

**ANNALES
BTS
BIOCHIMISTE
BTS
BIOTECHNOLOGIE**

**SESSIONS
2001/2002**

UPBM - ÉDILION

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

Photographie de couverture de Pascal MICHAUX :

Cytoculteur (de la marque Applikon) en place avec ses satellites, préparé pour une culture de cellules Hep 2 sur microporteurs.

Annales

**Brevet de Technicien Supérieur
BIOCHIMISTE**

**Brevet de Technicien Supérieur
BIOTECHNOLOGIE**

Sessions 2001 et 2002

Publications de l'UPBM

**UPBM - Édition Lycée Technique « La Martinière »
La Duchère 69338 LYON CEDEX 09**

Les annales du **BTS BIOCHIMISTE** ont été réalisées par **Michel VOL**, professeur au Lycée Raoul Dautry à Limoges ;

les annales du **BTS BIOTECHNOLOGIE** ont été réalisées par **Pascal MICHAUX**, professeur au lycée Valentine Labbé à La Madeleine.

Les propositions de corrigés ont été élaborées et relues par de nombreux collègues, d'enseignement général et technologique, que nous tenons à remercier chaleureusement ici : **Dominique Auclair, Sylvie Bardes, Dominique Binchet, Caroline Bonnefoy, Jacqueline Delrous, Marie-Noëlle Demanze, Cathy et Joël Dosda, Philippe Duthoit, Jean-Marc Elias, Frédéric Gomel, Guy Léonard, Bernard Mathelin, Jean-Marie Massy, Laurence Méaux, Françoise Naillat, Sophie Naud, Gilles Peyrat, Jean-Marie Peyridieu, Monique Platon, Lionel Roussel, Brigitte Sallen.**

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

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

ANNALES
BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOCHIMISTE

SESSIONS 2001 ET 2002

Publications de l'UPBM

UPBM - ÉDILION

LYCÉE TECHNIQUE " LA MARTINIÈRE "
LA DUCHÈRE 69338 LYON CEDEX 09

Annales du BTS Biochimiste

Définition de la nature des épreuves

1. Épreuve de français

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

But de l'épreuve

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

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

Nature de l'épreuve

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

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

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

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

Le candidat devra :

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

2. Épreuve d'anglais

- Épreuve écrite
- Durée : 2 heures
- Coefficient : 2

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

d'exploiter correctement des documents à caractère technique (articles de presse ou extraits d'ouvrages spécialisés, notices et modes d'emploi, diagrammes et schémas, lettres, communications),

de proposer des éléments de rédaction simples en anglais sur un sujet touchant à la spécialité

- Ceci implique la capacité :
- de rendre compte, en français, de manière pertinente des informations essentielles contenues dans le document,
 - de traduire une partie de ce document,
 - de rédiger en anglais quelques phrases selon les indications qui lui sont fournies.

3. Épreuve de mathématiques et sciences physiques

- Épreuve écrite
- Durée : 4 heures (2 h+2 h)
- Coefficient : 4

L'épreuve comporte deux parties obligatoires et indépendantes.

Mathématiques (coefficient 1,5)

Objectifs :

L'enseignement des Mathématiques a pour triple objectif de fournir un outil efficace pour les Sciences physiques et biologiques et la Technologie, de développer la formation scientifique et de contribuer à la

formation personnelle et relationnelle. Par suite, cette première partie d'épreuve doit permettre :

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

Nature de cette partie d'épreuve :

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

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

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

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

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

L'utilisation des calculatrices pendant l'épreuve est définie par la circulaire n°86-228 du 28 juillet 1986 publiée au Bulletin officiel n° 34 du 2 octobre 1986.

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

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

Sciences physiques (coefficient 2,5)

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

Il doit être vérifié que le candidat :

- analyse convenablement un problème pose en utilisant judicieusement ses connaissances,
- propose une solution (qualitative ou quantitative) justifiée par un raisonnement logique,
- fournit un résultat numérique exprimé avec des unités et la précision adéquates : la plus grande attention sera accordée au nombre de chiffres significatifs.

4. Épreuve de biochimie - biologie

- Épreuve écrite
- Durée maximale : 4 heures
- Coefficient : 6

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

Elle comporte plusieurs questions indépendantes.

5. Épreuve professionnelle de synthèse

- Épreuve écrite et pratique
- Durée maximale : 14 heures
- Coefficient : 12

Cette épreuve comporte deux parties obligatoires

Étude d'opérations techniques

- Partie écrite
- Durée : 4 heures
- Coefficient : 4

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

Elle doit permettre d'apprécier les capacités :

- d'analyse du problème,
 - de conception et de définition d'une stratégie expérimentale,
 - d'utilisation de documents, éventuellement de langue anglaise,
 - de prise en compte des aspects concernant la sécurité, la législation et la gestion,
 - d'utilisation des techniques et du matériel notamment informatique,
- et l'esprit d'initiative

Réalisation pratique d'opérations techniques

- Partie pratique
- Durée maximale : 10 heures
- Coefficient : 8

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

Elle est pluridisciplinaire.

Elle doit permettre de vérifier les capacités :

- de mise en œuvre d'un protocole opératoire dans des conditions satisfaisantes de sécurité et d'efficacité,
- d'organisation,
- de rigueur et de précision dans l'exécution,
- d'exploitation des résultats.

Elle peut se dérouler en plusieurs parties.

Elle comporte plusieurs questions liées ou indépendantes.

Elle a un caractère essentiellement pratique.

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

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

- Épreuve orale
- Durée maximale : 0,5 heure
- Coefficient : 3 (2 pour les compétences scientifiques et techniques, 1 pour les compétences en sciences économiques)

L'épreuve a pour but de vérifier :

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

- appréhender les données constitutives d'une entreprise ou d'un laboratoire,
- comprendre le fonctionnement d'une entreprise ou d'un laboratoire sur les plans de la technique et de l'organisation,
- présenter les activités d'un stage en analysant les problèmes techniques rencontrés et les démarches adoptées

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

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

Le candidat présentera et soutiendra oralement le rapport qu'il aura établi à l'issue de son stage de deuxième année en entreprise s'il s'agit d'un candidat

scolarisé ou un rapport sur son activité professionnelle s'il s'agit d'un candidat dispensé de stage en raison d'un emploi salarié.

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

La présentation n'excédera pas 20 minutes.

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

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

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

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

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

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

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

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

La commission de jury pour cette épreuve comprend :

- un professeur de sciences économiques,
- un professeur chargé d'enseignement technologique,
- un professionnel

Les candidats autorisés ayant échoué à l'examen peuvent :

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

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

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

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

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

ANNALES BTS-BIOCHIMISTE 2001

SOMMAIRE

Français	p.2001-1
Anglais	p.2001-7
Mathématiques	p.2001-8
Sciences Physiques	p.2001-10
Biochimie-Biologie	p.2001-12
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie théorique (Étude d'Opérations Techniques)	p.2001-22
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie pratique (Réalisation d'Opérations Techniques ; SUJET 1	p.2001-35
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie pratique (Réalisation d'Opérations Techniques ; SUJET 2	p.2001-46
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie pratique (Réalisation d'Opérations Techniques ; SUJET 3	p.2001-55
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie pratique (Réalisation d'Opérations Techniques ; SUJET 4	p.2001-64
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ /Anglais	p.2001-74
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ /Mathématiques	p.2001-75
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ /Sciences physiques	p.2001-77
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ /Biochimie-Biologie	p.2001-82
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ / Étude d'Opérations Techniques	p.2001-85

ANNALES BTS-BIOCHIMISTE 2002

SOMMAIRE

Français	p.2002-1
Anglais	p.2002-1
Mathématiques	p.2002-1
Sciences Physiques	p.2002-1
Biochimie-Biologie	p.2002-3
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie théorique (Étude d'Opérations Techniques)	p.2002-13
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie pratique (Réalisation d'Opérations Techniques ; SUJET 1	p.2002-24
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie pratique (Réalisation d'Opérations Techniques ; SUJET 2	p.2002-32
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie pratique (Réalisation d'Opérations Techniques ; SUJET 3	p.2002-39
Épreuve Professionnelle de Synthèse: partie pratique (Réalisation d'Opérations Techniques ; SUJET 4	p.2002-??
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ /Anglais	p.2002-48
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ /Mathématiques	p.2002-48
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ /Sciences physiques	p.2002-49
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ /Biochimie-Biologie	p.2002-54
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ / Étude d'Opérations Techniques	p.2002-59

EPREUVES
DE LA SESSION
2001

ÉPREUVE DE FRANÇAIS.

DURÉE : 4 HEURES

COEFFICIENT : 3

L'USAGE DES CALCULATRICES ÉLECTRONIQUES EST INTERDIT

SYNTHÈSE DE DOCUMENTS

Les documents suivants abordent le thème de la place des enfants dans la société ; vous en ferez une synthèse concise, ordonnée et objective.

Puis, dans une conclusion personnelle, vous donnerez votre point de vue sur la question.

Document 1 : " Droits de l'enfant "

Découvre la Convention relative aux Droits de l'Enfant,
Document publié par le Ministère de l'Éducation Nationale,
de la Recherche et de la Technologie, 1999,
version simplifiée de la *Convention internationale des*
Droits de l'Enfant, 1989.

Document 2 : Jean-Pierre ROSENCZVEIG et Pierre VERDIER,
" La parole de l'enfant est-elle légitime ? ",
La parole de l'enfant,
Editions Jeunesse et Droit, Dunod, 1999.

Document 3: Marie-Agnès COMBESQUE,
extrait de "Combattre le travail des Enfants ",
La Chronique d'Amnesty International, avril 1998.

Document 4: Victor HUGO,
" Melancholia ", écrit en 1838,
Les Contemplations, 1856,
Livre III : "Les Luttes et les Rêves "

Document 5: Dessin de PANCHO,
Le Monde, 1er novembre 1997.

DOCUMENT 1

DROITS DE L'ENFANT (extraits)

Le 20 novembre 1989, l'ONU a adopté la " Convention internationale des Droits de l'Enfant" qui comporte 54 articles. Un certain nombre de pays - pays industrialisés et pays en voie de développement - l'ont ratifiée et se sont engagés à modifier progressivement leur législation pour l'adapter aux nouveaux droits.

ARTICLE 1: DÉFINITION DE L'ENFANT

La convention concerne tous les enfants de moins de 18 ans sauf si leur pays leur accorde la majorité plus tôt. Tu es concerné si tu as moins de 18 ans.

ARTICLE 2: LE DROIT A LA NON-DISCRIMINATION

Tous les droits énoncés par la Convention doivent t'être accordés, quelle que soit ton origine ou celle de tes parents, de même qu'à tous les autres enfants, filles et garçons .

Les États ne doivent pas violer tes droits et doivent les faire respecter pour tous les enfants.

ARTICLE 13: LE DROIT À LA LIBERTÉ D'EXPRESSION

1 - Tu as le droit de t'exprimer librement. Tu as le droit de rechercher, de recevoir et de diffuser des informations.

2 - Il y a des limites à ta liberté d'expression :

- tu dois respecter les droits et la réputation des autres.
- tu ne peux pas mettre la société en danger.

ARTICLE 19: LE DROIT D'ETRE PROTÉGÉ CONTRE LES MAUVAIS TRAITEMENTS

1 - L'Etat doit te protéger contre toutes les formes de violence et de brutalités physiques ou mentales. Que tu sois sous la garde de tes parents ou de toute autre personne à qui tu es confié, l'État doit te protéger contre l'abandon, l'absence de soins, les mauvais traitements, l'exploitation et la violence sexuelle.

2 - L'État doit veiller à ce que de telles situations ne se produisent pas. Il prend les dispositions nécessaires.

ARTICLE 24: LE DROIT À LA SANTÉ ET AUX SERVICES MÉDICAUX

1 - Tu as le droit de jouir du meilleur état de santé possible et d'être soigné. Les États s'engagent à créer les services médicaux nécessaires pour qu'il en soit ainsi.

2 - Les États assureront en priorité:

- a) la réduction de la mortalité infantile,
- b) le développement des soins essentiels,
- c) le développement de la lutte contre les maladies et la malnutrition et la fourniture d'eau potable,
- d) le développement de l'aide aux mamans, avant et après l'accouchement,
- e) le développement de l'information des adultes et des enfants sur la santé, la nutrition, l'hygiène, la prévention des accidents,
- f) le développement de la planification familiale.

3 - Les États aboliront les pratiques traditionnelles dangereuses pour la santé des enfants. Les pays en développement seront particulièrement aidés.

ARTICLE 27: LE DROIT À UN NIVEAU DE VIE DÉCENT

1 - Tu as droit à un niveau de vie décent pour assurer normalement ton développement physique, mental, spirituel, moral et social.

2 - Tes parents ou ceux qui t'ont en charge sont responsables de ton développement.

3 - Si nécessaire, les États devront aider tes parents ou les personnes qui t'ont en charge. Ils accorderont la priorité à l'alimentation, à l'habillement et au logement.

4 - Les États te garantissent le droit de recevoir la pension alimentaire qui t'est due. Les États s'organiseront pour t'assurer ce droit, où que tu sois.

ARTICLE 28: LE DROIT À L'ÉDUCATION

1 - Les États te reconnaissent le droit à l'éducation sur la base de l'égalité des chances. Pour cela:

- a) tu dois pouvoir bénéficier gratuitement de l'enseignement primaire. Cet enseignement est obligatoire,
- b) les États encouragent l'organisation d'un enseignement secondaire. Ils le rendent accessible à tous les enfants. Il doit être gratuit. Des aides financières doivent être accordées, en cas de besoin,
- c) l'enseignement supérieur doit t'être également accessible, en fonction de tes capacités,
- d) tu as le droit à une orientation scolaire et professionnelle,
- e) tout doit être fait pour t'encourager à fréquenter régulièrement l'école.

2 - Les États doivent veiller à ce que les règles de la vie scolaire respectent ta dignité d'être humain conformément à cette Convention.

3 - Les États doivent coopérer pour éliminer l'ignorance et l'analphabétisme dans le monde et pour faciliter l'accès aux connaissances scientifiques et techniques ainsi qu'aux méthodes modernes d'enseignement. Les pays en développement doivent être particulièrement aidés.

ARTICLE 31: LE DROIT AUX LOISIRS

1 - Tu as le droit au repos, aux loisirs, au jeu, aux activités récréatives. Tu as le droit de participer librement aux activités artistiques et culturelles.

2 - Les États doivent protéger ce droit. Ils encourageront toutes les initiatives favorisant le développement de ce droit, dans des conditions d'égalité.

ARTICLE 32: LE DROIT À LA PROTECTION CONTRE L'EXPLOITATION

1 - Tu dois être protégé contre l'exploitation. Nul ne peut t'obliger à accomplir un travail dangereux ou nuisant à ton éducation, à ta santé, et à ton développement.

2 - Les États prendront toutes les mesures nécessaires pour te protéger.

- a) ils fixeront un âge minimum à partir duquel tu pourras travailler,
- b) ils établiront des règlements concernant tes heures et les conditions de travail,
- c) ils puniront ceux qui ne respectent pas ces règles.

Découvre la Convention relative aux Droits de l'Enfant, document publié en novembre 1999 par le Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, version simplifiée de la Convention internationale des Droits de l'Enfant, 1989.

DOCUMENT 2

LA PAROLE DE L'ENFANT EST-ELLE LÉGITIME ?

La question mérite d'être posée.

[...] Il peut paraître un peu brutal de priver d'expression quelques 17 millions des membres de la collectivité nationale(1). Surtout que la période moderne nous a démontré que les enfants - parfois même très jeunes - avaient un regard digne d'intérêt sur la cité et pas seulement sur ce qui les concerne. Si on ne s'en tient qu'au terrain de la sécurité physique, force est de constater que devant certaines défaillances de notre dispositif, il est essentiel de permettre aux enfants d'être les acteurs de leur protection. Il faut qu'il leur soit permis, et pas seulement au plan légal, de tirer le signal d'alarme, d'appeler au secours, voire de se mettre par eux-mêmes hors de danger.

D'une manière générale dans ce siècle - et pas depuis ces dernières années comme on l'affirme parfois rapidement - à l'image de notre société, notre droit a reconnu des droits aux enfants et une possibilité d'agir personnellement ses droits(2). Pour dire les choses simplement et rapidement: l'enfant a des droits, plus qu'il ne le croit et que nous le croyons nous-mêmes; surtout il s'est vu reconnaître le droit d'agir ses droits dans certaines circonstances.

Mais à s'engager délibérément dans cette voie, ne risque-t-on pas de nier l'enfance, cette période d'irresponsabilité ? Car il faut être cohérent: qui dit droits, dit devoirs, nous assène-t-on en permanence et avec vigueur, pour ne pas dire au passage qu'il serait bien utile de rappeler les devoirs aux enfants avant de songer à leur parler de leurs droits !

Ces deux approches sont respectables et recouvrent une même réalité. Il va donc falloir les rendre conciliables.

Une capacité relative d'expression.

Le débat est ainsi noué: on n'en est plus au "*Mange et tais-toi*" ou "*Apprends et tais-toi !*" des années 50, mais ce n'est quand même pas "*l'enfant-roi*" généralisé décidant en tout et de tout, coupant la parole aux adultes, sans le moindre respect pour eux. En d'autres termes, des "*niches*" de parole se sont ouvertes pour les enfants, pour reprendre l'expression utilisée au Parlement pour qualifier les possibilités reconnues depuis peu aux groupes politiques de présenter leurs propositions de loi dans un ordre du jour constitutionnellement verrouillé par le gouvernement !

Dans l'univers judiciaire, mais aussi dans la vie quotidienne, individuellement ou collectivement, les enfants et les jeunes vont pouvoir s'exprimer. Quitte à engager leur responsabilité s'ils dérapent. Ils seront alors tenus pour responsables à la hauteur de ce qu'ils sont: des enfants. Que l'on soit adulte ou enfant, tout un chacun a le droit de critiquer, mais pas de diffamer; d'interpeller, mais pas d'injurier à la maison, à l'école comme dans la vie courante.

Il est même de la responsabilité des adultes - d'abord des parents - de préparer leur enfant à l'exercice de cette responsabilité. C'est ce que l'on appelle l'éducation. Il ne s'agit pas seulement de savoir bien s'exprimer; il faut savoir apprendre à bien respecter l'autre, à l'écouter et échanger, à débattre même et surtout si on ne partage pas le point de vue de l'interlocuteur; bref, à échanger des mots plutôt que des coups. [.]

À la question initiale "*la parole de l'enfant est-elle légitime ?*", on peut donc faire une réponse pondérée. Certes elle l'est, mais chichement !

Jean-Pierre ROSENZVEIG et Pierre VERDER (3),
La parole de l'enfant,
Éditions Jeunesse et Droit, Dunod, 1999.

(1) Il s'agit de la France.

(2) agir ses droits: les faire agir, s'en servir.

(3) Jean-Pierre Rosenczveig est président du tribunal pour enfants de Bobigny;
Pierre Verdier est ancien directeur de DDASS de la Moselle.

DOCUMENT 3

COMBATTRE LE TRAVAIL DES ENFANTS

Les chiffres donnent le vertige, et pourtant, ils ne reflètent qu'une réalité tronquée et sous-estimée, prise il y a seulement 20 ans, lorsque les Nations unies ont décrété 1979 année de l'enfance.

À intervalles réguliers, le travail des enfants fait la une des médias. Montrés du doigt: l'Inde, le Pakistan, la Thaïlande, le Brésil où des cohortes de gosses en guenilles s'échinent à fabriquer des vêtements, des tapis, des briques, relancent des touristes dans des bordels. Les faits sont désormais connus. Il n'empêche, si les opinions publiques sont mieux informées aujourd'hui qu'hier, savent-elles que le phénomène est en constante aggravation ? En vingt ans, le pourcentage d'enfants au travail, âgés de moins de 15 ans, s'est accru. Leurs conditions de travail se sont détériorées. Les rendements que leurs patrons leur imposent sont sans cesse en augmentation. Et les enfants, contraints de travailler, se retrouvent de plus en plus isolés.

Depuis 1975, le travail des enfants est considéré par l'ONU comme une forme contemporaine d'esclavage au titre du travail forcé. Actuellement, selon le BIT (Bureau

international du travail), au moins 250 millions d'enfants âgés de 5 à 14 ans sont au travail dans l'agriculture, l'artisanat et l'industrie. Plus de la moitié d'entre eux travaille à temps plein. Plus de 55 % des enfants de la tranche d'âge 10-14 ans, sont contraints au travail au Bhoutan. Ils sont presque aussi nombreux au Mali (54,5 %), au Burkina Faso (51,1 %), au Burundi (49 %), sur l'île de Timor oriental (45,4 %). En Amérique du sud, 25,3 % des enfants haïtiens connaissent le même sort contre 16,2 % au Guatemala, 16,1 % au Brésil et en République dominicaine. Le continent européen n'est pas non plus épargné, quoique dans des proportions bien moindres: au Portugal, 1,8 % des enfants travaillent, en Albanie, 1,1 %. Ces chiffres ne constituent malgré tout qu'une hypothèse basse, notamment parce que les enquêtes menées par l'OIT (Organisation internationale du travail) et le BIT n'ont pas encore atteint un niveau de fiabilité optimum par manque de moyens. Ces enquêtes minorent vraisemblablement le nombre de filles au travail, puisque les questionnaires abordent rarement le travail au sein du cercle familial.

À qui la faute ?

Cette notion de travail des enfants demande à être encore affinée. L'Unicef, le Fonds des Nations unies pour l'enfance, distingue par exemple, travail intolérable et travail acceptable. Le travail intolérable entrave le développement physique et mental de l'enfant, concourt à son exploitation économique et sociale, viole son intégrité spirituelle et morale. Le travail acceptable procurerait à l'enfant assurance et fierté, en lui permettant de contribuer au revenu familial, et l'acquisition d'une formation, même s'il ne préserve pas toujours sa scolarité, son repos, ses loisirs. (...) Au Pérou depuis 1978, en Inde plus récemment, des associations aident les enfants à s'organiser, à établir leurs revendications sur leurs horaires et leurs salaires. Le travail acceptable porte en lui la promesse d'une vie meilleure, au contraire du travail intolérable qui perpétue la pauvreté et voue les futurs adultes à des emplois non qualifiés et mal rémunérés jusqu'à la fin de leur courte vie.

Marie-Agnès COMBESQUE,
La Chronique d'Amnesty International,
Avril 1998.

DOCUMENT 4

MELANCHOLIA

Où vont tous ces enfants dont pas un seul ne rit ?
Ces doux êtres pensifs que la fièvre maigrît ?
Ces filles de huit ans qu'on voit cheminer seules ?
Ils s'en vont travailler quinze heures sous des meules (1);
Ils vont, de l'aube au soir, faire éternellement
Dans la même prison le même mouvement,
Accroupis sous les dents d'une machine sombre,
Monstre hideux, qui mâche on ne sait quoi dans l'ombre.
Innocents dans un bagne, anges dans un enfer,
Ils travaillent. Tout est d'airain, tout est de fer.
Jamais on ne s'arrête et jamais on ne joue.
Aussi, quelle pâleur ! la cendre est sur leur joue.
Il fait à peine jour, ils sont déjà bien las.
Ils ne comprennent rien à leur destin, hélas !
Ils semblent dire à Dieu: Petits comme nous sommes,
Notre père, voyez ce que nous font les hommes !
O servitude infâme imposée à l'enfant !
Rachitisme (2) ! travail dont le souffle étouffant
Défait ce qu'a fait Dieu, qui tue, oeuvre insensée,
La beauté sur les fronts, dans les coeurs la pensée,
Et qui ferait - c'est là son fruit le plus certain ! -
D'Apollon un bossu, de Voltaire un crétin !

Travail mauvais qui prend l'âge tendre en sa serre,
 Qui produit la richesse en créant la misère,
 Qui se sert d'un enfant ainsi que d'un outil !
 Progrès dont on demande: Où va-t-il ? que veut-il ?
 Qui brise la jeunesse en fleur ! qui donne, en somme,
 Une âme à la machine et la retire à l'homme !
 Que ce travail, haï des mères, soit maudit !
 Maudit comme le vice où l'on s'abâtardit,
 Maudit comme l'opprobre (3) et comme le blasphème !
 O Dieu ! qu'il soit maudit au nom du travail même,
 Au nom du vrai travail, saint, fécond, généreux,
 Qui fait le peuple libre et qui rend l'homme heureux !

Victor HUGO,
Les Contemplations, 1856,
 Livre III: " Les Lutttes et les Rêves ".

- (1) meules: machines servant à broyer.
 (2) rachitisme: insuffisance du développement physique due à la malnutrition.
 (3) opprobre: honte, humiliation infligée à quelqu'un.

DOCUMENT 5

Ce dessin a illustré un article intitulé "Un plan d'action pour abolir le travail des enfants"



PANCHO,
Le Monde, 1^{er} novembre 1997

EPREUVE D'ANGLAIS.

DURÉE : 2 HEURES

COEFFICIENT : 2

L'usage de la calculatrice est interdit.
L'usage d'un dictionnaire bilingue est autorisé

ORGANIC FOOD IS A WASTE OF MONEY

Organic food is neither safer nor more nutritious than conventionally grown food and people are wasting their money by paying a premium (1) for it, the head of the Food Standards Agency said yesterday.

Sir John Krebs, chairman of the government-appointed body, said there was no evidence that organic food was healthier than conventionally grown produce. He said he believed that people were only getting value for their money if they wished to pay for the holistic approach(2) to farming. "They're not getting value for money, in my opinion and in the opinion of the Food Standards Agency, if they think they're buying food with extra nutritional quality or extra safety. We don't have the evidence to support those claims", he said.

Environmental and organic organisations said they were "appalled" by Sir John's comments, who they believed was "out of touch" with consumers and failing to inform himself properly about organic food.

In Britain sales of organic food are soaring by 40 per cent a year. The projected organic food sales for this year are £546m and expected to reach more than £1bn by 2002. Customers pay an average of 70 per cent more for organic produce than the ordinary equivalents.

Sir John said he thought the market was booming because people were seduced by an image of healthy and nutritious products. "I think the organic industry relies on image and that image is one that many consumers clearly want to sign up to", he said. [...]

Harry Hadaway, a spokesman for the Soil Association, a standards setter(3) which registers organic farmers, said: "We are deeply concerned that Sir John Krebs of the FSA is failing to inform himself and be objective in the on-going national food debate." [...]

Independent scientific tests, commissioned by the BBC, found conventionally grown carrots free of pesticides. Scientists at the Eclipse Scientific Group laboratory in Cambridgeshire extensively tested carrots bought anonymously from supermarkets. An organic British carrot, an organic carrot from abroad and a conventionally grown carrot were examined for more than 40 pesticide residues. The tests were negative for all three.

This latest research contradicts previous evidence by the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food's working party on pesticide residues which showed in 1998 that 26 per cent of foods tested contained pesticide residues and 1.3 per cent contained residues above legal levels. Even organic carrots were found to contain residues, albeit at levels 10 times lower than the maximum level allowed in non-organic vegetables.

Sandra Bell, real food campaigner for Friends of the Earth said the group was "appalled" that Sir John had launched this attack. "Organic food avoids synthetic pesticides, the routine use of antibiotics and genetically modified ingredients", she said.

"No one knows what long-term impact these may have on human health. If there is no problem with pesticides in conventionally grown food, why does the government advise people to wash and peel vegetables before giving them to children?"

- Cherry Norton -

THE INDEPENDENT, 2 November 2000.

Footnotes:

(1) (ligne 2) to pay a premium: payer plus cher

(2) (ligne 6) holistic approach: approche holistique, approche globale.

(3) (ligne 9) a standards setter: < to set standards: fixer des normes

QUESTIONS

PART 1: Compréhension (10 points)

- 1) Vous ferez un compte rendu du texte en langue française en mettant en évidence les idées essentielles. (environ 1150 mots : +/- 10 %)
- 2) Vous traduirez le texte en français (titre inclus) jusqu'à << to support those claims >>, he said. (ligne 9)

PART 2: Expression en langue anglaise (10 points)

Answer the following questions in English (150- 200 words)

- 1) What are the two positions expressed in this article ? (≈ 70 words)
- 2) Where do you stand ? Do you pay much attention to what you eat and drink ? Develop your point of view. (≈ 130 words).

EPREUVE DE MATHÉMATIQUES.

DURÉE : 2 HEURES

COEFFICIENT : 1,5

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

Le formulaire de mathématiques est joint au sujet. (*mais pas dans ces annales. N D L R*)
2 feuilles de papier millimétré par candidat.

Exercice 1 (12 points)

Les parties A et B peuvent être traitées indépendamment l'une de l'autre.

On se propose d'étudier l'évolution en fonction du temps des températures d'un bain et d'un solide plongé dans ce bain. Ces températures (à l'instant t) sont respectivement notées $\alpha(t)$ et $\beta(t)$. Le temps t est exprimé en seconde et les températures en °C.

Partie A

Les températures notées $\alpha(t)$ et $\beta(t)$ vérifient les conditions suivantes:

$$\left\{ \begin{array}{l} (1) \alpha'(t) = -0,011(\alpha(t) - \beta(t)) \\ (2) \beta'(t) = 0,021(\alpha(t) - \beta(t)) \end{array} \right. \quad \text{avec} \quad \left\{ \begin{array}{l} \alpha(0) = 40 \\ \beta(0) = 10 \end{array} \right.$$

1. On pose $f(t) = \alpha(t) - \beta(t)$.
- Vérifier que f est une solution de l'équation différentielle $y' + 0,032y = 0$.
 - Résoudre l'équation précédente.
 - Calculer $f(0)$ et montrer que $f(t) = 30 e^{-0,032 t}$.
2. Soit F la primitive de f qui vérifie $F(0) = 0$.
- Exprimer $F(t)$ en fonction de t .
 - À l'aide de la condition (2) justifier que $\beta(t) = K + 0,021 F(t)$

où K est une constante.

c. Déterminer K et donner une expression de $\beta(t)$ en fonction de t .

Partie B

Pour tout t dans $[0; +\infty[$ on pose :

$$\begin{cases} \alpha(t) = 5/16 (95 + 33 e^{-4t/125}) \\ \beta(t) = 5/16 (95 - 63 e^{-4t/125}) \end{cases}$$

1. Déterminer la limite de α ainsi que celle de β en $+\infty$. Que peut-on en déduire pour les courbes représentatives de ces fonctions ?

2. Calculer la dérivée et donner les variations de chacune des fonctions α et β .

3. Construire les courbes représentatives des fonctions α et β dans un repère orthogonal (sur papier millimétré; unités graphiques: 1 cm pour 5 secondes en abscisse et 2 cm pour 5°C en ordonnée; on fera varier t entre 0 et 120 secondes).

4. À partir de quel instant la différence de température entre le solide et le bain est-elle inférieure à 1 °C ?

Exercice 2 (8 points)

Un magicien prétend qu'il peut souvent deviner à distance la couleur d'une carte tirée au hasard d'un jeu de cartes bien battu et comportant des cartes de deux couleurs différentes en nombre égal.

On appelle p la probabilité que le magicien donne une réponse juste (succès) lors d'un tirage.

Si le magicien est un imposteur on a $p = 1/2$ sinon $p > 1/2$.

On appellera échantillon de taille n toute réalisation de n tirages successifs d'une carte dans le jeu, avec remise.

Partie A

On suppose $p = 1/2$ et on note Y la variable aléatoire qui, à tout échantillon de taille n , associe le nombre de succès du magicien. (On arrondira les probabilités au dix millième le plus proche.)

1. Dans cette question on prend $n = 20$.

a. Quelle est la loi suivie par Y ? Donner ses paramètres.

b. Calculer la probabilité $P(Y = 15)$.

2. Dans cette question on prend $n = 100$. On admet que la variable aléatoire Y peut être approchée par une variable aléatoire Z suivant une loi normale.

a. Préciser les paramètres de cette loi normale.

b. Utiliser cette approximation pour calculer $P(Y > 60)$.

Partie B

On appelle F la variable aléatoire qui, à tout échantillon de taille n , associe la fréquence des succès obtenus par le magicien au cours des n tirages d'une carte. On admet que F suit la loi normale de moyenne inconnue p et d'écart type $\sqrt{p(1-p)/n}$.

On construit un test unilatéral permettant de détecter, pour un échantillon de taille 100, au risque de 5%, si le magicien est un imposteur.

On choisit comme hypothèse nulle $H_0 : p = 1/2$, et comme hypothèse alternative $H_1 : p > 1/2$.

1. Calculer, sous l'hypothèse H_0 , le réel positif h tel que $P(F \leq 1/2 + h) = 0,95$.

2. Énoncer la règle de décision du test.

3. Sur un échantillon de taille 100, le magicien a obtenu 64 succès. Peut-on considérer, au risque de 5%, que le magicien est un imposteur ?

EPREUVE DE SCIENCES PHYSIQUES.

DURÉE : 2 HEURES

COEFFICIENT : 2,5

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

*L'usage de la calculatrice est autorisé.

I) SPECTROPHOTOMETRIE (12 points/50)

On réalise le dosage d'une solution de permanganate de potassium, de formule $K^+MnO_4^-$, par spectrophotométrie.

1) Comment choisit-on la longueur d'onde de travail ? Pourquoi ?

2) Le coefficient d'absorption linéique molaire, pour la longueur d'onde choisie, est :

$\epsilon = 216 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{m}^2$. La cuve utilisée a une épaisseur $l = 1 \text{ cm}$.

Une solution de permanganate de potassium de concentration molaire inconnue $\ll c \gg$ possède, pour cette longueur d'onde, une absorbance $A = 0,540$.

a) Énoncer la loi de Beer-Lambert.

Préciser la signification de chaque terme et exprimer les unités dans le Système International.

b) Déterminer la concentration molaire $\ll c \gg$ de la solution en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, puis sa concentration massique $\ll c' \gg$ en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Masse molaire de $KMnO_4$: $158 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

c) Définir la transmittance T de la solution. Calculer sa valeur.

3) Une impureté, de coefficient d'absorption linéique molaire $\epsilon = 100 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{m}^2$, pour la longueur d'onde précédente, a été mélangée à la solution de permanganate de potassium dont l'absorbance vaut maintenant $A' = 0,544$.

Calculer la concentration molaire $\ll c_i \gg$ de cette impureté.

II) RADIOACTIVITÉ DE L'OXYGÈNE 15 (13 points/50)

On mesure le débit sanguin cérébral d'un patient en lui injectant de l'eau marquée à l'oxygène 15. L'oxygène 15 ayant une période radioactive $T = 2 \text{ min}$, on peut répéter les injections d'eau toutes les 20 minutes.

L'oxygène 15 est un émetteur de positons. Leur parcours dans les tissus biologiques est de l'ordre du millimètre: ils s'annihilent dès qu'ils rencontrent un électron en donnant deux photons gamma éjectés dans des sens opposés, à 180° l'un de l'autre. Une gamma-caméra spécifique enregistre le passage de ces paires de photons et reconstitue l'image du cerveau.

1) Indiquer à quel type de radioactivité (β^- , β^+ , α) correspond l'émission d'un positon par un noyau d'oxygène 15. Écrire l'équation nucléaire correspondante en rappelant les lois de conservation utilisées et en précisant le nom de tous les corps produits.

2) Calculer la constante radioactive λ de l'oxygène 15 en min^{-1} , puis en s^{-1} (unité SI). L'activité initiale A_0 d'une injection est égale à $3,7 \cdot 10^7 \text{ Bq}$. Exprimer son activité $A(t)$ au bout d'un temps t exprimé en minutes. En déduire la valeur du rapport $A(20) / A_0$. Justifier que l'on puisse faire une nouvelle injection au bout du temps $t = 20 \text{ min}$.

3) En admettant que le volume V d'une injection d'activité initiale $A_0 = 3,7 \cdot 10^7 \text{ Bq}$ est égal à

5 cm³, calculer le nombre No de noyaux radioactifs qu'elle contient initialement. En déduire, dans ce cas, la proportion de molécules d'eau marquées dans l'injection.

Données:

Éléments de la classification: ₅ B; ₆ C; ₇ N; ₈ O; ₉ F; ₁₀ Ne;

ρ (eau) = 1000 kg.m⁻³;

Masse molaire de l'eau H₂O = 18 g.mol⁻¹;

Nombre d'Avogadro: N_A = 6,02 x 10²³ mol⁻¹;

On rappelle les relations $\lambda = \ln 2/T$ et $N = A/\lambda$.

III) CHIMIE ORGANIQUE (13 points/50)

On considère le composé A: (Z) 3,4-diméthylpent-2-ène.

1) Donner la représentation semi-développée plane du composé A.

2) On fait réagir le bromure d'hydrogène, de formule HBr, en milieu acide sur A. On obtient deux produits B et C, B étant majoritaire.

2.1) Écrire l'équation-bilan de la réaction.

2.2) Donner les noms et les formules semi-développées planes de B et C.

2.3) Indiquer combien de stéréoisomères peut donner C.

3) Représenter le stéréoisomère (R) de B en rappelant les règles utilisées.

4) On réalise la réaction de C sur le magnésium dans l'éther anhydre. Il se forme le composé E. Écrire l'équation-bilan de la réaction.

5) Le composé E réagit avec le propanal pour donner en deux étapes (la deuxième étape est une hydrolyse) le composé F.

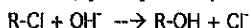
Écrire les équations-bilans de ces deux étapes.

Déterminer la formule du composé F et donner son nom.

IV) CINÉTIQUE (12 points/50)

On étudie la réaction d'hydrolyse, en milieu basique, du 2-chloro-2-méthyl propane (ou chlorure de tertibutyle): (CH₃)₃ - C - Cl, que l'on pourra noter R - Cl.

Les ions OH⁻ sont fournis par de la potasse (hydroxyde de potassium) de formule K⁺ + OH⁻.



La solution initiale contient 0,0510 mol.L⁻¹ de 2-chloro-2-méthyl propane et 0,0510 mol.L⁻¹ de potasse K⁺ + OH⁻.

On détermine la concentration molaire, x, en mol.L⁻¹, de R - Cl restant à différents instants t.

t (heures)	0	0,5	1	2	4	6	8
x(mol.L ⁻¹)	0,0510	0,0474	0,0441	0,0381	0,0284	0,0213	0,0158

1) Vérifier (graphiquement ou par le calcul, au choix) que la réaction est du premier ordre.

On démontrera la relation utilisée.

2) Montrer que la constante de vitesse k vaut 0,146 h⁻¹.

3) Calculer le temps de demi-réaction. On démontrera la relation utilisée.

4) Combien s'est-il formé de ROH à l'instant t = 7 heures ?

EPREUVE DE BIOCHIMIE BIOLOGIE.

Épreuve E4

DURÉE : 4 HEURES

COEFFICIENT : 6

Calculatrice autorisée.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES:

- 1 - Le sujet propose a un caractère pluridisciplinaire. Le candidat devra veiller à répondre de manière concise aux questions posées afin de pouvoir traiter l'ensemble du sujet.
- 2 - Il est suggéré de consacrer à chaque question un temps tenant compte du nombre de points attribués.

STRESS CELLULAIRES...

A - Des exemples de stress chez les Eucaryotes (83 points).

1) L'accident vasculaire cérébral: AVC (12 points).

Provoqué par une anoxie, il est la troisième cause de mortalité et de handicap en France. L'hypertension artérielle chronique est un facteur favorisant. Elle s'installe lorsque les systèmes de contrôle de l'organisme ne permettent plus de maintenir la pression artérielle dans les valeurs physiologiques définies par le sexe, l'âge, le poids. . .
La pression artérielle est déterminée expérimentalement à l'aide de l'équation fondamentale:

$$\text{Pression artérielle} = \text{débit cardiaque} \times \text{résistance périphérique vasculaire totale.}$$

Pour un individu de corpulence moyenne et d'activité physique modérée, la fréquence cardiaque et le volume systolique sont respectivement de l'ordre de 70 battements par minute et de 80 mL.

- 1.1) Donner une définition de la pression artérielle.
- 1.2) Indiquer à quoi correspond le volume systolique et calculer le débit cardiaque moyen.
- 1.3) Présenter succinctement les principales caractéristiques des deux composantes du système nerveux autonome impliquées dans les régulations.
- 1.4) Comment fonctionnent ces deux composantes du système nerveux dans le cadre de la régulation d'une hypertension ?

2) Un aspect cellulaire du stress oxydatif (17 points).

2.1) Une culture cellulaire, servant de modèle expérimental, est soumise à une anoxie temporaire puis replacée dans des conditions idéales de survie. On suit l'évolution de la culture après ce stress oxydatif. Parallèlement, on réalise une culture témoin.

Durée de l'anoxie en minutes	0	30	60	90	120	240
Taux de survie par rapport au témoin (%)	100	95	90	88	85	25

Quelles sont les conséquences de l'anoxie ?

2.2) Pour combattre les effets dus au stress oxydatif sur les cellules, il est nécessaire de connaître le cycle cellulaire. La plupart des études sont menées sur des cellules tumorales.

- 2.2.1) Citer et définir les étapes d'un cycle cellulaire.
- 2.2.2) Présenter les particularités des cellules tumorales.
- 2.2.3) Dans l'expérience suivante, des cellules tumorales sont cultivées en boîtes de Pétri jusqu'à la formation d'un tapis cellulaire uniforme. La densité cellulaire est déterminée à différents temps; les résultats sont donnés ci-dessous:

Temps	to	to+40h	to+80h	to+120h	to+160h
Cellules par cm ²	$2,5 \cdot 10^3$	10^4	$4 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^5$

À partir des résultats du tableau, déterminer la durée du cycle cellulaire.

2.2.4) Un échantillon de la culture est prélevé. L'ADN, rendu fluorescent par un colorant, est quantifié sur quatre jours par spectrofluorimétrie en cytomètre de flux (résultats fournis pour les jours 1 et 4).

Dans les conditions utilisées, la fluorescence des cellules est proportionnelle à la quantité d'ADN nucléaire.

L'appareil délivre les histogrammes monoparamétriques présentés dans le document n° 1.

- Que représente un pic sur un tel graphique ?

- Indiquer et justifier à quelles phases du cycle cellulaire correspondent les pics 1 et 2 de l'histogramme du jour 1.

- À quelle phase du cycle cellulaire correspond la région comprise entre les 2 pics ?

2.2.5) Une des particularités des cellules tumorales est la modification quantitative du patrimoine génétique.

En quoi la comparaison des histogrammes des jours 1 et 4 témoigne-t-elle de cette modification ?

3) Un aspect biochimique du stress oxydatif (54 points).

Chez les Eucaryotes, la phosphorylation oxydative s'effectue dans les mitochondries. Elle implique la réduction du dioxygène avec formation d'eau.

Les électrons du NADH, H⁺ ou du succinate sont pris en charge par une chaîne de transporteurs appelée chaîne respiratoire (document n° 2).

L'AVC conduit à un défaut de fonctionnement de cette chaîne et aboutit à la formation de radicaux libres oxygénés (RLO).

3.1) Phosphorylation oxydative et théorie chimio-osmotique.

3.1.1) Donner la légende des chiffres (de 1 à 8) portés sur le document n° 2.

3.1.2) Quelle propriété physico-chimique de l'ubiquinone justifie sa place dans la chaîne ?

3.1.3) Au cours de la phosphorylation oxydative effectuée avec une suspension de mitochondries dans un milieu de pH 7 et à 37°C, le pH interne de la matrice est mesuré à 7,8.

3.1.3.1)- Calculer le rapport $[H]_{ext} / [H]_{int}$

- Evaluer l'énergie associée au déplacement des protons.

- Quel est le sens spontané de ce déplacement ?

Données: la variation d'enthalpie libre liée au déplacement d'une molécule X d'un compartiment 1 vers un compartiment 2 est donnée par la formule:

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln ([X]_1 / [X]_2)$$

avec $R = 8,32 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

T = température en Kelvin

3.1.3.2) Montrer que le gradient de pH n'est pas suffisant pour générer de l'ATP.

Donnée: ΔG (synthèse d'ATP à partir d'ADP) = + 52,5 kJ.mol⁻¹ dans les conditions expérimentales.

3.1.3.3) - Calculer la valeur minimale du potentiel de membrane $\Delta \Psi$ nécessaire pour la synthèse d'ATP.

- De la matrice ou de l'espace intermembranaire, quel est le compartiment qui a le potentiel le plus élevé ?

Données:

- Les protons sont transférés deux par deux.

- La variation d'enthalpie libre liée au déplacement d'un ion X, d'un compartiment 1 vers un compartiment 2 de potentiel différent, est donnée par la formule:

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln ([X]_1 / [X]_2) + n \cdot F(\Psi_2 - \Psi_1)$$

R = constante des gaz parfaits = $8,32 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

T = température en Kelvin

F = constante de Faraday = $96500 \text{ J} \cdot \text{V}^{-1}$

n = charges transférées

Ψ = potentiel électrique du compartiment ($\text{V} \cdot \text{mol}^{-1}$)

$\Delta\Psi = \Psi_2 - \Psi_1$ représente donc le potentiel de membrane

3.2) Stress oxydatif lors de l'accident vasculaire cérébral.

Il s'explique par la cascade d'événements présentés dans le document n° 3.

Il existe plusieurs types de récepteurs au glutamate. Un des plus étudiés est un canal ionique non spécifique, le récepteur R-Glu, dont le principal agoniste in vitro est le N-méthyl D-aspartate (NMDA). Pour étudier in vitro le fonctionnement de ce récepteur, on soumet l'élément post-synaptique d'une synapse neuro-neuronale à l'action de molécules diverses. On enregistre les phénomènes électriques au niveau post-synaptique.

3.2.1) Légender la synapse schématisée dans le document n° 4 en indiquant sur la copie la signification des éléments A, B, C, D, E.

3.2.2) Définir les termes agoniste et antagoniste.

3.2.3) Quelle est la nature du phénomène électrique observé lors de l'expérience 1 en présence de glutamate ou de NMDA (document n° 5)? À quel mouvement d'ions est-il associé ?

3.2.4) En utilisant les documents n° 5 et n° 6, justifier la qualité d'agoniste pour le NMDA et proposer un effet possible du D-AP5.

3.2.5) La formation d'anion superoxyde se produit lors de phénomènes d'anoxie-réoxygénation. Le dioxygène est alors réduit directement par l'ubiquinone en anion superoxyde. En même temps, on peut noter une augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol (cf. document n° 3).

3.2.5.1) Quelle est la conséquence de la formation de l'anion superoxyde sur la synthèse de l'ATP ?

3.2.5.2) Comment cela peut-il expliquer l'augmentation de calcium cytosolique ?

3.3) Rôle protecteur du glutathion.

Le glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine ou GSH) est un tripeptide dont les propriétés réductrices jouent un rôle majeur dans la protection contre le peroxyde d'hydrogène, produit de transformation des RLO. Le rôle protecteur du glutathion résulte de sa capacité à être oxydé. La réaction est catalysée par la glutathion peroxydase.



3.3.1.) Écrire la formule développée du glutathion.

3.3.2) Deux des acides aminés étudiés sont sous forme énantiomérique L. Définir le terme énantiomère. Quel acide aminé ne possède pas d'énantiomère ? Justifier.

Écrire les formules développées de la L-Cystéine et de la D-Cystéine.

3.3.3) À l'aide du document n° 7, expliquer l'ionisation du glutathion dans les conditions cellulaires (pH = 7,3).

3.3.4) La glutathion réductase assure le réapprovisionnement en glutathion réduit:



Le NADP réduit nécessaire à l'activité de la glutathion-réductase est produit essentiellement lors de deux étapes de la voie non cyclique des pentose-phosphate.

Compléter le document n° 8.

B - Des exemples de stress chez les Procaryotes (37 points).

1) Éléments de taxonomie et de physiologie bactériennes (14 points).

E. faecalis appartient au genre *Enterococcus*. Les entérocoques sont caractérisés par un GC % inférieur à 50 %. La souche type ATCC 19433 au sein de l'espèce *E. faecalis* présente un GC de 38,6 %.

Si leur niche d'élection est la sphère intestinale, les entérocoques sont omniprésents. Depuis quelques années, ils constituent une cause croissante d'infections nosocomiales. *E. faecalis* est devenue une bactérie opportuniste redoutable.

1.2) Deux bactéries sont classées dans la même espèce si elles présentent 70 % d'homologie. Expliciter cette notion.

1.3) Peut-on affirmer que deux souches de même GC% appartiennent à la même espèce ?

1.4) Que signifient germe opportuniste et infection nosocomiale ?

1.5) L'adhésion des bactéries aux tissus est une étape fondamentale de l'infection. Citer deux structures bactériennes favorisant cette adhésion.

1.6) La sévérité des infections est liée aux difficultés thérapeutiques consécutives au développement de la polyrésistance d' *E. faecalis* aux antibiotiques. Dans le cas des β -lactamines, la résistance est due à une faible affinité de l'antibiotique pour sa cible. Quelle est cette cible ? Quelles sont les cibles possibles pour un antibiotique ?

2) Culture d' *Enterococcus faecalis* en conditions de stress (23 points).

2.1) Le document n° 9 donne la composition d'un milieu synthétique, le milieu DM (defined medium), et les résultats expérimentaux de la croissance d' *E. faecalis* sur ce milieu.

2.1.1) Définir et déterminer graphiquement l'ordre de grandeur du temps de génération de la souche en croissance.

2.1.2) Le temps de génération de cette bactérie en milieu coeur-cerveille (CC) dans les mêmes conditions est de 32 minutes. Comparer cette valeur avec celle obtenue en milieu DM et commenter.

2.2) L'influence de la concentration en sels biliaires sur la croissance d' *E. faecalis* figure dans le document n° 10. Quel est l'effet d'une concentration à 0,08 % en sels biliaires sur le temps de génération ?

2.3) On étudie l'influence de la concentration en chlorure de sodium.

2.3.1) Que se produit-il lorsqu'on transfère une bactérie dans un milieu d'osmolarité plus élevée ?

2.3.2) *E. faecalis* est incubé dans les milieux de culture DM et CC contenant des concentrations en NaCl variables (0 à 1,8 mol/L). La concentration minimale inhibitrice (CMI) en NaCl est estimée à 1,8 mol/L pour le milieu CC.

On mesure l'absorbance des cultures à 570 nm après 16 heures d'incubation. Les résultats figurent sur le document n° 11 a.

Quel est l'effet d'une augmentation de la concentration en NaCl sur la biomasse dans le milieu DM ?

En déduire la CMI en NaCl dans le milieu DM. Justifier.

Donnée: l'absorbance à $t = 0$ est de 0,1 UA.

2.3.3) Pour expliquer la différence de comportement d' *E. faecalis* dans des conditions de stress hyperosmotique, on compare la croissance de la bactérie:

- en milieu DM (contrôle)

- en milieu DM avec une concentration en NaCl de 0,75 mol/L

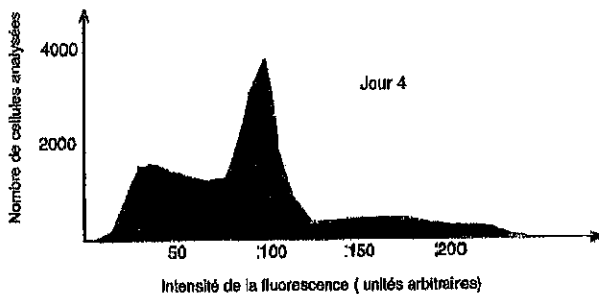
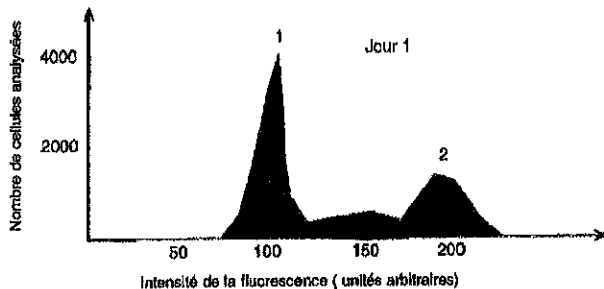
- en milieu DM avec une concentration en NaCl de 0,75 mol/L et avec de la glycine bêtaïne à 1 mmol/L.

Les résultats figurent sur le document n° 11 b.

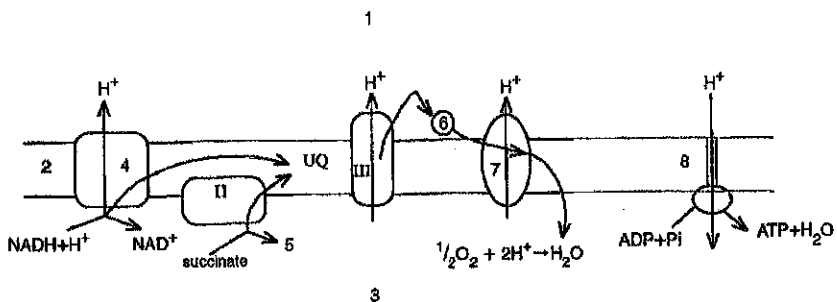
Comment évoluent la biomasse et le taux de croissance en milieu DM additionné de NaCl et de glycine bêtaïne ?

Que peut-on en conclure quant au rôle de la glycine bêtaïne ?

DOCUMENT N°1



DOCUMENT N°2 : schéma résumé de la chaîne respiratoire

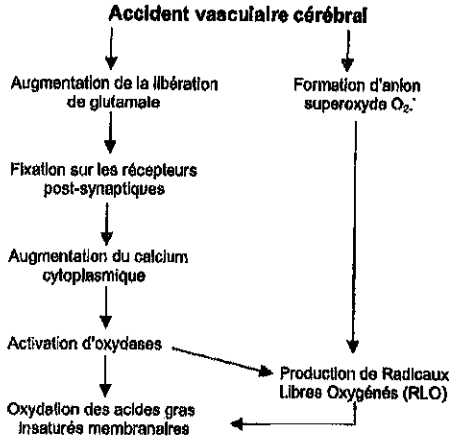


II Succinate déshydrogénase

UQ Ubiquinone

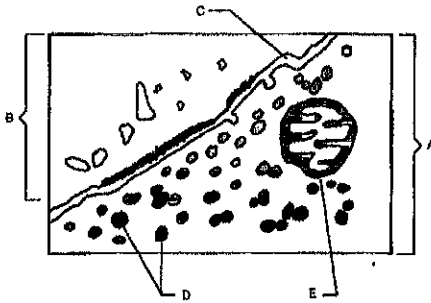
III Complexe cytochrome b/c₁

DOCUMENT N°3



Remarque : Pour les besoins du sujet, les phénomènes ont été simplifiés.

DOCUMENT N°4 : Jonction synaptique entre cellules nerveuses (x 100.000)

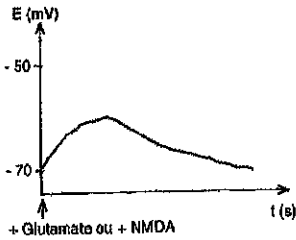


D'après « Atlas de Biologie Cellulaire » (Roland - Szöllösi - Callen) Masson ed.

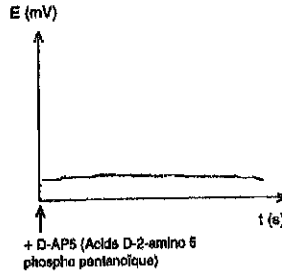
DOCUMENT N°5

Phénomènes électriques enregistrés au niveau post-synaptique

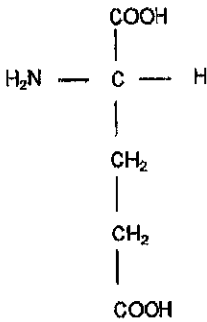
Expérience 1



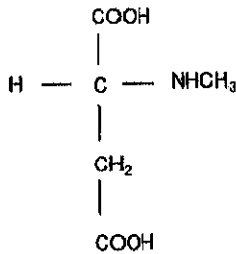
Expérience 2



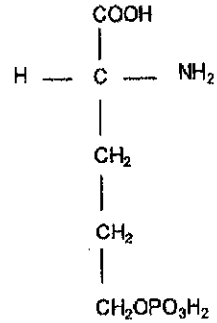
DOCUMENT N°6



Acide L-glutamique



Acide N-méthyl D aspartique
(NMDA)



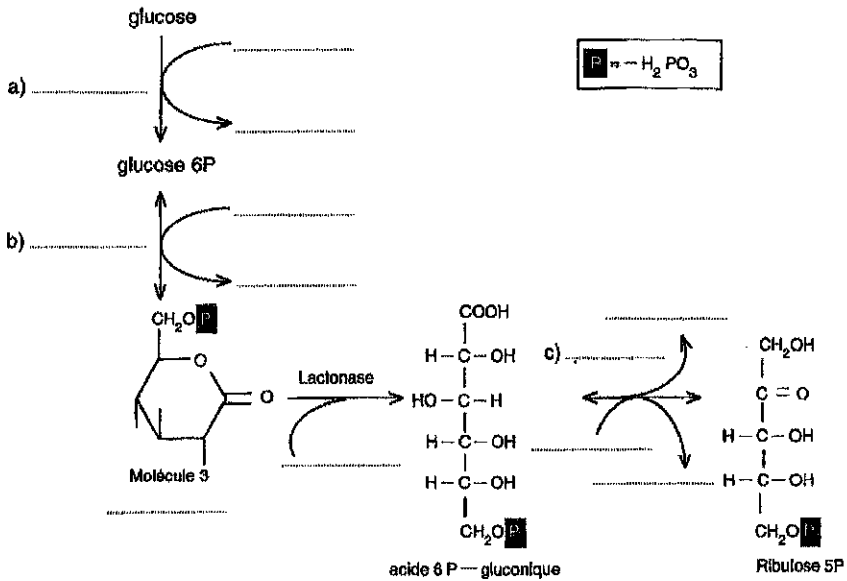
Acide D-2-amino-5-phosphopentanoïque
(D-AP5)

DOCUMENT A RENDRE AVEC LA COPIE

DOCUMENT N°7

Acide aminé	Code	Nom chimique	pK _a α-COOH	pK _a α-NH ₂	pK _a R chaîne latérale
cystéine	C	acide 2 amino 3 thio propanoïque	1,7	10,8	8,3
acide glutamique	E	acide 2 amino pentane dioïque	2,2	9,2	4,3
glycine	G	acide amino éthanique	2,3	9,5	---

DOCUMENT N°8 : production de NADPH.H⁺



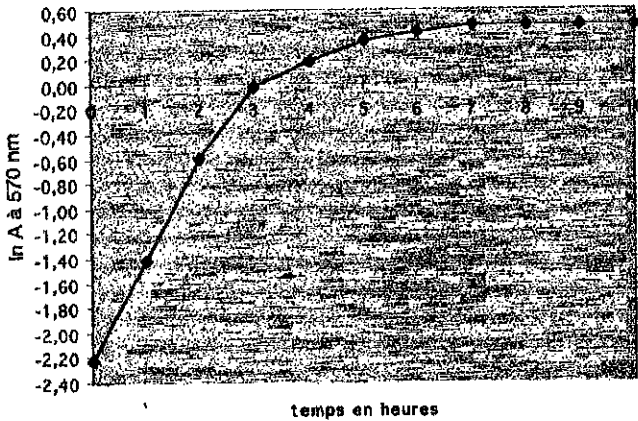
DOCUMENT N°9 : composition du milieu défini (DM)

Par litre d'eau distillée :

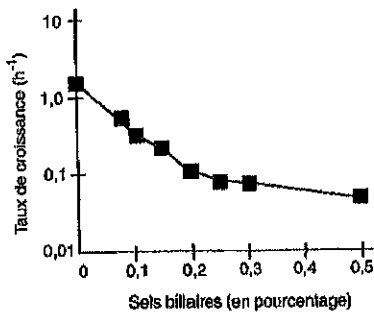
- | | | |
|-------------------------|------------------------------|--|
| - 5 g glucose | - 2 g NH_4Cl | - 6,8 g KH_2PO_4 |
| - 1 g acétate de sodium | - 0,6 g citrate de sodium | - 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ |

- sels d'oligoéléments
- supplémentation en acides aminés (300 à 100 mg selon les acides aminés)
- supplémentation en bases azotées (10 mg de chaque base)

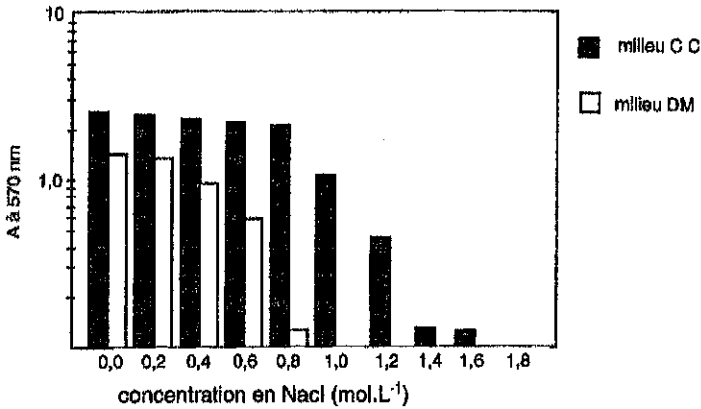
Courbe de croissance de *E. faecalis* en milieu défini (DM)
 $\ln A_{570 \text{ nm}} = f(t)$.



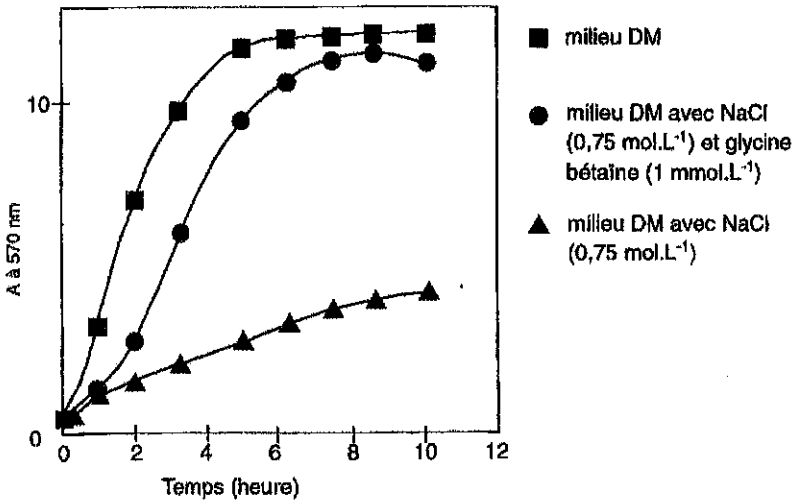
DOCUMENT N°10 : influence de la concentration en sels biliaires sur le taux de croissance



DOCUMENT N°11a : influence de la concentration en chlorure de sodium sur la croissance d'*E. faecalis* ATCC 19433



DOCUMENT N°11b : effet de la glycine bétaïne sur la croissance d'*E. faecalis* en condition de stress hyperosmotique



EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE.

Première partie :

ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

Épreuve E5.Unité U51

DURÉE : 4 HEURES

COEFFICIENT : 4

EVALUATION DE LA FRAICHEUR DU POISSON.

Calculatrice autorisée

La sécurité alimentaire est une question d'actualité: on a pu le constater récemment au travers << d'affaires >> qui ont défrayé la chronique (<< vache folle >>, pollution à la dioxine, boissons gazéifiées suspectes ...).

Dans la filière des produits de la mer, la fraîcheur du poisson est une qualité essentielle; elle peut se définir comme suit: un poisson frais a des caractères qui sont le plus proche possible de ceux qu'il possède à l'état vivant.

Divers critères permettent d'évaluer la fraîcheur du poisson. Ils doivent être quantifiés par des méthodes d'analyse rapides et fiables.

PREMIERE PARTIE: ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES

1)Évaluation de la fraîcheur du poisson: l'examen bactériologique.(20 points)

1-1) Évolution de la charge microbienne au cours de l'entreposage du poisson.

Au cours de l'entreposage du poisson, à température ambiante, les dénombrements des flores suivantes ont été réalisés:

- FMAT: Flore Mésophile Aérobie Totale,
- FPAT: Flore Psychrotrophe Aérobie Totale,
- coliformes totaux,
- coliformes thermotolérants ou fécaux.
- staphylocoques.

L'évolution de ces flores en fonction du temps de décomposition du poisson est représentée dans le document n° 1.

1-1-1) Définir les termes mésophile et psychrotrophe.

1-1-2) Après avoir défini le terme << coliformes >>, différencier coliformes totaux et coliformes thermotolérants.

1-1-3) Les coliformes thermotolérants sont des indicateurs représentatifs de l'état sanitaire d'un produit alimentaire.

1-1-3-1) Quelle signification donner à la présence de coliformes thermotolérants dans un produit alimentaire ?

Pourquoi leur recherche est-elle préférée à celle des coliformes totaux ?

1-1-3-2) Les coliformes thermotolérants ne sont pas les seuls microorganismes utilisés en microbiologie alimentaire comme indicateurs reflétant l'état hygiénique d'un produit.

Présenter trois critères ou propriétés que doit posséder un bon indicateur.

1-1-4) Les dénombrements des flores présentées dans le document n° 1 ont été réalisés par incorporation dans la masse (ou en profondeur) avec coulage en surface d'une deuxième couche de milieu.

1-1-4-1) Indiquer les différentes étapes de la technique en respectant la chronologie des opérations.

1-1-4-2) Justifier l'apport d'une deuxième couche de milieu en surface avant incubation.

1-1-5) Commenter les courbes obtenues dans le document n° 1.

1-2) Impédancemétrie.

L'impédancemétrie ou variation d'impédance repose sur le principe suivant:

- les microorganismes en se développant transforment les molécules constitutives du milieu de culture en molécules plus petites, de charge électrique plus élevée, ce qui entraîne une augmentation de la conductance;
 - ces modifications sont mesurées entre deux électrodes plongées dans le milieu de culture;
 - on définit le temps de détection (Td) comme l'intervalle de temps qui s'écoule entre l'ensemencement du milieu et la brusque augmentation de conductance.
- 1-2-1) Le tableau ci-dessous indique le nombre de coliformes thermotolérants par gramme de poisson (obtenu par la méthode du NPP = nombre le plus probable) en fonction du temps de détection.

Td (heures)	Ln N (N = nombre de coliformes thermotolérants par gramme de poisson)
2	20,65
3	18,26
4	15,87
5	13,49
6	11,10
7	8,70
8	6,33
9	3,91

- Donner l'équation de la droite de régression $\ln N = f(Td)$.
- Déterminer la valeur du coefficient de corrélation.
- Conclure.

1-2-2) En déduire le nombre de coliformes thermotolérants présents dans l'échantillon analysé dans le document n° 2.

1-2-3) Quel intérêt présente cette méthode par rapport à celle présentée en 1.1.4. ?

2) Évaluation de la fraîcheur du poisson: le dosage de l'ABVT (22 points).

On nomme ABVT (Azote Basique Volatil Total) l'ensemble formé par l'ammoniac et les amines volatiles produits lors de la dégradation protéique de la chair de poisson.

2-1) La méthode de référence de détermination de l'ABVT (décision de la Commission Européenne du 08/03/1995-95/149/CE) est exposée dans le document n° 3.

C'est une méthode par distillation, s'apparentant à la méthode de KJELDAHL directe, sans minéralisation préalable.

2-1-1) On procèdera à l'analyse du document n° 3 en répondant au questionnaire suivant, concernant:

2-1-1-1) L'étape 6.1 .:

- Quel est le rôle de l'acide perchlorique ?
- Que contiennent le filtrat et le précipité ?
- Sous quelle forme sont l'ammoniac et les amines (formule générale : $R-NH_2$) ? (Justifier en écrivant les équations des réactions).

2-1-1-2) L'étape 6.2.:

- Quel est le rôle de la soude ? (Justifier en écrivant les équations des réactions).
- Quel est le rôle de l'entraînement à la vapeur ?
- À quoi sert l'acide borique ?
- Écrire les équations du titrage par l'acide chlorhydrique.

2-1-1-3) L'étape 6.4.:

Quel est le rôle de l'essai à blanc ?

2-1-2) À partir de l'analyse précédente, exposer le principe de la détermination de l'ABVT sous forme d'un plan distinguant les différentes étapes.

2-1-3) Le document n° 3 indique que la manipulation de l'acide perchlorique est dangereuse. Un extrait de la fiche toxicologique figure dans le document n° 4.

2-1-3-1) Donner la signification des deux pictogrammes.

2-1-3-2) Quelles sont les précautions individuelles à prendre, au laboratoire, dans la manipulation de ce produit ?

2-1-4) Les outils de calcul:

2-1-4-1) Établir la formule littérale permettant de calculer l'ABVT et établir une équation aux dimensions pour obtenir l'ABVT en gramme d'azote par gramme de poisson.

2-1-4-2) L'annexe II de la directive européenne donne la formule simplifiée suivante:

$$\text{ABVT (mg /100g)} = (V_1 - V_0) 28 / m$$

$V_1(\text{mL})$ = volume de solution d'acide chlorhydrique 0,01 mol.L⁻¹ utilisé pour le dosage de l'échantillon.

$V_0(\text{mL})$ = volume de solution d'acide chlorhydrique 0,01 mol. L⁻¹ utilisé pour l'essai à blanc.

$m(\text{g})$ = masse d'échantillon.

Démontrer cette formule simplifiée.

Données: $M(\text{N}) = 14 \text{ g.mol}^{-1}$.

On supposera que la masse volumique du poisson haché est 1 g.mL⁻¹.

2-1-4-3) Que représente la valeur << 2mg/100g >> citée au paragraphe 6.3 de l'annexe II de la directive européenne ?

2-2) Une étude de dégradation contrôlée du poisson a été menée dans le but d'étudier les variations de l'ABVT.

Le protocole et les résultats de cette étude sont donnés dans le document n° 5.

2-2-1) Calculer les valeurs moyennes de l'ABVT, en mg/100g, dans les prélèvements aux différents temps de l'étude.

Présenter les résultats sous forme de tableau.

2-2-2) Analyser ces résultats.

3) Évaluation de la fraîcheur du poisson: le dosage de l'histamine (38 points).

L'histamine est le produit de la décarboxylation de l'histidine. Elle est responsable de troubles plus ou moins graves avec des symptômes ressemblant à ceux d'une allergie. Le seuil de tolérance chez les sujets sensibles est de 10 mg d'histamine pour 100g de poisson.

Il existe de nombreuses méthodes de dosage de l'histamine dont:

- des méthodes par chromatographie liquide haute performance,
- des méthodes immunoenzymatiques.

3-1) Dosage de l'histamine par chromatographie liquide haute performance:

3-1-1) Quels sont les facteurs qui justifient l'expression haute performance ?

3-1-2) La phase stationnaire est une colonne Kromasil 5µm, C18, 250x4,6 mm. S'agit-il d'une chromatographie de partage en phase normale ou en phase inverse ? Justifier.

3-1-3) L'élution est réalisée en gradient binaire eau-acétonitrile. Qu'est-ce qu'une élution en gradient ? Quel est le paramètre modifié dans le gradient présenté sur le document n° 6 ?

3-1-4) À l'aide des documents n° 6 et 7, justifier l'ordre d'élution pour la putrescine et la cadavérine.

3-1-5) La méthode de dosage utilise un étalonnage externe. Donner le principe d'un dosage utilisant l'étalonnage externe. Indiquer son principal inconvénient.

3-1-6) La préparation des échantillons avant injection, nécessite:

- une extraction,

- une dérivation précolonne par le chlorure de dansyle,
- la récupération du dérivé dansylé.

Ces étapes préparatives sont présentées sur le document n° 8.

Le contrôle du rendement de ces étapes préparatives nécessite la réalisation d'échantillons supplémentés en histamine à 50 et 100 mg.kg⁻¹.

3-1-6-1) Calculer la concentration en histamine dans les échantillons injectés en µg.mL⁻¹ (les aires des pics obtenus et l'équation de la régression linéaire sont données dans le document n° 9).

3-1-6-2) Calculer la masse d'histamine en mg par kg de poisson.

Données:

- Voir document n° 7: volume injecté.
- Voir document n° 8: étapes préparatives.
- Masse volumique de l'échantillon broyé: 1 g.mL⁻¹.

3-1-6-3) Déterminer le rendement pour chaque échantillon supplémenté.

3-1-6-4) Conclure.

3-2) Détection et dosage de l'histamine selon une méthode immunoenzymatique.

On utilise un kit du commerce. La composition du test et le protocole figurent en annexe dans le document n° 10.

L'analyse de daurades << fraîches >> récupérées à l'étal d'un poissonnier est conduite comme suit:

- prélèvement, broyage et homogénéisation d'un échantillon représentatif de poisson puis pesée de 2g du broyat obtenu dans un tube à centrifuger,
- ajustement à 10 mL avec le tampon, suivi d'une agitation durant 30 min,
- centrifugation 10 min à 3000 g, à 4°C, puis élimination de la couche de graisse,
- dilution d'une aliquote de la phase aqueuse au 1/10 avec le tampon de dilution.

Cette dilution de l'aliquote est utilisée pour réaliser les essais correspondant à deux échantillons de poisson E et F, à raison de 50 µL par puits.

Les résultats d'absorbance figurent dans le tableau du document n° 11. Gamme et essais sont réalisés en double.

3-2-1) En utilisant une représentation symbolique des anticorps et des antigènes mis en jeu, schématiser les étapes c, d, e, f et g du test correspondant au document n° 10 et en souligner les aspects importants pour la réussite du dosage.

En déduire le principe de la technique et la nommer.

3-2-2) On utilise les plaques dont les puits sont sensibilisés avec de l'histamine. L'histamine à doser est présente en solution (étalons et échantillons).

En quoi consiste la sensibilisation ?

3-2-3) On pourrait théoriquement utiliser des anticorps anti-histamine marqués. Ce n'est pas le cas dans le kit correspondant au document n° 10.

Expliquer à l'aide de schémas et nommer les deux techniques ainsi utilisables.

Quels sont les avantages du procédé utilisé dans le kit correspondant au document n° 10 ?

3-2-4) Compléter le tableau du document n° 11, à rendre avec la copie.

3-2-5) Réaliser sur papier millimétré la représentation graphique $P = f(\log C)$. Commenter l'allure de cette courbe, dans l'optique d'une exploitation quantitative.

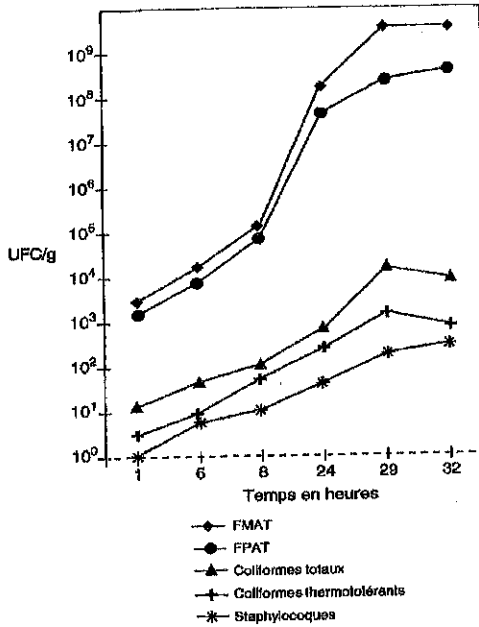
3-2-6) Déterminer la concentration d'histamine dans les échantillons de poisson analysés.

Exprimer ces résultats en µg.L⁻¹. Les traduire en µg.kg⁻¹.

Donnée: Formule de conversion: 1 µg.L⁻¹ correspond à 50 µg.Kg⁻¹.

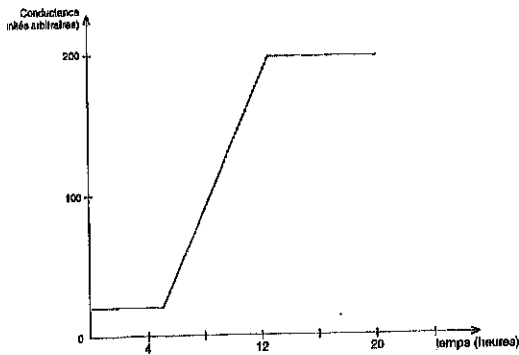
Commenter la validité des résultats obtenus.

DOCUMENT N° 1



Evolution, à température ambiante, de la charge microbienne exprimée en unité formant colonies par gramme (UFC/g) en fonction du temps de décomposition du poisson.

DOCUMENT N° 2



Evolution, en fonction du temps, de la conductance du milieu de culture inoculé avec un gramme de poisson.

DOCUMENT N° 3
DÉCISION DE LA COMMISSION
du 8 mars 1995

fixant les valeurs limites en azote basique volatil total (ABVT) pour certaines catégories de produits de la pêche et les méthodes d'analyse à utiliser.

Article premier

Les produits de la pêche non transformés appartenant aux catégories d'espèces visées à l'annexe I sont considérés comme impropres à la consommation humaine lorsque, l'évaluation organoleptique révélant un doute sur leur fraîcheur, le contrôle chimique montre que les limites suivantes en ABVT sont dépassées:

- 1) 25 milligrammes d'azote/100 grammes de chair pour les espèces visées au point A de l'annexe I;
- 2) 30 milligrammes d'azote/100 grammes de chair pour les espèces visées au point B de l'annexe I;
- 3) 35 milligrammes d'azote/100 grammes de chair pour les espèces visées au point C de l'annexe I.

ANNEXE I

CATÉGORIES D'ESPÈCES POUR LAQUELLE UNE VALEUR D'ABVT EST FIXÉE

A. *Sebastes sp.*

Helicolenus dactylopterus

Sebastichys capensis

B. Espèces appartenant à la famille des PLEURONECTIDAE (à l'exception du flétan: *Hippoglossus sp.*)

C. *Salmo salar*

Espèces appartenant à la famille des MERLUCIDAE

Espèces appartenant à la famille des GADIDAE

ANNEXE II

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN BASES AZOTIQUES VOLATILES (ABVT) CHEZ LES POISSONS ET LES PRODUITS À BASE DE POISSON: UNE PROCÉDURE DE RÉFÉRENCE.

1. Objet et champ d'application.

La présente méthode décrit une procédure de référence permettant d'identifier la teneur en azote des bases azotiques volatiles (azote basique volatil total: ABVT) chez les poissons et produits à base de poisson. Cette procédure s'applique aux teneurs d'ABVT comprises entre 5 mg/100g et 100 mg/100g.

2. Définition.

Par teneur en ABVT, il faut entendre la teneur en azote des bases azotiques volatiles déterminée par la procédure décrite. Elle s'exprime en mg/100g.

3. Brève description.

Les bases azotiques volatiles sont extraites d'un échantillon à l'aide d'une solution d'acide perchlorique. Après alcalinisation, l'extrait est soumis à une distillation par la vapeur et les constituants basiques volatils sont absorbés par un récepteur acide. La teneur en ABVT est déterminée par titrage des bases absorbées.

4. Produits chimiques.

Sauf indication contraire, utiliser des produits chimiques convenant comme réactifs. L'eau utilisée doit être soit distillée, soit déminéralisée, et au moins de la même pureté. Sauf indication contraire, il faut entendre par << solution >> une solution aqueuse.

4.1. Solution d'acide perchlorique = 6g/100 mL.

4.2. Solution de soude caustique = 20g/100 mL.

4.3. Solution d'acide chlorhydrique 0,01 mol/L.

Note: avec un appareil de distillation automatique, le titrage doit se faire avec une solution standard d'acide chlorhydrique 0,01 mol/L

4.4. Solution d'acide borique = 3g/100 mL

4.5. Agent anti-moussant au silicone.

4.6. Solution de phénolphaléine = 1g/100 mL d'éthanol à 95 %.

4.7. Solution indicateur (*Tashiro Mixed Indicator*)

Dissoudre 2g de rouge de méthyle et 1g de bleu de méthylène dans 1000 mL d'éthanol à 95 %.

5. Instruments et accessoires

5.1. Un *hachoir à viande* qui donne un hachis de poisson suffisamment homogène.

5.2. *Mélangeur* très rapide, nombre de tours compris entre 8000 min⁻¹ et 45 000 min⁻¹.

5.3. *Filtre plissé* de 150 mm de diamètre, à filtrage rapide.

5.4. *Burette* de 5 mL, graduée jusqu'à 0,01 mL.

5.5. *Appareil pour distillation à la vapeur* (schéma: voir le document n° 3 bis).

Cet appareil doit pouvoir régler différentes quantités de vapeur et en produire une quantité constante en une période de temps donnée. Il doit être conçu de telle sorte que pendant l'adjonction de substances alcalinisantes les bases libres ne puissent s'échapper.

6. Exécution.

Avertissement : lors de la manipulation d'acide perchlorique, qui est très corrosif, prendre les précautions et les mesures de prévention nécessaires.

Dans toute la mesure du possible, les échantillons doivent être préparés conformément au point

6.1. aussi rapidement que possible après leur arrivée.

6.1. Préparation de l'échantillon

Hacher soigneusement l'échantillon à analyser dans un hachoir à viande conforme au point 5.1.

Peser précisément 10g ± 0,1g de l'échantillon haché dans un récipient approprié, mélanger à 90,0 mL de solution d'acide perchlorique conforme au point 4.1., homogénéiser pendant 2

minutes dans un mélangeur conforme au point 5.2., puis filtrer.

L'extrait ainsi obtenu peut être conservé pendant au moins 7 jours à température comprise entre 2 et 6°C.

6.2. Distillation à la vapeur

Mettre 50,0 mL de l'extrait obtenu conformément au point 6.1. dans un appareil de distillation à la vapeur conforme au point 5.5. Pour vérifier une dernière fois si l'alcalinisation de

l'extrait est suffisante, ajouter plusieurs gouttes de phénolphaléine conforme au point 4.6. Après avoir ajouté quelques gouttes d'agent anti-moussant au silicone, ajouter à l'extrait

6,5 mL de solution de soude caustique conforme au point 4.2. et commencer immédiatement la distillation à la vapeur.

Régler la distillation à la vapeur de telle sorte qu'il soit produit environ 100 mL de distillat en l'espace de 10 minutes. Submerger le tube de sortie du distillat dans un récepteur contenant

100 mL d'une solution d'acide borique conforme au point 4.4., à laquelle 3 à 5 gouttes de la solution indicateur décrite au point 4.7. ont été ajoutées. Au bout de 10 minutes précises, la

distillation est terminée. Enlever le tube de sortie du distillat du récepteur et le rincer à l'eau. Déterminer les bases volatiles contenues dans la solution du récepteur par titrage par une

solution standard d'acide chlorhydrique conforme au point 4.3.

Le pH du point final doit être de 5,0 ± 0,1.

6.3. Titrage.

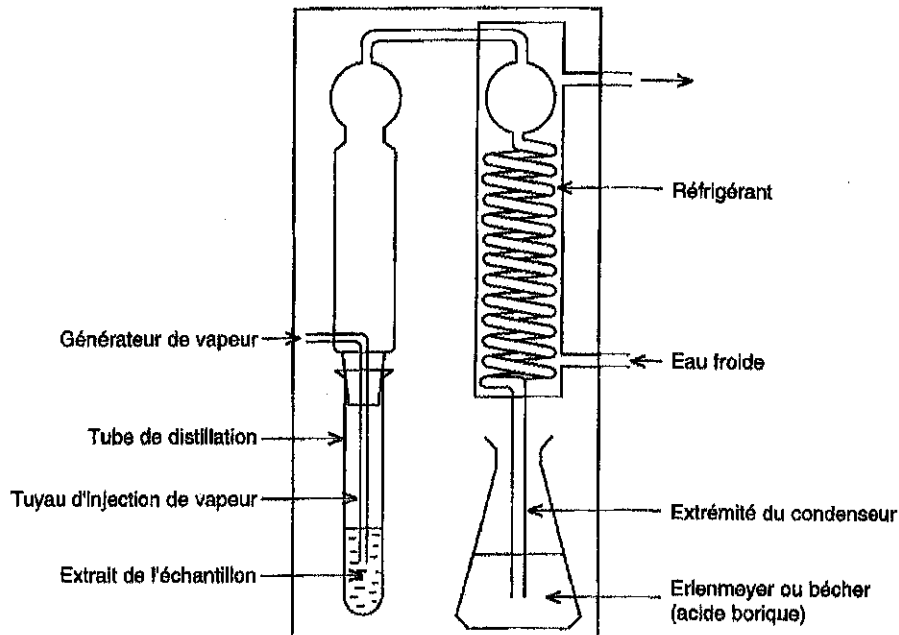
Les analyses doivent être effectuées en double. La méthode appliquée est correcte, si la différence entre les deux analyses ne dépasse pas 2 mg/100g.

6.4. Essai à blanc.

Effectuer un essai à blanc conformément au point 6.2. À la place de l'extrait, utiliser 50,0 mL de solution d'acide perchlorique conforme au point 4.1.

DOCUMENT N° 3bis

APPAREIL DE DISTILLATION A LA VAPEUR



DOCUMENT N° 4

Extrait de la fiche toxicologique INRS n° 141



ACIDE PERCHLORIQUE

... ($\geq 50\%$)

- R5 - Danger d'explosion sous l'action de la chaleur.
- R6 - Favorise l'inflammation des matières combustibles.
- R35 - Provoque de graves brûlures.
- S23 - Ne pas respirer les vapeurs / aérosols.
- S26 - En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
- S36 - Porter un vêtement de protection approprié.

DOCUMENT N° 5

L'étude de la dégradation contrôlée de la chair de poisson a été menée sur 108 échantillons appartenant à 5 espèces différentes de poisson de la catégorie B citée dans l'annexe I de la directive européenne.

1. Protocole de dégradation contrôlée:

Les échantillons sont prélevés au port, au moment de leur débarquement des bateaux.

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire dans une glacière à +4°C et stockés jusqu'au moment de l'analyse.

Ils sont ensuite exposés à la température ambiante, afin de favoriser leur décomposition pendant 32 heures.

On procède au dosage de l'ABVT dans les divers prélèvements, ceci à différents temps.

2. Le dosage de l'ABVT:

2.1 Le protocole: (voir méthode de référence dans la directive européenne du 08/03/1995).

2.2 Les résultats bruts:

Temps t (heures)	V' moyen * (mL)	Coefficient de variation (%)
1	5,80	1,43
5	6,20	2,14
8	7,09	3,46
24	11,74	30,96
29	21,74	9,97
32	22,36	5,12

Pour obtenir V' moyen, on a procédé de la manière suivante:

(1) à un temps t donné, pour chacun des 108 échantillons dosés, on a calculé la différence:

$$V = V_1 - V_0$$

(2) on a ramené cette valeur à une masse << standard >> de 10,0 g de poisson; soit V', la valeur ainsi corrigée.

(3) ensuite, on a procédé au calcul de la moyenne des valeurs V' obtenues au temps t.

DOCUMENT N° 6:

LE GRADIENT BINAIRE EAU-ACÉTONITRILE:

Temps en minutes	% des solutions		
	Acétonitrile	Eau	
0	60	40	Gradient
6	75	25	
8	75	25	
13	95	5	
20	95	5	
20,01	60	40	
30	60	40	Retour à l'état initial

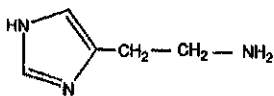
LES SOLVANTS:

Solvants	Constante diélectrique à 20°C (CD)
Eau	80,2
Acétonitrile (CH ₃ CN)	37,5

FORMULES DES AMINES:

Amine	Formule
Cadavérine	$H_2N-(CH_2)_5-NH_2$
Putrescine	$H_2N-(CH_2)_4-NH_2$

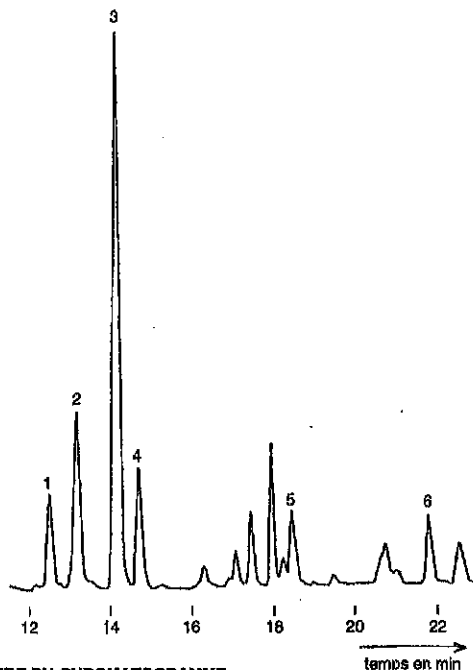
Histamine



DOCUMENT N° 7

CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES :

- ◆ Colonne : Kromasil® 5 µm, C18, 250 x 4,6 mm.
- ◆ Phase mobile : gradient binaire eau - acétonitrile (voir document n° 6).
- ◆ Débit : 1 mL.min⁻¹.
- ◆ Pression : 90 bars.
- ◆ Détection UV à 254 nm des dérivés dansylés des amines (voir document n° 8).
- ◆ Volume injecté : 20 µL.



LEGENDE DU CHROMATOGRAMME :

- | | | |
|------------------------|----------------|----------------|
| 1 : 1,3-diaminopropane | 2 : putrescine | 3 : cadavérine |
| 4 : histamine | 5 : spermidine | 6 : spermine |

NOTION D'ÉCHANTILLON SUPPLÉMENTÉ OU MÉTHODE DES AJOUTS DOSÉS:

Cette méthode consiste à ajouter une quantité connue d'un constituant à doser, ici l'histamine, à un milieu suppose en contenir, puis à doser la solution ainsi obtenue.

ÉTAPES PRÉPARATIVES:1^{ère} étape: extraction

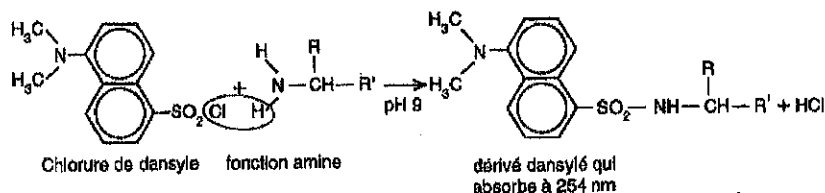
Échantillon supplémenté à 50 mg.kg ⁻¹	Echantillon supplémenté à 100 mg.kg ⁻¹
Peser 5g d'échantillon préalablement broyé exempt d'histamine après contrôle par CCM	
Ajouter 2,5 mL d'une solution d'histamine à 0,1 mg.mL ⁻¹	Ajouter 0,5 mL d'une solution d'histamine à 1 mg.mL ⁻¹
Ajouter 7,5 mL de solution d'acide perchlorique à 0,2 mol.L ⁻¹	Ajouter 9,5 mL de solution d'acide perchlorique à 0,2 mol.L ⁻¹
Homogénéiser Centrifuger à 2500 g pendant 20 minutes à 2°C	

2^{ème} étape: dérivation par le chlorure de dansyle

Prélever 100 µL de surnageant et ajouter:

- * 40 µL de solution de 1,3-diaminopropane à 25 µg.mL⁻¹ (contrôle de la reproductibilité des temps de rétention).
- * 200 µL de carbonate de sodium saturé (neutralise l'acide perchlorique).
- * 400 µL de chlorure de dansyle.
- * Agiter, boucher et placer dans un bain thermostaté à 60°C.
- * Ajouter 100 µL de solution de proline (pour neutraliser l'excès de chlorure de dansyle).
- * Agiter, laisser reposer.

Dérivation par le chlorure de dansyle

3^{ème} étape: récupération du dérivé dansylé

- * Ajouter 500 µL de toluène.
- * Agiter vigoureusement puis laisser décanter.
- * Transvaser la phase organique.
- * Évaporer le toluène sous azote.
- * Reprendre le résidu sec par 300 µL d'acétonitrile et filtrer sur filtre 0,2 µm.

DOCUMENT N° 9

ÉTALONNAGE EXTERNE:

Concentration	5	10	25	50	75	100
Aire du pic	34 872	74 619	170 562	373 331	510 794	716 989

Equation de la régression linéaire: $Y = aX + b$ $a = 14,0870 \cdot 10^{-5}$ $b = \text{négligeable}$ $r = 0,9887$

a = coefficient directeur de la droite

b = ordonnée à l'origine

Y = concentration (pg.mL^{-1})

X = aire des pics en unité arbitraire

r = coefficient de corrélation

ÉCHANTILLONS SUPPLÉMENTÉS:

Échantillon supplémenté à	50 mg.kg^{-1}	100 mg.kg^{-1}
Aire du pic	26 975	54 660

DOCUMENT N° 10

PRINCIPAUX ÉLÉMENTS COMPOSANT LE KIT:

- Barrettes à fond plat sensibilisées par de l'histamine.
- Anticorps de classe IgG anti-histamine et anticorps de lapin anti-IgG marqués à la peroxydase.
- Substrat; révélateur chromogène; solution stop (acide sulfurique).
- Solution étalons d'histamine:

Etalon 1	Etalon 2	Etalon 3	Etalon 4	Etalon 5	Etalon 6
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	150 $\mu\text{g.L}^{-1}$	450 $\mu\text{g.L}^{-1}$	1350 $\mu\text{g.L}^{-1}$	4050 $\mu\text{g.L}^{-1}$

PRINCIPALES ÉTAPES DE LA RÉALISATION DU TEST:

- a) Ouvrir le sachet d'emballage transversalement et sortir le nombre de barrettes nécessaire, ainsi que le cadre. Les autres barrettes sont conservées dans le sachet avec le déshydratant entre + 2° et + 8°C.
- b) Installer sur le cadre un nombre suffisant de puits pour traiter tous les étalons et les échantillons en double. Repérer les positions des étalons et des échantillons.
- c) Ajouter 50 μL de chaque solution étalon ou échantillon dans chaque puits(2 puits par cas).
- d) Ajouter 50 μL d'anticorps anti-histamine dans chaque puits. Mélanger doucement et incubé 1 h à température ambiante.
- e) Vider les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement (3 fois) contre du papier absorbant pour retirer tout le liquide des puits. Remplir les puits avec 250 μL de tampon de lavage et vider à nouveau la plaque. Répéter l'opération 2 fois.
- f) Ajouter 100 μL de conjugué dans chaque puits. Agiter délicatement et incubé 30 min à température ambiante.
- g) Vider les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement (3 fois) contre du papier absorbant pour retirer tout le liquide des puits. Remplir les puits avec 250 μL de tampon de lavage et vider à nouveau la plaque. Répéter l'opération 2 fois.
- h) Distribuer 50 μL de substrat et 50 μL de chromogène dans chaque puits. Mélanger doucement et incubé 30 min à température ambiante, à l'abri de la lumière.

i) Ajouter 100 μL de solution stop à chaque puits. Bien mélanger et mesurer l'absorbance à 450 nm (faire le blanc sur l'air). Lire dans l'heure suivant l'arrêt de la réaction.
Éviter la lumière directe pendant les étapes d'incubation.
Couvrir la plaque de microtitration.

DOCUMENT N° 11

(à joindre à la copie)

Tableau des résultats d'absorbance (unités d'absorbance):

	Étalons						Échantillons	
	1	2	3	4	5	6	E	F
A1(1 ^{er} essai)	1,732	1,491	1,275	0,893	0,579	0,408	1,428	0,968
A2(2 ^{ème} essai)	1,680	1,470	1,282	0,912	0,565	0,422	1,404	0,942
Moyenne des absorbances	1,706	1,480	1,279	0,902	0,572	0,415	1,416	0,955
Pourcentage d'absorbance P								
C($\mu\text{g.L}^{-1}$)								
Log C								

N.B.: détermination du pourcentage d'absorbance P.

Les valeurs moyennes des absorbances obtenues pour chacun des étalons et des échantillons sont divisées par la valeur d'absorbance moyenne du premier étalon ($0 \mu\text{g.L}^{-1}$) et multipliées par 100; on obtient alors des valeurs exprimées en pourcentages.

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie :

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

ÉPREUVE E5.UNITÉ U52

DURÉE : 10 HEURES

COEFFICIENT : 8

SUJET 1.

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

ANALYSE ET CONTRÔLE DE SOLUTIONS DE NETTOYAGE ET D'ENTRETIEN DE LENTILLES DE CONTACT.

BIOCHIMIE (70 points)

Durée : 4 H

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

On se propose de déterminer:

*l'activité protéasique d'une solution de déprotéinisation des lentilles de contact (solution A);

*la teneur en peroxyde d'hydrogène d'une solution de décontamination des lentilles (solution B).

1-Détermination de l'activité protéasique spécifique (solution A)(50 points)

1.1 - Réactifs.

- Solution L-BAPNA-DMSO à $0,025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.
- DMSO.
- Tampon Tris 10 X.
- Tampon Tris dilué DMSO.
- Solution A; échantillon A1.
- Solution A; échantillon A2.
- Réactif Rc (en distributeur).
- Solution de SAB à $1,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- Eau physiologique.

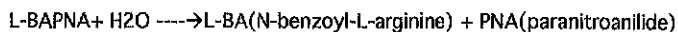
1.2 - Mesure de la concentration d'activité catalytique de la solution A.

La solution A est obtenue en dissolvant un comprimé de protéase dans 10 mL d'une solution tamponnée.

On opère sur l'échantillon A1, partie aliquote de la solution A.

1.2.1 - Principe.

La mesure est faite par méthode cinétique. Le substrat utilisé est le L-BAPNA (N-benzoyl-arginyl-L-paranitroanilide). Ce substrat, solubilisé par addition de diméthylsulfoxyde (DMSO), est hydrolysé en présence de protéase suivant la réaction:



Le PNA est coloré en jaune: on peut suivre son apparition par spectrophotométrie à 405 nm.

1.2.2 - Mode opératoire.

- Préparation de la solution de travail "ST".

Au moment de l'emploi, introduire dans une fiole jaugée de 10 mL:

- L-BAPNA-DMSO à 0,025 mol. L⁻¹: 0,5 mL;
- DMSO: 1,5mL;
- Tampon Tris 10 X: 1 mL.

Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Dosage (2 essais).

Dans une cuve de 1 cm de trajet optique, introduire successivement:

- Solution de travail "ST" 1,5 mL;
- tampon Tris dilué DMSO 0,5 mL.

Préincuber à 30°C pendant 10 minutes. Faire le zéro du spectrophotomètre sur l'eau distillée.

Déclencher la réaction en ajoutant 0,05 mL d'échantillon A1 puis placer la cuve dans son compartiment thermostaté à 30°C. Faire une mesure d'absorbance toutes les 15 secondes pendant 2 minutes.

1.2.3 - Compte rendu et résultats.

À l'aide de l'ordinateur, tracer la courbe A (405 nm) = f (temps). Rendre un graphique légendé.

En déduire la vitesse initiale en unités d'absorbance par minute.

Établir la formule littérale donnant la concentration d'activité catalytique en U.mL⁻¹ et faire l'application numérique.

Donnée: absorbance linéique molaire du PNA: $\epsilon_{405\text{nm}} = 11000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

1.3 - Dosage des protéines de la solution A.

On opère sur l'échantillon A2, partie aliquote de la solution A.

La méthode proposée utilise le bleu de Coomassie d'un réactif commercial prêt à l'emploi (réactif "Rc").

1.3.1 - Mode opératoire.

- Gamme d'étalonnage.

À partir d'une solution de SAB à 1,6 mg.mL⁻¹, préparer une solution fille à 16 µg.mL⁻¹ dans une fiole jaugée de 10 mL (diluant = eau physiologique).

Dans 6 cuves de spectrophotomètre, verser respectivement des volumes de solution fille croissants de 0 mL à 1 mL. Compléter chaque cuve à 1 mL avec de l'eau physiologique.

Puis ajouter 1 mL de réactif "Rc" dans chaque cuve. Attendre 10 minutes et lire à 595 nm contre le blanc-réactif.

- Essais: 2 essais seront préparés comme suit:

- échantillon A2 dilué au 1/5 1 mL;
- réactif "Rc" 1 mL.

Traiter dans les mêmes conditions que la gamme.

1.3.2 - Compte-rendu et résultats.

Compléter la feuille de relevés des valeurs expérimentales.

À l'aide de l'ordinateur, donner l'équation de la droite de régression ainsi que le coefficient de corrélation.

Calculer la concentration massique en protéines de l'échantillon A2 (la précision du dosage est évaluée à 3 %).

1.4 - Conclusion.

Calculer l'activité spécifique de la solution A en U.mg⁻¹.

Calculer la teneur en protéines d'un comprimé et en déduire le nombre d'unités protéasiques par comprimé.

2 - Dosage du peroxyde d'hydrogène (solution B), (20 points)

2.1 - Réactifs.

- Solution de thiosulfate de sodium à 0,1 mol.L⁻¹.
- Solution d'iodure de potassium à 100 g.L⁻¹.
- Iodate de potassium (au dessicateur).
- Acide sulfurique dilué au 1/5 (dans un distributeur).
- Empois d'amidon.
- Solution de molybdate d'ammonium à 50 g.L⁻¹.
- Solution B.

2.2 - Étalonnage de la solution de thiosulfate de concentration voisine de 0.1 mol.L⁻¹.

2.2.1- Principe.

En milieu acide, l'iodate de potassium oxyde les ions iodure I⁻ en diiode suivant la réaction:



Le diiode libéré est dosé par la solution de thiosulfate suivant la réaction:



2.2.2 - Mode opératoire.

Préparation de la solution étalon d'iodate de potassium.

Faire une pesée exacte voisine de 0,25 g d'iodate de potassium pur. Dissoudre dans de l'eau distillée et transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 50 mL.

Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Dosage (2 essais).

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL introduire:

- solution d'iodate 10 mL;
- eau distillée 10 mL;
- solution de KI à 100 g.L⁻¹ 10 mL;
- H₂SO₄ dilué au 1/5 5 mL.

Agiter et laisser reposer 5 minutes.

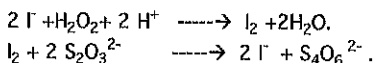
Doser par la solution de thiosulfate jusqu'à virage à l'incolore (possibilité d'utiliser l'empois d'amidon pour apprécier le virage).

2.3 - Dosage du peroxyde d'hydrogène.

2.3.1 - Principe.

En milieu acide, le peroxyde d'hydrogène oxyde les ions iodure I⁻ en diiode I₂.

Le diiode libéré est dosé par la solution de thiosulfate précédemment étalonnée:



2.3.2 - Mode opératoire (2 essais).

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, verser successivement:

- eau distillée 100 mL;
- solution de KI à 100 g.L⁻¹ 10 mL;
- H₂SO₄ dilué au 1/5 5 mL;
- solution de molybdate d'ammonium à 50 g.L⁻¹ 1 mL;
- solution B 0,5 mL.

Agiter, puis laisser reposer 5 minutes.

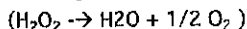
Doser par la solution de thiosulfate jusqu'à virage à l'incolore (possibilité d'utiliser l'empois d'amidon pour apprécier le virage).

2.4 - Compte rendu et résultats.

Établir la formule littérale permettant de calculer la concentration molaire de la solution de thiosulfate, puis effectuer l'application numérique.

Établir la formule littérale permettant de calculer la concentration molaire de la solution B en peroxyde d'hydrogène (mol. L⁻¹). Faire l'application numérique.

Exprimer ce résultat en volume de dioxygène que peut dégager un litre de solution B par auto oxydo-réduction, sachant qu'une mole de H₂O₂ libère 11,2 litres d'O₂



Données:	K	I	O
M (g.mol.L ⁻¹):	39,1	127	16

NUMÉRO DE POSTE:

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

MESURE DE LA CONCENTRATION D'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DE LA SOLUTION A:

Temps(secondes)	0	15	30	45	60	75	90	105	120
Absorbance(405nm)									

DOSAGE DES PROTÉINES DE LA SOLUTION A:

N° cuve	0	1	2	3	4	5	Essai 1	Essai 2
Volume de solution SAB 16µg.mL ⁻¹ (mL)								
Volume de l'échantillon A2 dilué (mL)								
Masse de protéines (µg)								
Absorbance à 595 nm								

ÉTALONNAGE DE LA SOLUTION DE THIOSULFATE:

Masse d'iodate pesée (g) =

Volumes de thiosulfate versés (mL) : V1= V2 =

DOSAGE DE H₂O₂ DANS LA SOLUTION B:

Volumes de thiosulfate versés (mL) : V3 = V4 =

MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (90 points)

1^{er} jour

Durée: 4 H 30

I - MICROBIOLOGIE (50 points)

ANALYSE ET CONTROLE DE SOLUTIONS DE NETTOYAGE ET D'ENTRETIEN DE LENTILLES DE CONTACT.

Le port de lentilles de contact nécessite un nettoyage quotidien avec une solution qui contient, entre autres, un conservateur. Celui-ci permet de garder la solution stérile.

Les larmes contiennent une certaine quantité de protéines entraînant une légère opacification des lentilles. Il est donc nécessaire de procéder à une déprotéinisation régulière à l'aide d'une protéase: la subtilisine.

1-Préparation et dénombrement des micro-organismes de la suspension inoculum.

La norme européenne relative aux antiseptiques et désinfectants (NF EN 1040, 1997) prévoit une réduction minimale de 99,999 % du nombre de bactéries avec un temps de contact de 15 minutes.

1.1 - Matériel.

- 4 cuves de spectrophotomètre.
- 4 morceaux de parafilm.
- 1 bouillon nutritif ordinaire.
- 7 tubes de 9 mL d'eau.
- 8 pipettes de 1 mL.
- 6 x 15 mL de milieu P.C.A en surfusion.
- 6 boîtes de Petri.

1.2 - Protocole opératoire.

La souche test *Staphylococcus aureus* notée << S1 >> est cultivée en bouillon nutritif ordinaire.

- Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre réglé à 600 nm.
- Ajuster cette suspension à environ 0,1 UA: on obtient la suspension S2.

Appeler un examinateur pour la mesure de l'absorbance.

Donnée: 0,1 UA correspond à environ $1,5 \cdot 10^8$ bactéries/mL.

- À partir de cette relation, dénombrer par ensemencement dans la masse, les microorganismes de S2 sur 3 dilutions en double.
- Incuber à 37°C.

1.3 - Compte rendu.

Justifier les calculs pour le choix des dilutions.

2 - Contrôle du pouvoir bactéricide du conservateur.

2.1 - Matériel.

- 1 culture de *Staphylococcus aureus* en bouillon nutritif ordinaire notée << C >> ajustée à 0,1 UA (au réfrigérateur).
- 1 tube de 8 mL de conservateur noté << conservateur >>.
- 1 tube d'eau distillée: 2 mL.
- 2 pipettes de 1 mL.
- 1 pipette automatique + cône.
- 1 fiole d'Erlenmeyer contenant 50 mL d'eau stérile notée << eau 50 mL >>.
- 1 filtre Millipore.
- 1 milieu P.C.A. coulé en petite boîte de Petri.

- 1 chronomètre.
- 10 mL d'eau stérile notée << rinçage >>.

2.2 - Principe.

Après un temps de contact de 15 minutes, la vérification de la neutralisation du conservateur doit se faire par une méthode validée. Celle-ci consiste en une filtration sur membrane. Le dénombrement des bactéries survivantes est effectué et la réduction du nombre de cellules viables est calculée.

2.3 - Protocole opératoire.

Dans le tube de conservateur {volume 8 mL}, introduire successivement :

- 1 mL de la suspension inoculum C;
- 1 mL d'eau distillée.

Agiter.

Laisser en contact 15 minutes.

Prélever 0,1 mL du mélange et le transférer dans 50 mL d'eau en fiole d'Erlenmeyer notée << eau 50 mL >>.

Mélanger puis filtrer immédiatement.

Déposer le filtre sur la boîte de gélose P.C.A.

Incuber à 37°C.

Appeler un examinateur pour la filtration.

2.4 - Compte rendu.

Quel est le nombre initial de cellules que l'on filtre ? Après action du conservateur, combien de bactéries survivantes devrait-on au maximum obtenir ?

3 - Dosage de la production de subtilisine.

Afin d'obtenir une production maximale de subtilisine, 3 milieux de culture sont testés: M1, M2, M3.

3.1 - Matériel.

- 3 milieux de culture M1, M2, M3 préincubés à 37° C avec la souche *Bacillus subtilis*.
- 1 solution de subtilisine 2 mL notée "solution mère de subtilisine à 0,04 mg/mL"
- 5 tubes à hémolyse stériles.
- 1 tube eau distillée 10 mL.
- 1 emporte-pièce.
- 1 boîte d'agar à la gélatine notée << gel >>.
- 1 pipette automatique P 100 + cônes.
- 1 gabarit (voir annexe microbiologie).

3.2 - Protocole opératoire.

À partir de la solution mère de subtilisine, réaliser une gamme de dilution de raison 1/2 et de volume final 2 mL: prévoir 5 concentrations.

Creuser 12 puits dans une boîte d'agar à la gélatine suivant gabarit donné en annexe.

Déposer 50 µL de la solution mère et de chaque dilution

Déposer en double 50 µL de chaque culture M1, M2, M3.

Incuber à 37° C.

3.3—Compte rendu.

Présenter sous forme de tableau la réalisation de la gamme d'étalonnage.

II- BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (40 points)

TOXICOLOGIE IN VITRO

La solution de déprotéinisation, destinée à éliminer les dépôts de protéines lacrymales sur les lentilles de contact, contient de la subtilisine A extraite de *Bacillus subtilis*. L'activité protéolytique doit être ajustée de manière:

- à assurer une activité déprotéinisante satisfaisante au bout de 6 heures de contact avec les lentilles (temps de contact préconisé sur la notice d'utilisation);
- à garantir l'innocuité du traitement pour l'utilisateur, notamment dans le cas où les lentilles seraient insuffisamment rincées après déprotéinisation. La subtilisine, à cause de son activité protéolytique, est susceptible de provoquer, sous certaines conditions, des altérations de la cornée.

Pour évaluer ces risques, la solution déprotéinisante doit faire l'objet de tests toxicologiques. L'activité protéolytique de la subtilisine est ainsi évaluée d'une part sur la membrane plasmique d'hématies de mouton (GRM), d'autre part sur des cellules animales en culture.

1 - Évaluation sur GRM.

1.1 - Principe.

Des dilutions de subtilisine sont incubées à 37°C avec des GRM. L'activité toxique est mesurée au bout de 30 minutes par observation de l'hémolyse obtenue. Deux échantillons (A et B) de subtilisine sont testés.

1.2 - Matériel et réactifs.

- Suspension de GRM à 50 % (v/v) dans un tampon isotonique neutre. Volume 0,5 mL.
- Échantillon A de subtilisine à 0,08 g.dm⁻³, tube étiqueté << A >>, volume 0,5 mL.
- Échantillon B de subtilisine à 0,4 g.dm⁻³, tube étiqueté << B >>, volume 0,5 mL.
- Tampon phosphate isotonique et neutre, tube étiqueté << T >>, volume 4 mL.
- Solution hémolytante, tube étiqueté << solution hémolytante >>, volume 0,5 mL.
- Microplaque de 96 puits à fond rond avec couvercle.
- Étuve à 37°C.

1.3 - Mode opératoire.

1.3.1 - Préparer 2,5 mL de GRM à 2 % à partir de la suspension à 50 % et du tampon.

1.3.2 - Réalisation du test.

Déposer 100 µL d'échantillon A en A1 et A2.

Déposer 100 µL d'échantillon B en B1 et B2.

À partir de A2 d'une part, de B2 d'autre part, réaliser des dilutions en série de raison 1/2, depuis la dilution 1/2 (respectivement en A2 et B2) jusqu'à la dilution 1/2048 (respectivement en A12 et B12).

Les dilutions sont réalisées avec le tampon. Le volume final est de 100 µL.

Utiliser la ligne C pour les témoins:

- témoin 0 % d'hémolyse;
- témoin 50 % d'hémolyse;
- témoin 100 % d'hémolyse.

Remarque: pour le témoin << 50 % d'hémolyse >>, il faut obtenir, après sédimentation, un culot de GRM égal à 50 % de celui du témoin 0 %. Ce témoin sera réalisé à partir de GRM et de tampon phosphate.

Homogénéiser la suspension de GRM à 2 % et en déposer 50 µL dans chaque puits des lignes A et B. Réaliser également les dépôts nécessaires pour les témoins. Agiter la plaque 2 minutes sur agitateur, placer le couvercle et incubé 30 minutes dans l'étuve à 37°C. Sortir la plaque et la placer à + 4 °C.

1.4- Compte rendu.

Compléter la feuille de résultats et la remettre avec la copie.

2 -Préparation d'une suspension cellulaire destinée à l'évaluation de l'activité protéolytique de la subtilisine.

2.1 - Matériel et réactifs.

- Sous la hotte à flux laminaire:

- pipettes stériles de 5 mL;
- pipettes stériles de 1 mL et de 2 mL;
- 1 tube à hémolyse stérile;
- 1 flacon de 25 cm² de culture cellulaire en monocouche dans du milieu RPMI additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF);
- 1 flacon de 7 mL de tampon PBS stérile sans calcium ni magnésium, étiqueté << PBS >>;
- 1 tube de 1,5 mL de trypsine stérile, étiqueté << trypsine >>;
- 1 flacon de 7 mL de solution de Earle stérile enrichie à 10 % avec du SVF, étiqueté <<EARLE+10% SVF >>;
- 1 récipient pour récupération des liquides souillés;
- 1 récipient pour récupération du matériel souillé.

- Au poste de travail:

- 1 hématimètre de Malassez avec lamelle planée;
- 1 chambre humide;
- 1 tube de 1 mL de bleu Trypan à 0,2 %, étiqueté << bleu Trypan >>.

2.2 - Préparation de la suspension cellulaire.

2.2.1 - Examens de la culture.

Réaliser:

- un examen macroscopique;
- un examen microscopique au microscope inverse.

Noter les résultats sur le compte rendu.

2.2.2 - Trypsinisation.

Réaliser en 25 minutes maximum, sous hotte à flux laminaire, les opérations suivantes:

- éliminer le milieu de culture par retournement du flacon;
- réaliser un lavage du tapis cellulaire avec 5 mL de PBS;
- éliminer le PBS puis introduire 1 mL de trypsine. Laisser agir 30 secondes sous la hotte puis rejeter l'excédent de trypsine en ne laissant qu'une fine couche de liquide sur les cellules;
- laisser agir quelques minutes à l'incubateur à 37°C, puis surveiller le décollement du tapis.

Lorsque les cellules sont en suspension, ajouter 5 mL de solution de EARLE à 10 % de SVF et homogénéiser.

Transférer 500 µL de suspension dans le tube à hémolyse stérile.

La suite des opérations sera réalisée au poste de travail à partir du tube à hémolyse préparé.

2.2.3 - Numération.

Ajouter dans le tube 500 μL de bleu Trypan à 0,2 % et homogénéiser.
Effectuer la numération des cellules viables et totales en cellule de Malassez.
Lors du comptage, dénombrer obligatoirement les 10 rectangles de la première rangée horizontale en haut du champ. Présenter le champ microscopique à un examinateur.
Poursuivre librement le comptage.

La cellule de Malassez comporte une chambre de 1 mm^3 divisée en 100 rectangles.
Compléter la feuille de résultats pour le dénombrement de la première rangée horizontale de 10 rectangles.

Présenter, sur le compte rendu, l'ensemble des résultats de la numération:

- nombre total de rectangles dénombrés;
- nombre total de cellules comptées;
- nombre de cellules viables comptées.

Calculer le nombre de cellules totales par mL de suspension.

Calculer le pourcentage de viabilité.

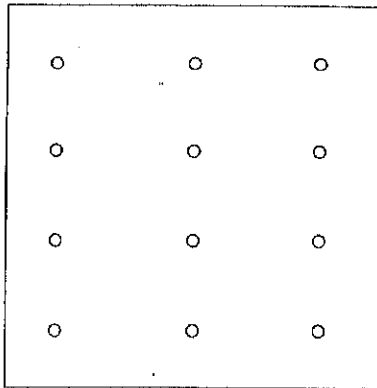
Pour les tests toxicologiques *in vitro*, ces cellules doivent être déposées dans une microplaque à raison de 8 000 cellules viables par puits. Calculer le volume de suspension cellulaire à déposer dans chaque puits.

MICROBIOLOGIE

ANNEXE

GABARIT POUR CREUSEMENT DES PUIITS.

Bolto de 160 mm avec 12 puits



BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
FEUILLE DE RÉSULTATS

N° DE POSTE:

1 - Évaluation sur GRM

1-1 - Réalisation de la suspension de GRM à 2 % (v/v).

Volume de suspension à 50 %	
Volume de tampon	
Dilution réalisée	

1-2 - Réalisation des dilutions en série (volumes donnés en μL).

N° puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Echantillon A ou B	100	100										
Tampon												
Redistribution												
Dilution	1/1	1/2										1/2048

1-3 - Réalisation des témoins (volumes donnés en μL).

Témoin	Hémolyse 0 %	Hémolyse 50 %	Hémolyse 100 %
Volume tampon			
Volume solution hémolytante			
Volume GRM 2%			

2 - Préparation d'une suspension cellulaire

Résultats du dénombrement de la 1^{ère} rangée horizontale de 10 rectangles.

- nombre total de cellules (viables + non viables) dans la première rangée horizontale de 10 rectangles.
- règles adoptées pour le dénombrement de cette première rangée (cellules qui chevauchent les bords).

Calcul du volume de suspension cellulaire à déposer dans chaque puits.

MICROBIOLOGIE- BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (90 points)

2^{ème} jour

Durée: 1 H 30

MICROBIOLOGIE (50 points)

1-Préparation et dénombrement des micro-organismes de la suspension inoculum.

Compter les colonies.

En déduire la concentration cellulaire de la suspension S_2 .

2-Contrôle du pouvoir bactéricide du conservateur.

Compter les colonies sur le filtre.

En déduire le nombre de bactéries viables dans le volume d'inoculum filtré.

Le taux de réduction minimum de 99,999 % est-il vérifié ? Justifier.

3-Dosage de la production de subtilisine.

Respecter les consignes de sécurité données en début de séance pour la manipulation du réactif de révélation.

Inonder les boîtes avec environ 2 à 3 mL de << solution de révélation >>.

Laisser en contact 3 à 4 minutes puis aspirer l'excès de la solution.

Mesurer les diamètres d'hydrolyse de la gélatine.

À l'aide de l'ordinateur, tracer la courbe: diamètre (en mm) = f (log [subtilisine]).

En déduire le taux de production de subtilisine dans les trois milieux M1, M2, M3.

Quel est le milieu le plus adapté à cette production ?

II- BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (40 points) TOXICOLOGIE IN VITRO

Évaluation sur GRM.

1 - Matériel.

Miroir de lecture pour l'observation des culots de sédimentation.

2 - Lecture.

Observer les résultats des témoins réalisés.

À l'aide des résultats des témoins, évaluer l'hémolyse dans chaque puits des lignes A et B.

L'hémolyse sera exprimée selon les critères suivants:

- 0 % absence d'hémolyse ;
- 50 % aspect du témoin correspondant pour le culot de GRM ;
- 100 % aspect du témoin correspondant ;
- 25 % hémolyse comprise entre 0 et 50 % ;
- 75 % hémolyse comprise entre 50 et 100 %.

Aussitôt la lecture terminée, replacer le couvercle et faire contrôler la plaque par un examinateur.

Remarques importantes:

- pour le témoin 50 % réalisé, seul l'aspect du culot de GRM doit être pris en compte. Ce témoin, s'il a été réalisé conformément aux indications fournies le premier jour, ne doit pas présenter de surnageant hémolysé;
- si le candidat estime que les témoins réalisés ne donnent pas les résultats attendus et ne permettent pas la lecture des lignes A et B, il peut demander la fourniture de témoins conformes. Cette demande entraînera une sanction dans la notation.

3 - Compte rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Calculer, s'il y a lieu, pour chaque échantillon de subtilisine:

- la plus petite concentration provoquant 100 % d'hémolyse;
- la plus forte concentration ne provoquant aucune hémolyse.

Exprimer les résultats en mg.dm^{-3} .

À l'issue de ces tests, quel échantillon semble le plus adapté aux exigences d'innocuité Justifier.

N° DE POSTE:

**BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
FEUILLE DE RESULTATS**

TÉMOINS

Témoin	Hémolyse 0%	Hémolyse 50%	Hémolyse 100%
Schéma de l'aspect du puits			
% d'hémolyse		50 (estimé sur le culot)	

Commentaires sur les résultats des témoins:

ÉCHANTILLONS

N° puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilution	1/1	1/2										1/2048
Hémolyse ligne A												
Hémolyse ligne B												

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie :

**RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.
ÉPREUVE E5.UNITÉ U52**

DURÉE : 10 HEURES

COEFFICIENT : 8

SUJET 2.

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

**CONTROLES COSMÉTOLOGIQUES AU COURS DE LA FORMULATION D'UN LAIT
HYDRATANT.**

IMMUNOLOGIE - BIOCHIMIE (110 points)

1^{er} jour.

Durée: 4 H 00

Le candidat commence par l'immunologie.

I - IMMUNOLOGIE (35 points)

Dosage immunoenzymatique compétitif de la vitamine E

De nombreux produits d'origine végétale entrent dans la composition des produits cosmétiques, certains pour leur effet mécanique ou hydratant, d'autres pour leurs effets protecteurs; agents antioxydants s'opposant à l'action des radicaux libres.

L' α tocophérol, ou vitamine E, est un antioxydant retrouvé dans les graines de céréales.

Une fraude est suspectée chez un fournisseur d'extraits végétaux enrichis en vitamine E. On se propose, pour contrôler ces extraits, de doser la vitamine E par une méthode immunoenzymatique compétitive.

1 - Matériel et réactifs.

- 1 microplaque ou 1 barrette double (16 cupules à fond plat).
- Film autocollant.
- Pipette automatique P 100 ou P 200 avec cônes.
- Solution de vitamine E pour sensibilisation à $500 \mu\text{g.L}^{-1}$, notée "Es" (2 mL).
- Tampon de sensibilisation (200 μL), noté "Ts".
- Étuve à 37°C .

2 - Mode opératoire.

Distribuer:

- 100 μL de vitamine E de sensibilisation dans les cupules A1 à H1 et B2 à D2;
- 100 μL de tampon de sensibilisation dans la cupule A2.

Les autres cupules peuvent être sensibilisées par la vitamine E afin de servir de cupules de secours (en cas d'erreur le 2^{ème} jour).

Recouvrir d'un film autocollant.

Incuber 2 h à 37°C , puis à 4°C jusqu'au lendemain.

II - BIOCHIMIE (75 points)

L'analyse biochimique du lait hydratant est réalisée afin de valider sa composition. Les constituants choisis comme cible de l'étude sont:

- les triglycérides: il s'agit essentiellement d'un triglycéride homogène saturé, quantitativement majoritaire;
- les alcools, en particulier le glycérol libre;
- les protéines: principalement le collagène, trouvé à l'état de traces dans le lait commercialisé.

On se propose:

- d'identifier le triglycéride majoritaire;
- de doser le glycérol par voie enzymatique;
- d'évaluer la concentration du collagène dans un concentré protéique.

Toutes les valeurs expérimentales devront être consignées dans la feuille de résultats.

1-Identification de l'acide gras constitutif du triglycéride majoritaire.(30 points)

1.1 - Étalonnage de la solution d'acide chlorhydrique (2 essais).

1.1.1 - Mode opératoire.

Étalonner la solution d'acide chlorhydrique fournie, de concentration voisine de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, par pesée d'hydrogénocarbonate de potassium, pour une chute de burette d'environ 20 mL (2 pesées).

Les indicateurs de fin de réaction disponibles sont: l'héliantine, le bleu de bromophénol et la phénolphthaléine.

Faire relever les chutes de burette par un examinateur.

1.1.2 - Compte rendu et résultats.

Justifier l'indicateur de fin de réaction utilisé.

Calculer la concentration molaire de la solution d'acide chlorhydrique, sachant que la précision de la balance est de $\Delta m = 0,0001 \text{ g}$ et celle de la burette de $\Delta V = 0,05 \text{ mL}$.

Données: $M_{\text{hydrogénocarbonate de potassium}} = 100,1 \text{ g mol}^{-1}$

CV de la méthode = 1 %.

1.2 - Détermination de l'indice d'acide.

Elle est réalisée sur l'acide gras libre obtenu après hydrolyse des triglycérides. La solution notée << AG >> obtenue est à 10 g.L^{-1} d'acide gras en solution éthanol/isobutanol.

1.2.1 - Mode opératoire (2 essais).

Dans une fiole d'Erlenmeyer, introduire:

- 10 mL de solution AG en solvant éthanol/isobutanol (v/v);
- 10 mL de solution de KOH éthanolique à environ $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$;
- 2 gouttes de phénolphthaléine.

Titrer par la solution d'acide chlorhydrique précédemment étalonnée jusqu'à décoloration stable 30 secondes.

Réaliser un témoin (2 essais).

Faire relever les chutes de burette par un examinateur.

Remarques:

- l'agitation doit être forte tout au long du dosage;
- toutes les solutions contenant des solvants devront être récupérées en bidons prévus à cet effet.

1.2.2 - Compte rendu et résultats.

Calculer l'indice d'acide du corps gras.

En déduire la masse molaire et le nombre d'atomes de carbone de l'acide gras constitutif des triglycérides.

Écrire la formule semi-développée du triglycéride ainsi identifié et calculer sa masse molaire théorique.

Données:

<< L'indice d'acide correspond à la masse de KOH en mg nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenue dans un gramme de corps gras >>.

- $M_K = 39,1 \text{ g.mol}^{-1}$;
- $M_H = 1 \text{ g.mol}^{-1}$;
- $M_O = 16 \text{ g.mol}^{-1}$;
- $M_C = 12 \text{ g.mol}^{-1}$.

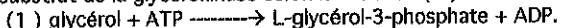
2 - Dosage du glycérol libre par méthode enzymatique en point final. (14 points)

La solution à doser est appelée GLY. Elle est obtenue de la manière suivante: 2 grammes de lait hydratant sont prélevés et introduits dans une fiole jaugée de 250 mL. Après addition d'environ 200 mL d'eau distillée, la solution obtenue est portée à 60°C pendant 15 minutes avec agitation régulière. Après retour à température ambiante, le volume final est ajusté à 250 mL, puis la fiole est placée pendant 20 minutes au réfrigérateur de manière à séparer la matière grasse. La solution est filtrée.

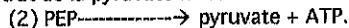
10 mL de filtrat aqueux sont mélangés à 10 mL d'acide trichloracétique à 30 mmol.L^{-1} et, après 5 minutes de contact, l'ensemble est centrifugé pendant 10 minutes à 2000 g. Le surnageant constitue la solution GLY utilisée pour les essais.

2.1 - Principe.

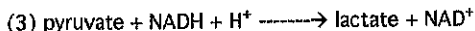
Le glycérol est le substrat de la glycérolkinase selon la réaction (1):



L'ADP ainsi formé est le substrat de la pyruvate kinase selon la réaction (2):



Le pyruvate issu de la réaction (2) est le substrat de la lactate déshydrogénase selon la réaction (3):



2.2 - Réactifs.

- Solution 1: tampon glycine à pH 7,4; NADH; ATP; PEP; sulfate de magnésium; stabilisateurs.
- Suspension 2: pyruvate kinase; lactate déshydrogénase.
- Suspension 3: glycérokinase.
- Solution GLY.

2.3 - Mode opératoire.

2.3.1 - Conditions de mesure.

- Longueur d'onde: $\lambda = 340 \text{ nm}$.
- Trajet optique: $l = 1 \text{ cm}$.
- Température: $20\text{-}25^\circ\text{C}$.
- Lire contre l'air.

2.3.2 - Réalisation des tests.

Réaliser directement dans les cuves de mesure 1 témoin et 2 essais selon les indications ci-dessous:

Introduire dans les cuves	Témoin	Essais
Solution 1	1,000 mL	1,000 mL
Essai	-	0,100 mL
Eau distillée	2,000 mL	1,900 mL
Suspension 2	0,010 mL	0,010 mL
Mélanger.		
Attendre 5 à 7 minutes et lire les absorbances des solutions (A1).		
Déclencher la réaction principale par addition de:		
Suspension 3	0,010 mL	0,010 mL
Mélanger.		
Attendre environ 10 minutes et lire les absorbances des solutions (A2).		

2.4—Compte rendu et résultats.

Compléter la feuille de résultats.

Calculer A1-A2 pour le témoin et les essais, puis calculer $\Delta A = (A1-A2)_{\text{essai}} - (A1-A2)_{\text{témoin}}$.

Établir la formule littérale et calculer la concentration molaire en glycérol des essais.

Calculer la concentration massique en glycérol des essais.

En déduire la teneur en glycérol en grammes de glycérol pour 100 g de lait hydratant (% masse/masse).

Données:

- CV de la méthode = 5 %.
- $M_{\text{glycérol}} = 92 \text{ g.mol}^{-1}$;
- $\epsilon_{\text{NADH}} = 6\,300 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à $\lambda = 340 \text{ nm}$ dans les conditions opératoires citées.

3 - Dosage du collagène. (31 points)

On se propose de doser une solution de collagène notée COL, utilisée comme base protéique dans la fabrication du lait hydratant. Cette solution est ensuite diluée 10 fois, puis 3 mL sont prélevés pour préparer 100 g de lait hydratant. Pour ce dosage, on utilise la coloration des protéines par le bleu de Coomassie.

3.1 - Mode opératoire.

Gamme étalon:

À partir d'une solution mère de protéines à 10 g.L^{-1} , préparer en eau physiologique, des solutions étalon de concentration massique en protéine allant de 0 à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$.

Dans des tubes à essais, introduire:

- 0,1 mL de chacune de ces solutions,

- 5 mL de réactif au bleu de Coomassie.

Mélanger rapidement.

Lire les absorbances à 595 nm.

Essais et contrôle:

Réaliser deux essais sur 0,1 mL de la solution COL.

Effectuer un contrôle avec une solution << contrôle >>, de collagène à exactement 0,25 g.L⁻¹.

Spectre:

À partir du tube n° 5 de cette gamme, réaliser un spectre d'absorption entre 500 et 700 nm et l'imprimer.

Donnée: stabilité de la coloration: 30 minutes.

3.2 - Compte rendu et résultats.

Expliquer la préparation des solutions étalon.

Compléter le tableau de la feuille de résultat.

Représenter la courbe d'étalonnage sur l'ordinateur. Valider les points expérimentaux et donner les paramètres de la régression.

Rendre un graphique légendé.

Déterminer la concentration massique en collagène de la solution contrôle. Indiquer si les résultats de la solution COL peuvent être pris en considération.

Déterminer la concentration massique en collagène de la solution COL (en g.L⁻¹).

En déduire le pourcentage massique de collagène dans le lait hydratant étudié.

A partir du spectre, discuter le choix de la longueur d'onde de lecture.

Donnée: CV de la méthode = 3 %.

FEUILLE DE RÉSULTATS

À COMPLETER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

N° de poste:

1 - IDENTIFICATION DE L'ACIDE GRAS CONSTITUTIF:

1.1 - Étalonnage de la solution d'acide chlorhydrique.

Masse de KHCO ₃ (g)		
Volume de HCl (mL)		

1.2 - Détermination de l'indice d'acide.

	Essai 1	Essai2	Témoin 1	Témoin 2
Volume de HCl (mL)				

2 - DOSAGE DU GLYCÉROL LIBRE:

	Témoin	Essai 1	Essai 2
Absorbance A 1 λ = 340 nm			
Absorbance A 2 λ = 340 nm			

3 - DOSAGE DU COLLAGÈNE:

Tableau des absorbances:

Tubes	0	1	2	3	4	5	E1	E2	Contrôle
Absorbance λ = 595 nm									

CONTROLES COSMÉTOLOGIQUES AU COURS DE LA FORMULATION D'UN LAIT

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

Le candidat commence par l'immunologie et s'organise dans le temps pour réaliser les deux matières.

I - IMMUNOLOGIE (2^{ème} jour) (35 points)

1 - Matériel et réactifs.

- 7 tubes à hémolyse.
- 1 cristalliseur pour rejet des liquides de lavage.
- Feuilles de papier filtre ou absorbant.
- Film autocollant.
- Pipette automatique réglable P 200 avec cônes.
- Vortex.
- Agitateur de microplaques.
- Étuve à 37°C.
- PBS-Tween pour les lavages; 25 mL.
- Tampon PBS pH 7,2.
- Albumine bovine; 5 mL.
- Solution étalon de vitamine E à 1 mg.L⁻¹, notée << E étalon >>; 300 µL.
- Extrait végétal à doser, dilué au 1/20, prêt à l'emploi; 500 µL.
- Conjugué anti-vitamine E: anticorps anti-vitamine E, couplé à la phosphatase alcaline, prêt à l'emploi, noté " conjugué "; 1 mL.

2- Mode opératoire.

Vider le contenu des cupules par retournement.

Procéder à trois lavages successifs avec 200 µL de PBS-Tween dans toutes les cupules.

Distribuer 200 µL d'albumine bovine dans toutes les cupules. Couvrir et incuber 30 minutes à 37°C puis procéder à trois lavages successifs des cupules avec 200 µL de PBS-Tween, comme précédemment.

Préparer une gamme étalon de vitamine E à partir du tube de solution étalon de vitamine E à 1 mg.L⁻¹. Pour cela, réaliser 7 dilutions successives de raison 1/2 en tampon PBS pH 7,2.

Appeler un examinateur lors de la réalisation d'une dilution.

Les cupules A2 (non sensibilisée) et B2 (sensibilisée) serviront de témoins: prévoir à l'avance leur composition en tenant compte de la suite du protocole opératoire (donné pour les autres cupules).

Distribuer 50 µL:

- de chacune des solutions de gamme de vitamine E, en commençant par la plus diluée et en terminant par la solution initiale à 1 mg.L⁻¹, respectivement dans les cupules A1 à H1;
- de l'extrait à doser dans les cupules C2 et D2;
- du réactif adéquat dans les cupules témoins A2 et B2.

Ajouter aussitôt dans les cupules de réaction, et éventuellement dans les cupules témoins, 50µL de conjugué anti-vitamine E.

Couvrir et agiter 10 minutes à température ambiante, à environ 200 tours.min⁻¹.

Incuber 1 heure à 37°C puis placer à 4°C pendant 24 à 48 heures.

3 - Compte rendu.

Compléter la fiche jointe: organisation de la plaque avec concentrations en vitamine E étalon indiquées en $\mu\text{g. L}^{-1}$, composition des témoins réalisés.

II - MICROBIOLOGIE (1^{er} jour) (50 points)

Les produits cosmétiques contiennent le plus souvent des conservateurs, substances naturelles ou synthétiques à effet bactériostatique ou bactéricide, fongistatique ou fongicide. Les critères de choix d'un conservateur sont liés d'une part aux micro-organismes à combattre et d'autre part à la nature de la préparation.

Lors de l'étape de formulation du produit, différents contrôles microbiologiques doivent être réalisés: mesure de l'activité du conservateur et vérification de la résistance du produit cosmétique à la contamination microbienne.

Les contaminations microbiennes sont apportées par les matières premières, l'air, le personnel et au cours de l'utilisation lorsque le système de conservation est déficient.

1 - Mesure de l'activité du conservateur par détermination de sa CMI.

Le parahydroxybenzoate de méthyle à activité bactériostatique peut être employé comme conservateur.

On détermine sa CMI par la méthode de dilution en milieu liquide vis-à-vis de différentes souches tests. Ici seule la détermination de la CMI vis-à-vis d' *E. coli* est envisagée.

1.1 - Matériels et réactifs.

- 1 tube de 10 mL de bouillon ordinaire.
- 1 tube de 10 mL de bouillon Mueller-Hinton.
- 4 tubes de 9 mL de bouillon Mueller-Hinton.
- 4 pipettes stériles de 1 mL.
- 1 microplaque stérile + film adhésif.
- 4 cuves de spectrophotomètre + parafilm.
- 1 pipette automatique de 50 μL + cônes stériles.
- 1 culture de 18 h de *E.coli* en bouillon nutritif noté "*E. coli* "
- 1 tube noté " conservateur; 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ".

1.2 - Préparation de l'inoculum bactérien.

Évaluer par opacimétrie à 620 nm la concentration cellulaire de la suspension mère d' *E.coli*.

Appeler un examinateur pour la mesure d'une absorbance.

À partir de cette suspension mère, réaliser en bouillon Mueller-Hinton une suspension contenant environ 10^5 bactéries. mL^{-1} .

Donnée: correspondance entre absorbance et concentration bactérienne fournie en début d'épreuve.

1.3 - Détermination de la CMI du conservateur en microméthode.

À partir d'une solution de conservateur à 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, réaliser en bouillon Mueller-Hinton 10 dilutions en série de raison 1/2 sous un volume final de 50 μL .

Ajouter 50 μL d'inoculum dans chaque cupule.

Réaliser un témoin.

Recouvrir la microplaque d'un film plastique.

Incuber à 37°C pendant 18 h.

1.4 - Compte rendu.

Justifier la préparation de l'inoculum.

Dans un même tableau, expliquer la réalisation de la gamme de dilution du conservateur. Préciser les volumes de solution mère de conservateur, de diluant, d'inoculum bactérien et indiquer les concentrations finales de conservateur dans chaque cupule. Justifier la composition et le rôle du témoin.

2 - Contrôle de l'efficacité de la conservation antimicrobienne d'un lait hydratant (challenge-test).

2.1 - Principe.

Ce test permet de vérifier l'efficacité du parahydroxybenzoate de méthyle entrant dans la composition du lait hydratant.

Selon la Pharmacopée Française, l'essai consiste en la contamination artificielle par une suspension de micro-organismes appropriés, le maintien de la préparation inoculée à une température prescrite, le prélèvement d'échantillons à intervalles de temps donnés J_0 , J_{14} et J_{28} et le dénombrement des micro-organismes dans les échantillons ainsi prélevés.

Le lait à examiner a étéensemencé avec une suspension d' *E.coli* afin d'obtenir un inoculum de 10^5 à 10^6 micro-organismes par gramme de préparation, puis a été maintenu à une température de 20 à 25°C à l'abri de la lumière.

On a prélevé des échantillons de 5 mL au temps zéro et on a déterminé le nombre de microorganismes viables par dénombrement en s'assurant que toute activité antimicrobienne résiduelle de la préparation ait été éliminée.

Le nombre de micro-organismes ainsi déterminé est de $7,5 \cdot 10^5$ UFC/mL au temps J_0 .

2.2 - Matériels et réactifs.

- 4 pipettes stériles de 1 mL.
- 6 boîtes de Petri stériles.
- 3 tubes de 9 mL de bouillon trypticase-caseïne-soja au LT 100.
- 6 tubes de 15 mL de gélose trypticase-caséine-soja au LT 100.
- 1 tube de 5 mL d'échantillon noté " J_{14} ".

2.3 - Protocole opératoire.

À partir du tube " J_{14} ", prélevé au 14^{ème} jour, effectuer le dénombrement des microorganismes dans la masse, en gélose trypticase-caséine-soja au LT 100.

Ensemencer en double les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} de la culture.

Appeler un examinateur lors de la réalisation d'une dilution.

Incuber 24 h à 37°C.

Remarque: le LT 100 est un additif favorisant la mise en suspension homogène, voire la dissolution du produit.

3 - Identification d'un micro-organisme contaminant.

Lors d'un contrôle microbiologique réalisé au cours du conditionnement du lait hydratant, un contaminant a été mis en évidence.

Ce contaminant est présenté sur gélose ordinaire (boîte notée Contaminant).

Effectuer les examens microscopiques et le test enzymatique permettant l'orientation du diagnostic. Noter les résultats sur le compte rendu et les soumettre à un examinateur.

Ensemencer les milieux et la galerie distribués. ,

IMMUNOLOGIE

FICHE À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE.

1 - Organisation de la plaque:

Concentration en vitamine E($\mu\text{g.L}^{-1}$)

A1		A2	Témoïn
B1		B2	Témoïn
C1		C2	Essai 1
D1		D2	Essai 2
E1			
F1			
G1			
H			

2 - Composition des témoins:

Cupule A2:

Cupule B2:

IMMUNOLOGIE (3^{ème} jour) et MICROBIOLOGIE (2^{ème} jour) (85 points)

Durée:2H15

Le candidat commence par l'immunologie.

I - IMMUNOLOGIE (3^{ème} jour) (35 points)

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

1 - Matériel et réactifs.

- 1 cristallisoir pour rejet des liquides de lavage.
- Feuilles de papier filtre ou absorbant.
- Film autocollant.
- Pipette automatique réglable P 100 ou P 200 avec cônes.
- Lecteur de microplaque: filtre réglé à 405 nm.
- Etuve à 37°C.
- PBS-Tween; 10 m L.
- Solution de révélation enzymatique: substrat PNPP à 1 g.L⁻¹ en tampon glycine MgCl₂ pH 10,5 ; 2 mL.
- Solution d'arrêt: NaOH à 5 mol.L⁻¹; 1 mL.
- Gants (pour la manipulation du NaOH).

2 - Mode opératoire.

Vider le contenu des cupules par retournement.

Procéder à trois lavages successifs avec 200 µL de PBS-Tween dans toutes les cupules.

Ajouter dans toutes les cupules (A1 à H1 et A2 à D2) 100 µL de solution de révélation.

Couvrir d'un film autocollant et incuber 20 minutes à 37°C.

Arrêter la réaction par ajout de 50 µL de solution de NaOH à 5 mol.L⁻¹ (attention: réactif corrosif).

Mesurer les absorbances à 405 nm en faisant le zéro contre l'air (cupule non utilisée).

3-Compte rendu.

3.1 - Donner le rôle des deux témoins A2 et B2.

3.2 - Présenter le tableau des résultats:

- absorbances brutes (Ab);
- absorbances nettes (An) en tenant compte des témoins;

- pour la gamme, logarithme décimal des concentrations en vitamine E (concentrations données en $\mu\text{g.L}^{-1}$).

3.3 - À l'aide de l'outil informatique, tracer le graphe $A = f(\log[\text{vitamine E}])$.
Rendre un graphique légendé.

3.4 - Déterminer la concentration en mg.L^{-1} de vitamine E dans l'extrait fourni, l'incertitude du dosage étant de 5 %.

3.5 - Conclure, sachant que la concentration annoncée par le fournisseur est de 10 mg.L^{-1} .

II—MICROBIOLOGIE (2^{ème} jour) (50 points)

1 - Mesure de l'activité du conservateur par détermination de sa CMI.

Déterminer la CMI du conservateur vis-à-vis de la souche d' *E.coli*.

2 - Contrôle de l'efficacité de la conservation antimicrobienne d'un lait hydratant (challenge-test).

Les critères pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont donnés dans le tableau en termes de réduction logarithmique du nombre de micro-organismes viables par rapport à la valeur obtenue pour l'inoculum.

	Réduction logarithmique 14 jours
Bactéries	3
Champignons	1

Ces critères représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre.
Exploiter les résultats du dénombrement.
Conclure.

3 - Identification d'un micro-organisme contaminant.

Lire la galerie.

Identifier le genre et l'espèce en justifiant les réponses.

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie :

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

ÉPREUVE E5.UNITÉ U52

DURÉE : 10 HEURES

COEFFICIENT : 8

SUJET 3.

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

PRINCIPES ACTIFS ET EXCIPIENTS.

BIOCHIMIE (70 points)

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

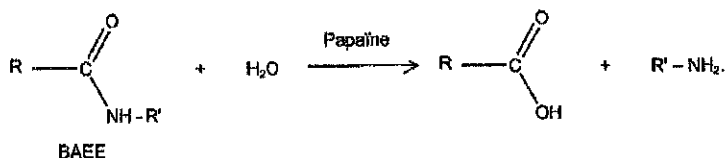
Les enzymes sont couramment utilisées comme principes actifs de nombreux médicaments. Pour agir efficacement, certaines enzymes nécessitent la présence d'activateurs. On se propose de mesurer l'action d'un activateur sur une protéase: la papaïne. D'autre part, un même médicament associe souvent deux enzymes. Les deux enzymes peuvent alors interagir. On déterminera l'influence de la papaïne sur une seconde enzyme: le lysozyme. Outre les principes actifs, le médicament sous sa forme commerciale comprend des excipients dont il faut connaître la composition pour une utilisation sans risque chez certains patients. Le chlorure de sodium y est souvent présent et la quantité ingérée doit être connue afin de l'intégrer dans les apports journaliers conseillés en cas de régime. On mesurera la teneur en ions chlorure de l'excipient utilisé.

1 - Efficacité de l'activation de la papaïne. (28 points)

On se propose de comparer les activités enzymatiques en l'absence ou en présence d'activateur.

1.1 - Principe de la mesure de la vitesse de réaction.

La papaïne (EC 3.4.22.2) catalyse l'hydrolyse de nombreuses protéines mais aussi de substrats synthétiques. On étudie la réaction d'hydrolyse du benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE):



On mesure la vitesse d'apparition de l'acide par titrimétrie selon la méthode du pH-stat.

1.2 - Matériel et réactifs.

- pH-mètre + solutions de calibration.
- Bécher forme haute de 50 mL.
- Dispositif d'agitation magnétique.
- Solution de substrat BAEE.
- Solution d'activateur.
- Excipient.
- NaOH 0,010 mol.L⁻¹.
- Extrait brut EB.
- P 200 + cônes.

1.3 - Mode opératoire.

1.3.1 - Préparation des 2 extraits.

- Extrait non activé (E): préparer 2 mL d'une dilution au 1/10 de l'extrait EB, dans de l'eau déminéralisée.
- Extrait activé (E.A.): préparer 5 mL d'une dilution au 1/10 de l'extrait EB, dans la solution d'activateur.

Conserver EA à la température ambiante pendant au moins 15 minutes avant la détermination de l'activité (noter la durée de la phase d'activation). Conserver à température ambiante une fraction de EA pour la 2^{ème} partie de l'étude.

1.3.2 - Préparation du milieu réactionnel.

Étalonner le pH-mètre.

Dans un bécher de 50 mL, introduire:

- 10 mL d'excipient,
- 5 mL de solution de substrat.

Amener le pH à $6,6 \pm 0,2$ à l'aide de la solution de NaOH à $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$.

1.3.3 - Mesure de l'activité des deux extraits d'enzyme.

Ajouter dans le milieu réactionnel 1,0 mL d'extrait E ou E.A.

Le pH diminue.

Lorsque le pH arrive à $6,2 \pm 0,2$ (= point de consigne) déclencher le chronomètre et ajouter immédiatement 100 μL de NaOH $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$ (ou ramener le pH à $6,2 \pm 0,2$ s'il diminue trop rapidement).

Noter le temps et ajouter 100 μL de NaOH chaque fois que le pH atteint le point de consigne.

La durée de la manipulation ne doit pas excéder 5 min ou le volume d'hydroxyde de sodium versé 2 mL.

1.4- Exploitation des résultats.

Compléter la feuille de résultats.

Tracer sur un même graphe: $V_{\text{versé}} = f(t)$ min pour les deux manipulations à l'aide de l'outil informatique.

Rendre un graphique légendé.

Déterminer pour chaque extrait la quantité de BAEE hydrolysé par minute dans les conditions de vitesse initiale.

En déduire la concentration d'activité catalytique de chacun des extraits E et EA, en U.mL^{-1}

Conclure sur l'efficacité de l'activation en comparant quantitativement les 2 valeurs.

Donnée: une unité papaïne est définie comme la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une micromole de BAEE par minute dans les conditions de l'expérience.

2 - Étude de l'influence de la papaïne sur l'activité du lysozyme. (20 points)

2.1 - Principe.

Le lysozyme (EC 3.2.1.17) catalyse l'hydrolyse du peptidoglycane des parois bactériennes. Son activité catalytique est déterminée par mesure de la diminution, au cours du temps, de l'absorbance à 450 nm d'une suspension bactérienne.

2.2 - Matériel et réactifs.

- Spectrophotomètre réglé à 450 nm.
- Cuves à usage unique.
- Suspension de parois bactériennes.
- Lysozyme (conserver à 4°C).
- Papaïne activée EA (voir § 1.3.1).
- Solution d'activateur.

2.3 - Mode opératoire.

2.3.1 - Préparation des extraits enzymatiques à tester.

À partir de l'extrait de lysozyme fourni, préparer les 2 solutions enzymatiques suivantes:

- $\text{Lys}_1 = 0,1 \text{ mL}$ extrait de lysozyme + $0,9 \text{ mL}$ solution d'activateur.
- $\text{Lys}_2 = 0,1 \text{ mL}$ extrait de lysozyme + $0,2 \text{ mL}$ solution de papaïne EA + $0,7 \text{ mL}$ solution d'activateur.

Conserver 10 min exactement la solution Lys_2 à la température ambiante avant de mesurer son activité catalytique.

2.3.2 - Mesure de l'activité.

Dans une cuve spectrophotométrique à usage unique, introduire 2,5 mL de suspension tamponnée pH 6,2 (équilibrée à 25°C) de parois bactériennes.

À $t = 0$, ajouter 0,2 mL de solution enzymatique à analyser (Lys_1 ou Lys_2).

Suivre l'évolution de l'absorbance à 450 nm pendant 3 minutes maximum.

2.4 - Exploitation des résultats.

Déterminer la variation d'absorbance par unité de temps (régression linéaire).
En déduire la concentration d'activité catalytique de chacune des solutions Lys, et Lys2.
Calculer l'activité spécifique du lysozyme en l'absence et en présence de papaïne.
Conclure sur les résultats.
Proposer une interprétation.

Données:

- une unité lysozyme est définie comme la quantité d'enzyme qui provoque une diminution de 0,001 unité d'absorbance par minute dans les conditions de l'expérience,
- la concentration en protéines de l'extrait de lysozyme fourni est de 1 mg.mL⁻¹.

3 - Dosage des ions chlorures dans l'excipient. (22 points)

La solution médicamenteuse à contrôler a été obtenue en dissolvant 1 comprimé dans 50 mL d'eau déminéralisée. Les protéines ont été éliminées par ultrafiltration. Le dosage est fait sur le perméat. On se propose de préparer une solution normalisée de nitrate d'argent de telle sorte que 1 mL de cette solution dose exactement 2 mg de chlorure de sodium.

3.1 - Principe.

En milieu neutre, les ions argent précipitent les ions chlorure. On utilise comme indicateur de fin de réaction les ions chromate d'une solution saturée de K₂CrO₄.

3.2 - Matériels et réactifs.

- 1 capsule de pesée.
- 1 entonnoir.
- Solution d'AgNO₃ à environ 0,05 mol.L⁻¹. Solution de K₂CrO₄.
- Perméat.
- KCl en poudre.

3.3 - Mode opératoire.

3.3.1 - Préparation de la solution étalon de chlorure de potassium.

Préparer 100 mL d'une solution étalon de KCl à environ 0,020 mol.L⁻¹.

3.3.2 - Titration de la solution de nitrate d'argent (2 essais).

Utiliser une prise d'essai de solution étalon telle que le volume de solution de nitrate d'argent verse soit inférieur à 10 mL.

Ajouter un volume équivalent d'eau déminéralisée et 8 gouttes d'indicateur.
Verser le nitrate d'argent jusqu'à l'apparition d'une teinte saumon.

3.3.3 - Ajustement de la solution de Ag NO₃ (préparer 50 mL de solution normalisée).

Procéder de telle sorte que 1 mL de AgNO₃ dose exactement 2 mg de NaCl.

3.3.4 - Dosage des ions chlorure du perméat (2 essais).

Doser 20 mL de perméat paneutre, les ions argente de nitrate d'argent (ou par la solution non normalisée en cas d'échec au 3.3.3).

Données: Cl : 35,5 g/mol; Na : 23,0 g/mol; K : 39,1 g/mol.

3.4 - Exploitation des résultats.

Indiquer la masse de KCl à peser pour préparer la solution étalon.

Justifier la prise d'essai de solution étalon.

Calculer la concentration de la solution de nitrate d'argent. CV = 1 %.

Indiquer la dilution à effectuer pour préparer la solution normalisée.

Calculer la concentration massique en NaCl de la solution testée.

Calculer l'apport journalier en NaCl dans le cas d'une prise de 5 cachets par jour.

FEUILLE DE RÉSULTATS
À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

N° DE POSTE:

1-Activité de la papaïne:

EXTRAIT E

NaOH mL									
Temps min									
NaOH mL									
Temps min									

EXTRAIT EA

Durée de la phase d'activation:

NaOH mL									
Temps min									
NaOH mL									
Temps min									

2-Activité du lysozyme:

Temps min									
Lys 1 UA									
Lys2 UA									

3-Dosage des chlorures:

Masse de KCl pesée:

Étalonnage

Prise d'essai (mL)	Volume AgNO ₃ (mL)	Prise d'essai (mL)	Volume AgNO ₃ (mL)
--------------------	-------------------------------	--------------------	-------------------------------

Dosage perméat : V1 (mL):..... V2 (mL) :

MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE (90 points)

1^{er} jour

Durée: 3 H 30

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

I - MICROBIOLOGIE (55 points)

1 - Dosage microbiologique d'une solution de lysozyme.

1.1 - Matériel.

- 1 culture sur gélose inclinée TCS de *Micrococcus luteus* notée << M >> (à garder pour la troisième partie du sujet).
- 2 mL de solution de lysozyme à 2 g/ L en tampon pH 6,2 notée << L >>.
- 2 mL de solution << X >> à doser.
- 1 gélose Mueller Hinton en boîte de 120 x 120 mm.
- 10 mL de tampon stérile pH 6,2.
- 1 flacon contenant 10 mL d'eau physiologique stérile.
- 1 tube à essai stérile.
- 2 tubes d'eau physiologique stérile (9 mL par tube).

- 1 tube étalon 0,5 de l'échelle de Mac Farland.
- 4 tubes à hémolyse stériles.
- 2 pipettes 1 mL stériles.
- 1 pipette 5 mL stérile.
- 1 micropipette P 1000.
- 1 micropipette P 20.
- Cônes stériles.
- 12 disques de papier filtre stériles.

1.2 - Préparation des solutions de lysozyme.

Gamme étalon: préparer en tubes à hémolyse une gamme correspondant aux dilutions 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 en tampon pH 6,2 de la solution à 2 g/L de lysozyme (solution "L"). Le volume final est de 1 mL.

Solution à doser: préparer dans un tube à hémolyse une solution diluée au 1/5 en tampon pH 6,2 de la solution X. Le volume final est de 1 mL.

1.3 - Préparation de l'inoculum.

Sachant que l'étalon 0,5 de Mac Farland correspond à une suspension d'environ 108 U.F.C. mL⁻¹, préparer une suspension de *Micrococcus luteus* à environ 106 U.F.C. mL⁻¹ notée S (suspension inoculum)

Ensemencer la gélose Mueller Hinton par inondation.
Laisser sécher 15 minutes.

1.4- Réalisation des dépôts.

Positionner 12 disques stériles sur la gélose à l'aide du gabarit (annexe 1)
Imprégner chaque disque par 10 µL de solution de lysozyme:

- étalons;
- solution X pure;
- solution X diluée.

Chaque solution est déposée en double.

Laisser sécher 30 minutes à température ambiante, puis incubé 48 heures à 30°C.

1.5—Compte rendu.

Présenter sous forme de tableau la préparation des différentes solutions de lysozyme.
Indiquer la démarche utilisée pour la réalisation de l'inoculum.

2 - Dénombrement de l'inoculum.

2.1 - Matériel.

- 6 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile.
- 7 géloses PCA coulées en boîte de Petri.
- 7 pipettes stériles 1 mL.
- 1 pipette râteau stérile.
- 1 micropipette P 20.
- Cônes jaunes stériles.

2.2 - Protocole opératoire.

2.2.1 - Réalisation de la gamme de dilution.

À partir de la suspension inoculum S_i, réaliser une série de dilutions suivant une progression géométrique de raison 1/10 jusqu'à la dilution 10⁻⁶.
Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution.

2.2.2 - Ensemencement par la technique de dépôt de micro-gouttes.

Choisir trois dilutions à ensemercer sachant que cette technique ne permet pas le comptage d'un nombre de micro-colonies supérieur à 20.
Déposer, en double, sur une gélose PCA, 20 μL de chaque dilution suivant la disposition proposée en annexe 2.
Laisser sécher 30 minutes et incuber 48 heures à 30°C.

2.2.3 - Vérification par la technique de référence.

Ensemencer, en double, sur géloses PCA, 0,1 mL de 3 dilutions judicieusement choisies.

Incuber 48 heures à 30°C.

2.3 - Compte rendu.

Indiquer, pour les 2 techniques utilisées, les trois dilutionsensemencées. Justifier ces choix.

3 - Vérification des caractères de genre de la souche *Micrococcus luteus*.

3.1 - Matériel.

- Culture de *Micrococcus luteus* sur gélose inclinée (tube M).
- 1 tube d'eau physiologique 2 mL.
- 1 gélose ordinaire en boîte de Petri.
- 1 milieu VF régénéré et maintenu à 45°C.
- 1 milieu CTA régénéré et maintenu à 45°C.
- 1 tube de solution de glucose stérile à 300 g.L⁻¹.
- 1 flacon d'H₂O₂ à 10 volumes.
- 5 pipettes Pasteur.
- Matériel de base du laboratoire.

3.2 - Protocole opératoire.

Effectuer une coloration de Gram et le test catalase.

Ensemencer les milieux de culture fournis.

Incuber 48 heures à 30°C.

Appeler un examinateur pour l'observation microscopique et la réalisation du test enzymatique.

3.3 - Compte rendu.

Rendre compte de l'observation microscopique et du résultat du test enzymatique.

II- BIOLOGIE CELLULAIRE (35 points)

Avant d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché, chaque médicament doit subir avec succès un ensemble de tests dont des tests toxicologiques. Ces tests sont d'abord réalisés sur des cultures de cellules, puis des animaux et enfin sur des êtres humains. Ici, on se propose d'étudier la toxicité d'un médicament associant lysozyme et papaïne sur des cultures de fibroblastes de rein de singe (cellules Véro).

1 - Matériel et réactifs.

Au poste de travail:

- 3 mL d'une solution du médicament noté << Med >> ;
- un tube contenant exactement 9 mL de PBS stérile;
- une pipette stérile de 1 mL.

Au poste de biologie:

- un microscope inversé;
- une étuve à CO₂ à 37°C;
- un dispositif de lavage des mains;

- un flacon d'alcool;
- papier absorbant.

Sous la hotte à flux laminaire:

- un flacon de cellules Vero repiquées 72 heures avant la manipulation;
- 15 mL de milieu DMEM complet (additionné de 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de glutamine, 1 % de solution de pénicilline-streptomycine);
- 3 mL de trypsine-EDTA;
- un tube contenant du PBS stérile;
- 1 pipette de 2 mL, 2 pipettes de 5 mL, 4 pipettes de 1 mL, stériles;
- 3 flacons stériles de 25 cm².

2 - Manipulation.

Réaliser stérilement une dilution de la solution de médicament au 1/10 dans le tampon PBS. Observer les cellules au microscope inverse.

Procéder au repiquage de la culture de cellules selon le protocole suivant:

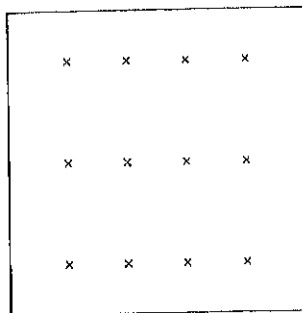
- éliminer par retournement le milieu de culture usage;
- rincer la surface du tapis cellulaire avec 2 mL de trypsine-EDTA. Eliminer par retournement;
- inonder la surface du tapis cellulaire avec 0,5 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pendant 5 minutes environ. Surveiller le décollement complet des cellules;
- arrêter l'action de la trypsine-EDTA avec 3 mL de milieu DMEM complet;
- ensemercer 3 flacons avec le même inoculum de 1 mL de suspension obtenue. Les flacons seront notés FC, FD et FT. Ajouter 1 mL de solution de médicament concentré dans le flacon FC, 1 mL de solution de médicament au 1/10 dans le flacon FD. Réaliser le témoin dans le flacon FT; Ajouter 3 mL de milieu DMEM complet dans chaque flacon;
- Incuber à 37°C en atmosphère contenant 5 % de CO₂.

3 - Compte rendu.

1. Décrire les cellules observées au microscope inversé et conclure.
2. Expliquer la réalisation de la dilution au 1/10 du médicament.
3. Donner sous forme de tableau la composition des 3 flacons ensemenés.

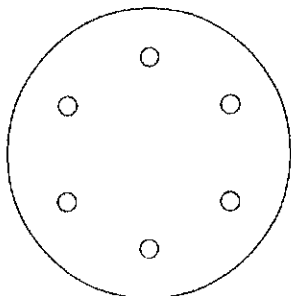
ANNEXE 1

GABARIT DES DEPOTS POUR LE DOSAGE DU LYSOZYME.



ANNEXE 2

GABARIT DES DEPOTS DES MICRO-GOUTTES.



2ème jour

Durée: 2 H 30

I - MICROBIOLOGIE (55 points)

1 - Dosage microbiologique d'une solution de lysozyme.

Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

Présenter les résultats sous forme d'un tableau.

À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe étalon: diamètres d'inhibition en fonction du logarithme décimal de la concentration en lysozyme en $g.L^{-1}$. Rendre un graphe légendé.

Déterminer la concentration en lysozyme de la solution X.

2 - Dénombrement de l'inoculum.

Compter les micro-colonies obtenues sur la gélose PCA.

Donner les résultats sous forme d'un tableau.

Calculer la concentration cellulaire de la suspension bactérienne en UFC.mL⁻¹.

3 - Vérification par la technique de référence.

Compter les colonies.

Rassembler les résultats sous forme d'un tableau.

Calculer la concentration cellulaire de la suspension bactérienne en UFC.mL⁻¹.

Comparer les résultats obtenus par les deux techniques. Conclure.

4 - Vérification des caractères de genre de la souche de *Micrococcus luteus*.

Procéder à la lecture des milieux.

Conclure.

II - BIOLOGIE CELLULAIRE (35 points)

1 - Matériel et réactifs par candidat au poste de travail.

- 1 mL de bleu de Trypan (0,4 %).
- 3 tubes à hémolyse vides.
- P 200 ou P 1000 et cônes adaptés.
- Hématimètre de Malassez et sa lamelle.

- 15 mL de milieu DMEM complet.
- 10 mL de trypsine-EDTA.
- 1 pipette de 2 mL, 1 pipette de 5 mL, 1 pipette de 1 mL, stériles.
- Gants.

2 - Manipulation.

Observer les cellules au microscope inversé.

Au poste de travail.

Vider les flacons par retournement. Rincer avec 2 mL de trypsine-EDTA. Éliminer par retournement.

Inonder la surface du tapis avec 0,5 mL de trypsine-EDTA. Incuber à l'étuve pendant 5 minutes environ. Surveiller le décollement complet des cellules.

Arrêter l'action de la trypsine-EDTA avec 4 mL de milieu DMEM complet.

Réaliser une dilution volume à volume de chaque suspension de cellules avec du bleu Trypan.

Numérer chaque suspension cellulaire ainsi diluée à l'hématimètre de Malassez.

Présenter un champ microscopique à un examinateur.

Entre chaque numération, l'hématimètre de Malassez sera désinfecté puis séché avec du papier Joseph.

3 - Compte rendu.

Donner les résultats de la numération pour chaque flacon, en nombre de cellules viables et de cellules totales par flacon (expliquer les calculs).

Calculer le pourcentage de viabilité pour chaque flacon.

En déduire l'action du médicament sur les fibroblastes.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie :

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

ÉPREUVE E5.UNITÉ U52

DURÉE : 10 HEURES

COEFFICIENT : 8

SUJET 4.

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

ETUDE DE LA FERMENTATION LACTIQUE DANS LA FABRICATION DU YAOURT

BIOCHIMIE (70 points)

Durée : 4 H

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

Pour étudier la fermentation lactique au cours de la fabrication du yaourt, le milieu M suivant est réalisé:

Composition du milieu M:

* yaourt 10 mL;

* lait UHT tiédi à 44°C 190 mL.

Ce milieu M est réparti en tubes stériles à raison de 10 mL par tube.

Deux lots de tubes sont réalisés:

* les tubes H0: tubes immédiatement mis dans de la glace;

* les tubes H4: tubes incubés 4 heures à 44°C.

L'étude de la fermentation lactique comportera:

- * la détermination de l'acidité titrable produite;
- * le dosage du lactose;
- * le dosage de l'acide lactique.

1 - Détermination de l'acidité titrable. (16 points)

L'acidité titrable est l'acidité dosable par une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphthaléine comme indicateur.

1.1 - Mode opératoire.

Vider le contenu d'un tube H dans un petit bécher (si le contenu du tube H est solidifié, agiter pour le liquéfier).

Rincer le tube avec environ 10 mL d'eau distillée; recueillir les eaux de rinçage.

Ajouter 4 gouttes d'une solution de phénolphthaléine.

Doser par une solution d'hydroxyde de sodium de concentration C voisine de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (la concentration exacte sera précisée en salle) jusqu'à teinte rose persistante pendant une dizaine de secondes.

Noter le volume V de NaOH versé.

1.2 - Dosages à réaliser.

Déterminer l'acidité titrable sur les échantillons:

* H₀ (2 essais)

* H₄ (2 essais)

1.3- Résultats.

Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

Pour chaque échantillon calculer l'acidité titrable en mmol d'ions H par litre de milieu M.

Convertir le résultat en g d'acide lactique par litre de milieu M.

Donnée: M acide lactique = 90 g.mol^{-1} .

2- Dosage du lactose. (26 points)

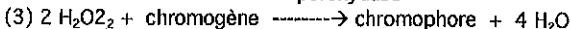
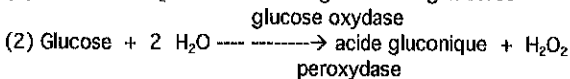
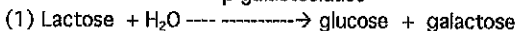
2.1 - Principe.

Le lactose est hydrolysé en D-glucose et D-galactose en présence de la p-galactosidase (1).

Le D-glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène en présence d'une glucose-oxydase (2).

Le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène incolore (amino-4 antipyrine + phénol) pour donner un chromophore utilisable dans un dosage colorimétrique. Cette réaction est catalysée par une peroxydase (3).

β galactosidase



2.2- Réactifs utilisés.

- * L1: Tampon acéto-acétate pH 4,5; $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.
- * L2: Solution de p-galactosidase en tampon acéto-acétate pH 4,5.
- * L3: Tampon phosphate pH 7; 1 mol.L^{-1} .
- * L4: Réactif GOD/POD.

2.3 - Mode opératoire.

Le lactose est dosé à partir de filtrats de défécation des tubes Ho et H4.

2.3.1- Préparation des filtrats.

Préparer les filtrats Fo et F4 à partir respectivement des tubes Ho et H4.

Mode opératoire:

Introduire dans un bécher étroit:

* échantillon H.....2 mL

* acide trichloracétique à 3 mol.L⁻¹.....1 mL

Mélanger doucement et laisser coaguler

* eau distillée.....20 mL

Laisser reposer 10 minutes.

Neutraliser avec une solution de NaOH à 1 mol.L⁻¹ en amenant le pH à la valeur 7± 0,5 à l'aide d'un pH-mètre.

Transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL.

Compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Filtrer pour obtenir environ 10 mL de filtrat.

2.3.2 - Dosage du lactose sur les filtrats F.

Faire deux essais sur chaque filtrat Fo et F4 (travailler en tubes à hémolyse).

Tube	Témoin réactifs	Essai
Eau distillée	100 µL	-
Echantillon	-	100 µL
L1: tampon acéto-acétate pH 4,5	200 µL	200 µL
L2: solution de p-galactosidase	100 µL	100 µL
Incuber 30 minutes à 37°C		
L3: tampon phosphate pH 7; 1 mol.L ⁻¹	200 µL	200 µL
L4: réactif GOD	2 mL	2 mL
Incuber 15 min à 37°C.		
Lire l'absorbance à 510 nm contre le témoin.		

De plus, pour chaque filtrat réaliser un tube << témoin glucose >>, permettant d'évaluer la présence éventuelle de glucose.

2.3.3 - Étalonnage.

À partir d'une solution étalon de lactose à 5 mmol.L⁻¹, réaliser une gamme de solutions étalons filles allant de 0 à 5 mmol. L⁻¹ en lactose. Préparer chaque solution avec un volume final de 5 mL.

À partir de cette gamme, réaliser un étalonnage de la méthode.

2.3.4 - Résultats.

Expliquer la préparation du témoin glucose.

Expliquer la préparation de la gamme d'étalonnage.

Établir le tableau de colorimétrie.

Compléter la feuille de relevés des valeurs expérimentales.

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

Déterminer la concentration molaire en lactose dans les tubes Ho et H4 en mmol.L⁻¹.

La précision du dosage est évaluée à 4 %.

3- Dosage de l'acide L-lactique. (20 points)

3.1 - Principe.

L'acide L- lactique est oxydé en pyruvate en présence de la L- lactate déshydrogénase (1).
LDH



La réaction est rendue totale grâce à une réaction couplée catalysée par une alanine-aminotransférase (ALAT) (2)



La variation de la concentration en NADH,H⁺ est suivie en mesurant l'absorbance à 340 nm.

3.2 - Réactifs.

R1: tampon glycylglycine de pH 10, acide glutamique, stabilisants.

R2: solution de NAD⁺.

R3: alanine-amino-transférase (ALAT).

R4: L- lactate déshydrogénase.

Solution contrôle d'acide L- lactique à 0,200 g.L⁻¹.

3.3 - Mode opératoire.

Travailler en cuve UV.

Doser l'acide L- lactique dans les filtrats Fo et F4 obtenus précédemment.

Faire un essai pour chaque filtrat.

Cuve	Blanc	Contrôle	Fo	F4
R1 (mL)	1,00	1,00	1,00	1,00
R2 (mL)	0,20	0,20	0,20	0,20
Eau distillée (mL)	1,00	0,90	0,90	0,90
R3 (mL)	0,02	0,02	0,02	0,02
Echantillon (mL)	-	0,100	0,100	0,100
Mélanger. Incuber 5 min à 20 - 25°C.				
Lire les absorbances A1 à 340 nm contre de l'eau distillée.				
R4 (mL)	0,02	0,02	0,02	0,02
Mélanger. Incuber 20 min à 20 - 25°C.				
Lire les absorbances A2 à 340 nm contre de l'eau distillée.				

3.4 - Résultats.

Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

Établir une formule littérale de calcul de la concentration molaire en acide L- lactique dans les tubes Ho et H4 et dans la solution contrôle.

En déduire les concentrations massiques en acide L- lactique dans la solution contrôle et dans les tubes Ho et H4 en g.L⁻¹.

Calculer les incertitudes absolue et relative de ce dosage.

Données: $\epsilon_{\text{NADH,H}^+} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

acide lactique: $M_{\text{acide lactique}} = 90 \text{ g.mol}^{-1}$

4- Conclusion. (8 points)

- Déterminer l'augmentation d'acidité titrable dans le milieu M en 4 heures de fermentation en mmol d'acide L- lactique.L⁻¹.
- Déterminer la production d'acide lactique dans le milieu M en 4 heures de fermentation en mmol d'acide L- lactique.L⁻¹.

- Déterminer la quantité de lactose disparu dans le milieu M en 4 heures en mmol de lactose.L⁻¹.

FEUILLE DE RÉSULTATS

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE.

N° de poste:

1-DÉTERMINATION DE L'ACIDITÉ TITRABLE:

Chutes de burette V (mL)	Ho	H4
Essai 1		
Essai 2		

2-DOSAGE DU LACTOSE:

Tubes	
A 510 nm	

Tubes	
A 510 nm	

3-DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE:

	Blanc	Contrôle	Fo	F4
A1 340 nm				
A2 340 nm				

MICROBIOLOGIE ET IMMUNOLOGIE (90 points)

1er jour

Durée: 3 H 30

I - MICROBIOLOGIE (60 points)

1 - Contrôles de laits crus arrivant en laiterie.

1.1 - Dénombrement de la flore totale d'un lait cru " L1".

Critère de la norme: moins de 10⁵ UFC par mL, seuil maximal égal à 10 fois la norme.

1.1.1 - Matériel.

- Échantillon à analyser: lait " L1" en tube à vis, à conserver dans la glace.
- 6 tubes de 20 mL de gélose dénombrement notes << PCA >> en surfusion.
- 6 boîtes de Petri stériles.
- 6 tubes contenant 9 mL d'eau distillée stérile.
- 7 pipettes stériles de 1 mL.

1.1.2 - Mode opératoire.

Réaliser une série de dilutions de raison 1/10 du lait " L1 "

Dénombrer dans la masse en double couche.

Faire viser sur le compte rendu la justification du choix des suspensions ensemencées.

1.2 - Recherche de mycobactéries dans un lait cru " L2 ".

Le lait cru " L2 " a été centrifugé pendant 5 min (4000 tours.min⁻¹), puis l'anneau de crème a été retiré.

1.2.1 - Matériel.

- Culot et surnageant du lait " L2 " en tube à centrifuger conique.
- Colorants, réactifs et notice technique pour coloration de Ziehl (ou une méthode équivalente).

1.2.2 - Mode opératoire.

Éliminer le surnageant, puis mélanger le culot avec les quelques gouttes de liquide restant.

Faire le frottis à l'aide de ce mélange, le sécher, puis le fixer à froid (éthanol pendant 5 min).

Réaliser la coloration, puis observer.

Montrer un champ microscopique à un examinateur.

1.2.3 - Compte rendu.

Décrire les flores observées. Conclure.

2 - Contrôles sur une chaîne de conditionnement de yaourts.

Suite à des accidents de fabrication dans un atelier de conditionnement de yaourts, divers contrôles de surfaces sont effectués par des techniques d'écouvillonnage et à l'aide de géloses contact. D'autre part, un dénombrement de la flore totale de l'eau du réseau est entrepris.

2.1 - Isolement à partir d'un liquide d'écouvillonnage.

Un nez de robinet a été écouvillonné à l'aide d'une solution stérile neutralisante, transférée ensuite dans un tube d'eau peptonée tamponnée. Ce dernier a été incubé à 30°C pour revivification.

2.1.1 - Matériel.

- Échantillon à étudier: tube d'eau peptonée tamponnée " EP ",
- Gélose trypticase-soja en boîte de Petri " GTS ".

2.1.2 - Mode opératoire.

Réaliser sur la gélose trypticase-soja un isolement à partir de l'échantillon.

Incuber à 30°C.

2.2 - Identification d'une souche bactérienne provenant d'une gélose contact.

Une gélose contact a été appliquée sur un plan de travail. Après incubation, des colonies sont observées. Ces colonies sont ensuite purifiées sur gélose ordinaire.

2.2.1 - Matériel.

- Souche pure << S >> isolée sur gélose ordinaire.
- 2 tubes de 2 mL d'eau distillée stérile.
- Réactifs pour tests enzymatiques rapides.

2.2.2 - Protocole opératoire.

Réaliser les tests d'orientation.

Présenter Gram et test(s) enzymatique(s) rapide(s) à un examinateur.

Sur le compte rendu, noter les résultats de cette orientation et proposer une galerie permettant l'identification complète de cette souche.

Faire viser le compte rendu par un examinateur.

Poursuivre l'identification en ensemençant la galerie fournie.

Indiquer sur le compte rendu la température d'incubation de cette galerie.

2.3 - Dénombrement de la flore totale par filtration.

2.3.1 - Matériel.

- Appareil de filtration.
- Échantillon à étudier: flacon d'eau du réseau, fraîchement prélevée << eau de réseau >>.
- 1 gélose PCA.
- 1 membrane filtrante.
- 3 tubes d'eau distillée stérile pour rinçages.

2.3.2 - Mode opératoire.

Réaliser la filtration en présence d'un examinateur.

Filtrer 50 mL d'eau du réseau.

Déposer la membrane filtrante sur la gélose PCA.

Indiquer sur le compte rendu la température d'incubation.

II - IMMUNOLOGIE (30 points)

DOSAGE DU COMPLÉMENT NÉCESSAIRE À LA SÉROLOGIE DE LA BRUCELLOSE

La brucellose peut être transmise par voie orale par l'intermédiaire des produits laitiers crus. La recherche indirecte de la maladie est faite soit par des tests d'agglutination, soit par réaction de fixation du complément (RFC)

Les résultats sont comparables mais la RFC présente des avantages:

- détection précoce des anticorps,
- phénomène de zone très rare,
- utilisable en microméthode.

La réaction de fixation du complément nécessite de placer dans les cupules une quantité connue de complément équivalente à 2 unités hémolytiques.

On doit réaliser un titrage du complément à tout changement de lot du complément et ce pour chaque sorte d'antigène utilisé.

1 - Préparation des réactifs.

Le complément est vendu lyophilisé et reconstitué par un réactif stabilisateur qui permet une conservation à 4°C pendant 4 semaines en récipients clos. La première dilution a été réalisée au 1/2 au moment de l'emploi par du tampon Véronal (VBS) et conservée au réfrigérateur jusqu'à son utilisation (150 µL de C étiqueté << C au 1/2 >>).

1.1 - Réactifs et matériel.

- Une microplaque à fond en U.
- Un film adhésif.
- Tampon véronal << VBS >>: 5 mL.
- Complément dilué au 1/2 en VBS, marqué << C au 1/2 >>: 0,2 mL.
- Antigène brucellique " Ag pur ": 50 µL.
- Tube à hémolyse.
- Carré de papier filtre.

1.2 - Réalisation de la gamme de dilution du complément.

Dans la ligne A d'une microplaque, réaliser une série de dilutions en déposant successivement le complément dilué au 1/2 et du tampon VBS selon le tableau suivant:

N°cupule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Complément au 1/2 (µL)	10	10	10	120	10	10	10	8	8	8		
Tampon VBS (µL)	90	140	190	215	240	265	290	252	272	292		

Homogénéiser.

1.3 - Préparation de la dilution de l'antigène.

Diluer l'antigène au 1/20 en tampon VBS.

1.4 - Dépôt des réactifs (ligne D).

Transférer 25 µL de complément dilué de chaque cupule de 1 à 10 de la ligne A dans les mêmes numéros de la ligne D.

Ajouter 25 µL de l'antigène dilué au 1/20 dans les cupules 1 à 11.

Ajouter:

- 25 µL de tampon VBS dans les cupules 1 à 10;
- 50 µL dans la cupule 11;
- 75 µL dans la cupule 12.

Homogénéiser la plaque. La recouvrir de papier filtre humidifié de VBS, puis d'un film adhésif. Placer 16 à 24 h à 4°C.

1.5- Compte rendu.

Expliquer la préparation de la solution diluée d'antigène brucellique.

Reprendre le tableau de dilution du complément en indiquant la dilution correspondant à chacune des cupules.

MICROBIOLOGIE ET IMMUNOLOGIE (90 points)

2ème jour

Durée: 2 H 30

I - MICROBIOLOGIE (60 points)

1- Dénombrement de la flore totale du lait cru "L1".

Compter les colonies.

Présenter les résultats sous forme de tableau.

Conclure.

2 - Contrôles sur une chaîne de conditionnement de yaourts.

2.1 - Liquide d'écouvillonnage.

Orienter le diagnostic d'identification de chaque type de colonie.

Présenter les observation(s) microscopique(s) et test(s) enzymatique(s) à un examinateur.

2.2 - Souche bactérienne provenant d'une gélose contact.

Exploiter les résultats.

Identifier cette bactérie.

2.3 - Dénombrement des coliformes totaux.

Exprimer le résultat en nombre d'U.F.C. de coliformes totaux par litre d'eau du réseau.
Justifier le calcul.

2.4 - Conclure sur les résultats de ces contrôles.

II - IMMUNOLOGIE (30 points)

1 - Réactifs et matériel.

- Une pipette P 1000.
- Une pipette P 100.
- Un tube à hémolyse vide.
- Suspension de GR de mouton à 2 % en tampon VBS: " GRM à 2 % ".
- Solution d'anticorps anti-hématies de mouton notée " SH ".

2 - Pré-incubation de la plaque de microtitration.

Sortir la plaque de microtitration du réfrigérateur et la placer 15 min à l'étuve à 37°C.

3 - Préparation et pré-incubation du système hémolytique.

Mélanger:

- 0,5 mL de la suspension d'hématies de mouton à 2% en VBS (étiqueté "GRM à 2 % "),
- 0,5 mL solution d'anticorps anti-hématies de mouton (étiqueté "SH").

Aspirer et refouler délicatement 3 fois le mélange pour favoriser la sensibilisation.
Laisser 15 min à température ambiante.

4 - Dépôt des hématies de mouton sensibilisées.

Déposer, dans les cupules 1 à 12 de la ligne D, 50 µL de système hémolytique.
Homogénéiser mécaniquement.
Incuber 15 à 25 minutes à 37°C.

5 - Centrifugation.

Centrifuger 3 minutes les microplaques dans des supports spéciaux à 200 g.

6 - Lecture.

Elle peut se faire dans les 2 h maximum après la centrifugation.

Observer à l'oeil nu l'aspect des cupules et noter:

- NH s'il n'y a pas d'hémolyse
- HP s'il y a hémolyse partielle
- HT s'il y a hémolyse totale

Présenter la microplaque à un examinateur en même temps que le report des observations sur la feuille de compte rendu en annexe.

7 - Interprétation - Conclusion.

Après avoir validé les témoins, donner le taux de dilution maximum du complément donnant une hémolyse complète. Cette dilution est supposée contenir 1 unité hémolytique.
Sachant que pour une sérologie de la brucellose, on souhaite introduire 2 unités hémolytiques par cupule avec un dépôt de 25 µL de complément dilué, calculer la dilution du complément testé à utiliser.

FEUILLE DE COMPTE RENDU D'IMMUNOLOGIE.

N° de poste:

N° cupule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Complément au 1/2 (µL)	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8		
VBS (µL)	90	140	190	215	240	265	290	252	272	292		
Dilution du complément												
Complément dilué (µL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25		
Ag dilué au 1/20 (µL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
Tampon VBS (µL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50	75
GRM sensibilisé (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Aspect												

Volumes en µL

ANGLAIS.

PART ONE

1) Compte rendu (6 points)

Selon le F.S.A, organisme gouvernemental, les aliments biologiques ne sont pas meilleurs que ceux issus de l'agriculture traditionnelle et les consommateurs, séduits par l'image qu'ils s'en font, gaspillent leur argent en les achetant.

Les organisations écologiques réagissent vivement en accusant Sir J. Krebs, président du F.S.A. d'être "déphasé" et mal informé.

La vente d'aliments biologiques augmente de 40 % par an en Grande Bretagne et les consommateurs sont de plus en plus enclins à payer beaucoup plus cher pour les aliments biologiques.

Des tests effectués par des laboratoires indépendants, n'ont trouvé aucun pesticide sur des carottes cultivées de manière traditionnelle, pas plus que sur la carotte biologique britannique voire même celle provenant de l'étranger. Ceci contredit une étude vieille de deux ans qui révélait la présence de résidus de pesticides à un taux supérieur aux taux légalement admis pour les carottes traditionnelles tout comme pour les carottes biologiques !

Cependant, personne à ce jour, ne connaît les effets à long terme des pesticides utilisés dans l'agriculture.

2) Proposition de traduction (4 points)

Titre: Acheter "Bio", c'est gaspiller son argent !

Les aliments "bio" ne sont ni plus sains ni plus nourrissants(1) que les aliments cultivés de manière traditionnelle et les gens gaspillent leur argent en payant davantage pour les premiers, a déclaré hier le responsable de l'Agence pour la Norme Alimentaire(2). (FSA)

Sir John Krebs, le président de cet organisme nommé par le gouvernement a affirmé qu'il n'y avait pas de preuves que les aliments "bio" étaient plus sains que les produits cultivés de manière traditionnelle. Selon lui, les gens(3) en avaient pour leur argent seulement s'ils souhaitaient s'offrir une approche holistique de l'agriculture. "D'après moi et d'après la FSA ils n'en ont pas pour leur argent s'ils pensent acheter des aliments d'une qualité nutritive ou d'une sécurité supérieures. Nous manquons de preuves pour corroborer de telles affirmations", a-t-il déclaré.

I. Recommandations aux correcteurs.

- (1) on acceptera également: "nutritifs".
- (2) on acceptera également 1'appellation britannique: "Food Standards Agency".
- (3) on acceptera également: "les consommateurs - le public".

II. Notation de la version: 4 points

Notation du compte rendu: 6 points

PART TWO

1) Éléments de réponse pour les correcteurs.

The issues raised in this article are: is it worth paying more for organic food ? Do you really get more for your money ? More guarantees of safety and more food value ? Sir J. Krebs, Head of the F.S.A., says you don't. You're only paying for an image - a very desirable but false image - that of healthier and more nutritious food stuffs.

On the other hand, environmental groups and organic farmers claim that their produce is really better,

for they do offer higher safety standards.

(environ 80 mots)

2) Sujet très personnel.

Toute argumentation, pourvu qu'elle soit cohérente, devra être admise.

MATHÉMATIQUES.

EXERCICE 1.

Partie A. (6,5 points)

$$1/ f(t) = \alpha(t) - \beta(t)$$

$$a) f'(t) = \alpha'(t) - \beta'(t) = -0,032 (\alpha(t) - \beta(t)) = -0,032 f(t)$$

$$\text{Donc : } f'(t) = -0,032 f(t)$$

$$b) y' + 0,032 y = 0 \quad \text{seulement si } y = ke^{-0,032 t} \quad (k \in \mathbb{R})$$

$$c) f(0) = \alpha(0) - \beta(0) = 30 \text{ et } f'(0) = k$$

$$\text{Donc : } k = 30 \text{ et } f(t) = 30 e^{-0,032 t}$$

2/

$$a) F(t) = (30/-0,032) e^{-0,032 t} + k' \quad (k' \in \mathbb{R})$$

$$F(0) = 0 \text{ seulement si : } k' = +30/0,032 = +937,5$$

$$F(t) = 937,5 (1 - e^{-0,032 t})$$

$$b) \beta'(t) = 0,021 f(t)$$

$$\text{Donc : } \beta'(t) = 0,021 F(t) + k'' \quad (k'' \in \mathbb{R})$$

$$c) \beta(0) = 10 = k''$$

$$\text{Donc : } \beta'(t) = 0,021 F(t) + 10$$

$$= 5/16 (95 - 63 e^{-4t/125})$$

Remarque : pour cette partie et la fin de la partie B, il ne fallait pas perdre de vue les définitions initiales.

Partie B. (5,5 points)

$$1/ \lim_{t \rightarrow +\infty} \alpha(t) = (5 \times 95)/16 = 475/16 \quad \text{car} \quad \lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-4t/125} = 0$$

de même :

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} \beta(t) = 475/16$$

$$t \rightarrow +\infty$$

La droite D d'équation $y = 475/16$ est asymptote aux courbes de α et β .

$$2/ \alpha'(t) = (5/16) \times 33 \times ((-4/125)e^{-4t/125}) = (-33/100) e^{-4t/125}$$

$$\beta'(t) = (63/100) e^{-4t/125}$$

$$e^{-4t/125} \text{ positif pour tout } t. \text{ Donc } \alpha'(t) < 0 \text{ et } \beta'(t) > 0$$

t	0	+∞
α'		-
α	40	475/16

t	0	+∞
β'		+
β	10	475/16

3/Pour le tracé des courbes :

bien respecter les unités ; tracer l'asymptote.

4/Il s'agit de résoudre $f(t) < 1$

$$\text{soit : } 30 e^{-0,032 t} < 1$$

$$\text{seulement si : } e^{-0,032 t} < 1/30$$

$$\text{seulement si : } -0,032 t < \ln 1/30$$

$$\text{seulement si : } t > -(\ln 30)/-0,032$$

$$\text{seulement si : } t > 106,3$$

Donc la différence de température entre le solide et le bain est inférieure à 1°C à partir de la 107^{ème} seconde.

EXERCICE 2.

Partie A. (5 points)

1/

a) Y est le nombre de succès du magicien à l'issue de 20 tirages successifs indépendants les uns des autres ; chaque tirage a 2 résultats possibles .

$$* \text{ succès avec } p = 1/2$$

$$* \text{ échec avec } q = 1 - p = 1/2$$

Donc Y suit une loi binomiale de paramètres :

$$n = 20 \text{ et } p = 1/2 \quad \underline{Y \text{ suit } \mathcal{B}(20; 0,5)}$$

$$b) \underline{P(Y = 15)} = C_{20}^{15} (0,5)^{15} (0,5)^5 = 0,0148$$

2/ $n = 100$

a) Z suit une loi normale de paramètres

$$m = np = 100 \times 0,5 = 50 \text{ et } \sigma = \sqrt{npq} = 5$$

$$\underline{Z \text{ suit } \mathcal{N}(50; 5)}$$

b) $p(Y > 60) = p(Z > 60,5)$ en effet, on apporte une correction de continuité car l'on passe d'une variable discrète à une variable continue.

$$\text{Soit : } T = (Z - 50)/5 \text{ alors, } T \text{ suit } \mathcal{N}(0, 1)$$

$$\underline{p(Z > 60,5) = p(T > 2,1) = 1 - \Pi(2,1) = 0,0179}$$

Il y a donc 1,79 % de chance pour que le magicien obtienne plus de 60 succès à l'issue de 100 tirages.

Partie B .(3 points)

1/ Sous H_0 , F suit $\mathcal{N}(1/2; \sqrt{(0,5 \times 0,5)/100})$

$$\text{Soit } \underline{F \text{ suit } \mathcal{N}(0,5; 0,05)}$$

$$p(F \leq 1/2 + h) = 0,95 \quad \text{soit } G = (F - 0,5)/0,05 \quad G \text{ suit } \mathcal{N}(0, 1)$$

$$\text{Alors, } 0,95 = p(G \leq h/0,05) \text{ , seulement si : } h/0,05 = 1,645$$

$$\text{Seulement si : } h = 0,082$$

2/Sur un échantillon de taille 100, soit f la fréquence des succès obtenus par le magicien :

$$\text{si } f > 0,582 \text{ alors on accepte } H_1$$

$$\text{si } f < 0,582 \text{ alors on rejette } H_1 \text{ au risque de 5\%}$$

3/ $f = 0,64$ donc on accepte H_1

Donc on peut considérer qu'au risque de 5% le magicien n'est pas un imposteur (puisque $H_1 : p > 1/2$).

SCIENCES PHYSIQUES.

PHYSIQUE.

EXERCICE I: Spectrophotométrie.

1-La longueur d'onde de travail doit correspondre à l'absorption maximale: les mesures sont alors plus précises.

2- a/L'absorbance de la solution est proportionnelle à la concentration en soluté, à la longueur de la solution traversée et dépend de la nature de la solution.

$$A = \epsilon l c$$

A: absorbance

ϵ : coefficient d'absorption linéique ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{m}^2$)

l: épaisseur de la solution traversée (m)

c: concentration molaire ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)

$$b/ c = A/\epsilon l \quad c = 0,540 / (216 \times 1,10^{-2}) = 0,25 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$$

$$c = 0,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$M = 158 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad c' = 0,25 \cdot 10^{-3} \times 158 \quad c' = 3,95 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c/\text{Transmittance} \quad T = \Phi \text{ transmis} / \Phi \text{ incident} \quad A = -\log T$$

$$T = 10^{-A} \rightarrow T = 10^{-0,54} \rightarrow T = 0,288 \text{ (ou } 28,8 \%)$$

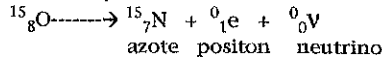
$$3- A' = A + A_1 \quad A_1 = \epsilon_1 c_1$$

$$c_1 = (A' - A) / \epsilon_1 l \rightarrow c_1 = (0,544 - 0,540) / 10^{-2} \times 100$$

$$c_1 = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

EXERCICE II: Radioactivité de l'oxygène 15.

1-Emission d'un positon ${}^0_{+1}e$: radioactivité β^+



Conservation de la charge totale.

Conservation du nombre de nucléons.

Conservation de l'énergie totale.

$$2- \lambda = \ln 2 / T \quad \lambda = 0,693 / 2 = 0,347 \text{ min}^{-1}$$

$$\lambda = 0,693 / 2 \times 60 = 5,77 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$A(t) = A_0 e^{-\lambda t} \quad t = 20 \text{ min} \quad A / A_0 = e^{-0,347 \times 20}$$

$A / A_0 = 10^{-3}$: l'activité est devenue négligeable

(environ 1/1000 de la valeur initiale \rightarrow nouvelle injection possible.)

$$3- A_0 = \lambda N_0 \quad N_0 = A_0 / \lambda = 3,7 \cdot 10^7 / 5,77 \cdot 10^{-3} \quad N_0 = 6,4 \cdot 10^9 \text{ noyaux radioactifs.}$$

L'injection de volume $v = 5 \text{ cm}^3$, de masse $m = \rho \cdot v = 5 \text{ g}$ contient donc $6,4 \cdot 10^9$ molécules H_2O marquées.

$$M_{\text{H}_2\text{O}} = 18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad n = 0,28 \text{ mol } \text{H}_2\text{O}$$

$$N_{\text{H}_2\text{O}} = 0,28 \times 6,02 \cdot 10^{23} = 1,67 \cdot 10^{23} \text{ molécules.}$$

$$N_0 / N = 6,4 \cdot 10^9 / 1,67 \cdot 10^{23} = 3,8 \cdot 10^{-14}$$

La proportion de molécules marquées est donc très faible.

CINETIQUE

1° Vérifier que la réaction est du premier ordre

Soit v_t la vitesse instantanée de disparition du chlorure de terbutyle et x la concentration molaire de composé restant aux instants t considérés.

$$\text{Par définition : } v_t = - \frac{dx}{dt}$$

Si la réaction est d'ordre 1, alors : $v = kx$

En égalant ces deux expressions de la vitesse instantanée on obtient une équation différentielle de la forme :

$$- \frac{dx}{dt} = kx$$

Cette équation différentielle admet une équation intégrée équivalente de la forme :

$$\ln x = -kt + \ln x_0$$

x_0 représente la concentration initiale en chlorure de terbutyle k est une constante de proportionnalité appelée constante de vitesse.

Si la réaction est d'ordre 1, la relation précédente est vérifiée, ce qui signifie que la fonction $\ln x = f(t)$ est une fonction affine du temps.

Elle devrait donc être représentée par une droite décroissante ne passant pas par l'origine :

- de coefficient directeur $-k$
- d'ordonnée à l'origine $\ln x_0$

Compléter le tableau suivant :

temps heures	0	0,5	1	2	4	6	8
x mol.l ⁻¹	0,0510	0,0474	0,0441	0,0381	0,0284	0,0213	0,0158
$\ln x$	- 2,98	- 3,05	- 3,12	- 3,27	- 3,56	- 3,85	- 4,15

Tracer la courbes $\ln x = f(t)$ et vérifier qu'elle est représentée par une droite décroissante : la réaction d'hydrolyse du chlorure de terbutyle est une réaction d'ordre 1.

2° Constante de vitesse

La droite tracée a pour coefficient directeur $-k$ et passe par les points $M(t_M = 0, y_M = - 2,98)$ et $N(t_N = 6, y_N = - 3,85)$:

$$k = - \frac{y_N - y_M}{t_N - t_M} = - \frac{- 2,98 + 3,85}{0 - 6} \approx 0,145 \text{ h}^{-1}$$

La valeur trouvée est voisine de la valeur attendue : $0,146 \text{ h}^{-1}$.

3° Temps de demi-réaction

Démontrer que pour une réaction d'ordre 1 :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} = \frac{\ln x_0}{0,145} = 4,75 \text{ h}$$

Détermination graphique :

au temps $t = 0$ $x_0 = 0,0510 \text{ mol.L}^{-1}$

au temps $t = t_{1/2}$ $x_{t_{1/2}} = \frac{x_0}{2} = 0,0255 \text{ mol.L}^{-1}$

donc $\ln x_{t_{1/2}} = -3,67$

porter cette valeur sur la courbe $\ln x = f(t)$.

et déterminer $t_{1/2} = 4,75 \text{ heures}$

4° Quantité de matière d'alcool formé à l'instant $t = 7 \text{ heures}$

D'après l'équation de réaction : $C_{\text{mol ayant réagi}} = C_{\text{mol formé}}$

Or : $C_{\text{mol ayant réagi}} = C_{\text{mol initial}} - C_{\text{mol restant}} = x_0 - x$

Donc : $C_{\text{mol formé}} = x_0 - x$

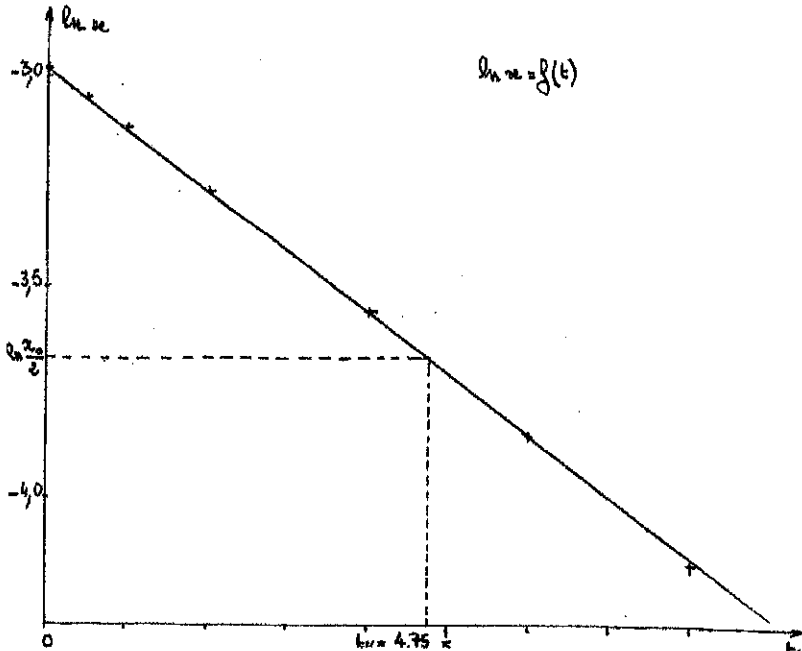
Comme la réaction est d'ordre 1 : $\ln x = -kt + \ln x_0$

$$x = x_0 e^{-kt}$$

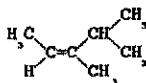
D'où : $C_{\text{mol formé}} = x_0 - x = x_0 (1 - e^{-kt})$

$$= 0,0510 (1 - e^{-(0,145 \cdot 7)})$$

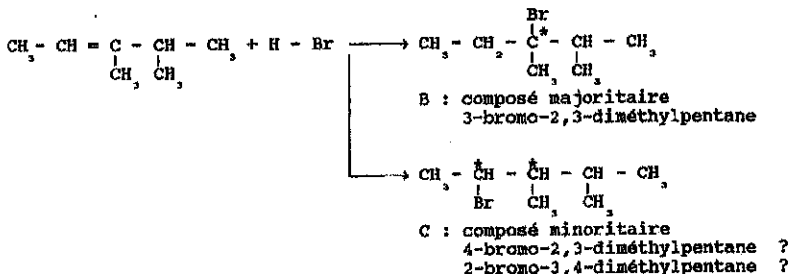
$$= 0,0325 \text{ mol.L}^{-1}$$



1° Représentation semi-développée plane du composé A



2° Equation-bilan de la réaction



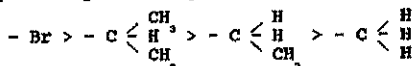
Le composé C possède deux atomes de carbone asymétriques (carbone tétraédrique porteur de 4 substituants différents). De plus, C ne présente pas de plan de symétrie : il possède donc $2^2 = 4$ stéréoisomères.

3° Stéréoisomère (R) de B

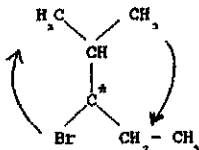
Le composé B possède un carbone asymétrique. Il présente 2 isomères optiques, appelés énantiomères, un de configuration absolue R, l'autre de configuration absolue S.

Pour déterminer la configuration absolue, il faut classer les différents substituants du carbone asymétrique dans l'ordre décroissant de priorité :

- d'abord considérer les atomes de premier rang (ceux directement liés au carbone asymétrique) et les classer par numéros atomiques décroissants;
- s'il y a ambiguïté entre deux atomes de premier rang, appliquer la règle de priorité aux atomes de deuxième rang, puis de troisième rang et ainsi de suite jusqu'à ce que l'ambiguïté soit levée.

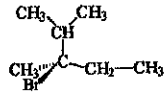


Regarder la molécule dans l'axe de la liaison de moindre priorité, le carbone asymétrique masquant le substituant de moindre priorité :

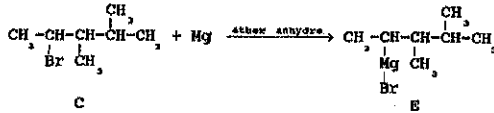


isomère R

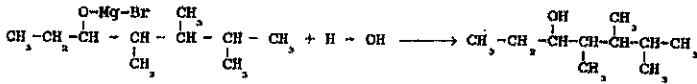
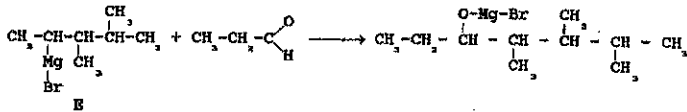
Représentation de Crém de l'isomère R :



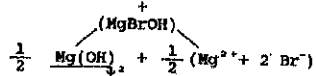
4° Equation-bilan de la réaction



5° Equations-bilans des deux étapes



F : 4,5,6-triméthylheptan-3-ol



BIOCHIMIE - BIOLOGIE

"Stress cellulaires"

Partie A- Des exemples de stress chez les Eucaryotes

1/ L'accident vasculaire cérébral : AVC

1.1 C'est la pression hydrostatique (la force) exercée par le sang sur la paroi des vaisseaux que sont les artères.

1.2 Volume systolique : volume de sang éjecté par chaque ventricule à chaque contraction.
Débit cardiaque moyen: $80 \text{ mL} \times 70 = 5\,600 \text{ mL/min}$.

1.3 Les deux composantes : système orthosympathique et système parasymphathique.
Localisation: thoraco-lombaire pour le système ortho. ; crânienne et sacrée pour le para.
Chaîne de ganglions latéro-vertbrale pour l'ortho.
Neurotransmetteur terminal : noradrénaline pour l'ortho . acétylcholine pour le para.

1.4 La correction de l'hypertension se fait par mise en jeu de mécanismes hypotensifs (consécutifs à la stimulation des barorécepteurs de la crosse de l'aorte et du sinus carotidien), mécanismes réflexes végétatifs.

- diminution de la fréquence cardiaque (effet chronotrope négatif) : par l'action cardiomodératrice du système para., et levée de l'effet cardioaccélérateur de l'ortho.
 - diminution du volume systolique par levée de l'action de l'ortho., d'où la diminution de la force de contraction des fibres cardiaques (effet inotrope négatif).
 - diminution de la résistance périphérique par levée de l'effet vasoconstricteur du système ortho.
- D'où la vasodilatation.

2/ Un aspect cellulaire du stress oxydatif.

2.1. Diminution du nombre de cellules viables, donc augmentation de la mort cellulaire ; fonction de la durée de l'anoxie (très importante après 4h ; moins importante jusqu'à 2h)

2.2.1 Phases :

- G1, pour croissance cellulaire ; synthèse de "matériaux" cellulaires : ARN et protéines (enzymatiques et structurales)
- S, synthèse d'ADN (doublement de la quantité)
- G2, croissance caractérisée par des synthèses spécifiques (protéines nécessaires à la division cellulaire)
- M, mitose ; ensemble de phénomènes cytologiques présentant la succession de 4 phases permettant l'obtention de deux cellules filles, identiques entre elles et identiques à la cellule mère.

2.2.2 Les cellules tumorales sont des cellules "transformées" qui sont devenues "immortelles".

Cette transformation se traduit par

- une perte de la différenciation (dédifférenciation)
- perte de l'inhibition de contact et de la nécessité d'ancrage sur un support (en culture, plusieurs couches cellulaires vont se superposer) ; le cycle cellulaire est dérégulé.
- l'acquisition de "marqueurs" tumoraux (protéines spécifiques, recherchées pour le diagnostic précoce de cancers)
- des modifications qualitatives et quantitatives du patrimoine génétique (cellules aneuploïdes).

2.2.3 Durée du cycle cellulaire : 20h

La densité cellulaire est multipliée par 4 entre t_0 et $t_0 + 40h$; donc, doublement en 20h (vérifiable sur les autres temps)

2.2.4 * un pic représente le nombre de cellules ayant une intensité de fluorescence donnée, c'est-à-dire une quantité donnée d'ADN, la même pour toutes les cellules du pic.

* le pic n°1 correspond à des cellules qui ont deux fois moins d'ADN que celles du pic n°2 (intensités de fluorescence 100 et 200). Le pic n°1 correspond donc à des cellules en phase G1 et le pic n°2 à des cellules en phase G2 ou M (après la phase S, l'ADN a doublé).

* entre les deux pics, on trouve les cellules dont la quantité d'ADN est en train de croître pour doubler (l'intensité de fluorescence passe de 100 à 200) : elles sont en phase S.

2.2.5. Entre le jour 1 et le jour 4 les cellules se sont multipliées abondamment ; or on constate que la quantité d'ADN dans la population cellulaire est très différente de ce que l'on observe sur l'histogramme précédant (avec des intensités de fluorescence inférieure à 100 ; beaucoup de cellules autour de 50). Donc de nombreuses cellules sont aneuploïdes.

3. Un aspect biochimique du stress oxydatif

3.1. Phosphorylation oxydative et théorie chimio-osmotique.

3.1.1. Signification des chiffres du document 2.

1: espace intermembranaire 2: membrane interne mitochondriale 3: matrice 4: NADH-DH
5: fumarate 6: cyt c 7: cyt a/a3 oxydase 8: Fo-F1 ATPase ou ATP synthase

3.1.2. Caractère lipophile (Déplacement aisé dans la membrane).

Potentiel d'oxydo-réduction (transfert des électrons de I ou II à III).

3.1.3.1. $[H^+]_{ext} / [H^+]_{int} = 6,3$ $\Delta G = - 4,7$ kJ/mol dans le sens ext \rightarrow int
déplacement thermodynamique: ext \rightarrow matrice

3.1.3.2. Pour que le retour des protons dans la matrice soit couplé avec la synthèse d'ATP il faut au moins que :

$$\Delta G_{grad\ de\ pH} + \Delta G_{synthèse} = 0$$

3.1.3.3. $\Delta \Psi = - 0,25V$ pour le transfert simultané de deux charges positives (deux protons).
Excès de charges + dans l'espace intermembranaire. Potentiel de membrane plus élevé à l'extérieur.

3.2. Stress oxydatif lors de l'accident vasculaire cérébral.

3.2.1. A= élément pré-synaptique / B= élément post-synaptique / C= espace (fente) synaptique / D= vésicules synaptiques / E= mitochondrie.

3.2.2. Agoniste = se fixe sur le même récepteur et mime l'effet du neurotransmetteur

Antagoniste = se fixe sur le même récepteur et ne provoque aucun effet

3.2.3 On observe une légère dépolariation d'environ 10 mV (ppse, pour : potentiel post synaptique excitateur), conséquence d'une entrée d'ions positifs (Ca²⁺, puisqu'il y a augmentation du calcium cytoplasmique d'après le document n°3).

3.2.4 Le NMDA provoque aussi une dépolariation, comme le glutamate. Or il a une analogie structurale avec celui-ci ; il pourrait donc occuper le récepteur et provoquer ainsi son activation, comme le glutamate.

Le D-AP5 est également analogue structural du glutamate ; il pourrait donc se fixer sur le récepteur, mais la chaîne latérale plus grosse (un -COOH phosphorylé) empêcherait l'ouverture du canal calcique et la dépolariation ne pourrait se faire, d'où l'absence d'effet.

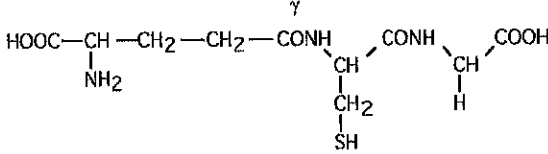
Autre explication : le D-AP5, trop gros, ne peut se fixer sur le récepteur du glutamate).

3.2.5.1. Le transfert d'électrons étant "shunté" au niveau de l'ubiquinone, le pompage des protons hors de la matrice grâce au transfert d'électrons et leur retour exergonique dans la matrice seront moins importants. La synthèse d'ATP sera donc réduite.

3.2.5.2. La concentration faible en calcium cytosolique est maintenue grâce à des ATPases membranaires (plasmique et du réticulum endoplasmique). Le manque d'ATP provoque donc une diminution du fonctionnement de ces pompes, entraînant une accumulation de calcium dans le cytosol.

3.3. Rôle protecteur du glutathion

3.3.1. Formule développée du glutathion



3.3.2. Deux molécules sont énantiomères lorsqu'elles sont chirales (image l'une de l'autre dans un miroir).

La glycine n'a pas de carbone asymétrique. Pas d'énantiomère.



3.3.3. Si pH > pKa, alors fonction déprotonée. Ionisation du glutathion dans les conditions cellulaires: 1 charge positive

3.3.4.

étape a) enzyme: hexokinase	substrat: ATP	produit: ADP
étape b) enzyme: glucose 6 P déshydrogénase	substrat: NADP ⁺	produit: NADPH, H ⁺
étape lactonase:	substrats: H ₂ O et molécule 3: 6P gluconolactone	
étape c) enzyme: ac. 6 P gluconique déshyd ^{ase}	substrat: NADP ⁺	produits: CO ₂ et NADPH, H ⁺

Partie B-Des exemples de stress chez les Procaryotes.

1-Éléments de taxonomie et de physiologie bactérienne.

- 1.2. 70% de similitude (complémentarité) entre les séquences d'ADN des deux bactéries.
- 1.3. non. On peut avoir un même GC% avec une séquence différente.
- 1.4. germe opportuniste: germe n'affectant pas un organisme sain, mais pouvant causer une maladie chez une personne affaiblie.
Infection nosocomiale: maladie survenant en milieu hospitalier.
- 1.5. acides teichoïques, adhésines, fimbriae, capsule, ...

1.6 . cible des β-lactamines: au niveau de la paroi, enzymes catalysant la réaction de transpeptidation et PLP (protéines liant la pénicilline)
cibles possibles pour un antibiotique: acteurs de la réplication, acteurs de la synthèse protéique, membrane plasmique.

2-Culture d'Enterococcus faecalis en conditions de stress.

2.1.1. G: temps correspondant à un doublement de population (ou temps moyen entre deux divisions successives). G voisin d'une heure.

2.1.2. G en milieu DM > G milieu CC
Le milieu CC est un milieu riche, avec de nombreux substrats utilisables rapidement par la bactérie.

Le milieu synthétique DM est limitant de la croissance (il ne contient pas tous les nutriments requis).

2.2. Le taux de croissance μ diminue donc le temps de génération G augmente car $G = \ln 2 / \mu$.

2.3.1. Sortie d'eau, conservation de la forme (résistance mécanique due à la paroi)

2.3.2. L'absorbance diminue quand la concentration en NaCl augmente. Donc la production de biomasse diminue quand la concentration en NaCl dans le milieu DM augmente.

NaCl en forte concentration entrave la multiplication des bactéries, et il n'y a plus de croissance quand $C_{\text{NaCl}} = 1 \text{ mmol/L}$ (ou $0,8 < C_{\text{NaCl}} \text{ mmol/L} \leq 1,0$).

Cette valeur correspond à la CMI en NaCl, concentration la plus faible à partir de laquelle il n'y a plus de croissance visible.

2.3.3. En milieu additionné de NaCl à 0,75 mol/L, le taux de croissance est fortement diminué; la quantité de biomasse en 10 heures est environ trois fois plus faible que celle du contrôle.

En milieu additionné de NaCl à 0,75 mol/L et de glycine bêtaïne à 1 mmol/L, le taux de croissance et la quantité de biomasse en 10 heures sont pratiquement les mêmes que ceux du contrôle.

La glycine bêtaïne semble donc avoir un effet osmoprotecteur sur la bactérie.

ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

ÉVALUATION DE LA FRAICHEUR DU POISSON.

1. ÉVALUATION DE LA FRAICHEUR DU POISSON: l'examen bactériologique.

1.1. Évolution de la charge microbienne.

1.1.1. **Mésophiles** : microorganismes dont la température moyenne de développement se situe entre 20 et 40°C (à 37°C pour les pathogènes ou 30°C pour les germes de l'environnement)

1.1.2. **Psychrotrophes** : se multiplient aux températures de réfrigération mais avec un optimum situé entre 10 et 30°C. Les psychrophiles ont une température optimale de croissance comprise entre 0 et 15°C.

1.1.3.1. **Les coliformes**, dont le dénombrement est désigné sous le nom de **coliformes totaux** sont des « bacilles Gram-, oxydase -, AAF, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et de fermenter le lactose avec production d'acides et de gaz en 48 h à 30-37°C ». Les coliformes thermotolérants sont des coliformes cultivant à 44°C. Les **coliformes thermotolérants** sont les indicateurs d'une contamination fécale récente par défaillance technologique ou hygiénique alors que les coliformes totaux se recrutent parmi les germes de l'environnement dont certains sont psychrotrophes, non thermotolérants et non significatifs d'une contamination fécale.

1.1.3.2. Les qualités d'un bon indicateur sont :

- **épidémiologique** : présence corrélée à l'apparition d'infection ,
- **écologique** : être spécifique des animaux et absent de l'environnement ,
- **sensible** : plus nombreux que les pathogènes et abondant dans les fèces.
- **bactériologique** : être plus résistant que les pathogènes aux désinfectants,
- **technique** : être facile à détecter, à identifier et ce à moindre coût,
- **taxonomique** : être classé en tant qu'espèce.

1.1.4.1.

- addition de façon homogène de 1 mL de dilution,
- coulage de la gélose nutritive en surfusion (46°C),
- agitation et prise en masse,
- addition d'une couche de gélose blanche.

1.1.4.2. Éviter l'envahissement des colonies en surface de gélose nutritive.

- 1.1.5. -au départ la flore indicatrice en valeur absolue est très faible et représente de 0,1 à 1% de la flore saprophyte totale /g de poisson,
 -le développement de la flore indicatrice est, à partir de 8h, moins rapide que celui de la flore totale,
 - stabilisation des flores après 29 h d'entreposage.

1.2. Impédancemétrie.

1.2.1. L'équation de la droite de régression est $\ln(N) = -2,39 \cdot T_d + 25,43$ et le coefficient r est égal à $-0,9998$ (valeur négative car $\ln(N)$ et T_d varient en sens inverse) ce qui montre que le log du nombre N de coliformes thermotolérants/g obtenu par la technique du NPP est bien corrélé au temps de détection T_d qui est d'autant plus petit que N est grand.

1.2.2. Graphiquement $T_d = 5$ h correspond à une brusque élévation de la conductance du milieu inoculé avec 1 g de poisson contenant $7,1 \cdot 10^5$ coliformes thermotolérants (cf équation précédente).

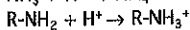
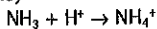
1.2.3. Comparée à la méthode de dénombrement dans la masse, cette méthode est rapide et ne nécessite qu'un temps d'incubation réduit.

2. ÉVALUATION DE LA FRAICHEUR DU POISSON: le dosage de l'ABVT.

2.1. Méthode de référence.

2.1.1.1. étape 6. 1.

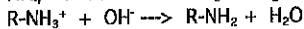
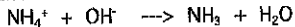
- L'acide perchlorique sert de déprotéinisant: précipitation des protéines de la chair de poisson afin de les éliminer, par la suite, du milieu réactionnel.
- le précipité contient donc les protéines et le filtrat contient les petites molécules azotées (ABVT)
- l'ammoniac et les amines sont en milieu acide fort: ces molécules seront donc totalement protonées (forme acide)



2.1.1.2. étape 6.2.

- la soude sert à neutraliser les acides présents dans le milieu réactionnel:

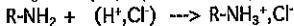
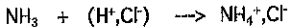
* les constituants de l'ABVT



* l'acide perchlorique en excès

- l'entraînement à la vapeur va chasser tous les composés volatils qui étaient dissous dans le milieu réactionnel.

- l'acide borique (acide faible) va réagir avec les composés basiques volatils pour donner des sels non volatils.



2.1.1.3.

L'essai "à blanc" est une manipulation réalisée sans extrait de poisson, mais avec tous les autres réactifs.

Il sert à:

- (1) tester la pureté des réactifs utilisés: ceux-ci ne doivent pas contenir d'impuretés azotées.
- (2) tester l'état de propreté de l'appareil qui ne doit pas contenir de traces d'azote.

2.1.2. Principe de la détermination de l'ABVT:

(1) extraction préalable de l'ABVT:

on précipite les protéines de la chair de poisson par l'acide perchlorique.
 le précipité est éliminé par filtration et l'ABVT se trouve dans le filtrat.

(2) dosage proprement dit:

(2.1.) les composés de l'ABVT (sous forme acide) sont neutralisés par la soude en excès: on obtient de l'ammoniac et des amines volatiles.

(2.2.) 1'ammoniac et les amines volatiles sont ensuite chassés du milieu réactionnel par entraînement à la vapeur.

(2.3.) après refroidissement, ils sont fixés dans l'acide borique et dosés par une solution d'acide fort titrée en présence d'un indicateur de pH.

2.1.3.1. C = corrosif O = comburant

2.1.3.2. Il faut se protéger les mains (gants) et les yeux (lunettes); il faut travailler sous une hotte ventilée. Il faut éviter toute élévation de température. Il faut faire attention à l'inflammabilité de matières organiques imbibées d'acide perchlorique (coton, papiers).

2.1.4.1 Les outils de calculs

$$n_N = n_{HCl} \quad (\text{cf équations})$$

$$n_{HCl} = C_{HCl} \cdot V$$

$$mN_{\text{essai}} = n_N \cdot M_N$$

$$mN_{\text{total}} = mN_{\text{essai}} \cdot V_{\text{total}} / V_{\text{essai}}$$

$$ABVT = mN_{\text{total}} / m_{\text{poisson}} = C_{HCl} \cdot V \cdot M_N \cdot V_{\text{total}} / V_{\text{essai}} \cdot 1 / m_{\text{poisson}}$$

$$2.1.4.2. V = (V_1 - V_0) V_{\text{total}} = 90 + 10 = 100 \text{ mL} \quad \text{et} \quad V_{\text{essai}} = 50 \text{ mL}$$

$$ABVT (\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}) = (V_1 - V_0) \cdot 10^{-3} \cdot 10^{-2} \cdot 14 \cdot 10^3 \cdot 100 / 50 \cdot 1 / \text{m}^* \cdot 100$$

2.1.4.3. Cette valeur représente l'écart permis entre deux mesures faites dans des conditions identiques.

2.2. Étude de dégradation contrôlée.

2.2.1.

temps (h)	1	5	8	24	29	32
ABVT (mg.100 g)	16,24	17,36	19,85	32,87	60,87	62,61

2.2.2.

La limite en ABVT pour les espèces de la catégorie B est de 30 mg/100 g donc après 24 heures de conservation à la température ambiante, le poisson est impropre à la consommation humaine.

3) ÉVALUATION DE LA FRAICHEUR DU POISSON: le dosage de l'histamine.

3.1. Dosage de l'histamine par CLHP.

3.1.1. Méthode de haute résolution: granulométrie fine (5 μm ici), nombre de plateaux théoriques élevés.

3.1.2. Phase inverse : C 18 = longue chaîne carbonée de 18 carbones, radical apolaire.

3.1.3. Un ou plusieurs paramètres de la phase mobile varient au cours du temps.

Le paramètre modifié dans le gradient présenté est la polarité. Augmentation du % d'acétonitrile, donc la phase mobile est de plus en plus apolaire.

3.1.4. t_R cadavérine > t_R putrescine. La phase stationnaire est apolaire, plus le composé sera apolaire plus le temps de rétention sera important. La cadavérine possède un carbone supplémentaire donc elle est plus apolaire que la putrescine.

3.1.5. Le principe d'un dosage utilisant l'étalonnage externe.

- Réalisation de solutions étalons d'amines biogènes à différentes concentrations.

- Traçage de la droite d'étalonnage $A = f(c)$ pour chacune des amines et détermination de l'équation de régression + r.

- Report de l'aire des échantillons sur la droite précédente et détermination de la concentration en amine dans les échantillons injectés.

Son principal inconvénient: le volume d'injection doit être parfaitement reproductible car $A = K \cdot n$ et $n = c \cdot V_{\text{injection}}$

$$3.1.6.1. \text{ Ech } 1 = 3,8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\text{ Ech } 2 = 7,7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$3.1.6.2. \text{ Ech } 1 = 34,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$$


$$\text{ Ech } 2 = 69,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$$


3.1.6.3. Rendement: Ech 1 = 68,4 % Ech2 = 69,3 %

3.1.6.4. Conclusion: rendements équivalents.

3-2- Détection et dosage de l'histamine selon une méthode immunoenzymatique

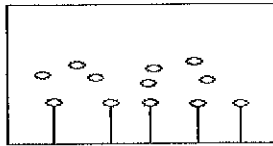
3-2-1 Légendes

 Histamine

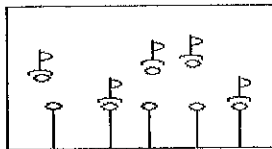
 Anticorps anti-histamine

 Conjugué : anticorps anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase

Etape c : addition de l'histamine

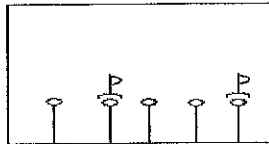


Etape d : addition des anticorps anti-histamine



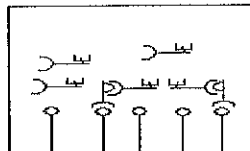
Incubation : 1 heure à température ambiante

Etape e : lavage



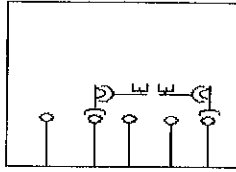
Il y a compétition entre l'histamine fixée et l'histamine libre pour la fixation de l'anticorps

Etape f : addition du conjugué



Incubation 30 minutes à température ambiante

Etape g : lavage



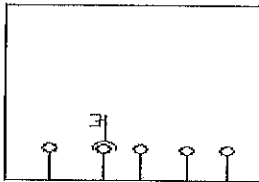
* Les lavages sont particulièrement importants car ils permettent l'élimination de tous les réactifs qui ne sont pas fixés. Ils doivent être réalisés avec le plus grand soin.

Il est également important de bien homogénéiser la plaque et de respecter les temps d'incubation.

* Il s'agit d'une technique immunoenzymatique par compétition : il y a compétition pour la fixation de l'anticorps anti-histamine sur l'histamine fixée au fond des puits et l'histamine libre. Plus la concentration en histamine libre de l'échantillon ou de l'étalon est élevée, moins il y a fixation de l'anticorps sur l'histamine adsorbée.

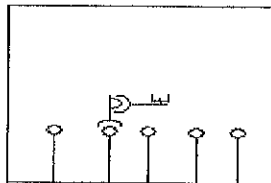
3.2.2. La sensibilisation consiste en la fixation de l'histamine au fond des puits, par adsorption. À noter que cette sensibilisation doit obligatoirement être suivie d'une saturation des sites des microcupules, avec par exemple une solution d'albumine, afin d'empêcher l'histamine libre à doser, ajoutée lors de l'étape c, ne s'adsorbe elle aussi.

3.2.3 Technique directe :



Inconvénients : Il est nécessaire de disposer d'un conjugué spécifique différent pour chaque type de substance à doser, d'où un coût élevé (les conjugués sont coûteux et de conservation limitée)

Technique indirecte



Avantages : Un seul type de conjugué est suffisant à condition que l'anticorps marqué soit choisi de telle façon qu'il s'agisse toujours d'une IgG de lapin.

3.2.4

	Etalons						Echantillons	
	1	2	3	4	5	6	E	F
A1 (1 ^{er} essai)	1,732	1,491	1,275	0,893	0,579	0,408	1,428	0,968
A2 (2 ^{ème} essai)	1,680	1,470	1,282	0,912	0,565	0,422	1,404	0,942
Moyenne des Absorbances	1,706	1,480	1,278	0,902	0,572	0,415	1,416	0,955

Pourcentage D'absorbance P	100	86,7	74,9	52,9	33,5	24,3	83	56
C ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0	50	150	450	1350	4050		
Log C	-	1,699	2,176	2,653	3,130	3,607		

3.2.5

Pour P supérieur à 75% (correspondant à des concentrations d'histamine inférieures à $150 \mu\text{g.L}^{-1}$), on se situe au voisinage du seuil de détection, la variation de P en fonction de logC est faible et le dosage est donc peu précis, voire aléatoire.

3.2.6

Echantillon E : par report sur la courbe, on trouve:

$$\log C_E = 1,9$$

ce qui donne pour l'extrait $C_E = 80 \mu\text{g.L}^{-1}$

Pour l'échantillon de poisson, on a donc:

$$X_E \approx 50 C_E = 4\,000 \mu\text{g.Kg}^{-1}$$

Valeur faible entachée d'une grande incertitude puisque $P > 75\%$.

Echantillon F : par report sur la courbe, on trouve:

$$\log C_F = 2,6$$

ce qui donne pour l'extrait $C_F = 398 \mu\text{g.L}^{-1}$

Pour l'échantillon de poisson, on a donc

$$X_F = 50 C_F \approx 20\,000 \mu\text{g.Kg}^{-1}$$

Valeur fiable puisque correspondant à la partie linéaire de la courbe.

**_*_*_*_*_*_*_

EPREUVES
DE LA SESSION
2002

EPREUVE DE FRANÇAIS.

DURÉE : 4 HEURES

COEFFICIENT : 3

Cette épreuve étant commune avec le BTS Biotechnologies, le sujet n'a été reproduit que pour la partie "BTS BIOTECHNOLOGIES" de ces annales.

EPREUVE D'ANGLAIS.

DURÉE : 2 HEURES

COEFFICIENT : 2

Cette épreuve étant commune avec le BTS Biotechnologies, le sujet n'a été reproduit que pour la partie "BTS BIOTECHNOLOGIES" de ces annales.

EPREUVE DE MATHÉMATIQUES.

DURÉE : 2 HEURES

COEFFICIENT : 1,5

Cette épreuve étant commune avec le BTS Biotechnologies, le sujet n'a été reproduit que pour la partie "BTS BIOTECHNOLOGIES" de ces annales.

EPREUVE DE SCIENCES PHYSIQUES.

DURÉE : 2 HEURES

COEFFICIENT : 2,5

SCIENCES PHYSIQUES

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

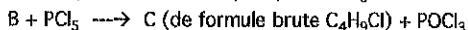
I) CHIMIE ORGANIQUE (12 points)

1) Sur l'amine A, de formule brute $C_4H_{11}N$, on fait réagir l'acide nitreux HNO_2 ($NaNO_2 + HCl$) en milieu aqueux. Il se forme un alcool B.

- a) Quelle est la classe de l'amine A ?
- b) L'amine A est une molécule chirale, établir sa formule semi développée plane.
- c) Représenter le stéréoisomère (S) de l'amine A en perspective cavalière (ou représentation de Cram) en rappelant les règles utilisées.

2) Donner la formule semi développée plane et le nom de l'alcool B. Préciser à quelle classe appartient cet alcool.

3) On traite B avec le pentachlorure de phosphore PCl_5



Écrire l'équation de la réaction.

4) C réagit sur le benzène en présence de chlorure d'aluminium AlCl_3 comme catalyseur pour donner D. Écrire l'équation de la réaction puis détailler son mécanisme.

Données: Numéros atomiques: $Z(\text{H}) = 1$; $Z(\text{C}) = 6$; $Z(\text{N}) = 7$.

II) SOLUBILITE, COMPLEXES (13 points)

1) Calculer la solubilité exprimée en mol.L^{-1} du chromate d'argent Ag_2CrO_4 :

a) dans l'eau pure;

b) dans une solution aqueuse de chromate de sodium $2\text{Na}^+ + \text{CrO}_4^{2-}$ à $16,2 \text{ g.L}^{-1}$.

2) Établir la structure électronique ainsi que la géométrie de la molécule d'ammoniac. Pourquoi cette molécule est-elle un agent complexant ?

3) L'ion Ag^+ forme avec l'ammoniac 1 ion complexe $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$.

On introduit du chromate d'argent solide dans 1 litre de solution aqueuse d'ammoniac de concentration molaire $C_1 = 1,00 \text{ mol/L}$.

a) Écrire les équations des deux équilibres qui s'établissent dans cette solution.

b) À l'aide de ces équations, justifier qualitativement que la solubilité du chromate d'argent soit plus grande dans une solution aqueuse d'ammoniac que dans l'eau pure.

Données: Numéros atomiques: $Z(\text{H}) = 1$; $Z(\text{N}) = 7$.

Masse molaire du chromate de sodium = 162 g/mol .

À la température de travail: $K_D \text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+ = 6,3 \cdot 10^{-3}$.

$K_S (\text{Ag}_2\text{CrO}_4) = 1,26 \cdot 10^{-12}$

III) POLARIMÉTRIE (12 points)

1) À l'aide d'un tube polarimétrique de longueur $\ell = 20 \text{ cm}$, on mesure les angles α de rotation que produisent des solutions étalons de saccharose sur le plan de polarisation de la lumière. On obtient le tableau de mesures suivant (à 20°C , pour la raie D du sodium):

Concentration massique en g/L	0	20	40	60	80	100
α en degré	0	2,65	5,35	8,00	10,65	13,35

Déterminer le pouvoir rotatoire spécifique du saccharose $[\alpha]^{20}_D$ en $^\circ.\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$. Vous choisirez la méthode de votre choix, numérique ou graphique.

2) Une solution inconnue S de saccharose est diluée 5 fois. On obtient pour cette solution diluée avec le même tube polarimétrique $\alpha = 7,50^\circ$.

a) Déterminer la concentration massique en g.L^{-1} de la solution inconnue S.

b) Pourquoi a-t-on dilué la solution inconnue S avant de faire la mesure polarimétrique ?

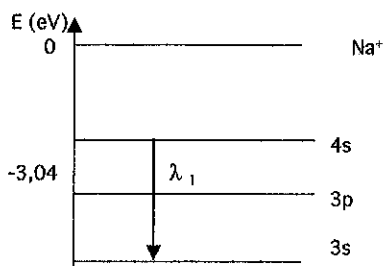
3) On veut doser une solution S, mélange de saccharose et de fructose. Dans ce mélange, les concentrations massiques respectives de saccharose et de fructose sont c_1 et c_2 avec $c_1 = 3 c_2$. On trouve, pour cette solution, avec le même tube polarimétrique, $\alpha = 4,24^\circ$.

Calculer c_1 et c_2 .

Données: pouvoir rotatoire spécifique du saccharose $[\alpha]^{20}_D = 0,66 \text{ }^\circ.\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$;

pouvoir rotatoire spécifique du fructose $[\alpha]^{20}_D = -0,93 \text{ }^\circ.\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$.

IV) ATOMISTIQUE (13 points)



Le diagramme ci-dessus représente quelques niveaux d'énergie exprimée en électron-volts (eV) de l'atome de sodium.

1) L'atome de sodium est noté : $^{23}_{11}\text{Na}$.

Montrer que le niveau 3s correspond à l'état fondamental.

2) L'énergie d'ionisation de l'atome de sodium dans l'état fondamental est 5,14 eV.

En déduire l'énergie E_{3s} du niveau 3s.

3)

a) Expliquer le mécanisme d'émission de la radiation de longueur d'onde λ_1 , conformément au diagramme d'étude ci-dessus.

b) Sachant que: $\lambda_1 = 389 \text{ nm}$, déterminer en électron-volts (eV) l'énergie du niveau 4s.

4)

a) Soit un photon de longueur d'onde associée $\lambda_2 = 589 \text{ nm}$.

Peut-il être absorbé par un atome de sodium dans son état fondamental ?

b) Si oui décrire le mécanisme de cette absorption.

Données: constante de Planck $h = 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$;

charge élémentaire $e = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$

célérité de la lumière dans le vide $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$;

$1 \text{ eV} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$.

EPREUVE DE BIOCHIMIE BIOLOGIE.

Épreuve E4

DURÉE : 4 HEURES

COEFFICIENT : 6

Calculatrice interdite.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES :

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

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

LA MULTIPLICATION CELLULAIRE : PHÉNOMÈNE UNIVERSEL

La multiplication cellulaire est un phénomène biologique essentiel qui augmente le nombre de cellules tout en permettant la conservation des caractères génétiques dans la descendance. On étudiera successivement:

- l'ADN, molécule support de l'information génétique, et certains de ses constituants,
- quelques aspects des mécanismes de division cellulaire,
- des exemples d'inhibiteurs de la multiplication cellulaire,
- la multiplication cellulaire dans certains phénomènes physiologiques comme la réponse immunitaire.

1) Organisation moléculaire du matériel génétique (32 points)

1.1) Nucléotides et acides nucléiques

Les nucléotides constituent le matériel de base des acides nucléiques.

1.1.1) Structure des nucléotides

Nommer les molécules entrant dans la composition des nucléotides.
Préciser la nature des liaisons qui les unissent.

1.1.2) Structure des ADN

1.1.2.1) Nommer précisément l'ose présent dans les ADN et écrire sa formule cyclique.

1.1.2.2) Représenter, de façon développée, à l'aide du document n° 1, le dinucléotide pdApdT. Préciser le sens 5' → 3'.

1.1.2.3) Les ADN sont bicaténares.

Quelles particularités présentent les deux brins l'un par rapport à l'autre (préciser la nature et le nombre de liaisons mises en jeu dans l'appariement des deux chaînes) ?

1.1.3) Séquençage des ADN

Le séquençage d'un brin d'ADN est souvent effectué par la méthode "didésoxy" de SANGER qui utilise une réplification. Cette réplification nécessite une amorce et la présence d'ADN polymérase permettant l'élongation de la chaîne nucléotidique de 5' vers 3'.

1.1.3.1) Sur un schéma, faire figurer l'amorce et préciser le sens du brin d'ADN et de l'amorce. Indiquer clairement la partie du brin d'ADN séquencée.

1.1.3.2) Que faut-il en plus dans le milieu pour permettre l'élongation de la chaîne ?

1.1.3.3) Ce processus se différencie du procédé naturel de réplification par l'ajout, dans le milieu réactionnel, d'un composé particulier.

Nommer ce composé et schématiser sa structure, en développant la partie de la molécule responsable de cette différence; expliquer son rôle au niveau du séquençage par la méthode de Sanger.

1.2) Les nucléotides: leurs rôles cellulaires

Outre leur rôle structural, les nucléotides (et notamment les ribonucléotides) ont un rôle cellulaire essentiel. Dans la cellule, les nucléotides sont généralement sous forme de nucléosides triphosphate. Ces derniers sont souvent formés à partir de nucléosides diphosphate grâce à la nucléoside diphosphate kinase.

1.2.1) Cinétique de la nucléoside diphosphate kinase

La nucléoside diphosphate kinase catalyse la réaction:
 $ATP + CDP \rightarrow ADP + CTP$

Le mécanisme de cette cinétique à deux substrats est un mécanisme PING-PONG. Il obéit au modèle général:



1.2.1.1) Expliquer brièvement le mécanisme ping-pong.

Signaler l'évolution générale de la réaction par la notation de Cleland.

1.2.1.2) L'expression de la vitesse initiale en fonction des concentrations des 2 substrats dans le mécanisme bi-bi ping-pong est du type:

$$V_i = \frac{V_{\max}}{1 + K_A/(A) + K_B/(B)}$$

Les vitesses initiales, en présence d'une concentration constante en nucléoside diphosphate kinase, pour différentes concentrations d'adénosine triphosphate (ATP: substrat A) et de cytidine diphosphate (CDP: substrat B) peuvent être mesurées et utilisées dans une représentation en coordonnées inverses (représentation de Lineweaver et Burk; document n° 2).

- Indiquer comment, à partir d'une telle représentation primaire, on peut, grâce aux ordonnées à l'origine ($1/V_A$), faire une représentation secondaire de Lineweaver et Burk permettant de déterminer la constante de Michaelis relative au CDP ainsi que la vitesse maximum V_{\max}

- Justifier la réponse.

1.2.2) Intervention des nucléotides dans les régulations

Les ribonucléosides triphosphate interviennent, d'une part, comme composés à haut potentiel d'hydrolyse et permettent, d'autre part, d'assurer directement ou indirectement par leurs dérivés une régulation des voies métaboliques. Parmi ces dérivés, il faut citer l'AMP cyclique (AMPC) qui intervient dans la transduction du signal hormonal.

1.2.2.1) Comment, d'un point de vue fonctionnel, peut-on qualifier l'AMPC ?

1.2.2.2) - Montrer comment l'AMPC intervient dans la régulation de la glycogénolyse musculaire.

On insistera principalement sur les diverses enzymes qui, par leur modification, permettent une cascade amplificatrice de l'action de l'adrénaline après fixation sur son β -récepteur.

- La glycogénogénèse est un mécanisme de synthèse du glycogène opposé à la glycogénolyse chez l'homme. L'enzyme centrale de la glycogénogénèse est la glycogène synthase.

- Donner la réaction chimique résumant l'action de la glycogène synthase. On écrira les formules détaillées des motifs glucidiques mis en jeu.
- La glycogène synthase et la glycogène phosphorylase sont régulées de façon réciproque. Illustrer cette constatation en décrivant l'effet de l'AMPC sur la glycogénogénèse à la suite de l'action de l'adrénaline sur le muscle.

1.3) Chromatine et ADN

Dans le noyau, l'ADN est associé étroitement à des protéines; l'ensemble constitue la chromatine. Nommer les éléments désignés de 1 à 3 du document n° 3.

2) Noyau et division cellulaire (40 points)

2.1) Noyau et nucléotide bactérien

En biologie la présence d'un noyau est un critère important de différence entre les cellules procaryotes et eucaryotes.

2.1.1) Le document n° 4 représente l'ultrastructure du noyau d'une cellule animale. Donner le nom des structures numérotées de 1 à 6.

2.1.2) Préciser le rôle du nucléole.

2.1.3) Présenter les particularités du nucléoïde bactérien par rapport au noyau de la cellule eucaryote.

2.2) Cycle cellulaire et chromosomes

L'organisme vivant produit continuellement de nouvelles cellules afin de remplacer celles qui sont éliminées; les cellules au repos entrent alors dans le cycle cellulaire.

2.2.1) Citer dans l'ordre chronologique les différentes phases du cycle cellulaire.

2.2.2) Détailler les événements qui se produisent au cours de l'interphase.

2.2.3) Afin d'étudier le contenu chromosomique du noyau, on peut utiliser la colchicine qui provoque l'arrêt de la mitose au stade métaphase.

Le document n° 5 représente une cellule et un chromosome en métaphase. Donner le nom des structures numérotées de 1 à 9.

2.2.4) Le fuseau mitotique, constitué de microtubules, rentre dans la constitution du cytosquelette.

Citer deux autres catégories de filaments du cytosquelette.

2.2.5) Les microtubules, constitués de tubulines, sont polarisés (extrémité + et extrémité -) et présentent une structure dynamique.

- Indiquer à quoi correspondent les extrémités + et - figurant dans le document n° 6.

- Justifier le terme "dynamique" à l'aide de l'expérience schématisée dans ce document.

2.2.6) Sachant que la colchicine bloque la réaction se déroulant à l'extrémité +, quelle sera la conséquence sur le fuseau mitotique ?

2.3) Chromosome bactérien et transfert

La réplication de l'ADN est nécessaire à certains transferts de gènes entre bactéries.

2.3.1) En prenant l'exemple de l'ADN de *E.coli*, citer les principales enzymes qui interviennent dans la réplication de l'ADN chromosomique.

2.3.2) La conjugaison est un moyen de transfert de gènes.

2.3.2.1) Définir la conjugaison bactérienne.

2.3.2.2) Un transfert de gènes est toujours orienté d'une cellule donneuse vers une cellule receveuse. Indiquer les caractéristiques des génomes de ces cellules.

2.3.2.3) Seules les cellules Hfr assurent un transfert efficace de gènes chromosomiques aux cellules receveuses F⁻.

- Expliquer, à l'aide de schémas, ce transfert chromosomique.

- Préciser le résultat final quant à l'information génétique dans les deux cas suivants:

- conjugaison interrompue.

- conjugaison non interrompue.

- Donner un exemple de critère de sélection des recombinants.

2.3.2.4) Expliquer comment la conjugaison Hfr x F⁻ permet de déterminer la localisation relative des gènes sur le chromosome bactérien.

2.3.3) Les plasmides, éléments extrachromosomiques, peuvent être transférés par conjugaison. Énumérer les principaux sites et gènes responsables des propriétés des plasmides.

3) Inhibition de la multiplication cellulaire (28 points)

La multiplication cellulaire peut être inhibée par des substances qui bloquent la synthèse d'ADN.

3.1) Inhibition compétitive

3.1.1) Expliquer par des schémas le mécanisme de l'inhibition compétitive en insistant sur les complexes réversibles formés.

3.1.2) Écrire l'équation donnant la vitesse initiale en fonction des concentrations en substrat et inhibiteur dans le cas d'une inhibition compétitive d'une réaction michaelienne à un substrat.

3.1.3) Donner l'aspect des représentations de Lineweaver et Burk correspondantes en coordonnées inverses (enzyme non inhibée, enzyme inhibée).

3.1.4) Une représentation graphique pratique (document n° 7) permet de déterminer une constante caractéristique (K_m est la constante de Michaelis apparente de l'enzyme inhibée).

Indiquer à quoi correspondent, sur ce document, l'ordonnée A et l'abscisse B. Justifier.

3.2) Acide folique et antifolates

L'acide folique est un coenzyme qui intervient dans la synthèse des acides nucléiques.

3.2.1) Inhibition par le méthotrexate

Le document n° 8 présente les formules développées de l'acide folique et de ses dérivés. La dihydrofolate réductase (DHFR) humaine ou animale est inhibée compétitivement par le méthotrexate (voir document n° 9). La réaction catalysée par la DHFR figure dans le document n° 11 résumant la synthèse cellulaire du désoxythymidine monophosphate.

3.2.1.1) L'acide tétrahydrofolique (FH4) intervient notamment dans la synthèse cellulaire du dTMP.

Indiquer, d'un point de vue général, les types de réactions auxquelles ce coenzyme participe.

3.2.1.2) À partir des documents n° 8, 9 et 11:

- expliquer pourquoi le méthotrexate peut bloquer la synthèse de l'ADN,
- justifier le type d'inhibition occasionné.

3.2.2) Inhibition par l'aminoptérine

La voie principale de synthèse des acides nucléiques est bloquée par l'aminoptérine, inhibiteur de l'acide folique.

La synthèse peut néanmoins être effectuée par une voie alterne dans laquelle interviennent deux enzymes:

- la HGPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase)
- la thymidine kinase.

L'inhibition par l'aminoptérine est utilisée pour la sélection de certains hybrides dans la préparation des anticorps monoclonaux par la technique de fusion classique.

3.2.2.1) Citer les cellules que l'on veut fusionner.

3.2.2.2) Ces cellules possèdent des propriétés particulières mises à profit dans la préparation des anticorps monoclonaux. Indiquer ces propriétés.

3.2.2.3) Expliquer le principe de sélection des hybrides par utilisation d'aminoptérine.

3.3) Inhibition de la multiplication bactérienne

3.3.1) Les antibiotiques sont utilisés dans le traitement des infections bactériennes. Donner une définition complète de ces substances.

3.3.2) À l'aide des formules des documents n° 8 et 10, expliquer le mécanisme d'action antibactérienne de la sulfanilamide.

4) Multiplication cellulaire dans les phénomènes immunologiques (20 points)

Les cellules du système immunitaire font l'objet d'une multiplication cellulaire intense au cours de la vie embryonnaire et après stimulation antigénique.

4.1) Multiplication au cours de la vie embryonnaire

Une multiplication cellulaire importante se produit dans les organes lymphoïdes primaires.

4.1.1) Nommer les organes lymphoïdes primaires et préciser le type de lymphocytes qui s'y forment.

4.1.2) Les lymphocytes T se forment à partir des cellules précurseurs. Citer les principaux phénomènes qui se produisent au cours de cette maturation et qui permettent d'obtenir des lymphocytes T "éduqués".

4.2) Multiplication après stimulation antigénique

Au cours de la réponse immunitaire, les cellules spécifiques de l'antigène subissent une importante prolifération.

4.2.1) L'antigène joue un rôle essentiel dans le déclenchement de cette multiplication cellulaire puisqu'en se fixant sur le récepteur spécifique, il active les cellules au repos qui passent alors du stade G_0 au stade G_1 .

- Présenter brièvement les différents constituants des récepteurs antigéniques des lymphocytes T et B.

- Préciser les molécules reconnues par le récepteur de l'antigène des lymphocytes T auxiliaires.

4.2.2) La stimulation antigénique est insuffisante, dans le cas général, pour provoquer la prolifération cellulaire. Des cytokines doivent être mises en jeu.

4.2.2.1) L'interleukine 2 (IL-2) est une cytokine qui joue un rôle important dans les réponses humorales nécessitant l'intervention des lymphocytes T auxiliaires.

- Expliquer les circonstances de sa production et présenter ses principaux effets cellulaires dans ce type de réponse.

- Présenter les caractéristiques générales d'action des cytokines sur les cellules du système immunitaire.

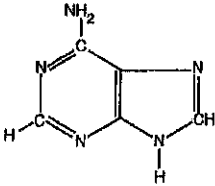
4.2.2.2) Expliquer pourquoi seuls les clones lymphocytaires spécifiques de l'antigène sont impliqués dans la prolifération.

4.3) Les cellules animales peuvent aussi se multiplier en culture, in vitro. Les lymphocytes ont besoin de substances mitogènes pour se diviser et la prolifération des cellules adhérentes nécessite des facteurs de croissance.

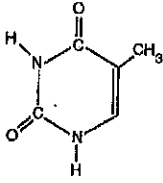
4.3.1) Citer un exemple de mitogène utilisé en culture lymphocytaire.

4.3.2) Quelles sont les origines des facteurs de croissance intervenant dans la culture des cellules adhérentes ?

DOCUMENT N°1



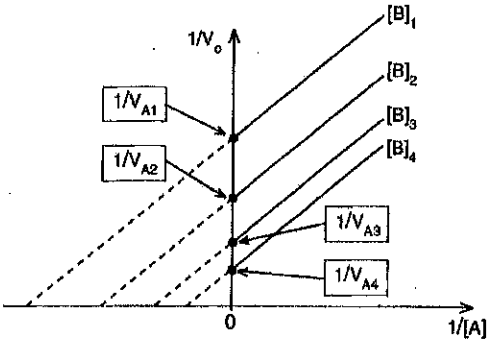
Adénine



Thymine

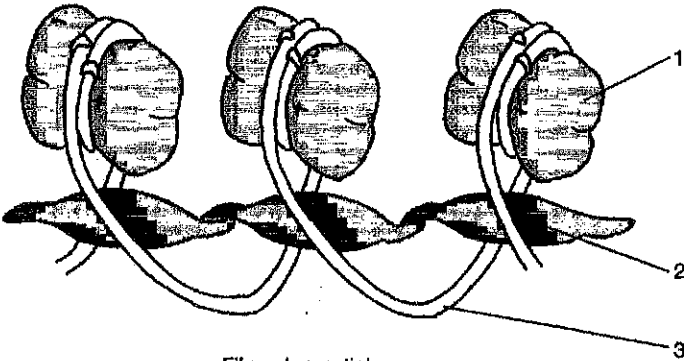
Formules de l'adénine et de la thymine

DOCUMENT N°2



Nucléoside diphosphate kinase : représentation primaire

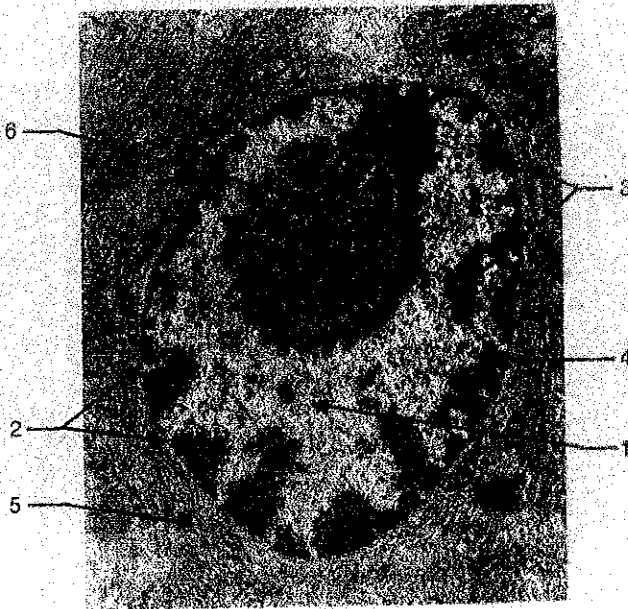
DOCUMENT N°3



Fibre chromatinienne

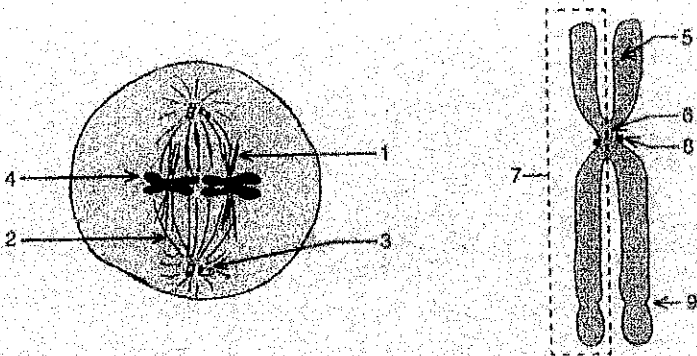
B.T.S. BIOCHIMISTE

DOCUMENT N°4



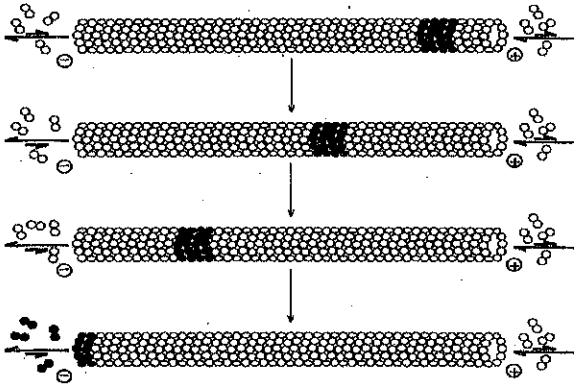
Ultrastructure du noyau d'une cellule eucaryote
d'après Stephen L. Wolfe

DOCUMENT N°5



Cellule et chromosome en métaphase

DOCUMENT N°6

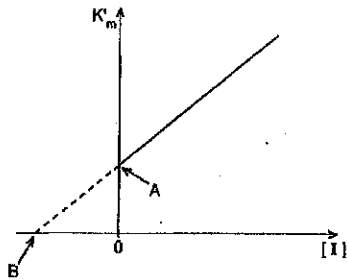


Microtubules (modèle du tapis roulant)

Ce schéma représente la localisation dans le temps des molécules de tubulines marquées (zone sombre).

DOCUMENT N°7

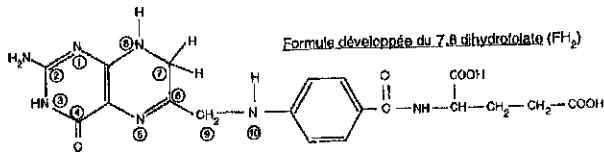
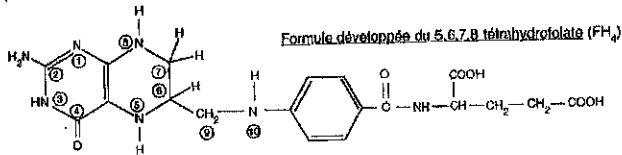
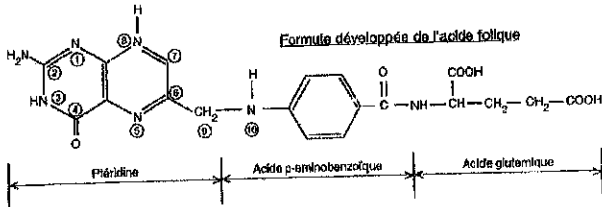
DOCUMENT A RENDRE AVEC LA COPIE



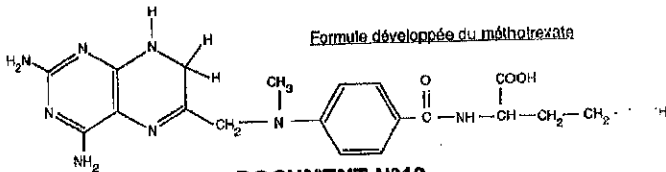
Inhibition compétitive
courbe $K'_m = f([I])$

DOCUMENT N°8

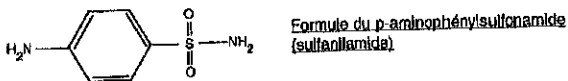
Formules de l'acide folique et des dérivés



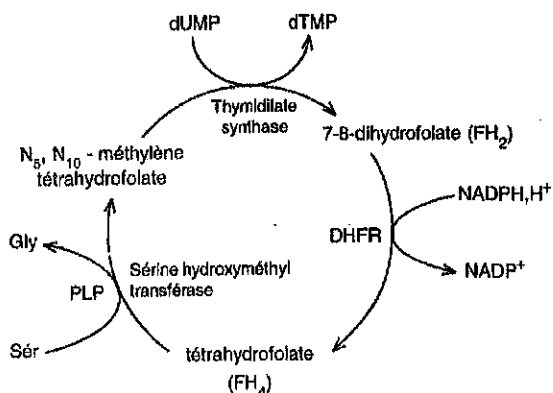
DOCUMENT N°9



DOCUMENT N°10



DOCUMENT N°11



La synthèse cellulaire du dTMP (désoxythymidine monophosphate)

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE.

Première partie :

ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

Épreuve E5. Unité U51

DURÉE : 4 HEURES

COEFFICIENT : 4

DIAGNOSTICS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE

Dictionnaire français-anglais et calculatrice autorisés

Maladie infectieuse commune à l'homme et aux animaux, la listériose est provoquée par une bactérie, *Listeria monocytogenes*. La contamination se fait essentiellement par voie digestive suite à la consommation d'aliments préparés à partir d'animaux malades ou porteurs sains. La fréquence de cette maladie augmente depuis plusieurs années sans qu'il soit possible d'établir s'il s'agit réellement d'une extension ou d'une meilleure détection. Depuis 1981, date à laquelle la transmission alimentaire a été prouvée, de nombreux tests de dépistage ont été développés: méthode bactériologique traditionnelle, immunodétection automatisée, hybridation moléculaire.

PREMIERE PARTIE:

recherche et identification des *Listeria monocytogenes* dans l'industrie fromagère par méthode bactériologique traditionnelle (20points)

Les bactéries appartenant au genre *Listeria* ont en commun les caractères suivants: petits bacilles Gram +, en palissade; catalase +; oxydase -; esculine +; aéro-anaérobies; halophiles; auxotrophes vis-à-vis de nombreux facteurs de croissance; mobiles (à 20-25°C) grâce à une ciliature péritriche; non sporulés.

1) Recherche de *Listeria monocytogenes*

1-1) D'une manière générale, les produits laitiers doivent se conformer aux standards impératifs suivants:

	n	c	m
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	absence dans 25 g

1-1-1) Que signifient: m, n et c ?

1-1-2) Que doit-on faire pour réaliser la recherche de *Listeria monocytogenes* en se conformant aux données ci-dessus ?

1-2) À partir du protocole fourni, document 1, dégager les différentes étapes et préciser leur intérêt.

1-3) Justifier l'emploi du bouillon de Fraser 1/2 dont la composition figure dans le document 2.

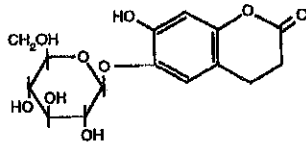
1-4) Comment peut-on, à partir de colonies suspectes sur milieu ALOA, s'orienter rapidement vers le genre *Listeria* ?

2) Identification des colonies suspectes sur galerie API *Listeria* (document 4)

2-1) La galerie d'identification permet la différenciation entre *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes* grâce au test DIM lu après addition d'un réactif ZYM B.

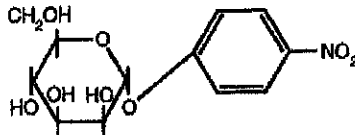
À partir du document 3, dégager les précautions à prendre lors de l'utilisation du ZYM B.

2-2) L'esculine a pour formule:



Écrire la réaction catalysée par les bactéries appartenant au genre *Listeria* (formules chimiques exigées)

2-3) L' α -mannosidase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse du substrat suivant:



para-nitrophényl α -D-mannopyranoside

Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une coloration jaune. Expliquer pourquoi.

2 4) Pour les sept derniers tubes de la galerie Api *Listeria*, un résultat positif se traduit par un virage à la coloration jaune. Pourquoi ?

2-5) Une colonie suspecte ensemencée sur galerie Api *Listeria* a donné le profil biochimique suivant:

DIM	ESC	α MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
-	+	+	+	-	+	+	-	+	-

2-5-1) Identifier la bactérie contaminante en justifiant la démarche.

2-5-2) Le logiciel API LAB donne un indice de typicité: $T = 0,68$.
Qu'est-ce que l'indice de typicité ? Pourquoi l'indice de typicité est-il inférieur à 1 ?

2-6) Lorsqu'une *Listeria monocytogenes* est identifiée, la souche est envoyée au Centre de Références des Listeria ou un sérotypage est réalisé. D'autre part, l'Institut Pasteur de Paris peut en réaliser le lysotypage. Définir les termes: sérotypage, lysotypage.

DEUXIEME PARTIE:

immunodétection automatisée de *Listeria monocytogenes* dans différents lots de fromages (25 points)

Une méthode d'immunodétection est testée en parallèle à la méthode traditionnelle bactériologique.

1) Préparation des échantillons

Les protocoles diffèrent selon les produits alimentaires, comme le montre le document 5. À partir du document, indiquer les conditions de réalisation de l'étape 2 dans le cadre d'une recherche sur des fromages préparés à partir de laits pasteurisés (volume de culture ensemence, matériel, conditions de travail).

2) Principe d'un test " E.L.F.A. "

Coffret VIDAS *Listeria monocytogenes* (VIDAS LMO), bioMérieux.

Le document 6 donne une représentation schématique du principe d'une telle détection des antigènes de surface de *Listeria monocytogenes*.

2-1) Que représentent les éléments a, b et c ?

2-2) Caractériser la méthode d'immunodétection.

2-3) Quel type de signal le détecteur reçoit-il ? En déduire la signification d' "E.L.F.A.".

2-4) S'étant du 4-méthylumbelliférylphosphate, quelle est l'enzyme utilisée ?

2-5) Quel est l'avantage principal de cette méthode par rapport à la méthode bactériologique traditionnelle ?

3) Automatisation de la technique

Le système VIDAS propose des cônes à usage unique qui servent à la fois de phase solide sensibilisée et de système de pipetage. Les autres réactifs sont proposés pré-repartis dans les différents puits (n°1 à 10) d'une cartouche (document 7).

3-1) Quels sont les rôles respectifs du standard et des deux contrôles (C+ et C-) ?

3-2) Quel est le rôle de l'azote de sodium contenu dans le standard, les contrôles et les différentes cupules de réactifs ?

3-3) Justifier la présence et le choix du tampon à pH 9,2 dans la cuvette de lecture n° 10.

3-4) Citer les principaux avantages d'un tel système automatisé, comparé à une technique manuelle.

4) Analyse des résultats

L'appareil effectue deux mesures de signal dans la cuvette optique pour chacun des tests. La première lecture prend en compte le bruit de fond de la cuvette de lecture n° 10 avant mise en contact avec le contenu du cône. La seconde lecture est effectuée après incubation de S avec le contenu du cône.

Le calcul de la "RFV" (Relative Fluorescence Value) est le résultat de la différence des deux mesures.

La "valeur du test" (VT) représente le rapport RFV essai / RFV standard et permet l'interprétation selon le tableau suivant:

Valeur du test	VIDAS LMO	
	< 0,05	> 0,05
Interprétation	Négatif	Positif

Un résultat avec une valeur test inférieure à la valeur seuil indique un échantillon contenant des antigènes indétectables. Un résultat avec une valeur test supérieure à la valeur seuil indique un échantillon contaminé.

Les résultats obtenus lors de 2 séries différentes testant chacune 5 lots de fromages sont présentés dans le document 8.

4-1) Calculer les "RFV" et les "valeurs des tests" pour chaque lot et pour les deux contrôles (remplir la feuille de résultats du document 8 et la joindre à la copie).

4-2) Les deux séries proposent-elles des résultats validables ? Justifier la réponse.

4-3) Compléter la colonne "interprétation" pour les tests validables.

TROISIEME PARTIE:

détection par l'intermédiaire du gène HlyA qui code pour l'hémolysine de *Listeria monocytogenes* appelée listériolysine (35 points)

Les techniques classiques sont assez longues et manquent de spécificité. Des méthodes de diagnostic rapide utilisant l'hybridation moléculaire ont été développées.

En 1986, P.COSSART et al ont cloné et séquencé le gène HlyA. Cette équipe s'est aperçue que certains fragments internes de ce gène sont spécifiques de *Listeria monocytogenes*. Les cinq lots de la série 1 testés par la méthode immunologique VIDAS sont étudiés.

1) Amplification d'une séquence spécifique du gène HlyA par réaction de polymérisation en chaîne (méthode PCR)

Le principe général de la méthode PCR est donné dans le document 9a.

1-1) Séquence du gène HlyA à amplifier (document 9b à joindre à la copie)

Les oligonucléotides utilisés sont les suivants:

PCRGO 5'GAATGTAAACTTCGCGCAATCAG 3'

PCRD0 5'GCCGTCGATGATTT GAAC TTCATC 3'

1-1-1) Compléter le document 9b en écrivant la séquence du brin d'ADN complémentaire puis en positionnant les amorces, sachant que les élongations s'effectueront à partir de l'amorce dans le sens 5' -> 3'.

1-1-2) Déterminer en paires de bases la longueur théorique de l'amplifiat.

1-2) Protocoles utilisés

1-2-1) Extraction et purification préalables de l'ADN de *Listeria* (Document 10)

Analyser le protocole en expliquant d'une part les rôles respectifs du lysosyme, du saccharose, du SDS, de l'EDTA, de la protéinase K, et d'autre part ceux du phénol, du NaCl, de l'éthanol, de la RNase.

1-2-2) Amplification d'un fragment d'ADN spécifique du gène HlyA.

1-2-2-1) Préparation du milieu réactionnel (Document 11a)
Oligonucléotides amorces:

Calculer le volume des solutions A1 et A2 nécessaires à la réalisation du milieu réactionnel.

Donnée: masses molaires de PCRG0 et de PCRDO = 7500 g.mol⁻¹.

dNTP:

A partir d'une solution stock à 50 mmol.L⁻¹, indiquer comment préparer une solution fille telle que 10 µL apportent 20 nanomoles du mélange de dNTP.

Donnée: tampon de dilution = Tris-HCl 5 mmol.L⁻¹, pH 9.

Taq-polymérase:

3 µL de la solution B incorporent 0,03 micromoles de dNTP en 15 minutes à 70°C; calculer le volume de la solution B à ajouter dans le milieu réactionnel.

Donnée: 1 unité de Taq-polymérase est la quantité d'enzyme qui incorpore 10 nanomoles de dNTP dans un ADN en 30 minutes à 70°C.

1-2-2-2) Protocole d'amplification (Document 11)

Justifier les différentes étapes présentées dans le document 11b et dégager la notion de cycle d'amplification.

2) Détection de la séquence amplifiée

2-1) Par électrophorèse en gel d'agarose

Les amplifiats [A] sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,4 % contenant 1 % de bromure d'éthidium.

De plus, pour augmenter la spécificité du test, on dépose également les amplifiats hydrolysés [AH] en présence de l'enzyme de restriction Rsa I spécifique du site 5'GTAC 3' (Document 9b). Les résultats sont fournis (Document 12) (12a = schéma de l'électrophorégramme; 12b = distance de migration des fragments d'ADN).

Tracer sur papier millimétré la courbe d'étalonnage log (paires de bases) = f (distance de migration) grâce au témoin de taille: ADN du phage λ hydrolysé par Bst EI. Déterminer la taille des fragments obtenus. Sont-ils en accord avec la taille théorique de l'amplifiat non hydrolysé [A] et hydrolysé [AH] ?

Conclure sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les cinq lots étudiés.

Les résultats obtenus avec cette méthode sont-ils concordants avec ceux obtenus avec la méthode immunologique (lots numérotés de 1 à 5) ?

2-2) Par sonde marquée avec une peroxydase

Une sonde de détection, longue de 20 nucléotides, permet aussi de détecter l'amplifiat du fragment du gène de la listériolysine.

On étudie l'influence de la concentration en H₂O₂ sur le développement du signal peroxydase. Pour cela, on détermine, dans les mêmes conditions expérimentales, la vitesse initiale (v_i) de la réaction catalysée par la peroxydase en fonction de différentes concentrations en H₂O₂ (0,0003%, 0,015%, 0,3%), la concentration en chromogène TMB demeurant quant à elle inchangée.

TMB: 3,3', 5, 5'tétraméthylbenzidine.

2-2-1) Protocole de mesure des v_i de la réaction

Dans une cuve thermostatée pour photométrie, on dépose 2 mL de substrat H₂O₂-TMB en tampon citrate, à la concentration choisie. On préchauffe quelques minutes à 37°C, puis on déclenche la réaction par ajout de 10 µL d'une solution de peroxydase du commerce diluée au 1/1000.

L'évolution de l'absorbance est suivie pendant 2 minutes à 655 nm.

Établir la formule permettant de déterminer les concentrations d'activité catalytique peroxydasique en mol.min⁻¹. L⁻¹ de solution enzymatique.

Données: e = 4,56.10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹;

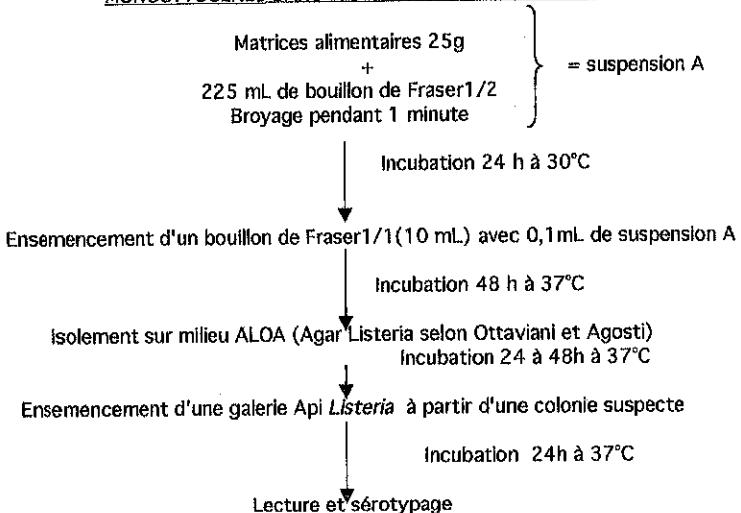
trajet optique = 1 cm.

2-2-2) Application

Utiliser les valeurs expérimentales suivantes pour choisir la concentration en H₂O₂ qui optimise la détection.

Concentrations en H ₂ O ₂ en %	ΔA / At en min ⁻¹
0,0003	0,001
0,015	0,200
0,3	0,015

DOCUMENT 1: METHODE POUR LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION DE LISTERIA MONOCYTOGENES DANS LES MATRICES ALIMENTAIRES



DOCUMENT 2: BOUILLON DE FRASER 1/2 (Laboratoire BOKAR)

Pour 1 litre de milieu:

- polypeptone 10 g
- extrait autolytique de levure 5 g
- extrait de viande 5 g
- chlorure de sodium 20 g
- phosphate disodique anhydre 9,6 g
- phosphate monopotassique 1,3 g
- esculine 1 g
- chlorure de lithium 3 g
- acide nalidixique 10 mg
- acriflavine 12,5 mg

pH du milieu: 7,2

Remarque: dans le bouillon de Fraser 1/1, les concentrations des trois derniers composants sont doublées.

DOCUMENT 3: REACTIF ZYM B

- Fast Blue BB: 0,35 g
- 2-méthoxy éthanol: 100 mL

TOXIQUE

R60: peut altérer la fertilité.

R61: risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant.

R10: inflammable.

R20/21/22: nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.

S53: éviter l'exposition (éviter le contact avec la peau et les yeux - l'inhalation des vapeurs et toute surchauffe brutale).

S45: en cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).

DOCUMENT 4: GALERIE API LISTERIA: (laboratoire BIOMERIEUX)

Principe:

La galerie API *LISTERIA* comporte 10 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, qui permettent la réalisation de tests enzymatiques ou des fermentations de sucres.

Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des changements de coloration spontanés ou révélés par l'addition de réactif.

Après incubation 18 - 24 heures à 35 - 37°C, la lecture des réactions est réalisée visuellement avec le tableau de lecture et l'identification obtenue grâce à la liste des profils ou d'un logiciel d'identification.

Mode opératoire:

- Préparation de l'inoculum:

A l'aide d'une pipette, prélever quelques colonies bien isolées et réaliser une suspension en eau distillée d'opacité égale à 1 de Mc Farland.

- Inoculation de la galerie:

Inoculer tube et cupule du test DIM avec la suspension bactérienne ajustée à 1 de Mc Farland.

Diluer l'inoculum de manière à obtenir une suspension d'opacité égale à 0,5 de Mc Farland.

Inoculer les tubes des tests ESC à TAG.

- Incubation.

Lecture:

Ajouter une goutte de réactif ZYM B au test DIM.

Lire les réactions en se référant au tableau de lecture.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	RÉACTIONS	RÉSULTATS	
		NÉGATIFS	POSITIFS
LDIM I	Différenciation <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	ZYM B / < 3 min	
		orange pâle rose beige gris beige	orange
ESC	ESCuline (Hydrolyse)	jaune pâle	noir
α-MAN	α-MANosidase	incolore	jaune
DARL	D-Arabitol	Rouge Rouge orangé	Jaune Jaune orangé
XYL	D-XYLose		
RHA	RHAMnose		
MDG	α-Méthyl-D-glucoside		
RIB	RIBose		
G1P	Glucose-1-Phosphate		
TAG	D-TAGatose		

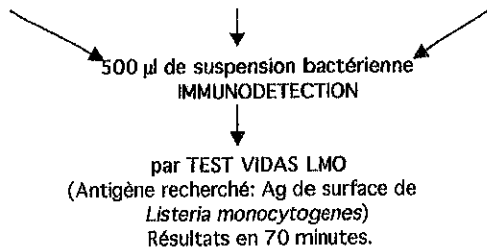
TABLEAU D'IDENTIFICATION

% de réactions positives après 18-24 h à 35-37°C

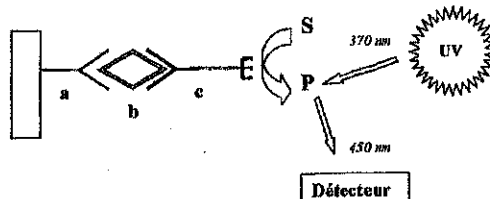
API LISTERIA	DIM	ESC	α MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
<i>Listeria grayi</i>	99	100	99	100	1	16	33	100	0	0
<i>Listeria innocua</i>	99	100	98	100	2	66	98	0	0	0
<i>Listeria ivanovii</i>	88	100	0	99	97	4	99	33	91	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	100	98	97	0	98	100	0	5	0
<i>Listeria seeligeri</i>	97	100	5	99	99	0	99	0	0	0
<i>Listeria welshimeri</i>	90	100	96	100	98	76	99	0	0	97

DOCUMENT 5:
PROTOCOLES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS AVANT IMMUNODETECTION
 (bioMérieux, AFNOR n° BIO-12/3-03/96)

		Fromages au lait cru	Autres produits	Autres produits alimentaires, non laitiers
ETAPE 1	Masse de produit	25 g	25 g	25 g
	Volume de bouillon	225 mL	225 mL	225 mL
		Incuber 24/26 h à 30°C		
ETAPE 2		Ensemencer sur gélose sélective	Ensemencer à 1% (v/v) dans le même bouillon (volume final du bouillon : 10 mL)	Ensemencer à 1% (v/v) dans le même bouillon (volume final du bouillon : 10 mL)
		Incuber 24 ou 48 h à 37°C. Ajouter 3 mL de trypsine -sel Racler Laisser 10 minutes à température ambiante.	Incuber 24/26 h à 30°C	



DOCUMENT 6 :
REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE D'UNE DETECTION E.L.F.A.

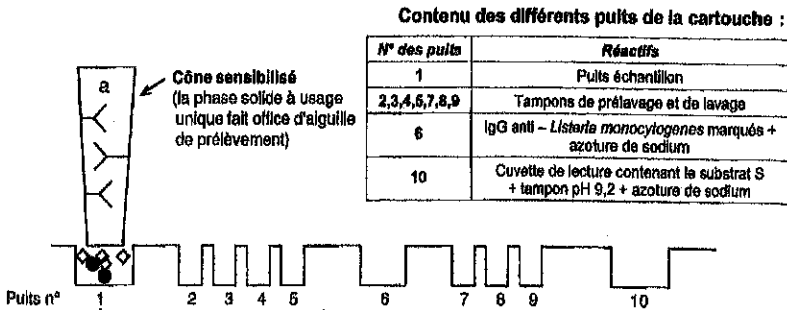


DOCUMENT 7 :

DISPOSITIF AUTOMATISE VIDAS POUR IMMUNODETECTION ELFA

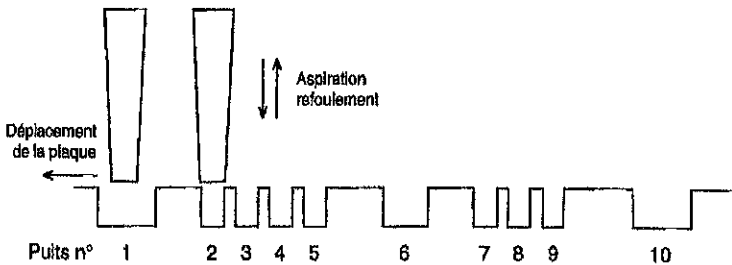
N.B. : Les éléments a et b sont de même nature que dans le document 7.

1 - Schéma technique du dispositif VIDAS



Échantillon (500 µL de bouillon ensemencé, après incubation : ◊ Ag recherché ● Autres antigènes)
 ou standard (Ag de *L. monocytogenes* purifié et inactivé de concentration connue + azoture de sodium)
 ou contrôles : - positif C+ (Ag de *L. monocytogenes* purifié et inactivé + azoture de sodium)
 - négatif C- (Tampon Tris-NaCl (150 mmol/L) - Tween pH 7,6 + azoture de sodium)

2 - Déroulement des étapes techniques



A chaque étape, le cône aspire et refoule plusieurs fois le réactif contenu dans la cupule : les cinétiques de réaction sont augmentées.

DOCUMENT 8: TABLEAU DE RESULTATS (à compléter et a rendre avec la copie)

Série 1	RFV stand	If1 BF	If2 essai	RFV essai	VT= RFVessai/RFV std	Interprétation (positif ou négatif)	Série 1	RFV stand	If1 BF	If2 essai	RFV essai	VT= RFVessai/RFV std	Interprétation (positif ou négatif)
Lot 1	3858	89	2713				Lot 1	3795	104	180			
Lot 2	3858	88	3753				Lot 2	3795	105	143			
Lot 3	3858	90	513				Lot 3	3795	104	218			
Lot 4	3858	90	167				Lot 4	3795	106	182			
Lot 5	3858	86	163				Lot 5	3795	103	140			
C+	3858	88	3869				C+	3795	105	290			
C-	3858	90	94				C-	3795	104	107			

BF : bruit de fond ; If : signal en unités arbitraires ; C+ : VT attendu : 0,8-1,2

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

DOCUMENT 9:

DOCUMENT 9a:

À partir d'informations sur les séquences situées de part et d'autre du locus désiré, on construit des amorces oligonucléotidiques.

Ces amorces sont complémentaires de brins opposés.

L'ADN total (double brin) est dénaturé par chauffage en présence d'un excès de ces oligonucléotides.

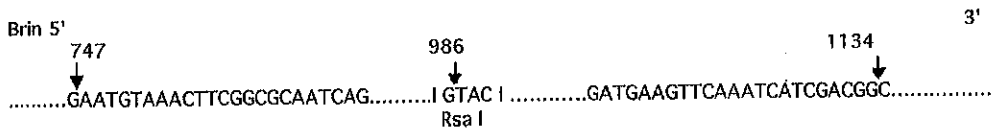
En refroidissant, les amorces s'associent à chacun des brins de l'ADN matrice.

On effectue leur élongation en présence de désoxynucléotides et d'une polymérase thermostable.

Après un cycle de synthèse, on recommence les mêmes étapes de chauffage, refroidissement, élongation.

DOCUMENT 9b: (à compléter et à rendre avec la copie)

Extrait de la séquence du gène Hly A.



L'enzyme de restriction Rsa I est spécifique du site 5'GTAC 3'.

DOCUMENT 10:

EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN DE *LISTERIA*

Infection and Immunity, apr. 1988

MENGAUD et al.

Listeria chromosomal DNA was prepared by a method adapted from that of Flamm et al. [15]. Overnight cultures (5 mL) of *Listeria* in brain heart infusion were centrifuged. Pellets were washed in 1 mL of 0,1 x SSC (1 x SSC is 0,15 M NaCl plus 0,015 M sodium citrate) and suspended in 0,6 mL of lysosyme solution (0,01 M sodium phosphate, 20 % sucrose [pH 7], 2,5 mg of lysosyme per mL, freshly added). The mixture was incubated for 1 h at 37°C, and then 5,4 mL of proteinase K solution (10 mM Tris hydrochloride [pH 8], 1 mM EDTA, 1 % sodium dodecyl sulfate [SDS], 500 µg of proteinase K per mL, freshly added) was added. After 1 or 2 h at 37°C, the mixture was gently extracted three times with 6 mL of saturated phenol. Then, 600 µL of sodium chloride was added, and DNA was ethanol precipitated for at least 2 h at - 20°C. DNA was then suspended in 0,5 mL of TE (10⁻² M Tris hydrochloride [pH 8], 10⁻³ M EDTA) containing RNase (50 µg/mL). Yield was about 10 µg of DNA per mL of overnight culture.

DOCUMENT 11:
AMPLIFICATION D'UN FRAGMENT D'ADN SPÉCIFIQUE DU GÈNE Hly A

DOCUMENT 11 a : composition du milieu réactionnel

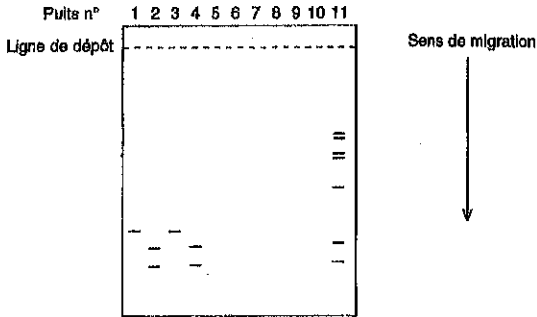
- extrait d'ADN.....10 μ L
- solution A1 d'oligonucléotides amorces à 20 μ mol/L (PCRGO).....300 ng
- solution A2 d'oligonucléotides amorces à 20 μ mol/L (PCRDO).....300 ng
- solution fille: mélange de dNTP (désoxyribonucléosides triphosphates)...10 μ L
- solution B de Taq-polymérase.....2 unités
- $MgCl_2$ à 25 mmol/L6 μ L
- tampon PCR 10X.....10 μ L
- eau distillée59 μ L

DOCUMENT 11 b : protocole d'amplification

L'ADN à amplifier est traité 5 minutes à 94°C, puis il subit les étapes suivantes: 1 minute à 94°C, 1 minute à 65°C, 2 minutes à 70°C... qu'on répète 30 fois.

DOCUMENT 12:
DÉTECTION DE LA SÉQUENCE AMPLIFIÉE PAR ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE.

DOCUMENT 12 a : schéma de l'électrophorégramme



Témoin de taille: ADN du phage λ coupé par Bst E1 = puits 11

Echantillons (lots de la série 1 testés par la méthode VIDAS):

Lots	1		2		3		4		5	
	[A]	[AH]	[A]	[AH]	[A]	[AH]	[A]	[AH]	[A]	[AH]
Puits	1	2 3	4 5	6 7	8 9	10				

DOCUMENT 12 b : distance de migration des différents fragments d'ADN

Témoin de taille:

Paired bases	15 500	9 800	4 000	3 595	1 450	290	160
Distances de migration en mm	22	23	27	28	36	51	56

Echantillons:

Lots	1			2		
	[A]	[AH]		[A]	[AH]	
Distances de migrations en mm	48	52	57	48	52	57

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie :

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

ÉPREUVE E5.UNITÉ U52

DURÉE : 10 HEURES

COEFFICIENT : 8

SUJET 1.

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

UTILISATION DE QUELQUES PROTEINES DU BLANC D'OEUF

Plusieurs protéines (avidine, lysozyme, ovomucoïde ...) sont extraites du blanc d'oeuf et, après purification, utilisées dans les domaines biochimiques et biologiques.

MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE (80 points)

1^{er} jour

Durée: 3 H 4!

A - MICROBIOLOGIE (50 points)

Le sujet comprend deux parties:

- recherche de contaminants dans une solution purifiée d'avidine;
- préparation de la solution substrat microbienne utilisée pour la détermination de l'activité du lysozyme.

1 - Contamination lors de la purification de l'avidine. (27 points)

1.1 - Recherche de salmonelles dans la solution de blanc d'oeuf ayant servi à préparer la solution d'avidine.

L'arrêté du 19 janvier 1980 indique que le blanc d'oeuf ne doit pas contenir de *Salmonella* dans 25 grammes.

1.1.1 - Matériel.

- gélose lactosée au vert brillant et au rouge neutre notée "L";
- gélose de Rambach notée "R" (fiche annexe 1).

1.1.2 - Protocole opératoire.

25 grammes de blanc d'oeuf ont été ensemencés en milieu d'enrichissement Rappaport et incubés 24 h à 37°C; tube noté "B".

Poursuivre la recherche des bactéries en ensemencant:

- une gélose lactosée au vert brillant et au rouge de phénol;
- une gélose de Rambach.

Incuber les milieux à 37°C.

1.2 - Identification du contaminant de la solution purifiée d'avidine.

1.2.1 - Matériel.

- peroxyde d'hydrogène;
- réactif oxydase.

1.2.2 - Protocole opératoire et compte rendu.

Effectuer les examens macroscopique et microscopique de la souche contaminante isolée sur la boîte "A".

Présenter un champ microscopique a un examinateur.

Effectuer, en présence d'un examinateur, un test rapide d'orientation.

Proposer, sur le compte rendu, une orientation de diagnostic et un choix de galerie d'identification de la souche contaminante.

Faire viser par un examinateur.

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

2 - Préparation d'une suspension de *Micrococcus lysodeikticus*. (23 points)

Le lysozyme (mucopeptide N acétyl muramoyl hydrolase EC 3.2.1.17.) est extrait du blanc d'oeuf. Le substrat utilisé pour déterminer son activité est une suspension de *Micrococcus lysodeikticus* lyophilisés à 200 mg.L⁻¹ en tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L, pH 6,24. Cette concentration correspond à une absorbance de 0,50 unité à 600 nm.

2.1 - Ajustage de la suspension.

2.1.1 - Matériel.

- 1 tube contenant 15 mL de tampon pH 6,24;
- 4 cuves de spectrophotomètre;
- 4 morceaux de parafilm;
- 4 pipettes de 1 mL;
- 4 pipettes de 5 mL.

2.1.2 - Protocole opératoire.

Mesurer l'absorbance à 600 nm de la suspension "C" puis ajuster à 0,50 ± 0,02 unité d'absorbance dans du tampon phosphate pH 6,24 (montrer l'absorbance de la suspension ajustée à un examinateur).

Donnée: limite de linéarité: ≤ 0,8 unité d'absorbance.

2.2 - Dénombrement de la souche ajustée.

2.2.1 - Matériel.

- 6 boîtes contenant 15 mL de gélose pour dénombrement;
- 6 pipettes de 1 mL;
- 5 tubes contenant 9 mL d'eau distillée stérile.

2.2.2 - Protocole opératoire.

Effectuer le dénombrement sur gélose par étalement en double de 0,1 mL des dilutions 10⁻³, 10⁻⁴ et 10⁻⁵ de la suspension préalablement ajustée. Indiquer les conditions d'incubation.

B - IMMUNOLOGIE (30 points)

UTILISATION DE L'AVIDINE EN IMMUNOENZYMOLOGIE.

L'avidine est fréquemment utilisée dans les méthodes immunoenzymatiques indirectes. On se propose de détecter la présence de protéines spécifiques sur une membrane de nitrocellulose après dépôt de ces protéines sur la membrane.

On peut réaliser une méthode indirecte, utilisant un premier anticorps spécifique de la protéine à détecter, puis une antiglobuline conjuguée à une enzyme. Cette technique permet de détecter des quantités de 1 à 10 ng.

On peut également utiliser une technique indirecte utilisant une antiglobuline biotinylée et de l'avidine conjuguée à une enzyme. C'est cette technique que l'on se propose de tester ici.

1 - Matériel et réactifs.

- deux bandelettes de nitrocellulose de 0,7 x 6,5 cm dans une boîte de Petri (attention: ne pas toucher avec les doigts)
- solution de protéine P d'origine humaine à 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ notée "P" (1 mL);
- tampon PBS (12 mL) noté "PBS";
- deux tubes à hémolyse contenant chacun 5 mL de solution de saturation notée "solution de saturation";
- 10 tubes à hémolyse;
- pipettes automatiques P1000, P200, P50 avec cônes;
- pipette automatique P10 avec cônes correspondants pour les dépôts;
- gants;
- pince plastique.

2 - Mode opératoire.

Préparer les deux bandelettes de nitrocellulose selon le schéma joint en annexe 2.

Attention: écrire exclusivement au crayon graphite 1 B ou 2B.

Réaliser une gamme de dilution de la protéine P en tampon PBS, les concentrations allant de 50 à 500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (volume maximum: 1 mL).

Déposer 1 μL de chacune des solutions au centre des différents emplacements des bandelettes de nitrocellulose.

Laisser sécher 15 min dans la boîte de Petri.

Placer chacune des bandelettes dans un tube à hémolyse contenant la solution de saturation.

Laisser incuber à température ambiante jusqu'à la séance suivante.

3 - Compte rendu.

Compléter le document donne en annexe 2.

ANNEXE 1

MICROBIOLOGIE

Fiche technique Diagnostica Merck
RAMBACH® AGAR

UTILISATION

Identification de Salmonella spp.

Milieu de culture différentiel permettant l'identification de *Salmonella* dans les aliments et les échantillons biologiques.

MODE D'ACTION

Les éléments nutritifs du Rambach® Agar permettent une multiplication facile des entérobactéries. Le désoxycholate de sodium inhibe la flore Gram positive accompagnante. Le Rambach® Agar permet de différencier sans aucune ambiguïté les différentes espèces de *Salmonella* des autres bactéries par le biais d'un nouveau procédé, dont l'emploi a été breveté, l'incorporation de propylène glycol au milieu de culture.

Les *Salmonella* métabolisent le propylène glycol en formant des acides qui, combinés avec un indicateur de pH, donneront aux colonies une couleur rouge caractéristique

Afin de différencier les coliformes des *Salmonella*, le milieu contient un chromogène qui traduit la présence de β -galactosidase, laquelle est caractéristique des coliformes.

Les coliformes poussent sous la forme de colonies bleu-vert ou bleu-violet.

Les autres entérobactéries et les bactéries Gram négatives telles que *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* se développent sous la forme de colonies incolores. Seules *S. typhi* et *S. paratyphi A* ne métabolisent pas le propylène glycol et donnent des colonies incolores.

Cette nouvelle méthode permet de détecter sûrement et sans ambiguïté les *Salmonella*.

Le taux élevé d'identification faussement positive de *Salmonella* obtenu par les milieux traditionnels (environ 20 à 30 %) est presque éliminé par l'utilisation du Rambach® Agar.

En conséquence, il en résulte une économie importante en matériel et en temps de travail.

COMPOSITION TYPE

PEPTONE	5,0 g/L
EXTRAIT DE LEVURE	2,0 g/L
EXTRAIT DE VIANDE	1,0 g/L
CHLORURE DE SODIUM	5,0 g/L
DESOXYCHOLATE DE SODIUM	1,0 g/L
MELANGE CHROMOGENE	1,5 g/L
PROPYLENE GLYCOL	10, 5 g/L
AGAR-AGAR	15,0 g/L

EMPLOI

Le Rambach Agar est utilisé dans l'analyse de routine de recherche des *Salmonella* dans des échantillons biologiques ou alimentaires. Il permet de détecter avec efficacité les colonies de *Salmonella* même en présence

d'une forte contamination de bactéries coliformes.

Le milieu de culture peut être ensemencé directement avec l'échantillon à analyser (échantillon clinique ou matériel susceptible de contenir des *Salmonella*) ou à partir d'un bouillon d'enrichissement.

Le milieu en boîte est opalescent et légèrement rose saumon.

Les boîtes doivent être convenablement séchées avant l'ensemencement.

Ensemencer en surface à l'aide d'une oese 1/4 de la surface de la gélose à partir de l'échantillon ou du bouillon d'enrichissement.

Afin d'obtenir des colonies isolées facilement identifiables, effectuer un étalement en stries sur les 3/4 restant de la boîte en utilisant la même oese.

Incubation :24 heures à 35 - 37°C.

ANNEXE 2

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

N° de poste

IMMUNOLOGIE

											n° poste n° bande
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----------------------

Schéma d'une bandelette

Tableau des dilutions :

Tubes n°																				
----------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Schéma des dépôts sur chacune des bandelettes:

IMMUNOLOGIE - BIOCHIMIE (110 points)

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

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

A - IMMUNOLOGIE 2ème jour (30 points)

UTILISATION DE L'AVIDINE EN IMMUNOENZYMOLOGIE

1 - Matériel et réactifs.

- 24 tubes à hémolyse;
- pince en plastique;
- agitateur de Kahn;
- parafilm;
- PBS-Tween 20 (150 mL en pissette) noté "PBS-Tween 20";
- Ac anti P (2 tubes à hémolyse) noté "anti-P";
- conjugué biotinylé (2 tubes à hémolyse) noté "conjugué";
- avidine-phosphatase (2 tubes à hémolyse) noté "Avidine-phosphatase";
- substrat (2 tubes à hémolyse) noté "substrat".

2 - Mode opératoire.

Laver les bandelettes 3 fois 5 min en tubes à hémolyse contenant environ 5 mL de PBS-Tween 20 et sous agitation.
Placer les bandelettes dans la solution d'anticorps anti P et incuber 45 min à température ambiante sous agitation.
Laver 3 fois les bandelettes comme précédemment.
Placer les bandelettes dans la solution de conjugué biotinylé et incuber 45 min à température ambiante sous agitation.
Laver 3 fois les bandelettes comme précédemment.
Placer les bandelettes dans la solution d'avidine-phosphatase et incuber 45 min à température ambiante sous agitation.
Laver 3 fois les bandelettes comme précédemment.
Placer les bandelettes dans la solution de substrat, incuber à température ambiante en surveillant l'apparition de taches colorées au niveau des dépôts (maximum 15 min).
Arrêter la réaction en rinçant les bandelettes sous un jet de pissette d'eau distillée.
Sécher les bandelettes entre deux feuilles de papier filtre.

3 - Résultats et compte rendu.

Compléter le schéma des bandelettes sur le document joint en annexe.
Déterminer en ng le seuil de détection de la technique utilisée. Conclure.

B - BIOCHIMIE (80 points)

1 - Détermination de la teneur en lysozyme du blanc d'oeuf. (54 points)

Le lysozyme (nom usuel) ou muramidase (mucopéptide N acétyl muramoyl hydrolase EC 3.2.1.17) est une protéine enzymatique qui catalyse la lyse de bactéries in vivo. On la trouve en quantité notable dans le blanc d'oeuf. Sa masse molaire est de 14 600 g/mol.
Au cours de cette manipulation, on se propose de déterminer la teneur en lysozyme du blanc d'oeuf.
Pour cela, on dosera l'activité catalytique et la concentration en protéines:

- d'une solution de blanc d'oeuf (que l'on notera " S_{BO} ");
- d'une solution de lysozyme purifié (que l'on notera " S_{LP} ").

1.1 - Détermination de l'activité catalytique.

L'activité catalytique du lysozyme est mesurée par diminution de l'absorbance à 450 nm d'une suspension bactérienne de *Micrococcus lysodeikticus* à pH 6,24. Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui provoque une variation d'absorbance de 0,001 par minute dans les conditions de l'expérience et à 25°C.

1.1.1 - Réactifs.

- substrat: suspension de *M. lysodeikticus* à 200 mg/L en tampon phosphate 0,1 mol/L pH 6,24 (10 mL);
- solution de blanc d'oeuf S_{BO} conservée dans de la glace (cette solution a été préparée par homogénéisation d'un blanc d'oeuf dans de l'eau physiologique) (10 mL);
- solution de lysozyme purifié S_{LP} conservée dans de la glace (2,5 mL);
- eau physiologique (500 mL).

1.1.2 - Mode opératoire.

Diluer la solution de blanc d'oeuf S_{BO} au 1/100 dans l'eau physiologique.

Diluer la solution de lysozyme purifiée S_{LP} au 1/1000 dans l'eau physiologique.

Mesurer l'activité catalytique des solutions diluées de la façon suivante:

Dans une cuve spectrophotométrique:

- introduire 2,9 mL de substrat;
- préincuber à 25°C pendant 5 minutes;
- ajouter 0,1 mL de solution enzymatique;
- suivre la variation d'absorbance à 450 nm pendant 3 minutes, contre l'air.

Réaliser cette opération en présence d'un examinateur.

1.2 - Dosage des protéines par la méthode du biuret.

1.2.1 - Réactifs.

- solution étalon de sérumalbumine bovine (SAB) à 8 g/L (5 mL);
- réactif de Gornall (en dispensette);
- solution de blanc d'oeuf S_{BO} (10 mL);
- solution de lysozyme purifié S_{LP} (2,5 mL);
- eau physiologique (500 mL).

1.2.2 - Gamme d'étalonnage.

Réaliser une gamme de 6 tubes comportant de 0 à 8 mg de protéines par tube.

Compléter à 1 mL avec de l'eau physiologique.

Ajouter 4 mL de réactif de Gornall. Mélanger.

Mesurer l'absorbance à 540 nm après 30 min d'attente à température ambiante.

1.2.3 - Essais.

Diluer la solution de blanc d'oeuf S_{BO} au 1/4 dans l'eau physiologique.

Réaliser le dosage dans les mêmes conditions que la gamme:

- sur 1 mL de S_{BO} diluée (2 essais);
- sur 1 mL de S_{LP} (2 essais).

2 - Dosage de la biotine. (26 points)

L'avidine est une glycoprotéine présentant une grande affinité pour la biotine (interactions protéine-ligand ou IPL)... Mais l'avidine possède aussi la capacité de fixer le colorant HABA

(4' Hydroxy-AzoBenzène 2 carboxylic Acid) au niveau du même site de fixation que la biotine;

cependant, l'affinité de l'avidine pour l'HABA est nettement inférieure. Par ailleurs, l'absorbance à

500 nm du colorant HABA diffère profondément selon que celui-ci est combiné ou non à l'avidine:

- l'absorbance linéique molaire de la forme libre est $\epsilon_L = 600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$;

- l'absorbance linéique molaire de la forme liée ou combinée est $\epsilon_c = 34\,500 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.1 - Principe du dosage.

Dans une solution contenant le complexe avidine-HABA, l'addition d'un échantillon de biotine conduit au remplacement mole à mole de l'HABA par la biotine au niveau du complexe et à la libération de l'HABA. Ce phénomène entraîne une diminution de l'absorbance à 500 nm.

Donnée: pour une solution de biotine à $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\Delta \epsilon_{\text{HABA}} (500 \text{ nm}) = \epsilon_c - \epsilon_L = 33\,900 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

2.2 - Réactifs.

- tampon Tris-HCl 0,1 mol/L à pH = 7 (50 mL);
- solution de HABA en tampon Tris-HCl 0,1 mol/L à environ 0,6 mmol/L (2,5 mL);
- solution d'avidine pure en tampon Tris-HCl 0,1 mol/L à environ 0,4 g/L (2,5 mL);
- solution à doser "BIOT 0,5" (0,3 mL).

2.3 - Mode opératoire (2 essais).

Préparer une dilution au 1/200 en tampon Tris-HCl de la solution à doser "BIOT 0,5".
Effectuer le dosage sur la solution diluée selon le protocole du tableau ci-dessous:

	Cuve n° 1	Cuve n° 2
Solution HABA	1 mL	1 mL
Solution d'avidine	1 mL	1 mL
	Mélanger et lire les absorbances	A_1 à 500 nm contre l'air
Solution diluée à doser	50 μ L	100 μ L
	Mélanger et lire les absorbances	A_2 à 500 nm contre l'air

3 - Compte rendu et résultats

3.1 - Détermination de la teneur en lysozyme du blanc d'oeuf.

3.1.1 - Détermination de l'activité catalytique.

Compléter le tableau de résultats.

Calculer la concentration d'activité catalytique de la solution de blanc d'oeuf S_{BD} ainsi que de la solution de lysozyme purifié S_{LP} en U/mL.

3.1.2 - Dosage des protéines.

Élaborer le tableau de colorimétrie.

Compléter le tableau de résultats.

Exploiter ces résultats à l'aide de l'ordinateur.

Valider les valeurs expérimentales retenues pour le calcul de la droite de régression.

Donner l'équation de cette droite de régression ainsi que le coefficient de corrélation.

En déduire les valeurs des essais.

Discuter la répétabilité des essais.

Déterminer la concentration en protéines de S_{BD} et de S_{LP} en mg/mL.

Donnée: coefficient de variation de la méthode du biuret = 3 %.

3.1.3 - Calcul de la teneur en lysozyme du blanc d'oeuf.

Calculer l'activité spécifique de S_{BD} et de S_{LP} en U/mg.

En déduire la teneur en lysozyme du blanc d'oeuf (exprimée en pourcentage massique de lysozyme par rapport aux protéines totales).

3.2 - Dosage de la biotine.

L'addition d'un certain volume de solution après la lecture de A_1 rend nécessaire la correction de A_1 .

Calculer les absorbances corrigées A_1' (tenir compte de la dilution due à l'addition de la solution diluée à doser).

Déterminer pour chaque essai $\Delta A = A_2 - A_1'$.

Calculer la concentration molaire, puis la concentration massique de la solution "BIOT 0,5".

Donnée: $M_{\text{biotino}} = 244,3$ g/mol.

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

N° de poste

**IMMUNOLOGIE
FEUILLE DE RÉSULTATS**

Bandelette n° 1

					1
--	--	--	--	--	---

Bandelette n° 2

					2
--	--	--	--	--	---

Schéma de lecture :

Seuil de détection:

Conclusion :

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

N° de poste

**BIOCHIMIE
FEUILLE DE RÉSULTATS**

1-Détermination de la teneur en lysozyme du blanc d'œuf.

1-1-Détermination de l'activité catalytique.

	$\Delta A/\text{min.}$
S_{BD} au 1/100	
S_{LP} au 1/1000	

1-2-Dosage des protéines par la méthode du biuret.

Tubes	1	2	3	4	5	S_{BD} au 1/4		S_{LP}	
						Essai 1	Essai 2	Essai 1	Essai 2
Q protéines par tube (mg)									
A à 540 nm									

2-Dosage de la biotine.

	Essai 1	Essai 2
Absorbance A_1		
Absorbance A_2		

MICROBIOLOGIE (50 points)

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

2^{ème} jour

Durée: 1 H 15'

1 - Contamination lors de la purification de l'avidine.

1.1 - Recherche de salmonelles dans la solution du blanc d'oeuf ayant servi à préparer la solution d'avidine.

Lire les deux boîtes ensemencées et conclure.

1.2 - Identification du contaminant de la solution ourifiée d'avidine.

Exploiter les résultats des cultures.

Identifier le microorganisme contaminant.

Conclure.

2 - Préparation d'une suspension de *Micrococcus lysodeikticus*.

Compter les colonies.

En déduire la concentration bactérienne dans la suspension ajustée.

Conclure.

Donnée: le point 0,5 de Mac Farland a une absorbance de 0,1 unité à 600 nm, ce qui correspond à environ 10^8 bactéries/mL.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE.

Deuxième partie :

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

ÉPREUVE ES.UNITÉ U52

DURÉE : 10 HEURES

COEFFICIENT : 8

SUJET 2.

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué au candidat en début d'épreuve.

FARINE, PANIFICATION ET PAIN

BIOCHIMIE (75 points)

1^{er} jour

Durée: 4 H 30

Le pain est un produit élaboré à l'aide de farine de blé tendre qui fournit par l'amidon les substrats glucidiques nécessaires à la fermentation panaire. L'amidon est hydrolysé grâce aux amylases α et β

Le grain de blé renferme une quantité relativement constante de β -amylase et une quantité d' α -amylase qui augmente avec la proportion de grains germes. Actuellement, avec la mécanisation des moyens de récolte, cette quantité d' α -amylase diminue régulièrement et justifie une supplémentation en α -amylase fongique.

On se propose:

- de doser l'amidon d'une farine;
- de déterminer l'activité α -amylasique d'une préparation enzymatique en vue de l'enrichissement de la farine;
- d'analyser par chromatographie sur couche mince les produits d'hydrolyse de l'amidon.

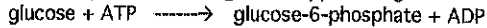
1-Dosage de l'amidon de la farine par méthode enzymatique en point final.(18 points)

1.1 - Principe.

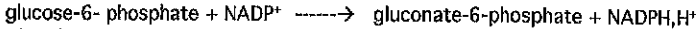
L'amyloglucosidase catalyse l'hydrolyse de l'amidon en glucose:



L'hexokinase catalyse la phosphorylation du glucose apparu en glucose-6-phosphate:



Le glucose-6-phosphate formé est oxydé en gluconate-6-phosphate dans une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate deshydrogénase, en présence de nicotinamide-adenine-dinucléotide-phosphate (NADP⁺):



La formation de NADPH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, est proportionnelle à la quantité de glucose libéré par l'hydrolyse de l'amidon.

1.2 - Préparation de l'échantillon à doser.

Les opérations suivantes ont été réalisées à partir de la farine à analyser selon le protocole suivant:

Pesée de X mg de farine homogénéisée et tamisée (la masse exactement pesée sera indiquée au candidat) et introduction dans une fiole d'Erlenmeyer. Ajout de 20 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) et de 5 mL d'acide chlorhydrique à 8 mol/L.

Incubation durant 30 minutes à 60°C dans un bain thermostaté avec agitation.

Après retour à la température ambiante, ajout d'environ 50 mL d'eau désionisée, ajustage du pH entre 4 et 5 avec de l'hydroxyde de sodium à 5 mol/L en agitant vigoureusement.

Transfert dans une fiole jaugée de 100 mL et ajustage au trait de jauge avec de l'eau désionisée.

Filtration si nécessaire.

On obtient la solution F.

Dans ces conditions, il n'y a pas formation de glucose libre provenant de l'amidon solubilisé.

Le glucose contenu en très faible quantité dans la farine pourra être négligé lors du dosage de l'amidon.

1.3 - Réactifs.

- solution F préparée selon le protocole ci-dessus (5 mL);
- solution 1: tampon citrate pH 4,6; amyloglucosidase (0,7 mL);
- solution 2: tampon triéthanolamine pH 7,6, NADP⁺, ATP, sulfate de magnésium (3,5 mL);
- suspension 3: hexokinase, glucose-6-phosphate déshydrogénase (80 µL).

1.4 - Mode opératoire.

Longueur d'onde: 340 nm. Cuve à usage unique de trajet optique 1 cm. Température: 20 à 25°C (température ambiante).

Diluer 10 fois la solution F à l'aide d'eau désionisée.

Introduire dans des cuves:

	Témoïn	Essai (2 essais)
Solution 1	0,20 mL	0,20 mL
Solution F diluée	---	0,10 mL
Eau désionisée	0,10 mL	---
Recouvrir les cuves de parafilm. Mélanger. Incuber 15 minutes au bain thermostaté à 55-60°C. Ajouter:		
Solution 2	1,00 mL	1,00 mL
Eau désionisée	1,00 mL	1,00 mL
Mélanger. Attendre environ 3 min. Lire l'absorbance (A ₁) de chaque cuve contre l'air. Ajouter:		
Solution 3	0,02 mL	0,02 mL
Mélanger. Attendre environ 15 minutes. Lire l'absorbance (A ₂) de chaque cuve contre l'air.		

1.5 - Résultats.

Calculer la différence d'absorbance $A_2 - A_1$ pour l'essai amidon (E) et pour le témoin (T).

Déterminer la différence (E - T).

Calculer la concentration molaire volumique (mmol/L) en glucose dans le milieu réactionnel.

Calculer la concentration massique (g/L) en amidon de la solution F.

En déduire le pourcentage en masse d'amidon dans la farine.

Données:

- absorbance linéique molaire du NADPH à 340 nm = $6\,300\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$;

- masse molaire: $M_{\text{unité glucosyle}} = 162,1\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;

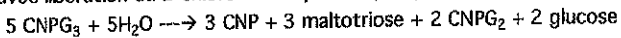
- coefficient de variation de la méthode = 3 %.

2 - Détermination cinétique de l'activité α -amylasique d'une préparation enzymatique. (42 points)

2.1 - Principe.

L'activité α -amylasique de la préparation est mesurée expérimentalement par méthode cinétique et déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

Le substrat 2-chloro-4-nitrophényl maltotrioside (CNPG₃) est hydrolysé en présence d' α -amylase avec libération du 2-chloro-4-nitrophénol (CNP):



CN PG₃: 2-chloro-4-nitrophényl maltotrioside

CNPG₂: 2-chloro-4-nitrophényl maltoside

CNP: 2-chloro-4-nitrophénol

2.2 - Réactifs.

préparation enzymatique;

tampon MES pH 6,0 à 50 mmol/L (15 mL)

solution de CNP à 2 mmol/L (2,5 mL)

monoréactif RTU: (5 mL)

tampon MES pH 6,0 à 50 mmol/L

NaCl à 50 mmol/L

Ca(CH₃COO)₂ à 5 mmol/L

KSCN à 0,4 mol/L

NaN₃ à 0,8 g/L

CNPG₃ à 3 mmol/L

2.3 - Mode opératoire.

2.3.1 - Détermination de l'activité α -amylasique de la préparation enzymatique (2 essais).

Le test s'effectue à la température de 30°C. La réaction enzymatique est déclenchée par addition de la préparation enzymatique.

Dans une cuve spectrophotométrique de 1 cm de trajet optique, introduire:

monoréactif RTU : 2 mL

préparation enzymatique : 50 μ L

Enregistrer l'absorbance à 405 nm pendant 3 minutes.

Réaliser cette opération en présence d'un examinateur.

2.3.2 - Courbe d'étalonnage.

À partir de la solution de CNP de concentration molaire $C = 2\text{ mmol/L}$, réaliser en eau désionisée et en tube à hémolyse une gamme de 5 solutions de CNP de concentration de 0 à 2 mmol/L.

Introduire dans des cuves spectrophotométriques de 1 cm de trajet optique:

2 mL de tampon MES pH 6,0;

50 μ L de chacune des solutions préparées.

Lire l'absorbance à 405 nm (stabilité de la coloration: 1 heure).

2.4 - Résultats.

Présenter les tracés des graphes : $A_{405\text{ nm}} = f(\text{temps})$.

Commenter brièvement.

Remplir le tableau d'étalonnage sur la feuille des résultats expérimentaux.

À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe d'étalonnage $A = f(n_{\text{CNP}})$

(n_{CNP} = nombre de μmol de CNP par tube)

Valider les valeurs expérimentales retenues pour le calcul de la droite de régression. Donner l'équation de cette droite ainsi que le coefficient de corrélation.

Calculer la concentration d'activité catalytique de la préparation enzymatique en U/L.

Données:

Une unité d'activité enzymatique (U) correspond à la quantité d'enzyme catalysant la production d'une micromole de CNP par minute dans les conditions du dosage.

Coefficient de variation de la méthode = 4 %

3 - Analyse de produits d'hydrolyse de l'amidon par fractionnement chromatographique sur couche mince. (15 points)

L'amidon d'une préparation de farine est hydrolysé par les amylases qu'elle contient. Une chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer les produits d'hydrolyse de faible masse molaire (fraction H) de l'amidon partiellement hydrolysé. La fraction H est analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

3.1 - Matériels et réactifs.

Cuve à chromatographie.

Phase stationnaire: gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium (5 x 10 cm) (chromatoplaque).

Phase mobile: méthyl-éthyl-cétone 3 V
acide éthanoloïque 1 V
méthanol 1 V

Solutions témoins de glucides à 5 g/L: xylose, glucose, saccharose, maltose, maltotriose.

Fraction H.

Révéléateur: réactif au thymol (thymol en milieu éthanol et acide sulfurique concentré).

3.2 - Mode opératoire.

Réactiver la chromatoplaque par passage à l'étuve à 105°C pendant 10 minutes.

Sous hotte à aspiration, introduire la phase mobile dans la cuve à chromatographie. La laisser se saturer en vapeurs de solvants pendant 15 à 20 minutes.

Sur la chromatoplaque réactivée et refroidie, à l'aide de capillaires, effectuer 2 dépôts successifs de chaque solution.

Placer la chromatoplaque dans la cuve.

À l'issue de la migration, laisser sécher la chromatoplaque sous la hotte.

Sous hotte à aspiration, révéler par le réactif au thymol (pulvérisation ou application au pinceau ou immersion).

Placer la plaque à l'étude à 105°C jusqu'à apparition des spots colorés.

3.3 - Résultats. (laisser le chromatogramme au poste de travail en fin d'épreuve)

Analyser le chromatogramme: justifier la migration différentielle des glucides testés.

Conclure quant à la nature des produits d'hydrolyse de l'amidon.

Données: tableau donnant les masses molaires moléculaires des glucides des solutions témoins:

glucide	xylose	glucose	saccharose	maltose	maltotriose
M (g/mol)	150	180	342	342	504

ANNEXE 2

À COMPLETER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

N° DE POSTE

BIOCHIMIE

1 - Dosage de l'amidon de la farine:

	A1	A2
Témoïn		
Essai 1		
Essai 2		

2 - Étalonnage:

C_{CNP} (mmol/L)	
n_{CNP} (μmol)	
A à 405 nm	

IMMUNOLOGIE - MICROBIOLOGIE (85 points)

FARINE, PANIFICATION ET PAIN

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire. L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

1^{er} jour

Durée: 3 H 45

A - IMMUNOLOGIE (30 points)

La farine de blé contient, à côté de l'amidon, des protéines insolubles dans l'eau ou gluten permettant l'obtention d'une pâte élastique qui donnera le pain. Une intolérance au gluten est observée chez les jeunes enfants entraînant une altération de la muqueuse de l'intestin grêle. Des pains sans gluten sont commercialisés.

On se propose, par une technique d'immunodiffusion double, d'effectuer une analyse semi-quantitative de la composition de deux extraits de pain: P1 et P2

1 - Matériel et réactifs.

- 3 petites boîtes de Petri de 5,6 cm de diamètre;
- 3 tubes contenant 4,5 mL d'agarose, à 1 % en PBS, en surfusion;
- extrait étalon contenant 150 mg gluten.L⁻¹ noté "E" (200 μL);
- extrait P₁ à analyser noté "P₁" (200 μL);
- extrait P₂ à analyser noté "P₂" (200 μL);
- solution d'anticorps antigluten notée << Ac >> (20 μL);
- tampon PBS, pH = 7,2 (10 mL) noté << PBS >>;
- un système de perforation;
- une chambre humide individuelle;
- P₁₀, P₁₀₀ ou P₂₀₀, P₁₀₀₀ + cônes adaptés;
- 8 tubes à hémolyse + portoir.

2 - Protocole opératoire.

*Préparation des boîtes

Couler 4,5 mL d'agarose à 1 % en tampon PBS dans 3 petites boîtes de Petri (l'une de ces boîtes servira à tester la réalisation des puits).

Laisser solidifier.

Creuser les puits suivant le gabarit en annexe. Préparer 2 boîtes.

***Dépôts**

Déposer 8 µL par puits.

Les extraits P1 et P2 sont testés purs et dilués au 1/5, 1/25 et 1/125 en tampon PBS.
L'extrait étalon E est utilisé pur.

Effectuer une série de dilutions en présence d'un examinateur.

Introduire l'anticorps antigluten << Ac >> dans l'un des puits de chaque boîte.

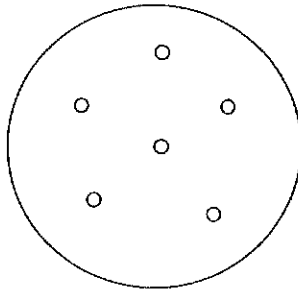
***Diffusion**

Laisser diffuser en chambre humide et à température ambiante, pendant 36 à 48 heures.

3 - Compte rendu.

Expliquer la réalisation des dilutions et schématiser la répartition des dépôts.

GABARIT POUR LA RÉALISATION DES PUIITS



B-MICROBIOLOGIE (55 points)

1 - Dénombrement de *Saccharomyces cerevisiae* dans une préculture de levain de panification. (17 points)

Une préculture de *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée pour fabriquer un levain. Cette préculture doit contenir au moins 10^6 UFC par mL.

1.1 - Matériels.

- 1 préculture de *Saccharomyces cerevisiae* noté << P >>;
- 6 géloses oxytétracycline glucose Agar (OGA) en boîte de Petri;
- un hématimètre de Malassez;
- 7 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile;
- pipette automatique P100 et cônes stériles;
- dispositifs stériles d'étalement;
- 7 pipettes stériles de 1 mL.

1.2 - Quantification par examen microscopique.

Réaliser la numération sur hématimètre des levures dans la préculture P.

Présenter un champ microscopique et le résultat de la numération de ce champ à un examinateur.

1.3 - Dénombrement sur gélose O.G.A.

En fonction du résultat de la numération sur hématimètre, préparer trois dilutions nécessaires au dénombrement en surface sur gélose O.G.A.

Ensemencer les boîtes de Petri.

Incuber 36 à 48 heures à 30°C.

1.4 - Compte rendu.

Donner le résultat de la numération sur hématimètre.
Justifier le choix des dilutions ensemencées.

2 - Contrôle de la pureté d'un levain à *Saccharomyces*. (10 points)

2.1 - Matériels.

- 1 tube contenant un levain noté << L >>;
- 1 gélose à l'actidione;
- 1 gélose WL (Wallerstein Laboratory = gélose au vert de crésol).

2.2 - Mode opératoire.

Afin de contrôler la pureté du levain L, étaler 0,1 mL de levain sur les milieux suivants:

- gélose à l'actidione;
- gélose WL.

Incuber 36 à 48 heures à 30°C.

2.3 - Compte rendu.

Justifier le choix des deux milieux ensemencés.

3 - Identification d'un contaminant isolé d'un levain de panification. (19 points)

3.1 - Matériels.

- 1 culture d'un contaminant sur gélose nutritive inclinée notée " G ";
- 1 tube contenant 2 mL d'eau physiologique stérile.

3.2 - Mode opératoire.

Le contaminant est présenté sur gélose nutritive inclinée notée << G >>.

Réaliser les observations macroscopique et microscopique, puis un test d'orientation.

Appeler un examinateur pour l'observation microscopique et le test d'orientation.

Noter sur le compte rendu la galerie miniaturisée souhaitée afin d'identifier le contaminant et le présenter à un examinateur.

Ensemencer la galerie distribuée et effectuer un isolement sur gélose nutritive.

3.3 - Compte rendu.

Rédiger le compte-rendu des observations macroscopique et microscopique ainsi que le résultat du test d'orientation.

IMMUNOLOGIE - MICROBIOLOGIE

2^{ème} jour

Durée: 1 H 45

FARINE, PANIFICATION ET PAIN

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

A - IMMUNOLOGIE (30 points)

Schématiser les résultats obtenus.

Commenter l'aspect et la position des arcs de précipitation obtenus et conclure qualitativement sur la composition des extraits P₁ et P₂.

Conclure sur la composition semi-quantitative des 2 extraits.

B - MICROBIOLOGIE (55 points)

1-Dénombrement de *Saccharomyces cerevisiae* dans une préculture de levain de panification. (17 points)

Compter les colonies.

Présenter les résultats sous forme d'un tableau;

Conclure en comparant les résultats des deux techniques de quantification.

2-Contrôle de la pureté d'un levain a *Saccharomyces*. (10 points)

Réaliser la lecture des deux milieux ensemencés .

Conclure sur la pureté du levain et la nature des éventuels contaminants.

3-Identification du contaminant isolé d'un levain de panification. (19 points)

Identifier le microorganisme isolé. Justifier la démarche.

4 - Identification d'une moisissure . (9 points)

Les moisissures productrices d' α -amylase, enzyme utilisée lors du prétraitement de la farine, sont recherchées afin de purifier cette enzyme et l'utiliser pour améliorer le processus de panification. Une moisissure M est fournie sur gélose PGA (Pomme de terre, glucose, Agar).

Réaliser les examens macroscopique et microscopique.

Montrer l'examen microscopique a un examinateur.

Réaliser un schéma de l'observation microscopique et identifier la moisissure.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie :

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.

ÉPREUVE ES.UNITÉ U52

DURÉE : 10 HEURES

COEFFICIENT : 8

SUJET 3.

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

LES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES EUKARYOTES.

BIOCHIMIE (70 points)

Durée: 3 H 30

Les milieux de culture des cellules eucaryotes doivent notamment contenir des glucides et des acides aminés (comme la glutamine). Ils peuvent être additionnés de sérum de veau foetal afin d'être enrichis en certains composés tels que le cholestérol.

On se propose de déterminer:

- la composition en glucides d'un milieu de culture;
- sa teneur en glutamine;
- sa teneur en cholestérol.

1 - Analyse de la composition en glucides par chromatographie sur couche mince. (15 points)

1.1 - Matériel - Réactifs.

- cuve à chromatographie;
- phase mobile: méthyléthylcétone 3 V / acide acétique 1 V / méthanol 1 V;

- plaque de gel de silice (5 x 7,5 cm);
- capillaires;
- solutions témoins: saccharose, glucose, raffinose, xylose;
- échantillon de milieu de culture à analyser (tube Eppendorf note M.C₁);
- réactif de révélation au naphtorésorcinol.

1.2 - Mode opératoire.

Saturation de la cuve: verser le solvant (sous la hotte) dans la cuve de migration, refermer et attendre environ 15 minutes.

Activation de la plaque: placer la plaque à l'étuve à 100°C pendant environ 10 minutes.

Dépôts: déposer une goutte des témoins et de l'échantillon à analyser.

Migration: placer la plaque dans la cuve et laisser migrer.

Révélation: sécher la chromatoplaque sous la hotte, puis révéler avec le réactif au naphtorésorcinol. Sécher à l'étuve pendant quelques minutes.

1.3 - Compte rendu.

Exploiter le chromatogramme obtenu.

2 - Dosage de la glutamine par pH-métrie. (34 points)

2.1 - Réactifs.

- hydrogénophthalate de potassium anhydre;
- solution d'hydroxyde de sodium à environ 0,050 mol.L⁻¹;
- indicateur coloré;
- milieu de culture à analyser (flacon note M.C₂);
- méthanal à 40 % (v/v);
- solution(s) tampon(s).

2.2 - Mode opératoire.

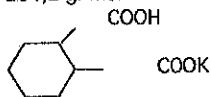
2.2.1 - Étalonnage de la solution d'hydroxyde de sodium (2 essais).

Il est réalisé par pesée d'hydrogénophthalate de potassium.

Effectuer le dosage sur une masse m telle que l'on versera environ 20 mL de solution d'hydroxyde de sodium.

Données: $M_{\text{hydrogénophthalate de potassium}} = 204,2 \text{ g. mol}^{-1}$

Formule:



Précision: 1%.

2.2.2 - Dosage de la glutamine par pH-métrie.

Étalonner le pH-mètre à l'aide des solutions tampons.

Dans un bécher de 100 mL, introduire:

- 5 mL de méthanal à 40 % (v/v). **Attention:** produit toxique; récupérer les déchets;
- 25 mL du milieu de culture à analyser (flacon noté M.C₂).

Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium préalablement étalonnée.

Effectuer un essai rapide et un essai précis.

2.3 - Compte rendu et résultats.

2.3.1 - Étalonnage de la solution d'hydroxyde de sodium.

Remplir la feuille de résultats jointe au protocole.

Justifier la masse pesée.

Calculer la concentration molaire volumique de la solution d'hydroxyde de sodium.

2.3.2 - Dosage de la glutamine par pH-métrie.

Donner le volume équivalent d'hydroxyde de sodium versé lors de l'essai rapide.

Remplir la feuille de résultats jointe au protocole.

À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe de titrage:

$$\text{pH} = f(\text{volume d'hydroxyde de sodium versé}).$$

Déterminer le point équivalent.

Calculer la concentration molaire volumique en glutamine du milieu de culture.

3 - Dosage enzymatique du cholestérol dans le milieu de culture (2 essais).

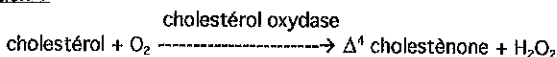
(21 points)

Le cholestérol du milieu de culture est dosé après une procédure d'extraction qui engendre une dilution au $1/20^{\text{ème}}$.

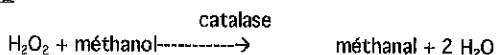
3.1 - Principe.

Le cholestérol extrait du milieu de culture est dosé selon le schéma réactionnel suivant:

- Réaction 1

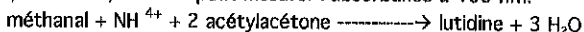


- Réaction 2



- Réaction 3

Le méthanal formé réagit avec de l'ammonium et de l'acétylacétone pour former un composé coloré en jaune, la lutidine, dont on peut mesurer l'absorbance à 405 nm.



3.2 - Réactifs.

- Réactif 1: tampon phosphate d'ammonium $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 7
méthanol
catalase
acétylacétone

- Réactif 2: cholestérol oxydase

3.3 - Mode opératoire.

Le cholestérol à doser se trouve dans le milieu d'extraction noté << ME >>. Effectuer une dilution préalable au $1/10^{\text{ème}}$ dans le propan-2-ol.

Introduire, dans trois tubes à hémolyse:

	Témoin	Essai 1	Essai 2
Réactif 1 (mL)	2,50	2,50	2,50
Milieu d'extraction dilué au $1/10$ (mL)	0,20	0,20	0,20
Réactif 2 (mL)	----	0,02	0,02

Mélanger soigneusement, boucher les tubes et incuber 60 minutes au bain thermostaté à 37°C .

Laisser refroidir à température ambiante puis transvaser dans des cuves.

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

3.4 - Compte rendu et résultats.

Compléter la feuille de résultats.

Déterminer la concentration massique en cholestérol du milieu de culture.

Données: $\epsilon_{\text{lutidine}} = 7,4 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

$M_{\text{cholestérol}} = 386,5 \text{ g.mol}^{-1}$

**NUMÉRO DE POSTE:
À COMPLETER ET À RENDRE AVEC LA COPIE**

**LES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES EUCARYOTES
RELEVÉ DES VALEURS EXPÉRIMENTALES**

2 - Dosage de la glutamine par pH-métrie.

2.2.1 - Étalonnage de la solution d'hydroxyde de sodium.

	Essai 1	Essai 2
masse d'hydrogénophthalate de potassium (g)	m_1	m_2
volume de la solution d'hydroxyde de sodium (mL)	V_1	V_2

2.2.2 - Dosage de la glutamine par pH-métrie (essai précis).

V NaOH (mL)	
PH	

3 - Dosage enzymatique du cholestérol dans le milieu de culture.

	Témoin	Essai 1	Essai 2
λ_{405nm}			

MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (90 points)

LES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES EUCARYOTES

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

1^{er} jour

Durée: 4 H 30

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

I - MICROBIOLOGIE (50 points)

Des substances à activité antimicrobienne (antibiotiques, fongicides) sont souvent ajoutées dans les milieux de culture.

1 - Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la nystatine. (18 points)

On peut considérer qu'une substance est fongicide si son action est capable de provoquer au moins une réduction de 99,99 % (4 réductions décimales) de l'inoculum initial.

1.1 - Matériel et réactifs.

- suspension de Candida albicans en bouillon Sabouraud notée "L₁";
- tube d'eau physiologique stérile (10 mL);
- pipette automatique P1000 + cônes;
- 2 tubes à hémolyse vides stériles ;
- 5 tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile ;
- 5 pipettes stériles de 1 mL ;
- solution de nystatine à 10 000 UI.mL⁻¹ en tube à hémolyse (1 mL)

- 3 boîtes de Petri contenant 20 mL de gélose Sabouraud;
- 8 écouvillons stériles ;

1.2 - Préparation des boîtes témoins.

Réaliser une dilution au 1/2 de la suspension "L₁" de Candida albicans en eau physiologique stérile. Cette dilution est appelée L₂.

À partir de "L₂", effectuer une série de dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁵ en eau physiologique.

Appeler un examinateur lors de la réalisation d'une dilution.

Pour chaque dilution, imprégner totalement un écouvillon stérile. Essorer ensuite l'écouvillon par trois pressions successives sur les parois du tube.

À l'aide du gabarit fourni (annexe 1), réaliser à la surface d'une première gélose Sabouraud, pour chacune des dilutions 10⁰ ("L₂") à 10⁻², une strie de 5 cm.

Laisser sécher les stries 30 minutes sans retourner les boîtes.

Procéder de la même manière sur une seconde gélose Sabouraud pour les dilutions 10⁻³ à 10⁻⁵. Incuber à 30°C pendant 48 heures.

1.3 - Réalisation du test.

Introduire dans le tube à hémolyse contenant 1 mL de nystatine à 10 000 UI.mL⁻¹, 1 mL de suspension de levure "L₁".

Mélanger et laisser en contact pendant 90 minutes à température ambiante.

À l'aide du gabarit fourni (annexe 1), réaliser à la surface d'une gélose Sabouraud 2 stries identiques (2 essais) selon la technique de l'écouvillon stérile.

Laisser sécher les stries 30 minutes sans retourner les boîtes.

Incuber à 30°C pendant 48 heures.

1.4 - Compte rendu.

Justifier la préparation de la suspension "L₂" pour la réalisation des boîtes "témoin".

Décrire et justifier l'aspect prévisible des boîtes "témoin" après incubation.

2 - Vérification de la bonne supplémentation du milieu de culture en pénicilline.

(32 points)

La mise en évidence d'un contaminant bactérien dans une culture de cellules animales conduit le technicien à s'interroger sur une éventuelle erreur de dosage de la pénicilline incorporée dans le milieu de culture.

La concentration en antibiotique devait être de 100 µg.mL⁻¹.

Afin de vérifier l'hypothèse, suivre le protocole ci-dessous de dosage de la pénicilline par diffusion en milieu gélosé.

2.1 - Matériel et réactifs.

- 10 mL de culture en bouillon nutritif ordinaire note "T₁";
- 1 tube de 10 mL de bouillon nutritif ordinaire;
- 4 cuves de spectrophotomètre;
- parafilm;
- spectrophotomètre;
- bac de désinfectant près du spectrophotomètre ;
- 6 tubes à hémolyse bouchés;
- 5 tubes de 9 mL d'eau physiologique;
- 4 pipettes stériles de 1 mL;
- 2 pipettes stériles de 2 mL;
- 1 pipette stérile de 5 mL;
- 1 flacon de 60 mL de gélose de Mueller Hinton à 5 % de NaCl en surfusion;
- 1 boîte de Petri de 120 mm x 120 mm;
- un dispositif pour creuser les puits avec emporte-pièce, aspiration et récupération des cylindres de gélose contaminée;
- 1 tube à hémolyse contenant 3 mL de solution de pénicilline G à 320 mg.L⁻¹ en eau

} matériel collectif

physiologique, noté "P";

- 1 tube à hémolyse contenant 2 mL de solution de pénicilline G noté "Pu";
- pipette automatique P1000;
- pipette automatique P100.

2.2 - Préparation de l'inoculum test.

L'inoculum "test" est fourni en bouillon nutritif ordinaire de 18 heures et noté "T₁".

Réaliser une coloration de Gram.

Appeler un examinateur pour le contrôle de l'observation microscopique.

Réaliser une lecture opacimétrique du bouillon "T₁" à $\lambda = 550 \text{ nm}$.

Appeler un examinateur pour le passage au spectrophotomètre.

En fonction des résultats et à l'aide du tableau fourni ci-dessous, déterminer la dilution de "T₁" à réaliser pour avoir une concentration cellulaire permettant d'obtenir des colonies confluentes.

Réaliser cette dilution (notée "T₂") en eau physiologique.

TAXON	Nombre d'UFC par mL pour 1 unité d'opacité mesurée à 550 nm	Densité bactérienne adéquate pour obtenir des colonies confluentes
ENTEROBACTERIACEAE	$6,4 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$
<i>Bacillus</i>	$4,4 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$
<i>Lactobacillus</i>	$1,8 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus</i>	$5,8 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.3 - Dosage de la solution de pénicilline incorporée dans le milieu de culture.

À partir de la solution de pénicilline "P" à 320 mg.L⁻¹, préparer une série de 6 dilutions de raison géométrique 1/2 en eau physiologique sous un volume de 1 mL.

À 60 mL de gélose de Mueller Hinton en surfusion ajouter 2 mL de la suspension "T₂".

Homogénéiser, couler dans une boîte de Petri carrée (120 mm x 120 mm).

Laisser prendre en masse. Sécher à 37°C, puis porter la boîte au réfrigérateur 15 min.

Creuser à l'emporte-pièce 16 puits en utilisant le gabarit fourni en annexe 2.

Chaque concentration ainsi que la solution utilisée pour la confection du milieu de culture notée "Pu" est testée deux fois.

Le volume déposé dans chaque puits est de 50 μL . Laisser prédiffuser 30 minutes à température ambiante, puis placer la boîte à 37°C pendant 24 heures.

2.4 - Compte rendu.

Commenter l'observation microscopique.

Expliquer la démarche aboutissant à la réalisation de la suspension T₂

Présenter la réalisation de la gamme de dilutions de la solution de pénicilline dans un tableau.

II - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (40 points)

La peste équine est une maladie virale qui affecte les équidés et plus particulièrement les chevaux dont elle provoque très fréquemment la mort. Le virus est transmis par l'intermédiaire d'insectes piqueurs.

Les méthodes classiques de diagnostic de cette infection consistent en une inoculation intracérébrale aux souriceaux nouveau-nés et une infection de cultures cellulaires (BHK1 ou cellules Véro). La lignée cellulaire utilisée doit être entretenue régulièrement.

Le diagnostic sérologique repose sur la recherche des anticorps fixant le complément.

La réaction de fixation du complément nécessite un dosage préalable du complément, à réaliser pour chaque lot de complément et d'antigène donné.

1 - Entretien des cultures cellulaires. (24 points)

1.1 - Matériel et réactifs.

- Au poste de travail:

- hématimètre de Malassez avec une lamelle plane;
- bleu de Funk à 0,1 % en tampon pH 7;
- pipettes automatiques P 1000; P 100;
- 2 tubes à hémolyse.

- Au laboratoire de biologie cellulaire (à proximité des hottes à flux laminaire):

- flacon contenant une culture confluente de cellules Véro en milieu MEM + 10 % SVF (sérum de veau foetal);
- microscope inversé;
- étuve à CO₂ à 37°C;
- dispositif de lavage des mains;
- flacon d'alcool et papier absorbant;
- tube contenant 6 mL de tampon PBS stérile;
- flacon contenant 15 mL de milieu MEM + 10 % SVF (le milieu à été complété);
- tube à hémolyse contenant 2,5 mL de solution de trypsine à 0,25 % stérile;
- tube à hémolyse stérile vide;
- 2 flacons de culture << neufs >> de 25 cm²;
- pipettes stériles de 5 mL: 3;
- pipettes stériles de 2 mL: 2;
- pipette stérile de 1 mL: 1;
- récipient pour pipettes et réactifs usagés.

1.2 - Protocole.

1.2.1 - Observation microscopique.

Observer les cellules en culture au microscope inversé. Noter la couleur du milieu de culture.

1.2.2 - Entretien de la lignée cellulaire sous hotte à flux laminaire.

(temps limité à 20 minutes - en présence d'un examinateur)

Éliminer par retournement le milieu de culture.

Réaliser un lavage des cellules avec 5 mL de tampon PBS.

Introduire 2 mL de trypsine dans le flacon. Laisser agir quelques minutes.

Ajouter 5 mL de milieu MEM + 10 % SVF.

Prélever un aliquot d'environ 0,5 mL afin de réaliser la numération au poste de travail.

Introduire dans chacun des 2 flacons de culture stériles 1,5 mL de suspension cellulaire.

Compléter ces flacons à 5 mL avec du milieu MEM + 10 % SVF.

Placer les flacons dans l'étuve à 37°C.

1.2.3 - Numération.

Réaliser en hématimètre de Malassez, une numération de la suspension prélevée après dilution au 1/2 dans le bleu de Funk à 0,1 % en tampon pH 7.

Présenter un champ microscopique à un examinateur.

1.3 - Compte rendu.

Décrire les cellules observées au microscope inversé et commenter la couleur du milieu de culture.

Déterminer le pourcentage de viabilité ainsi que le nombre de cellules par mL de suspension numérée.

Sachant que, dans les conditions idéales, un flacon doit êtreensemencé par 10⁶ cellules viables, commenter le choix du volume de suspension remise en culture.

2 - Dosage du complément. (16 points)

Le complément doit être titré dans les conditions de son utilisation pour un lot de complément et d'antigène donné.

2.1 - Matériel et réactifs.

- lot de complément à doser noté "C" (v = 400 µL);
- tampon véronal (v = 4 mL);
- solution d'Ag viral noté "Ag" (v = 600 µL);
- système hémolytique: globules rouges de mouton (GRM) sensibilisés par des Ac anti-GRM (v = 2 mL) ;
- eau distillée;
- microplaque à fond rond (avec couvercle ou feuille autocollante);
- étuve à 37°C;
- pipette automatique: P100.

2.2 - Mode opératoire.

Réaliser en microplaque, sur la ligne A, à partir du lot de complément fourni, des dilutions en série de raison 1/2, de 1/1 à 1/2048, sous un volume final de 50 µL.

Réaliser dans l'un des puits une dilution au 1/3 du lot de complément fourni.

Réaliser en microplaque, sur la ligne B, à partir de la dilution au 1/3, des dilutions en série de raison 1/2, de 1/3 à 1/1536 sous un volume final de 50 µL.

Toutes les dilutions seront réalisées en tampon véronal.

Ajouter dans les cupules A1 à A12 et B1 à B10: 25 µL d'Ag viral, puis 25 µL de tampon véronal.

Recouvrir et incuber environ 15 minutes à 37°C.

Ajouter dans toutes les cupules 50 µL de système hémolytique.

Réaliser en parallèle un témoin 0 % d'hémolyse et un témoin 100 % d'hémolyse.

Recouvrir la plaque et homogénéiser.

Incuber 30 minutes dans l'étuve à 37°C.

Sortir la plaque et la placer à 4°C.

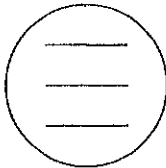
2.3 - Compte rendu.

Indiquer la composition des témoins 0 % et 100 % d'hémolyse réalisés.

MICROBIOLOGIE.

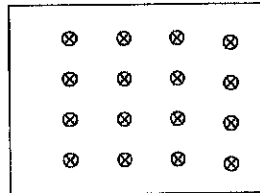
ANNEXE 1

GABARIT DE RÉALISATION DES STRIES.



ANNEXE 2

GABARIT DES DÉPÔTS POUR LE DOSAGE DE LA PÉNICILLINE.



NDLR: pour ces annales, l'échelle des gabarits n'a pas été respectée.

MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (90 points)

LES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES EUCARYOTES

2^{ème} jour

Durée: 2 H

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

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

I - MICROBIOLOGIE (50 points)

1 - Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la nystatine.

Comparer la densité des stries obtenues sur les boîtes "test" avec celles obtenues sur la boîte "témoin". Conclure.

2 - Vérification de la bonne supplémentation du milieu de culture en pénicilline.

Mesurer les diamètres des zones d'inhibition autour des puits.

À l'aide de l'outil informatique, tracer le graphe: diamètre (en mm) = f (ln [C_{pénicilline}])

Conclure quant à la concentration en pénicilline du milieu de culture note "Pu".

Discuter de la présence du contaminant dans la culture cellulaire.

II - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (40 points)

1 - Entretien des cultures cellulaires.

Observer les cellules au microscope inversé et noter la couleur du milieu de culture.

Reporter les observations sur le compte rendu.

2 - Dosage du complément.

2.1 - Lecture.

Observer les résultats des témoins réalisés.

Évaluer l'hémolyse dans chaque puits des lignes A et B.

2.2 - Compte rendu.

Présenter les résultats sous forme de tableau.

Commenter les résultats des témoins.

Noter la cupule contenant la plus forte dilution de complément donnant encore une hémolyse totale. Une telle dilution correspond à une unité CH 100.

Exprimer le titre de ce lot de complément en unité CH 100 par mL.

ÉLÉMENTS DE CORRIGÉS

BTS BIOCHIMISTE

SESSION 2 002

FRANÇAIS

Se reporter aux "Éléments de corrigés" du BTS BIOTECHNOLOGIES de ces mêmes annales.

ANGLAIS

Se reporter aux "Éléments de corrigés" du BTS BIOTECHNOLOGIES de ces mêmes annales.

MATHÉMATIQUES

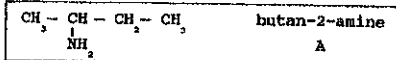
Se reporter aux "Éléments de corrigés" du BTS BIOTECHNOLOGIES de ces mêmes annales.

I. CHIMIE ORGANIQUE

1.a) Classe de l'amine A : A est une amine primaire

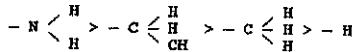
1.b) Formule semi-développée de la molécule chirale de A

A : amine primaire ayant 4 atomes de carbone dont un carbone asymétrique



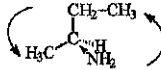
1.c) Représentation de Cram du stéréoisomère (S) de A

Classer les différents substituants du carbone asymétrique dans l'ordre décroissant de priorité :



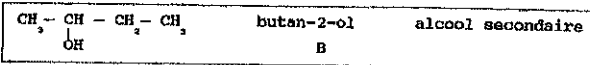
La configuration absolue se lit directement sur la représentation de Cram si le substituant de moindre priorité est placé vers l'arrière.

Si l'on voit tourner les substituants dans l'ordre décroissant de priorité et dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, alors le stéréoisomère concerné a une configuration absolue S.

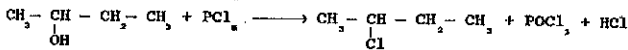


isomère S

2. Formule semi-développée plane et nom de l'alcool B

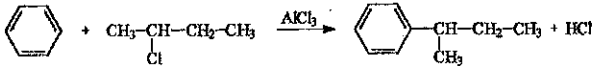


3. Equation de la réaction



C : 2-chlorobutane

4. Equation de la réaction



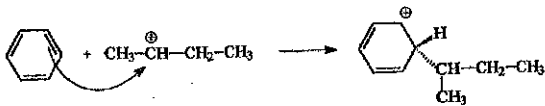
D : 2-phénylbutane

Mécanisme de la réaction : substitution électrophile (alkylation)

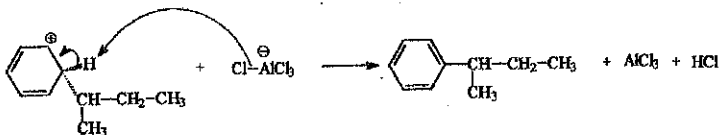
* Formation de l'attaquant positif grâce au catalyseur



* Attaque du noyau aromatique par l'attaquant positif

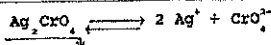


* Régénération du catalyseur



II. SOLUBILITE - COMPLEXES

1.a) Solubilité s du chromate d'argent dans l'eau pure



$$K_s = C_{\text{Ag}^+}^2 \cdot C_{\text{CrO}_4^{2-}} = 1,26 \cdot 10^{-12}$$

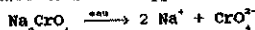
Dans la solution saturée : $C_{\text{Ag}^+} = 2s$ $C_{\text{CrO}_4^{2-}} = s$

$$K_s = 4s^3 \text{ soit}$$

$$s = \sqrt[3]{K_s/4} = 6,80 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

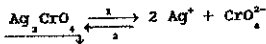
1.b) Solubilité s' du chromate d'argent dans une solution de chromate de sodium à $16,2 \text{ g.L}^{-1}$

La solution de chromate de sodium apporte des ions CrO_4^{2-} et des ions Na^+



$$\text{avec } c = C_{\text{Na}^+}/2 = C_{\text{CrO}_4^{2-}} = \frac{\rho_{\text{Na}_2\text{CrO}_4}}{M_{\text{Na}_2\text{CrO}_4}} = \frac{16,2}{162} = 0,100 \text{ mol.L}^{-1}$$

Les ions CrO_4^{2-} apportés par le solvant rétrogradent l'équilibre hétérogène dans le sens 2 :



Le chromate d'argent est moins soluble dans une solution de chromate de sodium que dans l'eau pure : $s' < s$
 $< 6,80 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

La solution saturée en chromate d'argent, dans une solution de chromate de sodium, contient des ions Ag^+ , Na^+ et CrO_4^{2-} tels que :

$$C_{\text{NH}_3, \text{aq}} = 0,200 \text{ mol.L}^{-1}$$

$$C_{\text{Ag}^+, \text{aq}} = 2s'$$

$$C_{\text{CrO}_4^{2-}, \text{aq}} = 0,100 + s'$$

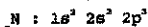
$$D'ou : K_s = (2s')^2(s' + 0,100)$$

Comme $s' < 6,80 \cdot 10^{-3}$, on peut considérer que $s' + 0,100 \approx 0,100$

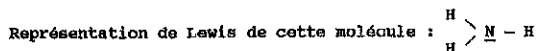
$$\text{Donc } K_s \approx 0,4(s')^3 \rightarrow s' \approx \sqrt[3]{\frac{K_s}{0,4}} \approx 1,77 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-3}$$

L'approximation faite est vérifiée.

2. Structure électronique de la molécule d'ammoniac



Ces éléments sont des non-métaux : ils vont mettre en commun leurs électrons de leur couche de valence de façon à compléter leur couche de valence à 8 électrons (pour l'azote) et à 2 électrons (pour l'hydrogène) de façon à acquies la structure stable du gaz noble qui les suit dans la classification : il se forme 3 liaisons de covalence simples N - H.



Géométrie de la molécule

3 doublets liants } entourant l'atome d'azote
1 doublet libre }

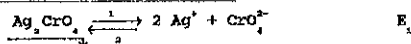
La figure de répulsion de formule AX₃E est de géométrie tétraédrique.

La molécule est pyramidale à base triangulaire et les angles de liaisons valent un peu moins de 109,5° à cause de la répulsion du doublet libre sur les doublets liés.

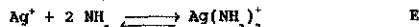
Cette molécule est un agent complexant

Le doublet libre porté par l'atome d'azote peut être mis en commun avec un élément métallique (atome ou plus souvent cation) possédant des orbitales vacantes sur sa couche de valence : il se forme des liaisons de covalence par coordination entre l'élément métallique central et les molécules d'ammoniac qui l'entourent (appelés ligands).

3.a) Equation de l'équilibre de solubilisation



Equation de la réaction de complexation des ions Ag⁺



3.b) Solubilité s'' du chromate d'argent dans la solution

L'ammoniac introduit complexe les ions Ag⁺ apportés par l'équilibre hétérogène E₁ : cet équilibre est donc déplacé dans le sens 1.

Le chromate d'argent est donc plus soluble dans une solution d'ammoniac que dans l'eau pure : $s'' > s$
 $> 6,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-3}$

III- Polarimétrie

●- Loi de BIOT

$$\alpha = [\alpha] \cdot l \cdot c \Rightarrow [\alpha] = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

Méthode numérique : on détermine $[\alpha]$ pour les différentes solutions étalons.

c (g.L ⁻¹)	0	20	40	60	80	100
α degré	0	2,65	5,35	8,00	10,65	13,35
$[\alpha]$ °.m ⁻¹ .g ⁻¹ .L	---	0,66	0,67	0,67	0,67	0,67

$$[\alpha] = 0,67 \text{ } ^\circ \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L} = 0,67 \text{ } ^\circ \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{m}^3$$

d'où :

$$[\alpha] = 0,67 \text{ } ^\circ \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$$

Méthode graphique : on trace le graphe de la fonction $\alpha = f(c)$.

On vérifie que l'on obtient une droite passant par l'origine, dont le coefficient directeur est égal à $[\alpha] \cdot l$.

●- a- $c = \frac{\alpha}{[\alpha] \cdot l} \Rightarrow c = \frac{7,5}{0,67 \times 0,2} = 56 \text{ g.L}^{-1}$

La solution a été diluée 5 fois $\Rightarrow c_5 = 5c \Rightarrow$

$$c_5 = 280 \text{ g.L}^{-1}$$

b- La solution doit être diluée, car sa concentration initiale a une valeur située en dehors du domaine d'étalonnage.

●- Mélange : $\alpha = \alpha_1 + \alpha_2 = [\alpha_1] \cdot l \cdot c_1 + [\alpha_2] \cdot l \cdot c_2$

mais $c_1 = 3c_2 \Rightarrow \alpha = [\alpha_1] \cdot l \cdot 3c_2 + [\alpha_2] \cdot l \cdot c_2 = (3[\alpha_1] + [\alpha_2]) \cdot l \cdot c_2$

d'où $c_2 = \frac{\alpha}{(3[\alpha_1] + [\alpha_2]) \cdot l} \Rightarrow c_2 = \frac{4,24}{(3 \times 0,66 + 0,93) \times 0,2} = 20,2 \text{ g.L}^{-1}$

Saccharose : $c_1 = 60,6 \text{ g.L}^{-1}$

Fructose : $c_2 = 20,2 \text{ g.L}^{-1}$

IV- Atomistique

●- Configuration électronique de l'atome de sodium $^{23}_{11}\text{Na}$

$$Z = 11 \Rightarrow 1s^2 2s^2 2p^6 3s^1$$

Le niveau 3s correspond donc à l'état fondamental.

●- L'énergie d'ionisation est l'énergie nécessaire pour faire passer l'atome de l'état fondamental 3s à l'état ionisé ($E = 0$).

On déduit que :

$$E_{3s} = -5,14 \text{ eV}$$

●- a- L'atome dans l'état excité 4s revient à l'état fondamental 3s en cédant de l'énergie transportée par un photon émis.

$$E = h\nu = hc/\lambda_1 = E_{4s} - E_{3s}$$

b- Energie du photon

$$E = \frac{hc}{\lambda_1} = \frac{6,62 \cdot 10^{-34} \times 3 \cdot 10^8}{389 \cdot 10^{-9}} = 5,1 \cdot 10^{-19} \text{ J}$$

$$E = \frac{5,1 \cdot 10^{-19}}{1,6 \cdot 10^{-19}} = 3,19 \text{ eV}$$

$$\text{d'où } E_{4s} = E + E_{3s} \Rightarrow E_{4s} = 3,19 - 5,14$$

\Rightarrow

$E_{4s} = -1,95 \text{ eV}$

ⓐ- a- Pour que le photon soit absorbé, il faut que son énergie corresponde exactement à une transition à partir de l'état fondamental 3s.

$$\text{Energie du photon : } E_2 = \frac{hc}{\lambda_2} = \frac{6,62 \cdot 10^{-34} \times 3 \cdot 10^8}{589 \cdot 10^{-9} \times 1,6 \cdot 10^{-19}} = 2,11 \text{ eV}$$

$$\text{Energie de la transition } 3p \rightarrow 3s : E_{3p} - E_{3s} = -3,04 + 5,14 = 2,10 \text{ eV}$$

Le photon peut donc être absorbé.

b- Lors de cette absorption, le photon apporte une énergie à l'atome pris dans l'état fondamental 3s et le fait passer à l'état excité 3p.

LA MULTIPLICATION CELLULAIRE: UN PHÉNOMÈNE UNIVERSEL.

Éléments de corrigé

1 - ORGANISATION MOLÉCULAIRE DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE.

1.1.1. Structure des nucléotides

Base azotée - pentose - acide o- phosphorique

Entre ose et base: liaison N- osidique (liaison N- glycosidique)

Entre ose et H_3PO_4 : liaison ester.

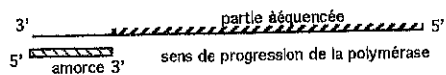
1.1.2. Structure des ADN

1.1.2.1 - Ose de l'ADN: β D- 2- désoxyribofuranose. Formule à donner

1.1.2.2 - 5'pdApdT 3'. Formule à donner.

1.1.2.3 - L'ADN est bicaténaire: Les 2 brins sont complémentaires (AT; GC) et antiparallèles (à 5'3' correspond 3'5' sur l'autre brin). L'appariement entre les 2 chaînes se fait entre A et T par 2 liaisons H et entre G et C par 3 liaisons H.

1.1.3. Le séquençage des ADN.

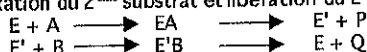
1.1.3.1 -  partie à séquencer
sens de progression de la polymérase

1.1.3.2 - Dans le milieu, pour permettre l'élongation, de la chaîne, il faut des désoxynucléosides triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

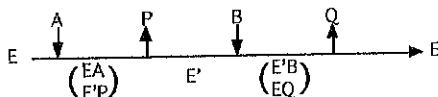
1.1.3.3 - Il faut un 2',3'- didésoxyribonucléoside triphosphate (didésoxynucléotide). Ce composé, n'ayant pas de 3' OH au niveau du pentose, arrête la synthèse de la copie d'ADN dès qu'il est incorporé (arrêt de l'élongation).

1.2.1 - Cinétique de la nucléoside diphosphate kinase.

1.2.1.1. - mécanisme ping-pong : fixation du 1^{er} substrat et libération du 1^{er} produit. Enzyme modifiée. Fixation du 2^{ème} substrat et libération du 2^{ème} produit.



Notation de Cleland:

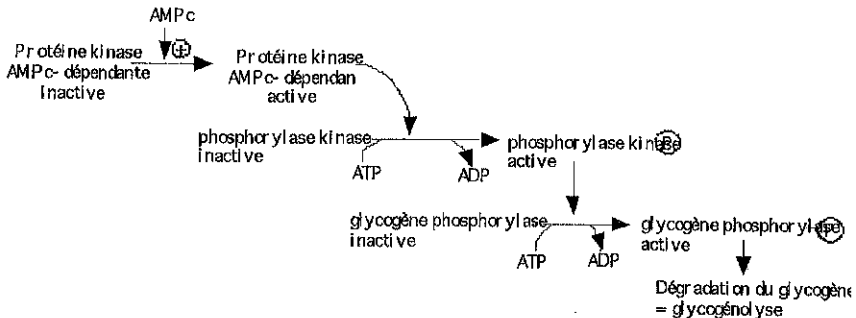


1.2.1.2. Si $1/[A] = 0$ (ou $[A]$ tend vers ∞), alors $v_i = V_M / (1 + K_B/[B])$ où B = CDP. Ainsi la courbe $1/V_M = f(1/[B])$ correspond à une représentation de Lineweaver et Burk pour une enzyme à un substrat limitant. L'ordonnée à l'origine correspond à $1/V_M$ et la courbe coupe l'axe des abscisses à $-1/K_B$

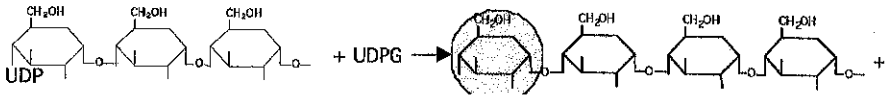
1.2.2. - Intervention des nucléotides dans les régulations.

1.2.2.1. - AMPc = second messenger

1.2.2.2.- Glycogénolyse musculaire



Glycogénogenèse : ajout au niveau de l'extrémité **non réductrice** d'une unité glycosyl par une liaison α 1-4.



Régulation: si AMPc, transformation de GS active (glycogène synthase) en GS inactive par phosphorylation par la protéine kinase (de plus la phosphatase est inhibée).

1.3.- Chromatine et ADN

1 : nucléosome 2 : histone 3 : ADN

2-NOYAU ET DIVISION CELLULAIRE

2.1.1. 1=nucléoplasme/2=pore nucléaire/3=chromatine/4=enveloppe nucléaire/5=RE (granuleux)/ 6=nuléole.

2.1.2. Participe à la synthèse des ARN ribosomiaux constituant les ribosomes (assemblage avec des protéines dans la zone granulaire)

2.1.3. Les procaryotes NE POSSEDENT PAS de noyau véritable, séparé du cytoplasme par une enveloppe. L'ADN est bicaténaire, circulaire et constitue l'unique chromosome. Celui-ci est associé à des protéines non histones.

2.2.1. Les phases: mitose + (G0)G1 + S +G2 . . . (puis à nouveau mitose)

2.2.2. G1 = des synthèses protéiques liées à la croissance de la cellule (enzymatiques et structurales)

S = réplication de l'ADN (doublement de la quantité) et synthèse de nouvelles histones

G2 = synthèse de protéines préparant à la mitose (tubulines, protéines contrôlant la mitose)

2.2.3. 1=fibres kinétochoriennes/2=fibres fusoriales/3=centrioles (diplosomes)/4=chromosomes (plaque équatoriale)/5=télomère (bras court)/6=centromère/7=chromatide/8=kinétochore/ 9=constriction secondaire.

2.2.4. microfilaments, filaments intermédiaires, neurofilaments, tonofilaments, filaments d'actine et de myosine peuvent être cités (deux, exigés)

2.2.5. L'extrémité "+" correspond à la zone où la tubuline globulaire est polymérisée ; l'extrémité "-" à celle où il y a dépolymérisation.

il y a donc un renouvellement permanent du microtubule qui s'allonge par une extrémité et se raccourcit par l'autre : cette structure n'est donc pas figée mais au contraire dynamique.

2.2.6. Si la polymérisation est inhibée alors que la dépolymérisation n'est pas atteinte, le fuseau disparaîtra progressivement, jusqu'à ne plus exister.

2.3 Chromosome bactérien et transfert

2.3.1 gyrase (topoisomérase); hélicase (+SSB); primase; ADN polymérase; ligase

2.3.2.1 La conjugaison consiste en un transfert de matériel génétique unidirectionnel entre deux bactéries (donneuse → receveuse) et nécessitant un contact entre celles-ci.

2.3.2.2

Cellule donneuse F⁺: chromosome + épisome F

Cellule donneuse Hfr: F intégré dans le chromosome

Cellule receveuse F⁻: chromosome seul (pas d'épisome F)

2.3.2.3

Schémas montrant:

- Le contact (pili)

- La rupture de F à oriT

- Le passage d'un brin d'ADN de la cellule donneuse (par le pilus ou par un pont intracytoplasmique) dans la cellule receveuse F⁻.

- La recombinaison éventuelle de l'exogénote dans l'endogénote

Conjugaison interrompue:

- Chromosome ayant intégré un fragment d'ADN de la cellule donneuse; la cellule reste F⁻

Conjugaison non interrompue:

- Passage éventuel de tout le chromosome: la cellule devient alors Hfr

Les recombinants sont surtout repérés leurs caractères de prototrophie (au départ: cellule donneuse prototrophe; cellule receveuse auxotrophe)

2.3.2.4

Différents temps de contact soit expérimentalement (conjugaison interrompue) ou naturellement (conjugaison non interrompue)

Passage des gènes dans l'ordre où ils se trouvent dans le chromosome à partir de l'origine de transfert (transfert orienté et progressif).

Les marqueurs transmis avec la plus grande fréquence sont ceux transmis en premier.

2.3.3

Site oriT, gènes tra, sites d'insertion, gènes de résistance aux antibiotiques, gènes de virulence, de caractères métabolique (lac, H₂S, ...), de bactériocines...

3 - INHIBITION DE LA MULTIPLICATION CELLULAIRE

3.1. L'inhibition compétitive

3.1.1. Les schémas du mécanisme de l'inhibition compétitive doivent montrer une analogie de structure entre S et I ainsi que la compétition entre ces 2 molécules pour l'occupation du site de fixation de l'enzyme.

3.1-2. Équation donnant la vitesse initiale en fonction de [S] et [I]:

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}$$

3.1.3. Aspect des représentations de Lineweaver et Burk

3.1.4. $K'_M = K_M (1 + [I]/K_I)$

si $[I]=0$ donc $K'_M = K_M$ et $A = K_M$

si $K'_M = 0$ donc $[I] = -K_I$ car $(1 + [I]/K_I = 0)$, donc $B = -K_I$

3.2. Acide folique et antifolates

3.2.1. Inhibition par le méthotrexate.

3.2.1.1 - L'acide tétrahydrofolique (FH4) intervient dans le métabolisme des radicaux monocarbonés.

3.2.1.2. - Le méthotrexate inhibe la reformation de FH4 à partir de FH2 donc il empêche indirectement les étapes suivantes qui conduisent à la formation de dTMP (et ainsi de dTTP) et donc finalement de l'ADN dont la thymine est un constituant essentiel.

Le méthotrexate a une formule assez voisine de FH2 (CH_3 , NH_2) substrat de la réaction catalysée par la DHFR; donc analogie stérique et possibilité d'inhibition compétitive.

3.2.2. Aminoptérine.

3.2.2.1. Les cellules en questions sont des lymphocytes, spécifiques de l'antigène provenant d'un animal immunisé (les plasmocytes, sécréteurs d'anticorps), avec des cellules myélomateuse de la même espèce.

3.2.2.2. Les lymphocytes ont la propriété de permettre une production d'anticorps spécifiques et possèdent l'enzyme HGPRT (mais il ne peuvent pousser, in vitro : ils sont "mortels").

Les cellules myélomateuses au contraire, sont "immortelles" mais ne possèdent pas l'HGPRT et ne peuvent permettre la synthèse d'anticorps.

3.2.2.3. Seules les cellules hybrides possèdent l'enzyme permettant de se développer sur ce milieu (HAT) et la propriété de produire des anticorps. Les lymphocytes ne peuvent eux, proliférer ; pas plus que les cellules myélomateuses, étant déficientes en HGPRT, et l'aminoptérine bloquant l'autre voie de synthèse des acides nucléiques.

La sélection de ces hybrides, développés après la fusion cellulaire (formation d'un hétérocaryon) et qui peuvent proliférer va donc permettre une synthèse importante d'anticorps monoclonaux.

3.3 Inhibition de la multiplication bactérienne

3.3.1 Un antibiotique est une molécule organique ayant une activité antibactérienne par un mécanisme spécifique d'inhibition de réactions essentielles. Il agit à faible dose, sur les micro-organismes et pas sur les cellules de l'hôte (recherche de l'innocuité).

3.3.2 La sulfanilamide est un analogue structural du PAB. Il entre en compétition avec celui-ci dans la synthèse de l'acide folique. L'acide folique ne peut plus intervenir dans la synthèse des nucléotides. Il y a donc interruption de la multiplication des bactéries.

IV-MULTIPLICATION CELLULAIRE DANS LES PHÉNOMENES IMMUNOLOGIQUES.

4.1.1. Le thymus pour les lymphocytes T

La moelle osseuse (bourse de Fabricius chez les oiseaux) pour les lymphocytes B.

4.1.2. Des réarrangements génétiques permettent la synthèse du récepteur antigénique spécifique (la possibilité de mutations augmente la diversité des récepteurs possibles).

Des populations lymphocytaires acquièrent ainsi des marqueurs spécifiques (CD4 pour les T auxiliaires, CD8 pour les Tcytotoxiques).

La reconnaissance du non soi devient effective ; les cellules "autoréactives" sont progressivement éliminées (pas d'affinité convenable pour le CMH) et seules les cellules T alors "éduqués" se développent (prolifération et différenciation).

4.2.1. Récepteur des B = immunoglobuline de surface de structure proche de celle des anticorps : 2 chaînes lourdes, 2 légères et le peptide de fixation à la membrane.

Récepteur des T = 2 chaînes polypeptidiques α et β fixées à la membrane.

Les molécules reconnues sont à la fois le peptide antigénique (traité et "présenté") ET la molécule du CMH classe II (double reconnaissance).

4.2.2.1. L'IL-2 est produite par les T helper après stimulation antigénique, elle même favorisée par l'IL-1 produite par les CPA (à la suite de cette stimulation antigénique).

Ainsi:

- les T subissent prolifération et maturation ; production d'autres interleukines augmentée (IFN γ , IL-4, IL-6)
- les B prolifèrent également et vont se différencier (plasmoblastes, plasmocytes) devenant producteurs d'anticorps.

En général, les cytokines ont une durée de vie courte, une action de proximité (paracrine et autocrine). Les actions sont de type "en cascade", sur des récepteurs spécifiques, aboutissant à des actions diverses (de multiplication ou de différenciation).

4.2.2.2. Seuls ces clones sont impliqués car le déclenchement est opéré par l'IL-2, elle-même consécutive à la fixation de la CPA et production d'IL-1, événements initiés par la rencontre de l'antigène en cause.

4.3.1. La PHA, ou la concanavalline, ou le pokeweed, ou le LPS peuvent être cités.

4.3.2. Le sérum de veau (fœtal ou jeune) fournit ces facteurs de croissance (les cellules elles-mêmes parfois).

**ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE
ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES**

Éléments de corrigé.

Diagnostic des Infections à *Listeria monocytogenes* dans l'industrie alimentaire.

PREMIÈRE PARTIE : Microbiologie.

Première partie: recherche et identification des <i>Listeria monocytogenes</i> dans l'industrie fromagère par méthode bactériologique traditionnelle (20 points)		
I Recherche des <i>Listeria monocytogenes</i> (9,5 points)		
I.1	3,5	
I.1.1.	1,5	Dans un plan d'analyse à 2 classes : m est le critère microbiologique, n le nombre d'échantillons et c le nombre d'échantillons ne répondant pas au critère.
I.1.2.	1	Analyser 25g de produit et prendre 5 échantillons dans un lot.
I.2.	3	Le mode opératoire comprend 5 étapes : -pré-enrichissement en bouillon de Fraser 1/1 incubé 24h à 30°C -enrichissement en bouillon de Fraser 1/2 incubé 24 à 48h à 37°C permettant une multiplication des <i>Listeria</i> -isolement sur milieu sélectif ALOA -identification des colonies suspectes grâce au système API <i>Listeria</i> -sérotypage de la souche identifiée
I.3.	2	Le bouillon de Fraser 1/2 est un milieu nutritif tamponné (sels de phosphates) et sélectif (acide nalidixique, acriflavine, LiCl, NaCl à 20g/L). Il contient moins d'inhibiteurs bactériens que le bouillon 1/1 pour permettre une meilleure revivification des <i>Listeria</i> .
I.4.	2	La sélection des colonies suspectes sur milieu ALOA se fait en vérifiant leur appartenance au genre <i>Listeria</i> grâce à l'examen au Gram et à la catalase.
II Identification des colonies suspectes sur galerie API <i>Listeria</i> (11,5 points)		
II.1.	2	Précautions à prendre par le manipulateur ou la manipulatrice (non enceinte) du réactif ZYM B : i porter des gants; ii éviter de respirer les vapeurs en utilisant un masque ou une hotte aspirante; iii additionner le réactif loin du bec Bunsen
II.2.	2	Sous l'action de l'esculinase (B-glucosidase) l'esculine est hydrolysée en D-glucose et esculetine (6,7 di OH dicoumarine).
II.3.	1	Ce test est fondé sur l'hydrolyse du substrat chromogène par l' α -mannosidase qui libère le paranitrophénol spontanément coloré en jaune
II.4.	1	La fermentation des oses ou dérivés d'oses se traduit par une acidification du milieu qui se traduit par le virage du rouge de phénol du rouge au jaune.
II.5.	2,5	
II.5.1.	1	Le test DIM permet de différencier les deux espèces proches <i>monocytogenes</i> et <i>innocua</i> toutes deux α MAN+, XYL-, RHA+, RIB-, G1P-, TAG- et d'identifier l'espèce contaminante comme étant <i>monocytogenes</i>
II.5.2.	1,5	La fréquence modale Fm est le rapport de la fréquence d'apparition du profil trouvé (0,88) à la fréquence du profil le plus typique de l'espèce. L'indice de typicité T est défini par la relation $T = (\log Fm - \log S) / -\log S$ avec S défini comme la Fm au dessous de laquelle l'appartenance à l'espèce est improbable. Il exprime le caractère typique de la souche identifiée par rapport à l'espèce type. Sa valeur, qui varie de 1 (profil le plus typique) à 0, est ici inférieure à 1 car la souche étudiée possède un test à l'encontre (G1P) du profil de l'espèce type

II.5.6.	3	sérotypage= recherche des antigènes bactériens pariétaux et flagellaires. lyso typage=recherche de la sensibilité de la souche aux bactériophages
---------	---	--

DEUXIEME PARTIE ; Biologie cellulaire et moléculaire.

I - 0,1 mL

Pipettes, tubes à essais stériles ou flacons d'erlenmeyer ...

Conditions aseptiques

II.1 a = anticorps spécifique des antigènes de surface de *Listeria monocytogenes*, sensibilisant la phase solide.

b = antigène recherché

c = conjugué : anticorps spécifique des antigènes de surface de *Listeria monocytogenes* marqué par un enzyme.

II.2 - technique immunoenzymatique qualitative en phase hétérogène et sandwich (directe).

II.3 - Fluorescence

E.L.F.A. = Enzyme Linked Fluorescent Assay

II.4 - Phosphatase (alcaline).

II.5 - Plus rapide.

III.1 - standard étalonner ou calibrer la technique

Contrôle positif vérifier la validité des réactifs

Contrôle négatif : vérifier la spécificité de la technique

III.2 - Conservateur antiseptique

III.3 - Présence d'un tampon : Réaction enzymatique

Choix du pH 9,2: pH optimum de la phosphatase alcaline

III.4 - Rapidité, reproductibilité, sécurité (et pas de contamination inter-échantillon)

IV.1-

Série 1	RFV std	If ₁ BF	If ₂ essai	RFV essai	VT= RFVe/RFVstd
Lot 1	3858	89	2713	2624	0,68
Lot 2	3858	88	3753	3665	0,95
Lot 3	3858	90	513	423	0,11
Lot 4	3858	90	167	77	0,02
Lot 5	3858	86	163	77	0,02
C+	3858	88	3869	3781	0,98
C-	3858	90	94	4	0,00

Série 2	RFV std	If ₁ BF	If ₂ essai	RFV essai	VT= RFVe/RFVstd
Lot 6	3795	104	180	76	0,02
Lot 7	3795	105	143	38	0,01
Lot 8	3795	104	218	114	0,03
Lot 9	3795	106	182	76	0,02
Lot 10	3795	103	140	37	0,01
C+	3795	105	290	185	0,05
C-	3795	104	107	3	0,00

BF : Bruit de fond; IF en unités arbitraires; C+: VT attendu:0,8-1,2 C-: VT attendu : 0,8-1,2
RFVe/RFVstd pour : RFV essai/ RFV standard

IV.2 - Dans les deux séries, les contrôles négatifs donnent bien une VT inférieure à 0,05.

Pour la première série, le contrôle positif donne un résultat compris dans l'intervalle attendu, cette série est donc validable.

Pour la seconde série, le contrôle positif ne donne pas un résultat compris dans l'intervalle attendu (problème d'altération d'un des réactifs ...).

On ne peut donc pas valider cette série.

IV.3-

Série 1	RFV std	If ₁ BF	If ₂ Essai	RFV essai	VT = RFV essai/ RFV std	Interprétation (Positif ou Négatif)
Lot 1	3858	89	2713	2624	0,68	+
Lot 2	3858	88	3753	3665	0,95	+
Lot 3	3858	90	513	423	0,11	+
Lot 4	3858	90	167	77	0,02	-
Lot 5	3858	86	163	77	0,02	-

TROISIEME PARTIE: Biochimie

1.1.1 - PCRGO de 747 à 770 (fixé sur le brin complémentaire de l'ADN représenté),
PCRDO de 1111 à 1134

1.1.2 Amplifiat de 388 pb

1.2.1 Extraction

Lysozyme : hydrolyse du peptidoglycane

Saccharose: évite la lyse cellulaire et la fuite d'ADN

SDS: détergent, lyse chimique de la membrane, dénaturation des protéines

EDTA: complexe Mg²⁺ ce qui inhibe les nucléases (DNases)

Protéinase K: hydrolyse les protéines nucléaires et libère l'ADN

Purification

Phénol: dénaturation des protéines et élimination des lipides (dans la phase phénolique) et des protéines dénaturées (interface entre les deux phases (eau / phénol)). Les acides nucléiques sont dans la phase aqueuse.

NaCl: modification de la force ionique pour permettre la précipitation de l'ADN par l'éthanol.

RNase: "détruit" les ARN

1.2.2.1 Solution A1 = 2 µL. Solution A2 = 2 µL

Dilution de la solution stock de dNTP 1/25. Solution B = 1 µL

1.2.2.2 1 min à 94°C = dénaturation de l'ADN bicaténaire

1 min à 65°C = hybridation des amorces

2 min à 70°C = élongation des amorces

Notion de cycle d'amplification: les trois étapes précédentes sont répétées 30 fois. La répétition des trois étapes aboutit à une amplification exponentielle, en théorie, égale à 2ⁿ (n : nombre de cycles d'amplification).

2.1 -

1 [A] et 2[A] un fragment d'environ 400 pb (+ ou - 20 pb)

1 [AH] et 2[AH] deux fragments d'environ 250 et 145 pb; à comparer avec la taille théorique

Résultats: lots 1 et 2 positifs = L. monocytogenes et lots 3, 4 et 5 négatifs

Concordance des résultats avec VIDAS: problème avec le lot n°3 positif avec la méthode VIDAS

II.2.1. - Vitesse initiale = $\Delta A / \Delta t \times 44 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ de solution enzymatique

II.2.2 - La concentration en H₂O₂ de 0,015% optimise la méthode.

ANNALES
BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE

SESSIONS 2001 ET 2002

Publications de l'UPBM

UPBM - ÉDILION

LYCÉE TECHNIQUE " LA MARTINIÈRE "
LA DUCHÈRE 69338 LYON CEDEX 09

Annales du BTS Biotechnologie

Définition de la nature des épreuves

1. Épreuve de français

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

Objet et contenu de l'épreuve

L'épreuve a pour but de vérifier l'aptitude du candidat à d'une part, saisir dans un texte les idées essentielles et leur organisation logique, d'autre part à s'exprimer correctement et avec simplicité.

On proposera un texte de 50 à 100 lignes dactylographiées qui offrira par lui-même un sens assez complet, qui soit clair bien composé et qui se prête à une analyse d'idées.

Le texte proposé portera sur les problèmes de la vie moderne, problèmes de culture personnelle et de relations sociales qui peuvent intéresser un futur technicien. On tiendra compte dans le choix du texte des caractéristiques particulières du domaine professionnel auquel le candidat se destine.

Le candidat devra :

- résumer le texte en un nombre limité de mots.
- répondre à quelques questions destinées à lui faire préciser et expliquer le sens de notions et de mots importants du texte en témoignant de la culture générale qu'il a reçue.
- exprimer dans un commentaire succinct et composé ses vues personnelles sur l'ensemble ou sur un aspect particulier du texte.

2. Épreuve d'anglais

- Épreuve écrite durée = 2 heures
- Oral : durée maximale 30 min.
- Coefficient : 2

L'épreuve écrite entrera pour deux tiers et l'épreuve orale pour un tiers.

Partie écrite

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

- lire une lettre à caractère technique et en rendre compte;
- comprendre des articles de revues spécialisées
- utiliser des notices, modes d'emploi, diagrammes et schémas en anglais concernant des matériels étrangers.

Cette épreuve comprendra d'abord une traduction ou le compte rendu d'un texte extrait d'un document technique; lui fera suite la rédaction d'un texte se rapportant au sujet étudié précédemment.

Partie orale

L'épreuve consistera en un entretien avec le jury, destiné à vérifier la maîtrise des structures essentielles de la langue.

Épreuve facultative de langue vivante II

- Épreuve orale de durée maximale : 30 min.
 - Coefficient 1.
- Seuls les points au-dessus de 10 seront pris en compte pour le total obtenu par le candidat.
- L'épreuve doit permettre d'apprécier les capacités du candidat :
- à lire, analyser et commenter succinctement un document se rapportant au domaine professionnel et écrit dans la langue choisie
 - à s'exprimer convenablement dans les domaines de ses futures activités, dans cette langue.
 - Cette épreuve, qui pourra être précédée par une préparation de 30 min au maximum, consistera en un entretien avec le jury et pourra comporter la lecture et le résumé du texte par le candidat et une conversation sur ce texte.

3. Épreuve de mathématiques et sciences physiques

- Épreuve écrite
- Durée: 4 heures (2 h+2 h)
- Coefficient : 4.

L'épreuve comporte deux parties obligatoires et indépendantes.

Mathématiques (coefficient 1,5)

Objectifs :

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

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

Nature de cette partie d'épreuve :

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

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

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

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

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

L'utilisation des calculatrices pendant l'épreuve est définie par la circulaire n°86-228 du 28 juillet 1986 publiée au Bulletin officiel n°34 du 2 octobre 1986.

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

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

Sciences physiques (coefficient 2,5)

Cette seconde partie de l'épreuve doit permettre d'apprécier le niveau de connaissances en sciences physiques du candidat et son aptitude à les utiliser dans des situations concrètes proches du domaine technique où il est appelé à intervenir.

Elle comporte plusieurs questions indépendantes ou exercices indépendants.

Les questions posées se rapportent à des applications concrètes dont la compréhension ne doit faire appel qu'à des notions fondamentales du programme.

Il doit être vérifié que le candidat :

- analyse convenablement un problème pose en utilisant judicieusement ses connaissances scientifiques,
- prend en compte l'ensemble des données et des hypothèses,
- propose une solution justifiée par un raisonnement logique, élaborée en faisant appel au contenu du programme

4. Épreuve de sciences biologiques fondamentales et génie biologique

- Épreuve écrite
- Durée maximale : 4 heures
- Coefficient : 6

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

Elle comporte plusieurs questions indépendantes.

5. Épreuve professionnelle de synthèse : étude de projet et réalisation pratique d'opérations de génie biologique

- Épreuve écrite et pratique
- Durée maximale : 12 heures
- Coefficient : 12

Cette épreuve comporte deux parties obligatoires

Étude de projet

- Partie écrite
- Durée : 4 heures
- Coefficient : 4

Cette partie a pour but de vérifier les capacités de réflexion en vue de la résolution d'un problème biotechnologique simple pouvant relever des domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique.

Elle doit permettre d'apprécier les capacités :

- d'analyse du problème,
 - de conception et de définition d'une stratégie expérimentale,
 - d'utilisation de documents, éventuellement de langue anglaise,
 - de prise en compte des aspects concernant la sécurité, la législation et la gestion,
 - d'utilisation des techniques et du matériel notamment Informatique,
- et l'esprit d'initiative.

Réalisation pratique d'opérations de génie biologique

- Partie pratique
- Durée maximale : 8 heures
- Coefficient : 8

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

Elle est pluridisciplinaire.

Elle doit permettre de vérifier les capacités :

- de mise en œuvre d'un protocole opératoire dans des conditions satisfaisantes de sécurité et d'efficacité,
- d'organisation,
- de rigueur et de précision dans l'exécution,
- d'exploitation des résultats.

Elle peut se dérouler en plusieurs parties.

Elle comporte plusieurs questions liées ou indépendantes.

Elle a un caractère essentiellement pratique.

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

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

- Épreuve orale
- Durée maximale : 1 heure
- Coefficient : 4 (2 pour les compétences scientifiques, technologiques et professionnelles, 1 pour

les compétences en français, 1 pour les compétences en sciences économiques)

L'épreuve a pour but de vérifier :

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

- saisir les données constitutives d'une entreprise ou d'un laboratoire,
- comprendre le fonctionnement d'une entreprise ou d'un laboratoire sur les plans de la technique et de l'organisation,
- présenter les activités d'un stage en analysant les problèmes techniques rencontrés et les démarches adoptées

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

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

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

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

La présentation n'excédera pas 20 minutes.

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

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

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

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

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

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

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

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

La commission de jury pour cette épreuve comprend :

- un professeur de français,
- un professeur de sciences économiques,
- un professeur chargé d'enseignement technologique.

Les candidats autorisés ayant échoué à l'examen peuvent :

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

ANNALES BTS-BIOTECHNOLOGIE

Les annales sont divisées en années. La numérotation est liée à chaque année.

Les énoncés des sujets et les éléments communs aux BTS Biochimiste et Biotechnologie ne sont publiés qu'une fois, les renvois permettent de retrouver facilement les documents.

SOMMAIRE

Année 2001 :

- Français Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE p 2001-1
- Anglais Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE p 2001-7
- Eléments de corrigé* Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE p 2001-74
- Mathématiques Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE p 2001-8
- Eléments de corrigé* Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE p 2001-75

Sujets spécifiques ne figurant que dans les annales du BTS Biotechnologie :

- Sciences physiques p 2001-1
- Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique p 2001-4
- Proposition de corrigé* p 2001-7
- Epreuve professionnelle de synthèse 1^{re} partie :
 - Etude de Projet p 2001-10
 - Proposition de corrigé* p 2001-18
- Epreuve professionnelle de synthèse 2^e partie :
 - Réalisation pratique d'opérations de Génie Biologique p 2001-20

Année 2002 :

- Français p 2002-1
- Eléments de corrigé et remarques du jury* p 2002-6
- Anglais p 2002-7
- Eléments de corrigé* p 2002-8
- Mathématiques p 2002-9
- Eléments de corrigé* p 2002-11

Sujets spécifiques ne figurant que dans les annales du BTS Biotechnologie :

- Sciences physiques p 2002-13
- Eléments de corrigé* p 2002-17
- Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique p 2002-19
- Proposition de corrigé* p 2002-21
- Epreuve professionnelle de synthèse 1^{re} partie :
 - Etude de Projet p 2002-26
 - Proposition de corrigé* p 2002-34
- Epreuve professionnelle de synthèse 2^e partie :
 - Réalisation pratique d'opérations de Génie Biologique p 2002-37

EPREUVES
DE LA SESSION
2001

EPREUVE DE SCIENCES PHYSIQUES

Durée : 2 heures

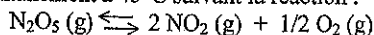
Coefficient : 2,5

RAPPEL : La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.
Seul l'usage d'une calculatrice électronique, autonome, non imprimante, à entrée unique par clavier, est autorisée pour cette épreuve.

Matériel à fournir : une feuille de papier millimétré.

I) CINETIQUE CHIMIQUE (18 points)

Dans un récipient indilatable vide d'air, on introduit du pentoxyde de diazote N_2O_5 gazeux. Celui-ci se décompose spontanément à $45^\circ C$ suivant la réaction :



On suit l'évolution de la réaction en déterminant la concentration de N_2O_5 en fonction du temps. Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

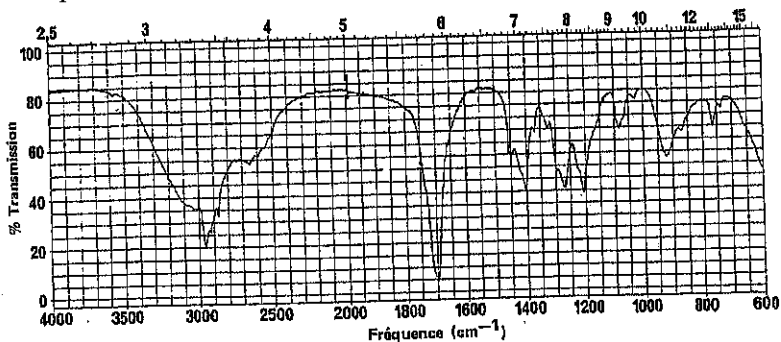
t en min	0	20	40	60	80	100
$[N_2O_5]$ en $mol.L^{-1}$	$12,4 \cdot 10^{-3}$	$6,8 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$0,6 \cdot 10^{-3}$

- 1) Montrer graphiquement que cette réaction de décomposition est d'ordre 1 par rapport à la concentration en N_2O_5 .
- 2) Calculer la constante de vitesse de la réaction.
- 3) Définir et calculer le temps de demi-réaction.
- 4) L'énergie d'activation de la réaction est égale à 102 kJ.mol^{-1} ;
4-1) Quelle est la valeur de la constante de vitesse à $65^\circ C$?
4-2) Comparer les constantes de vitesse et les vitesses initiales, pour des concentrations initiales en réactif identiques, lorsque la température passe de $45^\circ C$ à $65^\circ C$.

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

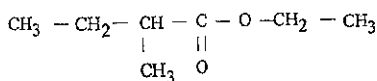
II) CHIMIE ORGANIQUE (15 points)

- 1) Un composé organique A de masse molaire 102 g.mol^{-1} contient du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène avec les pourcentages en masse suivants :
 C : 58,8% H : 9,8% O : 31,4%
 Déterminer sa formule brute.
- 2) Le composé A a le spectre infrarouge ci dessous :



Au vu de ce spectre et du tableau donné page suivante, identifier le groupe fonctionnel présent dans ce composé. Justifier votre réponse.

- 3) Déterminer la formule semi-développée de A sachant qu'il possède un carbone asymétrique, puis donner son nom.
- 4) Le composé A est obtenu au cours de la réaction d'hydrolyse du 2-méthylbutanoate d'éthyle



Ecrire l'équation bilan de cette hydrolyse et nommer l'autre produit de la réaction.

- 5) En appliquant la méthode VSEPR, donner la géométrie de la molécule au niveau du carbone du groupement fonctionnel de A.
- 6) Dessiner en représentation de Newman et en justifiant votre dessin, l'isomère de configuration R pour le composé A.

Données : masses molaires atomiques $M_{\text{C}} : 12 \text{ g.mol}^{-1}$ $M_{\text{H}} : 1 \text{ g.mol}^{-1}$ $M_{\text{O}} : 16 \text{ g.mol}^{-1}$
 Spectroscopie infrarouge, tableau des fréquences des vibrations (page suivante)

SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

FREQUENCE DES VIBRATIONS DE VALENCE (OU D'ETIREMENT) ET DES VIBRATIONS DE DEFORMATION

Liaison + environnement	Nature	Nbre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (1)
C _{sp3} - H	valence	2810 - 3000	F
C _{sp3} - H (CH ₃ -)	déformation	1365 - 1385	F
C _{sp2} - H	valence	3000 - 3100	m
C _{sp2} - H	déformation	790 - 960	F
C _{sp2} - H (aromatique)	valence	3030 - 3080	m
C _{sp2} - H (aromatique monosubstitué)	déformation hors du plan	690 - 770	F
		730 - 770	F
C _{sp2} - H (aromatique ortho.-disubstitué)	déformation hors du plan	735 - 770	F
C _{sp2} - H (aromatique méta.-disubstitué)	déformation hors du plan	680 - 725	m
		750 - 810	F
C _{sp2} - H (aromatique para.-disubstitué)	déformation hors du plan	800 - 860	F
C _{sp2} - H (aromatique 1.2.3 substitué)	déformation hors du plan	685 - 720	m
		770 - 800	F
C _{sp2} - H (aromatique 1.2.4 substitué)	déformation hors du plan	800 - 860	F
		860 - 900	m
C _{sp2} - H (aromatique 1.3.5 substitué)	déformation hors du plan	675 - 730	F
		810 - 865	F
C _{sp2} - H (aldéhyde)	valence	2750 - 2900	m
C _{sp} - H	valence	3300 - 3310	m
O - H libres	valence	3580 - 3670	F
O - H alcool et liaison H	valence	3200 - 3400	F
O - H (acide carboxylique)	valence	2500 - 3200	F
N - H (amines + imines)	valence	3100 - 3500	m
N - H (amides)	valence	3100 - 3500	F
C - C	valence	1000 - 1250	F
C = C	valence	1625 - 1680	m
C ≡ C	valence	2100 - 2250	f
C = C (aromatique)	valence	vers 1600	m
si le cycle est conjugué, ces 2 bandes sont déplacées de - 20 et - 40 cm ⁻¹ et elles deviennent		vers 1500	m
			F
C - O	valence	1050 - 1450	F
C = O (aldéhydes et cétones)	valence	1650 - 1730	F
C = O (acides)	valence	1680 - 1710	F
C = O (esters)	valence	1700 - 1740	F
C = O (anhydrides)	valence	1700 - 1840	F
		(2 bandes)	
C = O (amides)	valence	1650 - 1700	F
C - N	valence	1000 - 1400	F
C = N	valence	1600 - 1680	F
C ≡ N	valence	2120 - 2260	m . F
C - F	valence	1000 - 1400	F
C - Cl	valence	700 - 800	F
C - Br	valence	600 - 750	F
C - I	valence	500 - 600	F
N = O	valence	1510 - 1580	F
		1325 - 1365	

(1) F = forte

m = moyenne

f = faible

III) POLARIMETRIE (17 points)

- 1) 1-1) Enoncer la loi de Biot pour une substance optiquement active en solution dans un solvant inerte. Expliciter tous les termes employés.
- 1-2) La source lumineuse utilisée est une lampe à vapeur de sodium. Justifier ce choix.
- 2) L'acide (D) lactique a un pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha_D]_D^{20^\circ C} = -0,19^\circ \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$.
- 2-1) Faire la représentation de Fischer de l'acide (D) lactique. On rappelle la nomenclature officielle de l'acide lactique : acide-2-hydroxypropanoïque.
- 2-2) L'acide (D) lactique est-il dextrogyre ou lévogyre ? Justifier votre réponse.
- 2-3) Quel est le pouvoir rotatoire spécifique de l'acide (L) lactique ? Y-a-t-il d'autres propriétés physiques qui distinguent ces deux énantiomères ?
- 2-4) On réalise une solution S_0 d'acide (D) lactique en dissolvant 10 grammes d'acide (D) lactique dans 100 cm^3 d'eau distillée. (On considérera que la dissolution se fait sans variation de volume). La solution S_0 est placée dans un tube polarimétrique de longueur 20 centimètres. Calculer son pouvoir rotatoire α_0 à $20^\circ C$.
- 2-5) La mesure du pouvoir rotatoire d'une solution S_1 d'acide lactique de concentration $100\text{ g} \cdot L^{-1}$, placée dans un tube polarimétrique de longueur 20 centimètres donne $\alpha_1 = -2,28^\circ$ à $20^\circ C$.
- 2-5-1) Comparer α_0 et α_1 . Conclure.
- 2-5-2) Calculer la concentration de chacun des deux énantiomères de l'acide lactique dans la solution S_1 .

EPREUVE DE SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GENIE BIOLOGIQUE

Durée : 4 heures

Coefficient : 6

Calculatrices non autorisées.

LES BIOTECHNOLOGIES AU SERVICE DE LA THERAPIE GENIQUE

La thérapie génique vise à traiter les maladies d'origine génétique.

Elle nécessite le transport, l'intégration et l'expression de gènes thérapeutiques au sein des cellules du patient, afin d'y corriger leur déficience génétique ou de les détruire (dans le cas de cellules cancéreuses). Pour remplir cette mission, on utilise des vecteurs, notamment rétroviraux. ...

De récents développements permettent d'espérer traiter efficacement des patients atteints de syndrome d'immunodéficience.

Ainsi l'exemple suivant illustre une thérapie génique utilisant un rétrovirus pour infecter des cellules hématopoïétiques d'un patient atteint d'une déficience en adénosine désaminase (ADA).

Cette déficience conduit à des anomalies du métabolisme des nucléosides puriques qui sont sélectivement toxiques pour les lymphocytes.

1. CONSÉQUENCES DU DÉFICIT EN ADENOSINE DESAMINASE (ADA)
(29 points)

- 1.1. La mutation du gène codant pour l'ADA entraîne une diminution de l'activité de cette enzyme. Définir l'activité enzymatique et l'unité d'activité katal. Donner, en les justifiant, les conditions expérimentales de mesure de cette activité.
- 1.2. Cette mutation a aussi pour conséquence une diminution de la synthèse d'ADN et une augmentation du niveau de dATP et des métabolites associés.
- 1.2.1. Donner la formule du dATP et écrire la structure chimique du fragment d'ADN suivant : pApTpGpC. Les formules détaillées des bases azotées ne sont pas exigées.
- 1.2.2. Préciser le nom et le rôle des protéines impliquées au niveau de la fourche de réplication.

2. LES VECTEURS RÉTROVIRAUX (32 points)

2.1. Caractères généraux

- 2.1.1. Donner la définition d'un virus.
- 2.1.2. Réaliser le schéma d'un rétrovirus.
Préciser ses constituants biochimiques et la fonction biologique des diverses structures.
- 2.1.3. Comparer les modes de réplication et de transcription des rétrovirus et des virus à ADN comme les adénovirus, eux aussi utilisés comme vecteurs dans les thérapies géniques. Présenter les résultats sous forme de tableau ou de schémas.

2.2. Particularités du rétrovirus utilisé pour la thérapie génique ADA.

Le rétrovirus initial a la carte génomique suivante :

cis 1	gag	pol	env	cis 2
-------	-----	-----	-----	-------

cis : régions régulatrices nécessaires en position cis.

gag code *MA* protéine de matrice
 CA protéine de structure de la capside
 NC protéine de la nucléocapside
 PR protéase

pol code *RT* transcriptase inverse
 IN intégrase

env code glycoprotéines de surface

Le rétrovirus modifié, utilisé comme vecteur dans la thérapie génique ADA, est déficient et recombiné. Il est produit dans des cellules transcomplémentantes. Sa carte génétique est schématisée ci-dessous.

cis 1	ADA	Cis 2
-------	-----	-------

Les cellules transcomplémentantes ont été préparées par intégration des gènes gag, pol et env dans leur génome.

2.2.1. Expliquer le sens général des termes "virus déficient recombiné" et "cellule transcomplémentante".

Quel est le but de la séparation des gènes viraux en deux stocks génétiques, l'un chez le virus déficient et l'autre chez la cellule transcomplémentante ?

2.2.2. Dans le contexte de la thérapie génique ADA, préciser les fonctions assurées par les séquences cis et ADA.

3. PRODUCTION DES VECTEURS RÉTROVIRAUX (37 points)

Les premières étapes de production consistent à transférer de l'ADN viral recombiné dans la lignée de cellules eucaryotes transcomplémentantes et à la mettre en culture.

3.1. Caractéristiques génétiques de la lignée transcomplémentante

La lignée cellulaire utilisée exprime, sous le contrôle d'un promoteur fort et inductible, les protéines virales de structure.

3.1.1. Montrer au moyen d'un schéma la place du promoteur d'un gène.

3.1.2. Présenter le rôle du promoteur dans l'expression d'un gène. Quelles sont les particularités d'un promoteur fort et inductible ?

3.2. Transfection de la lignée cellulaire transcomplémentante

3.2.1. Définir le terme de lignée cellulaire établie.

3.2.2. Donner le principe de 3 techniques d'introduction d'ADN étranger dans les cellules eucaryotes animales.

3.3. Culture des cellules transfectées

3.3.1. Conditions de cultures

3.3.1.1. Justifier l'importance de l'utilisation de sérum de veau fœtal lors de la culture de cellules animales.

3.3.1.2. Quels sont les avantages liés à l'utilisation d'un milieu de culture de cellules animales sans sérum de veau fœtal dans le cadre de la production de virus recombinés à visée thérapeutique ?

3.3.2. Risques de contamination microbiologique

Les mycoplasmes sont des bactéries très particulières contaminant très fréquemment les milieux de culture.

L'analyse de leurs ARN ribosomiaux 16S et 5S montre qu'elles sont en relation phylogénétique avec le genre Clostridium.

La classification actuelle des bactéries s'attache à être phylogénétique. Expliquer très succinctement ce que cela signifie. Pourquoi l'analyse des ARN 16S a-t-elle été choisie pour établir les relations phylogénétiques ?

3.3.3. Purification des particules virales

La chromatographie d'affinité est une technique de choix pour purifier les particules virales. Présenter les différentes étapes de cette technique en l'appliquant aux virus.

4. INFECTION CORRECTRICE DES CELLULES HEMATOPOIETIQUES (22 points)

Le déficit en ADA se traduit par une thymopoïèse réduite d'où un nombre de lymphocytes T circulants très faible.

4.1. Déficit en lymphocytes T

4.1.1. Lors de la maturation thymique des lymphocytes T, une sélection positive et une sélection négative se produisent. Préciser leur intérêt.

4.1.2. Expliquer comment un déficit en lymphocytes T conduit à une immuno-déficience affectant les réponses cellulaire et humorale.

4.2. Infection correctrice des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques sont mises en culture en présence de cytokines adaptées puis infectées par un rétrovirus recombiné portant le transgène ADA. Après trois jours, les cellules ayant intégré le transgène sont réimplantées chez le patient. Pendant l'année qui suit la transplantation, on recherche :

- la présence de leucocytes transformés par PCR,
- la persistance de l'expression de l'enzyme ADA par la technique dite de RT-PCR (transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne).

4.2.1. Donner une définition générale des cytokines.

4.2.2. Décrire le principe de RT-PCR en vous appuyant sur la connaissance de la structure des ARN chez les organismes eucaryotes. Justifier la nécessité de détruire toute trace d'ADN lors de l'extraction.

PROPOSITION DE CORRIGE

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

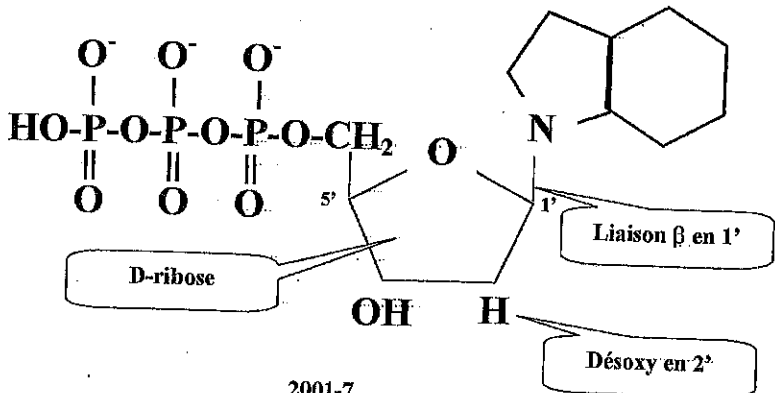
1.1. **Activité enzymatique :** quantité de substrat transformée ou de produit formé dans des conditions de mesure données. Elle est déterminée à partir de la valeur de la vitesse initiale de la réaction.

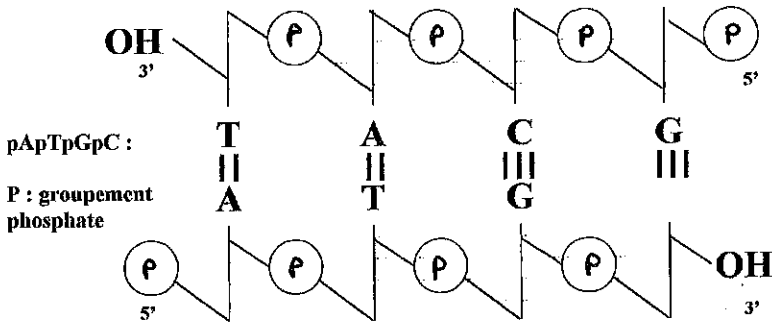
Katal : quantité d'enzyme qui transforme une mole de substrat par seconde.

Conditions expérimentales : concentration définie en substrat particulier, T et pH optimaux, milieu réactionnel adapté (ions, activateurs, cofacteurs, tampon), car l'activité dépend des paramètres physico-chimiques de ce milieu.

1.2.1.

ATP :





- 1.2.2. **Primase** : assure la synthèse des amorces **Hélicase** : déroule la double hélice
Gyrase ou topoisomérase II : élimine les supertours **SSB** : protéine stabilisant l'ADN simple brin
ADN Polymérase : activité exonucléasique éliminant l'amorce d'ARN de 5' en 3', puis assurant l'élongation de l'ADN de 5' en 3' avec une activité correctrice de 3' en 5'
ADN ligase : assure les liaisons entre les fragments d'Okasaki

2.1.1. Particule ou entité acellulaire formée de protéines et d'un seul type d'acide nucléique, parasite intracellulaire obligatoire, incapable de se multiplier à l'extérieur d'un hôte.

2.1.2. Schéma de la particule virale du V.I.H., virus de l'immunodéficience humaine, agent du S.I.D.A., syndrome d'immunodéficience acquise.

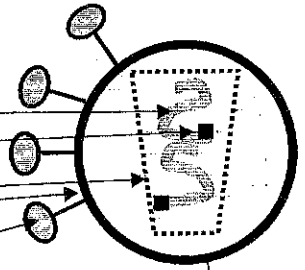
ARN : acide nucléique support de l'information génétique virale, ARN (+)

RT : transcriptase réverse assurant la synthèse de l'ADN, simple brin puis double brin à partir de l'ARN génomique.

Capside : structure protéique protégeant le génome

Enveloppe : bicouche phospholipidique

Glycoprotéines de surface : assurent la reconnaissance de la cellule-cible



2.1.3. Deux aspects essentiels : réplication du génome et expression (transcription et traduction)

	RETROVIRUS	ADENOVIRUS
REPLICATION	<ul style="list-style-type: none"> RT : obtention d'ADN_v à partir de l'ARN, puis intégration du provirus dans le génome cellulaire Transcription de l'ADN_v en ARN (+) viraux 	<ul style="list-style-type: none"> Réplication de l'ADN par les polymérases cellulaires Pas d'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire
EXPRESSION	Traduction de l'ARN (+) par la machinerie cellulaire	Transcription directe à partir de l'ADN viral

2.2.1. **Virus défectif** (absence de certains gènes) **recombiné** (intégration de matériel génétique d'origine exogène).
Cellule transcomplémentante : cellule ayant reçu les gènes manquant au virus défectif et qui sont nécessaires à la production de virus.

Séparation : le but est de « désarmer » le virus en enlevant les gènes viraux indispensables au pouvoir infectieux et de « faire de la place » dans le génome du virus afin d'y intégrer le transgène.

2.2.2. **ADA** : gène codant l'enzyme déficiente chez le malade.

CIS : zones nécessaires (signaux) à la transcription inverse, à l'intégration et à l'expression du génome viral.

3.1.1. et 3.1.2.

Promoteur : séquence nucléotidique située en amont d'un gène permettant la fixation du complexe d'initiation de la transcription.

Promoteur fort : séquence à forte affinité pour l'ARN polymérase, donc permettant d'obtenir un taux d'expression élevé (surexpression) de la protéine codée par le gène.

Promoteur inducible : la présence d'un inducteur est nécessaire à la transcription, des protéines se lient à certaines séquences du promoteur (en cis) et cela permet de choisir le moment de la production de la protéine d'intérêt par addition de l'inducteur dans le milieu de culture des cellules transcomplémentantes.

3.2.1. Cellules immortelles maintenues en culture in vitro par repiquages successifs.

3.2.2. 3 techniques parmi celles ci-dessous :

TECHNIQUE	PRINCIPE
Phosphate de calcium	Formation d'un précipité ADN/phosphate de calcium qui est internalisé par endocytose
Liposome	L'ADN est placé dans une vésicule sphérique constituée de lipides
Electroporation	Choc électrique bref et intense ayant pour effet de créer de manière transitoire des micropores dans la membrane plasmique, ce qui permet l'entrée de l'ADN
Biolistique	Bombardement des cellules par de microparticules d'or sur lesquelles est placé l'ADN
Microinjection	Injection de l'ADN dans la cellule grâce à une aiguille sous observation microscopique
Vecteur viral	Introduction du(des) gène(s) d'intérêt dans le génome d'un virus à ADN

3.3.1.1. Le sérum de veau fœtal (SVF) apporte des facteurs de croissance, des facteurs d'adhésion des cellules au support et des protéines assurant le transport des hormones, des oligoéléments ...

3.3.1.2. Réduction des risques biologiques liés à la manipulation de produits d'origine animale et diminution du coût du milieu.

3.3.2. **Classification phylogénétique** : basée sur le génome, sur l'évolution et la conservation de l'ADN au cours de l'évolution des espèces par comparaison des séquences. Plus les séquences sont proches, plus les espèces auxquelles elles appartiennent le sont aussi, c'est-à-dire que la séparation de ces espèces est « récente » au regard de l'évolution.

ARN 16 S : les fonctions en sont universelles chez les êtres vivants, les séquences d'ADN qui les codent sont très conservées phylogénétiquement.

3.3.3. L'application de la chromatographie d'affinité aux particules virales est basée sur les glycoprotéines de surface.

- Préparation d'un gel contenant un ligand spécifique du virus (anticorps, lectines) fixé par liaison covalente
- Dépôt de l'échantillon, rétention des particules virales
- Lavages : élimination des éléments non viraux
- Elution des virions : modification du pH (qui induit des changements conformationnels par dénaturation partielle réversible et modifie l'affinité virion/ligand), utilisation de solutions concentrées (en lectines ou en glycoprotéines de surface) qui provoquent une compétition aboutissant au « relarguage » des virions

4.1.1. **Sélection positive** : elle permet la restriction au complexe majeur d'histocompatibilité du soi (Classe II/CD4, classel/CD8)

Sélection négative : c'est l'élimination des lymphocytes T qui réagissent avec des antigènes du soi, ce qui fait qu'ils ne peuvent reconnaître qu'un antigène étranger associé au CMH du soi.

4.1.2. Les différents rôles des lymphocytes T sont :

- **LT helper** : production de cytokines, les LTH(1) stimulant plutôt la réponse à médiation cellulaire et les LTH(2) la réponse humorale, donc ces deux modes de réponse sont affectés.
- **LT cytotoxiques** : responsables de la RMIC.

4.2.1. (Glyco)protéines produites par des cellules ayant un effet autocrine ou paracrine, agissant par reconnaissance d'un récepteur spécifique et ayant des effets pléiotropes (activation ou inhibition).

4.2.2. **Rétrotranscription** :

- transcription de l'ARN en ADNsb par la transcriptase inverse grâce à une amorce non spécifique polydT ou une amorce aléatoire (hexanucléotide) ou une amorce spécifique : formation d'un hybride ARN/ADN
- synthèse du 2^{ème} brin d'ADN

Amplification :

- à l'aide d'une amorce spécifique ou non, et grâce à une ADN-polymérase thermostable
- dénaturation à 94°C
- hybridation (vers 55°C, en fonction des Tm des amorces)
- élongation à 72°C

Destruction de l'ADN : nécessaire, car on risque d'amplifier de l'ADN (puisque les séquences sont présentes dans les gènes), ce qui signifierait la présence d'un gène, mais pas forcément le fait qu'il soit exprimé.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE

1^{ère} PARTIE : ETUDE DE PROJET

Durée : 4 heures

Coefficient : 4.

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.
Calculatrice autorisée.
Une feuille de papier millimétré.

Les protéines de fusion : mise au point d'un système d'expression et application

L'optimisation du système permettant l'expression à haut niveau de protéines hétérologues est capital pour le succès d'un procédé biotechnologique.

Le PinPoint^{TR} mis au point et commercialisé par la firme PROMEG permet d'améliorer l'expression des protéines de fusion chez E. coli.

- Les divers aspects étudiés successivement seront :
- les éléments du Pin Point System^{TR}
 - la mise au point du système
 - un exemple d'application

1. Principe du Pin Point System^{TR} : (8 points)

C'est la capacité de la bactérie *E. coli* de fixer, par covalence, de la biotine sur un fragment protéique (de biotinyler un fragment protéique) porteur d'une séquence spécifique d'acides aminés qui est utilisée ici. La biotine ainsi fixée peut ensuite servir de marqueur et être reconnue par de l'avidine ou de la streptavidine. Ceci peut être utilisé pour la séparation de la protéine recombinante. Cette dernière pourra alors être séparée de la séquence marqueur ("tag") par hydrolyse grâce à une endopeptidase.

Le document 1 schématise les divers temps du mode opératoire permettant l'obtention d'une protéine dans *E. coli* par le système considéré. Il est indiqué que la technique peut être mise en œuvre sur colonne ou en batch.

Nommer le type de purification réalisé ici. Indiquer les avantages et les inconvénients d'une mise en œuvre d'un côté sur colonne et, de l'autre, en batch.

2. Étude de certains aspects d'éléments constitutifs du PinPoint System^{TR} (40 points)

Les éléments constitutifs étudiés seront : la biotinylation, la liaison biotine - avidine, la résine ayant fixé l'avidine.

La biotine est un coenzyme, cofacteur des carboxylases du métabolisme.

2.1. La biotinylation in vivo

La biotinylation réalisée dans la cellule hôte est possible grâce à l'existence d'une séquence spécifique d'acides aminés reconnue par la *biotine ligase* (EC 6.3.4.9) de *E. coli*. La biotine se fixe sur la lysine 89 de cette séquence marqueur ("Tag sequence"). La séquence spécifique d'acides aminés provient de la sous-unité 1,3 S de 12,5 kDa du complexe de la transcarboxylase de *Propionibacterium shermanii*. Elle est codée par une séquence nucléotidique de 386 pb ; celle-ci peut être introduite dans une cellule hôte grâce, par exemple, à un plasmide.

On s'intéressera ici à la bactérie dont a été extrait le gène de la transcarboxylase, *Propionibacterium shermanii*, puis au vecteur d'expression susceptible d'être utilisé pour le clonage du gène à exprimer.

2.1.1. *Propionibacterium shermanii*

- 2.1.1.1. L'étude préalable de la souche de *Propionibacterium shermanii* utilisée pour fournir la séquence d'ADN encodant la zone de marquage a été réalisée dans les conditions décrites par le **document 2**.

Dans quelles catégories classer cette bactérie, pour ce qui concerne sa source d'énergie, sa source de carbone, son type respiratoire, sa température et son pH optimum. Justifier les réponses

- 2.1.1.2. Le **document 3** rassemble des résultats obtenus sur milieu glucosé d'une part, et sur milieu glycérolé d'autre part.

Quel milieu est-il préférable de choisir pour cultiver cette bactérie en vue du clonage de la séquence d'intérêt ? Justifier la réponse.

D'après les données des documents 2 et 4, tracer la courbe de croissance obtenue dans ces conditions expérimentales et déterminer graphiquement son temps de génération. Calculer la biomasse obtenue en fin de croissance.

2.1.2. Un exemple de vecteur d'expression

- 2.1.2.1. Divers vecteurs d'expression ont été mis au point.

Les documents techniques de présentation du vecteur d'expression utilisé fournissent les indications suivantes :

- "DNA coding for the protein of interest is cloned into one of the three *PinPoint™ Xa Vectors*, which differ only in reading frame. The DNA is inserted downstream from a sequence encoding a peptide that is biotinylated in vivo as the fusion protein is expressed."
- "The sequence connecting the coding regions for the two fusion partners encodes an in-frame site for Endoproteinase Factor Xa cleavage."
Dans les indications précédentes, relever et expliquer les caractéristiques qui sont importantes pour la construction du vecteur recombinant.

- 2.1.2.2. Le vecteur *PinPoint™ Xa1 T* peut être utilisé. Les diverses séquences nucléotidiques présentes dans ce vecteur sont schématisées dans le **document 5**.

*Indiquer le rôle des diverses séquences nucléotidiques présentes dans ce vecteur *PinPoint Xa1 T*. Le choix d'une insertion aux sites *Eco RI* ou *Sca I* est-il judicieux ? Expliquer.*

2.2. La liaison biotine - avidine : les deux types de résine

L'avidine est un tétramère. Elle peut néanmoins être utilisée à l'état de monomère. Les formes tétramère et monomère sont fixées par covalence sur une résine métacrylique. Les constantes de dissociation des formes tétramère et monomère sont respectivement 10^{-15} M et 10^{-7} M.

- 2.2.1. *Ecrire l'équilibre d'association de la biotine-avidine monomère et calculer les constantes d'association pour les deux formes de l'avidine avec la biotine.*
- 2.2.2. *Quelle résine utiliser pour réaliser une chromatographie, celle ayant fixé la forme tétramère ou celle ayant fixé la forme monomère ? Justifier votre réponse.*

3. La mise au point du système : l'expression d'une β -galactosidase active (10 points)

Afin de valider le *PinPoint System^{TR}*, la β -galactosidase a été clonée et exprimée avec le vecteur d'expression *PinPoint Vector*. Après expression, les bactéries ont été lysées et le lysat passé sur une colonne remplie de résine sur laquelle de l'avidine a été fixée par covalence.

- 3.1. *Dans le document 6, dire ce que permet de quantifier la mesure d'absorbance à 280 nm? Justifier votre réponse.*
- 3.2. *En vous aidant des indications fournies dans le document 6, commenter le diagramme d'élution obtenu. Emettre une hypothèse expliquant l'absence de pic à 280 nm correspondant aux fractions obtenues suite à l'addition de biotine.*

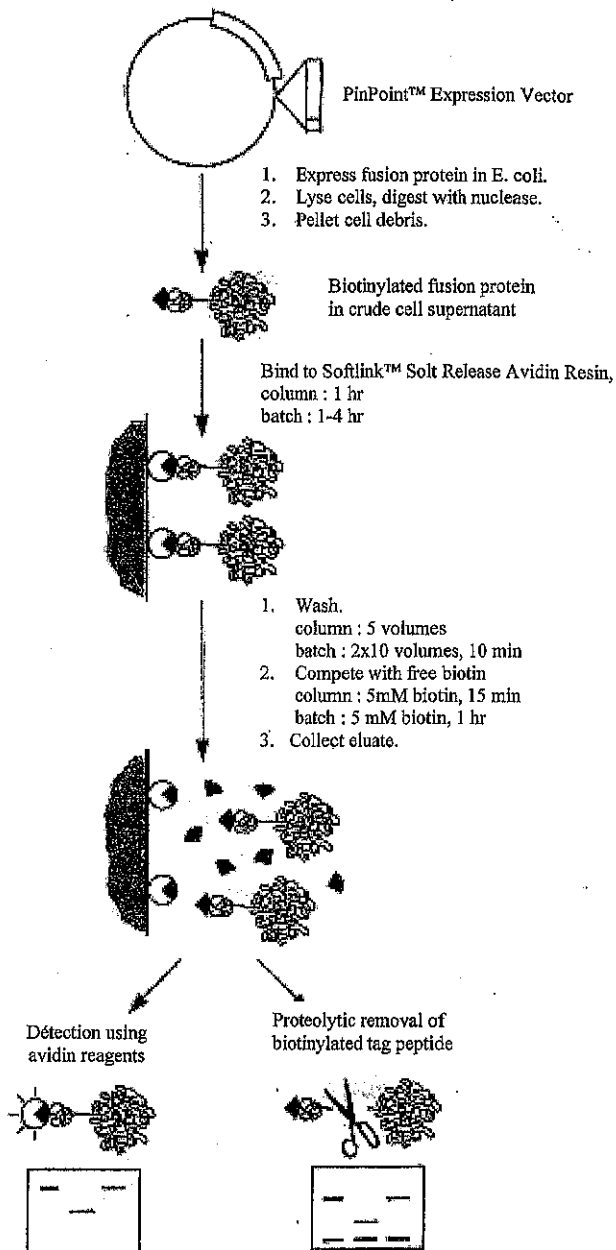
4. Utilisation du système dans la purification d'anticorps (22 Points)

Le système décrit précédemment (*PinPoint (TM) Xa1 T-vector / E.coli JM 109 / avidin linked resin*) a été utilisé pour purifier les anticorps dirigés contre la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) à partir d'œufs de poulets immunisés contre cette protéine.

- 4.1. *A partir des figures 1 et 2 du document 7 et en vous aidant du document 1, récapituler les différentes étapes de la purification.*
- 4.2. *Rappeler la définition d'un « sérum polyclonal ». Indiquer l'intérêt du système précédent pour la purification d'un anticorps spécifique d'un antigène particulier.*
- 4.3. *Analyser les résultats de la figure 1 du document 7.*
- 4.4. *Analyser les résultats de la figure 2 du document 7.*
- 4.5. *Le document 8 montre les résultats d'un test ELISA sur les différentes fractions.*

- *Les puits sont traités préalablement avec de la BSA à 1%. Pourquoi ? Schématiser la technique utilisée. Analyser les résultats.*

Document 1 : Schéma de l'obtention de protéines de fusion par utilisation de PinPoint System^{TR}



Document 2 : Medium and growth conditions

Inoculum culture was prepared in 120 mL flask containing 60 mL nitrogen-gassed, sterile, medium [10 g/L yeast extract ; 5 g/L tryptic soy broth ; 2,5 g/L K_2HPO_4 and 1,5 g/L KH_2PO_4]. Flask was sealed with butyl rubber caps and incubated for 30 h at 30°C. Batch fermentation was performed using 1,2 L glass reactor containing 1 L of the same culture medium supplemented with 20 g/L glucose or glycerol. Except for the concentrated solution of glucose or glycerol, which were sterilised separately, medium was autoclaved for 20 min at 120°C, then gassed with sterile nitrogen gas to remove any traces of oxygen. The inoculum consisted of 100 mL (10% v/v) inoculum culture ; the temperature was maintained at 30°C by a thermostated water-circulation system, the pH was controlled at 7,0 by automatic addition of 10M NaOH, and the medium was stirred by magnetic agitation (250 rpm).

Growth yield determination

Growth yield was calculated using the optical density of the culture broth after calibrating the dry cell mass to this parameter. The absorbance was measured at 578 nm (dry cell mass in g/L = 0,35 x A_{578}) with a spectrophotometer after appropriate dilution in distilled water.

Document 3

End-products yields, biomass and kinetic parameters of fermentations with *Propionibacterium shermanii*. (r_x , biomass production rate ; r_s , glucose or glycerol consumption rate ; r_p , propionate production rate ; r_a , acetate production rate.) Products yields are expressed in mol product / mol equivalent pyruvic acid from glucose or in mol product / mol glycerol

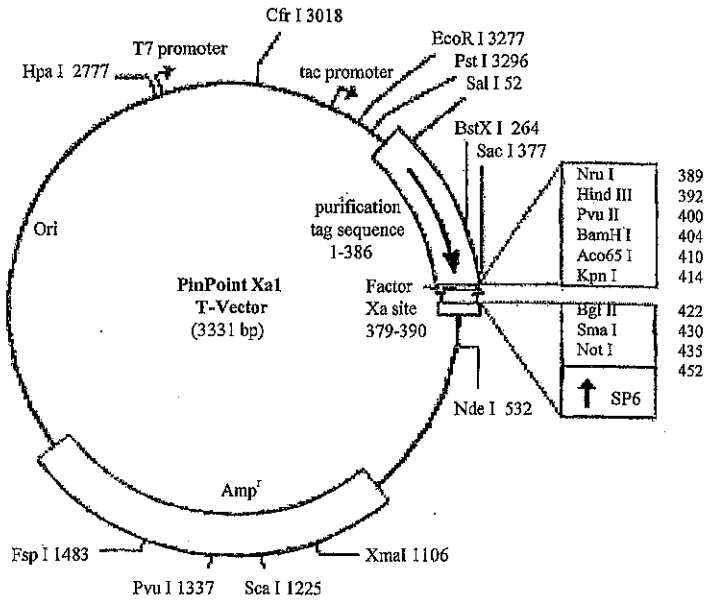
	product yield (mol/mol)				biomass (g/L)	kinetic parameters (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)			
	acetate	propionate	propanol	succinate		$r_x \frac{dx}{dx}$	$r_s \frac{ds}{dx}$	$r_p \frac{dp}{dt}$	$\frac{dp}{dt} r_a$
glucose	0,26	0,40	0,06	0,01	8,8	0,09	0,21	0,07	0,12
glycerol	0,16	0,58	0,09	0,04	5,2	0,13	0,29	0,18	0,07

Document 4

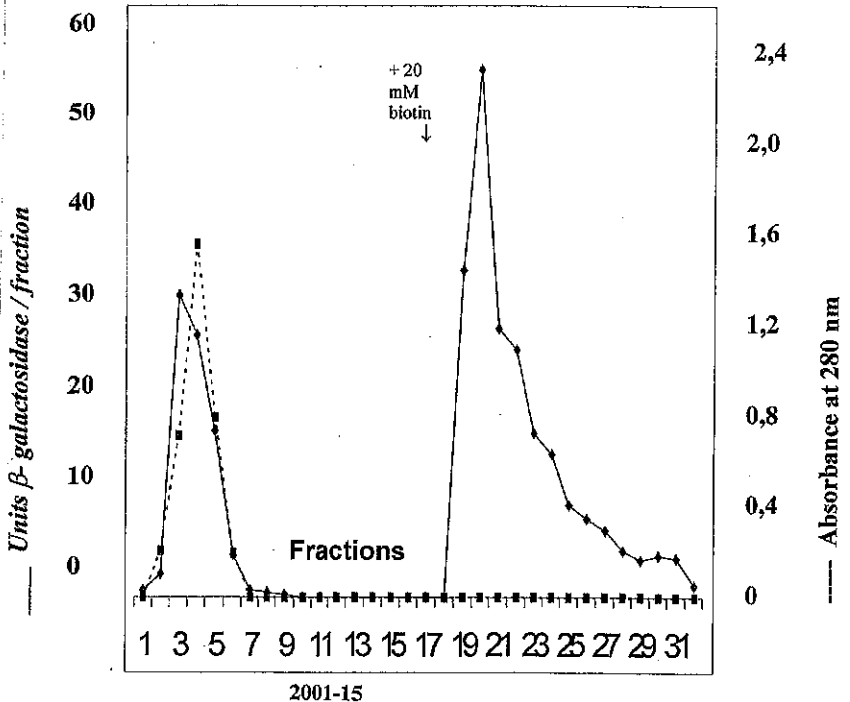
Absorbances à 578 nm

temps (heures)	absorbance
0	1,92
12,1	2,29
29,6	4,29
48,4	8,28
59,2	11,71
76,7	16,57
94,2	21,43
102,2	23,43
118,4	24,57
126,5	25,71
148	25,14

Document 5 : Structure d'un vecteur d'expression du PinPoint System^{TR} : le vecteur PinPoint System^{TR} XaI T



Document 6 :
curve d'élution



Purification of the β -galactosidase fusion protein

One hundred mL cultures of *E. coli* F 11 recA (β gal⁺) carrying the fusion plasmid pCY74 were grown to early exponential phase in a broth medium, induced with 1 mM IPTG for 3 h and harvested. The strain also carry pBA11, a compatible plasmid that overproduces biotin ligase ca 10-fold. These cells were harvested and disrupted in a buffer called Z. The resulting lysate was centrifuged at 48 000 g for 1 hr and the supernatant (ca 2 mg protein) were applied to an 0,5 mL column of avidin-Sepharose. The column is eluted with Z buffer or Z buffer containing 20 mM biotin (arrow) . Fraction of ca 250 μ L were collected and assayed for β -galactosidase (Miller, 1972) and protein (absorbance at 280 nm of a twenty fold dilution).

adapté de Cronan E. Jr., 1990, J Biol. Chem., 10333

Document 7

Figure 1. Preparation of a resin containing bound CAT fusion protein.

A plasmid containing the CAT gene fused to the biotinylation segment was constructed and introduced into JM109. Fusion protein was expressed by addition of IPTG to the growth media and cells were harvested approximately 14 hours post-induction. Cells were lysed by sonication, the resin was incubated with the cleared lysate overnight (4°C on a rotating platform) and the resin was washed with five column volumes of TBS. A small amount of the washed resin was removed and SDS sample buffer was added to remove the bound protein. The lysate and the bound protein were analyzed by SDS-PAGE (4-20% Tris-glycine) under reducing conditions and subsequently were visualized by Coomassie® staining. The position of the molecular weight markers (Promega's Mid-Range Protein Molecular Weight Markers (Cat.# V5231)) are indicated. Lane 1: *E. coli* lysate; Lane 2: bound protein.

The bound sample shows purified CAT fusion and a small amount of biotinylation domain that was present in the preparation due to the proteolysis of the fusion protein.

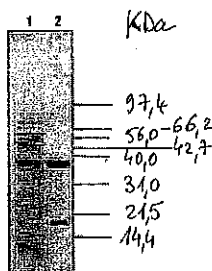
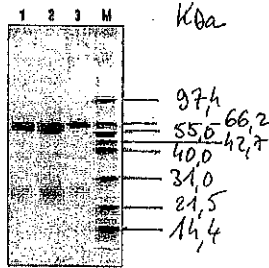


Figure 2. Affinity purification of anti-CAT antibody.

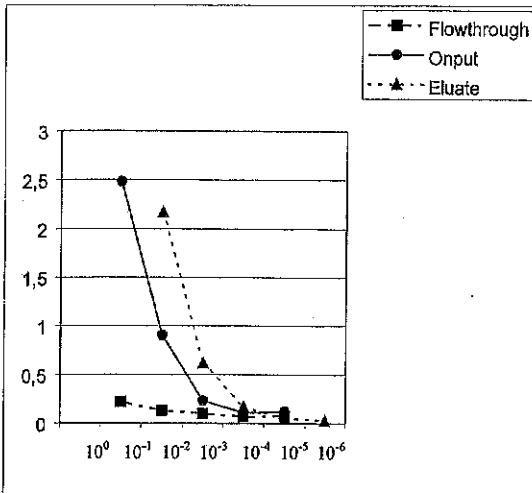
A polyclonal antibody pool was prepared from eggs produced by immunized chickens using the EGGstract® IgY Purification System and passed over the avidin linked resin containing bound biotinylated CAT fusion protein (see Figure and the text). The various fractions were analyzed by SDS-PAGE (4-20% Tris-glycine) under reducing conditions and subsequently were visualized by Coomassie® staining. Lanes: Lane 1, 4µl of total IgY pool; Lane 2, 4µl of non-specific IgY flowthrough; Lane 3, 4µl of antigen-specific IgY eluate.



Document 8 :

Antigen binding of the polyclonal antibodies in an ELISA format.

Ten-fold dilutions were prepared from the fractions indicated and incubated with 50ng/well of CAT protein. Bound antibody was detected using a goat anti-chicken alkaline phosphatase conjugate (Cat.# G1151) and p-nitrophenyl phosphate substrate.



PROPOSITION DE CORRIGE

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

1. Chromatographie d'affinité, avec reconnaissance de la biotine fixée sur la protéine par l'avidine présente sur le gel.
Avantages de la colonne : durée plus courte pour la fixation (1 h au lieu de 1 à 4 h) et l'élution (15 min au lieu de 1 h), volumes nécessaires pour le lavage plus faibles.

2.1.1.1. Caractéristiques de la souche :

REPONSE	JUSTIFICATION
Chimioorganotrophe	Nutriments énergétiques organiques (glucose, glycérol)
Hétérotrophe	Source de C organique : extrait de levure, peptone de soja, glucose
Anaérobie stricte	Ne cultive pas en présence de dioxygène; qui est éliminé du milieu par le diazote et le récipient de culture est fermé par un bouchon de caoutchouc
Mésophile	Cultive à 30°C, vraisemblablement en conditions très favorables, voire optimales, puisqu'on veut produire le maximum de biomasse pour obtenir de l'ADN en quantité suffisante
Neutrophile	Culture à pH = 7, vraisemblablement en conditions très favorables, voire optimales, puisqu'on veut produire le maximum de biomasse pour obtenir de l'ADN en quantité suffisante

2.1.1.2. On veut produire le maximum de biomasse pour obtenir de l'ADN à cloner, donc on choisit le milieu avec du glucose, puisque la biomasse obtenue est de 8,8 g/L au lieu de 5,2 sur glycérol.

Courbe de croissance :

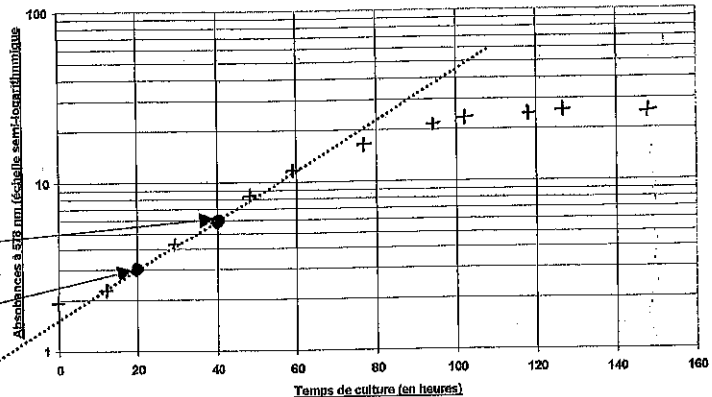
titre de la manipulation et loi mathématique de la représentation tracée, grandeurs/unités/graduations sur les axes, échelle, report correct des points sur la courbe, et soin du tracé.

Détermination claire de G lisible sur la courbe :
G = 40 - 20 = 20 h.

$$A = 6 \text{ pm} - t = 40 \text{ h}$$

$$A = 3 \text{ pm} - t = 20 \text{ h}$$

CROISSANCE DE *Protonibacterium shermanii*



Résultat de biomasse exprimé en concentration de matière sèche : $X = 25 \pm 25,71 \times 0,35 = 8,8 \pm 9,0 \text{ g/L}$.

2.1.2.1. Pour que la protéine soit fonctionnelle, il faut que le gène inséré soit en phase, et la séquence codant le peptide doit être en phase pour conserver le site de l'endoprotéase Xa : c'est-à-dire qu'il ne doit pas y avoir décalage du cadre de lecture.

Le gène d'intérêt doit être en aval de la séquence marqueur (« Tag sequence » citée dans le « chapeau du sujet en 2.1).

2.1.2.2.

SEQUENCE	ROLE
ORI	Origine de réplication chez <i>Escherichia coli</i>
Amp ^r	Gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des transformants
SP6, Tac, T7	Promoteurs permettant l'initiation de la transcription
SMC	Site multiple de clonage permettant l'insertion de la séquence à cloner et contenant des sites uniques
Tag sequence	Séquence marqueur qui sera biotinylée
Xa	Site de clivage par l'endoprotéase

Remarque : d'autres sites de restriction figurent sur le vecteur présenté dans le document 5.

Sca I est situé dans le gène de résistance à l'ampicilline, donc il y aura un problème de sélection des transformants. EcoRI est situé en amont du gène de la séquence marqueur, donc le clonage ne sera pas satisfaisant.

2.2.1. avidine + biotine \rightleftharpoons avidinebiotine $K_a = (\text{avidinebiotine})/(\text{avidine}) \times (\text{biotine}) = 1/K_d = 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$
Pour le tétramère : $K_a = 1/K_d = 10^{15} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$

2.2.2. La forme monomère est préférable, car sinon l'élution sera trop difficile.

3.1. L'absorbance à 280 nm permet de quantifier les protéines, car c'est la longueur d'onde du maximum d'absorption par les acides aminés aromatiques (Tyr, Phe, Trp).

3.2. 1^{er} pic, à 280 nm : sortie des protéines ayant une activité β -galactosidase mais non biotinylées, donc non retenues.
2^{ème} pic : fractions présentant une activité β -galactosidase, protéines non détectables car dilution importante à cause de la grande quantité de biotine ajoutée

4.1.	1 : Fusion du gène CAT-Tag	6 : Incubation de la résine avec le lysat
	2 : Transformation (<i>E. coli</i>) JM 109	7 : Lavage de la résine
	3 : Induction par l'IPTG	8 : Addition de la solution d'œufs
	4 : Récolte 14 h après l'induction	9 : Elution des anticorps
	5 : Lyse par sonication	10 : Contrôles par électrophorèse SDS-PAGE

4.2. Sérum polyclonal : solution d'anticorps différant par leur spécificité antigénique
Production d'antigène biotinylé par génie génétique et recyclage possible de l'ensemble résine/avidine

4.3. Ligne 1 : protéines présentes dans le cytoplasme d'*Escherichia coli*
Ligne 2 : présence de 2 bandes :
➤ grosse fraction : protéine de fusion CAT-biotinylée
➤ petite fraction : vraisemblablement le fragment biotinylé, libéré par hydrolyse
Conclusion : fixation de la protéine CAT réussie, la colonne est prête pour la purification

4.4. : Ligne 1 : fraction anticorps totale, les Ig ne sont pas séparées
Ligne 2 : fraction anticorps non retenue
Ligne 3 : fraction anticorps retenue

4.5. SAB à 1% : permet la saturation des sites non spécifiques

Étapes :
Fixation de l'antigène (protéine CAT) sur les puits de la plaque de microtitration
Saturation des sites non spécifiques par la SAB
Lavage
Dépôt de l'anticorps dilué 10x à partir des fractions obtenues
Lavage
Addition du conjugué Ac chèvre anti-poulet/phosphatase
Lavage
Révélation par addition du substrat PNPP

Courbes : on porte en ordonnée l'absorbance obtenue après révélation en fonction de (en abscisse) la dilution de l'échantillon. Plus la dilution permettant d'obtenir un signal important est faible, plus la solution d'anticorps testée est concentrée, la comparaison des dilutions permettant d'obtenir ce signal important avant et après purification de l'anticorps sur la colonne permettra de caractériser l'efficacité de la purification.

- Courbe « onput » : c'est la solution que l'on a déposée sur la colonne de résine portant l'avidine. Le signal le plus élevé (2,5) est obtenu pour une dilution proche de (et supérieure à) 10^{-1} .
- Courbe « flowthrough » : elle correspond à la fraction qui a été exclue de la colonne dès le début de la chromatographie, elle montre bien, par un signal faible de 0,25 (cependant non négligeable car il représente 10 % du signal précédent), qu'une faible quantité d'anticorps n'a pas été retenue par la colonne, ce qui montre l'efficacité (90 %) de la méthode.
- Courbe « eluate » : la fraction éluee après addition de biotine présente un signal maximal (2,2 environ) obtenu pour une dilution plus faible (entre 10^{-1} et 10^{-2}), ce qui montre que la fraction anticorps obtenue a été concentrée (d'un facteur légèrement inférieur à 10 : le signal 2,2 < 2,5 pour la fraction déposée, mais l'écart entre les dilutions est d'environ 10).

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE
2^{ème} PARTIE : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE
Durée : 8 heures **Coefficient : 8**

*Aucun pipetage à la bouche n'est autorisé et le port de lunettes de sécurité est recommandé.
Calculatrice autorisée.*

PRODUCTION D'UN IMMUNOCONJUGUÉ RECOMBINANT

PREMIER JOUR

Durée : 5 heures 30

Toutes les valeurs expérimentales doivent être communiquées immédiatement aux examinateurs.

Le sujet comporte 4 parties indépendantes et qui peuvent être réalisées dans un ordre différent de leur présentation. Il est important que le candidat réfléchisse à l'organisation du travail dans le temps. Ces manipulations s'inscrivent dans le cadre d'un projet de production chez *Escherichia coli* d'un immunoconjugué recombinant.

Cette molécule hybride bifonctionnelle est constituée du fragment F(ab)₂ d'un anticorps murin d'une part et de la phosphatase alcaline (PhoA) d'*E. coli* d'autre part.

La souche productrice d'*E. coli* a été obtenue en transformant une souche hôte par un vecteur plasmidique comportant la construction génétique adéquate.

PREMIÈRE PARTIE :

CROISSANCE DE LA SOUCHE RECOMBINANTE (25 points)

On souhaite déterminer la vitesse spécifique de croissance de cette souche en milieu LB additionné d'ampicilline (à 200 µg/mL) à 37°C.

1.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 1 erlen contenant 50 mL de milieu LB + ampicilline préchauffé à 37°C
- 1 tube contenant environ 5 mL de préculture de la nuit en milieu LB + ampicilline de la souche
- 1 flacon contenant environ 10 mL de milieu LB

1.2. Mode opératoire

- Ensemencer l'erlen de milieu préchauffé avec 2,5 mL de la préculture fournie et le mettre à incuber dans le bain thermostaté à 37°C agité.
- Prélever 1 mL de culture dans une semi-microcuve au temps 0 puis toutes les 30 minutes pendant 3 heures.
- Lire immédiatement l'absorbance à 600 nm contre du milieu LB ; (placer la cuve dans la glace en cas d'attente).
L'absorbance limite de linéarité est de 0,6.

Les résultats des mesures doivent être fournis au fur et à mesure à l'examinateur.

1.3. Résultats

- Consigner dans un tableau les temps de prélèvement et les valeurs d'absorbance.
- Tracer la courbe de croissance.
- Analyser cette courbe.
- Déterminer la vitesse spécifique de croissance maximale dans les conditions opératoires.

DEUXIÈME PARTIE :

CONSERVATION DE LA SOUCHE RECOMBINANTE (30 points)

La souche est conservée par congélation à -20°C en présence de glycérol. On souhaite déterminer le pourcentage de cellules viables après décongélation.

Une numération par culture sur milieu solide est effectuée sur la suspension après décongélation.

2.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 1 microtube contenant 1 mL de culture congelée fraîchement décongelée.
- 1 flacon d'eau physiologique stérile
- cônes stériles
- tubes à hémolyse stériles
- 6 boîtes de gélose LB + ampicilline
- billes de verre ou étaleur stériles

2.2. Mode opératoire

- Distribuer 900 μL d'eau physiologique stérile dans 5 tubes à hémolyse.
- Effectuer une série de dilutions en progression géométrique de raison 1/10 jusqu'à 10^{-6} .

Réaliser ces dilutions devant un examinateur

- Étaler 100 μL de chacune des dilutions 10^{-4} à 10^{-6} sur gélose LB, en réalisant 2 essais par dilution.
- Incuber à 37°C les boîtes clairement identifiées.

TROISIÈME PARTIE :

EXTRACTION DE L'IMMUNOCONJUGUÉ : COMPARAISON DE 2 PROTOCOLES (65 points)

La construction génétique est telle que l'immunoconjugué synthétisé est localisé dans le périplasma de la souche productrice, ce qui permet de l'extraire sans lyse cellulaire.

Pour cette extraction, deux protocoles différents seront comparés : le "choc osmotique" et le "choc lysozyme".

Un contrôle de l'affinité de l'enzyme conjuguée pour son substrat sera également effectué.

3.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 50 mL de culture de la nuit en milieu LB + ampicilline de la souche productrice d'*E.coli*
- 5 mL de tampon TSE = tampon Tris-HCl 0,1M pH 8,2 + saccharose à 200 g/L + EDTA 5mM
- 3 mL de Thypo = tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,2 + MgCl_2 0,5 mM
- 10 mL de Tris-Mg-Zn = tampon 200 mM pH 8,2 + MgCl_2 1 mM + ZnCl_2 0,1 mM
- 100 μL de lysozyme à 10 mg/mL
- 10 mL de pNPP 5mM en eau déminéralisée
- 10 mL de NaOH 2M
- 1 mL de NaCl à 9 g/L
- réactif de Bradford en distributeur
- 0.5 mL de SAB à 0,3 mg/mL
- 2 tubes de 50 mL à centrifuger
- 1 pipette de 10 mL à usage unique

3.2. Extraction par "choc osmotique"

Après séjour en milieu hyperosmotique, en présence d'EDTA qui fragilise la membrane externe, les cellules sont remises en suspension en milieu hypoosmotique. L'entrée d'eau consécutive provoque alors une expulsion des protéines périplasmiques. Réaliser à partir de la culture fournie une extraction selon le protocole ci-dessous.

Mode opératoire

- Centrifuger 15 mL de la culture fournie pendant 5 minutes à 3500 rpm (soit 2500 g), à 10°C. Eliminer le surnageant dans l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension dans 1 mL de tampon TSE et transférer en microtube. Laisser séjourner 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger 3 minutes. Eliminer le surnageant dans l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension rapidement dans 1 mL de tampon Thyvo glacé. Vortexer immédiatement énergiquement puis effectuer quelques aspirations-refoulements.

Réaliser cette remise en suspension devant un examinateur

- Laisser séjourner 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger 3 minutes.
- Prélever le surnageant qui constitue l'extrait et le transférer dans un autre microtube. Le conserver dans la glace.

Remarques :

- Les centrifugations en microcentrifugeuse sont effectuées à vitesse maximale.
- Tout matériel contaminé sera déposé dans un bac contenant de l'eau de Javel.

3.3. Extraction par "choc lysozyme"

Le séjour en milieu hyperosmotique provoque une sortie d'eau qui entraîne une fuite des protéines périplasmiques à travers la membrane externe rendue poreuse par l'EDTA. Le lysozyme facilite cette fuite en s'attaquant au peptidoglycane.

Réaliser à partir de la culture fournie une extraction selon le protocole ci-dessous.

Mode opératoire

- Centrifuger 15 mL de la culture fournie pendant 5 minutes à 3500 rpm (soit 2500 g), à 10°C. Eliminer le surnageant dans l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension dans 1 mL de tampon TSE et transférer en microtube.
- Ajouter 15 µL de lysozyme et homogénéiser.
- Laisser séjourner 30 minutes dans la glace.
- Centrifuger 3 minutes.
- Prélever le surnageant qui constitue l'extrait et le transférer dans un autre microtube. Le conserver dans la glace.

3.4. Détermination des concentrations d'activité catalytique

La concentration d'activité catalytique (catc) de la PhoA dans les extraits préparés est déterminée à partir de la mesure de la vitesse initiale par la méthode en 2 points.

3.4.1. Mode opératoire

Mesurer les vitesses initiales pour chacun des 2 extraits selon le protocole ci-dessous.

Dans un tube à hémolyse, introduire :

950 µL de Tris-Mg-Zn
1 mL de pNPP 5 mM
50 µL d'extrait.

Incuber 2 minutes exactement à 30°C.

Arrêter la réaction en ajoutant 1 mL de solution de NaOH 2M.

Lire l'absorbance à 405 nm contre un témoin convenable.

L'une des 2 déterminations sera effectuée en présence d'un examinateur.

3.4.2. Résultats

- Préciser la composition des témoins.
- Calculer les concentrations d'activité catalytique (catc) de la PhoA dans chacun des extraits préparés en tenant compte des données ci-dessous.
- Une unité de PhoA est définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant un micromole de pNPP (4-nitrophényl phosphate) par minute dans les conditions opératoires proposées. **2001-22**
- Le coefficient spécifique d'absorbance molaire du pNP est de $17500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (soit $1750 \text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$) dans les conditions opératoires.

3.5. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées dans chacun des extraits par la méthode de Bradford.

3.5.1. Mode opératoire

- **Protocole** : en cuves pour spectrophotomètre, introduire :
x μL de solution protéique à compléter jusqu' à $50 \mu\text{L}$ avec NaCl à 9 g/L
 $2,5\text{mL}$ de réactif de Bradford
Lire l'absorbance à 595 nm après 10 minutes de séjour à l'obscurité contre le blanc de gamme.
- **Gamme étalon** : une gamme en 6 tubes, contenant de 0 à $15 \mu\text{g}$ de protéines par tube, sera réalisée à partir de la solution étalon de SAB fournie.
- **Essais** : les protéines des extraits enzymatiques seront dosées avec des prises d'essais de $50 \mu\text{L}$ a priori, volumes à adapter si nécessaire. Effectuer 2 essais pour chaque extrait.

3.5.2. Résultats

- Présenter un tableau de réalisation de la gamme étalon.
- Tracer la courbe étalon.
- Déterminer graphiquement les masses de protéines dans les prises d'essai de chacun des extraits.
- En déduire les concentrations en protéines de chacun des 2 extraits préparés.

3.6. Comparaison des activités spécifiques

- Résultats
- Déterminer les activités spécifiques (exprimées en U/mg) des 2 extraits.
- Les comparer. Conclure.

QUATRIÈME PARTIE :

UTILISATION DE L'IMMUNOCONJUGUÉ PRODUIT (40 points)

On étudiera l'immunoconjugué recombinant produit le deuxième jour.

Pour des raisons techniques, certaines opérations doivent être réalisées immédiatement.

4.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 1 plaque de microtitration
- 5 mL de réactif "4J1-A"
- 50 mL de solution tampon phosphate salin (PBS)
- 10 mL de réactif "4J1-B"

4.2. Mode opératoire

- Distribuer $200 \mu\text{L}$ de réactif "4J1-A" dans chacun des puits A1 à A10 et B1 à B11.
- Incuber la plaque recouverte de son film autoadhésif à l'étuve à 37°C pendant 4 heures.
- Rejeter le contenu des puits et les rincer en tampon PBS.
- Distribuer $250 \mu\text{L}$ de réactif "4J1-B" dans tous les puits (A1 à A12 et B1 à B12).
- Recouvrir la plaque (clairement identifiée par le numéro de poste) de son film autoadhésif et la laisser sur le plan de travail.

*Aucun pipetage à la bouche n'est autorisé et le port de lunettes de sécurité est recommandé.
Calculatrice autorisée.*

PRODUCTION D'UN IMMUNOCONJUGUÉ RECOMBINANT

DEUXIÈME JOUR

Durée : 2 heures 30 minutes

DEUXIÈME PARTIE :

CONSERVATION DE LA SOUCHE RECOMBINANTE (30 points)

2.2. Mode opératoire

- Compter les colonies.

2.3. Résultats

- Présenter les résultats sous forme d'un tableau.
- Analyser ces résultats et en déduire la concentration en cellules viables dans la suspension après décongélation.
- La suspension congelée avait été préparée en mélangeant 700 μL de culture à 7.10^8 cellules par mL et 300 μL de glycérol à 50%. En déduire le pourcentage de viabilité après décongélation.

QUATRIÈME PARTIE :

UTILISATION DE L'IMMUNOCONJUGUÉ PRODUIT (40 points)

On se propose de s'assurer que la molécule hybride recombinante produite est utilisable dans un dosage immunoenzymatique en phase hétérogène.

Dans ce but, une gamme étalon sera réalisée en double essai.

La partie anticorps de l'immunoconjugué est dirigée contre une hormone humaine hH.

Le réactif "4J1-A" déposé dans les puits le premier jour était une solution de l'hormone hH.

Le réactif "4J1-B" déposé dans les puits le premier jour était une solution de SAB à 2%.

4.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- la plaque de microtitration traitée la veille
- 50 mL de tampon PBS
- 50 mL de tampon PBS-Tween
- 0,5 mL d'hormone hH à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS
- 2,5 mL d'immunoconjugué recombinant
- 5 mL de solution tamponnée de substrat pNPP
- 2 mL de NaOH 2M

4.2. Mode opératoire

La veille, les puits A1 à A10 et B1 à B12 ont été sensibilisés avec 200 μL de solution de d'hormone hH à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; tous les puits ont ensuite été traités par de la SAB à 2%.

- Rejeter le contenu des puits ; laver 3 fois en tampon PBS-Tween et rincer 2 fois en tampon PBS.
- A partir de la solution étalon d'hormone hH fournie à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, réaliser 10 dilutions en série de progression géométrique de raison 1/2, sous un volume de 125 μL , jusqu'à la dilution $(1/2)^{10}$, en utilisant comme diluant du tampon PBS.
Réaliser en double la série de dilutions.
Utiliser pour ces dilutions des cupules vides de la plaque.
- Distribuer 100 μL de chacune de ces dilutions dans les puits A1 à A10 d'une part, B1 à B10 d'autre part.
- Déposer 100 μL d'hormone hH à 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans la cupule B12.
- Distribuer 100 μL de la solution d'immunoconjugué fournie dans les puits A1 à A11 et B1 à B12.
- En A12 : distribuer 200 μL de tampon PBS.
- En A11, B11 et B12 : ajouter 100 μL de tampon PBS.

Le schéma ci-dessous visualise la disposition des puits.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$\frac{1}{2}$									$(\frac{1}{2})^{10}$		
B	$\frac{1}{2}$									$(\frac{1}{2})^{10}$		

Le puits A12 constituera le zéro optique.

- Placer la plaque pendant 2 minutes sur agitateur rotatif.
- L'incuber, recouverte de son film autoadhésif, à l'étuve à 37°C pendant 45 minutes.
- Laver 3 fois en tampon PBS-Tween et rincer 2 fois en tampon PBS.
- Distribuer dans tous les puits 150 μL de solution substrat pNPP. Recouvrir du film autoadhésif et incuber 15 minutes à l'étuve à 37°C.
- Distribuer dans tous les puits 50 μL de solution de NaOH.
- Placer la plaque pendant 2 minutes sur agitateur rotatif puis lire les absorbances de chaque puits à 405 nm contre le puits A12 dans un lecteur de microplaques à lecture automatique avec imprimante. La feuille d'impression des résultats après identification sera jointe au compte-rendu.

Les lectures seront réalisées en présence d'un examinateur.

4.3. Résultats

- Présenter sous forme de tableaux les dilutions effectuées et la composition des témoins.
- Calculer et présenter dans un tableau les quantités d'hormone hH exprimées en ng déposées dans les puits le deuxième jour pour chacune des dilutions.
- Tracer sur un même graphique les 2 courbes représentant la variation d'absorbance à 405 nm obtenue en fonction du logarithme décimal de la quantité d'hormone ajoutée le deuxième jour.
- Commenter l'allure de la courbe obtenue en précisant sous forme d'un schéma légendé le principe du dosage réalisé.
- Préciser le rôle du puits A11, B11 et B12 ; discuter les résultats obtenus pour ces puits.
- On utilise la courbe étalon pour doser deux solutions de hH dont les concentrations sont estimées à 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
Comment opérer pour déterminer ces concentrations à l'aide de la courbe étalon obtenue ? Justifier.

EPREUVES
DE LA SESSION
2002

EPREUVE DE FRANÇAIS GROUPE 1 : SYNTHÈSE DE DOCUMENTS

Durée : 4 heures

Coefficient : 2

L'USAGE DES CALCULATRICES ELECTRONIQUES EST INTERDIT

Vous ferez une synthèse ordonnée concise et objective des documents suivants, qui livrent une réflexion sur certains aspects de la rumeur. Dans une conclusion personnelle, vous donnerez votre opinion sur la question abordée.

Document 1 : BEAUMARCHAIS, « Le Barbier de Séville », 1775, acte II, scène 8 (extrait)

Document 2 : « Rumeurs : prévenir plutôt que guérir »
Maîtrise et information administrative, n°154, octobre 1982

Document 3 : Jean-Noël KAPFERER, « Rumeurs, le plus vieux média du monde », Editions du Seuil, 1987

Document 4 : Jean-Jacques BOZONNET, « La rumeur d'Abbeville », avril 2001

Document 5 : PESSIN, *Le Monde*, 2 octobre 2001

DOCUMENT 1

« La calomnie, Monsieur ? »

BAZILE

Bone Deus (1) ! Se compromettre ! Susciter une méchante affaire, à la bonne heure, et, pendant la fermentation, calomnier à dire d'experts (2) ; concedo (3).

BARTHOLO

5 Singulier moyen de se défaire d'un homme !

BAZILE

10 La calomnie, Monsieur ? Vous ne savez guère ce que vous dédaignez ; j'ai vu les plus honnêtes gens près d'en être accablés. Croyez qu'il n'y a pas de plate méchanceté, pas d'horreurs, pas de conte absurde, qu'on ne fasse adopter aux oisifs d'une grande ville, en s'y prenant bien ; et nous avons ici des gens d'une adresse ! ... D'abord un bruit léger, rasant le sol comme hirondelle avant l'orage, pianissimo (4) murmure et file, et sème en courant le trait empoisonné. Telle bouche le recueillement, et piano, piano (4) vous le glisse en l'oreille adroitement. Le mal est fait, 15 il germe, il rampe, il chemine, et rinforzando (4) de bouche en bouche il va le diable ; puis tout à coup, ne sais comment, vous voyez calomnie se dresser, siffler, s'enfler, grandir à vue d'œil ; elle s'élanche, étend son vol, tourbillonne, enveloppe, arrache, entraîne, éclate et tonne, et devient, grâce au ciel, un cri général, un crescendo (4) public, un chorus (5) universel de haine et de proscription – qui diable y résisterait ?

(1) Bon Dieu.

(2) Calomnier sans retenue et efficacement.

(3) Je l'accorde.

(4) Ces termes de musique empruntés à l'Italien marquent le tempo.

(5) Un chœur.

BEAUMARCHAIS,
Le Barbier de Séville,
1775, acte II, scène 8 (extrait).

DOCUMENT 2

Rumeurs : prévenir plutôt que guérir.

La rumeur se développe généralement très vite lorsqu'il existe un état d'inquiétude qui touche l'ensemble du groupe. C'est un phénomène collectif.

5 Les rumeurs sont d'autant plus nombreuses et extravagantes que les informations objectives et officielles sur la situation sont plus réduites. L'absence totale d'informations après connaissance d'un événement-choc favorise le développement des rumeurs.

A l'intérieur d'un groupe humain, la propagation de la rumeur est en rapport direct avec l'importance et la nature du contenu de la rumeur pour l'existence des membres de ce groupe.

10 La rumeur se propage selon des « canaux informels » et souvent incontrôlables.

En se propageant de bouche à oreille, la rumeur se transforme selon des lois de simplification, amplification, orientation dans le sens des sentiments dominants du groupe.

15 Dans l'offensive anti-rumeurs, les effets de l'information vraie ne sont ni immédiats, ni certains. Ils sont inversement proportionnels à l'ampleur de la rumeur et au vécu de la population concernée par la rumeur. Environ la moitié des personnes sont suffisamment atteintes pour ne pas être rassurées par les premières informations officielles contredisant la rumeur.

20 Les rumeurs se développent selon l'une ou l'autre de ces trois directions principales :

- colère-agressivité : ce type de rumeur accuse des groupes intérieurs ou extérieurs, des personnes, et s'oriente facilement sur des boucs émissaires ;
- 25 - panique-anxiété : ce type de rumeur grossit l'événement et produit des fabulations diffusant et accroissant la peur ;
- joie-espérance : ce type de rumeur traduit l'espoir, le rêve de l'élimination du danger.

30 Dans l'ordre des fréquences, les rumeurs du premier genre sont les plus nombreuses et les plus faciles à déclencher, celles du deuxième genre viennent ensuite avec 25 %, celles du troisième genre sont les moins fréquentes, avec 2 % (un certain pourcentage résiduel concerne des rumeurs inclassables).

Maîtrise et information administrative, n°154, octobre 1982

DOCUMENT 3

Malgré les médias, le public continue à tirer une partie de son information du bouche à oreille. L'émergence des premiers, loin de supprimer la rumeur, l'a seulement rendue plus spécialisée : chacun a désormais son territoire de communication.

5 Malgré cela, on ne sait pas grand-chose sur les rumeurs. Rarement un phénomène social aussi important aura été aussi peu étudié : événement mystérieux, presque magique, la rumeur constitue encore un no man's land ou un Mato Grosso (1) du savoir.

10 Où commence et où s'arrête le phénomène appelé rumeur ? En quoi est-il
différent de ce que l'on appelle communément le bouche à oreille ? En fait, le
concept se dérobe quand on croit l'avoir cerné. Chacun croit savoir reconnaître une
rumeur quand il en rencontre une, mais personne n'arrive à en donner une définition
satisfaisante. En somme, si chacun a le sentiment très fort de l'existence des
15 rumeurs, aucun consensus n'existe pour délimiter avec précision où commence et où
fini le phénomène [...].

Jusqu'à ce jour, l'étude des rumeurs a été gouvernée par une conception
négative : la rumeur serait nécessairement fautive, fantaisiste ou irrationnelle. Aussi
a-t-on toujours déploré les rumeurs, traitées comme un égarement passager, une
parenthèse de folie. D'aucuns ont même vu en la montée des mass médias
20 l'occasion d'en finir avec les rumeurs : la télévision, la radio et la presse
supprimerait la raison d'être des rumeurs.

Nous avons montré que cette conception négative est intenable. D'une part,
elle a mené la compréhension des rumeurs à une impasse : la plupart des facettes
du phénomène restaient inexplicables et qualifiées de pathologiques. D'autre part,
25 cette conception semble surtout mue par un souci moralisateur et des partis pris
dogmatiques. En effet, il n'existe qu'une seule façon de prévenir les rumeurs : en
interdisant aux gens de parler. Le souci apparemment légitime de ne voir circuler que
des informations fiables mène droit au contrôle de l'information, puis à celui de la
parole : les médias deviendraient la seule source d'informations autorisée. Alors il
30 n'existerait plus que des informations officielles.

Nous sommes là au cœur de la raison d'être des rumeurs. La rumeur n'est
pas nécessairement « fautive » : en revanche, elle est nécessairement non officielle.
En marge et parfois en opposition, elle conteste la réalité officielle en proposant
d'autres réalités. C'est pourquoi les mass médias ne l'ont pas supprimée.

35 Pendant longtemps, on a cru que la rumeur était un ersatz (2) : faute de
médias fiables et contrôlés, il fallait bien trouver un média de substitution, un pis-
aller. La coexistence des mass médias et des rumeurs démontre l'inverse : celles-ci
sont un média complémentaire, celui d'une autre réalité. C'est logique : les mass
médias s'inscrivent toujours dans une logique de communication descendante, de
40 haut en bas, de ceux qui savent à ceux qui ne savent pas. Le public ne reçoit donc
que ce qu'on veut bien lui dire. La rumeur est une information parallèle, donc non
contrôlée.

Pour l'ingénieur, le technicien, le journaliste, cette absence de contrôle évoque
le spectre d'une défaillance sur l'autel de la fiabilité de l'information. Il faut donc la
45 supprimer. Pour l'homme politique, le citoyen, absence de contrôle signifie absence
de censure, la levée du secret et l'accès à une réalité cachée. Il faut donc la
préserver.

La conception négative associant rumeur et fausseté est d'ordre
technologique : il n'est de bonne communication que contrôlée. La rumeur oppose
50 une autre valeur : il n'est de bonne communication que libre, même si la fiabilité doit
en souffrir. En d'autres termes, les « fausses » rumeurs sont le prix à payer pour les
rumeurs fondées.

Jean-Noël KAPFERER, « Rumeurs, le plus vieux média du monde » Editions du Seuil, 1987

(1) Mato grosso : Etat riche du Brésil.

(2) Ersatz : produit de remplacement de moindre qualité

La décrue de la Somme devrait prendre au minimum plusieurs semaines, et certains habitants pourraient avoir les pieds dans l'eau jusqu'en juin compte tenu de la géologie particulière de cette vallée, selon l'avis de plusieurs spécialistes. A Abbeville, l'inondation provoque la détresse des habitants, pris en charge par une cellule de soutien psychologique, et continue de nourrir la rumeur sur l'origine de la catastrophe.

ABBEVILLE

de notre envoyé spécial

Dans les rues d'Abbeville où la Somme s'est installée durablement, la rumeur court comme l'eau vive. Rien ni personne ne l'arrêtera. Surtout pas le maire Joël Hart (RPR) désormais « *persuadé que la brutale montée des eaux ne s'explique qu'à 70 % par la pluviométrie exceptionnelle de cette année* ». Alors, d'où vient le reste ?

Ses administrés ont une réponse toute prête qu'ils ont placardée dans les quartiers les plus touchés par la crue : « *Pour préserver Paris, on nous a inondés* », peut-on lire ici et là. Malgré les démentis énergiques des experts et les commentaires ironiques des médias, la thèse du complot est inlassablement ressassée par les sinistrés de la vallée de la Somme. L'air entendu, ils évoquent encore aujourd'hui les ordres « *d'en haut* ».

« *C'est révélateur de l'état d'esprit de la région, explique Christian Pourquier, porte-parole départemental des Verts. Il y a dans les esprits une victimisation partiellement fondée car la Picardie connaît depuis longtemps un mal-développement* ». Ici, on s'estime mal aimé, méprisé, oublié. « *Heureusement que Jean-Pierre Pernaut a accepté de nous aider* », dit Joël Hart, obligé de faire jouer ses amitiés picardes dans les médias au début des inondations « *pour que les pouvoirs publics s'intéressent enfin à notre sort* ».

L'eau a commencé à monter le 27 mars, la rumeur aussi. Dès le 30 mars, au cours d'une réunion organisée à la préfecture, un maire s'est écrié : « *On parle, on parle et personne ne ferme le robinet* », accréditant ainsi l'idée que quelqu'un l'aurait ouvert. Ce jour-là, Daniel Cadoux, préfet de région, avait convoqué le ban et l'arrière-ban des spécialistes pour mieux informer les élus de la situation. Il reconnaît aujourd'hui son erreur : « *Nous avons déversé trop d'arguments rationnels sur une population et des élus qui étaient dans l'émotion* ».

« CES BRUITS RIDICULES »

Les rumeurs échappaient alors à tout contrôle. La plus insistante évoquait des déversements du canal du Nord dans la Somme. Dimanche 8 avril, le préfet tentait de l'endiguer en menaçant les élus de les poursuivre en diffamation s'ils colportaient « *ces bruits ridicules* ». La manière forte est restée aussi vaine que la pédagogie tentée une semaine plus tôt. Dès le lendemain, dans une lettre ouverte à Lionel Jospin, Maxime Gremetz déclarait : « *Ne faut-il pas examiner sérieusement pourquoi, vendredi dernier, j'ai constaté que dans la journée, la Somme recevait de l'eau du canal du Nord ? Comme tous les Picards je me pose des questions* ».

35 Pour de nombreux observateurs, la spontanéité et la persistance des rumeurs viendraient du caractère inédit de la catastrophe. « *L'opinion constate un phénomène qu'elle ne peut expliquer*, commente M. Cadoux. *Jamais la Somme n'était sortie aussi loin et aussi vite de son lit* ». « *C'est cette montée énigmatique qui fait s'interroger* », dit Jean Pilniak, délégué pour la Somme de Chasse, pêche, nature et tradition.

40 Les techniciens de la Direction départementale de l'équipement (DDE) ne cessent de répéter que les lâchers d'eau depuis le canal du Nord représentent un faible cubage et que cette eau irait de toute façon à la Somme. Incrédules, des riverains diligentent leur propre enquête. [...]

45 Président du Comité de défense des riverains de la Somme, André Boulogne n'est pas non plus à l'origine de la rumeur. Mais ce retraité du Trésor public n'hésite pas à la relayer pour obtenir « *des réponses rapides et précises* » sur les déversements du canal du Nord. « *Dans le but de protéger les voies sur berges à Paris, vous avez pris la liberté d'inonder la vallée de la Somme* », a-t-il écrit au directeur de la DDE, avant d'organiser une manifestation de un millier de personnes, 50 le 11 avril, dans les rues d'Amiens.

« UN SCHMILBLICK QUELQUE PART »

L'ancien contrôleur des impôts est formel, « *la pluie n'explique pas tout. Il y a une schmilblick quelque part* ». Une telle suspicion est largement partagée dans la rue 55 où l'on cite Tchernobyl, l'Erika, l'amiante, etc. Abondant dans ce sens, Gilles de Robien, maire UDF d'Amiens, a demandé une commission d'enquête. Et Joël Hart va créer une association pour « *faire toute la lumière sur les causes réelles des inondations* ».

60 Mercredi 11 avril, le maire d'Abbeville a fait constater par huissier que le déversoir d'Epenancourt, sur le canal du Nord, débitait dix mètres cubes à la seconde, soit, dit-il « *le contenu de 10 000 camions-citernes déversé chaque jour dans la Somme* ». Quant aux eaux qui proviendraient du bassin de la Seine, des experts en hydrographie lui ont promis des études gratuites. Mystérieux, il ajoute : « *Des spécialistes de la Mairie de Paris parleront bientôt* ».

65 A qui profite une rumeur aussi vivace ? Le préfet refuse de croire à son instrumentalisation politique. Néanmoins, avoue-t-il « *je me sens bien seul pour la démentir* »..

Jean-Jacques BOZONNET, « *La rumeur d'Abbeville* », avril 2001

DOCUMENT 5

Ce dessin illustre un article qui faisait état de fausses informations circulant sur Internet à la suite des attentats du 11 septembre 2001.

PESSIN,
Le Monde, 2 octobre 2001

2002-5



PROPOSITION DE CORRIGÉ

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

La rumeur emprunte le bouche à oreille, elle se répand en dehors de toute possibilité de contrôle et apparaît comme essentiellement néfaste. Elle véhicule le plus souvent de fausses informations (cf document 4). Elle cherche souvent à nuire (cf document 1). Elle se développe en même temps que l'angoisse, à laquelle elle se donne pour réponse (cf document 2).

Néfaste, il doit être possible, a-t-on pensé, de l'éradiquer. Il suffirait pour cela d'utiliser les moyens de communication modernes qui rendent le contrôle possible. Cependant ces médias propres à l'ère de la technologie n'y font rien (cf document 5). Le phénomène est donc à examiner dans toute sa complexité. On voit alors que les gens privilégient la rumeur, par méfiance des pouvoirs de contrôle (cf document 3). Dans ces conditions, quelle analyse du phénomène peut-on formuler ? Y-a-t-il dans cette analyse les moyens d'une prévention ? (cf document 2).

La rumeur se répand par le bouche à oreille. Aucun contrôle ne peut s'exercer sur les informations le plus souvent fausses qu'elle répand très vite. Personne ne peut l'arrêter, et les essais même d'y mettre un terme la renforcent. La rumeur d'Abbeville, on le voit, se développe à partir d'un soupçon, à partir d'allégations dénuées de prudence, qui sont reprises, déformées, amplifiées. Elle enfle, à la recherche d'une réponse qui doit bien exister, malgré tout, et être donnée à l'angoisse et au désespoir. C'est une sorte de thérapie sociale par le mal. Le mal devient vite le fait d'un bouc émissaire, et ce bouc émissaire est souvent le pouvoir, les hommes qui le représentent. Toute information qui vient s'inscrire raisonnablement en contre émanera donc de ces personnages auxquels la haine s'attache. Le procédé du bouc émissaire est à rapprocher de la calomnie que Beaumarchais dénonce. L'intention de nuire se dissimule sous la virulence même des accusations. L'absurdité du propos moqué par passion n'apparaît plus à ceux qui sont pris dans la rumeur et qui trouvent jusque dans la contradiction logique une expression plausible de la peur qui les étreint. La rumeur est essentiellement émotionnelle et décharge apparemment le sujet pensant de son devoir de réflexion.

Il faut en outre considérer que la façon dont la rumeur, en tant que phénomène, est pensée par le jugement qui la condamne, ne permet pas d'en dire la complexité. En effet, si le fait de la condamner annonçait son éradication, si, par le moyen des médias qui ne véhiculeraient que des informations contrôlées, on pouvait mettre un terme à ses ravages, elle ne renaîtrait pas sans cesse.

C'est qu'elle est ancrée dans la peur et la violence que la peur engendre. Si ceux qui doivent avoir le pouvoir d'écartier le mal en sont les agents, cela signifie que l'on se méfie, inconsciemment même, de toute information descendante, et que l'on est prêt à croire tout bruit qui se développe en dehors du contrôle des maîtres. Cela signifie que tout ce qui est marqué par le sceau de la raison est suspect et qu'il semble raisonnable d'accroître cette peur et cette haine dont on souffre.

Ainsi l'éradication de la rumeur est impossible. Elle est impossible en raison de la méfiance qu'entretient tout individu par rapport à un pouvoir qu'il suspecte de décider de ce qu'il doit savoir et ce qu'il ne doit pas savoir.

Si cette éradication est impossible, l'analyse du phénomène permet peut-être de le prévoir et d'en limiter les effets déplorables.

Il faut, dans ce sens, retenir que la rumeur est une réponse d'ordre magique lorsque le malheur qui frappe un groupe ne peut en recevoir d'autre ; qu'une fois lancée, aucun raisonnement ne peut la combattre et qu'elle se développe dans le sens des sentiments dominants du groupe.

Est-il raisonnable d'espérer ?

Espérer que le politique prenne ce sens que, dans un pays où l'intérêt général serait le souci vrai de chaque citoyen, la rumeur perde son terreau naturel qui est fait de haine, de soupçon, d'accusation. Il faudrait que les Hommes de ce pays se comprennent eux-mêmes comme devant naître à la citoyenneté. Majeurs, ils auraient appris à considérer toute proposition sans y apporter d'abord foi, ils se refuseraient à véhiculer des bruits, à désigner des boucs émissaires. Les dirigeants de ce pays seraient capables d'analyser, de construire une pédagogie pour éloigner le peuple de la rancœur et de la haine.

COMMENTAIRES DU JURY

1. De nombreux candidat(e)s ne savent pas faire le travail qui consiste à mettre à distance la représentation qui est la leur attachée au mot, à la notion proposée : ils ne peuvent donc pas construire la problématique.
2. Trop de copies montrent que leurs auteurs ne savent pas lire et discerner les oppositions entre les thèses.
3. Techniquement, beaucoup de candidat(e)s ne font pas de plan ou bien utilisent un plan « passe-partout ». Ils n'annoncent pas leur plan dans leur introduction.
4. L'orthographe et la syntaxe sont souvent relâchées.
5. Concernant ce sujet, en particulier, il fallait comprendre que le pour/contre n'avait aucun sens. Le texte de Kapferer était central mais ne « défendait » pas la rumeur. Il fallait comprendre que la condamnation de la rumeur au nom, plutôt au moyen de la maîtrise et de la clarté de l'information, interdisait une approche plus subtile du phénomène.

EPREUVE D'ANGLAIS

Durée : 2 heures

Coefficient : 1

L'usage de la calculatrice est interdit. L'usage d'un dictionnaire bilingue est autorisé.

SPECIALITES	COEFFICIENT
Biochimiste	2
Biotechnologie	1

CONDITION CRITICAL

An exclusive look at a U.N. assessment of Earth's ecosystems shows they are strained to the limit.

For more than 40 years, Earth has been sending out distress signals. At first they were subtle, like the thin shells of bald-eagle eggs that cracked because they were laced with DDT. Then the signs were unmistakable, like the pall of smoke over the Amazon rain forest, where farmers and ranchers set fires to clear land. Finally, as the new millennium drew near, it was obvious that Earth's pain had become humanity's pain. The collapse of the North Atlantic cod fishery put 30,000 Canadians out of work and ruined the economies of 700 communities. Two years ago, deforestation worsened China's floods, which killed 3,600 people and left 14 million homeless. Population pressures and overcrowding raised the toll from last year's rains in Latin America, which killed more than 30,000 people and created armies of environmental refugees.

And how have we responded to four decades of ever louder distress signals? We've staged a procession of Earth Days, formed Green parties, passed environmental laws, forged a few international treaties and organized global gabfests and photo ops like the 1992 Earth Summit in Rio de Janeiro. All the while, the decline of Earth's ecosystems has continued unabated.

What will it take for us to get serious about saving our environment? When will environmentalism move from being a philosophy promoted by a passionate minority to a way of life that governs mainstream behavior and policy? How can we understand that Earth is one big natural system and that torching tropical rain forests and destroying coral reefs will eventually threaten the well-being of towns and cities everywhere?

One crucial step is a true accounting of the state of the planet, a thorough assessment of the health of all Earth's major ecosystems, from oceans to forests. Only a comprehensive global survey can show how damage to one system is affecting other systems and can determine whether Earth as a whole is losing its ability to nurture the full diversity of life and the economies of nations.

That was the thinking behind the launching of the most ambitious study of global ecosystems ever undertaken: a Pilot Analysis of Global Ecosystems (PAGE). The findings of the \$4 million study will be published in the 2000-01 edition of the *World Resources Report* titled *People and Ecosystems: The Fraying Web of Life*. PAGE will also set the stage for a larger \$20 million Millennium Ecosystems Assessment, scheduled to begin next year. The goal is to answer the most important question of the century: What is happening to Earth's capacity to support nature and civilization?

Adapted from Eugene LINDEN, *TIME*, April-May 2000

- (1.5) cod : morue
 (1.12) gabfest : useless talking
 (1.12) op : operation

2002-7

QUESTIONS

I. Compréhension (10 points)

1. Proposez un compte-rendu, en français, du texte et mettez en évidence les idées essentielles. (environ 150 mots)
2. Traduisez, en français, le texte de la ligne 14 : « What will it take for us ... » à la ligne 18 : « ... towns and cities everywhere ? »

II. Expression en anglais (10 points)

Answer the following questions in English.

1. Say in your own words why the journalist writes that we are not « serious about saving our environment. » (100 mots, + ou - 10 %)
2. Give your opinion on the PAGE project and say what you personally do to help save the planet. (100 mots, + ou - 10 %)

PROPOSITION DE CORRIGE

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

1. Compréhension (10 points)

1.1. Compte-rendu

Une étude des Nations-Unies a montré que les écosystèmes planétaires étaient très fortement altérés. En effet, depuis un peu plus de quarante ans, certains signes de ceci sont visibles : l'effondrement de la pêche à la morue au Canada, en Chine, des inondations de plus en plus ravageuses, du fait de la déforestation ... Les réactions à travers le monde à ces effets furent simplement des rencontres (des sommets, des « Journées de la Terre ») mais cela n'a pas empêché le déclin des écosystèmes. Il faut prendre conscience du fait que la destruction de la nature peut nous menacer. De ce fait, une étude mondiale et complète, appelée « Pilot Analysis of Global Ecosystems » (PAGE) va être menée pour connaître les interactions entre les écosystèmes et savoir quelle est la capacité de la Terre à concilier nature et civilisation. Cette étude marque un pas dans la volonté de préserver la nature.

147 mots

1.2. Traduction

« Que faudra-t-il pour que nous prenions au sérieux la sauvegarde de notre environnement ? Quand l'écologie évoluera-t-elle d'une philosophie défendue par une minorité de passionnés à un mode de vie régissant le comportement et l'attitude générale du plus grand nombre ? Comment parvenir à comprendre que la Terre est une seule et vaste organisation naturelle et que mettre le feu aux forêts tropicales humides et détruire les massifs coralliens finira par menacer, partout, le bien-être des villes et des centres urbains ? »

2. Expression en anglais (10 points)

2.1. Le(la) candidat(e) devait s'appuyer sur les éléments suivants :

- For several decades, Earth has been sending out more and more obvious distress signals.
- What had been affecting nature and wildlife eventually affected people through climatic changes or economic crises.
- The only response has been political or symbolic – i.e., what is likely to get media attention.
- In the meantime, the situation of the ecosystems has worsened.
- And yet, people are unaware of the seriousness of the threat to our environment.
- Environmentalism is still but a philosophy instead of being the way of life of a majority of people.
- People still do not understand the Earth is one global ecosystem and that destroying one part of it might affect the planet as a whole.

2.2. Idéalement, le(la) candidat(e) donnera, brièvement, son opinion sur l'étude lancée par l'ONU, puis proposera alors ses solutions accompagnées d'exemples personnels.

SOUS-EPREUVE DE MATHÉMATIQUES
 Durée : 2 heures Coefficient : 2

SPECIALITÉS	COEFFICIENT
Biochimiste	1,5
Biotechnologie	1,5

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

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

Le formulaire de mathématiques est joint au sujet.

2 feuilles de papier millimétré par candidat.

EXERCICE 1 (11 points)

Les trois parties peuvent être traitées indépendamment l'une de l'autre.

Pour une étude cardio-vasculaire, on effectue une perfusion lente à débit constant d'une solution marquée par un indicateur radioactif.

PARTIE A : Etude expérimentale

On relève l'évolution de la concentration au niveau du ventricule droit et on obtient les résultats suivants :

i	1	2	3	4	5	6	7
t_i : temps en minutes	0	2	4	6	8	10	12
c_i : concentration en microgrammes par cm^3	0	54	84	100	109	114	117

Dans cette partie, les résultats seront arrondis au centième le plus proche.

- On pose $z_i = \ln(120 - c_i)$ (\ln désigne le logarithme népérien).
Donner les valeurs de z_i pour i variant de 1 à 7.
- Déterminer par la méthode des moindres carrés une équation de la droite de régression de z en t .
- Donner une expression de la concentration c en fonction de t déduite de cet ajustement.

PARTIE B : Résolution d'une équation différentielle

On admet que la fonction c est solution de l'équation différentielle (E) : $y' + 0,3y = 36$.

- Résoudre l'équation différentielle : $y' + 0,3y = 0$.
- Déterminer une solution constante de l'équation différentielle (E).
- En déduire les solutions de (E) et donner la fonction c solution qui vérifie $c(0) = 0$.

PARTIE C : Etude d'une fonction.

Soit la fonction f définie sur $[0 ; +\infty[$ par $f(t) = 120(1 - e^{-0,3t})$.

1. Chercher les variations de f sur $[0 ; +\infty[$.
2. Déterminer la limite de f en $+\infty$; que peut-on en déduire pour sa courbe représentative ?
3. Représenter graphiquement la fonction f dans un repère orthogonal (unités : 1,5 cm pour une unité en abscisse et 1mm pour une unité en ordonnée).
4. Calculer la valeur moyenne de f sur l'intervalle $[2 ; 12]$ et en donner une valeur approchée à une unité près.

EXERCICE 2 (9 points)

Un atelier produit en grande série des disques de diamètre nominal 25 mm.

PARTIE A

On désigne par X la variable aléatoire qui à chaque disque de la production, associe son diamètre en mm. On admet que X suit une loi normale de moyenne m et d'écart type σ . Un disque est considéré comme valable si son diamètre est compris entre 24,90 mm et 25,08 mm, sinon il est considéré comme défectueux.

1. On suppose que $\sigma = 0,04$. Calculer la probabilité qu'un disque pris au hasard dans la production soit défectueux, dans chacun des deux cas suivants :

1.a : $m = 25$

1.b : $m = 24,99$

2. On note \bar{X} la variable aléatoire qui, à chaque échantillon de 100 disques de la production, associe la moyenne des diamètres de ces 100 disques. On admet que \bar{X} suit la loi normale de moyenne m et d'écart type 0,004.

On prélève au hasard et avec remise un échantillon de 100 disques dans la production. On souhaite construire un test bilatéral de validité d'hypothèse, pour savoir si l'on peut considérer, au risque de 5%, que la moyenne m des diamètres des disques de la production est égale à 25.

- 2.a Sous l'hypothèse nulle H_0 ($m = 25$), calculer la valeur du réel d tel que :
 $P(|\bar{X} - 25| < d) = 0,95$.

- 2.b La moyenne des diamètres des 100 disques de l'échantillon prélevé dans la production est 24,994. Quelle est la conclusion du test ?

PARTIE B

On suppose que 3% des disques de la production sont défectueux. On prélève au hasard un lot de 60 disques dans la production ; la production étant très importante, ce prélèvement peut être assimilé à un tirage avec remise.

On désigne par Y la variable aléatoire qui, à chaque lot de 60 disques, associe le nombre de disques défectueux.

1. 1.a Quelle est la loi suivie par Y ? Donner ses paramètres.
- 1.b Calculer la probabilité qu'un lot de 60 disques contienne au moins deux disques défectueux (arrondir au millième le plus proche).
2. On admet que la loi de Y peut être approchée par une loi de Poisson.
 - 2.a Donner le paramètre de cette loi de Poisson.
 - 2.b En utilisant cette loi de Poisson, calculer la probabilité qu'un lot de 60 disques contienne au moins deux disques défectueux (arrondir au millième le plus proche).

PROPOSITION DE CORRIGE

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

Exercice I : 11 points Partie A : Etude expérimentale

1.

t_i : temps en minutes	0	2	4	6	8	10	12
$z_i = \ln(120 - c_i)$	4,79	4,19	3,58	3,00	2,40	1,79	1,10

2. A la calculatrice : $z = -0,30 t + 4,81$
3. On déduit que $c(t) \approx 120 - 122,73 e^{-0,3t}$

Partie B : Résolution d'une équation différentielle

c est solution de l'équation différentielle (E) : $y' + 0,3 y = 36$

1. Solution de $y' + 0,3 y = 0$ $y = K e^{-0,3t}$
2. Solution constante de $y' + 0,3 y = 36$ $y = A$, alors $y' = 0$
D'où : $0,3 A = 36$ et $A = 120$
3. Solution générale de (E) : $y = K e^{-0,3t} + 120$
Solution de (E) vérifiant la condition initiale $c(0) = 0$: $c(t) = 120 (1 - e^{-0,3t})$

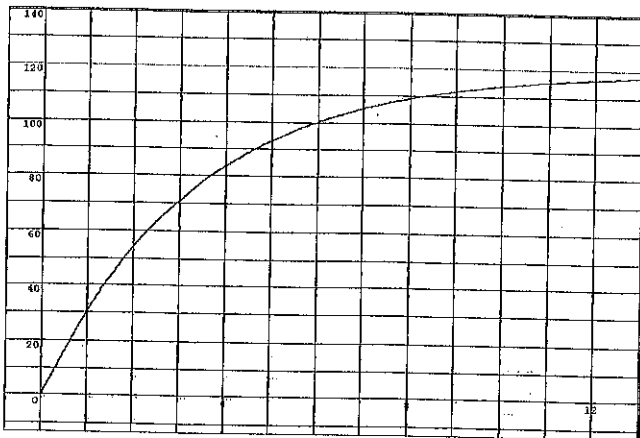
Partie C : Etude d'une fonction

Soit la fonction f définie sur $[0; +\infty[$ par $f(t) = 120 (1 - e^{-0,3t})$

1. $f'(t) = 36 e^{-0,3t}$ $f'(t) > 0$ donc f est strictement croissante sur $[0; +\infty[$
2. $\lim_{t \rightarrow +\infty} (-0,3t) = -\infty$ d'où $\lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-0,3t} = 0$ et $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 120$.

La courbe représentative de f admet une asymptote horizontale d'équation $y = 120$ en $+\infty$

3. Représentation graphique (échelle non respectée)



4. La valeur moyenne M de f est donné par :

$$M = \frac{1}{10} \int_2^{12} f(t) dt$$

Une primitive de $f(t)$ est : $120t + 400e^{-0,3t}$.

On en déduit que $M \approx 99$

Remarque : cette question, hors programme a été comptée en bonus pour les candidats l'ayant traité correctement.

Exercice 2 : 9 points

Partie A

Rappel : X suit une loi normale de moyenne m et d'écart-type σ alors $T = \frac{X - m}{\sigma}$ suit la loi normale centrée réduite $N(0 ; 1)$

1. On suppose $\sigma = 0,04$

On cherche la probabilité qu'un disque soit défectueux c'est à dire $1 - P(24,9 \leq X \leq 25,08)$ dans les cas suivants :

a. $m = 25$

$$\begin{aligned} \text{On a alors } P_1 &= 1 - P(-2,5 \leq T \leq 2) \\ &= 1 - (\pi(2) - \pi(2,5)) \\ &\approx 0,029 \end{aligned}$$

b. $m = 24,99$

On a alors

$$\begin{aligned} P_2 &= 1 - P(-2,25 \leq T \leq 2,25) \\ &= 1 - (2 \pi(2,25) - 1) \\ &\approx 0,0244 \end{aligned}$$

2. Soit \bar{X} la variable aléatoire, qui à chaque échantillon de 100 disques de la production associe la moyenne des diamètres de ces 100 disques. On admet que \bar{X} suit la loi normale de moyenne m et d'écart type $0,004$.

a. Hypothèse nulle H_0 ($m = 25$)

on cherche d tel que $P(25 - d \leq \bar{X} \leq 25 + d) = 0,95$

$$\text{On a alors } P\left(-\frac{d}{\sigma} \leq T \leq \frac{d}{\sigma}\right) = 0,95$$

$$\text{soit } 2\pi\left(\frac{d}{0,004}\right) - 1 = 0,95.$$

$$\text{D'où } d \approx 0,0078$$

b. On obtient d'après ce qui précède l'intervalle $[24,992 ; 25,008]$

Au risque de 5%, la moyenne de 25 mm est donc acceptée.

Partie B

On suppose que la probabilité qu'un disque soit défectueux est égale à 0,03.

A chaque lot, soit Y la variable aléatoire à qui on associe le nombre de disques défectueux.

1. A chaque prélèvement, deux issues possibles : disque défectueux avec une probabilité de 0,03 ou disque non défectueux avec une probabilité de 0,97.

Chaque prélèvement est indépendant des autres

On recommence 60 fois la même opération dans les mêmes conditions.

alors Y suit une loi binomiale de paramètres 60 et 0,03

et $P(Y = k) = C_{60}^k 0,03^k 0,97^{60-k}$ avec $0 \leq k \leq 60$

D'où $P(Y \geq 2) = 1 - (P(Y = 0) + P(Y = 1))$

$$\approx 0,541$$

2. On approche Y par une loi de Poisson

a. $\lambda = 60 \times 0,03$

$$= 1,8$$

b. $P(Y \geq 2) = 1 - (0,1652 + 0,2975)$

$$\approx 0,537$$

SOUS-EPREUVE : SCIENCES PHYSIQUES

Durée : 2 heures

Coefficient : 2,5

Rappel : La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.
Seul l'usage d'une calculatrice électronique, autonome, non imprimante, à entrée unique par clavier, est autorisé pour cette épreuve.

Les trois exercices sont indépendants.
Cet énoncé est composé de quatre pages

I) Conductimétrie - Composés peu solubles (15 points)

Afin de déterminer le produit de solubilité de l'hydroxyde de cadmium ($\text{Cd}(\text{OH})_2$), on mesure, à 25°C , la conductivité d'une solution saturée de ce sel.

On trouve $\sigma = 630 \mu\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$.

- 1) On rappelle que la conductivité d'une solution a pour expression $\sigma = \sum_i |z_i| \cdot \Lambda_i^0 \cdot C_i$. Donner la signification de chaque terme, préciser les unités dans le système international.
- 2) Le pH de l'eau pure étant égal à 7, calculer la conductivité de l'eau pure. Comparer le résultat obtenu à la conductivité de la solution saturée d'hydroxyde de cadmium. Conclure.
- 3) Exprimer la concentration des ions présents dans la solution saturée d'hydroxyde de cadmium en fonction de la solubilité s de l'hydroxyde de cadmium.
- 4) Exprimer la conductivité de la solution en fonction de s . En déduire une valeur expérimentale de s (en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
- 5) Donner l'expression du produit de solubilité de l'hydroxyde de cadmium en fonction de s . Calculer numériquement cette constante.

Données :

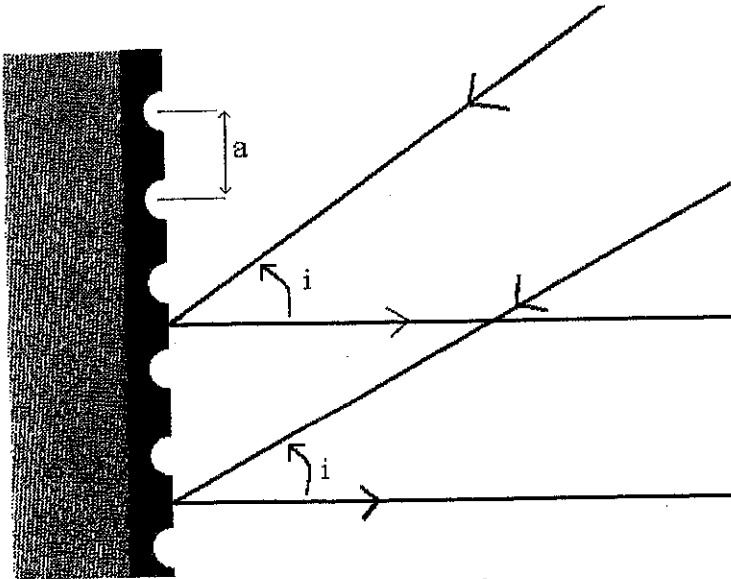
$$\Lambda_{\text{Cd}^{2+}}^0 = 5,4 \cdot 10^{-3} \text{ S.I.}; \quad \Lambda_{\text{H}_3\text{O}^+}^0 = 35,0 \cdot 10^{-3} \text{ S.I.}; \quad \Lambda_{\text{OH}^-}^0 = 19,9 \cdot 10^{-3} \text{ S.I.}$$

Masses atomiques molaires $M_{\text{H}} = 1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 $M_{\text{O}} = 16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 $M_{\text{Cd}} = 112 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

II) Spectrophotométrie (17 points)

1. Le principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre peut être schématisé comme indiqué sur le document 1 de l'annexe.
 - 1.1) Compléter le schéma en indiquant la fonction ou le nom de chacune des parties constituant l'appareil.
 - 1.2) Une lampe à vapeur de mercure conviendrait-elle pour équiper cet appareil ?
 - 1.3) Etude du réseau :

On observe des maxima principaux d'absorption tels que pour l'ordre 1 et de longueur d'onde de 600 nm , le pinceau diffracté est normal au plan du réseau. (Voir document 2). Dans ces conditions, calculer, pour cette longueur d'onde, l'angle d'incidence i (tel que $a \cdot \sin i = k \cdot \lambda$), sachant que le réseau comporte $1,2 \cdot 10^6$ traits par mètre.



Document 2

2. Application analytique

- 2.1) Définir la transmittance T et l'absorbance A d'une solution.
- 2.2) Énoncer la relation de Beer-Lambert, en précisant la signification de chaque terme ainsi que les unités dans le système international.
- 2.3) Une étude préliminaire a montré que la longueur d'onde correspondant à un maximum d'absorption pour une solution aqueuse de permanganate de potassium est $\lambda = 525 \text{ nm}$. A cette longueur d'onde, on mesure l'absorbance d'une gamme obtenue par dilutions successives d'une solution mère de permanganate de potassium avec une cuve de longueur utile égale à 1 cm . Les résultats obtenus ont permis de tracer le graphe en annexe (document 3).

- 2.3.1) Pourquoi la précision de la mesure de A est-elle optimum à cette longueur d'onde ?
- 2.3.2) Calculer, à partir du graphe, une valeur expérimentale du coefficient d'extinction linéique molaire du permanganate de potassium à la longueur d'onde sélectionnée.
- 2.3.3) Dans les mêmes conditions, une solution de permanganate de potassium de concentration inconnue présente une absorbance de 0,774. Calculer la valeur de sa concentration.

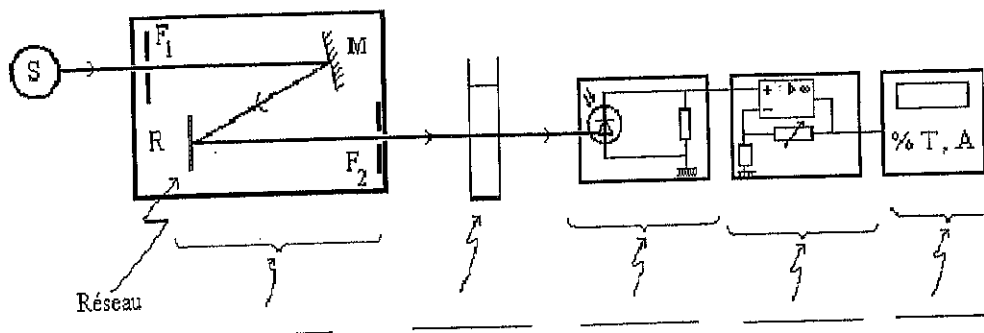
III) Chimie Organique (18 points)

Au cours de la réaction de chloration du propane, en présence d'une irradiation ultraviolette, le 2-chloropropane est obtenu.

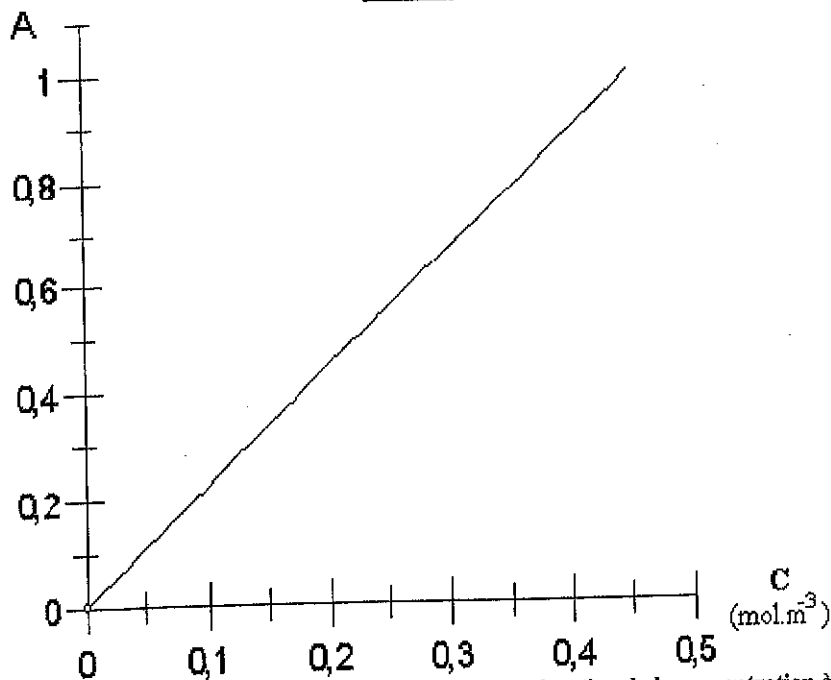
- 1) Donner la formule semi-développée du 2-chloropropane.
Quel est l'autre composé monochloré obtenu au cours de la même réaction ?
Donner son nom et sa formule semi-développée.
- 2) En traitant du 2-chloropropane avec un excès de benzène en présence de chlorure d'aluminium (Al Cl_3), on obtient un composé aromatique A. Donner sa formule semi-développée.
- 3) L'acide éthanoïque est traité par du chlorure de thionyle (SOCl_2) pour donner le composé B. Donner la formule semi-développée du composé B.
- 4) La réaction entre A et B, en présence de chlorure d'aluminium, donne deux composés C et C' (où C est le composé qui présente le moins d'encombrement stérique).
- 4.1) Donner les formules semi-développées des composés C et C'.
- 4.2) De quel type de réaction s'agit-il ? Donner son nom. Quel est le rôle du chlorure d'aluminium ?
- 5) La molécule C réagit avec l'éthylamine pour donner un composé D de formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}$, qui, à son tour, donne un composé E par hydrogénation catalytique. E a pour formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}$.
- 5.1) Donner les formules semi-développées des composés D et E.
- 5.2) Citer deux catalyseurs d'hydrogénation.
- 6) Le composé E est-il optiquement actif ? Justifier.
Dans l'affirmative, représenter l'énantiomère S en représentation perspective.

DOCUMENT A JOINDRE A LA COPIE

Document 1 (à compléter)



Document 3



Variation de l'absorbance de l'ion permanganate en fonction de la concentration à la longueur d'onde $\lambda = 525 \text{ nm}$

PROPOSITION DE CORRIGE

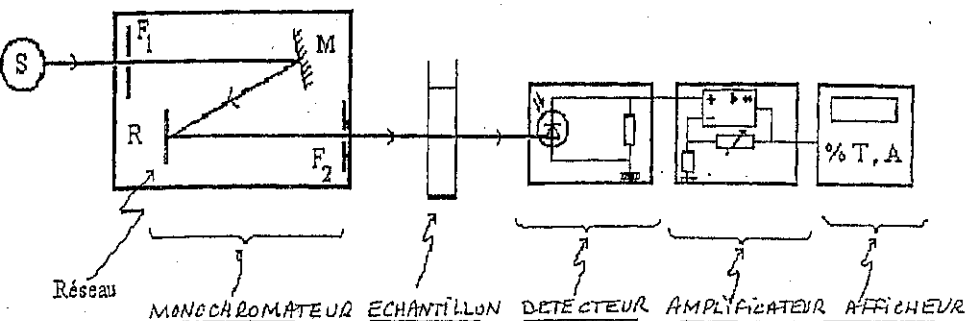
Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

I. CONDUCTIMETRIE

- σ : conductivité en $S.m^{-1}$
 $|Z_i|$: valeur absolue de la charge de l'ion i
 Λ_i° : conductivité molaire équivalente de l'ion i en $S.m^2.mol^{-1}$
 C_i : concentration molaire de l'ion i en $mol.m^{-3}$
- Eau pure $pH = 7$ $[H_3O^+] = [OH^-] = 10^{-7} mol.L^{-1}$
 σ eau pure = $|+1| . \Lambda^\circ H_3O^+ . [H_3O^+] + |-1| . \Lambda^\circ OH^- . [OH^-] = 5,49 \mu S.m^{-1}$
 σ eau pure $\ll \sigma$ solution $Cd(OH)_2$ saturée
- $Cd(OH)_2 \rightleftharpoons Cd^{2+} + 2 OH^-$ $[Cd^{2+}] = s$ $[OH^-] = 2s$
- $\sigma = 2 . \Lambda^\circ Cd^{2+} . s + |-1| . \Lambda^\circ OH^- . 2s = 2s . (\Lambda^\circ Cd^{2+} + \Lambda^\circ OH^-)$
 $s = 1,24 . 10^{-2} mol.m^{-3} = 1,24 . 10^{-5} mol.L^{-1} = 1,81 . 10^{-3} g.L^{-1}$
- $K_s = [Cd^{2+}] . [OH^-]^2 = 4 s^3 = 7,6 . 10^{-15}$

II. SPECTROPHOTOMETRIE

1.1. Document 1 complété :



1.2. Non, il faut une source à spectre continu.

1.3. Ordre 1. $a = 8,33 . 10^{-7} m$ $\sin i = 0,72$ $i = 46^\circ$

2.1. $T = \Phi / \Phi_0$ où Φ = flux lumineux transmis et Φ_0 = flux lumineux incident

$$A = \log(1/T)$$

2.2. $A = \epsilon l c$ l = longueur de la cuve en m

c = concentration molaire de la solution ($mol.m^{-3}$)

ϵ = absorbance linéique molaire ($mol^{-1}.m^2$)

A : sans unité

2.3.1. Au maximum d'absorbance, la précision est maximale, $\Delta A/A$ est minimum, $\Delta A/\Delta \lambda \approx 0$, A est peu sensible à λ .

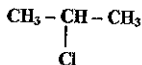
2.3.2. $\epsilon l = 2,2 mol^{-1}.m^3$ donc $\epsilon = 220 mol^{-1}.m^2$

2.3.3. $c = A/\epsilon l = 0,35 mol.m^{-3}$

III. CHIMIE ORGANIQUE

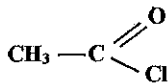
1.

Autre composé : 1-chloropropane $Cl - CH_2 - CH_2 - CH_3$



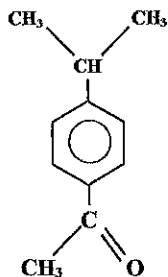
2.

3. Composé B

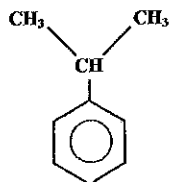


4.1.

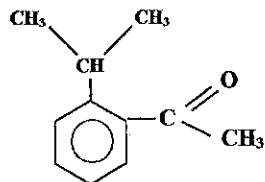
Composé C



Composé A



Composé C'



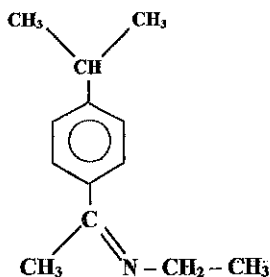
4.2. Réaction d'acylation de Friedel et Craft.

Le rôle du chlorure d'aluminium est de créer l'ion acylium.

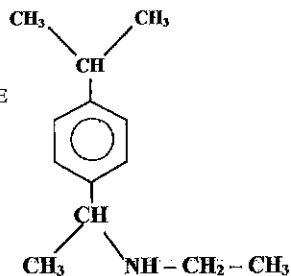


5.1.

Composé D

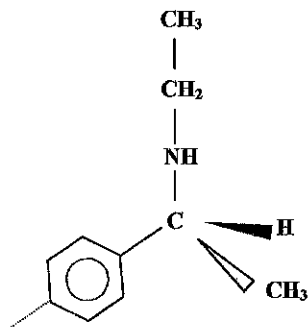


Composé E



5.2. Palladium, nickel de Raney, platine.

6. E est optiquement actif car il possède un carbone asymétrique.



**EPREUVE DE SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES
ET GENIE BIOLOGIQUE**

Durée : 4 heures

Coefficient : 6

Calculatrices non autorisées.

L'AMIDON ET SA TRANSFORMATION

L'amidon est la principale forme de réserve carbonée chez les végétaux. Il peut être extrait en grandes quantités des céréales (blé, maïs, riz en particulier) ou d'autres plantes cultivées comme la pomme de terre.

Ce composé est très utilisé dans l'industrie agro-alimentaire en tant que matière première et comme épaississant et agent texturant. En effet, sous l'action de diverses enzymes (α -amylase par exemple), il génère des molécules entrant en jeu dans la fabrication de la bière à basses calories (sans dextrines), des farines précuites pour enfants et des sirops sucrés comme le sirop de glucose ou de maltose.

En France, de nombreux micro-organismes (bactéries, levures) sont utilisés pour produire industriellement de l' α -amylase, dont *Bacillus subtilis* qui produit cette enzyme sur un milieu contenant des pelures de pommes de terre.

I. Structure, métabolisme et bioconversion de l'amidon (30 points)

- 1.1. Représenter la structure de l'amidon en décrivant l'ose qui le constitue et les différentes liaisons osidiques présentes.
- 1.2. S'agissant d'un polysaccharide de réserve, expliquer quelles sont les relations entre la structure et la fonction de cette molécule.
- 1.3. Les α -amylases sont des endoglucanases très largement répandues chez les animaux, les plantes, les bactéries et les champignons. Elles catalysent la dépolymérisation de l'amidon et des poly- ou oligo-saccharides apparentés, par hydrolyse sélective des liaisons α -1,4 glycosidiques. Leur numéro d'ordre est E.C. 3.2.1.1. Rappeler la signification des initiales " E.C. " ainsi que du chiffre " 3 " dans le numéro d'ordre.
- 1.4. L'hydrolyse de l'amidon produit entre autres molécules du maltose ou D glucopyranosyl α (1 \rightarrow 4) D glucopyranose. Ecrire sa formule développée.
- 1.5. Le maltose est lui-même hydrolysé en oses simples. Ecrire l'équation de cette réaction en précisant le nom des oses libérés ainsi que le nom de l'enzyme responsable de cette hydrolyse.
- 1.6. L'hydrolyse totale de l'amidon produit du sirop de glucose. Le glucose peut être converti en fructose par la glucose isomérase immobilisée par co-réticulation avec de la gélatine.
 - 1.6.1. Indiquer l'intérêt de produire du glucose à partir de l'amidon.
 - 1.6.2. L'isomérisation du glucose est une bioconversion. Définir une bioconversion et donner son intérêt dans ce cas précis.
 - 1.6.3. Exposer un autre exemple de bioconversion industrielle.
 - 1.6.4. Rappeler le principe de l'immobilisation par co-réticulation.
 - 1.6.5. Quel est l'avantage de la co-réticulation par rapport à la réticulation simple de l'enzyme ?
 - 1.6.6. Cette bioconversion aboutit à un équilibre où sont en présence 58 % de glucose et 42 % de fructose. Que proposeriez-vous pour améliorer ce rendement ?

2. Clonage du gène de l' α -amylase dans des bactéries et des levures (44 points)

- 2.1. Le gène de l' α -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* a été cloné dans un plasmide porteur de la résistance à l'érythromycine et introduit dans *Lactobacillus plantarum*.
 - 2.1.1. Définir un plasmide.
 - 2.1.2. Décrire les trois conformations possibles d'un plasmide.
 - 2.1.3. Préciser les autres vecteurs classiquement employés en génie génétique.
- 2.2. Des enzymes de restriction sont utilisées pour cloner un insert tel que le gène de l' α -amylase dans un plasmide.
 - 2.2.1. Définir une enzyme de restriction.
 - 2.2.2. Quelles sont les particularités des sites reconnus par les enzymes de restriction ?
 - 2.2.3. Dans un tableau, indiquer le principe, les contraintes techniques et les avantages d'un clonage non directionnel et d'un clonage directionnel avec des sites cohésifs dans les deux cas.
- 2.3. Citer deux techniques d'introduction d'un plasmide dans une bactérie et en expliquer le principe.
- 2.4. Indiquer le milieu de sélection à utiliser pour ne sélectionner que les bactéries ayant été transformées avec le plasmide recombinant exprimant l'insert α -amylase.
- 2.5. L' α -amylase peut être également produite chez une levure. Ainsi, l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) codant pour l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* a été placé sous le contrôle d'un promoteur fort, puis introduit au sein du locus des ADN ribosomiques de la levure de boulanger.
 - 2.5.1. A l'aide de schémas, représenter une technique permettant la fabrication d'un ADNc.
 - 2.5.2. Quel est l'intérêt d'introduire un ADNc dans un locus ribosomique ?
 - 2.5.3. Pourquoi les levures sont-elles parfois préférées, comme cellules hôtes, aux bactéries ?
 - 2.5.4. Schématiser, en mettant en évidence les organites impliqués, le parcours d'une glycoprotéine sécrétée, depuis sa traduction jusqu'à sa sécrétion, dans une cellule eucaryote.

3. Production de l' α -amylase en fermenteur (46 points)

- 3.1. Les souches utilisées pour cette production sont toutes chimio-organotrophes.
 - 3.1.1. Définir le terme de chimio-organotrophe.
 - 3.1.2. Exposer les autres types trophiques énergétiques.
 - 3.1.3. Présenter sous forme d'un tableau les principaux composants d'un milieu de culture pour ce type de microorganisme, à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle. Quels sont les avantages et les contraintes liés aux milieux utilisés à l'échelle industrielle ?
 - 3.1.4. Dans le cas particulier de la production d'amylase, quel composant important doit être présent dans le milieu de culture ? Justifier.

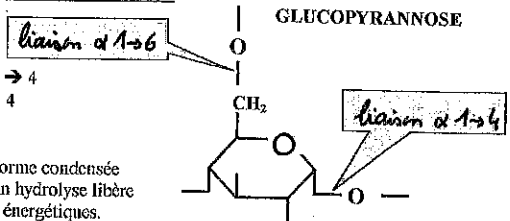
- 3.2. Citer un autre micro-organisme producteur d'amylase.
- 3.3. Toute production par fermentation nécessite la sélection d'une souche, l'optimisation et le choix d'un procédé.
- 3.3.1. Citer les critères retenus pour choisir une souche "bonne productrice" d'enzymes.
- 3.3.2. Définir l'optimisation de la production et citer les différentes méthodes de régulation et de modélisation utilisées pour optimiser un procédé.
- 3.3.3. Le procédé choisi est un procédé continu de type chemostat.
- 3.3.3.1. Schématiser l'appareillage.
- 3.3.3.2. Expliquer précisément le mécanisme de fonctionnement.
- 3.3.3.3. Définir le taux de dilution d'une culture continue. Donner un exemple.
- 3.4. L' α -amylase peut être détectée par une technique ELISA :
- 3.4.1. Décrire, à l'aide de schémas, la structure des différentes immunoglobulines.
- 3.4.2. Donner le principe général des méthodes de dosages immunoenzymatiques.
- 3.4.3. Proposer un protocole de détection de l' α -amylase dans un moût de fermentation par une technique ELISA.

PROPOSITION DE CORRIGE

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

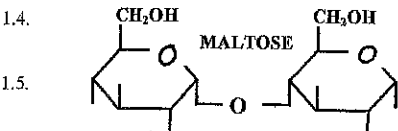
1.1. L'amidon comprend 2 molécules :

- l'amyllose, polymère linéaire de glucose en $\alpha 1 \rightarrow 4$
- l'amylpectine, polymère de glucose en $\alpha 1 \rightarrow 4$ présentant des branchements en $\alpha 1 \rightarrow 6$



1.2. L'amidon est une molécule de réserve, il est donc sous forme condensée dans la cellule afin de limiter la pression osmotique. Son hydrolyse libère du glucose (ou un ester de glucose) utilisable à des fins énergétiques.

1.3. Les initiales « E.C. » signifient « **enzyme commission** », 3 définit la **classe** d'enzymes, ici, les hydrolases.



1.6.1. Le procédé (hydrolyse à chaud en milieu acide) est simple et d'un coût limité, l'amidon est un substrat produit en grande quantité par l'agriculture, il n'est pas fermentescible donc il est intéressant de le valoriser autrement que par fermentation alimentaire.

1.6.2. Une bioconversion est une transformation stéréospécifique d'un substrat par un système biologique. L'intérêt d'une bioconversion pouvait être compris selon deux aspects :

- il est intéressant de produire du fructose : c'est un ose plus sucrant que le glucose, il est moins cariogène et cristallise moins facilement
- la bioconversion est un procédé intéressant pour produire du fructose : car la voie enzymatique est plus facile que la voie chimique, et l'extraction du fructose à partir des fruits ou du miel est très difficile

1.6.3. La production des hormones stéroïdes utilisées pour la préparation des pilules contraceptives : la solution de substrat d'origine animale ou végétale est ajoutée dans un milieu de culture en présence de bactéries (*Streptomyces, Bacillus, Arthrobacter, Mycobacterium*) ou de moisissures (*Aspergillus, Fusarium, Rhizopus*).

Des acides aminés de la série L (Ala, Met, Phe, Trp, Val) sont produits par résolution des mélanges racémiques obtenus par synthèse chimique, en raison de la solubilité différente des isomères : les enzymes qui interviennent appartiennent à des bactéries (*Achromobacter, Bacillus, Pseudomonas*), des levures (*Cryptococcus, Rhodotorula*) ou des moisissures (*Aspergillus*). L'acide ascorbique (vitamine C) est obtenu après plusieurs étapes : réduction chimique du glucose en sorbitol par hydrogénation, oxydation bactérienne du sorbitol en sorbose par *Acetobacter*, acétylation, puis oxydation chimique du sorbose. Production des antibiotiques semi-synthétiques : de très nombreux exemples, les plus connus étant l'obtention des pénicillines et des céphalosporines par des moisissures ou des bactéries à partir de l'acide 6 amino-pénicillique (6-APA). D'autres procédés permettent d'obtenir des prostaglandines, de la dihydroxyacétone, de l'acide malique, des médicaments antiparasitaires.

1.6.4. Il y a création de liaisons covalentes entre la gélatine et la glucose isomérase en présence d'un agent bifonctionnel permettant la réticulation. Cet agent est appelé « agent de pontage ».

1.6.5. La réticulation simple est obtenue par le mélange direct de l'enzyme à immobiliser avec l'agent pontant, ce qui crée des pontages entre les molécules et induit donc des contraintes stériques très fortes et il y a perte importante de l'activité.

1.6.6. Il faudrait déplacer l'équilibre en faisant disparaître le fructose ! Le procédé le plus simple est de faire recirculer le milieu réactionnel dans la colonne où se trouve l'enzyme immobilisée.

2.1.1. C'est une molécule d'ADN circulaire bicaténaire, de 1,5 à 3,5 kb, capable de s'autorépliquer.

2.1.2. Forme surenroulée (« twistée ») : pas de coupure. Forme relâchée : coupure d'un brin. Forme linéaire : coupure des 2 brins.

2.1.3. Virus infectant des bactéries (phages) ou des cellules eucaryotes, cosmides (vecteurs hybrides : plasmides comportant la séquence cos du phage λ , ce qui permet leur encapsidation dans des virions de λ), YAC (yeast artificial chromosomes) ...

2.2.1. C'est une endonucléase clivant l'ADN double brin et reconnaissant un site spécifique.

2.2.2. Les sites reconnus sont de 4 à 6 nucléotides, ils sont palindromiques ou possèdent un axe de symétrie.
 Pour les enzymes de type II : les sites sont parfois dégénérés, le site de coupure peut être différent du site de reconnaissance
 Pour les enzymes de type I et III : les sites sont parfois asymétriques, ou d'une longueur différente.

2.2.3.

	PRINCIPE	CONTRAINTES	AVANTAGES
CLONAGE DIRECTIONNEL	2 sites de restriction différents aux extrémités de l'insert et du vecteur	Purification de l'insert et du vecteur après la double digestion	Insertion orientée de l'insert (transcription dirigée) permettant l'expression, donc un nombre élevé de clones intéressants.
CLONAGE NON DIRECTIONNEL	Même site de restriction différents aux extrémités de l'insert et du vecteur	Traitement des extrémités du vecteur par une phosphatase pour limiter la religature du vecteur sur lui-même	2 sens possibles d'orientation de l'insert dans le vecteur (expression génétique non dirigée). Quantité de clones exprimant le gène plus faible. Forte probabilité de formation de concatémères d'insert dans le vecteur.

2.3. **Transformation bactérienne** : acquisition de la compétence par traitement au CaCl_2 (déstabilisation de la membrane plasmique par Ca^{++} et refroidissement de la membrane à 0°C) puis choc thermique provoquant la fracture de la membrane.

Electroporation : décharge électrique à haute tension provoquant l'apparition de nanopores dans la membrane.

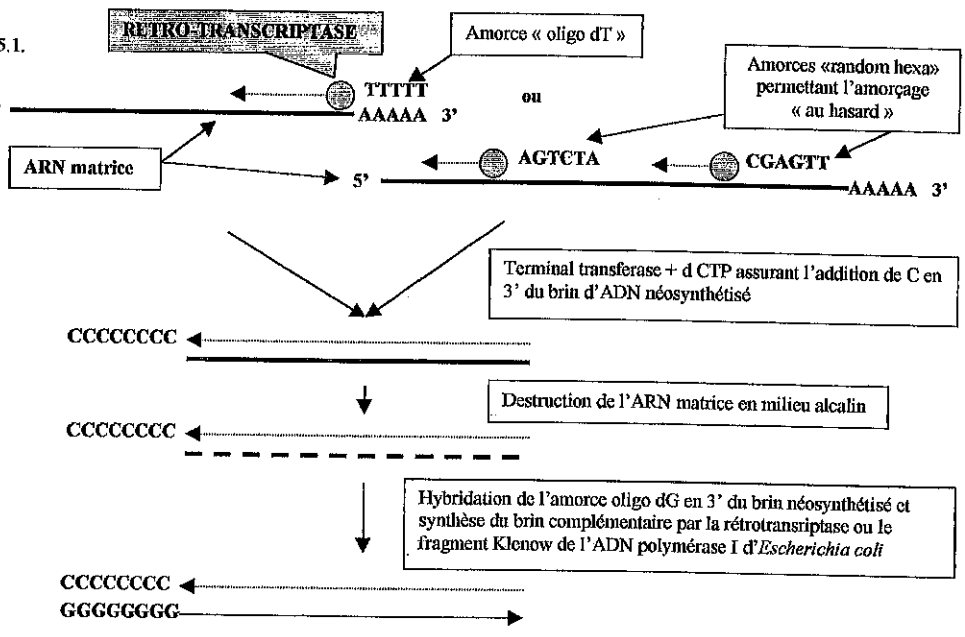
Biolistique : projection à très grande vitesse de particules métalliques (or, tungstène) sur lesquelles sont adsorbées les molécules d'ADN.

Transformation des bactéries Gram⁺ : elles sont « naturellement » compétentes.

2.4. Le milieu doit permettre :

- La sélection des clones transformés par le vecteur, donc il contient de l'érythromycine puisque le vecteur comporte un gène de résistance à cet antibiotique,
- Le criblage des clones transformés, grâce à la révélation de l'activité amylase directement sur le milieu en vérifiant par l'iode la présence ou non d'amidon résiduel dans le milieu après incubation.

2.5.1.

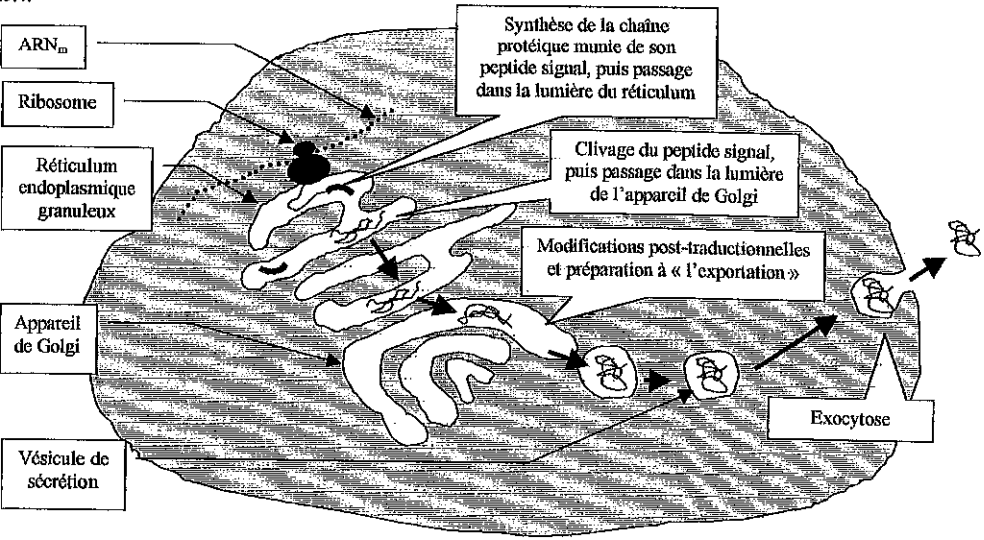


Remarque : d'autres méthodes pouvaient être citées (translation de brèche, amorçage spécifique, RT-PCR non spécifique ...)

2.5.2. Les locus ribosomiques ont un très fort taux d'expression, l'ADN, introduit sera donc exprimé activement.

2.5.3. Les levures sont des cellules eucaryotes, elles assurent donc les modifications post-traductionnelles. De plus, leur faible pathogénéicité les rend intéressantes pour une production à destination alimentaire.

2.5.4.



3.1.1. Une souche chimio-organotrophe dégrade un substrat organique réduit par des réactions d'oxydo-réduction pour produire de l'énergie.

3.1.2. Chimio-lithotrophes : elles dégradent un substrat minéral réduit par des réactions d'oxydo-réduction pour produire de l'énergie.

Les phototrophes exploitent l'énergie tirée de la photosynthèse, à partir de donneurs d'électrons et d'ions H^+ de nature minérale (photo-lithotrophes) ou organique (photo-organotrophes).

3.1.3.

COMPOSANTS	MILIEU UTILISE AU LABORATOIRE	MILIEU INDUSTRIEL
Source de C	Glucides simples, diholosides, dextrans	Sous-produits des industries agro-alimentaires (corn steep, dextrans, farine de soya ...)
Source de N	Peptones, hydrolysats de protéines d'origine végétale ou animale	Urée; sels d'ammonium, protéines d'origine végétale ou animale contenues dans les sous-produits des industries agro-alimentaires
Ions minéraux (NaCl, SO_4^{2-} , ...)	Sels purs	Sels purs, en complément des ions déjà présents dans les autres constituants
Système tampon	KH_2PO_4/K_2HPO_4	Assuré par les constituants des milieux
Oligonutriments	Addition éventuelle de vitamines (apport assuré par l'extrait de levure), d'ions minéraux particuliers	Extrait de levure, corn steep, pas de supplémentation des milieux par addition de vitamines (coût trop élevé)

Avantages : les constituants des milieux de culture industriels sont souvent des sous-produits des industries agro-alimentaires, ce qui permet de les valoriser ou d'éviter la pollution de l'environnement, leur coût est de plus limité.

Inconvénients : on recherche, en production industrielle, des procédés simples, reproductibles et productifs. Les sous-produits des industries agro-alimentaires posent des problèmes de reproductibilité, limitent l'agitation et l'oxygénation (à cause du moussage), sont parfois difficilement solubles ou contiennent une fraction insoluble importante, provoquent l'augmentation de la viscosité du milieu, limitent le transfert du dioxygène, présentent souvent une forte charge microbienne qui contraint à appliquer des barèmes de stérilisation élevés.

3.1.4. L'amidon doit être obligatoirement ajouté au milieu de culture car il est indispensable à l'induction de l'expression du gène cloné et donc à la production de l'enzyme.

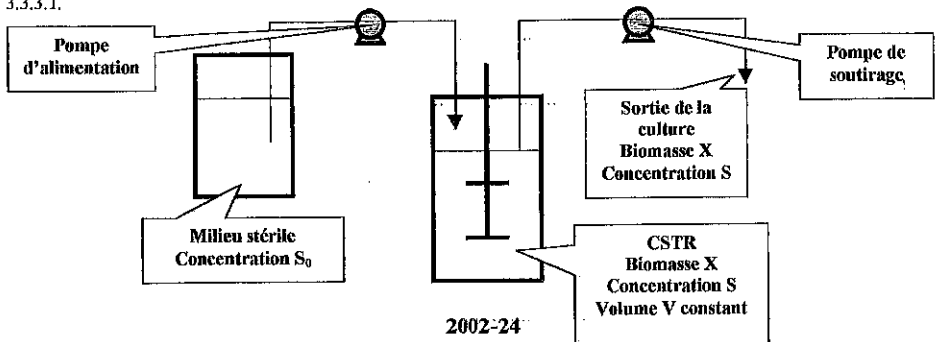
3.2. *Bacillus, Aspergillus, Rhizopus, Streptomyces*, certaines souches de levures.

3.3.1. Une telle souche doit être stable, tolérer des pH ou des températures élevés (ce qui permet d'éviter les contaminations), présenter un niveau d'expression élevé de l'enzyme recherchée tout en produisant un minimum de co-produits, se développer rapidement (μ élevé), être peu exigeante d'un point de vue nutritionnel et ne pas être inhibée par les constituants du milieu, ne pas présenter de caractère de toxicité ou de pathogénéicité. Les enzymes doivent être faciles à purifier (donc plutôt extra-cellulaires), produites en grande quantité (la souche sera de préférence un mutant dérégulé).

3.3.2. L'optimisation est une démarche qui consiste à augmenter la productivité tout en diminuant les coûts de production. Les méthodes utilisées sont, par exemple :

- la planification expérimentale, qui permet de rationaliser les essais en erlenmeyers et en bioréacteurs de laboratoire
- l'étude des régulations nécessaires au cours du suivi du procédé de fermentation : température, pH, $\%O_2$
- le contrôle des mousses
- la modélisation mathématique de la croissance, de la production de l'enzyme et de la productivité volumique horaire

3.3.3.1.



3.3.3.2. Rôles des différents éléments figurant sur le schéma de la question 3.3.3.1. :

Bioréacteur CSTR : « Continuous Stirred Tank Reactor », bioréacteur agité (c'est indispensable) fonctionnant en continu, c'est-à-dire recevant en permanence du milieu stérile et subissant en permanence un prélèvement de culture.

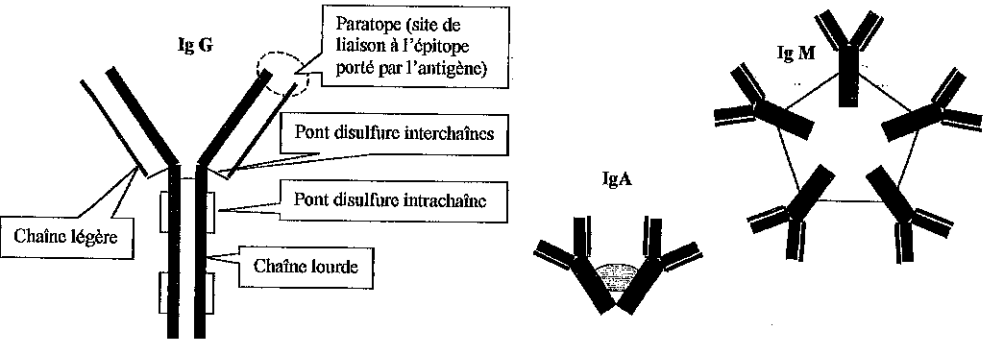
Alimentation : apport de milieu stérile contenu dans la réserve (appelé parfois « nourriture » ou « feed ») grâce à la pompe d'alimentation dont le débit est noté F ou Q exprimé en unité de volume/unité de temps. Ce milieu est caractérisé par un substrat limitant à la concentration S_0 . La notion de chimostat est due au fait que c'est le débit en ce substrat, dont la concentration S dans la cuve du bioréacteur est constante pour un débit donné. C'est cette concentration S qui va conditionner la vitesse spécifique de croissance (μ) de la biomasse présente dans la cuve : $\mu < \mu_{max}$.

Soutirage : prélèvement permanent de culture dans le bioréacteur, selon un débit F ou Q identique à celui d'alimentation, ce qui a pour conséquence que le volume présent dans la cuve est constant.

3.3.3.3. Le rapport entre le débit d'alimentation F (ou Q) et le volume contenu dans le bioréacteur permet d'obtenir le taux de dilution $D = F/V$ (ou Q/V) exprimé en unité de temps⁻¹. Lorsque le régime continu est établi, la concentration de biomasse X dans la cuve est constante et on a $dX/dt = 0$, soit $dX/dt = (\mu - D)X = 0$ (équation différentielle qui régit la croissance continue) donc $\mu = D$

3.4.1. **Structure du monomère d'immunoglobuline (type IgG)** : 2 chaînes « légères », 2 chaînes « lourdes », unies par des « ponts disulfures » interchaînes, présentant des régions constantes et des régions variables (domaines).

Catégories d'immunoglobulines : G, A, N, D, E.



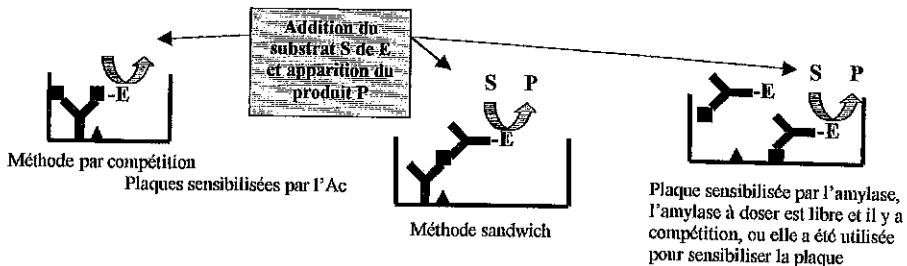
3.4.2. **Dosage en phase hétérogène** : il permet de doser un anticorps (Ac) ou un antigène (Ag) par réaction Ag-Ac, qui est révélée par un Ag ou un Ac marqué par un enzyme sans qu'il y ait modification de l'activité enzymatique.

Dosage en phase homogène : seuls les antigènes peuvent être dosés, par un Ac qui se fixe à l'haptène marqué par un enzyme, ce qui a pour effet de modifier l'activité enzymatique.

3.4.3. On peut utiliser des plaques sensibilisées, après saturation des sites non spécifiques par la sérumalbumine bovine SAB :

- **l'Ac anti-amylase** : la révélation a lieu respectivement soit grâce à l'amylase marquée par une enzyme révélatrice E (méthode par compétition), soit par un Ac anti-amylase couplé à l'enzyme E (méthode sandwich)
- **par l'amylase** : la révélation a lieu par un Ac anti-amylase couplé à l'enzyme E

▲ Protéine de saturation (SAB) ■ amylase à doser ■ -E amylase marquée Y Ac anti-amylase



EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

1^{ère} PARTIE : ETUDE DE PROJET

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

L'usage d'un dictionnaire anglais-fançais est autorisé.

Calculatrice autorisée.

Une feuille de papier millimétré.

Production industrielle d'acide glutamique

La production annuelle d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum*, utilisant diverses mélasses comme substrat, dépasse 400 000 tonnes. Les deux tiers de cette production sont destinés à l'industrie agro-alimentaire où l'acide glutamique est utilisé comme agent de rapidité dans de nombreuses préparations (sauces, soupes, plats cuisinés).

1. Les bactéries productrices d'acide glutamique (7 points)

Un mode d'amélioration des procédés de production repose sur la sélection de souches bactériennes présentant une synthèse et/ou une excrétion améliorée. La sélection de bactéries productrices peut être simple.

- 1.1. A l'aide du document I, décrire chaque étape du protocole de sélection de souches productrices.
- 1.2. Préciser leur rôle respectif.

2. Les procédés de culture des bactéries productrices d'acide glutamique (28 points)

Plusieurs substrats sont utilisables pour produire de l'acide glutamique. Le document II décrit un procédé fondé sur l'utilisation de l'acide acétique.

- 2.1. Quel est le type de procédé de culture mis en oeuvre ? Justifier la réponse.
- 2.2. Dans le cas présent, quel est l'intérêt de ce procédé ?
- 2.3. Analyser la courbe de production par rapport à la courbe de croissance.
- 2.4. L'excrétion de l'acide glutamique est un point clé de la fermentation glutamique. Les premiers procédés de production étaient fondés sur une limitation en biotine.
 - 2.4.1. A partir du tableau du document III, décrire et interpréter l'effet de la biotine sur la production de biomasse, d'une part et sur la production d'acide glutamique d'autre part.
Conclure quant à l'opportunité de la présence de biotine dans le milieu de culture.
 - 2.4.2. Pour une concentration en biotine de 1 µg/L, calculer le rendement global de production d'acide glutamique par rapport à la source de carbone, sachant que celle-ci est totalement consommée.

2.5 La mélasse de canne à sucre a été utilisée en remplacement du glucose dans le milieu de culture. La mélasse étant riche en biotine, les procédés s'appuyant sur sa limitation ne sont pas applicables. D'autres procédés ont été proposés, comme l'induction d'excrétion de l'acide glutamique par l'addition d'antibiotiques (pénicilline...), de surfactants (tweens...). Pour étudier cette induction, on met en regard la composition membranaire (nature des phospholipides et des acides gras, quantité d'acide oléique, rapport $\frac{\text{acides gras saturés}}{\text{acides gras insaturés}}$) et la quantité d'acide glutamique produit (document IV).

2.5.1 *Quel est l'effet du POEFE et de la pénicilline sur le taux d'acide glutamique produit ?*

2.5.2 *La pénicilline et le POEFE agissent-ils selon un même mécanisme sur l'excrétion de l'acide glutamique ? Justifier la réponse et en déduire le mécanisme probable dans le cas du POEFE.*

2.6 D'autres études, ont mis en évidence que l'excrétion de l'acide glutamique par des protoplastes bactériens dépend de la pression osmotique. Le document V présente l'effet de la pression osmotique en présence de pénicilline ou de POEFE.

2.6.1 *Donner le mode d'obtention d'un protoplaste.*

2.6.2 *Définir la pression osmotique. Comment varie-t-elle en fonction de la concentration extra-cellulaire en nitrate de sodium ?*

2.6.3 *Quel est le mode d'action de la pénicilline (antibiotique de la classe des β -lactamines) sur une cellule bactérienne en croissance et sur un protoplaste ?*

2.6.4 *Analyser le document V.*

2.6.5 *Proposer une interprétation des résultats obtenus en présence de pénicilline .*

3. Amélioration des souches et génie génétique (23 points)

L'augmentation de la production d'acide glutamique peut résulter d'une expression plus forte d'un gène clé dans la synthèse de ce métabolite. Dans ce but le gène peut être cloné dans un vecteur adapté à *C. glutamicum*.

3.1. Un tel vecteur a été construit à partir de deux plasmides (pCG4 et de pCG1). Justifier le rôle des marqueurs présents dans ces deux plasmides. (Document VI).

3.2 Le vecteur pCG4 a été incubé en présence des enzymes *Eco RI* et *Pst I*. Les résultats d'électrophorèse en gel d'agarose sont présentés dans le document VII.

3.2.1 *Regrouper dans un tableau les résultats obtenus pour le marqueur, tracer la courbe d'étalonnage.*

3.2.2 *Déterminer précisément la taille des différents fragments de restriction.*

3.2.3 *En déduire la carte de restriction de pCG4.*

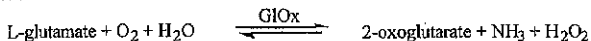
3.2.4 *Préciser sur un schéma la connexion du gel au générateur et nommer les électrodes.*

4. Dosage de l'acide glutamique (22 points)

L'optimisation de la production d'acide glutamique nécessite des dosages en cours de culture.

4.1. Citer deux méthodes permettant de doser l'acide glutamique.

4.2 Parmi les méthodes de dosage en cours de développement reviennent souvent les sondes à L-glutamate oxydase (GLOx ; EC 1.4.3.11.). Les performances des méthodes utilisées avec différents biocapteurs sont présentées dans le document VIII. La réaction catalysées par la GLOx est la suivante :



4.2.1 Dans cette réaction, préciser quels sont les composés utilisables pour générer des signaux électriques, ainsi que les transducteurs permettant de les capter. ?

4.2.2 Rappeler le principe du dosage ampérométrique.

4.2.3. Déduire du document VIII la gamme de tensions applicable à une électrode ampérométrique permettant la mesure de $[\text{O}_2]$ d'une part et de $[\text{H}_2\text{O}_2]$, d'autre part.

4.2.4. Comment établir la corrélation entre la concentration en glutamate et le signal détecté ?

4.2.5. Citer deux avantages et deux inconvénients des deux méthodes d'immobilisation : inclusion dans la gélatine et co-réticulation avec la SAB par le glutaraldéhyde.

4.3 Le document IX présente les résultats des mesures obtenus pour 17 acides aminés différents à l'aide d'un biocapteur utilisant la GLOx. Pour chaque acide aminé, la mesure a été effectuée pour une même concentration molaire.

4.3.1 Qu'entend-on par réponse relative ?

4.3.2 En utilisant le résultat obtenu pour l'acide aspartique, justifier l'intérêt de ces mesures.

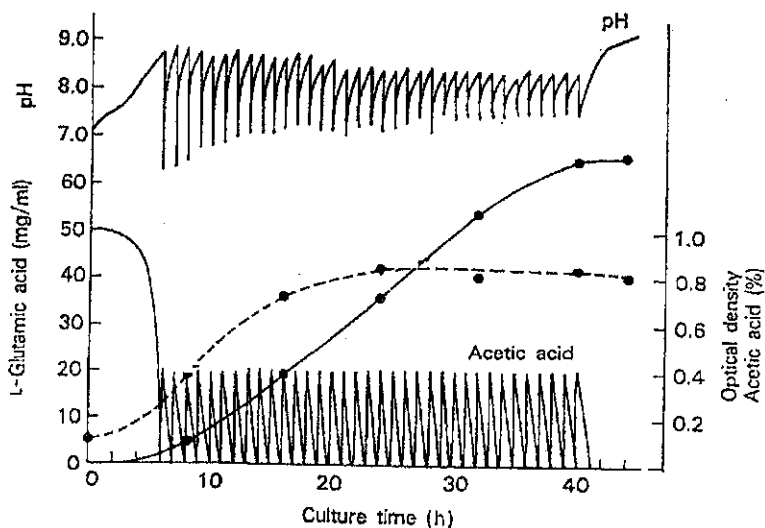
4.3.3 Pour un mélange équimolaire de ces 17 acides aminés le biocapteur est-il utilisable ? Justifier la réponse par un calcul.

Document I

In the case of bacteria, a simple but efficient method was borrowed from Udaka for the selection of glutamic acid-producing strains. Bacteria to be tested are spread over the plate agar containing the production medium and allowed to grow to small colonies. After they are replicated on another agar plate for preservation, the bacteria on the original plate are killed by UV-irradiation. A second agar medium containing *Leuconostoc mesenteroides* and the same ingredients as used for the bioassay of glutamic acid is then poured into the original plate and solidified. After incubation, the glutamic acid productivity of the bacteria on the first agar layer is estimated by the size of the haloes of *Leuconostoc mesenteroides* developing around them.

Document II

Acetic acid was also suggested as an available carbon substrate for the production of glutamic acid and many strains belonging to genera of *Brevibacterium* and *Corynebacterium* were found to be glutamic acid producing organisms. The disadvantage is that a yield of glutamic acid declines markedly because acetic acid itself prevents microbial growth. Work to improve the technique concentrated on this point and intermittent additions of acetic acid during fermentation resulted in success in industrial production.



A typical pattern of L-glutamic acid fermentation with acetic acid by *Brevibacterium thioogenitalis* D-248.⁴⁶⁾

●—● L-glutamic acid, ●---● optical density

Document III

Différents milieux de concentration variable en biotine sont utilisés pour conduire les fermentations produisant de l'acide glutamique. Le milieu de culture contient 36 mg/mL de glucose, 1,0 mg/mL de KH_2PO_4 , 0,4 mg/mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 ppm d'ions ferreux et manganoux, 2,0 mg/mL d'urée et 5 $\mu\text{L/mL}$ d'hydrolysat protéique de soja. Le milieu est ensemencé avec la souche *Brevibacterium lactofermentum* N° 2256 (ATCC N° 13869) et incubé à 31,5° C pendant 24 heures sous agitation. Le pH est maintenu voisin de 7,5 – 8,2 par addition d'une solution alcaline.

Concentration en biotine dans le milieu ($\mu\text{g/L}$)	Biomasse (g matière sèche/L)	Concentration d'acide L ⁻ glutamique produit (mg/mL)	Taux intracellulaire en biotine ($\mu\text{g/g}$ matière sèche)
0	0,4	-	-
1	2,2	19,8	0,5
3	5,0	19,4	0,5
5	7,1	15,5	0,5
10	8,4	0,72	1,1
20	10,7	0,70	1,4
50	10,8	0,72	2,2
100	10,7	0,68	7,6
200	10,9	0,68	13,0
300	11,0	0,70	17,8

Document IV

Relation entre la composition en lipides des membranes cellulaires et le taux d'acide glutamique accumulé lors de différentes expérimentations.

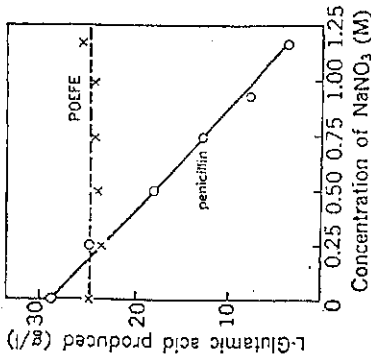
Source de carbone	Additifs	Taux d'Ac glutamique produit		Taux d'acide gras (mg/g matière sèche)				Rapport AG saturés	Taux de phospholipide (mg/g matière sèche)
		12 heures	final	C16	C16 ^{1m}	C18	C18 ^{1m}	AG insaturés	
Glucose	Biotine 2,5 $\mu\text{g/L}$	16,3	66,3	5,01	0,45	0,26	4,76	1,10	13,1
	Biotine 20 $\mu\text{g/L}$	3,9	5,2	7,11	1,03	0,31	11,20	0,66	22,2
Mélasses	Néant	3,8	5,2	7,37	1,21	0,45	8,79	0,85	24,5
	POEFE 1,5 g/L	20,5	73,7	5,85	0,75	1,06	4,61	1,37	14,6
	Pénicilline 5000 U/L	23,6	69,2	6,55	1,08	0,73	8,11	0,89	23,3

POEFE : Poly Oxy Ethylene sorbitan Fatty acid Ester = Tween

AG = acide gras

Document V

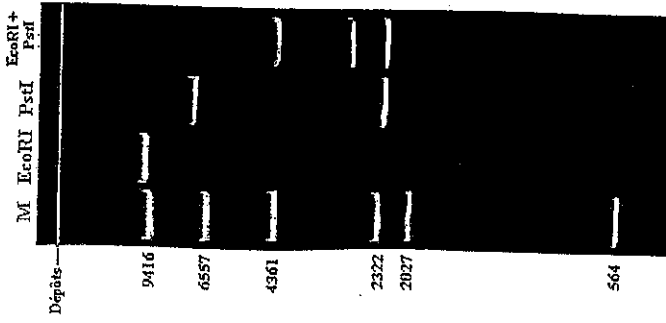
Effet de la pression osmotique extracellulaire sur le taux d'acide L-glutamique excrété.



Document VI

To increase glutamic acid yield, a recombinant DNA molecule was constructed in *C. glutamicum* consisting of a plasmid pCG4, encoding streptomycin resistance (Str^r) and spectinomycin resistance (Sp^r), and a high copy number plasmid pCG1. pCG1 et pCG4 were isolated from *C. glutamicum*.

Document VII Résultats pCG₄



M : marqueur de taille (lambda Hind III)
La taille des fragments est exprimée en pb.

DOCUMENT VIII

Exemples, relevés dans la littérature, de biocapteurs ampérométriques utilisant la L-glutamatoxydase (GLOx) ; électrode de référence Ag/AgCl.

enzyme	transducteur	Tension de Mesure	Immobilisation	domaine de linéarité (µmol/L)
1 GLOx	platine	O ₂ : - 600 mV ou H ₂ O ₂ : + 600 mV H ₂ O ₂ : 500 mV	inclusion dans la gélatine	10 - 1 000
2 GLOx	platine		co-inclusion avec de la SAB dans une membrane de nylon	0,002 - 10
3 GLOx	membrane de platine silanisée	cellule à circulation H ₂ O ₂ : 500 mV	co-réticulation par le glutaraldéhyde avec de la SAB et fixation sur le support silanisé	5 - 1 000
4 GLOx	membrane de la triacétate de cellulose	O ₂	co-réticulation par le glutaraldéhyde et des espaceurs	120 - 840
5 GLOx	feuille de carbone recouverte de platine	H ₂ O ₂ : > + 400 mV	couplage par divers carbodiimides	0 - 25
6 GLOx	platine	cellule à circulation O ₂ : - 650 mV ou H ₂ O ₂ : + 650 mV H ₂ O ₂ : + 150 mV	membrane d'Immobilon - P®	0,05 - 500
7 GLOx	pâte de carbone		co-réticulation avec la SAB par le glutaraldéhyde	2,6 - 800
8 GLOx	feuille de carbone recouverte de platine	cellule à circulation, H ₂ O ₂ : + 600 mV	couplage par un carbodiimide	jusqu'à 100 000
9 GLOx	platine	cellule à circulation, H ₂ O ₂ : + 600 mV	mousse de SAB et de glutaraldéhyde	2 - 100

SAB = sérumalbumine bovine

Immobilon-P® : membrane Millipore™ hydrophobe de fluorure de polyvinylidène (PVDF)

Silanisé = revêtu de groupements silanols.

Document IX

Réponse relative d'une sonde ampérométrique enzymatique à GIOx à 17 L-aminoacides.

aminoacide	réponse relative
acide L-glutamique	100,0
acide L-aspartique	18,2
L-sérine	9,9
L-asparagine	8,8
L-valine	8,8
L-glutamine	8,3
L-proline	8,3
L-thréonine	8,3
glycine	7,8
L-leucine	7,8
L-méthionine	7,8
L-histidine	7,8
L-phénylalanine	7,8
L-alanine	0
L-arginine	0
L-lysine	0
L-tryptophane	0

PROPOSITION DE CORRIGE

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

1.1 et 1.2 :

ETAPES		ROLES
1	Isolément ou étalément	Obtenir des clones isolés producteurs d'acide glutamique
2	Réplique sur un autre milieu gélosé	Conservation de la souche productrice car elle va être détruite à l'étape 3 Repérage des clones (sur)producteurs par la technique de détection
3	Destruction par UV des micro-organismes producteurs d'acide glutamique	Éviter les interférences entre souches productrice et révélatrice
4	Coufage d'une gélose contenant les <i>Leuconostoc</i>	Utilisation d'une souche auxotrophe vis à vis de l'acide glutamique pour la révélation des clones producteurs
5	Mesure des diamètres de culture	Évaluation semi-quantitative de la production

2.1 : Fed-batch, addition régulière du substrat : l'acide acétique

2.2 : Inhibition par l'acide acétique à forte dose, de la croissance, par ce type de procédé il est apporté petit à petit et non pas en totalité au départ comme dans le cas de la culture discontinue.

2.3 : Analyse comparée des deux courbes : la production de l'acide glutamique débute au cours de la phase exponentielle de croissance et se poursuit lors des phases de ralentissement et stationnaire. Il y a donc un découplage entre croissance et production : ce n'est pas un métabolite primaire mais un métabolite partiellement associé à la croissance

2.4.1 :

DESCRIPTIONS	INTERPRETATIONS
Augmentation de la biomasse jusqu'à 20 µg/L de biotine puis stabilisation	[biotine] < 20 µg/L : facteur limitant de la croissance
Production maximale de l'acide jusqu'à 5 µg/L de biotine puis chute	[biotine] > 5 µg/L : effet inhibiteur sur la production d'acide glutamique

Conclusion : la biotine est nécessaire pour cette production mais ne doit pas être en trop grande quantité entre 1 (et 3) µg/L **semble le plus judicieux car la production est maximale**

2.4.2 : Rendement global de production :

$$R \text{ (ou YF) } \text{ gH/C} = \frac{\text{[acide glutamique]}_{\text{produit}}}{\text{[glucose]}_{\text{consommé}}} = \frac{19,8}{36} = 0,55 = 55\%$$

2.5.1 :

- Absence de POEPE ou de pénicilline : faible production d'acide glutamique (5,2 g/L)
- Présence de POEPE ou de pénicilline : augmentation importante de la production d'acide glutamique (73,7 g/L et 69,2 g/L)

2.5.2 :

Les valeurs du rapport AG saturés / insaturés et du taux de phospholipides, sont très proches en absence d'additifs et en présence de pénicilline (0,85/0,89 et 24,5 mg/g / 23,3 mg/g).
Donc la pénicilline n'a pas d'action sur la composition membranaire
Par contre en présence de POEPE ces valeurs sont modifiées (1,37 et 14,6 mg/g), cet additif agit sur la composition membranaire (augmentation de la saturation des AG, diminution du taux de phospholipides).
Le POEPE modifierait la perméabilité membranaire.

2.6.1 : lysozyme en milieu légèrement hypertonique ou isotonique

2.6.2 :

Pression due à une différence de concentration des solutés de part et d'autre d'une membrane héli-perméable entraînant un flux d'eau à travers la membrane du compartiment le moins concentré vers le compartiment le plus concentré.
La pression osmotique intracellulaire augmente quand la concentration extracellulaire en nitrate de sodium augmente

2.6.3 : La pénicilline inhibe la synthèse de la paroi bactérienne en bloquant la synthèse du peptidoglycane, elle est donc sans action sur le protoplaste.

2.6.4 :

En présence de POBFE : la [acide glutamique] est indépendante de la [NaNO₃]

En présence de pénicilline : la [acide glutamique] est inversement proportionnelle à la [NaNO₃] pour la gamme utilisée

2.6.5 : La diminution de la pression osmotique dans le milieu de culture augmente l'excrétion de l'acide glutamique des cellules soumises à l'action de la pénicilline. L'absence de peptidoglycane induit une compensation de l'hyper-osmolarité extracellulaire par une augmentation de la [acide glutamique] intracellulaire

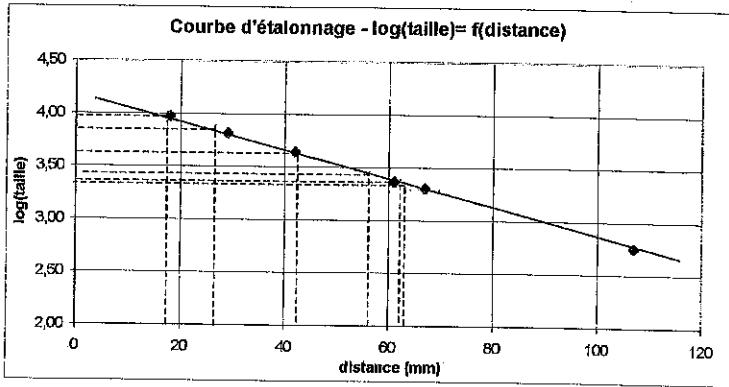
3.1 :

Un plasmide apporte deux gènes de résistance à des antibiotiques : un sera exprimé (sélection des clones transformés), l'autre pourra être interrompu (sélection des plasmides recombinés).

L'autre plasmide apporte la possibilité d'un nombre élevé de copies par cellule ce qui augmentera la production du produit X

3.2.1 :

taille (pb)	9416	6557	4361	2322	2027	564
distance (mm)	18	29	42	61	67	107
log (taille)	3,97	3,82	3,64	3,37	3,31	2,75

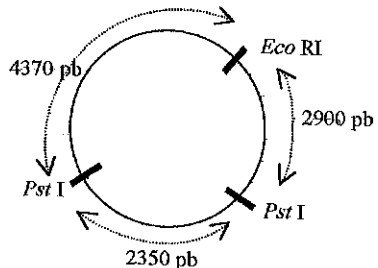


3.2.2 :

Distance (mm)	Log M	M (pb)	Distance (mm)	Log M	M (pb)	Distance (mm)	Log M	M (pb)
17	3,98	9612	26	3,86	7236	43	3,64	4368
			62	3,37	2324	55	3,46	2899
						62	3,37	2324
<i>Eco RI</i>			<i>Pst I</i>			<i>Eco RI + Pst I</i>		

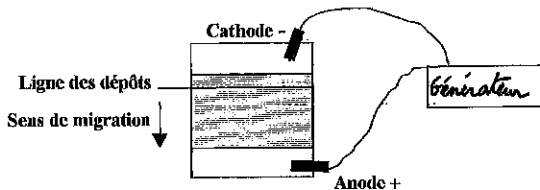
3.2.3 :

- **Eco RI** : un seul fragment donc une seule coupure :
taille du plasmide : 9600 pb
- **Pst I** : Deux fragments donc deux coupures, la somme des tailles des fragments peu ≠ 9600 pb, ceci représente la taille du plasmide
- **Double digestion** : trois fragments donc trois coupures, on retrouve le petit fragment de la digestion avec *Pst I* (≠ 2350 pb), donc la coupure de *Eco RI* se situe dans le grand fragment de cette même digestion (les tailles sont concordantes : 4370+2900=7270≠ 7240 pb)



Remarque : la carte symétrique dans un miroir est aussi valable, aucun élément ne permet de placer *Eco RI* par rapport aux deux coupures de *Pst I*

3.2.4 :



4.1 : Méthodes enzymatique, colorimétrique à la ninhydrine, microbiologique avec une souche auxotrophe....

4.2.1 :

composés	transducteurs
O ₂	Électrode ampérométrique, électrode de Clark
H ₂ O ₂	Électrode ampérométrique
NH ₃ , H ⁺	Électrode de verre

4.2.2 : Pour une ddp adéquate et imposée, il y a proportionnalité entre l'intensité du courant et la concentration de l'espèce détectée par l'électrode ampérométrique.

4.2.3 :

[O₂] : -650 mV à -600 mV

[H₂O₂] : +150 mV à +650 mV

4.2.4 : On réalise un étalonnage à l'aide de solution de glutamate de concentrations connues

4.2.5 :

	Inclusion dans la gélatine	Co-réaction avec la SAB par le glutaraldéhyde
Avantages	Immobilisation peu dénaturante Simplicité de mise en œuvre Pas de toxicité des produits	Grande stabilité thermique Simplicité de mise en œuvre Pas de risque de fuite
Inconvénients	Faible gain en stabilité thermique Risque de fuite	Immobilisation entraîne une forte perte d'activité Toxicité du glutaraldéhyde

4.3.1 : On attribue la valeur 100 au signal obtenu pour le glutamate, puis on rapporte à ce signal les autres réponses dans un but de comparaison.

$$X = \text{signal de l'acide aminé} \times 100 / \text{signal du glutamate}$$

4.3.2 : Ces études ont pour but de déterminer la spécificité du biocapteur utilisant la GlOx. Le résultat obtenu pour l'acide aspartique est de 18,2, ce qui montre que ce biocapteur est peu spécifique puisqu'il donne un signal (de l'ordre de 20 %) pour une molécule autre que l'acide glutamique.

4.3.3 : Comme le mélange est équimolaire, il est possible d'additionner les réponses relatives obtenues pour les différentes molécules étudiées.

Somme des signaux = 109,6 > 100 (valeur obtenue pour le glutamate)

Donc ce biocapteur est inutilisable dans un milieu complexe (le signal du glutamate n'est pas discriminé des autres signaux).

Calculatrice autorisée

PRODUCTION ET UTILISATION D'UN ANTIBIOTIQUE AU LABORATOIRE

PREMIER JOUR

Durée : 6 heures

Toutes les valeurs expérimentales doivent être communiquées immédiatement aux examinateurs.

PREMIÈRE PARTIE :

CARTOGRAPHIE PARTIELLE DU VECTEUR RECOMBINANT pGEM-penDE (50 points)

L'amélioration de la production d'un antibiotique par une souche S peut être obtenue par mutagenèse dirigée dans un gène *penDE* qui est impliqué dans sa synthèse. Ce gène est cloné dans le vecteur pGEM.

La mutation a créé un site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction B thermostable. Le site de restriction spécifique de l'enzyme B est unique dans l'insert *penDE* et absent dans le vecteur pGEM.

Trois enzymes de restriction B, H et X sont utilisées pour vérifier la construction du plasmide recombinant.

Trois digestions sont nécessaires :

- digestion d'ADN du phage λ par B pour contrôler l'activité de cette enzyme ;
- digestion par X et H pour déterminer la taille de l'insert ;
- digestion par B et X pour localiser le site de restriction B dans l'insert.

L'une de ces trois manipulations sera réalisée obligatoirement devant un examinateur.

Réactifs

- Enzymes de restriction dans un tampon contenant 50% de glycérol :
 - Enzyme B 10 U/ μ L
 - Enzyme H 10 U/ μ L
 - Enzyme X 10 U/ μ L
- Tampons de digestion 10x adaptés :
 - à B,
 - aux couples B + X et X + H.
- Eau ultrapure
- ADN du phage λ à 250 ng/ μ L
- Plasmide pGEM-penDE à 50 ng/ μ L
- Phénol saturé en tampon Tris pH 8. Ne pas agiter le tube et prélever la phase inférieure. Manipuler avec gants et lunettes de protection.
- Tampon de charge 6x
- Huile minérale pour biologie moléculaire (limite l'évaporation de l'eau à 60°C)

1.1. CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME DE RESTRICTION B

- Dans un microtube de 500 μ L, introduire :

ADN du phage λ	750 à 900 ng
Tampon de digestion X10 (spécifique de l'enzyme B)	V ₁ μ L
Enzyme B	10 unités
Volume final du mélange réactionnel	25 μ L
- Centrifuger quelques secondes et déposer à la surface environ 25 μ L d'huile minérale.
- Incuber 1 heure 30 minutes à 60°C.
- Prélever la phase inférieure et la transférer dans un autre microtube de 500 μ L contenant 30 μ L de phénol.
- Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement ou vortex.
- Centrifuger quelques dizaines de secondes et transférer la phase aqueuse supérieure dans un microtube neuf (TUBE n°1).

Les deux transferts seront réalisés devant un examinateur et les volumes lui seront indiqués.

1.2. DÉTERMINATION DE LA TAILLE DE L'INSERT *penDE*

- Dans un microtube de 500 μ L, introduire :

Vecteur recombiné	150 à 200 ng
Tampon de digestion X10 (adapté aux enzymes H et X)	V ₂ μ L
Enzyme H	10 unités
Enzyme X	10 unités
Volume final du mélange réactionnel	30 μ L
- Centrifuger et incuber 1 heure 30 minutes à 37°C.
- Arrêter la digestion en introduisant 30 μ L de phénol. Homogénéiser, centrifuger et transférer la phase aqueuse supérieure dans un microtube neuf.
- Reprendre la phase aqueuse supérieure et la transférer dans un microtube neuf (TUBE n°2).

1.3. LOCALISATION DU SITE DE RESTRICTION DE L'ENZYME B

- Dans un microtube de 500 μ L, introduire :

Vecteur recombiné	250 ng
Tampon de digestion X10 (adapté aux enzymes B et X)	V ₃ μ L
Enzyme B	10 unités
Enzyme X	10 unités
Volume final du mélange réactionnel	30 μ L
- Centrifuger quelques secondes et déposer à la surface 25 μ L d'huile minérale.
- Incuber 50 minutes à 37°C, puis 45 minutes à 1 heure à 60°C.
- Prélever la phase inférieure et la transférer dans un microtube contenant 30 μ L de phénol.
- Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement.
- Centrifuger quelques dizaines de secondes et transférer la phase aqueuse supérieure dans un microtube neuf (TUBE n°3).

1.4. ELECTROPHORÈSE

- Mélanger 15 à 20 μ L de chaque digestion avec le tampon de charge 6x.
- Incuber la digestion n°1, 10 minutes à 65°C et la refroidir immédiatement dans la glace.
- Déposer 15 μ L de chacun des tubes sur un gel d'agarose à 0,7% dans l'ordre 1, 2, 3.

*Les trois dépôts seront réalisés simultanément devant un examinateur.
Une piste par gel est réservée à un marqueur de taille déposé par un examinateur.*

Compte-rendu

- A l'aide de tableaux, décrire les trois mélanges de digestion en indiquant :
 - l'ordre d'introduction des réactifs
 - le volume (justifié) de chaque réactif utilisé
 - la quantité d'ADN digéré
 - le taux final de glycérol (commenter le résultat).
- Dans un autre tableau, donner :
 - le volume de chaque digestion mélangée au tampon de charge
 - le volume de tampon de charge
 - la quantité estimée d'ADN introduit dans chaque puits de dépôt.

DEUXIÈME PARTIE :

VÉRIFICATION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE ET EN GLUTAMATE DU MILIEU DE CULTURE (30 points)

Le milieu de culture contient 30 à 40 g/L de glucose (source de carbone) et environ 1 g/L de glutamate qui stimule la production d'antibiotique.

2.1. DOSAGE DU GLUCOSE PAR MÉTHODE ENZYMATIQUE (GOD)

Matériel et réactifs

- Milieu de culture "M"
- Etalon 4 g/L

Réalisation des étalons

3 étalons à 1, 2, et 3 g/L sont réalisés à partir d'une solution de glucose à 4 g/L.

Dosage

- Dans des microcuvettes introduire :

	Témoin réactif	Etalon	Essai
Etalon		20 µL	
Echantillon à doser			20 µL
Eau distillée	20 µL		
Réactif à la GOD	2 mL	2 mL	2 mL

Linéarité : 4 g/L

- Mesurer l'absorbance à 510 nm après une incubation de 20 min à la température du laboratoire.

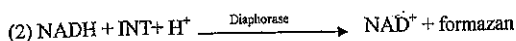
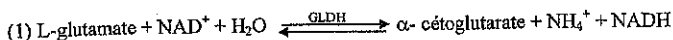
Résultats

- Tracer la droite d'étalonnage.
- Calculer la concentration en glucose du milieu de culture.

2.2. DOSAGE DE L'ACIDE L-GLUTAMIQUE

Principe

- En présence de glutamate déshydrogénase, l'acide L-glutamique subit une désamination en α -cétoglutarate par l'intermédiaire du NAD^+ .
Le NADH formé transforme en présence de diaphorase, le chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) en un formazan qui est mesuré dans le visible à 492 nm.



- L'équilibre de la réaction (1) est situé du côté du glutamate. En captant le NADH formé par l'INT (2), on déplace l'équilibre de la réaction vers l' α -cétoglutarate.

Mode opératoire

- Introduire dans des cuves :

	Témoin	essai	
Solution de travail	1 mL	1 mL	A DEMANDER AU JURY
Eau bidistillée	2 mL	1,8 mL	
Essai	-	0,2 mL	

- Mélanger. Après 2 min, lire l'absorbance des solutions (A_1) à 492 nm contre l'air ou l'eau.
- Déclencher la réaction par addition de glutamate déshydrogénase :

Glutamate deshydrogénase	0,03 mL	0,03 mL	A DEMANDER AU JURY
--------------------------	---------	---------	--------------------

- Mélanger, attendre la fin de la réaction environ 15 min, lire l'absorbance des solutions (A_2) comme précédemment.

Remarques :

- Solution d'essai : 1 à 14 μg de L-glutaminate/cuve (pour un volume de 0,2 à 2 mL).
- INT est photosensible : après avoir ajouté la solution de travail, éviter d'exposer les cuves à la lumière en les entourant de papier aluminium.

Résultats

- Déterminer les différences d'absorbances ($A_2 - A_1$) du témoin et de l'essai. Déduire la différence d'absorbance du témoin (ΔA_T) de celle de l'essai (ΔA_E) : $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$
- Calculer la concentration massique en acide L-glutamique en utilisant le coefficient d'absorption du formazan.
- Données :
 - Coefficient d'absorbance linéique molaire du formazan à 492 nm : $\epsilon = 19,9 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
 - Masse molaire de l'acide glutamique : 147,13 g/mol
 - Trajet optique : 1,0 cm

TROISIÈME PARTIE :

PRODUCTION ET DOSAGE DE L'ANTIBIOTIQUE AU LABORATOIRE (50 points)

La souche S a été cultivée en bioréacteur de laboratoire et un prélèvement "P" a été réalisé en fin de phase stationnaire.

3.1. PRÉPARATION DU PRÉLÈVEMENT P

Matériels et réactifs

On dispose du matériel suivant :

- un flacon ou un erlen contenant 100 mL de culture (prélèvement P réalisé en conditions d'asepsie)
- un tube à centrifuger de 50 mL, gradué stérile
- un petit flacon stérile
- un bac à glace

Mode opératoire

- Transvaser dans un tube à centrifuger stérile un volume d'environ 40 mL de culture (se servir des graduations du tube et noter le volume effectivement prélevé)

Effectuer cette opération en présence d'un examinateur

- Centrifuger pendant 10 min à 5000 rpm
- Décanter le surnageant dans le petit flacon stérile, conserver alors celui-ci sur la glace. Ce surnageant constitue la solution inconnue I pour le dosage de la solution d'antibiotique. Conserver le culot pour la détermination de la biomasse en 3.2.

Compte-rendu

- Pourquoi faut-il respecter les conditions d'asepsie pour effectuer ces opérations ?

3.2. DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DE BIOMASSE SÈCHE

Matériels et réactifs

On dispose du matériel suivant :

- une balance permettant des pesées à 0,1 mg près
- un filtre à café déshydraté et placé en dessiccateur
- un entonnoir et un erlenmeyer non stérile de 250 mL
- un carré de papier aluminium
- un flacon de 50 mL d'eau distillée non stérile
- une étuve à 90°C

Mode opératoire :

- Indiquer le numéro de poste sur le filtre (au crayon de papier), puis tarer celui-ci
- Placer l'entonnoir sur l'erlenmeyer et disposer le filtre
- Transférer **quantitativement** sur le filtre la biomasse du culot
- Rincer la biomasse recueillie avec de l'eau distillée

Réaliser ces opérations devant un examinateur

- Disposer alors le filtre sur le papier aluminium et placer le tout à l'étuve à 90°C jusqu'au lendemain

Compte-rendu

- Noter la valeur de la masse du filtre sur la feuille de résultats qui sera restituée le 2ème jour
- Pourquoi les conditions d'asepsie ne sont-elles pas nécessaires pour effectuer ces opérations ?

3.3. DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE L'ANTIBIOTIQUE PRODUIT PAR DIFFUSION EN GÉLOSE

Matériels et réactifs

On dispose du matériel suivant :

- un tube (noté R) de culture de la souche sensible à l'antibiotique produit, en bouillon Mueller-Hinton
- spectrophotomètre, cuves et portoirs
- un flacon contenant exactement 50 mL de gélose Mueller-Hinton maintenu en surfusion à 45°C
- un tube de solution de TTC
- une boîte carrée stérile
- un flacon contenant environ 20 disques non imprégnés stériles
- un tube de solution étalon d'antibiotique "E1" à 40 U/mL
- un tube à essais contenant quelques mL de tampon pH=7 stérile
- matériel nécessaire pour réaliser des dilutions
- 1 étuve à 37°C

3.3.1 Préparation de la boîte de dosage

Mode opératoire

- Déterminer l'absorbance de la culture de la souche R sur une dilution adéquate.

Effectuer toutes les opérations ci-dessus (prélèvement, dilution et mesure) en présence d'un examinateur

- En déduire la concentration cellulaire N de cette culture, sachant qu'une absorbance de 1 à 600 nm correspond à environ 4.10^8 UFC/mL
- Calculer alors la dilution nécessaire pour obtenir une suspension-inoculum permettant d'ensemencer le flacon de gélose Mueller-Hinton pour obtenir une concentration cellulaire finale de 10^6 UFC/mL dans la gélose avec un volume maximal de 5 mL de cette suspension-inoculum

Faire vérifier ces calculs par un examinateur (N, puis dilution de la culture et volume d'ensemencement pour le flacon de gélose)

- Préparer un volume suffisant de cette suspension-inoculum pour ensemencer le flacon de gélose.
- Ajouter 1 mL de solution de TTC dans le flacon de gélose Mueller-Hinton
- Ensemencer alors le flacon de gélose avec le volume (précédemment calculé) de suspension-inoculum, homogénéiser (sans provoquer la formation de bulles) et couler immédiatement dans la boîte carrée
- Lorsque la gélose a solidifié dans la boîte, sécher la surface de celle-ci pendant 15 min à l'étuve à 37°C

Compte-rendu :

- Indiquer, en détaillant les calculs, les étapes de cet ensemencement
- Que doit-on faire du flacon ayant contenu la gélose Mueller-Hinton après avoir coulé la boîte ?

3.3.2. Réalisation du dosage

Mode opératoire

- Préparer une gamme d'étalonnage, à partir de la solution étalon E1 à 40 U/mL, par dilutions géométriques de raison 2 en tampon pH=7 stérile : E2 = 20 U/mL E3 = 10 U/mL
E4 = 5 U/mL E5 = 2,5 U/mL
- Diluer, de même la solution inconnue I à 10^{-1} et à 10^{-2} en tampon pH=7 stérile
- Disposer à la pince les disques selon le schéma fourni sur la feuille de résultats
- Déposer alors, selon le même schéma, 10 μ L de chaque solution, étalon ou inconnue
- Laisser prédiffuser les solutions déposées pendant 30 min à la température du laboratoire, boîte à l'endroit
- Retourner la boîte et incuber à 37°C jusqu'au lendemain.

3.4. IDENTIFICATION DE LA SOUCHE PRODUCTRICE

On dispose du matériel suivant :

- 1 culture de la souche S sur gélose Sabouraud
- 1 flacon de bleu coton
- 1 lame porte-objet
- 1 morceau de ruban adhésif

Mode opératoire

- Déposer une goutte de bleu coton sur la lame
- Prélever la culture avec un morceau de ruban adhésif
- Déposer ce prélèvement dans la goutte de colorant
- Observer

Compte-rendu :

- Faire le dessin légendé de l'observation réalisée
- Identifier la souche en indiquant la démarche suivie.

Montrer le champ observé (qui a servi à la réalisation du dessin) ainsi que le compte-rendu correspondant à un examinateur

3^{ème} PARTIE

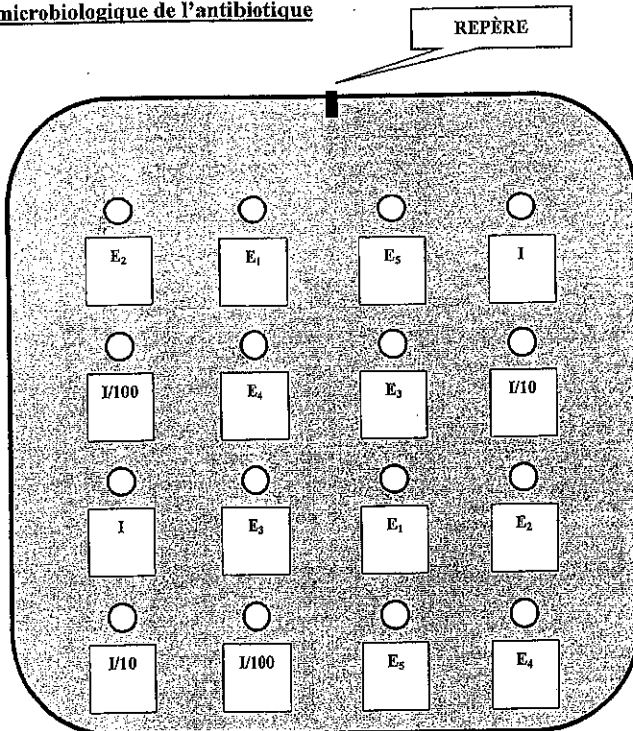
FEUILLE DE RÉSULTATS A JOINDRE AU COMPTE RENDU

Numéro de poste :

3.1. et 3.2. Détermination de la concentration de biomasse sèche

VOLUME DE PRÉLEVEMENT P (mL)	TARE DU FILTRE (g)	PESEE APRES DESSICCATION (g)

3.2. Dosage microbiologique de l'antibiotique



Calculatrice autorisée

PRODUCTION ET UTILISATION D'UN ANTIBIOTIQUE AU LABORATOIRE

DEUXIÈME JOUR

Durée : 2 heures

PRODUCTION ET DOSAGE DE L'ANTIBIOTIQUE AU LABORATOIRE

1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DE BIOMASSE SECHE

- Peser le filtre.

Compte-rendu

- Noter la valeur de la masse mesurée dans la feuille de résultats.
- Calculer la concentration de biomasse sèche du prélèvement « P ».

2. DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE L'ANTIBIOTIQUE PRODUIT.

- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition et consigner ces résultats sur la feuille fournie le 1^{er} jour.

Compte rendu

- Lorsque c'est possible, calculer les diamètres moyens des zones d'inhibition pour les solutions étalons, et récapituler ces résultats dans un tableau.
- Tracer la courbe des variations du diamètre moyen en fonction du logarithme décimal de la concentration en antibiotique sur papier millimétré.
- Exploiter graphiquement les résultats des inconnues, en justifiant brièvement le choix de la(des) valeur(s) retenue(s).
- Calculer la concentration en antibiotique dans le prélèvement « P ».

Conclusion

- Calculer la productivité spécifique exprimée en mg d'antibiotique par g de biomasse sèche. (6 µg de cet antibiotique correspondent à 10 U)

CARTOGRAPHIE PARTIELLE DU VECTEUR pGEM-penDE

Document à compléter et à joindre au compte-rendu

L'enzyme de restriction B hydrolyse l'ADN de λ en générant 14 fragments dont les tailles sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

- A l'aide de la photographie ou de l'enregistrement de l'image du gel illuminé en U.V., repérer chaque fragment de la piste 1.
- Coller le document de travail à droite du tableau.

Taille en pb	Distance du puits en mm
8454	
7242	
6369	
5686	
4822	
4324	
3675	
2323	
1929	
1371	
1264	
702	
224	Non visible
117	Non visible

- Sans réaliser de graphique et à partir des résultats expérimentaux précédents, évaluer la taille des fragments de restriction séparés et situés sur les pistes 2. et 3.

Piste n°2.		
Piste n°3.		

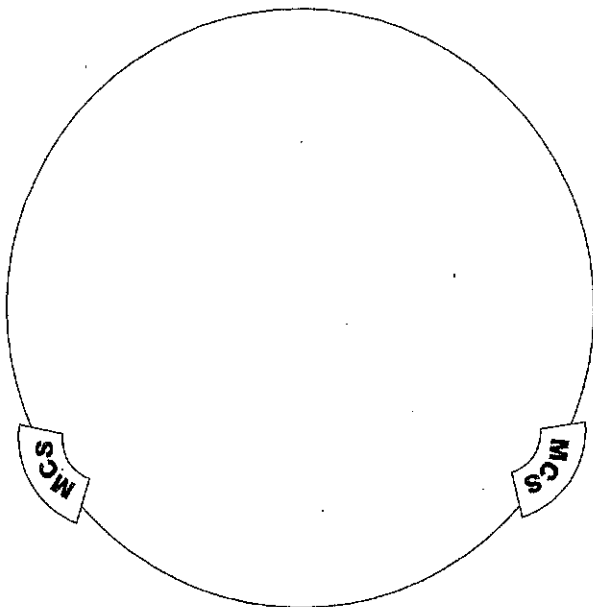
Document à compléter et à joindre au compte-rendu

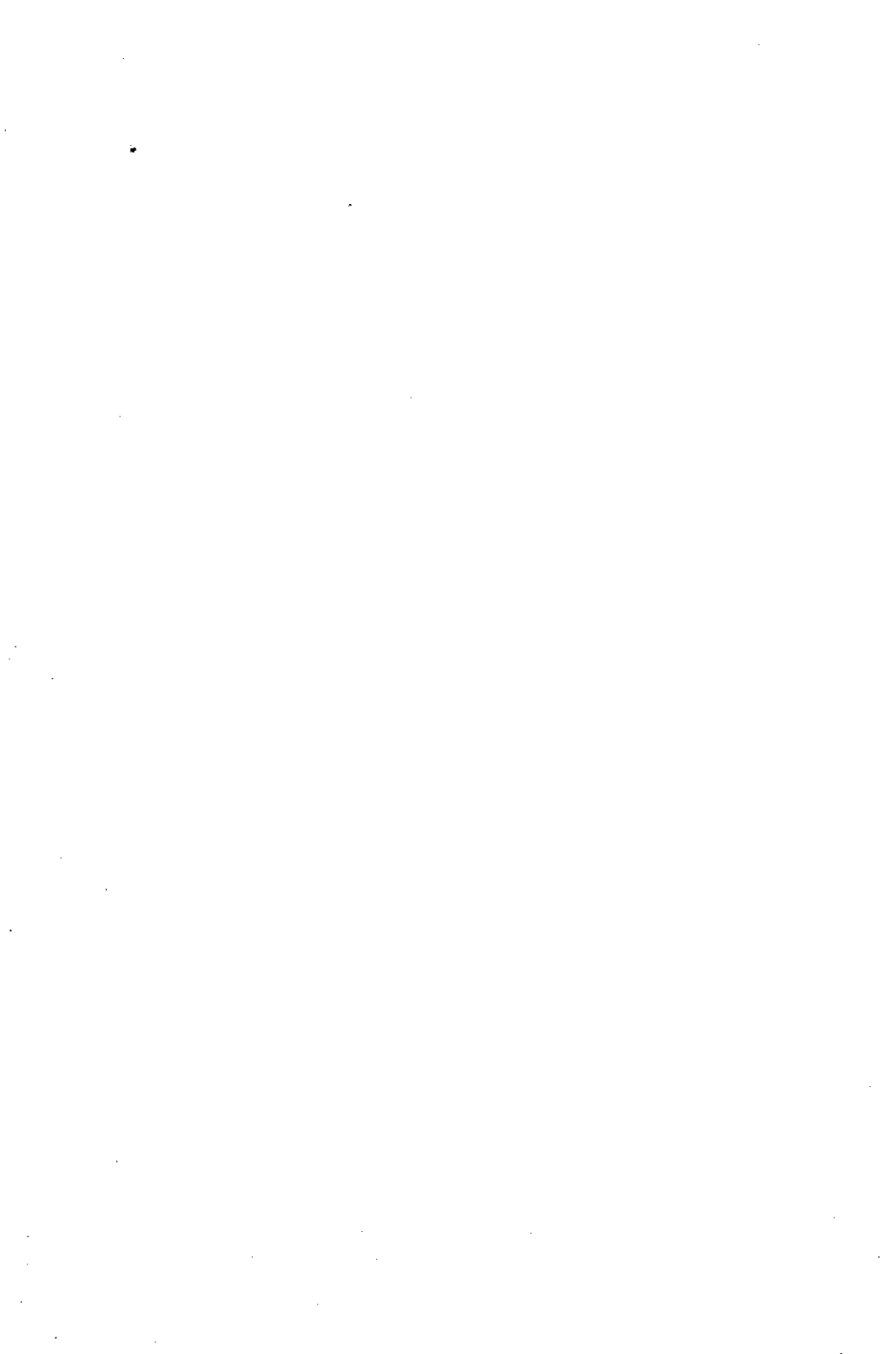
Les enzymes X et H ont chacun leur site unique situé dans l'un des deux sites multiples de clonage (MCS).

- Indiquer sur la figure ci-dessous, en justifiant les réponses :
 - la position des sites de restriction X et H
 - la dimension des segments en pb
 - la position du site B et la situation de l'insert
- Cette configuration vous semble-t-elle unique ? Justifier la réponse.

Donnée :

Plasmide non recombiné : 3100 pb.





Achévé d'imprimer le 3^e trimestre 2002
Directeur de la publication : Jean-Noël JOFFIN

**ANNALES
BTS BIOCHIMISTE
BTS BIOTECHNOLOGIE**

Sessions 2001/2002

**UPBM - Édition
Publications de l'UPBM**

**Consulter le site internet :
<http://www.upbm.net>**

ISBN 2-910069-36-2



9 782910 069360