à un agencement particulier des éléments de structure secondaire. Lors de l'établissement de la structure tertiaire, des aminoacyles éloignés dans la structure primaire peuvent se retrouver à proximité.*

Elle est stabilisée par les différents types de liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, liaisons de Van der Waals, interactions hydrophobes), et par des liaisons covalentes (ponts disulfure)

3.1.3. On observe principalement des feuillets β antiparallèles.

3.1.1. La technique FRET est basée sur le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

Une molécule excitée par une longueur d'onde λ_1 émet une lumière fluorescente à une longueur d'onde λ_2 ($> \lambda_1$) qui peut être absorbée par une autre molécule pourvu qu'elle soit suffisamment proche. Cette deuxième molécule émet alors une fluorescence de longueur d'onde λ_3 ($> \lambda_2$).

Cette technique permet de visualiser le rapprochement ou l'éloignement de 2 molécules (en général des macromolécules marquées par un fluorophore). Si les molécules sont proches le transfert d'énergie a lieu, si elles sont éloignées, il n'a pas lieu.

3.1.2. Immobilisation d'une enzyme par :

▫ confinement : inclusion dans un gel, microencapsulation

▫ fixation sur un support (adsorption ou liaisons covalentes)

▫ (co)réticulation

3.1.3. Le biocapteur est constitué de billes de sépharose dans lesquelles sont immobilisées des molécules de concanavaline A marquées par le fluorophore Alexa 750. On met en présence du dextrane marqué par le fluorophore Alexa 647, qui s'associe à la concanavaline A puisqu'il s'agit d'un analogue du glucose.

On envoie une lumière par la fibre optique de longueur d'onde 647 nm, ce qui excite le fluorophore Alexa 647. Il émet alors une lumière fluorescente de longueur d'onde de 675 nm. Compte tenu de la proximité spatiale des molécules, cette dernière est absorbée par le fluorophore Alexa 750 qui réémet à la longueur d'onde de 780 nm. Ainsi, en absence de glucose, on enregistre une forte émission à 780 nm.

En présence de glucose, il y a compétition entre le glucose et le dextrane pour la fixation sur la concanavaline A. Plus il y a de glucose dans le milieu, moins il reste de dextrane fixé à la concanavaline. Dans ce cas la lumière émise à 675 nm par Alexa 647 n'est pas absorbée par Alexa 750.

On enregistre alors une forte émission à 675 nm.

3.1.4. L'injection d'insuline provoque une hypoglycémie tandis que l'injection de glucose provoque une augmentation de la glycémie. Il s'agit ici de s'assurer que les capteurs détectent ces variations.

La courbe de détermination ex-situ de la concentration en glucose permet d'obtenir des valeurs de référence.

Si l'on excepte la valeur mesurée au temps 100 min, on constate que l'allure des 3 courbes est identique. Les biocapteurs répondent donc aux variations de glycémie in vivo.

Toutefois, il existe une surévaluation de la concentration en glucose mesurée avec le capteur X. On peut aussi observer une surévaluation pour le capteur FAS pour les mesures réalisées dans l'heure qui suit l'implantation.

4.1.

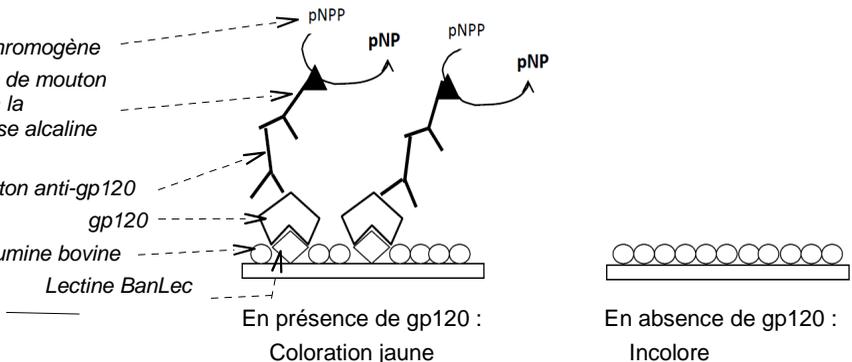
Substrat chromogène
Ac anti -Ac de mouton
conjugué à la
phosphatase alcaline

Ac de mouton anti-gp120

gp120

Sérum albumine bovine

Lectine BanLec



4.2.

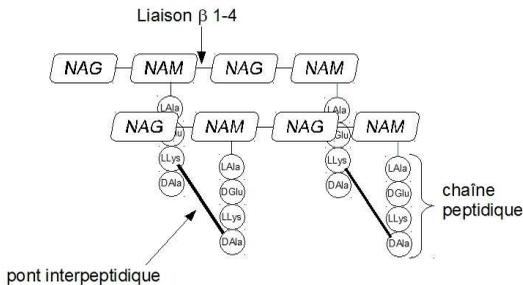
L'Ac anti mouton se fixe sur le fragment constant Fc de l'anticorps anti-gp 120 produit par un mouton. (Tous les anticorps IgG de mouton possèdent le même fragment Fc).

U41 : Microbiologie et génie fermentaire

1. Caractéristiques physiologiques et métaboliques

1.1. *L. lactis* : agent probiotique

1.1.1. Schéma du peptidoglycane.



Les noms complets doivent apparaître.

Il est judicieux de rappeler :

- qu'il y a plusieurs couches,
- que les ponts interpeptidiques peuvent être directs entre deux chaînes peptidiques ou indirects avec des pentaglycines par exemple.
- que les ponts interpeptidiques sont fixés sur les acides aminés 3 et 4 des tétrapeptides

légende :

NAG : N-acétyl-glucosamine

NAM : acide N-acétyl-muramique

1.1.2. Types trophiques

Lactococcus est genre classé dans les bactéries lactiques qui fermentent le lactose du lait. Donc leur source d'énergie est chimique et le donneur d'électron est organique (types trophiques : Chimio-organotrophe) . De plus leur source de carbone est aussi organique (type trophique : hétérotrophe).

1.1.3. Condition particulière.

Il est dit qu'une atmosphère contenant 5 à 10 % de CO₂ favorise la croissance.

1.2. *L. lactis* : bactérie homofermentaire

1.2.1. Fermentation homolactique : voie de fermentation du pyruvate conduisant uniquement à la production d'acide lactique.

Fermentation hétérolactique : voie de fermentation du pyruvate conduisant à la production d'acide lactique et d'autres métabolites (CO₂, éthanol...)

1.2.2. Légende du **document 2**

1. Glycolyse
2. Fermentation lactique
3. LDH (Lactate déshydrogénase)
4. Acide lactique CH₃-CHOH-COOH

1.2.3. Localisation et conditions de réalisation des voies 1 et 2

Les 2 voies ont lieu dans le cytoplasme. La glycolyse est indépendante de la présence de dioxygène et la fermentation lactique aussi (la bactérie est strictement fermentaire).

1.3. Culture sur milieu MRS

1.3.1. rôles des constituants soulignés :

Peptones : apport de nutriments organiques servant de source d'azote, de carbone, voire de nutriments énergétiques,

Extrait de levure : utilisé pour l'apport en facteurs de croissance (vitamines...)

Glucose : source principale de C et énergie

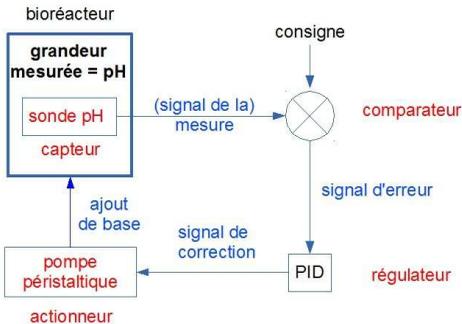
MRS : c'est un milieu empirique

1.3.2. Poly-auxotrophe signifie que la souche présente des exigences en plusieurs facteurs de croissance.

2. Optimisation des paramètres de croissance de *L. lactis* pour la production de nisine.

2.1. Procédé de fermentation en discontinu

2.1.1. Expliquer à l'aide d'un schéma de la boucle de pH mise en jeu pour cette culture.



- Le pH de la culture tend à diminuer.
- Le capteur (sonde pH) détermine la grandeur à mesurer (le pH) et envoie un signal de mesure au comparateur.
- Ce dernier compare la valeur mesurée au point de consigne et envoie un signal d'erreur au régulateur.
- Ce dernier envoie un signal de correction à l'actionneur (effecteur) qui dans le cas de cette culture est une pompe péristaltique permettant l'ajout de base.

2.1.2. Analyse du document 4A.

Biomasse : croissance de la culture pendant 8 h, puis stabilisation à environ $1,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de masse sèche.

Saccharose : chute de la concentration en saccharose durant toute la période de mesure. Mais on note 2 phases dans l'utilisation du saccharose : entre 3 et 7 h, chute rapide (fermentation et croissance), puis entre 7-8 et 24 h, chute moins rapide (fermentation sans croissance).

pH : chute du pH de 0 à 16 heures. La diminution est lente de 0 à 4 heures, très rapide de 4 heures à 8 heures (production de biomasse), puis de nouveau lente jusqu'à 16 heures. Il y a acidification par fermentation lactique à partir du saccharose.

2.1.3. hypothèse.

Il peut y avoir un arrêt de croissance à 8 h malgré le fait qu'il reste encore du saccharose, car les conditions de croissance deviennent défavorable : pH trop acide (< 5).

2.1.4. rendement de production global.

Le rendement de conversion global (ou final) est calculé à partir des valeurs des masses initiales et finales en nisine et en saccharose : **formule littéraire**.

$$R_{\frac{\text{nisine}}{\text{glucide}}} = \frac{(m_{\text{nisine finale}} - m_{\text{nisine initiale}}) (g)}{(m_{\text{saccharose initiale}} - m_{\text{saccharose finale}}) (g)}$$

C'est une culture discontinue (en batch), il n'y a pas de modification de volume. Comme $C_m = m$

. V et que le volume est constant du début à la fin de la manipulation, on peut remplacer les masses par les concentrations massiques.

$$R_{\frac{\text{nisine}}{\text{glucide}}} = \frac{(Cm_{\text{nisine finale}} - Cm_{\text{nisine initiale}})(g.L^{-1})}{(Cm_{\text{saccharose initiale}} - Cm_{\text{saccharose finale}})(g.L^{-1})}$$

On sait que 10^6 UI de nisine correspond à 1 g de nisine brute donc 10^6 UI·L⁻¹ de nisine correspond à 1 g·L⁻¹ de nisine.

Cm finale de nisine est d'environ 1200 UI·mL⁻¹ de nisine soit $1,2 \cdot 10^6$ UI·L⁻¹ ce qui fait $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de nisine.

Application numérique

$$R_{\frac{\text{nisine}}{\text{glucide}}} = \frac{(1,2 - 0)(g.L^{-1})}{(10 - 0)(g.L^{-1})}$$

$$R_{\frac{\text{nisine}}{\text{glucide}}} = 0,12 \text{ g nisine} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucide}$$

2.1.5. Productivité volumique horaire finale et maximale.

La productivité volumique horaire finale (PVHF) :

$$PVHF = \frac{(Cm_{\text{nisine finale}} - Cm_{\text{nisine initiale}}) (g.L^{-1})}{(t_{\text{finale}} - t_{\text{initiale}}) (heure)}$$

$$PVHF = \frac{(1,2 - 0)}{24} = 0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

La productivité volumique horaire maximale (PVHM)

$$PVHM = \frac{(Cm_{\text{nisine maximale}} - Cm_{\text{nisine initiale}}) (g.L^{-1})}{(t_{\text{maximale}} - t_{\text{initiale}}) (heure)}$$

La concentration maximale en nisine est atteinte à 8 h de culture et correspond à $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (même calcul que précédemment)

$$PVHM = \frac{(1,5 - 0)}{8} \simeq 0,19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

2.1.6. arrêt de la production.

En industrie, on arrêterait à 8 h car ensuite, on ne produit pas plus de nisine. Il y a une chute de la production volumique horaire qui passe de environ 0,2 à $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ entre 8 et 24 h de culture.

2.1.7. Stabilité selon le pH

En présence d'une régulation du pH, la concentration en nisine chute brutalement vers 12 h pour atteindre environ $500 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ au lieu de $1200 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ en 24 heures sans régulation. La stabilité de la molécule de nisine est donc meilleure en milieu acide.

2.2. Amélioration de la production de nisine

2.2.1. Intérêt de l'incubation à 30 °C (**document 5A**)

L'intérêt est d'obtenir le plus de nisine possible. En effet, la dernière phrase du **document 5A** indique que la température optimale pour la production de nisine est de 30 °C.

2.2.2. intérêt de la supplémentation... (**document 5B**)

Le lait assure l'apport en facteurs de croissance à *Lactococcus* (il permet de reproduire l'environnement naturel dans lequel se développe la souche productrice de nisine).

Les conditions optimales sont celles de l'essai n°5 car la concentration finale en nisine, qui est de $884 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et la productivité spécifique en nisine, qui est de $66,10 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasse, sont les plus élevées

2.3. Risques d'échec de production de nisine à grande échelle

2.3.1. Les étapes de l'infection par un bactériophage virulent

1. **Adsorption** : fixation spécifique sur la bactérie (récepteur/antirécepteur)
2. **Pénétration** : attaque de la paroi, éventuellement contraction de la gaine si phage caudé, perforation de la paroi et injection de l'ADN phagique
3. **Phase productive** : destruction de l'ADN bactérien, expression des protéines précoces (ex : réplicase virale), réplication virale et expression des protéines tardives (ex : protéines de la capsid)
4. **Assemblage** : génome et éléments capsidiques (encapsidation)
5. **Libération** : la lyse bactérienne permet la libération des virions.

2.3.2. Les principales caractéristiques d'un bactériophage tempéré

C'est un phage effectuant une interaction non productive de type lysogène. L'ADN phagique est inséré dans l'ADN bactérien sous forme de prophage. Le prophage reste dormant et se multiplie avec le chromosome de l'hôte (transmission verticale aux cellules filles). À la faveur d'une induction, le prophage s'excise et enclenche un cycle lytique.

3. Mode d'action de la Nisine

3.1. interprétation des courbes

Nisine $0 \mu\text{M}$: courbe témoin, montrant une croissance donc une germination, les spores étaient viables, les bactéries sont revivifiables, l'expérience est validée.

Concentration minimale inhibant totalement la germination : à partir de $1 \mu\text{M}$ puisque diminution de DO, pas de germination et donc pas de croissance

3.2. corrélation entre les observations et la concentration en nisine.

Nisine $0,1 \mu\text{M}$: concentration en nisine peu efficace, car peu (ou pas) de croissance mais aspect similaire au témoin après 5 h

Nisine 1 à $100 \mu\text{M}$: concentration en nisine efficace, blocage de la germination puisque pas de cellules végétatives observées sur le document B jusqu'à 10 h

On confirme que la « CMI » est de $1 \mu\text{M}$

U42 : Biologie cellulaire

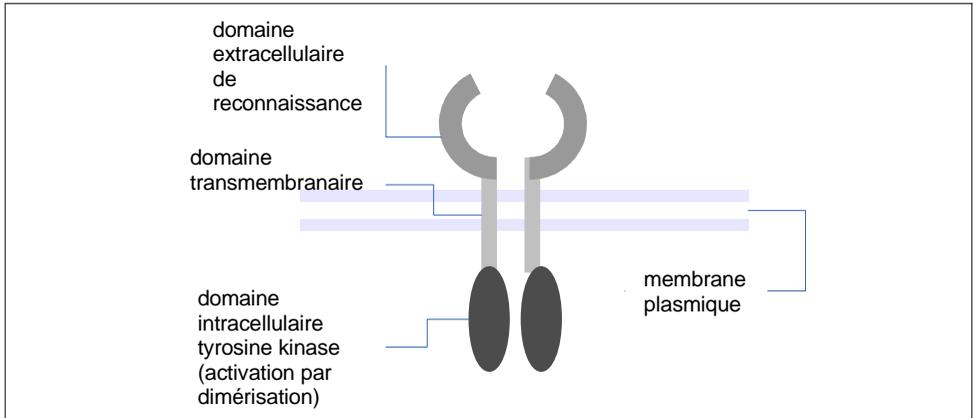
Durée : 2 h – coefficient 1

1.

1.1.

1 : glycoprotéine	2 : Glycosylation	3 : glycolipide
4 : protéine transmembranaire / intrinsèque	5 : protéine périphérique / extrinsèque	6 : cytosquelette
7 : cholestérol	8 : milieu extracellulaire	9 : cytosol

1.2.



1.3.

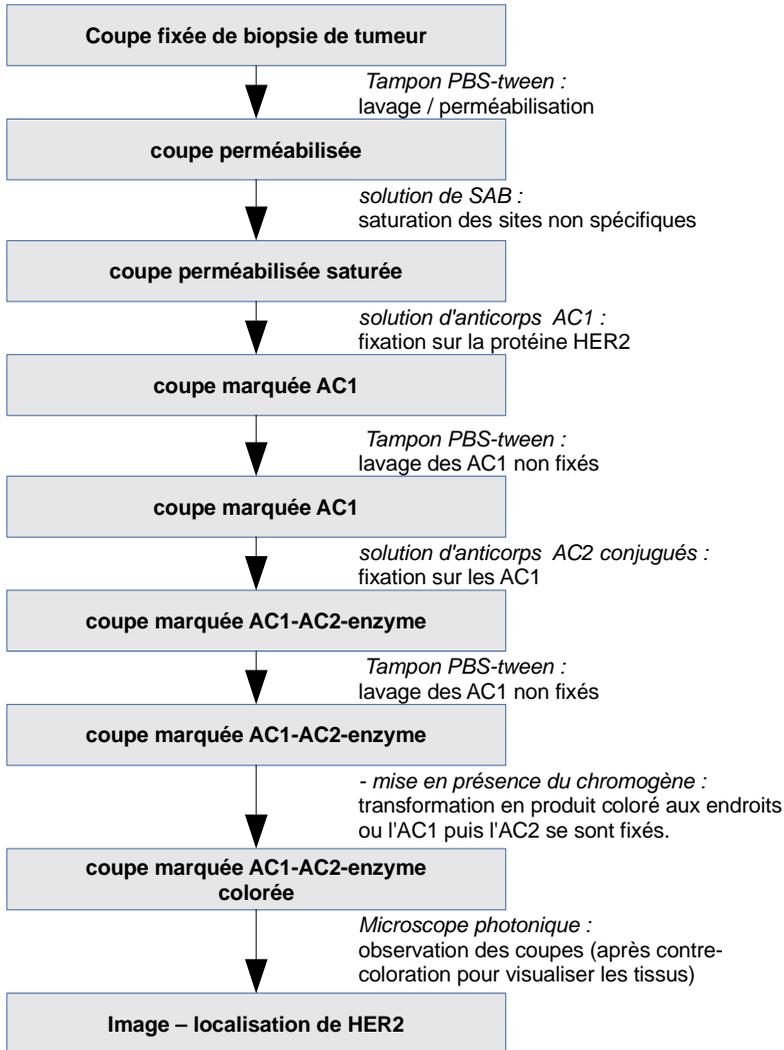
la phosphorylation d'une protéine cytosolique sur une tyrosine active une cascade de phosphorylation jusqu'à activation des protéines fonctionnelles (enzymes, facteurs de transcription...)

2.

2.1. un proto-oncogène est un gène impliqué dans la régulation du cycle cellulaire qui, suite à une mutation ou une modification d'expression, peu devenir un oncogène – c'est-à-dire favoriser l'apparition d'un cancer.

2.2. la transformation d'un proto-oncogène en oncogène peu venir, par exemple, d'une translocation génétique à proximité d'un *enhancer* ou sous le contrôle d'un promoteur plus fort. Autres exemples : mutation « gain de fonction » ou perte du caractère inductible, intégration dans un génome rétroviral...

2.3.



2.4. Un résultat « 0 » ne présente pas de marquage coloré dans le tissu tumoral. Un résultat « 3+ » présente un marquage abondant, révélateur d'une forte expression de HER2 dans la tumeur.

2.5. La colchicine, en empêchant la dépolymérisation des microtubules, bloque en métaphase les cellules qui entrent en mitose. Elle permet donc d'accumuler les cellules en métaphase pendant le temps de la culture, augmentant le nombre de contenus chromosomiques visibles

par la suite.

2.6. Les chromosomes sont classés selon les critères suivants, par ordre d'importance :

- la taille,
- la position du centromère,
- les bandes obtenues par la coloration au Giemsa.

2.7. Le caryotype présenté est normal, il n'y a pas de polysomie du chromosome 17.

2.8.

Prétraitement : dénaturation de l'ADN cible (dans les tissus) et des sondes ADN marquées.

Hybridation : les sondes ADN s'hybride avec l'ADN génomique du tissu.

Lavage : élimination des sondes non hybridées

Contre-coloration : une coloration globale de l'ADN au DAPI permet de visualiser l'ensemble des noyaux cellulaires

Observation : la fluorescence des sondes ADN marquées est visible en vert et rouge sur fond de fluorescence bleue au DAPI.

2.9. Un spot vert correspond à l'hybridation d'une sonde complémentaire du centromère du chromosome 17, donc montre la présence et la localisation d'un chromosome 17.

Un spot vert correspond à l'hybridation d'une sonde complémentaire du gène HER2, donc montre la présence et la localisation d'un locus HER2.

2.10. on observe deux spots vert, il y a donc deux chromosome 17. On confirme donc l'absence de polysomie 17. En revanche, on observe un nombre élevé de spots rouges (15). La technique révèle donc 15 copies du locus HER2, ce qui correspond à une amplification génétique naturelle (nombre de copies du gène augmenté).

3.

3.1. Des anticorps monoclonaux sont des anticorps produits à partir d'un seul clone lymphocytaire, c'est-à-dire à partir de cellules issues de l'activation d'un lymphocyte unique.

3.2. Un anticorps monoclonal humanisé présente, sur sa fraction FC notamment, des déterminants antigéniques caractéristique des anticorps humains. La partie spécifique est en revanche le plus souvent obtenue chez la souris.

3.3. Un anticorps monoclonal humanisé permettra d'avoir une spécificité, une affinité pour la cible et une stabilité constante (anticorps monoclonal). De plus, il sera bien toléré par le système immunitaire des patients et pourra activer par sa fraction FC le complément et les autres cellules immunitaires (caractère humanisé).

3.4. Les hybridomes sont cultivés entre les fibres du bioréacteur.

3.5. La glutamine, le glucose, l'O₂ diffusent de l'intérieur des fibres vers le site de culture : ce sont des nutriments pour la cellule. En revanche, le CO₂, le lactate et le NH⁴⁺ sont des déchets cellulaires : produits par les cellules, ils diffusent vers le milieu circulant à l'intérieur des fibres.

3.6. productivité massique journalière : masse d'anticorps produits par jour.

On a en fibres creuses 1800 mg produits en 600 heures, soit 3 mg/heure ce qui donne 72 mg/jour.

En batch, on a 200 mg en 240 heures, soit 20 mg/jour.

3.7. le système de perfusion en fibres creuses permet donc de multiplier par 2,5 environ la productivité massique journalière, mais également d'augmenter le temps de culture donc d'obtenir 9 fois plus d'anticorps monoclonal.

Travaux pratiques de biotechnologies

U51 : TP de biologie moléculaire et génie génétique

Coefficient 1 - CCF

Compétences évaluables

compétences terminales Globales	Compétences terminales élémentaires	
C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail	C1.1.1.	Préparer et conditionner solutions de travail et réactifs
	C1.1.2.	Préparer des milieux de culture
	C1.1.3.	Etalonner les solutions titrantes
C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques	C1.2.1.	Préparer les échantillons biologiques
	C1.2.2.	Prétraiter les échantillons biologiques
	C1.2.3.	Conditionner le matériel biologique
C1.3- Mettre en œuvre des techniques en biochimie et biophysique		Techniques préparatives
	C 1.3.1	choisir un protocole adapté aux caractéristiques biochimiques et/ou biophysiques du lot ou de l'échantillon
	C 1.3.2.	appliquer sur le lot ou l'échantillon le protocole adapté
	C 1.3.3.	conserver la préparation purifiée
		Techniques analytiques
	C 1.3.4	choisir un étalon ou un matériel de référence
	C 1.3.5	choisir un protocole adapté.
	C 1.3.6	appliquer sur l'échantillon et l'étalon, le protocole adapté
	C 1.3.7	caractériser un échantillon
C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps	C1.5.1	Choisir un protocole adapté.
	C1.5.2	Prévoir des témoins et des échantillons de référence
	C1.5.3	Appliquer sur les échantillons et les témoins le protocole choisi
C1.6- Mettre en œuvre des techniques en biologie moléculaire et génie génétique	C1.6.1	Rechercher une séquence ou une donnée dans une banque
	C1.6.2	Analyser une séquence ou un ensemble de séquences
	C1.6.3	Préparer la mise en œuvre en fonction des caractéristiques et du nombre d'échantillons à traiter
	C1.6.4	Appliquer aux acides nucléiques les protocoles adaptés
	C1.6.5	Appliquer aux cellules procaryotes, eucaryotes, et aux virus les protocoles adaptés
	C1.6.6	Exploiter et valider les résultats
	C1.6.7	Conserver et stocker le matériel biologique d'intérêt

C2.1- Organiser son activité de travail	C2.1.1	Recenser et planifier les travaux à réaliser
	C2.1.2	Inventorier les besoins en matériels et en réactifs
	C2.1.3	Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.4	Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.5	Organiser son espace de travail
	C2.1.6	Remettre en ordre son espace de travail
	C2.1.7	Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires
C2-2- Préparer les équipements et les matériels	C2.2.1	Vérifier le bon état du matériel ou des installations
	C2.2.2	Réaliser le montage des appareils et de leurs accessoires
	C2.2.3	Vérifier la présence et le fonctionnement des équipements collectifs de sécurité
	C2.2.4	Vérifier la présence et l'état des protections individuelles de sécurité
	C2.2.5	Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires
	C2.2.6	Vérifier ou étalonner les appareils de mesure
C 2.4 Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	C2.4.1	Identifier les dangers
	C2.4.2	Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation
	C2.4.3	Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés
	C2.4.4	Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés
	C2.4.5	Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement
	C2.4.6	Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident
	C2.4.7	Pour toute personne entrante : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs
	C2.4.8	Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	C3.1.1	Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique
	C3.1.2	Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	C4.3.1	Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué

U52 : TP de biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Coefficient 1 – CCF

Compétences évaluables

compétences terminales Globales	Compétences terminales élémentaires	
<u>C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail</u>	C1.1.1.	Préparer et conditionner solutions de travail et réactifs
	C1.1.2.	Préparer des milieux de culture
	C1.1.3.	Etalonner les solutions titrantes
<u>C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques</u>	C1.2.1.	Préparer les échantillons biologiques
	C1.2.2.	Prétraiter les échantillons biologiques
	C1.2.3.	Conditionner le matériel biologique
<u>C1.3- Mettre en œuvre des techniques en biochimie et biophysique</u>	Techniques préparatives	
	C 1.3.1	choisir un protocole adapté aux caractéristiques biochimiques et/ou biophysiques du lot ou de l'échantillon
	C 1.3.2.	appliquer sur le lot ou l'échantillon le protocole adapté
	C 1.3.3.	conserver la préparation purifiée
	Techniques analytiques	
	C 1.3.4	choisir un étalon ou un matériel de référence
	C 1.3.5	choisir un protocole adapté.
	C 1.3.6	appliquer sur l'échantillon et l'étalon, le protocole adapté
C 1.3.7	caractériser un échantillon	
<u>C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps</u>	C1.5.1	Choisir un protocole adapté.
	C1.5.2	Prévoir des témoins et des échantillons de référence
	C1.5.3	Appliquer sur les échantillons et les témoins le protocole choisi
<u>C .1.8 - Mettre en œuvre des techniques en génie enzymatique</u>	C1.8.1	Réaliser et évaluer les étapes d'une purification d'enzyme
	C1.8.2	Réaliser une immobilisation d'enzyme
	C1.8.3	Evaluer les performances d'une immobilisation et les caractéristiques d'une enzyme immobilisée
	C1.8.4	Utiliser un biocapteur
	C1.8.5	Mettre en œuvre une biocatalyse en réacteur
<u>C2.1- Organiser son activité de travail</u>	C2.1.1	Recenser et planifier les travaux à réaliser
	C2.1.2	Inventorier les besoins en matériels et en réactifs
	C2.1.3	Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.4	Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.5	Organiser son espace de travail
	C2.1.6	Remettre en ordre son espace de travail
	C2.1.7	Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires

C2-2- Préparer les équipements et les matériels	C2.2.1	Vérifier le bon état du matériel ou des installations
	C2.2.2	Réaliser le montage des appareils et de leurs accessoires
	C2.2.3	Vérifier la présence et le fonctionnement des équipements collectifs de sécurité
	C2.2.4	Vérifier la présence et l'état des protections individuelles de sécurité
	C2.2.5	Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires
	C2.2.6	Vérifier ou étalonner les appareils de mesure
C 2.4 Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	C2.4.1	Identifier les dangers
	C2.4.2	Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation
	C2.4.3	Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés
	C2.4.4	Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés
	C2.4.5	Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement
	C2.4.6	Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident
	C2.4.7	Pour toute personne entrante : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs
	C2.4.8	Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	C3.1.1	Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique
	C3.1.2	Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	C4.3.1	Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué

U53 : TP de microbiologie – génie fermentaire

Coefficient 1 – CCF

Compétences évaluables

compétences terminales Globales	Compétences terminales élémentaires	
C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail	C1.1.1.	Préparer et conditionner solutions de travail et réactifs
	C1.1.2.	Préparer des milieux de culture
	C1.1.3.	Etalonner les solutions titrantes
C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques	C1.2.1.	Préparer les échantillons biologiques
	C1.2.2.	Prétraiter les échantillons biologiques
	C1.2.3.	Conditionner le matériel biologique
<u>C1.4- Mettre en œuvre des techniques en microbiologie</u>	C1.4.1	Mettre en œuvre un examen microscopique
	C1.4.2	Cultiver des agents biologiques
	C1.4.3	Identifier par méthodes biochimiques, immunologiques, moléculaires
	C1.4.4	Mettre en œuvre un typage de souche
	C1.4.5	Dénombrer les agents biologiques
	C1.4.6	Conservier et stocker les agents biologiques
C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps	C1.5.1	Choisir un protocole adapté.
	C1.5.2	Prévoir des témoins et des échantillons de référence
	C1.5.3	Appliquer sur les échantillons et les témoins le protocole choisi
<u>C1.7- Mettre en œuvre des techniques en génie fermentaire</u>	C1.7.1	Préparer et organiser une unité de fermentation (2 à 10 litres)
	C1.7.2	Préparer et stériliser les différents milieux, réactifs, solutions et matériels
	C1.7.3	Réaliser la préculture et ensemencer le milieu de fermentation
	C1.7.4	Conduire la fermentation
	C1.7.5	Traiter des données cinétiques
	C1.7.6	Effectuer le traitement primaire du moût en fin de fermentation : séparation de la biomasse
	C1.7.7	Conservier et stocker le matériel collecté
	C1.7.8	Assurer l'élimination des cultures et des consommables
	C1.7.9	Décontaminer et nettoyer l'unité de fermentation et les périphériques
C2.1- Organiser son activité de travail	C2.1.1	Recenser et planifier les travaux à réaliser
	C2.1.2	Inventorier les besoins en matériels et en réactifs
	C2.1.3	Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.4	Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.5	Organiser son espace de travail
	C2.1.6	Remettre en ordre son espace de travail
	C2.1.7	Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires

C 2.4 Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	C2.4.1	Identifier les dangers
	C2.4.2	Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation
	C2.4.3	Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés
	C2.4.4	Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés
	C2.4.5	Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement
	C2.4.6	Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident
	C2.4.7	Pour toute personne entrante : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs
	C2.4.8	Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	C3.1.1	Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique
	C3.1.2	Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	C4.3.1	Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué

U54 : TP de biologie et technologies cellulaires

Coefficient 1 – CCF

Compétences évaluables

compétences terminales Globales	Compétences terminales élémentaires	
C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail	C1.1.1.	Préparer et conditionner solutions de travail et réactifs
	C1.1.2.	Préparer des milieux de culture
	C1.1.3.	Etalonner les solutions titrantes
<u>C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques</u>	C1.2.1.	Préparer les échantillons biologiques
	C1.2.2.	Prétraiter les échantillons biologiques
	C1.2.3.	Conditionner le matériel biologique
C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps	C1.5.1	Choisir un protocole adapté.
	C1.5.2	Prévoir des témoins et des échantillons de référence
	C1.5.3	Appliquer sur les échantillons et les témoins le protocole choisi
<u>C1.9- Mettre en œuvre des techniques de génie cellulaire</u>	C1.9.1	Préparer les milieux de culture
	C1.9.2	Préparer une culture primaire de cellules eucaryotes supérieures
	C1.9.3	Entretenir une culture de cellules eucaryotes supérieures
	C1.9.4	Utiliser des cellules eucaryotes supérieures comme support d'expérimentation ou de production
	C1.9.5	Conservier et stocker des lignées cellulaires et les clones
	C1.9.6	Assurer l'élimination des cultures et du matériel contaminés
C2.1- Organiser son activité de travail	C2.1.1	Recenser et planifier les travaux à réaliser
	C2.1.2	Inventorier les besoins en matériels et en réactifs
	C2.1.3	Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.4	Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.5	Organiser son espace de travail
	C2.1.6	Remettre en ordre son espace de travail
	C2.1.7	Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires

C 2.4 Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	C2.4.1	Identifier les dangers
	C2.4.2	Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation
	C2.4.3	Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés
	C2.4.4	Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés
	C2.4.5	Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement
	C2.4.6	Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident
	C2.4.7	Pour toute personne entrante : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs
	C2.4.8	Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	C3.1.1	Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique
	C3.1.2	Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	C4.3.1	Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué

U6 : Rapport de stage et soutenance

Extraits du référentiel :

1. Objectifs et modalités des stages

Les stages en entreprise doivent permettre :

- d'apprendre à travailler en situation réelle,
- de s'insérer dans une équipe de professionnels et de percevoir l'importance des facteurs humains et des relations sociales au sein de l'entreprise,
- d'acquérir ou d'approfondir ou d'appliquer des méthodologies ou des techniques inscrites au référentiel de certification,
- de conduire une réflexion critique sur les résultats obtenus

La durée totale des stages sera de 15 semaines soit 5 à 6 semaines en 1^{ère} année et 9 à 10 semaines en 2^{ème} année.

2. Choix du terrain de stage

Le terrain de stage doit être obligatoirement en adéquation avec les objectifs de la formation professionnelle du BTS Biotechnologies. Il est également impératif que les activités principales du stagiaire comportent la mise en oeuvre de techniques en relation avec les travaux de l'équipe d'accueil. S'agissant d'entreprises de production, des regroupements ponctuels organisés en partenariat avec les entreprises de Biotechnologie seront l'occasion d'une première approche de la démarche – qualité (référentiels et normes).

Bien que pouvant être conseillé par l'équipe pédagogique, le candidat doit rester responsable du choix de son terrain de stage.

3. Rédaction des rapports de stage :

Hors figures, bibliographie, index , lexiques et annexes diverses, le corps de chacun des rapports (1^{ère} ou 2^{ème} année) ne devra pas dépasser 20 pages dactylographiées, en format A4, police de type Times 11 ou 12, marges de 2 cm et texte justifié, interligne simple.

Le volume des annexes ne devra pas excéder 10 pages. Les illustrations seront disposées en regard des textes.

Le rapport comportera, en quatrième de couverture, un résumé en anglais de 20 lignes. Tout en bénéficiant de conseils de la part des enseignants ou du maître de stage, la rédaction du rapport doit rester un travail personnel et original du candidat.

4. Contenu de l'épreuve :

L'épreuve de soutenance doit permettre d'évaluer les qualités d'expression, de communication et de réflexion des candidats ainsi que la maîtrise des connaissances scientifiques et techniques correspondant au sujet traité.

L'exposé oral ne doit pas excéder 20 minutes. Il comportera la présentation en anglais du résumé du rapport de stage.

Cet exposé sera suivi d'un questionnement qui doit permettre d'apprécier les capacités du candidat à répondre de façon argumentée à des questions techniques sur le sujet choisi. L'étudiant sera en outre interrogé sur ses prestations écrites et orales en anglais. La durée totale du questionnement n'excédera pas 30 minutes.

5. Évaluation :

L'évaluation portera sur les points suivants :

- Les contenus scientifiques et techniques (évalués dans le rapport et lors de la soutenance) :
 - adéquation du thème du stage aux objectifs de formation,
 - cohérence du plan,
 - place du travail réalisé dans le projet ou la thématique du laboratoire,
 - présentation claire et correcte des techniques,
 - pertinence et qualité de la réflexion sur l'analyse critique des résultats et leur exploitation ,
 - prolongements possibles et mise en perspective.
- Le travail rédactionnel (évalué dans le rapport) : présentation matérielle du rapport de stage, qualité des illustrations, expression française (orthographe, syntaxe...), pertinence et qualité des documents présentés lors de la soutenance ;
- La communication (évaluée lors de la soutenance) : présentation pertinente du rapport, expression orale, respect du temps imparti, aptitude au dialogue.
 - L'expression en langue anglaise.

Le jury sera obligatoirement composé d'un professeur de biochimie-génie biologique, d'un professionnel (qui n'est pas le tuteur du candidat) d'un professeur de Français et d'un professeur d'anglais.

Le maître de stage peut assister à la soutenance en qualité d'observateur. En aucun cas, il ne participera à l'évaluation de l'épreuve.

PUBLICATIONS DE L'UPBM

L'UPBM édite d'autres annales et documents pédagogiques, certains ouvrages épuisés sont disponibles en consultation et en téléchargement sur le site Internet de l'UPBM : <http://www.upbm.org>

ANNALES BAC STL (Les annales de 1995 à 2011 sont accessibles sur le site UPBM).
Année 2013, nouveau programme

ANNALES BTS Biotechnologies
Années 2005 - 2007), 2008 – 2010), 2011 – 2013

ANNALES BTS Bioanalyses et Contrôle
Années 2010 – 2011, 2012 – 2013

ANNALES BTS Analyses de Biologie Médicale
Années 2012 – 2013

ANNALES BTS QIAB
Années 2008 – 2009 ; 2010 – 2011 ; 2012 – 2013

ANNALES BTS Diététique
Années 2000 - 2002 ; 2003 – 2006

CD-ROM : Hématologie, Microorganismes des boues d'épuration

PLANCHES A3 sur le sang normal, la moelle, anomalie des hématies ...

Le prélèvement sanguin (Opéron spécial N°28)

Laboratoire NSB2

N° de l'Opéron au détail.

INFORMATIONS - CATALOGUES - BONS DE COMMANDES

UPBM - ÉDILION :

Publications UPBM : UPBM ÉDILION Lycée la Martinière – Duchère
Avenue Andreï Sakharov – 69338 LYON Cedex 9

Site Internet : UPBM <http://www.upbm.org>
(catalogues, informations, archives, liens, bons de commande en ligne)

Et toujours, des liens sur les formations, des infos sur les filières, des ressources pour les professeurs...