

ANNALES

B.T.S.

BIOCHIMISTE

B.T.S.

BIOTECHNOLOGIE

sessions 1995-1996

UPBM - Edilion

École Technique "La Martinière Duchère" 69338 Lyon Cedex 9

Cartographie de restriction de l'ADN du phage lambda
(photographie TS Biotechnologie - Lycée La Martinière - Lyon)

Annales

**Brevet de Technicien Supérieur
BIOCHIMISTE**

**Brevet de Technicien Supérieur
BIOTECHNOLOGIE**

sessions 1995-1996

Publications de l'UPBM

**UPBM Edilion Lycée Technique "La Martinière"
La Duchère 69338 Lyon Cedex 09**

Les Annales du B.T.S. Biochimiste ont été réalisées par Michel VOL, professeur au Lycée Raoul Dautry à Limoges

Les Annales du B.T.S. Biotechnologie ont été réalisées par Pascal MICHAUX, professeur au Lycée Valentine Labbé à La Madeleine-lès-Lille

avec la collaboration de Guy BATTIER, professeur au Lycée La Martinière à Lyon.

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

ISBN 2-910069-18-4



9 782910 069186

ANNALES

Brevet de Technicien Supérieur
BIOCHIMISTE

sessions 1995-1996

Publications de l'UPBM

UPBM Edilion Lycée technique "La Martinière"
La Duchère. 69338 LYON CEDEX 9

Annales du BTS Biochimiste.

Les annales sont divisées en années.

La numérotation est liée à chaque année. La partie "Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques)" comprend plusieurs sujets différents.

Sommaire:

Année 1995.

	Français	95-1
	Anglais	95-5
	Mathématique	95-6
	Sciences physiques	95-8
	Biochimie-Biologie	95-11
Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etude d'opérations techniques)		95-20
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques) SUJET 1,		95-30
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques) SUJET 2,		95-38
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques) SUJET 3,		95-45
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques) SUJET 4,		95-51

Année 1996.

	Français	96-1
	Anglais	96-6
	Mathématique	96-7
	Sciences physiques	96-9
	Biochimie-Biologie	96-12
Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etude d'opérations techniques)		96-24
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques) SUJET 1,		96-35
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques) SUJET 2,		96-44
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques) SUJET 3,		96-52
Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation d'opérations techniques) SUJET 4,		96-62

Annales du BTS Biochimiste

Définition de la nature des épreuves

1. Epreuve de français

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

1.1 But de l'épreuve

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

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

1.2 Nature de l'épreuve

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

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

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

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

Le candidat devra :

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

2. Epreuve d'anglais

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

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

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

Ceci implique la capacité :

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

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

3. Epreuve de mathématiques - sciences physiques

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

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

Première partie : Mathématiques (coefficient : 1,5)

— Objectifs :

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

- d'apprécier la solidité des connaissances des candidats et leur capacité à les utiliser dans des situations variées,

- de vérifier leur aptitude au raisonnement et leur capacité à analyser correctement un problème, à justifier les résultats obtenus et à apprécier leur portée,

- d'apprécier leurs qualités dans les domaines de l'expression écrite et de l'exécution soignée de tâches diverses (tracés graphiques, calculs à la main ou sur machine).

— Nature de cette partie d'épreuve :

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

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

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

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

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

L'utilisation des calculatrices pendant l'épreuve est définie par la circulaire n° 85-228 du 28 juillet 1986 publiée au *Bulletin officiel* n° 34 du 2 octobre 1986.

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

- la clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante de l'appréciation des copies ;

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

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

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

Il doit être vérifié que le candidat :

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

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

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

4. Epreuve de biochimie-biologie

— Epreuve écrite

— Durée maximale : 4 heures

— Coefficient : 6

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

Elle comporte plusieurs questions indépendantes.

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

— Epreuve écrite et pratique

— Durée maximale : 14 heures

— Coefficient : 12

Cette épreuve comporte deux parties obligatoires.

Première partie : étude d'opérations techniques

— Partie écrite

— Durée : 4 heures

— Coefficient : 4

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

Elle doit permettre d'apprécier :

— les capacités :

• d'analyse du problème,

• de conception et de définition d'une stratégie expérimentale,

• d'utilisation de documents, éventuellement, de langue anglaise,

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

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

— l'esprit d'initiative.

Deuxième partie : réalisation pratique d'opérations techniques

— Partie pratique

— Durée maximale : 10 heures

— Coefficient : 8

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

Elle est pluridisciplinaire.

Elle doit permettre de vérifier les capacités :

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

— d'organisation,

— de rigueur et de précision dans l'exécution,

— d'exploitation des résultats.

Elle peut se dérouler en plusieurs parties.

Elle comporte plusieurs questions liées ou indépendantes.

Elle a un caractère essentiellement pratique.

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

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

— Epreuve orale

— Durée maximale : 0,5 heure

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

L'épreuve a pour but de vérifier :

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

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

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

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

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

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

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

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

La présentation n'excédera pas 20 minutes.

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

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

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

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

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

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

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

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

La commission de jury pour cette épreuve comprend :

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

Les candidats autorisés ayant échoué à l'examen peuvent :

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

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

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

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

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

EPREUVE DE FRANCAIS: SYNTHESE DE DOCUMENTS.

Durée: 4 heures;

Coefficient: 3

A partir des documents ci-joints, qui évoquent les difficultés de la communication dans le monde d'aujourd'hui, vous ferez une synthèse objective, concise et ordonnée. Après quoi, dans une brève conclusion, vous donnerez votre point de vue sur la question.

Document 1 : A. Oger Stéfanink

La communication c'est comme le Chinois, cela s'apprend
Rivager/les Echos - 1987

Document 2 : J.P. Lehnisch - La communication dans l'entreprise
PUF - 1985

Document 3 : E. Zarifian - Des paradis plein la tête
Ed. Odile Jacob - 1994

Document 4 : P. Watzlawick, J. Helmick - Beavin et D.D. Jackson
Une logique de la communication
Seuil - 1967

Document 5 : F. Mauriac - Le noeud de vipères
le livre de poche - 1932

DOCUMENT 1 «*Méfie toi de l'homme dont le ventre ne bouge pas quand il rit.*»

dicton cantonnais.

L'objectif du code verbal est la transmission d'une information. Le non-verbal est utilisé pour établir et maintenir la relation interpersonnelle. C'est ce que confirme Riccoboni, acteur de la Commedia dell'arte, quand en 1738, parlant du théâtre, il déclare : «*L'art de la déclamation consiste à joindre à une prononciation variée l'expression du geste, pour mieux faire sentir toute la force de la pensée.*»

En effet, c'est la convergence et la concordance du système verbal et du non-verbal qui assurent la meilleure réception du message et la communication la plus efficace.

Le dit de la parole et le vécu du corps doivent être en congruence. Au théâtre, le bon comédien est celui qui sait jouer cet accord pour faire vivre son personnage.

Sachez que lorsqu'il y a mensonge, le non-verbal le transmet à l'insu de l'individu. Le corps est plus difficile à censurer que la parole. La bouche peut se taire, les doigts continuent à bavarder. Un individu peut simuler un sourire, mais un seul côté de sa bouche «joue le jeu». Le sourire glisse en coin. Un sourire «de façade» se transforme en grimace. «*Il existe mille orifices invisibles (...) à travers lesquels un oeil pénétrant peut voir d'un seul coup ce qui se passe dans une âme*», écrivait Laurence Sterne.

Lorsque le président égyptien Anouar el-Sadate est venu en 1977 à la Knesset, le parlement israélien, parler du pacte d'amitié entre l'Egypte et Israël, on raconte que Jérusalem se demandait si, huit jours plus tard, les chars égyptiens ne seraient pas, une fois encore, sur les plateaux du Golan. Sachant que la discordance entre la parole et la pensée entraîne automatiquement un contre-discours corporel, les services secrets israéliens avaient décidé de filmer et d'observer Sadate de la tête aux pieds. Il peut y avoir des doigts de pieds qui manifestent leur désaccord ! L'observation directe, puis le visionnage du film ne décelèrent aucune dissonance. L'histoire l'attesta. Les accords ne furent pas rompus et Sadate paya de sa vie, le 6 octobre 1981, la signature de ce traité.

Ne devenez ni un grand inquisiteur, ni un agent de la CIA, ni du KGB, mais surveillez tout geste parasite, toute dissonance dans le discours de vos interlocuteurs. Apprenez à lire le langage du corps, vous y découvrirez le mensonge ou la vérité de la parole...

«Car à côté de la culture par mots, il y a la culture par gestes».

Antonin Artaud.

A. Oger - Stéfank

La communication c'est comme le Chinois, cela s'apprend

DOCUMENT 2

Par son importance, la communication dans l'entreprise est devenue un élément de la stratégie que doit adopter toute organisation. Le problème à résoudre est cependant redoutable pour au moins trois raisons :

- Pendant longtemps, et en périodes de croissance notamment, ce besoin de communication n'apparaissait pas comme un impératif. En ère de vaches grasses, l'on sait que les problèmes psychologiques sont plus facilement refoulés. Il y a une dynamique de la croissance et de la réussite qui balait tout ce qui peut apparaître comme des obstacles ou des réflexions inutiles. Actuellement, cette époque a vécu. Les difficultés à résoudre ont mis en évidence la nécessaire collaboration des hommes, laquelle passe inévitablement par une communication de qualité qui, elle-même, sous-tend la motivation ambiante.

- La deuxième raison vient du fait que tout ce qui touche l'humain est très difficile à résoudre. Les cadres français ont été plus habitués à résoudre des problèmes techniques précis que de s'occuper de «psychologie» longtemps apparue, non pas comme une technique, mais comme une «philosophie» avec le côté «rêveur» que ce mot revêt pour le profane.

- L'entreprise est à la recherche d'un nouveau modèle d'organisation. Celui d'hier a vécu. Celui de demain est en voie d'apparition. Pendant longtemps, on a vécu sur un modèle de l'entreprise 1880 modifié 1925, c'est-à-dire sur un schéma de l'entreprise industrielle modifiée par le taylorisme. C'était un modèle rationnel, héritier du XVIII^e siècle et de la philosophie des Lumières associée au culte de la raison. On se désintéressait donc naturellement de l'irrationnel. Notons que le taylorisme n'a pas seulement pénétré l'industrie, mais également les services et les administrations. Ce système a répondu avec beaucoup d'efficacité à l'attente de l'époque : il a créé des emplois par dizaines de millions, a modernisé la société, a créé des richesses au point que l'on est arrivé à critiquer les sociétés de consommation, et a permis, après la Seconde Guerre mondiale, de faire redémarrer les économies nationales.

Cependant, depuis cinq à dix ans, ce système d'organisation s'efface (cf. l'industrie automobile, la sidérurgie...). La culture taylorienne cède de plus en plus la place à la société de l'information. Le grave problème à résoudre est que cette mutation se fait très vite. Il fallait jadis une à deux générations pour passer d'un système à un autre. Actuellement, quelques années seulement sont laissées aux entreprises pour passer d'un modèle industriel à un modèle de communication.

J.P. Lehnisch

La communication dans l'entreprise

DOCUMENT 3

Les troubles psychiques pâtissent d'une image extrêmement négative dans l'esprit du grand public. En fait ce sont les gens souffrant de troubles psychiques qui sont gravement pénalisés. Dans notre monde logique et rationnel, où toute vérité doit être matérialisée et concrète, la souffrance psychique dérange, fait peur, ou pire, n'est pas crédible. «Il le fait exprès, secoue-toi, tu as tout pour être heureux, tu es paresseux, regarde ce que l'on fait pour toi, c'est de la simulation, c'est une tentative de suicide chantage...» Abrégeons. Les représentations des «maladies mentales» sont toujours effrayantes et elles engendrent la peur, donc l'intolérance et l'exclusion. La rançon pour les patients, c'est la honte, le retard dans les soins, les difficultés de réinsertion. Les conséquences pour les familles, c'est le silence, la solitude dans la peine, le sentiment d'abandon et l'interdiction de la compassion d'autrui.

Les représentations fausses sont bien évidemment le résultat d'une absence d'information ou d'une information erronée. Le «malade mental», comme on dit de manière globale, mélangeant dans une fraternelle confusion toutes les formes de souffrance psychique, est dangereux et incurable. Il est interné dans des asiles où il est soigné (sans que l'on sache bien de quels soins il s'agit) par des gens que l'on appelle les «psy» et qui sont en général aussi fous que leurs malades. Les mots «maladies mentales» pèsent d'un poids très lourd. Le public ne sait pas que 800 000 personnes sont suivies en France dans le seul secteur public pour troubles psychiques dont 73 000 sont hospitalisées tous les ans. Le public ne sait pas que personne n'est à l'abri et qu'aujourd'hui 25 % des Français connaissent dans leur entourage quelqu'un qui est en difficulté. Le public ne sait pas que la souffrance psychique va du chagrin d'amour à la schizophrénie en passant par toutes les conséquences traumatisantes des accidents de parcours de l'existence.

C'est pour ces raisons que des pays proches de la France, comme la Hollande et la Grande-Bretagne, ont développé des campagnes de communication destinées au grand public et qui ont modifié l'image, et donc le statut, des troubles psychiques. C'est pourquoi aussi quatre grands hôpitaux psychiatriques parisiens se sont associés en créant une structure, «Psycom», animée par Joël Martinez, un directeur d'établissement, et se sont lancés dans l'analyse d'image, la communication et la transformation de la représentation des troubles psychiques. C'est pour ces raisons que des associations de psychiatres, des groupes très divers de professionnels de la santé mentale multiplient les efforts pour informer le public, les journalistes, les élus locaux. C'est pour ces raisons enfin que le ministère de la Santé a décidé d'accorder une attention particulière au redressement de la vérité dans ce domaine et à l'information de l'opinion. Le jour où la réalité de ce qu'est la souffrance psychique et des formes qu'elle peut prendre sera vraiment connue, les aides et les prises en charge seront considérablement facilitées.

E. Zarifian

Des paradis plein la tête

DOCUMENT 4

L'IMPOSSIBILITE DE NE PAS COMMUNIQUER

Disons tout d'abord que le comportement possède une propriété on ne peut plus fondamentale, et qui de ce fait échappe souvent à l'attention : le comportement n'a pas de contraire. Autrement dit, il n'y a pas de «non-comportement», ou pour dire les choses encore plus simplement : on ne peut pas ne pas avoir de comportement. Or, si l'on admet que, dans une interaction(1), tout comportement a la valeur d'un message, c'est-à-dire qu'il est une communication, il suit qu'on ne peut pas ne pas communiquer, qu'on le veuille ou non. Activité ou inactivité, parole ou silence, tout a valeur de message. De tels comportements influencent les autres, et les autres, en retour, ne peuvent pas ne pas réagir à ces communications, et de ce fait eux-mêmes communiquer. Il faut bien comprendre que le seul fait de ne pas parler ou de ne pas prêter attention à autrui ne constitue pas une

exception à ce que nous venons de dire. Un homme attablé dans un bar rempli de monde et qui regarde droit devant lui, un passager qui dans un avion reste assis dans son fauteuil les yeux fermés, communiquent tous deux un message : ils ne veulent parler à personne, et ne veulent pas qu'on leur adresse la parole ; en général, leurs voisins « comprennent le message » et y réagissent normalement en les laissant tranquilles. Manifestement, il y a là un échange de communication, tout autant que dans une discussion animée.

On ne peut pas dire non plus qu'il n'y ait « communication » que si elle est intentionnelle, consciente ou réussie, c'est-à-dire s'il y a compréhension mutuelle. Savoir s'il y a correspondance entre le message adressé et le message reçu appartient à un ordre d'analyse différent, quoique important, car il repose nécessairement en fin de compte sur l'estimation de données spécifiques, de l'ordre de l'introspection et du témoignage personnel, données que nous laissons délibérément de côté dans une théorie de la communication exposée du point de vue du comportement. Quant au problème du malentendu, étant donné certaines propriétés formelles de la communication, nous examinerons comment peuvent s'installer les troubles pathologiques qui y sont liés, indépendamment, et même en dépit, des motivations ou intentions des partenaires.

P. Watzlawick, J. Helmick-Beavin et D.D. Jackson
Une logique de la communication

(1) interaction : série de messages échangés entre des individus.

DOCUMENT 5

A soixante-huit ans, Louis, persuadé que sa femme et ses enfants ne l'ont jamais aimé ni compris, décide de se venger en les déshéritant au profit de son fils naturel qui vit à Paris. Juste avant son départ pour Paris, il a cette conversation avec sa femme Isa.

- Pourquoi les détestes-tu, Louis, pourquoi hais-tu ta famille ?

- C'est vous qui me haïssez. Ou plutôt, mes enfants me haïssent. Toi... tu m'ignores, sauf quand je t'irrite ou que je te fais peur.

- Tu pourrais ajouter : « ou que je te torture... » Crois-tu que je n'aie pas souffert autrefois ?

- Allons donc ! tu ne voyais que les enfants...

- Il fallait bien me rattacher à eux. Que me restait-il en dehors d'eux (et à voix plus basse), tu m'as délaissée et trompée dès la première année, tu le sais bien.

- Ma pauvre Isa, tu ne me feras pas croire que mes fredaines(1) t'aient beaucoup touchée... Dans ton amour-propre de jeune femme peut-être...

Elle rit amèrement :

- Tu as l'air sincère ! Quand je pense que tu ne t'es même pas aperçu...

Je tressaillis d'espérance. C'est étrange à dire, puisqu'il s'agissait de sentiments révolus, finis. L'espoir d'avoir été aimé, quarante années plus tôt, à mon insu... Mais non, je n'y croyais pas...

- Tu n'as pas eu un mot, un cri... Les enfants te suffisaient.

Elle cacha sa figure dans ses deux mains. Je n'en avais jamais remarqué, comme ce jour-là, les grosses veines, les tavelures(2).

- Mes enfants ! quand je pense qu'à partir du moment où nous avons fait chambre à part, je me suis privée, pendant des années, d'en avoir aucun avec moi, la nuit, même quand ils étaient malades, parce que j'attendais, j'espérais toujours ta venue.

Des larmes coulaient sur ses vieilles mains. C'était Isa ; moi seul pouvais retrouver encore, dans cette femme épaisse et presque infirme, la jeune fille vouée au blanc(3), sur la route de la vallée du Lys.

- C'est honteux et ridicule à mon âge de rappeler ces choses. Oui, surtout ridicule. Pardonne-moi, Louis.

Je regardais les vignes, sans répondre. Un doute me vint, à cette minute-là. Est-il possible, pendant près d'un demi-siècle, de n'observer qu'un seul côté de la créature qui partage notre vie ? Se pourrait-il que nous fassions, par habitude, le tri de ses paroles et de ses gestes, ne retenant que ce qui nourrit nos griefs et entretient nos rancunes ? Tendance fatale à simplifier les autres ; élimination de tous les traits qui adouciraient la charge, qui rendraient plus humaine la caricature dont notre haine a besoin pour sa justification...

F. Mauriac
Le noeud de vipères

(1) fredaines : écarts de conduite.

(2) tavelures : taches sur la peau.

(3) au blanc : après la mort de ses deux frères (tuberculose), elle avait été placée sous la protection spéciale de la Vierge Marie par un vœu dont la marque extérieure était, dans son cas, la couleur exclusivement blanche de ses vêtements.

EPREUVE D'ANGLAIS.

Durée: 2 heures;

Coefficient: 2

POWDERED MILK CURE FOR FATAL DIARRHOEA

Ian Anderson, Melbourne

A POWDER developed in Australia from cow's milk may save the lives of hundreds of young children who die in hospital each year from a highly contagious form of gastroenteritis. The powder prevents the rotavirus responsible from invading the cells lining the intestine.

Unfortunately, at around \$3 (about £1.40) a day, the powder will be too expensive for the villages of the developing world, where the rotavirus does the greatest damage. But it will help to stop the spread of the virus in hospitals, where one in five children admitted for other ailments contracts gastroenteritis. Between 150 and 200 children in the US die from the disease each year. A similar number die in Western Europe and about 20 in Australia.

"This is an important development," says Jim Tulloch, director of the WHO's Division of Diarrhoeal and Acute Respiratory Disease Control. "But it would be dishonest to convey the idea that it will revolutionise the health of young children in the developing world." Some 3.3 million children die from diarrhoeal diseases each year; the rotavirus is responsible for about a third of the cases.

The rotavirus invades the intestine, where it multiplies and destroys the cells. The immature cells that grow in their place are unable to absorb nutrients, resulting in severe diarrhoea and vomiting. Death is caused by dehydration. The usual treatment is to rehydrate children intravenously or by giving them a mixture of water, salt and sugar.

The powder, called Gastrogard, has been developed by Peter Whyte, a veterinarian at the South Australian Research and Development Institute (SARDI), and Geoff Davidson, a

gastroenterologist at the Adelaide Women and Children Hospital.

[Davidson and Whyte grew a strain of the rotavirus, killed it and injected the killed virus into cows that were about to calve (1). The cows produced antibodies to the virus in their colostrum—the rich milk produced by mammals just after birth. The colostrum is collected and processed into a skimmed-milk (2) powder that is high in protein, but low in fat, lactose and salt. Any bacteria in the milk are removed during processing, so the product is essentially sterile.]

The powder can be sprinkled on food or dissolved in water or milk, in doses of about 1.5 grams, taken three times a day. It is not a substitute for breast milk, and is normally given to children who have been weaned (3). Children are protected only while they are taking the powder.

Successful trials (4) of Gastrogard have been carried out in hospitals in India, Hong Kong and Australia. None of the 200 children given the powder developed gastroenteritis, while those who were not treated became sick at the usual rate. Four Australian hospitals are carrying out trials on 500 children for the US Food and Drug Administration before Gastrogard is allowed onto the US market.

NEW SCIENTIST
8 January 1994

(1) to calve : to give birth (for a cow)

(2) to skim : to remove the cream

(3) to wean : to stop feeding with mother's milk

(4) trial : test

QUESTIONS :

- 1 - Résumez en français, de manière ordonnée, les informations essentielles contenues dans le texte. (7 points)
- 2 - Traduisez en français depuis "Davidson and Whyte grew a strain ..." (ligne 45) jusqu'à "... the product is essentially sterile" (ligne 55). (6 points)
- 3 - Show how the milk cure is medically effective but not easily put into effect. (7 points)
80-100 mots.

EPREUVE DE MATHÉMATIQUE.

Durée: 2 heures;

Coefficient: 1,5

La qualité de la rédaction, la clarté et la précision des raisonnements entreront pour une part importante dans l'appréciation des copies. L'usage des calculatrices réglementaires et du formulaire officiel est autorisé.

EXERCICE 1 (8 points)

On prélève, d'une population P très grande, un échantillon E de 100 individus et on mesure, en mg par 24 heures, l'élimination urinaire de calcium de chacun d'entre eux. On obtient le tableau ci-dessous :

Calcium éliminé, en mg par 24 heures	Effectifs
[100 ; 140[9
[140 ; 180[22
[180 ; 220[25
[220 ; 260[21
[260 ; 300[16
[300 ; 340[7

- 1) Calculer une approximation de la moyenne \bar{x} et une de l'écart type σ_e de cette série statistique. Les résultats seront donnés à l'unité près (le regroupement en classes induit une erreur de méthode qui ne permet pas une précision plus grande).
- 2) Estimer, à partir des résultats ci-dessus, la moyenne μ et l'écart type s du calcium éliminé, pour la population P.
- 3) Déterminer un intervalle de confiance, au coefficient de confiance de 95 %, de la moyenne μ de calcium éliminé, pour la population P.
- 4) En prenant pour valeur de s l'estimation obtenue au 2), déterminer la taille minimum n de l'échantillon pour que l'amplitude de l'intervalle de confiance soit au maximum de 10 mg par 24 heures, au coefficient de confiance de 95 %.

EXERCICE 2 (12 points)

Le but de cet exercice est l'étude de la dynamique d'une population d'oeufs et de larves de certains insectes, en fonction du temps.

Dans l'ensemble de cette modélisation, le temps est mesuré dans une unité choisie.

Les deux parties de l'exercice sont liées par les notations, mais peuvent être traitées indépendamment les unes des autres.

1ère PARTIE :

La fonction N qui donne, à l'instant t , le nombre d'oeufs vivants, avant l'éclosion ou la mort, est définie sur $[0; +\infty[$ approximativement par :

$$t \rightarrow N(t) = N_0 e^{-0,3t}$$

où N_0 désigne le nombre initial d'oeufs au moment de la ponte, c'est-à-dire à l'instant $t = 0$. On prendra dans la suite $N_0 = 1000$.

1) Etudier la fonction N sur $[0; +\infty[$ (sens de variation, étude aux bornes).

Dans un repère orthogonal, où l'on prendra pour unités graphiques 1 cm pour une unité de temps en abscisses et 10 cm pour 1000 en ordonnées, construire la représentation graphique (C) de la fonction N pour t appartenant à $[0; 15]$.

2) Résoudre l'équation : $N(t) = \frac{1}{2} N_0 = 500$ dans $[0; +\infty[$.

On appelle t_1 sa solution (t_1 correspond à la durée au bout de laquelle la population d'oeufs a diminué de moitié).

Placer, sur le graphique précédent, le point de coordonnées $(t_1; 500)$.

3) a étant un réel strictement positif,

a) Calculer $\int_0^a 1000e^{-0,3t} dt$.

b) On pose :

$$A = \int_0^{+\infty} 1000e^{-0,3t} dt = \lim_{a \rightarrow +\infty} \int_0^a 1000e^{-0,3t} dt$$

Déduire du 3) a) le calcul de A .

c) Démontrer que la fonction F définie sur $[0; +\infty[$ par :

$$F(t) = -\frac{10}{3} e^{-0,3t} (0,3t + 1)$$

est une primitive de la fonction f définie sur $[0; +\infty[$ par :

$$f(t) = 0,3te^{-0,3t}$$

En déduire $\int_0^a 0,3te^{-0,3t} dt$

d) La durée moyenne de vie d'un oeuf, avant l'éclosion ou la mort, est le nombre réel E qui peut se mettre sous la forme :

$$E = \frac{1}{A} \int_0^{+\infty} 1000te^{-0,3t} dt = \lim_{a \rightarrow +\infty} \int_0^a 0,3te^{-0,3t} dt$$

Déduire du 3) c) le calcul de E .

2ème PARTIE :

La fonction L qui donne, à l'instant t , le nombre de larves vivantes, avant l'éclosion ou la mort, est solution dans $[0; +\infty[$ de l'équation différentielle :

$$\frac{dL}{dt} = 0,5N - 0,2L$$

c'est à dire :

$$\frac{dL}{dt}(t) + 0,2L(t) = 500e^{-0,3t} \quad (1)$$

1) Déterminer le réel K tel que la fonction L_1 définie sur $[0; +\infty[$ par :

$$L_1(t) = Ke^{-0,3t}$$

soit une solution de (1).

- 2) Déterminer dans $[0; +\infty[$ la solution générale de l'équation sans second membre associée à l'équation (1).
- 3) En utilisant les deux questions précédentes, déterminer la solution générale de l'équation différentielle (1) dans $[0; +\infty[$.
- 4) Déterminer la solution particulière de l'équation différentielle (1) vérifiant la condition initiale $L(0) = 0$.

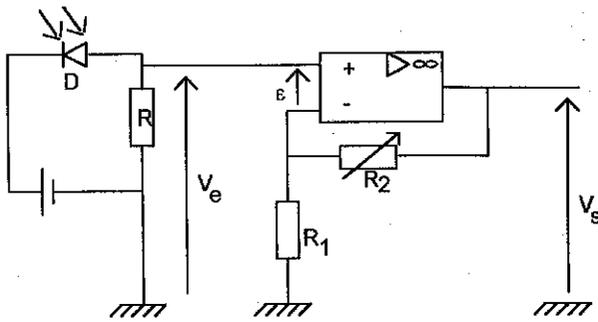
EPREUVE DE SCIENCES PHYSIQUES.

Durée: 2 heures;

Coefficient: 2,5

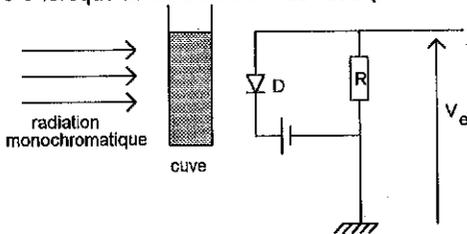
1 ELECTRONIQUE

Le schéma suivant représente, de manière simplifiée, une partie de la constitution interne d'un spectrophotomètre.



- La source lumineuse est monochromatique.
- L'amplificateur opérationnel est supposé idéal : $\varepsilon = 0$; $i_+ = i_- = 0$
- D est une photodiode dont le courant inverse, indépendant de la tension qui lui est appliquée, est proportionnel à l'éclairement (mesuré en lux) qu'elle reçoit. Sa sensibilité est de 70 nA par lux.
- $R = 100 \text{ k}\Omega$
- R_2 est une résistance ajustable.
- V_s est mesuré à l'aide d'un voltmètre

1. Déterminer l'expression du rapport V_s/V_e en fonction de R_1 et R_2 .
2. L'éclairement de la photodiode étant de 3 lux, déterminer la valeur du rapport R_2/R_1 pour que V_s soit égale à 0,10 V.
3. Lors d'une utilisation de l'appareil, l'éclairement maximal de la photodiode devient supérieur à 3 lux. Quelle solution peut-on adopter pour obtenir la même réponse, 0,10 V, sur le voltmètre ? Expliquer le raisonnement suivi.
4. On veut utiliser ce montage en spectrophotomètre d'absorption (fig. ci-dessous) :
 - le voltmètre qui mesure V_s (non représenté sur la figure ci-dessous, voir figure 1) indique 0,10 V lorsque la cuve contient de l'eau (le "blanc"),



- on remplace l'eau pure par une solution aqueuse ; le voltmètre qui mesure V_s indique alors 0,04 V.
Calculer l'absorbance de cette solution.

2 RADIOACTIVITE

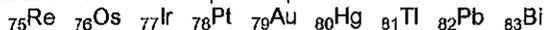
Une scintigraphie (examen d'imagerie médicale) d'un patient de 70 kg implique l'injection d'une préparation de l'isotope radioactif de l'or (Au : $A = 198$, $Z = 79$), de période 2,7 jours.

L'activité de la préparation doit être de $1,00 \cdot 10^5$ becquerels par kg de masse corporelle.

On utilise une solution de sel d'or achetée depuis huit jours. Un centimètre cube de cette solution avait une activité de $740 \cdot 10^6 \text{ Bq}$ au moment de l'achat.

1. L'or étant radioactif β^- écrire son équation de désintégration.
2. La solution est diluée au 1/100^{ème} avant injection :
 - a. quelle est l'activité de 1 cm^3 de solution au moment de l'utilisation ?
 - b. quel volume de solution doit être injecté au patient ?

Extrait de la classification périodique des éléments :



3 CHIMIE ORGANIQUE

On considère le composé: 3-méthylbutan-2-ol

1. Donner la formule semi-développée du composé **A** et montrer que la molécule est chirale. Représenter et nommer, en justifiant les règles utilisées, les différents stéréoisomères.
2. La déshydratation en milieu acide du composé **A**, conduit à deux composés. Soit **B** celui obtenu majoritairement.
 - a- Ecrire l'équation de la réaction de déshydratation.
 - b- Nommer le composé **B**.
3. L'action de l'ozone en milieu réducteur, conduit à deux dérivés carbonylés.
 - a- Donner la formule semi-développée de chacun d'eux.
 - b- Citer un test permettant de différencier ces deux produits.
4. L'action d'un organomagnésien **RMgX** sur l'éthanal, suivi d'une hydrolyse, donne le composé **A**.
 - a- Ecrire les deux équations correspondantes.
 - b- Déterminer la formule semi-développée de l'organomagnésien.

4 CHIMIE GENERALE

Toutes les solutions seront prises à 298 K.

1. Le potentiel standard de chacun des couples redox suivants est:
 I_2/I^- $E^\circ_1 = 0,54 \text{ V}$; $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ $E^\circ_2 = 1,77 \text{ V}$.
 - a- Quelle est la réaction envisageable entre les espèces de ces deux couples :
 - Equilibrer les demi-équations rédox. En déduire l'équation bilan de la réaction globale.
 - b- Calculer la variation d'enthalpie libre standard ($\Delta_r G^\circ$) correspondant à cette réaction.
 - c- Calculer sa constante d'équilibre.Cette réaction peut-elle être utilisée pour un dosage?
2. En réalité la réaction est lente.
 - a- Citer deux facteurs cinétiques permettant d'augmenter la vitesse de réaction.
 - b- Les ions H^+_{aq} et I^-_{aq} étant en excès, la cinétique de la réaction est alors d'ordre un, ceci par rapport à l'eau oxygénée. Etablir la loi de vitesse correspondante.
 - c- On dose le diiode formé à différents instants:

t (min)	0	4	8	12	20	60	100	140
$[\text{I}_2]$ (mmol/L)	0	4,8	7,4	9,2	10,7	11,6	11,6	11,6

à l'aide du tableau ci-dessus :

- déduire la concentration initiale de l'eau oxygénée.
- vérifier que la réaction est d'ordre un.
- en déduire la constante de vitesse apparente.

Données: 1 Faraday = 96500 C/mol ;

R = 8,32 SI

EPREUVE DE BIOCHIMIE BIOLOGIE.

Durée: 4 heures;

Coefficient: 6

Remarques préliminaires :

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

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

L'ADENOSINE TRIPHOSPHATE ET L'ACTIVITE CELLULAIRE

1 - L'ATP DONNEUR DE GROUPEMENT PROSPHORYLE (20 points).

1.1. Définir le terme de phosphorylation.

Illustrer cette notion à l'aide d'un exemple (on écrira l'équation de réaction sans faire appel aux formules développées).

1.2. Structure de l'ATP.

1.2.1. Donner la formule détaillée de l'ATP.

Donnée : adénine = 6-amino-purine.

1.2.2. Aspects énergétiques.

L'hydrolyse de l'ATP en ADP s'accompagne d'une variation d'enthalpie libre dans les conditions standard :

$$\Delta G_0' = - 30,5 \text{ kJ.mol}^{-1}.$$

1.2.2.1. Donner des arguments qui permettent de justifier une telle variation d'enthalpie libre.

1.2.2.2. A quelle catégorie de composés appartient l'ATP ?

Citer d'autres biomolécules possédant les mêmes propriétés énergétiques (trois exemples).

1.2.2.3. La variation d'enthalpie libre accompagnant l'hydrolyse de l'ATP peut, dans certains cas, être évaluée dans les conditions réelles intracellulaires.

Dans les érythrocytes humains, à 37°C, on a pu mesurer les concentrations cellulaires en ATP, ADP et Pi. Les résultats sont exprimés en mmol.dm⁻³.

$$[\text{ATP}] = 2,25$$

$$[\text{ADP}] = 0,25$$

$$[\text{Pi}] = 1,65$$

Calculer la variation d'enthalpie libre d'hydrolyse de l'ATP, $\Delta G'$, dans les conditions intracellulaires de l'érythrocyte.

Commenter le résultat obtenu.

Donnée : R = 8,32 J.K⁻¹.mol⁻¹

1.2.3. Dans les cellules, l'ensemble des molécules d'ATP forme un "pool" dont le niveau dépend de l'activité cellulaire.

1.2.3.1. Enumérer les différents phénomènes aboutissant à la synthèse d'ATP, dans les différents types cellulaires connus.

1.2.3.2. Enumérer les activités cellulaires consommatrices d'ATP.

2 - SYNTHÈSE DE L'ATP DANS LES CELLULES EUKARYOTES ET PROCARYOTES (54 points)

2.1. A l'aide d'un tableau, comparer la structure d'une cellule procaryote et d'une cellule eucaryote.

2.2. Dans les cellules eucaryotes fonctionnant en aérobose, une partie importante de l'ATP cellulaire est synthétisée dans un organe schématisé dans le document Ia.

2.2.1. Légèder ce document.

2.2.2. Préciser la localisation de cette synthèse.

2.3. Dans cet organe, la phosphorylation de l'ADP en ATP est couplée au transport des électrons dans la chaîne respiratoire.

2.3.1. Quelle est l'origine des électrons transportés ?

2.3.2. A l'aide d'un exemple, montrer le fonctionnement d'une biomolécule transportant des électrons dans cette chaîne.

2.3.3. Proposer un schéma de la chaîne respiratoire (les sites de phosphorylation ne sont pas exigés).

2.4. Dans les cellules procaryotes, les chaînes respiratoires sont diverses.

Celle d'E. coli est schématisée sur le document II.

Localiser cette chaîne respiratoire.

La comparer avec celle proposée en 2.3.3.

2.5. Dans les cellules eucaryotes et procaryotes, la synthèse d'ATP est couplée énergétiquement au transfert des électrons dans la chaîne respiratoire. Pour expliquer le mécanisme de ce couplage, plusieurs théories sont en concurrence.

Peter MITCHELL a proposé le modèle chimio-osmotique :

- l'énergie dégagée lors du transfert des électrons sert à expulser des protons à travers une membrane ;

- ceci a pour conséquence la création :

* d'un gradient de concentration en protons de part et d'autre de la membrane,

* d'une différence de potentiel transmembranaire ;

- le retour de ces protons, dans le sens du gradient, permet la synthèse de l'ATP.

La variation d'enthalpie libre accompagnant le retour d'une mole d'ions H^+ s'exprime par la formule suivante :

$$\Delta G' = RT \ln \frac{[H^+]_2}{[H^+]_1} + ZF \Delta \Psi$$

R = constante des gaz parfaits
T = température absolue
Z = charge de l'ion transféré
F = constante de FARADAY
 $\Delta\psi$ = différence de potentiel transmembranaire.

2.5.1. Calculer $\Delta G'$ dans les conditions suivantes :

$\text{pH}_2 = 7,5$
 $\text{pH}_1 = 5,5$
 $\Delta\psi = -77 \text{ mV}$
 $R = 8,32 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$
 $F = 96500 \text{ J.V}^{-1}$
 $t = +37^\circ\text{C}$
Justifier le signe de $\Delta G'$.

2.5.2. Calculer n, le nombre entier minimum de moles de protons dont le retour est nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP.
Commenter le résultat obtenu.

2.6. Dans les cellules procaryotes et eucaryotes, l'ATP peut être synthétisé par une voie extramitochondriale. Cette synthèse se déroule lors de la glycolyse.

2.6.1. Ecrire le bilan de la glycolyse et préciser les étapes donnant lieu à une production d'ATP.

2.6.2. Détailler ce qui se passe entre le 3-phosphoglycéraldéhyde et le 3-phosphoglycérate (enzymes et coenzymes mis en jeu, transfert de l'énergie, bilan général).

2.6.3. Nommer ce type de phosphorylation et dire quel est son intérêt métabolique.

2.7. Dans certaines cellules pourvues de pigments particuliers, la synthèse de l'ATP a lieu lors de la photosynthèse.

2.7.1. Donner une définition générale de la photosynthèse.

2.7.2. Dans les cellules chlorophylliennes, la photosynthèse s'effectue dans des organites présentés dans le document Ib.

2.7.2.1. Légender ce document.

2.7.2.2. Donner une équation générale de la photosynthèse.

2.7.2.3. Dans les cellules chlorophylliennes, la photosynthèse se déroule en deux phases distinctes.

- Quelles sont ces deux phases ?

La première phase est représentée sur le document III.

- Que se passe-t-il au niveau des photosystèmes ?

- Ecrire le bilan de cette première phase.

2.7.3. La photosynthèse est également présente chez certains microorganismes.

2.7.3.1. Ecrire l'équation générale de la photosynthèse chez ces microorganismes. Présenter les principales différences entre photosynthèse bactérienne et photosynthèse végétale.

2.7.3.2. Parmi les bactéries photosynthétiques, on trouve les pourpres sulfureuses photolithotrophes et les pourpres non sulfureuses photoorganotrophes.

- Expliciter les deux termes : photolithotrophe et photoorganotrophe.

- Quels sont les autres types trophiques bactériens ?

En préciser les principales caractéristiques (source de carbone, source d'énergie, rôle du donneur d'électrons et de protons).

3 - UTILISATION CELLULAIRE DE L'ATP (46 points).

3.1. Activité métabolique.

3.1.1. Dans la glycolyse, la phosphofructokinase (PFK), enzyme allostérique, catalyse une réaction consommatrice d'ATP. Ecrire l'équation de cette réaction (formules chimiques non exigées).

3.1.2. Cette enzyme est une protéine tétramérique de 380 kd ; elle existe dans deux états conformationnels différents, en équilibre :

état T <-----> état R

La transition T <-----> R est du type concerté.

Chaque sous-unité possède deux sites de fixation pour l'ATP, un site catalytique et un site modulateur. Le site catalytique a la même affinité pour l'ATP quel que soit l'état conformationnel de l'enzyme. Le site modulateur fixe l'ATP lorsque l'enzyme est dans l'état T. Le fructose-6-phosphate se fixe préférentiellement sur l'enzyme à l'état R.

3.1.2.1. Expliquer ce que sont les états T et R.

3.1.2.2. Définir une transition concertée.

3.1.2.3. Commenter les courbes du document IV.

3.1.2.4. Préciser l'action de l'ATP sur la PFK.

3.1.2.5. Expliquer comment l'étape catalysée par la PFK est une étape où se fait une régulation de la glycolyse.

3.2. Transport des molécules au travers des membranes.

3.2.1. Donner une classification des principaux types de transports transmembranaires.

3.2.2. Les transports actifs.

En donner une définition, puis en présenter un exemple.

3.2.3. Les systèmes phosphotransférasiques.

Chez E. coli, le glucose pénètre dans la cellule soit par transport actif soit par un système membranaire appelé système "phosphotransférase".

La synthèse de ces systèmes de perméation est le plus souvent induite ou réprimée selon les conditions de vie de la bactérie, lui permettant ainsi de s'adapter au milieu extérieur.

3.2.3.1. Différencier enzyme inductible et enzyme constitutive.

3.2.3.2. L'expérience suivante a été réalisée chez E. coli. Des vésicules (obtenues par traitement d'extraits de membrane plasmique aux ultra-sons) renfermant du glucose sont transférées dans un milieu contenant du glucose marqué au carbone 14 radioactif. Après une heure d'incubation, ces vésicules sont centrifugées, lavées et leur contenu est analysé. Elles renferment du glucose non radioactif et du glucose-6-phosphate radioactif.

a) Interpréter cette expérience.

b) Analyser le document V :

- quelle est l'origine du PEP (phosphoénolpyruvate) ?

- à quoi sert-il ici ?

3.2.3.3. Quel est l'intérêt du système "phosphotransférase" par rapport au transport actif ?

3.3. Un aspect des mouvements cellulaires : adaptation à l'effort des fibres musculaires striées.

3.3.1. Compléter les légendes du document VI.

3.3.2. Définir le terme sarcomère, puis indiquer le nom de ses deux principaux constituants. L'un d'eux est doué d'une activité ATPasique ; lequel ?

3.3.3. Analyse du document VII.

Il existe plusieurs types de fibres musculaires striées : fibres rouges et fibres blanches.

Les fibres rouges, ou fibres oxydatives, tirent leur couleur rouge foncé du fait qu'elles contiennent de grandes quantités de myoglobine. On les subdivise elles-mêmes en deux catégories :

* fibres lentes, à faible activité ATPase ;

* fibres rapides, à forte activité ATPase.

Les fibres blanches, ou fibres glycolytiques, contiennent peu de myoglobine. Ce sont des fibres rapides, à forte activité ATPase.

L'activité ATPase est en rapport avec la vitesse de raccourcissement des fibres musculaires.

La myoglobine constitue une réserve d'oxygène.

D'où provient l'essentiel de l'ATP nécessaire à la contraction, dans le cas des fibres rouges ?

D'où provient l'essentiel de l'ATP nécessaire à la contraction, dans le cas des fibres blanches ?

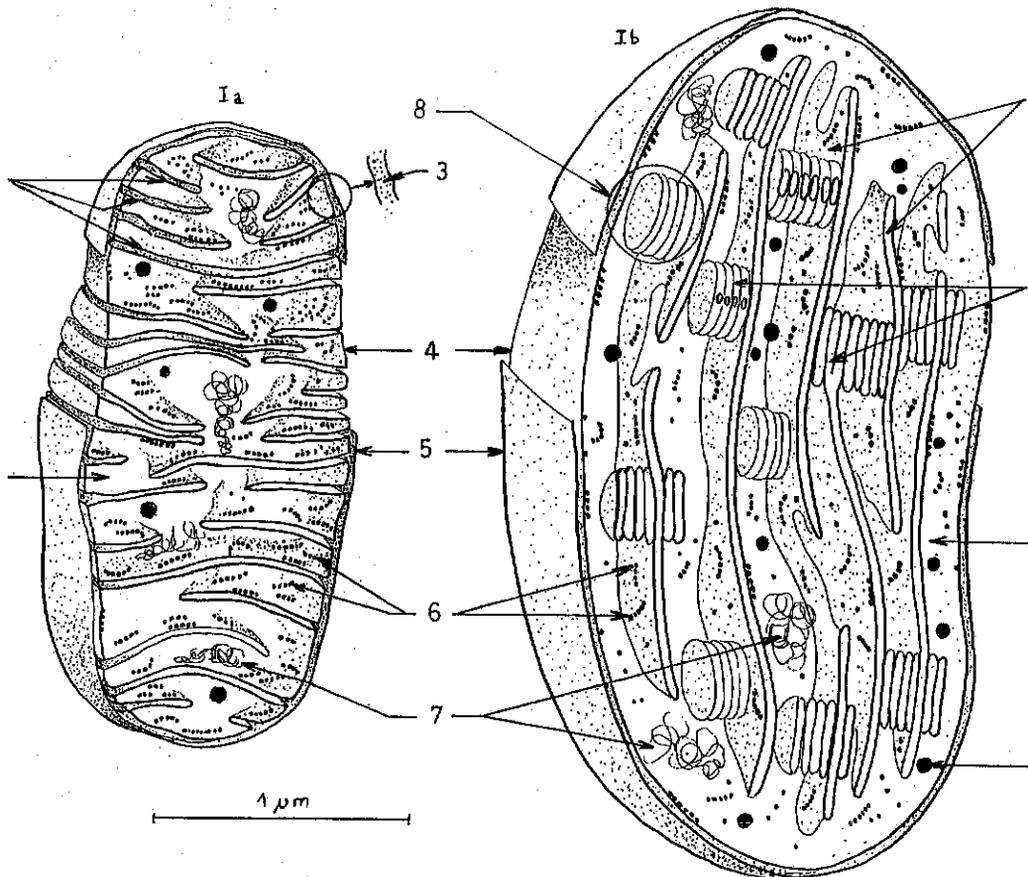
Quel est le type de fibre favorisé par l'entraînement chez un coureur de 100 m ?

Quel est le type de fibre favorisé par l'entraînement chez un marathonien ?

Justifier les réponses.

DOCUMENT I

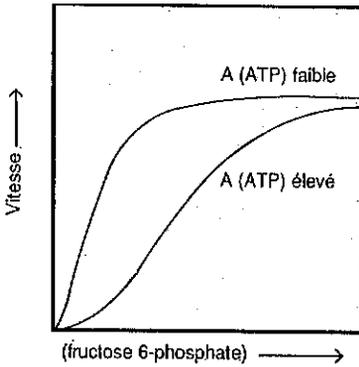
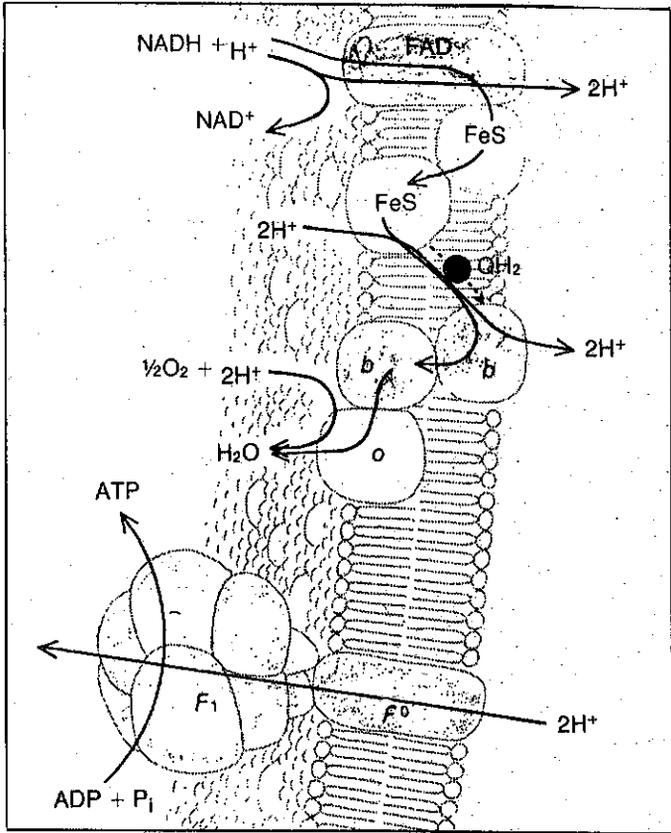
A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6

- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12

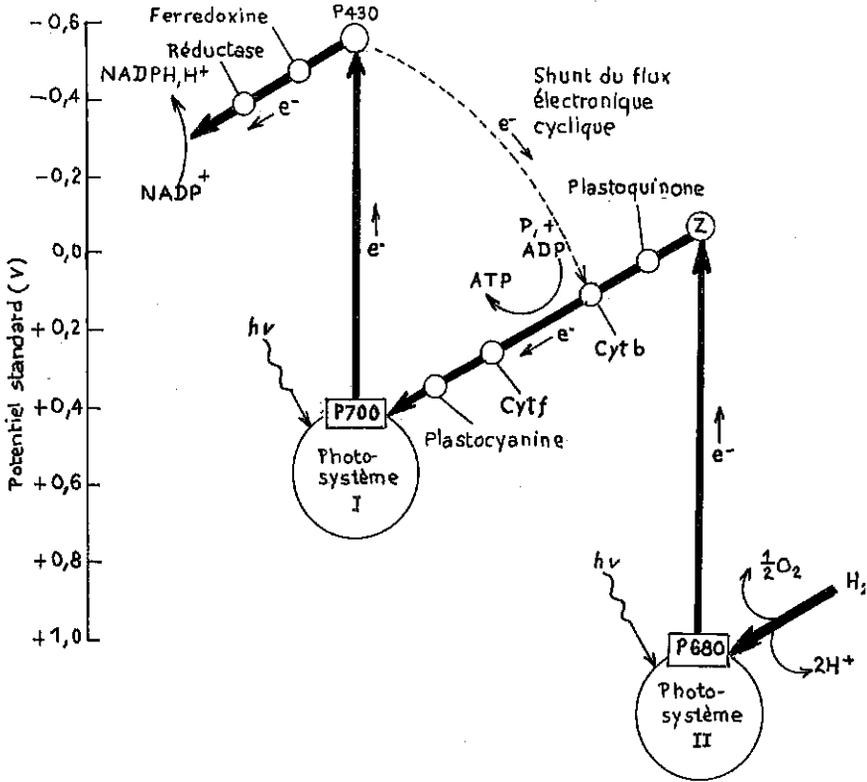
DOCUMENT II. La chaîne respiratoire d'E.coli



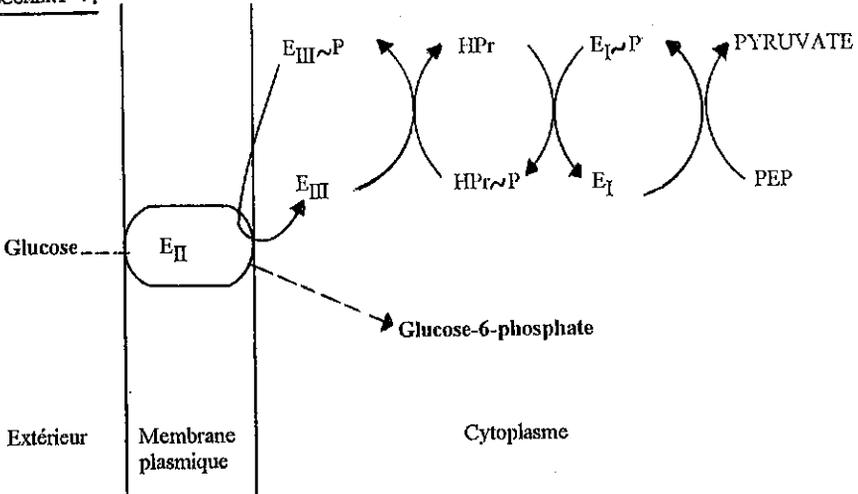
DOCUMENT IV,

Effet de la concentration de l'ATP et du fructose-6-phosphate sur la vitesse de réaction de la phosphofructokinase.

DOCUMENT III.

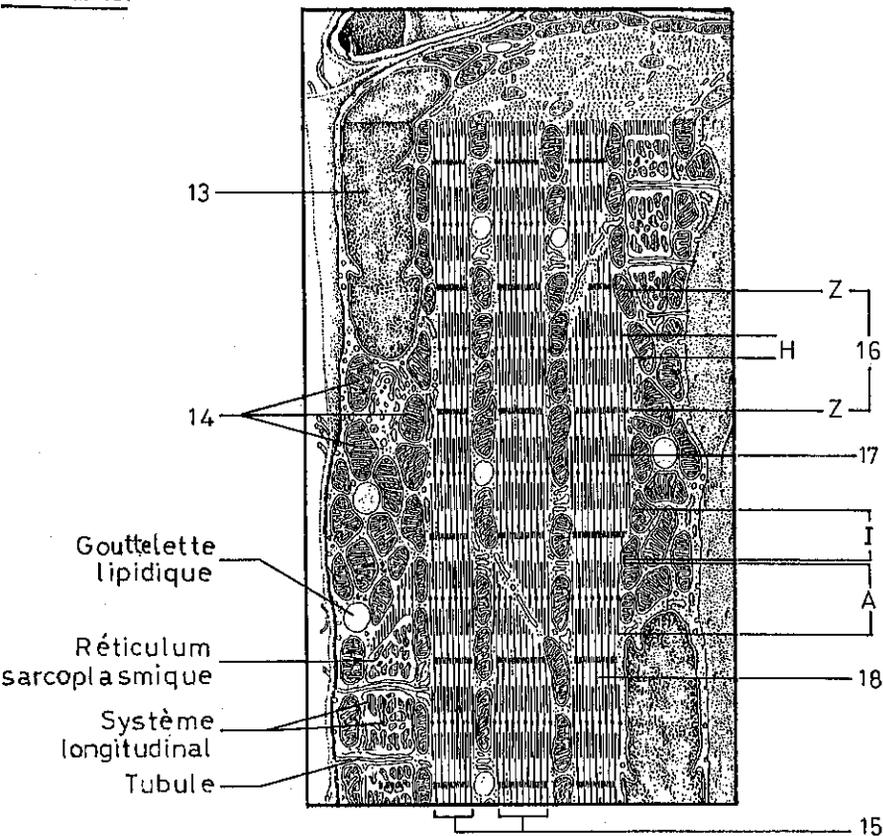


DOCUMENT V.



HPr : protéine contenant de l'histidine

Organisation et fonctionnement du système de transport du glucose par phosphotransférase.



DOCUMENT VII.

Les trois types de fibres musculaires squelettiques

Types de fibres	Fibre lente oxydative	Fibre rapide oxydative	Fibre rapide glycolytique
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
ATPase	Activité faible	Activité élevée	Activité élevée
Nombre de mitochondries	Important	Important	Assez réduit
Capillaires	Beaucoup	Beaucoup	Peu
Quantité de myoglobine	Elevée	Elevée	Faible
Quantité de glycogène	Faible	Moyenne	Elevée
Diamètre des fibres	Petit	Moyen	Gros
Vitesse de fatigabilité	Lente	Moyenne	Rapide

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Première partie: étude d'opérations techniques

Durée: 4 heures;

Coefficient: 4

ANALYSES DE LABORATOIRE : FILIÈRE BETTERAVE

Nous nous proposons d'aborder autour du thème de la betterave quelques aspects des apports du laboratoire dans :

- * l'étude des maladies virales de la betterave,
- * le dosage des produits élaborés par la betterave,
- * la valorisation des mélasses et leur contrôle microbiologique.

1. - ETUDE D'UNE MALADIE VIRALE DE LA BETTERAVE (23 points)

La qualité des betteraves peut baisser lorsqu'elles sont parasitées par certains virus dont le virus de la Rhizomanie de la betterave (BNYVV : Beet Necrotic Yellow Vein Virus).

Les laboratoires "Sanofi Phyto-Diagnostics" ont élaboré un protocole de mise en évidence du virus BNYVV.

Le contenu de la trousse de diagnostic ainsi que le protocole proposé sont donnés dans les documents 1a, 1b, 1c.

- 1.1. Schématiser les étapes de la manipulation indiquées sur le document 1a. En déduire le type d'immunodosage utilisé.
- 1.2. Justifier le rôle des composants n° 1, 2, 10 de la trousse (document 1b).
- 1.3. Justifier les consignes données dans le document 1c, paragraphe "plan de plaque".
Dégager l'intérêt des deux types de témoins.
- 1.4. Pourquoi l'eau distillée seule ne convient-elle pas au lavage des plaques (document 1a) ?
- 1.5. En immuno-enzymologie le choix de l'enzyme est important.
 - 1.5.1. D'après la composition de la trousse (document 1b), quel est l'enzyme marqueur ?
 - 1.5.2. Citer deux autres exemples d'enzymes utilisables comme marqueurs en immuno-enzymologie.
 - 1.5.3. Quelles précisions liées au choix du test enzymatique faut-il apporter au document 1c pour la lecture des plaques et l'exploitation quantitative des résultats ?
- 1.6. Dans le document 1c, on détermine le seuil de discrimination par une mesure de bruit de fond.
 - Comment réalise-t-on cette mesure ?
 - Représente-t-elle "la limite de détection" ou "la sensibilité de la méthode" ? Justifier la réponse.

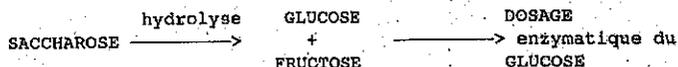
2 - LA BETTERAVE SOURCE DE GLUCIDES (35 points)

Le planteur est rétribué en partie en fonction de la teneur en sucre des betteraves. Celle-ci est traditionnellement déterminée par polarimétrie, mais ce type de dosage donne des résultats erronés si les betteraves ont subi des dégradations lors de leur stockage.

C'est pourquoi des méthodes enzymatiques sont de plus en plus utilisées.

2.1. Quelques aspects des méthodes de dosage enzymatique du saccharose.

Toutes les méthodes peuvent se résumer par le schéma suivant :



2.1.1. Trois méthodes enzymatiques peuvent être utilisées pour doser le glucose en agro-alimentaire :

- * méthode à la glucose-oxydase/peroxydase,
- * méthode à l'hexokinase/glucose-6-P-déshydrogénase,
- * méthode à la glucose-déshydrogénase.

2.1.1.1. Ecrire l'enchaînement des réactions intervenant dans ces dosages (aucune formule chimique développée n'est exigée).

2.1.1.2. Pour exprimer le résultat on peut utiliser :

- soit l'absorbance obtenue avec un étalon,
- soit le coefficient linéique molaire d'un produit.

Comparer ces deux procédés.

2.1.2. A partir du document 2, discuter l'importance de la spécificité de la méthode à la glucose-déshydrogénase dans le cas du dosage du saccharose dans les betteraves.

2.2. Méthode manuelle du dosage du glucose par la glucose-déshydrogénase : (document 3).

2.2.1. Préciser le rôle de la mutarotase dans ce dosage.

2.2.2. Donner la composition des cuves "témoin" qui permettent de lire les absorbances A(T) et A(BT).

2.2.3. Déterminer la valeur du facteur f permettant de calculer la concentration en glucose c dans l'échantillon en $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Données : $c = f [A(T) - A(BT)]$

$$\epsilon_{\text{NADH à } 340 \text{ nm}} = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$$

2.2.4. La méthode de dosage mise au point est soumise à plusieurs contrôles de qualité.

2.2.4.1. Donner la définition des critères suivants :

- exactitude,
- répétabilité.

2.2.4.2. Pour évaluer ces deux critères, une série de 40 dosages est effectuée sur le même échantillon dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus figurent ci-dessous :

Valeur de référence du contrôle	0,92 mmol.dm ⁻³
Nombre de dosages	40
Valeur moyenne obtenue	0,89 mmol.dm ⁻³
Ecart-type	0,02 mmol.dm ⁻³

Calculer :

- le degré d'inexactitude relatif de la méthode,
- le coefficient de variation de la méthode.

2.2.4.3. Préciser pour ce dosage les facteurs qui peuvent modifier l'exactitude.

2.3. Automatisation de la méthode en point final.

Le protocole précédent est adapté sur analyseur de transfert.

Au cours de la programmation, le technicien doit introduire différents paramètres.

Sachant que l'analyse comportera un échantillon contrôle ayant les caractéristiques suivantes :

- concentration cible = 1,22 mmol.dm⁻³
- écart-type = 0,03 mmol.dm⁻³

compléter la fiche (document 4) et la joindre à la copie.

Justifier le temps d'incubation et la température choisie.

2.4. Dosage par méthode cinétique.

Le dosage du glucose par la glucose-déshydrogénase (document 3) est adaptable en méthode cinétique non linéaire en temps fixé.

Quels sont les paramètres expérimentaux qui devraient être modifiés ? Justifier les réponses.

3 - VALORISATION D'UN SOUS-PRODUIT DE LA BETTERAVE : LA MELASSE (22 points)

La mélasse résiste bien à l'envahissement microbien, pour peu qu'elle soit stockée à l'abri de l'air. Par contre, une fois diluée, elle constitue un bon milieu de culture.

La mélasse diluée au 1/10 peut alors servir de milieu de culture pour produire de la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*).

L'opération se déroule en aérobios.

Une fermentation pilote en continu est lancée, afin de tester l'intérêt de ce mode de valorisation.

3.1. Expliquer la bonne conservation de la mélasse non diluée, dont la composition partielle figure sur le document 5a.
Citer un exemple d'aliment se conservant de cette manière.

3.2. La régulation de cette culture continue utilise une mesure opacimétrique. Justifier le choix et préciser les limites de l'opacimétrie.

3.3. La teneur en biomasse sèche du milieu sortant du fermenteur est de $9,7 \text{ g.dm}^{-3}$. Le document 5b indique la composition chimique partielle de cette levure.

3.3.1. Calculer le rendement brut R1 de cette fermentation. R1 est exprimé en grammes de matière organique sèche de levure formée par gramme de saccharose dans le milieu de culture (mélasse diluée au 1/10).

3.3.2. Calculer le rendement azoté R2 de cette fermentation. R2 est exprimé en grammes d'azote fixé dans la biomasse par gramme d'azote dans le milieu de culture. On admettra que 6,1 g de matière organique azotée contiennent 1 g d'azote.

3.3.3. A la lumière des résultats précédents, quelle hypothèse formuler pour améliorer le rendement brut de la fermentation ?

3.4. Contrôle microbiologique du moût de fermentation.

Après quelques jours de fonctionnement apparaît une baisse sensible de R1 et R2, associée à une forte augmentation de l'acidité du moût. Une contamination bactérienne est suspectée. Deux types de dénombrements bactériens sont alors entrepris :

- un dénombrement en gélose MRS additionnée d'actidione,
- un dénombrement en gélose PCA additionnée d'actidione.

La composition des deux bases gélosées figure sur le document 6.

Toutes les géloses sont ensemencées par inclusion dans la masse de 1 cm^3 de chacune des dilutions. Les essais sont réalisés en double. Après incubation, les résultats suivants sont obtenus :

dilution testée		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
nombre de colonies	géloses MRS + actidione	NC	NC	NC	428	61	4
		NC	NC	NC	392	52	8
par boîte	géloses PCA	33	1	0	0	0	0
	+ actidione	28	4	0	0	0	0

Donnée : NC = non comptable

3.4.1. Quel est le rôle de l'actidione ajoutée dans les milieux ?

3.4.2. Quelle est la flore dénombrée sur chacun des deux types de milieux ? Justifier.

3.4.3. Exprimer le résultat de chacun des dénombrements.

3.4.4. Quelle serait la nature du contaminant responsable de la baisse des rendements ?

Comment confirmer de façon simple son identité ?

Tests

Immuno-enzymatiques

pour la détection

des maladies

des plantes

*Détection du virus de la Rhizomanie de la Betterave
Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV)*

PROCOLE

1. Fixation des anticorps:

Reconstituer les anticorps en ajoutant 1 ml d'eau distillée au lyophilisat, agiter, et conserver à +4°C.

Au moment de l'emploi: pour une plaque, diluer 200 µl d'anticorps dans 21 ml de solution de fixation (tampon Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 9.6).

Déposer 200 µl de cette préparation dans chaque puits, et incuber 2 à 4 heures à +37°C, ou une nuit à +4°C.

Laver les plaques avec le tampon PBS Tween.

2. Dépôt des échantillons:

Déposer 200 µl d'extrait dans chaque puits, et incuber 2 à 3 heures à +37°C, ou une nuit à +4°C.

Laver les plaques avec le tampon PBS Tween.

3. Dépôt du conjugué:

Reconstituer les anticorps conjugués en ajoutant 1 ml d'eau distillée au lyophilisat, agiter, et conserver à +4°C.

Au moment de l'emploi: pour une plaque, diluer 200 µl d'anticorps dans 21 ml de solution de conjugué (tampon PBS Tween Albumine pH 7.4).

Déposer 200 µl de cette préparation dans chaque puits, et incuber 2 à 3 heures à +37°C.

Laver les plaques avec le tampon PBS Tween.

4. Dépôt du substrat:

Au moment de l'emploi: pour une plaque, dissoudre 2 tablettes de 4-nitrophenylphosphate SANOFI dans 21 ml de solution de substrat (tampon diéthanolamine pH 9.8).

Déposer 200 µl de cette préparation dans chaque puits et incuber 30 minutes à 2 heures à la température du laboratoire (voir la fiche de spécificité pour l'interprétation des résultats). La réaction peut être stoppée par addition de 50 µl de NaOH 1M dans chaque puits.

N.B: Les réactifs réhydratés ont une durée de vie de 1 mois environ. Pour allonger leur durée de conservation, utiliser pour leur réhydratation 1 ml d'un mélange volume/volume d'eau distillée et de glycérol, et conserver à -20°C.

DOCUMENT 1 B

Détection du virus de la Rhizomanie de la Betterave

Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV)

LA TROUSSE DE DIAGNOSTIC CONTIENT :

- 1 - Anticorps de coating
ou
Plaques précoatées
- 2 - Anticorps conjugués
- 3 - Témoins positifs lyophilisés
= extraits de plantes infectées
- 4 - Témoins négatifs lyophilisés
= extraits de plantes saines
- 5 - Solution de fixation
- 6 - Solution de conjugué
- 7 - Solution de substrat
- 8 - Solution de lavage
- 9 - Solution de broyage
ou
Composants du tampon de broyage
- 10 - Substrat 4-nitrophénylphosphate
- 11 - Plaques de microtitration

DOCUMENT 1 C

Préparation des échantillons

Le tampon de broyage est le tampon PBS-Tween-PVP X1 standard.

Les échantillons seront broyés dans le rapport 1g/4 à 5 ml de tampon.

Témoins

Le témoin positif SANOFI reconstitué peut être dilué 5 fois dans le tampon de broyage avant l'emploi.

Témoins négatifs : la détermination du bruit de fond nécessite l'utilisation de témoins sains frais, de même nature et préparés identiquement aux échantillons à tester.

De manière générale, il est conseillé :

- 1) de placer un témoin positif sur chaque plaque pour s'assurer qu'aucune erreur n'a été commise au cours du test.
- 2) de préparer plusieurs extraits sains différents, et non de répéter le dépôt d'un même extrait sur la plaque, afin d'éprouver la variabilité du bruit de fond et établir ainsi le seuil de discrimination entre échantillons sains et infectés (cf § "Interprétation"). Il est également souhaitable de ne pas grouper ces dépôts sur la plaque.

Plan de plaque : consignes.

Les puits de bordure des plaques ne seront utilisés que moyennant certaines précautions (couverture de la plaque et incubation au bain marie ou en incubateur...).

Une colonne sera employée pour faire le "blanc" (témoin tampon).

Comme il est conseillé ci-dessus, plusieurs témoins sains doivent être répartis sur la plaque : nous conseillons de placer au moins 6 témoins différents.

Enfin, il est souhaitable de répéter au moins une fois le dépôt des échantillons à tester.

Modalités de lecture et interprétation

- Faire les lectures à 30 min, 1h, 2h d'incubation du substrat. Le suivi de la cinétique de la réaction jusqu'à 4 ou 5 heures d'incubation du substrat permet dans certains cas de discriminer des échantillons faiblement positifs.

Dans les conditions d'emploi préconisées, un extrait de feuille infecté au 1/5 ainsi que le témoin positif SANOFI donnent une D.O. supérieure à 1 après 1 heure d'incubation du substrat.

Interprétation : le seuil de discrimination peut être établi de différentes façons. Nous conseillons :

- soit de le fixer à 2 fois le bruit de fond,
- soit de le calculer comme suit : seuil = $x + 3s$, où x représente le bruit de fond et s son écart-type.

DOCUMENT 2

(D'après Diagnostica MERCK)

SPECIFICITE DE LA GLUCOSE-DESHYDROGENASE ENVERS LES GLUCIDES

Activité envers le glucose = 100.

Le tableau indique les substances à activités $\geq 0,1$.

Concentrations au début du test : 160 mmol.dm^{-3} de glucide ; $1,4 \text{ mmol.dm}^{-3}$ de NAD ; $0,63 \text{ mmol.dm}^{-3}$ de tampon Tris, pH 7,6.

Mesure de la variation d'absorbance à 340 nm pendant 3 minutes.

<u>Substrat</u>	<u>Activité</u>
Désoxy-2-glucose	120
β -D-glucose	100
D-glucosamine	31
D-xylose	15
D-mannose	8
Amino-6-désoxy-6-glucose	6
Cellobiose	1
D-ribose	0,8
Lactose	0,7
Désoxy-2-ribose	0,1

Les composés suivants ne réagissent pratiquement pas (0,03 à 0 % du métabolisme du glucose) : galactose, désoxy-2-galactose, fructose, talose, thioglucose, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, N-acétyl-2-glucosamine, N-méthyl-2-glucosamine, N-benzyl-2-glucosamine, arabinose, delta-lactone de l'acide glucuronique, tréhalose, saccharose. On obtient la même spécificité en utilisant le NADP comme coenzyme.

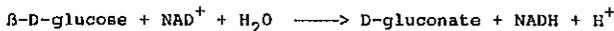
DOCUMENT 3

GLUCOSE GDH (D'après Diagnostica ROCHE)

Méthode :

Test enzymatique U.V. avec glucose déshydrogénase (GDH)

Principe :



La concentration en NADH formé est déterminée par la mesure de l'absorbance à 340 (334, 365) nm.

Coffret :

R1 Coenzyme-enzymes pour 3 x 100 ml	GDH mutarotase NAD ⁺	> > >	0,45 kU 9 U 0,18 mmol par flacon
R2 Tampon 3 x 100 ml	NaCl phosphate		0,15 mmol/l 0,12 mmol/l pH 7,6 (25°C)

Les réactifs non ouverts sont stables entre +2 et +8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

Réactifs :

Solution de travail :

Dissoudre le contenu d'un flacon R1 dans le contenu d'un flacon R2 et bien mélanger.

Stabilité : 12 semaines entre +2 et +8°C.

Comme réactif supplémentaire, utiliser de la solution de NaCl 154 mmol/l (0,9 %).

Mode opératoire :

	T	BT
Echantillon	10 μ l	10 μ l
Solution de NaCl	-	1000 μ l
Solution de travail	1000 μ l	-

Bien mélanger et incuber 10 minutes à la température ambiante.

Dans les 30 minutes qui suivent, mesurer A(T) et A(BT) par rapport à des témoins appropriés.

Données :

T = test BT = blanc test A = absorbance

Photomètre à filtre : Hg 334 nm ou Hg 365 nm

Spectrophotomètre : 340 nm

Cellule de mesure : 1 cm de trajet optique

DOCUMENT 4

A RENDRE AVEC LA COPIE

PROGRAMMATION DE L'ANALYSEUR AUTOMATIQUE

Longueur d'onde (nm)
Volume échantillon (μ l)
Volume réactif (μ l)
Temps d'incubation (min)
Température (0 : ambiante ; 1 : 25°C ; 2 : 30°C ; 3 : 37°C)
Blanc échantillon (0 : oui ; 1 : non)
Contrôle (0 : oui ; 1 : non)
Concentration contrôle > à (mmol/l)
Concentration contrôle < à (mmol/l)
Etalon (0 : oui ; 1 : non)
Coefficient
Unité (0 : mmol/l ; 1 : g/l)

DOCUMENT 5

DOCUMENT 5a

COMPOSITION PARTIELLE DE LA MELASSE DE BETTERAVE A SUCRE
(exprimée en grammes par dm^3 de mélasse)

Saccharose	450
Autres molécules organiques	190
Azote total (Kjeldahl)	14
Cendres	100
pH de la mélasse	pH 6 à 7

DOCUMENT 5b

COMPOSITION DE LA LEVURE DE BOULANGERIE
(exprimée en grammes pour cent grammes de levure sèche)

Protides et acides nucléiques	49
Lipides	3
Glucides	36
Autres molécules organiques	1
Cendres	11

DOCUMENT 6
(d'après "Institut Pasteur production")

GÉLOSE M.R.S.

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

Peptone bactériologique	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Acétate de sodium	5
Phosphate bipotassique	2
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium 7 H ₂ O	0,2
Sulfate de manganèse 4 H ₂ O	0,05
Glucose	20
Tween 80	1 ml
Agar	10

pH = 6,2 (environ)

GÉLOSE STANDARD POUR DENOMBREMENT (P.C.A.)

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

Hydrolysate tryptique de caséine	5
Extrait de levure	2,5
Glucose	1
Agar	9

pH = 7 (environ)

ANALYSES DE LABORATOIRE

VALORISATION D'UNE MATIERE PREMIERE D'ORIGINE AGRICOLE

BIOCHIMIE (80 points)

Durée : 4 H 30

Les manipulations seront réalisées selon l'ordre précisé sur le lieu de l'épreuve.

VALORISATION DU JUS DE BETTERAVE

Le jus de betterave peut être utilisé industriellement :

- pour la fabrication du sucre (saccharose),
- pour la production d'une biomasse (levure de boulangerie),
- pour la production de β -fructosidase,
- pour la production de sucre inverti.

La manipulation comporte deux parties indépendantes.

1. Dosage du saccharose d'un jus de betterave.
2. Etude comparative de l'activité enzymatique d'une β -fructosidase libre et immobilisée.

1 - DOSAGE ENZYMATIQUE DU SACCHAROSE D'UN JUS DE BETTERAVE PAR TEST UV (33 points).

1.1. Contrôle de l'exactitude des absorbances mesurées à 340 nm.

1.1.1. Réactifs :

Réactif C1 : tampon Tris pH 9

Réactif C2 : solution de NADH à 400 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$

1.1.2. Mode opératoire.

A partir du réactif C2 préparer 5 cm^3 en tampon Tris d'une solution fille ayant une absorbance à 340 nm d'environ 0,5.

Lire l'absorbance de la solution fille à 340 nm en faisant le zéro de l'appareil avec le réactif C1.

- 1.2. Dosage du saccharose.
Le dosage est réalisé selon le protocole indiqué sur le document 1.
Diluer le jus de betterave 500 fois.

Réaliser deux essais sur le jus de betterave dilué.

- 1.3. Contrôle de la méthode.
Réaliser un essai à partir du réactif 4 : solution contrôle à $0,4g.dm^{-3}$.

Donnée :

$$* CV = 4 \%$$

- 1.4. Calculs.

Calculer le coefficient d'extinction linéique molaire du NADH à 340 nm.
Discuter le résultat sachant que sa valeur théorique à 340 nm est :

$$\epsilon_{NADH} = 6,3.10^3 dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$$

Calculer la concentration en saccharose du jus de betterave.
Valider la mesure à l'aide de la solution contrôle (la méthode est validée pour un résultat compris entre plus ou moins 2σ).

2 - TRANSFORMATION DU JUS DE BETTERAVE EN SUCRE INVERTI (47 points).

Les sucreries fabriquent des sirops de sucre inverti pour améliorer le pouvoir sucrant.

L'utilisation d'invertase ou β -fructosidase pour réaliser la conversion évite l'apparition de produits engendrés par l'hydrolyse acide. L'immobilisation de l'enzyme permet une production en continu en renforçant la stabilité de l'enzyme.

Au cours d'essais de mise au point, on se propose de comparer l'activité de l'enzyme libre et de l'enzyme incluse dans de l'alginate.

- 2.1. Principe.

La β -fructosidase catalyse la transformation du saccharose en un mélange équimolaire de glucose et de fructose.



Toutes les déterminations d'activité enzymatique sont réalisées à $40^\circ C$ et à pH 4,7 par méthode en "deux points".

On suit la réaction en dosant le glucose apparu par la méthode à la glucose oxydase (GOD) après blocage de la réaction enzymatique par action conjuguée d'une élévation de pH et de l'ébullition.

Une unité d'enzyme est définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant une micromole de saccharose par minute à $40^\circ C$ et à pH 4,7.

- 2.2. Détermination de la concentration d'activité catalytique de la β -fructosidase libre.

- 2.2.1. Réactifs.

- solution (E) de β -fructosidase en tampon acéto-acétique pH 4,7,
- tampon acéto-acétique pH 4,7,
- saccharose à $1 mol.dm^{-3}$,
- tampon phosphate pH 7,5,
- glucose étalon à $1 mmol.dm^{-3}$,
- réactif à la GOD.

2.2.2. Protocole pour la réaction enzymatique (2 essais).

- Préparer une dilution de la solution E au 1/50 en tampon acéto-acétique (solution E₅₀).

- Préincuber dans un tube à essais 10 min à 40°C :
0,5 cm³ de saccharose à 1 mol.dm⁻³
2,4 cm³ de tampon acéto-acétique

- Déclencher la réaction en ajoutant :
0,1cm³ de solution E₅₀

Après exactement 5 min bloquer la réaction en ajoutant :
0,3 cm³ de tampon phosphate
Boucher avec du papier d'aluminium.
Puis porter le tube 5 min à 100°C.

Soit V le volume total obtenu.
Réaliser un témoin sans enzyme.

2.2.3. Protocole pour le dosage du glucose apparu.

Dans un tube à hémolyse mettre :
- 2 cm³ du monoréactif à la GOD,
- 0,1 cm³ de prise d'essai.

Laisser la réaction se développer 15 min à température ambiante.

Lire les absorbances à 505 nm.

Réaliser :

- un dosage sur chaque essai enzymatique,
- un dosage sur le témoin,
- un étalonnage avec la solution de glucose à 1 mmol.dm⁻³,
- un blanc réactif.

2.2.4. Calculs.

- Exprimer la quantité de glucose apparue en micromoles dans les 0,1 cm³ de prise d'essai et dans les V cm³ de volume total.
- En déduire la concentration catalytique de la solution (E) en U.cm⁻³.

2.3. Inclusion de la β-fructosidase dans l'alginate :

2.3.1. Réactifs :

- solution (E) de β-fructosidase en tampon acéto-acétique pH 4,7,
- alginate à 1,5 % (m/v).

2.3.2. Inclusion :

- Préparer une dilution de la solution E au 1/10 en tampon acéto-acétique (E₁₀)

Dans un tube à hémolyse mélanger :

- 0,5 cm³ de E₁₀,
- 2,5 cm³ d'alginate à 1,5 % (m/v)

A l'aide d'un dispositif d'aspiration transférer ce mélange dans une pipette de 10 cm³ et laisser tomber le mélange goutte à goutte, de 20 cm de hauteur, dans 150 cm³ d'une solution de CaCl₂ à 0,15 mol.dm⁻³ légèrement agitée.

Laisser reposer les billes 30 minutes dans la solution de chlorure de calcium.

Les rincer à l'eau déminéralisée et les égoutter sur du papier filtre.

Compter les billes obtenues (soit N ce nombre). On admettra que dans les conditions opératoires précédentes la totalité des billes représente un volume de $1,6 \text{ cm}^3$.

(La polymérisation par les ions Ca^{2+} se fait avec contraction de l'alginate qui expulse de l'eau).

2.4. Détermination de la concentration d'activité catalytique de l'enzyme immobilisée (2 essais).

2.4.1. Protocole :

- Préincuber $2,4 \text{ cm}^3$ de tampon acéto-acétique et $0,5 \text{ cm}^3$ de saccharose à 1 mol.dm^{-3} .
- Ajouter un nombre entier de billes voisin du quart des billes obtenues (volume estimé à $0,4 \text{ cm}^3$).
- Laisser la réaction enzymatique se poursuivre 5 min exactement à 40°C en agitant régulièrement.
- Introduire rapidement 1 cm^3 de surnageant dans un tube à hémolyse contenant $0,1 \text{ cm}^3$ de tampon phosphate et porter 5 min à l'ébullition (tube bouché au papier d'aluminium).
- Doser le glucose apparu dans $0,1 \text{ cm}^3$ de ce milieu réactionnel en ajoutant 2 cm^3 de réactif à la GOD.
- Réaliser également un tube étalon et un tube blanc-réactif comme au 2.2.3.

Donnée : Le témoin réalisé en 2.2.2. reste valable pour ce dosage.

2.4.2. Exploitation des résultats.

- Conserver les billes d'alginate au poste de travail.
- Exprimer la quantité de glucose apparue en micromoles dans les $0,1 \text{ cm}^3$ de milieu réactionnel dosés.
- En déduire successivement :
 - * les micromoles de glucose apparues dans les $1,1 \text{ cm}^3$ d'essai enzymatique bloqué,
 - * les micromoles de glucose apparues dans l'essai enzymatique total.
- Calculer l'activité enzymatique immobilisée :
 - * pour N billes (on admettra que les billes sont homogènes),
 - * pour 1 cm^3 de E.
- A partir des résultats obtenus en 2.2.4. et en considérant que toute l'enzyme a été immobilisée, calculer en pourcentage la baisse d'activité due à l'immobilisation.

DOCUMENT I

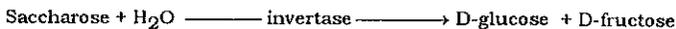
DOSAGE DU SACCHAROSE PAR METHODE UV

D'après Boehringer Mannheim

SACCHAROSE/D-GLUCOSE (Méthode UV)

- PRINCIPE :

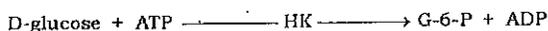
A pH 4,6 le saccharose est hydrolysé par la bêta-fructosidase (invertase) en D-glucose et D-fructose.



La détermination du D-glucose se fait selon le principe suivant :

A pH 7,6 l'hexokinase (HK) catalyse la phosphorylation du D-glucose par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) avec formation simultanée d'adénosine-5'-diphosphate (ADP).

En présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH), le glucose-6-phosphate formé est spécifiquement oxydé par le nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate (NADP⁺) en 6-phosphogluconate avec formation de nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate réduit (NADPH).



L'absorbance du NADPH est mesurée à 340 nm.

REACTIFS :

Réactif 1 :

Tampon triéthanolamine pH 7,6
NADP⁺
ATP
Sulfate de magnésium

Réactif 2 :

Hexokinase
Glucose-6-phosphate déshydrogénase

Réactif 3 :

Tampon citrate pH 4,6
Bêta-fructosidase

Réactif 4 :

Solution contrôle de saccharose à 0,4g.dm⁻³

2 - MODE OPERATOIRE

Cuve	Blanc saccharose	Essai saccharose
Réactif 3	0,20 cm ³	0,20 cm ³
Echantillon	—	0,10 cm ³

Mélanger Incuber 20 min à 20-25°C

Réactif 1	1,00 cm ³	1,00 cm ³
Eau distillée	1,80 cm ³	1,70 cm ³

Mélanger. Mesurer l'absorbance de chaque cuve après 3 min environ (A1).

Déclencher la réaction par addition de :

Réactif 2	0,02 cm ³	0,02 cm ³
-----------	----------------------	----------------------

Mélanger. Incuber 15 à 20 min à 20-25°C. Mesurer l'absorbance de chaque cuve (A2). Vérifier l'absorbance après 5 min jusqu'à ce qu'elle soit stable.

CALCUL :

Déterminer la différence d'absorbance (A2-A1) pour le blanc (B) et l'essai (E).

Déterminer la différence (B-E).

$$\text{Csaccharose} = \frac{V \cdot \text{Msaccharose}}{\epsilon \cdot l \cdot v} \cdot (B-E) \cdot F \text{ (g/dm}^3\text{)}$$

V = volume final (cm³)

v = volume d'échantillon (cm³)

Msaccharose = masse molaire du saccharose (g/mol)

l = trajet optique (cm)

ϵ = coefficient d'extinction linéique molaire du NADPH (dm³.mol⁻¹.cm⁻¹) = coefficient d'extinction linéique molaire du NADH

F = dilution de l'échantillon

MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE (80 points)

Durée : 5 H 30

De la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) est produite par fermentation d'un substrat agricole.

* Une partie de cette levure est commercialisée sous forme fraîche pour servir à l'élaboration de levains, notamment pour l'alimentation humaine.

* L'autre partie sert à la fabrication d'enzymes industrielles, dont la β -fructosidase utilisée pour l'inversion du saccharose.

A - MICROBIOLOGIE (50 points)

1 - MESURE DU POURCENTAGE DE REVIVIFICATION

Pour pouvoir servir à l'élaboration de levains, la levure doit présenter un pourcentage de revivification élevé. On se propose de mesurer ce paramètre à partir d'une fraction du moût de fermentation.

Le matériel à utiliser est le suivant :

- moût de fermentation,
- hématimètre,
- tubes de diluant (9mL exactement d'eau physiologique par tube),
- pipettes de 1 mL stériles à usage unique,
- 6 tubes de géloses OGA (Oxytétracycline Glucose Agar) maintenues en surfusion,
- 6 boîtes de Pétri.

- 1.1. Réaliser un dénombrement hématimétrique des levures totales et exprimer les résultats en nombre de levures par mL de moût de fermentation.
- 1.2. Réaliser un dénombrement des UFC ou Unités Formant Colonies de levure sur gélose OGA en utilisant 2 essais par dilution. Incuber 48 h à 30°C.
- 1.3. Faire un compte rendu des manipulations effectuées et des résultats obtenus.

2 - CONTROLES AVANT COMMERCIALISATION

La levure fraîche est conditionnée en cubes. Deux lots de cubes douteux sont analysés.

- 2.1. Un contaminant C est isolé sur gélose nutritive à partir du lot n°1.
Réaliser l'orientation du diagnostic. La galerie d'identification ne sera pas entreprise.
- 2.2. Suite à la mise en évidence d'une contamination fécale du lot n°2, une recherche de Salmonella est effectuée.

25 g de levure fraîche ont été portés dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée.

Après 16 h d'incubation à 37°C, 0,1 mL de ce milieu a été inoculé dans un tube de bouillon sélénite-cystéine qui a été ensuite incubé 24 h à 37°C.

Réaliser un isolement du bouillon sélénite sur gélose lactosée au Vert Brillant et au Rouge de Phénol et sur gélose Hektoen.
Incuber 24 h au moins à 37°C.

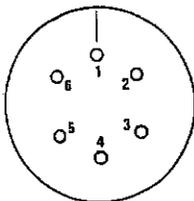
B - IMMUNOLOGIE (30 points)

1- DOSAGE D'UN EXTRAIT DE β -FRUCTOSIDASE OBTENUE A PARTIR DE S.CEREVISIAE

Une boîte de gélose contenant des anticorps de lapin anti β -fructosidase de S.cerevisiae est sur la paillasse (étiquetée "gel + anti β -fructosidase").

- 1.1. Perforer le gel à l'aide d'un emporte-pièce permettant d'obtenir 6 puits de 3 mm de diamètre disposés en périphérie selon le schéma suivant :

Distance entre 2 trous opposés : 25 mm
Distance entre bord et trous : 12 mm



- 1.2. Préparer une gamme étalon de β -fructosidase.

A partir de la solution mère de β -fructosidase à 3 mg.mL⁻¹ (étiquetée E) et de tampon PBS pH 7,2 préparer 4 solutions étalons en β -fructosidase :

$$\begin{aligned} E_1 &= 600 \mu\text{g.mL}^{-1} \\ E_2 &= 900 \mu\text{g.mL}^{-1} \\ E_3 &= 1200 \mu\text{g.mL}^{-1} \\ E_4 &= 1800 \mu\text{g.mL}^{-1} \end{aligned}$$

- 1.3. Déposer 5 μ L des 4 solutions étalons et des 2 essais de la solution inconnue (étiquetée I_X) de β -fructosidase.

- 1.4. Mettre en chambre humide pendant 48 h à température ambiante (en fixant dans le couvercle 2 à 3 épaisseurs de papier absorbant humidifié).
- 1.5. Compte rendu.
Dresser un tableau expliquant la préparation des étalons E_1, E_2, E_3, E_4 .

2 - DOCUMENT A COMPLETER

Regrouper les renseignements utiles pour les comptes rendus de la seconde séance sur le document distribué sujet page 4/4.

DOCUMENT A COMPLETER ET A RENDRE A LA FIN DE LA PREMIERE SEANCE

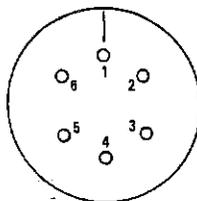
Numéro de poste.....

1 - MICROBIOLOGIE

Résultats des dénombrements en hématimètre :

2 - IMMUNOLOGIE

N° de puits	concentration déposée en $\mu\text{g.mL}^{-1}$		diamètre mesuré
	1er JOUR	2ème JOUR	en mm
1			
2			
3			
4			
5			
6			



Plan de dépôt des différents étalons et essais

A - MICROBIOLOGIE (50 points)**1 - MESURE DU POURCENTAGE DE REVIVIFICATION**

Lire le dénombrement des UFC et conclure sur le pourcentage de revivification des levures du moût de fermentation.

2 - CONTROLES AVANT COMMERCIALISATION (lot n°2)

- 2.1. Réaliser la lecture macroscopique des isolements.
- 2.2. En présence de colonies suspectes, effectuer le test uréase rapide.
- 2.3. Interpréter les résultats.

B - IMMUNOLOGIE (30 points)**DOSAGE D'UN EXTRAIT DE β -FRUCTOSIDASE OBTENUE A PARTIR DE S.CEREVISIAE**

- 1 - Mesurer les diamètres D de précipitation en lumière diffuse sur un fond noir.
- 2 - Compléter le tableau de résultats sur le document rendu le premier jour et établir la courbe d'étalonnage $D^2 = f(\text{Concentration en } \beta\text{-fructosidase en } \mu\text{g.mL}^{-1})$.

Tracer la courbe d'étalonnage.

Valider les valeurs expérimentales de cette courbe et calculer la droite de régression linéaire ; en donner les paramètres et en déduire la concentration en β -fructosidase dans l'essai.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie: réalisation pratique d'opérations techniques
Durée: 10 heures; Coefficient: 8

Sujet 2.

ANALYSES DE LABORATOIRE

CONTROLE DE PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE PROTEINES OBTENUES PAR

GENIE BIOLOGIQUE

Les levures sont utilisées en génie biologique comme source de protéines dans des applications très diversifiées :

- production d'une biomasse destinée tant à l'alimentation animale qu'humaine,
- production d'enzymes au service des bioconversions,
- production de protéines recombinantes telles les hormones ou autres protéines biologiquement actives, au service de la thérapeutique.

BIOCHIMIE (80 points)

Durée : 4 H 30

=====

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

Environ 25 grammes de *Saccharomyces cerevisiae* ont été finement broyés au mixer dans un minimum de tampon hydrogénéocarbonate. Cet homogénat a été incubé 24 heures au bain thermostaté agité à 40°C, puis centrifugé 15 minutes à 4000 tours/min. Le surnageant constitue l'autolysat de levure : AL 1.

En vue de la détermination de l'activité invertase, cet autolysat AL 1 est ensuite dilué au 1/50 dans un tampon acétate pH 4,7 (Tp4,7). Cette dilution constitue la solution AL 2.

I - DOSAGE DES PROTEINES DANS L'AUTOLYSAT DE LEVURE "AL 1" (30 points)

1.1. Préparation de la gamme étalon.

A partir d'une solution étalon de sérum albumine bovine (SAB) à $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, on effectuera des dilutions "en cascade" de 2/3 en 2/3.

- Introduire (micropipette pour l'ensemble de la manipulation) 100 μL d'eau déminéralisée dans 5 tubes à hémolyse numérotés 2 à 6.
- Introduire 200 μL de SAB dans le tube numéroté 2 ; mélanger.
- Prélever 200 μL de ce tube 2 et les introduire dans le tube 3 ; mélanger.
- Reprendre 200 μL , les introduire dans le tube 4 et ainsi de suite jusqu'au dernier tube.

1.2. Dilution de l'autolysat de levure à doser.

Effectuer une dilution au 1/10 de l'autolysat de levure "AL 1" (diluant : eau déminéralisée).

1.3. Colorimétrie.

Mettre 20 μL de solution étalon, ou de chacune des 5 dilutions, dans des cuves de spectrophotomètre. Ajouter 2 mL de réactif de Bradford, agiter.

Réaliser 2 essais avec la dilution de "AL 1".

Lire, contre un témoin sans protéines, l'absorbance à 590 nm après quelques minutes d'attente.

1.4. Compte rendu et résultats.

Calculer les concentrations protéiques de chaque solution étalon. Présenter les résultats de ces calculs et les absorbances sous forme d'un tableau.

Tracer la courbe d'étalonnage ; valider les valeurs expérimentales ; calculer la droite de régression ; en donner les paramètres et en déduire la concentration protéique des essais.

Calculer la concentration en protéines de l'autolysat de levure AL 1.

II - DOSAGE DE L'ACTIVITE β -FRUCTOSIDASE DE L'AUTOLYSAT DE LEVURE DILUE AL 2 (50 POINTS)

La β -D fructofuranoside fructohydrolase E.C.3.2.1.26 (ou invertase ou β -fructosidase ou saccharase) catalyse l'hydrolyse du saccharose en un mélange équimolaire de glucose et de fructose appelé "sucre inverti".

L'autolysat de levure, contenant la β -fructosidase a été dilué au 1/50 dans Tp4,7 ; solution "AL 2".

2.1. Etalonnage du sucre inverti par le 3-5 DNS.

Le 3-5 DNS (acide 3-5 dinitrosalicylique) forme quantitativement, à chaud, avec les sucres réducteurs un dérivé rouge orangé dont l'absorbance est mesurée à 530 nm. Le développement de la coloration à 100°C et les lectures d'absorbance devront être menés simultanément pour les essais (activités libres, activités immobilisées) et pour l'étalon.

Dans un tube à essai, verser :

- 1 mL de "sucre inverti" à 5 mmol/L (glucose à 5 mmol/L + fructose à 5 mmol/L),
- 1 mL d'eau déminéralisée,
- 1 mL de Tp4,7,
- 2 mL de DNS.

Réaliser en parallèle un tube témoin sans "sucre inverti".

Boucher les tubes avec du papier d'aluminium et les porter à 100°C pendant 5 minutes exactement ; refroidir sous courant (ou dans un bain) d'eau froide.

Ajouter 15 mL d'eau déminéralisée.

Lire l'absorbance à 530 nm contre le tube témoin.

2.2. Détermination des activités libres mises en jeu.

Déterminer l'activité de la β -fructosidase selon le protocole suivant :

Dans 3 tubes à essai, introduire :

- 0,50 mL de saccharose à 0,5 mol/L (préchauffé 10 minutes à 35°C)
- 2,45 mL de Tp4,7 (préchauffé 10 minutes à 35°C)
- 0,05 mL de solution "AL 2"

Placer exactement 2, 6, 10 minutes à 35°C ; agiter régulièrement.

Arrêter la réaction par l'addition de 2 mL de 3-5 DNS.

Boucher avec du papier aluminium.

Porter 5 minutes exactement à 100°C, refroidir et ajouter 15 mL d'eau déminéralisée.

2.3. Inclusion dans l'alginate.

Verser la solution de chlorure de calcium à 0,15 mol/L dans un bécher de 250 mL.

Oter le piston de la seringue et boucher le conduit d'écoulement avec du parafilm. Dans le corps de la seringue, verser :

- 2,50 mL d'alginate à 3 % (m/v) préalablement préchauffé à 45°C,
- 0,50 mL de β -fructosidase diluée au 1/50 (solution "AL 2").

Bien mélanger à l'aide d'un petit agitateur de verre puis oter le parafilm.

Laisser tomber le mélange, goutte à goutte, de 20 cm de hauteur, dans la solution de CaCl_2 à 0,15 mol/L légèrement agitée ; utiliser avec précaution le piston pour chasser lentement le mélange enzyme-alginate.

Laisser séjourner les billes formées 30 minutes dans le chlorure de calcium, puis les rincer à l'eau déminéralisée et les égoutter sur papier filtre. Compter le nombre N de billes obtenues ; les répartir en 3 lots égaux de n billes.

2.4. Détermination des activités immobilisées.

Dans 3 tubes à essais, introduire successivement :

- n billes d'alginate
- 0,50 mL de saccharose à 0,5 mol/L (préchauffé 10 minutes à 35°C),
- 2,50 mL de Tp4,7 (préchauffé 10 minutes à 35°C).

Placer exactement 2, 6, 10 minutes à 35°C, agiter régulièrement.

Arrêter la réaction en ~~prélevant la phase liquide et en la versant dans un tube~~ contenant 2 mL de 3-5 DNS.

Boucher avec du papier aluminium.

Porter 5 minutes exactement à 100°C, refroidir et ajouter 15 mL d'eau déminéralisée.

2.5. Compte rendu et résultats.

Conserver les billes d'alginate sur un papier filtre au poste de travail.

Présenter sous forme de tableau les absorbances obtenues.

Tracer sur le même graphe les courbes $A(530\text{nm}) = f(\text{temps})$ pour les enzymes libres et immobilisées. En déduire la variation d'absorbance par minute lors de la phase stationnaire.

Déterminer le nombre de micromoles de sucre inverti formé par minute dans le milieu réactionnel, par l'enzyme libre et l'enzyme immobilisée.

Calculer la concentration d'activité catalytique de l'autolysat de levure en UI/mL.
Calculer l'activité spécifique en UI/mg protéines.

Calculer les activités totales libres mises en jeu dans 0,05 mL d'AL 2 et les activités totales immobilisées dans N billes réalisées avec 0,5 mL d'AL 2 ; en déduire le pourcentage d'activité immobilisée (le volume des billes sera considéré comme négligeable pour le calcul).

MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

PREMIER JOUR

DUREE : 4 H

A - MICROBIOLOGIE (50 POINTS)

Contrôle d'un processus de production de biomasse levure pour alimentation animale

La production de biomasse destinée à l'alimentation animale met en oeuvre diverses souches microbiennes dont le choix dépend en particulier de la matière première transformée. Le rendement de production est fonction des propriétés métaboliques de la souche et des conditions du processus fermentaire.

I - CONTROLE DE LA SOUCHE DE LEVURE CANDIDA TROPICALIS UTILISEE DANS UNE UNITE DE PRODUCTION INDUSTRIELLE (12 POINTS)

La souche est présentée sur gélose OGA (étiquetée C.t, n° poste).

- contrôle des caractères cultureux et morphologiques (compte rendu),
- contrôle des caractères biochimiques par microméthode,
- contrôle du genre et de l'espèce.

2 - ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CROISSANCE EN ERLNMEYER (24 points)

Evaluer le nombre d'UFC (unités formant colonies) en phase stationnaire après culture en milieu liquide YPD oxygéné (étiquetée biomasse, n° poste).

- Numération préliminaire en cellule de Malassez (compte rendu : dilutions, résultats bruts, calculs, expression de N/mL).
- Numération précise sur gélose OGA avec ensemencement.

Seront ensemencées, en parallèle, 2 gammes de 3 dilutions successives (compte rendu : choix des dilutions).

Nota : Au moment de l'emploi ajouter, à 20 mL de gélose de base OGA fondue, 2 mL d'une solution stérile d'oxytétracycline à 1g.L^{-1} .

3 - IDENTIFICATION D'UN CONTAMINANT MICROBIEN ISOLE AU COURS D'UN CONTROLE DE PROPRETE DU MATERIEL DE LA CHAINE DE PRODUCTION (14 points)

Le contaminant est présenté sur gélose à l'extrait de malt (étiqueté : contaminant, n° poste).

- Etude des caractères cultureux : aspect macroscopique (compte rendu).
- Etude des caractères morphologiques après montage au microscope (compte rendu : effectuer un dessin légendé de l'observation ; déduire le nom du genre du micro-organisme).

Nota : La technique de montage est laissée à l'initiative du candidat.

Matériel disponible : lame, lamelle, pince, scotch, bleu coton, eau physiologique.

B - IMMUNOLOGIE (30 POINTS)

DOSAGE DE L'ÉCHISTATINE PROTÉINE RECOMBINANTE, PAR IMMUNODIFFUSION RADIALE

L'échistatine est un anticoagulant présent dans le venin de certaines vipères.

L'interaction avec la coagulation se situe au niveau de l'agrégation des plaquettes sanguines.

Afin de produire l'échistatine, son gène a été inséré dans un vecteur d'expression introduit dans une souche de *Saccharomyces cerevisiae*.

Après 48 heures de culture, on dose l'échistatine dans le surnageant de la culture par immunodiffusion radiale.

Réactifs et matériel utilisés :

- Petite boîte de Pétri dont le fond a été préalablement glacé par un gel d'agarose à 0,3 %.
- Tampon PBS à pH = 7,2 : 4 mL.
- Solution étalon d'échistatine à 2 mg/mL dans le tampon PBS : 1 mL.
- Surnageant de culture noté "SC" : 50 µL.

Mode opératoire

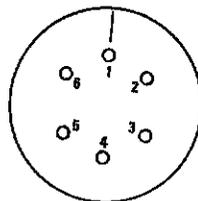
- Placer la boîte de Pétri sur une surface parfaitement horizontale.
- Verser, dans la boîte, le mélange agarose-immunsérum contenu dans un tube à hémolyse (le mélange est maintenu dans un bain thermostaté à 45°C).
- Laisser solidifier le gel pendant 45 minutes.
- Creuser dans le gel 6 puits de 3 mm de diamètre à l'aide d'emporte-pièces (voir document annexe).
- Réaliser une gamme d'étalonnage de l'échistatine de 0,5 à 2 mg/mL (diluant : tampon PBS pH = 7,2).
- Déposer les solutions de la gamme et le surnageant de culture à raison de 5 µL par puits.
- Pour éviter la déshydratation du gel, fixer une bande de papier filtre préalablement humidifiée sur le couvercle de la boîte de Pétri.
- Incuber 48 h.

Compte rendu

- Indiquer le mode opératoire de réalisation de la gamme d'étalonnage.
- Regrouper les renseignements utiles pour le compte rendu de la seconde séance sur le document annexe.

A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE

N° de puits	concentration déposée en $\mu\text{g.mL}^{-1}$	diamètre mesuré en mm
	1er JOUR	2ème JOUR
1		
2		
3		
4		
5		
6		



DEUXIEME JOUR

Durée : 1 H 30

A - MICROBIOLOGIEQuestion 1 : Contrôle de la souche de levure

- Lecture des résultats
- Compte rendu :
 - du contrôle des caractères biochimiques,
 - du contrôle du genre et de l'espèce.

Question 2 : Etude expérimentale de la croissance en Erlenmeyer

- Lecture des résultats, calculs, expression de N/mL.

B - IMMUNOLOGIE

- Mesurer le diamètre des anneaux de précipitation et reporter les valeurs sur le document annexe.
- Tracer sur papier millimétré la courbe d'étalonnage : carré du diamètre = f (concentration en échistatine).
- Valider les valeurs expérimentales de cette courbe.
- Donner les paramètres de la droite de régression et en déduire la concentration en échistatine dans le surnageant de culture.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

Deuxième partie: réalisation pratique d'opérations techniques

Durée : 10 heures;

Coefficient : 8

SUJET 3.

ANALYSES DE LABORATOIRE

LES ANTICORPS MONOCLONAUX

BIOCHIMIE (80 points)

Durée : 5 H

=====

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

Les anticorps monoclonaux peuvent être marqués par des enzymes. Parmi ceux-ci, la Peroxydase de Raifort (E.C. :1.11.1.7) souvent désignée par le sigle HRP (provenant de l'anglais : Horse Radish Peroxydase) est très utilisée. La manipulation se propose d'étudier quelques caractéristiques de l'activité de cette enzyme grâce à la réaction, particulièrement connue en immunologie, qui consiste à oxyder le substrat soluble ABTS en un chromogène coloré en vert.

L'étude comporte trois étapes :

- 1) Evaluation du coefficient d'absorbance linéique molaire de l'ABTS oxydé.
- 2) Détermination de l'activité spécifique d'une solution de HRP.
- 3) Influence de l'azide de sodium sur l'activité de l'HRP.

Les trois solutions suivantes sont à la base de la manipulation :

- Solution de substrat (**solution S**) : solution à 1 mg/mL de ABTS (2,2'-Azino-bis (3-éthyl BenzoThiazoline 6-Sulfonate) di-ammonium) dans une solution tampon (contenant acide citrique, phosphate de sodium et perborate de sodium) à pH = 5. La masse molaire de l'ABTS est égale à 514,6 g/mol.

- Solution d'enzyme HRP (**Solution E**) : solution à environ 1 mg/mL d'une poudre protéique incomplètement purifiée de HRP dans de l'eau ultrapure.

- Solution d'inhibiteur (**Solution I**) : solution à 1 mg/mL d'azide de sodium dans de l'eau ultrapure.

I - DETERMINATION DU COEFFICIENT D'ABSORBANCE LINEIQUE MOLAIRE DE L'ABTS OXYDE (20 POINTS)

1.1. Principe.

Dans une solution diluée d'ABTS, l'enzyme HRP en net excès (conditions de dosage de substrat par la méthode en point final) transforme complètement l'ABTS présent dans le milieu réactionnel en ABTS oxydé.

La relative instabilité de l'ABTS oxydé oblige à mesurer l'absorbance maximale rapidement après l'addition de l'enzyme dans le milieu réactionnel.

1.2. Réactifs.

- **Solution S'** : solution de substrat ABTS qui correspond à la solution S diluée au 1/100 dans du tampon pH = 5.
- **Solution E** : solution d'enzyme HRP non diluée.

1.3. Mode opératoire (2 essais).

Dans une cuve de spectrophotomètre, introduire 3 mL de solution S'. Opérer ensuite près du spectrophotomètre dont la longueur d'onde sera réglée à 405 nm :

- faire le 0 de référence sur la cuve contenant la solution S',
- ajouter 100µL de solution E, homogénéiser par retournement, puis remettre en place la cuve dans le spectrophotomètre,
- lire l'absorbance maximale (A) qui apparaît dans un délai compris entre 45 et 60 secondes après l'addition de l'enzyme.

1.4. Calculs et résultats.

Calculer le coefficient d'absorbance linéique molaire de l'ABTS oxydé (ϵ 405nm) dans les conditions de l'expérience, en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

II - DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE D'UNE SOLUTION DE HRP [44 POINTS]

2.1. Activité enzymatique de la solution E de HRP.

2.1.1. Principe.

En présence d'un excès de substrat dans le milieu réactionnel et dans des conditions opératoires bien définies, la vitesse de transformation du substrat traduit l'activité enzymatique de la préparation utilisée (conditions de dosage d'enzyme ou détermination d'activité enzymatique).

2.1.2. Réactifs.

- **Solution S** : solution de substrat ABTS non diluée.
- **Solution E'** : cette solution sera préparée par dilution de la solution E en eau ultrapure (cf mode opératoire).

2.1.3. Mode opératoire (1 essai).

Préparer la **solution E'** par dilution au 1/100 de la solution E en eau ultrapure.
Dans une cuve de spectrophotomètre, introduire 3 mL de solution S et préincuber 5 minutes à 30°C.
Déclencher la réaction par addition de 100 µL de solution E' ; homogénéiser ; lire ou enregistrer la variation d'absorbance à 405 nm pendant 2 minutes.

2.1.4. Calculs et résultats.

Calculer la concentration d'activité catalytique (Catc) de la solution E en $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Donnée : 1 U correspond à la quantité d'enzyme qui oxyde 1 µmole d'ABTS à pH = 5 et à 30°C.

2.2. Dosage des protéines dans la solution E de HRP.

2.2.1. Principe du dosage des protéines par la méthode au BCA.

Le dosage des protéines grâce à l'acide bicinchoninique (BCA) met en jeu un réactif unique de couleur verte composé par le mélange de deux solutions : l'une d'acide bicinchoninique et l'autre de sulfate de cuivre. En présence de protéines, les ions Cu^{2+} sont réduits en ions Cu^+ ce qui fait virer la solution au pourpre (longueur d'onde de lecture de l'absorbance : $\lambda = 562 \text{ nm}$). La réponse est linéaire pour des concentrations allant de 0,1 à 1 mg/mL.

2.2.2. Réactifs.

- **Solution E** : solution d'enzyme HRP à doser,
- **Solution SAB** : solution de sérumalbumine bovine à 2 mg/mL en eau physiologique.
- **Réactif BCA** : réactif de coloration, de couleur verte, prêt à l'emploi.

2.2.3. Mode opératoire.

Gamme d'étalonnage.

Préparer, dans 6 tubes à hémolyse, une gamme de dilutions de sérumalbumine bovine en eau physiologique contenant 0,0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 mg/mL.

Pour chaque tube de la gamme, la réaction sera réalisée en portant dans un tube à hémolyse :

- 0,1 mL de solution diluée de SAB,
- 2 mL de réactif BCA.

Incuber les tubes à 37°C pendant 30 minutes, puis laisser refroidir à la température de la salle.

Lire les absorbances des tubes à 562 nm dans un délai compris entre 5 et 10 minutes après le retrait des tubes du bain thermostaté à 37°C.

Dosage (2 essais).

Le dosage des protéines dans la solution E sera effectué à partir de prises d'essais appropriées et selon des conditions rigoureusement identiques à celles de la gamme d'étalonnage.

2.2.4. Compte rendu et résultats.

Présenter un tableau des résultats avec :

- d'une part la méthode de réalisation et la composition des tubes de la gamme de dilutions ainsi que celles des tubes essais pour le dosage,
- d'autre part les absorbances lues à 562 nm.

Tracer la courbe d'étalonnage. Puis valider les valeurs expérimentales de cette courbe et calculer la droite de régression. En donner les paramètres et en déduire la concentration massique en protéines (P) de la solution E en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.3. Activité spécifique de la solution E de HRP.

Calculer l'activité spécifique (Z_{sp}) de la solution E utilisée en $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$.

III - EFFET DE L'AZIDE DE SODIUM SUR L'ACTIVITE DE L'HRP (16 POINTS).

3.1. Présentation.

L'azide de sodium est un poison violent qui bloque en particulier le transfert des électrons par les cytochromes dans la chaîne respiratoire et qui inhibe, d'une façon plus générale, les chromoprotéines hémiques. Il s'agit d'une substance antibactérienne et, à ce titre, il est employé pour la conservation des anticorps marqués ou non au taux de 0,02 %. Cependant son utilisation est à exclure dans le cas d'anticorps marqués à l'HRP, car cet enzyme est une chromoprotéine hémique.

3.2. Réactifs.

- **Solution S** : solution de substrat ABTS non diluée.
- **Solution EI** : cette solution correspondant à un mélange de solution E et de solution I a été préparée (cf mode opératoire) ; elle sera testée après dilution.

3.3. Mode opératoire.

Action de l'inhibiteur:

Dans un tube à hémolyse, on a introduit :

- 0,8 mL de solution E,
- 0,2 mL de solution I.

Après homogénéisation et incubation à la température de la salle pendant une heure, on obtient la solution EI mise à disposition.

Détermination de l'activité enzymatique de la solution EI (1 essai).

Préparer la **solution EI'** par dilution au 1/80 de la solution EI en eau physiologique. Dans une cuve de spectrophotomètre, introduire 3 mL de solution S et préincuber 5 minutes à 30°C.

Déclencher la réaction par addition de 100 µL de solution EI' ; homogénéiser ; lire ou enregistrer la variation d'absorbance à 405 nm pendant 2 minutes.

3.4. Calculs et résultats.

Calculer la concentration d'activité catalytique (Catc) de la solution EI en U.mL⁻¹. En déduire l'activité spécifique (Zsp) de la solution E ayant subi l'action de l'inhibiteur. Calculer le % d'inhibition (I) due à l'action de l'azide de sodium.

$$I(\text{en}\%) = \frac{Z_{sp} - Z_{sp'}}{Z_{sp}} * 100$$

MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE (80 points)

Durée : 5 H

PREMIER JOUR

Durée : 4 H

Le déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

A - MICROBIOLOGIE (55 points)

Les anticorps monoclonaux sont conditionnés en flacons stériles, en présence d'un conservateur : l'azide de sodium.

I - DETERMINATION D'UNE C.M.I. (27 points).

Afin de connaître la concentration en azide de sodium à utiliser, on détermine la C.M.I. de celui-ci vis-à-vis de différentes souches tests. Ici seule la détermination de la C.M.I. vis-à-vis d'*Escherichia coli* sera envisagée.

1.1. Préparation de la suspension bactérienne.

La concentration bactérienne de la suspension est étalonnée par spectrophotométrie. En tenant compte des indications fournies en début d'épreuve : correspondance entre absorbance et concentration bactérienne, diluer la culture (E.c) afin d'obtenir une suspension contenant environ 10^5 bactéries.mL⁻¹ (diluant : bouillon nutritif). Cette concentration bactérienne est nécessaire pour une détermination correcte de C.M.I.

1.2. Vérification de la concentration bactérienne.

Afin de vérifier la concentration de la suspension bactérienne préparée précédemment, effectuer un dénombrement des bactéries sur gélose (3 dilutions appropriées).

Milieu : gélose dénombrement.

Technique : méthode d'étalement en surface (0,1 mL).

Réaliser les essais en double.

1.3. Préparation du conservateur.

A partir d'une solution d'azide de sodium à 10 g.L⁻¹ (AZ), réaliser une dilution 10^{-1} dans du bouillon nutritif.

1.4. Détermination de la C.M.I. par microméthode.

Réaliser des dilutions en série, de la solution fille d'azide de sodium, du 1/2 au 1/128 sous un volume final de 100 µL (diluant : bouillon nutritif).

Ajouter 100 µL de suspension bactérienne préparée en 1.1. dans chaque cupule.

Recouvrir la microplaque d'un film plastique.

Incuber à 37°C.

II - CONTROLE DE STERILITE D'UN RECIPIENT DE CONDITIONNEMENT DES ANTICORPS MONOCLONAUX (15 POINTS).

Pour effectuer ce contrôle le récipient a été lavé à l'eau stérile.

Filtrer ce liquide de lavage (L.L) sur membrane.

La manipulation sera effectuée en présence d'un examinateur.

Justifier sur le compte rendu la nécessité ou non d'un rinçage de l'appareil de filtration.

III - ETUDE D'UN MICRO-ORGANISME CONTAMINANT (13 POINTS).

Lors d'un contrôle microbiologique d'un lot d'anticorps monoclonaux, un contaminant (C) a été isolé sur gélose au sang.

Orienter le diagnostic.

TYPAGE D'UN SURNAGEANT D'HYBRIDOME

Pour purifier les anticorps d'un surnageant d'hybridome obtenu par fusion de cellules murines (souris) et pouvoir les commercialiser, il est nécessaire de connaître leur isotype. On se propose donc de typer les anticorps d'un surnageant d'hybridome.

1. Réactifs et matériel.

- Surnageant d'hybridome à typer noté H,
- Ac de chèvre anti Ig de souris dirigés contre les différents isotypes de la souris (6 anticorps),
- Ac de lapin anti Ig de chèvre marqué à la peroxydase = conjugué,
- Solution de substrat OPD à $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ en tampon citrate acide citrique pH 5 + H_2O_2 à 0,014 %,
- H_2SO_4 à 2 mol.L^{-1} ,
- PBS,
- PBS - Tween 20,
- Barrette 16 puits + support.

2. Mode opératoire.

On utilisera 14 cupules de chaque barrette, chaque réaction étant réalisée en double. A chaque étape d'incubation, on pourra mettre une feuille autocollante sur la plaque. Placer dans 14 cupules de la barrette A1 à G2 100 μL de surnageant d'hybridome. Incuber 1 heure à 37°C .

Vider par retournement la barrette, la sécher par tapotement sur une feuille de papier absorbant.

Laver trois fois chaque cupule avec 200 μL de PBS - Tween.

Dans les cupules A1, A2 introduire 100 μL d'immunsérum de chèvre anti IgG1 de souris.

Dans les cupules B1, B2 introduire 100 μL d'immunsérum de chèvre anti IgG2a de souris.

Dans les cupules C1, C2 introduire 100 μL d'immunsérum de chèvre anti IgG2b de souris.

Dans les cupules D1, D2 introduire 100 μL d'immunsérum de chèvre anti IgG3 de souris.

Dans les cupules E1, E2 introduire 100 μL d'immunsérum de chèvre anti IgG A de souris.

Dans les cupules F1, F2 introduire 100 μL d'immunsérum de chèvre anti Ig M de souris.

Dans les cupules G1, G2 introduire 100 μL de PBS.

Incuber 30 min à la température du laboratoire.

Vider la barrette par retournement et la laver comme à l'étape précédente.

Placer dans les 14 cupules 100 μL de conjugué et incuber 15 min à la température du laboratoire.

Vider la barrette par retournement et la laver comme à l'étape précédente.

Ajouter 100 μL de substrat - chromogène dans chaque cupule, incuber à l'obscurité jusqu'à l'apparition d'une coloration nette dans certains puits (10 à 15 min).

Arrêter la réaction avec 50 μL d'acide sulfurique à 2 mol.L^{-1} .

Observer.

3. Résultats ; conclusions.

Faire un schéma correctement annoté de la réaction réalisée.
Indiquer les résultats obtenus pour chaque cupule dans un tableau.
Justifier la réalisation des cupules G1 et G2 en donnant leur rôle.
Conclure.

UXIEME JOUR

Durée : 1 H

MICROBIOLOGIE

I - DETERMINATION DE LA C.M.I.

- Donner le résultat de la numération d'*Escherichia coli*. Conclure.
- Déterminer la C.M.I. de l'azide de sodium vis-à-vis d'*Escherichia coli*.

Rappel : La concentration bactérienne nécessaire pour une détermination correcte de C.M.I. est d'environ 10^5 bactéries.mL⁻¹.

II - CONTROLE DE STERILITE D'UN RECIPIENT DE CONDITIONNEMENT DES ANTICORPS MONOCLONAUX

- Donner le résultat. Conclure.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE.

Deuxième partie: réalisation pratique d'opérations techniques

Durée : 10 heures;

Coefficient : 8

SUJET 4.

ANALYSES DE LABORATOIRE. ALIMENTATION.

BIOCHIMIE (80 points) ; durée : 5 H

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

UREASE ET UREE

On se propose de contrôler l'activité enzymatique d'une préparation d'uréase par une mesure cinétique dans l'UV. Cette préparation est ensuite utilisée pour doser dans un échantillon de viande l'urée avec révélation de l'ammoniaque formée par une réaction colorée.

Les méthodes retenues requièrent de pipeter des volumes de 200 μ l qui seront mesurés avec une pipette automatique réglable, préalablement étalonnée par pesée d'eau distillée.

1 - ETALONNAGE D'UNE PIPETTE AUTOMATIQUE (15 points).

(d'après norme AFNOR 35-309)

1.1. Dispositions préliminaires.

Disposer, dans la chambre de pesée d'une balance, une feuille de papier filtre imbibée d'eau distillée pour permettre la saturation en vapeur d'eau. La température et la pression ambiantes sont indiquées par les examinateurs.

1.2. Réalisation.

Peser successivement dans un petit bûcher, ou une capsule à peser, les volumes d'eau délivrés par la pipette. Tous les ajouts s'effectuent dans le même récipient, sans le vider. On mesurera, en double, les masses correspondant à 5 réglages de la pipette, différents et régulièrement répartis jusqu'à la capacité maximale de la pipette.

1.3. Calcul d'exploitation.

Les masses sont déduites par différence. On peut convertir les masses pesées en volume d'eau distillée en utilisant la relation suivante :

$$v = m \times \frac{1}{\rho_{\text{eau}} - \rho_{\text{air}}} \times (1 - \rho_{\text{air}})$$

v = volume effectivement délivré

m = masse pesée (calculée)

ρ_{eau} = masse volumique (1) de l'eau à la température mesurée

ρ_{air} = masse volumique (2) de l'air à la température et la pression mesurées.

1.4. Résultats - Applications.

1.4.1. Compléter le tableau de relevés joint en annexe.

1.4.2. Construire sur papier millimétré le graphe $m = f$ (volume affiché).

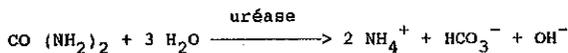
1.4.3. Déterminer graphiquement le volume à afficher sur la pipette pour obtenir un volume délivré exact de 200 μl .

Remarque importante : On pourra traiter cette partie indépendamment des autres. Mais il est demandé de manipuler avec la même pipette automatique et de tenir compte, dans les parties 2 et 3, du volume effectivement délivré pour un affichage de 200 μl .

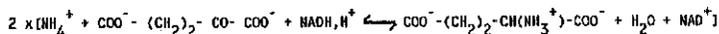
2 - CONTROLE D'UNE PREPARATION D'UREASE PAR UNE METHODE CINETIQUE UV (25 points).

2.1. Principe.

Il s'agit du système de réactions enzymatiques couplées :



Glutamate déshydrogénase



2-oxoglutarate

glutamate

dans lequel les ions ammonium formés sont impliqués dans la réaction, indicatrice, de réduction de l'oxoglutarate en glutamate. On suit donc la diminution de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps, qui mesure l'activité enzymatique.

- (1) Valeur dans le tableau annexe 1
- (2) Valeur dans le tableau annexe 2

2.2. Réalisation d'un essai (1 essai).

La réaction se développe en tampon Tris à pH 8,0, à 30°C. Dans un tube à hémolyse, ou dans une cuve spectrophotométrique, introduire :

- 2,4 ml de solution réactionnelle préalablement préincubée à 30°C
- 0,2 ml de solution de glutamate déshydrogénase
- 0,2 ml de solution T d'uréase à tester (étiquette de couleur).

Mélanger. Suivre l'absorbance à 340 nm qui doit être stable en l'absence d'interférence. Ajouter :

- 0,2 ml de solution d'urée.

Mélanger. Relever ou enregistrer les absorbances à 340 nm toutes les 30 secondes entre 3 et 6 minutes d'incubation. Déterminer le coefficient

$$\text{directeur } \frac{\Delta A}{\Delta t} .$$

2.3. Témoin.

Réaliser un témoin en l'absence d'urée dans les mêmes conditions.

Retrancher alors la variation $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ du témoin de celle de l'essai.

2.4. Résultats.

- Remplir le tableau joint en annexe ou rendre les enregistrements après les avoir annotés.
- Donner la valeur de $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ mesurant l'activité uréasique.
- Calculer la concentration d'activité catalytique en unité d'uréase par litre. Le coefficient mesurant l'incertitude relative totale de la méthode vaut 4,3 %.
- La solution d'uréase testée est une dilution au $\frac{1}{10}$ d'une solution commerciale, pour laquelle le fournisseur indique une concentration ≥ 3500 U/l. Conclure.

Données :

1 unité d'uréase libère 2 μ moles de NH_4^+ par minute dans les conditions de l'expérience.

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{NADH, H}^+ \\ 340 \end{array} \right. = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$$

3 - DOSAGE DE L'UREE DANS UNE VIANDE (40 points).

L'urée est parfois ajoutée comme complément azoté dans le fourrage du bétail. La viande commercialisée ne doit pas en contenir.

On contrôle un échantillon d'environ 100 g de basse côte pris sur une carcasse de boeuf. L'échantillon est broyé, puis minutieusement homogénéisé au mixer. Une masse, m, de 4,9263 g de l'échantillon est ensuite traitée selon le protocole indiqué en annexe 3.

On dose l'urée dans une dilution au $\frac{1}{10}$, appelée filtrat dilué, du filtrat évoqué par le protocole.

3.1. Principe.

Il s'agit d'un dosage en point final par l'uréase. Les ions ammonium formés par hydrolyse (et éventuellement présents dans l'échantillon et les réactifs) sont révélés par la réaction de Berthelot : en présence de phénol et d'hypochlorite, à pH alcalin, il se forme stoechiométriquement avec NH_4^+ un composé indolique bleu dont l'absorbance est renforcée par de petites quantités de nitroprussiate.

3.2. Composition d'un essai (réaliser 2 essais).

Introduire successivement au fond d'un tube à essai :

- solution d'uréase 200 μl
- filtrat dilué 200 μl

Mélanger. Boucher. Laisser incuber 15 minutes à 37°C.
Puis ajouter successivement et immédiatement

- réactif au phénol⁽¹⁾ 2,5 ml
- réactif à l'hypochlorite⁽¹⁾ 2,5 ml

Mélanger. Boucher. Laisser la réaction colorée se développer 15 minutes à 37°C.

Lire l'absorbance à 620 nm.

Réaliser parallèlement :

- un témoin-essai qui permette de compenser la présence éventuelle de NH_4^+ dans le filtrat dilué,
- un essai à blanc qui permette de compenser la présence éventuelle de NH_4^+ dans la solution d'uréase.

3.3. Réalisation d'une gamme de solutions d'ammonium.

A partir d'une solution-mère à 2 mmol/l de NH_4^+ , concevoir une série de 6 tubes contenant de 0 à 0,4 μmol /tube pour étalonner le spectrophotomètre. Réaliser la gamme en tubes à essai.

(1) ATTENTION : réactif corrosif - Distributeur

3.4. Exécution du dosage.

- Compléter la feuille de résultats jointe en annexe.
- Etalonner le spectrophotomètre. Tracer la courbe $A_{620} = f(\{\text{NH}_4^+\})$ ou calculer l'équation de la droite de régression linéaire. Indiquer la sensibilité de cet étalonnage.
- Lire l'absorbance des essais et des témoins contre le zéro de la gamme.

- Comment utiliser les témoins pour corriger l'essai ? Justifier.
- Calculer la concentration de l'urée dans le filtrat, par report de l'absorbance corrigée. Le coefficient mesurant l'incertitude relative totale de la méthode vaut 3,5 %.
- Calculer la teneur de la viande en urée, en gramme pour 100 grammes. Conclure.

Donnée : masse molaire de l'urée : 60 g.mol^{-1}

ANNEXE 1

Masse volumique de l'eau exempte d'air
pour différentes températures

Température °C	Masse volumique ρ_{eau} en g.cm^{-3}
20	0,998 202
21	0,997 990
22	0,997 768
23	0,997 536
24	0,997 294
25	0,997 043
26	0,996 782
27	0,996 511
28	0,996 232
29	0,995 943
30	0,995 045

ANNEXE 2

Masse volumique de l'air sec

ρ_{air} en 10^{-3} g.cm $^{-3}$

pression t°C	980 mbar	990	1000	1010	1020	1030	1040
20	1,165	1,177	1,189	1,201	1,213	1,225	1,236
21	1,161	1,173	1,185	1,197	1,208	1,220	1,232
22	1,157	1,169	1,181	1,193	1,204	1,216	1,228
23	1,153	1,165	1,177	1,189	1,200	1,212	1,224
24	1,149	1,161	1,173	1,185	1,196	1,208	1,220
25	1,145	1,157	1,169	1,181	1,192	1,204	1,216
26	1,142	1,153	1,165	1,177	1,188	1,200	1,212
27	1,138	1,150	1,161	1,173	1,184	1,196	1,208
28	1,134	1,146	1,157	1,169	1,180	1,192	1,204
29	1,130	1,142	1,153	1,165	1,176	1,188	1,200
30	1,126	1,138	1,150	1,161	1,172	1,184	1,196

ANNEXE 3

PROTOCOLE DE TRAITEMENT DE LA VIANDE

La masse, m, d'échantillon est homogénéisée pendant 2 minutes dans 20 ml de solution d'acide perchlorique (1 mol.l $^{-1}$). On neutralise l'excès d'acide en portant le pH du mélange, allongé de 40 ml d'eau, entre 7 et 7,5 avec une solution d'hydroxyde de potassium. Le mélange neutralisé est alors transféré en totalité dans une fiole de 100 ml. On complète avec de l'eau distillée pour que la partie aqueuse affleure exactement au trait de jauge (couche lipidique au-dessus du trait).

On réfrigère à 4°C pour précipiter le perchlorate de potassium et figer la partie lipidique. On filtre alors.

On élimine les premiers ml. On recueille ainsi le filtrat F.

FEUILLE DE RESULTATS A REMETTRE AVEC LA COPIE

N° PIPETTE =

N° DE POSTE =

1 - ETALONNAGE D'UNE PIPETTE AUTOMATIQUE

Volumes affichés	masses calculées	
	m_1	m_2

2 - CONTROLE D'UNE PREPARATION D'UREASE

N° APPAREIL DE MESURE =

t_r durée d'incubation	3 min	3min30s	4min	4min30s	5min	5min30s	6min
A_{340} témoin							
A_{340} essai							

3 - DOSAGE DE L'UREE DANS UNE VIANDE

essai à blanc
composition

$A_{620} =$

témoin essai
composition

$A_{620} =$

Compléter le tableau suivant décrivant la composition des solutions-étalon

Tube n°	

lecture des absorbances

Tube n°	
A_{620}	

MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE (80 points)

1ER JOUR

4 H

A la suite de cas d'intoxications alimentaires dans un restaurant de collectivités, un laboratoire de contrôle procède à des prélèvements sur le personnel et au niveau des locaux.

1 - LES PRELEVEMENTS SONT ENSEMENCES SUR UNE GELOSE COLUMBIA AU SANG

Après 24 h d'incubation à 37°C, ce milieu présente de très nombreuses colonies. Les colonies suspectes ont été repiquées sur gélose trypticase soja.

1.1. Identification de la souche S présentée sur gélose trypticase soja (étiquetée S n°...) (48 points).

- 1.1.1. Vérification de la pureté de la souche.
- 1.1.2. Identification de la souche par galerie miniaturisée.
- 1.1.3. Préparation d'un réactif spécifique de la protéine A de *Staphylococcus aureus* en vue de l'identification de la souche S.

Principe.

La protéine A présente à la surface de *Staphylococcus aureus* a la propriété de fixer le fragment Fc des immunoglobulines de lapin et d'homme. Des hématies de mouton stabilisées et correctement sensibilisées par des anticorps de lapin dirigés contre les hématies de mouton (GRM) sont agglutinées en présence de staphylocoques porteurs de la protéine A.

Matériel et réactifs.

Globules rouges de mouton lavés, dilués à 10 % en eau physiologique.
Dilution de sérum anti GRM au 1/200.
Eau physiologique.
Souche de référence *Staphylococcus* protéine A⁺ (étiquetée prot A⁺).
Souche de référence *Staphylococcus* protéine A⁻ (étiquetée prot A⁻).
Bain marie à 37°C, centrifugeuse.
Tubes, pipettes, lames de verre.

Mode opératoire de la sensibilisation des GRM.

Dans un tube à hémolyse introduire 4 ml de la dilution au 1/200 du sérum anti-GRM.
Ajouter 1 ml de GRM à 10 % dans le tube.
Incuber 15 minutes à 37°C.
Laver trois fois les GRM ainsi sensibilisés avec 2 ml d'eau physiologique (centrifugations de 5 minutes à 1500 rpm).
Remettre le culot en suspension de façon à obtenir des GRM sensibilisés à 20 %.
Préparer également 0,5 ml de GRM non sensibilisés à 20 %.

Evaluation de la qualité de la sensibilisation des GRM par la technique d'agglutination sur lame.

Tester les GRM sensibilisés en suspension à 20 % par la technique d'agglutination sur lame avec les souches bactériennes de référence, sans oublier de réaliser tous les témoins nécessaires à la validation de ces tests.

N.B. Toutes les réactions d'agglutination réalisées par le candidat seront montrées à l'examinateur.
Les réactifs "GRM sensibilisés à 20 % et non sensibilisés" seront conservés à + 4°C pour le deuxième jour d'épreuve.

Compte rendu.

- * Expliquer la préparation des suspensions de GRM à 20 %.
- * Donner la composition des témoins et justifier leur rôle.
- * Conclure sur la sensibilisation des GRM.

1.2. Détermination de la CMI de la souche S par microméthode en milieu liquide (20 points).

Matériel et réactifs.

Plaque de microtitration stérile et couvercle.
Pipette automatique et cônes de prélèvement stériles.
Tube à hémolyse contenant la solution de streptomycine à 512 mg/l noté streptomycine.
Préculture de 18 h de la souche S en bouillon Mueller Hinton notée PS.

Mode opératoire.

- Distribuer dans les 12 cupules 50 µl de bouillon Mueller Hinton.
- Introduire 50 µl de solution de streptomycine à 512 mg/l dans la première cupule puis procéder par dilutions successives dans les 10 cupules suivantes.
- Ajouter dans chaque cupule 50 µl d'inoculum contenant environ 10⁵ bactéries.

L'inoculum est préparé à partir de la préculture de 18 h de la souche S notée PS. En tenant compte de la relation fournie par le centre d'examen entre l'absorbance et la concentration bactérienne, réaliser une dilution correcte de la préculture.

Le candidat précisera dans le compte rendu :

- la technique choisie pour la préparation de l'inoculum,
- le calcul des concentrations finales en streptomycine obtenues dans les cupules.

La réalisation du témoin est laissée à l'initiative du candidat.

Les plaques inoculées sont recouvertes d'un couvercle et incubées 18 h à 37°C.

2 - UN CONTROLE DES SURFACES ET DES DIFFERENTS APPAREILS A ETE ENTREPRIS (12 points).

De nombreuses contaminations responsables "d'accidents" sont provoquées et entretenues par le matériel ou les appareils qui se comportent comme de véritables "nids microbiens".

Un contaminant, cultivé sur milieu OGA, a été incubé pendant quatre jours à 28°C (étiqueté C n°...).

Identifier ce contaminant.

2EME JOUR

1 H

1 - IDENTIFICATION DE LA SOUCHE S

- 1.1. Vérifier la pureté de la souche.
- 1.2. Procéder à la lecture de la galerie.
- 1.3. Tester la souche S avec les GRM préparés le 1er jour d'épreuve.
- 1.4. Conclure.

2 - DETERMINATION DE LA CMI

- 2.1. Lire la microplaque.
- 2.2. Déterminer la valeur de la CMI.

EPREUVE DE FRANCAIS: SYNTHESE DE DOCUMENTS.

Durée : 4 heures;

Coefficient : 3

Vous ferez une synthèse objective, concise et ordonnée des documents ci-joints sur le mythe du cow-boy.
Dans une brève conclusion, vous donnerez votre point de vue sur la question.

Document 1 : Jules LAFORGUE

Albums

"Des Fleurs de bonne volonté", 1890

Document 2 : Publicité Marlboro parue dans la presse française dans les années 1980.

Document 3 : Gary N.GRANVILLE

Les chevaliers du Far West

"Le courrier de l'Unesco", septembre 1989.

Document 4 : Philippe JACQUIN,

Le mythe de l'Ouest américain

"L'Histoire", mai 1990.

Document 5 : Entretien avec Philippe JACQUIN,

Les mythes de la réalité

"Calades Arts et Cultures", n° 147, février 1994.

DOCUMENT 1
ALBUMS

On m'a dit la vie au Far-West et les Prairies,
Et mon sang a gémi : « Que voilà ma patrie !... »
Déclassé du vieux monde, être sans foi ni loi,
Desperado ! là-bas, là-bas, je serai roi !...
Oh là-bas, m'y scalper de mon cerveau d'Europe !
Piaffer, redevenir une vierge antilope,
Sans littérature, un gars de proie, citoyen
Du hasard et sifflant l'argot californien !
Un colon vague et pur, éleveur, architecte,
Chasseur, pêcheur, joueur, au-dessus des Pandectes(1),
Entre la mer, et les États Mormons(2) ! Des venaisons
Et du whisky ! vêtu de cuir, et le gazon
Des Prairies pour lit, et des ciels des premiers âges
Riches comme des corbeilles de mariage !...
Et puis quoi ? De bivouac en bivouac, et la Loi
De Lynch(3) ; et aujourd'hui des diamants bruts aux doigts,
Et ce soir nuit de jeu, et demain la refuite
Par la Prairie et vers la folie des pépites !...
Et, devenu vieux, la ferme au soleil levant,
Une vache laitière et des petits-enfants...
Et, comme je dessine au besoin, à l'entrée
Je mettrai : « Tatoueur des bras de la contrée » !
Et voilà. Et puis, si mon grand coeur de Paris
Me revenait, chantant : « Oh ! pas encor guéri !
« Et ta postérité, pas pour longtemps coureuse !... »
Et si ton vol, Condor des Montagnes Rocheuses,
Me montrait l'Infini ennemi du confort,
Eh bien, j'inventerais un culte d'Age d'or,
Un code social, empirique et mystique
Pour des Peuples Pasteurs, modernes et védiques(4) !...
Oh ! qu'ils sont beaux les feux de paille ! qu'ils sont fous,
Les albums ! et non incassables, mes joujoux !...

Jules LAFORGUE (1860-1887) Des Fleurs de bonne volonté, 1890

- (1) *Pandectes* : recueils de lois
(2) *Mormons* : membres d'un mouvement religieux installés dans l'Utah
(3) *Loi de Lynch* : aux Etats Unis, procédure expéditive à l'égard des criminels
(4) *védiques* : en rapport avec les livres sacrés de l'Inde. Dans le contexte lire :
attachés à des traditions sacrées et immémoriales.

DOCUMENT 2

FILTER CIGARETTES

Marlboro

20 CLASS A CIGARETTES

Publicité Marlboro parue dans la presse française
dans les années 1980

LES CHEVALIERS DU FAR WEST

Aucun mythe n'est plus répandu, intégré dans la fibre culturelle contemporaine que celui du western. A l'aube du 21^e siècle, il est fascinant qu'un contexte historique plus que centenaire conserve une telle actualité, une telle vitalité. Par les comportements et les aspirations, la mode vestimentaire et même le type d'alimentation qu'il diffuse, le western est devenu une référence mondiale, l'étoffe d'un rêve omniprésent.

Le vêtement le plus populaire de la planète est le blue-jean, image de marque du cow-boy. Et le vêtement n'est-il pas le signe le plus manifeste de l'image que l'on désire projeter ? Avec la popularité du jean, les émules des cow-boys se comptent par centaines de millions. Comment expliquer cette emprise universelle ? Deux facteurs, semble-t-il, entrent surtout en jeu : la puissance archétypale du mythe et le contexte technoculturel de notre siècle.

Du chevalier au cow-boy

Le cow-boy est en fait l'héritier démocratique de la figure mythique du chevalier. Il évoque les innombrables légendes qui ont suivi de tout temps et en tout lieu la domestication du cheval, mais en les adaptant au grand public moderne.

Le chevalier est celui qui maîtrise sa nature animale. Par là, il s'élève au-dessus des autres hommes, jouit d'une puissance, d'une mobilité, d'une liberté supérieures. C'est à lui qu'incombe la haute responsabilité de rétablir la justice, de défendre le faible et l'opprimé. Mais il est vulnérable, car s'il vacille, il tombe de haut, et solitaire, car n'est pas chevalier qui veut. L'attrait du mythe chevaleresque vient de ce qu'il y a en chaque homme un double rêve de maîtrise de soi et de prolongation de la justice. Pendant longtemps ce rêve est resté inaccessible au plus grand nombre.

Avec les révolutions américaine et française, le grand principe de l'égalité des hommes va s'imposer partout, transformant les mentalités. L'idéal romanesque du western vient à point nommé se substituer à un mythe par trop élitiste. La dignité et la liberté du cavalier sont désormais à la portée de l'imaginaire de chacun, hors de toute distinction de caste ou de rang social. Un personnage du Nouveau Monde, le cow-boy, se greffe ainsi sur un mythe ancien et s'apprête à fasciner la terre entière.

Gary N.GRANVILLE, "Le courrier de l'Unesco", Sept. 1989

LE MYTHE DE L'OUEST AMERICAIN

«J'ai toujours agi seul comme un cow-boy conduisant son troupeau, un cow-boy entrant seul dans une ville sur son cheval, sans même un pistolet, parce qu'il ne vient pas pour tirer. Il agit, se trouvant au bon endroit au bon moment.» Telle est l'étrange confidence que fit Henry Kissinger à la célèbre journaliste italienne Oriana Fallaci en décembre 1972, alors que les succès diplomatiques de l'«ambassadeur» du président Nixon le plaçaient au sommet de la popularité. Qu'un brillant sujet de Harvard puisse se comparer sans ambages aux héros des westerns de série B nous laisse songeurs. Mais, pour les Américains d'aujourd'hui, cette référence incarne, mieux qu'aucune autre, les valeurs traditionnelles de leur pays.

Ainsi donc, après avoir été conquis au siècle dernier, l'Ouest, avec ses paysages, ses figures légendaires et ses valeurs propres, a fini par conquérir le continent tout entier. Alors que le développement industriel, l'urbanisation et une forte immigration transformaient l'Est en une véritable ruche, au-delà du Mississippi triomphait encore une civilisation rurale. L'implantation des industries minières n'y change rien : l'Ouest, c'est le royaume des espaces, des chevauchées, des Indiens, de la violence - une image que véhiculent journalistes et voyageurs. Il est entré dans les moeurs. On s'en réclame, on l'affiche : d'honorables sénateurs débarquent du train à Washington en bottes et *stetson*(1) de cow-boy, parfois le colt à la ceinture...

Voici plus d'un siècle que cette contrée mythique nourrit les rêves de millions d'Américains. La légende de l'Ouest est d'abord apparue dans la littérature bon marché, le roman de quat' sous, le *dime novel*. Le précurseur en la matière s'appelait Ned Buntline. Lors d'un voyage dans les Plaines, il avait rencontré un jeune éclaireur «*vaniteux comme une jolie femme*», William F. Cody (1846-1917). Buntline bavarde avec Cody devant une bouteille de whisky. A son retour, les lecteurs du *New York Weekly* découvrent «*un héros de l'Ouest*» : Buffalo Bill est né. Buntline a lancé une mode. Romans-feuilletons et magazines se remplissent d'histoires invraisemblables, celles que tous les hâbleurs de l'Ouest - et ils sont nombreux - se plaisent à brailler dans les *saloons*. A la fin du XIXe siècle, l'image héroïque de l'Ouest a envahi tous les esprits.

La figure du cow-boy émerge de ce maelström(2) au cours des années 1880. Il représente alors la génération des constructeurs d'une nation puissante et dynamique. En 1902, un ancien élève de Harvard, Owen Wister, publie *Le Virginien* : le cow-boy a trouvé son Victor Hugo. Ce roman se vend pendant trois ans à plus de trois cent mille exemplaires : on ne compte plus les rééditions. Wister offre à l'Amérique un personnage à sa mesure : grand, le teint clair, les yeux bleus, beau parleur, le courage du «*Virginien*» n'a d'égal que son sens de l'honneur. Adroitement, l'auteur a cherché à réconcilier l'Est et l'Ouest. Comme l'indique le titre, le héros n'est pas né dans l'Ouest ; il a même reçu une éducation de gentleman avant de devenir cow-boy. Il joint à l'esprit chevaleresque un individualisme farouche hérité des pionniers. De cette conjonction naît un vrai Américain dont les «*ennemis sont à la fois Wall Street et les syndicats*» (préface à l'édition de 1911).

Philippe JACQUIN, "L'Histoire", n° 133, mai 1990

- | | | |
|---------------|---|------------------------|
| (1) Stetson | : | chapeau à larges bords |
| (2) maelström | : | tourbillon |

DOCUMENT 5. LES MYTHES DE LA REALITE

Comment fabrique-t-on un cow-boy ?

Ce qui a séduit les Américains, c'est le côté sauvage. Dans les années 1870, les journalistes venaient couvrir les guerres indiennes et croisaient ces bandes de jeunes, les cow-boys - terme encore péjoratif. Ces hommes ont un mode de vie qui n'existe pas dans l'Est : le nomadisme - un homme à cheval - qui s'éteint lentement ailleurs. Les représentants de la culture industrielle sont attirés par ce mode de vie pastoral, témoin de l'équilibre de l'homme dans le milieu naturel. Les journalistes ont ainsi fait croire que le cow-boy vivait de façon très saine, en osmose avec la nature. Le travail proprement dit va être déformé puisqu'on supprime le côté paysan. Pour une partie de l'élite du Nord-Est américain, le monde rural est méprisé, peuplé de gens rustres et brutaux. Le cow-boy reste

socialement supérieur, il est à cheval. Les vaches "ne font" pas très "esthétique". La peinture, la littérature, la photo vont préférer valoriser et accentuer l'aspect dynamique, la jeunesse. En même temps elles vont développer le mythe de la vie libre.

Au départ, le côté brutal va faire plaisir aux romantiques de l'Est qui aiment cette espèce d'anarchisme. Le caractère rousseauiste attire, l'indépendance, la vie sans loi. [...]

Le cow-boy est un personnage des villes. Les journalistes, les écrivains vont enraciner le cow-boy dans une tradition américaine du roman, qui avait déjà forgé des personnages exceptionnels. Le cow-boy va être intégré aux trappeurs, aux chasseurs d'Indiens, pour en faire un héros. Certains écrivains vont même astucieusement l'intégrer à des personnages de la vie urbaine : le confidence man. Par ce biais on met en garde contre la ville, contre laquelle il faut se forger une moralité.

Le western au cinéma ne fera d'ailleurs que réutiliser ce mythe, les scénarios copiant les romans de la littérature populaire. Quand le western arrive au début du siècle, le personnage est déjà en place : il ne s'occupe plus de bétail. Il est armé - alors qu'en réalité il ne l'était pas - , il est blond aux yeux bleus, un WAPS - alors que la plupart sont métis, noirs. Le cow-boy établit le lien ainsi entre l'Amérique pastorale des premiers temps, et une Amérique industrielle.

- Ces hommes de l'Est sont-ils hostiles aux Indiens ?

Ils inventent leur Indien, comme leur cow-boy, pour pérenniser la hiérarchie sociale soutenue par l'archétype américain où tout le monde peut réussir. Il suffit de se conformer à ce mythe, de ne pas le critiquer, aujourd'hui il recouvre l'histoire américaine, mais aussi d'autres valeurs de la société occidentale. Cette image englobe une forme de vie et une forme de loisirs où la nature est un lieu de ressourcement de valeurs. Les quartiers pour ces "ouvriers agricoles" étaient minables.

- Sur place, la ségrégation par l'argent est plus forte que la ségrégation raciale, on le voit bien dans les villes du bétail.

Le quartier pour les cow-boys - red light district - est réservé pour le plaisir avec des saloons minables, des prostituées. Le sol est en terre battue, ils sont mal éclairés, l'alcool est frelaté. Les saloons plus confortables accueillent les propriétaires.[...]

La ségrégation a lieu en ville et dans les ranchs, mais peu sur la piste, comme sur les chantiers de nos villes. En revanche les cow-boys de couleur sont moins payés pour un travail identique.

- Et aujourd'hui que reste-t-il du cow-boy américain ?

Dans l'Ouest américain on continue à faire de l'élevage, rationalisé, semi-extensif. Les troupeaux sont surveillés à cheval et en hélicoptère. On a creusé de vastes puits dont on pompe l'eau par éolienne dans les nappes phréatiques.

Le rodéo est devenu un spectacle machiste, sensé démontrer la virilité, la force, le courage des hommes. Il n'a plus beaucoup de liens avec le métier d'éleveur.

- Et ce mythe est-il toujours porteur ailleurs que dans l'Ouest ?

Bien sûr, comme chez nous Jeanne d'Arc, Du Guesclin, Napoléon. Le succès du film "Impitoyable" le montre bien. Il casse un peu le mythe en présentant des héros négatifs, mais casser le mythe le renforce. C'est un signifiant historique, le fait que l'Amérique de 1992 fasse de son meilleur film un western avec des cow-boys, un Indien. Clint Eastwood porte parfaitement l'image du cow-boy dont on parlait : yeux bleus, grand gaillard... c'est le Gary Cooper ou le John Wayne de la fin du XXe siècle.

Bugs make a meal of rubbish

Andy Coghlan

BACTERIA that feast on rubbish are providing local authorities with an environmentally benign way to dispose of household waste. Engineers meeting in Birmingham last week reported the first large-scale trials of a new design of anaerobic digester for treating dustbin waste. The waste is broken down by bacteria in the digester to form methane, carbon dioxide and solid residue.

Britain produces 30 million tonnes of domestic rubbish each year and 90 per cent of it is dumped in landfill sites. But landfill space is tight and the government announced plans in November to impose a landfill tax next year.

The bacteria in the digesters break down the organic portion of household waste, which makes up between 35 and 50 per cent by weight. The bacteria are anaerobic (they feed on waste without using air) and this encourages them to generate methane. The gas can be burnt to provide electricity to run the plant.

"Our process takes mixed household waste, separates out the organic fraction, produces methane and reduces the solids fraction of waste that is sent for landfilling by 50 per cent," says Alistair Pettigrew of Motherwell Bridge Envirotec, one of the three organisations involved. "It produces electricity and a stable, compost-like material for conditioning soil," he says.

There are already some 30 anaerobic digesters tackling household rubbish around the world. But Pettigrew and his colleagues say that their scheme is much simpler, and potentially cheaper, than any existing system. Interest in the development is

intense, with 400 applications from local authorities and waste disposal companies for the 250 places at last week's meeting.

The demonstration digester is at Irvine, south of Glasgow, and has handled 600 kilograms of organic waste per day since it began operating last May. Motherwell Bridge Envirotec's partners are Environmental Energy, a consultancy based at Presteigne in Powys and a team from the University of Newcastle upon Tyne.

Anaerobic digesters for household waste are based on established designs for digesters that deal with sewage sludge and farm slurry. Because these wastes are mostly liquids, the mechanics of the systems that handle rubbish have had to be modified so that they can deal with a higher solids content. Once the organic material has been separated, the British system transfers it to the anaerobic bioreactor down an auger - a device similar to an Archimedes' screw. A second auger removes the processed waste from the other side of the digester.

25-02-95 NEW SCIENTIST

- | | |
|-------------------|--|
| (1) to dispose of | : to get rid of (L. 3) |
| (2) landfill site | : centre d'enfouissement des déchets (L. 11) |
| (3) by weight | : du poids total (L. 16) |
| (4) to tackle | : to treat (L. 30) |
| (5) sewage sludge | : vidanges d'égouts (L. 46) |
| (6) farm slurry | : purin (L. 46) |
| (7) auger | : vrille (L. 52) |

COMPREHENSION

- 1) Rendez compte en français des informations essentielles contenues dans cet article. (8 points)
- 2) Traduisez les deux premiers paragraphes. (6 points)

EXPRESSION

Show in a few sentences that bacteria can be both harmful and helpful (80 - 100 words) (6 points)

La qualité de la rédaction, la clarté et la précision des raisonnements entreront pour une part importante dans l'appréciation des copies. L'usage des calculatrices réglementaires et du formulaire officiel est autorisé.

EXERCICE 1 (8 points)

Une usine produit en très grande quantité des ampoules d'une solution injectable.

La probabilité qu'une ampoule, prise au hasard dans la production de l'usine, ne suive pas le cahier des charges et soit donc considérée comme défectueuse est 0,001.

1) On prélève au hasard 100 ampoules dans la production d'une journée. Le prélèvement s'effectue avec remise. On appelle X la variable aléatoire prenant pour valeur le nombre d'ampoules défectueuses de ce prélèvement.

Quelle est la loi de probabilité de la variable aléatoire X ?

Préciser ses paramètres, son espérance mathématique, sa variance et son écart type.

2) On admet que l'on peut approcher la loi de probabilité de X par une loi de Poisson.

a) Quel est le paramètre de cette loi de Poisson ?

b) Calculer les probabilités des événements suivants :

A : "il n'y a aucune ampoule défectueuse dans le prélèvement".

B : "il y a au plus deux ampoules défectueuses dans le prélèvement".

3) On a mesuré le volume de liquide dans chaque ampoule de ce prélèvement, et on a obtenu les résultats suivants :

volume en cm^3	[4,94; 4,96[[4,96; 4,98[[4,98; 5,00[[5,00; 5,02[[5,02; 5,04[[5,04; 5,06[[5,06; 5,08[
effectif	11	22	30	18	10	8	1

Dans ce qui suit, les résultats seront donnés sous forme décimale arrondie au centième le plus proche.

a) Calculer une approximation de la moyenne \bar{x} et de l'écart type σ_x de cette série statistique.

b) Soit Y une variable aléatoire suivant une loi normale centrée réduite. Calculer le réel $t_{0,01}$ tel que $P(-t_{0,01} \leq Y \leq t_{0,01}) = 0,99$.

On suppose que le volume de liquide d'une ampoule prélevée au hasard suit une loi normale $N(\mu, \sigma)$, de moyenne μ et d'écart type σ . Construire un intervalle de confiance pour μ , au risque de 1%.

EXERCICE 2 (12 points)

On se propose d'effectuer l'étude cinétique de l'hydrolyse de l'iodure de tertio-butyle, l'unité de temps étant la minute.

lère PARTIE :

Le processus est globalement représenté par l'équation :

Iodure de tertiobutyle + eau \rightarrow hydroxyde de tertiobutyle + iodure d'hydrogène

La concentration molaire initiale de l'iodure de tertiobutyle est 0,104 mole par litre.
Celle de l'eau est 5,5 moles par litre.

La constante cinétique de la réaction est 0,06 par minute.

Soit c la fonction numérique définie par :

$$c : [0 ; +\infty[\rightarrow \mathbb{R} \\ t \mapsto c(t)$$

où $c(t)$ désigne la concentration molaire en hydroxyde de tertiobutyle obtenu dans la réaction à l'instant t .

On émet l'hypothèse que la vitesse de formation $\frac{dc}{dt}$ de l'hydroxyde en fonction du temps est donnée par l'équation différentielle d'inconnue c :

$$\frac{dc}{dt} = 0,06 \times 5,5(0,104 - c)$$

$$\text{soit } \frac{dc}{dt} = 0,33(0,104 - c) \quad \text{ou encore} \quad \frac{dc}{dt} + 0,33c = 0,03432.$$

- 1) Donner la solution générale de cette équation différentielle sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$.
- 2) Préciser la solution particulière vérifiant la condition initiale $c(0) = 0$.
- 3) Soit x la fonction numérique définie par :

$$x : [0 ; +\infty[\rightarrow \mathbb{R} \\ t \mapsto x(t) = \frac{c(t)}{0,104}$$

où $x(t)$, degré d'avancement de la réaction à l'instant t , est le quotient de la concentration molaire d'hydroxyde à l'instant t par la concentration molaire initiale de l'iodure.

Vérifier que $x(t) = 1 - e^{-0,33t}$.

4) a) Etudier $\lim_{t \rightarrow +\infty} x(t)$.

b) Déterminer le sens de variation de la fonction x sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$.

c) Dresser son tableau de variation.

5) Le plan (P) est rapporté à un repère orthogonal d'unités graphiques :

2cm pour une unité en abscisse

10 cm pour une unité en ordonnée.

Soit (C) la courbe représentative de la fonction x dans le plan (P).

Préciser l'asymptote (Δ) à la courbe (C) ; tracer la courbe (C) et la droite (Δ) dans le plan (P).

6) Déterminer, par le calcul, le temps à partir duquel on peut prévoir que le degré d'avancement de la réaction sera supérieur ou égal à 0,98.

Dans cette partie, tous les résultats seront donnés sous forme décimale arrondie au millième le plus proche.

On a réalisé une série de mesures expérimentales qui ont permis d'écrire le tableau ci-dessous :

t_i en min	0	2	4	6	8	10
x_i	0,000	0,500	0,712	0,875	0,923	0,942
$z_i = \ln(1 - x_i)$						

1) Reproduire et compléter ce tableau.

2) Calculer le coefficient de corrélation linéaire de la série ($t_i ; z_i$).

Un ajustement linéaire est-il justifié pour la série considérée ?

3) Déterminer par la méthode des moindres carrés une équation de la droite d'ajustement de z en t .

4) En déduire une expression approchée de x en fonction de t .

5) En utilisant le résultat ci-dessus, estimer le degré d'avancement de la réaction au bout de 12 minutes.

EPREUVE DE SCIENCES PHYSIQUES.

Durée : 2 heures;

Coefficient : 2,5

II) POLARIMETRIE (10 points/50)

1. Faire le schéma simplifié et annoté du polarimètre à pénombre ou polarimètre de Laurent.

2. Donner la loi de Biot :

a) pour une solution comportant un seul soluté ;

b) pour une solution comportant plusieurs solutés.

Expliciter tous les termes employés.

3. Un corps A est optiquement actif. Le pouvoir spécifique rotatoire de son énantiomère dextrogyre a pour valeur :

$$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = +0,293 \text{ } ^\circ \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}.$$

Celui de l'isomère lévogyre : $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = -0,163 \text{ } ^\circ \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}.$

Une solution à $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ du corps A, placée dans un tube de longueur 20 cm, est introduite dans un polarimètre à pénombre. Elle provoque une rotation du plan de polarisation d'une lumière polarisée rectilignement d'un angle $\alpha_{\text{exp.}} = 1,6^\circ$.

a) Si la solution du corps A utilisée contenait uniquement l'énantiomère dextrogyre, quelle serait la valeur α_d de l'angle de rotation ?

b) Interpréter la différence observée entre les deux valeurs de l'angle de rotation, $\alpha_{\text{exp.}}$ et α_d .

- c) Calculer les concentrations de l'énantiomère dextrogyre et de l'énantiomère lévogyre dans la solution précédente.

II) MICROSCOPE (15 points/50)

Un microscope optique est constitué d'un objectif sur lequel est noté x30 et d'un oculaire portant l'indication x10.

Un observateur ayant une vue normale (vision nette de 25 cm à l'infini) place l'oeil au foyer principal image de l'oculaire et observe un objet AB.

1. Faire un schéma du microscope dans le cas d'une observation à l'infini. Qualifier les deux images représentées.
2. Qu'appelle-t-on latitude de mise au point ?
Donner, sans calcul, son ordre de grandeur.
3. Donner la signification des indications notées sur l'objectif et l'oculaire.
4. Définir la puissance intrinsèque d'un microscope, et en donner l'expression littérale en fonction du grossissement commercial.
Calculer la puissance intrinsèque du microscope étudié dans cet exercice.
5. Calculer l'angle sous lequel on verrait une hématie au travers de ce microscope, l'observation étant faite à l'infini. Le diamètre de l'hématie est de 7 micromètres.
6. La puissance de ce microscope est-elle suffisante pour que l'hématie soit visible. Le pouvoir séparateur de l'oeil vaut $3 \cdot 10^{-4}$ radian.

III) CHIMIE GENERALE (12 points/50)

1. Le brome a pour numéro atomique $Z = 45$.
 - a) Donner sa structure électronique.
 - b) Donner la structure électronique de l'ion Br^- .
2. Calculer la solubilité du bromure d'argent dans :
 - a) l'eau pure ;
 - b) une solution aqueuse de bromure de sodium à $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

Donnée : pour AgBr $k_s = 2 \times 10^{-13}$ à 25°C .
3. Dans la photographie à l'argent, la phase dite de développement consiste à réduire les cristaux de bromure d'argent insolés sans agir sur les autres.
Un révélateur couramment utilisé est l'hydroquinone, notée QH_2 .

a) Le potentiel standard d'oxydo-réduction du couple Ag^+/Ag vaut $E_1^0 = 0,80 \text{ V}$ à 25°C .

Quel est le potentiel de ce couple en présence d'ions bromures à la concentration de $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$?

b) L'hydroquinone, symbolisée par QH_2 , a pour forme oxydante associée la quinone, symbolisée par Q.

- Ecrire la demi-équation relative au couple rédox Q/QH_2 .

- Le potentiel standard d'oxydo-réduction de ce couple vaut $E_2^0 = 0,70 \text{ V}$ à 25°C .

En négligeant les propriétés acides de QH_2 , donner la relation entre le potentiel rédox du couple et le pH pour des concentrations en QH_2 et Q toutes deux égales à $1,00 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$.

- En déduire, le potentiel du couple Q/QH_2 à $\text{pH} = 11$?

c) Dans les conditions évoquées aux 3a) et 3b), y-a-t-il réaction entre le bromure d'argent et l'hydroquinone ? Justifier la réponse.

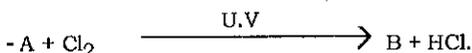
IV) CHIMIE ORGANIQUE (13 points/50)

SYNTHESE DE LA BENZÉDRINE

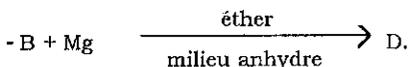
La benzédrine ou 1-phénylpropan-2-amine est une amphétamine. On peut réaliser sa synthèse de la façon suivante :



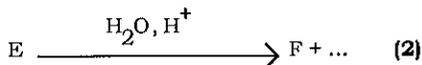
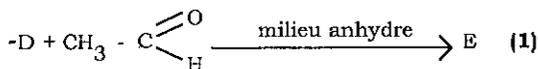
Ecrire l'équation-bilan de la réaction.



Ecrire l'équation-bilan de la réaction. Donner le nom du type de réaction.



Ecrire l'équation-bilan de la réaction.

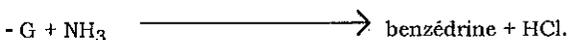


Ecrire les équations-bilans des réactions (1) et (2). Donner le nom de F.



Ecrire l'équation-bilan de la réaction.

Expliquer pourquoi on fait réagir PCl_5 de préférence à HCl .



La molécule de benzédrine a un carbone asymétrique. Représenter, en justifiant, les formes R et S de cette molécule en utilisant la représentation de Cram (ou perspective cavalière).

REMARQUES PRELIMINAIRES.

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

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

IMPORTANCE DES GLUCIDES ET DES GLYCOCONJUGUES DANS LE MONDE VIVANT.

Longtemps considérés comme n'ayant qu'un rôle énergétique et structural, les glucides libres ou associés dans des glycoconjugués possèdent en fait une importance biologique plus large.

On se propose d'évoquer certains aspects de la synthèse de ces molécules et quelques-unes de leurs activités.

I - GLUCIDES ET GLYCOCONJUGUES : LE METABOLISME (40 points)

Le glucose est à la fois un composé énergétique et un élément structural et fonctionnel. Il est mis en réserve sous forme de glycogène au niveau du foie chez l'homme et peut être synthétisé à partir de molécules diverses. Le glucose et ses dérivés sont retrouvés également dans des hétéroprotéines appelées glycoprotéines.

1.1. Le métabolisme glucidique**1.1.1. Le glycogène hépatique**

Le métabolisme hépatique du glycogène est contrôlé au niveau de deux enzymes principales :

- la glycogène-synthétase (principale enzyme de la glycogénogénèse),
- la glycogène-phosphorylase (principale enzyme de la glycogénolyse).

1.1.1.1. Ecrire les réactions catalysées par ces deux enzymes (formules chimiques non exigées).

1.1.1.2. On admet classiquement que l'adrénaline et le glucagon, en se combinant à leurs récepteurs spécifiques respectifs (récepteurs β_2 -adrénergiques d'une part et récepteurs GR-2 d'autre part), assurent une régulation de la glycogénolyse et de la glycogénogénèse en augmentant la concentration intracellulaire en AMP cyclique.

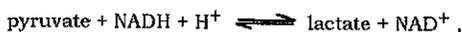
Décrire les effets de l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMP cyclique sur les deux enzymes hépatiques citées.

1.1.2. La néoglucogénèse dans l'hépatocyte

1.1.2.1. Définir le terme "néoglucogénèse".

1.1.2.2. La néoglucogénèse s'effectue essentiellement dans le foie. Elle peut avoir comme point de départ l'acide lactique (document n°1).

a) En considérant de gauche à droite la réaction catalysée par la LDH :



calculer sa variation d'enthalpie libre standard biochimique ΔG° , à 25°C et à pH 7.

Données :

$$F = 96500 \text{ J.V}^{-1}.\text{mol}^{-1}$$

Les potentiels standards biochimiques des couples redox, à 25°C et à pH 7, sont les suivants :

NAD ⁺ /NADH :	E'o = -0,320 V
pyruvate/lactate :	E'o = -0,190 V

b) Ecrire sous forme chimique (avec formules des substrats et produits) la séquence de réactions (A) de la néoglucogénèse allant de l'acide pyruvique au phosphoénolpyruvate.
Préciser enzymes et coenzymes. Les réactions nécessitées par le transfert intracellulaire ne seront pas évoquées.

c) Calculer le nombre de moles d'ATP nécessaires pour la synthèse d'une mole de glucose à partir de 2 moles d'acide lactique (équivalence ATP-GTP).

1.2. Les glycoprotéines

Une glycoprotéine est schématisée dans le document n°2.

1.2.1. La liaison des chaînes glucidiques avec la partie protéique dans une glycoprotéine se fait selon 2 modes principaux :

- **mode 1** : liaison N-glycosidique entre le carbone n°1 d'une N-acétylglucosamine sous forme β et la chaîne latérale d'une asparagine.

- **mode 2** : liaison O-glycosidique entre, par exemple, le carbone n°1 d'une N-acétylgalactosamine, par exemple sous forme α , et la chaîne latérale d'acides aminés hydroxylés comme la sérine.

Représenter ces 2 types de liaisons (structure des molécules exigées).

1.2.2. La glycophorine A de la membrane des hématies est une glycoprotéine. Elle est représentée dans le document n°3. Commenter la composition qualitative en acides aminés rapportée dans ce document.

1.2.3. L'UDP-N-acétylglucosamine représente, chez l'homme et les animaux, la forme active d'incorporation de la N-acétylglucosamine dans les glycoprotéines. L'UDP-N-acétylglucosamine dérive, in vivo, de la glucosamine, transformée successivement en glucosamine-6-P, N-acétylglucosamine-6-P et, enfin, en N-acétylglucosamine-1-P.

La glucosamine-6-phosphate peut provenir :

- soit de la phosphorylation de glucosamine exogène,
- soit du glycérol par un processus proche de la néoglucogénèse.

Le schéma de ce dernier processus est rapporté dans le document n°4.

1.2.3.1. Ecrire, sous forme chimique (avec formules des substrats et produits), les réactions 3, 4 et 5.
Donner le nom des enzymes correspondantes.

1.2.3.2. Un mélange de glucosamine marquée par ³H et de glycérol marqué par ¹⁴C est injecté à un rat non traité par la puromycine et à un rat prétraité par ce composé. L'UDP-N-acétylglucosamine est isolée ensuite du foie, dosée et les radioactivités en [³H] et [¹⁴C] sont déterminées. Les résultats sont les suivants :

	micromoles d'UDP-N- acétylglucosamine	^3H cpm/ μmol^*	^{14}C cpm/ μmol^*
rat témoin non traité par la puromycine	2,40	820	1100
rat prétraité par la puromycine	2,50	830	405

cpm/ μmol^* = coups par minute et par micromole d'UDP-N-acétylglucosamine

Que peut-on déduire de cette expérience ?

- 1.2.3.3.** La puromycine est un antibiotique qui bloque également la biosynthèse des protéines, par exemple chez les Procaryotes. On explique cet effet par l'analogie entre la puromycine et l'extrémité 3' des aminoacyl_tRNA.

Un schéma donnant la structure secondaire classique d'un aminoacyl_tRNA est donné dans le document n°5.

A quoi correspondent les légendes (A à H) ?

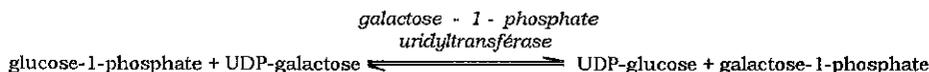
II - NUCLEOSIDES-DIPHOSPHOSUCRES ET GLYCOLIPIDES (40 points)

Les formes activées des sucres dans la synthèse de molécules complexes (glycolipides...) sont des formes dérivées de l'union des oses avec l'uridine-diphosphate (UDP) et le guanosine-diphosphate (GDP).

Ces dérivés, appelés globalement "nucléosides-diphosphosucres" ou NDP-oses, sont souvent interconvertibles. Ces interconversions sont soit des épimérisations soit des réactions de transfert de groupements nucléotidiques.

- 2.1.** Etude cinétique d'une réaction de transfert de groupement nucléotidique

La réaction choisie est la suivante :



On considère cette réaction de la gauche vers la droite ; les substrats sont le glucose-1-phosphate (G-1-P) et l'UDP-galactose (UDP-Gal). L'enzyme choisie provient d'une levure.

Le mécanisme de cette cinétique est un mécanisme ping-pong. L'équation des vitesses initiales est :

$$v_i = \frac{V_M}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}}$$

A et B sont les deux substrats

- 2.1.1.** Schématiser l'évolution de la réaction par la notation de Cleland (on appellera A et B les 2 substrats, P et Q les 2 produits).

2.1.2. A partir du document n°6 donnant $1/v_i$ en fonction de $1/[G-1-P]$ pour différentes concentrations en UDP-Gal, déduire, par une représentation graphique secondaire (ou par l'équation de la droite de régression correspondante), la constante de Michaelis vis-à-vis de l'UDP-galactose et la vitesse maximum.

2.1.3. On a étudié l'effet du galactose-1-phosphate sur la vitesse initiale de la réaction entre les deux substrats G-1-P et UDP-Gal (concentration variable en G-1-P, $[UDP-Gal] = 90 \mu\text{mol/L}$).

Que conclure du document n° 7 ?

Montrer en quoi ce résultat est en accord avec le mécanisme invoqué.

2.2. Glycolipides : constituants pariétaux des Procaryotes

La paroi des bactéries Gram négatives possède une membrane externe contenant des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides(LPS).

La structure chimique d'un LPS d'une entérobactérie (S.Typhimurium) est donnée dans le document n°8.

2.2.1. Indiquer la partie de la molécule de LPS qui est ancrée dans la bicouche phospholipidique de la membrane externe. Justifier la réponse.

2.2.2. Les molécules de LPS confèrent des propriétés particulières aux bactéries Gram négatives. Indiquer les et préciser le rôle joué par chacune des parties de la molécule.

2.2.3. Les chaînes latérales O des LPS sont très diverses et peuvent subir des variations liées à des modifications génétiques.

2.2.3.1. L'incorporation des sucres dans le LPS a été étudiée chez Salmonella Typhimurium à l'aide de divers mutants ayant un déficit de synthèse des LPS. Ces mutants sont cultivés en présence du seul glucose. Les oses sont incorporés sous forme activée (nucléosides-diphosphosucres).

a) Définir les termes "mutation" et mutant".

Citer un agent chimique mutagène et présenter succinctement son mode d'action.

b) A l'aide du document n°9, indiquer, pour chaque mutant 1, 2 et 3, le ou les sucres qui ne peuvent pas être incorporés dans le polyside du LPS.

c) La composition du polyside du mutant 2 est donnée dans le tableau du document n°10. Justifier l'absence de certains oses chez le mutant n°2 par rapport à la souche sauvage.

A l'aide des divers documents concernant Salmonella Typhimurium, reconstituer la composition du polyside du mutant 1.

2.2.3.2. Chez les bactéries, des modifications structurales peuvent être déterminées par des virus bactériens.

a) Donner l'ensemble des caractères qui permet de définir un virus.

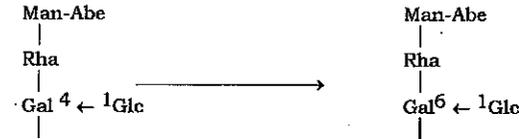
b) Expliquer, à l'aide de schémas, les relations phage tempéré-bactérie.

III - GLYCOCONJUGUES : MOLECULES DE RECONNAISSANCE (40 points)

- 3.1. Les glycoconjugués sont souvent des molécules antigéniques reconnues par le système immunitaire.

Ce type de composés comprend des molécules aussi diverses que les antigènes O des bactéries Gram- ou les allo-antigènes du groupe érythrocytaire ABO humain.

- 3.1.1. Quels sont les constituants d'un déterminant antigénique sur ces molécules ? Préciser ce qui, au niveau structural, conditionne la spécificité.
- 3.1.2. La présence d'un phage tempéré entraîne le changement suivant dans la chaîne latérale O de S.Typhimurium :



Quelle nouvelle propriété la souche bactérienne peut-elle ainsi acquérir ?

Cette modification résulte d'une conversion lysogénique.

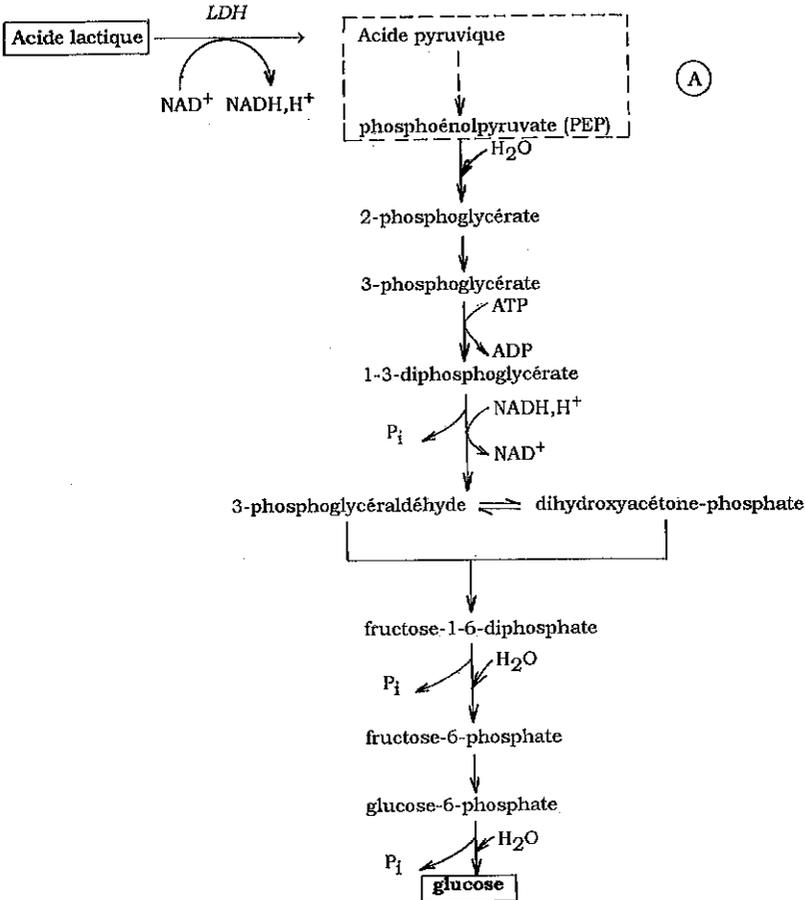
Comment la présence du phage peut-elle induire ce changement ?

- 3.1.3. Chez les bactéries Gram-, le passage de la forme S("Smooth") à la forme R("Rough") fait perdre la spécificité des antigènes O.
- 3.1.3.1. Expliquer, à l'aide du document n°8, cette perte de spécificité.
- 3.1.3.2. Comment se manifestent les différences entre les souches S et R ?
- 3.2. Les polysides antigéniques appartiennent parfois aux antigènes "T-indépendants" et provoquent une réponse humorale généralement restreinte aux immunoglobulines M (IgM).
- 3.2.1. Que signifie l'expression "antigènes T-indépendants" ?
- 3.2.2. A partir d'un schéma simple mettant en évidence les différents gènes codant pour une chaîne lourde d'immunoglobuline dans un lymphocyte mature, expliquer pourquoi les anticorps produits lors d'une immunisation primaire sont des IgM.
- 3.3. Les antigènes osidiques jouent un rôle important dans l'immunité anti-bactérienne car l'activation du système immunitaire qu'ils provoquent entraîne la mise en jeu des constituants du complément.
Montrer, sans détailler les mécanismes, comment l'activation du complément peut favoriser l'immunité anti-bactérienne.
- 3.4. Des composés glycosylés peuvent aussi se comporter comme adjuvant et renforcer les réponses immunitaires vis-à-vis de nombreuses molécules.
- On connaît par exemple, depuis longtemps, le rôle immunostimulant de l'adjuvant complet de Freund (ACF) à partir duquel on a isolé une petite molécule, le N-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP), responsable, en grande partie, des effets stimulants de l'ACF.
- 3.4.1. Citer les mécanismes d'action essentiels généralement proposés pour expliquer les effets immunostimulants des adjuvants.

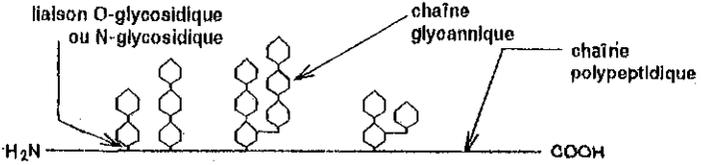
- 3.4.2. Indiquer la composition de l'adjuvant complet de Freund et préciser les avantages de son remplacement par le MDP ou ses dérivés.
- 3.4.3. Les adjuvants sont particulièrement importants pour la mise au point de nouveaux vaccins anti-bactériens dans lesquels on envisage d'utiliser des polysaccharides extraits de bactéries.
- 3.4.3.1. Citer les différents types de vaccins anti-bactériens classiques et donner un exemple pour chacun d'eux.
Dégager les avantages des nouveaux vaccins anti-bactériens envisagés.
- 3.4.3.2. Les polysaccharides utilisés sont parfois peu ou pas immunogènes. Quel moyen classique peut-on employer, en dehors de l'utilisation des adjuvants, pour obtenir une réponse immunitaire importante ?

DOCUMENT N° 1

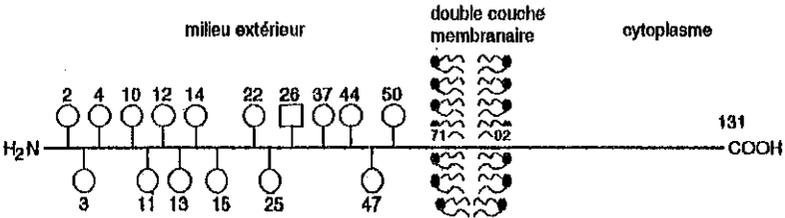
La néoglucogénèse à partir de l'acide lactique chez l'homme



DOCUMENT N° 2
Structure schématisée d'une glycoprotéine



DOCUMENT N° 3
La glycophorine A

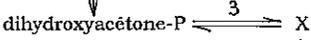
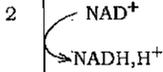
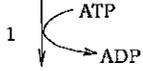


zone 71-82: grande fréquence de Leu, Val, Ile, Phe.
 zone 83-131: grande fréquence de Glu, Asp, Arg, Lys.
 Les nombres précisent la position des acides aminés.

○ : unité glycanique liée O-glycosidiquement
 □ : unité glycanique liée N-glycosidiquement

DOCUMENT N° 4
Transformation du glycérol en
glucosamine-6-phosphate

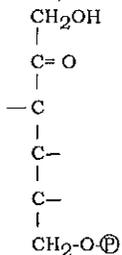
GLYCEROL



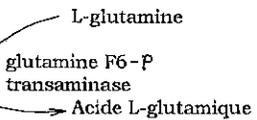
4

Y

5

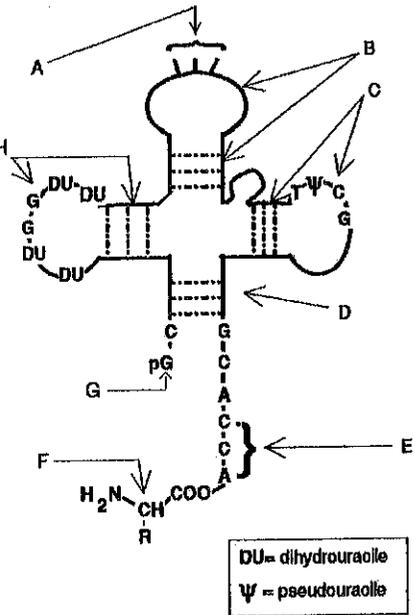


6



glucosamine-6-P

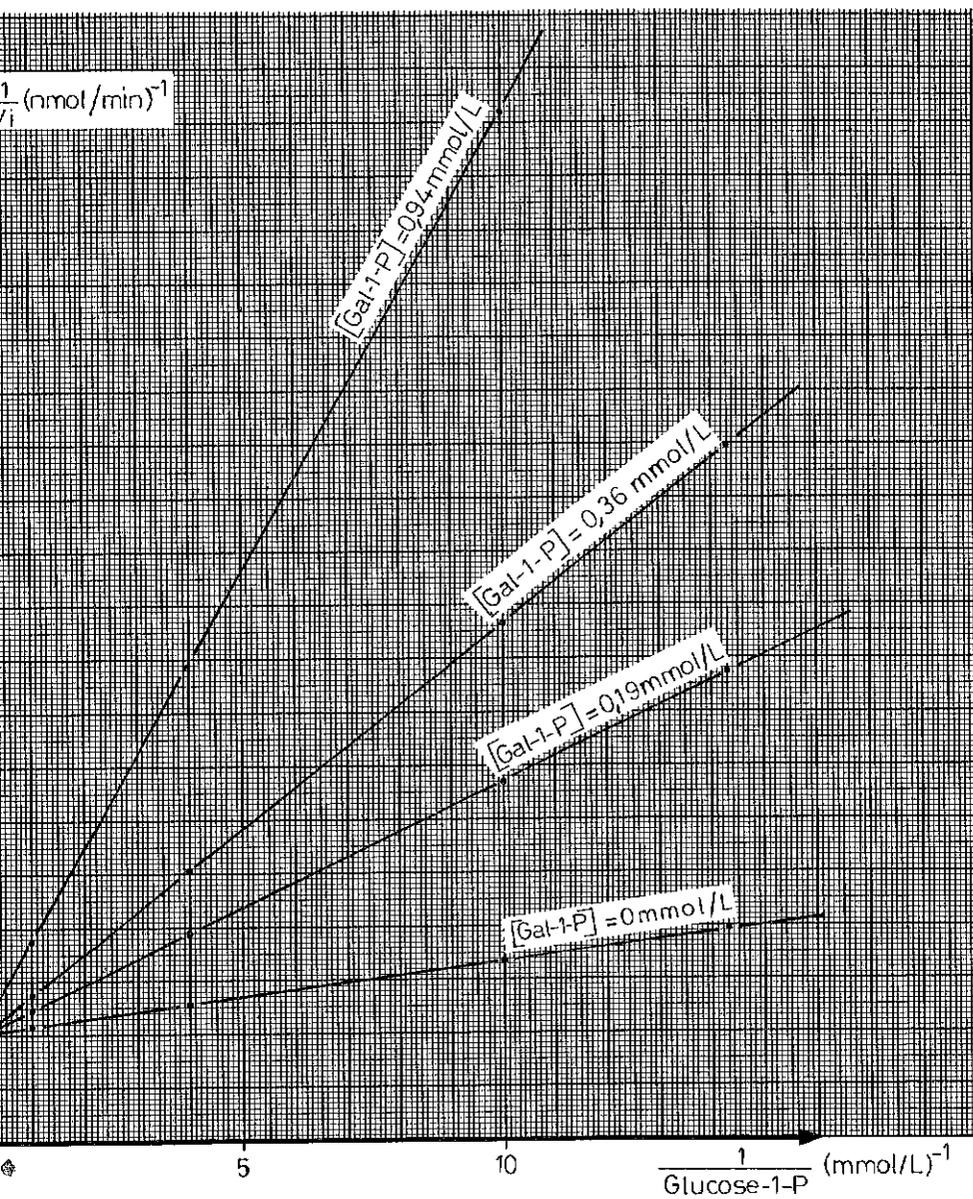
DOCUMENT N° 5
Structure d'un
aminoacyl_tRNA



DOCUMENT N°7

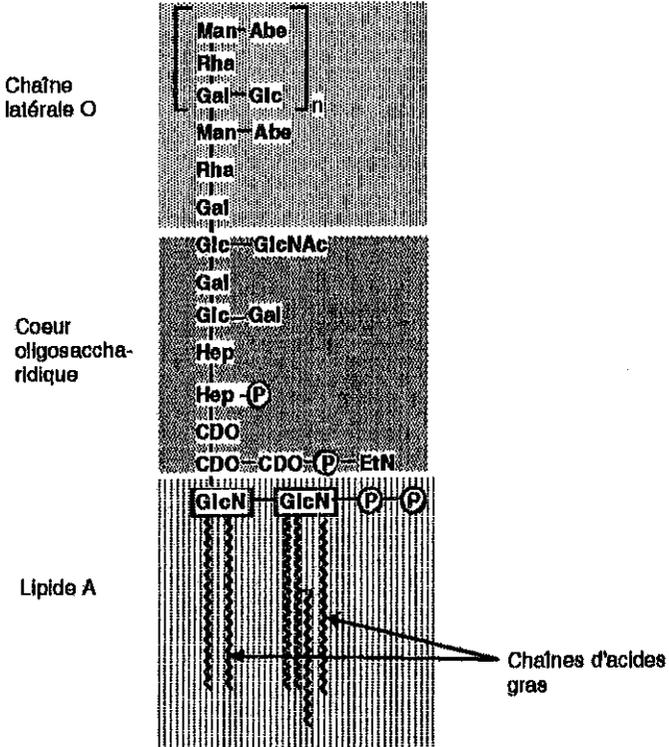
Effet du galactose-1-phosphate sur la vitesse initiale entre les deux substrats G-1-P (Glucose-1-P) et UDP-Gal

Concentration en 2ème substrat : [UDP - Gal] = 90 $\mu\text{mol/L}$



DOCUMENT N°8

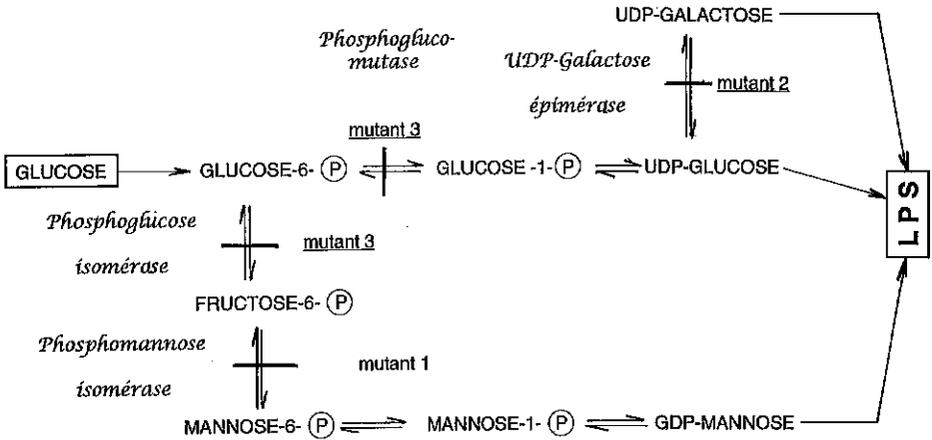
Le LPS de *S.Typhimurium*



Abe= abéquose Etn = éthanolamine Gal = galactose Glc = glucose
 GlcN = glucosamine GlcNAc = N-acétylglucosamine Hep = heptose
 CDO = 2-oëto-3-désoxyoctonate Man = mannose Rha = L-rhamnose

DOCUMENT N°9

Etapas de la biosynthèse du polysaccharide de la paroi de *S.Typhimurium* à partir du glucose (schéma simplifié)



DOCUMENT N°10

Tableau donnant la composition du polyside de la souche sauvage de *S.Typhimurium* (groupe B) et de mutants

sucre souche	CDO	Heptose	Glucose	Galactose	*Glc-NAc	Mannose	Rhamnose	Abéquose
sauvage "S"	+	+	+	+	+	+	+	+
mutant 2	+	+	+	○	○	○	○	○

* Glc-NAc = N-acétylglucosamine

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Première partie: étude d'opérations techniques

Durée : 4 heures;

Coefficient : 4

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

LES EXTRAITS PLACENTAIRES EN COSMÉTOLOGIE

Les agents d'activité utilisés en cosmétologie sont des produits de synthèse ou d'origine biologique.

L'objet de cette étude concerne les extraits placentaires.

Initialement utilisés comme substances thérapeutiques actives sur la cicatrisation, ils ont peu à peu trouvé un regain d'intérêt en cosmétologie, grâce à leurs activités stimulantes et assouplissantes.

I - OBTENTION ET COMPOSITION GÉNÉRALE DES EXTRAITS PLACENTAIRES
(6 POINTS).

On prépare ces extraits à partir des placentas humains ou animaux. Le schéma d'obtention est donné sur le document 1.

Toutes les manipulations sont effectuées en atmosphère stérile, réfrigérée et en l'absence de toute opération de chauffage.

- 1.1. Préciser le rôle des différentes techniques de biochimie préparative notées "a" sur le document 1.
- 1.2. A partir notamment du document 2, justifier le fait que les manipulations soient effectuées en atmosphère stérile et réfrigérée.
- 1.3. Afin d'établir la composition générale des extraits placentaires, différents dosages doivent être réalisés.
Les polypeptides peuvent être dosés par la technique du biuret en flux continu (document 3).
L'échantillon segmenté par de l'air est dilué par un courant de réactif au biuret.
La coloration obtenue est mesurée à 550 nm dans une cuve tubulaire à flux continu de 15 mm.

Compléter le document 3 en remplissant les cases vides prévues à cet effet. Rendre ce document avec la copie.

II - RECHERCHE DE L'ORIGINE HUMAINE OU ANIMALE D'EXTRAITS PLACENTAIRES :
TEST D'IDENTITÉ PAR IMMUNODIFFUSION (10 POINTS).

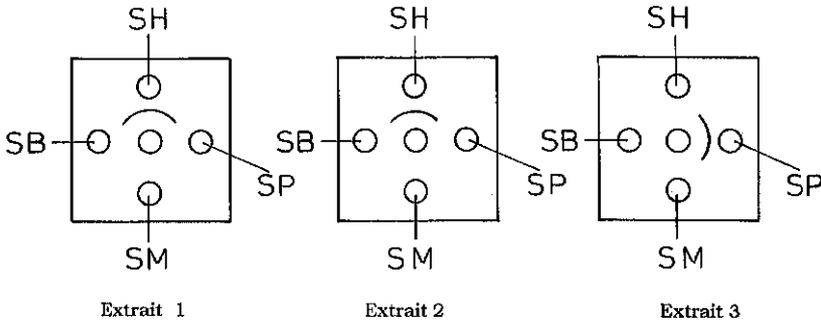
Les réactifs utilisés sont les suivants :

- gel d'agarose à 1 % coulé sur une lame glacée,
- antisérums :
 - * humain (SH)
 - * bovin (SB)
 - * ovine (SM)
 - * porcine (SP),
- extraits à tester.

- 2.1. Quelles doivent-être les qualités du gel utilisé ?

2.2. Qu'est-ce qu'un glaçage ? Quel est son intérêt ?

2.3. Les résultats donnés par 3 extraits sont schématisés ci-dessous :
- dans le puits central : extrait à tester,
- dans les puits périphériques : antisérums.



Quelles sont les caractéristiques de la réaction Ag-Ac mise en jeu ?
Interpréter les résultats obtenus.

III - EVALUATION DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS PLACENTAIRES (14 POINTS).

Avant d'incorporer ces extraits dans les produits cosmétiques, il est nécessaire d'évaluer leur activité biologique : mesure de l'augmentation de la consommation en oxygène par activation de la respiration cellulaire, évaluation du contenu enzymatique (enzymes du cycle de Krebs, phosphatases alcalines...).

Le dosage des phosphatases alcalines (PAL) s'effectue par une méthode cinétique optimisée selon les recommandations suivantes :

- méthode cinétique à 405 nm et à 30°C,
- solution réactionnelle : tampon diéthanolamine 1 mol.L⁻¹ pH 9,80 ; chlorure de magnésium 0,5 mmol.L⁻¹,
- 4-nitrophénylphosphate 10 mmol.L⁻¹, les concentrations données étant les concentrations dans le milieu réactionnel,
- rapport de dilution de l'échantillon à doser : 1/61 (un volume d'échantillon dans 61 volumes de milieu réactionnel).

Données :

- à 405 nm et en milieu alcalin, le 4-nitrophénylphosphate n'absorbe pas,
- le coefficient d'absorption molaire du 4-nitrophénol est égal à 1850 m².mol⁻¹.

- 3.1. Donner l'équation de la réaction catalysée par les PAL dans cette technique et proposer les modalités du suivi cinétique à adopter.
- 3.2. Quelles sont les conditions physico-chimiques à respecter pour doser valablement les PAL ?
- 3.3. Qu'appelle-t-on méthode cinétique optimisée ?
- 3.4. Proposer un mode opératoire pour le dosage des PAL en respect des recommandations précisées ci-dessus. On supposera que l'extrait à doser ne doit pas subir de dilution préalable.
- 3.5. La concentration catalytique des extraits placentaires exprimée en UI.L⁻¹ s'obtient à partir d'une relation du type K. ΔA.min⁻¹. Calculer K.

IV - VALIDATION D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DES RESIDUS HORMONAUX (20 POINTS).

Les dosages hormonaux sont nécessaires pour que l'extrait soit conforme aux exigences de la législation qui prévoit une absence totale d'oestrogènes. L'oestriol (catabolite de l'oestrone et de l'oestradiol) peut être toléré à l'état de traces, compte tenu de sa très faible activité.

La technique classique de dosage des oestrogènes totaux est la méthode colorimétrique de Kober. Elle aurait avantage à être remplacée par une chromatographie en phase liquide à haute performance, plus rapide et plus sélective.

Afin de valider une technique chromatographique, on procède à des essais sur des produits pharmaceutiques dont on connaît la teneur en hormones stéroïdes.

4.1. Principe de la séparation.

La séparation des stéroïdes préalablement estérifiés s'effectue à température ambiante sur une colonne de silice greffée avec des groupements en C18. La phase mobile constituée par un mélange méthanol-eau (50 : 40) passe à travers la colonne avec un débit de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Une pompe à pression constante est notamment reliée au dispositif d'injection qui permet de déposer un volume de $10 \mu\text{L}$ sur la colonne. Le détecteur U.V. placé en sortie de colonne est réglé à 280 nm .

- Sur quel principe se base la séparation effectuée ?
- Quel est le paramètre physico-chimique essentiel régissant l'ordre d'apparition des composés en sortie de colonne ?

4.2. Exploitation des résultats.

Avant de procéder à la séparation proprement dite, il faut déterminer le taux de réponse (TRE) obtenu pour chaque oestrogène en fin de chromatographie. On prépare une solution standard de référence contenant une quantité précise et connue de chaque catégorie d'hormones et de 2, 3, 6 triméthylphénol - standard interne - (voir document 4)

Ce mélange est injecté sur la colonne ; la hauteur des pics est relevée sur le chromatogramme (voir document 5).

On calcule le TRE de chaque constituant selon la relation suivante :

$$\text{TRE} = \frac{\text{He (std)} \times \text{Csi}}{\text{Hsi (std)} \times \text{Ce}}$$

- He (std) : hauteurs des pics relatifs aux oestrogènes de la solution standard,
- Hsi (std) : hauteur du pic relatif au standard interne,
- Ce : concentrations en oestrogènes dans la solution standard en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,
- Csi : concentration en standard interne dans la solution standard en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

La préparation pharmaceutique de validation est broyée finement et préparée en final de la même façon que la solution standard : $112,55 \text{ mg}$ de cette poudre sont solubilisés dans 10 mL de solution stock de standard interne. La hauteur des pics est relevée sur le chromatogramme (voir document 6). La teneur de chacun des oestrogènes contenus dans 1 g de préparation pharmaceutique est calculée de la façon suivante :

$$\text{Qe (éch)} = \frac{\text{He (éch)} \times \text{Csi} \times \text{F}}{\text{Hsi (éch)} \times \text{TRE} \times \text{m (éch)}}$$

- Qe (éch) : teneur en oestrogènes dans l'échantillon ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),
- He (éch) : hauteur des pics relatifs aux oestrogènes de l'échantillon,
- Csi : concentration du standard interne ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),
- Hsi (éch) : hauteur du pic relatif au standard interne,
- TRE : taux de réponse pour chaque oestrogène,
- m(éch) : masse de l'échantillon (g) = $0,11255 \text{ g}$,
- F : facteur de dilution inhérent à la préparation multiplié par le facteur de conversion oestrogènes libres - oestrogènes estérifiés ($F = 10 \times 1,38$).

- 4.2.1. Quel est l'intérêt d'utiliser un standard interne ?
- 4.2.2. Déterminer la concentration massique de chacun des œstrogènes de la solution standard en $g.L^{-1}$ (document 4). En déduire les TRE correspondants (document 5).
- 4.2.3. Calculer la teneur en chacun des œstrogènes contenus dans la préparation pharmaceutique de validation en $mg.g^{-1}$ (document 6).

4.3. Validation de la technique.

La composition exacte de la préparation pharmaceutique de validation est donnée sur le tableau suivant en mg d'œstrogènes par tablette (poids d'une tablette : 11,17 mg) :

œstrogènes	Equilénine	Equiline	Oestrone	Oestradiol	Total
Quantité (mg/tablette)	0,011	0,050	0,324	0,009	0,408

- 4.3.1. Calculer l'inexactitude relative des résultats obtenus pour chaque œstrogène et pour les œstrogènes totaux. Conclure sur la validité de la technique testée.

Donnée : pourcentage d'inexactitude relatif =

$$\frac{\text{valeur théorique} - \text{valeur expérimentale}}{\text{valeur théorique}} \cdot 100$$

- 4.3.2. Quels sont les autres paramètres qualité à vérifier avant d'utiliser cette technique en routine sur les extraits placentaires ?

V - CONTROLE DE L'INOCUITE BACTERIOLOGIQUE D'UN PRODUIT COSMETIQUE (30 POINTS).

L'arrêté du 3 juillet 1972 (paru au J.O. du 8 août 1972) décrit, dans ses annexes I, II, III, IV, les méthodes officielles de contrôle microbiologique des cosmétiques :

- I : préparation des échantillons, de la solution mère et des dilutions décimales.
- II : dénombrement des germes aérobies mésophiles dans les produits cosmétiques dépourvus d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque.
- III : recherche qualitative d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque des produits cosmétiques,
- IV : dénombrement des levures et des moisissures.

A côté de ces analyses officielles, les fabricants de produits cosmétiques pratiquent le dénombrement des *Staphylococcus aureus* et des *Pseudomonas aeruginosa* pour les cosmétiques à usage externe et, en présence de levures, ils effectuent la recherche de *Candida albicans*.

La préparation de la suspension mère est réalisée de la manière suivante :

- 10 grammes de produit, prélevés aseptiquement, sont homogénéisés dans 90 mL de diluant aseptique.

5.1. Recherche qualitative d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque.

La technique de recherche du pouvoir inhibiteur intrinsèque est comparable à celle de l'antibiogramme par la méthode des disques.

Elle nécessite :

- de la gélose nutritive,
- des disques de papier filtre stériles,
- 3 souches de référence (Staphylococcus aureus A.T.T.C. 9.144, Klebsiella pneumoniae A.T.T.C. 10.031, Saccharomyces cerevisiae A.T.T.C. 2.601) cultivées en bouillon nutritif à 30°C.

La recherche est effectuée sur la suspension mère vis-à-vis des 3 souches de référence. L'inoculation des milieux est réalisée avec 0,1 mL des souches. La lecture est possible après 3 jours d'incubation à 30°C.

Rédiger le protocole de la recherche du pouvoir inhibiteur intrinsèque d'un produit cosmétique en précisant :

- les étapes opératoires,
- le matériel nécessaire,
- la préparation des souches de référence,
- la lecture.

5.2. Dénombrement des levures et des moisissures.

A partir de la suspension mère et de sa dilution au dixième, on ensemence en double 0,1 mL à la surface d'un milieu O.G.A.

On incube les milieux à 20°C en aérobiose pendant 5 jours.

5.2.1. Justifier la composition du milieu O.G.A. donnée sur le document 7.

5.2.2. Lors d'une analyse, de nombreuses colonies de moisissures et de levures sont dénombrées.

La présence de Candida albicans est confirmée en réalisant, à partir des colonies suspectes, deux tests :

- le test de blastèse (ou test de filamentation),
- la culture sur milieu P.C.B. (Pomme de terre, Carotte, Bile).

5.2.2.1. Décrire le test de blastèse ; donner le résultat obtenu lors de cette analyse.

5.2.2.2. L'observation microscopique de la culture sur milieu P.C.B. peut présenter 3 aspects différents, représentés sur le document 8. Nommer les éléments désignés par A, B et C ; préciser à quel schéma correspond l'espèce Candida albicans.

5.2.2.3. L'aspect microscopique des colonies de moisissures est schématisé sur le document 9. Nommer les structures désignées par A, B, C, D et identifier le genre microbien auxquelles elles appartiennent.

5.3. Dénombrement et confirmation de la présence de Staphylococcus aureus.

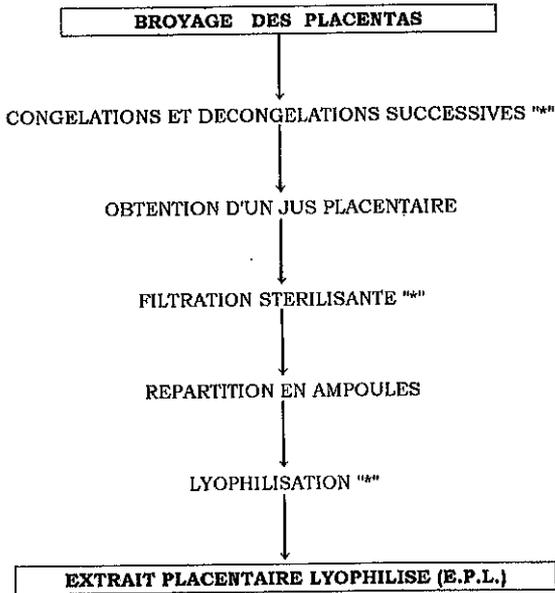
Le dénombrement est réalisé sur milieu de Baird-Parker. 5 colonies suspectes ont été testées à l'aide du coffret PASTOREX STAPH (voir fiche technique sur le document 10).

5.3.1. Expliquer le principe de ce test.

5.3.2. Dans le cadre d'une identification bactérienne d'un coque Gram positif / catalase positive / aérobic-anaérobic facultatif, comment doit-on conclure l'analyse face à un test d'agglutination négatif ?

DOCUMENT 1

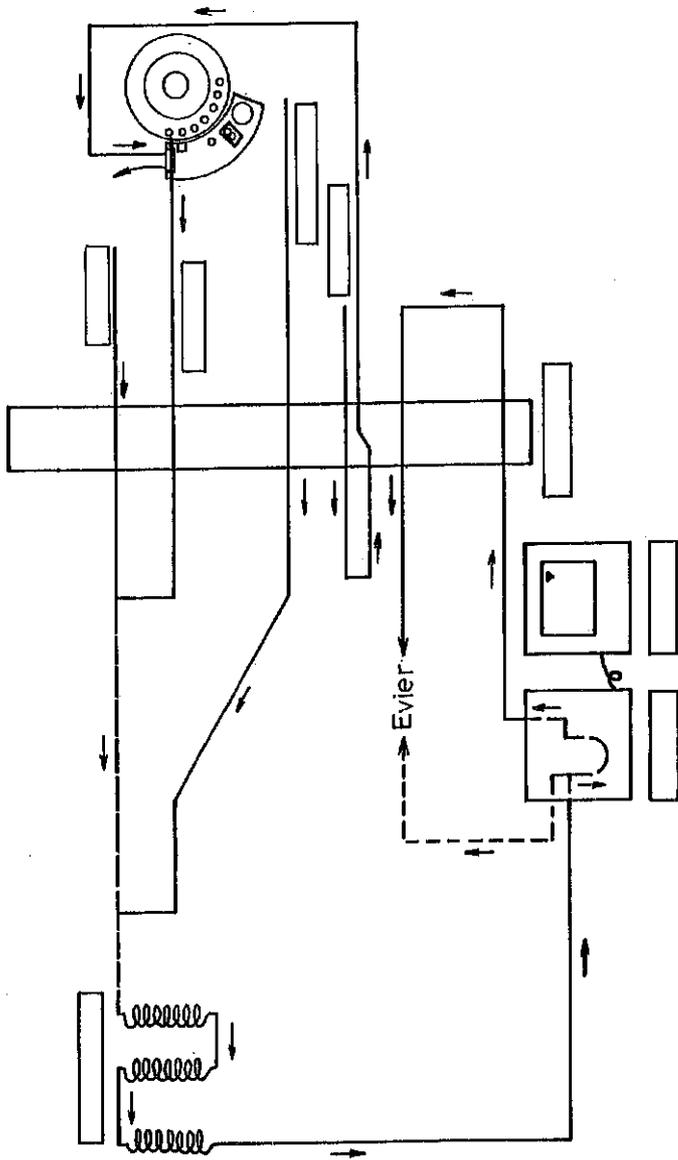
Préparation des extraits placentaires lyophilisés



DOCUMENT 2

Composition générale des E.P.L.

- Sels minéraux : les ions les plus fréquemment rencontrés sont Na^+ , K^+ , Cl^- , ions phosphates.
- Substances azotées : acides aminés, polypeptides et protéines.
- Résidus d'acides nucléiques.
- Enzymes : enzymes du cycle de Krebs, phosphatase alcaline...



Durée : 4 H

Coefficient : 4

SESSION 1996

Repère : FBP5

Page : 8/14

DOCUMENT 3 (A RENDRE AVEC LA COPIE)

DOSAGE DES POLYPEPTIDES EN FLUX CONTINU

DOCUMENT 4

Préparation de la solution standard de référence

Standard Solution Preparations - Internal Standard - Weigh accurately 20 mg of 2,3,6-trimethylphenol into a 100 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol (internal standard stock solution).

Estrone Reference Standard - Weigh accurately 32 mg of reference standard into a 25 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol.

Equilin Reference Standard - Weigh accurately 12,5 mg of reference standard into a 100 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol.

Equilenin Reference Standard - Weigh accurately 12 mg of reference standard into a 25 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol. Subdilute by pipetting 2 mL into a 25 mL volumetric flask and bring to volume with methanol.

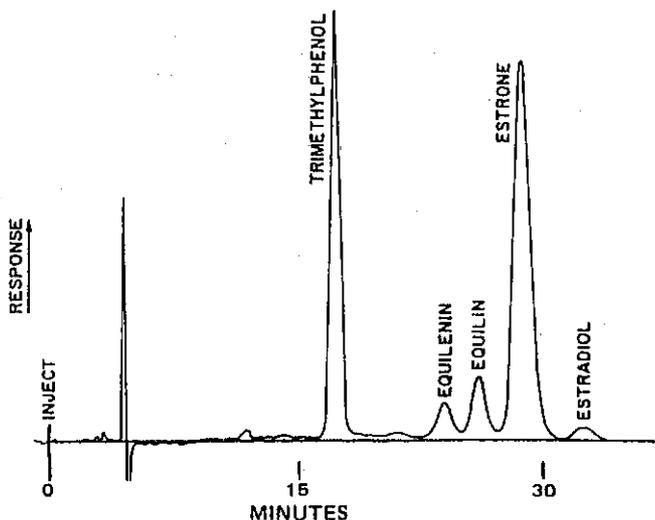
Estradiol Reference Standard - Weigh accurately 10 mg of reference standard into a 25 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol. Subdilute by pipetting 3 mL into a 25 mL volumetric flask and bring to volume with methanol.

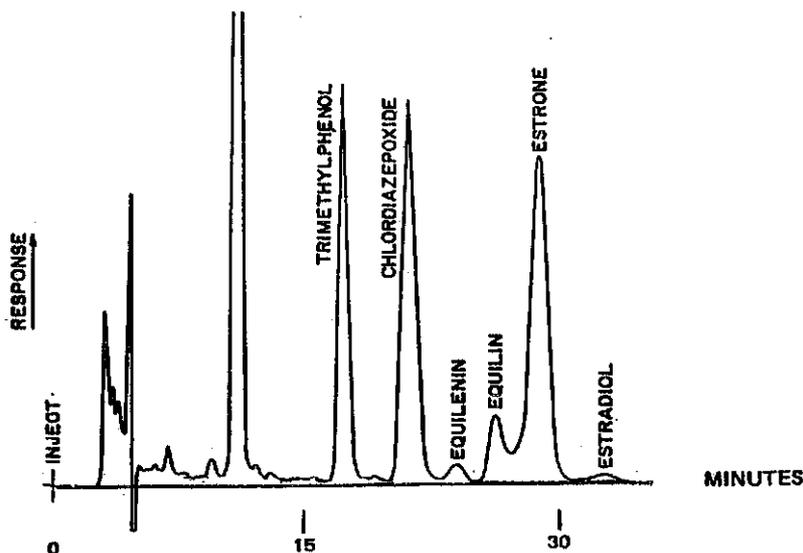
Combined Reference Standard Solution - Into a 50 mL glass-stoppered erlenmeyer flask, pipet the following amounts of the previously prepared individual reference standards : 2 mL of estrone solution, 3 mL of equilin solution, 2 mL of subdiluted equilenin solution, and 3 mL of subdiluted estradiol solution.

Evaporate the methanolic mixture of estrogens to dryness under a nitrogen stream. To the dried residue, add 10 mL of the internal standard stock solution. Stopper the flask and mix thoroughly for complete dissolution (working standard solution).

DOCUMENT 5

Chromatogramme obtenu pour la solution standard de référence





DOCUMENT 7

Milieux de culture Mycologie

O.G.A.

(gélose glucosée à l'oxytétracycline)

La gélose glucosée à l'oxytétracycline (O.G.A.) est utilisée pour recherche et le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires.

Formule
(en grammes par litre d'eau distillée)

- Extrait de levure
 - Glucose
 - Agar
- pH final : 7,0 ± 0,2

Préparation
(déshydraté)

Mettre 41 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. Attendre 5 minutes, puis mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Ajuster, si nécessaire, le pH à 7. Répartir à raison de 100 ml par flacon de 150 ml. Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 20 minutes.

Utilisation

Faire fondre le milieu de base au bain-marie bouillant. Refroidir 50 °C environ. Ajouter à 100 ml de milieu, 10 ml d'une solution stér. d'oxytétracycline (Terramycine) à 1 mg/ml. Mélanger soigneusement et couler en boîtes de Petri stériles. Apr solidification, étaler 0,1 ml de l'échantillon (ou des dilutions) analyser. Incuber à 20-25 °C pendant 3 à 5 jours.

Présentations

- Milieu prêt à l'emploi
 - flacon de 200 ml Code : 56 50
- Milieu déshydraté
 - boîte de 450 g Code : 64 89
- Oxytétracycline 1 mg/ml
 - 5 tubes de 10 ml Code : 56 19

Conservation

Milieu prêt à l'emploi : + 2-8 °C.
Milieu déshydraté : boîte soigneusement fermée dans un endroit frais et sec.
Oxytétracycline : + 4 °C.
La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

DOCUMENT 8

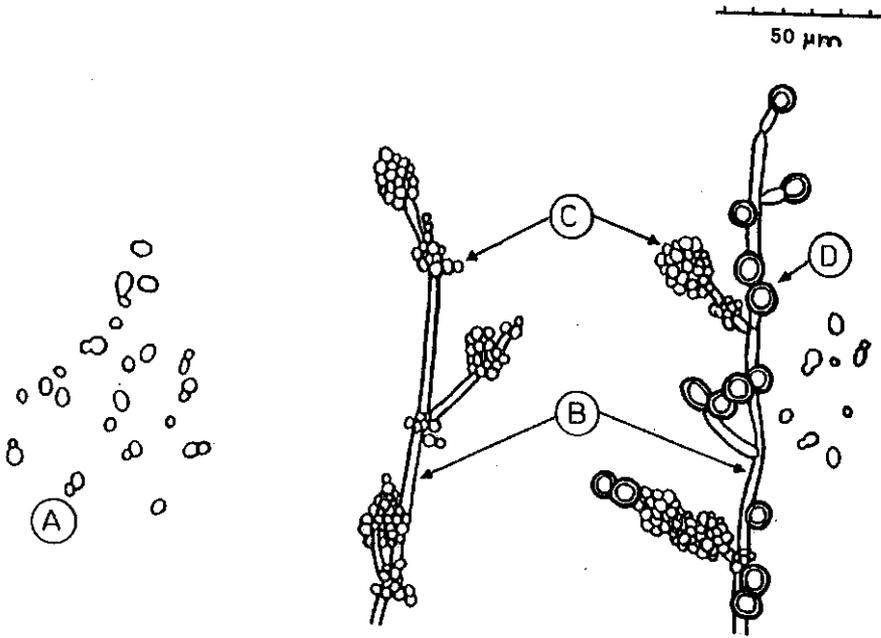
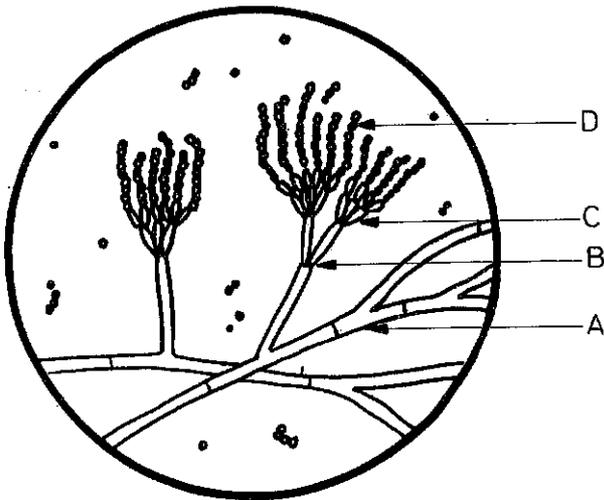


Schéma n° 1

Schéma n° 2

Schéma n° 3

DOCUMENT 9



PASTOREX® STAPH
(méthode d'agglutination sur lame)

PASTOREX® STAPH est un test d'identification de *Staphylococcus aureus* effectué directement à partir de primocultures.

Il permet de détecter simultanément, par agglutination sur lame de particules de latex sensibilisées avec du plasma humain :

- le "Clumping factor", substance fixée à la surface de la bactérie et présentant une forte affinité pour le fibrinogène,
- la Protéine A élaborée par 85 à 95 % des souches humaines de *S. aureus*.

Méthodologie

A partir d'une primoculture réalisée sur gélose Columbia ou sur gélose Trypto-Caséine-Soja*, effectuer sur les colonies présumées de staphylocoques les tests classiques (1) : étude de la morphologie des colonies, recherche de la catalase.

Utilisation de PASTOREX® STAPH

- bien homogénéiser le réactif latex;
- déposer 1 goutte de ce réactif dans l'un des cercles de la plaque pour agglutination;
- prélever 1 colonie de staphylocoques et l'émulsionner dans la goutte de latex;
- homogénéiser par rotation douce de la plaque.

Lecture

Le test est considéré comme positif si une agglutination apparaît dans les 45 secondes. En règle générale cette positivité se manifeste en moins de 20 secondes.

Évaluation

Résultats d'une étude effectuée avec PASTOREX® STAPH sur 228 souches de staphylocoques isolées sur milieu Trypto-Caséine-Soja. (2).

Espèces	Nombre de souches	PASTOREX® STAPH	
		Positif	Négatif
<i>S. aureus</i>	121	118	3
<i>S. epidermidis</i>	91	3	88
<i>S. saprophyticus</i>	9	2	7
<i>S. capitis</i>	2	0	2
<i>S. hominis</i>	2	1	1
<i>S. haemolyticus</i>	3	2	1
Sensibilité		97,5 %	
Spécificité		92,5 %	

Présentation

Coffret pour 50 tests contenant :

- 1 flacon compte-gouttes de réactif (prêt à l'emploi)
- 1 plaque pour agglutination

Code : 58 355

Conservation

à + 2-8 °C.

La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

* Éviter le milieu de Chapman, dont la concentration en NaCl est défavorable au test.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie: réalisation pratique d'opérations techniques

Durée : 10 heures;

Coefficient : 8

SUJET 1.

**QUELQUES ASPECTS TECHNOLOGIQUES DE LA MISE AU POINT D'UN
COSMÉTIQUE**

BIOCHIMIE (70 points)

Durée : 3 H 45

Contrôle de solutions nécessaires à la préparation d'une crème hydratante colorée.

La préparation de la crème hydratante colorée nécessite le contrôle qualitatif ou quantitatif des composants utilisés.

La manipulation comporte 3 parties indépendantes :

- 1 - La vérification de l'absence de tartrazine (colorant jaune E 102 numérotation CEE) allergène, dans le mélange de colorants utilisé.
- 2 - Le dosage d'une solution P, mélange de protéines, nécessaire à la préparation.
- 3 - Le dosage d'une solution d'acide lactique L, agent émulsifiant de la crème.

**1 - VÉRIFICATION DE L'ABSENCE DE TARTRAZINE DANS LE COLORANT,
PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (12 POINTS).**

1.1. Matériels et réactifs.

- 1 plaque de gel de silice, à réactiver à 100°C pendant 10 min
- 1 cuve à chromatographie
- solvant pour chromatographie
- solution témoin de tartrazine (E 102)
- mélange de colorants à analyser.

1.2. Chromatographie sur couche mince.

- Introduire le solvant dans la cuve ; la saturer.
- Déposer en double la solution témoin et le mélange de colorants à analyser.
Pour chaque solution, faire 2 dépôts successifs, en séchant entre chaque dépôt.
- Réaliser la migration.
- Sortir la plaque et sécher au thermo-ventilateur.

1.3. Résultats.

Joindre à la copie le chromatogramme obtenu. Conclure sur la recherche de tartrazine.

2 - DOSAGE DE LA SOLUTION P DE PROTÉINES PAR LA MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE DE FOLIN-LOWRY (2 essais) - (35 POINTS).

Préparer par pesée 50 mL d'une solution étalon de sérum-albumine bovine à 2 g.L^{-1} .

Réaliser selon le protocole fourni en annexe A, la gamme étalon suivante : 40, 60, 80, 100 μg par tube.

Effectuer le dosage sur 1 mL de solution P à diluer au 1/50.

Résultats.

- 2.1. Rassembler dans un tableau les Indications relatives à la préparation de la gamme étalon.
- 2.2. Compléter le relevé de valeurs expérimentales.
- 2.3. Tracer la courbe d'étalonnage ; indiquer les valeurs expérimentales retenues pour le "calcul de la droite de régression" ; en effectuer le traitement et donner les paramètres de la droite de régression ; en déduire la concentration protéique des essais.

3 - DOSAGE ENZYMATIQUE EN U.V DE LA SOLUTION L (2 essais) - (23 POINTS).

La concentration massique de la solution L est contrôlée par la méthode enzymatique donnée en annexe B. La solution L contient environ 15 g d'acide lactique par litre.

La quantité d'acide lactique dans la cuve doit être comprise entre 4 et 20 μg pour une mesure à 340 nm.

- 3.1. Expliciter la préparation de la solution d'essai.
- 3.2. Compléter le relevé de valeurs expérimentales.
- 3.3. Calculer la concentration massique d'acide lactique dans la solution L.

ANNEXE A

DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE FOLIN-LOWRY

Introduire dans un tube à essais :

- * x mL de solution protéique
- * (1- x) mL d'eau physiologique
- * 5 mL de solution cupro - alcaline

Attendre 5 min

Ajouter 0,5 mL de réactif de Folin dilué au $\frac{1}{2}$

Attendre 30 min

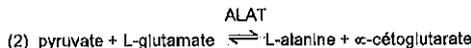
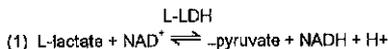
Lire les absorbances à 650 nm

PRINCIPE

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

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

En présence du L-glutamate, le pyruvate est transformé en L-alanine grâce à l'alanine amino-transférase (ALAT) (2).



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

REACTIFS - STABILITE DES SOLUTIONS

Solution 1 : acide glutamique ; tampon pH 10

Solution 2 : NAD⁺

Suspension 3 : ALAT

Solution 4 : L-LDH

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

La solution 2 se conserve au moins 3 semaines à +4°C ou 2 mois à -20°C.

Ramener la solution 1 à 20-25°C avant utilisation.

MODE OPERATOIRE

Longueur d'onde : 340 nm.

Cuve : 1 cm d'épaisseur.

Température : 20 à 25°C.

Volume du test : 2,24 mL.

Mesurer contre l'air (pas de cuve dans le trajet optique) ou contre l'eau ou contre le témoin.

Introduire dans des cuves	Témoin	Essai
Solution 1	1,0 mL	1,0 mL
Solution 2	0,2 mL	0,2 mL
Eau bidistillée	1,0 mL	0,9 mL
Suspension 3	0,02 mL	0,02 mL
Solution d'essai	—	0,1 mL
Mélanger : après env. 2 min, lire l'absorbance des solutions (A1) Déclencher la réaction par addition de :		
Solution 4	0,02 mL	0,02 mL
Mélanger. En fin de réaction (20 minutes) lire l'absorbance du témoin et des essais (A2) immédiatement les uns après les autres.		

Déterminer les différences d'absorbances (A₂ - A₁) du témoin et de l'essai.

Déduire la différence d'absorbance du témoin de celle des essais :

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

Les différences d'absorbance mesurées doivent être au moins égales à 0,1 pour obtenir des résultats précis.

CONCENTRATION MASSIQUE EN LACTOSE DE LA SOLUTION D'ESSAI

l (trajet optique) = 1 cm

V : volume réactionnel en mL

v : volume de la prise d'essai en mL

MM (masse molaire de l'acide lactique) = 90 g.mol⁻¹

$$\rho \text{ g.L}^{-1} = \frac{\Delta A}{\epsilon l} \cdot \frac{V}{v} \cdot \text{MM}$$

$$\epsilon_{\text{NADH, H}^+}^{340\text{nm}} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE

Relevé de valeurs expérimentales

2 - DOSAGE DE LA SOLUTION P

Gamme étalon et essais

	0	Etalons				essai 1	essai 2
		1	2	3	4		
quantité de protéines (µg/tube)	0	40	60	80	100		
A							

3 - DOSAGE ENZYMATIQUE DE LA SOLUTION L.

Résultats obtenus

	Témoin	Essai 1	Essai 2
A ₁			
A ₂			

MICROBIOLOGIE - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (90 points)

PREMIER JOUR

Durée 4 h 30

Avant la mise sur le marché d'un produit cosmétique, différents contrôles de qualité doivent être réalisés en parallèle :

- des contrôles microbiologiques,
- des contrôles d'efficacité et de toxicité effectués sur des cellules en culture.

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

A - CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES DES COSMÉTIQUES (50 POINTS).

Ils seront réalisés sur une même lotion L.

Le dénombrement des micro-organismes s'applique à des produits cosmétiques dépourvus de pouvoir inhibiteur intrinsèque.

1 - DENOMBREMENT DES GERMES AEROBIES MESOPHILES (16 points).

1.1. Matériel disponible par candidat.

- * un flacon de 20 mL de lotion L n° x.
- * un flacon de 90 mL de tryptone-sel stérile.
- * 4 tubes de 9 mL de tryptone-sel stériles.
- * 12 tubes de 15 mL de gélose PCA (Plate count agar) stériles maintenus en surfusion à 45°C (ou un flacon de 180 mL).
- * 12 tubes de 5 mL de gélose blanche stériles maintenus en surfusion à 45°C (ou un flacon de 60 mL).
- * 12 boîtes de Petri stériles.
- * une pipette de 10 mL stérile.
- * 10 pipettes de 1 mL ou équivalent stériles.

1.2. Manipulation.

Le candidat devra tenir compte du matériel disponible pour organiser sa manipulation.

Réaliser 100 mL de suspension-mère 10^{-1} .

A partir de la suspension-mère, préparer en parallèle deux tubes de la dilution 10^{-2} .

A partir de chaque dilution 10^{-2} , préparer un tube de la dilution 10^{-3} .

Réaliser quatre ensemencements dans la masse de la suspension-mère et deux ensemencements dans la masse à partir de chacune des dilutions 10^{-2} et de chacune des dilutions 10^{-3} .

Incuber les boîtes 48 h à 30°C.

2 - RECHERCHE D'UN POUVOIR INHIBITEUR INTRINSEQUE (PII) (15 points).

On appelle PII d'un produit la faculté que possède ce produit d'empêcher le développement des micro-organismes dans les conditions de l'expérience. La mise en évidence du PII doit être effectuée à l'aide de différentes souches-tests.

2.1. Matériel disponible par candidat.

- * Une culture de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 sur gélose nutritive inclinée.
- * Une culture de *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 en bouillon de 18 h (correspond à environ 10^9 bactéries. mL⁻¹).
- * 2 géloses trypticase-soja coulées en boîtes de Petri stériles.
- * Un étalon de Mac Farland 0,5 (correspond à environ 1 à $3 \cdot 10^8$ bactéries. mL⁻¹).
- * 7 tubes contenant 9 mL de bouillon nutritif stérile.
- * Un flacon d'environ 10 mL d'eau distillée stérile.
- * 2 étaleurs en verre.
- * 4 disques de papier filtre stérile.
- * Un tube stérile.
- * 10 pipettes de 1 mL ou équivalent stériles.

2.2. Manipulation.

Le candidat devra tenir compte du matériel disponible pour organiser sa manipulation.

Préparation des inoculums : pour chaque souche, réaliser une suspension en bouillon ordinaire de densité environ 10^8 bactéries.mL⁻¹.

Ensemencements des inoculums : déposer sur chaque boîte 0,1 mL de chaque suspension et étaler uniformément à l'aide d'un étaleur en verre.

Dépôt des disques : sur chaque boîte, déposer
- un disque imprégné de la lotion L à la dilution 10^{-1} préparée en 1 - 2,
- un disque servant de témoin négatif.

incuber 48 h à 30°C.

2.3. Compte-rendu.

Préciser la préparation des deux inoculums.

3 - CONTROLE DE LA SOUCHE-TEST *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ATCC 10031 (19 points).

3.1. Matériel disponible par candidat.

En plus du matériel classique de microbiologie :

- * culture de *K.pneumoniae* du 2 - 1
- * une galerie API 20E stérile
- * un tube de 5 mL d'eau stérile ou un tube de Suspension Medium (API)
- * un tube d'environ 2 mL d'eau physiologique stérile
- * une gélose nutritive en boîte de Petri stérile
- * un tube à hémolyse stérile
- * réactif oxydase.

3.2. Manipulation.

Le candidat devra tenir compte du matériel disponible pour organiser sa manipulation.
Vérifier les caractères morphologiques, culturels et biochimiques.

Remarque :
les résultats des différents examens réalisés doivent être contrôlés par un examinateur.

3.3. Compte-rendu.

Présenter les résultats des examens réalisés.

B - BIOLOGIE CELLULAIRE (40 points).

Entretien d'une lignée continue de cellules épithéliales utilisées pour contrôler des produits cosmétiques.

Chaque candidat doit réaliser deux nouveaux flacons de culture de cellules épithéliales à partir d'un flacon de culture à repiquer mis à sa disposition.

1 - REACTIFS ET MATERIEL

Les réactifs et matériel sont disposés en partie dans le laboratoire de microbiologie et en partie sous la hotte à flux laminaire.

Au poste de microbiologie :

- * un flacon de culture contenant une culture confluyente de cellules épithéliales en milieu DMEM+ 10 % SVF (sérum de veau foetal),
- * un hématimètre de Malassez avec une lamelle optiquement plane,
- * un tube à hémolyse contenant 0,5 mL de bleu Trypan à 0,4 %,
- * un tube à hémolyse vide,
- * pipettes automatiques P1000, P100

Dans le laboratoire de microbiologie :

- * un microscope Inverse,
- * une étuve à CO₂.

Sous la hotte à flux laminaire :

- * un tube à essai contenant 6 mL de tampon PBS stérile,
- * un flacon contenant 15 mL de milieu DMEM+ 10 % SVF. Le milieu DMEM a été au préalable complété par de la glutamine, des antibiotiques et de la fungizone,
- * un tube à hémolyse contenant 2,5 mL d'une solution de trypsine à 0,25 % stérile,
- * un tube à hémolyse stérile vide,
- * deux flacons de culture neufs,
- * trois pipettes stériles de 5 mL.,
- * deux pipettes stériles de 2 mL.,
- * récipient pour pipettes et réactifs usagés contenant de l'eau de Javel.

A côté des hottes :

- * un dispositif de lavage des mains,
- * un flacon d'alcool et du papier absorbant.

2 - PROTOCOLE

2.1. Au laboratoire de microbiologie :

- Observer les cellules en culture au microscope inverse et noter la couleur du milieu de culture.
- Reporter les observations sur le compte rendu.

2.2. Stérilement sous la hotte à flux laminaire (en présence d'un examinateur) - temps limité à 20 minutes.

- Eliminer par retournement le milieu de culture.
- Réaliser un lavage des cellules avec 5 mL de solution PBS.
- Introduire 2 mL de trypsine. Laisser agir la trypsine quelques minutes en contrôlant son action à l'oeil nu.
- Ajouter 5 mL de milieu neuf DMEM+10 % SVF.
- Prélever une aliquote d'environ 0,5 mL de la suspension obtenue dans un tube à hémolyse stérile afin de réaliser une numération (au poste de microbiologie).
- Introduire dans chacun des deux flacons de culture neufs 1,5 mL de cette suspension.
- Compléter ces deux flacons à 5 mL avec du milieu DMEM+10 % SVF.
- Placer les deux flacons dans l'incubateur à CO₂.

Remarque :

Chaque candidat devra veiller à maintenir parfaitement stérile la hotte à flux laminaire.

2.3 Au poste de microbiologie :

- Réaliser une numération de la suspension prélevée, après dilution au 9/10 en bleu Trypan. La numération d'un rectangle devra être contrôlée par un examinateur.
- Déterminer le pourcentage de viabilité ainsi que la densité de la suspension.
- Sachant que la densité idéale en cellules viables doit être comprise entre 0,5 et 1.10^6 cellules par flacon, commenter le choix du volume de suspension remise en culture.

DEUXIEME JOUR

DUREE : 1 H 45

A- CONTROLES MICROBIOLOGIQUES DES COSMETIQUES (50 points)

Le dénombrement des micro-organismes s'applique à des produits cosmétiques dépourvus de pouvoir inhibiteur intrinsèque.

1 - DENOMBREMENT DES GERMES AEROBIES MESOPHILES.

1.1. Analyse des ensemencements.

Examiner les boîtes de milieu PCA après incubation. Dénombrer les colonies.

1.2. Compte rendu.

Présenter les résultats des dénombrements sous forme d'un tableau.

Retenir quatre boîtes.

Déterminer le nombre de germes aérobies mésophiles par mL de lotion L à l'aide du document donné en annexe.

2 - RECHERCHE D'UN POUVOIR INHIBITEUR INTRINSEQUE (PII).

2.1. Analyse des ensemencements.

Observer les boîtes de gélose TS après incubation.

2.2. Compte rendu.

Interpréter les résultats obtenus et conclure quant à la présence d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque.

Discuter la validité du résultat trouvé au 1.

3 - CONTROLE DE LA SOUCHE-TEST KLEBSIELLA PNEUMONIAE ATCC 10031.

3.1. Analyse des ensemencements.

Effectuer les lectures après incubation.

3.2. Compte rendu.

Présenter les résultats des lectures et conclure.

B - BIOLOGIE CELLULAIRE (40 points)

ENTRETIEN D'UNE LIGNEE CONTINUE DE CELLULES EPITHELIALES UTILISEES POUR CONTROLER DES PRODUITS COSMETIQUES

Observer les cellules en culture au microscope inverse et noter la couleur du milieu de culture. Reporter et commenter les observations sur le compte rendu.

ANNEXE

Extrait du Journal Officiel : expression des résultats.

A la suite des opérations de dénombrements, les quatre boîtes retenues se situent au plus au niveau de deux taux de dilutions consécutifs; dans les cas *a*, *b*, *c*, *d* et *e* ci-après :

Taux de dilution	Cas possibles					Nombre de boîtes retenues
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	
10^{-x}	4	3	2	1	0	
$10^{-(x+1)}$	0	1	2	3	4	

Si les quatre boîtes ont le même taux de dilution (cas *a* ou *e*), calculer la moyenne arithmétique du nombre de colonies dénombrées dans ces boîtes ; si le résultat est un nombre de trois chiffres, l'arrondir à la dizaine près. Si le chiffre des unités est 5, arrondir à la dizaine paire près. Multiplier par le facteur de dilution pour obtenir le nombre de germes aérobies mésophiles par millilitre de produit cosmétique.

Si les quatre boîtes n'ont pas le même taux de dilution (cas *b*, *c* ou *d*), faire la moyenne arithmétique du nombre de colonies pour chaque taux. Arrondir comme indiqué ci-dessus les deux nombres ainsi obtenus. Les rapporter au millilitre en les multipliant par le facteur de dilution correspondant et en faire la moyenne pour obtenir le nombre moyen de germes aérobies mésophiles par millilitre de produit cosmétique.

Donner, comme résultat, le nombre de germes aérobies mésophiles par millilitre de produit cosmétique. L'exprimer par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10 (par exemple un nombre moyen de 15 000 serait indiqué par $1,5 \times 10^4$ par millilitre).

LES EXTRAITS PLACENTAIRES EN COSMÉTOLOGIE

BIOCHIMIE (70 points)

Durée : 4 h

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

Un principe actif utilisé en cosmétologie doit normalement contribuer au processus de régénération cellulaire.

Pour ce qui concerne les extraits placentaires lyophilisés (EPL), le contenu en phosphatases alcalines (PAL) est classiquement représentatif d'une activité au niveau cellulaire. Cette activité, de plus, est fonction d'un certain nombre de facteurs physico-chimiques. La composition en acides aminés, notamment, se révèle être particulièrement déterminante.

Au cours de cette manipulation, on se propose de déterminer la concentration catalytique en phosphatases alcalines d'un extrait placentaire ainsi que sa teneur en un acide aminé, la valine.

1 - DETERMINATION DE LA CONCENTRATION CATALYTIQUE DES PAL DANS UN EXTRAIT PLACENTAIRE (20 points).

Cette détermination s'effectue directement sur une solution d'EPL à 0,1 % (m/V).

1.1. Principe.

La réaction utilisée pour mesurer l'activité de ces enzymes est la suivante :



paranitrophénylphosphate (PNPP)

paranitrophénol (PNP)

Le PNPP est incolore, alors que le PNP est jaune en milieu alcalin. Son coefficient d'absorption linéique molaire à 405 nm est égal à $18\,500\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$.

1.2. Mode opératoire (2 essais).

La température de mesure est de 30°C. Equilibrer les solutions à 30°C.

Remplir le document de programmation du spectrophotomètre en mode cinétique (document annexe à compléter et à remettre à l'examinateur juste avant la mesure) sachant qu'après un temps d'attente de 30 secondes, l'augmentation de l'absorbance doit être mesurée toutes les 30 secondes pendant 3 minutes à 405 nm, contre de l'eau distillée.

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

- 1 mL de solution tampon glycine à 100 mmol.L^{-1} , pH 10,5,
- 1 mL de solution de PNPP à 4 g.L^{-1} ,
- 0,2 mL de solution d'EPL à 0,1 %.

Après un temps d'attente de 30 secondes, suivre la cinétique de la réaction au spectrophotomètre.

1.3. Résultats.

Compléter le relevé de valeurs expérimentales ou joindre les enregistrements donnés par le spectrophotomètre.

Déterminer la concentration catalytique des PAL en unités par mL de solution d'EPL (une unité est la quantité d'enzyme qui transforme une micromole de substrat par minute dans les conditions expérimentales décrites).

En déduire le nombre d'unités par g d'EPL.

2 - DOSAGE DE LA VALINE (50 points).

Le dosage de la valine s'effectue après extraction des acides aminés à partir d'une solution d'EPL à 1 % (m/V). Cette extraction a permis d'éliminer des substances pouvant s'avérer gênantes (sels minéraux, protéines...) pour la suite des opérations. A la suite de cette extraction, plusieurs techniques chromatographiques ont été mises en oeuvre :

- chromatographie d'échange d'ions, permettant d'isoler un groupe d'acides aminés aliphatiques (glycine, alanine, valine, leucine et isoleucine), suivie d'une concentration nécessaire à la réalisation d'une chromatographie sur couche mince (CCM). On obtient l'extrait E1, concentré 10 fois par rapport à la solution d'EPL de départ,

- CCM quantitative par dépôt de $40 \mu\text{L}$ de E1, suivie, après migration chromatographique, de l'élution de la valine dans 2 mL d'éluant. Cet éluat est noté E2.

On se propose de contrôler la pureté de l'extrait E1 et de doser la valine sur l'éluat E2.

2.1. Contrôle de la pureté du groupe des acides aminés aliphatiques sur E1 (15 points).

2.1.1. Principe.

Ce contrôle se fera par chromatographie ascendante sur couche mince. On utilise comme solvant mobile le mélange :

butan-1-ol, acide éthanóique, eau distillée (3, 1, 1).

2.1.2. Mode opératoire.

Introduire le solvant mobile dans le fond de la cuve.

La plaque de CCM (7 cm x 10 cm) est prête à l'emploi. Réactiver celle-ci par un séjour de quelques minutes à 100°C .

Réaliser un dépôt des solutions témoins d'acides aminés (glycine, alanine, valine, leucine et isoleucine) à l'aide de tubes capillaires. Procéder de même pour l'extrait E1. Dans ce dernier cas, surcharger 2 fois en prenant soin de sécher après chaque dépôt.

Développer le chromatogramme.

Sécher, puis révéler par le réactif à la ninhydrine (pulvérisation ou utilisation d'un pinceau).

Mettre 10 minutes environ à l'étuve à 100°C .

2.1.3. Résultats.

Conclure quant à la pureté du groupe des acides aminés aliphatiques de E1.

2.2. Dosage de la valine dans l'éluat E2 (35 points).

2.2.1. Principe.

La valine, comme la plupart des acides aminés, donne une coloration bleu-violette à chaud en présence de ninhydrine.

2.2.1. Mode opératoire.

Effectuer une gamme étalon avec 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5 mL de solution de leucine à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (la leucine sert classiquement d'acide aminé de référence pour le dosage colorimétrique des acides aminés par la ninhydrine).

Compléter à 0,5 mL avec de l'eau distillée.

Ajouter 0,5 mL de solution diluante S_D .

Ajouter 0,5 mL de solution de ninhydrine S_N .

Boucher les tubes à l'aide de coton cardé.

Mettre au bain marie bouillant pendant 5 minutes.

Refroidir sous l'eau courante pendant 5 minutes.

Ajouter 5 mL de solution de propan-2-ol au $\frac{1}{2}$ (flacon distributeur).

Lire l'absorbance à 570 nm après 15 minutes d'attente.

Effectuer le dosage de la valine sur 0,5 mL d'éluat E2 dans des conditions identiques à celles de l'étalonnage. Faire 2 essais.

2.2.3. Résultats.

Compléter le relevé de valeurs expérimentales.

Tracer la courbe d'étalonnage ; valider les valeurs expérimentales ; calculer la droite de régression ; en donner les paramètres et en déduire la concentration en valine de l'EPL en mg de valine pour 100 mg d'EPL.

Données :

** On considère que les intensités colorantes d'une mole de valine et d'une mole de leucine sont équivalentes.*

** Masses molaires de la leucine 131 g.mol^{-1} , de la valine 117 g.mol^{-1} .*

Compte tenu des résultats obtenus par CCM, cette technique de dosage est-elle généralisable aux autres acides aminés aliphatiques ? Justifier la réponse.

DOCUMENT ANNEXE

A COMPLETER ET A RENDRE A L'EXAMINATEUR

N° de poste :

Programmation du spectrophotomètre en mode cinétique

- * Longueur d'onde (nm) :
- * Température (°C) :
- * Blanc réactif : OUI NON
- * Temps d'attente (s) :
- * Nombre de tronçons (intervalles de mesure) :
- * Temps de tronçon (s) (intervalle de temps entre 2 mesures) :
- * Nombre d'étalons :

RELEVÉ DE VALEURS EXPERIMENTALES

+++++

1 - Détermination de la concentration catalytique des PAL.

temps (s)	30	60	90	120	150	180	210
1er essai : A							
2ème essai : A							

2 - DOSAGE DE LA VALINE.

Gamme étalon et essais

	0	1	2	3	4	5	essai 1	essai 2
Volume de leucine (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5		
A								

Contrôle de qualité d'extraits placentaires en cosmétologie.

Est dite « cosmétique » toute préparation destinée à l'hygiène ou à la beauté.

L'analyse microbiologique des produits cosmétiques est réglementée par un arrêté du 3 juillet 1972, paru au Journal Officiel le 8 août 1972. Ce document officiel précise le mode de prélèvement des échantillons, la technique de préparation de la suspension-mère, la méthode de dénombrement de la flore mésophile aérobie, des levures et champignons et la technique de recherche d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque.

1ER JOUR

Durée : 4 h

A - IMMUNOLOGIE (30 points)

Contrôle de l'origine d'extraits placentaires.

Contrôler l'origine de deux extraits placentaires, E1 et E2 en utilisant la technique d'immunodiffusion double dite "Ouchterlony".

Le matériel et les réactifs suivants sont fournis :

- deux lames porte-objet,
- une lame recouverte d'agarose à 1 % en PBS,
- deux tubes contenant chacun 4 mL d'agarose à 1 % en PBS et maintenus à 55°C,
- un schéma « gabarit » pour la réalisation des puits,
- un emporte-pièce de 2,5 mm avec un système d'aspiration,
- une pipette automatique,
- une chambre humide,
- deux tubes Eppendorf marqués « E₁ », « E₂ » et contenant les extraits à contrôler,
- un tube à hémolyse contenant du PBS,
- quatre tubes Eppendorf vides,
- un tube Eppendorf marqué « EPL » contenant un extrait placentaire connu d'origine humaine,
- un tube Eppendorf marqué « Ac » contenant un sérum anti-extrait placentaire humain.

1. Préparation des lames.

Noter à la pointe diamant ou au feutre indélébile les deux lames « A » et « B ».

Sur chacune d'entre elles couler 4 mL d'agarose à 1 % en PBS et laisser solidifier.

Réaliser ensuite sur les deux lames les puits à l'aide du schéma gabarit fourni et d'un emporte-pièce (une lame déjà coulée est fournie en guise d'entraînement).

Orienter correctement les lames (compléter les schémas représentés sur le document annexe à rendre avec la copie).

2. Préparation et exécution des dépôts.

Chaque extrait E1 et E2 sera testé pur et aux dilutions au 1/10 et au 1/50. Les dilutions seront réalisées en PBS. Présenter un tableau d'exécution des dilutions sur le compte rendu.

Chaque essai sera réalisé en double.

L'extrait connu « EPL » sera utilisé pur.

Les puits centraux seront réservés à l'anticorps et les puits périphériques aux différents extraits.

Déposer dans chaque puits 4 à 5 µL.

Sur le document remis en annexe compléter les schémas des lames et le tableau.

3. Diffusion.

Laisser les lames en chambre humide pendant 48 heures.

B - MICROBIOLOGIE (60 points)

Les fabricants de produits cosmétiques se soumettent aux contrôles obligatoires, et, généralement, ils y adjoignent la recherche de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* pour les cosmétiques à usage externe ; en outre, en présence de levures, ils effectuent la recherche de *Candida albicans*.

1 - ANALYSE PARTIELLE D'UN LAIT HYDRATANT (21 points).

La préparation de la suspension mère a été réalisée en mélangeant 10 grammes de produit à 90 mL de diluant en présence de billes de verre, afin de faciliter l'homogénéisation de la suspension.

Réaliser une dilution au dixième de la suspension mère dans 9 mL de diluant, puis à partir de la dilution au dixième, préparer, de la même façon, une dilution au centième.

1.1. Dénombrement des germes aérobies mésophiles.

Le dénombrement sera réalisé en double dans la masse d'une gélose dénombrement, selon la technique en double couche, à partir des dilutions et de la suspension mère.

Les boîtes seront incubées à 30°C.

1.2. Dénombrement des levures et moisissures.

Le dénombrement sera réalisé en double à la surface d'un milieu OGA à partir des dilutions et de la suspension mère.

Les boîtes seront incubées à 30°C.

2 - RECHERCHE D'UN POUVOIR INHIBITEUR INTRINSEQUE : contrôle des souches de référence (27 points).

On appelle *pouvoir inhibiteur intrinsèque* d'un produit la faculté que possède ce produit d'empêcher le développement de micro-organismes dans les conditions décrites dans l'arrêté du 3 juillet 1972..

Une de ces conditions est l'utilisation de 3 souches de référence :

Staphylococcus aureus ATCC 9144
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031 (IPP 53153)
Saccharomyces cerevisiae ATCC 2601

Ces souches sont présentées en culture de 16 heures à 30°C, en bouillon nutritif.

2.1. Contrôler la pureté des 3 souches en réalisant :

- une coloration de Gram pour les bactéries,
- une coloration au bleu de méthylène pour les levures.

2.2. Ensemencer, en vue de récupérer le contaminant, toutes les souches de référence contaminées sur un milieu non sélectif et sur un milieu sélectif de votre choix, parmi ceux de la liste suivante :

- la gélose nutritive,
- la gélose lactosée au bromocrésol pourpre,
- le milieu de Drigalski,
- le milieu de Chapman,
- le milieu de Sabouraud + chloramphénicol.

Remarque :

- les boîtes de Petri nécessaires aux isollements sont à disposition sur une paillasse latérale.

2.3. Faire un compte rendu des examens microscopiques et justifier le choix des milieux ensemencés.

3 - IDENTIFICATION D'UNE LEVURE (12 points).

En présence de colonies de levure sur milieu OGA à partir d'un produit cosmétique, il convient d'effectuer la recherche de *Candida albicans*.

A partir d'une colonie suspecte réisolée sur gélose Sabouraud inclinée :

- réaliser un test de chlamydo sporulation sur milieu R.A.T.,
- ensemencer une galerie API 20 C AUX.

Remarque :

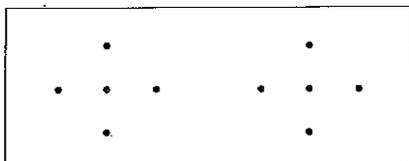
- préciser sur le compte rendu les conditions d'incubation.

A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE

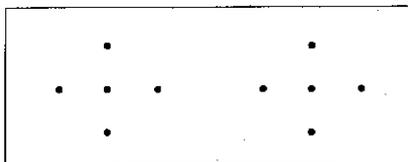
N° de poste :

* Schéma des lames à compléter :

Lame « A »



Lame « B »



* Tableau à compléter :

Position des dépôts	Lame « A »	Lame « B »
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

A - IMMUNOLOGIE (30 points).

- 1 - Représenter par des schémas les résultats obtenus.
- 2 - Commenter l'aspect des arcs de précipitation obtenus. Conclure.
- 3 - Conclure sur l'origine des extraits proposés « E1 » et « E2 ».

Référence pour les dépôts : document annexe rempli le 1er jour.

B - MICROBIOLOGIE (60 points).

1 - ANALYSE PARTIELLE D'UN LAIT HYDRATANT (21 points).

Lire les dénombrements et exprimer les résultats par gramme de produit analysé.

2 - RECHERCHE D'UN POUVOIR INHIBITEUR INTRINSEQUE : contrôle des souches de référence (27 points).

Faire l'examen macroscopique des isoléments et le bilan de l'ensemble des résultats obtenus.
Orienter le diagnostic de famille du (ou des) germes (s) contaminant(s).

3 - IDENTIFICATION D'UNE LEVURE (12 points).

Effectuer la lecture du test de chlamydosporulation et de la galerie API 20 C AUX.

Identifier la souche.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie: réalisation pratique d'opérations techniques

Durée : 10 heures;

Coefficient : 8

SUJET 3.

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

LE LACTOSÉRUM

Le lactosérum, produit dérivé de l'industrie laitière, contient des constituants à valeur nutritive élevée qui peuvent présenter d'excellentes propriétés fonctionnelles. Il est valorisé par son utilisation dans l'alimentation animale et dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques.

BIOCHIMIE (80 points)

Durée : 5 H

Le lactosérum est produit lors de la fabrication du fromage :

- la coagulation du lait aboutit à un gel de caséines qui emprisonne également les lipides,
- lors de l'égouttage de ce gel, le lactosérum se sépare du caillé. Il entraîne la plus grande partie de l'eau et des constituants solubles du lait.

1 - ELECTROPHORESE DES PROTEINES DU LACTOSERUM (21 points).

1.1. Principe.

L'électrophorèse des protéines du lactosérum est réalisée sur acétate de cellulose en tampon Tris-véronal pH 9,2 en présence d'un témoin protéique (β -lactoglobulines A et B).

1.2. Réactifs.

- bande d'acétate de cellulose,
- tampon Tris-véronal - pH 9,2 - force ionique 0,05 mol/L,
- colorant : rouge Ponceau,
- décolorant : acide éthanoïque,
- déshydratant : méthanol,
- transparent,

- solution de lactosérum,
- solution de β -lactoglobulines A et B.

1.3. Mode opératoire.

Le protocole opératoire est décrit dans la fiche technique distribuée par le centre d'examen.

La manipulation comporte les opérations suivantes :

- mise en place des bandes d'acétate de cellulose ;
- dépôt, côté cathodique, du lactosérum et du témoin β -lactoglobulines ;
- migration électrophorétique ;
- coloration par le rouge Ponceau ;
- transparence ;
- présentation de la bande d'acétate de cellulose sur plaque de verre.

1.4. Résultats.

Proposer une identification des protéines mises en évidence par cette technique en s'aidant du tableau ci-dessous.

Données :

protéines du lait de vache	concentration (g/L)
caséine	25
β -lactoglobulines (A et B)	2,7
α -lactalbumine	1,2
sérum-albumine	0,25
immunoglobulines	0,65
protéoses-peptones	0,6

- DETERMINATION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ALCALINE D'UN LACTOSERUM (39 points).

2.1. Principe.

Le lactosérum est préparé par précipitation des caséines du lait par l'acide éthanoïque. L'activité phosphatasique alcaline du filtrat est mesurée expérimentalement par méthode cinétique et déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

La réaction catalysée à pH 10,5 est la suivante :



2.2. Réactifs.

Substrat : 4-nitrophénylphosphate
Produit : 4-nitrophénol (solution mère à 10 mmol/L)
Tampon AMP (2-amino-2-méthylpropan-1-ol) pH 10,5
Acide éthanoïque 0,1 mol/L environ
Lait cru

2.3. Mode opératoire.

2.3.1. Courbe d'étalonnage.

Préparer une solution fille par dilution au 1/50 de la solution mère de 4-nitrophénol (10 mmol/L) à l'aide d'eau désionisée.

Introduire dans 6 tubes 0 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 et 0,5 mL de solution fille. Compléter tous les tubes à 0,5 mL à l'aide d'eau désionisée.

Ajouter dans chaque tube 2,5 mL (distributeur) de solution tampon AMP pH 10,5. Attendre 5 min.

Lire l'absorbance dans des cuves de 1 cm de trajet optique à 405 nm, (stabilité de la coloration 1 h).

2.3.2. Préparation du lactosérum à partir d'un lait cru.

L'exécution du protocole ci-dessous sera rapide de manière à limiter l'altération éventuelle de l'enzyme sous l'action conjuguée de la température et du pH.

- Etalonner le pH-mètre à l'aide d'une solution tampon fournie.
- Dans un bécher étroit de 50 mL, introduire 20 mL de lait cru.
- Disposer les électrodes du pH-mètre puis verser rapidement sous agitation, à la burette, une solution d'acide éthanoïque à environ 0,1 mol/L jusqu'à pH 4,7. Noter le volume d'acide éthanoïque versé.

- Laisser reposer 5 minutes dans la glace.
- Filtrer le surnageant en recueillant le filtrat dans la glace (1 à 2 mL de filtrat suffisent pour la suite de la manipulation).
- Vérifier l'absence de particules en suspension dans le filtrat.

2.3.3. Détermination de l'activité phosphatase du filtrat (1 essai).

Le test s'effectue à la température de 30°C. La réaction enzymatique est déclenchée par addition du filtrat.

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

- solution tampon AMP pH 10,5 : 2,5 mL
- substrat (4-nitrophénylphosphate) : 0,3 mL
- filtrat : 0,2 mL

Enregistrer l'absorbance à 405 nm pendant 3 minutes (ou noter les valeurs d'absorbance toutes les 30 secondes, pendant 3 minutes).

2.4. Résultats.

Tracer la courbe d'étalonnage $A(405 \text{ nm}) = f(\text{nombre de } \mu\text{mol de 4-nitrophénol})$. Valider les valeurs expérimentales ; calculer l'équation de la droite de régression ; en donner les paramètres. Présenter l'enregistrement de la cinétique ou le tracé du graphe $A(405\text{nm}) = f(\text{temps})$. Commenter brièvement.

Calculer la concentration d'activité catalytique du filtrat en $\mu\text{kat/L}$.

Calculer la concentration d'activité catalytique du lait cru en $\mu\text{kat/L}$.

Remarque : on admettra que la réponse des spectrophotomètres est identique si des appareils différents ont été utilisés pour la gamme d'étalonnage et pour la cinétique.

3 - DOSAGE DU LACTOSE DANS LE LACTOSERUM (20 points).

3.1. Principe.

Le lactose est hydrolysé en D-glucose et D-galactose par la β -galactosidase (1).

Le D-galactose est oxydé en acide galactonique par le NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide) en présence de la galactose déshydrogénase (2).



Il s'agit d'une méthode de dosage enzymatique en point final ; la quantité de NADH,H^+ produit est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

Remarque : le lactosérum contient une très faible quantité de galactose libre qui sera négligée dans dosage.

3.2. Réactifs.

- solution 1 : tampon citrate pH 8,6 - NAD^+ - MgSO_4 : 0,8 mL
- suspension 2 : suspension de β -galactosidase : 0,2 mL
- solution 3 : tampon phosphate pH 8,6 : 4 mL
- suspension 4 : suspension de galactose déshydrogénase : 0,2 mL
- échantillon : solution de lactosérum (la concentration massique volumique exacte en lactosérum de ce candidat sera précisée au candidat) : 5 mL

3.3 Mode opératoire.

Longueur d'onde : 340 nm.

Cuve à usage unique : trajet optique : 1 cm.

Température : 20 à 25°C (température ambiante).

Diluer le lactosérum 10 fois à l'aide d'eau désionisée. Réaliser deux essais sur le lactosérum dilué. Introduire dans des cuves :

	témoin lactose	essai lactose
solution 1	0,20 mL	0,20 mL
suspension 2	0,05 mL	0,05 mL
lactosérum dilué	-----	0,10 mL
Mélanger. Attendre 10 min. Ajouter :		
solution 3	1,00 mL	1,00 mL
eau désionisée	2,00 mL	1,90 mL
Mélanger. Attendre 2 min. Lire l'absorbance (A1) de chaque cuve contre l'air. Ajouter :		
suspension 4	0,05 mL	0,05 mL
Mélanger. Attendre 20 min. Lire l'absorbance (A2) de chaque cuve contre l'air.		

3.4. Résultats.

Calculer la différence d'absorbance A2 - A1 pour l'essai lactose (E) et pour le témoin lactose (T). Déterminer la différence (E-T).

Calculer la concentration molaire volumique c (mmol/L) et la concentration massique volumique ρ (g/L) en lactose de la solution de lactosérum.

En déduire le pourcentage en masse de lactose dans le lactosérum en poudre.

Données :

masse molaire : $M_{\text{lactose}} = 342,3 \text{ g.mol}^{-1}$

concentration molaire volumique en lactose du lactosérum dilué testé

$$c = \frac{(E - T)}{\epsilon \cdot l} \cdot \frac{V}{v} \text{ mol.L}^{-1}$$

avec :

- V : volume réactionnel en mL
- v : volume de la prise d'essai en mL
- l (trajet optique) : 1 cm
- coefficient d'absorbance molaire du NADH à 340 nm $\epsilon = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE FEUILLE DE RELEVES DES VALEURS EXPERIMENTALES

2 - DETERMINATION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ALCALINE D'UN LACTOSERUM.

2.3.1. Courbe d'étalonnage :

V solution fille (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
A _{405 nm}						

2.3.2. Préparation du lactosérum à partir d'un lait cru.

V_{acide éthanotique} = mL.

2.3.3. Détermination de l'activité phosphatasique alcaline du filtrat :

- enregistrement $A_{405 \text{ nm}} = f(\text{temps})$

- ou

temps (s)							
$A_{405 \text{ nm}}$							

3. DOSAGE DU LACTOSE DANS LE LACTOSÉRUM.

	A_1	A_2
Témoin		
essai 1		
essai 2		

MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

1ER JOUR

DUREE : 3 H

A - MICROBIOLOGIE (50 points)

Le lactosérum est commercialisé sous forme de poudre.

Il peut être ajouté au lait au cours de la fabrication de certains fromages.

Il doit donc répondre à des critères bactériologiques et ne doit pas contenir d'antibiotique pouvant être à l'origine d'une inhibition du développement des ferments lactiques.

Différents échantillons de lactosérum sont analysés.

1. CONTRÔLE DE CERTAINS CRITÈRES MICROBIOLOGIQUES (15 POINTS).

1.1. Dénombrement des coliformes à 30°C.

Echantillon de lactosérum (L) (suspension obtenue en mélangeant 10 g de poudre à 90 mL de tryptone-sel).

Technique :

- incorporation dans la masse, double couche,
- essai en double,
- lactosérum (L) et dilution à 10^{-1} en tryptone-sel.

Milieu :
- VRBL

1.2. Recherche de *Salmonella*.

Isolement sur gélose de Rambach à partir du milieu d'enrichissement (R) (voir fiche technique - annexe 1).

Milieu d'enrichissement = milieu de Rappaport incubé 24 h à 42°C.

ETUDE DE LA PRÉSENCE D'ANTIBIOTIQUE (15 POINTS).

2.1. Principe.

3 échantillons de lactosérum A, B, C sont analysés afin de vérifier l'absence d'antibiotique. La méthode de diffusion en milieu gélosé est utilisée avec des spores de *Bacillus subtilis* comme organisme test. L'antibiotique recherché est la streptomycine.

2.2. Matériel - Réactifs.

Echantillons de lactosérum A, B, C.
Lactosérum témoin positif contenant 5 µg/mL de streptomycine.
Suspension de spores de *Bacillus subtilis* à 10^7 spores/mL.
Gélose pour antibiogramme maintenue en surfusion (50 mL).
Tubes contenant 9 mL d'eau physiologique.
Boîte de Pétri carrée.
Disques de papier filtre stériles (8 disques).
Pipettes automatiques et cônes stériles.

2.3. Technique.

- Préparation de la gélose pour antibiogramme.

Diluer la suspension de spores et ensemercer un volume V de suspension diluée dans la gélose en surfusion de manière à obtenir une concentration finale d'environ $5 \cdot 10^3$ spores par mL.
Couler le milieu en boîte de Pétri.
Laisser solidifier.

- Répartition des disques.

Répartir 8 disques de papier filtre stériles.

- Dépôt des échantillons.

Déposer 10 µL des échantillons A, B, C et du lactosérum témoin positif sur les disques (réaliser chaque essai en double).
La répartition des dépôts se fera de manière aléatoire.

- Incubation

2.4. Compte rendu.

Préciser la dilution effectuée et le volume utilisé pour l'ensemencement de la gélose.

Schématiser la boîte de Pétri avec l'emplacement des disques et les dépôts correspondants (repère sur la boîte).

3 - IDENTIFICATION D'UNE SOUCHE ISOLEE AU COURS DE L'ANALYSE D'UN ECHANTILLON DE LACTOSERUM NON CONFORME (20 points).

Sur la souche S présentée sur gélose nutritive inclinée, effectuer : examens macroscopique et microscopique, test enzymatique.

Relater sur le compte rendu les observations effectuées ; en déduire l'orientation de la souche.

Faire appel à un examinateur avant de poursuivre l'identification.

(Les milieux distribués sont imposés par le centre d'examen).

B - IMMUNOLOGIE (30 points)

DOSAGE DE LA LACTALBUMINE DU LACTOSERUM PAR IMMUNODIFFUSION

SIMPLE RADIALE

On se propose de doser la lactalbumine du lactosérum par immunodiffusion simple radiale à l'aide d'une gamme d'étalonnage.

1 Réactifs.

- 0,2 mL de lactosérum dilué au 1/3,
- 2 mL de solution étalon de lactalbumine à 1 g/L,
- 0,2 mL d'immunsérum anti-lactalbumine,
- 2 tubes contenant chacun 7 mL d'agarose à 1 % (bain-marie à 56°C),
- 4 mL de tampon phosphate.

2. Protocole.

2.1. Préparation des gels.

- Couler dans une boîte de Pétri de 5 cm de diamètre le contenu d'un tube d'agarose à 1 %.
Cette boîte servira d'entraînement à la réalisation des puits.
- Préparer un tube de mélange agarose/immunsérum à raison de 20 μ L d'immunsérum par mL d'agarose et couler immédiatement ce mélange dans une autre boîte de Pétri de 5 cm de diamètre.
- Laisser refroidir les gels environ 10 min à 4°C.

2.2 Réalisation des puits.

A l'aide d'un emporte-pièce de 3 mm de diamètre, réaliser 7 puits régulièrement espacés.

2.3. Remplissage des puits, diffusion.

- A partir de la solution étalon de lactalbumine à 1 g/L, réaliser une gamme d'étalonnage de 200 à 600 mg/L dans le tampon phosphate.
- Introduire les solutions étalons et le lactosérum dilué à raison de 5 μ L par puits.
- Laisser diffuser à température ambiante en atmosphère humide (chambre humide ou papier humidifié).

3. Compte rendu.

Réaliser un tableau expliquant la préparation de la gamme d'étalonnage.
Compléter le document : annexe 2.

ANNEXE 1

MICROBIOLOGIE

Fiche technique
Diagnostica Merck

RAMBACH AGAR

UTILISATION

Identification de *Salmonella* spp.

Milieu de culture différentiel permettant l'identification de *Salmonella* dans les aliments et les échantillons biologiques.

MODE D'ACTION

Les éléments nutritifs du Rambach-Agar permettent une multiplication facile des entérobactéries.

Le désoxycholate de sodium inhibe la flore gram-positive accompagnante.

Le Rambach-Agar permet de différencier sans aucune ambiguïté les différentes espèces de *Salmonella* des autres bactéries par le biais d'un nouveau procédé, dont l'emploi a été breveté, l'incorporation de propylène glycol au milieu de culture.

Les *Salmonella* métabolisent le propylène glycol en formant des acides qui, combinés avec un indicateur de pH, donneront aux colonies une couleur rouge caractéristique.

Afin de différencier les coliformes des *Salmonella*, le milieu contient un chromogène qui traduit la présence de β -galactosidase, laquelle est caractéristique des coliformes.

Les micro-organismes coliformes poussent sous la forme de colonies bleu-vert ou bleu-violet.

Les autres entérobactéries et les bactéries gram-négatives telles que *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* se développent sous la forme de colonies incolores. Seules *S. Typhi* et *S. Paratyphi A* ne métabolisent pas le propylène glycol et donnent des colonies incolores.

Cette nouvelle méthode permet de détecter sûrement et sans ambiguïté les *Salmonella*.

Le taux élevé d'identification faussement positive de *Salmonella* obtenu par les milieux traditionnels (environ 20 à 30 %) est presque éliminé par l'utilisation du Rambach-Agar.

En conséquence, il en résulte une économie importante en matière et en temps de travail.

COMPOSITION TYPE

PEPTONE-----	5,0 g/L
EXTRAIT DE LEVURE -----	2,0 g/L
EXTRAIT DE VIANDE -----	1,0 g/L
CHLORURE DE SODIUM -----	1,0 g/L
DESOXYCHOLATE DE SODIUM -----	1,0 g/L
MELANGE CHROMOGENE -----	1,5 g/L
PROPYLENE GLYCOL-----	10,5 g/L
AGAR-AGAR-----	15,0 g/L

INTERPRETATION

<i>Souche test</i>	<i>Colonie</i>
<i>Salmonella enteritidis</i> --- ATCC 13075	rouge
<i>Salmonella typhimurium</i> - ATCC 14028	rouge
<i>E. coli</i> ----- ATCC 25822	bleu-vert
<i>Klebsiella pneumoniae</i> -- ATCC 13883	bleu-violet
<i>Citrobacter freundii</i> - ATCC 8090	bleu-vert
<i>Proteus mirabilis</i> --- ATCC 14273	incolore
<i>Shigella flexneri</i> ----- ATCC 12022	incolore

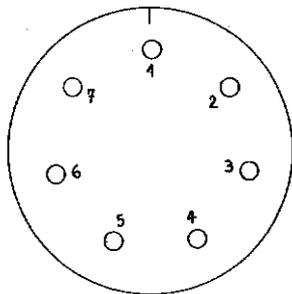
ANNEXE 2

DOCUMENT A COMPLETER ET A RENDRE A LA FIN DE LA PREMIERE SEANCE

N° Poste.....

IMMUNOLOGIE

N° de puits	concentration déposée en mg.L ⁻¹	diamètre mesuré en mm
	1er JOUR	2ème JOUR
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		



A - MICROBIOLOGIE

1ère partie : CONTROLE DE CERTAINS CRITERES MICROBIOLOGIQUES.

Dénombrer les coliformes.
Lire le résultat de l'isolement sur géiose de Rambach.
Conclure.

Données :

Normes microbiologiques :

- | | | |
|---------------------|---|--------------------|
| - coliformes à 30°C | : | 25 par g |
| - <i>Salmonella</i> | : | absencé dans 100 g |

2ème partie - ETUDE DE LA PRESENCE D'ANTIBIOTIQUE.

Effectuer les lectures.
Conclure par référence au lactosérum témoin positif.

3ème partie - IDENTIFICATION D'UNE SOUCHE.

Lire la galerie et justifier l'identification d'espèce de la souche.
Préciser l'origine possible de cette souche bactérienne dans ce type de produit.

B - IMMUNOLOGIE

DOSAGE DE LA LACTALBUMINE PAR IMMUNODIFFUSION SIMPLE RADIALE

- Mesurer les diamètres D des anneaux de précipitation (précision de la mesure au 1/10 mm) et compléter le tableau de résultats (annexe 2 - premier jour).
- Tracer la courbe $D^2 = f(\rho \text{ mg/L})$ sur papier millimétré sachant que la précision du dosage est de 10 %.
- Déterminer graphiquement la concentration en lactalbumine (en g/L) du lactosérum.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.

Deuxième partie: réalisation pratique d'opérations techniques

Durée : 10 heures;

Coefficient : 8

SUJET 4.

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

BIOCHIMIE (75 points)

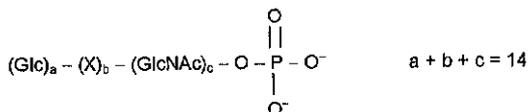
Durée : 5 H

PROBLEMES SANITAIRES POSES PAR LA PRODUCTION INDUSTRIELLE DE VIANDES DE VOLAILLES

Certains élevages de volailles peuvent être touchés par des infections virales susceptibles de provoquer des troubles divers. Une meilleure connaissance de la structure des virus impliqués et de leur multiplication dans les cellules cibles permet d'améliorer les moyens de prévention et de traitement.

De nombreux virus aviaires comportent une **enveloppe** contenant des glycoprotéines synthétisées par les cellules hôtes. Ces **glycoprotéines** sont des hétéroprotéines supportant de nombreuses unités oligosaccharidiques. Dans de nombreux cas, ces unités oligosaccharidiques proviennent d'un **précurseur à 14 unités glucidiques** initialement porté, dans la biosynthèse des glycoprotéines, par un lipide membranaire du réticulum endoplasmique. Une fois lié à la glycoprotéine, ce précurseur glucidique est remanié.

On a isolé ce précurseur et on l'a séparé de son support lipidique. Sa structure peut être schématisée de la façon suivante :



Glc = glucose

GlcNAc = N-acétylglucosamine

X est un composé glucidique (ose ou oside) différent du glucose.

On a hydrolysé totalement ce précurseur puis traité l'hydrolysat de façon à transformer la N-acétylglucosamine en glucosamine. Cet hydrolysat, une fois transformé, est nommé "hydrolysat H".

L'hydrolysat H comprend donc :

- le composé glucidique X
- des ions orthophosphates
- du glucose
- de la glucosamine.

On se propose, de déterminer les indices a, b et c et la nature du composé X. A cette fin, sur des solutions dérivées de l'hydrolysat H (solutions C, P, G et GN), on conduira différentes analyses :

- chromatographie en couche mince (solution C)
- dosage du phosphore minéral (solution P)
- dosage du glucose (solution G)
- dosage de glucosamine (solution GN).

Remarque préliminaire.

Une feuille de relevés de valeurs expérimentales est fournie avec le sujet. Elle doit être complétée directement en salle de mesures.

1 - DETERMINATION DE LA NATURE DU GLUCIDE X PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE (16 points).

A partir de l'hydrolysat H, un traitement de destruction spécifique des composés glucidiques différents de X a été mené. Après concentration, on obtient la solution C.

1.1. Matériel choisi - Activation des plaques.

Le matériel choisi est constitué de 2 chromatoplaques de gel de silice.
Les placer 30 min à 100°C et laisser refroidir.

1.2. Préparation de la cuve et dépôts.

Introduire, au fond de la cuve, sur une hauteur de 1 cm, le solvant de développement :

butan-1-ol / acétone / eau distillée
4 V 5 V 1 V

Fermer le couvercle, saturer 15 minutes.

A l'aide de capillaires, effectuer les dépôts de chaque glucide témoin (glucose, xylose, lactose, raffinose, saccharose et mannose) et de la solution C.

NB : les opérations de chromatographie (1.2., 1.3., 1.4.) devront se dérouler loin de toute flamme.

1.3. Développement du chromatogramme.

Introduire les plaques dans la cuve. Fermer. Laisser migrer.

1.4. Révélation.

Sortir les chromatoplaques. Sécher environ 10 minutes à l'étuve à 100°C, puis, après refroidissement, pulvériser, **sous la hotte**, le réactif de révélation (thymol sulfurique) [Précautions].

Mettre à l'étuve 15 minutes à 100°C..

1.5. Résultats.

Exploiter les chromatogrammes.

2 - DOSAGE DU PHOSPHORE PAR LA METHODE DE BRIGGS (14 points).

Après dilution au 1/5 de la solution H, on a obtenu la solution P. On dose le phosphore de cette solution P par la méthode de Briggs.

2.1. Détermination du phosphore minéral de la solution P (2 essais).

Dans un tube, introduire :

- solution P ----- 1 mL
- réactif sulfomolybdique ----- 1 mL
- solution d'hydroquinone à 10 g/L ----- 1 mL
- solution de sulfite de sodium à 200 g/L ----- 1 mL
- eau distillée ----- 10 mL

Laisser 20 min à l'obscurité. Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à $\lambda = 700$ nm en réglant le zéro de l'appareil à l'aide d'un témoin réactifs.

2.2. Etalons.

A partir d'une solution de phosphore à 4 millimoles de phosphore par litre, préparer deux étalons contenant 2,0 micromoles de phosphore par tube.

2.3. Résultats.

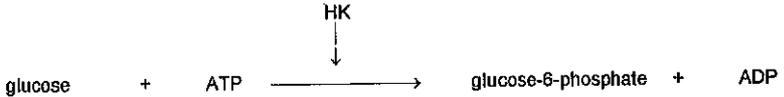
Calculer la concentration molaire (mmol/L) en phosphore minéral de la solution P.
En déduire la concentration molaire (mmol/L) en phosphore de l'hydrolysats H.

3 - DOSAGE DU GLUCOSE PAR LA METHODE A L'HEXOKINASE (14 points).

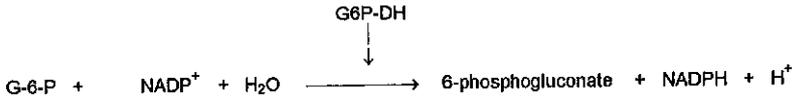
Après dilution au 1/3 de la solution H, on a obtenu la solution G. On dose le glucose de la solution G par la méthode à l'hexokinase.

3.1. Principe.

Le glucose est phosphorylé par l'ATP en présence d'hexokinase (HK) :



Le glucose-6-phosphate est ensuite oxydé en présence de glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PDH) et de NADP^+ :



La formation de NADPH, H^+ , mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, est proportionnelle à la quantité de glucose dans le milieu réactionnel.

3.2. Réactif utilisé.

Une solution réactionnelle R préparée de la façon suivante est fournie :

Préparation et conservation de la solution réactionnelle R .

Mélanger 6 volumes de solution du flacon 1 avec 1 volume de solution du flacon 2.

Conservation minimum : 4 semaines entre 2° et 8°C. Amener la solution réactionnelle à 20°-25°C avant emploi.

- Flacon 1 : tampon NADP-ATP	
Composition :	tampon Tris 100 mmol/L ; pH = 7,8
	Mg ²⁺ 4 mmol/L
	NADP >1,0 mmol/L
	ATP >1,7 mmol/L
- Flacon 2 : HK/G6P-DH	
Composition :	G6P-DH >2,5 U/mL
	HK >1,4 U/mL

Les solutions 1 et 2 contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Ne pas avaler.
Eviter le contact avec la peau et les muqueuses.

3.3. Mode opératoire.

a) Dilutions.

A partir d'une solution mère de glucose à 10 mmol/L, préparer, dans un tube à hémolyse, 1 mL d'une solution étalon à 3,0 mmol/L (dilution réalisée en eau physiologique (NaCl à 9 g/L)).
Faire, dans un tube à hémolyse, une dilution au 1/4 de la solution G en eau physiologique.

b) Caractéristiques de la méthode.

Longueur d'onde (λ) :	340 nm
Cuve :	1 cm de trajet optique
Température :	20-25°C
Mesurer essais et TR contre l'air.	
Limites du dosage :	après 5 min, 0,5 g/L (2,77 mmol/L) pour la solution testée
	après 10 min, 1,0 g/L (5,55 mmol/L) pour la solution testée.

c) Etalonnage de la méthode et essais (2 étalons et 2 essais).

Introduire dans des cuves spectrophotométriques identiques :

	Témoin-réactifs (TR)	Etalon	Essai
eau physiologique	100 μ L		
solution étalon (3,0 mmol/L)		100 μ L	
solution G diluée au ¼			100 μ L
solution réactionnelle R (20-25°C)	2,00 mL	2,00 mL	2,00 mL

Obturer par du Parafilm. Mélanger. Après 5 à 10 min, lire l'absorbance des essais, étalons et TR à $\lambda = 340$ nm contre l'air.

Si A_E = absorbance de l'essai ou de l'étalon, on peut calculer ΔA :

$$\Delta A = A_E - A_{TR}$$

Faire deux essais et deux étalons identiques.

3.4. Résultats.

Calculer la concentration molaire de la solution G (mmol/L).

En déduire la concentration molaire en glucose de l'hydrolysat H (mmol/L).

4 - DOSAGE DE LA GLUCOSAMINE PAR LA METHODE D'ELSON ET MORGAN (25 points).

Après dilution au 1/5 de la solution H, on a obtenu la solution GN. On dose la glucosamine de la solution GN par la méthode photométrique d'Elson et Morgan.

4.1. Principe.

Le chauffage, en milieu alcalin, d'un mélange d'acétylacétone et de glucosamine conduit à la formation de plusieurs chromogènes que l'on condense par la suite avec le p-diméthylaminobenzaldéhyde.

4.2. Réactifs utilisés.

- solution alcaline fraîchement préparée d'acétylacétone ((pentane-2, 4-dione) :
acétylacétone ----- 40 mL
solution de Na_2CO_3 anhydre à 0,62 mol/L. ----- qsp 1 L

- réactif d'Ehrlich (*dangerueux*) :
 - p-diméthylaminobenzaldéhyde* 5,3 g
 - HCl concentré 100 mL

* 4-diméthylaminobenzaldéhyde

- solution mère étalon à 3,0 millimoles de glucosamine par litre.

4.3. Mode opératoire.

a) Dilutions.

Diluer au 1/5 la solution mère étalon de glucosamine, avec de l'eau bidistillée (fiole jaugée de 10 mL).

Diluer la solution GN au 1/10 en eau bidistillée.

b) Gamme d'étalonnage et essais.

Dans des tubes à essais, préparer la gamme étalon et pratiquer la réaction colorée sur la solution GN diluée (2 essais).

Tubes n°	0	1	2	3	Essais
solution mère étalon de glucosamine diluée au 1/5 (mL)	0	0,30	0,60	0,90	-
eau bidistillée (mL)	1,0	0,70	0,40	0,10	-
solution GN diluée au 1/10 (mL)	-	-	-	-	1,00
solution alcaline d'acétylacétone (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
eau bidistillée (mL)	2	2	2	2	2
Boucher au coton cardé. Porter au bain-marie bouillant 10 min. Refroidir. Puis ajouter :					
éthanol 96 % vol (mL)	5	5	5	5	5
Boucher au coton cardé. Agiter. Porter dans un bain thermostaté à 75°C pendant 5 min. (+/-2°C).					
Additionner lentement (propipette ou autre dispositif, hotte) : réactif d'Ehrlich (mL)	1	1	1	1	1
Boucher au coton cardé. Mettre 30 min à 75°C. Puis refroidir le contenu du tube.					
Ajouter : éthanol 96 % vol (mL)	5	5	5	5	5
Agiter. Laisser 30 min à l'obscurité.					

Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à $\lambda = 530$ nm. (Coloration stable).

NB : les additions d'éthanol doivent se faire loin de toute flamme.

4.4 Résultats.

Tracer la courbe d'étalonnage : $A = f(\mu\text{mol}/\text{tube})$.

Valider les valeurs expérimentales.

Calculer la droite de régression ; en donner les paramètres.

En déduire la concentration molaire en glucosamine de la solution GN (mmol/L), puis la concentration molaire en glucosamine de l'hydrolysat H (mmol/L).

MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE (80 points)

1er JOUR

DUREE : 2 H 30

PROBLEMES SANITAIRES POSES PAR LA PRODUCTION INDUSTRIELLE DE VIANDES DE VOLAILLES

Pour des raisons sanitaires et économiques, des contrôles doivent s'exercer à tous les niveaux de la production de la viande de volaille.

Certains élevages peuvent être touchés par des infections virales ou bactériennes susceptibles de provoquer des troubles divers.

Les opérations de transport et de transformation peuvent être à l'origine de la dissémination d'agents pathogènes rendant cette viande potentiellement dangereuse.

Les contrôles doivent intervenir à différents stades : élevage, transport et transformation.
On se propose d'en étudier divers aspects :

- diagnostic immunologique d'infection virale en élevage,
- influence de la technologie et des conditions de nettoyage sur la contamination des carcasses de volailles avant leur conditionnement.

A) MICROBIOLOGIE (45 points).

EVALUATION DES FACTEURS DE DISSEMINATION DES MICRO-ORGANISMES DANS UN ABATTOIR DE VOLAILLES

1 - RECHERCHE DE SALMONELLA EN DIVERS ENDROITS DE LA CHAÎNE.

Des chiffonnettes de papier non tissé imprégnées d'eau peptonée tamponnée stérile sont appliquées sur diverses surfaces (plumeuses, machines à éviscérer) ainsi que sur les gants du personnel.

La mise en évidence des *Salmonella* à partir de ces échantillons est réalisée par :

- préenrichissement en eau peptonée 12 h à 37°C,
- enrichissement en bouillon Rappaport 24 h à 41°C,
- isolement sur milieu au vert brillant,
- identification biochimique et sérologique des colonies suspectes après purification sur gélose nutritive.

Un isolement d'une colonie suspecte sur milieu au vert brillant est présenté sur gélose nutritive.

Procéder à un examen macroscopique.

Identifier la souche (la galerie distribuée comporte les milieux indiqués dans la norme internationale ISO 6579).

2 - CONTROLE DE LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE D'UNE SURFACE DE TRAVAIL APRES NETTOYAGE ET DÉSINFECTION.

La technique de prélèvement décrite précédemment est appliquée à une surface de 25 cm² dans une salle d'éviscération, avec mise en suspension des micro-organismes dans 5 mL d'eau peptonée tamponnée stérile (tube étiqueté E n°...).

Procéder à la recherche et au dénombrement des entérobactéries et des coliformes sur milieu VRBG (gélose glucosée, billée, cristal violet et rouge neutre) et VRBL (gélose lactosée, billée, cristal violet et rouge neutre).

Utiliser la technique dans la masse avec double couche du même milieu pour l'échantillon et la dilution

B) IMMUNOLOGIE (40 points).

On peut parfois constater, dans certains élevages aviaires, des maladies d'origine virale ou bactérienne. Des cas d'association entre Rotavirus et Myxovirus ou Paramyxovirus ont été envisagés dans certaines formes pathologiques (diarrhées, signes pulmonaires...).

La sérologie peut apporter des éléments intéressants pour le dépistage de ces maladies.

La réaction de fixation du complément (RFC) peut être utilisée pour la détection d'anticorps chez les animaux infectés de façon assez récente.

SERODIAGNOSTIC PAR REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT

On réalise un test quantitatif sur le sérum d'une volaille malade ("SPm" n°...) et un test qualitatif (dilution) sur le sérum d'une volaille apparemment saine du même élevage ("SPs" n°...).

1. Technique (réaction en plaque) : premier temps de la réaction.

On fournit les échantillons et réactifs suivants :

- sérums à étudier préalablement décomplémentés,
- antigène de paramyxovirus aviaire PMV₂ (étiqueté "antigène viral"),
- complément titré (sérum de cobaye)
- tampon véronal Ca-Mg.

1.1 R.F.C. :

- Diluer au 1/4 chacun des sérums.
- Réaliser, pour le sérum "SPm", des dilutions en plaque, du 1/4 au 1/256.
- Effectuer pour les sérums "SPm" et "SPs" la réaction selon le protocole suivant :
 - sérum dilué : 25 µL
 - antigène viral : 25 µL
 - complément (5 CH 50 / 50 µL) 50 µL

(Remarque : toutes les dilutions seront réalisées en tampon véronal).

1.2. Témoins :

- Préparer tous les témoins utiles.

Remarque : le témoin "système hémolytique" sera réalisé avec le complément pur en double exemplaire et avec les dilutions au 1/2 et au 1/4.

1.3. Incubation :

- Mélanger et placer 3 minutes sur agitateur rotatif.
- Recouvrir d'une feuille adhésive et incuber la plaque à 4 - 6°C.

2. Compte rendu.

Préciser :

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

DOCUMENT ANNEXE

A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE

SCHEMA DE LA PLAQUE DE MICROTITRATION

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

2ème JOUR

DUREE : 2 H 30

IL EST CONSEILLÉ DE COMMENCER PAR LA PARTIE IMMUNOLOGIE

A - MICROBIOLOGIE (45 points)

1 - RECHERCHE DE SALMONELLA EN DIVERS ENDROITS DE LA CHAÎNE.

- Lire les résultats.
- Contrôler le genre, le sérotype.
- Conclure.

2 - CONTROLE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE D'UNE SURFACE DE TRAVAIL APRES NETTOYAGE ET DESINFECTION.

- Lire les milieux VRBG et VRBL.
- Calculer les résultats pour la surface contrôlée.
- Discuter des résultats dans le contexte de cette recherche.

B - IMMUNOLOGIE (40 points)

R.F.C.

La plaque a été remise à la température ambiante depuis 15 minutes.

On fournit une suspension de globules rouges sensibilisés ("GR-S") préparés en mélangeant à volumes égaux une suspension de globules rouges de mouton à 2 % et un sérum hémolytique convenablement dilué.

1. Deuxième temps de la réaction.

- Placer la plaque à l'étuve à 37°C pendant 5 min.
- Ajouter 50 µL d'hématies sensibilisées dans les cupules "réaction" ainsi que dans les témoins si nécessaire.
- Recouvrir d'une feuille autocollante ou d'un couvercle.
- Mélanger et incuber la plaque 40 minutes à l'étuve ou au bain-marie à 37°C en agitant toutes les 10 minutes pour remettre les globules en suspension.
- Préparer, à l'aide de la suspension globale fournie et du témoin "système hémolytique" supplémentaire de la plaque, une cupule présentant l'aspect d'une réaction donnant 50 % d'hémolyse.
- Centrifuger la plaque 3 min à 1400 t/min et effectuer la lecture.

2. Compte rendu.

- Expliquer la réalisation de la cupule "50 % d'hémolyse" et préciser son emplacement sur le schéma de la plaque (document annexe du 1er jour).
- Présenter les résultats sous forme d'un tableau indiquant, pour chaque dilution de sérum, le pourcentage d'hémolyse et l'intensité de la réaction de - à +++.
- Déterminer le titre du sérum "SPm" (on prendra comme critère une hémolyse inférieure ou égale à 50 %).
- Donner les conclusions relatives au sérum "SPs".
- Interpréter les résultats obtenus avec les témoins.

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

ANNALES

**Brevet de Technicien Supérieur
BIOTECHNOLOGIE**

SESSIONS 1995-1996

Publications de l'UPBM

**UPBM Edition Lycée Technique "La Martinière"
La Duchère 69338 Lyon Cedex 09**

Annales du BTS Biotechnologie

Les annales sont divisées en année. La numérotation est liée à chaque année

Sommaire

Année 1995

	Français	95-1
	Anglais	95-5
	Mathématiques et Sciences physiques	95-6
	Sciences biologiques fondamentales et Génie biologique	95-10
	Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etude de projet)	95-14
	Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations de génie biologique)	95-25

Année 1996

	Français	96-1
	Anglais	96-6
	Mathématiques et Sciences physiques	96-7
	Sciences biologiques fondamentales et Génie biologique	96-12
	Epreuve professionnelle de synthèse 1° partie (Etude de projet)	96-14
	Epreuve professionnelle de synthèse 2° partie (Réalisation pratique d'opérations de génie biologique)	96-21

Annales du BTS Biotechnologie

Définition de la nature des épreuves

1. Epreuve de français

Modalités de l'épreuve :

- Epreuve écrite
- Durée : 3 heures
- Coefficient : 2

Objet et contenu de l'épreuve

L'épreuve a pour but de vérifier l'aptitude du candidat, d'une part à saisir dans un texte les idées essentielles et leur organisation logique, d'autre part à s'exprimer correctement et avec simplicité.

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

Le texte proposé portera sur les problèmes de la vie moderne, problèmes de culture personnelle et de relations sociales qui peuvent intéresser un futur technicien. On tiendra compte dans le choix du texte des caractéristiques particulières du domaine professionnel auquel le candidat se destine.

Le candidat devra :

- résumer le texte en un nombre limité de mots ;
- répondre à quelques questions destinées à lui faire préciser et expliquer le sens de notions et de mots importants du texte en témoignant de la culture générale qu'il a reçue ;
- exprimer dans un commentaire succinct et composé ses vues personnelles sur l'ensemble ou sur un aspect particulier du texte.

2. Epreuve d'anglais

- Ecrit : durée = 2 heures
- Oral : durée maximale = 30 min
- Coefficient : 2

L'épreuve écrite entrera pour deux tiers et l'épreuve orale pour un tiers.

Partie écrite

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

- lire une lettre à caractère technique et en rendre compte ;
- comprendre des articles de revues spécialisées ;
- utiliser des notices, modes d'emploi, diagrammes et schémas en anglais concernant des matériels étrangers.

Cette épreuve comprendra d'abord la traduction ou le compte rendu d'un texte extrait d'un document technique ; lui fera suite la rédaction d'un texte se rapportant au sujet étudié précédemment.

Partie orale

L'épreuve consistera en un entretien avec le jury, destiné à vérifier la maîtrise des structures essentielles de la langue.

Epreuve facultative

Langue vivante II

Epreuve orale : durée maximale : 30 min

Coefficient : 1

Seuls les points au-dessus de 10 seront pris en compte pour le total obtenu par le candidat.

L'épreuve doit permettre d'apprécier les capacités du candidat :

- à lire, analyser et commenter succinctement un document se rapportant au domaine professionnel et écrit dans la langue choisie ;
- à s'exprimer convenablement dans les domaines de ses futures activités, dans cette langue.

Cette épreuve, qui pourra être précédée par une préparation de 30 minutes au maximum, consistera en un entretien avec le jury et pourra comporter la lecture et le résumé du texte par le candidat et une conversation sur ce texte.

3. Epreuve de mathématiques - Sciences physiques

- Epreuve écrite
- Durée = 4 heures
- Coefficient = 4

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

Première partie : Mathématiques (coefficient = 1,5)

Objectifs :

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

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

Nature de cette partie d'épreuve :

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

Les sujets comportent deux exercices de mathématiques recouvrant une part très large du programme. Les thèmes mathématiques qu'ils mettent en œuvre portent principalement sur les chapitres les plus utiles pour les sciences et techniques biologiques.

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

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

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

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

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

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

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

Cette seconde partie de l'épreuve doit permettre d'apprécier le niveau des connaissances en sciences physiques du candidat et son aptitude à les utiliser dans des situations concrètes proches du domaine technique où il est appelé à intervenir.

Elle comporte plusieurs questions indépendantes ou exercices indépendants.

Les questions posées se rapportent à des applications concrètes dont la compréhension ne doit faire appel qu'à des notions fondamentales du programme.

Cette épreuve doit permettre de vérifier que le candidat :

- analyse convenablement un problème posé en utilisant judicieusement ses connaissances scientifiques ;
- prend en compte l'ensemble des données et des hypothèses ;
- propose une solution justifiée par un raisonnement logique, élaborée en faisant appel au contenu du programme.

4. Epreuve de sciences biologiques fondamentale et génie biologique

- Epreuve écrite
- Durée : 4 heures
- Coefficient : 6

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

Elle comporte plusieurs questions indépendantes.

5. Epreuve professionnelle de synthèse : étude de projet et réalisation pratique d'opérations de génie biologique

- Epreuve écrite et pratique
- Durée maximale : 12 heures
- Coefficient : 12

Cette épreuve comporte deux parties obligatoires.

Première partie : Etude de projet

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

Cette partie a pour but de vérifier les capacités de réflexion en vue de la résolution d'un problème biotechnologique simple pouvant relever des domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique.

Elle doit permettre d'apprécier :

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

Deuxième partie : Réalisation pratique d'opérations de génie biologique

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

Cette partie a pour but de vérifier les savoir-faire en biotechnologie, notamment dans les domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique.

Elle est pluridisciplinaire.

Elle doit permettre de vérifier les capacités :

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

Elle peut se dérouler en plusieurs parties.

Elle comporte plusieurs questions liées ou indépendantes.

Elle a un caractère essentiellement pratique.

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

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

- Epreuve orale
- Durée maximale = 1 heure
- Coefficient = 4 (2 pour les compétences scientifiques, technologiques et professionnelles,
1 pour les compétences en français
1 pour les compétences en économie et gestion).

L'épreuve a pour but de vérifier :

1. en ce qui concerne la connaissance professionnelle et humaine de l'entreprise, si le candidat est capable de :
 - saisir les données constitutives d'une entreprise ou d'un laboratoire ;
 - comprendre le fonctionnement d'une entreprise ou d'un laboratoire sur les plans de la technique et de l'organisation ;
 - présenter les activités d'un stage en analysant les problèmes techniques rencontrés et les démarches adoptées.
2. en ce qui concerne la communication et l'expression, si le candidat est capable de :
 - dégager, ordonner et mettre en valeur les points essentiels d'un document à caractère technique ;
 - maîtriser les techniques de la communication orale devant un auditoire non familier ;
 - utiliser la langue française correctement et avec clarté.

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

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

La présentation n'excédera pas 20 minutes.

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

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

- une présentation schématique de l'établissement de stage et du déroulement du stage de deuxième année ou de l'activité professionnelle exercée dans le domaine de la biotechnologie ;

- le compte rendu d'un travail personnel ;
- une réflexion personnelle concernant l'activité professionnelle et un bilan sur ce stage ou sur cette activité professionnelle.

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

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

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

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

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

La commission de jury pour cette épreuve doit comprendre :

- un professeur de français ;
- un professeur d'économie et gestion ou de sciences et techniques économiques ;
- un professeur chargé d'enseignement technologique.

Les candidats autorisés ayant échoué à l'examen peuvent :

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

EPREUVES DE LA SESSION 1995

EPREUVE DE FRANCAIS : SYNTHESE DE DOCUMENTS
DURÉE : 4 HEURES COEFFICIENT : 2

A partir des documents ci-joints, qui évoquent les difficultés de la communication dans le monde d'aujourd'hui, vous ferez une synthèse objective, concise et ordonnée. Après quoi, dans une brève conclusion, vous donnerez votre point de vue sur la question.

DOCUMENT 1

«Méfie toi de l'homme dont le ventre ne bouge pas quand il rit.»

dicton cantonais.

L'objectif du code verbal est la transmission d'une information. Le non-verbal est utilisé pour établir et maintenir la relation interpersonnelle. C'est ce que confirme Riccoboni, acteur de la Commedia dell'arte, quand en 1738, parlant du théâtre, il déclare : *«L'art de la déclamation consiste à joindre à une prononciation variée l'expression du geste, pour mieux faire sentir toute la force de la pensée.»*

En effet, c'est la convergence et la concordance du système verbal et du non-verbal qui assurent la meilleure réception du message et la communication la plus efficace.

Le dit de la parole et le vécu du corps doivent être en congruence. Au théâtre, le bon comédien est celui qui sait jouer cet accord pour faire vivre son personnage.

Sachez que lorsqu'il y a mensonge, le non-verbal le transmet à l'insu de l'individu. Le corps est plus difficile à censurer que la parole. La bouche peut se taire, les doigts continuent à bavarder. Un individu peut simuler un sourire, mais un seul côté de sa bouche «joue le jeu». Le sourire glisse en coin. Un sourire «de façade» se transforme en grimace. *«Il existe mille orifices invisibles (...) à travers lesquels un oeil pénétrant peut voir d'un seul coup ce qui se passe dans une âme»*, écrivait Laurence Sterne.

Lorsque le président égyptien Anouar el-Sadate est venu en 1977 à la Knesset, le parlement israélien, parler du pacte d'amitié entre l'Egypte et Israël, on raconte que Jérusalem se demandait si, huit jours plus tard, les chars égyptiens ne seraient pas, une fois encore, sur les plateaux du Golan. Sachant que la discordance entre la parole et la pensée entraîne automatiquement un contre-discours corporel, les services secrets israéliens avaient décidé de filmer et d'observer Sadate de la tête aux pieds. Il peut y avoir des doigts de pieds qui manifestent leur désaccord ! L'observation directe, puis le visionnage du film ne décelèrent aucune dissonance. L'histoire l'attesta. Les accords ne furent pas rompus et Sadate paya de sa vie, le 6 octobre 1981, la signature de ce traité.

Ne devenez ni un grand inquisiteur, ni un agent de la CIA, ni du KGB, mais surveillez tout geste parasite, toute dissonance dans le discours de vos interlocuteurs. Apprenez à lire le langage du corps, vous y découvrirez le mensonge ou la vérité de la parole...

«Car à côté de la culture par mots, il y a la culture par gestes».

Antonin Artaud.

A. Oger - Stéfanink

La communication c'est comme le Chinois, cela s'apprend

DOCUMENT 2

Par son importance, la communication dans l'entreprise est devenue un élément de la stratégie que doit adopter toute organisation. Le problème à résoudre est cependant redoutable pour au moins trois raisons :

- Pendant longtemps, et en périodes de croissance notamment, ce besoin de communication n'apparaissait pas comme un impératif. En ère de vaches grasses, l'on sait que les problèmes psychologiques sont plus facilement refoulés. Il y a une dynamique de la croissance et de la réussite qui balaie tout ce qui peut apparaître comme des obstacles ou des réflexions inutiles. Actuellement, cette époque a vécu. Les difficultés à résoudre ont mis en évidence la nécessaire collaboration des hommes, laquelle passe inévitablement par une communication de qualité qui, elle-même, sous-tend la motivation ambiante.

- La deuxième raison vient du fait que tout ce qui touche l'humain est très difficile à résoudre. Les cadres français ont été plus habitués à résoudre des problèmes techniques précis que de s'occuper de «psychologie» longtemps apparue, non pas comme une technique, mais comme une «philosophie» avec le côté «rêveur» que ce mot revêt pour le profane.

- L'entreprise est à la recherche d'un nouveau modèle d'organisation. Celui d'hier a vécu. Celui de demain est en voie d'apparition. Pendant longtemps, on a vécu sur un modèle de l'entreprise 1880 modifié 1925, c'est-à-dire sur un schéma de l'entreprise industrielle modifiée par le taylorisme. C'était un modèle rationnel, héritier du XVIII^e siècle et de la philosophie des Lumières associée au culte de la raison. On se désintéressait donc naturellement de l'irrationnel. Notons que le taylorisme n'a pas seulement pénétré l'industrie, mais également les services et les administrations. Ce système a répondu avec beaucoup d'efficacité à l'attente de l'époque : il a créé des emplois par dizaines de millions, a modernisé la société, a créé des richesses au point que l'on est arrivé à critiquer les sociétés de consommation, et a permis, après la Seconde Guerre mondiale, de faire redémarrer les économies nationales.

Cependant, depuis cinq à dix ans, ce système d'organisation s'efface (cf. l'industrie automobile, la sidérurgie...). La culture taylorienne cède de plus en plus la place à la société de l'information. Le grave problème à résoudre est que cette mutation se fait très vite. Il fallait jadis une à deux générations pour passer d'un système à un autre. Actuellement, quelques années seulement sont laissées aux entreprises pour passer d'un modèle industriel à un modèle de communication.

J.P. Lehnisch

La communication dans l'entreprise

DOCUMENT 3

Les troubles psychiques pâtissent d'une image extrêmement négative dans l'esprit du grand public. En fait ce sont les gens souffrant de troubles psychiques qui sont gravement pénalisés. Dans notre monde logique et rationnel, où toute vérité doit être matérialisée et concrète, la souffrance psychique dérange, fait peur, ou pire, n'est pas crédible. «Il le fait exprès, secoue-toi, tu as tout pour être heureux, tu es paresseux, regarde ce que l'on fait pour toi, c'est de la simulation, c'est une tentative de suicide chantage...» Abrégeons. Les représentations des «maladies mentales» sont toujours effrayantes et elles engendrent la peur, donc l'intolérance et l'exclusion. La rançon pour les patients, c'est la honte, le retard dans les soins, les difficultés de réinsertion. Les conséquences pour les familles, c'est le silence, la solitude dans la peine, le sentiment d'abandon et l'interdiction de la compassion d'autrui.

Les représentations fausses sont bien évidemment le résultat d'une absence d'information ou d'une information erronée. Le «malade mental», comme on dit de manière globale, mélangeant dans une fraternelle confusion toutes les formes de souffrance psychique, est dangereux et incurable. Il est interné dans des asiles où il est soigné (sans que l'on sache bien de quels soins il s'agit) par des gens que l'on appelle les «psy» et qui sont en général aussi fous que leurs malades. Les mots «maladies mentales» pèsent d'un poids très lourd. Le public ne sait pas que 800 000 personnes sont suivies en France dans le seul secteur public pour troubles psychiques dont 73 000 sont hospitalisées tous les ans. Le public ne sait pas que personne n'est à l'abri et qu'aujourd'hui 25 % des Français connaissent dans leur entourage quelqu'un qui est en difficulté. Le public ne sait pas que la souffrance psychique va du chagrin d'amour à la schizophrénie en passant par toutes les conséquences traumatisantes des accidents de parcours de l'existence.

C'est pour ces raisons que des pays proches de la France, comme la Hollande et la Grande-Bretagne, ont développé des campagnes de communication destinées au grand public et qui ont modifié l'image, et donc le statut, des troubles psychiques. C'est pourquoi aussi quatre grands hôpitaux psychiatriques parisiens se sont associés en créant une structure, «Psycom», animée par Joël Martinez, un directeur d'établissement, et se sont lancés dans l'analyse d'image, la communication et la transformation de la représentation des troubles psychiques. C'est pour ces raisons que des associations de psychiatres, des groupes très divers de professionnels de la santé mentale multiplient les efforts pour informer le public, les journalistes, les élus locaux. C'est pour ces raisons enfin que le ministère de la Santé a décidé d'accorder une attention particulière au redressement de la vérité dans ce domaine et à l'information de l'opinion. Le jour où la réalité de ce qu'est la souffrance psychique et des formes qu'elle peut prendre sera vraiment connue, les aides et les prises en charge seront considérablement facilitées.

E. Zarifian
Des paradis plein la tête

DOCUMENT 4

L'IMPOSSIBILITE DE NE PAS COMMUNIQUER

Disons tout d'abord que le comportement possède une propriété on ne peut plus fondamentale, et qui de ce fait échappe souvent à l'attention : le comportement n'a pas de contraire. Autrement dit, il n'y a pas de «non-comportement», ou pour dire les choses encore plus simplement : on ne peut pas ne pas avoir de comportement. Or, si l'on admet que, dans une interaction(1), tout comportement a la valeur d'un message, c'est-à-dire qu'il est une communication, il suit qu'on ne peut pas ne pas communiquer, qu'on le veuille ou non. Activité ou inactivité, parole ou silence, tout a valeur de message. De tels comportements influencent les autres, et les autres, en retour, ne peuvent pas ne pas réagir à ces communications, et de ce fait eux-mêmes communiquer. Il faut bien comprendre que le seul fait de ne pas parler ou de ne pas prêter attention à autrui ne constitue pas une exception à ce que nous venons de dire. Un homme attablé dans un bar rempli de monde et qui regarde droit devant lui, un passager qui dans un avion reste assis dans son fauteuil les yeux fermés, communiquent tous deux un message : ils ne veulent parler à personne, et ne veulent pas qu'on leur adresse la parole ; en général, leurs voisins «comprennent le message» et y réagissent normalement en les laissant tranquilles. Manifestement, il y a là un échange de communication, tout autant que dans une discussion animée.

On ne peut pas dire non plus qu'il n'y ait «communication» que si elle est intentionnelle, consciente ou réussie, c'est-à-dire s'il y a compréhension mutuelle. Savoir s'il y a correspondance entre le message adressé et le message reçu appartient à un ordre d'analyse différent, quoique important, car il repose nécessairement en fin de compte sur l'estimation de données spécifiques, de l'ordre de l'introspection et du témoignage personnel, données que nous laissons délibérément de côté dans une théorie de la communication exposée du point de vue du comportement. Quant au problème de malentendu, étant donné certaines propriétés formelles de la communication, nous examinerons comment peuvent s'installer les troubles pathologiques qui y sont liés indépendamment, et même en dépit, des motivations ou intentions des partenaires.

P. Watzlawick, J. Helmick-Beavin et D.D. Jackson
Une logique de la communication

1) interaction : série de messages échangés entre des individus.

DOCUMENT 5 *A soixante-huit ans, Louis, persuadé que sa femme et ses enfants ne l'ont jamais aimé, ni compris, décide de se venger en les déshéritant au profit de son fils naturel qui vit à Paris. Juste avant son départ pour Paris, il a cette conversation avec sa femme Isa.*

- Pourquoi les détestes-tu, Louis, pourquoi hais-tu ta famille ?
 - C'est vous qui me haïssez. Ou plutôt, mes enfants me haïssent. Toi... tu m'ignores, sauf quand je t'irrite ou que je te fais peur.
 - Tu pourrais ajouter : «ou que je te torture...» Crois-tu que je n'aie pas souffert autrefois ?
 - Allons donc ! tu ne voyais que les enfants...
 - Il fallait bien me rattacher à eux. Que me restait-il en dehors d'eux (et à voix plus basse), tu m'as délaissée et trompée dès la première année, tu le sais bien.
 - Ma pauvre Isa, tu ne me feras pas croire que mes fredaines(1) t'aient beaucoup touchée... Dans ton amour-propre de jeune femme peut-être...
 Elle rit amèrement :
 - Tu as l'air sincère ! Quand je pense que tu ne t'es même pas aperçu...
 Je tressaillis d'espérance. C'est étrange à dire, puisqu'il s'agissait de sentiments révolus, finis. L'espoir d'avoir été aimé, quarante années plus tôt, à mon insu... Mais non, je n'y croyais pas...
 - Tu n'as pas eu un mot, un cri... Les enfants te suffisaient.
 Elle cacha sa figure dans ses deux mains. Je n'en avais jamais remarqué, comme ce jour-là, les grosses veines, les tavelures(2).
 - Mes enfants ! quand je pense qu'à partir du moment où nous avons fait chambre à part, je me suis privée, pendant des années, d'en avoir aucun avec moi, la nuit, même quand ils étaient malades, parce que j'attendais, j'espérais toujours ta venue.
 Des larmes coulaient sur ses vieilles mains. C'était Isa ; moi seul pouvais retrouver encore, dans cette femme épaisse et presque infirme, la jeune fille vouée au blanc(3), sur la route de la vallée du Lys.
 - C'est honteux et ridicule à mon âge de rappeler ces choses. Oui, surtout ridicule. Pardonne-moi, Louis.
 Je regardais les vignes, sans répondre. Un doute me vint, à cette minute-là. Est-il possible, pendant près d'un demi-siècle, de n'observer qu'un seul côté de la créature qui partage notre vie ? Se pourrait-il que nous fassions, par habitude, le tri de ses paroles et de ses gestes, ne retenant que ce qui nourrit nos griefs et entretient nos rancunes ? Tendence fatale à simplifier les autres ; élimination de tous les traits qui adouciraient la charge, qui rendraient plus humaine la caricature dont notre haine a besoin pour sa justification...

(1) fredaines : écarts de conduite.

(2) tavelures : taches sur la peau.

(3) au blanc : après la mort de ses deux frères (tuberculose), elle avait été placée sous la protection spéciale de la Vierge Marie par un voeu dont la marque extérieure était, dans son cas, la couleur exclusivement blanche de ses vêtements.

F. Mauriac

Le noeud de vipères

(L'usage de la calculatrice et du dictionnaire est interdit)

Green shoots* showing for transgenic rice

TRIALS of genetically engineered rice have shown encouraging progress towards commercial varieties resistant to diseases that cause serious crop losses. Rice, one of the world's staple foods*, is a monocotyledon - one of the hardest types of plant to manipulate genetically. 1

Biotechnologists in China and Japan have recently tested rice modified to fight the red stripe virus*, which can destroy entire harvests in Southeast Asia. In Texas, the first trials are about to begin on transgenic strains designed to combat a destructive beetle called the rice water weevil*. And British researchers are ready to test rice made resistant to the rice tungro virus*. No rice is naturally resistant to this virus. 5

The first transgenic rice was made in 1989 by Ko Shimamoto and colleagues at the Plantech Institute in Yokohama. That only included marker genes to show whether the gene had been successfully incorporated. The latest trials, all of them indoors, are the first involving modified rice that is of potential value to farmers. 10

Yan Yitang and colleagues from the institute of Microbiology of the Chinese Academy of Sciences in Peking used a technique called "biolistics", which involves "shooting" metal beads * coated with genetic material into cultures of cells (Technology, 2 November 1991). The researchers gave their rice plants a gene which manufactures the protein coat of the red stripe virus. 15

Tests in other transgenic plant species show that protein coats taken from viruses appear to confer protection against them, though no one knows why.

In greenhouse conditions, Yan and colleagues found that 10 of their 16 transgenic plants remained completely healthy when infected with the red stripe virus. While the other six showed symptoms of infection, these were much milder than those afflicting the 100 control plants. 20

"We are very pleased with the results, but we need to take it further," says Yan. Presently, farmers have to use expensive insecticides to kill the small brown planthopper* (*Laodelphax striatellus*) that spreads the virus from plant to plant. "These genetically engineered plants will open up a new way," he says. 25

Yan's team is the only one to have transformed Indica varieties of rice, grown throughout Asia and the former Soviet Union, which account for four-fifths of the world's rice harvest and are the staple food for about two billion people. It has proved the trickiest* variety to transform ; biolistics provides the only way to do it. 30

All the other trials are on Japonica rice, a variety grown commercially in the West and Latin America. These were genetically modified by inserting the new DNA through pores in protoplasts, rice cells which have been stripped of their cell walls. 30

Shimamoto's team also protected their Japonica varieties against red stripe virus by inserting the gene which makes the viral protein coat. They even managed to breed 220 second-generation plants that carried the foreign gene and were all resistant to the virus. 35

Meanwhile in Texas, Tim Hall and colleagues at the Texas A&M University have equipped Japonica rice plants with a gene taken from a bean (*Phaseolus vulgaris*). The DNA codes for the manufacture of arcelin, a protein lethal* to the rice water weevil (*Lissorhoptrus oryzophilus*). This is a significant pest in Texas, which produces a quarter of the US's rice harvest. Trials are about to begin at the university's Beaumont Experimental Station. 40

Hall is working with teams at the University of Nottingham and the John Innes Institute in Norwich, which is about to test Japonica rice modified with the protein coat of the rice tungro virus.

FOOTNOTES :

Andy Coghlan
The New Scientist - 12 June 1993

- | | | |
|-----------------------|---|-----------------------------|
| (titre) green shoot | : | bourgeon - plante naissante |
| £ 2 staple food | : | nourriture de base |
| £ 4 red stripe virus | : | virus à rayures rouges |
| £ 6 rice water weevil | : | charançon du riz |
| £ 7 rice tungro virus | : | virus Tungro |
| £ 14 bead | : | perle |
| £ 23 planthopper | : | sorte de sauterelle |
| £ 28 tricky | : | difficile, malaisé |
| £ 38 lethal | : | mortel |

Le candidat traitera les deux sujets.

I - Compte-rendu en langue française - (10 points)

Vous rédigerez un compte rendu du texte en faisant ressortir les idées essentielles.
(entre 200 et 250 mots)

II - Rédaction en anglais - (10 points)

This article illustrates some positive applications of biotechnology as specifically concerns rice plants.

Give other examples in the field of agriculture.

Does biotechnology sometimes go too far? Going beyond the agricultural domain, are there real or potential risks that should be considered?

EPREUVE DE MATHÉMATIQUES ET SCIENCES PHYSIQUES
DURÉE : 4 HEURES COEFFICIENT : 4

1ÈRE PARTIE : MATHÉMATIQUES

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

EXERCICE 1 - (8 points) -

Le but de cet exercice est l'étude statistique du diamètre des feuilles d'une plante médicinale au moment où une résine pharmaceutique les utilise dans la préparation d'un médicament.
On admet que la variable aléatoire X qui à chaque feuille associe son diamètre suit une loi normale de moyenne m et d'écart type σ .

A. Une étude portant sur un échantillon de 70 feuilles choisies au hasard dans la cueillette d'une journée a donné les résultats suivants :

Diamètre en cm	[4,5]	[5,6]	[6,7]	[7,8]	[8,9]	[9,10]	[10,11]
Effectif	2	8	14	20	16	6	4

- A1. Donner des valeurs approchées de la moyenne \bar{x} et de l'écart-type σ_n de cet échantillon. Le regroupement en classes induit une erreur de méthode. Aussi les résultats demandés seront donc donnés au dixième près.
- A2. Donner une estimation de la moyenne m et de l'écart - type σ de la population.
- A3. Déterminer un intervalle de confiance de la moyenne de la population au risque de 5 %.

- B. On admet que la variable aléatoire X suit une loi normale de moyenne $m = 7,5$ cm et d'écart-type $\sigma = 1,4$ cm.
Seules les feuilles dont le diamètre est inférieur à 8 cm sont utilisables.
- B1. Calculer la probabilité P qu'une feuille prise au hasard soit utilisable. Le résultat sera arrondi au millième le plus proche.
- B2. On prélève par tirage au hasard un échantillon de 100 feuilles. Soit Y la variable aléatoire représentant le nombre de feuilles utilisables.
On prend dans la suite de l'exercice $P = 0,64$.
- B2a. Justifier le fait que Y suit une loi binômiale, préciser ses paramètres.
- B2b. On veut approcher la loi de Y par une loi normale.
1. Quels sont les paramètres de cette loi normale.
 2. Calculer $P(Y < 70)$ et $P(Y > 60)$.

EXERCICE 2 - (12 points) -

Dans l'étude d'un phénomène on considère les variations de deux grandeurs x et y en fonction du temps t . Ces grandeurs vérifient les relations :

$$\begin{cases} x' = \frac{dx}{dt} = -x + 4y & (1) \\ y' = \frac{dy}{dt} = 0,6x - 1,8y & (2) \end{cases}$$

avec les conditions initiales :

$$\begin{cases} x(0) = 0 & (3) \\ y(0) = 0,8 & (4) \end{cases}$$

- A1.a. En utilisant (1) exprimer y en fonction de x et x' .
- A1.b. Dédire du 1.a. l'expression de
- $$y' = \frac{dy}{dt} \text{ en fonction de } x' \text{ et } x'' = \frac{d^2x}{dt^2}$$
- A2. En reportant les expressions de y et y' trouvées au 1.a. et au 1.b. dans l'équation (2) établir une équation différentielle du second ordre vérifiée par x .
- A3.a. Déterminer la solution générale de l'équation différentielle du second ordre :
- $$x'' + 2,8x' - 0,6x = 0 \quad (E)$$
- où x est une fonction du temps $t \geq 0$.
- A3.b. En utilisant les relations (1), (3) et (4) calculer $x'(0)$.
En déduire l'expression de $x(t)$ en tenant compte des conditions initiales.
- A3.c. En déduire l'expression de $y(t)$ puis de $y'(t)$.

B. Soit f la fonction définie sur $[0; 10]$ par

$$f(t) = x(t) - y(t) = 0,7 e^{0,2t} - 1,5 e^{-3t}.$$

Soit C la courbe représentative de f dans un repère orthogonal (O, i, j) (Unités : 1 cm en abscisse et 2 cm en ordonnée).

B1. Etudier les variations de f sur $[0; 10]$ et donner le tableau de variation de f .

B2. Recopier et compléter le tableau suivant dans lequel les résultats seront arrondis au millièème le plus proche.

t_i	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$f(t_i)$	-0,8	0,780									

B3. Construire soigneusement C pour $t \in [0; 10]$.

2ÈME PARTIE : SCIENCES PHYSIQUES

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

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

I - FIBRE OPTIQUE (15 points)

Une fibre optique "à saut d'indice" est constituée d'un coeur cylindrique d'indice $N_1 = 1,55$ entouré d'une gaine optique d'indice $N_2 = 1,48$ (voir figure 1).

coupe longitudinale

coupe transversale

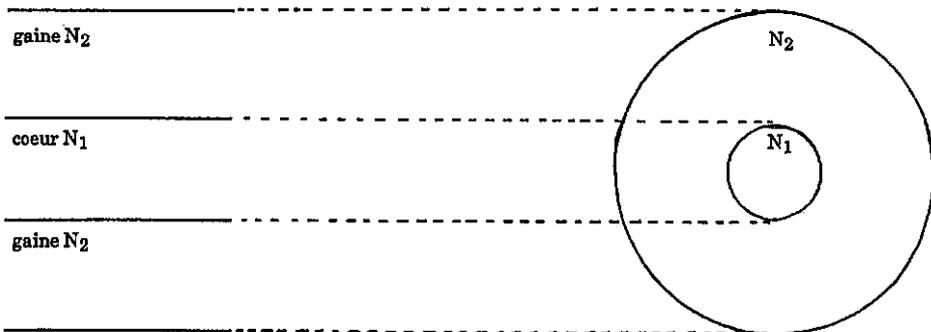


Figure 1

1) Quelle condition doit remplir l'angle i pour que le rayon R puisse se propager dans le coeur d'indice N_1 (voir figure 2).

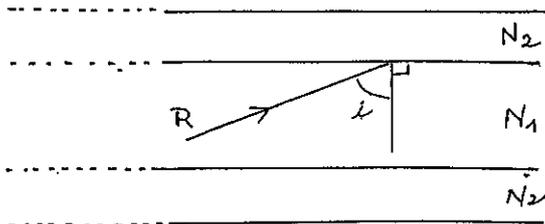


Figure 2

Faire l'application numérique

- 2) Un rayon lumineux, provenant de l'air d'indice égal à 1, frappe la face d'entrée de la fibre sous une incidence $\alpha = 25^\circ$ (voir figure 3). Ce rayon peut-il se propager par réflexion totale à l'intérieur de la fibre? Justifier.

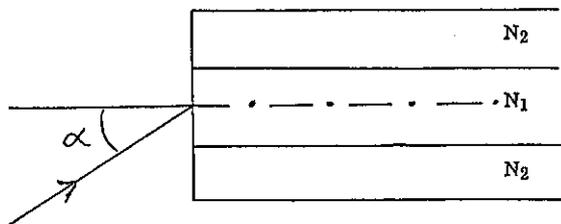


Figure 3

- 3) Montrer que la propagation par réflexion totale est possible tant que l'angle α vérifie la condition

$$\sin \alpha < (N_1^2 - N_2^2)^{1/2}$$

Calculer la valeur maximale de α correspondante.

II - THERMOCHEMIE (20 points)

On considère l'équilibre : $\text{SO}_2(\text{gaz}) + 1/2 \text{O}_2(\text{gaz}) \rightleftharpoons \text{SO}_3(\text{gaz})$ que l'on étudie à 673 K.

- 1) On se propose de déterminer, de deux façons différentes, la valeur de la constante d'équilibre relative aux pressions partielles, soit K_p .
- Utiliser la valeur de la variation d'enthalpie libre standard à 673 K pour déterminer K_p .
 - À 673 K, alors que la pression totale à l'équilibre est de 1 bar, on étudie l'évolution d'un mélange qui ne contient initialement que les réactifs $\text{SO}_2(\text{gaz})$ et $\text{O}_2(\text{gaz})$ mélangés dans les proportions stoechiométriques.
Des mesures permettent d'établir qu'à l'équilibre, 98 % du dioxyde de soufre présent au départ a disparu. Déterminer K_p .
- 2) Dans quel sens l'équilibre est-il déplacé si l'on augmente la pression, la température étant maintenue constante? Justifier.

- 3) Dans quel sens l'équilibre est-il déplacé si l'on augmente la température, la pression étant maintenue constante? Justifier.

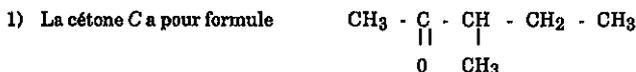
Données : les données thermodynamiques standard sont prises à 673 K.

* $R = 8,314 \text{ S.I.}$ * pour l'équilibre étudié : $\Delta G_r^\circ = - 34,7 \text{ kJ. mol}^{-1}$

* $\Delta H_f^\circ (\text{SO}_2\text{g}) = - 207 \text{ kJ. mol}^{-1}$ * $\Delta H_f^\circ (\text{SO}_3\text{g}) = - 396 \text{ kJ. mol}^{-1}$

* $\Delta H_f^\circ (\text{O}_2\text{g}) \approx 0$

III - CHIMIE ORGANIQUE (15 points)



- 1.a. Nommer ce composé.
- 1.b. Identifier le carbone asymétrique et faire la représentation du composé en configuration absolue.
- 2) L'ozonolyse suivie d'une hydrolyse d'un alcène A produit C et de l'éthanal. Donner la formule semi-développée, dans la configuration E, et le nom de A.
- 3) On réalise la cétolisation de C par le méthanal en catalyse basique.
- 3.a. La première étape consiste en la formation d'un carbanion par le départ d'un "hydrogène en α ". Justifier la mobilité de cet hydrogène et donner la formule des deux carbanions susceptibles de former.
- 3.b. Donner le nom et la formule semi-développée des cétoles pouvant être obtenus par cette réaction.

EPREUVE DE SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GENIE BIOLOGIQUE	DURÉE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 6
--	-------------------------	------------------------

Calculatrices non autorisées.

LES BIOTECHNOLOGIES AU SERVICE DE L'ENVIRONNEMENT

Les biotechnologies peuvent jouer un rôle important dans la lutte pour la sauvegarde de l'environnement. Elles interviennent dans l'évaluation, le traitement biologique et la prévention de la pollution.

Le sujet se propose d'envisager quelques aspects de ces différents domaines.

I. - CONTROLE ET EVALUATION DE LA POLLUTION 60 points

Les biotechnologies permettent de mettre au point des sondes spécifiques : enzymatiques, nucléiques ou immunologiques pour la détection de substances polluantes.

1.1. Sondes enzymatiques

1.1.1. Rappel de quelques propriétés des enzymes.

Le document en annexe présente la structure du monomère de la D glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de *Bacillus stearothermophilus* lié à son cosubstrat. Cette enzyme possède une bonne stabilité à la température.

1.1.1.1. Commenter ce document en dégagant l'organisation structurale de la protéine. Citer les liaisons stabilisatrices mises en jeu. Montrer la relation entre la structure d'une enzyme et sa fonction.

1.1.1.2. La "demi-vie" d'une enzyme à une température donnée est l'un des paramètres qui permet de caractériser sa thermostabilité. Définir ce paramètre et indiquer comment il peut être déterminé expérimentalement.

1.1.2. La réalisation de biocapteurs enzymatiques met en jeu une (des) enzyme(s) immobilisée(s).

1.1.2.1. Citer les techniques d'immobilisation d'une enzyme.

1.1.2.2. Exposer le principe de la fixation covalente d'une enzyme sur un support insoluble et donner un exemple de méthode utilisable. Indiquer les avantages et les inconvénients de cette technique d'immobilisation.

1.2. Sondes nucléiques

L'utilisation de sondes nucléiques se développe, notamment pour la détection rapide de microorganismes pathogènes dans l'eau ou les aliments.

Les oligosondes froides sont de plus en plus utilisées. La détection à l'aide d'une sonde nucléique met en jeu une hybridation spécifique. Pour effectuer cette hybridation, la température de fusion constitue un paramètre important.

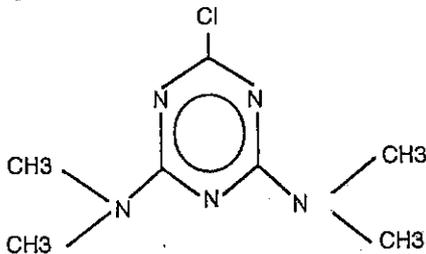
1.2.1. Définir la température de fusion d'un ADN et montrer comment elle peut être déterminée expérimentalement.

1.2.2. Qu'est-ce qu'une oligosonde et comment l'obtient-on ?

1.2.3. Qu'appelle-t-on sonde froide ? Donner le principe de la mise en évidence de l'hybridation avec ce type de sondes.

1.3. Sondes immunologiques

La détection dans l'eau potable de l'atrazine, herbicide utilisé massivement et dont la structure est donnée ci-dessous, peut être réalisée par méthode ELISA.



1.3.1. Préciser le principe et les conditions de la méthode ELISA par compétition.

1.3.2. Indiquer la démarche expérimentale nécessaire à l'obtention d'un sérum polyclonal anti-atrazine.

1.3.3. Préciser le rôle de l'antigène dans les processus conduisant à la synthèse d'anticorps.

1.4. Cytotoxicité

Le caractère toxique de certaines molécules peut être établi par étude toxicologique. La toxicologie cellulaire utilise comme modèle expérimental des cellules animales en culture, des lignées "immortelles" cultivées en présence d'une atmosphère enrichie en CO_2 . Un test de cytotoxicité permet de déterminer la dose létale 50 (DL 50).

- 1.4.1. Indiquer le principe d'une méthode d'immortalisation des cellules en culture.
- 1.4.2. Justifier la présence de CO_2 dans l'atmosphère de culture. En fonction de quelle(s) donnée(s) fixe-t-on le pourcentage de CO_2 ?
- 1.4.3. Exposer le principe d'une méthode de détermination de la DL 50 d'une substance.

2. - DEPOLLUTION BIOLOGIQUE 40 points

Le traitement des eaux usées met en oeuvre des transformations métaboliques effectuées par des micro-organismes, notamment des bactéries. D'autres organismes (bactériophages, protozoaires, nématodes) participent également au traitement des eaux usées.

2.1. Principales voies du métabolisme hétérotrophe.

La biodégradation des composés organiques polluants peut être effectuée en aérobie ou en anaérobie.

- 2.1.1. Indiquer dans chaque cas :
 - les lieux de synthèse de l'ATP
 - les modes de régénération des coenzymes réduits en coenzymes oxydés.
 - la nature de l'accepteur final d'électrons.
- 2.1.2. Quels sont les devenir possibles des atomes de carbone C ?
- 2.1.3. Rassembler sous forme d'un schéma simplifié les grandes voies du catabolisme des composés glucidiques.

2.2. Application au traitement des eaux usées

Des procédés de traitement des eaux usées alternant des étapes aérobie et anaérobie sont actuellement mis en oeuvre.

- 2.2.1. Indiquer sous quelles formes chimiques se présente la pollution azotée des eaux usées
- 2.2.2. Expliquer l'intervention des différents types bactériens dans ces étapes pour éliminer ces différentes formes de pollution.

2.3. Les bactériophages

La limitation de la biomasse bactérienne dans le bassin d'aération des boues activées est assurée par différents phénomènes, dont la lyse par les bactériophages. Parmi ces phages, certains sont capables de provoquer deux types d'interactions avec les cellules bactériennes : cycle lytique et lysogénie.

- 2.3.1. Sous forme d'un schéma commenté, décrire le cycle lytique.
- 2.3.2. Expliquer ce qu'est le phénomène de lysogénie en prenant comme exemple le phage lambda et la bactérie *Escherichia coli*.

3. - PREVENTION DES POLLUTIONS 20points

Les biotechnologies peuvent également intervenir dans la réduction des sources de pollution, par la mise en oeuvre de procédés de fabrication moins polluants ou par la diminution de la toxicité des produits utilisés (par exemple, les biopesticides peuvent remplacer les pesticides traditionnels).

- 3.1. Citer un biopesticide en précisant son mode de production et son rôle en agronomie.
- 3.2. Une autre approche peut consister en l'obtention de plantes transgéniques, capables par exemple de se protéger directement contre les insectes.
On peut utiliser le plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* pour transférer un gène étranger dans une cellule végétale.

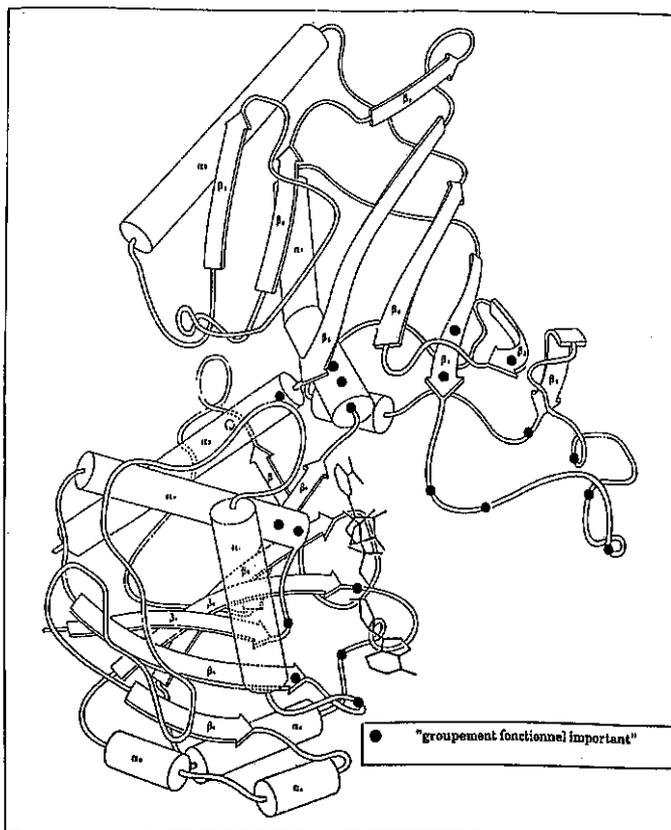
Expliquer les étapes de la préparation du vecteur recombinant et de son introduction dans la cellule végétale.

- 3.3. De quelles autres méthodes dispose-t-on pour transférer un gène chez un végétal et obtenir une plante transgénique ? Indiquer le principe de chacune d'elles.

ANNEXE

document n°1

Structure du monomère
de la D glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
de *Bacillus stearothermophilus*



in La Recherche n°158 juin 1984

L'usage du dictionnaire bilingue anglais-français est autorisé.

LA CALMODULINE

PROTOTYPE DES CALCIPROTEINES

La calmoduline (CaM) est une petite protéine soluble présente dans le cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes.

Il s'agit d'une calciprotéine qui reconnaît et fixe sélectivement les ions calcium comme d'autres protéines du même type (Troponine C des cellules musculaires des mammifères, Parvalbumine des poissons, reptiles et batraciens...).

Ces protéines agissent entre autres comme des intermédiaires qui activent des enzymes dépendant du calcium et sont responsables des effets du "Signal Calcium".

Les calmodulines participent ainsi à de nombreuses fonctions physiologiques telles que division et mobilité cellulaires, contraction musculaire et sécrétion.

L'étude de la structure et des activités biologiques des calmodulines est une condition préalable indispensable à des applications importantes en thérapeutique humaine.

1. PURIFICATION ET ETUDE STRUCTURALE DE LA CALMODULINE (23 points)

Les tableaux 1A et 1B du Document 1 donnent la composition en acides aminés de calmodulines d'origines diverses, ainsi que la composition en acides aminés de quelques calciprotéines.

Le principe et le résultat d'une focalisation isoélectrique de la calmoduline sont présentés sur le Document 2.

Le Document 3 décrit une technique de purification de la calmoduline par chromatographie d'affinité sur Melittine - Sépharose.

1.1. Composition en acides aminés de différentes calmodulines et de quelques calciprotéines (Document 1 et Document 2)

- Comparer brièvement les calmodulines entre elles. (tableau 1 A).
- Montrer quels sont les acides aminés majoritaires.
Ce résultat est-il compatible avec celui du Document 2 ? (Justifier la réponse)
Comparer brièvement la composition en acides aminés de la calmoduline et des autres calciprotéines. (tableau 1 B).

1.2. Purification de la calmoduline (Document 3)

- 1.2.1. Résumer ce texte en indiquant, de manière schématique les différents temps et les principaux réactifs de la chromatographie sur Melittine - Sépharose. Quel est le rôle précis de l'EGTA ?
- 1.2.2. Calculer la masse de chlorure de calcium CaCl_2 à ajouter dans l'échantillon de calmoduline déposé en tête de colonne.
($\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O} = 147 \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- 1.2.3. Commenter les courbes et les électrophorogrammes correspondants et représentés au-dessus dans la figure 3.
- 1.2.4. Déterminer précisément la masse moléculaire de la calmoduline à partir des résultats du Document 3.

2. CALMODULINE ET GÉNIE GÉNÉTIQUE (18 points)

L'extraction et la purification de la calmoduline par les techniques biochimiques classiques est un travail long et délicat. Aussi, dès que les techniques d'isolement des gènes et de clonage furent maîtrisées, de nombreuses équipes ont essayé de produire la calmoduline par génie génétique. Les bactéries ont été les premières cellules hôtes utilisées pour assurer la production, puis le choix s'orienta vers les cellules de mammifères.

2.1. Production de la calmoduline par *E.coli*

Divers types de vecteurs d'expression peuvent être utilisés pour faire produire à *E.coli* la calmoduline ou toute autre protéine, par exemple, un vecteur type plasmide pBR322 modifié présentant les caractéristiques consignées sur le Document 4.

Préciser ces caractéristiques.

2.2. Production de la calmoduline par les cellules de mammifères.

Les cellules choisies sont des cellules de la lignée C 127 provenant d'une tumeur mammaire de souris.

L'utilisation des cellules eucaryotes permet l'étude de l'expression et de la régulation du gène de la calmoduline *in vivo*.

Les vecteurs choisis pour cette production sont dérivés du virus du papillome bovin (BPV).

Ce virus peut se répliquer sous forme épisomique dans la cellule hôte et contient des gènes capables de transformer les cellules de souris, ce qui facilite la sélection des cellules transfectées.

2.2.1. Justifier le choix d'un virus comme vecteur de transfection.

2.2.2. Trois vecteurs ont été construits pour amorcer l'étude des propriétés physiologiques de la calmoduline.

Le Document 5 présente la construction de ces trois vecteurs BPV-CM, BPV-MCM II et BPV-Mac I.

Sous forme d'un tableau, regrouper les éléments utilisés pour construire chacun de ces trois vecteurs.

2.2.3. Sélection des cellules transfectées.

Après extraction de l'ADN des cellules transfectées, la technique de Southern va permettre d'identifier les cellules qui contiennent l'ADN de BPV.

L'ADN total des cellules transfectées est extrait par une technique semblable à celles utilisées pour les minipréparations de plasmides.

De ce fait, l'ADN du virus reste intact alors que l'ADN chromosomique, de haute masse molaire, est fragmenté.

2.2.3.1. A partir du protocole de la méthode de Southern exposé dans le Document 6, identifier les étapes importantes de la manipulation et expliquer le rôle de chacune d'elle.

Présenter la réponse sous forme d'un organigramme.

2.2.3.2. Pourquoi l'ADN des cellules transfectées ne peut-il être simplement analysé par une hydrolyse suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose ?

2.2.3.3. Quelle sonde faut-il utiliser pour caractériser les cellules transfectées ?

3. PRODUCTION DE CALMODULINE PAR GÉNIE FERMENTAIRE (14 points)

Cette production a été réalisée par culture d'une souche d'*E.coli* en fermenteur de 300 litres sur milieu synthétique HM.

La souche résulte de la transformation d'*E.coli* par un vecteur d'expression type pBR322 modifié dans lequel a été cloné l'ADNc de la calmoduline.

La calmoduline, protéine intracellulaire, est récoltée par lyse des cellules bactériennes, extraction et purification.

L'objectif de la culture est donc l'obtention d'une masse cellulaire importante.

La mise en œuvre de la fermentation est présentée dans le Document 7.

3.1. Pourquoi utilise-t-on deux milieux de culture différents (LB et HM) lors des étapes préliminaires au lancement du fermenteur de production.

La composition des milieux figure dans le Document 8.

- 3.2. Tracer la courbe de croissance de la souche d'*E.coli* en utilisant les résultats expérimentaux proposés dans le Document 9.
Déterminer le temps de génération G et la vitesse spécifique de croissance maximum.
- 3.3. Déterminer le rendement de croissance $Y \frac{x}{S}$ pendant la phase exponentielle à l'aide des données du Document 9.

4. PRODUCTION ET UTILISATION D'ANTICORPS ANTI-CALMODULINE (25 points)

La calmoduline est une protéine dépourvue d'activité enzymatique. Des techniques immunologiques, faisant appel à des anticorps anti-calmoduline, sont donc particulièrement utiles pour étudier les concentrations cellulaires et tissulaires de la calmoduline, son renouvellement dans les cellules, sa localisation et ses fonctions.
On se propose d'étudier préalablement quelques aspects de la production et de l'utilisation d'anticorps anti-calmoduline.

4.1. Production d'un immunosérum anti-calmoduline.

Le Document 10 fournit le protocole d'immunisation.

- 4.1.1. Pourquoi est-il important que la calmoduline utilisée soit homogène d'un point de vue électrophorétique ?
- 4.1.2. Schématiser le protocole d'immunisation.
Pourquoi réalise-t-on plusieurs injections successives ?
Indiquer le rôle de l'adjuvant de Freund.

4.2. Caractérisation des anticorps anti-calmoduline.

A partir de l'immunosérum obtenu, les anticorps anti-calmoduline ont été purifiés par chromatographie d'affinité. Pour caractériser la spécificité de ces anticorps, on étudie leur liaison à la calmoduline et à d'autres calciprotéines.
On peut doser la calmoduline en déterminant son action sur l'activité d'enzymes calmoduline-dépendantes. La calmoduline active en particulier une phosphodiésterase (PDE) qui catalyse l'hydrolyse de l'AMP cyclique (AMPc).

Le Document 11 présente deux expériences où l'on mesure l'effet des anticorps purifiés sur l'activité d'une phosphodiésterase calmoduline-dépendante.

- 4.2.1. Commenter le graphe du Document 11A. Que peut-on en déduire sur les anticorps précédemment préparés ?
- 4.2.2. Dégager sous forme d'un tableau les facteurs expérimentaux testés dans l'expérience du Document 11B (expérience 2).
Quelles conclusions peut-on tirer sur les conditions d'activité de la phosphodiésterase d'une part, et sur la spécificité des anticorps purifiés d'autre part ?
- 4.3. Dosage de la calmoduline par radioimmunologie.

Un dosage radioimmunologique de la calmoduline a été mis au point avec les anticorps précédemment purifiés. Le Document 12A fournit le protocole utilisé et les courbes de référence.

- 4.3.1. Exposer le principe du radioimmunos dosage utilisé en précisant les paramètres qui doivent être fixés dans l'expérience.
- 4.3.2. Justifier l'allure de la courbe obtenue avec les différentes calmodulines.
Comparer les résultats obtenus avec les différentes protéines testées et conclure quant à l'utilisation de ce dosage.

4.4. Comparaison du dosage de la calmoduline par radioimmunologie et du dosage via la phosphodiesterase.

Le Document 12B présente les résultats du dosage de la calmoduline dans différents tissus par les deux méthodes. Formuler une hypothèse pouvant expliquer la différence entre les résultats donnés par les deux méthodes.

DOCUMENT 1

TABLEAU 1 A

AMINO ACID COMPOSITIONS OF CALMODULINS

	Bovine (residues/ molecule)	<i>Acanth- amoeba</i> (residues/ molecule)	<i>Tetra- hymena</i> (residues/ molecule)	<i>Dictyo- stellum</i> (residues/ molecule)	Spinach leaf (residues/ molecule)
Asp	23	21	23	23	24
Thr	12	9	11	10	9
Ser	4	7	4	7	4
Glu	27	27	25	27	27
Pro	2	2	2	2	2
Gly	11	11	11	11	10
Ala	11	10	11	10	11
l-Cys	0	0	0	0	1
Val	7	8	6	8	8
Met	9	8	8	9	8
Ile	8	8	9	8	7
Leu	9	11	12	10	11
Tyr	2	1	1	2	1
Phe	8	9	8	8	9
His	1	1	2	1	1
TmL	1	1	1	0	1
Lys	7	9	7	8	9
Trp	0	0	0	0	0
Arg	6	6	6	6	5

TmL residue of ϵ -N-trimethyllysine.

TABLEAU 1 B

AMINO ACID COMPOSITIONS OF VARIOUS Ca^{2+} -BINDING PROTEINS

Residue	Calmod- ulin	Trop- onin C	21K CaPB	Calci- neurin B	S-100 α	S-100 β	Parval- bumin
Lysine	8	9	16	15	9	8	16
Histidine	1	1	3	2	2	5	2
Arginine	6	7	9	6	0	1	1
Aspartic acid	23	22	21	28	13	9	15
Threonine	12	6	8	3	4	3	5
Serine	4	7	17	11	5	5	11
Glutamic acid	27	31	27	22	15	19	10
Proline	2	1	6	3	0	0	0
Glycine	11	13	19	14	6	4	9
Alanine	11	13	12	5	8	5	11
Cysteine	0	1	3	0	1	2	0
Valine	7	7	8	13	8	7	5
Methionine	9	10	5	6	2	3	2
Isoleucine	8	10	8	11	1	4	6
Leucine	9	9	13	14	11	8	10
Tyrosine	2	2	5	3	2	1	0
Phenylalanine	8	10	11	12	5	7	9
Tryptophan	0	0	2	0	1	0	0

DOCUMENT 2

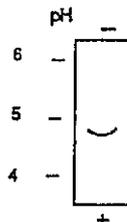
DOCUMENT 2 A

Isoelectric focusing

This technique allows separation of molecules purely on the basis of their charge characteristics. We have noted that every polyampholyte has an isoelectric point, at which its net charge is zero. It is possible to set up, in a gel, a stable pH gradient covering a pH range that includes the electric points of the various polyampholytes in a mixture. This is done by using a mixture of low molecular weight ampholytes as the gel buffer. These produce a gradient of pH between the electrodes. In such a gradient, each polyampholyte molecule migrates to the position of its isoelectric point. At that position its net charge becomes zero, so it remains there.

DOCUMENT 2 B

Résultat de la focalisation isoélectrique de la calmoduline



DOCUMENT 3

The Use of Melittin-Sepharose Chromatography for Purification of Calmoduline

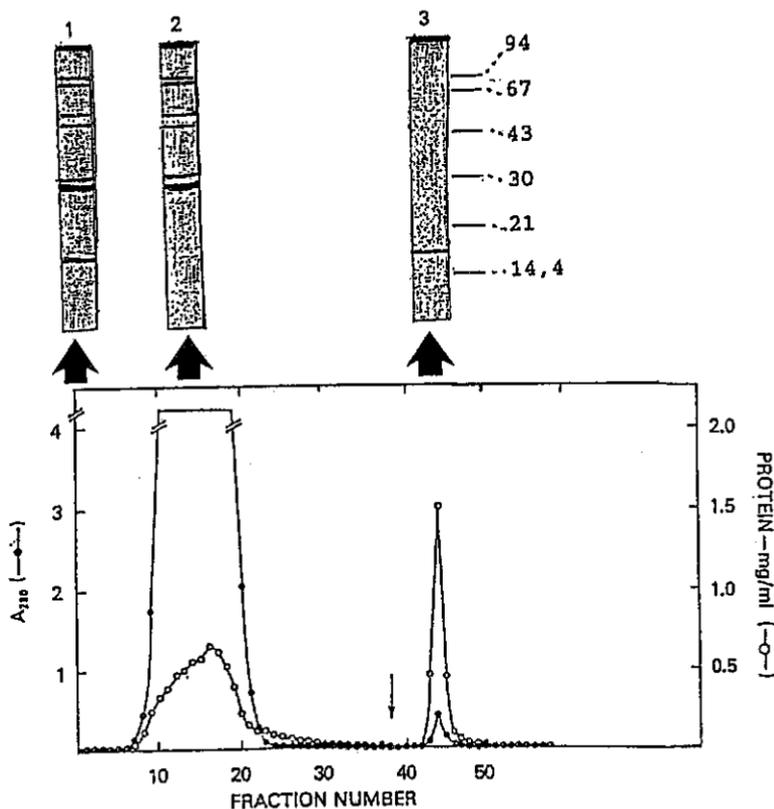
Melittin, the major component of bee venom, is a 26 amino acid peptide which is amphipathic ; it contains a long stretch of hydrophobic residues, a single aromatic residue (tryptophan) and several positively charged side chains clustered near the carboxyl terminus.

The affinity of melittin for CaM was estimated to be in the nanomolar range. Because of this high binding constant, as well as its well-defined properties and availability, it seemed an appropriate ligand for the Ca⁺⁺ -dependent affinity chromatography of CaM and perhaps other Ca⁺⁺ -binding proteins. Data indicates that melittin is immobilized to the beads in its monomeric form and that CaM can interact and be eluted without obvious problems such as steric hindrance or diminished recovery. The preferred ligand density for most applications would appear to be 5 - 10 mg melittin/ml gel, since this would permit both batchwise adsorption from extracts as well as concentration of partially purified CaM.

When the fraction was applied to a column of melittin - Sepharose in the presence of Ca⁺⁺, CaM was selectively retained while contaminating protein and nucleotide passed through. Minor amounts of nucleotide may interact with positively charged groups on the melittin - Sepharose ; however, these can be eliminated by washing step with 0,5 M NaCl. After addition of 2 mM EGTA, CaM was eluted, indicating efficient reversal of the Ca⁺⁺ -dependent protein-peptide association. This purified fraction appeared homogenous by sodium dodecyl sulfate (SDS)-gel electrophoresis (inset, line 3) and its ultraviolet absorption spectrum showed essentially complete removal of nucleotide present in the starting material.

- bee venom = venin d'abeille
- hindrance = empêchement
- beads = billes

DOCUMENT 3 (suite)

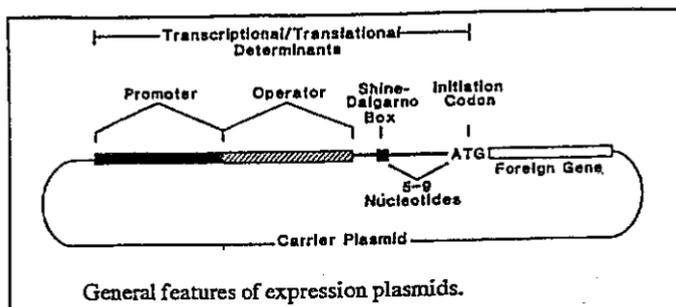


Purification of CaM by affinity chromatography on melittin-Sephacrose. Partially purified CaM (47 mg in 52 ml) was adjusted to 1 mM CaCl₂ and applied to a column (2.5 × 8 cm, 40 ml) of melittin-Sephacrose (0.6 mg melittin/ml gel) equilibrated in buffer A. After washing with 100 ml of buffer A containing 0.5 M NaCl (final concentration) at a flow rate of 120 ml/hr, the column was eluted (flow rate, 60 ml/hr) with 100 ml of buffer B; this is indicated by the arrow. Fractions (5 ml) were collected and assayed for protein (○) or absorbance at 280 nm (●). SDS-Gel electrophoresis of the starting material (4 μg), material not retained on the column (2.2 μg), and the EGTA eluate (4 μg) are shown in the inset, lanes 1, 2, 3 respectively. Positions of molecular weight standards (Pharmacia) run on the same gel are indicated on the right (phosphorylase a, 94 kDa; bovine serum albumin, 67 kDa; ovalbumin, 43 kDa; carbonic anhydrase, 30 kDa; soybean trypsin inhibitor, 21 kDa; α-lactalbumin, 14.4 kDa).
 buffer A (25 mM BES, pH 7.0, containing 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃, and 250 mM NaCl), columns were eluted with three bed volumes of buffer A lacking Ca²⁺ and containing 2 mM EGTA and 10% glycerol (buffer B).

EGTA = Ethylene glycol bis (β-amino-ethyl ether) N - N' tetraacetic acid

BES = (N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethanesulfonic acid; 2-[bis(2-Hydroxyethyl)amino]ethanesulfonic acid)
 pKa = 7.1 at 25°C; useful pH range 6.4-7.8.

DOCUMENT 4



DOCUMENT 5

We have utilized three different BPV-based CaM expression vectors to study the effect of changes in intracellular CaM levels on cellular function. The vectors BPV-CM and BPV-MCM II both contain a CaM minigene whose expression is regulated by either a CaM promoter (BPV-CM,), or by the human metallothionein IIa promoter (BPV-MCM II). A minigene construction was used since it, permitted the removal of the first two large introns of the CaM genomic sequence (8 kb in total), thus allowing a smaller vector to be produced.

A third vector, BPV-Mac I, contains a portion of a CaM cDNA placed in an inverted orientation, 3' to the mouse metallothionein I promoter, allowing the production of CaM anti-sense RNA when cells transformed with this vector are cultured in the presence of Zn^{2+} . BPV-Mac I contains the entire BPV genome. All three vectors are cloned in pML2 (a pBR322 derivative) for replication in *Escherichia coli*.

DOCUMENT 6

For Southern blot analysis, 10 μ g of total DNA is digested with the appropriate restriction enzyme, and electrophoresed in a 1% agarose gel.¹⁵

Following electrophoresis, the gel is soaked in denaturing solution (1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH)¹⁵ for 30 min, rinsed for 5 min in 3 M sodium acetate, and the DNA transferred to Biohyne A filters.¹⁶ After transfer, the filter is air dried, and baked for 2-3 hr at 68°. Prehybridization is for 1 hr at 42° in a solution of 5 \times SSC (20 \times SSC = 3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0), 5 \times Denhardt's, 50 mM sodium phosphate (pH 6.5); 50% deionized formamide, 0.1% SDS, and 200 μ g per μ l yeast rRNA. A ³²P-labeled probe is prepared by the oligo-labeling method.¹⁷ The specific activity is typically 1-2 \times 10⁹ cpm/ μ g. Before use, the probe DNA is denatured by heating at 95° for 4 min, followed by rapid cooling on ice. Hybridization using 20 \times 10⁶ cpm of the labeled probe is carried out for 18 hr, in a solution of the same composition as that used for prehybridization.

Filters are washed for 5 min in each of four changes of 2 \times SSC, 0.1% SDS at room temperature, and for 15 min in each of two changes of 0.1 \times SSC, 0.1% SDS at 55°. The filter is sealed in a food storage bag, and exposed to Kodak XAR-5 film at -70° using two intensifying screens. Exposure time is typically 2 hr.

DOCUMENT 7

en oeuvre de la fermentation

ur 1 :

- ensemencer la culture d'E.coli conservée par congélation à 0° C dans un erlenmeyer contenant 50 ml de milieu LB.
- Incuber toute la journée à 37° C sous agitation .
- En fin de journée mesurer l'absorbance de la culture à 600 nm
- Inoculer 500 ml de milieu HM par 5 ml de cette culture et cultiver 24 heures à 37° C sous agitation .

ur 2 :

- A 16 heures mesurer l'absorbance de la culture à 600 nm .
- Utiliser les 500 ml de cette culture pour ensemercer le fermenteur de 14 litres contenant du milieu HM (volume utile : 10 litres)
- Laisser se dérouler la culture toute la nuit dans les conditions suivantes :
 - * agitation : 400 rpm
 - * débit d'air : 10 l.min⁻¹
 - * température : 37° C
 - * pH : 7.2 régulé par NH₄OH à 10 %

ur 3 :

- A 8 heures mesurer l'absorbance de la culture à 600 nm .
- Ensemercer le fermenteur de 300 litres contenant du milieu HM (volume utile 200 litres).
- Laisser se dérouler la culture toute la journée dans les conditions suivantes :
 - * agitation : 300 rpm
 - * aération : 200 l.min⁻¹
 - * température : 37° C
 - * pH : 7.1 régulé par NH₄OH à 10 %
- Arrêter la culture en fin de journée lorsque l'absorbance atteint une valeur proche de 25 .
- Centrifuger en continu à - 4° C , à 17000 g.
- Congeler la pâte cellulaire ainsi obtenue à - 80° C après découpage .

DOCUMENT 8

Composition des milieux de culture

Milieu LB

pour 1 litre de milieu :

yeast extract.....5g
tryptone10g
NaCl.....5g

Milieu HM

pour 1 litre de milieu :

K₂HPO₄.....24g
KH₂PO₄.....10g
(NH₄)₂SO₄.....5g
MgSO₄, H₂O.....0.1g
Oligoéléments1ml
Vitamine B1.....1mg
Glycérol.....24 ml

DOCUMENT 9

ETUDE DE LA CROISSANCE DE E.COLI EN MILIEU HM.

Temps (h)	Absorbance	Glycérol (g/l)
0	0,58	14,6
0,75	0,82	14,4
1,75	1,14	14,2
2,75	1,65	13,9
4,75	4	12,2
5,75	5,4	11,25
6,75	7,95	9,5
7,75	11,2	7,2
8,75	20	4,1
9,25	23	1,1
9,75	26	0,5
10,75	26,75	0,05
11,75	27	0

A 11,75 heures, après centrifugation, on obtient 4,7Kg de pâte cellulaire.

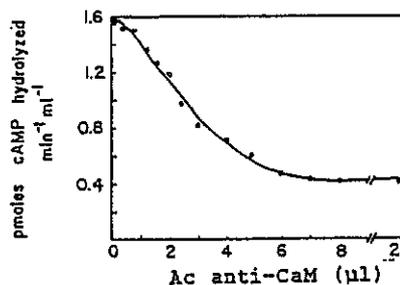
DOCUMENT 10

Protocole d'immunisation

Electrophoretically homogenous rat testis calmodulin was prepared. The protein solution was emulsified in an equal volume of either complete Freund's adjuvant (initial injection) or incomplete Freund's adjuvant (subsequent injections) and injected subcutaneously into an adult sheep. 10 mg of calmodulin was injected on day 0, followed by 2 mg injections on days 42, 56, 70. The sheep was bled on day 84 (600 ml of blood). The blood was allowed to clot and the serum was stored in aliquots at -90°C .

DOCUMENT 11

DOCUMENT 11A

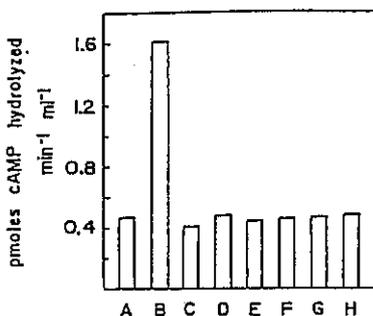


Effet des anticorps anti-calmoduline sur l'activité d'une phosphodiesterase calmoduline-dépendante. Expérience 1.

16 ng de calmoduline de rat et différentes quantités des anticorps anti-calmoduline précédemment purifiés (Ac anti-CaM) sont incubés 3 heures à 37°C dans un tampon approprié. La phosphodiesterase calmoduline-dépendante (PDE) est ensuite ajoutée et après 15 minutes la réaction enzymatique est déclenchée par l'addition d'AMPc.

DOCUMENT 11 B

Effet des anticorps anti-calmoduline sur l'activité d'une phosphodiesterase calmoduline-dépendante. Expérience 2.



- A : PDE + 100 μ M Ca^{2+}
- B : PDE + 100 μ M Ca^{2+} + 16 ng CaM
- C : PDE + 0,025 μ M Ca^{2+} + 16 ng CaM
- D : PDE + 100 μ M Ca^{2+} + 16 ng CaM + 5 μ l Ac anti-CaM
- E : PDE + 100 μ M Ca^{2+} + 320 ng troponine C
- F : PDE + 100 μ M Ca^{2+} + 320 ng parvalbumine
- G : PDE + 100 μ M Ca^{2+} + 320 ng troponine C + 16 ng CaM + 5 μ l Ac anti-CaM
- H : PDE + 100 μ M Ca^{2+} + 320 ng parvalbumine + 16 ng CaM + 5 μ l Ac anti-CaM.

Les incubations ont été réalisées comme dans l'expérience 1. Troponine C et parvalbumine sont ajoutées au même moment que la calmoduline.

PDE = phosphodiesterase calmoduline-dépendante

CaM = calmoduline

Ac anti-CaM = anticorps anti-calmoduline

100 μ M Ca^{2+} = le tampon contient 100 μ mol/l de calcium

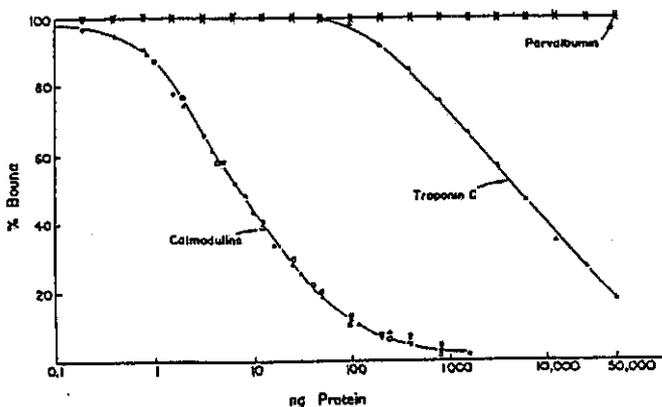
DOCUMENT 12

DOCUMENT 12 A

Radioimmunos dosage de la calmoduline : réalisation des courbes de référence.

Réactifs : - anticorps anti-calmoduline précédemment purifiés
- calmoduline de rat marquée à l'iode 125 (^{125}I -calmoduline)
- calmodulines de différentes origines, troponine C, parvalbumine
- tampon RIA

Protocole : Pour chacune des protéines (calmoduline ou troponine C ou parvalbumine) on réalise une série de dilutions et pour chaque dilution l'essai suivant :
- A 100 μl de dilution sont ajoutés 300 μl de tampon RIA contenant 10000 cpm d' ^{125}I -calmoduline et 100 μl d'anticorps. Le mélange est incubé 2 heures à 25°C puis la nuit à 4°C.
- Les complexes antigène-anticorps sont précipités par l'addition de 10 μl de protéine A à 10 % suivie d'une incubation 30 minutes à 25°C. Le culot, obtenu par centrifugation 15 minutes à 10000 g, est lavé trois fois par du tampon RIA.
- La radioactivité du culot est mesurée avec un compteur gamma. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité mesurée quand on réalise l'essai avec ^{125}I -calmoduline + anticorps seuls.



Origine des calmodulines : ● testicules de rat
□ cerveau de boeuf
■ anémone de mer
▲ arachide

Comparison of calmodulin levels from various sources as determined by the radioimmunoassay and phosphodiesterase assay.

Equal aliquots from the same tube of each sample were assayed for calmodulin by both assays. Calmodulin levels are expressed as nanograms per μl of sample.

	Radioimmunoassay	Phosphodiesterase assay
	<i>ng/μl</i>	
Rat heart	3.5	1.2
Rat liver	12.0	5.4
Rat brain	21.0	14.7
Rat testis	29.0	26.0
Rabbit polymorphonuclear leukocytes	45.0	9.0
<i>D. discoideum</i> (moisissure)	1.3	0
<i>C. reinhardtii</i> (algue)	4.9	0

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE
B : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE
DURÉE : 8 HEURES COEFFICIENT : 8

Documents personnels non autorisés.

ÉTUDE DE QUELQUES ASPECTS DE LA PRODUCTION ET DE L'UTILISATION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE D'*ESCHERICHIA COLI*

Phosphatase alcaline = Pho A

Le sujet comporte 3 parties indépendantes :

PREMIER JOUR (durée : 6 h + 1 heure de repas)

La même solution enzymatique (PhoA) sera utilisée dans les parties 1 et 2.

1. CINÉTIQUE DE DENATURATION THERMIQUE DUNE ENZYME SOLUBLE ou IMMOBILISÉE : Pho A

PhoA catalyse la réaction :



pNPP = paranitrophényl phosphate de sodium

pNP = para nitrophénol

pNP absorbe la lumière à 420 nm, $\epsilon_{420}^{\text{pNP}} = 1850 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ à pH = 9,8.

Remarque : la solution de pNPP ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) est préparée dans du tampon Tris HCl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 9,8 ; le trajet optique est de 1 cm.

Une cinétique concernant l'enzyme soluble et une autre concernant l'enzyme immobilisée seront à effectuer devant un examinateur .

1.1. Détermination de l'activité enzymatique initiale de PhoA soluble

- Dans une cuve, introduire :
 - 2 mL de pNPP à 20 mmol.L⁻¹
 - 0,5 mL de MgCl₂ à 10 mmol.L⁻¹
- Préincuber quelques minutes à 37°C.
- Déclencher la réaction en ajoutant 20 µL de PhoA.
- Mesurer les variations d'absorbance à 420 nm en fonction du temps :
 - durée 30 s en méthode automatique,
 - ou 2 min en méthode manuelle.
- Déterminer l'activité de PhoA soluble en UI.mL⁻¹

1.2. Immobilisation de PhoA par inclusion dans des billes d'alginate

- Dans un tube à centrifuger contenant 15 mL d'alginate de sodium à 1,5% (m/v), ajouter 100 µL de la solution PhoA.
 - Bien homogénéiser à l'aide d'un agitateur de verre.
 - Centrifuger 3 min à 500 g afin de dégazer la solution.
 - Transvaser la solution visqueuse dans une seringue montée sur un support.
 - Laisser tomber goutte à goutte dans un bécher contenant 150 à 200 mL environ d'une solution de CaCl₂ à 2% (m/v) placée à 4°C.
 - Incuber les billes formées au moins 1 heure à température ambiante afin qu'elles atteignent un état de dureté suffisant.
 - Récupérer les billes par filtration (passoire, gaze ou autre...)
 - Rincer les billes avec environ 10 mL de tampon Tris-HCl pH 9,8.
 - Tarer chacun des 6 tubes.
 - Répartir équitablement les billes à l'aide d'une spatule fine dans les 6 tubes à hémolyse.
 - Déterminer la masse de billes contenues dans chaque tube et la masse totale des billes.
- Remarque : Eviter que les billes restent trop longtemps à l'air.**

1.3. Détermination de l'activité enzymatique initiale de PhoA immobilisée

Réaliser simultanément un essai (tube à hémolyse n°1 contenant PhoA immobilisée) et un témoin réactif (tube T).

- Préincuber les 2 tubes à hémolyse à 37°C.
 - Préincuber les solutions (MgCl₂ 10 mmol.L⁻¹ et pNPP 20 mmol.L⁻¹) à 37°C.
 - Dans chaque tube, introduire :
 - 0,5 mL de MgCl₂ 10 mmol.L⁻¹
 - 2 mL de pNPP à 20 mmol.L⁻¹
 - Bien homogénéiser au vortex pendant 5 s exactement.
 - Placer rapidement les tubes à 37°C et déclencher immédiatement le chronomètre.
 - Après 5 min, homogénéiser au vortex pendant 5 s.
 - Prélever la phase liquide du tube n°1. La conserver dans la glace jusqu'aux mesures.
 - Mesurer l'absorbance de la phase liquide à 420 nm contre le témoin réactif (T).
- Calculer l'activité enzymatique en UI.g⁻¹.

1.4. Réalisation des cinétiques de dénaturation et détermination des activités enzymatiques résiduelles.

PhoA soluble et PhoA immobilisée sont traitées à 70°C. Les temps d'incubation à 70°C sont de 30 s, 1, 2, 3 et 5 min.

1.4.1. Dénaturation

1.4.1.1. Dénaturation de PhoA soluble

- Utiliser 5 nouveaux tubes à hémolyse (A, B, C, D et E).
- Dans chaque tube, introduire 50 μL de PhoA.
- Boucher par du coton cardé.
- Placer les tubes dans un bain thermostaté à 70°C et déclencher le chronomètre.
- Après des temps : 30 s, 1, 2, 3 et 5 min, retirer les tubes du bain thermostaté et les plonger immédiatement dans la glace.

1.4.1.2. Dénaturation de PhoA immobilisée

- Reprendre les tubes n°2 à 6 contenant PhoA immobilisée (préparés en 1-2)
- Dans chaque tube, ajouter 0,5 mL de MgCl_2 à 10 mmol.L^{-1}
- Boucher par du coton cardé.
- Placer les tubes dans un bain thermostaté à 70°C et déclencher le chronomètre.
- Après des temps : 30 s, 1, 2, 3 et 5 min, retirer les tubes du bain thermostaté et les plonger immédiatement dans la glace.

1.4.2. Détermination des activités enzymatiques résiduelles

1.4.2.1. Détermination de l'activité enzymatique soluble résiduelle

- Préincuber les solutions (MgCl_2 à 10 mmol.L^{-1} et pNPP 20 mmol.L^{-1}) à 37°C.
- Préincuber les tubes A, B, C, D et E à 37°C.
- Dans chaque tube, introduire :
 - 0,5 mL MgCl_2 à 10 mmol.L^{-1}
 - 2 mL pNPP à 20 mmol.L^{-1}
- Mesurer immédiatement les variations d'absorbance à 420 nm en fonction du temps (comme en 1.1.)

Calculer les activités enzymatiques résiduelles en UI.mL^{-1} .

1.4.2.2. Détermination des activités enzymatiques immobilisées

Réaliser en parallèle un témoin réactif (tube T') identique à celui du 1.3. et les 5 essais (tubes n°2 à 6 contenant PhoA immobilisée)

- Préincuber la solution de pNPP à 37°C.
- Préincuber tous les tubes à 37°C.
- Dans chaque tube, ajouter 2 mL de pNPP à 20 mmol.L^{-1} .
- Mélanger à l'aide d'un vortex pendant 5 s.
- Replacer les tubes à 37°C et déclencher le chronomètre.
- Attendre 5 min.
- Homogénéiser au vortex pendant 5 s et prélever rapidement le surnageant.
- Mesurer l'absorbance à 420 nm contre le témoin réactif T'.

Calculer les activités enzymatiques immobilisées résiduelles en UI.g^{-1} .

COMPTE-RENDU

1. En raisonnant sur les quantités d'enzymes en UI apportées et récupérées lors de l'immobilisation, déterminer le pourcentage d'immobilisation.
2. Pour PhoA soluble et PhoA immobilisée, présenter les résultats expérimentaux sous forme de tableau.
(Indiquer les activités initiales, les activités résiduelles, les rapports activité résiduelle/activité initiale exprimés en pourcentage, en fonction des temps d'incubation à 70°C).
3. A l'aide d'un ordinateur ou sur papier millimétré, tracer, pour PhoA soluble et pour PhoA immobilisée, sur le même graphe, les courbes pourcentage d'activité résiduelle par rapport à l'activité initiale en fonction du temps de dénaturation.
- Analyser et interpréter ce graphe.
4. Sur le graphe, déterminer le T1/2 (temps pour lequel l'activité enzymatique est divisée par 2) pour PhoA soluble.
Déterminer, sur le graphe la valeur de l'activité résiduelle à ce temps pour PhoA immobilisée.

2. ELECTROPHORESE DENATURANTE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE (PAGE – SDS ; TECHNIQUE DE LAEMMLI)

On veut déterminer la masse moléculaire de PhoA en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (gel de résolution : T = 12 % (m/V), C = 2,67 % (m/m)).
Les divers gestes techniques seront réalisés devant un examinateur.

2.1. Quantification de l'échantillon PhoA

- Diluer PhoA soluble au 1/10e dans du tampon A.
- Mesurer l'absorbance à 280 nm.
- Evaluer la concentration en protéine.
(On donne : 1 UA₂₈₀ correspond à : 1 mg.mL⁻¹ de protéine).
- Ajuster éventuellement la solution diluée de manière à ce que la concentration en protéine soit comprise entre 0,2 et 0,5 mg.mL⁻¹.

2.2. Préparation des échantillons PhoA et Etalon

- Les échantillons sont
- Pho A dilué
 - Une solution étalon contenant des protéines de masse moléculaire connue.
- Rediluer PhoA et l'étalon au 1/4 dans du tampon B (tampon de charge dénaturant).
 - Au moment de l'emploi, chauffer au bain-marie bouillant pendant 4 min.

2.3. Dépôt des échantillons et électrophorèse

- Effectuer un dépôt de 10 µL d'étalon à côté de 10µL de PhoA dénaturé.
- Faire migrer environ 35 minutes sous une tension constante de 200 V.

3. ASPECTS MICROBIOLOGIQUES DE LA PRODUCTION

3.1. Vérification des caractéristiques phénotypiques de la souche productrice "S"

Différentes souches peuvent produire de la phosphatase alcaline.

- A partir de la culture pure de souche productrice, fournie sur gélose ordinaire (repérée " S") :
. réaliser
 - un examen microscopique (*)
 - un test enzymatique approprié (*)et interpréter les résultats.

. réaliser un isolement sur gélose ordinaire et ensemercer les milieux mis à disposition pour la vérification des caractères cultureux et biochimiques. Justifier ces recherches.

(*) Les résultats seront montrés aux examinateurs, la rédaction correspondante sur le compte rendu étant déjà effectuée.

3.2. Recherche de contaminants en cours de fermentation

A partir du tube repéré "F" contenant un échantillon du milieu de fermentation en cours de production :

- réaliser un examen microscopique (montrer celui-ci à un examinateur), interpréter et exploiter le résultat ,
- réaliser les isolements jugés utiles sur les milieux mis à disposition,
- justifier les choix effectués.

DEUXIEME JOUR (durée : 2 h)

2. ELECTROPHORESE DENATURANTE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Détermination de la masse moléculaire de PhoA.

Donnée :

La phosphatase alcaline, majoritaire, est constituée de deux sous-unités identiques. Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie et contrastés, éventuellement séchés ou photographiés.

La composition de l'étalon est fournie en annexe.

Questions : exploitation des résultats de l'électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide.

- Dresser un tableau consignnant les masses moléculaires et les R_t (lysozyme) des protéines étalons.
- Exploiter de même la ou les bandes de l'extrait de PhoA.

- Quelle est la masse moléculaire de la protéine de la bande la plus intense ?
- Quelle est la masse moléculaire de la phosphatase alcaline native ?

Justifier les réponses.

Annexes :

1/

Protéine	Masse moléculaire M en kD
Phosphorylase B de muscle de lapin	97,4
Sérumalbumine bovine	66,2
Ovalbumine d'oeuf de poule	45 μ g
Anhydrase carbonique bovine	31
Inhibiteur trypsique de soja	21,5
Lysozyme d'oeuf de poule	14,4

2/

$$R_t = \frac{\text{distance de migration de la protéine X}}{\text{distance de migration du témoin}}$$

3. ASPECTS MICROBIOLOGIQUES DE LA PRODUCTION

3.1. Identification de la souche productrice "S".

- Déterminer le profil numérique de la souche et identifier celle-ci.
- Observer les résultats et vérifier l'identification obtenue par une démarche dichotomique et exposer celle-ci dans le compte-rendu.

3.2. Recherche de contaminants en cours de fermentation

- Observer les cultures obtenues.
- Réaliser les tests enzymatiques nécessaires.
- Présenter et exploiter les résultats en justifiant une orientation possible de l'identification du contaminant.

Oapi 20 €

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	ortho-nitro-phenyl-galactoside	β-galactosidase	incolora	jaune (1)
ADH	arginine	arginine dihydrolase	jaune	rouge/orangé (2)
LDC	lysine	lysine décarboxylase	jaune	orangé
DOC	ornithine	ornithine décarboxylase	jaune	rouge/orangé (2)
[CIT]	citrate de sodium	utilisation du citrate	vert pâle/jaune	bleu-vert/bleu (3)
H ₂ S	thiosulfate de sodium	production d'H ₂ S	incolora/ grisâtre	dépôt noir/ fin fissuré
URE	urée	uréase	jaune	rouge/orangé
TDA	tryptophane	tryptophane desaminase	TDR / Immédiat	
			jaune	marron foncé
IND	tryptophane	production d'indole	JAMES/ immédiat ou IND/ 2 mn	
			JAMES	JAMES
			incolora	rose
			Vert pâle-jaune IND jaune	IND Anneau Rouge
[VP]	pyruvate de sodium	production d'acétolactone	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
[GEL]	gélatine de Kohn	gelatinase	incolora	rosé-rouge
			non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU ₂	glucose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
MAN	mannitol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
INO	inositol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
SOR	sorbitol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
RIHA	rhamnose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
SAC	saccharose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
MEL	melibiose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
ARA	arabinose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
OX	sur papier filtre	cytochrome-oxydase	OX / 1-2 mn	
			incolora	violet
NO ₃ -NO ₂	tube GLU	production de NO ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 mn	
			jaune	rouge
			Zn	
			rouge	jaune
MOB	(RPI M) (microscope)	mobilité	immobile	mobile
MAC	milieu de MacConkey	culture sur	absence	présence
OF	glucose (RPI OF)	fermentation : sous huile oxydation : à l'air	vert	jaune
			vert	jaune

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Une couleur orange apparaissant APRÈS 24 H d'incubation doit être considérée négative.

(3) lecture dans le cupule (zone aérobie)

(4) le fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans le cupule.

EPREUVES DE LA SESSION 1996

EPREUVE DE FRANÇAIS : SYNTHÈSE DE DOCUMENTS
DURÉE : 4 HEURES COEFFICIENT : 2

Vous ferez une synthèse objective, concise et ordonnée des documents ci-joints sur le mythe du cow-boy.
Dans une brève conclusion, vous donnerez votre point de vue sur la question.

DOCUMENT 1

ALBUMS

On m'a dit la vie au Far-West et les Prairies,
Et mon sang a gémi : «Que voilà ma patrie !...»
Déclassé du vieux monde, être sans foi ni loi,
Desperado ! là-bas, là-bas, je serai roi !...
Oh là-bas, m'y scalper de mon cerveau d'Europe !
Piaffer, redevenir une vierge antilope,
Sans littérature, un gars de proie, citoyen
Du hasard et sifflant l'argot californien !
Un colon vague et pur, éleveur, architecte,
Chasseur, pêcheur, joueur, au-dessus des *Pandectes*(1),
Entre la mer, et les Etats Mormons(2) ! Des venaisons
Et du whisky ! vêtu de cuir, et le gazon
Des Prairies pour lit, et des ciels des premiers âges
Riches comme des corbeilles de mariage !...
Et puis quoi ? De bivouac en bivouac, et la Loi
De Lynch(3) ; et aujourd'hui des diamants bruts aux doigts,
Et ce soir nuit de jeu, et demain la refuite
Par la Prairie et vers la folie des pépites !...
Et, devenu vieux, la ferme au soleil levant,
Une vache laitière et des petits-enfants...
Et, comme je dessine au besoin, à l'entrée
Je mettrai : «Tatoueur des bras de la contrée» !
Et voilà. Et puis, si mon grand coeur de Paris
Me revenait, chantant : «Oh ! pas encor guéri !
«Et ta postérité, pas pour longtemps coureuse !...»
Et si ton vol, Condor des Montagnes Rocheuses,
Me montrait l'Infini ennemi du confort,
Eh bien, j'inventerais un culte d'Age d'or,
Un code social, empirique et mystique
Pour des Peuples Pasteurs, modernes et védiques(4) !...
Oh ! qu'ils sont beaux les feux de paille ! qu'ils sont fous,
Les albums ! et non incassables, mes joujoux !...

Jules LAFORGUE (1860-1887)

Des Fleurs de bonne volonté, 1890

(1) *Pandectes* : recueils de lois

(2) *Mormons* : membres d'un mouvement religieux installés dans l'Utah

(3) *Loi de Lynch* : aux Etats Unis, procédure expéditive à l'égard des criminels

(4) *védiques* : en rapport avec les livres sacrés de l'Inde. Dans le contexte lire :
attachés à des traditions sacrées et immémoriales.

DOCUMENT 2

FILTER CIGARETTES



Marlboro

20 CLASS A CIGARETTES

Publicité Marlboro parue dans la presse française
dans les années 1980

Aucun mythe n'est plus répandu, intégré dans la fibre culturelle contemporaine que celui du western. A l'aube du 21^e siècle, il est fascinant qu'un contexte historique plus que centenaire conserve une telle actualité, une telle vitalité. Par les comportements et les aspirations, la mode vestimentaire et même le type d'alimentation qu'il diffuse, le western est devenu une référence mondiale, l'étoffe d'un rêve omniprésent.

Le vêtement le plus populaire de la planète est le blue-jean, image de marque du cow-boy. Et le vêtement n'est-il pas le signe le plus manifeste de l'image que l'on désire projeter ? Avec la popularité du jean, les émules des cow-boys se comptent par centaines de millions. Comment expliquer cette emprise universelle ? Deux facteurs, semble-t-il, entrent surtout en jeu : la puissance archétypale du mythe et le contexte technoculturel de notre siècle.

Du chevalier au cow-boy

Le cow-boy est en fait l'héritier démocratique de la figure mythique du chevalier. Il évoque les innombrables légendes qui ont suivi de tout temps et en tout lieu la domestication du cheval, mais en les adaptant au grand public moderne.

Le chevalier est celui qui maîtrise sa nature animale. Par là, il s'élève au-dessus des autres hommes, jouit d'une puissance, d'une mobilité, d'une liberté supérieures. C'est à lui qu'incombe la haute responsabilité de rétablir la justice, de défendre le faible et l'opprimé. Mais il est vulnérable, car s'il vacille, il tombe de haut, et solitaire, car n'est pas chevalier qui veut. L'attrait du mythe chevaleresque vient de ce qu'il y a en chaque homme un double rêve de maîtrise de soi et de prolongation de la justice. Pendant longtemps ce rêve est resté inaccessible au plus grand nombre.

Avec les révolutions américaine et française, le grand principe de l'égalité des hommes va s'imposer partout, transformant les mentalités. L'idéal romanesque du western vient à point nommé se substituer à un mythe par trop élitiste. La dignité et la liberté du cavalier sont désormais à la portée de l'imaginaire de chacun, hors de toute distinction de caste ou de rang social. Un personnage du Nouveau Monde, le cow-boy, se greffe ainsi sur un mythe ancien et s'apprête à fasciner la terre entière.

Gary N.GRANVILLE, "Le courrier de l'Unesco", Sept. 1989

«J'ai toujours agi seul comme un cow-boy» conduisant son troupeau, un cow-boy entrant seul dans une ville sur son cheval, sans même un pistolet, parce qu'il ne vient pas pour tirer. Il agit, se trouvant au bon endroit au bon moment.» Telle est l'étrange confiance que fit Henry Kissinger à la célèbre journaliste italienne Oriana Fallaci en décembre 1972, alors que les succès diplomatiques de l'«ambassadeur» du président Nixon le plaçaient au sommet de la popularité. Qu'un brillant sujet de Harvard puisse se comparer sans ambages aux héros des westerns de série B nous laisse songeurs. Mais, pour les Américains d'aujourd'hui, cette référence incarne, mieux qu'aucune autre, les valeurs traditionnelles de leur pays.

Ainsi donc, après avoir été conquis au siècle dernier, l'Ouest, avec ses paysages, ses figures légendaires et ses valeurs propres, a fini par conquérir le continent tout entier. Alors que le développement industriel, l'urbanisation et une forte immigration transformaient l'Est en une véritable ruche, au-delà du Mississippi triomphait encore une civilisation rurale. L'implantation des industries minières n'y change rien : l'Ouest, c'est le royaume des espaces, des chevauchées, des Indiens, de la violence - une image que véhiculent journalistes et voyageurs. Il est entré dans les mœurs. On s'en réclame, on l'affiche : d'honorables sénateurs débarquant du train à Washington en bottes et *stetson*(1) de cow-boy, parfois le colt à la ceinture...

Voici plus d'un siècle que cette contrée mythique nourrit les rêves de millions d'Américains. La légende de l'Ouest est d'abord apparue dans la littérature bon marché, le roman de quat' sous, le *dime novel*. Le précurseur en la matière s'appelait Ned Buntline. Lors d'un voyage dans les Plaines, il avait rencontré un jeune éclaireur «*vaniteux comme une jolie femme*», William F. Cody (1846-1917). Buntline bavarde avec Cody devant une bouteille de whisky. A son retour, les lecteurs du *New York Weekly* découvrent «*un héros de l'Ouest*» : Buffalo Bill est né. Buntline a lancé une mode. Romans-feuilletons et magazines se remplissent d'histoires invraisemblables, celles que tous les hâbleurs de l'Ouest - et ils sont nombreux - se plaisent à brailler dans les *saloons*. A la fin du XIXe siècle, l'image héroïque de l'Ouest a envahi tous les esprits.

La figure du cow-boy émerge de ce maelström(2) au cours des années 1880. Il représente alors la génération des constructeurs d'une nation puissante et dynamique. En 1902, un ancien élève de Harvard, Owen Wister, publie *Le Virginien* : le cow-boy a trouvé son Victor Hugo. Ce roman se vend pendant trois ans à plus de trois cent mille exemplaires : on ne compte plus les rééditions. Wister offre à l'Amérique un personnage à sa mesure : grand, le teint clair, les yeux bleus, beau parleur, le courage du «*Virginien*» n'a d'égal que son sens de l'honneur. Adroitement, l'auteur a cherché à réconcilier l'Est et l'Ouest. Comme l'indique le titre, le héros n'est pas né dans l'Ouest ; il a même reçu une éducation de gentleman avant de devenir cow-boy. Il joint à l'esprit chevaleresque un individualisme farouche hérité des pionniers. De cette conjonction naît un vrai Américain dont les «*ennemis sont à la fois Wall Street et les syndicats*» (préface à l'édition de 1911).

Philippe JACQUIN, "L'Histoire", n°133, mai 1990

- | | | |
|---------------|---|------------------------|
| (1) Stetson | : | chapeau à larges bords |
| (2) maelström | : | tourbillon |

LES MYTHES DE LA REALITE

DOCUMENT 5

Comment fabrique-t-on un cow-boy ?

Ce qui a séduit les Américains, c'est le côté sauvage. Dans les années 1870, les journalistes venaient couvrir les guerres indiennes et croisaient ces bandes de jeunes, les cow-boys - terme encore péjoratif. Ces hommes ont un mode de vie qui n'existe pas dans l'Est : le nomadisme - un homme à cheval - qui s'éteint lentement ailleurs. Les représentants de la culture industrielle sont attirés par ce mode de vie pastoral, témoin de l'équilibre de l'homme dans le milieu naturel. Les journalistes ont ainsi fait croire que le cow-boy vivait de façon très saine, en osmose avec la nature. Le travail proprement dit va être déformé puisqu'on supprime le côté paysan. Pour une partie de l'élite du Nord-Est américain, le monde rural est méprisé, peuplé de gens rustres et brutaux. Le cow-boy reste socialement supérieur, il est à cheval. Les vaches "ne font" pas très "esthétique". La peinture, la littérature, la photo vont préférer valoriser et accentuer l'aspect dynamique, la jeunesse. En même temps elles vont développer le mythe de la vie libre.

Au départ, le côté brutal va faire plaisir aux romantiques de l'Est qui aiment cette espèce d'anarchisme. Le caractère rousseauiste attire, l'indépendance, la vie sans loi. [...]

Le cow-boy est un personnage des villes. Les journalistes, les écrivains vont enraciner le cow-boy dans une tradition américaine du roman, qui avait déjà forgé des personnages exceptionnels. Le cow-boy va être intégré aux trappeurs, aux chasseurs d'Indiens, pour en faire un héros. Certains écrivains vont même astucieusement l'intégrer à des personnages de la vie urbaine : le confidence man. Par ce biais on met en garde contre la ville, contre laquelle il faut se forger une moralité.

Le western au cinéma ne fera d'ailleurs que réutiliser ce mythe, les scénarios copiant les romans de la littérature populaire. Quand le western arrive au début du siècle, le personnage est déjà en place : il ne s'occupe plus de bétail. Il est armé - alors qu'en réalité il ne l'était pas - , il est blond aux yeux bleus, un WAPS - alors que la plupart sont métis, noirs. Le cow-boy établit le lien ainsi entre l'Amérique pastorale des premiers temps, et une Amérique industrielle.

- Ces hommes de l'Est sont-ils hostiles aux Indiens ?

Ils inventent leur Indien, comme leur cow-boy, pour pérenniser la hiérarchie sociale soutenue par l'archétype américain où tout le monde peut réussir. Il suffit de se conformer à ce mythe, de ne pas le critiquer, aujourd'hui il recouvre l'histoire américaine, mais aussi d'autres valeurs de la société occidentale. Cette image englobe une forme de vie et une forme de loisirs où la nature est un lieu de ressourcement de valeurs. Les quartiers pour ces "ouvriers agricoles" étaient minables.

- Sur place, la ségrégation par l'argent est plus forte que la ségrégation raciale, on le voit bien dans les villes du bétail.

Le quartier pour les cow-boys - red light district - est réservé pour le plaisir avec des saloons minables, des prostituées. Le sol est en terre battue, ils sont mal éclairés, l'alcool est frelaté. Les saloons plus confortables accueillent les propriétaires. [...]

La ségrégation a lieu en ville et dans les ranchs, mais peu sur la piste, comme sur les chantiers de nos villes. En revanche les cow-boys de couleur sont moins payés pour un travail identique.

- Et aujourd'hui que reste-t-il du cow-boy américain ?

Dans l'Ouest américain on continue à faire de l'élevage, rationalisé, semi-extensif. Les troupeaux sont surveillés à cheval et en hélicoptère. On a creusé de vastes puits dont on pompe l'eau par éolienne dans les nappes phréatiques.

Le rodéo est devenu un spectacle machiste, sensé démontrer la virilité, la force, le courage des hommes. Il n'a plus beaucoup de liens avec le métier d'éleveur.

- Et ce mythe est-il toujours porteur ailleurs que dans l'Ouest ?

Bien sûr, comme chez nous Jeanne d'Arc, Du Guesclin, Napoléon. Le succès du film "Impitoyable" le montre bien. Il casse un peu le mythe en présentant des héros négatifs, mais casser le mythe le renforce. C'est un signifiant historique, le fait que l'Amérique de 1992 fasse de son meilleur film un western avec des cow-boys, un Indien. Clint Eastwood porte parfaitement l'image du cow-boy dont on parlait : yeux bleus, grand gaillard... c'est le Gary Cooper ou le John Wayne de la fin du XXe siècle.

(L'usage de la calculatrice et du dictionnaire est interdit)

VEGETABLE VACCINES KEEP THE DOCTORS AWAY ⁽¹⁾

1 VOLUNTEERS are being recruited to eat raw (2) potatoes in the first human trials of a vaccine grown in genetically engineered vegetables. Researchers in Texas hope that people who eat the potatoes will be protected against common gut (3) infections. They believe this technique could prove to be a cost-effective way of growing vaccines in developing countries where such diseases are still killers.

5 Other researchers previously succeeded in using similar techniques to produce potential vaccines (Technology, 21 January 1995). Now Hugh Mason and his colleagues at Texas A&M University have successfully tested their plant vaccines on mice and plan to recruit 15 volunteers for a human trial.

10 The team first tested the technique in tobacco plants. They took a strain of Escherichia coli bacteria that causes food poisoning, and identified the part of the poison which binds to (5) its victims' gut cells. They then used a modified plant bacterium called Agrobacterium tumefaciens to transfer the segment of DNA which manufactures the binding protein into the tobacco plant. Under normal circumstances, these bacteria transfer packets of DNA into plant cells to force the plant to manufacture the nutrients they need. But in the modified bacteria, the DNA package includes the gene to produce the binding protein.

15 Once the foreign DNA segment was incorporated into the tobacco's own DNA, the bacteria were killed off with antibiotics. Mason's team then grew these modified tobacco plants and found that the cuttings produce the E. coli binding protein.

20 Proof of success came when the tobacco leaves were mashed up (6) and squirted (7) into the stomachs of mice. Mason says that within days the mice started producing specific antibodies to the E. coli poison, but suffered no ill effects from digesting the binding protein. Mason then produced genetically engineered potatoes and fed these to mice, with similar results.

Mason's team have used plants to produce vaccines against a number of other infectious agents. For example, they have made a vaccine using a protein from the shell (8) of the Norwalk virus, which causes diarrhoea in children.

25 A third vaccine has also been produced in tobacco using a surface protein from the hepatitis B virus. But Mason says that so far they have only been able to produce small amounts of it in potatoes. Although a vaccine already exists against hepatitis B, a cheaper plant version could make mass immunisation possible.

One problem with growing potatoes to produce vaccines is that cooking tends to destroy the protein component of the vaccine, so they must be eaten raw. Mason thinks that banana may be a better option. "On a banana could potentially produce a whole host (9) of different vaccines", says Mason.

Abi Berger - The New Scientist - 12 August 1995

Vocabulary :

- | | |
|---------------------|--------------------------|
| 1) to keep away : | éloigner, tenir éloigné |
| 2) raw : | cru |
| 3) gut infection : | maladie de l'intestin |
| 4) cost-effective : | rentable |
| 5) to bind to : | se lier à, s'accrocher à |
| 6) to mash up : | broyer, écraser |
| 7) to squirt : | injecter |
| 8) shell : | (ici) paroi |
| 9) host : | multitude |

I Compte Rendu en Français (10 pts)

Vous rédigerez un compte rendu du texte en langue française en faisant ressortir les idées essentielles (230 mots).

Redaction en Anglais

(10 pts)

Le candidat choisira l'un des deux sujets suivants. Il indiquera clairement s'il a choisi le numéro 1 ou 2.

- 1 According to Hugh Mason "One banana could potentially produce a whole host of different vaccines". In your opinion, what are the positive and/or negative implications of this statement ? (250 words max.)
- 2 Hugh Mason and his colleagues plan to recruit 15 volunteers for a human trial on genetically engineered vaccines in vegetables. If you were given the opportunity, would you volunteer to take part in the test ? Justify your reasons and explain your own position concerning genetic engineering applied to man. (250 words max.)

EPREUVE DE MATHÉMATIQUES ET SCIENCES PHYSIQUES

DURÉE : 4 HEURES COEFFICIENT : 4

1ÈRE PARTIE : MATHÉMATIQUES

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

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

EXERCICE 1 - (8 points) - Etude statistique des groupes sanguins

D'une part, le sang humain est classé en quatre groupes distincts : A, B, AB et O. Sur une population P, les groupes sanguins se répartissent d'après le tableau suivant :

A	B	AB	O
41 %	10 %	4 %	45 %

D'autre part, le sang peut posséder le facteur Rhésus : si le sang d'un individu possède ce facteur il est dit de Rhésus positif (noté Rh⁺) , s'il ne possède pas ce facteur il est dit de Rhésus négatif (noté Rh⁻).

Pour chaque groupe la proportion d'individus possédant ou non le facteur Rhésus se répartit d'après le tableau suivant :

Groupe	A	B	AB	O
Rh ⁺	84 %	81 %	85 %	80 %
Rh ⁻	16 %	19 %	15 %	20 %

Ainsi, la probabilité que le sang d'un individu tiré au hasard soit de Rhésus positif sachant que son groupe est A vaut $P(\text{Rh}^+/\text{A}) = 0,84$

Les deux parties peuvent être traitées indépendamment l'une de l'autre.

Les valeurs approchées des résultats numériques finaux seront données au centième le plus proche.

=====

2ÈME PARTIE :

Un individu ayant un sang du groupe O et de Rhésus positif est appelé un donneur universel.

- 1.1. Montrer que la probabilité pour qu'un individu pris au hasard dans la population P soit un donneur universel est 0,36.

- 1.2. En considérant chacun des autres cas : groupe A et Rh⁺, groupe B et Rh⁺, groupe AB et Rh⁺, démontrer que la probabilité pour qu'un individu pris au hasard dans la population P ait un sang Rh⁺ est 0,82.

2ème PARTIE :

Au cours d'une collecte de dons bénévoles, supposés tirés au hasard dans la population, on recueille n flacons. La probabilité qu'un flacon contienne du sang du groupe AB⁻ est $p = 0,006$. On note X la variable aléatoire égale au nombre de flacons de groupe AB⁻.

- 2.1. L'effectif de la population est assez grand pour qu'on admette que la variable aléatoire X suive une loi binomiale.
Quels sont les paramètres de cette loi ?
Calculer en fonction de n l'espérance mathématique de X.
- 2.2. On admet de plus que le nombre n de flacons est assez grand pour que l'on puisse approcher la loi de probabilité de X par une loi de Poisson.
- 2.2.1. Exprimer, en fonction de n, le paramètre de cette loi.
- 2.2.2. Calculer la probabilité d'avoir au moins un flacon du groupe AB⁻ au cours de cette collecte.
- 2.2.3. Combien doit-on au minimum recueillir de flacons pour que cette probabilité soit supérieure à 0,95 ?
- 2.2.4. Ce résultat est-il compatible avec les conditions d'approximation de la loi binomiale par la loi de Poisson ?

EXERCICE 2 : (12 points) - Etude de la production industrielle de pénicilline.-

Lors de la production industrielle de pénicilline G par la moisissure *Penicillium chrysogenum*, l'évolution de la biomasse de moisissure dans le fermenteur est suivie par des déterminations de masse sèche.

Les deux parties peuvent être traitées indépendamment les unes des autres.

Les résultats numériques seront donnés par valeur décimale approchée par défaut à 10^{-3} près.

1ère PARTIE : Etude théorique.

On admet que la quantité X de biomasse, en grammes par litre, sur un intervalle de temps donné est solution de l'équation différentielle :

$$\frac{dX}{dt} = kX,$$

où k est une constante réelle strictement positive, et où t est le temps exprimé en heures.

- 1.1. Donner la solution générale de cette équation différentielle.

- 1.2. Exprimer X en fonction de t, sachant que :

$$X(0) = 2,7 \text{ et } X(20) = 24.$$

2ème PARTIE : Etude expérimentale.

Au cours d'une expérience, les mesures de biomasse ont été rassemblées dans le tableau suivant :

temps t_i en heures	0	5	10	15	20	25	30	35	40
biomasse X_i en g/l	2,48	4,53	8,85	15,03	23,34	36,60	42,12	44,32	45,21

- 2.1. Représenter le nuage de points de coordonnées (t_i, X_i) dans le plan rapporté à un repère orthogonal où :
- 2 cm représentent 5 heures sur l'axe des abscisses
 - 1 cm représente 5 grammes par litre sur l'axe des ordonnées
- 2.2. On considère que la phase de croissance avant ralentissement s'effectue durant les 25 premières R. On pose $U = \ln X$, où \ln désigne le logarithme népérien.
- 2.2.1. Déterminer le coefficient de corrélation linéaire du nuage des 6 points de coordonnées (t_i, U_i) .
- 2.2.2. Déterminer, par la méthode des moindres carrés, une équation de la droite d'ajustement de U en t .
- 2.2.3. Vérifier que sur l'intervalle $[0; 25]$, on a $X(t) = 2,698 e^{0,108 t}$ (les constantes étant calculées à 10^{-3} près).
- 2.2.4. Tracer dans le même repère la courbe représentative de la fonction X définie sur l'intervalle $[0; 25]$.
- 2.3. On définit la productivité du système par la fonction définie sur l'intervalle $]0; 25]$ par

$$f(t) = \frac{X(t)}{t}$$

Cette productivité est le coefficient directeur de la droite (OM) où O est l'origine du repère et M le point de coordonnées $(t, X(t))$.

En utilisant la courbe tracée à la question 2.2.4., déterminer graphiquement l'instant où la productivité est minimale.

2ÈME PARTIE : SCIENCES PHYSIQUES

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

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

I. MICROPHOTOGRAPHIE (15 points)

Un microscope est formé de deux lentilles convergentes :

- un objectif L_1 de vergence $C_1 = 100$ dioptries et de centre optique O_1 .
- un oculaire L_2 de vergence $C_2 = 20$ dioptries et de centre optique O_2 .

1. Déterminer les distances focales de l'objectif L_1 et de l'oculaire L_2 .
2. Un objet lumineux AB est placé à 1,2 cm de O_1 (voir schéma - fig.1)
 - a) Compléter le schéma en construisant l'image A_1B_1 de AB donnée par l'objectif L_1 .
 - b) Déterminer par le calcul la position de l'image A_1B_1 de AB. L'image est-elle réelle ou virtuelle ?
 - c) Définir et calculer le grandissement γ_1 de l'objectif L_1 . L'image A_1B_1 est-elle droite ou renversée par rapport à l'objet AB ?
3. Sur un film perpendiculaire à l'axe optique du système de lentilles L_1 et L_2 , on réalise une photographie de l'objet AB. Le film plan coupe l'axe optique en K tel que $\overline{O_2K} = +15$ cm
 - a) l'objet AB étant toujours placé à 1,2 cm de O_1 , quelle doit être la distance entre O_1 , centre optique de l'objectif L_1 et O_2 , centre optiques de l'oculaire L_2 pour que l'image définitive A_2B_2 donnée par le dispositif des deux lentilles de l'objet AB soit nette sur le film.
 - b) Compléter le schéma précédent en positionnant l'oculaire L_2 (O_2, F_2, F'_2), le film en K et en construisant l'image A_2B_2 que donne l'oculaire L_2 de l'image intermédiaire A_1B_1 .
 - c) Sachant que l'image formée sur le film est inscrite dans un rectangle de dimensions 24 mm \times 36 mm, calculer la longueur maximale de l'objet dont l'image peut s'inscrire dans la plus grande dimension de ce rectangle.

II. Etude de la solubilité de l'éthanoate d'argent (20 points)

Le symbole de litre est L.

Donnée : produit de solubilité K_s (CH_3COOAg) = 2×10^{-3}

1. Ecrire l'équation de l'équilibre de solubilisation de l'éthanoate d'argent dans l'eau. Calculer la solubilité de l'éthanoate d'argent dans l'eau pure ?
2. Calculer la solubilité de l'éthanoate d'argent dans une solution de nitrate d'argent à 0,2 mol. L⁻¹ ? Conclusion.
3. On mélange 50 mL d'une solution d'éthanoate de sodium à 0,1 mol.L⁻¹ et 100 mL d'une solution de nitrate d'argent à 2×10^{-3} mol. L⁻¹. Y a-t-il précipitation de l'éthanoate d'argent ? Justifier votre réponse.
4. a) Montrer qualitativement que le précipité d'éthanoate d'argent est soluble en milieu très acide.

- b) Etablir la relation donnant la solubilité s de l'éthanoate d'argent en milieu acide en fonction de la concentration en ions H_3O^+ , du produit de solubilité $K_s (CH_3COOAg)$ et de la constante d'acidité K_a du couple CH_3COOH/CH_3COO^- .
- c) On donne la solubilité de l'éthanoate d'argent dans différentes solutions pour lesquelles on connaît la concentration en ions H_3O^+ .

$[H_3O^+]$ mol.L ⁻¹	10^{-2}	3×10^{-2}	5×10^{-2}	7×10^{-2}
s mol.L ⁻¹	0,353	0,612	0,790	0,935

Tracer le graphe $s^2 = f([H_3O^+])$ et montrer que ces résultats expérimentaux vérifient la relation précédemment trouvée.

En déduire la valeur du pK_a du couple CH_3COOH/CH_3COO^- .

REMARQUE : Toutes les questions sont indépendantes.

III. - CHIMIE ORGANIQUE (15 points)

- On fait réagir le propanal sur lui-même : il se forme du 3-hydroxy-2-méthylpentanal (produit A)
 - Ecrire les formules semi-développées du propanal et du produit A.
 - Ecrire l'équation bilan de la réaction du propanal sur lui-même et nommer chacune des fonctions présentes dans le corps A.
 - Quel est le catalyseur de cette réaction ?
 - Par l'écriture d'une succession d'étapes réactionnelles, préciser comment le catalyseur intervient sur le propanal et comment la condensation du propanal sur lui-même a lieu pour conduire au produit A.
 - Quel est le nombre de configurations différentes possibles pour le produit A ? Justifier. Représenter dans le mode de représentation de votre choix l'isomère de configuration 2R - 3S. Justifier.
- Par déshydratation en milieu acide, A (tous stéréoisomères confondus) donne un produit B.
 - Ecrire l'équation bilan de la réaction et indiquer le nom du produit B ainsi que sa formule semi développée.
 - Représenter les différents stéréoisomères de B en précisant leur configuration Z ou E.

Calculatrices non autorisées.

LES VACCINS ANTIRABIQVES

Si la rage humaine a aujourd'hui quasiment disparu dans les pays industrialisés, elle est encore bien présente dans les pays en voie de développement. Par ailleurs la rage animale existe toujours en Europe avec elle, le risque de contamination d'individus humains. C'est pourquoi la vaccination antirabique est toujours d'actualité.

Depuis la première vaccination contre la rage lancée par Pasteur il y a un siècle, une série ininterrompue de recherches a visé à améliorer l'efficacité et l'inocuité de cette vaccination, jusqu'aux travaux les plus récents faisant appel aux connaissances modernes de la biologie moléculaire et de biotechnologies.

1. PRODUCTION D'UN VACCIN INACTIVE (45 points)

Le vaccin actuellement le plus utilisé est un vaccin, constitué de virus entiers et inactivés. La production de ce vaccin suppose d'une part de bien connaître le virus et d'autre part de disposer de ce virus en quantité importante.

1.1 Structure du virus (20 points)

Le virus de la rage appartient à la famille des *Rhabdoviridae*.

C'est un virus enveloppé en forme d'obus, de symétrie hélicoïdale, à ARN monocaténaire non fragmenté de polarité négative. Son enveloppe est hérissée de spicules.

1.1.1 Proposer un schéma annoté de l'architecture d'une telle particule virale.

1.1.2 L'ARN monocaténaire est un élément de base de la particule virale.

1.1.2.1 Citer les constituants des ARN

1.1.2.2 Ecrire la structure chimique (formule développée) du fragment d'ARN suivant pApGpUpU et faire apparaître la polarité de cet oligonucléotide, la formule des bases n'est pas demandée.

1.1.2.3 Quelles sont les structures spatiales possibles d'un ARN ? Comment sont-elles stabilisées ?

1.1.3 Préciser la nature biochimique des autres structures de la particule virale.

1.2 Cycle de multiplication viral (15 points)

1.2.1 Citer les différents modes de pénétration possible d'un virus enveloppé dans une cellule cible.

1.2.2 Donner la signification de l'expression "ARN de polarité négative". Décrire les différentes étapes de la multiplication d'un virus comportant un tel ARN.

1.2.3 Décrire brièvement le mécanisme de libération des virions matures dans le cas d'un tel virus.

1.3 Culture en masse du virus (10 points)

Le virus est actuellement produit à échelle industrielle à l'aide de cellules animales en lignée continue cultivées sur microporteurs dans des bioréacteurs de plusieurs centaines de litres.

1.3.1 Définir une lignée cellulaire continue. Dégager l'intérêt de l'utilisation de telles cellules.

1.3.2 Exposer le principe de l'immobilisation de cellules.

1.3.3 Dégager les avantages et inconvénients de l'utilisation de cellules immobilisées.

ETUDE D'UN VACCIN "SOUS-UNITE" (55 points)

Les vaccins antirabiques traditionnels présentent un risque potentiel, c'est pourquoi une des applications les plus prometteuses de la technologie de l'ADN recombinant est la production de vaccins "sous unité" constitués uniquement de la protéine de surface.

1 Etude structurale de la protéine "vaccinante" (20 points)

La glycoprotéine d'enveloppe du virus rabique a été identifiée comme responsable du pouvoir immunisant du virus.

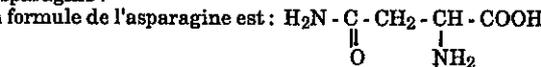
2.1.1 Définir brièvement les différents niveaux d'organisation d'une protéine globulaire.

2.1.2 Chaque niveau d'organisation est stabilisé par certains types d'interactions ou liaisons. Donner leurs noms et leurs propriétés. Préciser à quel niveau elles interviennent.

2.1.3 Dans la glycoprotéine la fraction protéique est unie à la fraction glucidique par une liaison covalente N- glucosidique résultant de la combinaison entre l' α D-N-acétylglucosamine et l'asparagine.

2.1.3.1 Ecrire la formule de l' α D-N-acétylglucosamine sachant que le groupement acétylamine est porté par le carbone 2 et l' α D-glucose.

2.1.3.2 Ecrire la formule détaillée de la liaison N-glycosidique entre l' α D-N-acétylglucosamine et l'asparagine.



2 Production en masse de la protéine vaccinante (35 points)

La production en masse de la glycoprotéine est indispensable pour que soient testées les propriétés de vaccin sous unité potentiel. Le clonage du gène a été effectué chez *E. coli*, mais son expression est réalisée chez *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.1 Clonage : le clonage du gène de la glycoprotéine passe par la synthèse d'ADN_c à partir de l'ARN_m viral.

2.2.1.1 Faire un schéma des différentes étapes de la synthèse d'ADN_c

2.2.1.2 Les fragments d'ADN_c bicaténaire obtenus après une digestion partielle, sont insérés dans un vecteur plasmidique.

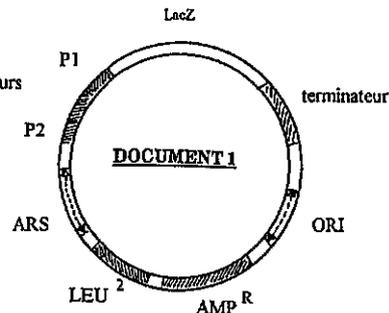
l'insertion est donc ainsi réalisée en effectuant sur le gène et sur le vecteur des coupures cohésives. Deux stratégies peuvent être mises en oeuvre :

- technique à une enzyme
- technique à deux enzymes

représenter par un schéma les résultats obtenus dans les deux cas.

quel intérêt présente la deuxième stratégie ?

2.2.1.3 Quels sont les rôles des différents éléments représentés sur le document 1 ? Où doit se faire l'insertion du gène ? Justifier.



Données :	ORI	Origine de répllication <i>E. coli</i>
	ARS	Origine de répllication levure
	LEU ²	Marqueur de sélection pour <i>S. cerevisiae</i>
	P1	Promoteur de lac Z
	P2	Promoteur de gène de levure

2.2.1.4 Les cellules d'*E. coli* compétentes sont ensuite transformées avec le vecteur recombinant. Proposer et décrire une méthode qui permette de sélectionner le clone qui contient le gène d'intérêt.

2.2.2 Pourquoi est-il indispensable d'utiliser *Saccharomyces cerevisiae* et non *E. coli* pour produire la protéine vaccinnante ?

2.2.3 Conservation de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* recombinée. Présenter sous forme d'un tableau les différentes méthodes de conservation, en soulignant leurs avantages et inconvénients.

3. ETUDE DE LA REPONSE VACCINALE (20 points)

La mise au point de vaccins ne peut pas être dissociée de l'étude de la réponse immunitaire.

3.1 La réponse immunitaire dirigée contre un virus met en jeu anticorps et lymphocytes T cytotoxique. Expliquer comment ces deux systèmes peuvent contribuer à l'élimination du virus.

3.2 Les gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ont été impliqués dans la variation de niveau de réponse immunitaire d'un individu à l'autre.

Décrire le rôle des molécules de classe I et de classe II du CMH dans la réponse à une stimulation antigénique.

Préciser dans chaque cas l'origine et le devenir de l'antigène.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE		
A : ETUDE DE PROJET	DURÉE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4

UTILISATION DE MICROORGANISMES RECOMBINES POUR LA PRODUCTION DE BLEU INDIGO

Le bleu indigo est une teinture utilisée depuis l'antiquité pour les parures des prêtres et des rois, elle était alors extraite d'un mollusque : *Murex*. Le colorant fut ensuite extrait de plantes : *Isatis tinctoria* et *Indigofera tinctoria*. Les besoins en cette teinture se sont accrus d'une manière importante ("blue jean"). Le bleu indigo est devenu le premier colorant mondial, dont la synthèse chimique est réalisée depuis le siècle dernier.

Les récentes crises pétrolières ont fait rechercher d'autres modes de production, et une synthèse biotechnologique apparemment plus rentable est en cours de développement.

Cette biosynthèse repose sur le clonage chez *Escherichia coli* d'un plasmide originaire de *Pseudomonas putida* porteur d'une série de gènes codant pour la Naphtalène Dioxygénase (NDO ; EC 1.14.12.-).

1. LA NAPHTALÈNE DIOXYGÉNASE (NDO)

1.1. Le Document 1 présente de manière simplifiée les voies métaboliques, respectivement d'*Escherichia coli* recombinant et *Pseudomonas putida*, impliquées dans la biosynthèse du bleu indigo.

Comment expliquer que la naphthalène dioxygénase soit également active chez *Escherichia coli* recombinant et permette une synthèse de bleu indigo greffée sur le métabolisme du glucose ?

1.2. Quels peuvent être les intérêts de la production biotechnologique du bleu indigo par rapport à la synthèse chimique ?

1.3. Le Document 2 présente les résultats de l'extraction de la NDO par chromatographie, à partir d'un extrait de *Pseudomonas putida*. Il présente de plus quelques résultats de l'étude de son activité.

1.3.1. Chromatographie des protéines sur DEAE cellulosé.

1.3.1.1. Quel est le principe de la chromatographie sur DEAE cellulose ? Expliquer l'intérêt de cette technique.

1.3.1.2. Justifier le choix de la longueur d'onde à 280 nm pour le suivi spectrophotométrique de l'élution des protéines.

1.3.2. Activité de la NDO

La recherche d'activité NDO dans les différents tubes d'élution de chromatographie donne les résultats suivants :

- Aucun tube ne présente d'activité. Mais lorsque les contenus des différents tubes sont mélangés, on retrouve l'activité NDO.

1.3.2.1. Quelle hypothèse a dû être proposée pour expliquer le phénomène ?

1.3.2.2. A l'aide du document 2, déterminer les conditions optimales de l'activité NDO.

2. RECHERCHE ET OBTENTION DE SOUCHES PRODUCTRICES DE BLEU INDIGO

2.1. Recherche de la souche de *Pseudomonas putida*

2.1.1. A partir de l'analyse du document 3 :

2.1.1.1. Quelle est la souche présentant la meilleure productivité spécifique ? Justifier la réponse.

2.1.1.2. Quels éléments indispensables doit-on ajouter au milieu minimum pour cultiver cette souche ? Justifier la réponse.

2.1.2. Quelle souche semble la mieux adaptée à cette production ? Justifier la réponse.

2.1.3. A l'aide du document 4 :

2.1.3.1. Donner les caractéristiques de la souche PpE1^r apparue lors de la culture de la souche PpE1.

2.1.3.2. Comment a-t-on mis en évidence cette souche ?

2.1.3.3. Comment appelle-t-on le phénomène génétique dont elle a fait l'objet ?

2.1.4. Pourquoi la souche PpE1^r est-elle intéressante pour la production de bleu indigo ? Expliquer ce phénomène en s'appuyant sur les voies de biosynthèse.

2.2. Obtention des bactéries *Escherichia coli* recombinées.

Les gènes NDO de *Pseudomonas putida* PpE1^r sont clonés chez *Escherichia coli* sans leur promoteur. *Escherichia coli* est un microorganisme utilisé pour la production du bleu indigo.

2.2.1. Le document 5 donne la carte de restriction de l'ADN des gènes NDO PpE1^r, de leurs régions bordantes et le nom des sites de restriction dans le site de multiclonage du vecteur d'expression utilisé.

Quelles enzymes de restriction choisit-on pour réaliser ce clonage ?

Quelle est la probabilité pour que la construction du vecteur recombiné permette la production de la protéine active ? Justifier la réponse.

2.2.2. Les chercheurs ont conçu un test simple de criblage des recombinants, basé sur l'étude des produits d'amplification in vitro d'un fragment de l'insert par Amplification en Chaîne par Polymérase (ACP) ou "PCR".

Ce test simple, rapide et réalisé directement sur des bactéries, permet de sélectionner les clones adaptés à une production de bleu indigo par fermentation.

Donner sous forme d'un schéma clair et précis, le principe d'une ACP.

2.2.3. Dans le cas présent, la durée de la première étape du premier cycle d'amplification est rallongée de 2 min. Expliquer pourquoi ?

2.2.4. Le document 6 présente une étape du test de criblage par ACP qui consiste à utiliser des amorces A et B.

2.2.4.1. En déduire quels sont les profils électrophorétiques d'amplification obtenus avec les deux amorces A et B que l'on peut observer avec les différents clones recombinants.

2.2.4.2. Quel est le profil de celui qui correspond au clone d'intérêt ?

2.2.5. Préciser quels sont les critères de choix d'une amorce d'une ACP.

2.2.6. Afin d'optimiser cette ACP, on réalise des amplifications à différentes concentrations en magnésium sur des clones qui synthétisent la protéine active. Les résultats de ces amplifications sont testés sur gel de polyacrylamide et sont présentés au document 7.

Quel est le rôle du magnésium dans une ACP ?

Analyser et interpréter le document 7. Quelle est la concentration optimale en magnésium ?

2.2.7. Pourquoi choisir un gel de polyacrylamide ?

3. PRODUCTION DE BLEU INDIGO

Des essais de production sont réalisés en "batch alimenté" (fed-batch). Les cultures sont induites par l'addition d'IPTG quand elles atteignent une absorbance de 20 à 30 unités.

3.1. Suivi de la production.

3.1.1. A partir du document 8, tracer sur le même graphe les courbes montrant l'évolution de $\ln X$ en fonction du temps d'une part et la production d'indigo d'autre part. Déterminer les phases de la croissance et la vitesse spécifique maximale de croissance.

3.1.2. De quel type de métabolite le bleu indigo fait-il partie ? Justifier la réponse.

3.2. Le "fed-batch".

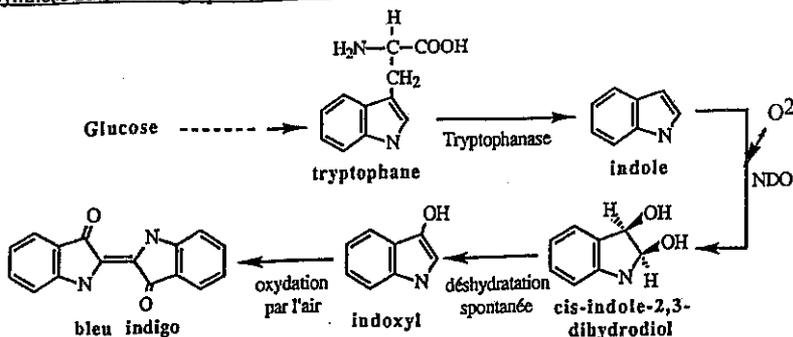
3.2.1. Qu'est-ce qu'un "fed-batch" ? Dans quelles circonstances ce procédé est-il utilisé ?

3.2.2. Un ajout de glucose doit être effectué au temps $t = 3305$ min alors que la biomasse est de 16,1 g. Sachant que l'on doit ajouter 1,3 mL de glucose à 50 % (m/v) par gramme de bactérie et que la pompe du fermenteur fonctionne à un débit constant de 2 mL/min, calculer :

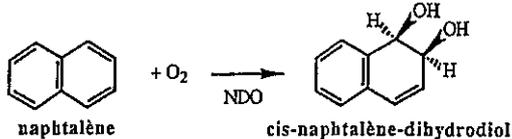
- la masse de glucose à ajouter
- la durée de fonctionnement de la pompe.

document 1

Biosynthèse du bleu indigo par une souche recombinante de *E. coli* :

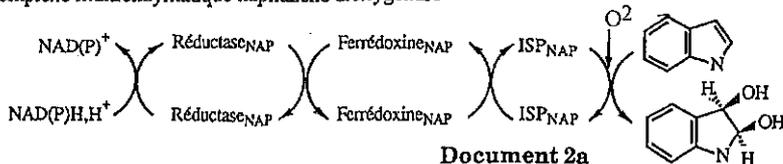


Action de la naphthalène dioxygénase chez *Pseudomonas putida* :



Document 2

Le complexe multienzymatique naphthalène dioxygénase



Document 2a

ISP = Iron Sulfur Protein

Rôle de cofacteurs enzymatiques sur l'activité de la NDO reconstituée.

Cofacteurs ajoutés :	Activité NDO (nmol/min)
aucun	0,4
NADH, H ⁺	4,6
NADPH, H ⁺	2,0
NADH, H ⁺ + FADH ₂	9,2
NADH, H ⁺ + FMNH ₂	7,8
NADH, H ⁺ : 2,5 mmol/L ; NADPH, H ⁺ : 2,5 mmol/L ; FAD : 1,0 μmol/L ; FMN : 1,0 μmol/L.	

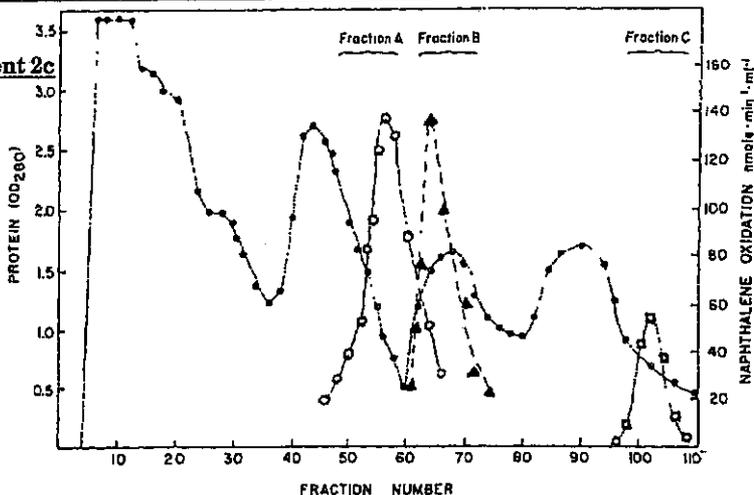
Document 2b

Détermination des associations de fractions pour la mesure de l'activité NDO.

Fractions	Activité NDO (nmol/min)
A	0,0
B	0,0
C	0,0
A + B	0,0
A + C	0,3
B + C	0,0
A + B + C	6,7

Document 2d

Document 2c



DEAE-cellulose chromatography of crude extract from *Ps. putida* strain NCIB 9816.

Napthalene dioxygenase activity was not detected in any of the fractions eluted from the column : pooled fractions in various combinations were assayed for enzyme activity.

Symbols : (●) Protein as determined by optical density at 280 nm ; (○) activity of fraction A measured in the presence of 93 μg of fraction B and 264 μg of fraction C ; (▲) activity of fraction B measured in the presence of 70 μg of fraction A and 264 μg of fraction C ; (□) activity of fraction C measured in the presence of 70 μg of fraction A and 93 μg of fraction B.

Document 3 :

Évaluation spectrophotométrique de la biomasse (A_{550}) et de la production de bleu indigo par <i>Ps. putida</i> Pp01 et ses mutants			
Souche	Phénotype	A_{550} (UA)	Production de bleu indigo ($\mu\text{g/mL}$) en 6 h
Pp 01	type sauvage Trp ⁺	0,501	5,60
Pp E1	Trp ⁻ , Tc ^r	0,314	5,44
Pp A47	PhnA ⁻ , Tc ^r	0,403	2,13
Pp A48	PhnA ⁻ , Hg ^r	0,210	1,45

REMARQUE : Trp : tryptophane ; Tc : tétracycline ; PhnA : Phényl anthranilate ; Hg : mercure ;
r : résistant

Les cellules sont cultivées pendant 20 h. dans 5 mL de milieu PB à 37°C sous aération.

COMPOSITION DES MILIEUX :**PB (*Pseudomonas* broth)**

20 g/L de Bacto-peptone
1,4 g/L de MgCl₂
10 g/L de K₂SO₄

Milieu minimum

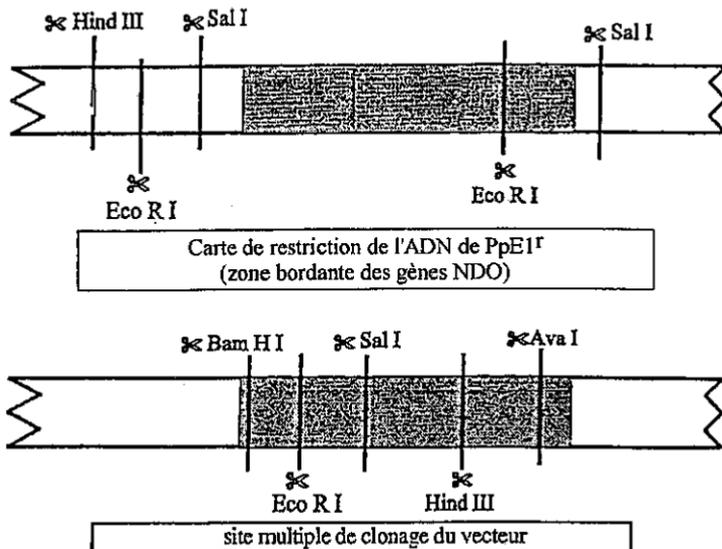
2 g/L de glucose
13,6 g/L de KH₂PO₄
2 g/L de (NH₄)₂SO₄
0,25 g/L de MgSO₄
0,2 mg/L de FeSO₄, 7 H₂O

Document 4 :

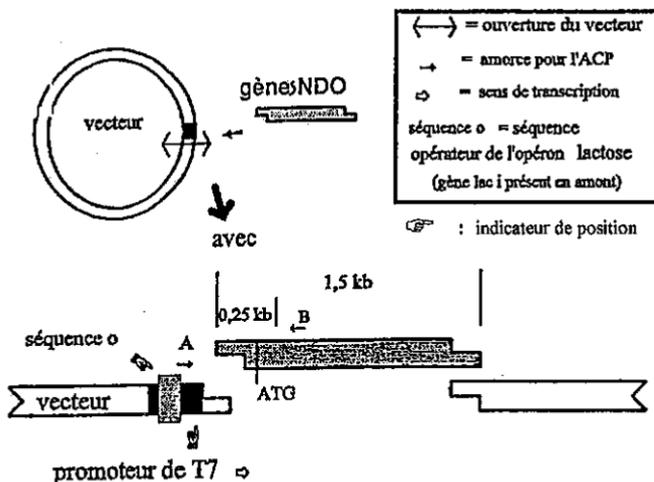
Characterization of Pp E1^r : during the characterization of Pp E1, spontaneous tryptophan-independent colonies appeared at a frequency of 10⁻⁵ to 10⁻⁶ : one of these Trp⁺ colonies was isolated and designated Pp E1^r. Pp E1^r grew without supplementation on minimal medium and on low- or high-ammonia medium. Its parent Pp E1 required supplementation with either anthranilate or L-tryptophan for growth on minimal medium.

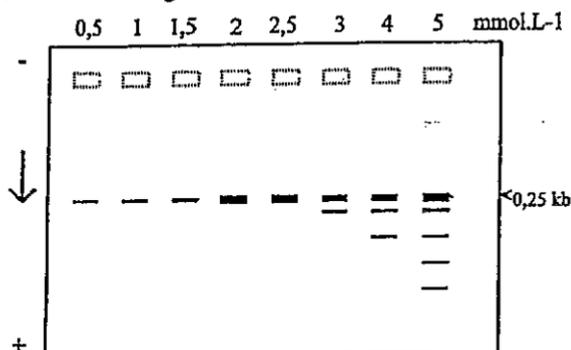
Évaluation spectrophotométrique de la production de biomasse (A_{550}) et de bleu indigo par <i>Ps putida</i> Pp01 et ses mutants		
Souche	A_{550} (UA)	Production d'indigo ($\mu\text{g/mL}$) en 6h
Pp 01	0,501	5,60
Pp E1 ^r	0,458	9,78

Document 5 :



Document 6 :



Document 7 :concentration en MgCl₂ finale lors de l'ACP**Document 8 :**

Courbes de croissance, de production d'indigo et d'ajout de glucose lors du fed batch pilote

temps	Densité optique	X	LnX	Glucose ajouté	Indigo obtenu
min	UA à 550 nm	g.L ⁻¹	sans unité	g	en unité relative
0	0,109	0,0327	-3,42	0	-
90	0,129	0,0387	-3,25	0	-
180	0,172	0,0516	-2,96	0	0,15
210	0,22	0,066	-2,72	0	-
300	0,345	0,1035	-2,27	0	-
360	0,532	0,1596	-1,84	0	0,8
450	1,212	0,3636	-1,01	0	-
600	2,1	0,83	-0,46	0	-
900	6,3	1,89	0,64	0	3,5
1200	7,8	2,34	0,85	0	-
1500	9,5	2,85	1,05	1,4	-
1515	9,5	2,94	1,08	0	6,4
1750	13,2	3,96	1,38	1,5	-
1945	15,9	4,77	1,56	0	-
2245	20,5	6,15	1,82	1,9	15,6
2345	22	6,6	1,89	2,4	-
2645	27	8,1	2,09	2,7	-
2845	31,55	9,465	2,25	3,8	24
3145	42	12,6	2,53	4,5	-
3245	48,15	14,445	2,67	6,1	39,2

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE
B : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE
DURÉE : 8 HEURES COEFFICIENT : 8

Documents personnels non autorisés.

Premier jour : durée 6h30 + 1h00 pour le repas

ETUDE D'UNE SOUCHE DE *Bacillus cereus*

Afin de développer la production industrielle d'une souche de *Bacillus cereus* utilisée dans le traitement de diarrhées d'origine bactérienne, on cherche :

- à tester la possibilité d'utiliser un milieu de culture peu coûteux,
- à vérifier l'absence de production de toxine par la bactérie,
- à mesurer l'activité bactériolytique de *Bacillus*,
- à vérifier la viabilité de la souche produite après conditionnement sous forme de gélules,
- à tester sa résistance aux antibiotiques susceptibles d'être prescrits conjointement, lors du traitement de la diarrhée.

1) RECHERCHE DE LA PRÉSENCE D'UN FACTEUR DE CROISSANCE DANS UN MILIEU DE CULTURE : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (30 points)

La disponibilité locale en mélasse incite à utiliser ce sous-produit de l'industrie betteravière comme constituant de base du milieu de culture. La souche est auxotrophe pour la thréonine. On recherche la présence de cet acide aminé dans la mélasse par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

La cuve à chromatographie contient le mélange	butanol-1	5 v
	acide éthanoïque	1 v
	eau	1 v

sur une hauteur de 1 cm.

- Activer la plaque de gel de silice en la portant 20 min. à l'étuve à 110° C.
- Marquer les emplacements des dépôts, régulièrement espacés, sur la largeur de la plaque.
- Faire 3 dépôts successifs pour chaque témoin ou échantillon. Sécher entre chaque application à l'aide d'un sèche-cheveux.
 - * Témoins : L-cystéine, L-leucine, L-lysine, L-thréonine et L-valine.
 - * Échantillon : défécât de mélasse.
- Faire migrer jusqu'à ce que le solvant atteigne le bord supérieur de la plaque.
- Noter la position du front du solvant, sécher la plaque.
- Révéler par pulvérisation, sous hotte ventilée, de ninhydrine à 0,2 % dans l'acétone puis séjour 5 à 10 min. à l'étuve à 100°C.

COMPTE-RENDU

- 1.1. Définir et déterminer le Rf de chaque acide aminé témoin et des constituants de la mélasse.
- 1.2. Identifier ou indiquer la nature possible des acides aminés de la mélasse.
- 1.3. La mélasse peut-elle, *a priori*, convenir comme constituant de base du milieu de production de *Bacillus cereus*? Justifier.

2) VÉRIFICATION DE L'ABSENCE DE PRODUCTION D'UNE TOXINE ÉMÉTISANTE PAR ELECTROSYNÈRESE (OU CONTRE-ELECTROPHORÈSE) (45 points)

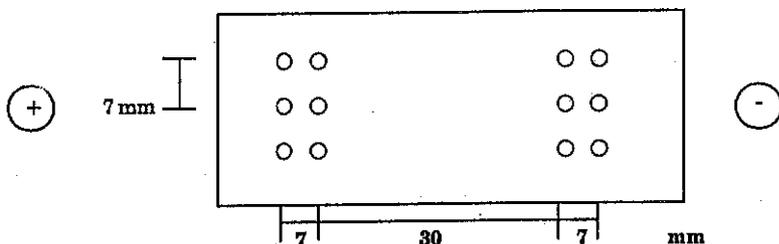
Une substance émetisante provoque des nausées et des vomissements.

On dispose :

- d'anticorps anti-toxine "Ac" : 80 μ L
- d'une solution étalon de toxine "Ag" : 40 μ L
- d'un échantillon de surnageant de culture "S" : 500 μ L
- d'agarose à 1 % en tampon pH 8,2 3 mL
- de 2 lames numérotées, glacées : une lame servira pour s'entraîner à couler le gel et faire des essais de perforation, l'autre sera traitée complètement et servira à l'électrosynèrese.

1) Préparation des lames :

- Couler le gel d'agarose (3 mL) sur chaque lame.
- Laisser prendre en masse.
- Perforer le gel à l'aide d'un emporte-pièce selon le schéma suivant :



2 colonnes de 3 x 2 puits
diamètre des puits : 2,5 mm
distance entre 2 puits (de centre à centre) : 7 mm

2) Préparation des dilutions :

- Effectuer des dilutions en eau distillée stérile :
- de l'antigène témoin (Ag) au 1/2, 1/4, 1/8
- du surnageant de culture au 1/2.

3) Dépôts et migration :

- Réaliser le schéma de dépôt des réactifs dans les puits, sachant qu'à ce pH alcalin, les Ag migrent vers l'anode et les Ig G vers la cathode.
- Présenter ce schéma à l'examineur avant de remplir les puits.
- Déposer 10 μ L de chaque échantillon dans les puits selon le schéma réalisé (Ag pur et ses dilutions ; surnageant et sa dilution).
- Déposer ensuite les Ac (10 μ L).
- Disposer la lame dans la cuve contenant le tampon pH 8,2 pour migration.
- Installer les "ponts" permettant le passage du courant.
- Laisser migrer 35 minutes sous une tension de 150 V.

4) Lecture :

- Faire une première lecture.
- Conserver la lame pour une deuxième lecture et confirmation le lendemain : mettre la lame en chambre humide à la température du laboratoire.

COMPTE-RENDU

2.1. Sous forme de tableau, indiquer la technique des dilutions.

2.2. Sur le schéma effectué précédemment, dessiner le résultat obtenu après migration dans le champ électrique.

2.3. Interpréter et conclure.

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIOLYTIQUE (25 points)

On recherche la capacité du surnageant de culture de *Bacillus cereus* à lyser une suspension de *Micrococcus lysodeikticus*. Cette lyse s'accompagne d'une diminution d'absorbance à 450 nm du mélange réactionnel proportionnelle à l'activité bactériolytique de la culture. L'activité lytique est quantifiée en comparant la diminution d'absorbance à 450 nm provoquée par le surnageant de culture à celle qui résulte de l'activité d'une solution connue de lysozyme.

La suspension de *Micrococcus lysodeikticus* et la solution étalon de lysozyme sont réalisées dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH 6,2. Elles seront, ainsi que le surnageant de culture et le milieu stérile, préincubées à température du laboratoire.

Effectuer les manipulations suivantes. L'une d'entre elles sera réalisée devant un examinateur. Il n'est pas indispensable de manipuler stérilement mais les cuves, leur contenu et les cônes doivent être placés dans un bain d'eau de javel.

1) Diminution d'A_{450 nm} provoquée par la solution de lysozyme à 500 UI.mL⁻¹.

Mesurer dans la cuve du spectrophotomètre :

2,0 mL de suspension de *Micrococcus* à température ambiante.

0,1 mL de solution de lysozyme à 500 UI.mL⁻¹ à température ambiante.

Mélanger, placer immédiatement dans le porte-cuve du spectrophotomètre et suivre l'évolution de l'absorbance à 450 nm pendant 3 min.

2) Opérer dans les mêmes conditions pour mesurer l'activité bactériolytique du surnageant de culture à température ambiante. Les mesures sont utilisables pour la détermination de cette activité si $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ de l'étalon lysozyme et $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ du surnageant de culture ne diffèrent pas de plus de 30 %.

Dans le cas contraire, effectuer la dilution appropriée.

3) Effectuer un témoin pour voir l'influence du milieu et/ou le comportement d'une suspension bactérienne qui vient d'être agitée. On suivra pendant 3 min. l'absorbance à 450 nm du mélange :

2,0 mL de suspension de *Micrococcus* à température ambiante

0,1 mL de milieu de culture stérile à température ambiante.

COMPTE-RENDU

3.1. Rendre les cinétiques.

3.2. Déterminer $\Delta A_{450 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$ pour chaque test.

3.3. Calculer l'activité bactériolytique du surnageant de culture.

4) ÉTUDE DE LA VIABILITÉ DES SPORES ET DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES (60 points)

La présentation retenue pour le traitement par voie orale des diarrhées est une géluie contenant :

- 10⁹ spores de *Bacillus cereus*

- un excipient constitué de carbonate de calcium et de kaolin.

Pour vérifier la viabilité des spores en présence de l'excipient, on effectue une numération des spores par culture sur milieu solide.

De plus, la souche ne doit pas être sensible aux antibiotiques ingérés simultanément ; on réalise donc un antibiogramme.

1) Numération des spores :

- Prélever aseptiquement une gélule.
- Placer la gélule dans un flacon contenant 10 mL d'eau physiologique stérile.
- Laisser reposer au moins une heure en agitant de temps en temps au vortex.
- Homogénéiser vigoureusement ; si la gélule n'est pas entièrement dissociée, l'ouvrir à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Dans une série de tubes à hémolyse stériles, numérotés, mettre 900 μ L d'eau physiologique stérile.
- Effectuer une série de dilutions en progression géométrique de raison 1/10.
- Étaler 100 μ L de suspension de spores sur une gélose nutritive : choisir 3 dilutions successives et étaler 2 boîtes par dilution.
- Incuber une nuit à 37°C.

2) Antibiogramme :

- À partir d'une des dilutions précédentes, préparer un volume suffisant d'une suspension à environ 10^6 spores par mL.
- Ensemencer une gélose pour antibiogramme par inondation.
- Disposer régulièrement les disques d'antibiotiques sur la boîte.
- Incuber une nuit à 37°C.

COMPTE-RENDU

- 4.1. Les quantités de matériel et de produit étant limitées, commencer par rédiger le plan d'organisation retenu et indiquer le matériel nécessaire.
- 4.2. Présenter les calculs effectués et leur justification pour la numération des spores et pour l'antibiogramme.

Deuxième jour : durée 1h30

1) VERIFICATION DE L'ABSENCE DE PRODUCTION D'UNE TOXINE EMETISANTE

Effectuer une deuxième lecture de la lame et compléter, si nécessaire, le compte-rendu du premier jour.

2) ETUDE DE LA VIABILITE DES SPORES

- Compter les colonies. Présenter les résultats sous forme de tableau.
- Calculer le pourcentage de spores ayant germé.

3) ANTIBIOGRAMME

- Lire l'antibiogramme et calculer la CMI de la souche vis-à-vis de l'ampicilline. Présenter les résultats sous forme de tableau.
- Cette souche est-elle susceptible de produire une β -lactamase ? Justifier la réponse.

Achévé d'imprimer le 20 Novembre 1996
Dépôt légal 4^e Trimestre 1996
Directeur de la publication : J.N. JOFFIN

ISBN 2-910069-18-4



9 782910 069186