



**ANNALES
BTS
BIOCHIMISTE
BTS
BIOTECHNOLOGIE**

**SESSIONS
2003/2004**

UPBM – ÉDILION

Lycée « La Martinière » 69338 LYON CEDEX 9
Publications de l'UPBM

Annales du 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 2003 :

- Français Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE 2003 p 1
Eléments de corrigé Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE 2003 p 5
- Anglais Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE 2003 p 5
Eléments de corrigé Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE 2003 p 6

Sujets spécifiques ou corrigés ne figurant que dans les annales du BTS Biotechnologie :

- Mathématiques p 2003-1
Eléments de corrigé p 2003-2
- Sciences physiques p 2003-5
Eléments de corrigé p 2003-7
- Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique p 2003-8
Proposition de corrigé p 2003-10
- Epreuve professionnelle de synthèse 1^{ère} partie : Etude de Projet p 2003-12
Proposition de corrigé p 2003-19
- Epreuve professionnelle de synthèse 2^{ème} partie :
Réalisation pratique d'opérations de Génie Biologique p 2003-21

Année 2004 :

- Français Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE 2004 p 1
Eléments de corrigé Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE 2004 p 5
- Anglais Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE 2004 p 6
Eléments de corrigé Voir les annales de BTS BIOCHIMISTE 2004 p 7

Sujets ou corrigés ne figurant que dans les annales du BTS Biotechnologie :

Remarque : nous n'avons pu recueillir à temps les éléments de corrigé des sujets de mathématiques et de sciences physiques et prions le lecteur de bien vouloir nous en excuser.

- Mathématiques p 2004-1
- Sciences physiques p 2004-3
- Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique p 2004-6
Proposition de corrigé p 2004-9
- Epreuve professionnelle de synthèse 1^{ère} partie : Etude de Projet p 2004-11
Proposition de corrigé p 2004-20
- Epreuve professionnelle de synthèse 2^{ème} partie :
Réalisation pratique d'opérations de Génie Biologique p 2004-22

SOUS-EPREUVE DE MATHÉMATIQUES

Durée : 2 heures

Coefficient : 1,5

Exercice 1 (11 points)

Partie A

On considère l'équation différentielle (E) : $4y' + y = 1200 e^{-x/4}$ où y est une fonction de la variable réelle x , définie et dérivable sur \mathbf{R} .

Déterminer la constante réelle a telle que la fonction h_1 définie par $h_1(x) = axe^{-x/4}$ soit solution de (E).

Résoudre l'équation différentielle (E_0) : $4y' + y = 0$ et en déduire les solutions de (E).

Déterminer la fonction h solution de (E) qui vérifie $h(6) = 0$.

Partie B

On considère la fonction f définie sur $[6 ; +\infty[$ par $f(x) = 300(x - 6)e^{-x/4}$

- Déterminer la limite de f en $+\infty$
- Montrer que $f'(x) = 75(10 - x)e^{-x/4}$.
- Étudier les variations de la fonction f sur l'intervalle $[6 ; +\infty[$ et donner son tableau de variations.
- Tracer la courbe représentative de f dans un repère orthogonal.
(unités graphiques : 0,5 cm sur l'axe des abscisses ; 1 mm sur l'axe des ordonnées)

Partie C

Une société veut vendre des machines destinées à certaines entreprises. Le prix de vente minimal est fixé à 10 000 euros. Le nombre prévisible, y , de machines vendues, est fonction du prix proposé, en millier d'euros, x . Une enquête auprès de clients potentiels a donné les résultats suivants :

x_i : prix proposé pour une machine en milliers d'euros	10	12.5	15	17.5	20	25
y_i : nombre prévisible de machines vendues au prix proposé	100	85	62	42	28	11

- Représenter les six points du nuage sur le graphique de la question B4.
 - On pose $z_i = \ln(x_i)$. Donner les valeurs de z arrondies au millième le plus proche.
 - Donner une équation de la droite de régression de z en x ; les coefficients seront arrondis au millième le plus proche.
 - En déduire une expression approchée de y de la forme $y = \alpha(x - 6)e^{\beta x}$.
- On admet dans cette question que le chiffre d'affaires est $g(x) = xf(x)$ pour $x \geq 10$, où x est le prix proposé en milliers d'euros et f la fonction définie dans la partie B. En étudiant les variations de la fonction g déterminer pour quel prix le chiffre d'affaires est maximal et donner la valeur du maximum.

Exercice 2 (9 points)

Deux machines M_A et M_B produisent, en grande série, des objets de masse théorique 180 grammes.

Partie 1

On note X_A (respectivement X_B) la variable aléatoire qui, à un objet pris au hasard dans la production de la machine M_A (respectivement M_B) associe sa masse en grammes. On sait que X_A (respectivement X_B) suit une loi normale de moyenne m_A (respectivement m_B) et d'écart-type σ_A (respectivement σ_B). Un objet est conforme si sa masse est comprise entre 178 g et 182 g.

- On donne $m_A = 179,8$ et $\sigma_A = 1$. Calculer la probabilité qu'un objet pris au hasard dans la production de la machine M_A soit conforme.
- On donne $m_B = 180$ et on sait que 98 % des objets fabriqués par la machine M_B sont conformes. Calculer l'écart-type σ_B (résultat arrondi au centième).

Partie 2

Dans la production totale, 40 % des objets proviennent de la machine M_A et 60% de la machine M_B . La machine M_A produit 5% d'objets non conformes et la machine M_B en produit 2 %.

1. On prélève au hasard un objet dans la production. Calculer la probabilité que cet objet soit conforme.
2. On prélève au hasard un objet dans la production et on constate qu'il est conforme. Quelle est alors la probabilité (arrondie au millième) que cet objet provienne de la machine M_A ?

Partie 3

On admet que 96,8% des objets de la production sont conformes. Les objets sont stockés par boîtes de vingt. On désigne par Y la variable aléatoire qui associe à une boîte prise au hasard le nombre d'objets conformes de cette boîte.

1. Donner les paramètres de la loi binomiale suivie par Y .
2. On choisit une boîte au hasard dans la production. Calculer la probabilité des événements suivants :
 - tous les objets sont conformes ;
 - au moins dix-huit objets sont conformes.

Partie 4

On admet que la variable aléatoire X qui associe à un échantillon de taille 100 sa masse moyenne en grammes suit une loi normale de moyenne m et d'écart-type 0,092.

La valeur exacte de la masse moyenne m des objets étant inconnue., on prélève au hasard un échantillon de 100 objets dont la masse moyenne est 179,93g. Déterminer un intervalle de confiance, au seuil de risque 10%, de la valeur de m .

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 n°1

Partie A

1. $h_1(x)$ est solution de l'équation (E) donc : $4h_1'(x) + h_1(x) = 1200 e^{-\frac{1}{4}x}$

soit : $4a e^{-\frac{1}{4}x} - ax e^{-\frac{1}{4}x} + ax e^{-\frac{1}{4}x} = 1200 e^{-\frac{1}{4}x}$, on obtient $a=300$.

2. Résolution de l'équation différentielle

- résolution de (E_0) $4y' + y = 0$ ou $y' + \frac{1}{4}y = 0$

la solution générale de l'équation différentielle (E_0) est : $y_0(x) = C e^{-\frac{1}{4}x}$

- résolution de (E)

la solution générale de (E) est donc : $y(x) = C e^{-\frac{1}{4}x} + 300x e^{-\frac{1}{4}x}$

vérification....

3. la solution h qui vérifie $h(6) = 0$ est alors donnée par **$h(x) = 300(x - 6) e^{-\frac{1}{4}x}$**

Partie B

Soit f la fonction définie sur $[6 ; +\infty[$ par : $f(x) = 75(10 - x) e^{-\frac{1}{4}x}$

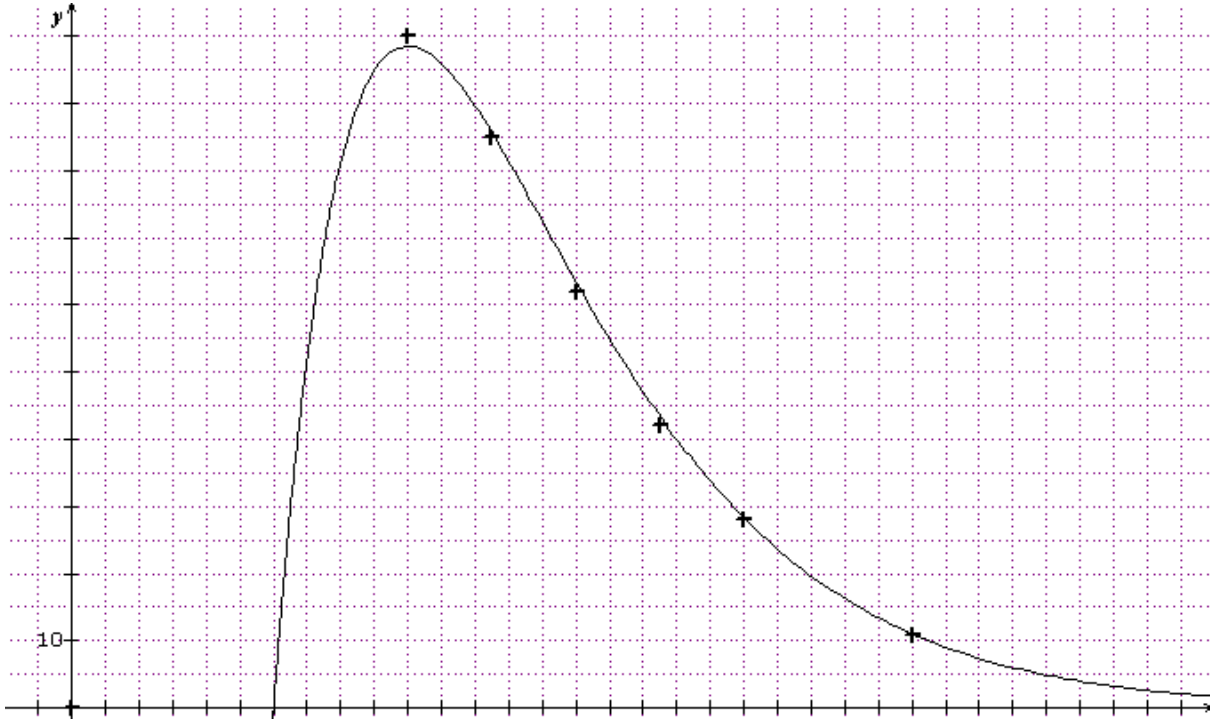
1. **$\lim_{x \rightarrow +\infty} f(x) = 0$**

2. **$f'(x) = 75(10 - x) e^{-\frac{1}{4}x}$**

3. Pour étudier les variations de f sur $[0 ; 6[$, on étudie le signe de $f'(x)$ d'où le tableau page suivante

x	6	10	$+\infty$
$f'(x)$	+	0	-
$f(x)$	0	$1200 e^{-\frac{1}{2}}$	0

courbe :



Partie C

1.

a. nuage de points dans le repère précédent.

b. on pose $z_i = \ln\left(\frac{y_i}{x_i - 6}\right)$

x_i	10	12.5	15	17.5	20	25
z_i	3.219	2.571	1.930	1.295	0.693	-0.547

c. équation de la droite de régression de z en x (à la calculatrice)

$$z = -0.251x + 5.705$$

d. On a $z = \ln\left(\frac{y}{x-6}\right)$ et $z = -0.251x + 5.705$

$$\text{D'où : } \frac{y}{x-6} = e^{-0.251x + 5.705}$$

$$\text{soit : } y(x) = 300(x-6)e^{-0.251x}$$

2.

Le chiffre d'affaires est donné par $g(x) = x f(x)$ avec $x \geq 10$ et x en milliers d'euros.

$$\text{on a donc } g(x) = 300x(x-6)e^{-\frac{1}{4}x}$$

Pour étudier les variations de g, on étudie le signe de sa dérivée :

$$g'(x) = 75 e^{-\frac{1}{4}x} (-x^2 + 14x - 24)$$

le signe de $g'(x)$ est celui de $p(x) = -x^2 + 14x - 24$

On a $\Delta = 100$. p(x) a donc deux racines 12 et 2.

On en déduit le tableau de signes suivant :

x	10	12	$+\infty$
$g'(x)$	+	0	-

La fonction g admet donc un maximum pour $x = 12$

Le chiffre d'affaires est maximal pour un prix de vente de 12 000 € .

$g(12) \approx 1075$ donc le chiffre d'affaires maximal est 1 075 000 €.

Exercice n°2 :

Partie 1

On a X_A la variable aléatoire qui, à un objet pris au hasard dans la production de la machine M_A associe sa masse m_A .

On a X_B la variable aléatoire qui, à un objet pris au hasard dans la production de la machine M_B associe sa masse m_B .

Un objet est conforme si sa masse est comprise entre 178g et 182g.

1. On donne $m_A = 179.8$ et $\sigma_A = 1$.

X_A suit donc la loi normale $\mathcal{N}(179.8 ; 1)$.

D'où $P(178 \leq m \leq 182) = P(-1.8 \leq T \leq 2.2)$ avec $T = \frac{m - 179.8}{1}$

$$= \Pi(2.2) - \Pi(-1.8)$$

$$= 0.9861 - 1 + 0.9641$$

$P(178 \leq m \leq 182) = 0.9502$

2. On donne $m_B = 180$.

X_B suit donc la loi normale $\mathcal{N}(180 ; \sigma)$ et on sait que $P(178 \leq m \leq 182) = 0.98$ donc :

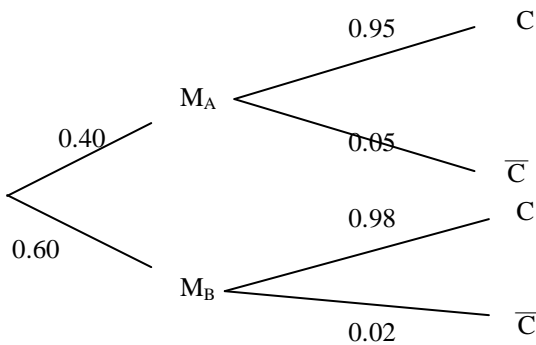
$$P\left(-\frac{2}{\sigma} \leq T \leq \frac{2}{\sigma}\right) = 0.98 \text{ avec } T = \frac{m - 180}{\sigma} \text{ ou encore :}$$

$$2\Pi\left(\frac{2}{\sigma}\right) - 1 = 0.98$$

On trouve alors que $\frac{2}{\sigma} \approx 2.33$ soit que **$\sigma \approx 0.86$**

Partie 2

On peut résumer l'énoncé par l'arbre de probabilité suivant :



1. On en déduit que :

$$P(C) = 0.40 \times 0.95 + 0.60 \times 0.98$$

$$= 0.968$$

2. On cherche la probabilité que l'objet provienne de la machine M_A sachant qu'il est conforme, soit :

$$P(M_A/C) = \frac{P(M_A \cap C)}{P(C)}$$

$$= \frac{0.4 \times 0.95}{0.968}$$

$P(M_A/C) \approx 0.393$

Partie 3

1. Y suit la loi binomiale $\mathcal{B}(20; 0.968)$

2. On cherche $P(Y=20) = C_{20}^{20} 0.968^{20} 0.032^0$

$$P(Y=20) \approx 0.522$$

puis $P(Y \geq 18) = P(Y=18) + P(Y=19) + P(Y=20)$

$$P(Y \geq 18) \approx 0.9751$$

Partie 4

\bar{X} suit la loi $\mathcal{N}(m; 0.092)$ ou $T = \frac{\bar{X} - m}{0.092}$ suit la loi $\mathcal{N}(0; 1)$.

On cherche t tel que $P(-t \leq T \leq t) = 0.90$

$$2 \Pi(t) - 1 = 0.90$$

soit

$$t = 1.645$$

On en déduit l'intervalle : $[179.93 - 1.645 \times 0.092; 179.93 + 1.645 \times 0.092] = [179.78; 180.08]$.

Il y a donc 90% de chance que la masse moyenne des objets de toute la production soit dans l'intervalle [179.78 ; 180.08]. (seuil de risque 10 %)

SOUS-EPREUVE : SCIENCES PHYSIQUES

Durée : 2 heures

Coefficient : 2,5

EXERCICE I : chimie organique (20 points)

On considère les deux composés organiques suivants :

(a) $\text{CH}_3\text{—CHO}$

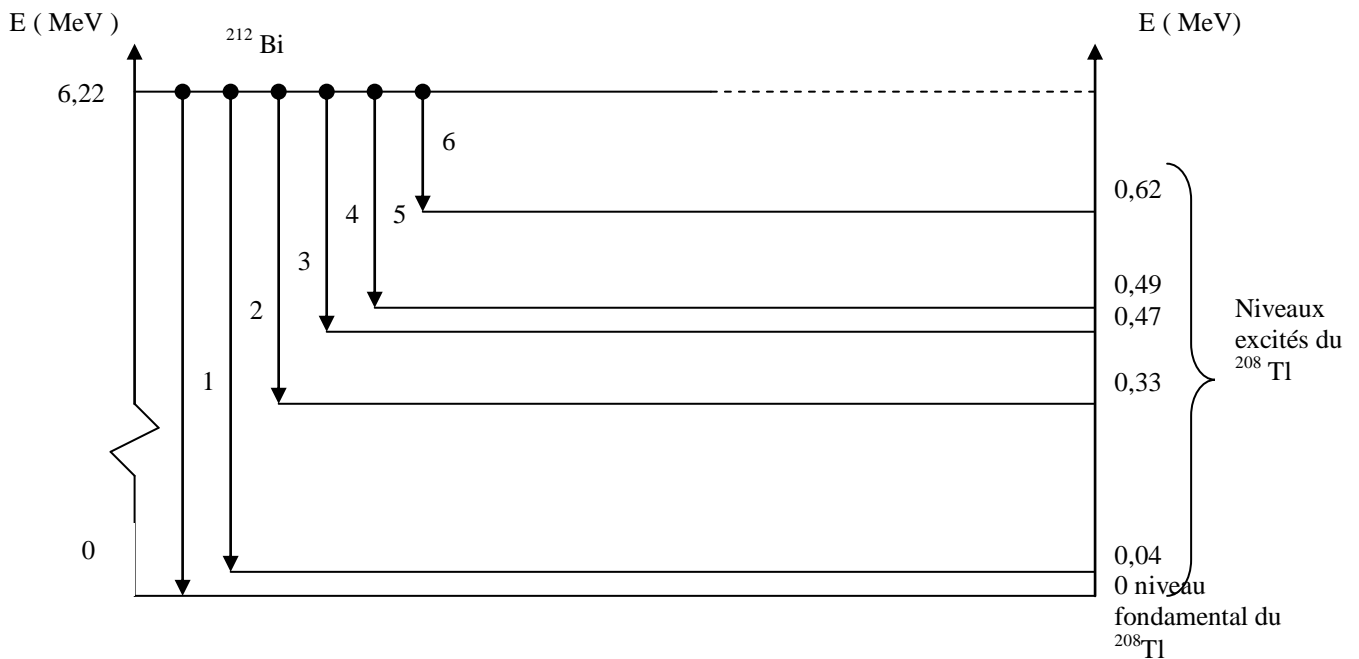
(a') le 2,2-diméthylpropanal.

- Donner le nom de (a). Ecrire la formule semi-développée de (a'). Quelle est la fonction commune à ces deux composés ?
- Lequel de ces deux composés (a) et (a') possède un hydrogène en α d'un groupement carbonyle ? Justifiez la mobilité de cet hydrogène.
- On fait réagir le composé (a) en milieu basique (HO^-) :
 - Ecrire le mécanisme de cette réaction. Donner le nom du produit (b) obtenu.
 - Combien d'isomères de configuration le produit (b) possède-t-il ? Justifier. Représenter ces isomères en projection de Cram et les nommer.
 - Le produit (b) est déshydraté en milieu acide, on obtient un produit (c). Ecrire l'équation-bilan de la réaction de déshydratation. Représenter les différents stéréo-isomères de (c) en précisant leur configuration Z ou E.
- Les produits (a) et (a') possèdent tous les deux une fonction identique. Pourtant, ils n'obéissent pas au même mécanisme réactionnel et ne conduisent pas au même type de produit.
 - Expliquer pourquoi.
 - La réaction de (a') en milieu basique conduit aux produits organiques suivants :

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3\text{—C—C} \\ | \quad \backslash \\ \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \text{CH}_3 \quad \text{O}^- \end{array}$$

et

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{H} \\ | \quad | \\ \text{CH}_3\text{—C—C—OH} \\ | \quad | \\ \quad \quad \text{CH}_3 \quad \text{H} \end{array}$$
 - C'est une réaction de dismutation. Expliquer pourquoi.

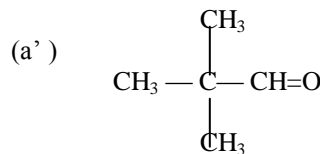


PROPOSITION DE CORRIGE

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 : chimie organique (20 points)

1.
CH₃—CHO éthanal



Tous deux possèdent le groupe — CHO : ce sont des aldéhydes.

2. le composé (a) a un hydrogène en α CH₃—CHO

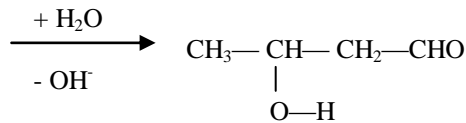
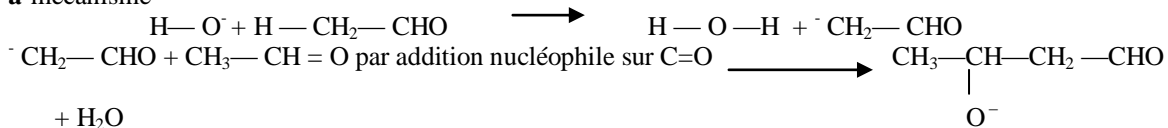
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{C}=\text{O} \end{array}$

effet inducteur attracteur de l'oxygène dans le groupe carbonyle

ce qui augmente la polarité des liaisons C—H

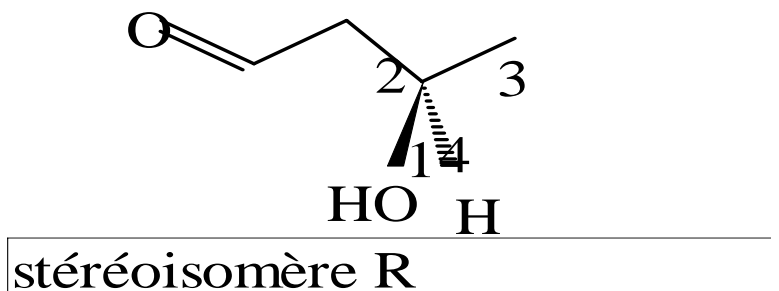
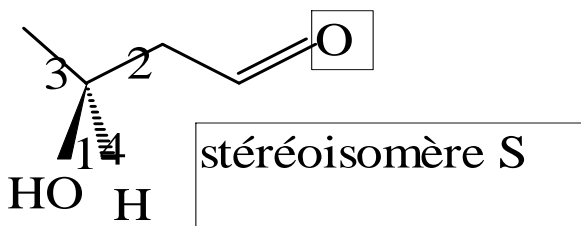
effet mésomère accepteur du groupe carbonyle, stabilisant l'anion $\xi^- \text{CH}_2-\text{CH}=\text{O} \leftrightarrow \text{CH}_2=\text{CH}-\text{O}^- \xi$

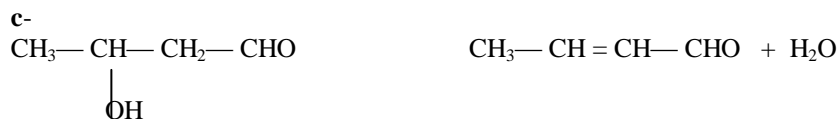
3. a-mécanisme



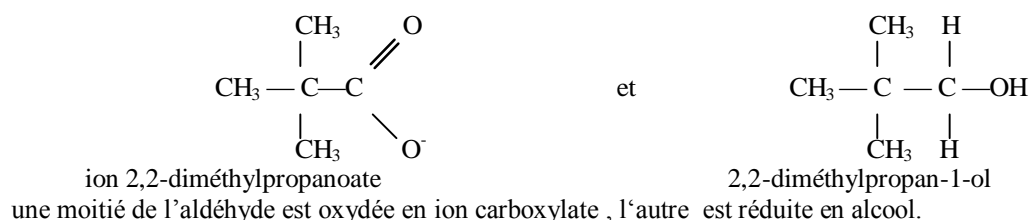
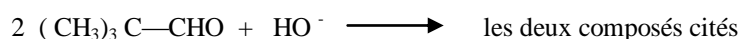
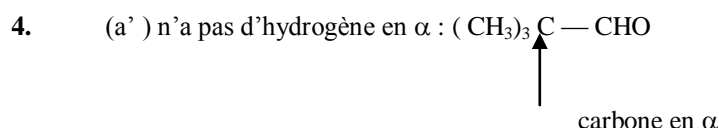
composé nommé : 3-hydroxybutanal

b- 2 stéréoisomères, 2 énantiomères, présence d'un carbone asymétrique (4 substituants différents sur un carbone hybridé sp³)





La réaction de (a') en milieu basique conduit aux produits organiques suivants :



Réaction de dismutation : un composé conduit à deux produits ayant l'un un degré d'oxydation plus élevé (le composé dismuté a été oxydé), l'autre plus faible (le composé dismuté a été réduit)

EPREUVE : SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GENIE BIOLOGIQUE

Durée : 4 heures

Coefficient : 6

Calculatrices non autorisées.

Production d' α -amylase thermostable par *Bacillus* et son utilisation en glucoserie

Les industries agroalimentaires et pharmaceutiques utilisent des millions de tonnes de glucose ou dérivés de glucose. Ces produits n'existent qu'en faible quantité à l'état naturel mais en grande quantité sous forme de glucides de réserve (amidon, cellulose).

Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des moyens de transformation de ces réserves. Il s'agit là d'une des principales activités des industries de glucoserie.

Ces transformations sont fondées essentiellement sur l'utilisation d'enzymes hydrolytiques dont l' α -amylase.

Il faut donc produire cette enzyme, le plus souvent par voie microbiologique, puis définir les conditions de son utilisation.

1. Sélection et amélioration d'une souche de *Bacillus* productrice d' α -amylase (45 points)

1.1. Sélection de souches productrices d' α -amylase.

- 1.1.1. Indiquer les caractères distinctifs du genre *Bacillus* et citer l'espèce toujours pathogène.
- 1.1.2. Présenter une méthode de traitement d'un échantillon de sol permettant une présélection du genre *Bacillus*.
- 1.1.3. Un milieu de culture est utilisé pour sélectionner les souches possédant l'activité α -amylasique. Donner la nature de la (des) source(s) de carbone et d'azote. Justifier les réponses.
- 1.1.4. Expliquer le principe de la mise en évidence de l'activité de l' α -amylase.
- 1.1.5. Le milieu de culture ne contient pas de glucose. Quel mécanisme de régulation veut-on ainsi éviter ?

- 1.1.6. La régulation de l'expression du gène codant l' α -amylase est soumise à un contrôle du type opéron lactose. Décrire, à l'aide de schémas, le fonctionnement de cet opéron.

1.2. Amélioration des souches sélectionnées.

Les souches bactériennes précédemment sélectionnées révèlent une production d' α -amylase insuffisante. On cherche à augmenter la synthèse et l'excrétion de l'enzyme par génie génétique. Pour ce faire on utilise un vecteur d'expression.

- 1.2.1. Définir le terme vecteur d'expression.
1.2.2. Donner les caractéristiques essentielles d'un vecteur d'expression.
1.2.3. On introduit dans un vecteur d'expression une séquence d'ADN codant un peptide signal.
1.2.3.1. Quel est l'intérêt de rajouter cette séquence dans la stratégie de production d' α -amylase ?
1.2.3.2. Décrire le mode d'action du peptide signal. Justifier ce mode d'action par la composition du peptide signal.
1.2.4. Présenter (éventuellement sous forme de schémas) les principales étapes du clonage d'un gène de l' α -amylase jusqu'à l'obtention d'un clone d'intérêt et ce, en utilisant un plasmide comme vecteur d'expression.

2. Production industrielle de Voc-amylase (30 points)

- 2.1. La souche recombinée a été utilisée pour une production à grande échelle en fermenteur aéré de type « batch » (bioréacteur à milieu non renouvelé).
Proposer un schéma annoté de ce type de fermenteur. Schématiser les dispositifs permettant l'enregistrement en ligne des principaux paramètres.
2.2. Certains de ces paramètres sont régulés. Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire de « boucles de régulation ». Schématiser une boucle de régulation en indiquant les divers éléments qui la constituent et leurs interrelations.
2.3. Le dioxygène dissous est un paramètre critique tant d'un point de vue métabolique que d'un point de vue technologique. Expliciter son rôle dans la réoxydation des coenzymes réduits.
2.4. En quoi le dioxygène est-il un paramètre critique d'un point de vue technologique ?
2.5. Le $K_L a$ est un paramètre lié à l'aération du fermenteur. Quel est l'intérêt de la détermination de ce paramètre ? Quelle en est l'unité ? Comment le détermine-t-on en présence d'une culture bactérienne ?

3. Utilisation industrielle de l' α -amylase (16 points)

L'enzyme produite est utilisée en glucoserie pour transformer du lait d'amidon.

- 3.1. A quelle classe de glucide l'amidon appartient-il ?
Donner la composition et la structure complète de l'amidon sous forme de schéma.
Indiquer la structure de(s) monomère(s) et le type de liaisons qui les relient entre eux.
Identifier les extrémités réductrices et non réductrices des molécules d'amidon sur le schéma. Justifier la réponse.
3.2. L' α -amylase est une α (1 \rightarrow 4) D glucane hydrolase.
A l'aide de formules semi-développées, écrire la réaction d'hydrolyse que catalyse cette enzyme. Indiquer, sur le schéma de l'amidon précédemment réalisé, les sites de coupure reconnus par l' α -amylase et citer les produits et les sous-produits d'hydrolyse obtenus.
3.3. L' α -amylase est active sur le glycogène mais pas sur la cellulose. Expliquer ces deux observations.

4. Valorisation du lait d'amidon (29 points)

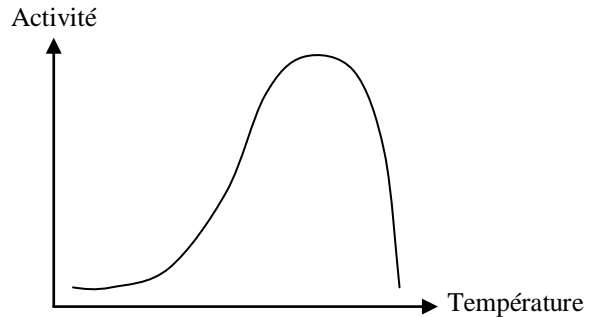
- 4.1. Le lait d'amidon est traité dans un premier temps par l' α -amylase à 88°C pendant 1 h 30 min.
La courbe du document I représente l'activité d'une α -amylase en fonction de la température.
4.1.1. Interpréter cette courbe.
4.1.2. Certaines enzymes industrielles sont dites « thermostables » ; préciser le sens de ce terme. Indiquer l'intérêt de leur utilisation.
4.1.3. Tracer sur le graphe du document I la courbe représentant l'activité d'une α -amylase thermostable en fonction de la température. Justifier.
4.1.4. Proposer deux démarches générales permettant l'obtention d'enzymes thermorésistantes.

4.2. Une des utilisations majeures du sirop de glucose obtenu consiste à le soumettre à l'action d'une glucose isomérase immobilisée.

- 4.2.1. Ecrire la réaction catalysée par la glucose isomérase (formules non demandées).
- 4.2.2. Quel est le nom classiquement donné au produit obtenu et sa principale propriété ?
- 4.2.3. Préciser l'intérêt de l'immobilisation d'une enzyme dans le cadre d'une production industrielle.
- 4.2.4. Indiquer les deux grands types d'immobilisation d'enzymes et préciser en le justifiant, le procédé qui est a priori le plus adapté dans le cadre de l'utilisation présentée ici.

DOCUMENT 1 (à rendre avec la copie)

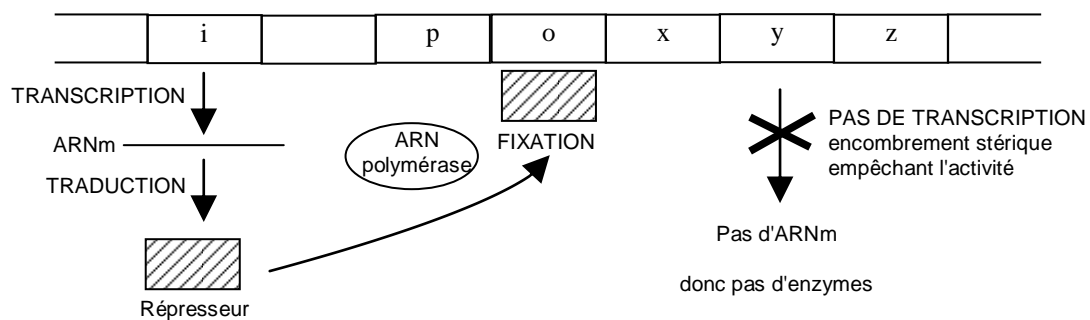
Activité d'une α -amylase en fonction de la température



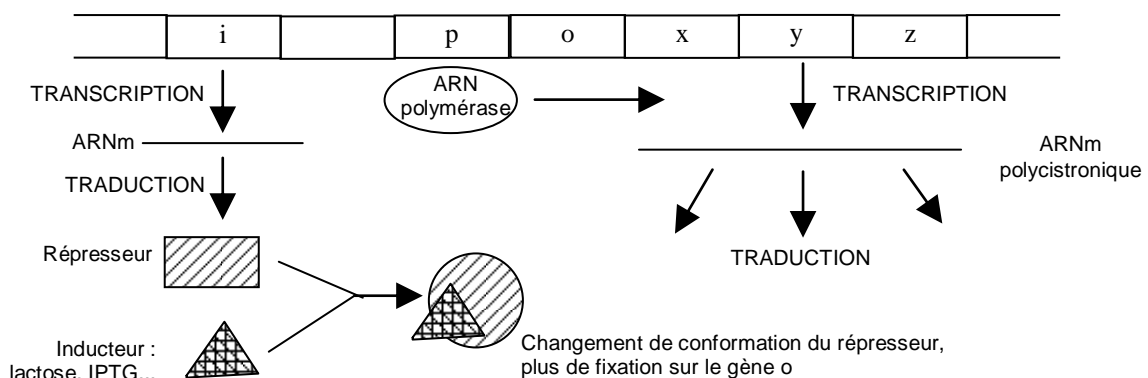
PROPOSITION DE CORRIGE

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.

- 1.1.1 : Caractéristiques : Bacilles Gram+, sporulés, aérobies, non exigeants, catalase+
Espèce pathogène : *Bacillus anthracis* (homme), *Bacillus thuringiensis* (insectes)
- 1.1.2 : Traitement de l'échantillon par la chaleur (10 min à 80°C)
* élimination des formes végétatives
* restent les spores thermorésistantes de *Bacillus*, non détruites
- 1.1.3 : Source de carbone : lait d'amidon (ou amidon soluble) comme **seule** source de carbone, seules les bactéries amylases + y cultiveront
Source d'azote minérale : NH_4^+ (ou NO_3^- , si NR+), une source organique d'azote risquerait d'être utilisée comme source de carbone, alors les souches amylases – y cultiveraient.
- 1.1.4 : Utilisation de lait d'amidon, le milieu gélosé est blanc. Une activité amylasique peut être révélée par un halo d'éclaircissement autour de la colonie.
Rem.: on peut aussi utiliser un réactif iodé : apparition d'un halo non coloré sur fond bleu
- 1.1.5 : Répression catabolique : blocage par le glucose de l'expression des gènes d'utilisation de l'amidon
- 1.1.6 : **Opéron réprimé :**



Opéron induit :



- 1.2.1 : molécule d'ADN douée d'autoréplication permettant une synthèse importante d'une protéine d'intérêt dans une cellule hôte.
- 1.2.2 :
 * un ou plusieurs sites uniques de restriction (polylinker), situé(s) derrière le promoteur
 * promoteur **fort** et cadre de lecture correct et inductible
 * séquences d'initiation et de terminaison de la transcription et traduction
 * marqueur de sélection (ex : Amp^R)
 * ori : origine de réplication
- 1.2.3.1 : L'intérêt d'ajouter un peptide signal est de faire excréter l' α -amylase dans le milieu de culture et de faciliter ainsi sa récupération, à moindre coût.
- 1.2.3.2 : Le peptide signal permet l'adressage d'une protéine = séquence d'acides aminés hydrophobes, il s'ancre dans la membrane et permet le passage du reste de la protéine.
- 1.2.4 : Digestion du vecteur par
 * une enzyme : extrémités cohésives : clonage non orienté
 * deux enzymes différentes : clonage orienté
- Extraction de l'ADN génomique « source » du gène et digestion par le(s) même(s) enzyme(s) que le vecteur.
 Insertion, ligature (ADN ligase, ATP)
 Transformation et sélection des transformants
 Repérage des transformants recombinés par inactivation d'un gène par insertion et criblage des recombinés avec insert d'intérêt dans le bon sens (activité de la protéine)
- 2.1 : Eléments attendus sur le schéma :
 * cuve, agitation (mécanique : pales, axe d'agitation, contrepalettes ou bulles)
 * dispositif d'aération + sortie d'air
 * sondes (pH, température, O₂) + armoire de contrôle et de régulation
 * échangeur thermique
- 2.2 : Eléments attendus sur le schéma :
 * capteur / sonde : transforme un phénomène physicochimique en signal électrique : i ou ΔE
 * comparateur : comparaison de la valeur mesurée à la valeur de consigne
 * (régulateur), création d'un signal électrique fonction de l'écart entre mesure et consigne
 * actionneur – effecteur (pompe ou moteur) : correction du paramètre mesuré
- 2.3 : nécessité du recyclage du NAD, dans la chaîne respiratoire après un transfert progressif d'électrons jusqu'à l'O₂ (accepteur final)
- 2.4 : paramètre critique car l'O₂ est peu soluble or l'O₂ utilisable est celui dissout
- 2.5 : quantification de la capacité ou vitesse de transfert de l'oxygène de l'air injecté à la phase liquide
 unités : t⁻¹
 méthode dynamique : arrêt de l'aération
 remise en route lorsque l'O₂ est presque totalement consommé
 suivi de $C_L = f(t)$
 graphe secondaire : $dC_L/dt = f(C^* - C_L)$, $K_L a$ est la pente de ce graphe (C^* : concentration à saturation en O₂)
- 3.1 : L'amidon est un polyholoside car il est constitué uniquement d'unités « ose ». Plus précisément, c'est un homoglycane car il ne contient qu'un seul type d'ose : le glucose
 L'amidon est constitué d'un mélange de 2 polyholosides distincts :
 * l'amylose : polyside non ramifié dans lequel les unités de glucose sont liées par des liaisons osidiques $\alpha 1 \rightarrow 4$ (schéma d'une hélice)
 * l'amylopectine présente en plus des ramifications grâce aux liaisons $\alpha 1 \rightarrow 6$ (schéma d'une structure arborescente)
- 3.2 : réactions d'hydrolyse : formule développée de l'hydrolyse d'une liaison $\alpha 1 \rightarrow 4$
 produits d'hydrolyse sont : quelques molécules de glucose, quelques molécules de maltose, et principalement des dextrines
- 3.3 : le glycogène et un homoglycane dans lequel les molécules de glucose sont liées en $\alpha 1 \rightarrow 4$ et $\alpha 1 \rightarrow 6$ aux ramifications. Les liaisons osidiques sont donc dans la même configuration que celle de l'amidon. Le glycogène, comme l'amidon sont tous les deux des substrats de l' α -amylase puisqu'elle coupe spécifiquement $\alpha 1 \rightarrow 4$. Par contre la cellulose est un homoglycane dans lequel les molécules de glucose sont liées en $\beta 1 \rightarrow 4$. L' α -amylase est donc inactive sur ce substrat.
- 4.1.1 : La courbe est le résultat de 2 effets : courbe théorique d'activation thermique suivant la loi d'Arrhénius et courbe de dénaturation des protéines.
- 4.1.2 : Enzyme possédant une température critique élevée, non dénaturée à température élevée
 Intérêts :
 * possibilité d'utilisation à une température plus élevée
 * meilleure stabilité dans le temps pour une utilisation à une température donnée
 * fluidité plus importante des réactants car température plus élevée
 * contamination moins facile du fermenteur

- 4.1.3 : tracé sur le graphe : courbe avec phase d'activation prolongée et translation de la courbe vers les températures élevées (ou même courbe car thermostable)
- 4.1.4 : * sélection des souches (niches écologiques particulières, criblage...)
* mutagénèse dirigée (remplacement d'une base donc d'un Aam précis)
* mutagénèse aléatoire + criblage
- 4.2.1 : glucose ↔ fructose
- 4.2.2 : isoglucose ou sirop de fructose,
pouvoir sucrant plus élevé
- 4.2.3 : procédé en continu et recyclage de l'enzyme plus facile, stabilité accrue
récupération plus aisée du produit
- 4.2.4 : rétention à un support solide soit physiquement, soit par liaisons chimiques (covalentes ou non)
substrat petit : méthode indifférente
fixation chimique covalente : augmentation de la thermostabilité
adsorption ionique : renouvellement aisé
inclusion : facilité, faible coût, alginate, non toxicité

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE 1^{ère} partie : ETUDE DE PROJET Durée : 4 heures Coefficient : 4

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

1 feuille de papier millimétré.

La Taq polymérase

En 1983, Kary Mullis conçoit l'idée de la réaction d'amplification spécifique *m vitro* de l'ADN : la "Polymerase Chain Reaction" (PCR). L'ADN polymérase I d'*Escherichia coli*, utilisée à l'origine, était cependant irréversiblement dénaturée à chaque cycle.

En 1988, David Gelfand et ses collaborateurs isolèrent à partir de l'eubactérie thermophile *Thermus aquaticus* une enzyme qui devait devenir, sous le nom de Taq polymérase (EC 2.7.7.7), un outil majeur du génie génétique.

Depuis, cet outil ne cesse d'être amélioré. D'autres enzymes ont en effet été isolées à partir de bactéries thermophiles (eubactéries ou archaées) et toute une panoplie d'enzymes recombinantes sont commercialisées par des sociétés spécialisées.

En particulier, différents protocoles sont maintenant proposés pour réaliser une "hot start" PCR ou "démarrage à chaud" de la PCR.

Le sujet se propose d'aborder quelques aspects de cette recherche.

1. La purification originelle de la Taq polymérase (19 points)

Cette purification a nécessité de partir d'un grand volume de culture de *Thermus aquaticus* et a mis en jeu trois chromatographies successives sur colonne.

1.1. La culture de *Thermus aquaticus*

Le milieu et les conditions de culture sont indiqués dans le **Document 1**.

Indiquer et justifier le rôle de chacun des nutriments organiques du milieu de culture utilisé.

Préciser et justifier les conditions de culture mises en jeu.

1.2. La purification

Les cellules sont mises en culture pendant 20 h puis centrifugées. L'extraction de l'enzyme est réalisée sur le culot bactérien. Le tableau du **Document 2 A** indique les étapes chromatographiques mises en jeu ainsi que les résultats obtenus à l'issue de chaque étape.

1.2.1. L'activité enzymatique est mesurée selon le protocole du **Document 2 B**.

Dégager les étapes du protocole mis en jeu pour déterminer l'activité enzymatique.

1.2.2. Reproduire et compléter le tableau du **Document 2 A** en prenant comme référence pour les calculs l'extrait brut ("crude").

2. La production de Taq polymérase chez *E. coli* (35 points)

Par la suite, le gène de la Taq polymérase a été cloné chez *E. coli* à partir d'une banque génomique de *Thermus aquaticus*, puis séquence. Un clonage direct du gène est alors devenu possible, ce qui a permis de produire plus aisément l'enzyme, d'étudier sa relation structure-fonction et de l'améliorer.

2.1. Le clonage direct du gène

Le gène est amplifié spécifiquement à partir de l'ADN génomique de *Thermus aquaticus* puis inséré dans le site de clonage multiple (MCS) du plasmide pUC18.

La construction obtenue est utilisée, après ligature, pour transformer une souche hôte de *E. coli*.

Le **Document 3** présente :

- une brève présentation du principe du clonage
- les sites de restriction des enzymes utilisées
- une carte de restriction partielle du gène *Taq* avec les positions des amorces utilisées
- les séquences de ces amorces
- la carte du plasmide pUC18

2.1.1. L'amplicon formé doit subir une double digestion. Préciser laquelle et expliquer pourquoi.

2.1.2. Comparer les sites de restriction *Bam* HI et *Bgl* II.

Justifier le choix de ces 2 enzymes pour ce clonage (en plus d'*EcoR* I).

2.1.3. Montrer à l'aide d'un schéma que la stratégie utilisée conduit à une insertion orientée du gène *Taq* dans le vecteur pUC18 et représenter la construction obtenue.

Le **Document 4** reproduit les indications du vendeur de ces enzymes sur la composition des tampons de digestion fournis et les activités des enzymes dans ces tampons.

2.1.4. En déduire le tampon à utiliser lors de la double digestion de l'amplicon d'une part, et celui utilisé pour la digestion du vecteur d'autre part.

2.2. La production de Taq polymérase chez *E. coli*

Le vecteur recombinant pTAQ obtenu précédemment est utilisé pour exprimer le gène *Taq* sous la dépendance du promoteur Lac.

La thermostabilité de l'enzyme rend possible son extraction et sa purification en une seule étape.

Le **Document 5** présente le protocole mis en œuvre (5A) et le résultat de l'électrophorèse (SDS-PAGE) de contrôle (5B).

2.2.1. Pourquoi procède-t-on à une addition d'IPTG ?

2.2.2. Dégager le principe de l'extraction et de la purification à partir du document 5A.

2.2.3. Quel est le pourcentage final de glycérol et quelle est la dilution finale du lysat congelé ?

2.2.4. Analyser le document 5B et conclure quant à l'efficacité de la purification.

2.2.5. La taille de la protéine obtenue est-elle en accord avec la taille du gène du document 3 ?

Donnée : masse molaire moyenne d'un acide aminé : 110 g.mol^{-1}

2.3. Une Taq polymérase recombinante

Le **Document 6** présente un alignement informatique des séquences protéiques de la Taq polymérase (Taq) et de l'ADN polymérase I d'*E.coli* (pol), enzyme possédant les 3 domaines suivants :

activité exonucléase 5' \Rightarrow 3'	activité exonucléase 3' \Rightarrow 5'	activité polymérase 5' \Rightarrow 3'
Acides aminés 1 à 323	Acides aminés 324 à 517	Acides aminés 521 à 928

Analyser les homologies de séquences résultant de cet alignement et conclure quant aux domaines susceptibles d'être présents dans la Taq polymérase.

3. Un procédé de « hot start » (26 points)

La Taq polymérase possède à la température du laboratoire une activité non négligeable qui peut conduire à des amplifications non spécifiques consécutives à des appariements indésirables des amorces avec l'ADN matrice lors de la préparation du milieu réactionnel.

Pour éviter ces risques, on effectue un "démarrage à chaud" de l'amplification en faisant en sorte que l'enzyme ne soit active qu'après la montée en température du premier segment du premier cycle.

Plusieurs procédés ont été développés, parmi lesquels l'utilisation d'un anticorps monoclonal neutralisant.

3.1. L'obtention et le criblage des clones d'hybridomes producteurs

Les anticorps monoclonaux dirigés contre l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* sont préparés en utilisant des cellules sensibilisées de souris ou de rats immunisés par PADN polymérase, selon le procédé classique.

- 3.1.1. Rappeler les grandes étapes de la préparation d'anticorps monoclonaux.
- 3.1.2. A l'aide du **Document 7**, expliquer le principe de la sélection des hybrides.
- 3.1.3. Les puits contenant des hybridomes obtenus après 10 jours de culture sont testés pour leur capacité à synthétiser des anticorps monoclonaux contre l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (criblage). Le protocole du criblage des hybridomes sécréteurs est décrit dans le **Document 8**.
- 3.1.4. Schématiser le principe du criblage des puits contenant des hybridomes.
- 3.1.5. Quels sont les rôles des réactifs : "gelatin" et "tween 20 0,05 % in phosphate buffered salin" ?
- 3.1.6. Quels sont les témoins réalisés pour valider cet ELISA ? Donner la composition qualitative de ces témoins, le résultat attendu et le rôle de chacun d'eux.

3.2. Etude des anticorps obtenus

A l'issue du criblage, plusieurs surnageants ont été trouvés positifs.

L'effet inhibiteur des différents anticorps monoclonaux vis à vis de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* est ensuite testé selon 2 protocoles différents rapportés dans le **Document 9**.

- 3.2.1. Dans la perspective de l'utilisation d'un procédé "hot start" PCR justifier les températures mises en jeu dans les protocoles 1 et 2.
Que teste-t-on dans le protocole 1 ? Que vérifie-t-on dans le protocole 2 ?
- 3.2.2. Que peut-on conclure de l'analyse des résultats obtenus lors de la mise en œuvre du protocole 1 ?
Comment qualifier les anticorps étudiés ?
- 3.2.3. Que peut-on déduire des résultats du protocole 2 ?
- 3.2.4. Quel anticorps monoclonal est-il préférable d'utiliser pour éviter la formation de produits non spécifiques au cours de la PCR ? Justifier ce choix.

DOCUMENT 1

Culture medium

Cells were grown in a defined mineral salts medium (CaSO₄, MgSO₄, NaCl, KNO₃, NaNO₃, ZnSO₄, H₃BO₃, CuSO₄, NaMoO₄, CoCl₂, FeCl₃, MnSO₄, Na₂HPO₄) containing 0.3 % glutarnic acid, biotin and thiamin (0,1 mg/L each) and nicotinic acid (0,05 mg/L).

Growth conditions

Cells were grown initially in 500 mL Erlenmeyer flasks at 75°C in a water bath shaker. When the cultures reached a density of approximately 170 Klett units, 1 liter of these cells was transferred to 16-liter bioreactor, which were placed in hot-air incubators. In place of shaking, sterile air was bubbled through the cultures, and the temperature was maintained at 75°C. The cells were allowed to grow for 20 h before they were collected with continuous-flow centrifuge.

DOCUMENT 2

2A

Summary of the purification procedure

Fraction	volume (mL)	Total polymerase activity (U)	Total protein (mg)	Yield of activity (%)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
« Crude »	176	2,080	975	100		1
DEAE-Sephadex	210	1,982	197			
Phosphocellulose	132	1,900	16			
DNA-cellulose	63	0,685	ND			

ND : non déterminable par suite de l'ajout de BSA indispensable pour enrayer la perte d'activité.

2B

DNA polymerase assays

The reaction mixture (125 μ L) contained : tris buffer (pH 8, 25 mM) ; $MgCl_2$, 10 mM ; KCl, 25 mM ; 2-mercaptoethanol, 1 mM ; dCTP, dGTP and dTTP (150 μ M each) ; [3H]dATP (150 μ M, specific activity : 38 mCi/mmol) and activated calf thymus DNA template, 12,5 μ g.

Activated calf thymus DNA template is a double-stranded molecule which has gaps in portions of either strand, which gaps are filled by the appropriate dNTPs using the DNA polymerase.

After 30 minutes of incubation with enzymatic extracts at 80°C in sealed tubes, the assay was stopped by chilling the tubes in an ice bath. Samples of 100 μ L were then pipetted onto filter paper disks and immediately dropped into ice-cold 10% trichloroacetic acid containing 0.1 M sodium pyrophosphate for at least 1 h.

Finally, the disks were washed in ether-ethanol, air dried and the amount of [3H] dATP incorporated into an acid-insoluble product was measured in a scintillation spectrometer.

One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme that will incorporate 10 nmol of [3H]dATP into acid-insoluble material at 80°C in 30 min.

DOCUMENT 3

Construction of the Expression Vector

Briefly, genomic DNA was isolated from *T. aquaticus* and used as a template to amplify the Taq DNA polymerase gene by Polymerase Chain Reaction (PCR). The Forward primer creates a unique *EcoR* I restriction cut site and the Reverse primer creates a unique *Bgl* II restriction cut site.

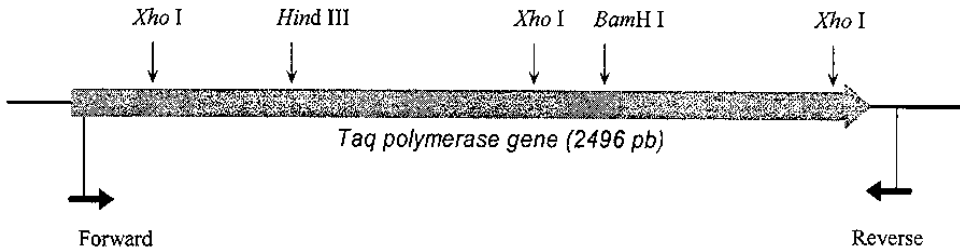
The resulting amplification product was digested with *EcoR* I and *Bgl* II and cloned into pUC 18 digested with *EcoR* I and *Bam* HI.

This vector was designated pTAQ and transformed into *DH5 α E. coli* by Hanahan's method for bacterial transformation.

Sites de restriction des enzymes utilisées

<i>Bgl</i> II	A/GATCT
<i>EcoRI</i>	G/AATTC
<i>Bam</i> HI	G/GATCC

Carte de restriction partielle du gène *Taq* et positions des amorces utilisées

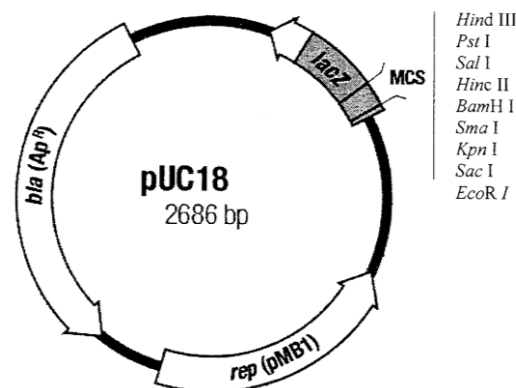


Séquences des amorces utilisées

Forward primer : 5'-CACGAATTCGGGGATGCTGCC-CCTCTTTGAGCCCAAG

Reverse terminal primer : 5'-GTGAGATCTATCACTCCTTGGCGGAGAGCCAGTC

Carte du plasmide pUC18



DOCUMENT 4

Buffer Compositions (1X):

Buffer 1 : 10 mM Bis Tris Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7.0 at 25°C).

Buffer 2 : 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT (pH 7.9 at 25°C).

Buffer 3 : 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT (pH 7.9 at 25°C).

	% activity in Buffer 1	% activity in Buffer 2	% activity in Buffer 3
BamHI	75	100	50
BglII	10	75	100
EcoRI	100	100	100

DOCUMENT 5

5A

Purification of DNA Polymerase

Taq DNA polymerase was purified from 100 mL cultures. Super Broth media plus ampicillin was inoculated with 100 µL of a log phase culture of DH5α containing the pTAQ construct described above. This culture was grown to an OD₆₀₀ of 0,3 at 37 °C, then induced with 0.5 mM IPTG and allowed to grow for 16 hours.

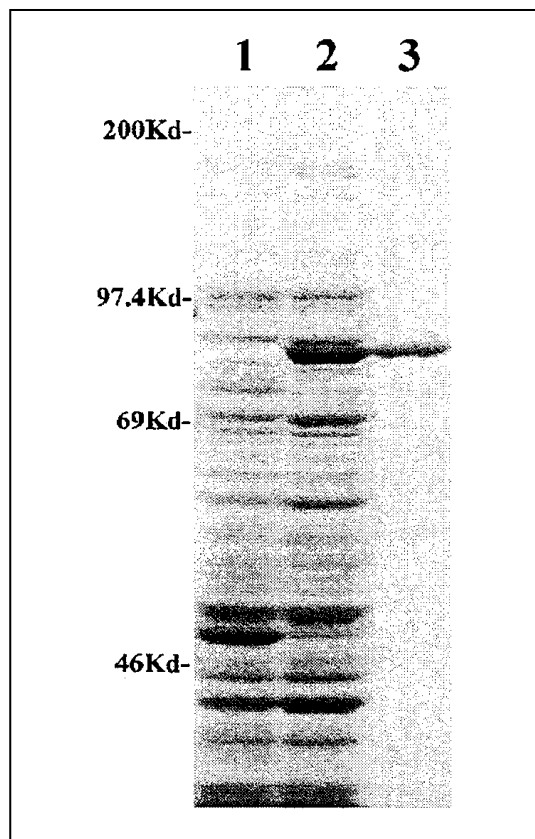
Cells were centrifuged, resuspended in three mL of buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 50 mM dextrose, 1 mM EDTA) containing 4 mg/mL lysozyme, and incubated 15 minutes at room temperature.

Three mL of buffer B was added (10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P40), and the mixture was incubated 60 minutes at 75 °C in a shaking water bath.

Cell debris and denatured protein were removed by centrifugation at 12,000xg for 10 minutes at 4 °C.

This lysate was then mixed with an equal volume of storage buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1% Triton X-100) containing 50% glycerol, followed by addition of an equal volume of storage buffer containing 75% glycerol. This mixture was then stored at -20 °C.

5B



12% SDS-PAGE gel was used to analyze each step of the purification process.

Lanes contain :

- 1) sonicated *E. coli* host cells not expressing *Taq* DNA pol I,
- 2) sonicated *E. coli* expressing *Taq* DNA pol I,
- 3) cell lysate cleared by thermal denaturation.

(Protocoles pour 1) et 2) non fournis)

DOCUMENT 7

Procedure for producing monoclonal antibodies specific for a given antigen developed by G. Kohier and C. Milstein.

Spleen cells from an antigen-primed mouse are fused with mouse myeloma cells (HGPRT⁻ and Ig⁻).

The spleen cells provides the necessary enzymes for growth on HAT medium, while the myeloma provides immortal-growth properties. Unfused myeloma cells or myeloma-myeloma fusions fail to grow due of lack of HGPRT. Unfused spleen cells have limited growth in vitro and therefore do not need an enzyme deficiency for elimination with the HAT selection procedure.

After 7-10 days of culture in the HAT medium, most of the wells contain dead cells, but a few wells contain small clusters of viable cells, which could be visualized by using an inverted phase contrast microscope.

DOCUMENT 8

Microtiter well plates are coated with *Thermus aquaticus* DNA polymerase (50 µL/plate well of 2 µg/mL) were incubated at room temperature for one hour, contacted with gelatin 1% and tween 20 0,05% in phosphate buffered saline solution (200µL/plate well) and stored frozen until needed.

Conventionnal ELISA is performed for initial screening for antibody by the addition of the hybridoma culture supernatant (50µL/plate well) followed by incubation at room temperature with constant agitation.

All incubations were followed by washing five times with tween 20 0,05% in phosphate buffered saline solution using a microtiter plate washer.

The detection reagents (50µL/plate well) included goat anti mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (diluted 1/3000 in gelatin/phosphate buffered saline solution) were incubated for one hour at room temperature. After washing five times, the peroxidase substrate used to produce dye (ABTS) was incubated for 15 minutes at room temperature.

The dye signal was evaluated at 414nm using a plate reader.

Enzymatic reaction was stopped with 2 M NaOH.

DOCUMENT 9

Protocole 1

L'ADN polymérase est incubée avec chaque anticorps 10 minutes à température ambiante. L'activité enzymatique est ensuite mesurée après incubation à 37°C pendant 240 minutes en présence d'ADN matrice et des quatre dNTPs.

L'activité ADN polymérase est exprimée en % d'activité par rapport au contrôle sans anticorps.

Anticorps	Activité ADN polymérase % de contrôle A
Pas d'anticorps (contrôle A)	100 %
Pas d'anticorps. Pas d'enzyme (contrôle B)	0,3 %
Mab1	28 %
Mab2	87 %
Mab3	64,3 %
Mab4	1,4 %

Protocole 2

L'ADN polymérase est incubée avec chaque anticorps à température ambiante puis le mélange est chauffé à 85°C pendant 1 min avant d'être refroidi 5 minutes dans la glace. L'activité enzymatique est ensuite mesurée après incubation pendant 10 min à 75° C en présence d'ADN matrice et des quatre dNTPs.

L'activité ADN polymérase est exprimée en % d'activité par rapport au contrôle sans anticorps.

Anticorps	Activité : ADN polymérase % de contrôle A
Pas d'anticorps (contrôle A)	100 %
Pas d'anticorps. Pas d'enzyme (contrôle B)	0 %
Mab1	99,4 %
Mab2	104 %
Mab3	98,5 %
Mab4	101 %

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. Glu, en concentration élevée, sert de source de C, source de N et de nutriment énergétique. Biotine, thiamine et acide nicotinique, présents à faible concentration, sont des facteurs de croissance.

T=75°C donc souche vraisemblablement thermophile.

Agitation et aération assurées par l'insufflation d'air stérile, donc souche aérobie (stricte) ou aéro-anaérobie.

1.2.1. Incubation des substrats avec la Taq polymérase – arrêt brutal de la réaction par refroidissement sur glace – précipitation de l'ADN obtenu – lavage – mesure de la radioactivité incorporée dans l'ADN obtenu

1.2.2. Le tableau, lisible et complet, devait faire apparaître les résultats suivants :

Fraction	Yield of activity (%)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
« Crude »	100	$2,3 \cdot 10^{-3}$	1
DEAE-sephadex	95,2	$10,1 \cdot 10^{-3}$	4,7
Phosphocellulose	91,3	$118,8 \cdot 10^{-3}$	55,8
DNA-cellulose	32,9	ND	ND

Les formules littérales des calculs devaient figurer, afin d'explicitier l'origine des résultats :

- « yield of activity » (= rendement) = activité polymérase de l'étape considérée / 2,080 (référence à l'extrait brut)
- « specific activity » = activité polymérase de l'étape considérée / « total protein »
- « purification fold » = rapport des activités spécifiques après / avant l'étape considérée

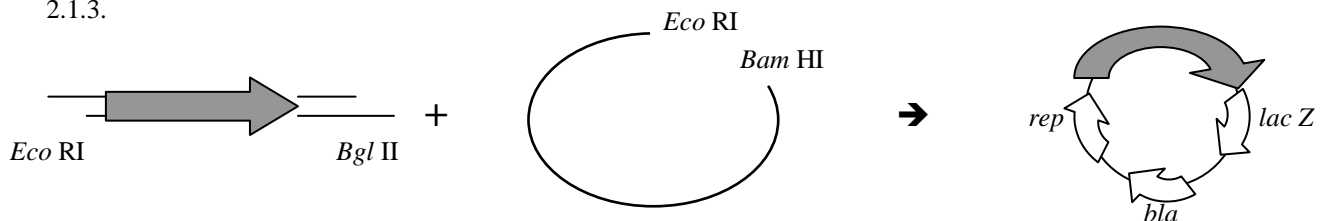
2.1.1. *Eco* RI et *Bgl* II possèdent un site unique situé dans les amorces et hors des séquences codantes.

2.1.2. *Bam* HI et *Bgl* II possèdent des sites différents mais les extrémités générées sont compatibles.

Pour le vecteur : digestion par *Eco* RI et *Bam* HI car leurs sites sont présents dans le site multiple de clonage (MCS).

Pour l'amplikon : digestion par *Eco* RI et *Bgl* II (utilisation de *Bam* HI impossible car site dans le gène).

2.1.3.



2.1.4. Vecteur : tampon 2 car 100 % d'activité pour les 2 enzymes. Amplikon : tampon 3 pour la même raison.

2.2.1. IPTG : induction de l'expression du gène Taq et levée de la répression.

2.2.2. Lyse du peptidoglycane par le lysozyme – désorganisation des membranes par le tween (détergent) – dénaturation des protéines par la chaleur (la Taq n'est pas dénaturée) – centrifugation : la Taq demeure dans le surnageant

2.2.3. Lysat mélangé volume à volume avec du glycérol à 50 % : donc lysat dilué au 1/2 et glycérol final à 25 %.

Mélange obtenu mélangé volume à volume avec du glycérol à 75 % : donc dilution finale du lysat 1/4 et glycérol final à 50 %.

2.2.4. Piste 1: profil témoin des protéines d'*E. coli* mais absence de Taq

Piste 2 : apparition d'une bande montrant une forte expression, vraisemblablement de la Taq.

Piste 3 : une seule bande, donc protéine parfaitement purifiée, obtenue par traitement thermique, donc c'est la Taq.

2.2.5. Taille du gène : 2496 pb, donc protéine de $2496/3 = 832$ acides aminés (en réalité 831), la taille de la protéine est donc de $832 \times 110 = 91$ kDa, ce qui est en accord avec la position de la bande sur les pistes 2 et 3.

2.3. Les acides aminés communs sont repérés par des *. Les domaines sont présents si le % d'homologie est important.

Résultat : homologie moyenne entre les AA 1 et 323, faible entre 324 et 517 et forte de 521 à 928.

Conclusion : l'activité exonucléase 3' → 5' est vraisemblablement absente.

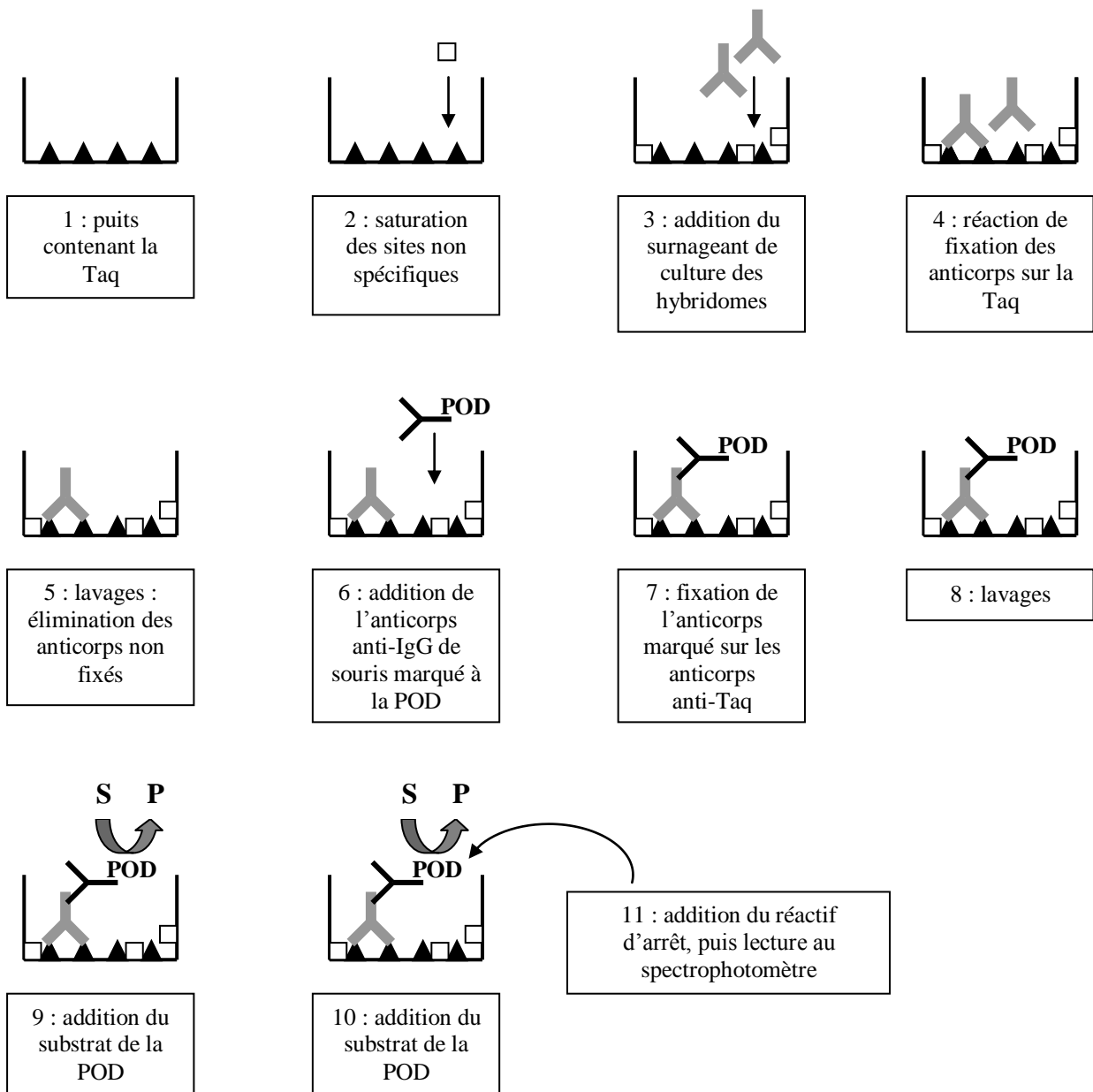
3.1.1. Immunisation de la souris – fusion des lymphocytes et des cellules myéломateuses avec PEG – sélection des hybrides – repérage des puits positifs – criblage des clones – clonage – purification

3.1.2. Croissance des seules cellules (hybridomes) issues de la fusion car elles sont immortalisées et HGPRT⁺ (l'hypoxanthine ajoutée permet l'expression de ce caractère).

Elimination des cellules myéломateuses par l'aminoptérine, qui bloque la voie principale de synthèse des bases puriques et pyrimidiques et la voie secondaire n'est pas possible car les cellules sont HGPRT⁻.

Mort des splénocytes par leur incapacité à se multiplier in vitro.

3.1.3.



3.1.4. Gélatine : protéine permettant de saturer les sites non spécifiques des puits de la plaque.

Tween : détergent éliminant les protéines non fixées.

3.1.5. Témoin zéro optique : il contient tous les réactifs sauf l'anticorps secondaire, il permet de vérifier que le substrat n'est pas hydrolysé spontanément.

Témoin d'absence de fixation non spécifique de l'anticorps secondaire : dans un puits contenant la Taq, on place tous les réactifs sauf le surnageant, on attend une absorbance faible ou nulle.

Témoin d'absence de fixation non spécifique de l'anticorps produit par l'hybridome : dans un puits sans Taq, on place tous les réactifs et on vérifie que l'absorbance obtenue est faible ou nulle.

Protocole 1 : on teste la capacité de anticorps à inhiber la Taq à T du laboratoire, car l'anticorps n'est pas dénaturé à 37°C et reste associé à la Taq.

Protocole 2 : vérification de l'efficacité du traitement thermique pour libérer la Taq fonctionnelle par dénaturation de l'anticorps.

Contrôle B : témoin permettant de valider l'expérience, pas de bruit de fond d'amplification de l'ADN.

Mab 1 à Mab 4 : inhibition de la Taq, les anticorps sont bien neutralisants, Mab 4 est le plus efficace.

Après traitement thermique, les activités de la Taq en présence des anticorps est proche de celle du témoin, donc les 4 anticorps testés sont satisfaisants puisqu'ils ont bien été dénaturés.

L'anticorps Mab 4 est le seul qui soit très bon neutralisant de la Taq (cf résultats du protocole 1 : 1,4 % de l'activité du témoin est obtenu en présence de Mab 4) et sa dénaturation thermique est efficace.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE 2^{ème} partie :
REALISATION PRATIQUE D'OPERATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE

Durée : 8 heures

Coefficient : 8

Calculatrice autorisée.

**CARACTÉRISATION D'UNE SOUCHE DE LEVURE RECOMBINÉE ET MISE
AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE**

PREMIER JOUR

Durée 6 heures 30

Une PME- des biotechnologies envisage de produire à grande échelle une protéine végétale P, présentant un intérêt thérapeutique. Le gène correspondant a été cloné et transféré dans une levure par un mécanisme impliquant des recombinaisons homologues entre l'ADN de levure et l'ADN vecteur.

Avant de lancer la production industrielle, l'entreprise décide de contrôler directement la présence du gène d'intérêt dans la levure après avoir vérifié certaines de ses caractéristiques microbiologiques et de fabriquer un outil d'identification fiable de la protéine produite. On envisage donc de réaliser :

- une vérification de caractères microbiologiques de la souche de levure recombinée productrice de la protéine P.
- un contrôle de la présence de l'insert dans cette souche de levure par Polymerase Chain Reaction (= PCR = ACP = amplification en chaîne par polymérase).
- la mise au point d'une technique immunoenzymatique permettant de doser la protéine P. Cette technique nécessite l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de cette molécule, couplés à une enzyme : la phosphatase alcaline. Celle-ci est produite par une souche *d'E.coli*. La qualité des immunoconjugés obtenus après le couplage est contrôlée.

**1. CARACTÉRISATION DE LA SOUCHE DE LEVURE RECOMBINÉE
PRODUCTION DE LA PROTÉINE P**

Tous les résultats doivent être consignés dans le compte-rendu.

1.1. Examens macroscopiques et microscopiques de la souche de levure

A partir de la culture présentée sur gélose Sabouraud :

- réaliser les examens macroscopiques et microscopiques de la souche,
- montrer à l'examineur un champ accompagné de sa description rédigée sur le compte-rendu.

1.2. Vérification par PCR de la présence de l'insert dans le génome de la levure

Le gène codant la protéine P a été intégré par un mécanisme de recombinaison homologue dans le génome de la levure hôte. Pour contrôler l'efficacité du transfert, on recherche par PCR la présence de l'insert dans l'ADN de levure à l'aide d'amorces spécifiques.

Réactifs et matériel

- 12 µL de tampon d'amplification x 10 (tp 10 x)
- 10 µL de dNTP à 10 mmol.L⁻¹ (dNTP)
- 12 µL d'un mélange des deux amorces à 1,25 µmol.L⁻¹ chacune (amorces)
- 4 µL d'extrait d'ADN de levure à 10 ng.µL⁻¹ (ADN)
- 4 µL de solution de *Taq* polymérase à 1,5 U.L⁻¹ (*Taq*)
- 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire (eau BM)
- 10 µL de solution de dichlorure de magnésium à 25 mmol.L⁻¹ (MgCl₂)
- 5 µL de solution de tampon de charge 10 x (charge 10 x)
- 1 00 µL d'huile minérale (huile)
- 3 tubes coniques de 0,5 mL
- pipettes automatiques + embouts adaptés

1.2.1. Préparation du mélange réactionnel

Déposer dans un tube conique de 0,5 mL placé dans la glace :

- 5 µL de solution de tampon d'amplification x 10
- 4 µL de solution de dNTP à 10 mmol.L⁻¹
- V µL de solution de dichlorure de magnésium à 25 mmol.L⁻¹ telle que la concentration finale soit de 5 mmol.L⁻¹
- 5 µL du mélange des amorces à 1,25 µmol.L⁻¹ chacune
- eau de qualité biologie moléculaire pour un volume final de 50 µL
- 1 µL d'extrait d'ADN à 10 ng.µL⁻¹
- 1 µL de solution de Taq polymérase à 1,5 U.L⁻¹

Indiquer et justifier sur le compte-rendu la valeur du volume V de la solution de MgCl₂ ajouté. Faire valider par un examinateur avant réalisation.

Homogénéiser par aspiration-refoulement et centrifuger quelques secondes. Ajouter 20 à 30 µL d'huile minérale. Conserver ce tube dans la glace jusqu'au lancement de la PCR.

1.2.2. Réalisation de la PCR

Au moment imposé par les examinateurs, introduire le tube identifié dans le thermocycleur.

Les caractéristiques de l'amplification réalisée sont les suivantes :

ETAPE	TEMPERATURE	DUREE
déshybridation	94°C	30 s
hybridation	45°C	30 s
extension des amorces	72°C	1 min

- lors de la première étape du premier cycle, 1 min 30 s sont rajoutées (total : 2 min)
- lors de la dernière étape du dernier cycle, 2 minutes sont rajoutées (total : 3 min)
- 30 cycles de trois étapes sont ainsi réalisés

Le tube sera remis après amplification

1.2.3. Préparation de l'échantillon pour l'électrophorèse

À l'issue de l'amplification :

- prélever, sous l'huile, 9 µL du mélange réactionnel et conserver le reste dans la glace,
- transférer ce volume dans un nouveau tube conique de 0,5 mL,
- ajouter 1 µL de tampon de charge 10 x,
- déposer, devant un examinateur, la totalité de cet échantillon sur un gel d'agarose à 2 % (m/v).

Les dépôts d'un marqueur de taille, de deux témoins (positif et négatif), la migration, la révélation et la photographie du gel seront réalisés par les examinateurs.

Compte-rendu :

Préciser le rôle des témoins.

2. PRODUCTION À PETITE ÉCHELLE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR UNE SOUCHE D'*E. COLI*

On envisage de doser la protéine P par une technique immuno-enzymatique. Cette technique nécessite la préparation d'un immunoconjugué avec la phosphatase alcaline comme marqueur.

Une culture en milieu non renouvelé d'une souche *d'E.coli* exprimant de façon constitutive la phosphatase alcaline, a été réalisée en fermenteur de 2L.

2.1. Prélèvement d'un échantillon de culture

- Effectuer au fermenteur, un prélèvement de 10 mL, en tube conique stérile.
- Noter l'heure de prélèvement dans le compte-rendu.
- Conserver l'échantillon dans la glace.

Cette opération doit être effectuée devant un examinateur.

2.2. Estimation de la biomasse par opacimétrie et de la productivité horaire globale.

Réactifs et matériel

- prélèvement effectué au fermenteur
- un tube à essai contenant du milieu de culture utilisé pour la croissance (LB)
- microcuvettes pour lecture spectrophotométrique
- pipettes graduées stériles de 1 mL

Mode opératoire

Mesurer l'absorbance du prélèvement précédent à 600 nm.
Effectuer cette opération devant un examinateur.

Compte-rendu

Données :

- limite de linéarité de la méthode : 0,6 UA.
- une unité d'absorbance à 600 nm correspond à $5 \cdot 10^8$ microorganismes / mL
- volume du milieu de culture : 1,5 L
- inoculum à 5 % (v/v) de densité 10^9 microorganismes / mL
- date d'inoculation : précisée par le centre d'examen,
- masse moyenne d'un micro-organisme: $9 \cdot 10^{-13}$ g

Déterminer la biomasse du prélèvement en g/L.

Calculer la productivité horaire globale en biomasse au moment du prélèvement.

2.3. Vérification de la relation concentration de la culture et absorbance.

Afin de valider le calcul précédent, on se propose de vérifier la relation : une unité d'absorbance à 600 nm correspond à $5 \cdot 10^8$ micro-organismes par mL de milieu.

Réactifs et matériel

- prélèvement effectué au fermenteur
- un flacon de gélose PCA pour dénombrement maintenu en surfusion permettant de couler 6 géloses en boîte de Petri
- tubes de 9 mL d'eau physiologique (**eau physiologique**)
- système de pipetage adapté
- 6 boîtes de Petri stériles

Mode opératoire

Effectuer un dénombrement de la culture par une technique d'ensemencement dans la masse en testant trois dilutions successives en double essai.

Compte-rendu

Justifier le choix des dilutions réalisées.

3. MISE EN ÉVIDENCE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PRODUITE PAR *E. COLI*

Réactifs et matériel

- prélèvement effectué au fermenteur
- 4 mL de la solution d'hydroxyde de sodium à 2 mol.L^{-1} (NaOH)
- 4 mL de la solution de pNPP à 2 mg.mL^{-1} (pNPP)
- 4 mL de la solution de tampon DEA à pH 9,8 à $c = 1 \text{ mol.L}^{-1}$ (DEA)
- 2 tubes comportant 120 mg de microbilles de verre
- 4 microtubes de 1,5 mL
- 6 microcuvettes standard
- 6 microcuvettes U.V.

3.1. Préparation d'un lysat d'E.coli

- introduire 1 mL de culture dans un tube contenant des microbilles de verre
- agiter vigoureusement au vortex durant 30 secondes
- centrifuger 3 minutes à 12000 g
- prélever le surnageant et le transférer dans un tube conique stérile de 1,5 mL
- conserver le tube dans la glace

3.2. Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline dans le lysat

- introduire 0,5 mL de la solution de pNPP dans un tube conique de 1,5 mL
- ajouter 0,5 mL de la solution de tampon DEA
- préincuber le tube quelques minutes à 30°C
- ajouter 0,05 mL de lysat d'*E.coli*
- homogénéiser et incubé 5 minutes à 30°C
- arrêter la réaction par addition de 0,5 mL de solution de NaOH
- mesurer l'absorbance à 405 nm contre un témoin adapté

Compte-rendu

Donnée :

Coefficient d'absorption molaire du pNP dans ces conditions opératoires : $18500 \text{ L.mol}^{-1} . \text{cm}^{-1}$

Indiquer la composition du tube témoin.

Calculer l'activité enzymatique de l'essai (nanokatal).

En déduire la concentration catalytique (nanokatal.mL^{-1}) du lysat.

3.3. Détermination de l'activité spécifique du lysat

- introduire 0,05 mL de lysat, dans une microcuve UV
- ajouter 0,950 mL d'eau distillée
- homogénéiser
- mesurer l'absorbance à 280 nm, 260 nm et 320 nm contre de l'eau distillée

Compte-rendu

Donnée : $\text{concentration en protéines} = 1,55 \times (A_{280 \text{ nm}} - A_{320 \text{ nm}}) - 0,75 \times (A_{260 \text{ nm}} - A_{320 \text{ nm}})$ en mg/mL

Donner la composition du témoin.

Calculer la concentration en protéines en mg par mL de lysat.

Calculer l'activité spécifique du lysat (en nanokatal par mg de protéine).

4. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DES IMMUNOCONJUGUÉS OBTENUS APRÈS COUPLAGE : CHOIX D'UN PROTOCOLE ADAPTE

Afin de disposer d'un outil de recherche et de dosage de la protéine P, on compare 3 protocoles de couplage de la phosphatase alcaline avec des anticorps monoclonaux de type Ig G spécifiques de la protéine P. Le glutaraldéhyde est utilisé comme agent chimique de couplage. On se propose de tester par colorimétrie la qualité des immunoconjugués obtenus.

Réactifs et matériel

- 250 µL de chaque immunoconjugué répertorié dans le tableau suivant :

Protocole	Dilution	Identification
1	1/10000	E1.a
	1/50000	E1.b
2	1/10000	E2.a
	1/50000	E2.b
3	1/10000	E3.a
	1/50000	E3.b

- 2,4 mL de solution de protéine P à 200 µg/mL en tampon carbonate pH = 9,6 (P)
- 6 mL de solution de sérum albumine bovine à 10 g/L en tampon carbonate pH = 9,6 (SAB)
- 4 mL de solution de tampon DEA pH 9,8 (DEA)
- 4 mL de solution de substrat pNPP à 2 mg/mL (pNPP)
- 4 mL de solution d'hydroxyde de sodium à 2 mol/L (NaOH)
- solution de tampon PBS-tween
- solution de tampon PBS
- 2 barrettes de 8 cupules à fond plat présentées sur un support
- un tube à hémolyse
- pipettes automatiques avec embouts adaptés

Un schéma d'identification des cupules est présenté ci-dessous

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	E1.a	E2.a	E3.a	E1.b	E2.b	E3.b	Blanc	
2	E1.a	E2.a	E3.a	E1.b	E2.b	E3.b	Blanc	

Mode opératoire :

- introduire 200 µL de solution de protéine P dans les cupules de la barrette 1 (A1 à G1) et dans la cupule G2. Couvrir d'un film protecteur auto-adhésif et incubé une heure à 37°C.
- Laver deux fois à l'aide de la solution de tampon PBS.

Un des lavages devra être réalisé devant un examinateur.

- Ajouter 300 µL de SAB dans toutes les cupules sauf H1 et H2. Couvrir d'un film protecteur et incubé 1 heure à 37°C.
- Laver deux fois en tampon PBS.
- Déposer 100 µL de solution de PBS dans les cupules G1 et G2.
- Dans les autres cupules (sauf H1 et H2), déposer 100 µL des solutions d'immunoconjugués à tester selon le schéma fourni
- Placer la plaque pendant 2 minutes sur agitateur rotatif puis incubé la plaque recouverte d'un film protecteur pendant 45 minutes à l'étuve à 37°C.
- Laver trois fois à l'aide de la solution de tampon PBS-tween et rincer deux fois à l'aide de la solution de tampon PBS.
- Préparer le substrat en introduisant dans un tube à hémolyse : 1,5 mL de la solution de pNPP et 1,5 mL de la solution de tampon DEA.
- Distribuer dans toutes les cupules (sauf H1 et H2), 150 µL de la solution de substrat ainsi préparée.
- Recouvrir d'un film protecteur et incubé 10 minutes à l'étuve à 37°C.
- Distribuer dans toutes les cupules (sauf H1 et H2), 50 µL de solution de NaOH.
- Effectuer la lecture en notant l'intensité de la couleur obtenue pour chaque cupule (témoins et essais).
- Dès la lecture des cupules, appeler immédiatement un examinateur.

Compte-rendu

Schématiser, en les justifiant, les différentes étapes de ce test qualitatif.

Indiquer la composition et le rôle des témoins.

Etablir le tableau de résultats

Conclure.

Calculatrice autorisée.

CARACTÉRISATION D'UNE SOUCHE DE LEVURE RECOMBINÉE ET MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE

DEUXIEME JOUR

Durée 1 heure 30

1. CARACTÉRISATION DE LA SOUCHE DE LEVURE RECOMBINÉE PRODUCTION DE LA PROTÉINE P

1.2. Vérification par PCR de la présence de l'insert dans le génome de la levure.

Une reproduction du gel d'agarose ainsi que les caractéristiques du marqueur utilisé sont fournies en début de séance.

Compte rendu

Données :

La taille attendue de l'amplicon est d'environ 750 pb.

Tailles des bandes du marqueur fournies par le centre d'examen.

- Analyser le dépôt après avoir annoté l'électrophorogramme fourni.
- Vérifier la validité des témoins.
- Interpréter les résultats et conclure.

2. PRODUCTION À PETITE ECHELLE DE LA PHOSPHATASE ACALINE PAR UNE SOUCHE D'*ESCHERICHIA COLI*

2.3. Vérification de la relation entre la concentration de la culture et l'absorbance.

Le résultat d'absorbance de la culture du premier jour sera fourni si nécessaire.

Rappel : 1 UA à 600 nm correspond à $5 \cdot 10^8$ micro-organismes/mL de milieu.

Compte-rendu :

- Présenter sous forme de tableau le résultat des dénombrements.
- Calculer la concentration bactérienne de la culture au moment du prélèvement.
- Calculer le coefficient de correspondance : concentration bactérienne - absorbance.
- Conclure

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

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

Exercice 1 (10 points)

Les deux parties de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

PARTIE A : Résolution d'une équation différentielle**SUJET DE BTS BIOCHIMISTE**

On considère l'équation différentielle $(E) : y'' - 2y' + y = 2e^x$ où y désigne une fonction de la variable réelle x définie et deux fois dérivable sur \mathbf{R} , y' sa fonction dérivée et y'' sa fonction dérivée seconde.

1. Résoudre l'équation différentielle $(E_0) : y'' - 2y' + y = 0$.
2. Montrer que la fonction g définie sur \mathbf{R} par $g(x) = x^2 e^x$ est une solution particulière de l'équation (E) .
3. En déduire la solution générale de l'équation différentielle (E) .
4. Déterminer la solution f de l'équation (E) qui vérifie les conditions initiales : $f(0) = 1$ et $f'(0) = 3$.

SUJET DE BTS BIOTECHNOLOGIE

On considère l'équation différentielle $(E) : y' - y = 2(x+1)e^x$ où y désigne une fonction de la variable réelle x définie et dérivable sur \mathbf{R} , y' sa fonction dérivée.

1. Résoudre l'équation différentielle $(E_0) : y' - y = 0$.
2. Déterminer les réels a et b de façon que la fonction g définie sur \mathbf{R} par $g(x) = (ax^2 + bx)e^x$ soit une solution particulière de (E) .
3. En déduire la solution générale de l'équation différentielle (E) .
4. Déterminer la solution f de l'équation (E) qui vérifie la condition initiale : $f'(0) = 3$.

Remarque : la partie B de l'exercice 1 et l'exercice 2 sont communs aux deux sujets.

Partie B : Étude d'une fonction

Soit f la fonction définie sur \mathbf{R} par $f(x) = (x+1)^2 e^x$. On note \mathcal{C} la courbe représentative de f dans le plan rapporté à un repère orthogonal $(O; \vec{i}, \vec{j})$ d'unités graphiques : 1 cm en abscisse et 4 cm en ordonnée.

1. Déterminer la limite de f en $+\infty$ et la limite de f en $-\infty$ (on rappelle que, pour $\alpha > 0$, $\lim_{x \rightarrow -\infty} x^\alpha e^x = 0$).
En déduire l'existence d'une asymptote à la courbe \mathcal{C} .
2. Montrer que $f'(x) = (x+1)(x+3)e^x$.
3. Étudier les variations de f sur \mathbf{R} , puis dresser le tableau de variation de la fonction f .
4. Tracer la courbe \mathcal{C} dans le plan repéré par $(O; \vec{i}, \vec{j})$.
5. Calcul d'aire :
 - a. Vérifier que $F(x) = (x^2 + 1)e^x$ est une primitive de f sur \mathbf{R} .
 - b. En déduire l'aire exacte A , en cm^2 , de la partie du plan limitée par la courbe \mathcal{C} , l'axe (Ox) et les droites d'équations respectives $x = -1$ et $x = 0$.
 - c. Donner la valeur arrondie de A à 10^{-2} près.

Exercice 2 (10 points) :

Les trois parties de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

Une entreprise fabrique en grande quantité des tiges en plastique de longueur théorique 100 mm. Les résultats numériques seront arrondis au centième le plus proche.

Partie A : Loi normale

Une tige est considérée comme conforme pour la longueur lorsque sa longueur, exprimée en millimètres, est dans l'intervalle $[99,64 ; 100,36]$.

On note X la variable aléatoire qui, à chaque tige prise au hasard dans la production, associe sa longueur. On suppose que X suit la loi normale de moyenne 100 et d'écart-type 0,16.

1. Calculer la probabilité qu'une tige prélevée au hasard dans la production soit conforme pour la longueur.
2. Déterminer le nombre réel a tel que $P(X < a) = 0,96$.

Partie B : Loi binomiale et loi de Poisson

Dans un lot de ce type de tiges, 2 % des tiges n'ont pas une longueur conforme. On prélève au hasard n tiges de ce lot pour vérification de longueur. Le lot est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de n tiges.

On considère la variable aléatoire Y qui, à tout prélèvement de n tiges, associe le nombre de tiges de longueur non conforme.

1. Pour cette question on prend $n = 50$.
 - a. Justifier que la variable aléatoire Y suit une loi binomiale dont on donnera les paramètres.
 - b. Calculer $P(Y=3)$.
2. Pour cette question on prend $n = 100$. La variable aléatoire Y suit alors une loi binomiale que l'on décide d'approcher par une loi de Poisson.
 - a. Déterminer le paramètre λ de cette loi de Poisson.
 - b. On désigne par Z une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre λ où λ est le paramètre obtenu à la question 2.a. À l'aide de l'approximation de Y par Z , calculer la probabilité d'avoir au plus 4 tiges de longueur non conforme.

Partie C : Test d'hypothèse

Un client reçoit un lot important de tiges de ce type. Il veut vérifier que la moyenne μ de l'ensemble des longueurs, en mm, des tiges constituant ce lot est égale à la longueur théorique.

On note L la variable aléatoire qui, à chaque tige prélevée au hasard dans le lot, associe sa longueur en mm. La variable aléatoire L suit la loi normale de moyenne inconnue μ et d'écart-type 0,16.

On désigne par \bar{L} la variable aléatoire qui, à chaque échantillon aléatoire de 90 tiges prélevé dans le lot, associe la moyenne des longueurs de ces tiges (le lot est assez important pour que l'on puisse assimiler ces prélèvements à des tirages avec remise). \bar{L} suit la loi normale de moyenne μ et d'écart-

$$\text{type } \sigma = \frac{0,16}{\sqrt{90}} \approx 0,017.$$

Le client construit un test d'hypothèse :

- L'hypothèse nulle est $H_0 : \mu = 100$.
- L'hypothèse alternative est $H_1 : \mu \neq 100$.
- Le seuil de signification est fixé à 5%.

1. Sous l'hypothèse nulle H_0 déterminer le réel positif h tel que :

$$P(100 - h < \bar{L} < 100 + h) = 0,95.$$

2. Énoncer la règle de décision permettant d'utiliser ce test.
3. Le client prélève un échantillon aléatoire de 90 tiges dans la livraison et il constate que la moyenne des longueurs de l'échantillon est de 100,04 mm. Le client estime que le fournisseur n'a pas respecté ses engagements et renvoie tout le lot. Le client a-t-il raison ? Justifier votre réponse.

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

Seul l'usage d'une calculatrice électronique, autonome, non imprimante, à entrée unique par clavier, est autorisé pour cette épreuve.

I. RADIOACTIVITE (10 points)

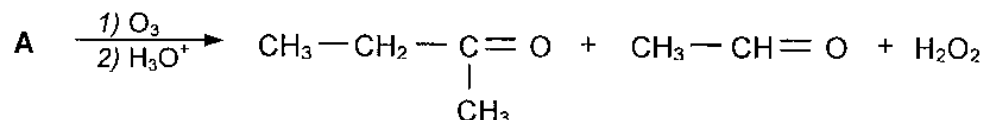
L'isotope $^{87}_{37}\text{Rb}$ se désintègre spontanément en $^{87}_{38}\text{Sr}$.

1. Écrire l'équation-bilan correspondante en indiquant les lois de conservation utilisées. Préciser le type de radioactivité.
2. Soient T , la période radioactive du $^{87}_{37}\text{Rb}$ et λ , sa constante radioactive.
 - 2.1. Définir la période T
 - 2.2. Exprimer T en fonction de λ .
 - 2.3. On considère un échantillon contenant un nombre N_0 d'atomes de $^{87}_{37}\text{Rb}$ à l'instant $t_0 = 0$.
 - 2.3.1 Exprimer le nombre d'atomes $N_{\text{Rb}}(t)$ de $^{87}_{37}\text{Rb}$ restant à la date t en fonction de t , N_0 et λ .
 - 2.3.2 En déduire le nombre d'atomes $N_{\text{Sr}}(t)$ de $^{87}_{38}\text{Sr}$ formés à la date t en fonction de t , N_0 et λ .
 - 2.3.3 Exprimer alors le rapport $r = \frac{N_{\text{Sr}}(t)}{N_{\text{Rb}}(t)}$
3. Dans une météorite, on a dosé ce rapport r , sa valeur est 0,0620. Sachant que la période T de $^{87}_{37}\text{Rb}$ est égale à 48,9 milliards d'années, calculer l'âge de la météorite.

II. CHIMIE ORGANIQUE (15 points)

Soit la séquence réactionnelle suivante :

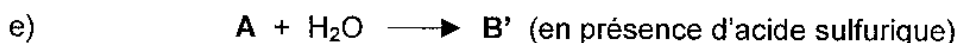
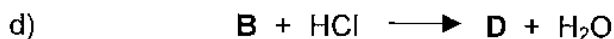
a) L'ozonation puis l'hydrolyse de **A** en milieu acide sont décrites par la réaction suivante :



b) En présence d'acide sulfurique concentré et à 170°C, **A** peut être obtenu par les deux réactions suivantes :



c) **B** réagit avec les ions dichromates ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) en milieu acide en conduisant au seul produit **C**. On rappelle que dans ce cas, les ions dichromates se transforment en ions Cr^{3+} .



- Déterminer les formules semi-développées des composés **A**, **B**, **B'**, **C** et **D** et préciser leurs noms systématiques.
- Donner la nature de chacune des réactions chimiques précédentes (oxydation, substitution, addition, élimination). Préciser si la solution d'acide sulfurique utilisée à l'étape e) est diluée ou concentrée.
- Représenter les isomères Z et E de la molécule **A**.
- La molécule **B** comporte deux atomes de carbone asymétrique, représenter les isomères (R,R) et (S,S) de cette molécule dans la représentation de Cram et justifier les configurations proposées.

III. OXYDO-REDUCTION, COMPLEXATION ET PRECIPITATION (25 points)

Données :

Elément	C	N	O	K	Cr	Ag
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	12	14	16	39	52	108

$$E^\circ(\text{Ag}^+/\text{Ag}) = 0,80 \text{ V}$$

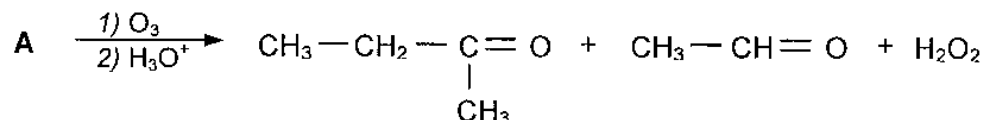
$$\frac{R.T}{F} \cdot \ln x = 0,06 \cdot \log x \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad (\text{Tous les calculs seront effectués pour cette température.})$$

$$\text{pKs}(\text{Ag}_2\text{CrO}_4) = 11,95$$

II. CHIMIE ORGANIQUE (15 points)

Soit la séquence réactionnelle suivante :

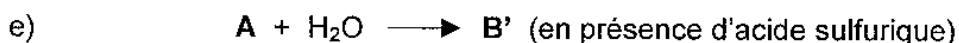
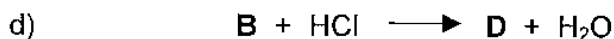
a) L'ozonation puis l'hydrolyse de **A** en milieu acide sont décrites par la réaction suivante :



b) En présence d'acide sulfurique concentré et à 170°C, **A** peut être obtenu par les deux réactions suivantes :



c) **B** réagit avec les ions dichromates ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) en milieu acide en conduisant au seul produit **C**. On rappelle que dans ce cas, les ions dichromates se transforment en ions Cr^{3+} .



- Déterminer les formules semi-développées des composés **A**, **B**, **B'**, **C** et **D** et préciser leurs noms systématiques.
- Donner la nature de chacune des réactions chimiques précédentes (oxydation, substitution, addition, élimination). Préciser si la solution d'acide sulfurique utilisée à l'étape e) est diluée ou concentrée.
- Représenter les isomères Z et E de la molécule **A**.
- La molécule **B** comporte deux atomes de carbone asymétrique, représenter les isomères (R,R) et (S,S) de cette molécule dans la représentation de Cram et justifier les configurations proposées.

III. OXYDO-REDUCTION, COMPLEXATION ET PRECIPITATION (25 points)

Données :

Elément	C	N	O	K	Cr	Ag
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	12	14	16	39	52	108

$$E^\circ(\text{Ag}^+/\text{Ag}) = 0,80 \text{ V}$$

$$\frac{R.T}{F} \cdot \ln x = 0,06 \cdot \log x \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad (\text{Tous les calculs seront effectués pour cette température.})$$

$$\text{pKs}(\text{Ag}_2\text{CrO}_4) = 11,95$$

Calculatrices non autorisées.

LE PRION

Le prion est considéré comme l'agent responsable des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) chez les animaux et l'homme.

Ce sont des maladies qui entraînent une dégénérescence du système nerveux (maladies neuro-dégénératives), à incubation lente, dont le mode de transmission et l'agent infectieux sont mal définis.

L'étude des caractéristiques structurales et fonctionnelles du prion devrait permettre la mise au point de tests de diagnostic ainsi que la découverte de traitements thérapeutiques.

1. Le prion : un agent infectieux initialement assimilé à un virus (24 points)

L'encéphalopathie spongiforme bovine (maladie de la vache folle, ESB) et la maladie de Creutzfeld-Jacob font partie des ESST.

Certains auteurs préfèrent encore employer le terme d'agent transmissible non conventionnel, plutôt que prion, pour définir les agents infectieux responsables de ces maladies.

En effet, leur nature étant mal connue au départ, le prion a longtemps été assimilé à un virus.

- 1.1. Donner la définition d'un virus.
- 1.2. Citer les critères à la base de la classification structurale des virus.
- 1.3. L'hypothèse d'une analogie entre prion et virus de la poliomyélite a pu être formulée à un moment donné car ce virus peut atteindre les neurones de la moelle épinière.
Le virus de la poliomyélite est un virus non enveloppé, de symétrie icosaédrique, à ARN monocaténaire de polarité positive.
 - 1.3.1. Proposer un schéma annoté de l'architecture de cette particule virale.
 - 1.3.2. Donner la définition d'un ARN (+).
 - 1.3.3. Schématiser les étapes du cycle de multiplication d'un virus à ARN (+) dans une cellule.
 - 1.3.4. Quelle différence y-a-t-il entre un cycle de virus à ARN (-) et un cycle de virus à ARN (+) ?

2. Etude de la structure du prion (38 points)

Afin d'isoler l'agent responsable des encéphalopathies spongiformes transmissibles, des expériences ont été réalisées chez des mammifères. A partir du broyat d'un cerveau de hamster présentant des signes cliniques d'infection, des fractions ont été inoculées à des cerveaux de souris. Une fraction infectieuse hautement purifiée (10^6 DL₅₀ /mL) conserve son pouvoir pathogène après différents traitements : protéinase K, rayons UV et γ , ultrasons, urée, méthanal, nucléases.

2.1.

- 2.1.1. Donner la définition de la classe d'enzyme à laquelle appartiennent la protéinase K et les nucléases.
- 2.1.2. Préciser la réaction catalysée par la protéinase K.
- 2.1.3. Rappeler le principe de la classification internationale des enzymes.

2.2. En 1985, après traitement de la fraction infectieuse par la protéinase K, Prusiner a mis en évidence une protéine de masse moléculaire évaluée à 27-30 kDa. Il baptise cette protéine PrP pour « Proteinaceous infectious Particles » (ou Protéine du Prion).

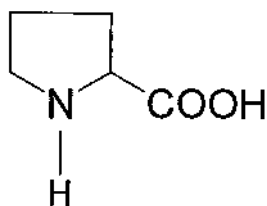
- 2.2.1. Donner la masse molaire de la protéine PrP. Justifier.
- 2.2.2. La masse moléculaire des protéines a été évaluée par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide.
Donner le principe général de cette électrophorèse.
Préciser la nature chimique et le rôle du réactif dénaturant.

La protéine PrP isolée de cerveaux sains est nommée PrP^c et celle de cerveaux infectés PrP^{sc}. Le séquençage des deux types de PrP donne des résultats identiques. Leur structure tridimensionnelle est donnée en document annexe.

2.3. L'étude de la structure primaire montre l'existence d'un peptide signal, d'une région riche en glycine et proline, d'un ancrage OPI (GlycoPhosphatidylInositol), d'hélices transmembranaires et amphiphiles et d'une partie hydrophobe éliminée.

2.3.1. Ecrire la formule semi-développée du dipeptide glycyl-proline.

Donnée : formule de la proline



2.3.2. Définir les quatre niveaux de structure d'une protéine en précisant la nature des liaisons mises en jeu à chaque niveau d'organisation.

2.3.3. Donner la définition d'un peptide signal. Expliquer son rôle.

2.3.4. Indiquer la propriété caractéristique des acides aminés présents dans un segment transmembranaire. Citer deux exemples d'acides aminés possédant cette caractéristique.

L'hypothèse actuelle sur le mécanisme de la maladie causée par le prion est la suivante : la présence d'une PrP^{Sc} serait responsable d'un mauvais repliement des PrP saines au niveau de leur structure secondaire et de leur conformation tridimensionnelle. Les PrP synthétisées en présence de PrP^{Sc} seraient donc anormales et leur accumulation entraînerait des troubles neurologiques.

2.4.1. Identifier les structures A, B, C du document **annexe** et reporter leur nom sur la copie.

2.4.2. Comparer les deux structures protéiques de l'annexe.

2.4.3. Donner le nom des protéines intervenant lors du repliement des protéines naissantes et responsables de la structure spatiale de ces molécules.

3. **Etude génétique du prion (33 points)**

Afin d'isoler le gène codant la PrP, une démarche partant de l'ADNc de la PrP a été suivie en 1985, incluant la création d'une banque d'ADNc et le criblage de cette banque par une sonde PrP obtenue par synthèse chimique.

3.1.

3.1.1. Définir précisément le terme ADNc.

3.1.2. Citer les différentes étapes de la création de la banque d'ADNc.

3.1.3. Présenter à l'aide d'un schéma commenté une technique de synthèse de l'ADNc, en faisant ressortir les étapes indispensables et communes à toutes les techniques.

3.1.4. A l'ADNc sont ensuite ajoutés des adaptateurs (linkers) de jonction.

Préciser le principe et l'intérêt de cette addition.

3.2. La conception de la sonde repose sur la connaissance d'une partie N terminale de la séquence en acides aminés de la PrP.

3.2.1. Nommer et résumer le principe général d'une méthode de séquençage d'un peptide.

3.2.2. Indiquer les étapes aboutissant à l'obtention de la sonde PrP.

3.2.3. La sonde PrP est dite « dégénérée ». Pourquoi ce qualificatif ?

3.3. Le gène codant la PrP est un gène cellulaire ubiquitaire présent sur le chromosome 2 de la souris. Il est noté *Prn-p*. Il possède un intron de 10 kb. Le cadre de lecture ouvert est situé sur le second exon.

3.3.1. Donner la définition d'un exon et d'un intron.

3.3.2. Schématiser la structure d'un gène eucaryote en faisant ressortir les différents éléments nécessaires à son fonctionnement.

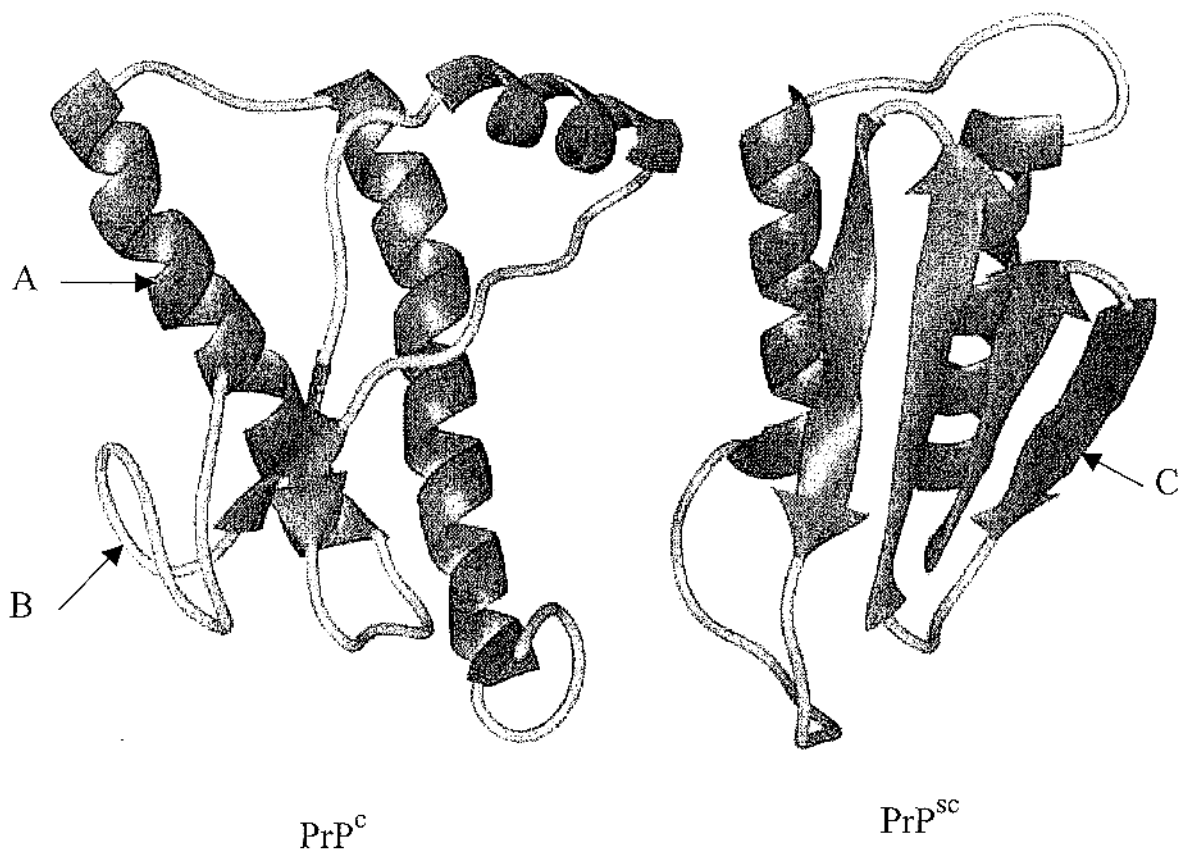
3.3.3. Que signifie l'expression « cadre de lecture ouvert » ?

4. Tests de détection du prion (25 points)

Les tests immunologiques de détection d'une encéphalopathie spongiforme transmissible utilisent des anticorps monoclonaux (ou non) dirigés contre la protéine PrP.

- 4.1. La sensibilité est un des critères de qualité d'une méthode de détection :
 - la définir,
 - citer et définir deux autres critères de qualité.
- 4.2. Présenter, en les justifiant, toutes les étapes de la production d'anticorps monoclonaux.
- 4.3. Plusieurs tests immunologiques sont basés sur la différence de comportement entre la protéine PrP^c et PrP^{sc} vis-à-vis de la protéinase K. L'enzyme provoque une hydrolyse complète de la PrP^c et une protéolyse partielle de la PrP^{sc} engendrant la protéine isolée par Prusiner : PrP₂₇₋₃₀.
Un anticorps anti PrP reconnaît la PrP₂₇₋₃₀.
La fixation de cet anticorps sur l'échantillon digéré par la protéinase K indique la présence de la forme anormale PrP^{sc} dans l'échantillon analysé.

La mise en évidence du prion dans un extrait cérébral peut être réalisée par Western blot.
Donner (éventuellement à l'aide de schémas) toutes les étapes de cette recherche à partir de l'extrait cérébral.
Envisager les résultats possibles.



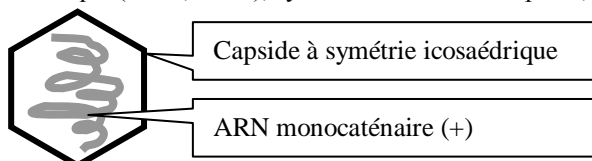
PROPOSITION DE CORRIGE

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. Structure acellulaire, parasitisme intracellulaire absolu (le virus est incapable de se multiplier en dehors des cellules), information génétique constituée d'ADN ou d'ARN.

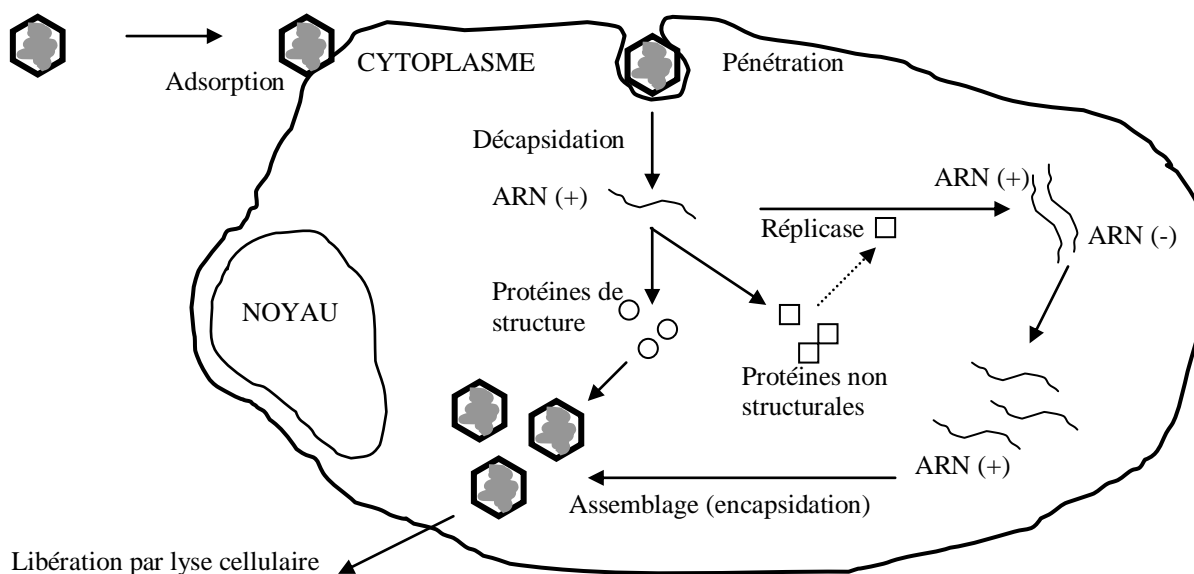
1.2. Nature de l'acide nucléique (ADN, ARN), symétrie de la nucléocapside, présence ou non d'une enveloppe.

1.3.1. Schéma :



1.3.2. ARN(+) équivalent d'un ARN_m, c'est-à-dire qu'il peut être traduit en protéines.

1.3.3. Schéma :



1.3.4. Le cycle d'un virus à ARN(-) nécessite une étape de transcription en ARN(+) réalisée par une transcriptase codée par le génome viral, afin de permettre la synthèse des protéines virales.

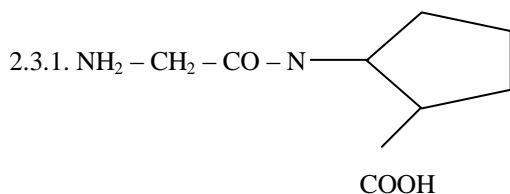
2.1.1. Ce sont des hydrolases, enzymes assurant la rupture d'une liaison covalente par addition d'une molécule d'eau.

2.1.2. La protéinase K catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidique, son activité est non spécifique.

2.1.3. La spécificité de la réaction catalysée et la nature du substrat interviennent. Il existe des classes et des sous-classes (en fonction du substrat et d'autres critères).

2.2.1. Un poids moléculaire de 27 à 30 kDa équivalent à une masse molaire voisine de 27000 à 30000 g/mol.

2.2.2. Le sodium docecyl sulfate (SDS) est un détergent constitué d'une chaîne hydrophobe terminée par un groupement $-SO_3^-$ qui dénature les structures III et IV des protéines. Celles-ci sont alors chargées négativement, leur densité de charge est constante, ce qui fait que la migration des protéines est seulement fonction de leur taille, elles sont séparées lors de l'électrophorèse dans le gel de polyacrylamide par un effet de tamisage moléculaire.



2.3.2. Structure primaire : séquence (ordre, enchaînement) des acides aminés reliés par liaisons covalentes «peptidiques» (amides)

Structure secondaire : organisation régulière locale (hélice α , feuillet β), interactions « hydrogène » entre les fonctions $-C=O$ et $-N-H$ des liaisons peptidiques.

Structure tertiaire : structure tridimensionnelle d'une chaîne
Structure quaternaire : association de sous-unités

Interactions de faible énergie (« hydrogène », ioniques, hydrophobes). Ponts disulfures.

2.3.3. Le peptide « signal » est une séquence de 15 à 30 acides aminés, hydrophobe, située à l'extrémité N-terminale, placée sur les protéines à destination du réticulum endoplasmique. Il permet l'adressage de la protéine qui le contient vers son insertion dans la membrane plasmique ou sa sécrétion dans le milieu extra-cellulaire.

2.3.4. : Ce sont des acides aminés hydrophobes, car le segment dans lequel ils sont situés est inséré la région hydrophobe de la membrane plasmique. Ala, Val, Leu ou Ile.

2.4.1. A = hélice α B = boucle C = feuillet β

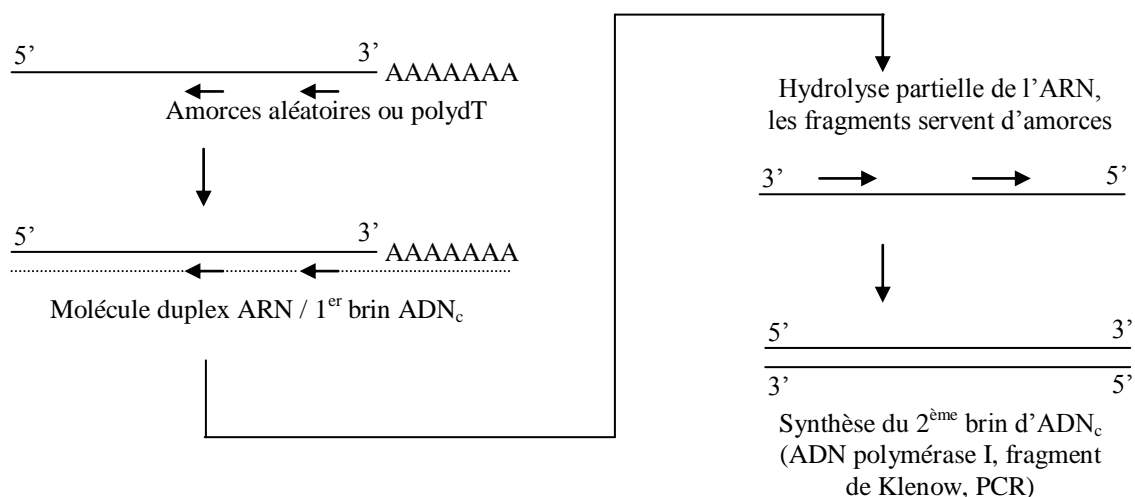
2.4.2. Dans la PrP^{sc} : il y a davantage de feuillet β , antiparallèles, et moins d'hélices α , la protéine est plus compacte.

2.4.3. Protéines chaperons (ou protéines chaperonnes, ou chaperonines).

3.1.1. L'ADN complémentaire est obtenu à partir d'une molécule d'ARN_m.

3.1.2. Extraction des ARN – synthèse de l'ADN double brin – insertion dans un vecteur – transformation (bactérienne)

3.1.3. Schéma :



3.1.4. Petites séquences d'ADN double brin, ajoutées par ligature, contenant des sites de restriction afin d'obtenir des extrémités cohésives permettant l'insertion du fragment d'intérêt dans le vecteur.

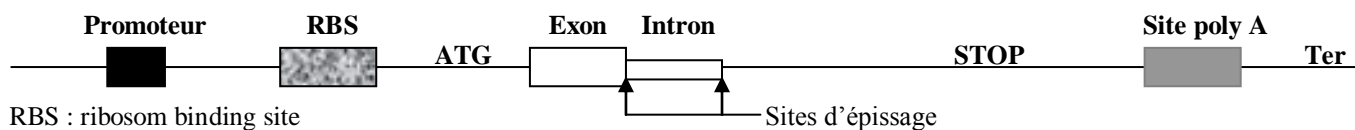
3.2.1. Méthode d'Edman : méthode récurrente, permettant la libération progressive et séquentielle des résidus de l'extrémité N-terminale, puis leur identification.

3.2.2. La séquence des acides aminés permet de déduire la séquence nucléotidique, puis d'effectuer la synthèse chimique des oligonucléotides correspondants et le marquage des sondes.

3.2.3. Le code génétique est « dégénéré », c'est-à-dire que plusieurs codons peuvent correspondre à un seul acide aminé. La sonde est donc un mélange d'oligonucléotides.

3.3.1. Un intron est une séquence éliminée du transcrit par épissage, il est présent dans les gènes des Eucaryotes et des Archaeobactéries. Un exon est une séquence codante.

3.3.2. Schéma :



3.3.3. La séquence est terminée par un codon de terminaison.

4.1. Sensibilité : aptitude du test à fournir une réponse mesurable lorsqu'il y a un faible écart du paramètre à mesurer. Autres critères de qualité : spécificité, limite de détection, reproductibilité, répétabilité, exactitude, précision.

4.2. Immunisation répétée pour stimuler la prolifération des lymphocytes B – Prélèvement de la rate pour récupérer les lymphocytes – Fusion des lymphocytes avec des cellules myélomateuses HGPRT⁻ – Sélection des cellules hybrides (HGPRT⁺ et immortalisées) produisant des anticorps sur milieu HAT (contenant de l'aminoptérine bloquant la synthèse des bases) – criblage des hybrides produisant des anticorps de spécificité donnée – Isolement des clones produisant les anticorps recherchés – Production de ces anticorps par cultures cellulaires en bioréacteur – Purification des anticorps produits.

4.3. Traitement à la protéinase K – Electrophorèse en gel de polyacrylamide – (Electro)transfert sur membrane – Saturation des sites non spécifiques – Lavage – Addition des anticorps marqués anti-PrP – Lavage – Révélation.

Extrait cérébral sain : il contient la protéine native PrP, dont l'hydrolyse est totale, donc la bande PrP₂₇₋₃₀ est absente.

Extrait cérébral d'un individu malade : présence de la bande PrP₂₇₋₃₀ car l'hydrolyse de la protéine PrP^{sc} est partielle.

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

1 feuille de papier millimétré.

PECTINES ET BACTERIES PECTINOLYTIQUES

Les pectines constituent, avec d'autres polymères glucidiques, le ciment maintenant l'armature de cellulose des parois végétales.

Ces polysides peuvent être détruits par différentes enzymes pectinolytiques dont l'action peut être dommageable (pourrissement de fruits ou de légumes, sur pied, après récolte ou lors du stockage) ou bénéfique (production de protoplastes dans le but d'obtenir de nouvelles espèces végétales, amélioration de la libération du jus de raisin lors des premières étapes de la vinification, valorisation de déchets de biomasses végétales ou obtention de fragments osidiques ayant des propriétés thérapeutiques).

L'étude des enzymes pectinolytiques, en particulier des pectate lyases, se révèle donc d'un grand intérêt biotechnologique.

1. Etude de la croissance et de l'activité Pectate Lyase d'*Erwinia chrysanthemi* dans le but d'une production industrielle (10 points)

1.1. Etude du document 1.

1.1.1. Donner pour chaque graphe (1 et 2) les différentes phases de la croissance de *E.chrysanthemi* et estimer graphiquement la valeur des paramètres d'état suivants :

- temps de génération (G)
- vitesse spécifique de croissance (Q_x) pendant la phase exponentielle

1.1.2. Commenter les différences observées entre les deux graphes pour Q_x , G et l'activité pectate lyase.

1.1.3. Donner le rôle du polygalacturonate et des extraits de plantes.

1.2. Que penser des valeurs obtenues pour Q_x et G en vue d'une production industrielle de pectate lyase par *E.chrysanthemi* ?

2. Clonage du gène d'une pectate lyase chez *Escherichia coli* (31 points)

Il existe 5 isoenzymes de la pectate lyase notés Pel A, Pel B, Pel C, Pel D, Pel E.

Les pectate lyases Pel E et Pel D ont fait l'objet d'un clonage et d'une production chez la bactérie hôte *Escherichia coli*.

2.1. Choix d'une bactérie hôte de production.

En s'appuyant sur la valeur de G obtenue en 1.1.1. expliquer le choix d'*E. coli* comme cellule hôte dans le cadre du clonage de gènes codant les pectate lyases d'*E.chrysanthemi*.

2.2. Clonage du gène *pel E*

Dans des études préliminaires, le gène *pelE* (1,7 kb) codant la pectate lyase E a été placé dans un plasmide pour obtenir le plasmide TP9 (4,5 kb) (document 2).

Afin de caractériser enzymatiquement la pectate lyase PelE, le gène *pelE* du plasmide TP9 doit être transféré dans le vecteur de production constitué par le plasmide pT7-5 (document 2).

2.2.1. Le document 3 présente un gel sur lequel a été déposé le produit de digestion du plasmide TP9 :

- Estimer la taille des trois bandes a – b – c obtenues pour le dépôt 2.
- Indiquer leur nature.

2.2.2. Le fragment de restriction issu du TP9 contenant *pelE* est récupéré puis mis en présence du plasmide pT7-5 digéré au préalable par *Bam* HI et *Hind* III afin de tenter une ligature (ou ligation) entre eux.

Pour vérifier la qualité de ce clonage, des bactéries *Escherichia coli* DH5 α rendues compétentes sont transformées par le mélange de ligature.

2.2.2.1. D'après le schéma du pT7-5 (document 2), rappeler les rôles des différentes séquences portées par ce vecteur.

2.2.2.2. Préciser sur quel milieu la sélection des bactéries transformées peut être effectuée.

2.2.2.3. 150 μL de bactéries compétentes DH5 α ont été transformées par 5 μL d'une solution de pT7-5-*pelE* à 3 ng/ μL . 800 μL de LB liquide sont ensuite ajoutés. Une boîte de sélection estensemencée avec 50 μL de cette suspension. Après incubation, 80 colonies sont dénombrées sur la boîte. Calculer l'efficacité de transformation exprimée en nombre d'unités formant colonie (UFC) par μg de plasmide transformant.

2.3. Vérification des clones sélectionnés :

Les bactéries obtenues après transformation et sélection sont repiquées sur un milieu de croissance contenant du polygalacturonate qui est un des substrats de la Pel E. En recouvrant ces répliques d'une solution saturée d'acétate de cuivre, un halo translucide sur fond bleu apparaît autour des colonies dotées d'une activité pectate lyase.

2.3.1. Quels sont les génotypes correspondant aux deux phénotypes mis en évidence sur ce milieu ?

2.3.2. Comment préparer le vecteur afin d'obtenir, après transformation, exclusivement des clones présentant une activité pectate lyase ?

2.4. Production de la protéine pel E.

Le plasmide pT7-5-*pelE* est ensuite transféré dans la souche BL21 d'*E. coli*. Cette souche présente dans son génome le gène de l'ARN polymérase du phage T7 (T7 polymérase) sous le contrôle du promoteur Lac (*Plac*) inducible par l'IPTG. Cette T7 polymérase reconnaît spécifiquement le promoteur *phi 10* placé sur le pT7-5 (**document 4a**).

2.4.1. Reproduire, compléter et annoter le **document 4a** pour expliquer l'effet de l'addition ou non d'IPTG dans un milieu de cultureensemencé avec des bactéries BL21 contenant le plasmide pT7-5-*pelE*.

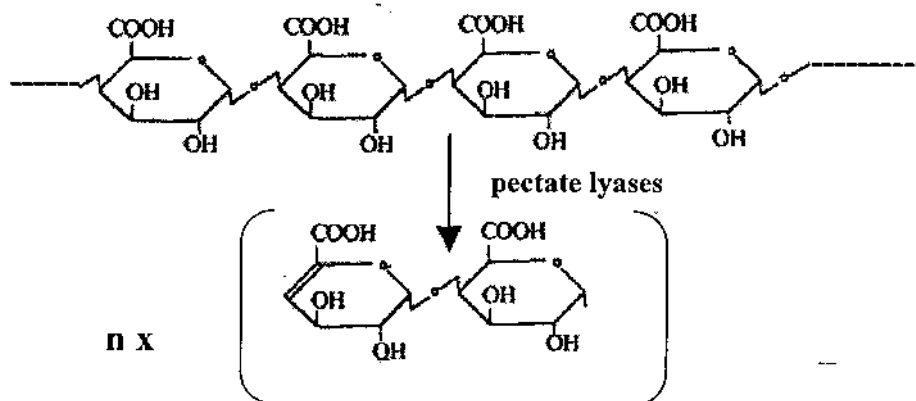
2.4.2. Le **document 4 b** présente les résultats d'une SDS-PAGE réalisée à partir d'extraits de la souche d'*E. coli* cultivée dans deux conditions différentes. Analyser ces résultats.

3. Extraction, purification et étude de pectate lyases (28 points)

3.1. Extraction et purification de l'enzyme à partir d'une culture d'*Escherichia coli* recombinante.

L'extraction - purification est conduite selon différentes étapes. Lors du recueil de la fraction périplasmique, on utilise un tampon contenant du β -mercaptoéthanol.

Le suivi de l'extraction nécessite le contrôle, à chaque étape, de l'activité catalytique (**document 5**). La réaction catalysée par une pectate lyase est la suivante :



Les composés insaturés produits présentant un maximum d'absorption à 230 nm (coefficient d'absorption linéique molaire $5200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) permettent un suivi spectrophotométrique. L'activité Pel est exprimée en « μmol de produit formé par min » dans les conditions précisées pour le dosage.

3.1.1. Quel est le rôle du β -mercaptoéthanol dans le tampon d'extraction ?

3.1.2. Calculer l'enrichissement global (facteur de purification) obtenu lors de la purification de la Pel D à partir du **document 5**.

3.2. Etude de quelques propriétés des pectate lyases.

3.2.1. Influence de la nature du substrat.

Différentes pectines de citron, possédant des degrés variables de méthylation, ont été testées avec différentes pectate lyases (Pel). Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 6**.
Dégager les conclusions de cette étude.

3.2.2. Détermination des constantes cinétiques.

Les conditions de mesure de la vitesse initiale sont les suivantes :

- 900 μL de substrat en tampon TRIS (concentrations variables en substrat) sont préincubés 5 min à 37° C.
- après addition de 100 μL d'enzyme la cinétique est suivie à 230 nm pendant 2 min.
- trajet optique : 1 cm.

3.2.2.1. Les résultats, obtenus pour la Pel C sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Concentration en substrat g.L^{-1}	0,016	0,024	0,032	0,040
Vitesse initiale $\Delta\text{A}/\text{min}$	0,028	0,037	0,044	0,050

- A partir de l'équation de Michaelis-Menten, retrouver l'expression $V/S = -1/K_m \times V + V_m/K_m$
- Tracer la courbe $V/S = f(V)$
- Déterminer graphiquement les constantes cinétiques de la Pel C (K_m en g.L^{-1} , V_{max} en $\Delta\text{A}/\text{min}$).
Exprimer la concentration d'activité catalytique en U/mL d'enzyme sachant que 1 U correspond à la formation de 1 μmol de produit par minute ?

3.2.2.2. Comparaison de l'efficacité des différentes Pel.

Pel étudiée	A	B	C	D	E
K_m (g.L^{-1})	0,30	0,03	0,04	0,28	0,42
V_{max} (U) rapportée à 1 mg d'enzyme	46	2500	760	670	3800

- Dans quelle condition de milieu réactionnel de catalyse peut on écrire : $V_i \approx V_{\text{max}}/K_m \times [S]$? Justifier.
- Le rapport V_{max}/K_m est appelé efficacité catalytique. A partir des valeurs du tableau ci-dessus, déduire la forme enzymatique la plus efficace.

3.2.3. Influence de l'épicatéchine sur l'activité des pectate lyases (**document 7**)

L'épicatéchine est un composé présent à forte concentration dans le péricarpe (ensemble des tissus entourant les graines) de fruits non mûrs.

3.2.3.1. Indiquer et justifier la nature de l'effet observé sur la Pel E.

3.2.3.2. En déduire le rôle physiologique de l'épicatéchine sur le pourrissement des fruits.

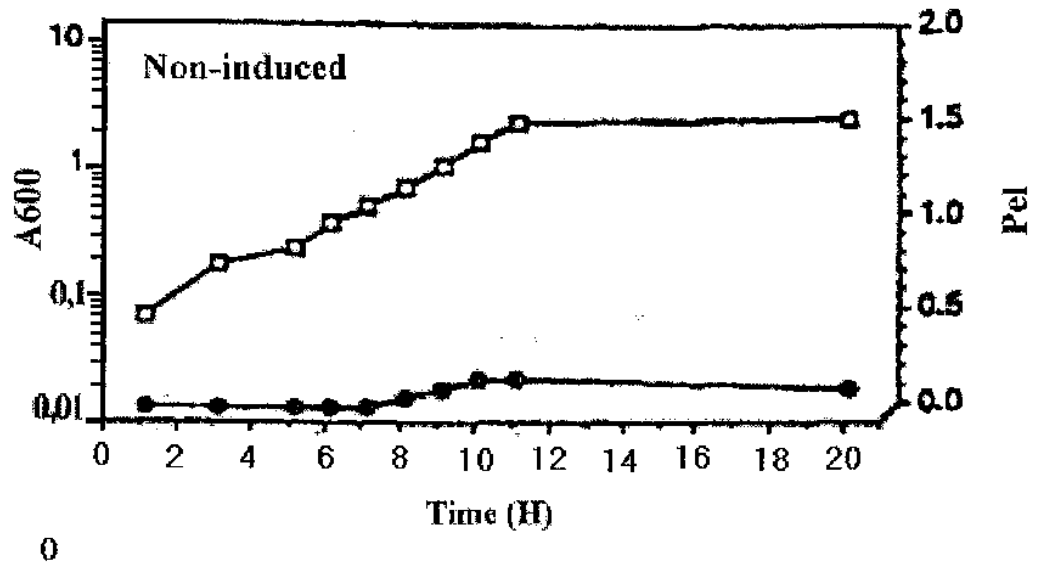
4. **Applications biotechnologiques des pectinases : obtention et cultures de protoplastes (11 points)**

- 4.1. Préciser le rôle de chaque catégorie de substances entrant dans la composition des milieux utilisés pour l'obtention et la culture de protoplastes (**document 8**).
- 4.2. Déduire de l'analyse comparative de la composition des deux milieux proposés, l'utilisation de chacun des milieux.

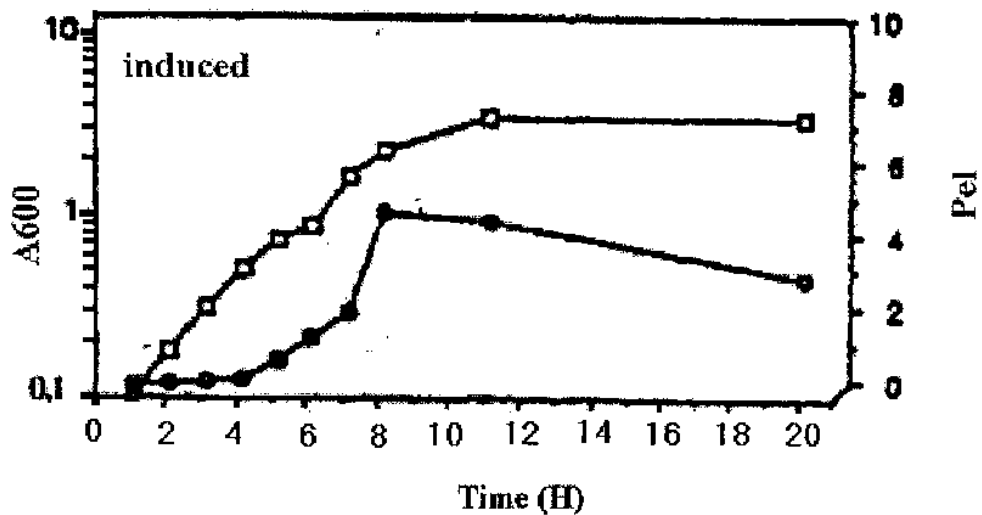
DOCUMENT 1 :

Croissance et activité pectate lyase (Pel de *Erwinia chrysanthemi* en fonction du temps

GRAPHE 1



GRAPHE 2

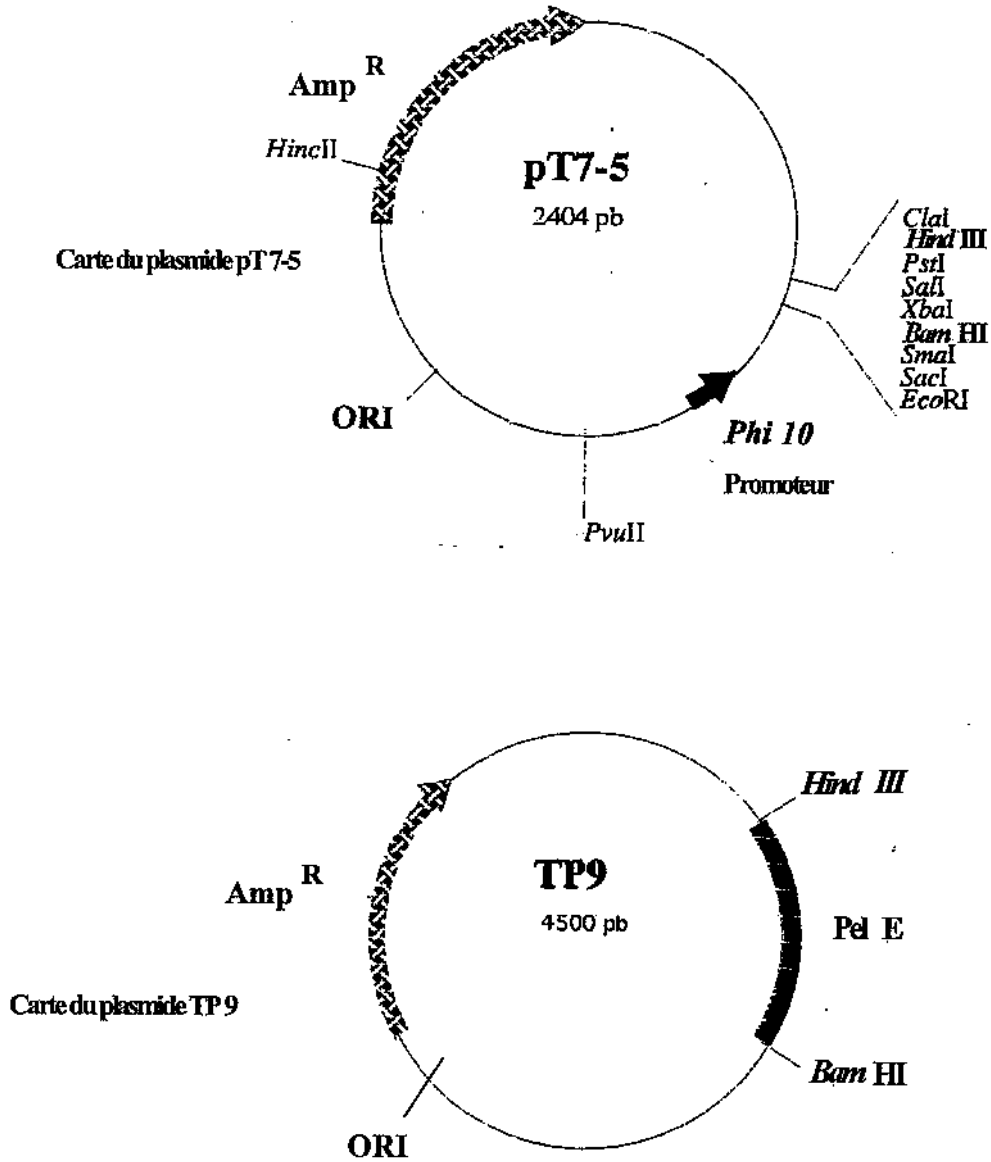


Pel synthesis during bacterial growth. Growth and induction of Pel synthesis were followed in the wild-type strain 3937 in glycerol M63 minimal medium supplemented with PGA and vegetal extract for the inducing conditions. Growth was followed by measurement at A_{600} (\square). Pel (\bullet) specific activities were determined on each sample and are expressed in micromoles per minute per milligram (dry weight) of bacteria.

PGA = polygalacturonate

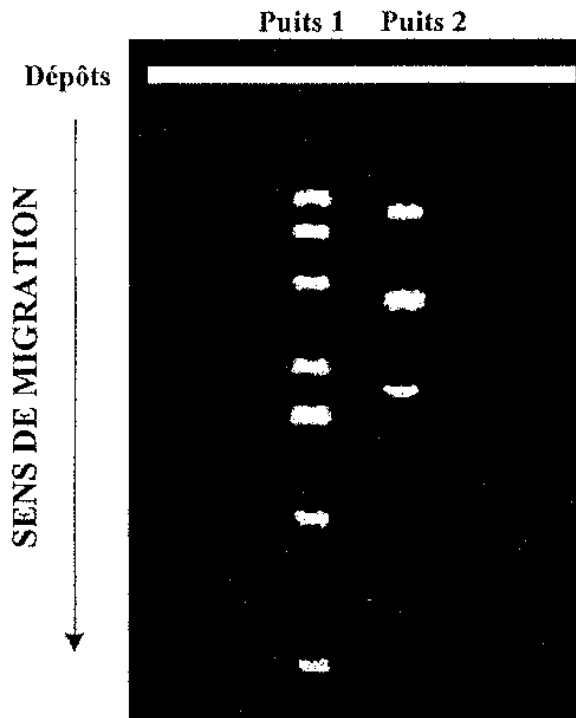
DOCUMENT 2 :

Vecteurs de clonage du gène *Pel E*.



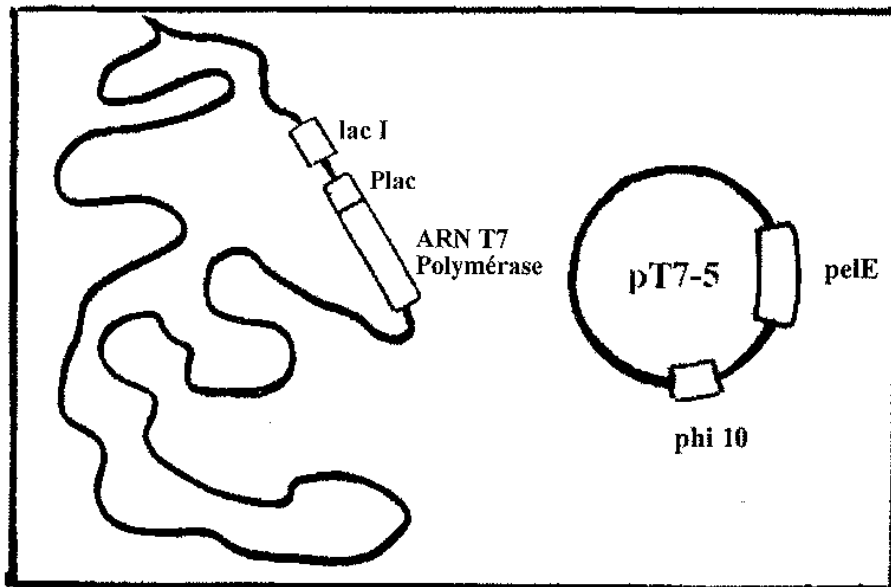
DOCUMENT 3 :

Profil de restriction du TP9 digéré par *Hind* III et *Bam* HI



- a Puits 1 : marqueur de taille
(bandes : 516, 1018, 1633, 2036, 3054,
4077, 5090 pb)
- b Puits 2 : partie aliquote de la digestion du
plasmide TP9 par *Bam*HI et *Hind* III.
- c

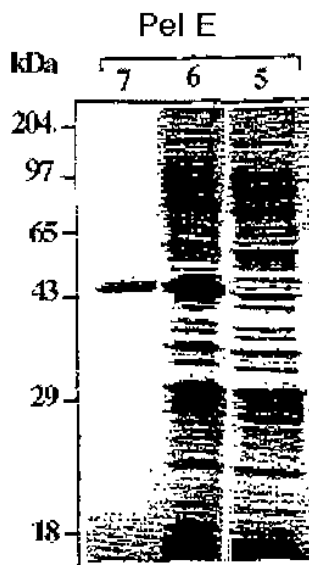
DOCUMENT 4a :



Bactérie BL 21 transformée par pT7-5

lac I = gène codant le répresseur de l'opéron lactose
Plac = promoteur de l'opéron lactose

DOCUMENT 4b :



SDS-PAGE of the *E. chrysanthemi* PelE extracts from *E. coli* : protein bands were detected by Coomassie blue staining. Lane 5 : extracts of the recombinant *E. Coli* cultures before induction. Lane 6 : extracts of the recombinant *E.coli* cultures after induction. Lane 7 : purified enzyme.

DOCUMENT 5 :

Extraction et purification de pectate lyases (Pel).

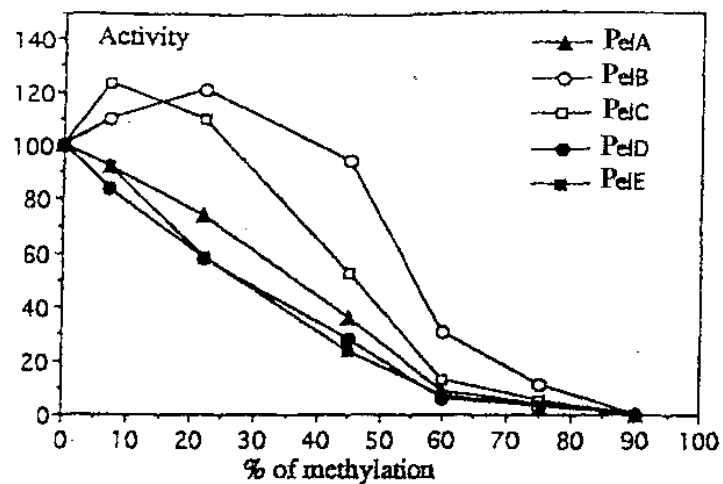
Pel E purification

Step	Sp act ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) ^a
	PelE
Cell	24
Periplasmic fraction	98
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	160
TSK- gel Phenyl 5 PW column	487

^a Specific activities are expressed as enzyme units per mg of protein. Standard conditions were used for these assays : 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.1 mM CaCl₂ and 0.5 g of polygalacturonate per liter.

DOCUMENT 6 :

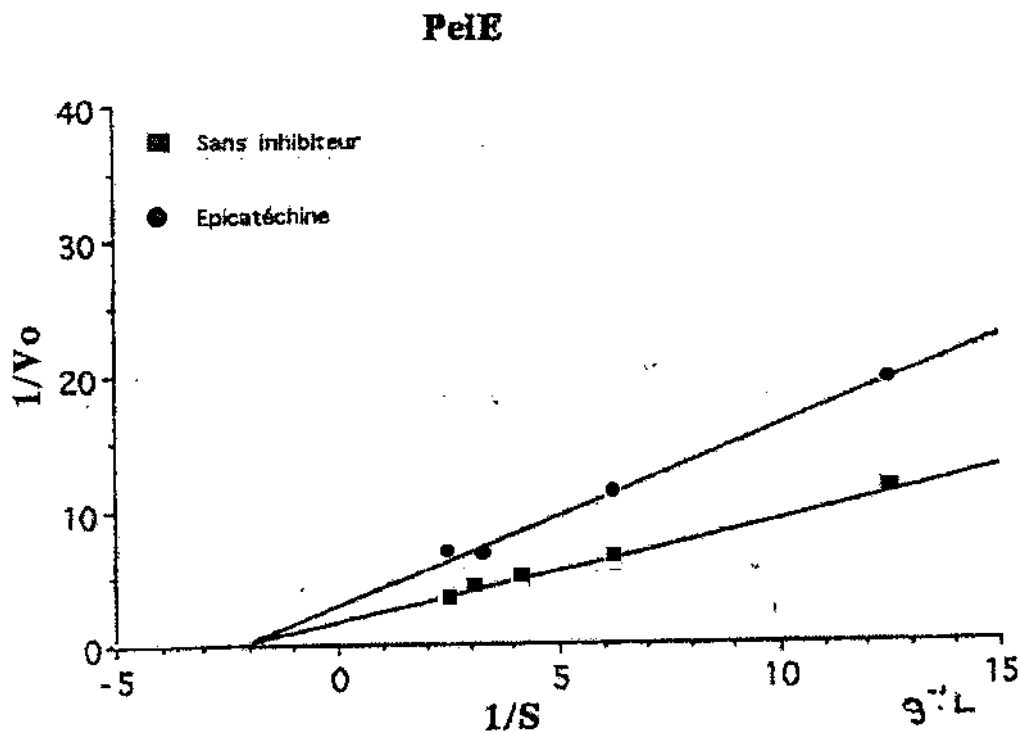
Etude de l'influence de la nature du substrat sur l'activité des différentes Pel.



Effects of the degree of pectin methylation on Pel activity. Activities of the five Pels toward pectins, presenting various degrees of methylation, were expressed relative to that toward nonmethylated substrate, which was arbitrarily defined as 100. Assays were performed at 37°C in 100 mM Tris-HCl (pH 8.5)-0.1 mM CaCl₂-0.5 g of substrate per liter.

DOCUMENT 7 :

Etude de l'inhibition de la Pel E par l'épicatéchine.



DOCUMENT 8 :**Composition des deux milieux utilisés pour l'obtention et la culture de protoplastes.**

ELEMENTS	COMPOSITION EN MILLIGRAMME/LITRE	
	MILIEU 1	MILIEU 2
Pectinase		
- Macerozyme R10 (¹).....	200	
Cellulases :		
- Onozuka R10 (¹).....	1 000	
- Driselase (²).....	500	
NH ₄ NO ₃	825	825
KNO ₃	950	950
CaCl ₂ , 2 H ₂ O.....	220	220
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	185	185
KH ₂ PO ₄	85	85
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,85	27,85
Na ₂ SO ₄	37,25	37,25
ZnSO ₄	1	1
H ₂ BO ₃	1	1
MnSO ₄ , 4H ₂ O.....	0,1	0,1
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	0,03	0,03
AlCl ₃	0,03	0,03
NiCl ₂ , 6H ₂ O.....	0,03	0,03
K I.....	0,01	0,01
Inositol.....	100	100
Panthoténate de calcium.....	1	1
Biotine.....	0,01	0,01
Niacine (Nicotinamide).....	1	1
Pyridoxine.....	1	1
Thiamine.....	1	1
Acide naphthalène acétique.....	3	3
6-Benzyladénine.....	1	1
Saccharose.....		20 000
Mannitol.....	80 000	80 000
Agar.....		6 000
(le pH est ajusté à 5,5)		(éventuellement)

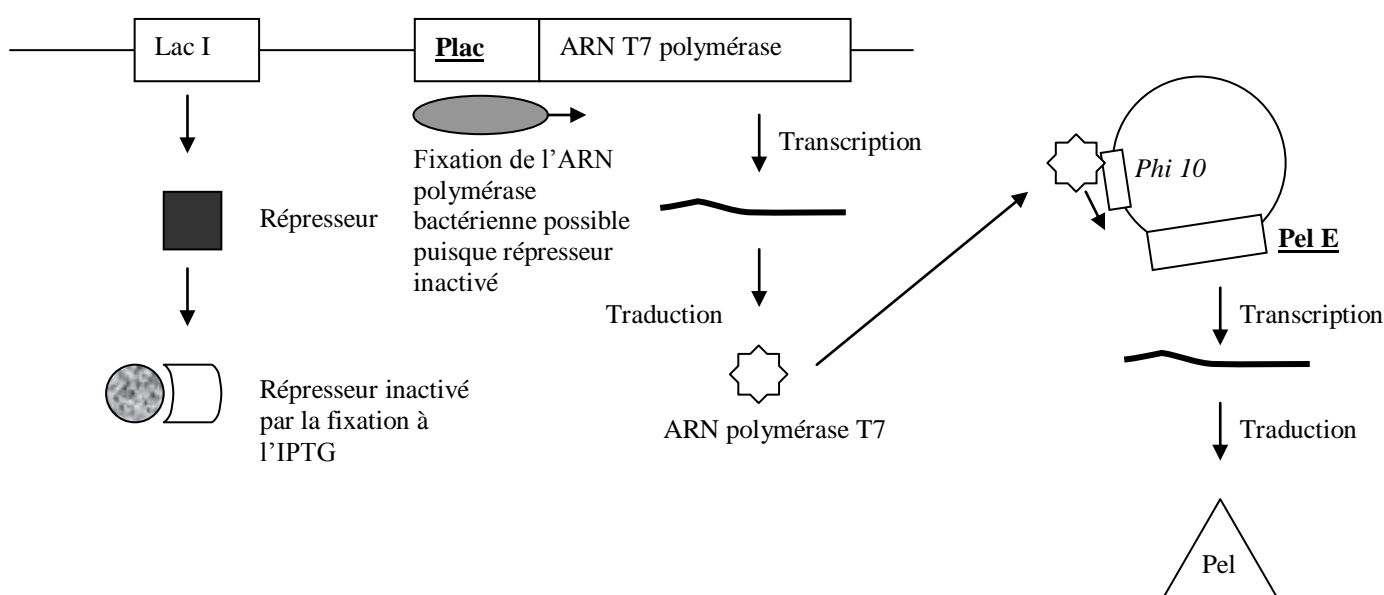
1. Yakult Biochemicals Co, Ltd, 8-21 Shingikancho, Nishinomiya, Japon.

2. Kyoxa Hakko Kogyo Co, Ltd, P.O. Box 5170, Tokyo International 100-31, Japon.

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.

- 1.1.1. Graphe 1 : phase exponentielle jusqu'à 11 h, puis phase stationnaire de 11 à 20 h.
 $G_1 \approx 2$ h, d'où $Q_{X1} = \ln 2/G \approx 0,35$ h⁻¹
- Graphe 2 : phase exponentielle jusqu'à 6 h, puis phase de ralentissement (ou décélération) jusqu'à 11 h environ, puis phase stationnaire de 11 à 20 h.
 $G_2 \approx 1,2$ h, d'où $Q_{X2} = \ln 2/G \approx 0,58$ h⁻¹
- 1.1.2. G_1 plus grand que G_2 (ou Q_{X1} plus petit que Q_{X2})
 Activité pectate lyase très faible sur graphe 1 et n'augmente pas (voisine de 0,1).
 Synthèse de l'enzyme visible sur graphe 2 pendant la phase exponentielle (environ 5 μmol/min/mg).
- 1.1.3. Le PGA et les extraits de plantes sont des polymères osidiques, substrats de l'enzyme, inducteurs de sa synthèse, favorisent la croissance par leur assimilation en tant que sources de C et d'énergie. Apport de facteurs de croissance ?
- 1.2. Le temps de génération est trop élevé, mais surtout le milieu de culture doit contenir des inducteurs de la synthèse des pectate lyases, ce qui complique la production à l'échelle industrielle.
- 2.1. Le temps de génération d'*Escherichia coli* est plus court (20 à 30 min dans des conditions optimales).
- 2.2.1. Bande a : entre 4 et 5 kb, c'est le plasmide non digéré (4,5 kb).
 Bande b : environ 2,8 kb (< 3 kb), c'est le TP9 linéarisé sans insert.
 Bande c : environ 1,8 kb (> 1,6 et < 2 kb), c'est l'insert (1,7 kb).
- 2.2.2.1. Amp^R : gène codant la résistance à l'ampicilline, ce marqueur permet la sélection des transformants.
 ORI : origine de répllication bactérienne.
 Phi 10 : promoteur pour la transcription du gène Pel.
 MCS : site multiple de clonage permettant l'insertion du gène Pel.
- 2.2.2.2. Milieu contenant de l'ampicilline afin de maintenir la pression de sélection.
- 2.2.2.3. A = Nombre total de clones = (80 colonies / 50 μL étalés) x (800 + 150 + 5 μL de volume total)
 B = Masse d'ADN mise en jeu = 5 μL x 3 ng/μL x 10⁻³ exprimée en μg
 Efficacité de transformation = A/B = 1,0.10³ UFC/μg.
- 2.3.1. Pel + : clones transformés par le vecteur recombinant, repérés par un halo clair sur fond bleu.
 Pel - : clones transformés par le vecteur recircularisé, pas de halo clair.
- 2.3.2. Il faut éviter la recircularisation du vecteur, soit par purification par électrophorèse préparative, soit par un traitement à la phosphatase alcaline.
- 2.4.1. Schéma :



- 2.4.2. Piste 7 : enzyme purifiée, une bande à environ 43 kDa
 Piste 5 : nombreuses bandes correspondant à l'ensemble des protéines bactériennes
 Piste 6 : profil similaire à la piste 5 avec une bande plus intense à environ 43 kDa, correspondant à la Pel surexprimée.

- 3.1.1. β-mercaptoéthanol : agent réducteur protecteur des groupements thiols (-SH) de la protéine
- 3.1.2. Enrichissement global = activité spécifique finale / activité spécifique initiale = 487/24 = 20,3.

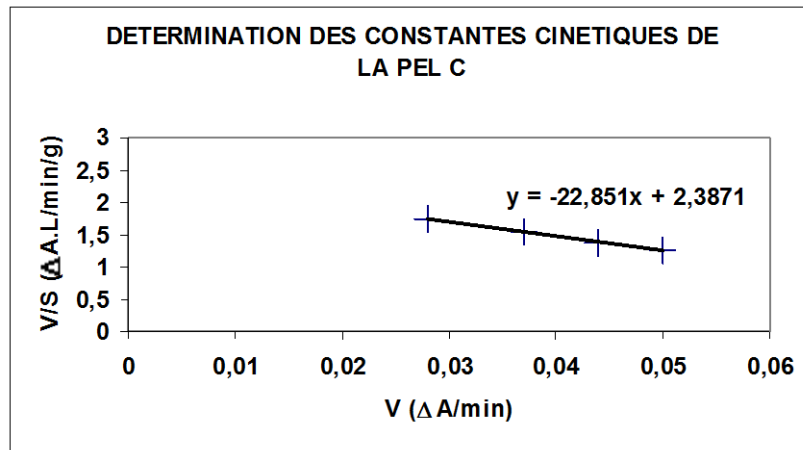
3.2.1. Pel B et Pel C : augmentation de l'activité pour les pourcentages de méthylation < 20 %, puis diminution pour des pourcentages > 45 %
 Pel A, D et E : diminution de l'activité quel que soit le pourcentage de méthylation.
 Conclusion : il est intéressant de méthyler les substrats de Pel B et Pel C entre 10 et 20 %, mais pas pour les autres enzymes.

3.2.2.1. $V = V_m \times S / (K_m + S)$, donc en développant $(V \times K_m) + (V \times S) = (V_m \times S)$, soit en mettant S en facteur :
 $V \times K_m = S \times (V_m - V)$, d'où finalement $V/S = (V_m - V) / K_m = V_m / K_m - V / K_m$.

Le tableau suivant permet le tracé :

V/S en $\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$	1,75	1,54	1,375	1,25
Vitesse initiale $\Delta A/\text{min}$	0,028	0,037	0,044	0,050

Graphes :



Pente : - 22,851 = -1/ K_m d'où $K_m \approx 0,044 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.
 Ordonnée à l'origine : 2,3871 $\approx 2,39 = V_m / K_m$, d'où $V_m \approx 2,39 \times 0,044 = 0,104 \Delta A/\text{min}$.

Cat C = $(V_m / \epsilon \cdot l) \times (V_{MR} / PE) = (0,105 / 5200) \times (1/0,1) \times 10^3 = 0,202 \text{ U/mL}$.
 Avec V_{MR} = volume du milieu réactionnel et PE = volume de la prise d'essai de solution enzymatique.

3.2.2.2. Si $S \ll K_m$.

Le tableau suivant, obtenu à partir des valeurs figurant dans l'énoncé, permet de répondre à la question :

Pel étudiée	A	B	C	D	E
Efficacité catalytique V_m / K_m	153,3	$8,3 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^3$	$9 \cdot 10^3$

Pel B est donc la forme la plus efficace.

- 3.2.3.1. K_m inchangé, V_m diminue, il s'agit donc d'une inhibition on compétitive.
- 3.2.3.2. L'épicatéchine est un inhibiteur des pectinases. Le tissu végétal n'est alors pas hydrolysé tant que la graine n'est pas mûre et l'épicatéchine évite le pourrissement des fruits qui pourrait aboutir à la perte de la graine.

4.1. Pectinases et cellulases : enzymes dégradant les parois pecto-cellulosiques et permettant l'obtention des protoplastes.
 P, K, Ca, Mg : macroéléments.
 Zn, Mn, Cu ... : microéléments.
 NH_4NO_3 et KNO_3 : sources d'azote (NO_3^- assimilable par les plantes).
 Biotine, panthoténate, niacine, pyridoxine, thiamine : facteurs de croissance (vitamines).
 Acide naphthalène acétique (= auxine) : phytohormone stimulant la multiplication cellulaire et l'organogenèse.
 6 benzyladénine (= cytokinine) : phytohormone stimulant la multiplication cellulaire.
 Saccharose : source de C et d'énergie.
 Mannitol : maintien d'une pression osmotique élevée permettant d'éviter la lyse des protoplastes.
 Agar : gélification du milieu.
 Remarque : le pH=5,5 correspond à l'optimum de croissance des végétaux.

4.2. Milieu 1 : présence des enzymes (pectinases et cellulases) et milieu hypertonique, il permet d'obtenir les protoplastes.
 Milieu 2 : absence d'enzymes, milieu hypertonique gélifié contenant du saccharose, destiné à la culture des protoplastes obtenus

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE 2^{ème} partie :
REALISATION PRATIQUE D'OPERATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE

Durée : 8 heures

Coefficient : 8

Calculatrice autorisée. Une feuille de papier millimétré.

RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT DANS L'INDUSTRIE LAITIÈRE

PREMIER JOUR

Durée : 5 heures 30

Le département «Recherche et Développement» d'une industrie fromagère est chargé de la mise au point de la fabrication d'une nouvelle variété de fromage « pur chèvre ».

Dans l'industrie laitière, les micro-organismes qui portent le plus atteinte aux processus fermentaires sont les phages de bactéries lactiques. Ces derniers sont responsables de 98 % des accidents de fabrication.

Les levains utilisés pour la fabrication des fromages étant susceptibles d'être contaminés par des phages de nombreuses études sont réalisées pour trouver des méthodes de prévention.

A l'occasion de ces études, un gène de résistance aux phages du biovar *diacetylactis* de *Lactococcus lactis* sous-espèce *lactis* a été cloné puis transféré dans différentes souches de ferments lactiques utilisés industriellement.

Afin d'apprécier l'efficacité de ce transfert génétique, on cherche :

- à quantifier l'expression, par dosage immunologique, d'une protéine de résistance aux phages, nommée « *TIG* », codée par ce gène ;
- à évaluer l'impact de cette insertion d'ADN dans la qualité organoleptique du fromage fabriqué à l'aide de ce ferment.

PREMIÈRE PARTIE :

Contrôle de matériel génétique avant clonage (53 points)

Une séquence de 1000 à 1300 paires de bases de l'ADN génomique de *Lactococcus lactis*, délimitée par deux sites de restriction de l'enzyme E1, confère une résistance aux phages.

Lors d'une manipulation antérieure, deux fragments d'ADN génomique de *Lactococcus lactis* ont été récupérés (fragment X et fragment Y). On se propose de vérifier la présence de la séquence de résistance dans ces deux ADN sources, en vue de leur insertion dans le plasmide P.

Le plasmide P ne possède pas de site de restriction pour l'enzyme E1 mais peut être linéarisé par l'enzyme E2 compatible avec E1.

1.1.Réactifs

- solution d'ADN source X à 25 ng.µL⁻¹, notée « X »
- solution d'ADN source Y à 25 ng.µL⁻¹ notée « Y »
- solution de plasmide P à 40 ng.µL⁻¹, notée « P »
- endonucléase de restriction E1 à 10 U.µL⁻¹ notée « E1 »
- endonucléase de restriction E2 à 10 U.µL⁻¹, notée « E2 »
- tampon d'hydrolyse Tp1 10X (10 fois concentré), noté « Tp1 »
- tampon d'hydrolyse Tp2 10X (10 fois concentré), noté « Tp2 »
- eau distillée notée « eau BM »
- solution de marqueur de taille prêt à l'emploi en solution tampon de charge, notée « MT »
- solution de tampon de charge 6 X, notée « TCh »

1.2.Hydrolyse des ADN sources et du plasmide

1.2.1. Mise au point du protocole d'hydrolyse

Selon les indications du protocole suivant, construire un tableau de manipulation donnant la composition exacte des trois mélanges réactionnels correspondant aux trois digestions.

Soumettre ce tableau à un examinateur avant de manipuler.

Protocole :

- hydrolyse n°1 : 100 ng d'ADN source X
+ 10 U d'enzyme E1
+ tampon Tpl 1 X final
+ « eau BM » qsp 15 µL
- hydrolyse n°2 : idem avec ADN source Y
- hydrolyse n°3 : 100 ng de plasmide P
+ 10 U d'enzyme E2
+ tampon Tp2 1 X final
+ « eau BM » qsp 15 µL

1.2.2. Manipulation

- Réaliser les trois digestions dans des microtubes en suivant les indications du document 1. Ce document sera distribué après vérification par un examinateur du tableau de manipulation.

Montrer la réalisation d'une des digestions à un examinateur.

- Centrifuger les tubes quelques secondes puis les placer à 37°C pendant 1 h.

1.3. Analyse sur gel d'agarose à 0,7% (m/v)

- Ajouter 3 µL de la solution tampon de charge dans chacun des trois tubes. Centrifuger quelques secondes et conserver les tubes dans la glace.

Signaler à l'examineur que les dépôts peuvent être réalisés.

- Déposer à la demande d'un examinateur les trois échantillons ainsi que le marqueur de taille, selon la feuille d'identification fournie. Le volume d'échantillons déposé sera indiqué par un examinateur.

Montrer la réalisation d'un dépôt à un examinateur.

- La migration et la révélation seront réalisées par un examinateur.

Compte rendu

Les résultats obtenus seront communiqués et exploités le 2^{ème} jour.

DEUXIÈME PARTIE :

Etude de la résistance aux phages d'une bactérie lactique recombinante (47 points)

Le plasmide recombiné a été transféré dans une souche de bactérie lactique *Lactobacillus bulgaricus* appelée « LbR1 ». Une étude de sa résistance effective aux phages est entreprise.

Lors d'un accident de fabrication, un lysat phagique S a été isolé du lactosérum.

A partir de ce lysat, on a préparé deux suspensions de titres différents.

- l'une, S1, est utilisée pour tester la résistance aux phages de la souche recombinante LbR1 ;
- l'autre, S2, pour étudier l'effet de la congélation sur la conservation de ces phages.

2.1. Étude de la résistance aux phages de la souche recombinante

La mesure de la sensibilité de la souche recombinante est réalisée à partir du lysat S1. Cette mesure consiste à évaluer le titre de S1 sur la souche LbR1 et à le comparer au titre connu de ce lysat (10^{10} UFP.mL⁻¹) déterminé sur une souche sensible. La méthode des phages de lyse, technique des spots, est utilisée pour cette première étude.

2.1.1. Réactifs

- 1 mL de suspension phagique titrée et notée « S1 »
- 10 mL de suspension de souche LbR1 ajustée à 10^8 UFC.mL⁻¹ notée « LBR1 »
- 2 boîtes de gélose Mueller Hinton sèches

2.1.2. Protocole du titrage

- Sur 2 boîtes de gélose, réaliser un ensemencement en nappe par inondation de la souche LbR1 testée.
- Laisser sécher les boîtes à l'étuve.
- A partir du lysat S1, réaliser une gamme de dilution de raison 1/10, de 10^{-1} à 10^{-8} sous un volume de 1 mL.
- Déposer 10 μ L de chaque dilution sur une nappe de LbR1, en spot. Réaliser l'essai en double.
- Laisser sécher les dépôts.
- Retourner les boîtes et les incuber 18 à 24 heures à 37°C.

2.2. Titrage du lysat décongelé S2

La qualité de la conservation est évaluée par comparaison des titres du lysat avant et après congélation. Le titre du lysat S2, avant congélation, a déjà été déterminé (10^7 UFP.mL⁻¹).

La méthode des plages de lyse, technique de la double couche, est utilisée pour cette seconde étude.

2.2.1. Réactifs

- 5 mL d'une suspension phagique notée «S2»
- 5 mL d'une culture en bouillon de la souche sensible, notée « BS »
- 25mL d'eau peptonée
- 8 géloses Mueller Hinton coulées en boîtes de Petri
- 8 tubes de gélose molle maintenue en surfusion, notés " top agar "
- 5 mL de solution de CaCl₂ à 1 mol.L⁻¹

2.2.2. Manipulation

2.2.2.1. Ajustage de la suspension bactérienne «BS»

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de la préculture fournie.
- Ajuster la suspension à 10^8 bactéries.mL⁻¹ en eau peptonée.

*L'absorbance limite de linéarité du spectrophotomètre est de 0,6.
1 unité d'absorbance à 600 nm correspond à 5.10^8 bactéries.mL⁻¹.*

2.2.2.2. Titrage de S2

Dilution de la suspension de phages

- Réaliser à partir de la suspension S2 une série de dilutions de raison 1/10 en eau peptonée, de 10^{-1} à 10^{-5} dans des tubes à hémolyse, sous un volume de 1 mL.

Adsorption des phages sur les bactéries sensibles.

- Cette opération est effectuée avec les suspensions-dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} et en double essai.
- Dans des tubes à hémolyse stériles, mélanger 0,1 mL de suspensions-dilutions de phages et 0,1 mL de la culture de bactéries sensibles.
- Homogénéiser doucement et incuber les tubes 15 à 20 minutes à 37°C sans agiter.
- Supplémenter chaque tube « top agar » avec 50 μ L de solution de CaCl₂

Etalement sur boîtes :

- Après incubation ajouter à chaque mélange phages - bactéries 5 mL de gélose « top agar », maintenue en surfusion.
- Homogénéiser doucement et verser rapidement le contenu de chaque tube sur une gélose Mueller-Hinton.
- Laisser solidifier, retourner les boîtes et incuber 18 à 24 heures à 37°C.

Compte rendu

Présenter dans le compte rendu la démarche expérimentale d'ajustage de la suspension bactérienne « BS » et les résultats des calculs.

TROISIÈME PARTIE :

Le port de gants est obligatoire pour cette troisième partie.

Détermination du niveau d'expression de la protéine recombinante « TIG » (35 points)

La protéine recombinante « TIG » a été produite par fermentation en milieu optimisé, à partir d'une souche d'*Escherichia coli* recombinée lors d'un précédent clonage. Il a été possible :

- d'obtenir des anticorps spécifiques de cette molécule ;
- de disposer d'une solution de protéine recombinante concentrée, utilisée comme étalon.

On cherche à déterminer le niveau d'expression de cette protéine lors du procédé de fabrication du fromage, en utilisant la technique immunologique de Mancini, technique simple à mettre en œuvre.

3.1. Réactifs et matériels

- solution d'agarose à 1 % en tampon PBS maintenue en surfusion à 50°C
- immunsérum anti-TIG, noté « IS »
- solution étalon de protéine «TIG» à 1 g.L⁻¹, notée « TIG Et »
- échantillon de lactosérum à étudier, obtenu à l'issue de la fabrication du caillé, noté « Lacto n° »
- eau physiologique
- emporte-pièce de 3 mm de diamètre
- système d'aspiration pour gel

3.2. Préparation du gel

Préparation de la solution d'agarose contenant l'immunsérum

- Calculer le volume d'immunsérum nécessaire pour préparer 12 mL d'une solution d'agarose contenant 2,5 % (v/v) d'immunsérum anti-TIG.
- Réaliser le mélange agarose - immunsérum dans un tube ; mélanger par retournement.
- Couler le mélange dans une grande boîte de Petri, **en présence d'un examinateur**.
- Laisser solidifier le gel à température ambiante puis 20 minutes au réfrigérateur.
- Creuser 7 puits à l'emporte-pièce.

3.3. Réalisation d'une gamme d'étalonnage de la protéine TIG

Réaliser en microtubes une gamme de cinq solutions étalons de protéine TIG à
0,2 g.L⁻¹ 0,4 g.L⁻¹ 0,6 g.L⁻¹ 0,8 g.L⁻¹ 1 g.L⁻¹
Les dilutions seront réalisées en eau physiologique, sous un volume total de 100 µL.

3.4. Dépôts sur gel

- Indiquer un repère sur la boîte et effectuer judicieusement les dépôts, à raison de 7 µL par dépôt : 5 puits pour la gamme étalon de protéine « TIG » et 2 puits pour l'échantillon

L'un des dépôts sera effectué en présence d'un examinateur.

- Laisser diffuser 24 h à température ambiante en chambre humide.

Compte rendu

1. Expliciter le calcul du volume d'immunsérum nécessaire à la préparation du gel (partie 3.2.).
2. Donner dans un tableau la composition de la gamme d'étalonnage de la protéine « TIG ».
3. Faire un schéma du gel précisant l'emplacement du repère et des différents dépôts.

QUATRIÈME PARTIE :

Dosage du diacétyle (2, 3 butanedione) d'extrait de fromage de chèvre (25 points)

Le diacétyle participe aux qualités organoleptiques de certains

produits laitiers, ce qui justifie l'utilisation du biovar *diacetylactis* de *Lactococcus lactis* sous-espèce *lactis* dans le procédé industriel.

Le but de la manipulation est d'analyser l'influence du clouage sur les propriétés aromatisantes de la souche.

Le diacétyle (2, 3 butanedione) réagit avec la 3,3'-diaminobenzamidine pour donner un composé jaune mesurable par photométrie à 360 nm.

Le diacétyle (2, 3 butanedione) des fromages est extrait par l'éther diéthylique. Une fois l'éther évaporé, l'extrait est repris dans l'eau.

Le même protocole ayant été strictement appliqué à un échantillon de fromage fabriqué avec la souche de référence et à un échantillon de fromage fabriqué avec la souche modifiée, les deux extraits respectivement « extrait réf » et « extrait mod » sont directement comparables.

4.1. Réactifs

- 2 mL « extrait réf » en tube étanche, noté «extrait réf»
- 2 mL « extrait mod » en tube étanche, noté « extrait mod »
- 2 mL « diacétyle » solution étalon de diacétyle à 0,05 g.L⁻¹
- 30 mL de solution d'acide sulfurique 6 mol.L⁻¹, noté « H₂SO₄ 6 mol.L⁻¹ »
- 4 mL de solution fraîchement préparée de diaminobenzidine à 5 g.L⁻¹ noté « DBZ »

4.2. Manipulation

Réaliser l'étalonnage de la méthode sur la base suivante :

- préparer une série de 6 tubes à essai contenant de 0 à 0,5 mL de solution étalon de diacétyle à 0,05 g.L⁻¹
- compléter chaque tube avec de l'eau déminéralisée pour obtenir un volume final de 0,5 mL
- ajouter 0,2 mL de solution de diaminobenzidine (sous la hotte) ; boucher les tubes
- homogénéiser et attendre 1 minute à l'obscurité
- ajouter 1,8 mL de solution de H₂SO₄
- ajouter 6 mL d'eau déminéralisée
- homogénéiser et attendre 10 minutes à l'obscurité
- mesurer les absorbances à 360 nm

Sur la même base, réaliser en parallèle les dosages dans les extraits : prises d'essais de 0,2 et 0,4 mL (essais réalisés en double).

Compte rendu

1. Tracer la courbe d'étalonnage de la méthode.
2. En déduire la concentration en g.L⁻¹ de diacétyle dans les extraits.
3. Comparer les 2 valeurs obtenues et conclure quant à l'impact de la modification de la souche sur ses capacités de production de diacétyle (2, 3 butanedione).

DOCUMENT 1

Distribué après la remise du compte rendu 1.2.1.

N° tube	1	2	3
Réactifs	X	Y	P
Eau bidistillée	8,5 µL	8,5 µL	10 µL
Tampon 10 X	1,5 µL de Tp1	1,5 µL de Tp1	1,5 µL de Tp2
ADN X à 25 ng.µL ⁻¹	4 µL		
ADN Y à 25 ng.µL ⁻¹		4 µL	
Plasmide P à 40 ng.µL ⁻¹			2,5 µL
Enzyme à 10 U.mL ⁻¹	1 µL de E1	1 µL de E1	1 µL de E2

DEUXIEME JOUR

Durée : 2 heures 30

PREMIERE PARTIE :

Contrôle de matériel génétique avant clonage

1.1. Joindre au compte-rendu l'électrophorégramme fourni. Schématiser les résultats obtenus en repérant clairement les différentes bandes.

1.2. Tracer, pour les bandes du marqueur, $\log(\text{taille}) = f(\text{distance de migration})$

Les tailles en kpb des fragments d'ADN linéaires bicaténaux composant le marqueur de taille MT sont fournies par les examinateurs.

1.3. À l'aide de cette courbe, déterminer la taille des fragments obtenus après hydrolyse des fragments X, Y et du plasmide P linéarisé.

1.4. La séquence de 1000 à 1300 pb recherchée est-elle présente dans les fragments X et Y ? Justifier votre réponse et proposer, à l'aide d'un schéma, une interprétation des profils électrophorétiques obtenus.

Données :
- les fragments X et Y sont linéaires
- la séquence d'intérêt est encadrée par des sites *E1*
- la gamme des tailles des fragments d'ADN double brin linéaires séparés dans un gel d'agarose à 0,7 % (m/v) en tampon TBE 1x est comprise entre 0,8 kpb et 10 kpb

1.5. Quelle sera la taille du plasmide recombinant ?

DEUXIÈME PARTIE :

Etude de la résistance aux phages d'une bactérie recombinée

2.1. Détermination du niveau de résistance de la souche LbR1

- 2.1.1. Lire et présenter les résultats du titrage de S1 sur LbR1. Evaluer le titre de la suspension S1 en UFP.mL⁻¹.
2.1.2. Calculer le taux d'amélioration de la résistance de la souche LbR1, défini selon l'expression suivante :

$$\frac{\text{Titre du lysat déterminé sur une souche sensible} - \text{Titre du lysat déterminé sur LbR1}}{\text{Titre du lysat déterminé sur une souche sensible}}$$

Rappel : le titre du lysat S1 déterminé sur une souche sensible est égal à 10^{10} UFP.mL⁻¹.

2.2. Contrôle des conditions de conservation d'un lysat

- 2.2.1. Effectuer le dénombrement des UFP obtenues pour la suspension S2.
Consigner les résultats dans un tableau.
Calculer la concentration en particules phagiques.
- 2.2.2. Conclure sur l'efficacité de conservation de suspensions phagiques par congélation, sachant que la suspension initiale S2 titrait 10^7 UFP.mL⁻¹.

TROISIÈME PARTIE :

Détermination du niveau d'expression de la protéine recombinante « TIG »

- 3.1. Mesurer le diamètre des anneaux de précipitation et présenter les résultats dans un tableau.
3.2. A l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe d'étalonnage de la méthode de Mancini.
3.3. Déterminer la concentration de la protéine « TIG » dans l'échantillon de lactosérum.
3.4. Indiquer comment préparer, à partir de ce lactosérum, 100 mL d'une solution contenant 0,2 g.L⁻¹ de protéine « TIG ».