

AVANT-PROPOS

Compte tenu de la rénovation du BTS Biotechnologies et afin de diminuer le coût de cet outil de travail, l'UPBM a choisi de faire figurer dans les annales du présent volume :

- pour la session 2008, les sujets qui pourraient présenter un intérêt dans la préparation du BTS rénové : c'est le cas, en plus des épreuves de Mathématiques et de Sciences Physiques, des épreuves de Sciences Biologiques Fondamentales et Génie biologique et de l'Étude de projet.
- les sujets des deux premières sessions, 2009 et 2010 du BTS rénové.

Les sujets et les propositions de corrigés des épreuves des sessions 2009 et 2010 ont été fournis sous forme de fichiers de traitement de texte par Mme Isabelle Faller, IPR responsable du BTS Biotechnologies : qu'elle soit ici vivement remerciée pour son aide à la préparation de ce document, ainsi que Mr Haudidier, du rectorat de Strasbourg qui a envoyé ces fichiers.

Les propositions de corrigés des épreuves de mathématiques ont été élaborées ou relues par des collègues de nos lycées. Nous tenons à les remercier chaleureusement et amicalement ici d'avoir donné un coup de main ... pour un coup de pouce aux étudiants.

Les propositions de corrigés des épreuves de biotechnologie ont été rédigées à partir des corrigés officiels et des fiches de correction des jurys du groupe interacadémique Lille-Paris-Versailles : ces documents ont été souvent retravaillés, voire complétés par des remarques ou des compléments qui, nous l'espérons, seront utiles aux étudiant(e)s. Là encore, merci aux collègues qui ont fait parvenir des documents remis en forme.

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

Photographie de couverture (cliché personnel) :

Ce sont des colonies d'*Escherichia coli* obtenues après une conjugaison interrompue, au cours de laquelle un facteur $F'(Lac^+)$ est transféré à une souche receveuse $F'(Lac^-)$ qui porte une résistance chromosomique à la streptomycine. La souche donneuse $F'(Lac^+)$ est sensible à la streptomycine.

- Le milieu est un milieu Mac Conkey contenant la streptomycine qui permet la sélection.
- Les colonies incolores sont issues des cellules receveuses $F'(Lac^-)$ qui n'ont pas participé à la conjugaison et ne sont donc pas transformées.
- Les colonies rouges sont formées après multiplication des cellules conjuguantes initialement $F'(lac^-)$ devenues $F'(Lac^+)$ en ayant reçu une copie du facteur $F'(Lac^+)$ et demeurées résistantes à la streptomycine.

Je tiens à remercier vivement Mme Annie Pfeffer, professeure au lycée Edmond Rostand de Strasbourg, qui m'a fait profiter de son expérience et prodigué de nombreux conseils qui se sont révélés fort utiles, notamment pour la réussite de cette manipulation.

Pascal MICHAUX

Sommaire

Épreuves de la session 2008

Épreuve	Sujet	Proposition de corrigé
Mathématiques	Page 1	Page 4
Sciences physiques	Page 5	Page 8
Sciences biologiques fondamentales et génie biologique	Page 11	Page 15
Étude de projet	Page 18	Page 27

Épreuves de la session 2009

Épreuve	Sujet	Proposition de corrigé
Mathématiques	Page 31	Page 34
Sciences physiques et chimiques	Page 36	Page 41
Biologie des procaryotes et des eucaryotes Sous-épreuve de Biologie Cellulaire	Page 44	Page 50
Biologie des procaryotes et des eucaryotes Sous-épreuve de Microbiologie et Génie fermentaire	Page 53	Page 57
Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	Page 59	Page 63
Biologie moléculaire et génie génétique	Page 65	Page 69

Épreuves de la session 2010

Épreuve	Sujet	Proposition de corrigé
Mathématiques	Page 73	Page 77
Sciences physiques et chimiques	Page 80	Page 84
Biologie des procaryotes et des eucaryotes Sous-épreuve de Biologie Cellulaire	Page 87	Page 90
Biologie des procaryotes et des eucaryotes Sous-épreuve de Microbiologie et Génie fermentaire	Page 93	Page 99
Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	Page 102	Page 108
Biologie moléculaire et génie génétique	Page 111	Page 116

Sujets des épreuves de la session 2008

ÉPREUVE DE MATHÉMATIQUES

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 (calculatrice conforme à la circulaire n°99/186 du 16/11/99) et du formulaire officiel de mathématiques (NON REPRODUIT ICI) est autorisé.

Durée : 2 heures

Coefficient : 2

1 EXERCICE 1 (10 points)

Dans cet exercice on s'intéresse à l'évolution de la température d'une tasse de thé.
Les deux parties A et B de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

1.1 Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E): $y' + 0,05 y = 1,05$,

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

1.1.1 Déterminer les solutions sur $[0, +\infty[$ de l'équation différentielle (E₀) : $y' + 0,05 y = 0$.

1.1.2 Soit h la fonction définie sur $[0, +\infty[$ par $h(t) = a$, où a est un nombre réel.
Déterminer le nombre réel a pour que la fonction h soit une solution particulière de l'équation différentielle (E).

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

1.1.4 Déterminer la solution f de l'équation différentielle (E) qui prend la valeur 100 pour $t = 0$.

1.2 Étude d'une fonction et calcul intégral

Soit f la fonction définie sur $[0, +\infty[$ par $f(t) = 79 e^{-0,05 t} + 21$.

On désigne par C la courbe représentative de f dans un repère orthonormal $(O; \vec{i}, \vec{j})$.
La courbe C est donnée annexe, à rendre avec la copie.

1.2.1

Déterminer $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t)$.

Déduire du 1.2.1.1) que la courbe C admet une asymptote Δ dont on donnera une équation. Tracer la droite Δ sur la figure de l'annexe.

1.2.2 Résoudre par le calcul dans $[0, +\infty[$ l'équation $f(t) = 21,1$.

Donner la valeur exacte de la solution, puis une valeur approchée arrondie à 10^{-1} .

1.2.3

On désigne par f' la fonction dérivée de la fonction f

Calculer $f'(t)$ pour tout t de $[0, +\infty[$

Établir le tableau de variation de f

1.2.4 Démontrer que la valeur moyenne V_m de la fonction f sur $[0, 120[$ est:

$$V_m = 21 + \frac{79}{6}(1 - e^{-6})$$

1.3 Exploitation des résultats des parties 1.1 et 1.2

Du thé est mis à infuser dans une tasse placée dans une pièce où la température ambiante, supposée constante, est de 21°C .

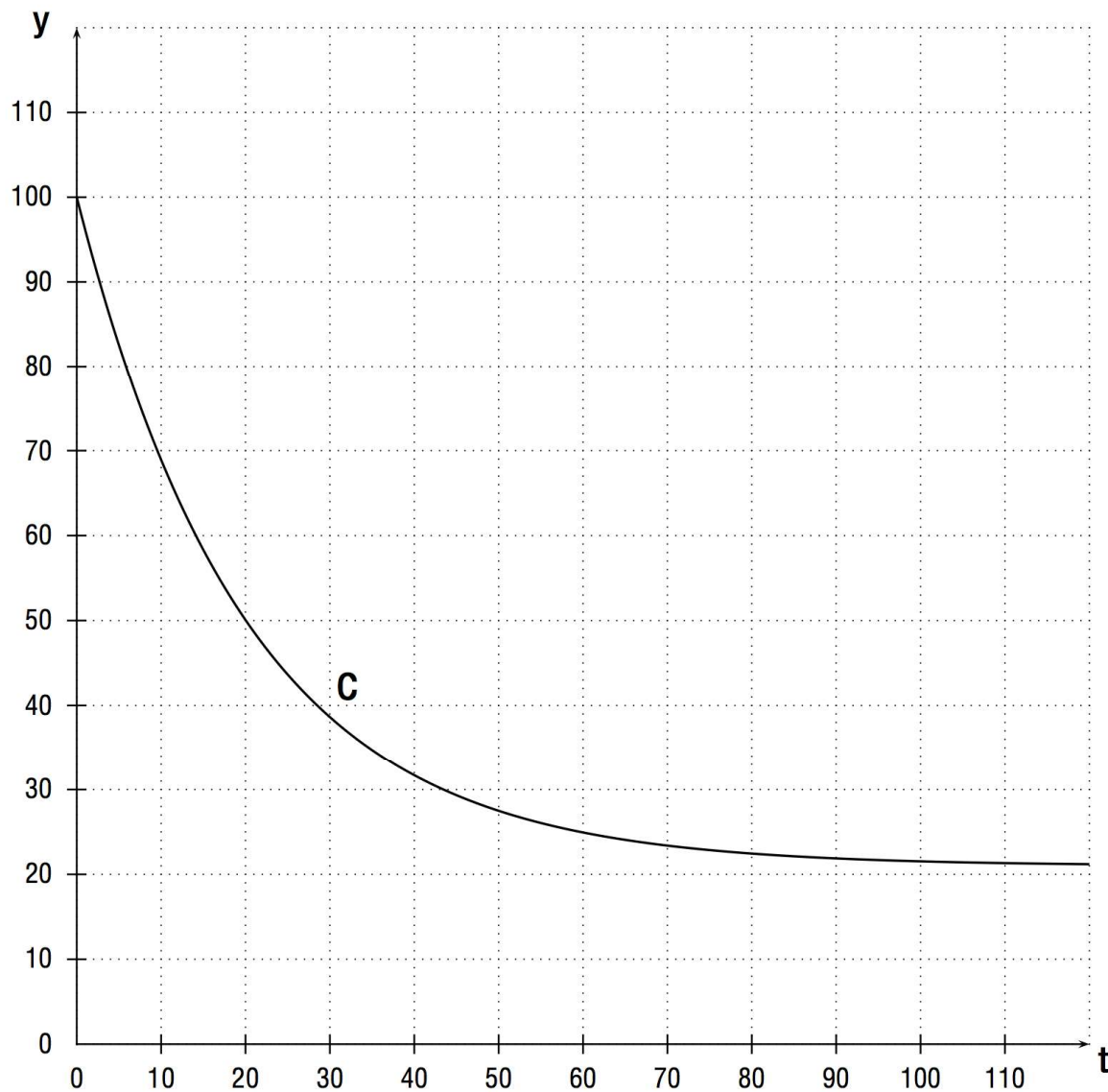
Dans ce qui suit, t est le temps exprimé en minutes.

On admet que la température du thé exprimée en degrés Celsius est $f(t)$, où f est la fonction définie au début de la partie 1.2).

1.3.1 En utilisant le résultat de la question 1.2.2.), donner, à la minute près, l'instant au-delà duquel la température du thé est inférieure à $21,1^{\circ}\text{C}$.

1.3.2 Déterminer graphiquement, à la minute près, l'instant où la température du thé est de 60°C . On fera apparaître les constructions utiles sur la figure.

ANNEXE À RENDRE AVEC LA COPIE



2 EXERCICE 2 (10 points)

Les trois parties de cet exercice sont indépendantes.

Un industriel de l'agroalimentaire conditionne du ketchup dans des bouteilles en verre.

Dans cet exercice, les résultats approchés sont à arrondir à 10^{-2} .

2.1 Loi normale

On désigne par X la variable aléatoire qui à chaque bouteille prélevée au hasard dans la production d'une journée associe la masse de sauce, exprimée en grammes, contenue dans cette bouteille. On suppose que la variable aléatoire X suit la loi normale de moyenne 570 et d'écart type 4.

Une bouteille n'est commercialisée que si la masse de sauce qu'elle contient est comprise entre 560 grammes et 580 grammes.

- 2.1.1 Calculer la probabilité qu'une bouteille prélevée au hasard dans la production de la journée soit commercialisée.
- 2.1.2 Calculer la probabilité que la masse de sauce soit supérieure ou égale à 565 grammes.

2.2 Loi binomiale et approximation d'une loi binomiale par une loi de Poisson

- 2.2.1 Dans un stock important de bouteilles destinées aux livraisons en France, 10% des bouteilles contiennent une masse de sauce inférieure ou égale à 565 grammes. Les bouteilles sont livrées en France par cartons de 16.

On prélève au hasard 16 bouteilles de ce stock pour vérification. Le stock est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 16 bouteilles.

On considère la variable aléatoire Y qui, à tout prélèvement de 16 bouteilles, associe le nombre de bouteilles de ce prélèvement qui contiennent une masse de sauce inférieure ou égale à 565 grammes.

- 2.2.1.1 Justifier que la variable aléatoire Y suit une loi binomiale dont on déterminera les paramètres.
- 2.2.1.2 Calculer la probabilité qu'aucune bouteille de ce prélèvement ne contienne une masse de sauce inférieure ou égale à 565 grammes.
- 2.2.1.3 Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement, une bouteille au plus, contienne une masse de sauce inférieure ou égale à 565 grammes.

- 2.2.2 Les bouteilles destinées à l'exportation sont conditionnées par colis de 100.

On prélève au hasard 100 bouteilles pour vérification dans le stock destiné à l'exportation. Le stock est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 100 bouteilles.

On considère la variable aléatoire Z qui, à tout prélèvement de 100 bouteilles, associe le nombre de bouteilles de ce prélèvement qui contiennent une masse de sauce inférieure ou égale à 565 grammes. On admet que la variable aléatoire Z suit la loi binomiale de paramètres 100 et 0,1.

- 2.2.2.1 On considère que la loi suivie par Z peut être approchée par une loi de Poisson. Déterminer le paramètre X de cette loi de Poisson.

- 2.2.2.2 On désigne par Z_1 une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre X , où X est la valeur obtenue au 2.2.2.1). Calculer $P(Z_1 \leq 5)$.

2.3 Intervalle de confiance

Dans cette partie, on s'intéresse à la masse de sucre, exprimée en grammes, contenue dans chaque bouteille.

On prélève au hasard et avec remise un échantillon de 25 bouteilles dans un lot important.

Soit \bar{S} la variable aléatoire qui, à tout échantillon de 25 bouteilles prélevées au hasard et avec remise dans ce lot, associe la moyenne des masses de sucre contenue dans les bouteilles de cet échantillon.

On suppose que \bar{S} suit la loi normale de moyenne inconnue μ et d'écart type $\frac{\sigma}{\sqrt{25}}$ avec $\sigma = 7$.

Pour l'échantillon prélevé, la moyenne obtenue, arrondie à 10^{-1} , est $\bar{s} = 137,7$.

Déterminer un intervalle de confiance centré sur \bar{S} de la moyenne μ des masses de sucre contenu dans chacune des bouteilles de ce lot, avec le coefficient de confiance 95 %.

Proposition de corrigé de l'épreuve de MATHÉMATIQUES

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

1 Exercice 1

1.1.1 $g(t) = k e^{-0.05 t}$

1.1.2 $a = 21$.

1.1.3 $f(t) = k e^{-0.05 t} + 21$

1.1.4 $f(t) = 79 k e^{-0.05 t} + 21$

1.2

$\lim_{t \rightarrow \infty} e^{-0.05 t} = 0$ d'où $\lim_{t \rightarrow \infty} f(t) = 21$

Δ a pour équation: $y = 21$.

1.2.1 $t = -\frac{1}{0,05} \text{Ln} \frac{0,1}{79} \quad t \approx 133,4$

1.2.2

Pour tout t de $[0, +\infty [$, $f'(t) = -3,95 e^{-0.05 t}$

t	0	$+\infty$
$f'(x)$	-	
$f(x)$	100	21

1.3

1.3.1 $t = 134$

1.3.2 Sur le graphique, on lit que $f(14) \cong 60$.

La température du thé est de 60°C au bout de 14 minutes.

2 Exercice 2

2.1.1 $P(560 \leq X \leq 580) \cong 0,99$

2.1.2 $P(X \geq 565) \cong 0,89$.

2.2

Chaque prélèvement est constitué par 16 épreuves élémentaires indépendantes puisque le prélèvement est assimilé à un tirage avec remise.

Chaque épreuve élémentaire peut déboucher sur deux résultats et deux seulement: la bouteille contient une masse de sauce inférieure ou égale à 565 grammes, événement de probabilité $p = 0,10$, et la bouteille contient une masse de sauce supérieure à 565 grammes, événement de probabilité $q = 1 - p = 0,9$. La variable aléatoire Y associée à ces tirages le nombre total de bouteilles contenant une masse de sauce inférieure ou égale à 565 grammes.

Donc Y suit la loi binomiale de paramètres $n = 16$ et $p = 0,10$

$P(Y = 0) \cong 0,19$.

$P(Y \leq 1) \cong 0,51$ ou $0,52$

2.2.1 $\lambda = 10 \quad P(Z \leq 5) \cong 0,07$.

2.3. $I = [134,96; 140,44]$

ÉPREUVE DE SCIENCES PHYSIQUES

1 PHYSIQUE (16 points)

Les deux questions sont indépendantes.

1. Bilan énergétique de la désintégration de l'iode 131

L'iode 131 ($^{131}_{53}\text{I}$) se désintègre principalement par une radioactivité β^- .

Données. Extrait de la classification périodique :

$^{51}_{51}\text{Sb}$	$^{52}_{52}\text{Te}$	$^{53}_{53}\text{I}$	$^{54}_{54}\text{Xe}$	$^{55}_{55}\text{Cs}$
-----------------------	-----------------------	----------------------	-----------------------	-----------------------

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

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

$1 \text{ u} = 1,66 \times 10^{-27} \text{ kg}$

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

$1 \text{ MeV} = 1 \times 10^6 \text{ eV}$

Masse de certains noyaux et particules	$^{131}_{53}\text{I}$	β^-	$^{131}_{54}\text{Xe}$
	130,906114 u	0,000549 u	130,905072 u

1.1. Donner la composition du noyau de l'iode 131.

1.2. Quelle est la nature de la particule β^- ?

1.3. Écrire l'équation de désintégration de l'iode 131, après avoir précisé les lois de conservation utilisées.

1.4. Calcul de l'énergie libérée

1.4.1. Donner l'expression littérale de la perte de masse pour cette désintégration.

1.4.2. En déduire l'expression littérale de l'énergie libérée E_1 pour cette désintégration.

1.4.3. Calculer la valeur de l'énergie libérée E_1 en utilisant les unités du système international, puis donner sa valeur en MeV.

1.5. Cette désintégration est suivie de l'émission d'un rayonnement γ d'énergie $E_2 = 0,268 \text{ MeV}$.

Quelle est l'origine du rayonnement γ ? Calculer sa longueur d'onde λ .

2. Traitement d'un hyperthyroïdien

Un hyperthyroïdien absorbe une gélule contenant de l'iode 131 (sous forme d'iodure de potassium) d'activité $A = 2,00 \times 10^8 \text{ Bq}$. Les noyaux d'iode radioactifs se fixent rapidement sur la thyroïde. Le temps de demi-vie (période radioactive) de l'iode 131 est $T = 8,10 \text{ jours}$.

2.1. Quel est le nombre de noyaux d'iode radioactif présents dans la gélule au moment de son absorption ?

2.2. Composition de la gélule

2.2.1. Quelle est la masse d'iodure de potassium constitué d'iode radioactif contenue dans la gélule ?

Données :

Masse molaire $M(\text{KI}) = 170 \text{ g.mol}^{-1}$

Constante d'Avogadro : $N_A = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

2.2.2. La masse d'une gélule est de 1 g. Conclure quant à la composition de la gélule.

2 CHIMIE GÉNÉRALE (21 points)

Tous les ions sont hydratés en solution aqueuse.

On se propose d'étudier la réaction de complexation des ions $\text{Cr}^{3+}(\text{aq})$ par l'E.D.T.A. en solution aqueuse maintenue à $\text{pH} = 5,1$.

1. L'E.D.T.A. est un tétra-acide noté H_4Y dont les pK_a en solution aqueuse sont respectivement :



1.1. Tracer le diagramme donnant sur une échelle de pH , les domaines respectifs des diverses espèces majoritaires.

1.2. Quelle est en conséquence l'espèce prédominante dans cette solution aqueuse sachant que son pH vaut 5,1 ?

2. L'équation de la réaction de complexation à $\text{pH} = 5,1$ s'écrit sous la forme :



Le complexe CrY formé est très stable.

La transformation est lente et totale ; elle est d'ordre 1 par rapport aux ions Cr^{3+} et d'ordre 1 par rapport aux ions H_2Y^{2-} . La constante de vitesse est notée k .

La solution contient initialement :

- des ions H_2Y^{2-} de concentration molaire $[\text{H}_2\text{Y}^{2-}]_0 = 0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ et
- des ions Cr^{3+} de concentration molaire $[\text{Cr}^{3+}]_0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

On suit le déroulement de la réaction à température, volume et pH constants en mesurant la quantité de complexe formé et on obtient le tableau suivant :

<i>t en min</i>	0	10	20	30	40	60	90	120
<i>$[\text{CrY}]$ en mol.L^{-1}</i>	0	$0,240 \times 10^{-3}$	$0,450 \times 10^{-3}$	$0,650 \times 10^{-3}$	$0,840 \times 10^{-3}$	$1,17 \times 10^{-3}$	$1,57 \times 10^{-3}$	$1,88 \times 10^{-3}$

2.1. Donner l'expression de la vitesse de la réaction en fonction de k et des concentrations en ions Cr^{3+} et H_2Y^{2-} .

2.2. Calculer la concentration en ions H_2Y^{2-} en fin de réaction. Comparer cette valeur à la valeur initiale de la concentration en ions H_2Y^{2-} , $[\text{H}_2\text{Y}^{2-}]_0 = 0,100 \text{ mol.L}^{-1}$.

En déduire que la concentration en ions H_2Y^{2-} peut être considérée comme constante au cours de la réaction.

Donner alors une expression simplifiée de la vitesse de la réaction en introduisant une constante k' que l'on définira. Quel est alors l'ordre apparent de la réaction par rapport au réactif Cr^{3+} ?

2.3. Établir par un simple bilan de matière la relation reliant les concentrations molaires des espèces chimiques Cr^{3+} et CrY à l'instant de date t .

Consigner dans un tableau les huit valeurs numériques de $[\text{Cr}^{3+}]$ pour chacune des dates t figurant dans le tableau ci-dessus.

2.4. On suppose que la disparition des ions Cr^{3+} suit une loi de vitesse du premier ordre. Donner sans démonstration la relation entre le temps t écoulé depuis le début de la réaction, la valeur correspondante $[\text{Cr}^{3+}]$ de la concentration des ions Cr^{3+} et la valeur initiale de la concentration en ions Cr^{3+} , $[\text{Cr}^{3+}]_0$.

2.5. Montrer par une méthode graphique que la cinétique est d'ordre 1 par rapport aux ions Cr^{3+} . On prendra **obligatoirement** pour échelle :

- 1 cm pour 10 minutes,
- 10 cm pour une unité logarithmique.

2.6. En déduire la valeur de la constante k' . Préciser son unité.

2.7. En déduire la valeur de la constante k . Préciser son unité.

3 CHIMIE ORGANIQUE (13 points)

L'éphédrine est une molécule naturelle extraite de l'Ephédra et utilisée depuis 5000 ans par la médecine chinoise. Il s'agit d'un produit dopant et stimulant.

L'éphédrine naturelle est la (-) éphédrine ou

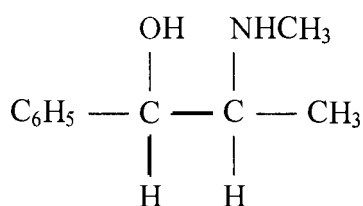
(1R, 2S)-1-phényl-2-(N-méthyl)-aminopropan-1-ol

dont la formule semi-développée plane est la suivante :

1. Faire une représentation de Cram (perspective) de la molécule naturelle de configuration (1R, 2S) : le carbone numéro 1 sera représenté à gauche. Justifier la représentation faite.

Données

Numéros atomiques : $Z(O) = 8$; $Z(N) = 7$; $Z(C) = 6$, $Z(H) = 1$



2. Étude des propriétés optiques de la molécule

2.1. Que signifie la notation (-) devant le nom de la molécule ?

2.2. La loi de Biot est donnée pour une espèce chimique optiquement active en solution dans un solvant inactif par la relation : $\alpha = [\alpha] \cdot l \cdot \rho$.

Donner la signification de chacun des termes de cette loi.

2.3. Une solution d'éphédrine de concentration massique $\rho = 100 \text{ g.L}^{-1}$ placée dans la cuve d'un polarimètre de longueur 20,0 cm possède un pouvoir rotatoire de $(- 1,20^\circ)$. Calculer le pouvoir rotatoire spécifique de l'éphédrine en $(^\circ \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{m}^2)$.

3. La synthèse chimique de l'éphédrine est réalisée depuis 1923. La première étape consiste à faire réagir du benzène sur le chlorure de propanoyle ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{COCl}$) en présence de trichlorure d'aluminium (AlCl_3).

3.1. Quel est le rôle de AlCl_3 ?

3.2. De quel type de réaction s'agit-il ?

3.3. Écrire le mécanisme de la réaction.

3.4. Écrire l'équation de la réaction.

Proposition de corrigé de l'épreuve de Sciences Physiques

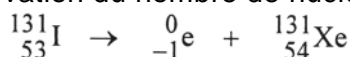
Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

1 PHYSIQUE (16 points)

1.1. 53 protons et 131 – 53 neutrons

1.2. Électrons

1.3. Lois de conservation : conservation du nombre de nucléons et du nombre de charges.



1.4.1. $\Delta m = (m_{\beta} + m_{\text{Xe}} - m_{\text{I}})$

1.4.2. $\Delta E = \Delta m \cdot c^2$, $E_1 = |\Delta m| \cdot c^2$

1.4.3. $\Delta E = (m_{\beta} + m_{\text{Xe}} - m_{\text{I}}) \cdot c^2$
 $= (0,000549 + 130,905072 - 130,906114) \times 1,66 \cdot 10^{-27} \times (3,00 \cdot 10^8)^2$
 $= -7,37 \cdot 10^{-14} \text{ J} = -0,461 \text{ MeV}$ $E_1 = 0,461 \text{ MeV}$

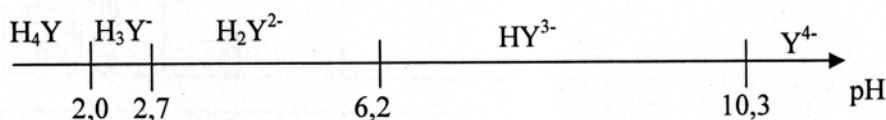
1.5. Désexcitation du noyau fils (Xe). $E_2 = (h \cdot c) / \lambda_2$ donc $\lambda_2 = (h \cdot c) / E_2$ et :
 $\lambda_2 = (6,63 \cdot 10^{-34} \times 3,00 \cdot 10^8) / (0,268 \times 1 \times 10^6 \times 1,60 \cdot 10^{-19}) = 4,64 \cdot 10^{-12} \text{ m}$

2.1. $A = \lambda \cdot N = (\ln 2) / T$ et $N = (A \cdot T) / \ln 2 = (2,00 \cdot 10^8 \times 8,10 \times 24 \times 3600) / \ln 2 = 2,02 \cdot 10^{14}$ noyaux

2.2.1. $m = (N / N_A) \times M_{\text{KI}} = (2 \cdot 10^{14} \times 170) / 6,02 \cdot 10^{23} = 6 \cdot 10^{-8} \text{ g}$

2.2.2. La masse de KI radioactif est très faible devant la masse de la gélule. Les excipients servent à donner un certain volume à la gélule.

2 CHIMIE GÉNÉRALE (21 points)



1.1.

1.2. Donc, à pH = 5,1 il y a prédominance de H₂Y²⁻.

2.1. $v = k[\text{Cr}^{3+}] \cdot [\text{H}_2\text{Y}^{2-}]$

2.2. Le tableau ci-dessous n'était pas exigé.

Équation de la réaction		$\text{Cr}^{3+}_{(aq)} + \text{H}_2\text{Y}^{2-}_{(aq)} = \text{CrY}_{(aq)} + 2\text{H}^+_{(aq)}$			
État du système	Avancement (en mol)	Quantité de matière (en mol)			
État initial	$x = 0$	$(3,00 \cdot 10^{-3})$ V-x	$(0,100)$ V-x	x	x
État au cours de la transformation	x	$(3,00 \cdot 10^{-3})$ V-x	$(0,100)$ V-x	x	x
État final	x_{max}	$(3,00 \cdot 10^{-3})$ V- x_{max}	$(0,100)$ V- x_{max}	x_{max}	x_{max}

Les quantités de matière sont positives ou nulles : $(3,00 \cdot 10^{-3})$ V-x ; $(0,100)$ V-x ; $x_{\text{max}} = 3,00 \cdot 10^{-3}$ V
 $[\text{H}_2\text{Y}^{2-}] = 0,100 - 3,00 \cdot 10^{-3} = 9,7 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: la variation est au plus égale à 3 % de la valeur initiale.

Cette concentration est voisine de la concentration initiale. On peut donc considérer la concentration en ions $\text{H}_2\text{Y}^{2-}_{(\text{aq})}$ comme constante au cours de la réaction.

$$v = k' [\text{Cr}^{3+}_{(\text{aq})}] \text{ avec } k' = [\text{H}_2\text{Y}^{2-}]$$

L'ordre apparent de la réaction par rapport au réactif Cr^{3+} est de 1.

2.3. Avec $[\text{Cr}^{3+}]_{(t)} = [\text{Cr}^{3+}]_0 - [\text{CrY}^-]_{(t)}$:

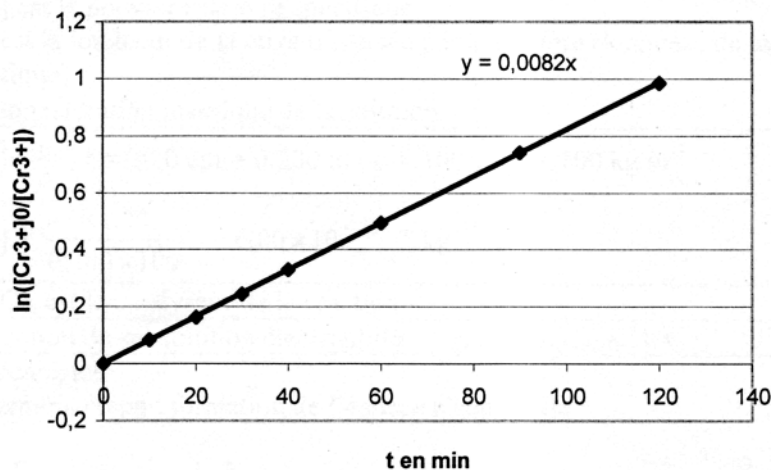
t en min	0	10	20	30
$[\text{CrY}^-]$	0	$0,240 \cdot 10^{-3}$	$0,450 \cdot 10^{-3}$	$0,650 \cdot 10^{-3}$
$[\text{Cr}^{3+}]$	$3,00 \cdot 10^{-3}$	$2,76 \cdot 10^{-3}$	$2,55 \cdot 10^{-3}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$

t en min	40	60	90	120
$[\text{CrY}^-]$	$0,840 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-3}$	$1,57 \cdot 10^{-3}$	$1,88 \cdot 10^{-3}$
$[\text{Cr}^{3+}]$	$2,16 \cdot 10^{-3}$	$1,83 \cdot 10^{-3}$	$1,43 \cdot 10^{-3}$	$1,12 \cdot 10^{-3}$

2.4. $\ln([\text{Cr}^{3+}]_0 / [\text{Cr}^{3+}]) = k' \cdot t$

2.5. Il faut tracer le graphe $\ln([\text{Cr}^{3+}]_0 / [\text{Cr}^{3+}]) = f(t)$.

t en min	0	10	20	30	40	60	90	120
$\ln([\text{Cr}^{3+}]_0 / [\text{Cr}^{3+}])$	0	0,0834	0,162	0,244	0,329	0,494	0,741	0,985



On obtient une droite passant par l'origine, donc la cinétique est bien d'ordre 1 par rapport aux ions Cr^{3+} .

2.6. k' est le coefficient directeur de la droite : $8,23 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

2.7. $k = k' / [\text{H}_2\text{Y}^{2-}]_0 = 8,23 \cdot 10^{-3} / 0,100 = 8,23 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$.

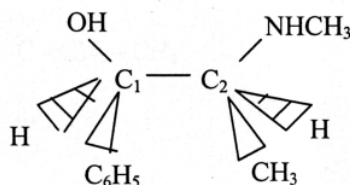
3. CHIMIE ORGANIQUE (13 points)

1. C_1 et C_2 sont asymétriques.

Classement par Z décroissant :
 sur C_1 : OH, C_2 , C_6H_5 , H
 sur C_2 : NHCH_3 , C_1 , CH_3 , H

Observation en plaçant les numéros 4 à l'arrière pour chaque carbone asymétrique.

Nomenclature R si le sens de rotation 1, 2, 3 est dans le sens horaire, S dans le sens inverse.



2.1. La notation (-) signifie que la molécule est lévogyre.

2.2. $\alpha = [\alpha] \cdot \ell \cdot \rho$

α est le pouvoir rotatoire ; $[\alpha]$ est le pouvoir rotatoire spécifique ; ℓ est la longueur de la cuve traversée par la lumière (longueur du trajet optique) ; ρ est la concentration massique de la solution

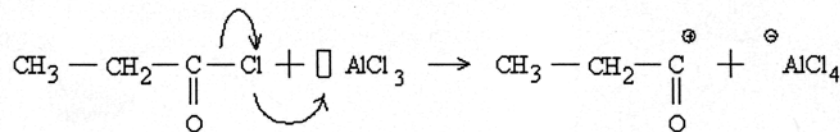
2.3. $[\alpha] = \alpha / \ell \cdot \rho = -1,2 / (0,200 \cdot 100) = -6,00 \cdot 10^{-2} \text{ } ^\circ \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{m}^2$

3.1. AlCl_3 est le catalyseur de la réaction.

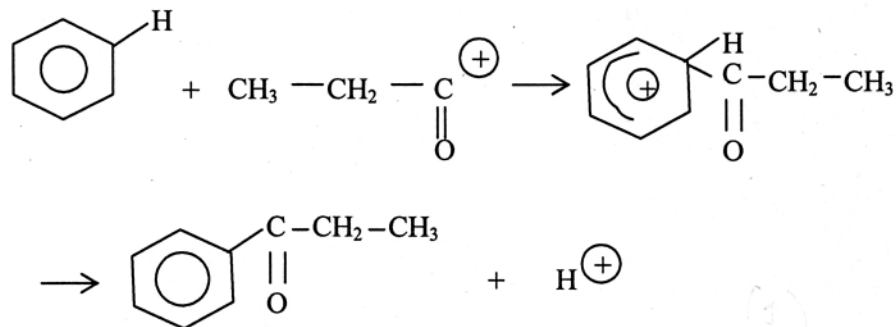
3.2. Réaction de substitution électrophile.

3.3. Mécanisme

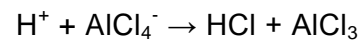
Première étape : formation de l'espèce électrophile



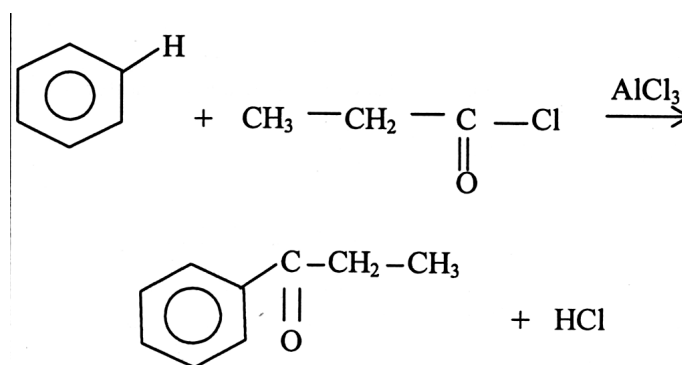
Deuxième étape : substitution



Troisième étape : reconstitution du catalyseur



3.4. Équation de la réaction :



SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GÉNIE BIOLOGIQUE

Durée : 4 heures Coefficient : 6
L'usage d'une calculatrice est interdit.

Avertissement important : comme le lecteur s'en apercevra, la forme de ce type d'épreuve (de la session 1986 à 2008) était un sujet qui ne comportait que des questions de cours.

LE DIOXYGÈNE

1. Diffusion du dioxygène (38 points)

Le dioxygène est un gaz nécessaire à la vie aérobie des cellules. À ce titre, sa diffusion dans les milieux et les membranes biologiques est essentielle.

1.1. Membrane plasmique et diffusion

La membrane plasmique des cellules est une structure supramoléculaire complexe qui délimite les cellules vivantes. Sa structure a été modélisée en 1972 sous forme d'une mosaïque fluide par Singer et Nicholson.

1.1.1. Représenter par un schéma légendé la structure de la membrane plasmique eucaryote.

1.1.2. Justifier le terme de « mosaïque fluide ».

1.1.3. Le dioxygène sous forme dissoute traverse la membrane par diffusion simple. De nombreux autres solutés utilisent un mécanisme de diffusion facilitée par un transporteur.

1.1.3.1. Exposer les caractéristiques de la diffusion simple et de la diffusion facilitée.

1.1.3.2. Tracer sur un graphe l'évolution de la vitesse de transport en fonction de la concentration en soluté :

- dans le cas d'une diffusion simple
- dans le cas d'une diffusion facilitée par un transporteur.

1.1.4. Présenter les autres types de transports membranaires possibles. Illustrer chacun d'eux par un exemple.

1.2. Diffusion du dioxygène en bioréacteur

Le dioxygène est un facteur limitant de la croissance des organismes aérobies en culture.

1.2.1. Quels sont les problèmes posés par le dioxygène en génie fermentaire ?

1.2.2. Schématiser le parcours d'une molécule de dioxygène du milieu de culture vers son site d'utilisation cellulaire en précisant les étapes limitantes de la diffusion.

1.2.3. Définir le $K_L a$ d'un bioréacteur et proposer une méthode permettant sa détermination.

1.2.4. Indiquer trois paramètres permettant d'améliorer l'oxygénation d'un milieu en bioréacteur.

2. Métabolismes oxydatifs (41 points)

2.1. Diversités des métabolismes

2.1.1. Présenter les différents types énergétiques rencontrés chez les microorganismes en distinguant la source d'énergie et la source d'électrons.

2.1.2. Citer et définir les différents comportements vis-à-vis du dioxygène qui peuvent être rencontrés chez les microorganismes.

2.2. Fonctionnement de la chaîne respiratoire

2.2.1. Dans les cellules eucaryotes l'énergie chimique issue de l'oxydation des nutriments est convertie en ATP grâce à la chaîne respiratoire.

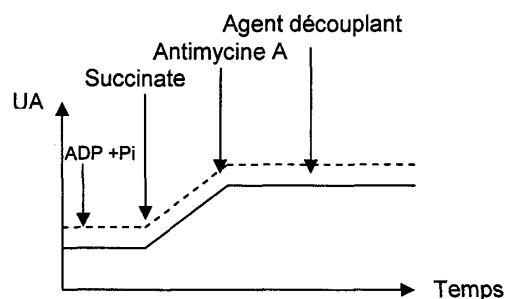
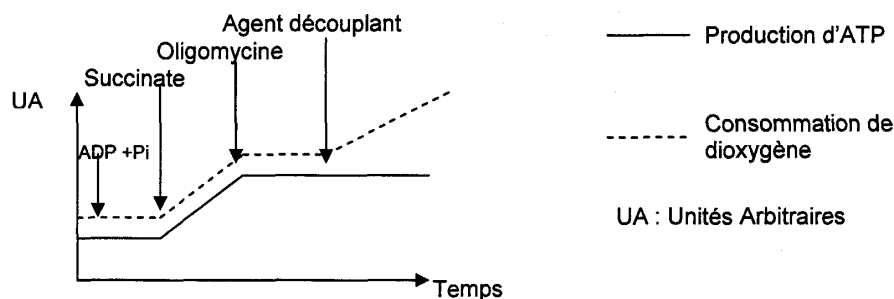
- Présenter un schéma de cette chaîne respiratoire.
- Préciser sa localisation dans la cellule.

2.2.2. Expliquer le couplage entre le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP.

2.2.3. L'antimycine A et l'oligomycine sont deux antibiotiques agissant par inhibition de la phosphorylation oxydative.

Pour préciser la cible d'action de ces deux antibiotiques (chaîne respiratoire ou ATPase), l'expérience suivante est réalisée :

Une suspension de mitochondries est réalisée en eau physiologique. La consommation du dioxygène et la formation d'ATP sont suivies après l'ajout de divers additifs.

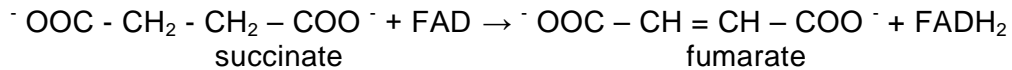


2.2.3.1. Commenter les courbes obtenues et préciser la cible des deux antibiotiques en justifiant la réponse.

2.2.3.2. Citer quatre autres cibles potentielles des antibiotiques.

2.3. Métabolisme associé à la respiration

La succinate déshydrogénase catalyse la réaction suivante :



Le malonate ($^- \text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$) exerce un effet inhibiteur sur cette enzyme.

2.3.1. Expliquer l'effet inhibiteur du malonate sur la succinate déshydrogénase.

2.3.2. Nommer ce type d'inhibition.

2.3.3. Représenter sur le même graphique $V_i = f([\text{succinate}])$ en absence et en présence de malonate.

2.3.4. Indiquer sur ce graphique les constantes michaeliennes dans les deux cas.

2.3.5. Proposer une solution simple pour obtenir une activité succinate déshydrogénase satisfaisante en présence de malonate.

3. Les organismes producteurs de dioxygène (41 points)

3.1. Les organismes procaryotes producteurs de dioxygène

3.1.1. Il existe deux types de photosynthèse chez les bactéries : la photosynthèse en milieu aérobie et la photosynthèse en milieu anaérobie.

Donner un exemple de groupe bactérien représentant chacun de ces cas.

3.1.2. Certaines bactéries sont des procaryotes phototrophes et fixateurs d'azote.

3.1.2.1. Nommer l'enzyme permettant la fixation du diazote atmosphérique.

3.1.2.2. Préciser la condition physicochimique permettant l'activité de cette enzyme.

3.2. Les organismes eucaryotes producteurs de dioxygène

Les organismes eucaryotes producteurs de dioxygène sont les végétaux et les algues.

3.2.1. Représenter par un schéma légendé l'ultrastructure d'une cellule végétale type.

3.2.2. La production de dioxygène chez les eucaryotes a lieu au niveau d'organites spécialisés.

- Nommer les trois organites représentés dans l'**annexe 1**.
- Indiquer celui qui est responsable de la production de dioxygène.
- Présenter le rôle des deux autres organites.

3.2.3. Deux de ces trois organites sont dits « semi-autonomes ». Ils seraient issus d'une symbiose ancestrale avec des cellules procaryotes (théorie endo-symbiotique de Margulis).

- Justifier l'appellation « organites semi-autonomes ».
- Présenter un autre argument en faveur de cette théorie.

3.2.4. Les photosystèmes sont responsables de la photosynthèse :

- Préciser la localisation de ces photosystèmes au sein des chloroplastes.
- Exposer l'intérêt métabolique des photosystèmes I et II.

3.3. Le cycle du dioxygène

Présenter sous forme de schéma le cycle du dioxygène, en mettant en évidence les organismes vivants qui y participent.

3.4. Modification génétique des plantes d'intérêt agro-alimentaire

Pour permettre aux végétaux des pays tempérés de s'adapter au stress oxydatif lié au réchauffement climatique, on envisage le transfert d'un gène responsable d'un métabolisme adapté aux climats tropicaux.

La transgénèse végétale peut être réalisée grâce au système suivant : une bactérie *Agrobacterium tumefaciens* possédant deux plasmides, un plasmide pTi (tumor inducing plasmid) d'*Agrobacterium tumefaciens* et un plasmide (pN) d'*Escherichia coli* modifié.

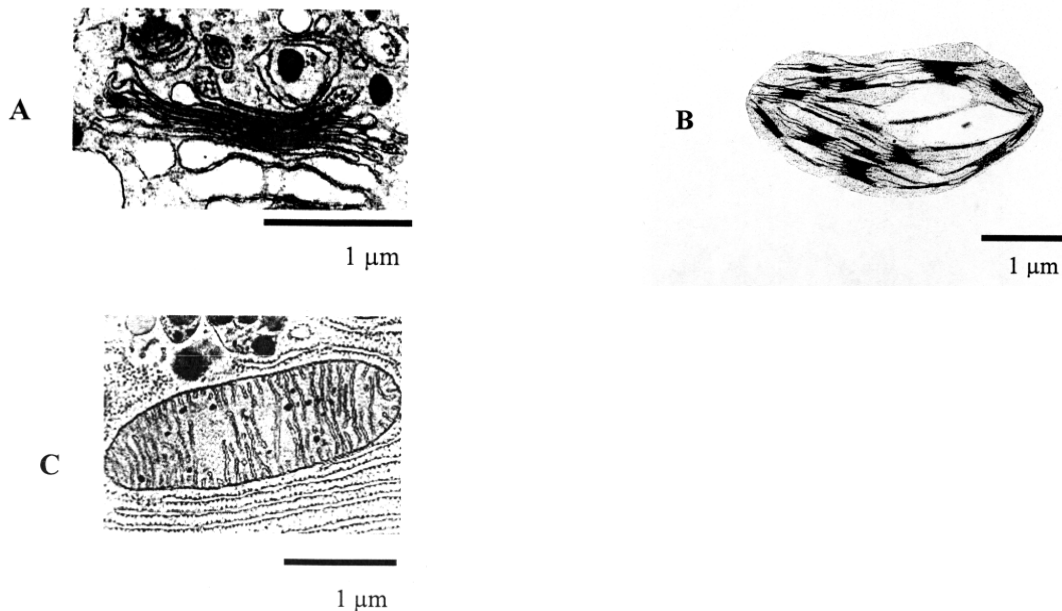
3.4.1. Comment s'appelle un tel système ?

3.4.2. Indiquer la fonction de chacune des séquences plasmidiques présentées sur l'**annexe 2**.

3.4.3. Schématiser la structure du gène d'intérêt et préciser les éléments qui permettent son expression dans la plante transfectée.

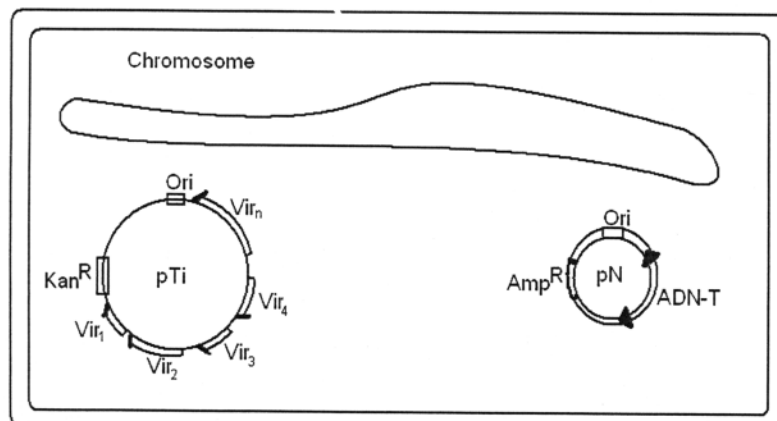
3.4.4. Citer deux autres méthodes de transfection utilisables chez les végétaux.

Annexe 1



Annexe 2

Agrobacterium tumefaciens



Proposition de corrigé de l'épreuve de SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GÉNIE BIOLOGIQUE

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

1.1.1. Schéma propre, orienté et légendé montrant sur une coupe de la membrane plasmique : les phospholipides en double couche, le cholestérol, les protéines extrinsèques et intrinsèques, les chaînes glycosylées.

1.1.2. Mosaïque : association des différents éléments.

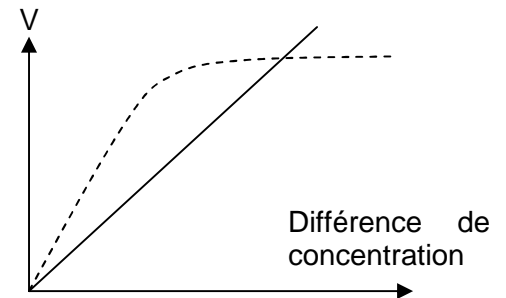
Fluide : l'organisation permet le déplacement des molécules (phospholipides et protéines) notamment latéralement, et occasionnellement d'un feuillet à l'autre.

1.1.3.1. Diffusion simple : elle a lieu dans le sens du gradient de concentration, sans intervention d'un transporteur et sans dépense d'énergie.

Diffusion facilitée : le soluté traverse la membrane grâce à une protéine transmembranaire (une perméase) qui est saturable, spécifique et dont la synthèse est inductible.

1.1.3.2. Diffusion simple : segment de droite (trait plein)

Diffusion facilitée : branche d'hyperbole (tirets)



1.1.4. Transports actifs : un transporteur protéique intervient, le déplacement a lieu contre le gradient de concentration et avec consommation d'énergie.

Transport actif primaire : l'énergie chimique est libérée par l'hydrolyse de l'ATP, par exemple dans le cas de la pompe Na^+/K^+ .

Transport actif secondaire : il utilise l'énergie d'un autre gradient (par cotransport ou antiport) pour transporter le soluté concerné. Exemple d'antiport : expulsion d'un ion Ca^{2+} et entrée d'un ion Na^+ . Exemple de cotransport : absorption conjointe du glucose et de l'ion Na^+ dans l'entérocyte, ou entrée du lactose avec H^+ dans *Escherichia coli* grâce au gradient d'ions H^+ .

1.2.1. Le dioxygène est faiblement soluble dans l'eau, donc dans les milieux de culture, dont les constituants peuvent également modifier sa solubilité (c'est-à-dire la concentration maximale qu'il peut atteindre). Celle-ci (notée souvent C^*) diminue lorsque la température augmente, ce qui pose problème pour les cultures en bioréacteur, qui sont en général menées à des températures supérieures à la température ambiante.

1.2.2. Schéma montrant : la sortie du dioxygène de la bulle d'air, sa solubilisation et sa diffusion dans le milieu de culture, puis le franchissement des enveloppes de la cellule.

1.2.3. Le $K_L a$ est le coefficient de transfert volumétrique du dioxygène, il est exprimé en inverse d'unité de temps (par exemple en min^{-1} ou h^{-1}).

Sa détermination a lieu par le suivi de la concentration instantanée C_L ou du pourcentage de saturation $\% \text{O}_2 = C_L / C^*$ indiqué par le module de contrôle du bioréacteur :

○ En méthode statique (en absence de culture) : après avoir saturé le milieu étudié en dioxygène par aération, on provoque la disparition du dioxygène (par exemple par une « chasse au diazote ») puis on réoxygène en suivant l'évolution de la relation $\ln(C^*/(C^*-C_L)) = f(t)$ ou $\ln(100-\% \text{O}_2) = f(t)$ (on peut aussi utiliser les log). On obtient alors un segment de droite de pente $-K_L a$.

ou

○ En méthode dynamique, on procède au suivi d'une culture consommant du dioxygène, puis on coupe l'aération et on détermine alors $-Q_{\text{O}_2} \cdot X$, vitesse de consommation OUR (oxygen uptake rate), puis on réoxygène, l'évolution de dC_L/dt est alors écrite : $dC_L/dt = K_L a \cdot (C^* - C_L) - Q_{\text{O}_2} \cdot X$, où $K_L a \cdot (C^* - C_L)$ représente l'oxygénation OTR (oxygen transfer rate). On peut alors déterminer $K_L a$.

1.2.4. Augmentation de la vitesse d'agitation et/ou du débit d'air, augmentation du %O₂ dans l'air entrant par enrichissement en dioxygène, diminution de la température (si c'est possible ...) ...

2.1.1. Les appellations dues au type de source d'énergie (chimio ou photo) et au type de nutriment énergétique (litho ou organo) qui fournit les électrons, ce qui donne :

Nutriment énergétique	Source d'énergie	
	lumineuse	chimique
minéral	photolithotrophes	chimiolithotrophes
organique	photoorganotrophes	chimioorganotrophes

2.1.2. Aérobie stricts : le dioxygène, accepteur final de la chaîne respiratoire, leur est indispensable.

Aéro-anaérobies facultatifs : l'utilisation du dioxygène est possible, ils sont aussi capables d'effectuer des processus fermentaires.

Anaérobies aéro-tolérants : ils utilisent un autre accepteur final d'électrons mais le dioxygène n'est pas toxique.

Anaérobies stricts : le dioxygène est toxique, ils utilisent d'autres accepteurs finaux d'électrons.

Microaérophiles : une concentration limitée en dioxygène leur est indispensable (O₂ est l'accepteur final mais il est toxique à la concentration atmosphérique).

2.2.1. Schéma propre, orienté et légendé montrant sur une coupe de la membrane mitochondriale interne : le NADH comme donneur initial, la présence de différents complexes protéiques, les flux d'électrons, les flux d'ions H⁺ orientés (sortie de protons dans l'espace intermembranaire, puis entrée avec synthèse d'ATP)

2.2.2. Libération d'énergie par le transfert d'ions H⁺ : la membrane de la mitochondrie est imperméable aux protons, donc entrée passive de ceux-ci vers la matrice mitochondriale via le canal de l'ATP-synthétase, la synthèse d'ATP est liée à l'utilisation du gradient.

2.2.3.1. Le succinate, donneur d'ions H⁺ et d'électrons, déclenche la consommation de dioxygène. La consommation de dioxygène et la production d'ATP sont stoppées par l'addition des antibiotiques, car les deux phénomènes sont couplés :

- Cas de l'oligomycine : la consommation d'O₂ a encore lieu après le découplage, donc l'étape bloquée était la production d'ATP, qui ne reprend pas
- Cas de l'antimycine : la consommation d'O₂ ne reprend pas après le découplage, donc l'étape qui est bloquée est la consommation de l'ATP

2.2.3.2. Cibles moléculaires ou structurales : membrane plasmique, ribosomes, ADN gyrase ...

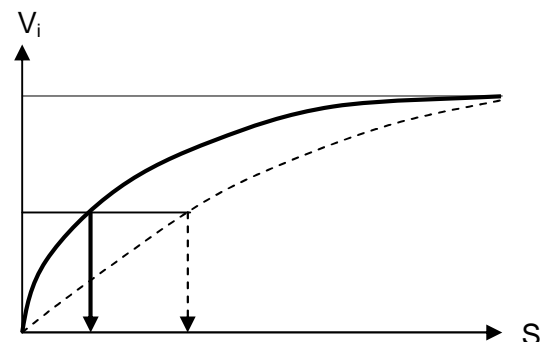
Phénomènes inhibés ou perturbés :
synthèse de peptidoglycane,
réplication, transcription, traduction,
métabolisme ...

2.3.1. Le malonate est un analogue structural qui se fixe sur le site actif de l'enzyme.

2.3.2. C'est une inhibition compétitive.

2.3.3. et 2.3.4.

Courbe en traits pleins : en absence de malonate, la courbe est une branche d'hyperbole, montrant une asymptote qui correspond à la vitesse maximale V_{max} et l'abscisse du point d'ordonnée $V_{max}/2$ correspond à la constante de Michaelis K_M . En présence de malonate (courbe en tirets), on constate que V_{max} est inchangée mais que K_M est augmentée.



2.3.5. Il faudrait opérer en présence d'une concentration plus élevée en succinate, donc en ajouter dans le milieu réactionnel.

3.1.1. Les bactéries « vertes » et « bleues » effectuent une photosynthèse oxygénique et les bactéries pourpres une photosynthèse anoxygénique.

3.1.2.1. La nitrogénase.

3.1.2.2. Fonctionnement en présence d'une concentration limitée en dioxygène.

3.2.1. Schéma propre, orienté et légendé montrant : la paroi pectocellulosique, la membrane plasmique, le cytoplasme, un chloroplaste, une mitochondrie, une vacuole, un noyau.

3.2.2. L'appareil de Golgi (photo A de l'annexe 1) assure la maturation et l'adressage des protéines.

Le chloroplaste (photo B) assure la photosynthèse et donc la production de dioxygène.

La mitochondrie (photo C) assure la production d'énergie par le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire.

3.2.3. Ils possèdent une réplication de l'ADN et une synthèse protéique propres.

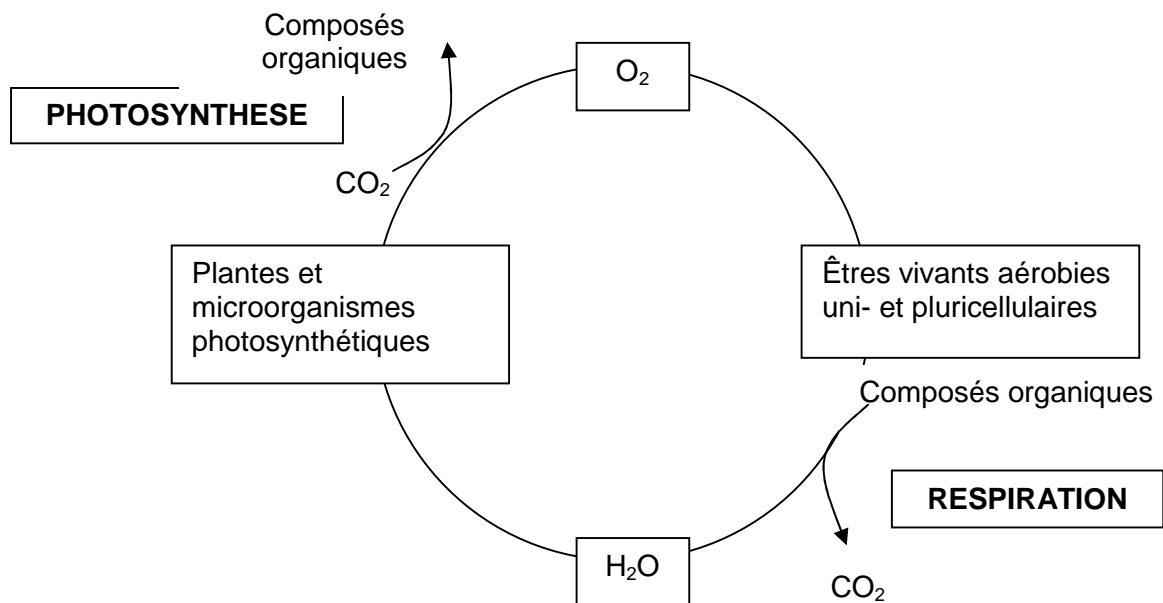
La théorie endo-symbiotique repose, en plus des deux caractéristiques précédentes, sur des arguments phylogénétiques, sur la taille des organites ou la présence d'une double membrane.

3.2.4. Les photosystèmes sont localisés dans la membrane des thylacoïdes des chloroplastes.

Le photosystème II permet l'utilisation de l'énergie lumineuse, photolyse de l'eau et la production de dioxygène, la création d'un gradient de protons, puis la formation d'ATP.

Le photosystème I assure la formation de pouvoir réducteur sous forme de $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

3.3.



3.4.1. C'est un système binaire, puisque la cellule héberge en même temps deux vecteurs.

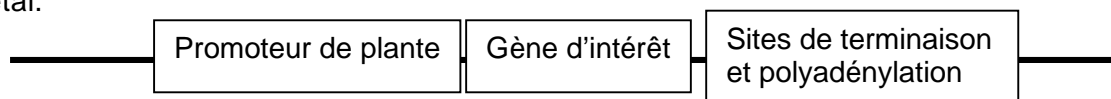
3.4.2. ORI : origine de réplication

Amp^{R} et Kan^{R} : gènes de résistance à des antibiotiques (ampicilline et kanamycine respectivement) permettant de maintenir la pression de sélection et donc d'éviter la perte des plasmides.

VIR : gènes de virulence, impliqués notamment dans le transfert du vecteur

ADN-T : région génétique, contenant le gène d'intérêt, qui sera intégrée dans le génome végétal.

3.4.3.



3.4.4. Biolistique, transfection sur un protoplaste (par électroporation, lipofection, ...)

ETUDE DE PROJET

Durée : 4 heures Coefficient : 4

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

Avertissement important : comme le lecteur s'en apercevra, la forme de ce type d'épreuve (des sessions 1986 à 2008) était un sujet qui comportait des questions de technologie (portant notamment sur des principes de manipulations) et des questions d'exploitation de documents.

Production et caractérisation de deux variants de la protéine prion du mouton

Les prions sont des agents pathogènes transmissibles non conventionnels responsables d'encéphalopathies spongiformes (maladie de Creutzfeldt-Jakob, tremblante du mouton) ayant toutes des caractéristiques communes. Ces agents provoquent des désordres neurovégétatifs affectant diverses espèces de mammifères.

Une glycoprotéine, la PrPc, abondante à la surface des neurones et qui interviendrait dans le fonctionnement synaptique et la transduction des signaux, serait à l'origine de ces pathologies. Cette molécule pourrait changer de conformation, de la forme PrPc physiologique à celle pathologique, dite "scrapie" ayant un taux de feuillets β augmenté et celui d'hélices α diminué.

Chez le mouton, une étude génétique menée sur le gène PRNP qui code la protéine PrPc a fait ressortir deux allèles particuliers :

- Les animaux homozygotes portant l'**allèle V136-Q171** (valine en position 136 et glutamine en position 171) sont particulièrement prédisposés à la maladie. La protéine synthétisée est nommée **PrPc (VQ)**.
- Les animaux homozygotes pour l'**allèle A136-R171** (alanine en position 136 et arginine en position 171) sont très peu sujets à la maladie. La protéine synthétisée est nommée **PrPc (AR)**.

Les clonages des deux variants du gène PRNP codant la protéine PrPc du mouton ont été réalisés dans *E.coli*. Il est alors possible de produire et purifier en grande quantité ces deux protéines afin d'en étudier les propriétés.

1. Clonage médié par PCR des variants du gène PRNP du mouton (23 pts)

La stratégie de clonage des deux variants est similaire.

Le **document n°1** présente la structure du gène PRNP du mouton (*Ovis aries*). Seul l'exon n°2 code la protéine prion et son clonage a été décidé pour les deux variants du gène PRNP.

1.1. Choix des amorces

1.1.1 À partir du **document n° 1a**, préciser pourquoi ce clonage est réalisable par PCR.

1.1.2 À l'aide du **document n° 1b**, déterminer les séquences des deux amorces utilisables pour cette PCR et s'hybrident avec les régions soulignées. Justifier.

Elles sont nommées respectivement « *amorce 161* » et « *amorce 931* » selon leur site d'hybridation.

1.1.3 Calculer la T_m (°C) de chacune de ces deux amorces en utilisant la règle de Wallace :

$$T_m (\text{°C}) = (4 \times \text{nombre de bases GC}) + (2 \times \text{nombre de base AT})$$

1.1.4 Déterminer une valeur de température d'hybridation pour ce couple d'amorces.

Le clonage est réalisé en utilisant ces amorces modifiées au niveau de leur extrémité 5' par l'ajout, lors de leur synthèse, d'une petite séquence possédant un site de restriction unique :

Séquence ajoutée à l'amorce 161 : 5'-**ATGCGAATTC**-3' où GAATTC correspond à un site *Eco* RI

Séquence ajoutée à l'amorce 931 : 5'-**AGTCCATATG**-3' où CATATG correspond à un site *Nde* I.

1.1.5 Quel est le rôle des nucléotides indiqués en caractères gras dans les séquences ajoutées aux amorces ?

1.1.6 À l'aide des **documents 1a et 1b**, calculer la taille de l'amplicon attendu. Expliquer.

1.2. Optimisation de la PCR

Cette PCR est réalisée avec différentes concentrations en magnésium. Les résultats sont présentés dans le **document n° 2**.

1.2.1 Quelle est la composition du tube "témoin négatif" ? Quel est son rôle ? Quel autre témoin peut être réalisé ? Donner sa composition et son rôle.

1.2.2 Présenter l'analyse de cet électrophorégramme sous la forme d'un tableau (nombre de bandes, taille estimée, intensité).

Commenter les résultats des pistes 3 à 8.

1.2.3 Conclure quant aux conditions optimales en magnésium de cette PCR.

2. Production des variants de la protéine PrPc par fermentation (18 pts)

La production de la protéine recombinée est réalisée dans une unité de fermentation de 3 L utiles, selon le mode opératoire présenté dans le **document n° 3**.

2.1. Étude des étapes de la production

2.1.1 Expliquer le rôle des différentes étapes de la production.

Préciser le rôle de l'ampicilline.

2.1.2 Préciser l'intérêt d'une absorbance proche de 1 à l'étape n° 2 du mode opératoire.

2.1.3 À partir du **document n° 3**, calculer la quantité d'IPTG nécessaire à la réalisation d'une production. En déduire le conditionnement le plus approprié à l'aide du **document n° 4**.

2.1.4 Justifier l'intérêt de réaliser les deux prélèvements aux étapes 2 et 3.

2.1.5 Comment peut-on procéder en fin de production pour l'évaluation de la biomasse ? Quel en est l'intérêt ?

2.2. Étude de l'unité de fermentation

2.2.1 Légender le **document n° 5 a**, en reportant les numéros sur la copie.

2.2.2 À partir du schéma de l'échantillonneur (**document n° 5 b**), présenter le mode opératoire à suivre pour effectuer un prélèvement.

3. Production d'anticorps monoclonaux spécifiques des variants de la protéine PrPc (17 pts)

Les études envisagées nécessitent de disposer d'anticorps monoclonaux murins spécifiques de la protéine prion PrPc reconnaissant indifféremment les protéines PrPc (VQ) et PrPc (AR).

3.1. Obtention des hybridomes et contrôle de la préparation obtenue.

3.1.1 À partir du **document n° 6**, justifier le choix des souris PrP.^{0/0} pour l'immunisation.

Afin de s'assurer que les hybridomes obtenus sont producteurs d'anticorps monoclonaux, un test ELISA est pratiqué sur les surnageants de culture des hybridomes.

3.1.2 À partir du **document n° 7**, schématiser les différentes étapes du test ELISA. Indiquer leurs rôles et préciser les conditions opératoires.

3.1.3 Quelles sont les caractéristiques de l'anticorps appelé « *second antibody* » utilisé dans ce protocole ?

3.2. Production d'ascite

Une inflammation est déclenchée par injection d'une molécule, le pristane dans la cavité intra-péritonéale d'une souris PrP^{0/0}. Après 48 h, $8,0 \cdot 10^5$ cellules d'hybridomes sont injectées dans le péritoine de la souris. Celle-ci est surveillée quotidiennement pour apprécier le gonflement abdominal jusqu'au prélèvement de l'ascite après environ 10 jours.

3.2.1 Quel volume d'hybridome faut-il injecter à la souris sachant qu'après trypsination d'une culture d'hybridomes, la concentration cellulaire est de $3,4 \cdot 10^6$ cellules totales.mL⁻¹ et la viabilité de 94 % ?

3.2.2 Quels sont les avantages et inconvénients de la production d'anticorps monoclonaux en ascite de souris et en cytotuteur ?

4. Purification et analyse des variants de la protéine PrPc (22 pts)

4.1 Purification des deux variants

Les deux protéines, **PrPc (VQ)** et **PrPc (AR)**, contiennent naturellement des régions riches en histidines, présentant une haute affinité pour le nickel. Cette propriété est utilisée pour les purifier. Le **document n° 8** présente les différentes étapes à suivre pour les extraire et les purifier, à partir de *E.coli* BL21 recombinées.

4.1.1 Expliciter le mode opératoire de l'étape d'extraction.

4.1.2 Expliquer le principe de l'élution des protéines retenues en présence d'imidazole 1 M.

4.1.3 Indiquer le rôle de l'étape soulignée dans le protocole utilisé.

4.2. Analyse des caractéristiques structurales des variants PrPc (VQ) et PrPc (AR).

La masse moléculaire de ces protéines est connue (23 kDa). Afin de préciser leurs caractéristiques structurales, elles sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide selon deux conditions expérimentales :

A : SDS

B : SDS + β -mercaptoéthanol

4.2.1 Préciser l'action du β -mercaptoéthanol sur les protéines.

4.2.2 Analyser l'électrophorégramme obtenu (**document n° 9**).

Conclure quant à la structure monomérique ou multimérique des variants protéiques.

4.3. Protéolyse ménagée du variant PrPc (VQ)

On cherche à démontrer l'influence de la conformation tridimensionnelle d'une protéine sur l'action de la chymotrypsine. La chymotrypsine est une protéase, qui hydrolyse les liaisons peptidiques du côté carboxyl des résidus tryptophanyl, tyrosyl et phénylalananyl.

Les sites de coupure de la chymotrypsine sont positionnés aux mêmes endroits sur les deux protéines étudiées, car la présence des 2 résidus différents aux positions 136 et 171 ne rajoute pas de site de coupure supplémentaire (**document n° 10**).

La protéine PrPc (VQ) est soumise à une hydrolyse ménagée par la chymotrypsine, après action préalable ou non de l'urée. Les produits d'hydrolyse sont déposés sur SDS PAGE et révélés au bleu de Coomassie. Cette expérience a été uniquement réalisée sur le variant PrPc (VQ).

	PrPc (VQ) avec urée (1 mol/L)	PrPc (VQ) sans urée
Nombre de fragments obtenus après hydrolyse ménagée par la chymotrypsine	environ 20 fragments peptidiques	5 fragments peptidiques

- 4.3.1 Rappeler l'effet de l'urée sur une protéine.
- 4.3.2 Expliquer pourquoi l'hydrolyse ménagée de la protéine PrPc (VQ), avec ou sans urée, ne conduit pas au même résultat.
- 4.4. **Protéolyse ménagée des variants PrPc (VQ) et PrPc (AR) en conditions non dénaturantes**

Les deux protéines PrPc (VQ) et PrPc (AR) sont soumises à une hydrolyse ménagée par la chymotrypsine, sans urée.

Les produits de la digestion sont déposés sur un gel SDS-PAGE, suivi d'un western blot utilisant un anticorps monoclonal spécifique, l'anticorps **2D6 (document n° 10)**.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **document n° 11**.

- 4.4.1 Analyser et comparer les résultats obtenus.
- 4.4.2 Formuler une hypothèse relative à la structure des protéines analysées.
- 4.4.3 Conclure sur le lien entre la prédisposition à la maladie de la tremblante du mouton et la conformation de la protéine exprimée chez les variants VQ et AR.

Document n° 1 a

Principales caractéristiques du gène PRNP du mouton (*ovis aries*)

gene ID : 493887

taille ADN : # 20 kpb taille du transcrit : 4178 bases 3 exons,
 mais seul l'exon 2 (*nucléotides 161 - 931 soit 7:771^b*) code pour la protéine PRION de 256 aa
 (ID P23907)

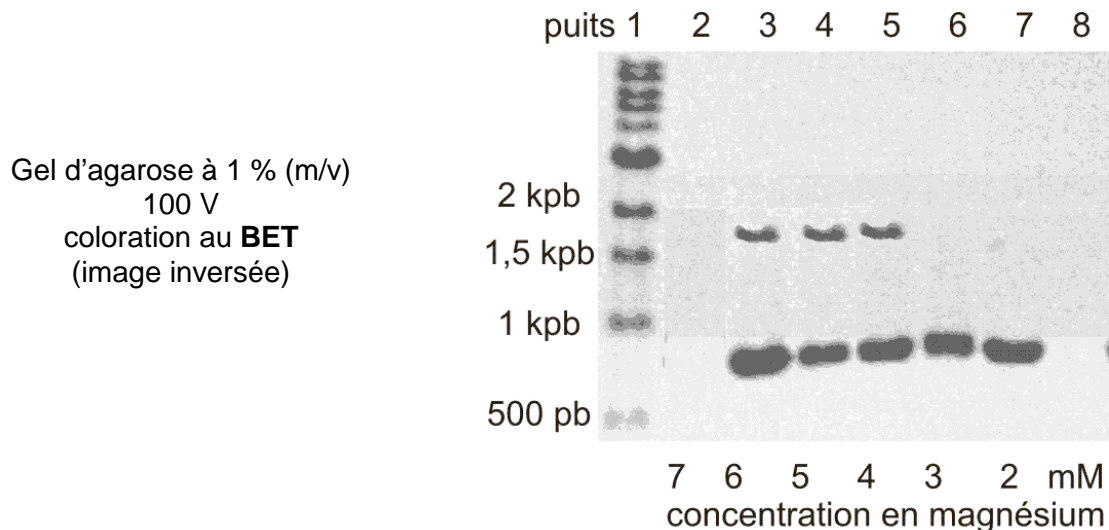
Document n° 1 b

Séquence de l'exon n° 2 du gène PRNP du mouton

161 atggtgaaaa gccacatagg
 181 cagttggatc ctggttctct ttgtggccat gtggagtgc gtgggcctct gcaagaagcg
 241 accaaaaacct ggcggaggat ggaacactgg ggggagccga taccggggac agggcagtc
 301 tggaggcaac cgctatccac ctgaggagg ggggtggctgg ggtcagcccc atggaggtgg
 361 ctggggccaa cctcatggag gtggctgggg tcagcccat ggtggtggct ggggacagcc
 421 acatggtggt ggaggctggg gtcaaggtgg tagccacagt cagtggaaca agcccagtaa
 481 gccaaaaacc aacatgaagc atgtggcagg agctgctgca gctggagcag tggtaggggg
 541 ccttgggtgc tacatgctgg gaagtgccat gagcaggcct cttatacatt ttggcaatga
 601 ctatgaggac cgtfactatc gtgaaaacat gtaccgttac cccaaccaag tgtactacag
 661 accagtggat cagtatagta accagaacaa ctttgtgcat gactgtgtca acatcacagt
 721 caagcaacac acagtcacca ccaccaccaa gggggagaac ttcaccgaaa ctgacatcaa
 781 gataatggag cgagtgggtg agcaaatgtg catcaccag taccagagag aatcccaggc
 841 ttattacaa aggggggcaa gtgtgatcct cttttctcc cctcctgtga tectcctcat
 901 ctcttctc attttctca tagtaggata g

Document n° 2

Électrophorégramme. Optimisation de la concentration en magnésium



puits 1 : marqueur : 1 kpb ladder (biolabs)

puits 8 : témoin négatif

Document n° 3

Mode opératoire de la production de la protéine PrPc

Le vecteur utilisé est porteur des gènes Amp^R et LacI. L'insert est placé sous contrôle d'un promoteur régulé par la protéine codée par le gène LacI.

Étape 1

- Introduire 750 mL de milieu LB dans un fermenteur de 3 L de volume utile.
- Ajouter 750 μ L d'ampicilline (100 mg.mL⁻¹).
- Ajouter 30 μ L de bactéries *E.coli* BL21 recombinées (souche productrice) glycérolées.
Incubation une nuit à 37 °C 180 rpm, pH régulé à 6,8.

Étape 2

- Ajouter 750 mL de milieu LB.
- Vérifier que l'absorbance à 600 nm est proche de 1.
- Prélever 10 mL de culture dans un tube conique.
- Ajouter 750 μ L d'IPTG (240 mg.mL⁻¹).
Incubation une nuit à 37 °C 180 rpm, pH régulé à 6,8.

Étape 3

- Prélever 10 mL de culture dans un tube conique.
- Récolter la culture dans des pots à centrifuger de 500 mL.
- Centrifuger 15 min à 4°C et à 1800 rpm.

Document n° 4
Fiche fournisseur de l'IPTG (prix hors taxes en euros)

Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IPTG; Isopropyl β -D-thiogalactoside

C₉H₁₈O₅S FW 238.30 [367-93-1]

BioChemika, $\geq 99.0\%$ (TLC)

Non-metabolizable galactose analog.

IPTG is commonly used in cloning procedures that require induction of β -galactosidase activity. It is used in conjunction with X-Gal or Blue-Gal in blue-white selection of recombinant bacterial colonies that induce expression of the *lac* operon in *Escherichia coli*. IPTG functions by binding to the *lacI* repressor and altering its conformation, which prevents the repression of the β -galactosidase coding gene *lacZ*.

IPTG is an inducer of β -galactosidase activity in bacteria and is used to detect *lac* gene activity during cloning experiments¹

loss on drying $\leq 6\%$

ign. residue $\leq 0.2\%$

Lit. cited: 1. S. Cho et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **128**, 1268 (1985)

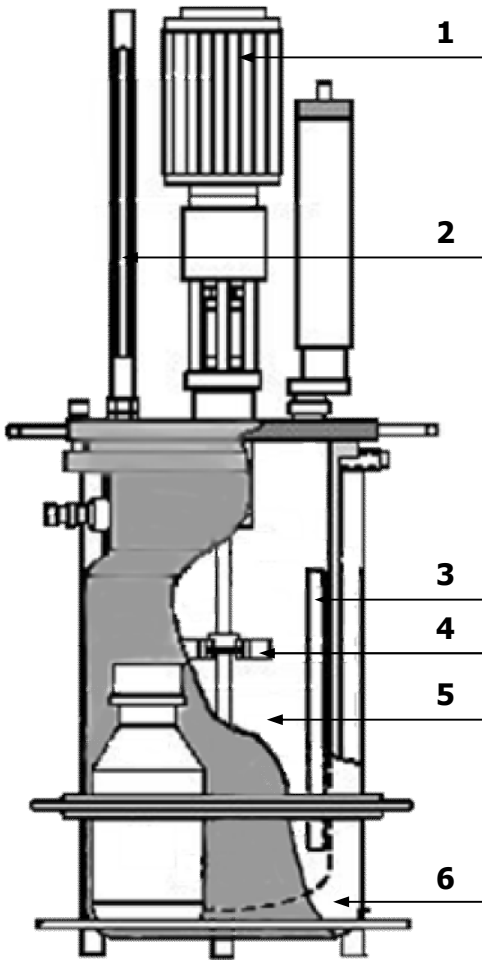
S: 22-24/25 EC No. 206-703-0 -20°C

59740-250MG	250 mg	21.90
59740-1G	1 g	54.80
59740-5G	5 g	240.50

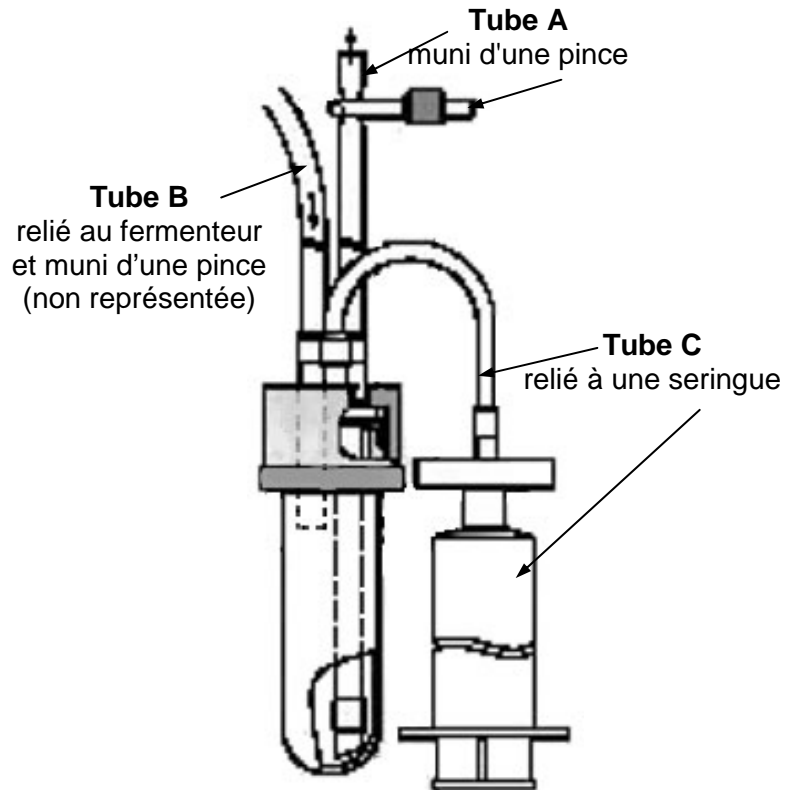
Document n° 5

Quelques aspects du bioréacteur utilisé

Document n°5 a :
Schéma du bioréacteur



Document n°5 b :
Échantillonneur



Document n° 6

Protocole d'immunisation des souris.

Les animaux choisis pour l'immunisation sont des souris non tolérantes PrP^{0/0}, immunologiquement compétentes mais déficientes dans l'expression de la protéine prion endogène.

Le protocole d'immunisation est basé sur l'injection d'acide nucléique (ADN ou ARN) codant pour une partie de la protéine prion de mouton dans le tissu musculaire de la souris.

Après un délai convenable, l'immunsérum des souris est prélevé et testé par méthode ELISA afin de détecter la présence d'anticorps spécifiques de la protéine prion du mouton. Les souris présentant un taux élevé d'anticorps sont sacrifiées et leur rate est prélevée.

Document n° 7

ELISA on hybridoma supernatants

Protocol : ELISA plates were coated overnight at room temperature with 100 ng per well of prion protein-specific peptide in coating buffer (10 mM Na₂ CO₃, 35mM NaHCO₃, pH9.6). ELISA plates were blocked for 30 minutes at 37°C (PBS supplemented with 0.1% Tween and 5% milk powder) and subsequently washed with washing buffer (PBS with 0.1% Tween and 200 mM NaCl). Hybridoma supernatants were diluted 1:10 in PBS containing 3% FCS and incubated for 2h at 37°C. Plates were washed four times with washing buffer. Binding antibodies were detected with a second antibody coupled with horseradish peroxidase and detected with oPD.

FCS: foetal calf serum

oPD: ortho-Phenylene diamine dihydrochloride

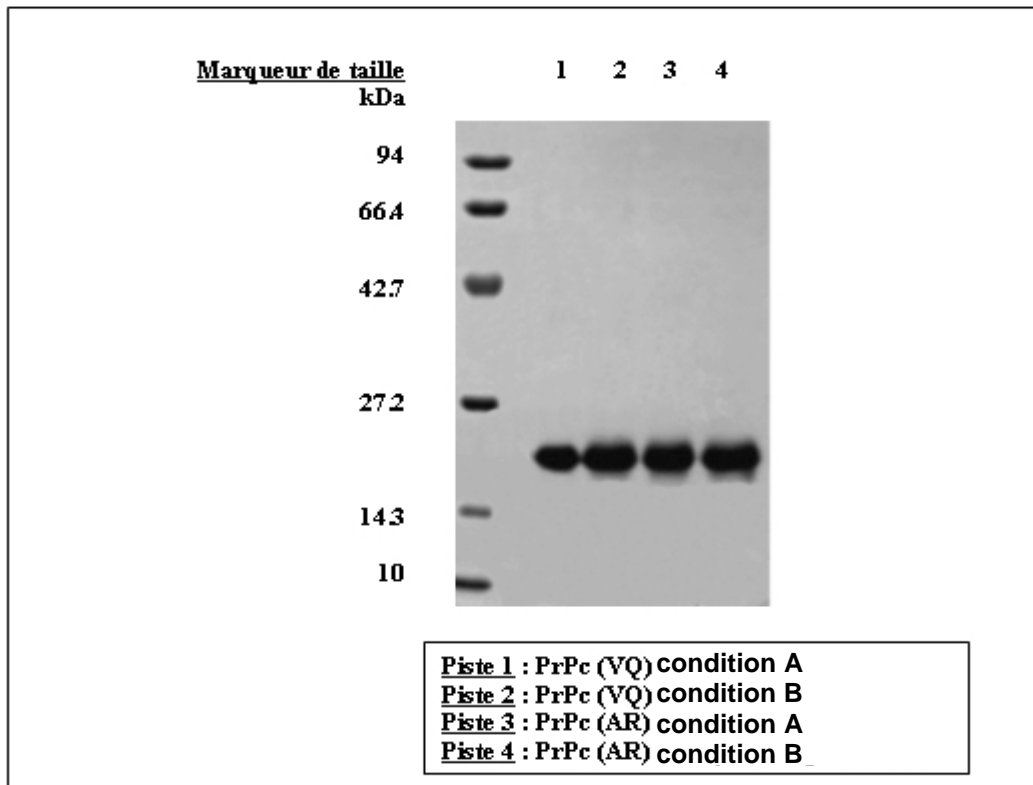
Document n° 8

Protein extraction and purification

After lysis for 30 min of *E.coli* BL21 (in Tris 10 mM EDTA 10 mM pH 7.5 containing 50 mg.mL⁻¹ of lysozyme), sonication and centrifugation, the supernatant is applied to a Ni-Sepharose column. The wash step with Tris/imidazole buffer led simultaneously to elimination of urea and renaturation of Ni²⁺ bound-proteins. PrP variants were eluted in one-step by a 1 M imidazole solution in 20 mM Mops, pH 7.5. Imidazole was removed by an exclusion G 25 column and protein recovered in the desired buffer. Final protein concentration was measured by the optical density at 280 nm using for the extinction coefficient a value of 58718.0 M⁻¹ cm⁻¹ deduced from the composition of the protein.

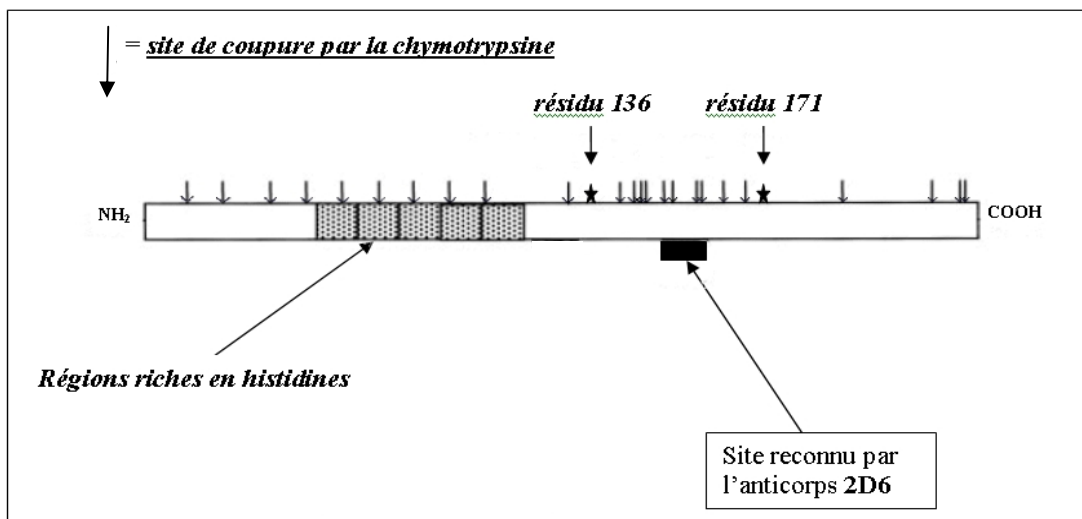
Document n° 9

Électrophorégramme des variants protéiques PrPc (VQ) et PrPc (AR) sur gel de polyacrylamide

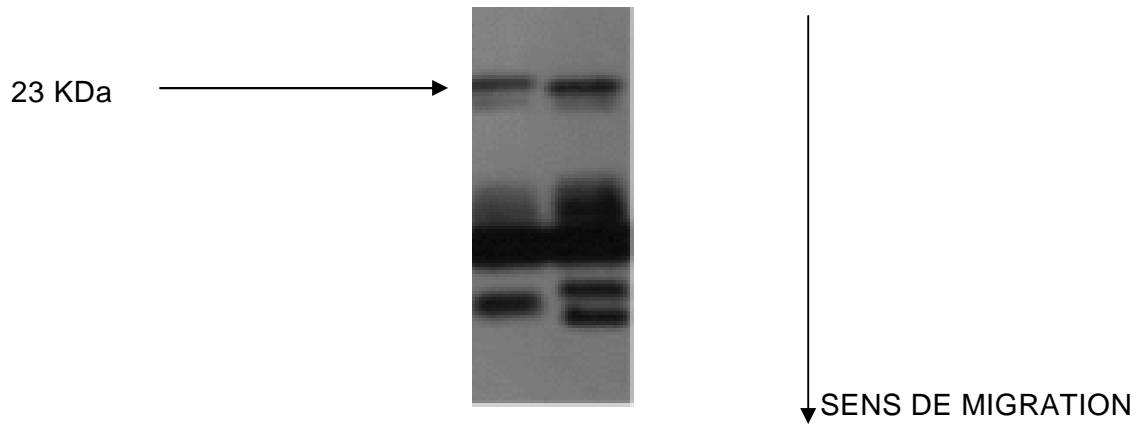


Document n° 10

Localisation de sites d'intérêt sur les variants protéiques PrPc (VQ) et PrPc (AR)



Document n°11
Analyse par western blot des résultats d'hydrolyse ménagée.
Révélation avec l'anticorps 2D6



Proposition de corrigé de l'étude de projet

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

1.1.1. Ce clonage est possible car le fragment à amplifier est de petite taille (< 1 kpb) donc amplifiable par PCR et la séquence est connue, ce qui permet de dessiner les amorces.

1.1.2. Les séquences et les orientations correctes des oligonucléotides étaient attendues

Amorce 161 (= séquence identique à celle fournie) :

5'-ATGGTGAAAAGCCACATAGG-3'

Amorce 931 (= séquence complémentaire à celle fournie puis inversion d'orientation) :

5'-TATCCTACTATGAGAAAAATGAG-3'

L'amorce 161 correspond à la séquence du début de l'exon 2 et doit s'hybrider avec le brin complémentaire.

L'amorce 931 doit hybrider avec la séquence en 3' de l'exon 2 et doit donc être le complément réverse de cette séquence.

1.1.3. *Amorce 161* : 11 bases A ou T et 9 bases G ou C $T_m = (11 \times 2) + (9 \times 4) = 22 + 36 = 58^\circ\text{C}$

Amorce 931 : 16 bases A ou T et 7 bases G ou C $T_m = (16 \times 2) + (7 \times 4) = 32 + 28 = 60^\circ\text{C}$

1.1.4. Température d'hybridation : 53°C (T_m le plus bas -5°C)

1.1.5. Ces quelques bases sont ajoutées afin de permettre à l'enzyme de restriction de se positionner correctement sur l'ADN, ces enzymes n'agissant pas toujours parfaitement lorsque les sites de restriction sont aux extrémités d'une molécule d'ADN.

1.1.6. $771 - (1) + 2 \times 10 = 790$ ou 791

Taille de la cible (exon 2 sans la base G en 3') + les séquences ajoutées en 5' des amorces

1.2.1. T_1 : ce tube témoin est constitué de tous les réactifs sauf l'ADN matrice et permet ainsi de valider l'absence d'ADN contaminant.

T_2 : on aurait pu faire un témoin positif (tous les réactifs et un ADN dont on connaît l'origine et hybridant les amorces), Il permet de vérifier la qualité des réactifs et les conditions de la PCR.

T_3 : un autre témoin négatif peut être envisagé avec un ADN en principe non amplifiable par ce couple d'amorces. Il permet de vérifier la spécificité de ces amorces.

Le témoin négatif est T_1 ou T_3 .

1.2.2.

Puits	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de bandes	0	2	2	2	1	1	0
Taille approximative et intensité		≠ 1,7 kpb peu intense	≠ 1,7 kpb peu intense	≠ 1,7 kpb peu intense			
Taille approximative et intensité		0,7 kpb très intense	0,7 kpb très intense	0,7 kpb très intense	0,7 kpb très intense	0,7 kpb très intense	

Puits 8 : absence de bande donc le témoin négatif est validé.

Puits 6 et 7 : une seule bande à la taille attendue donc l'amplification est réussie et spécifique.

Puits 3 à 5 : deux bandes (une à la taille attendue et l'autre de taille supérieure). L'amplification est réussie mais avec une amplification parasite non spécifique. Celle-ci apparaît quand la concentration en magnésium augmente et devient supérieure à 4 mM.

1.2.3. Les conditions optimales en magnésium sont celles correspondant à 2 et 3 mM.

2.1.1.

Étape 1 : Culture d'*E.coli* permettant l'obtention d'une biomasse suffisante avant induction.

Étape 2 : Induction par l'IPTG pour permettre la production de la protéine d'intérêt, grâce au gène lac I.

Étape 3 : Récolte de la biomasse, contenant la protéine d'intérêt, et élimination du milieu de culture.
L'ampicilline est un antibiotique permettant l'obtention d'une pression de sélection afin d'éviter la perte du plasmide.

2.1.2. Pour réaliser l'induction sur une biomasse suffisante et donc disposer d'une quantité finale de protéine suffisante. L'induction détourne la machinerie cellulaire vers la traduction protéique plutôt que vers la croissance cellulaire.

2.1.3. Il faut 0,75 mL d'IPTG à 240 mg/mL donc : $0,75 \times 240 = 180$ mg ou 0,18 g.
Le conditionnement 59740-250MG suffit (sauf s'il y a plusieurs manipulations).

2.1.4. Ces prélèvements avant et après induction permettront de contrôler la production de protéine et/ou la pureté de la culture.

2.1.5. Par pesée de la biomasse humide ou sèche (X) ramenée au volume de culture, ou mesure de la DO si on connaît la relation entre X et DO.

Pour calculer après extraction protéique sur la biomasse un rendement de production (protéine/biomasse).

2.2.1. 1 : moteur 2 : sonde 3 : contre pale 4 : pale d'agitation 5 : cuve 6 :
double enveloppe

2.2.2. Pincer le tuyau A, ouvrir le tuyau B et aspirer le milieu par le tuyau B via la seringue dans l'échantillonneur. Pincer le tuyau B, ouvrir le tuyau A et purger en refoulant la culture dans un tube de prélèvement par le tuyau A par poussée sur la seringue.

3.1.1.

- Pas de protéine prion produite naturellement donc la protéine prion introduite sera immunogène
- Souris immunologiquement actives donc production possible d'anticorps
- Souris non tolérantes vis à vis de la protéine prion de mouton donc capable de produire des anticorps anti mouton

3.1.2. Schéma soigné présentant les étapes, sachant que l'antigène (peptide- fragment de la protéine prion) doit apparaître en excès :

- Fixation du peptide- fragment de la protéine prion
100 ng de peptide par puits en tampon carbonate
Incuber une nuit à T laboratoire
- Saturation du support en présence de lait en poudre à 5%
Incubation 30 minutes à 37°C
- Lavages en PBS tween pour éliminer l'excès de protéines saturantes
- Dilution 1/10 des surnageants d'hybridomes en PBS
Incubation 2 h à 37°C ; délai de fixation des anticorps spécifiques du peptide - prion
- Lavages pour éliminer les molécules non spécifiques non fixées
- Incubation + Ac couplé à la peroxydase, spécifiques des anticorps à doser
- Lavages pour éliminer les anticorps en excès
- Incubation en présence d'OPD, substrat de la peroxydase
- Apparition du chromophore

3.1.3. C'est un anticorps spécifique de l'anticorps de souris et qui est couplé à l'enzyme peroxydase.

3.2.1. $V = q / c = 8 \cdot 10^5 / (3,4 \cdot 10^6 \cdot 0,94) = 0,25$ mL

3.2.2. Production en ascite :

- La manipulation puis le sacrifice des souris pose des problèmes techniques et éthiques.
- La production est seulement possible à petite échelle, de l'ordre du gramme d'anticorps
- On obtient cependant 1000 fois plus d'anticorps que dans un surnageant de culture
- Le liquide biologique ne contient pas que des anticorps

Production en cytotoculteur :

- production de plus grandes quantités
- purification des anticorps facilitée

4.1.1. L'extraction des protéines PrPc est réalisée par :

- l'EDTA, qui chélate les cations retenus par les lipides chargés de la membrane externe, ce qui fragilise donc les membranes
- le lysozyme, qui assure l'hydrolyse du peptidoglycane de la paroi
- la sonication, procédé de lyse des cellules par les ultrasons
- la centrifugation, qui permet la séparation des débris cellulaires et des protéines recombinantes du surnageant

4.1.2. L'histidine possède un noyau imidazole dans sa chaîne latérale. Le noyau imidazole présente une forte affinité électrostatique pour les ions nickel de la colonne. Les noyaux imidazoles libres ajoutés (concentration 1 mol.L⁻¹), entrent en compétition avec les noyaux imidazoles des histidines, ce qui interrompt l'interaction électrostatique et provoque l'élution des protéines retenues sur la colonne.

4.1.3. Cette étape permet d'éliminer l'imidazole petite molécule présente dans l'éluat, par gel-filtration.

4.2.1. Le β-mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures des protéines, ce qui entraîne la séparation de résidus cystéines, parfois éloignés dans la structure primaire. Ces liaisons covalentes jouent une part importante dans la consolidation des structures tertiaire et quaternaire des protéines.

4.2.2. Chacune des 4 pistes correspondant à l'analyse des protéines PrPc (AR) et PrPc (VQ) avec ou sans β-mercaptoéthanol, montre une bande dont la masse moléculaire est comprise entre 27,2 et 14,3 kDa.

On peut considérer qu'elles correspondent à la masse moléculaire de la protéine (23 kDa).

On obtient la même bande, avec ou sans traitement au β-mercaptoéthanol.

Le SDS dissociant les éventuelles liaisons faibles entre sous unités et le β-mercaptoéthanol réduisant les ponts disulfures, on en déduit que les protéines PrPc sont :

- monomériques
ou
- multimériques avec des sous-unités de même taille et non reliées par des ponts disulfures (dans le cas contraire, il y aurait apparition d'une bande de taille différente dans les pistes A en absence de β-mercaptoéthanol)

4.3.1. L'urée perturbe les liaisons hydrogène stabilisatrices de la structure protéique. En présence d'urée, les protéines perdent leur conformation initiale, c'est donc un agent dénaturant.

4.3.2. Le document 10 montre qu'il existe plus de vingt sites de coupure par la chymotrypsine.

En présence d'urée, l'hydrolyse ménagée par la chymotrypsine donne environ 20 fragments : quasiment tous les sites de coupure sont utilisés.

En absence d'urée, seulement quelques sites de coupure sont utilisés (5 fragments) : on peut supposer que seulement les sites les plus accessibles (externes) sont utilisés par la chymotrypsine.

4.4.1. Les pistes montrent le résultat de l'hydrolyse des variants protéiques VQ et AR, avec révélation avec l'anticorps, 2D6 :

- PRPc(VQ) : 3 bandes (dont une correspond à la protéine non hydrolysée à 23 Kda)
- PRPc (AR) : au moins 4 bandes (dont une correspond à la protéine non hydrolysée à 23 Kda)

La protéine AR est plus sensible à l'hydrolyse, donc plus accessible à la chymotrypsine, bien que le nombre de sites de coupure soient identiques.

4.4.2. Les mutations génèrent une différence de conformation, entre les deux variants protéiques, qui modifie l'accessibilité des sites de coupure par la chymotrypsine.

4.4.3. Le variant VQ est beaucoup plus prédisposé à la maladie que le variant AR. Les études précédentes ont montré que seulement 2 résidus modifiés, 136 et 171, sont suffisants pour donner une conformation générale différente.

Ces observations sont cohérentes avec les connaissances sur la protéine du prion, dont la conformation est modifiée (forme scrapie) chez les sujets malades. Certaines conformations sont davantage susceptibles d'évoluer vers la forme pathologique.

Sujets des épreuves de la session 2009

MATHÉMATIQUES

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 (calculatrice conforme à la circulaire n°99/186 du 16/11/99) et du formulaire officiel de mathématiques (NON REPRODUIT ICI) est autorisé.

Durée : 2 heures

Coefficient : 2

3 EXERCICE 1 (9 points)

Les deux parties de cet exercice sont indépendantes.

Un industriel fabrique des tuyaux en PVC destinés à l'évacuation des eaux sanitaires des habitations.

3.1 Loi binomiale et approximation d'une loi binomiale par une loi de Poisson

Dans cette partie, les résultats approchés sont à arrondir à 10^{-3} .

3.1.1 On s'intéresse à une livraison importante de tuyaux en PVC pour un grand groupe du secteur de la construction.

On note E l'événement « un tuyau prélevé au hasard dans la livraison est défectueux ».

On suppose que $P(E) = 0,015$.

On prélève au hasard 20 tuyaux dans la livraison pour vérification. La livraison est assez importante pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 20 tuyaux.

On considère la variable aléatoire X qui, à tout prélèvement ainsi défini, associe le nombre de tuyaux défectueux de ce prélèvement.

Justifier que la variable aléatoire X suit une loi binomiale dont on déterminera les paramètres.

Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement, aucun des tuyaux ne soit défectueux.

Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement, deux tuyaux au plus soient défectueux.

3.1.2 Les tuyaux sont expédiés dans les dépôts régionaux par lots de 200.

On prélève au hasard 200 tuyaux pour vérification dans un stock important. Le stock est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 200 tuyaux.

On considère la variable aléatoire Y qui, à tout prélèvement de 200 tuyaux, associe le nombre de tuyaux de ce prélèvement qui sont défectueux.

On admet que la variable aléatoire Y suit la loi binomiale de paramètres 200 et 0,015.

On considère que la loi de Y peut être approchée par une loi de Poisson. Déterminer le paramètre λ de cette loi de Poisson.

- a) On désigne par Z une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre λ où λ a la valeur obtenue au a) Calculer $P(Z \leq 4)$

3.2 Loi normale

Dans cette partie, les résultats approchés sont à arrondir à 10^{-2} .

Dans cette partie on s'intéresse au diamètre extérieur des tuyaux, exprimé en millimètres.

1° On note D_1 la variable aléatoire qui, à tout tuyau prélevé au hasard dans la production d'une journée, associe son diamètre extérieur. On suppose que la variable aléatoire D_1 suit la loi normale de moyenne 40 et d'écart type 0,2. Un tuyau ne peut être commercialisé que lorsque son diamètre extérieur est compris entre 39,6 mm et 40,4 mm.

Calculer la probabilité qu'un tuyau prélevé au hasard dans la production de la journée soit commercialisable.

2° L'entreprise désire améliorer la qualité de la fabrication des tuyaux : il est envisagé de modifier le réglage des machines produisant les tuyaux. On note D_2 la variable aléatoire qui, à chaque tuyau

prélevé au hasard dans la production journalière future, associera son diamètre. On suppose que la variable aléatoire D_2 suit une loi normale de moyenne 40 et d'écart type σ .

Déterminer σ pour que la probabilité qu'un tuyau prélevé au hasard dans la production journalière future puisse être commercialisable soit égale à 0,99.

4 EXERCICE 2 (11 points)

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

A. Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) : $2y' + y = 8 e^{-0,5t}$ où y est une fonction de la variable réelle t , définie et dérivable sur $[0, +\infty[$, et y' la fonction dérivée de y .

1° Déterminer les solutions sur $[0, +\infty[$ de l'équation différentielle (E_0) : $2y'+y=0$.

2° Soit h la fonction définie sur $[0, +\infty[$ par $h(t) = 4t e^{-0,5t}$
Démontrer que la fonction h est une solution particulière de l'équation différentielle (E).

3° En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E).

4° Déterminer la solution f de l'équation différentielle (E) qui vérifie la condition initiale $f(0) = 1$.

B. Étude d'une fonction et calcul intégral

Soit f la fonction définie sur $[0, 15]$ par $f(t) = (4t + 1) e^{-0,5t}$.

On désigne par C la courbe représentative de f dans un repère orthogonal $(O; \vec{i}, \vec{j})$
Unités graphiques: 1 cm sur l'axe des abscisses, 4 cm sur l'axe des ordonnées.

1° On désigne par f' la fonction dérivée de la fonction f .

On admet que, pour tout nombre réel t de $[0, 15]$, $f'(t) = (3,5 - 2t) e^{-0,5t}$.
Ce résultat n'a pas à être démontré

Étudier le signe de $f'(t)$ sur $[0, 15]$.

a) Établir alors le tableau de variation de f

2° Tracer la courbe C sur une feuille de papier millimétré.

3° Soit F la fonction définie sur $[0, 15]$ par : $F(t) = (-18 - 8t) e^{-0,5t}$

Démontrer que la fonction F est une primitive de la fonction f sur $[0, 15]$.

a) On note $I = \int_0^{11} f(t) dt$. Démontrer que $I = 18 - 106 e^{-5,5}$.

C. Application des parties A et B

Dans une usine, on se propose de tester un nouveau modèle de hotte aspirante pour les laboratoires. Avant de lancer la fabrication en série, on a réalisé l'expérience suivante avec un prototype: dans un local clos de volume 500 m^3 , équipé du prototype de hotte aspirante, on diffuse du dioxyde de carbone (CO_2) à débit constant.

Dans ce qui suit, t est le temps exprimé en minutes.

À l'instant t_0 , la hotte est mise en marche. Les mesures réalisées permettent d'admettre qu'au bout de t minutes de fonctionnement de la hotte, avec $0 \leq t \leq 15$, le volume de dioxyde de carbone, exprimé en m^3 , contenu dans le local est $f(t)$, où f est la fonction définie dans la partie 2.2.

- 1° Déterminer le volume de dioxyde de carbone, en m^3 , présent dans le local au moment de la mise en marche de la hotte aspirante.
- 2° L'atmosphère « ordinaire » contient 0,035 % de dioxyde de carbone, ce qui correspond pour le local où a été réalisé l'expérience à un volume de $0,175 \text{ m}^3$ de dioxyde de carbone.

À l'aide d'une lecture graphique sur la figure réalisée à la question 2.2.2., déterminer au bout de combien de temps de fonctionnement de la hotte aspirante l'atmosphère dans le local clos contenait un volume de dioxyde de carbone inférieur ou égal à $0,175 \text{ m}^3$.

- 3° Calculer le volume moyen V_m de dioxyde de carbone présent dans le local pendant les 11 premières minutes de fonctionnement de la hotte aspirante. Donner la valeur exacte de V_m , puis la valeur approchée de V_m arrondie à 10^{-1} .
La formule donnant la valeur moyenne d'une fonction est dans le formulaire ci-joint.

Proposition de corrigé de l'épreuve de MATHÉMATIQUES

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

Exercice 1 :

A.

1° a) Expérience : on vérifie un tuyau : Succès, il est défectueux, $p = 0,015$
Échec, il n'est pas défectueux, $q = 0,985$

On recommence 20 fois cette expérience de façon indépendante (tirages assimilés avec remise), donc X est la loi binomiale de paramètres 20 et 0,015 ; $X = B(20; 0,015)$.

1° b) $p(X = 0) = 0,985^{20} \approx 0,739$ $X = B(20; 0,015)$

1° c) $p(X \leq 2) = p(X = 0) + p(X = 1) + p(X = 2) = 0,985^{20} + 20 \times 0,015 \times 0,985^{19} + \binom{20}{2} \times 0,015^2 \times 0,985^{18}$

2° a) $\lambda = np = 200 \times 0,015 = 3$

2° b) $Z = P(3) \quad \boxed{p(Z \leq 4) = p(Z = 0) + \dots + p(Z = 4) \approx 0,050 + 0,149 + 0,224 + 0,224 + 0,168}$
 $\boxed{p(Z \leq 4) \approx 0,815}$

B.

1° Calculons $D_1 = N(40; 0,2)$, on pose $T = \frac{D_1 - 40}{0,2}$ avec $T = N(0; 1)$, on a alors
 $\boxed{p = p(-2 \leq T \leq 2) = 2\Pi(2) - 1 \approx 2 \times 0,9772 - 1 \approx 0,95}$

La probabilité pour qu'un tuyau prélevé au hasard dans la production soit commercialisable est de 0,95.

2° $D_2 = N(40; \sigma)$ et on a $p(39,6 \leq D_2 \leq 40,4) = 0,99$, on pose $U = \frac{D_2 - 40}{\sigma}$ avec $U = N(0; 1)$, on a alors

$\boxed{p(39,6 \leq D_2 \leq 40,4) = p\left(-\frac{0,4}{\sigma} \leq U \leq \frac{0,4}{\sigma}\right) = 2\Pi\left(\frac{0,4}{\sigma}\right) - 1 = 0,99}$

D'où $\Pi\left(\frac{0,4}{\sigma}\right) = 0,995 = \Pi(2,58)$ et par suite $\boxed{\sigma = \frac{0,4}{2,58} \approx 0,16}$

Exercice 2 :

A.

1° Les solutions de $(E_0) : 2y' + y = 0$ ($y' = -\frac{1}{2}y$) sont $y = Ce^{-0,5t}$ $C \in \mathbb{R}$

A 2° $h(t) = 4te^{-0,5t}$ donc $h'(t) = 4e^{-0,5t} - 2te^{-0,5t}$

$2h'(t) + h(t) = 8e^{-0,5t} - 4te^{-0,5t} + 4te^{-0,5t} = 8e^{-0,5t}$, donc h est solution de (E).

A 3° Les solutions de (E) sont donc : $\underline{y = Ce^{-0,5t} + 4te^{-0,5t}} \quad C \in \mathbb{R}$.

A 4° $f(0) = 1 \Rightarrow C = 1$, donc $\boxed{f(t) = (4t + 1)e^{-0,5t}}$

B.

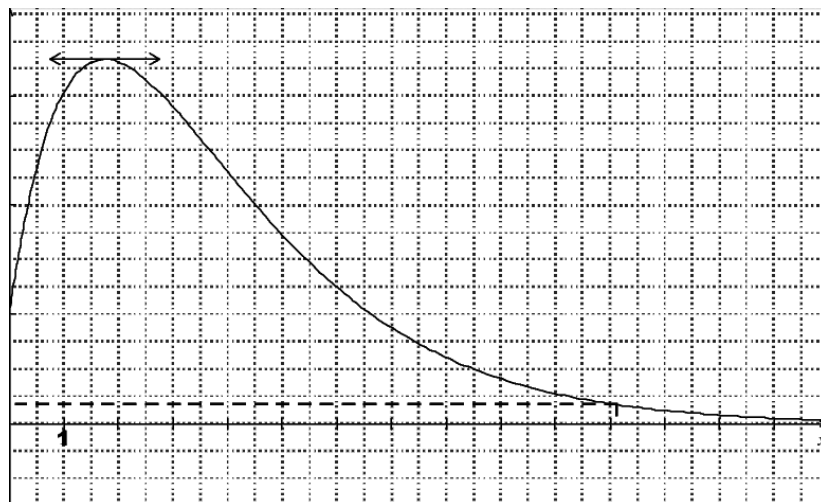
1°a) Pour tout réel t , $e^{-0,5t} > 0$, donc la dérivée est du signe de $(3,5 - 2t)$ et s'annule pour $t = \frac{3,5}{2} = \frac{7}{4}$.

1° b)

t	0	7/4	15
f'(t)	+	0	-
f	1	$8\exp(-0,875)$	$61\exp(-7,5)$

$$f(7/4) \approx 3,33 \quad f(15) \approx 0,038$$

2°



3°a)

$$F'(t) = -8e^{-0,5t} - 0,5(-18 - 8t)e^{-0,5t} = e^{-0,5t}(-8 + 9 + 4t) = (4t + 1)e^{-0,5t} = f(t) \quad \text{donc } F \text{ est une primitive de } f.$$

3° b)

$$\int_0^{11} f(t)dt = [F(t)]_0^{11} = -106e^{-\frac{11}{2}} + e^0 \times 18 = 18 - 106e^{-\frac{11}{2}}$$

C.

1° $f(0) = 1$, le volume présent dans le bocal au moment de la mise en marche est de 1 m^3 .

2° Par lecture graphique, l'abscisse du point de la courbe d'ordonnée $0,175$ est environ $11,1$. Comme la fonction est décroissante sur $\left[\frac{7}{8}; 15\right]$, le volume de dioxyde de carbone sera inférieur à $0,175 \text{ m}^3$ à partir d'environ $11,1 \text{ min}$.

$$3^\circ V_m = \frac{1}{11-0} \int_0^{11} f(t)dt = \frac{18 - 106e^{-5,5}}{11}, \text{ soit } V_m \approx 1,6\text{m}^3$$

SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

DURÉE DE L'ÉPREUVE : 2h — COEFFICIENT: 1

L'usage des calculatrices est autorisé

L'utilisation des calculatrices pendant l'épreuve est définie par la circulaire N° 86-228 du 28 juillet 1986 (BO N° 34 du 2 octobre 1986).

L'emploi de toutes les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique est autorisée à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (circulaire n°99- 0 18 du 1-02-1999).

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.

Ce sujet comporte 5 pages numérotées de 1 à 5, y compris celle-ci. Les données sont en italique.

Les données numériques sont indiquées dans chaque exercice.

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

1. CHIMIE ORGANIQUE (15 points)

Données :

Numéros atomiques: Cl : Z = 17 O : Z = 8 H : Z = 1 C . Z = 6

1. On s'intéresse à l'isomère de configuration absolue **R** du 2-chloropentane, que l'on appelle **A**.

1.1. Donner la formule semi-développée de **A**.

1.2. Qu'appelle-t-on activité optique ?

1.3. **A** possède-t-il une activité optique ? Pourquoi ?

1.4. Donner une représentation de CRAM en perspective de **A** en justifiant la réponse.

2. *Traité par la soude diluée en solution aqueuse, **A** donne un seul stéréoisomère **B** d'un alcool possédant une activité optique.*

2.1. Écrire l'équation de la réaction.

2.2. De quel type de réaction s'agit-il ?

2.3. Détailler le mécanisme de cette réaction.

2.4. Quelle est la configuration absolue du carbone asymétrique de **B** ? Justifier la réponse.

2.5. Quel est le nom complet de **B** ?

3. *On fait réagir de l'acide acétique (acide éthanoïque) sur l'alcool **B**, on obtient le produit **C**. (Dans cette partie on ne tiendra pas compte de la stéréochimie de **B**).*

3.1. Écrire l'équation de la réaction.

3.2. Donner deux caractéristiques de cette réaction ainsi que le nom du catalyseur.

4. On réalise cette réaction en remplaçant l'acide acétique (acide éthanoïque) par du chlorure d'acétyle (chlorure d'éthanoyle).

4.1. Écrire l'équation de la réaction.

4.2. Quel est l'intérêt de ce changement de réactif ?

2. ÉQUILIBRES ACIDO-BASIQUES (20 points)

Données :

$pK_{A1} (H_2S / HS^-) = 7$ $pK_{A2} (HS^- / S^{2-}) = 13$ Numéro atomique du soufre : 16

Bleu de bromothymol :

Teinte acide	Zone de virage	Teinte basique
Jaune	6,0 à 7,6	Bleu

1. Schéma de Lewis et géométrie.

1.1. Donner la configuration électronique du soufre.

1.2. En déduire le schéma de Lewis de la molécule H_2S ainsi que celui de l'ion HS^- .

1.3. En utilisant la méthode V.S.E.P.R., donner la géométrie de la molécule H_2S .

2. On dispose d'une solution aqueuse S_0 de sulfure d'hydrogène H_2S de concentration molaire C_0 . Lorsqu'on y verse quelques gouttes de bleu de bromothymol, la solution devient jaune.

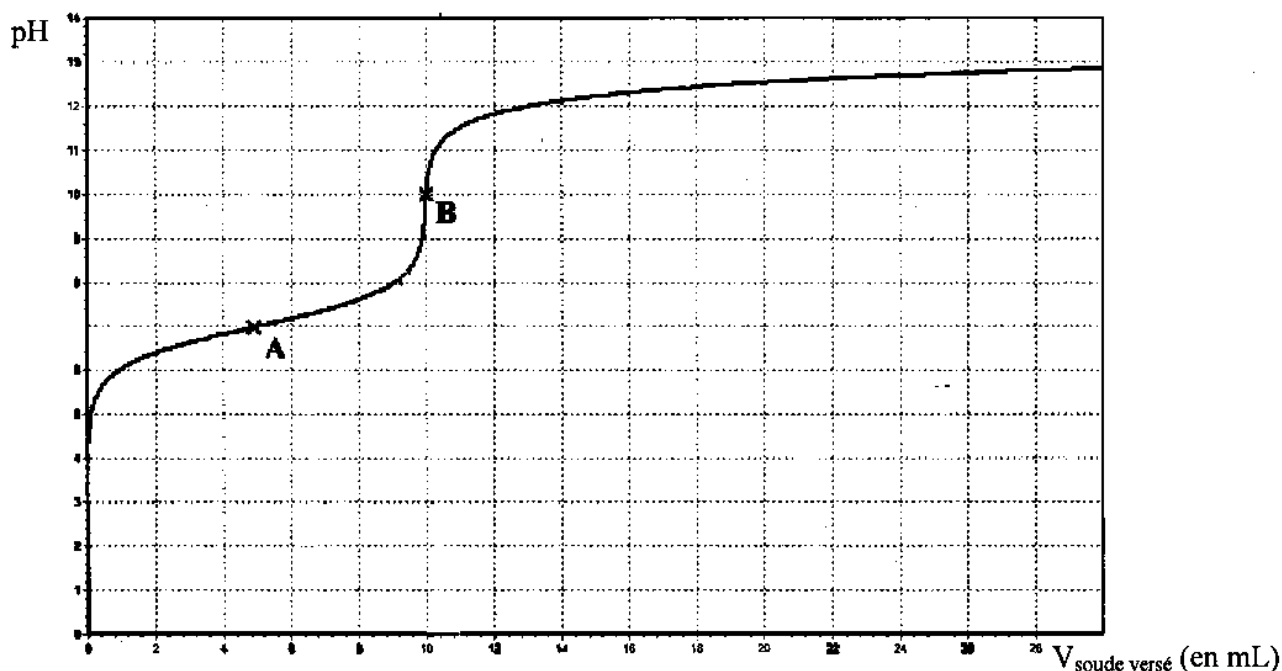
2.1. Que peut-on en déduire quant au pH de la solution S_0 ?

2.2. Donner le diagramme de prédominance des espèces H_2S , HS^- et S^{2-} en fonction du pH.

2.3. De ces trois espèces, laquelle est prédominante dans la solution aqueuse S_0 ?

3. On procède au titrage pH métrique d'un volume $V_0 = 200,0$ mL de S_0 par une solution aqueuse de soude de concentration molaire $C_1 = 1,0$ mol.L⁻¹.

On obtient la courbe ci-dessous :



3.1. En s'appuyant sur les valeurs de pK_{A1} et pK_{A2} , justifier le fait que les deux acidités soient dosées séparément.

3.2. Pourquoi ne voit-on pas de deuxième saut de pH ?

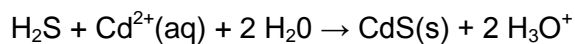
3.3. Écrire l'équation de la réaction du dosage de la première acidité du sulfure d'hydrogène.

3.4. Montrer que la concentration molaire C_0 de la solution S_0 est égale à $0,050 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.5. Justifier par des calculs rapides la valeur du pH aux points **A** (demi-équivalence) et **B**.

4. On mélange un volume $V_0 = 200,0 \text{ mL}$ de la solution aqueuse S_0 de sulfure d'hydrogène et un volume $V'_0 = 200,0 \text{ mL}$ d'une solution aqueuse de concentration $C'_0 = 0,050 \text{ mol.L}^{-1}$ en ions cadmium Cd^{2+} .

Il se produit alors de façon rapide et totale la réaction de précipitation d'équation :



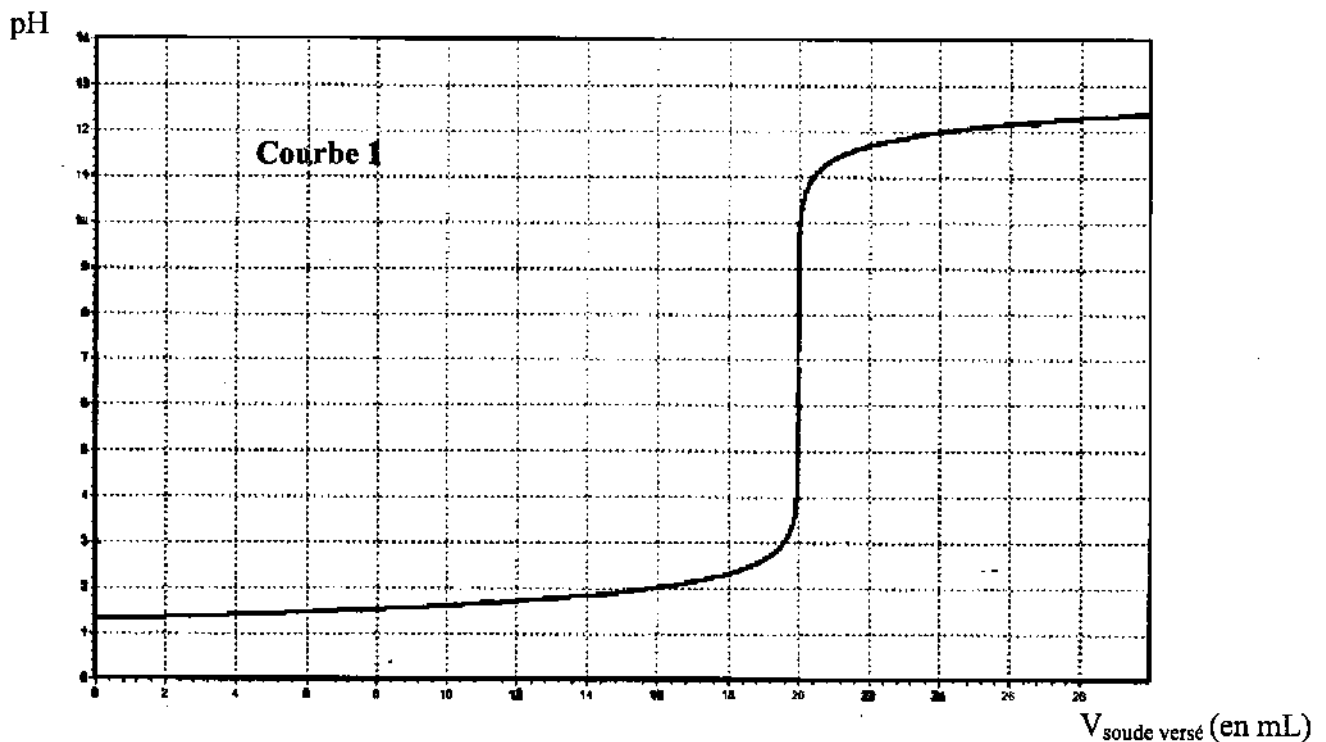
4.1. En considérant la quantité de matière en ions H_3O^+ négligeable à l'état initial dans le mélange, effectuer un bilan de matière pour déterminer la composition finale du mélange.

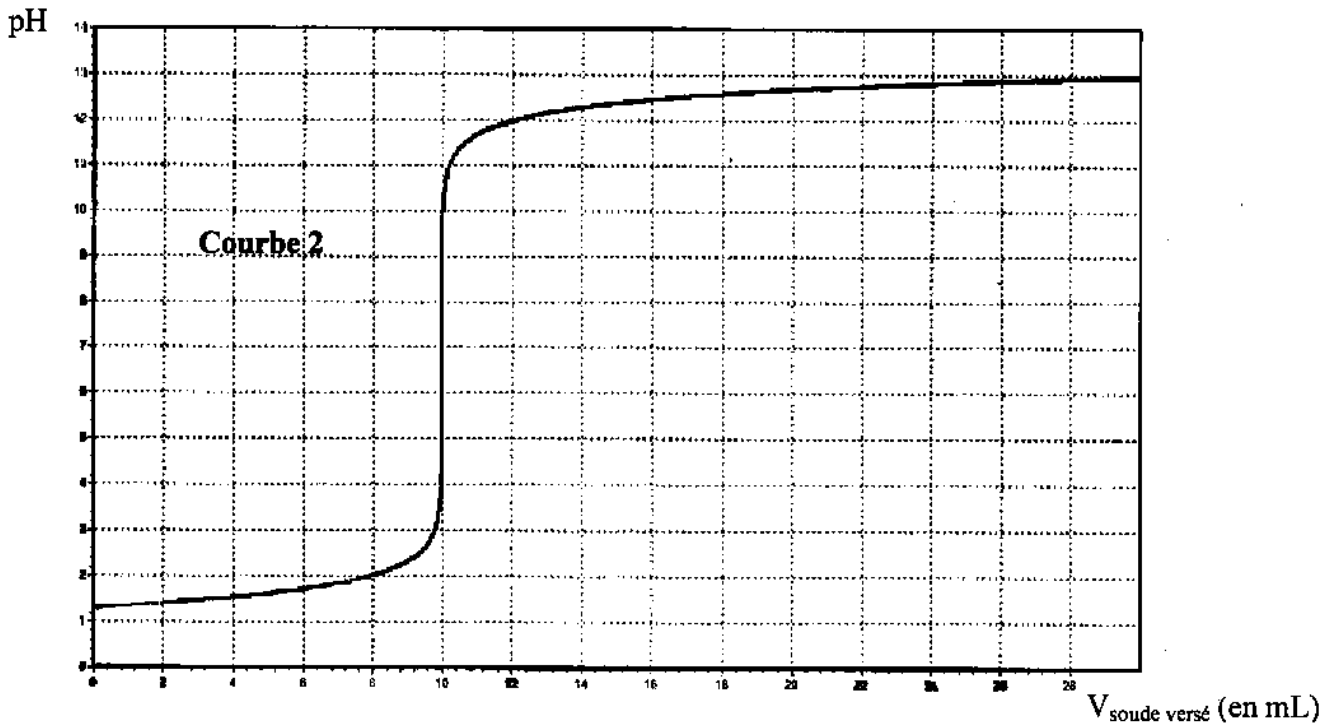
On verse alors progressivement dans ce mélange, la solution aqueuse de soude de concentration molaire $C_1 = 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

4.2. Écrire l'équation de la réaction de cette nouvelle méthode de dosage.

4.3. Parmi les deux courbes (courbe 1 et courbe 2) représentées page suivante, choisir celle obtenue en justifiant clairement la réponse.

4.4. Justifier l'intérêt de cette méthode pour faire un dosage du sulfure d'hydrogène.





3. PRISME ET SPECTROSCOPIE (15 points)

Les parties 1 et 2 sont totalement indépendantes.

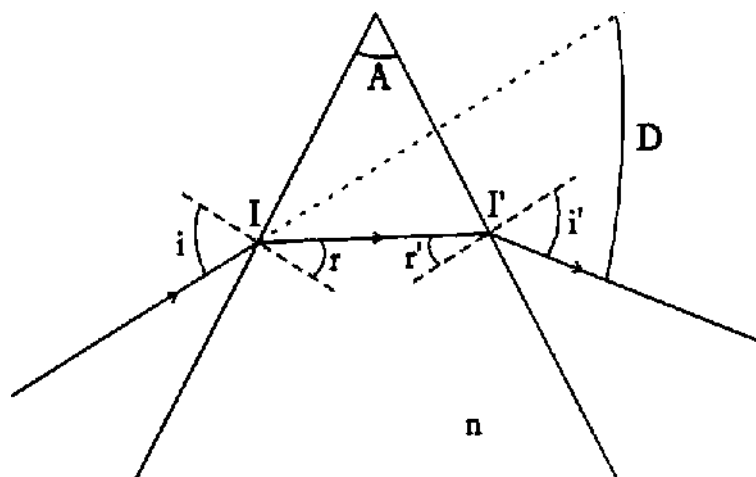
Données :

$$h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s} \quad 1\text{eV} = 1,60 \times 10^{-19} \text{ J} \quad c = 3,00 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$$

1. Indice d'un prisme.

On considère un prisme d'angle au sommet A. Il est constitué d'un verre transparent d'indice n et est situé dans l'air, dont l'indice sera pris égal à 1.

On considère le schéma suivant décrivant le trajet d'un rayon lumineux dans le prisme :



- 1.1. Quel phénomène physique se produit aux points I et I'?
- 1.2. En déduire les deux relations liant l'angle i à l'angle r et l'angle i' à l'angle r' .
- 1.3. On éclaire ce prisme avec la lumière provenant d'une lampe à vapeur d'hydrogène. On obtient quatre raies visibles de la série de Balmer, émergeant dans des directions différentes. Justifier succinctement cette observation.

- 1.4. Quel autre dispositif aurait-on pu utiliser pour décomposer la lumière émise par cette lampe à vapeur d'hydrogène ?

2. Spectroscopie de l'hydrogène.

Dans cette partie, n désigne le nombre quantique principal caractérisant l'état de l'électron de l'atome d'hydrogène (n est un entier positif non nul).

On éclaire le prisme avec la lumière provenant d'une lampe à vapeur d'hydrogène. On obtient les quatre raies visibles de la série de Balmer, raies correspondant à des transitions entre un état excité tel que $n > 2$ et le premier état excité (niveau pour lequel $n = 2$).

Une mesure de chaque minimum de déviation permet d'évaluer les longueurs d'onde de ces radiations : $\lambda_1 = 656 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 486 \text{ nm}$, $\lambda_3 = 434 \text{ nm}$, $\lambda_4 = 410 \text{ nm}$.

2.1. Sachant que pour l'hydrogène, l'énergie d'un niveau n s'exprime $E_n = -\frac{13,6}{n^2} \text{ eV}$, calculer l'énergie des cinq premiers niveaux.

2.2. Représenter sur un diagramme le niveau d'énergie zéro et les cinq niveaux d'énergie de la question précédente, en utilisant l'échelle suivante : 1 cm pour 1 eV.

2.3. Quelle énergie faut-il fournir à l'atome d'hydrogène dans son état fondamental pour l'ioniser ? Justifier la réponse.

2.4. Définir l'état fondamental et l'indiquer sur le diagramme précédent.

2.5. Calculer en J puis en eV l'énergie de la radiation de longueur d'onde λ_3 .

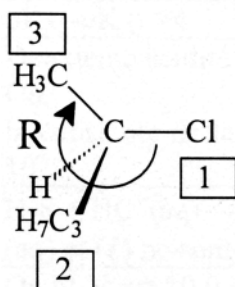
2.6. À quelle transition correspond-elle ? Justifier la réponse et faire apparaître cette transition sur le diagramme précédent.

Proposition de corrigé de l'épreuve de Sciences Physiques et Chimiques

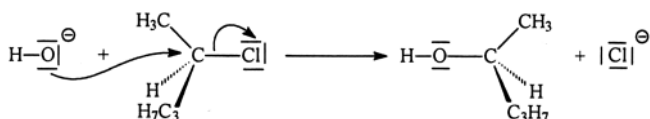
Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

1. CHIMIE ORGANIQUE (15 points)

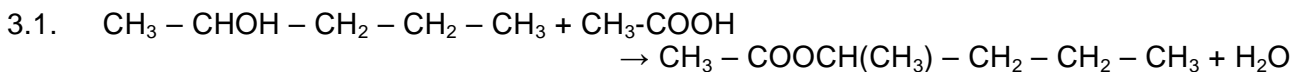
- 1.1. $\text{CH}_3 - \text{CHCl} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$.
- 1.2. Une substance possède une activité optique lorsqu'elle fait tourner (dévie) le plan de polarisation d'une lumière polarisée qui la traverse.
- 1.3. A présente une activité optique car elle possède un atome de carbone asymétrique.
- 1.4. Le classement des substituants était exigé :



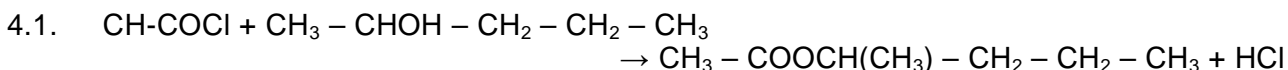
- 2.2. Il s'agit d'une réaction de type $\text{S}_{\text{N}}2$.



- 2.3. _____
- 2.4. Le C asymétrique a pour configuration absolue S. $\text{HO}^- > \text{C}_3\text{H}_7^- > \text{CH}_3^- > \text{H}$. Il y a inversion de Walden lors de la réaction.
- 2.5. (S)-Pentan-2-ol.



- 3.2. Lente, limitée, athermique, catalysée par les ions H^+ (exemple : acide sulfurique).

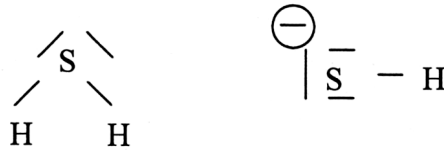


- 4.2. Rendre la réaction totale pour en améliorer le rendement. Réaction rapide, à froid.

2. ÉQUILIBRES ACIDO-BASIQUES (20 points)

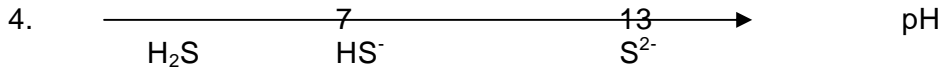
- 1.1. $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^4$.

1.2.



1.3. Type AX₂E₂.

3. Le pH est inférieur à 6.



5. H₂S prédomine à pH < 6.

3.1. $K_{A2} - pK_{A1} > 4$.

3.2. Deuxième acidité trop faible. Constante de la réaction du 2^{ème} dosage inférieure à 10⁴.

3.3. $H_2S + HO^-_{(aq)} \rightarrow HS^-_{(aq)} + H_2O(l)$ NB : les notations _(aq) et (l) n'étaient pas exigées.

3.4. On lit $V_{eq} = 10,0$ mL. A l'équivalence, on aura versé autant d'ions HO⁻ qu'il y avait d'acide au départ, d'où : $C_1V_{eq} = C_0V_0$ et $C_0 = (1,0 \times 10,0) / 200 = 0,050$ mol.L⁻¹.

3.5. En A, on a pH = pK_{A1} = 7 car il y a autant de H₂S que de HS⁻.
En B, on a le pH d'un ampholyte pH = (pK_{A1} + pK_{A2}) / 2 = 10.

4.1. On pouvait construire le tableau ci-dessous :

H ₂ S	+	Cd ²⁺	+	2H ₂ O	→	CdS(s)	+	2H ₃ O ⁺
C ₀ V ₀		C' ₀ V' ₀		Solvant		0		0
C ₀ V ₀ - x _{max} = 0		C' ₀ V' ₀ - x _{max} = 0		Solvant		C ₀ V ₀		2 C ₀ V ₀

La solution contient donc 1,0.10⁻² mol de CdS(s) et 2,0.10⁻² mol de H₃O⁺.

4.2. $H_3O^+ + HO^-_{(aq)} \rightarrow 2 H_2O$.

4.3. Pour faire réagir 2,0.10⁻² mol de H₃O⁺, il faudra verser autant d'ions HO⁻ donc un volume de 20 mL de solution de soude à 1 mol.L⁻¹. On obtient la courbe 1.

4.4. On obtient une courbe avec un saut de pH plus important, donc plus facile à repérer.

3. PRISME ET SPECTROSCOPIE (15 points)

1.1. Réfraction.

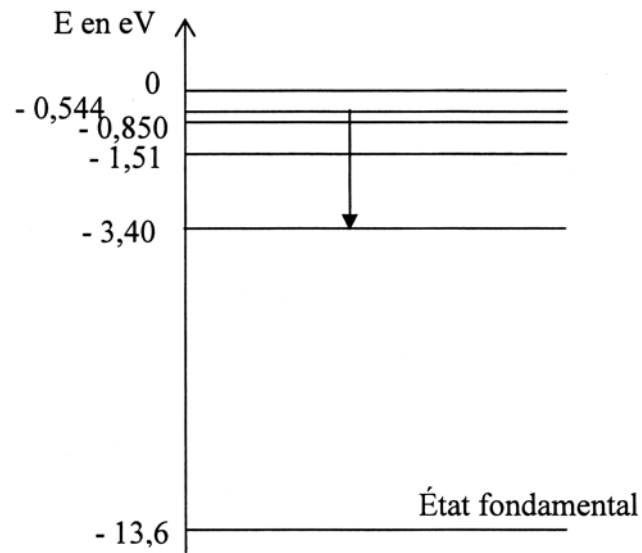
1.2. $\sin i = n \cdot \sin r$ et $\sin i' = n \cdot \sin r'$.

1.3. L'indice du prisme varie avec la longueur d'onde.

1.4. Un réseau.

2.1. On trouve - 13,6 eV ; - 3,40 eV ; - 1,51 eV ; - 0,85 eV et - 0,544 eV

2.2. Diagramme :



2.3. C'est l'énergie minimale nécessaire pour lui arracher un électron. $E = 13,6 \text{ eV}$.

2.4. L'état fondamental est l'état de plus basse énergie $n = 1$.

2.5. $E = h.c/\lambda_3 = (6,63.10^{-14} \times 3,00.10^8) / 434.10^{-9} = 4,58.10^{-19} \text{ J} = 2,86 \text{ eV}$.

2.6. $E = E_n - E_2 = -3,4 + 2,86 = -0,54 \text{ eV}$.

Il s'agit donc de la transition du niveau 5 au niveau 2, ce que représente la flèche sur le diagramme.

BIOLOGIE DES PROCARYOTES ET DES EUCARYOTES

SOUS-ÉPREUVE DE BIOLOGIE CELLULAIRE

Durée de l'épreuve : 2 heures Coefficient : 1

*L'usage d'un dictionnaire anglais/français et d'une calculatrice est autorisé.
Papier millimétré nécessaire.*

Remarque importante :

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par une bonification maximale de deux points.

Étude d'une lignée cellulaire productrice de protéines recombinées

Les anticorps monoclonaux représentent une part importante des médicaments issus des biotechnologies. Ils sont produits dans des lignées cellulaires, principalement la lignée de hamster CHO « Chinese Hamster Ovary » qui est devenue un standard de production de protéines recombinées. La lignée CHO est une lignée adhérente.

1. Étude des conditions de culture des cellules CHO (5 points)

Le milieu Ham F12 mis au point par RG Ham (composition dans le **document 1**), satisfait les exigences nutritionnelles des cellules CHO.

Il est nécessaire de compléter le milieu avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) pour assurer la culture des cellules.

- 1.1 Justifier la composition qualitative du milieu en précisant le rôle des familles de constituants et les molécules soulignées dans le tableau.
- 1.2 Expliquer l'intérêt de l'addition de SVF pour la culture des cellules.
- 1.3 Préciser les conditions nécessaires pour obtenir une asepsie rigoureuse lors de la pratique des cultures cellulaires animales concernant le laboratoire, le matériel, les milieux de culture et les manipulateurs.

2. Étude des caractéristiques de la croissance des cellules CHO (7 points)

Les cellules CHO sont cultivées dans les conditions standards : atmosphère contrôlée (température : 37°C, mélange de 5 % CO₂ et 95 % d'air humidifié), dans du milieu Ham F12 supplémenté avec 10 % de SVF, 1 % d'un mélange pénicilline/streptomycine et 1 % de L-glutamine.

Le **document 2** représente l'évolution de la densité surfacique des cellules CHO en fonction du temps.

- 2.1 A $t_0 + 144h$, le milieu de culture n'est pas épuisé. Expliquer alors l'arrêt de la croissance cellulaire à $t_0 + 144h$.
- 2.2 Déterminer graphiquement le taux exponentiel de croissance des cellules CHO après avoir tracé la courbe permettant sa détermination.
- 2.3 En déduire la durée d'un cycle cellulaire pendant la phase exponentielle de croissance. Afin de déterminer la durée des différentes phases du cycle, des cellules CHO en phase exponentielle de croissance sont prélevées et leur ADN est rendu fluorescent par un fluorochrome. Dans les conditions utilisées, la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN contenu dans chaque noyau. On détecte ensuite l'intensité de la fluorescence cellulaire dans la population étudiée avec un cytomètre de flux. Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 3**.

- 2.4** A partir du graphique du **document 3**, établir la correspondance entre les phases du cycle et les trois zones a, b, c du graphe.
- 2.5** Calculer la durée de chaque phase du cycle cellulaire.

Données : - 100 % des cellules sont dans le cycle cellulaire,
- 57 % des cellules correspondent au pic a,
- 25 % des cellules correspondent au pic c,
- la durée de la mitose est de deux heures.

Représenter l'enchaînement des différentes phases du cycle cellulaire des cellules CHO sur un schéma en indiquant la durée de chaque phase.

3. Production d'anticorps monoclonaux (8 points)

La production d'anticorps monoclonaux par la lignée CHO, nécessite plusieurs étapes préliminaires.

- production et sélection d'hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux contre l'antigène d'intérêt (**documents 4 et 5**),
- extraction des ARN totaux des hybridomes, purification des ARNm,
- RT PCR : synthèse des ADNc des chaînes lourdes et légères des anticorps,
- construction de vecteurs d'expression recombinants contenant les ADNc d'intérêt **document 6**,
- transfection stable des cellules CHO,
- sélection des clones transformés.

3.1 En utilisant les informations du **document 4**, préciser la chronologie des grandes étapes de la production d'hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux chez la souris.

3.2 À partir du **document 5**, expliquer le principe de la sélection des hybridomes en milieu supplémenté par du HAT.
(H = hypoxanthine, A = aminoptérine, T = thymidine).

3.3 Citer et comparer deux méthodes de transfection adaptées aux cellules eucaryotes.

3.4 À partir du **document 6**, expliquer le principe de la sélection des clones de cellules CHO ayant intégré l'ADN des chaînes H et L de façon stable dans leur génome.

Les cellules de mammifères sont particulièrement adaptées à la production des protéines eucaryotes : elles synthétisent et sécrètent les protéines recombinées de façon constitutive dans le surnageant de culture.

Une protéine sécrétée par la cellule CHO va subir différentes étapes de maturation, depuis sa synthèse jusqu'à sa sécrétion dans le surnageant de culture.

3.5 Légèrer le **document 7** après avoir reporté les numéros sur la copie.

3.6 Indiquer les organites où s'effectue cette maturation, préciser pour chacun les signaux moléculaires permettant l'adressage correct de cette protéine jusqu'à sa sécrétion.

Document 1 : Composition d'un milieu de culture

	Composants en mg/L	HAMF12
<u>IONS MINÉRAUX</u>	NaCl	7599
	KCl	223,6
	NaH ₂ PO ₄ , 7 H ₂ O	268
	NaHCO ₃	1176
	MgCl ₂ , 6 H ₂ O	122
	CaCl ₂	44
	Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0,00249
	Fe SO ₄ , 7 H ₂ O	0,834
	Zn SO ₄ , 7 H ₂ O	0,863
<u>ACIDES AMINÉS ESSENTIELS</u>	L-Arginine chlorhydrate	211
	L-Cystine chl. H ₂ O	35,12
	L-Glutamine	145
	L-Histidine chl. H ₂ O	20,96
	L-Isoleucine	3,94
	L-Leucine	13,1
	L-Lysine chlorhydrate	36,5
	L-Méthionine	4,48
	L-Phénylalanine	4,96
	L-Thréonine	11,9
	L-Tryptophane	2,04
	L-Tyrosine (Na)	5,4
	L-Valine	11,7
<u>ACIDES AMINÉS NON ESSENTIELS</u>	L-Alanine	8,9
	L-Asparagine H ₂ O	15,01
	L-Acide Aspartique	13,3
	L-Acide Glutamique	14,7
	L-Glycocolle	7,5
	L-Proline	34,5
	L-Sérine	10,5
<u>VITAMINES</u>	Biotine	0,0073
	D-Panthoténate de Ca	0,48
	Choline chlorhydrate	13,96
	Acide folique	1,3
	Inositol	18
	Nicotinamide	0,04
	Pyridoxal chlorhydrate	0,062
	Riboflavine	0,038
	Thiamine chlorhydrate	0,34
	Cobalamine	1,36
Pyridoxine chlorhydrate	0,062	
<u>AUTRES MOLECULES</u>	<u>D-Glucose</u>	1802
	Acide lipoïque	0,21
	<u>Pyruvate de Na</u>	110
	<u>Hypoxanthine</u>	4,1
	<u>Thymidine</u>	0,084
	Putrescine chlorhydrate	0,161
	Acide linoléique	0,73

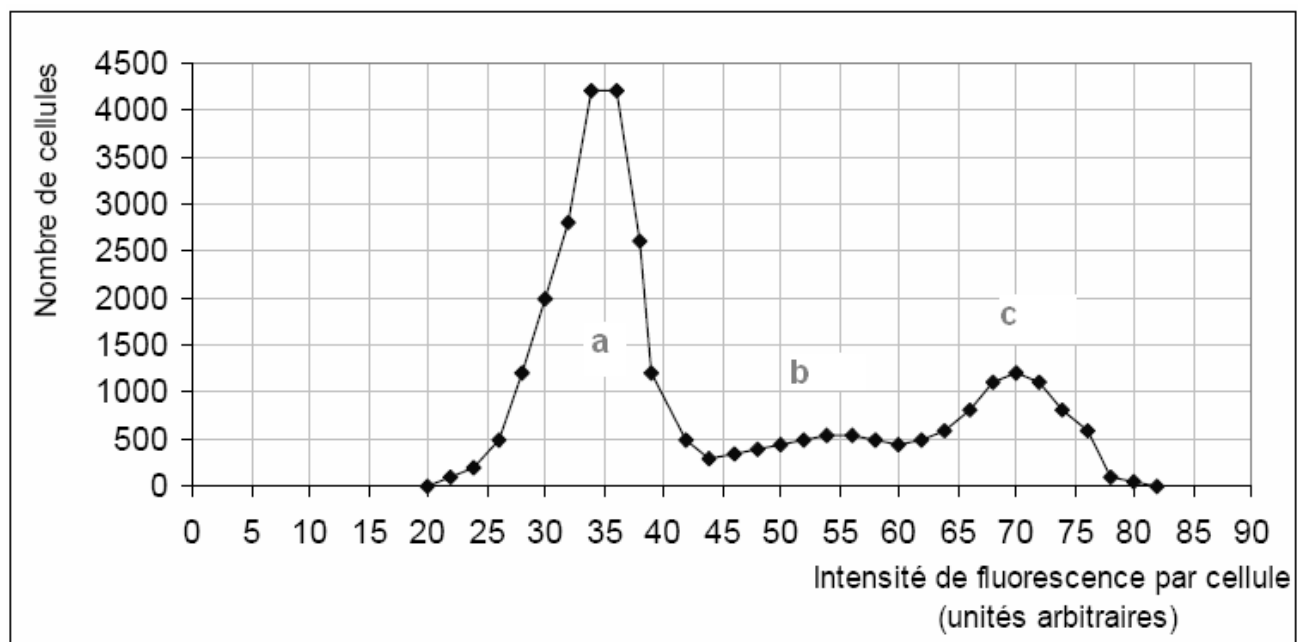
Document 2 : Évolution de la densité surfacique des cellules CHO en fonction du temps

T	0	24	48	72	96	120	144
DS	10000	14300	34000	78000	164000	347000	348000

T : Temps en heures

DS : Densité Surfactive en nombre de cellules/cm².

Document 3 : Variation du nombre de cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence



Document 4 : Procedure for producing monoclonal antibodies specific for a given antigen developed by G. Kohler and C. Milstein.

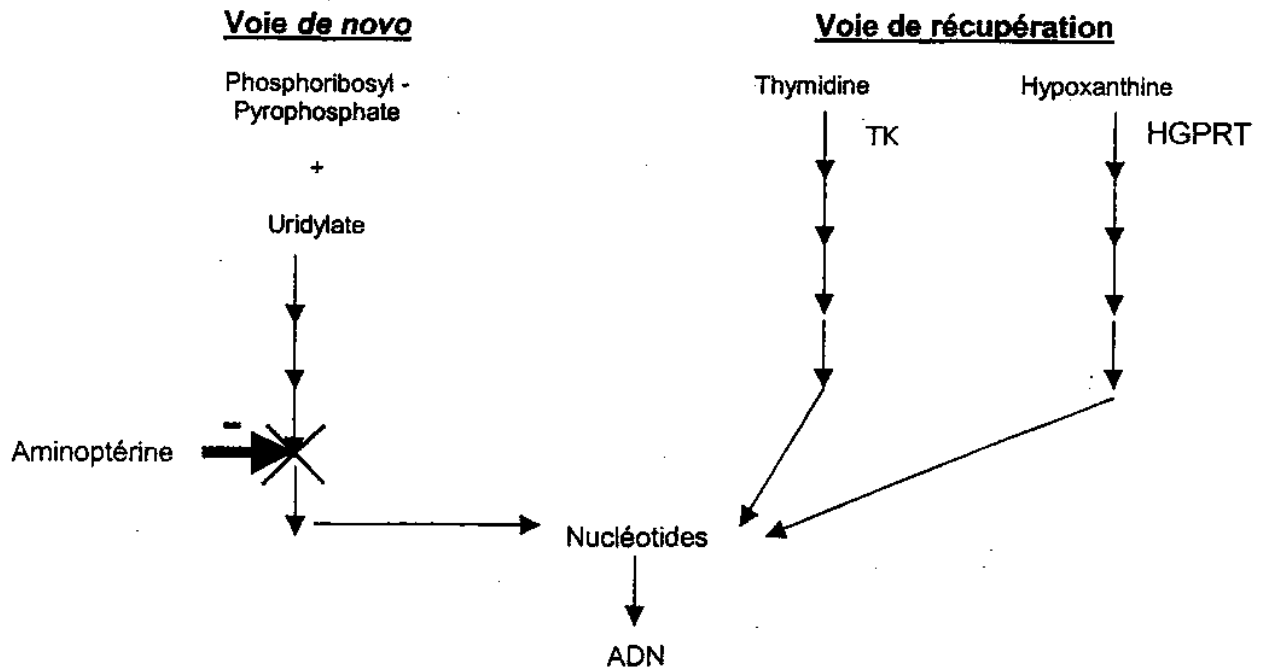
Spleen cells from an antigen-primed mouse are fused with mouse myeloma cells (HGPRT- and Ig-) The spleen cells provides the necessary enzymes for growth on HAT medium, while the myeloma provides immortal-growth properties. Unfused myeloma cells or myeloma-myeloma fusions fail to grow due of lack of HGPRT.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

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

Once pure clones of antibody secreting hybridomas are obtained, they must be screened for the desired antibody specificity.

Document 5 : Sélection des hybridomes

- Il existe deux voies de synthèse des nucléotides chez les mammifères :
 - la voie de synthèse *de novo*
 - la voie de récupération qui se met en place lorsque la voie *de novo* est bloquée.

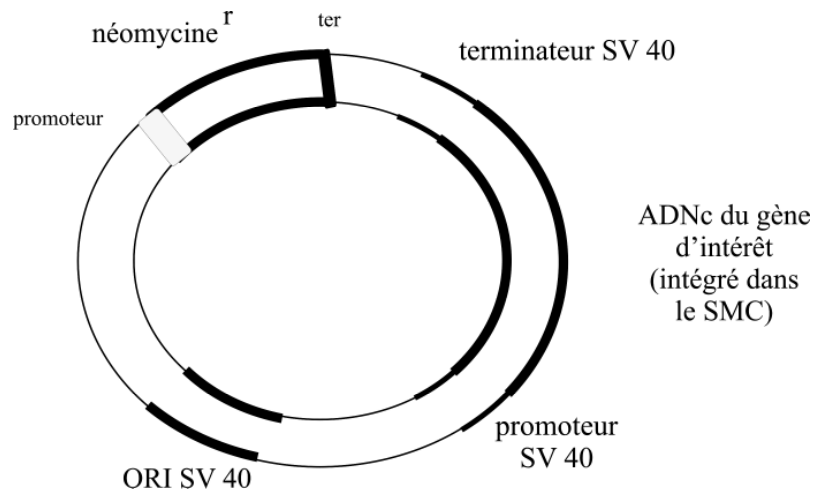


TK = Thymidine Kinase

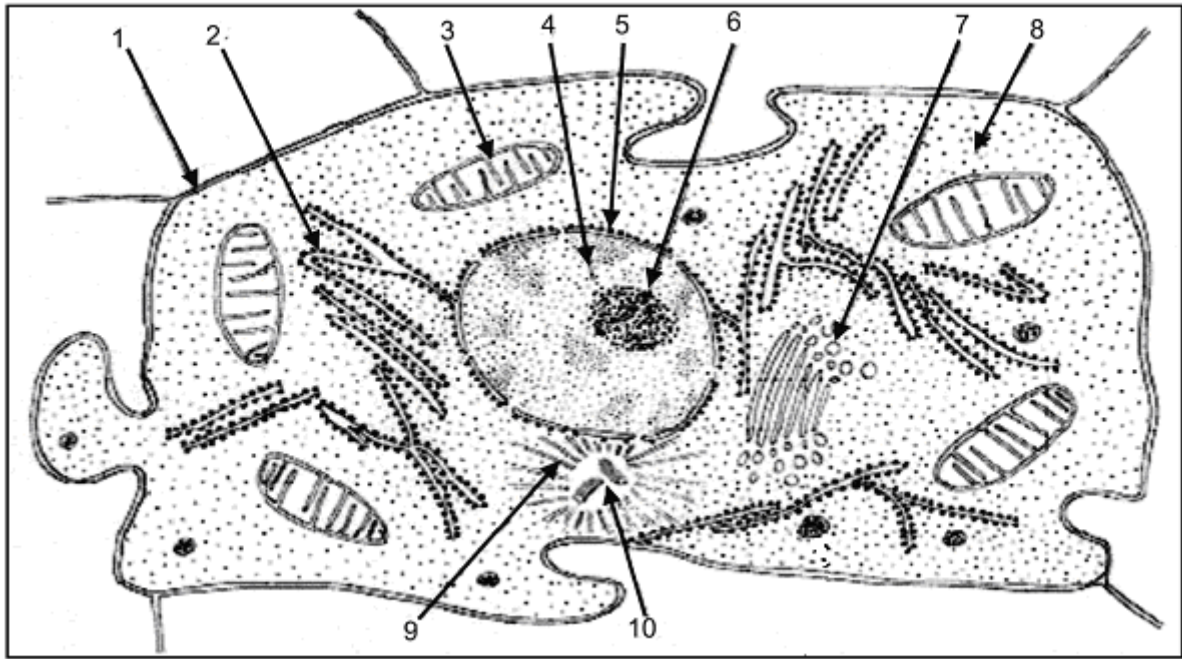
HGPRT = Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase

- Milieu HAT = Milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine

Document 6 : vecteur d'expression recombiné



Document 7 : représentation d'une cellule animale observée en microscopie électronique



Proposition de corrigé de la sous-épreuve de Biologie Cellulaire

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

- 1.1. Ions minéraux : isotonicité du milieu, échanges ioniques et transports cellulaires
 Acides aminés essentiels (non synthétisés in vitro par les cellules) et non essentiels (synthétisés in vitro en trop faible quantité) nécessaires à la synthèse des protéines cellulaires, sources d'azote et de carbone
 Vitamines non synthétisées par les cellules : cofacteurs enzymatiques
 D glucose et pyruvate : source de carbone et d'énergie pour la cellule
 Hypoxanthine et thymidine : bases nécessaires à la synthèse des acides nucléiques

1.2. Le SVF (sérum de veau fœtal) est indispensable à la culture des cellules car il apporte de très nombreuses protéines, en particulier :

- Facteurs de croissance et hormones stimulant la croissance et la multiplication cellulaire
- Facteurs favorisant l'adhérence des cellules au support

1.3. Respect de conditions d'asepsie rigoureuse :

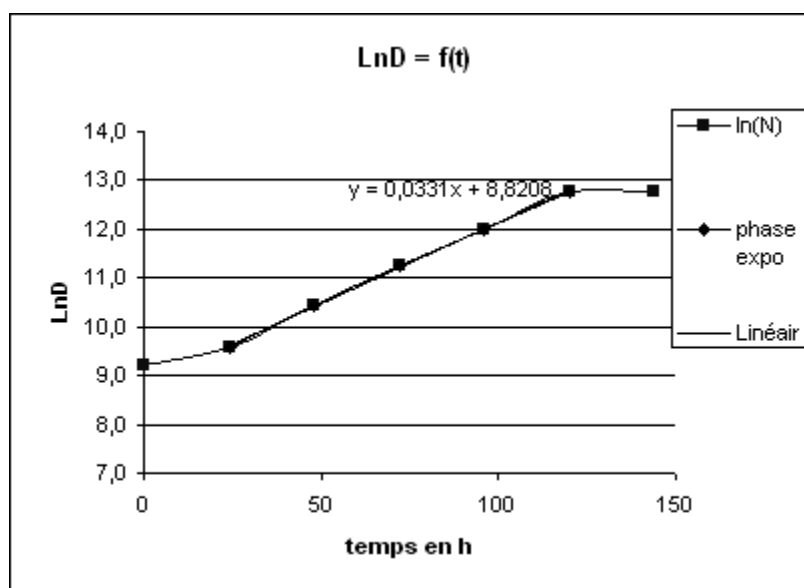
- Poste de travail : PSM type II c'est-à-dire hotte à flux laminaire vertical
- Surface de travail stérilisée et décontaminée à l'alcool,
- Port d'une blouse dédiée à l'activité dans ce laboratoire spécialisé (aucune culture microbienne ne doit y être réalisée)
- Utilisation d'une solution antiseptique pour le nettoyage des mains
- Matériel stérile et à usage unique : flacons de culture, tubes, pipettes etc..
- Milieux : solutions salines stérilisées par autoclavage, composés thermosensibles stérilisés par filtration, addition d'antibiotiques et d'antifongique pour prévenir les contaminations bactériennes et fongiques

2.1. Arrêt de la croissance cellulaire dû au phénomène d'inhibition de contact, la culture est arrivée à confluence.

2.2.

t (h)	0	24	48	72	96	120	144
DS	10000	14300	34000	78000	164000	347000	348000
LnDS	9,2	9,6	10,4	11,3	12,0	12,8	12,8

Courbe :



Détermination de la pente : vitesse spécifique de croissance (taux de croissance exponentiel) :
 Formule littérale et application numérique :

$$\mu_{\text{expo}} = \Delta \ln D / \Delta t = (\ln DS_2 - \ln DS_1) / (t_2 - t_1) = (12,8 - 9,6) / (120 - 24) = 0,0333 \text{ h}^{-1}$$

2.3. Durée du cycle cellulaire = temps de doublement de la population = temps de génération G :
 Détermination : soit graphique, soit par le calcul $G = \ln 2 / \mu_{\text{expo}} = 20,94 \text{ h}$ (ou 21h)

2.4. Les cellules de la phase exponentielle de croissance ne sont pas toutes dans la même phase du cycle.

On observe deux pics de cellules :

- o un premier pic, à une fluorescence de 35 unités arbitraires, les cellules sont en phase G1 (fluorescence correspondant à une quantité d'ADN Q)
- o un deuxième pic, à une fluorescence de 70 unités arbitraires, ces cellules sont en phase G2 et en mitose jusqu'à l'anaphase (quantité d'ADN 2Q)

Entre ces deux pics un certain nombre de cellules dont la fluorescence varie de 35 à 70 unités, en phase S (ces cellules dont la quantité d'ADN varie entre Q et 2Q, l'ADN est en cours de synthèse et de réplication).

2.5.

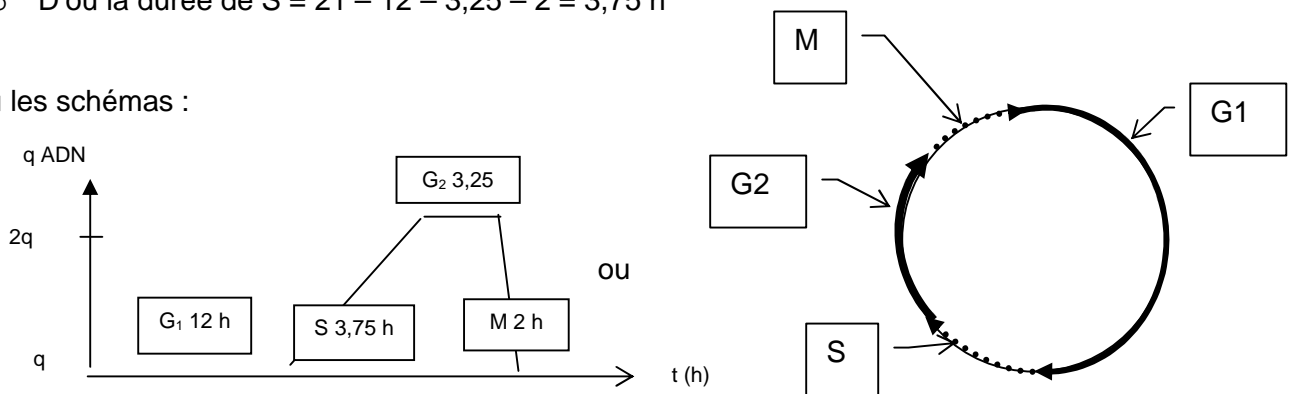
1^{ère} démarche possible (trop approximative) :

- o 57 % des cellules en phase G1 signifie que la phase G1 dure 57 % du cycle cellulaire soit : $0,57 \times 21 = 12 \text{ h}$
- o Cellules en G2 : 25 % des cellules donc durée de G2 = $0,25 \times 21 = 5,25 \text{ h}$
- o Calcul de la durée de la phase S : $21 - 12 - 5,25 - 2 = 1,75 \text{ h}$

2^{ème} démarche (la plus rigoureuse) :

- o 57 % des cellules en phase G1 signifie que la phase G1 dure 57 % du cycle cellulaire soit : $0,57 \times 21 = 12 \text{ h}$
- o Cellules en G2 + M : 25 % des cellules, soit une durée totale de $0,25 \times 21 = 5,25 \text{ h}$ et G2 représente donc $5,25 - 2 = 3,25 \text{ h}$
- o D'où la durée de S = $21 - 12 - 3,25 - 2 = 3,75 \text{ h}$

D'où les schémas :



3.1. Immunisation des souris avec l'antigène d'intérêt

Fusion des lymphocytes de la rate avec une lignée cellulaire immortelle

Mise en culture et sélection des cellules hybrides (milieu HAT)

Repérage des clones

Criblage pour la production des anticorps monoclonaux

3.2. L'aminoptérine contenue dans le milieu de sélection est un inhibiteur de la synthèse des bases puriques par la voie principale.

Les cellules de myélome sont HGPRT⁻ et vont donc mourir car elles n'ont pas de voie de récupération et sont donc incapables de synthétiser leurs nucléotides.

Les lymphocytes sont HGPRT⁺ mais ne cultivent pas in vitro.

Seules se multiplieront donc les cellules immortelles, hybrides HGPRT⁺ capables de réaliser la synthèse des nucléotides par la voie de récupération grâce à l'hypoxanthine.

- 3.3. Électroporation (forte mortalité)
 Lipofection: utilisation de lipides cationiques (méthode plus douce mais efficacité de transfection moindre)
 Biolistique
 Vecteur viral (100% de transfection mais construction plus difficile)
- 3.4. Les plasmides utilisés pour la transfection des cellules CHO contiennent le gène de sélection néo^r qui code la résistance à la néomycine. Les cellules transfectées qui ont intégré de façon stable l'ADN recombinant sont résistantes à l'antibiotique introduit dans le milieu de culture et se multiplient. Les autres cellules meurent car elles sont sensibles à la néomycine.
- 3.5. 1 = membrane (cyto)plasmique 2 = réticulum endoplasmique rugueux 3 = mitochondrie
 4 = noyau (chromatine, nucléoplasme, ribosome accepté) 5 = enveloppe nucléaire
 6 = nucléole 7 = vésicule golgienne (appareil de Golgi, dictyosome)
 8 = cytoplasme (cytosol, hyaloplasme) 9 = microtubule
 10 = centriole (centrosome, centre organisateur de microtubules)
- 3.6. Réticulum endoplasmique rugueux : synthèse de la chaîne polypeptidique par les ribosomes liés au réticulum grâce à un peptide signal localisé en position N-terminale, puis passage à l'intérieur de la lumière du réticulum puis excision du peptide signal, maturation (formation des ponts disulfure, glycosylations)
 Appareil de Golgi : maturation (O-glycosylation, phosphorylation, ...), absence de signal moléculaire particulier donc formation de vésicules trans-golgiennes, afin d'assurer le transport vésiculaire (protéines SNARE)
 Vésicules de transport : exocytose et sécrétion de la protéine dans le surnageant de culture

BIOLOGIE DES PROCARYOTES ET DES EUCARYOTES

SOUS-ÉPREUVE DE MICROBIOLOGIE ET GENIE FERMENTAIRE

Durée de l'épreuve : 2 heures Coefficient : 1

L'usage d'un dictionnaire anglais/français et d'une calculatrice est autorisé.

Remarque importante :

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par une bonification maximale de deux points.

Production d'acide lactique par *Kluyveromyces lactis*

L'acide L-(+)-lactique est généralement produit par des microorganismes industriels appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bacillus* et *Rhizopus* par fermentation.

Lors d'une fermentation lactique classique, la chute du pH, due à la production de cet acide, a un effet inhibiteur sur les souches productrices.

Lors de fermentations industrielles, il est courant de réguler le pH par ajout de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, de CaCO_3 , de NaOH ou de NH_4OH , afin de neutraliser l'acide lactique.

Ces ajouts ont pour inconvénient d'induire des opérations industrielles supplémentaires pour régénérer, après fermentation, d'une part l'acide lactique non ionisé à partir de ses sels et d'autre part les cations régulateurs pour des fermentations ultérieures.

1. Acide lactique et pH des milieux de production (3,5 points)

- 1.1. Indiquer les principales caractéristiques morphologiques microscopiques du genre *Bacillus*.
- 1.2. Expliquer pourquoi la chute du pH, due à la production d'acide lactique, a un effet inhibiteur sur la croissance des souches productrices.
- 1.3. Réaliser un schéma légendé d'une boucle de régulation du pH dans un bioréacteur de laboratoire dans le cas de cette production. Indiquer les rôles des différents éléments et préciser le sens de parcours de cette boucle.

2. Voies fermentaires des souches de levures utilisées (10 points)

Pour éviter ces étapes chimiques, les industriels s'intéressent à des microorganismes qui ne sont pas sensibles à la baisse du pH, tels que les levures.

La levure *Kluyveromyces lactis*, KA1, a été modifiée génétiquement par transformation avec le gène de la lactate déshydrogénase (*LDH*).

Dans un premier temps la fermentation de la souche recombinante a donné les résultats résumés dans le **document 1**.

- 2.1. Nommer le type fermentaire de la souche de *Kluyveromyces lactis* KA1. Justifier la réponse.
- 2.2. Déterminer sur les courbes les valeurs nécessaires et estimer par rapport au glucose, en indiquant une formule littérale de calcul :
 - le rendement global de croissance ($R_{X/S}$ ou $Y_{F_{X/S}}$) en g de biomasse par g de glucose ;
 - le rendement global de conversion en acide lactique ($R_{LA/S}$ ou $Y_{F_{LA/S}}$) ;
 - le rendement global de conversion en éthanol ($R_{ET/S}$ ou $Y_{F_{ET/S}}$)

Dans un second temps, le gène *LDH* a été introduit dans une autre souche de *Kluyveromyces lactis*, KB2, dont l'activité d'une enzyme clé du métabolisme glucidique a été supprimée par mutagenèse aléatoire.

La fermentation de cette deuxième souche KB2 est résumée dans le **document 2**.

Les résultats obtenus, exprimés dans les mêmes unités qu'en 2.2., sont les suivants :

$R_{X/S}$ ou $YF_{X/S}$	$R_{LA/S}$ ou $YF_{LA/S}$
0,14 g biomasse / g glucose	0,24

- 2.3. Nommer le type fermentaire de la souche de *Kluyveromyces lactis* KB2. Justifier la réponse.
- 2.4. Comparer les rendements globaux de croissance et interpréter à l'aide des réponses aux questions 2.1. et 2.3.
- 2.5. Comparer les rendements globaux de conversion en acide lactique et en éthanol de ces deux fermentations.
Interpréter ces résultats, à l'aide du **document 3** : l'enzyme ❶ est l'enzyme clé dont l'activité a été supprimée dans la souche KB2.
- 2.6. Citer les enzymes ❶, ❷ et ❸ impliquées dans les fermentations alcoolique et lactique ainsi que le(s) coenzyme(s) d'oxydoréduction des réactions catalysées par les enzymes ❷ et ❸.
- 2.7. Donner la définition d'un coenzyme.

Les coenzymes d'oxydoréduction retrouvés dans les voies fermentaires décrites dans le **document 3** sont ceux que l'on trouve également dans le métabolisme énergétique de type respiratoire.

- 2.8. Indiquer la localisation cellulaire précise où les coenzymes réduits sont réoxydés en aérobiose par les levures.

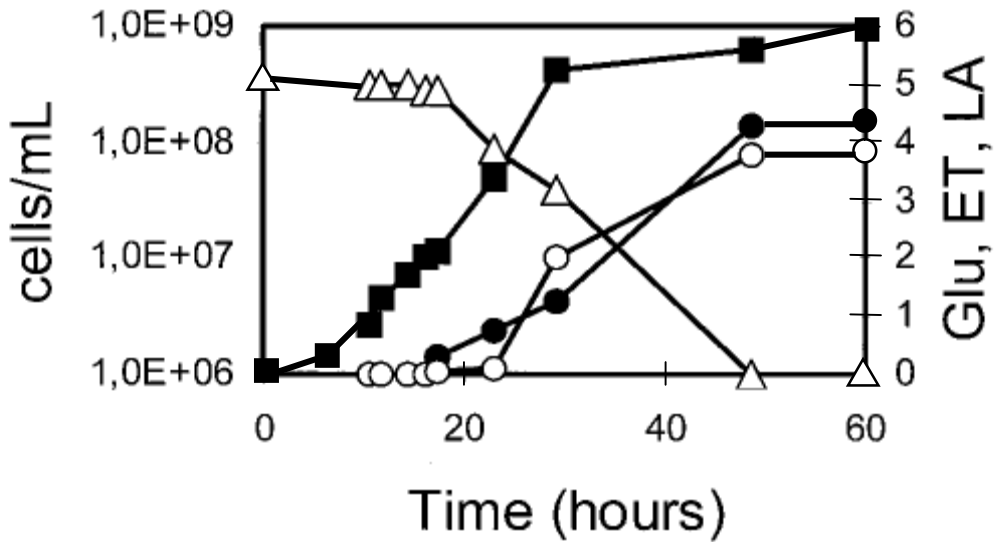
3. Milieux de culture et conditions de production (6,5 points)

Lors de la culture en bioréacteur, les levures réalisent les deux métabolismes énergétiques (respiratoire et fermentaire) simultanément.

Le texte du **document 4** précise les conditions nécessaires à la culture des levures étudiées.

- 3.1. Le milieu « yeast nitrogen base » est un milieu synthétique minimum.
 - 3.1.1. Donner la définition d'un milieu minimum.
 - 3.1.2. Compte tenu de la nature de certains composants du milieu, proposer un type trophique pour les souches KA1 et KB2. Justifier la réponse.
- 3.2. Donner la définition de la pO_2 .
- 3.3. Présenter sous forme de graphe, l'évolution de la pO_2 et de X au cours d'un batch non régulé d'une culture de levure.
- 3.4. À l'aide du **document 4**, expliquer quel effecteur intervient dans la régulation de la pO_2 . Expliquer comment cet effecteur agit sur la pO_2 .
- 3.5. Proposer un type de mobile d'agitation à utiliser. Justifier le choix.
- 3.6. Indiquer le débit d'air insufflé dans le bioréacteur exprimé en litres par heure.

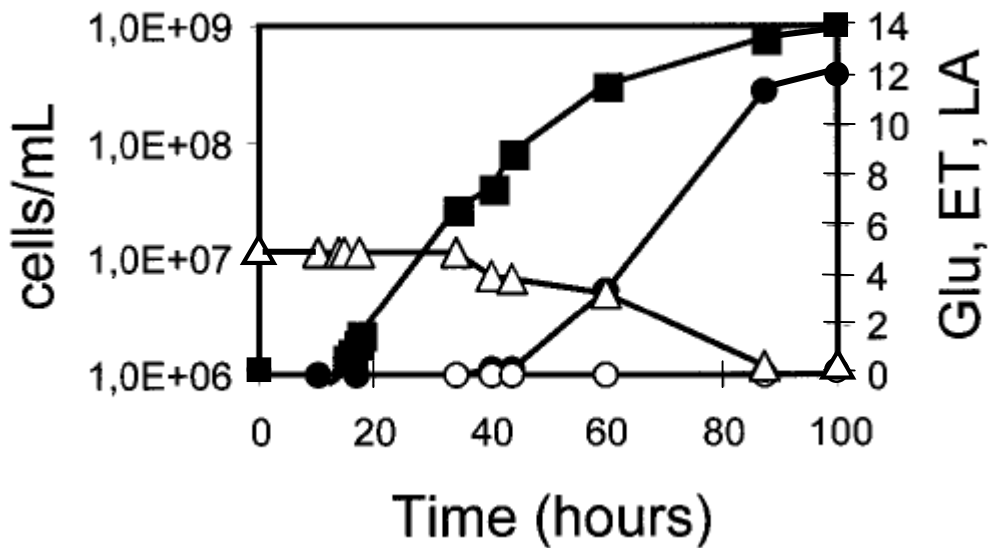
Document 1



Fermentation of *Kluyveromyces lactis* KA1, transformed by *LDH*. ■ cells per milliliter ; ○ ethanol (ET) production, grams per liter ; ● L-(+)-lactic acid (LA) production, grams per liter ; and Δ percent (wt/vol) residual glucose (Glu).

Donnée : la masse moyenne d'une cellule est 7.10^{-12} g

Document 2



Fermentation of *Kluyveromyces lactis* KB2, transformed by *LDH*. ■ cells per milliliter ; ○ ethanol (ET) production, grams per liter ; ● L-(+)-lactic acid (LA) production, grams per liter ; and Δ percent (wt/vol) residual glucose (Glu).

Document 3

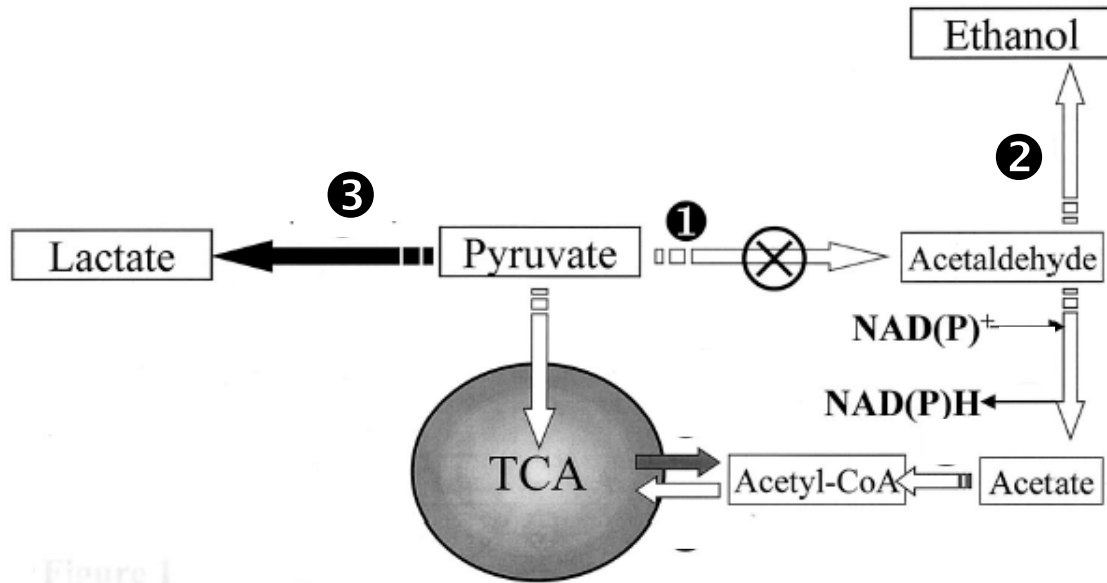


Figure 1

TCA : tricarboxylic acid cycle

Document 4

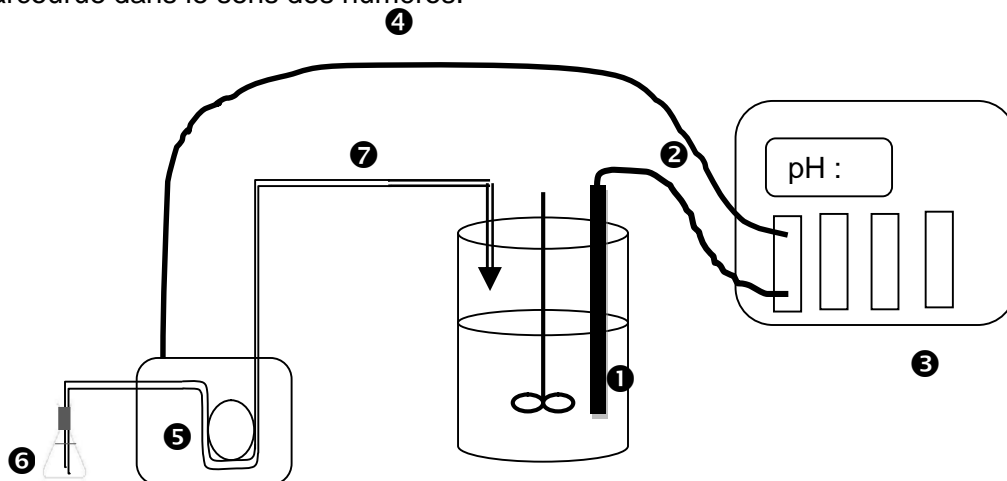
“**Stirred-tank cultures.** Growth on glucose medium of strains KA1 and KB2 was monitored in a 5-liter Biostat-B stirred-tank bioreactor (B-Braun). Cells were inoculated in 4 liters of yeast nitrogen base medium, containing 5% (wt/vol) glucose, and supplemented with $\rho_{\text{adenine}} = 200 \text{ mg.L}^{-1}$ and of $\rho_{\text{uracil}} = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ final concentration. The bioreactor was kept at 30°C and pH = 5 and air flowrate was 2 L.min⁻¹. A pO₂ higher than 40 % was maintained throughout the process by controlling the stirring rate.”

Proposition de corrigé de l'épreuve de Microbiologie et Génie fermentaire

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

- 1.1. Bacille Gram⁺ sporogène.
- 1.2. Diminution du pH, qui n'est alors plus optimal, donc la croissance est ralentie.
- 1.3. Un schéma plus simple était accepté, le document ci-dessous est fourni à titre d'outil de travail et les éléments figurant entre parenthèses n'étaient pas exigés :
 - ❶ capteur : électrode de pH
 - (❷ câble électrique reliant le capteur et le module de contrôle : le signal capté est envoyé au module de contrôle ou régulateur)
 - ❸ module de contrôle ou régulateur : **compare le signal** capté et la **valeur de consigne** imposée et envoie un ordre de correction à l'organe d'action : ici, la pompe péristaltique
 - (❹ câble électrique reliant le module de contrôle et l'organe d'action)
 - ❺ **organe d'action ou effecteur ou actionneur ou pompe péristaltique** qui ajoute de la base pour corriger le pH du milieu (faire figurer également une alimentation en acide n'était pas une erreur, mais elle n'est pas utile s'il n'y a pas de risque d'alcalinisation du milieu pendant le procédé)
 - ❻ **solution basique** (concentrée pour tenir moins de place et être moins facilement contaminée) car il y a diminution du pH
 - (❼ tuyau d'apport de la base dans le bioréacteur)

La boucle est parcourue dans le sens des numéros.



- 2.1. Cette souche est hétérolactique (ou hétérofermentaire) car elle produit à la fois de l'acide lactique et de l'éthanol.
- 2.2. $R_{X/S}$ ou $YF_{X/S} = [(N_{\text{finale}} - N_{\text{initiale}}) \times 7 \cdot 10^{-12}] / (\rho_{\text{glucose initial}} - \rho_{\text{glucose final}})$
 N : concentration cellulaire exprimée en cellules / L
 - $R_{LA/S}$ ou $YF_{LA/S} = (\rho_{LA \text{ final}} - \rho_{LA \text{ initial}}) / (\rho_{\text{glucose initial}} - \rho_{\text{glucose final}})$
 - $R_{ET/S}$ ou $YF_{ET/S} = (\rho_{ET \text{ final}} - \rho_{ET \text{ initial}}) / (\rho_{\text{glucose initial}} - \rho_{\text{glucose final}})$

Applications numériques :

- $R_{X/S}$ ou $YF_{X/S} = (1,0 \cdot 10^9 - 1,0 \cdot 10^6) \times 1000 \times 7 \cdot 10^{-12} / 50 = 0,14 \text{ g / g}$
- $R_{LA/S}$ ou $YF_{LA/S} = 4,3 / 50 = 0,086 \text{ g d'acide lactique par g de glucose}$
- $R_{ET/S}$ ou $YF_{ET/S} = 3,8 / 50 = 0,076 \text{ g d'éthanol par g de glucose}$

Remarque : les concentrations finales en acide lactique et éthanol sont approximatives puisqu'elles sont estimées par lecture graphique sur le graphe du document 1.

- 2.3. La souche réalise une fermentation homolactique car elle produit uniquement de l'acide lactique.

ÉPREUVE DE BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES PROTÉINES

Durée de l'épreuve : 2 heures Coefficient : 1

L'usage d'un dictionnaire anglais/français et d'une calculatrice est autorisé.

Remarque importante :

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par une bonification maximale de deux points.

Les β -lactamases

Les β -lactamines sont des antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane. Elles possèdent un noyau structural commun, le cycle β -lactame.

Certaines souches bactériennes produisent des β -lactamases capables d'hydrolyser le cycle β -lactame, donc, capables d'inactiver ces antibiotiques. Par conséquent, la présence de ces enzymes confère à la souche productrice une résistance à ces antibiotiques.

1. Structure et activité des β -lactamases « TEM » (15 points)

TEM-1 est une β -lactamase retrouvée aussi bien chez des souches bactériennes Gram-positives que chez des souches bactériennes Gram-négatives.

- 1.1 TEM-1 est désignée par le code E.C 3.5.2.6 selon la classification internationale des enzymes.
 - 1.1.1 Rappeler les grands principes de cette classification.
 - 1.1.2 Citer les différentes classes d'enzymes.
 - 1.1.3 Préciser la classe de TEM-1.
- 1.2 Le **document 1** présente la structure de la β -lactamase TEM-1. Celle-ci révèle que l'enzyme est composée de deux domaines structuraux, le site actif de l'enzyme se situant à l'interface entre ces deux domaines.
 - 1.2.1 Nommer une technique permettant la détermination précise de la structure tridimensionnelle d'une protéine.
 - 1.2.2 Définir la structure secondaire d'une protéine en précisant les liaisons mises en jeu.
 - 1.2.3 Indiquer les types de structures secondaires qui apparaissent dans le document 1.
 - 1.2.4 Préciser la signification de « domaine structural d'une protéine ».
 - 1.2.5 Indiquer les rôles des résidus d'acides aminés présents dans le site actif d'une enzyme.
- 1.3 De nombreuses souches d'*E.coli* productrices de β -lactamases TEM ont été isolées. Différents variants de TEM ont alors été mis en évidence.

Chez le variant TEM-31, la cystéine 241 est substituée par une lysine.

 - 1.3.1 Donner la formule semi-développée de ces deux acides aminés.
 - 1.3.2 Nommer les fonctions chimiques présentes dans les chaînes latérales de ces deux acides aminés.

- 1.3.3 Citer deux caractéristiques distinguant ces deux acides aminés et pouvant entraîner des modifications de structure.

Le tableau du **document 2** présente des paramètres cinétiques de TEM-1 et de TEM-31.

- 1.3.4 Définir les 2 paramètres K_M et k_{cat} .
- 1.3.5 Comparer les affinités apparentes de ces 2 enzymes pour la pénicilline G.
- 1.3.6 Montrer que l'enzyme TEM-31 est 17 fois plus efficace pour l'hydrolyse de la pénicilline G que pour l'hydrolyse de la céphaloridine.

L'acide clavulanique est un analogue structural des β -lactamines.

- 1.3.7 En déduire le type d'inhibition de l'activité β -lactamase attendu par ajout d'acide clavulanique ; justifier.
 - 1.3.8 Préciser quel est le paramètre cinétique modifié ; justifier.
- 1.4** Certaines mutations des β -lactamases TEM s'accompagnent d'un accroissement de la résistance à la dénaturation thermique à 42°C. On étudie cette dénaturation en traçant la fonction $\ln(\text{activité résiduelle}) = f(\text{temps de dénaturation})$
- 1.4.1 Lister les opérations expérimentales permettant de tracer cette fonction.
 - 1.4.2 Définir le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de l'enzyme à 42°C.
 - 1.4.3 Dans quel sens varie le $t_{1/2}$ lorsque la résistance à la dénaturation thermique augmente ? Justifier.
- 1.5** Certaines mutations des β -lactamases TEM ont pour conséquence une modification du point isoionique (pI).
- 1.5.1 Définir le paramètre pI.
L'isoélectrofocalisation permet de séparer les protéines selon le pI.
 - 1.5.2 Exposer succinctement le principe de cette technique.
 - 1.5.3 Justifier son intérêt en électrophorèse bi-dimensionnelle.

2. Obtention d'une fraction pure de β -lactamase « BES-1 » (5 points)

On cherche à purifier une nouvelle β -lactamase BES-1 (MM = 29 kDa), responsable de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Les différentes étapes de cette purification sont indiquées dans le **document 3**.

- 2.1** Le **document 4** présente le protocole de l'extraction de cette β -lactamase.
- 2.1.1 Expliquer comment la lyse bactérienne est obtenue.
 - 2.1.2 Indiquer l'intérêt de l'étape de dialyse dans le protocole.
- 2.2** La phase stationnaire utilisée pour la chromatographie de gel filtration présente un domaine de fractionnement (ou domaine de séparation) de 700 à 5 000 Da.
- 2.2.1 Cette phase stationnaire est constituée de billes de SéphadexTM.
Donner les caractéristiques de ces billes.
 - 2.2.2 Préciser le comportement de la β -lactamase dans ce gel.
Indiquer à quoi correspond son volume d'élution.
- 2.3** Analyser l'électrophorégramme du **document 5** présentant le résultat du suivi par SDS-PAGE de la purification.

Document 1

Structure tridimensionnelle de la β -lactamase TEM-1.
(La sérine active est repérée par la flèche.)

Site actif



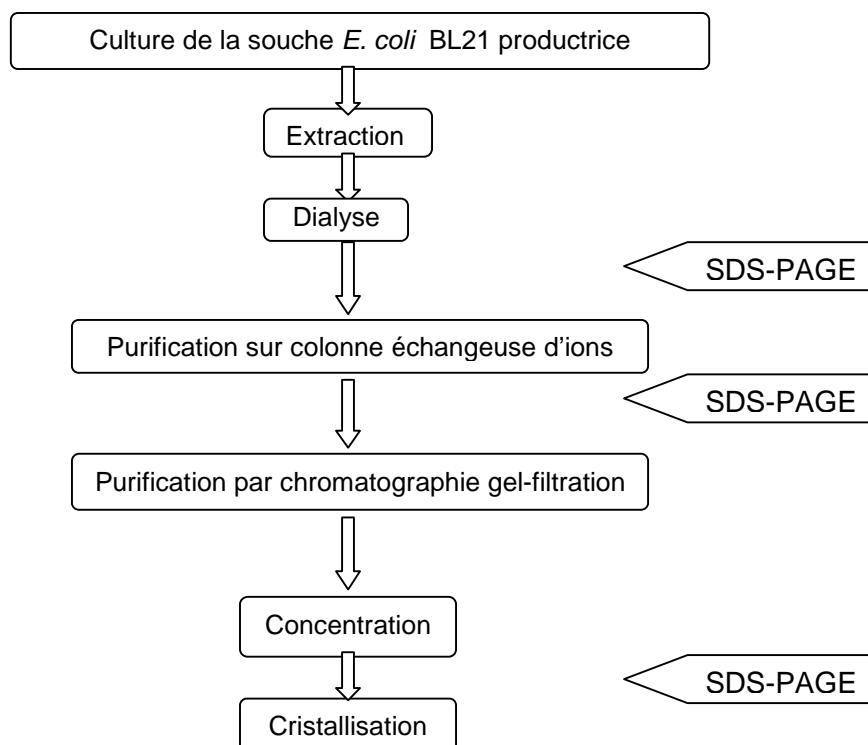
Document 2

Paramètres cinétiques des β -lactamases TEM-1 et TEM-31

Souche productrice	β -lactamase	k_{cat} en unités arbitraires relatives pour le substrat :		K_M (μM) pour le substrat :	
		Pénicilline G	Céphaloridine	Pénicilline G	Céphaloridine
DH5 α TEM-1	TEM-1	100	65	38	1169
13162	TEM-31	100	11	365	681

Document 3

Organigramme montrant les différentes étapes de la manipulation



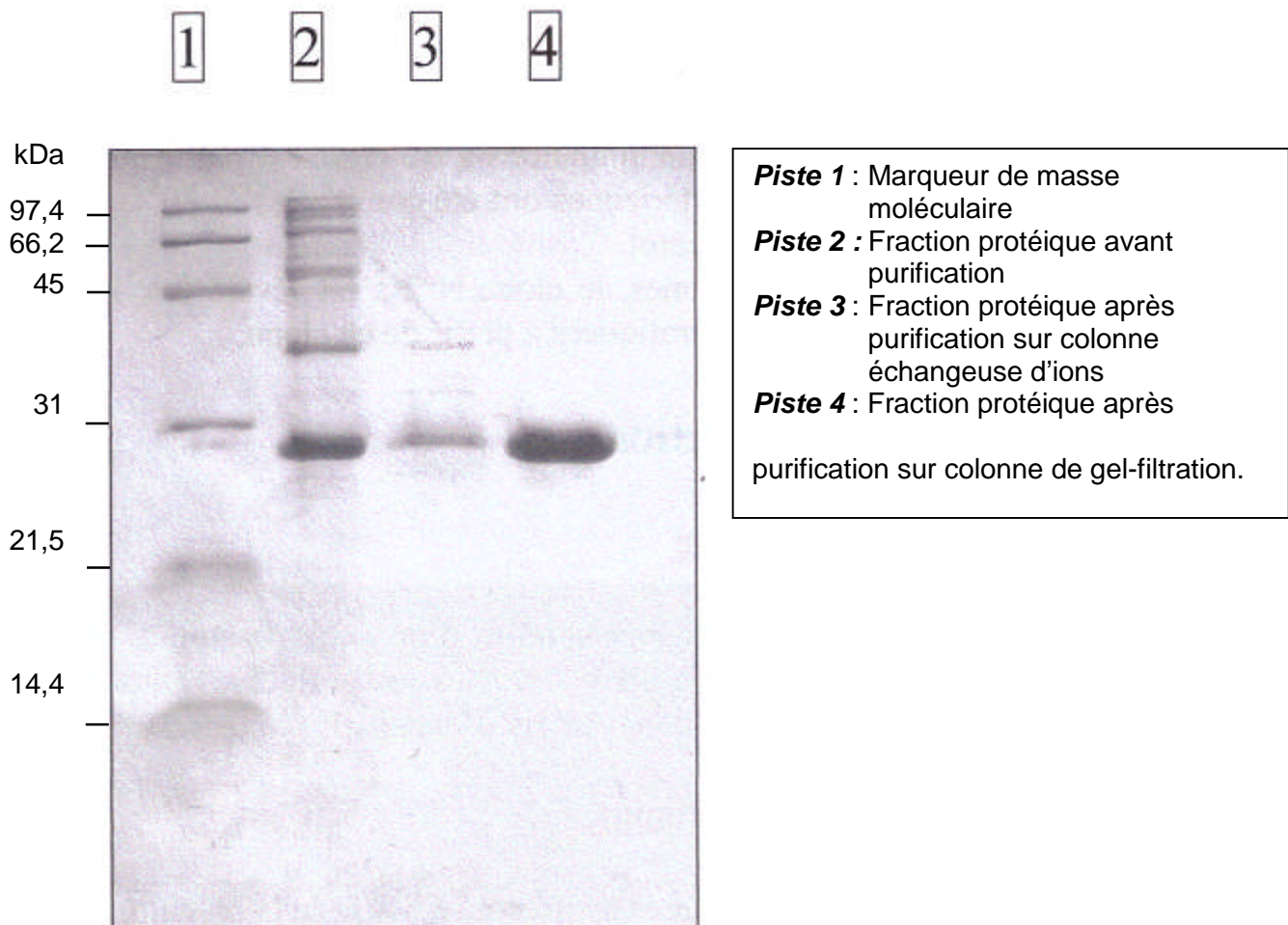
Document 4

Extraction de BES-1

Deux litres de bouillon sont centrifugés pendant 15 minutes à 7000 rpm à une température de +4°C. Trois lavages successifs du culot sont effectués : le premier en eau ultra-pure, les deux suivants en tampon MES (petite molécule ionique) à 20 mmol.L⁻¹. Le culot est pesé, puis soumis à des cycles congélations-décongélations. Lors de la dernière décongélation à température ambiante, le culot est repris avec du tampon MES à 20 mmol.L⁻¹ ajusté à pH 6,5 (20 mL de tampon pour 5 g de culot), puis subit 5 cycles de sonication de 30 secondes après 30 secondes de pause. La suspension est ensuite centrifugée 10 minutes à 10 000 rpm et à +4°C. De la DNase est ajoutée au surnageant, et une centrifugation de 1 heure à 10 000 rpm à +4°C est effectuée. À l'issue de la centrifugation, le surnageant contenant la protéine est prélevé. Son volume est de 90 mL.

Document 5

Électrophorégramme obtenu par SDS-PAGE



1.4.2. Temps 1/2 vie = durée qui conduit à la dénaturation thermique (observée par la perte d'activité catalytique) de la moitié de la quantité d'enzyme présente.

1.4.3. Il y a augmentation de $t_{1/2}$ puisque la dénaturation thermique d'une enzyme plus thermostable nécessitera une exposition plus longue.

1.5.1. Le pI est le pH pour lequel la charge globale de la protéine est nulle.

1.5.2. On réalise une migration électrophorétique dans un gel contenant un gradient de pH. Chaque protéine est alors focalisée au niveau de son pI, la migration étant arrêtée lorsque $\text{pH} = \text{pI}$.

1.5.3. C'est un critère supplémentaire de séparation, en plus du poids moléculaire déterminé ensuite par SDS-PAGE.

2.1.1. 1^{ère} étape : cycle congélation / décongélation, procédé mécanique visant par la formation des cristaux de glace à faire éclater la paroi bactérienne.

2^{ème} étape : sonication, procédé mécanique dont les ondes d'implosion des cavitations formées lors de l'application des ultra-sons lysent les cellules.

2.1.2. La dialyse est utilisée pour éliminer de l'extrait protéique les ions diffusibles pouvant interférer avec la chromatographie échangeuse de cations.

2.2.1. Pores calibrés ; les molécules de tailles inférieures à 5 000 Da peuvent pénétrer.

2.2.2. β -lactamase exclue (MM > 5 000 Da)

Volume d'élution correspond au volume mort, volume extérieur aux billes.

2.3. La SDS-PAGE permet d'évaluer la pureté de chacune des fractions obtenues au cours des étapes d'extraction-purification et donne des indications de masses moléculaires sur les unités protéiques détectées.

La piste 2 permet de mettre en évidence les différentes protéines présentes après extraction.

À l'issue de la 1^{ère} étape de purification (échangeur de cations), il y a plusieurs bandes mais en nombre inférieur, donc il y a eu une purification mais incomplète.

À l'issue de la 2^{ème} étape (gel filtration), il n'y a plus qu'une seule bande, d'une épaisseur plus importante ; à l'issue de la chromatographie gel-filtration une seule fraction protéique est détectée. La protéine serait ainsi formée par un seul type d'unité protéique de masse moléculaire voisine de 30 kDa.

ÉPREUVE DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET GÉNIE GÉNÉTIQUE

Durée de l'épreuve : 2 heures Coefficient : 1
L'usage d'un dictionnaire anglais/français et d'une calculatrice est autorisé.

Remarque importante :

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par une bonification maximale de deux points.

Étude de la structure, de l'expression et de la fonction du gène *bdnf*

Les neurotrophines sont une classe de protéines sécrétées par les cellules du système nerveux. Elles sont impliquées dans la survie et la différenciation des neurones au cours du développement.

Parmi les neurotrophines, le BDNF (brain derived neurotrophic factor ou facteur neurotrophique dérivé du cerveau) est l'objet d'intenses recherches. En effet, au delà de son rôle dans le développement de l'organisme, le BDNF semble impliqué dans de nombreuses pathologies du système nerveux. Les études récentes se sont plus particulièrement intéressées à la structure du gène *bdnf*, ainsi qu'à la régulation de son expression chez les rongeurs modèles en laboratoire.

1. Structure et expression du gène *bdnf* chez la souris (6 points)

1.1. Structure du gène *bdnf*

1.1.1. Donner la définition d'une séquence codante.

1.1.2. À l'aide d'un schéma légendé, représenter la structure d'un gène eucaryote en précisant les éléments nécessaires à son expression en protéine.

1.2. Expression du gène *bdnf*

La transcription du gène *bdnf* est suivie d'un épissage.

1.2.1. Préciser en quoi consiste l'épissage.

1.2.2. Présenter, sous forme de schéma(s), les étapes d'un épissage.

L'organisation du gène *bdnf* chez la souris et la représentation schématique de ses transcrits matures sont représentés sur le **document 1**.

1.2.3. À l'aide du **document 1**, nommer le processus qui est à l'origine de la diversité des transcrits matures produits à partir du gène *bdnf*. Justifier cette appellation.

1.2.4. Citer un autre mécanisme permettant d'augmenter la diversité des produits d'expression d'un gène.

1.2.5. À l'aide du **document 1**, déterminer le nombre de transcrits matures produits à partir du gène *bdnf*.

1.2.6. Présenter, dans un tableau, la taille des transcrits BDNF I, BDNF III et BDNF VII. Détailler le calcul pour le transcrit BDNF III en l'expliquant.

1.2.7. Déterminer le nombre de protéine(s) issue(s) de la traduction de ces ARN messagers. Justifier la réponse.

2. Mise en œuvre de l'étude de la régulation de l'expression du gène *bdnf* (8,5 points)

L'expression du gène *bdnf* a été étudiée chez la souris par RT-PCR.

2.1. Stratégie mise en œuvre.

2.1.1. Donner le principe de la RT-PCR.

- 2.1.2. Réaliser un organigramme présentant les principales étapes du protocole décrit dans le **document 2**.

2.2. Extraction des transcrits totaux :

Les ARN totaux sont extraits à l'aide d'un kit commercial (RNAagents total RNA isolation system) mentionné dans le **document 2** et dont la composition est décrite dans le **document 3**.

- 2.2.1. Expliciter le rôle des réactifs indiqués en gras dans le **document 3**.
- 2.2.2. Expliquer l'importance de l'utilisation de phénol acide dans le cadre de cette extraction.

2.3. Réaction de transcription inverse :

- 2.3.1. Préciser la nature des amorces utilisées pour cette transcription inverse dont le protocole est présenté dans le **document 2**.
Citer un autre type d'amorces susceptibles d'être utilisées pour cette étape.
- 2.3.2. La transcriptase inverse utilisée présente une activité RNase H⁻ (négative).
Rappeler l'activité enzymatique de la RNase H.

2.4. Réaction d'amplification par PCR :

- 2.4.1. Présenter, sous forme de schéma(s), le principe de la technique PCR.
- 2.4.2. Justifier la nécessité d'éliminer toute trace d'ADN lors de l'extraction des ARN dans le cadre d'une RT-PCR.
- 2.4.3. Rappeler les qualités des amorces nécessaires au bon fonctionnement d'une PCR.

3. Résultats de l'étude de la régulation de l'expression du gène *bdnf* (5,5 points)

Le **document 4** présente les résultats d'une des études par RT-PCR de l'expression du gène *bdnf*.

3.1. Intérêt de l'utilisation d'un gène contrôle.

- 3.1.1. Donner la propriété essentielle d'un gène de ménage.

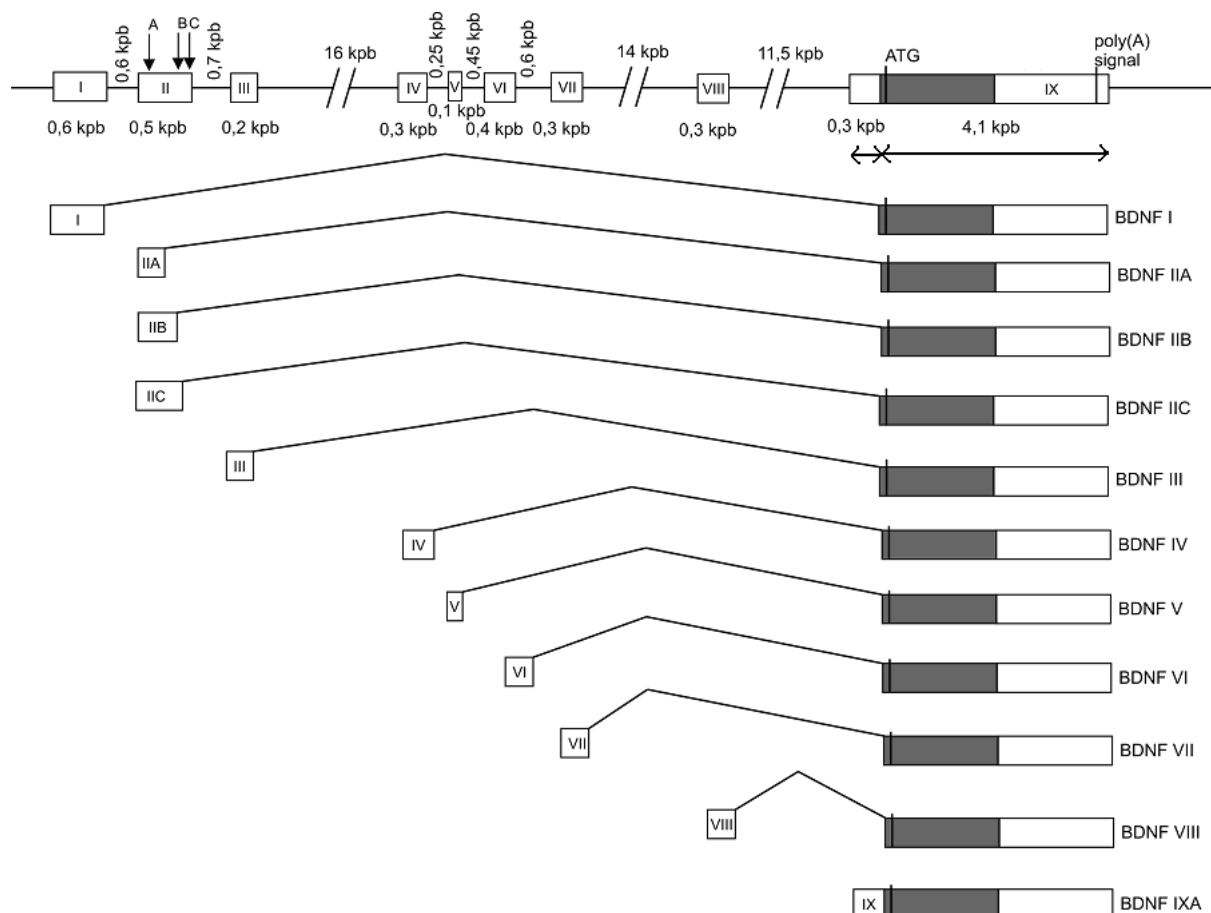
Le gène *hprt* est un gène de ménage codant une enzyme intervenant dans le métabolisme des nucléotides.

- 3.1.2. Préciser les intérêts de l'utilisation du gène *hprt* dans cette expérience.

3.2. Analyse de l'expression du gène *bdnf*. (**document 4**)

- 3.2.1. Analyser les résultats obtenus pour les produits de RT-PCR de *hprt*.
- 3.2.2. Analyser les résultats obtenus pour les produits de RT-PCR de BDNF I et analyser de même les produits de RT-PCR de BDNF V et BDNF VIII.
- 3.2.3. Conclure quant à l'expression du gène *bdnf* dans l'organisme.

Document 1 : Mouse *bdnf* gene structure.



The schematic representation of BDNF transcripts in relation to the gene is shown below the gene structure. Protein coding regions are shown as solid (black) boxes and untranslated regions are shown as open (white) boxes. Each of the eight 5' untranslated exons is spliced to the common 3' protein coding exon IX.

Document 2 : Protocole d'analyse de l'expression du gène *bdnf*.

RNA isolation, cDNA synthesis, RT-PCR

Total RNA from developing and adult mouse total brain regions and nonneuronal tissues was purified by RNAagents total RNA isolation system (Promega, USA) as recommended by the manufacturer. DNase treatment of total RNA was performed, followed by DNase inactivation.

Five micrograms of total RNA from different tissues was used for first strand synthesis using oligo(dT) and SuperScript III First-Strand synthesis system (Invitrogen, Carlsbad, CA). To analyse expression of BDNF transcripts, reverse primer specific for 3' BDNF coding exon and forward primers specific for 5' noncoding exons were used. cDNA was amplified in a total volume of 25 μ L. Because of relatively low expression levels of these mRNA, a robust HotstarTaq Master Mix kit (Qiagen, Chatsworth, CA) was used for cDNA amplification for 40-45 PCR cycles.

Document 3 : Descriptif des réactifs utilisés pour l'extraction des ARN totaux
(*kit RNAgents total RNA isolation system*)

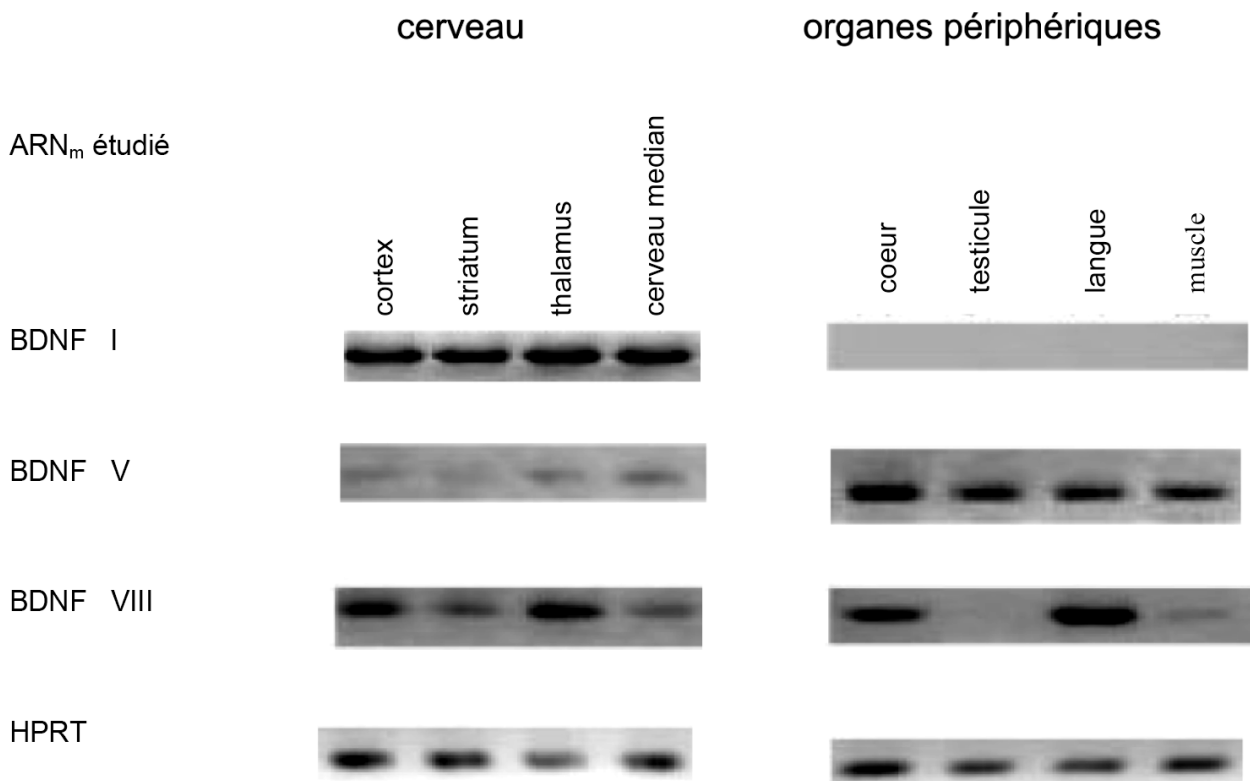
Solutions	Description et/ou composition
<i>Solution A</i>	- solution dénaturante qui lyse les cellules ou les tissus, dans des conditions qui inhibent rapidement les ribonucléases. - contient du thiocyanate de guanidium et du β-mercaptoéthanol .
<i>Solution B</i>	mélange de phénol acide et de chloroforme
<i>Solution C</i>	isopropanol

Les solutions A, B, C sont utilisées successivement lors de l'extraction des ARN cellulaires.

Document 4 : Analyse de l'expression du gène *bdnf* chez la souris.

Une réaction de RT-PCR semi-quantitative a été réalisée à partir des ARNm extraits de divers tissus de souris adulte. L'expression des gènes *bdnf* et *hprt* (hypoxanthine-phosphoribosyl-transférase) est étudiée dans le cerveau et différents organes périphériques.

Les produits de chaque RT-PCR sont analysés par électrophorèse.



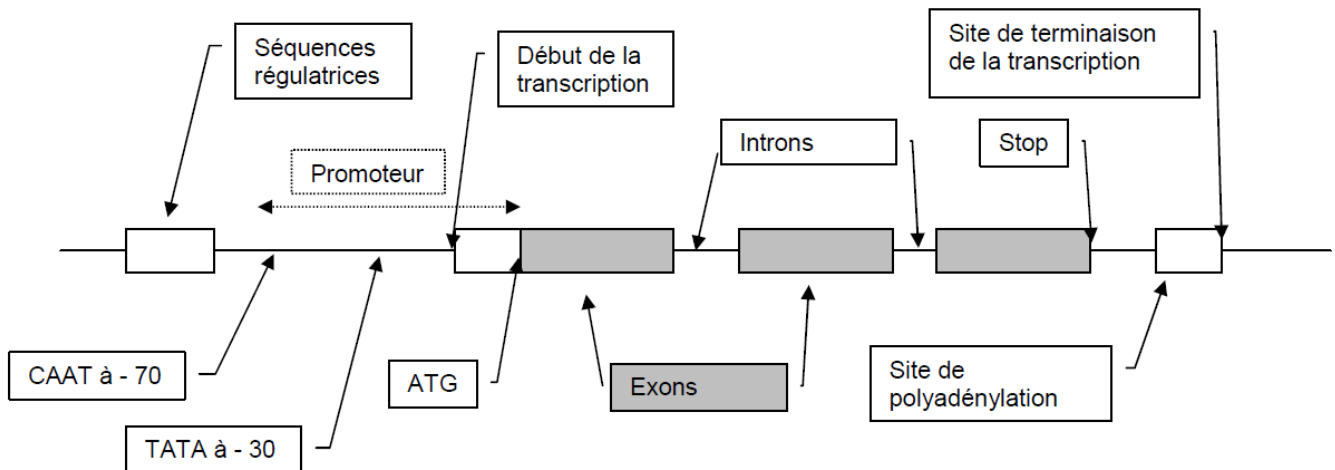
Proposition de corrigé de l'épreuve de Biologie moléculaire et Génie génétique

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

1.1.1. Séquence permettant la synthèse d'un ARN fonctionnel ou d'une protéine fonctionnelle

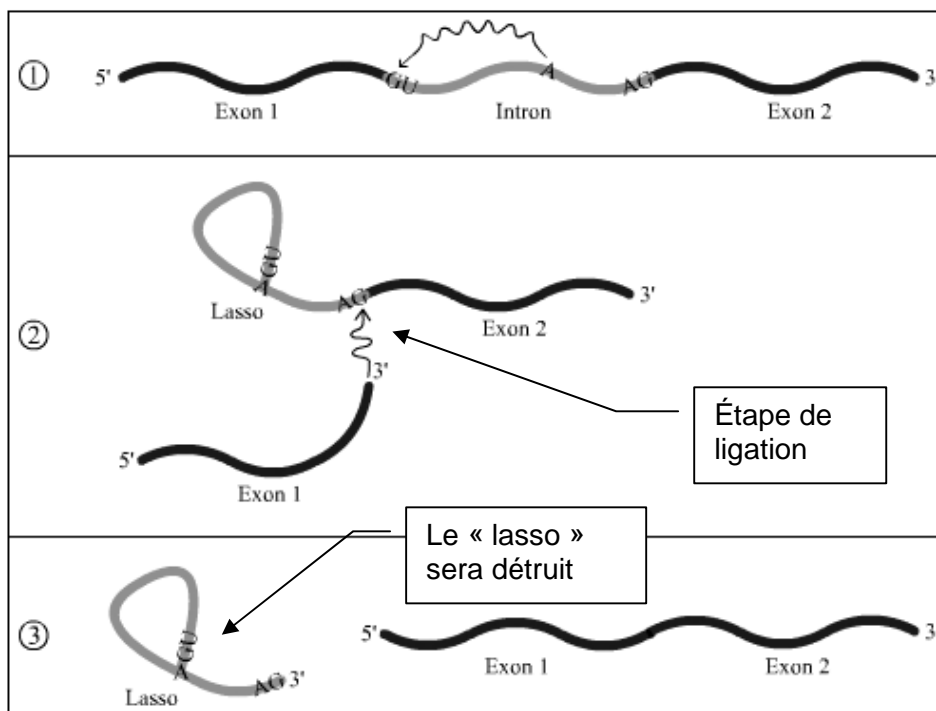
1.1.2. Faire figurer les éléments ci-dessous sur un schéma :

Promoteur Introns et exons Séquences ATG et stop Site de début de transcription
Site de polyadénylation Site de terminaison
D'où un schéma du type :

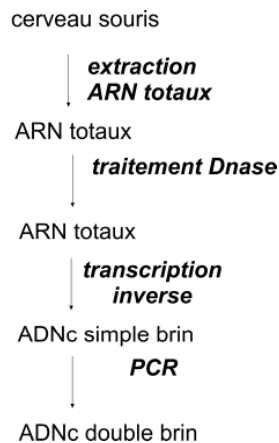


1.2.1. L'épissage consiste à **exciser les introns** du transcrit primaire chez les eucaryotes et à **relier les exons** qui vont former l'ARNm mature.

1.2.2. Voici, à titre d'exemple, le schéma accessible sur le site de l'Université de Jussieu :
Source : <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transcription/transcription.htm>

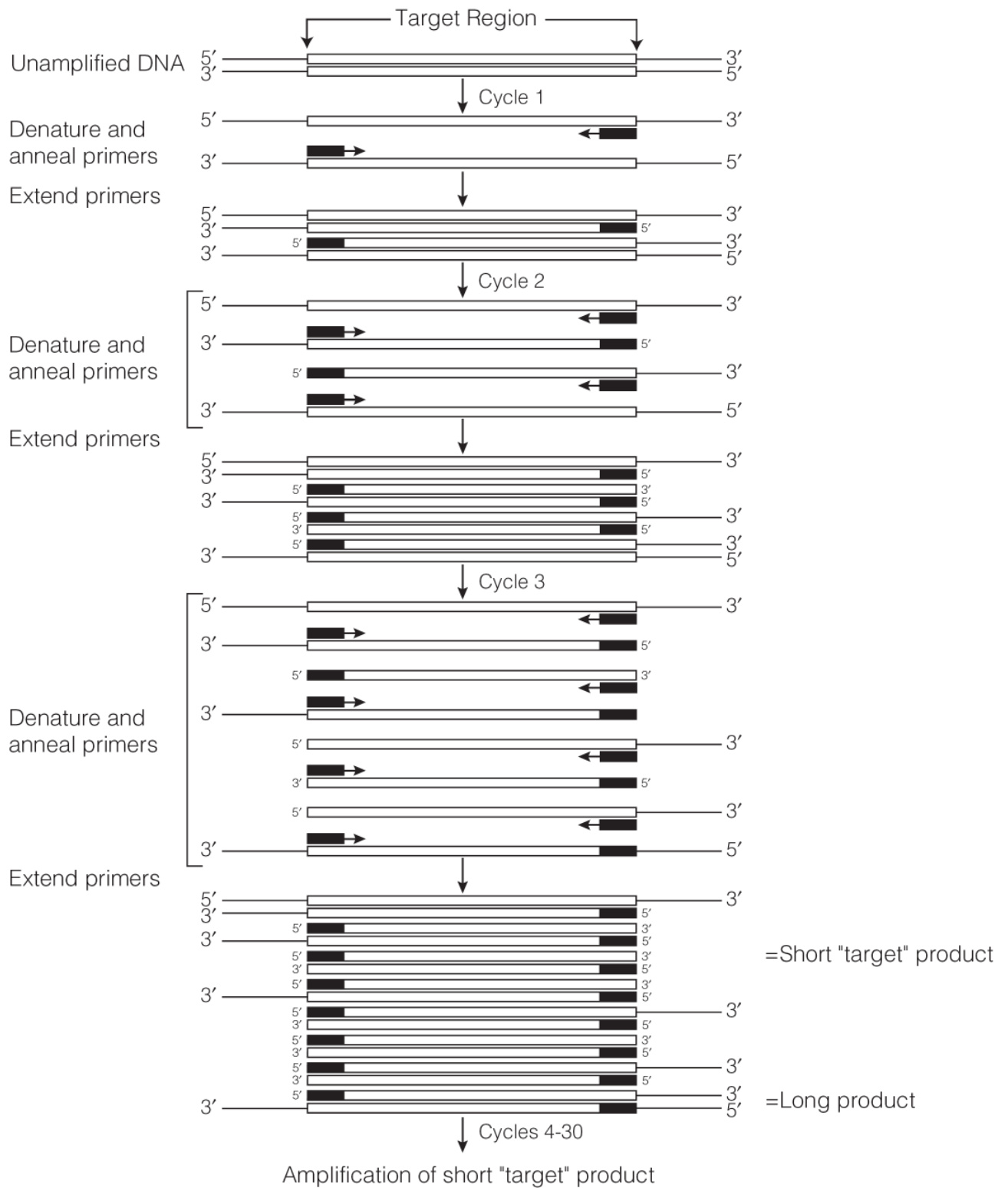


- 1.2.3. Les différents transcrits matures sont produits par épissage alternatif (ou différentiel). Un exon (alternativement I à VIII) est associé par élimination des autres exons et des introns, avec l'exon IX.
- 1.2.4. Toute réponse cohérente était acceptée : recombinaison interne à l'ADN, editing, contrôle des initiations de la transcription, modifications post-traductionnelles, transépissage ...
- 1.2.5. 11 transcrits matures différents sont possibles.
- 1.2.6. BDNF I : (exon I + exon IX) soit $(0,6 + 4,1) = 4,7$ kb
 BDNF III : (exon III + exon IX) soit $(0,2 + 4,1) = 4,3$ kb
 BDNF VII : (exon VII + exon IX) soit $(0,3 + 4,1) = 4,4$ kb.
 Calcul pour le transcrit BDNF III : seul l'exon III, d'une taille de 0,2 kb et l'exon IX, d'une taille de 4,1 kb) sont conservés lors de l'épissage. Tous les exons intermédiaires sont éliminés ainsi que les introns sur l'ARNm mature.
- 1.2.7. Une seule protéine est synthétisée car il n'y a qu'un seul codon d'initiation de la traduction (ATG) disponible sur les exons et il est localisé sur le début de l'exon IX (séquence en noire sur le schéma)
- 2.1.1. La RT-PCR (Reverse transcription / Polymerase Chain Reaction) consiste en une transcription inverse des ARN qui produit un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'un ARN, suivie d'une amplification spécifique par méthode PCR.
- 2.1.2. La démarche est la suivante :



- 2.2.1. β -mercaptoéthanol : agent réducteur des ponts disulfure, contribue à la dénaturation des protéines
 Chloroforme : élimination des molécules présentes dans la phase organique (protéines, lipides) ainsi que des ultimes traces de phénol de la phase aqueuse contenant les ARN
- 2.2.2. Les ARN demeurent solubles dans la phase aqueuse alors que l'ADN non.
- 2.3.1. On peut utiliser des amorces hexamériques aléatoires (oligoDT).
- 2.3.2. La RNase H est une ribonucléase active sur des molécules hybrides ADN/ARN.
- 2.4.1. Le schéma devait présenter les 3 étapes majeures (dénaturation, hybridation, polymérisation) en rappelant leurs températures respectives (95°C , environ 50°C , 72°C) et indiquer qu'il y a succession d'une trentaine de cycles constitués chacun de ces 3 étapes. Le schéma permettait de préciser l'orientation des brins, d'indiquer l'hybridation des amorces, de montrer l'amplification débordante au 1^{er} cycle et l'apparition de la 1^{ère} copie cible au 3^{ème} cycle.

L'exemple ci-dessous est un schéma complet, qui n'était évidemment pas exigé mais permet aux futurs candidats de parfaire leur préparation, disponible sur le site de la société PROMEGA :



2.4.2. Pour permettre la seule amplification des ADNc, il faut éliminer l'ADN génomique car il peut aussi servir de matrice.

2.4.3. Longueur d'au moins 20 désoxyribonucléotides ; spécifiques du fragment d'ADN à amplifier ; absence de structures secondaires ; absence de complémentarité entre les amorces ; T_m proches ; richesse des extrémités 3' en G et C.

3.2.1. Un gène de ménage est un gène dont l'expression demeure (quasi) constante quel que soit le type cellulaire ou/et les conditions de l'environnement cellulaire.

- 3.2.2. La RT-PCR est validée (extraction, RT et PCR) puisqu'il y a présence d'une bande, la comparaison du niveau de transcription dans les différents types cellulaires étant possible grâce à l'intensité de la bande.
- 3.2.3. Pour tous les tissus étudiés, une bande est présente, donc la RT-PCR est validée. Les intensités sont équivalentes, les taux d'expression sont voisins.
- 3.2.4. Certains transcrits ne sont exprimés que dans le cerveau (exon I), selon un taux constant et élevé étant donnée l'intensité des bandes.
Certains transcrits ne sont pas exprimés dans le cerveau (ou très peu) mais sont abondants dans les organes périphériques (exon V), surtout dans le cœur et la langue.
Certains transcrits sont exprimés à la fois dans le cerveau et dans certains organes périphériques (exon VIII) ; ils sont ubiquitaires.
Conclusion : les localisations et les intensités des expressions sont variables.
- 3.2.5. Le gène *bdnf* est donc un gène exprimé de manière ubiquitaire, préférentiellement dans le tissu nerveux. Son épissage alternatif permet son expression différentielle selon les tissus.

Sujets des épreuves de la session 2010

ÉPREUVE DE MATHÉMATIQUES

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 (calculatrice conforme à la circulaire n°99/186 du 16/11/99) et du formulaire officiel de mathématiques (NON REPRODUIT ICI) est autorisé.

Durée : 2 heures Coefficient : 1

Ce sujet comporte 6 pages, la page 6 est une annexe, à rendre avec la copie.

EXERCICE 1 (10 points)

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

A. Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) : $y' + 2y = 2e^{-2t}$,
où y est une fonction de la variable réelle t , définie et dérivable sur l'intervalle $[0; +\infty[$, et y' la fonction dérivée de y .

1. Déterminer les solutions sur l'intervalle $[0; +\infty[$ de l'équation différentielle (E₀) : $y' + 2y = 0$.
2. Soit h la fonction définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par : $h(t) = 2t e^{-2t}$.
Démontrer que h est une solution particulière de l'équation différentielle (E).
3. En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E).
4. Déterminer la solution f de l'équation différentielle (E) qui prend la valeur 1 pour $t = 0$.

B. Étude d'une fonction

Soit la fonction f définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par : $f(t) = (1+2t)e^{-2t}$.
On désigne par C la courbe représentative de la fonction f dans un repère orthogonal.

1. Déterminer $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t)$. Que peut-on en déduire pour la courbe C ?
2. On désigne par f' la fonction dérivée de la fonction f .
 - a. Vérifier que pour t appartenant à l'intervalle $[0; +\infty[$: $f'(t) = -4t e^{-2t}$.
 - b. En déduire le signe de $f'(t)$ pour t appartenant à l'intervalle $[0; +\infty[$ et donner le tableau de variation de la fonction f sur l'intervalle $[0; +\infty[$.
3.
 - a. Compléter le tableau de valeurs donné en **annexe (page 6)**. Arrondir à 10^{-2} .
 - b. Tracer la courbe C dans le repère donné en **annexe (page 6)**.

C. Application de la partie B

Dans les régions de production, on peut contrôler le taux de sucre des melons avec un réfractomètre à mesure rapide.

Le taux de défaillance du réfractomètre dans l'intervalle de temps $[0; +\infty[$ peut être modélisé par la fonction g définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par: $g(t) = 1 - f(t) = 1 - (1+2t)e^{-2t}$, où t est exprimé en heures et f est la fonction étudiée dans la partie B.

1. Dans cette question, on donnera les valeurs exactes puis les valeurs arrondies à 10⁻².
 - a. Quel est le taux de défaillance du réfractomètre au bout d'une heure ?
 - b. Quel est le taux de défaillance du réfractomètre au bout de deux heures ?
2. Pour des raisons de fiabilité, on doit changer le réfractomètre lorsque le taux de défaillance est supérieur ou égal à 0,75.
 - a. Montrer que le taux de défaillance est supérieur ou égal à 0,75 lorsque $f(t) \leq 0,25$.
 - b. En utilisant la courbe représentative de la fonction f tracée en **annexe (page 6)**, déterminer graphiquement, à 10⁻¹ près, la durée d'utilisation du réfractomètre. On laissera les traits de construction apparents.

EXERCICE 2 (10 points)

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

Une usine fabrique en grande quantité des récipients cylindriques pour le laboratoire.

A. Loi normale

Le couvercle d'un récipient est conçu pour avoir un diamètre de 60 millimètres.

Il est non défectueux lorsque son diamètre, exprimé en millimètres, appartient à l'intervalle $[59,93 ; 60,07]$.

On note X la variable aléatoire qui, à chaque récipient prélevé au hasard dans la production d'une journée, associe le diamètre, en millimètres, de son couvercle.

On suppose que la variable aléatoire X suit la loi normale de moyenne 60 et d'écart type 0,03.

Calculer la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard dans la production ait un couvercle non défectueux. On arrondira à 10⁻².

B. Événements indépendants

Les récipients fabriqués sont susceptibles de présenter deux défauts : un défaut au niveau de leur couvercle ou un défaut de contenance.

On prélève un récipient au hasard dans la production d'une journée. On considère les événements suivants:

E_1 : « le couvercle du récipient prélevé est défectueux » ;

E_2 : « le récipient prélevé présente un défaut de contenance ».

On suppose que les événements E_1 et E_2 sont indépendants. On admet que: $P(E_1) = 0,02$ et $P(E_2) = 0,01$.

Dans cette partie, on donnera les valeurs exactes des probabilités demandées.

1. Calculer la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard dans la production d'une journée présente les deux défauts.
2. a. Calculer la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard dans la production d'une journée présente au moins un des deux défauts.

b. Calculer la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard dans la production d'une journée ne présente aucun des deux défauts.

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

On prélève au hasard 50 récipients dans un stock pour vérification de leur couvercle. Le stock est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 50 récipients.

On rappelle que la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard ait un couvercle défectueux est égale à 0,02.

On considère la variable aléatoire Y qui, à tout prélèvement de 50 récipients, associe le nombre de récipients de ce prélèvement ayant un couvercle défectueux.

1. On admet que la variable aléatoire Y suit une loi binomiale.
Déterminer les paramètres de cette loi.
2. Calculer la probabilité que, dans un prélèvement, un seul récipient ait un couvercle défectueux.
On arrondira à 10^{-2} .
3. On considère que la loi suivie par Y peut être approchée par une loi de Poisson.
 - a. Déterminer le paramètre λ de cette loi de Poisson.
 - b. On désigne par Y_1 une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre λ , où λ est la valeur obtenue au a.

En utilisant la loi suivie par Y_1 , calculer la probabilité qu'au plus trois récipients d'un prélèvement aient un couvercle défectueux. On arrondira à 10^{-2} .

D. Intervalle de confiance

Dans cette partie on s'intéresse à la contenance de chaque récipient, exprimée en centimètres cubes. On prélève au hasard et avec remise un échantillon de 50 récipients dans un lot important.

Soit \bar{C} la variable aléatoire qui, à tout échantillon de 50 récipients prélevés au hasard et avec remise dans le lot, associe la moyenne des contenances des récipients de cet échantillon.

On suppose que \bar{C} suit la loi normale de moyenne inconnue μ et d'écart type $\sigma/\sqrt{50}$ avec $\sigma = 0,06$.

Pour l'échantillon prélevé, la moyenne obtenue, arrondie à 10^{-2} , est : $\bar{x} = 119,88$.

Déterminer un intervalle de confiance centré sur \bar{x} de la moyenne μ des contenances des récipients de ce lot, avec un taux de confiance supérieur ou égal à 95 %.

On arrondira à 10^{-2} les bornes de cet intervalle.

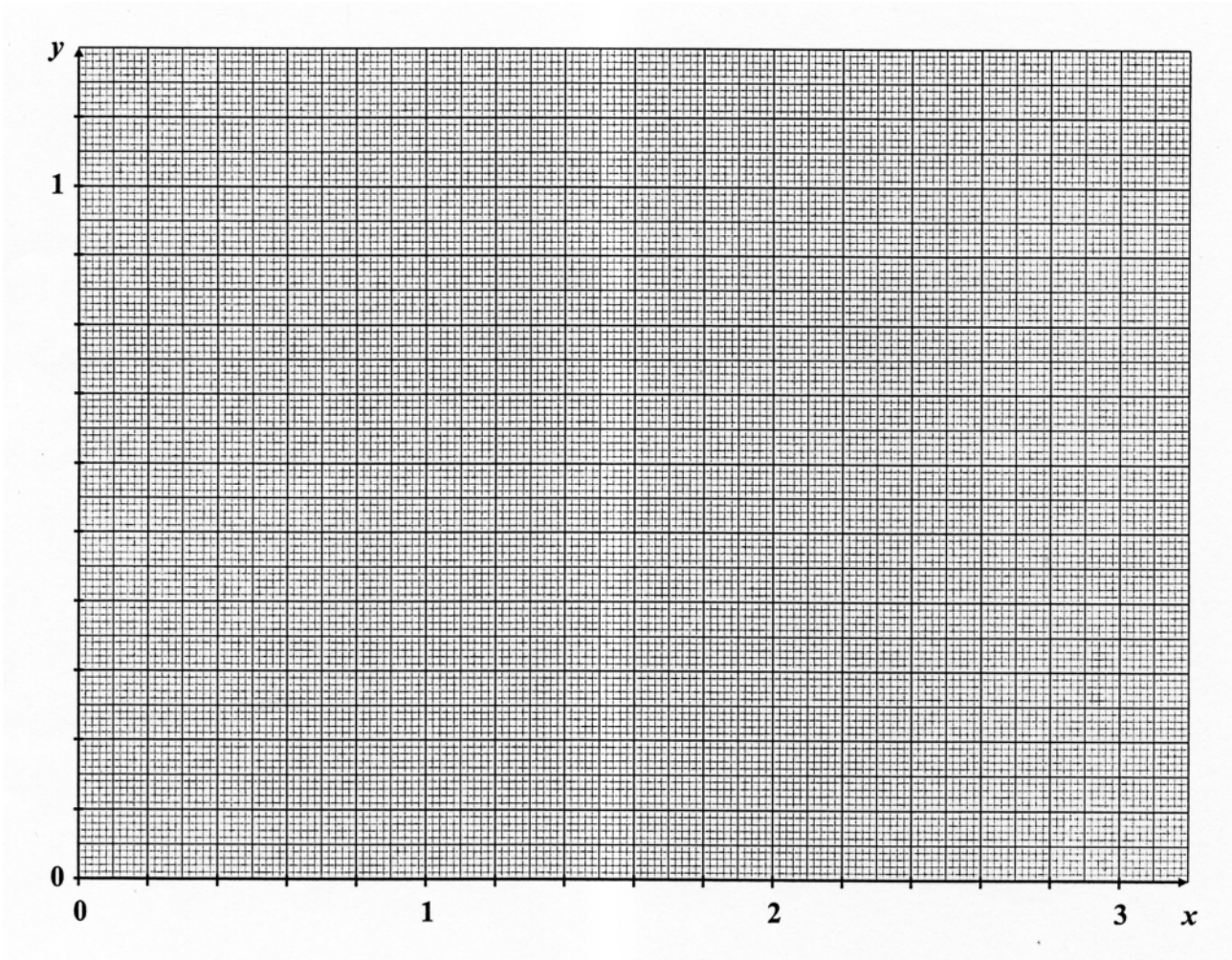
ANNEXE (à rendre avec la copie)

EXERCICE 1, Partie B, question 3.

a. Tableau de valeurs (arrondies à 10^{-2}) de la fonction f

x	0	0.5	1	1.5	2	3
$f(x)$						

b. Tracé de la courbe C



Proposition de corrigé de l'épreuve de MATHÉMATIQUES

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

Exercice 1

A. Résolution d'une équation différentielle

1. (E_0) est une équation différentielle du premier ordre sans second membre, les solutions sur $[0; +\infty[$ sont du type : $y(t) = k e^{-2t}$

$$2. h(t) = 2t e^{-2t} \quad h'(t) = 2e^{-2t} + 2t(-2)e^{-2t} = 2e^{-2t} - 4t e^{-2t} \quad (\text{forme } u v)$$

$$h \text{ solution particulière de } (E) \Leftrightarrow h'(t) + 2h(t) = 2e^{-2t}$$

$$\text{Or } h'(t) + 2h(t) = 2e^{-2t} - 4te^{-2t} + 2(2te^{-2t}) = 2e^{-2t} - 4te^{-2t} + 4te^{-2t} = 2e^{-2t}$$

Donc la fonction h est bien une solution particulière de (E)

3. Les solutions de (E) sont formées des solutions de l'équation homogène (E_0) et d'une solution particulière de (E) .
Donc $y(t) = k e^{-2t} + 2te^{-2t}$

4. $y(0) = k e^{-2 \times 0} + 2 \times 0 \times e^{-2 \times 0} = k e^0 = k$ Comme $y(0) = 1$, $k = 1$ et donc :
pour tout $t \in [0; +\infty[$ $f(t) = e^{-2t} + 2te^{-2t} = (1 + 2t)e^{-2t}$

B. Étude d'une fonction

1. C'est une forme indéterminée « $+\infty \times 0$ », ,

$$\text{mais : } f(t) = e^{-2t} + 2te^{-2t} = (1 + 2t)e^{-2t} = e^{-2t} + 2te^{-2t} = e^{-2t} + \frac{2t}{e^{2t}}$$

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

$$\left. \begin{array}{l} \lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{2t}{e^{2t}} = 0 \\ \lim_{X \rightarrow -\infty} e^X = 0 \\ \lim_{t \rightarrow +\infty} -2t = -\infty \end{array} \right\} \lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-2t} = 0 \quad \lim_{t \rightarrow +\infty} f(t)$$

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

2. a) La fonction f est dérivable sur $[0; +\infty[$ comme produit et composée de fonctions dérivables sur $[0; +\infty[$.

f est un produit, on utilise la forme $(uv)' = u'v + v'u$

$$u(t) = 1 + 2t \quad u'(t) = 2$$

$$v(t) = e^{-2t} \quad v'(t) = -2e^{-2t}$$

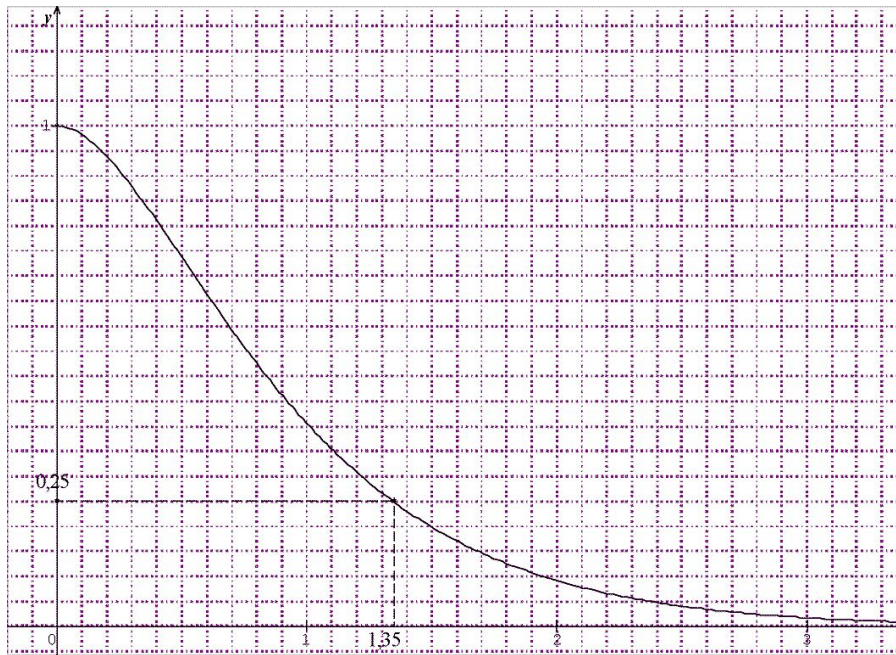
$$f'(t) = 2e^{-2t} + (1 + 2t)(-2)e^{-2t} = 2e^{-2t} - 2e^{-2t} - 4te^{-2t} = -4te^{-2t}$$

b)

t	0	$+\infty$
e^{-2t}		+
$-4t$		-
$f'(t)$		-
$f(t)$	1	0

Pour tout $t \in [0; +\infty[$, $e^{-2t} > 0$ et $-4t \leq 0$

3. b)



C. Application de la partie B

1. a) $g(1) = 1 - (1+2)e^{-2} = 1 - 3e^{-2} \approx 0,59$

Au bout d'une heure, le taux de défaillance du réfractomètre est de 0,59 à 10^{-2} près

b) $g(2) = 1 - (1+4)e^{-4} = 1 - 5e^{-4} \approx 0,91$

Au bout de 2 heures, le taux de défaillance du réfractomètre est de 0,91 à 10^{-2} près

2) a) $g(t) \geq 0,75 \Leftrightarrow 1 - f(t) \geq 0,75 \Leftrightarrow -f(t) \geq -0,25 \Leftrightarrow f(t) \leq 0,25$

b) voir graphique, le taux de défaillance est supérieur à 0,75 si $t \geq 1,3$ h.

Exercice 2

A. Loi normale

X suit une loi normale de paramètres 60 ; 0,03 .

$$P(59,93 \leq X \leq 60,07) = P(-0,07 \leq X - 60 \leq 0,07) = P\left(\frac{-0,07}{0,03} \leq \frac{X - 60}{0,03} \leq \frac{0,07}{0,03}\right) = P\left(\frac{-7}{3} \leq \frac{X - 60}{0,03} \leq \frac{7}{3}\right)$$

Et $Y = \frac{X - 60}{0,03}$ suit une loi $N(0;1)$

donc $P\left(\frac{-0,07}{0,03} \leq Y \leq \frac{0,07}{0,03}\right) = 2\pi\left(\frac{7}{3}\right) - 1 \approx 2 \times 0,9901 - 1 \approx 0,98$ à 10^{-2} près

B. Événements indépendants

1. Les événements E_1 et E_2 sont indépendants ,
donc $P(E_1 \cap E_2) = P(E_1) \times P(E_2) = 0,02 \times 0,01 = 0,0002$

2. a) $P(E_1 \cup E_2) = P(E_1) + P(E_2) - P(E_1 \cap E_2) = 0,02 + 0,01 - 0,0002 = 0,0298$

b) Ne présenter aucun des 2 défauts est l'événement contraire du précédent , donc :

$$P(\overline{E_1 \cup E_2}) = 1 - P(E_1 \cup E_2) = 1 - 0,0298 = 0,9702$$

C. Loi binomiale

1. Y suit une loi binomiale de paramètres 50 et 0,02 $Y \square B(50; 0,02)$

2. $P(Y) = \binom{50}{1} (0,02)^1 (0,98)^{49} = 50 \times 0,02 \times (0,98)^{49} \approx 0,37$ à 10^{-2} près .

3. a) On peut approcher la loi binomiale par une loi de poisson de paramètre $\lambda = 50 \times 0,02 = 1$

b) $P(Y_1 \leq 3) = P(Y_1 = 0) + P(Y_1 = 1) + P(Y_1 = 2) + P(Y_1 = 3) = 0,368 + 0,368 + 0,184 + 0,061 = 0,981$

D. Intervalle de confiance

\bar{C} suit une loi normale de paramètres μ et d'écart type $\frac{\sigma}{\sqrt{50}}$.

On souhaite déterminer h pour que : $P(119,88 - h \leq \bar{C} \leq 119,88 + h) = 0,95$

$$P(119,88 - h \leq \bar{C} \leq 119,88 + h) = 0,95 \Leftrightarrow P(-h \leq \bar{C} - 119,88 \leq h) = 0,95 \Leftrightarrow P\left(\frac{-h}{\frac{\sigma}{\sqrt{50}}} \leq \frac{\bar{C} - 119,88}{\frac{\sigma}{\sqrt{50}}} \leq \frac{h}{\frac{\sigma}{\sqrt{50}}}\right) = 0,95$$

$$\Leftrightarrow P\left(\frac{-h \times \sqrt{50}}{\sigma} \leq \frac{\bar{C} - 119,88}{\frac{\sigma}{\sqrt{50}}} \leq \frac{h \times \sqrt{50}}{\sigma}\right) = 0,95$$

La variable aléatoire $\frac{\bar{C} - 119,88}{\frac{\sigma}{\sqrt{50}}}$ suit une loi $N(0;1)$. On a alors :

$$P\left(\frac{-h \times \sqrt{50}}{\sigma} \leq \frac{\bar{C} - 119,88}{\frac{\sigma}{\sqrt{50}}} \leq \frac{h \times \sqrt{50}}{\sigma}\right) = 0,95 \Leftrightarrow 2\pi\left(\frac{h \times \sqrt{50}}{\sigma}\right) - 1 = 0,95 \Leftrightarrow \pi\left(\frac{h \times \sqrt{50}}{\sigma}\right) = \frac{1 + 0,95}{2} = 0,975$$

Par lecture de la table : $\frac{h \times \sqrt{50}}{\sigma} = 1,96$ d'où $h = \frac{1,96 \times \sigma}{\sqrt{50}} = \frac{1,96 \times 0,06}{\sqrt{50}} \approx 0,01663 \approx 0,02$ à 10^{-2} près.

L'intervalle de confiance à 95% centré sur la moyenne est donc : $[119,88 - 0,02; 119,88 + 0,02]$ soit $[119,86; 119,90]$

ÉPREUVE DE SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

DURÉE DE L'ÉPREUVE : 2h - COEFFICIENT: 1

L'usage des calculatrices est autorisé
Le sujet nécessite l'utilisation d'une feuille de papier millimétré

L'utilisation des calculatrices pendant l'épreuve est définie par la circulaire N° 86-228 du 28 juillet 1986 (BO N°34 du 2 octobre 1986).

L'emploi de toutes les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique est autorisée à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (circulaire n°99-018 du 1-02-1999).

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.

Ce sujet comporte 6 pages numérotées de 1 à 6, y compris celle-ci.

Les données sont en italique.

Les données numériques sont indiquées dans chaque exercice.

L'ANNEXE (PAGE 6) EST À RENDRE AVEC LA COPIE

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

I. POLARIMÉTRIE (18 points)

1. *Le saccharose, le glucose et le fructose sont des substances optiquement actives dont les solutions aqueuses suivent la loi de Biot $\alpha = [\alpha]_D^{20^\circ C} \cdot l \cdot C_m$*

1.1. Expliciter les différents termes intervenant dans la loi de Biot.

1.2. Préciser les unités de chacun de ces termes.

2. *On utilise un polarimètre de Laurent pour déterminer le pouvoir rotatoire spécifique du fructose. Des solutions de différentes concentrations sont introduites dans un tube polarimétrique de longueur l égale à 20,0 cm. On mesure leur pouvoir rotatoire α à 20 °C pour la raie D du sodium et on obtient le tableau de résultats suivant :*

<i>Concentration C_m (en g.L⁻¹)</i>	<i>0</i>	<i>20,0</i>	<i>40,0</i>	<i>60,0</i>	<i>80,0</i>	<i>100</i>
<i>α (en°)</i>	<i>0</i>	<i>- 3,70</i>	<i>- 7,40</i>	<i>- 11,1</i>	<i>- 14,7</i>	<i>- 18,5</i>

2.1. *La source lumineuse utilisée est une lampe à vapeur de sodium. Justifier ce choix.*

2.2. *À l'aide d'une construction graphique sur papier millimétré à rendre avec la copie, montrer que ces solutions vérifient la loi de Biot.*

2.3. *Déduire de la courbe le pouvoir rotatoire spécifique du fructose $[\alpha_F]_D^{20^\circ C}$.*

2.4. *Le fructose est-il dextrogyre ou lévogyre ? Justifier la réponse.*

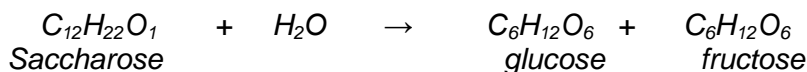
3. On considère un volume $V = 1,00 \text{ L}$ d'une solution aqueuse S_0 contenant un mélange de glucose et de saccharose de concentrations massiques respectives $C_{0G} = 40,1 \text{ g.L}^{-1}$ et $C_{0S} = 80,3 \text{ g.L}^{-1}$

Données :

- Longueur du tube polarimétrique : $\ell = 20,0 \text{ cm}$
- Pouvoir rotatoire spécifique du glucose : $[\alpha_G]_D^{20^\circ\text{C}} = 0,527 \text{ }^\circ.\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$
- Pouvoir rotatoire spécifique du saccharose : $[\alpha_S]_D^{20^\circ\text{C}} = 0,665 \text{ }^\circ.\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$
- Pouvoir rotatoire spécifique du fructose : $[\alpha_F]_D^{20^\circ\text{C}} = -0,920 \text{ }^\circ.\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$
- Masse molaire du saccharose : $M_S = 342 \text{ g.mol}^{-1}$
- Masse molaire du glucose : $M_G = 180 \text{ g.mol}^{-1}$
- Masse molaire du fructose : $M_F = 180 \text{ g.mol}^{-1}$

3.1. On mesure dans un premier temps le pouvoir rotatoire α_0 de la solution S_0 à 20°C . Donner l'expression littérale de α_0 en fonction de C_{0G} et C_{0S} en utilisant la loi de Biot. Calculer α_0 .

3.2. Dans un deuxième temps on réalise l'hydrolyse totale du saccharose dans le mélange selon l'équation de la réaction chimique suivante pour obtenir une solution finale S_f .



3.2.1. Montrer que les quantités de matière initiales en saccharose n_{0S} et en glucose n_{0G} valent respectivement dans la solution S_0 , $0,235 \text{ mol}$ et $0,223 \text{ mol}$.

3.2.2. Compléter le tableau d'avancement en **feuille annexe page 6 à rendre avec la copie** de cette transformation totale. Déterminer la valeur de l'avancement maximal, puis les quantités de matière n_{fS} , n_{fG} , n_{fF} dans l'état final de saccharose, de glucose et de fructose.

3.2.3. En considérant que l'hydrolyse se fait sans variation de volume, déterminer les concentrations massiques C_{fG} en glucose et C_{fF} en fructose dans la solution S_f .

3.3. Calculer le pouvoir rotatoire α_f de la solution S_f .

II. PRODUIT DE SOLUBILITÉ (15 points)

L'hydroxyde de cuivre (II) $\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{s})$ est utilisé entre autres pour protéger la vigne contre le mildiou. C'est un sel très peu soluble dans l'eau.

On se propose de déterminer le produit de solubilité de l'hydroxyde de cuivre (II) de différentes façons.

Données : à 25°C

- Produit ionique de l'eau : $K_e = 1,0 \times 10^{-14}$.
- Potentiel redox standard : $E^0(\text{Cu}^{2+}(\text{aq})/\text{Cu}(\text{s})) = 0,337 \text{ V}$.
- $(\frac{RT}{F}) \cdot \ln(x) = 0,06 \cdot \log(x)$
- Conductivités équivalentes limites (par mole de charge) : $\Lambda^0(\text{Cu}^{2+}(\text{aq})) = 5,35 \times 10^{-3} \text{ unités S.I.}$
 $\Lambda^0(\text{HO}^-(\text{aq})) = 19,9 \times 10^{-3} \text{ unités S.I.}$

Les parties 2, 3 et 4 sont indépendantes.

Dans les quatre parties la dissociation de l'eau sera considérée comme négligeable.

1. La solubilité de l'hydroxyde de cuivre (II) dans l'eau pure à 25°C a pour valeur $s = 4,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

1.1. Écrire l'équation de dissolution de l'hydroxyde de cuivre (II) dans l'eau pure.

1.2. Exprimer le produit de solubilité K_S en fonction des concentrations molaires des espèces présentes en solution.

1.3. Établir l'expression littérale de K_S en fonction de la solubilité s . Calculer sa valeur.

2. Le pH d'une solution aqueuse saturée d'hydroxyde de cuivre (II) est égal à 7,9 à 25 °C.

2.1. Déterminer la concentration molaire des espèces présentes en solution.

2.2. En déduire la valeur du produit de solubilité de l'hydroxyde de cuivre (II).

3. La conductivité d'une solution ionique est donnée par la relation : $\sigma = \sum_i \Lambda_i |z_i| C_i$

3.1. Préciser la signification de chaque terme et les unités S.I. correspondantes.

3.2. La conductivité d'une solution aqueuse saturée d'hydroxyde de cuivre (II), mesurée à 25 °C, a pour valeur $2,0 \times 10^{-5} \text{ S.m}^{-1}$.

Calculer les concentrations molaires en ions cuivre (II) et en ions hydroxyde. On assimilera Λ_i à Λ_i^0 .

3.3. En déduire la valeur du produit de solubilité de l'hydroxyde de cuivre (II).

4. Le potentiel redox d'une électrode constituée d'une lame de cuivre plongeant dans une solution aqueuse saturée d'hydroxyde de cuivre(II) est égal à 0,145 V à 25 °C.

4.1. Exprimer ce potentiel redox en fonction de la concentration molaire en ions cuivre (II) $[\text{Cu}^{2+}(\text{aq})]$.

4.2. En déduire la valeur de $[\text{Cu}^{2+}(\text{aq})]$.

4.3. Calculer la valeur numérique du produit de solubilité K_S de l'hydroxyde de cuivre (II).

5. Conclure que les différentes valeurs de K_S sont compatibles entre elles.

Expliquer qualitativement pourquoi l'hydroxyde de cuivre (II) est très peu soluble dans l'eau.

III. CHIMIE ORGANIQUE (17 points)

Données :

Élément	H	C	N	O
Masse molaire (en g.mol^{-1})	1,0	12,0	14,0	16,0
Numéro atomique	1	6	7	8

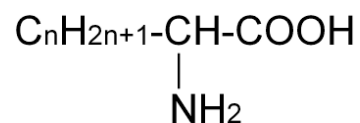
On cherche à déterminer la structure d'un composé organique **X** comportant deux groupes caractéristiques dont l'un est le groupe ester.

L'hydrolyse de **X** conduit à un monoalcool **B** et à un acide α -aminé **A**.

Les deux premières parties sont indépendantes.

1. Détermination de la structure de **A**

A a pour formule semi-développée :



La masse molaire de A vaut $M_A = 117 \text{ g.mol}^{-1}$.

1.1. Déterminer la valeur de n.

1.2. Représenter les formules semi-développées possibles pour **A**.

1.3. **A** est l'acide 2-aminopentanoïque. Représenter la formule semi-développée de A.

1.4. **A** existe sous forme de deux énantiomères.

1.4.1. Définir un couple d'énantiomères.

1.4.2. Représenter ces énantiomères en projection de Fischer et préciser leur configuration relative D ou L.

1.4.3. Représenter ces énantiomères en représentation de Cram et préciser leur configuration absolue (R ou S). Justifier la méthode.

2. Détermination de la structure de **B**.

Pour établir la structure de **B** de formule brute C_4H_9OH on réalise les tests suivants :

a) La déshydratation intramoléculaire de **B** en milieu acide donne un seul composé possible **C**.

b) L'ozonolyse réductrice de **C** donne deux composés **D** et **E**.

c) Les deux composés **D** et **E** forment un précipité avec la 2,4-DNPH.

d) **D** réduit la liqueur de Fehling.

e) **E** ne réduit pas la liqueur de Fehling.

2.1. Sachant que **B** est un alcool primaire représenter les deux formules semi-développées possibles pour **B**.

2.2. Indiquer le type de réactions (addition, substitution, élimination, oxydation,...) correspondant au test a) ?

2.3. Indiquer les renseignements apportés par les tests c), d) et e) ?

2.4. En déduire les formules semi-développées des composés **C**, **D** et **E**.

2.5. Écrire la formule semi-développée de **B** et donner son nom.

3. Détermination de la structure de **X**.

3.1. Écrire l'équation de la réaction d'hydrolyse de **X** en utilisant les formules semi-développées pour les produits de la réaction, et en gardant la notation **X** pour la formule de **X**.

3.2. En déduire la formule semi-développée de **X**.

3.3. Préciser deux caractéristiques de cette réaction.

ANNEXE (À RENDRE AVEC LA COPIE)

I. POLARIMÉTRIE

Question 3.2.2.

Équation de la réaction		$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$			
	Avancement	Quantités de matière (en mol)			
État initial	0				
État final	x_{max}				

Proposition de corrigé de l'épreuve de SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

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

I. POLARIMÉTRIE (18 points)

1.1. α , pouvoir rotatoire

$[\alpha]_D^{20^\circ C}$ pouvoir rotatoire spécifique

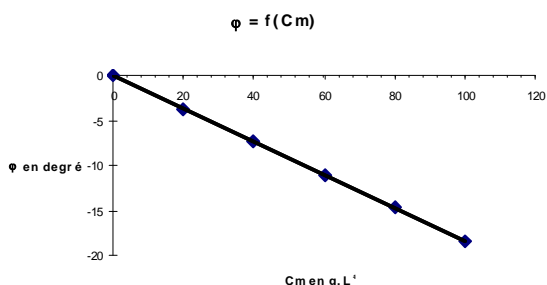
l , longueur du tube polarimétrique

C_m , concentration massique

1.2. α en degré, $[\alpha]_D^{20^\circ C}$ en $^\circ \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$, l en m, C_m en $kg \cdot m^{-3}$

2.1. Travail en lumière monochromatique car $[\alpha]_D^{20^\circ C}$ dépend de λ .

2.2. Tracé de α en fonction de la concentration :



La droite passe par l'origine ou proportionnalité entre α et concentration

2.3. Détermination du coefficient directeur

$$K = -0,184 \text{ } ^\circ \cdot L \cdot g^{-1} = -0,184 \text{ } ^\circ \cdot m^3 \cdot kg^{-1}$$

$$[\alpha_F]_D^{20^\circ C} = K/l = -0,184/0,200 = -0,920 \text{ } ^\circ \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$$

2.4. Fructose lévogyre car $[\alpha_F]_D^{20^\circ C} < 0$

3.1. $\alpha_0 = [\alpha_G]_D^{20^\circ C} \cdot l \cdot C_{0G} + [\alpha_S]_D^{20^\circ C} \cdot l \cdot C_{0S}$. $\alpha_0 = 14,9^\circ$

3.2.

3.2.1. $n_{0S} = C_{0S} \cdot V/M_S = \frac{80,3 \times 1,00}{342} = 0,235$ mol et $n_{0G} = C_{0G} \cdot V/M_G = \frac{40,1 \times 1,00}{180} = 0,223$ mol

3.2.2. Tableau (voir à la fin du corrigé)

$$x_{\max} = 0,235 \text{ mol} \quad n_{fS} = 0 \quad n_{fG} = 0,458 \text{ mol} \quad n_{fF} = 0,235 \text{ mol}$$

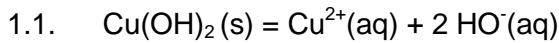
3.2.3. $C_{fG} = 0,458 \times 180 = 82,4 \text{ g} \cdot L^{-1} = 82,4 \text{ kg} \cdot m^{-3}$ et $C_{fF} = 0,235 \times 180 = 42,3 \text{ g} \cdot L^{-1} = 42,3 \text{ kg} \cdot m^{-3}$

3.3. $\alpha_f = [\alpha_G]_D^{20^\circ C} \cdot l \cdot C_{fG} + [\alpha_F]_D^{20^\circ C} \cdot l \cdot C_{fF}$ et $\alpha_f = 0,527 \times 0,200 \times 82,4 - 0,920 \times 0,200 \times 42,3 = 0,902^\circ$

Question 3.2.2.

Équation de la réaction		$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$			
	Avancement	Quantités de matière (en mol)			
État initial	0	0,235	Solvant en excès	0,223	0
État final	x_{\max}	$0,235 - x_{\max} = 0$	Solvant en excès	$0,223 + x_{\max}$	x_{\max}

II. PRODUIT DE SOLUBILITE (15 points)



1.2. $K_S = [\text{Cu}^{2+}(\text{aq})]_{\text{éq.}} \cdot ([\text{HO}^{-}(\text{aq})]_{\text{éq.}})^2$

1.3. $K_S = 4 s^3 = 4 \times (4,0 \times 10^{-7})^3 = 2,6 \times 10^{-19}$

2.1. $[\text{H}_3\text{O}^{+}(\text{aq})] = 10^{-\text{pH}} = 1,3 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$

$[\text{HO}^{-}(\text{aq})] = K_e / [\text{H}_3\text{O}^{+}(\text{aq})] = 7,7 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$

$[\text{Cu}^{2+}(\text{aq})] = 1/2 \cdot [\text{HO}^{-}(\text{aq})] = 3,8 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ en négligeant $[\text{H}_3\text{O}^{+}(\text{aq})]$

2.2. $K_S = 3,8 \times 10^{-7} \times (7,7 \times 10^{-7})^2 = 2,3 \times 10^{-19}$

3.1. σ : conductivité de la solution en S.m^{-1}

Λ_i : conductivité molaire ionique par mole de charge de l'ion i en $\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$

z_i : électrovalence ou nombre de charge de l'ion i (sans unité)

C_i : concentration molaire de l'ion i en mol.m^{-3}

3.2. $\sigma = 2 \cdot \Lambda^0(\text{Cu}^{2+}(\text{aq})) \cdot [\text{Cu}^{2+}(\text{aq})] + \Lambda^0(\text{HO}^{-}(\text{aq})) \cdot [\text{HO}^{-}(\text{aq})]$

$\sigma = (\Lambda^0(\text{Cu}^{2+}(\text{aq})) + \Lambda^0(\text{HO}^{-}(\text{aq}))) \cdot [\text{HO}^{-}(\text{aq})]$

$[\text{HO}^{-}(\text{aq})] = 7,9 \times 10^{-4} \text{ mol.m}^{-3} = 7,9 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$

$[\text{Cu}^{2+}(\text{aq})] = 1/2 \cdot [\text{HO}^{-}(\text{aq})] = 4,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$

3.3. $K_S = [\text{Cu}^{2+}(\text{aq})]_{\text{éq.}} \cdot ([\text{HO}^{-}(\text{aq})]_{\text{éq.}})^2 = 4([\text{Cu}^{2+}(\text{aq})]_{\text{éq.}})^3 = 2,5 \times 10^{-19}$

4.1. $E_{\text{Cu}} = E^0(\text{Cu}^{2+}(\text{aq})/\text{Cu}(\text{s})) + 0,03 \cdot \log [\text{Cu}^{2+}(\text{aq})]$

4.2. $[\text{Cu}^{2+}(\text{aq})] = 10^{(E_{\text{Cu}} - E^0)/0,03} = 10^{(0,145 - 0,337)/0,03} = 4,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$

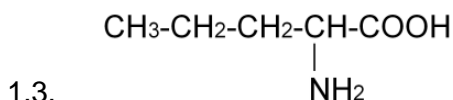
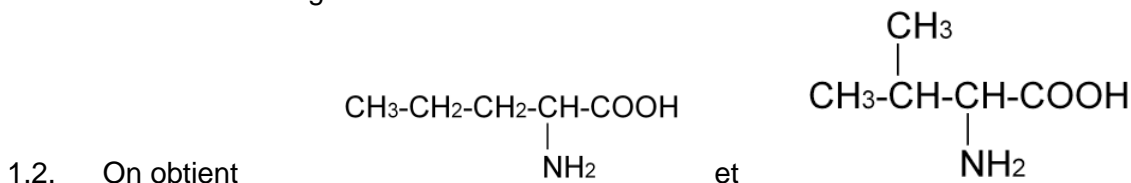
4.3. $[\text{HO}^{-}(\text{aq})] = 2 \cdot [\text{Cu}^{2+}(\text{aq})] = 8,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$

$K_S = [\text{Cu}^{2+}(\text{aq})]_{\text{éq.}} \cdot ([\text{HO}^{-}(\text{aq})]_{\text{éq.}})^2 = 4([\text{Cu}^{2+}(\text{aq})]_{\text{éq.}})^3 = 2,5 \times 10^{-19}$

5. Les valeurs de K_S sont compatibles. $K_S \ll 10^{-3}$. La réaction est défavorisée dans le sens de la dissociation de l'hydroxyde de cuivre (II)

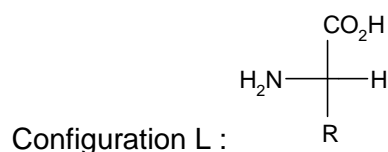
III. CHIMIE ORGANIQUE (17 points)

1.1. $14n + 75 = 117 \text{ g.mol}^{-1}$ d'où $n = 3$



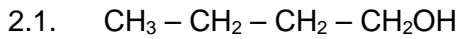
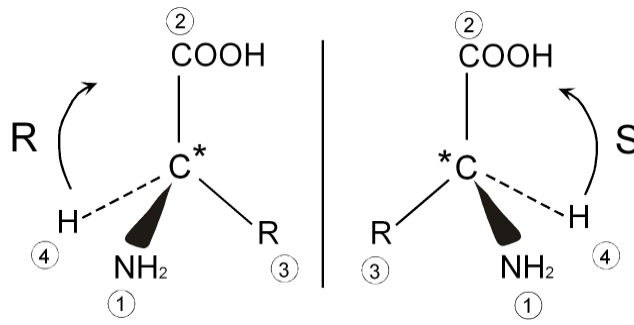
1.4.

1.4.1. Espèces chimiques images l'une de l'autre à travers un miroir plan et non superposables.



1.4.3. Classement des substituants : $\text{NH}_2 > \text{CO}_2\text{H} > \text{R} > \text{H}$

Règle de Cahn-Ingold-Prelog pour la configuration R ou S

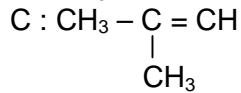


2.2. Déshydratation : élimination.

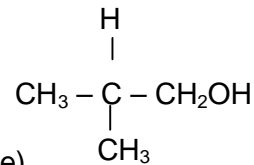
2.3. c) D et E sont des dérivés carbonylés d) D est un aldéhyde

e) E est une cétone.

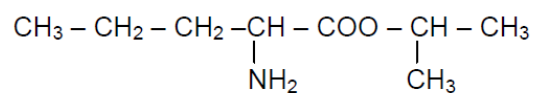
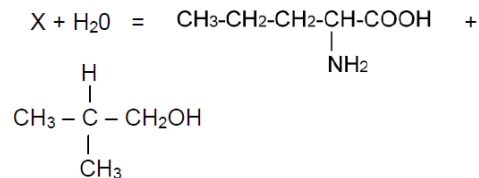
2.4. E : $\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{CH}_3$ car au moins 3 C. D : $\text{H} - \text{CHO}$ car au moins 1 C.



2.5. B :
méthylpropan-1-ol
(alcool primaire pouvant subir une oxydation ménagée)



3.1. $\text{X} + \text{H}_2\text{O} = \text{A} + \text{B}$



3.2. X :

3.3. Réaction lente et limitée, athermique.

BIOLOGIE DES PROCARYOTES ET DES EUCARYOTES

SOUS-ÉPREUVE DE BIOLOGIE CELLULAIRE

Durée de l'épreuve : 2 heures Coefficient : 1

*L'utilisation d'un dictionnaire Anglais/Français est autorisée.
L'utilisation d'une calculatrice est interdite.*

Remarque importante : il sera tenu compte de « la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition » par la prise en compte d'une valeur d'un point sur vingt dans le barème.

Cellules sécrétrices d'insuline et perspective de thérapie cellulaire du diabète

L'insuline est une hormone protéique sécrétée par les cellules β , situées dans les îlots de Langerhans représentant le tissu endocrine du pancréas. La production de cette hormone est déficiente chez les diabétiques de type I. La thérapie cellulaire constitue une perspective pour soigner ces malades. Par conséquent, des équipes de recherche étudient le développement de lignées cellulaires qui conserveraient les caractéristiques des cellules β du pancréas et notamment un contrôle de la sécrétion d'insuline par la glycémie (l'hormone est sécrétée en cas d'hyperglycémie).

1. La sécrétion d'insuline (3 points)

Le contrôle de la sécrétion de l'insuline par la concentration en glucose sanguin implique une entrée du glucose dans les cellules β . Le processus mis en jeu est la diffusion facilitée.

1.1. Présenter les caractéristiques de la diffusion facilitée.

1.2. Expliquer les modalités de synthèse et de sécrétion d'une protéine destinée à l'exportation cellulaire en précisant les différentes étapes et les organites cellulaires impliqués.

2. Lignées cellulaires productrices d'insuline (13 points)

Parmi les cellules candidates pour la thérapie cellulaire, on trouve des cellules souches embryonnaires et des cellules souches adultes présentes dans le pancréas. Des conditions de culture contrôlées permettent de faire proliférer ces cellules *in vitro* et d'obtenir leur différenciation en cellules β productrices d'insuline. Les cellules seront ensuite transplantées chez les patients afin de pallier leur déficience en insuline.

2.1. Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes et de grande capacité proliférative, ce qui est un inconvénient car, quand elles sont implantées chez un animal, elles génèrent très souvent des tumeurs. On a donc cherché à les modifier génétiquement pour empêcher leur prolifération.

La modification génétique choisie consiste à incorporer dans les cellules une construction d'ADN chimérique codant d'une part un facteur inactivant un mitogène cellulaire et d'autre part la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein). Les cellules sont ensuite triées après analyse en cytomètre de flux (FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting).

2.1.1 Définir le terme « cellule pluripotente ».

2.1.2 Décrire succinctement deux méthodes permettant l'introduction d'un gène étranger dans une cellule eucaryote animale.

2.1.3 Expliquer le principe du tri cellulaire par FACS.

Données : longueur d'onde d'excitation du GFP = 345 nm
longueur d'onde d'émission du GFP = 455 nm

2.1.4 Le **document 1** montre les histogrammes obtenus avec des cellules non transfectées et des cellules transfectées.

2.1.4.1. Justifier l'intérêt de réaliser un témoin avec des cellules non traitées.

2.1.4.2. Repérer sur l'histogramme 2, le pic correspondant aux cellules transfectées. Justifier.

2.2. Les cellules souches adultes du pancréas auraient pour fonction le renouvellement des cellules de cet organe. Après prélèvement, on peut les faire évoluer *in vitro* en cellules sécrétrices d'insuline.

Afin de récupérer les cellules souches, des fragments de pancréas sont prélevés, les cellules sont dissociées puis mises en culture dans un milieu permettant leur prolifération puis leur différenciation. Ce milieu peut être un milieu de base usuel comme le milieu RPMI auquel on ajoute notamment des molécules comme le FGF, l'EGF.

2.2.1 Décrire succinctement une méthode permettant la dissociation des cellules.

2.2.2 À l'aide d'un tableau :

- citer les différentes catégories de molécules contenues dans un milieu de base,
- indiquer leurs rôles,
- donner un exemple de molécule pour chaque catégorie.

2.2.3 Après avoir rappelé la signification des lettres « GF » qui apparaissent dans les abréviations FGF et EGF, préciser le rôle de ces molécules.

Les cellules souches sont repérées par des marqueurs caractéristiques : elles sont notamment « nestine positive ». Celles qui évoluent en cellules β possèdent en plus le récepteur à une hormone peptidique, la GLP-1 (Glucagon like peptide), il sera noté GLP-1R.

2.2.4 La nestine est un des filaments intermédiaires du cytosquelette.
Citer et décrire les autres catégories de composants du cytosquelette.

2.2.5 Le récepteur du GLP-1 est un récepteur membranaire couplé à une protéine G activant l'adénylate cyclase.

2.2.5.1. Justifier l'importance d'un récepteur membranaire pour l'action du GLP-1.

2.2.5.2. Citer les différentes étapes de la transduction du signal, en précisant l'action de l'adénylate cyclase.

2.2.5.3. Citer un autre système de transduction du signal ne faisant pas intervenir l'adénylate cyclase

2.2.6 La mise en évidence des marqueurs tels que le GLP-1R à la surface de ces cellules repose sur des expériences d'immunocytochimie. Le **document 2** présente le protocole d'un double marquage, d'une part avec des anticorps anti-GLP-1R, d'autre part avec du DAPI. (4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole).

2.2.6.1 Rappeler la structure cellulaire marquée par le DAPI.

2.2.6.2 À partir du **document 2**, présenter les différentes étapes du protocole de détection des GLP-1R par immunocytochimie.
Préciser le rôle de chacune de ces étapes.

3. Survie des cellules productrices d'insuline après transplantation (3 points)

3.1. La persistance des cellules productrices d'insuline chez le malade repose sur l'absence de rejet de ces cellules par le système immunitaire de l'hôte. Le rejet met en jeu notamment les lymphocytes T cytotoxiques.

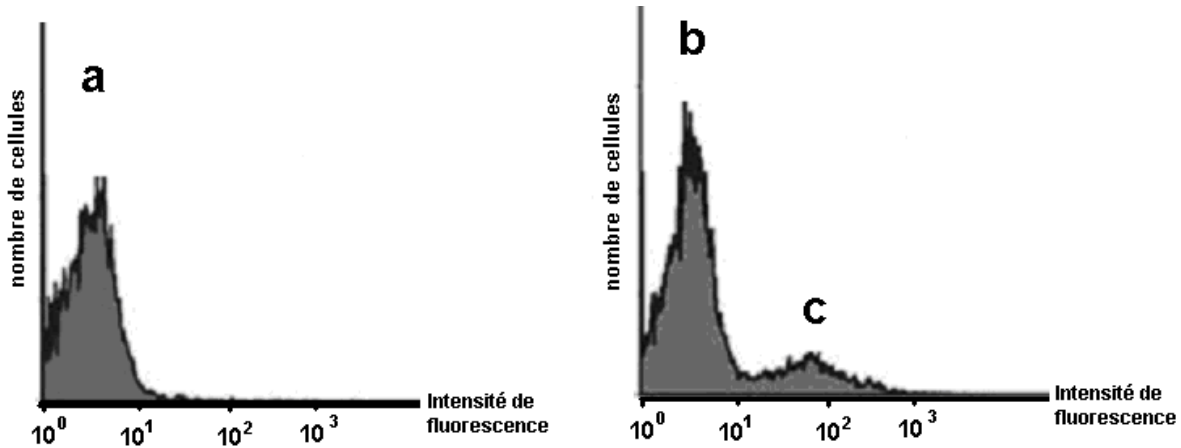
Indiquer la signification des légendes a, b, c, d sur le **document 3**.

3.2. Afin de pallier ce problème de rejet, il est envisagé d'inclure, avant injection au malade, les cellules β , (sous forme de pseudo-ilôts correspondant à des cellules agrégées) dans des microcapsules.

3.2.1 Expliquer pourquoi l'encapsulation évitera le rejet par le système immunitaire.

3.2.2 Caractériser les propriétés concernant la perméabilité que devront posséder ces microcapsules.

DOCUMENT 1 : The figure shows FACS-analysis of ES cells which were genetically modified to express GFP.



Histogram 1
non-treated control cells

Histogram 2
traited cells

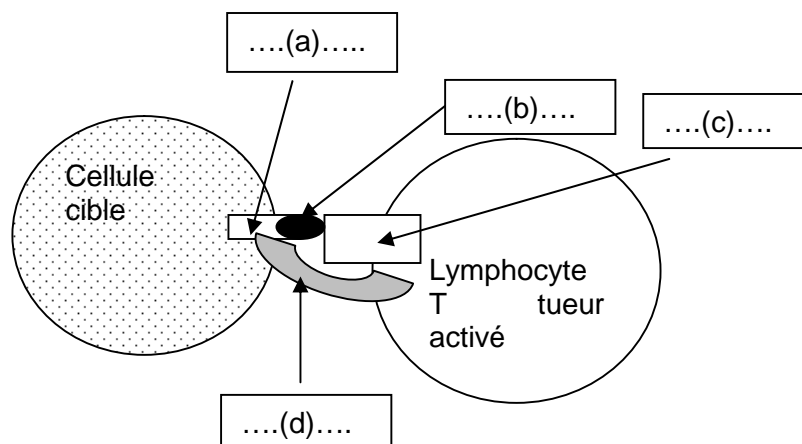
DOCUMENT 2

Immunocytochemical identification of GLP-1R-positive human pancreatic stem cells.

Islets were washed and cultured in RPMI 1640 medium containing serum, 11.1 mM glucose, antibiotics, sodium pyruvate and growth factors. Within several days, nestin-positive cells (immunocytochemically identified) grew out from the islets. Later, these cells were cloned and expanded in medium containing β -FGF and EGF. Incubation with GLP-1 was performed in the absence of serum and fresh peptide was added every 48 hr without changing the medium.

Immunocytochemical detection of GLP-1R was performed using polyclonal antiserum. Cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature. After several rinses in PBS, normal donkey serum was added for 30 minutes and incubated with primary antiserum at 4°C. The following day, cells were rinsed with PBS and incubated with secondary antiserum labeled with fluorochromes Cy-3 or Cy-2 for 1 hour at room temperature. After several wash steps, coverslips were mounted onto slides in mounting medium containing DAPI. Fluorescence images were obtained using an epifluorescence microscope equipped with camera.

DOCUMENT 3



Proposition de corrigé de la sous-épreuve de Biologie Cellulaire

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

- 1.1. Transport dans le sens du gradient électrochimique, assuré par un transporteur spécifique et saturable.
- 1.2.

Compartiment cellulaire	Événements
Cytoplasme	Début de la synthèse de la chaîne peptidique par les ribosomes, avec présence du peptide signal.
Réticulum endoplasmique rugueux	Élimination du peptide signal, fin de la synthèse protéique, maturation et glycosylation, formation des ponts disulfure.
Appareil de Golgi	Tri selon l'étiquetage glucidique, fin de maturation.
Vésicules	Sécrétion dans le milieu extracellulaire par exocytose

2.1.

2.1.1. Cellule capable de se différencier en différents types cellulaires.

2.1.2. Deux méthodes parmi les suivantes :

- Lipofection : ADN associé à un liposome cationique fusionnant avec la membrane ou entrant par endocytose
- Précipitation ADN/phosphate de calcium : modification de la perméabilité de la membrane puis endocytose
- Électroporation : choc électrique bref créant des pores temporaires dans la membrane
- Utilisation d'un vecteur viral : l'ADN est introduit dans un virion inactivé, l'infection virale des cellules-cibles assurant une pénétration efficace

2.1.3. Les cellules, véhiculées par une veine liquide, passent une à une devant un faisceau laser d'excitation (pour la GFP : $\lambda = 345 \text{ nm}$). La lumière émise par fluorescence (pour la GFP : $\lambda = 455 \text{ nm}$) est détectée, ce qui permet la décision de charge selon l'intensité du signal de fluorescence, le tri est effectué selon un critère et la collecte des cellules a lieu ensuite.

2.1.4.

2.1.4.1. Le témoin permet de détecter l'auto-fluorescence des cellules non traitées (ce signal est appelé le bruit de fond).

2.1.4.2. Le pic c correspond aux cellules transfectées puisqu'elles présentent une intensité de fluorescence très supérieure au bruit de fond des cellules non traitées.

2.2.1. Méthode enzymatique : action d'une protéase (collagénase, trypsine ...)
Méthode mécanique : dissociation par un homogénéiseur (« Potter » ...)

2.2.2.

Catégorie	Exemple	Rôles
Sels minéraux	NaCl Mg ²⁺	Maintien de la pression osmotique Cofacteurs enzymatiques
Acides aminés	Glutamine...	Édification des protéines

<i>Vitamines</i>	<i>Vitamines du groupe B essentiellement (biotine)</i>	<i>Cofacteurs ou précurseur de cofacteurs enzymatiques</i>
<i>Ose ou diholoside</i>	<i>glucose</i>	<i>Source de C et nutriment énergétique</i>
<i>Indicateur coloré</i>	<i>Rouge de phénol</i>	<i>Vérification visuelle du pH</i>
<i>Bases azotées</i>	<i>thymine</i>	<i>Synthèse des acides nucléiques</i>

2.2.3. GF = Growth factor = facteur de croissance, agent mitogène stimulant la prolifération cellulaire et/ou la différenciation cellulaire

2.2.4. Microtubules : cylindres creux constitués de polymères d'une protéine globulaire la tubuline
 Microfilaments : polymères d'actine, protéine globulaire formant des fibres (associées en hélice par 2)

2.2.5.

2.2.5.1. Le récepteur est membranaire car le GLP-1 est un peptide qui ne peut franchir la membrane plasmique

2.2.5.2. Liaison GLP-1 à son récepteur GLP1R
 Activation de la sous-unité α de la protéine G
 Échange GDP / GTP
 Liaison et activation de l'adénylate cyclase
 Transformation de l'ATP en AMPc
 Activité GTPasique

2.2.5.3. Plusieurs réponses étaient possibles :
 Récepteur portant une activité enzymatique (ex activité Tyr-kinase dévoilée quand l'insuline se fixe à son récepteur)
 RCPG couplé à PLC
 Canal ionique
 Récepteur couplé à une Tyr-kinase cytoplasmique

2.2.6.

2.2.6.1. Le DAPI est un marqueur de l'ADN, la structure marquée est donc le noyau

2.2.6.2. Les 7 étapes sont :

Étape 1	fixation avec le formaldéhyde	immobilisation des structures
Étape 2	blocage, avec du sérum d'âne, des sites de fixation non spécifiques pour les anticorps utilisés	diminution bruit de fond
Étape 3	fixation des anticorps primaires	fixation de l'anticorps anti GLP-1-R
Étape 4	lavages	élimination des anticorps primaires non fixés
Étape 5	fixation des anticorps secondaires	anticorps anti-isotypiques couplés à un fluorochrome (Cy2 ou Cy3)
Étape 6	lavages	élimination des anticorps secondaires non fixés
Étape 7	montage pour l'observation au microscope à épifluorescence	Le liquide de montage contient du DAPI pour marquer les noyaux

3.1. a : molécule du CMH de classe I
 b : peptide antigénique (Ag endogène)
 c : TCR
 d : CD8

3.2.

3.2.1. Les interactions cellulaires déclenchant la réponse immunitaire ne sont pas possibles du fait de cette encapsulation, il n'y a pas de contact possible entre les LTc et les cellules β .

3.2.2. La microcapsule doit :

- laisser entrer : le dioxygène, les nutriments et notamment le glucose pour le contrôle de la sécrétion d'insuline
- laisser sortir : l'insuline, les déchets métaboliques (CO_2 , ions H^+ ...)

BIOLOGIE DES PROCARYOTES ET DES EUCARYOTES

SOUS-ÉPREUVE DE MICROBIOLOGIE ET GÉNIE FERMENTAIRE

Durée de l'épreuve : 2 heures Coefficient : 1

Le sujet comporte 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7.

L'utilisation d'un dictionnaire Anglais/Français et d'une calculatrice est autorisée.

Remarque importante : il sera tenu compte de « la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition » par la prise en compte d'une valeur d'un point sur vingt dans le barème.

Antibiotiques : les bactéries font de la résistance

Les antibiotiques, dont les premières molécules ont été découvertes au début du XX^e siècle, sont des composés antimicrobiens, le plus souvent d'origine naturelle, qui inhibent la croissance ou détruisent des bactéries. Leur toxicité est sélective. Ils sont produits industriellement pour faire face aux besoins importants liés à leur utilisation en santé humaine et animale.

Leur administration abusive durant des décennies a occasionné l'apparition de nombreuses souches résistantes. La recherche actuelle essaie donc de contrer ces mécanismes de résistance ou de mettre au point de nouvelles molécules qui auraient les mêmes effets antimicrobiens sans ces inconvénients.

1. Les antibiotiques (5 points)

- 1.1. Expliquer l'expression « toxicité sélective ».
- 1.2. Le principal intérêt des antibiotiques est thérapeutique, mais ces molécules sont aussi utilisées en génie génétique.
Préciser quel est alors leur intérêt.

Le genre *Streptomyces* est à l'origine de plus de 70 % des antibiotiques et *Penicillium chrysogenum* est la source de pénicilline G. Ces micro-organismes sont tous deux de classe 1.

- 1.3. Indiquer à quels groupes microbiens appartiennent ces deux micro-organismes.
- 1.4. Décrire l'aspect microscopique de *Streptomyces*.
- 1.5. Expliquer l'expression : « organisme de classe 1 ».
- 1.6. Pénicillines et céphalosporines appartiennent à la même famille d'antibiotiques.
 - 1.6.1. À partir des molécules présentées dans le **document 1**, reproduire sur la copie :
 - le noyau caractéristique des pénicillines ;
 - le noyau caractéristique des céphalosporines.
 - 1.6.2. Indiquer et nommer la structure commune à ces deux sous-familles d'antibiotiques.
- 1.7. Le **document 2** montre la cible de la pénicilline G. Le noyau de l'antibiotique est un analogue structural du dipeptide DAla-DAla. La flèche indique une réaction de transpeptidation.
 - 1.7.1. Nommer et situer dans la bactérie, la molécule représentée dans ce document.

1.7.2. Faire un schéma simplifié et annoté de cette molécule (les formules développées ne sont pas exigées).

1.7.3. Préciser en quoi la structure de la pénicilline G explique son action.

2. Production de pénicilline G (10 points)

Le **document 3** présente l'évolution du rendement en pénicilline depuis les premières productions de cet antibiotique.

2.1. Sachant qu'une unité de pénicilline correspond à 0,6 μg d'antibiotique, exprimer sa concentration massique par litre de milieu :

- en 1940,
- en 2000.

2.2. Expliquer en quoi l'année 1951 a été un tournant dans l'évolution de la production de pénicilline.

2.3. Des technologies permettent d'améliorer les performances des souches industrielles : citer un exemple.

2.4. Le **document 4** présente, en trois étapes successives, le procédé de production industrielle de pénicilline G. Celle-ci nécessite l'apport d'acide phénylacétique, qui s'avère toxique pour la souche productrice à forte concentration.

2.4.1. Étape ① :

Différents transferts permettent de passer :

- d'une ampoule de lyophilisat à une culture,
- d'une culture en fiole d'Erlenmeyer à un bioréacteur.

Expliquer l'intérêt de ces deux transferts.

2.4.2. Étape ② :

- Nommer le type de procédé de fermentation utilisé pour la production de pénicilline. justifier la réponse.
- Donner deux arguments à l'origine du choix de ce procédé.

2.4.3. Étape ③ :

Justifier la nécessité des trois opérations réalisées au cours de cette étape.

2.5. Le suivi de différents paramètres de la production de pénicilline est présenté dans le **document 5**. La phase exponentielle a été identifiée de 0 à 14 heures. Des essais ont montré que la production de pénicilline G est limitée par une concentration trop élevée en glucose.

2.5.1. À partir des courbes et du tableau de valeurs, interpréter l'évolution de la biomasse et des concentrations en lactose et en ammonium.

2.5.2. Déterminer à quel type de métabolite appartient la pénicilline. Justifier.

2.5.3. Calculer la vitesse spécifique de croissance de la souche en phase exponentielle μ_{Xexpo} (ou Q_{Xexpo}), et en déduire le temps de génération G. Expliciter les calculs.

2.5.4. Expliquer ce que signifient, dans le **document 5**, les expressions : « *Glucose feeding* » et « *Nitrogen feeding* ».

Exposer les raisons de cette façon de procéder.

2.5.5. Calculer le rendement spécifique de la pénicilline produite par rapport à la biomasse formée à la fin du procédé, exprimé en g de pénicilline par g de biomasse.

2.6. La pénicilline naturelle produite par *Penicillium chrysogenum* est principalement de la pénicilline G. Cette dernière peut être modifiée.

2.6.1. Citer un moyen permettant cette modification.

2.6.2. Qualifier les antibiotiques ainsi modifiés.

3. Résistance bactérienne aux antibiotiques (4 points)

En milieu hospitalier, l'émergence de nouveaux micro-organismes pathogènes résistant aux antibiotiques crée une situation alarmante. 10 % des patients, et plus dans certains services, contractent une infection lors de leur séjour à l'hôpital. Le **document 6** liste différents facteurs à l'origine de l'augmentation du nombre de souches résistantes.

3.1. Donner la signification de l'expression « *antimicrobial selective pressure* ».

3.2. Illustrer cette notion par un exemple emprunté au laboratoire de génie génétique.

3.3. Rappeler un mécanisme de résistance aux pénicillines, fréquemment rencontré chez les bactéries.

3.4. L'acquisition de résistances aux antibiotiques se fait le plus souvent par transfert de plasmide de résistance de bactérie à bactérie par conjugaison.

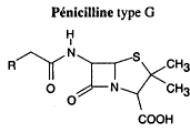
3.4.1. Décrire le transfert d'un plasmide par ce mécanisme à l'aide d'un ou plusieurs schémas commentés.

3.4.2. Citer et définir brièvement deux autres mécanismes de transfert de matériel génétique entre bactéries.

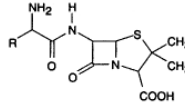
Document 1

Structure de quelques antibiotiques de la famille de la pénicilline G

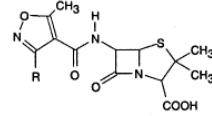
Pénicillines (exemples)



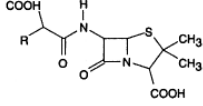
Aminopénicilline (ampicilline et dérivés)



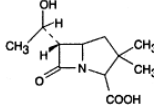
Isoxazolypénicillines (oxacilline et dérivés)



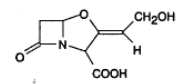
Carboxypénicilline (Carbénicilline et dérivés)



Imipéném et dérivés

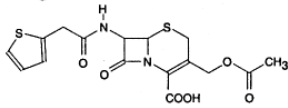


Acide clavulanique

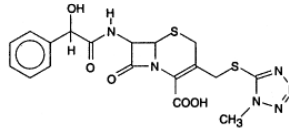


Céphalosporines (exemples)

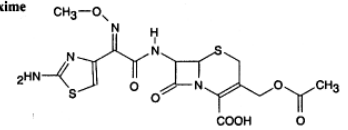
Céphalosporine de 1^{re} génération ex : céfaloétine



Céphalosporine de 2^e génération (noyau céphème ou céphamycine) ex : céfamandole

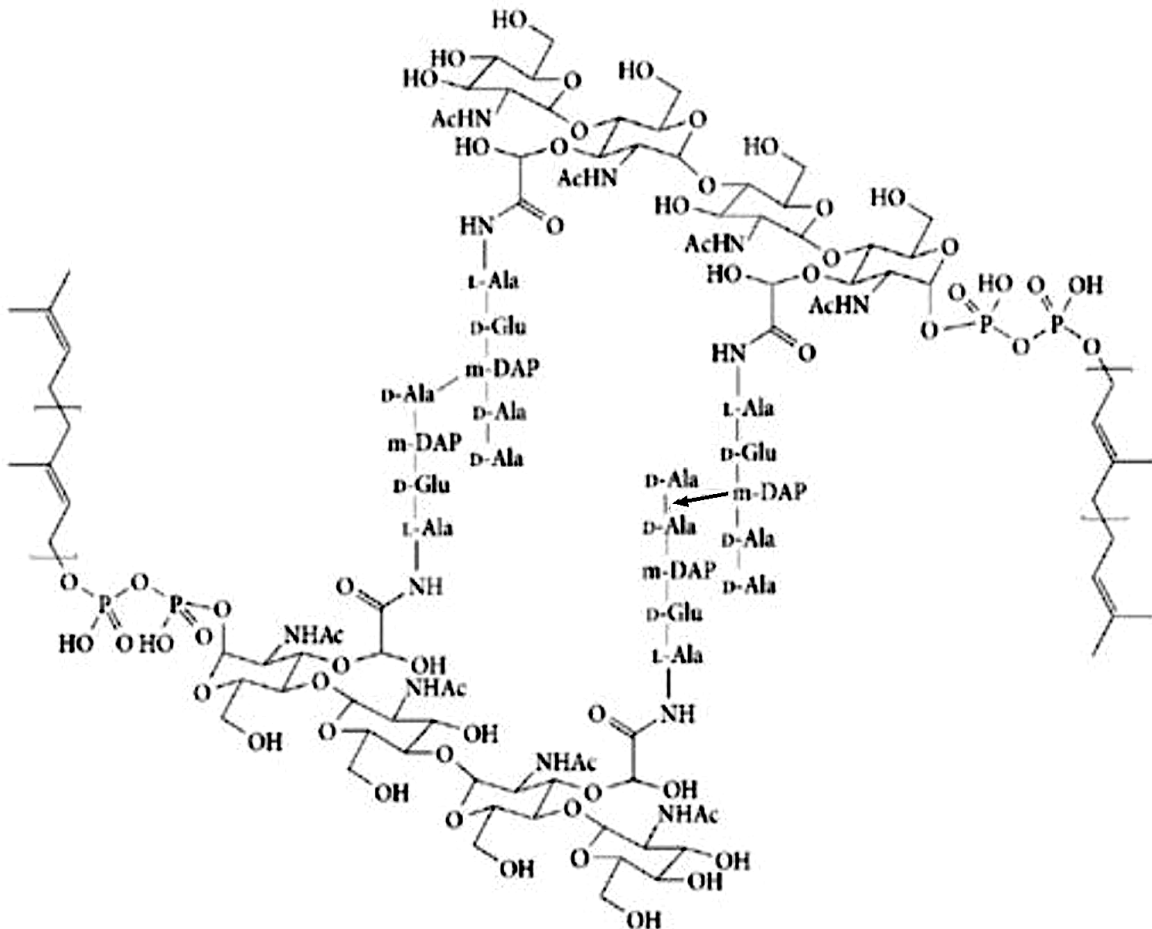


Céphalosporine de 3^e génération ex : céfotaxime



Document 2

Cible de la pénicilline G

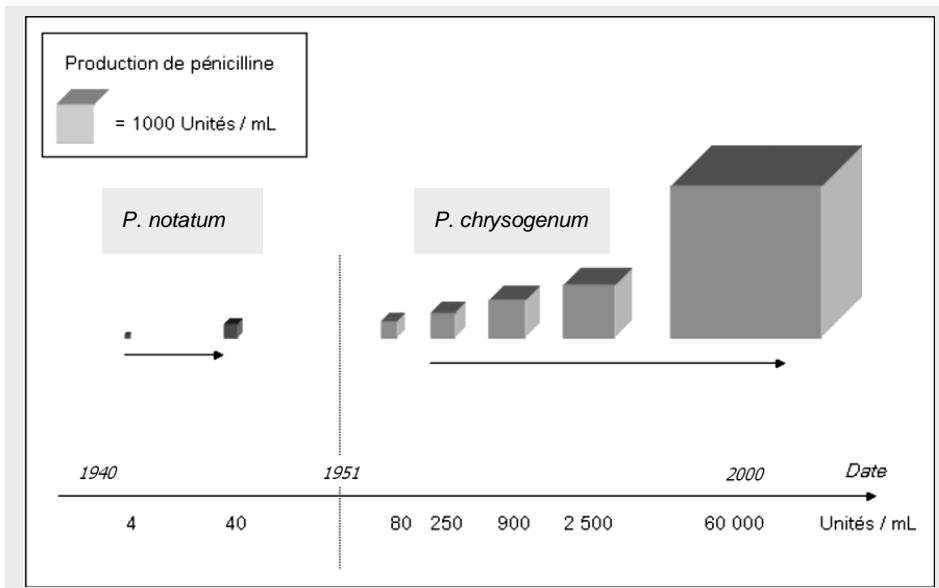


Document 3

Amélioration de la production de la pénicilline G

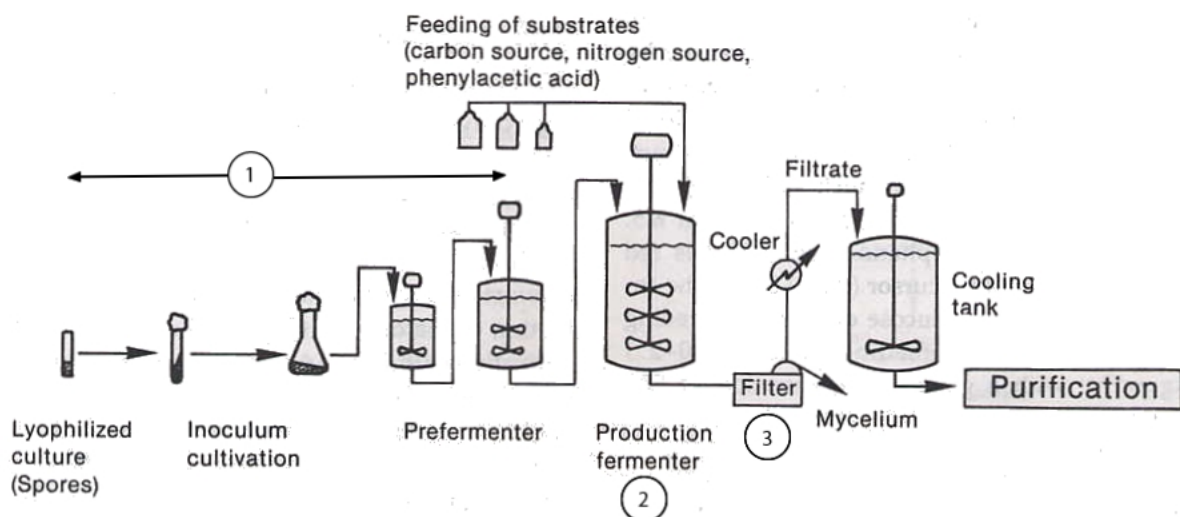
En 1928, le bactériologiste écossais Alexander FLEMING découvre un agent antibactérien : la pénicilline. En 1939, Howard FLOREY, Ernest CHAIN et Norman HEATLEY la purifient à partir d'une culture de *Penicillium notatum* et testent son effet *in vitro*. En 1941, les premiers essais *in vivo* sur des soldats au cours de la guerre sont couronnés de succès. Les besoins en pénicilline sont alors très importants. La production débute à partir de cultures de la moisissure sur milieux gélosés.

Elle évolue ensuite par étapes avec en 1951 une modification majeure, celle de la souche productrice. On choisit alors une moisissure isolée d'un melon contaminé apporté par une ménagère à la suite d'un appel au public : une souche de *Penicillium chrysogenum* hautement productive, la souche NRRL 1951 (NRRL = Northern Regional Research Laboratory). Cette espèce est toujours utilisée actuellement mais la production de pénicilline a considérablement évolué depuis. Elle est représentée dans le schéma ci-dessous :



Document 4

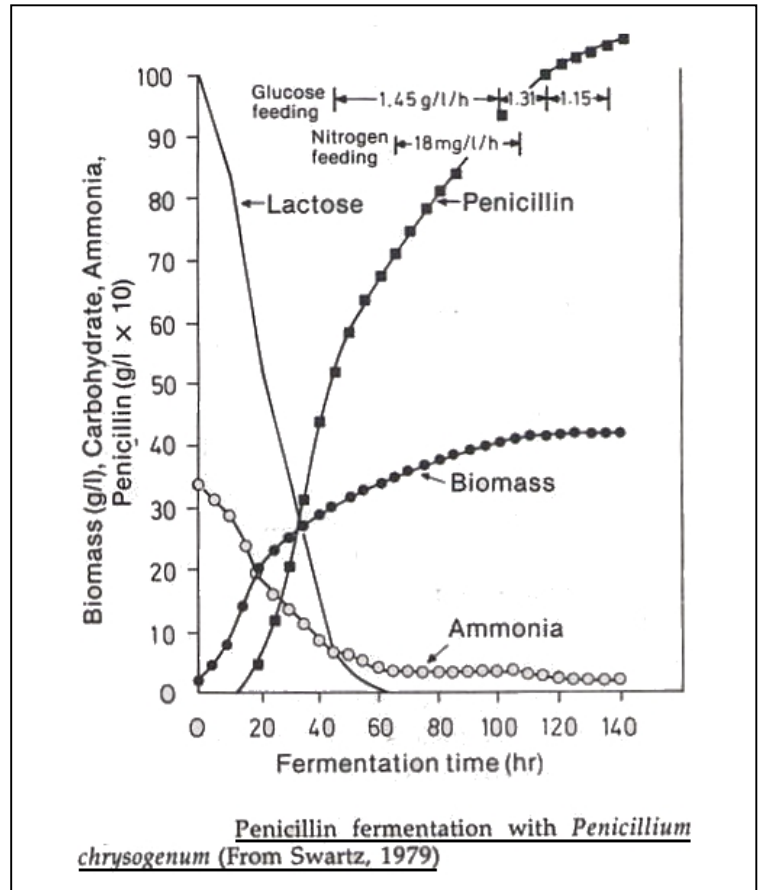
Procédé de fabrication de la Pénicilline G



Flow chart of the penicillin fermentation (From Swartz, 1979)

Document 5
Suivi de la production industrielle de pénicilline G

Fermentation time (hr)	Biomass (g.L ⁻¹)	Lactose (g.L ⁻¹)	Ammoniac (g.L ⁻¹)	Penicilline (g.L ⁻¹)
0	2.5	10.0	3.4	0.0
4	4.6	9.3	3.2	0.0
9	8.2	8.6	2.9	0.0
14	14.8	7.2	2.4	0.0
19	20.9	5.6	1.9	0.4
24	23.5	4.5	1.6	1.2
29	26.3	3.6	1.2	2.0
34	28.2	2.6	1.1	3.2
40	29.0	1.6	0.9	4.4
44	30.5	0.5	0.7	5.2
50	32.0	0.3	0.6	5.9
54	32.9	0.1	0.5	6.4
60	34.1	0.0	0.4	6.8
64	35.0	0.0	0.3	7.2
68	36.2	0.0	0.3	7.5
73	37.0	0.0	0.3	7.9
78	38.1	0.0	0.3	8.2
84	38.5	0.0	0.3	8.4
89	39.2	0.0	0.3	8.7
95	39.8	0.0	0.3	9.1
100	40.1	0.0	0.3	9.3
105	41.1	0.0	0.3	9.6
110	41.8	0.0	0.2	9.8
114	42.0	0.0	0.2	10.0
120	42.1	0.0	0.2	10.2
124	42.1	0.0	0.2	10.3
129	42.2	0.0	0.2	10.4
134	42.2	0.0	0.2	10.5
139	42.3	0.0	0.1	10.6



V_{initial} de culture = 5000 L
 V_{final} de culture = 9000 L

Document 6
Factors that contribute to the spread of antimicrobial resistance in the community

Antimicrobial resistance in the community setting is a multifactorial problem. Increased antimicrobial use around the world is the foremost reason for this spread. [...] Hospitals, nursing homes and long-term care facilities also serve as reservoirs of antibiotic-resistant organisms. [...] The use of antimicrobials in food animals is an important contributing cause. The acquisition of a foreign genetic resistance element, antimicrobial selective pressure and clonal dissemination are key factors, which carry different weight for different organisms and geographic locations.

Nature reviews microbiology, Jan 2006, vol. 4

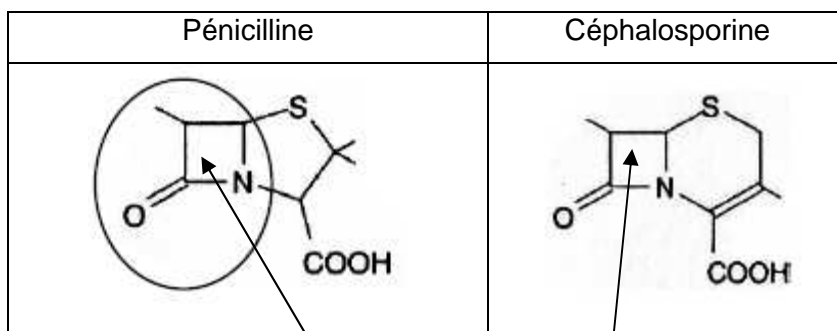
Proposition de corrigé de la sous-épreuve de MICROBIOLOGIE ET GÉNIE FERMENTAIRE

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

1. Les antibiotiques (10 points)

- 1.1. Toxicité sélective : toxicité vis à vis des micro-organismes indésirables et non pas vis-à-vis des cellules de l'hôte.
- 1.2. Sélection des souches transformées par un vecteur portant un gène de résistance à un antibiotique
- 1.3. *Streptomyces* : Bactérie (Procaryote) *Penicillium* : Moisissure (Eucaryote).
- 1.4. *Streptomyces* : bacille Gram⁺ présentant des filaments ramifiés présentant des chaînes de petites spores.
- 1.5. Micro-organismes reconnus comme non pathogènes pour l'Homme.
- 1.6.

1.6.1. Structure des noyaux :



1.6.2.

Cycle β -
lactame

1.7.

1.7.1. Peptidoglycane dans la paroi bactérienne

1.7.2. Le schéma devait présenter : les osamines ((NAMA – ou NAM – et NAG) unies par des liaisons osidiques ; les chaînes peptidiques (tétrapeptides ou pentapeptides) et les ponts interchaînes (ou interpeptidiques).

1.7.3. la pénicilline G est un analogue structural du dipeptide DAla-Dala, qui est le substrat de la transpeptidase : il y a donc inhibition compétitive de la transpeptidation.

2. Production de pénicilline G (20 points)

- 2.1. en 1940 : on obtient une concentration de 4 U.mL^{-1} , soit $\rho = (4 \times 0,6)/10^{-3} = 2,4 \text{ mg.L}^{-1}$
En 2000, la concentration atteint $\rho = (60\ 000 \times 0,6)/10^{-3} = 36 \text{ g.L}^{-1}$
- 2.2. 1951 : on opère un changement de souche, *Penicillium chrysogenum* étant plus productive.
- 2.3. On peut améliorer les souches industrielles par mutation spontanée ou par mutation provoquée par des agents physiques, des agents chimiques, par la fusion de protoplastes, par génie génétique ...

2.4.1. Réhydratation du contenu d'un tube conservé par lyophilisation : ceci permet le réveil de la souche (ou revivification). La propagation de la souche en fiole d'Erlenmeyer puis en bioréacteurs permet d'augmenter progressivement la quantité de biomasse nécessaire à l'inoculation d'un bioréacteur de production.

2.4.2. Des solutions d'alimentation sont apportées en cours de fermentation, donc le volume augmente : c'est une culture en « fed-batch » (ou batch alimenté).

Plusieurs arguments peuvent être évoqués :

- l'apport des substrats au fur et à mesure des besoins permet éviter l'inhibition de la croissance par un excès de substrat comme dans les procédés en batch
- la toxicité de l'acide phényl-acétique est limitée par son ajout en fin de phase exponentielle (il est toxique pendant la croissance)
- la durée de la culture est allongée, ce qui permet d'augmenter la production

2.4.3. Filtration du moût : elle permet l'élimination du mycélium

Refroidissement du filtrat : la pénicilline qu'il contient est une molécule thermolabile

Purification : récupération de l'antibiotique par élimination des constituants du milieu

2.5.1. Phase exponentielle de 0 à 14 heures : consommation du lactose (source de C et nutriment énergétique) et des ions ammonium (source d'azote minéral facilement assimilable par tous les microorganismes) : il y a croissance rapide de la biomasse.

14 à 40 h : phase de ralentissement de la croissance : on observe l'épuisement du lactose et une forte consommation de l'ammonium.

A partir de la 45^{ème} heure environ : démarrage de l'alimentation en glucose (puis l'azote est apporté à partir de la 70^{ème} heure environ), la croissance en concentration de biomasse est moins rapide (mais le volume augmente), les ions ammonium sont épuisés vers la 60^{ème} heure environ.

2.5.2. La pénicilline est produite en fin de phase exponentielle de croissance et surtout en phase de ralentissement, c'est donc un métabolite secondaire.

2.5.3. La phase exponentielle étant parfaitement identifiable entre $t = 0$ et $t = 14$ h, on peut exploiter les valeurs : $\mu_{X_{\text{expo}}} = Q_{X_{\text{expo}}} = \frac{\ln(14,8) - \ln(2,5)}{(14 - 0)} = 0,127 \text{ h}^{-1}$

D'où $G = \frac{\ln(2)}{\mu_{X_{\text{expo}}}} = 5,5 \text{ h}$ (5h30)

Remarque : l'exploitation d'autres couples de points expérimentaux pendant la phase exponentielle permettait d'obtenir des valeurs numériques parfois nettement différentes de celles qui figurent ci-dessus. Ces calculs ont été validés à partir du moment où ils montraient une démarche cohérente.

2.5.4. *Glucose feeding* : cette alimentation en glucose permet d'éviter la limitation de la production (le glucose est inhibiteur de la synthèse de pénicilline car il oriente le métabolisme vers la production de biomasse et empêche d'atteindre la phase stationnaire). Cet apport permet de compenser l'épuisement du lactose (non inhibiteur de la synthèse de pénicilline) en fournissant une autre source de C et surtout un nutriment énergétique.

Nitrogen feeding : alimentation en azote pour compenser l'épuisement en ions ammonium.

Remarque : il faut, de même que pour l'apport en glucides, éviter d'orienter le métabolisme de la culture vers la production de biomasse : le fed-batch, apportant les nutriments énergétiques et sources de C et N au fur et à mesure des besoins, est la solution technologique permettant de n'apporter que ce qui est nécessaire à l'entretien de la biomasse et à la synthèse de pénicilline, très coûteuse en énergie.

2.5.5. Exprimé $R_{P/X}$ en g pénicilline (P) / g biomasse (X), le rendement spécifique est le rapport des variations de la quantité de pénicilline produite à la quantité de biomasse

apparue, il faut donc tenir compte des volumes initial et final de la culture pour le calcul des quantités.

$$R_{P/X} = [(10,6 \times 9000) - 0 \times 5000] / [(42,3 \times 9000 - 2,5 \times 5000)] = 0,26 \text{ g pénicilline / g biomasse}$$

2.6.1. On peut modifier les molécules par voie chimique ou enzymatique.

2.6.2. Ces antibiotiques sont semi (ou hémi-) synthétiques

3. Résistance bactérienne aux antibiotiques (8 points)

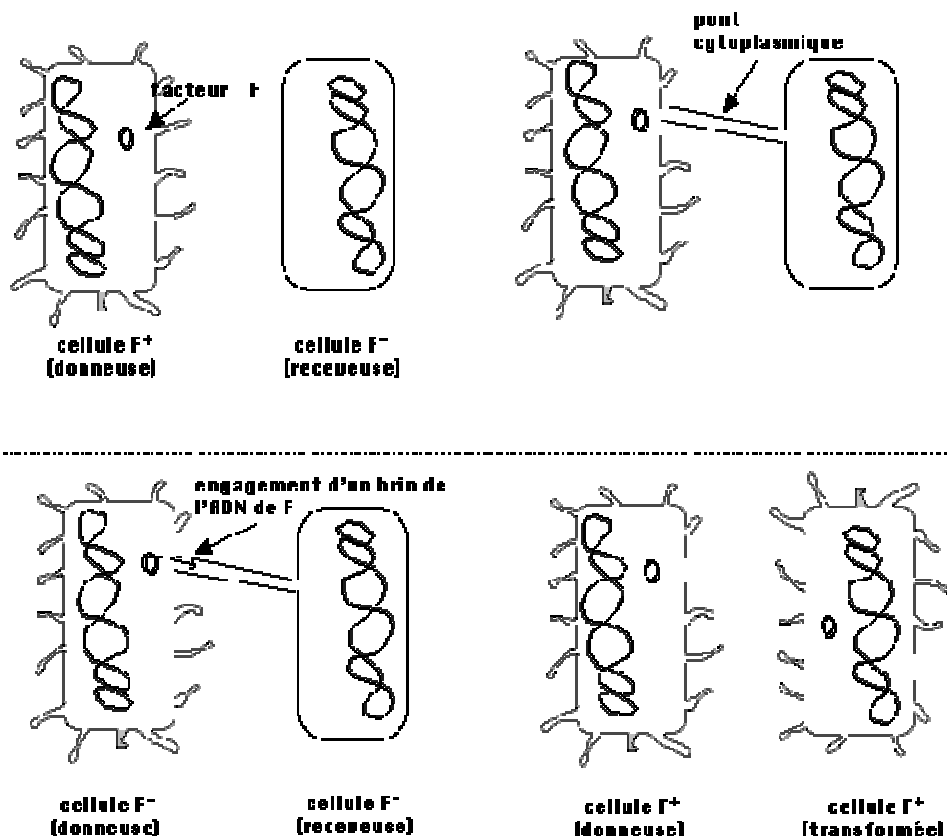
3.1. C'est la pression de sélection, qui est exercée par la présence d'un antibiotique dans les milieux. La conservation, dans un milieu contenant l'antibiotique, d'une souche transformée par un vecteur portant un gène de résistance, permet d'éviter la perte du plasmide appelée curage plasmidique. Les milieux de culture doivent toujours contenir l'antibiotique.

3.2. L'ouverture du noyau β -lactame par hydrolyse catalysée par les β -lactamases (pénicillinasés) permet l'inactivation définitive de l'antibiotique.

Les mutations des PLP (protéines liant la pénicilline) sont aussi à l'origine d'apparition de souches résistantes.

3.3.1. Schéma de la conjugaison : il devait indiquer le rapprochement de la bactérie donneuse (F^+ ou F') et de la bactérie receveuse (F^-), le contact assuré par le F pilus, l'établissement du pont cytoplasmique, et le passage d'une copie du plasmide. Exemple de schéma simplifié (issu de la page

<http://ead.univ-angers.fr/~jalouzot/genetique/courshtm/chap6/chap-6.htm>) :



3.3.2. Transformation : le transfert d'ADN nu a lieu spontanément chez les bactéries Gram⁺, naturellement compétentes. La transformation artificielle est menée chez les bacilles Gram⁻ après acquisition de la compétence par traitement au $CaCl_2$.

Transduction : les bactériophages peuvent transférer du matériel génétique entre bactéries par transduction généralisée ou spécialisée.

ÉPREUVE DE BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES PROTÉINES

Durée de l'épreuve : 2 heures Coefficient : 1

*L'utilisation d'un dictionnaire Anglais/Français est autorisée.
L'utilisation d'une calculatrice est interdite.*

Remarque importante : il sera tenu compte de « la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition » par la prise en compte d'une valeur d'un point sur vingt dans le barème.

Étude de phosphatases alcalines mutées, responsables de maladies des os et des dents (hypophosphatasies) chez l'Homme

Chez l'Homme, la phosphatase alcaline humaine « tissu non spécifique » (notée TNSALP) est une protéine ancrée dans la membrane plasmique, côté milieu extracellulaire, par l'intermédiaire d'un bras GPI (glycosyl phosphatidyl inositol). Elle catalyse la réaction d'hydrolyse d'une molécule de pyrophosphate, qui, à forte concentration, bloque le processus de minéralisation du milieu extracellulaire. Ainsi, certaines mutations du gène codant pour la TNSALP sont responsables de maladies affectant la minéralisation des os et des dents (hypophosphatasies).

1. Étude de la structure et de la synthèse de la TNSALP sauvage (10 points)

L'enzyme TNSALP est un homodimère non covalent. Chaque sous-unité (**66 kDa**) porte 3 chaînes glucidiques ce qui lui donne une masse moléculaire globale de **80 kDa**. Les formes glycosylée et non glycosylée peuvent coexister dans le cadre d'une surexpression.

1.1 Définir les termes « homodimère » et « non covalent ».

Des cellules COS-1 sont transfectées par un plasmide portant le gène **codant pour la protéine TNSALP sauvage**. Après 24 heures de culture, elles sont lysées par sonication à 4°C, puis le lysat est centrifugé à basse vitesse. Le surnageant obtenu, appelé homogénat cellulaire, est analysé par SDS-PAGE, suivi d'un western blot utilisant un anticorps anti-TNSALP.

1.2 Présenter les étapes principales d'analyse de l'homogénat cellulaire.

1.3 Expliquer pourquoi dans la plupart des cas une seule bande ou un nombre faible de bandes est observé après l'ajout d'anticorps.

L'électrophorèse SDS-PAGE est effectuée en conditions réductrices et en conditions non réductrices.

1.4 Donner le nom et le rôle d'un agent réducteur utilisé pour pré traiter les échantillons en conditions réductrices.

Les résultats obtenus pour l'analyse de l'homogénat cellulaire contenant la protéine sauvage sont visualisés sur les **pistes 1 et 5 du document 1**.

1.5 Expliquer pourquoi ces résultats sont en accord avec les données sur la structure de la protéine TNSALP sauvage.

Les trois résidus de la protéine TNSALP sauvage, correspondant à des sites de glycosylation, sont surlignés en gris sur le **document 2**. Le **document 3** donne la correspondance entre le code à une lettre et le code à trois lettres des acides aminés.

1.6 Donner le nom et la formule du résidu surligné **N** dans le document 2.

- 1.7 Nommer la liaison reliant l'ose et le résidu **N** de la protéine glycosylée.
- 1.8 Préciser le(s) compartiment(s) cellulaire(s) où se déroule cette glycosylation.
- 1.9 Citer deux rôles joués par les chaînes glucidiques sur une glycoprotéine.

Le schéma du **document 4** représente le phénomène de translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique rugueux.

- 1.10 Annoter ce schéma (**légendes 1 à 6 à recopier sur la copie**).

Les 17 premiers résidus de la séquence de la TNSALP sauvage délimitent le peptide signal.

- 1.11 À l'aide des **documents 2 et 3**, relever les caractéristiques de cet élément.
- 1.12 Citer les étapes successives du phénomène représenté sur **le document 4**.

2. Étude des mutants de la protéine TNSALP (7 points)

Chez certains patients atteints d'hypophosphatasie plus ou moins sévère, des protéines mutantes ont été isolées :

- TNSALP (R 433 H) : substitution de l'arginine 433 par une histidine
- TNSALP (R 433 C) : substitution de l'arginine 433 par une cystéine

Des cellules COS-1 sont utilisées pour produire les protéines TNSALP mutantes, selon les mêmes étapes que pour la protéine sauvage.

Pour les protéines sauvage et mutantes (R 433 H et R 433 C), la mesure de l'activité spécifique dans les homogénats cellulaires est effectuée selon le mode opératoire du **document 5**.

- 2.1 En utilisant le mode opératoire fourni, donner la formule littérale permettant de calculer la concentration d'activité catalytique, CAC, en $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'homogénat cellulaire. Justifier les unités et préciser les valeurs numériques des volumes intervenant dans cette formule.
- 2.2 Calculer les activités spécifiques, AS, en $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, pour chaque forme protéique, à l'aide des résultats du **document 6**.
- 2.3 Commenter les activités spécifiques obtenues, en tenant compte des substitutions distinguant les formes sauvages et mutées.

Les TNSALP humaines sauvages contiennent 5 résidus cystéines (C 102, C 122, C 184, C 472 et C 480) dont la position est très conservée entre les différentes isoenzymes connues. Chaque sous-unité de la protéine sauvage contient 5 cystéines ; seule la cystéine 102 n'est pas impliquée dans un pont disulfure.

Les protéines mutantes (R 433 H et R 433 C) sont analysées de la même façon que la protéine sauvage, par western blot. Les résultats sont présentés dans le **document 1 (pistes 2, 3, 6 et 7)**.

- 2.4 Définir la notion d'isoenzyme.
- 2.5 Comparer les résultats obtenus pour ces mutants à ceux de la protéine sauvage.
- 2.6 Proposer une hypothèse permettant d'expliquer les modifications structurales observées pour les mutants R 433 C.
- 2.7 Schématiser (formule semi-développée) un pont disulfure formé entre deux cystéines.

Un double mutant est créé à partir du mutant TNSALP (R 433 C) pour lequel le résidu cystéine C 102 est substitué par une sérine : **TNSALP (R 433 C ; C 102 S)**. La protéine correspondante est

analysée par western blot, selon les mêmes conditions que les autres protéines : les résultats sont donnés dans le **document 1 (pistes 4 et 8)**.

- 2.8** La cystéine 102 participe-t-elle à la modification structurale observée pour les mutants (R 433 C) et (R 433 C ; C 102 S) ? Justifier.
- 2.9** Représenter schématiquement la structure quaternaire des protéines des deux mutants TNSALP (R 433 C), TNSALP (R 433 C ; C 102 S) et de la protéine sauvage, en précisant la position des ponts disulfures intra et/ou intercaténaire(s) (intra et inter chaînes). Représenter les liaisons reliant les sous-unités.

Données : résidus cystéines reliés par des ponts disulfures C 122-C 184 et C 472-C 480

3. Utilisation de l'enzyme TNSALP (R 433 H) en dosage immuno-enzymatique (2 points)

L'enzyme TNSALP (R 433 H) est intéressante pour sa forte activité. On envisage de l'utiliser comme marqueur dans une technique ELISA.

Les premières étapes du dosage d'un antigène par compétition en microplaques sont les suivantes :

- Etape 1 : fixation de l'anticorps spécifique (en quantité limitante)
- Etape 2 : saturation de la microplaque avec de la gélatine

3.1 Représenter l'étape 3 de compétition.

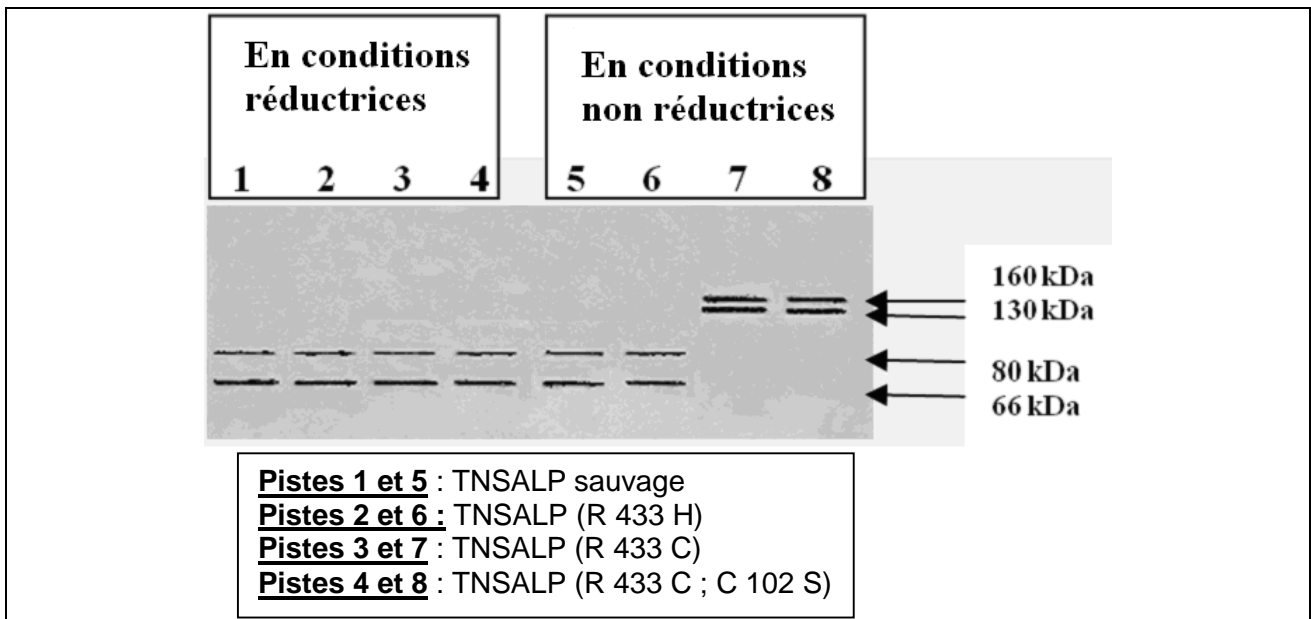
3.2 L'activité enzymatique mesurée diminue en fonction de la concentration en antigène à doser. Justifier cette observation.

3.3 Préciser le rôle de la gélatine.

3.4 Les étapes 1, 2 et 3 se terminent par un lavage. Donner le rôle du lavage dans l'étape 3.

Document 1

Analyse de la protéine sauvage et des protéines mutées par SDS-PAGE en conditions réductrices et non réductrices couplée à un western blot



Document 2

Séquence de la protéine TNSALP sauvage

MIS <u>PFLVLAIGTCLTNS</u>	10	20	30	40
LVPEKEKDPK	YWRDQAQETL	KYALELQKLN	TNVAKNVIMF	
50	60	70	80	90
LGDGMGVSTV	TAARILKGQL	HHNPGEETRL	EMDKFPFVAL	SKTYNTNAQV
110	120	130	140	150
<u>L</u> CGVKANEGT	VGVSAATERS	<u>R</u> CNTTQNEV	TSILRWAKDA	GKSVGIVTTT
170	180	190	200	210
YAHSAARDWY	SDNEMPEAL	<u>S</u> QGC <u>K</u> DIAYQ	LMHNIRDIDV	IMGGGRKYMY
230	240	250	260	270
SDEKARGTRLDGL	DLVDTWKSFK	PRYKHSFIW	<u>N</u> RTELLTLDP	HNVDYLLGLF
290	300	310	320	330
ELNRNNTVDP	SLSEMVVVAI	QILRKNPKGK	FLLVEGGRID	HGHHEGKAKQ
350	360	370	380	390
AIGQAGSLTS	SEDTLTVVTA	DHSHVFTFGG	YTPRGNSIFG	LAPMLSDTDK
410	420	430	440	450
GPGYKVVGGE	RENVSMVDYA	HNNYQAQSAV	PLRHETHGGE	DVAVFSKGP
470	480	490	500	
NYVPHVMAYA	<u>A</u> CIGANLGH <u>C</u>	APASSAGSLA	AGPLLLALAL	YPLSVLF

Le peptide signal est représenté en gras.

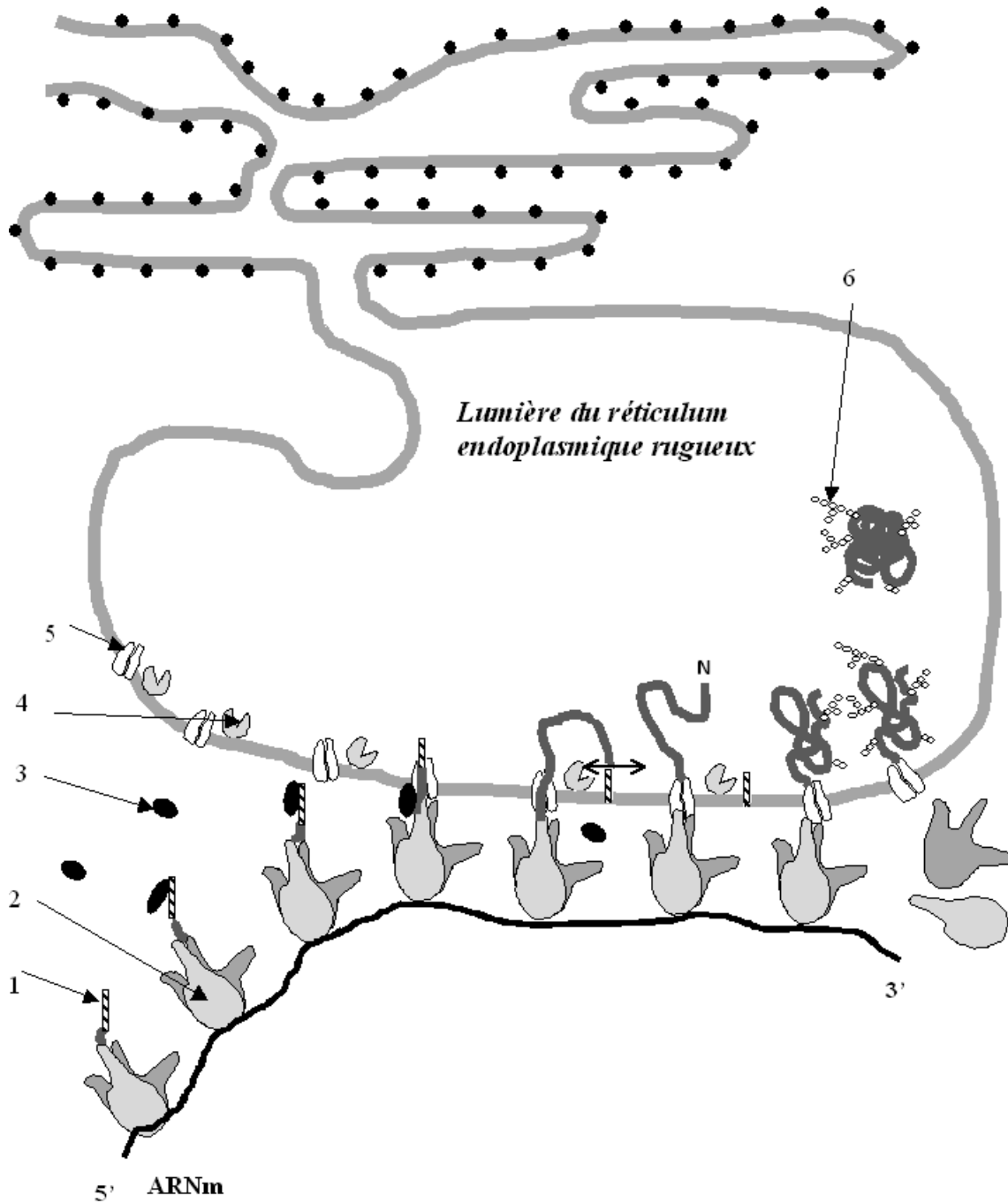
Document 3

Correspondance entre le code à une lettre et le code à 3 lettres de certains acides aminés

M	I	S	P	F	L	V	A	G	T	C	N
Met	Ile	Ser	Pro	Phe	Leu	Val	Ala	Gly	Thr	Cys	Asn

Document 4

Représentation de la synthèse et de la translocation de la protéine TNSALP dans le réticulum endoplasmique rugueux



Document 5

Mesure de l'activité spécifique des enzymes TSNALP sauvage et mutantes

Protocol :

Alkaline phosphatase was assayed at pH 10,0 using pNPP (para-nitrophenyl phosphate or nitro-4 phenyl phosphate) as substrate. The reaction mixture contained :

- 0,1 mL pNPP (10 mM)
- 0,3 mL 2-amino-2-methyl propanol / HCl buffer (0,5 M) with MgCl₂ (2 mM)
- 0,1 mL cellular homogenate

The mixture was incubated at 37 °C for 15 min, before 0,5 mL of 0,75 M NaOH was added to each tube. Absorbances were measured at 410 nm ($\epsilon_{pNP \text{ at } 410 \text{ nm}} = 18\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

One unit of alkaline phosphatase is the quantity of enzyme which releases 1 μmol of p-nitrophenol in one min.

Document 6

Détermination des activités spécifiques des protéines mutantes et sauvage

	Concentration d'activité catalytique en U par mL d'homogénat cellulaire	Concentration massique en protéines en mg par mL d'homogénat cellulaire (méthode de Folin-Lowry)
TNSALP sauvage	1500	5,0
TNSALP (R 433 H)	3000	6,0
TNSALP (R 433 C)	612	6,0

Proposition de corrigé de l'épreuve de Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Protéines

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

- 1.1. Homodimère : protéine composée de 2 sous-unités identiques
Non covalent : les sous-unités sont reliées uniquement par des liaisons faibles.
- 1.2. Étapes principales du Western blot :
 - une étape d'électrophorèse classique SDS PAGE permettant de séparer les protéines selon leur masse moléculaire. Les protéines, chargées négativement en présence de SDS, migrent toutes vers l'anode
 - une étape de transfert des protéines du gel vers une membrane de nitrocellulose, par un phénomène d'électro-transfert ou de transfert par capillarité
 - révélation : toutes les protéines transférées ne sont pas révélées. Un anticorps marqué, et spécifique de la protéine étudiée, permet d'en révéler la présence
- 1.3. De nombreuses protéines peuvent être contenues dans l'échantillon analysé, mais seule la protéine spécifique de l'anticorps marqué utilisé, est révélée.
- 1.4. Le β mercaptoéthanol et le dithiothréitol sont des agents réducteurs, permettant la rupture des ponts disulfure, présents à l'intérieur d'une sous-unité protéique, ou bien reliant deux sous-unités
- 1.5. En présence de β -mercaptoéthanol (conditions réductrices), on obtient 2 bandes de mêmes intensités, à 66 et 80 kDa. Ces masses moléculaires correspondent à la taille d'une sous-unité de la protéine TNSALP annoncée (forme non glycosylée à 66 kDa et forme glycosylée à 80 kDa). La TNSALP étant un homodimère, on attend une bande pour chacune des deux sous-unités, séparées en présence de SDS.
En absence de β -mercaptoéthanol, on obtient les mêmes résultats, ce qui prouve que le β -mercaptoéthanol n'a aucun effet sur la protéine TNSALP, donc que les sous-unités ne sont reliées que par des liaisons faibles (homodimère non covalent).
- 1.6. Les résidus N sont des molécules d'asparagine (Asn). La formule est $\text{CH}_2\text{-CO-NH}_2$.
- 1.7. Sur les résidus Asn, il s'agit d'une liaison N-osidique ou N-glycosidique.
- 1.8. Elle commence dans le REG et se poursuit dans l'appareil de Golgi.
- 1.9. Parmi les rôles ci-dessous, les chaînes glucidiques :
 - augmentent le caractère hydrophile
 - peuvent jouer le rôle de marqueur antigénique
 - constituent des motifs de reconnaissance pour des récepteurs
 - peuvent être utilisées pour l'adressage correct de la protéine dans la cellule
- 1.10. Les légendes attendues étaient :
1 = peptide signal 2 = ribosome 3 = SRP = signal recognition protein
4 = signal peptidase ou enzyme protéolytique 5 = translocon ou canal de translocation
6 = chaîne glucidique
- 1.11. Caractéristiques du peptide signal :
 - c'est une courte séquence riche en résidus apolaires (G, L, V, A, P, I, M, C...)
 - il est positionné du côté N-terminal

- 1.12. Le document 4 représente la synthèse et la translocation de la protéine :
- Démarrage de la traduction par un ribosome libre dans le cytoplasme.
 - Reconnaissance du peptide signal par une protéine SRP, qui bloque la traduction.
 - Fixation de l'ensemble « SRP-système de traduction » sur le translocon.
 - Libération de la SRP (après hydrolyse d'un GTP) puis reprise de la traduction.
 - Entrée progressive de la protéine en cours de synthèse dans le REG, par le translocon.
 - Clivage du peptide signal dans le REG par le signal peptidase.
 - À la fin de la traduction, dissociation du ribosome du translocon et de l'ARNm.
 - Repliement de la protéine
 - Glycosylations éventuelles de la protéine dans le REG.

2.1 $CAC (U \cdot mL^{-1}) = (\Delta A / \Delta t) \times (1 / \epsilon \times \ell) \times (V_T / V_{enz}) \times 10^6$
 Dans cette formule, V_T est en L et V_{enz} en mL
 $V_T = (0,1 + 0,3 + 0,1 + 0,5) \cdot 10^{-3} = 1 \cdot 10^{-3} L$; $V_{enz} = 0,1 mL$ (homogénat cellulaire)

2.2 $AS (U/mg) = CAC (U/mL) / \rho (mg/mL)$
 On obtient : TNSALP sauvage : 300 U/mg R 433 H : 500 U/mg et R 433 C : 102 U/mg

2.3 L'enzyme mutante R 433 C présente une AS plus faible que la sauvage (102 au lieu de 300). Il y a remplacement de l'arginine, résidu à chaîne latérale basique, polaire et assez encombrante, par une cystéine, résidu apolaire, à petite chaîne latérale. Cela engendre certainement des modifications structurales défavorables à l'activité enzymatique. L'enzyme R 433 H présente une AS plus forte que la sauvage (5070 au lieu de 300). Il y a remplacement de l'arginine, résidu à chaîne latérale basique, polaire et assez encombrante, par une histidine, résidu aux propriétés très proches de l'arginine. On pouvait donc s'attendre à une AS similaire. On peut supposer que la mutation engendre des modifications structurales favorables à l'activité enzymatique : l'activité est conservée si l'acide aminé a un caractère basique et diminue dans le cas contraire.

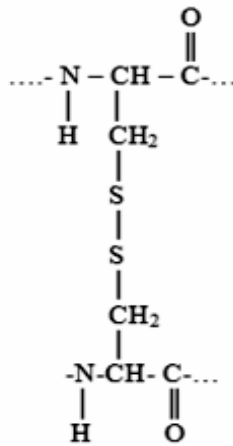
2.4 Deux enzymes sont des isoenzymes si elles catalysent la même réaction, ont une séquence très proche, mais présentent des propriétés de régulation différentes.

2.5 Le mutant R 433 H donne des résultats équivalents à la protéine sauvage sur western blot. Comme pour la protéine sauvage, on déduit que cette protéine mutante est un homodimère non covalent. Le mutant R 433 C donne des résultats équivalents à la protéine sauvage en conditions réductrices. En revanche, en conditions non réductrices, on obtient deux bandes de 130 et 160 kDa, valeurs correspondant au double de 66 et 80 kDa. En absence de β mercaptoéthanol, les sous-unités de la protéine ne se sont donc pas dissociées. Le mutant R 433 C possède donc un pont disulfure reliant les sous-unités.

2.6 Hypothèse 1 : pour le mutant R 433 C, le pont disulfure est formé entre les deux cystéines 433 des 2 sous-unités.

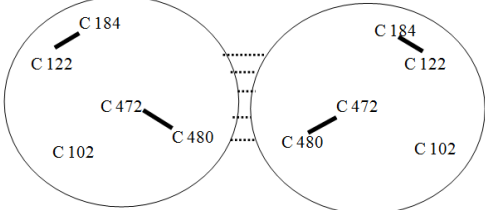
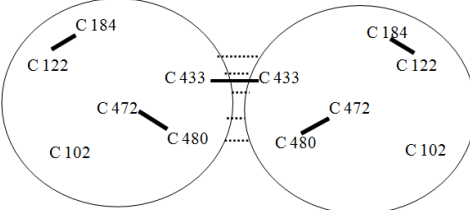
Hypothèse 2 : pour le mutant R 433 C, deux ponts disulfures sont formés entre la cystéine 433 de chacune des 2 sous-unités et la cystéine 102 de l'autre sous-unité.

2.7 Schéma (page suivante) d'un pont disulfure entre deux résidus Cys :
 (Illustration issue de la page : http://www-lemm.univ-lille1.fr/biologie/biochim/co/ch1_11.html)

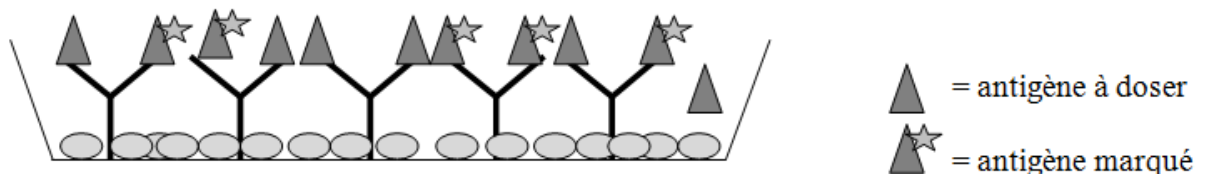


2.8 Les bandes obtenues pour le double mutant (R 433 C - C 102 S) sont les mêmes que pour le mutant (R 433 C), en conditions réductrices et non réductrices. La mutation de la cystéine 102 n'a donc aucun effet sur les ponts disulfures reliant les deux sous-unités.

2.9 **Remarque importante :** les schémas ci-dessous sont beaucoup plus complexes que ceux qui ont été admis par les correcteurs. Ils ont pour but d'aider les candidat(e)s à perfectionner leur préparation par un corrigé plus approfondi.

<p><u>TNSALP sauvage</u> : les sous-unités sont reliées par des liaisons faibles (figurées en pointillés).</p>	<p><u>TNSALP mutant (R 433 C)</u> : les sous-unités sont reliées par des liaisons faibles (en pointillés) et un pont disulfure (en trait plein) entre les Cys 433.</p>
	
<p><u>Dans le mutant (R 433 C - C 102 S)</u>, la cystéine 102 est remplacée par une sérine, mais la structure est la même que pour le mutant (R 433 C).</p>	

3.1. L'antigène à doser et l'antigène marqué sont placés simultanément, ce qui induit la compétition entre eux pour leur rétention par l'anticorps avec lequel la microplaque est sensibilisée.



3.2. Plus la concentration en antigène à doser (ajouté en quantité variable) augmente, plus la quantité d'antigènes marqués (ajoutés en quantité limitante) retenus diminue, car l'anticorps fixé au support est en quantité limitante. Après les lavages pour éliminer les molécules d'antigène non retenues, la mesure de l'activité de l'enzyme (TNSALP) sera d'autant plus forte que la concentration de l'antigène à doser est faible.

3.3. La gélatine permet de saturer les sites de la phase solide non occupés par l'anticorps.

3.4. Il assure l'élimination des antigènes (marqués ou non) non retenus par les anticorps.

ÉPREUVE DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET GÉNIE GÉNÉTIQUE

Durée de l'épreuve : 2 heures Coefficient : 1

*L'utilisation d'un dictionnaire Anglais/Français est autorisée.
L'utilisation d'une calculatrice est interdite.*

Les méganucléases : outils de recherche et de thérapie génique

Une société française de biotechnologie est spécialisée dans la production d'enzymes de restriction « à façon » : les méganucléases. Elles sont dérivées d'une endonucléase appelée I-Cre I et hautement spécifiques de très grands sites.

1. Propriétés de la nucléase I-Cre I (8 points).

La nucléase I-Cre I a été découverte en étudiant le gène codant l'ARNr du chloroplaste de *Chlamydomonas eugameto*. Dans la séquence de l'unique intron de ce gène, a été détecté un ORF qui code l'endonucléase I-Cre I ; ce gène a été cloné et exprimé dans *E. coli*.

1.1 Donner la signification des termes suivants :

- ORF ;
- ARNr ;
- Intron.

1.2 Représenter à l'aide d'un schéma légendé les éléments nécessaires à l'expression d'un gène eucaryote. Préciser le rôle de chacun d'eux.

1.3 Le **document n° 1** présente un extrait de la fiche technique des enzymes AsiS I et I-Cre I.

1.3.1 L'endonucléase AsiS I reconnaît une séquence palindromique de huit paires de bases commençant par 5'GCGAT, le site de clivage est situé après T.

Donner :

- la séquence complète de ce site ;
- les deux fragments obtenus après hydrolyse.

1.3.2 À l'aide du **document n°1**, proposer une définition générale de l'unité d'activité pour une enzyme de restriction.

1.3.3 D'après le **document n°1**, indiquer si l'enzyme I-Cre I est à coupure rare ou fréquente. En déduire l'intérêt de fournir le plasmide pGPS2 avec l'enzyme I-Cre I.

1.3.4 Calculer la concentration massique de la BSA 100X fournie.

1.3.5 Proposer un mode opératoire précis de double digestion par AsiS I et I-Cre I de pGPS2 dans un volume de réaction de 50 µL en une heure à 37°C. Justifier ces choix.

1.4 La carte de restriction du plasmide pGPS2 linéarisé par *Not* I est donnée dans le **document n° 2**.

Schématiser le résultat de la séparation par électrophorèse des fragments obtenus après digestion totale de pGPS2 (linéarisé par *Not* I) par :

AsiS I seule I-Cre I seule AsiS I et I-Cre I

Indiquer la taille des fragments obtenus et nommer les électrodes.

2. Criblage de mutants de la nucléase I-Cre I (5 points)

Sur la nucléase I-Cre I, quatre motifs protéiques responsables de la reconnaissance de séquences spécifiques de l'ADN ont été identifiés. La séquence nucléique codant pour l'un d'entre eux, composé de huit acides aminés (SKTRKTTS), a été mutée pour obtenir des protéines variantes dans leur spécificité de reconnaissance.

2.1 Le gène de I-Cre I a été synthétisé en incluant les mutations à tester puis a été cloné dans un vecteur d'expression de levure.

Le **document n° 3** présente un échantillon des différentes modifications testées.

2.1.1 Traduire la séquence de l'oligonucléotide **n° 4** en séquence protéique avec le code à une lettre, en utilisant le code génétique (**document n° 4**) ; préciser l'orientation de l'oligonucléotide n° 4 et du peptide codé.

2.1.2 Préciser l'utilité de l'« *accession number* » donné dans le **document n° 3**.

2.1.3 Le codon UUA code la leucine. Proposer un exemple de codon dérivé de UUA différent par une seule base dans chacun des cas suivants :

- mutation non sens ;
- mutation faux sens ;
- mutation silencieuse.

Justifier le choix de chacun de ces exemples.

2.2 Criblage des variants.

Pour ce criblage, le test d'activité des enzymes modifiées est présenté dans le **document n° 5**.

Des levures sont cotransfectées avec d'une part un vecteur d'expression de l'enzyme mutante, et d'autre part par un vecteur dont la construction simplifiée est représentée dans le **document n° 5**. L'activité de I-Cre I peut induire une recombinaison homologue dans les cellules de levures.

2.2.1 Expliquer à l'aide d'un schéma légendé le processus de recombinaison homologue.

2.2.2 Expliquer le principe du test présenté dans le **document n° 5**.

2.2.3 Indiquer comment sont visualisées les colonies positives.

3. Production de la nucléase I-Cre I modifiée (6 points)

Pour tester les variants efficaces, le gène codant I-Cre I modifiée a été amplifié par PCR en ajoutant un *linker* pour *Eco* RI juste avant le codon d'initiation et un *linker* *Sal* I en aval du codon stop (**document n° 6**). Le produit d'amplification, digéré par ces deux enzymes, a été cloné dans un vecteur d'expression de la série pGex-4T présenté dans le **document n° 7**.

3.1 Résumer en une ou deux phrases, sans schéma, le principe de la PCR.

3.2 Donner précisément la composition qualitative d'un milieu réactionnel (aucune justification n'est demandée).

3.3 Préciser les trois températures usuellement utilisées dans un cycle de PCR. Justifier ces valeurs de température.

3.4 Les enzymes *Eco* RI et *Sal* I sont incompatibles :

- définir le terme « incompatibles » ;

- montrer l'intérêt majeur de l'utilisation de ces deux enzymes pour le sous clonage de I-Cre I.
- 3.5 Expliquer pour quelles raisons le traitement par la phosphatase alcaline du vecteur ouvert par *Eco* RI et *Sa*/I est inutile dans ce cas.
- 3.6 Parmi les trois vecteurs de la série pGex-4T présentés dans le **document n° 7**, seul pGex-4T-1 est utilisable pour produire la nucléase I-Cre I modifiée. Expliquer pourquoi.
- 3.7 Définir les rôles des trois éléments désignés par une étoile sur le **document 7**.
- 3.8 Dans ce contexte, préciser le rôle de l'IPTG.

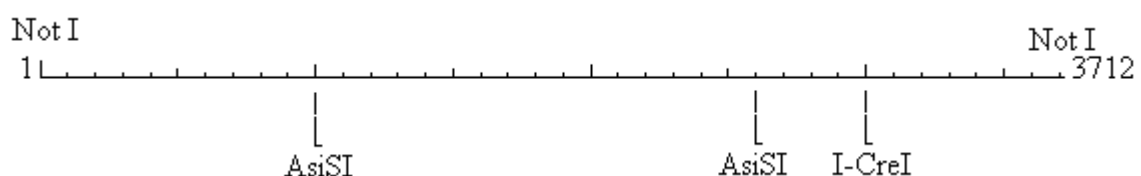
Document n° 1

Extraits de la fiche technique des enzymes AsiS I et I-Cre I

Enzyme	AsiS I	I-Cre I
	5'...GCGAT' _____ _____	5'...CGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAA...3' 3'...GCATTGATATTGCCAGGATTCATCGCTT...5'
<u>Unit Definition</u>	One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 µg of pXba linearized in 1 hour at 37°C in a total reaction volume of 50 µL.	One unit is defined as the amount of enzyme required to cleave 1 µg of pGPS2 <i>Not</i> I-linearized Control Plasmid in 1 hour at 37°C in a total reaction volume of 50 µL.
Reagents Supplied:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Buffer 4 Red (10X) ➤ BSA (100X) ➤ AsiS I 1U/µL 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Buffer I-Cre I (10X) ➤ BSA (100X) ➤ I-Cre I 1U/µL ➤ pGPS2 <i>Not</i> I-cut control plasmid 100 ng/µL
Reaction Conditions:	1X Buffer 4 red 1X 100 µg/ml BSA Incubate at 37°C.	1X Buffer I-Cre I 1X 100 µg/ml BSA Incubate at 37°C.
Buffers	Activity %	
1 Blue	50	10
2 Green	100	50
3 Yellow	100	50
4 Red	100	50
I-Cre I	25	100
When using a buffer other than the optimal (supplied) Buffer, it may be necessary to add more enzyme to achieve complete digestion.		

Document n° 2

Carte de restriction de « pGPS2 *Not* I-cut control plasmid »



Document n° 3

Séquences nucléotidiques des motifs variants de I-Cre I

N°	Access number	Séquence nucléotidique
wild type	CAA26008	tcgaagacgcgtaaaacaacttct
1	DM199304	tcaaaacgtcgtgagacagtttgg
2	DM199305	ccaaactgtctcgagacagtttgg
3	DM199306	tcaaaacgtcgtacgacgtttga
4	DM199307	tcgggacgtcgtacgacgtcccga
5	DM199308	tcggaacgtcgtacgacgttccga
6	DM199309	tcggtacgtcgtacgacgtaccga

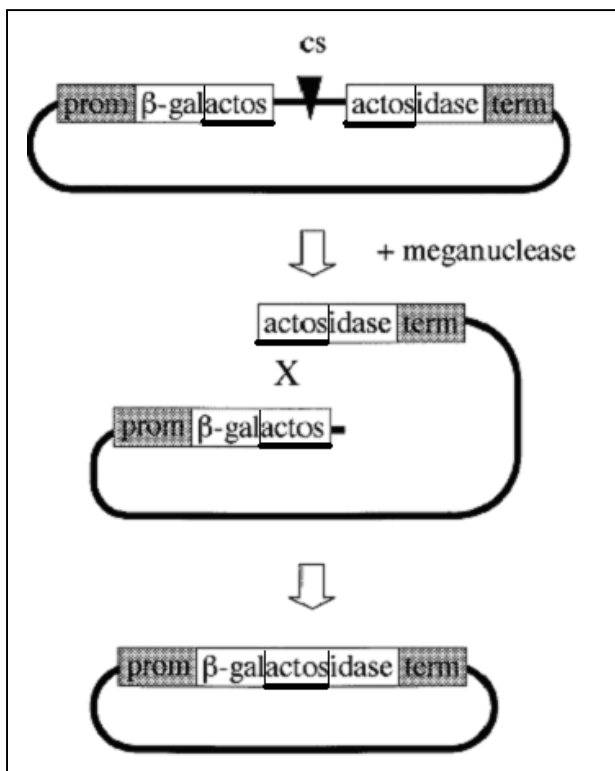
Document n° 4

Code génétique

		Second letter					
		U	C	A	G		
U	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	C
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys		
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA } Stop	UGA } Stop		
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG } Stop	UGG } Trp		
C	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	C
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg		
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg		
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg		
A	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	C
		AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser		
		AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg		
		AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg		
G	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	C
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly		
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly		
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly		

Codes à une lettre et à trois lettres pour les acides aminés :

A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V
Ala Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp Tyr Val



Document n° 5

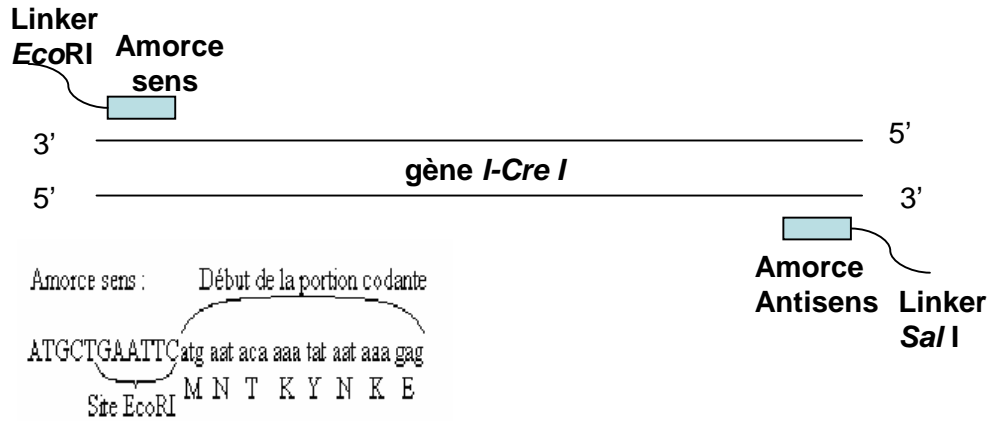
Functional test of I-Cre I

In yeast, and mammalian cells, DNA cleavage between two direct repeats is known to induce a very high level of homologous recombination between the repeats. The recombination pathway, often referred to as single-strand annealing (SSA), removes one repeat unit and all intervening sequences.

We thus constructed a SSA reporter vector, with two truncated, non-functional copies of the bacterial LacZ gene and an I-Cre I cut site (cs) within the intervening sequence, in a yeast plasmid. Cleavage of the cut site should result in a unique, functional LacZ copy that can be detected by X-gal staining.

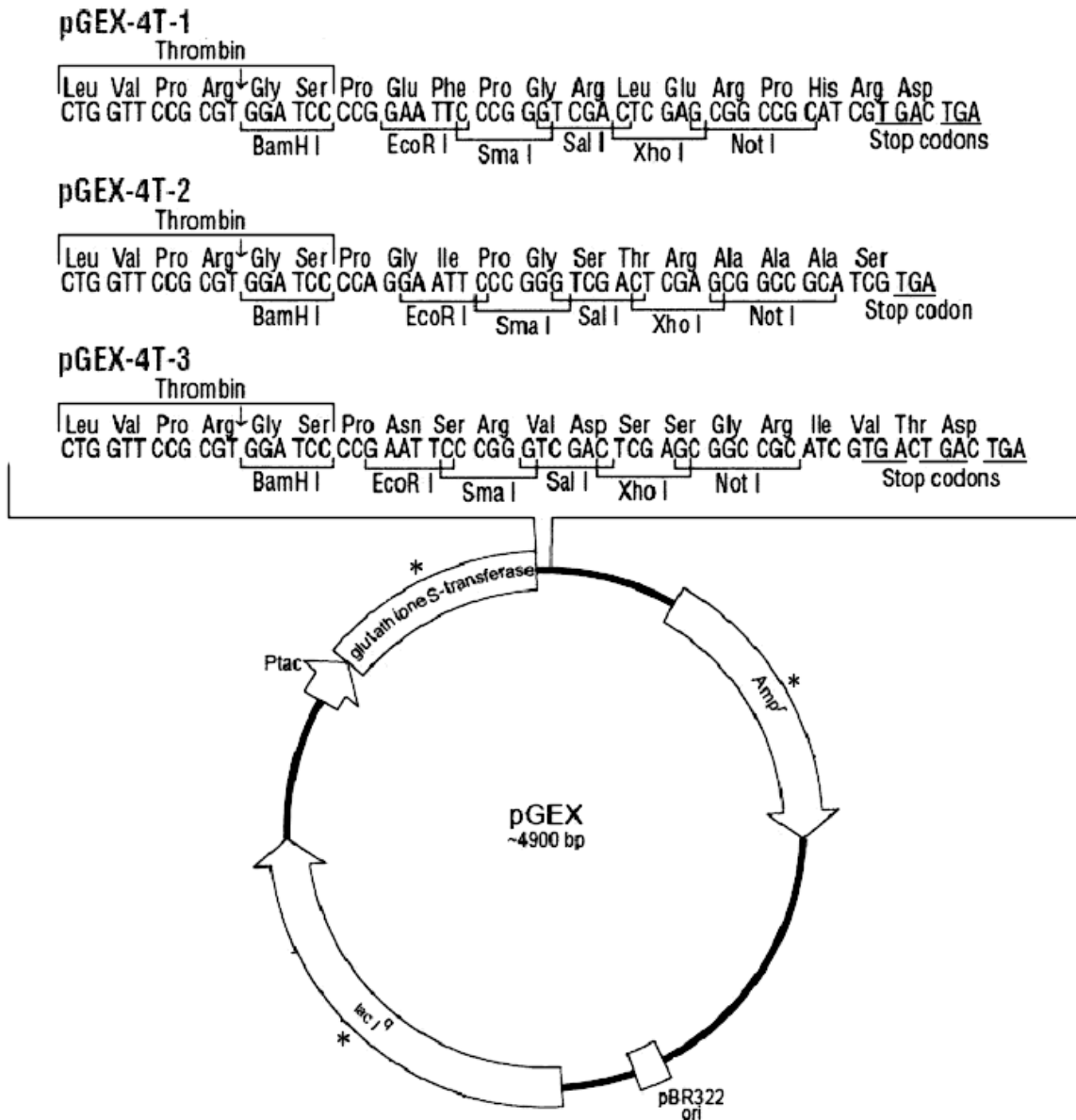
Document n° 6

Schéma de la stratégie d'amplification de l'insert à cloner



Document n° 7

Vecteurs d'expression de la série pGex-4T



Ptac : promoteur hybride entre Plac et Ptrp

Proposition de corrigé de l'épreuve de Biologie Moléculaire et Génie Génétique

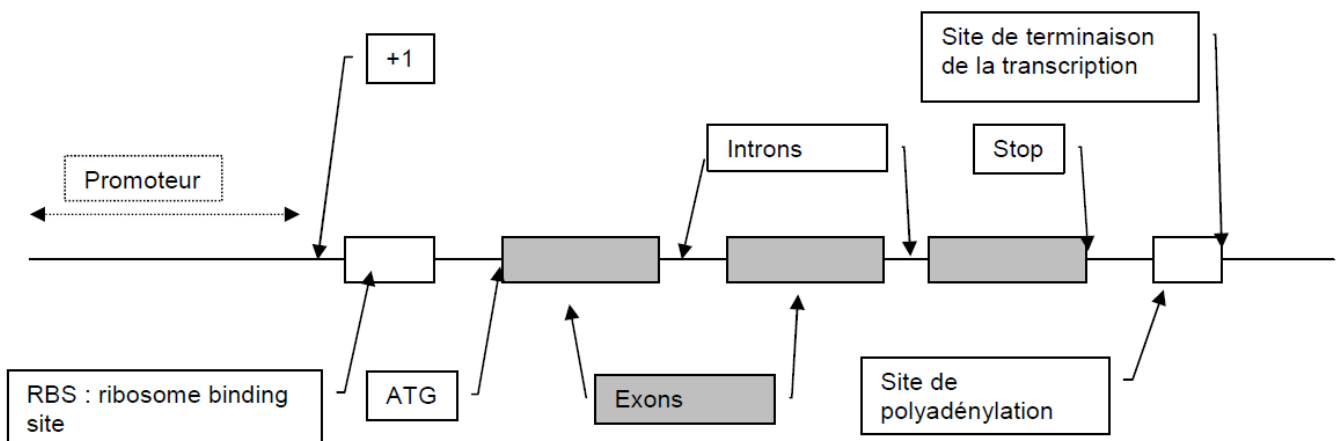
Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

- 1.1. ORF : « open reading frame ». Cadre ouvert de lecture, commençant par un codon ATG et finissant par un codon stop = gène potentiel
Intron : portion non codante d'un gène séparant les exons codants et épissés lors de la maturation des ARNm
ARNr : ARN ribosomal impliqué dans la traduction des ARNm en protéines constitutif des sous unités ribosomales

1.2. Le schéma annoté devait présenter les éléments ci-dessous :

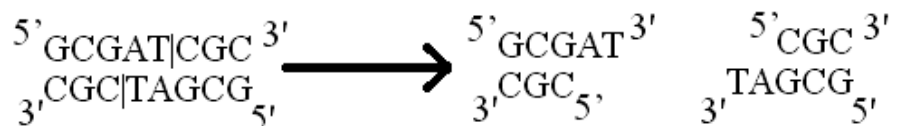
- la séquence codante (exons et introns),
- signaux nécessaires à la transcription : promoteur, contenant le site de fixation de l'ARN polymérase (début de la transcription) et un élément de cis régulation où se fixera une protéine trans-activatrice ou trans-inhibitrice, signal de terminaison.
- signaux nécessaires à la maturation des ARNm : polyadénylation.
- signaux nécessaires à la traduction : RBS, AUG et codon stop

D'où :



1.3.

1.3.1. La coupure du site est donc la suivante :



1.3.2. Unité : quantité d'enzyme nécessaire à la digestion d'un microgramme d'ADN contenant au moins une séquence cible en une heure à 37°C dans le tampon optimal de l'enzyme et dans un volume défini.

1.3.3. L'enzyme I-Cre I est à coupure rare. pGPS2 est fourni avec I-Cre I car il contient (au moins) un site de restriction très long (introuvable dans le commerce) pour cette enzyme, et il est donc utilisé dans la définition de l'unité de cette enzyme.

1.3.4. $\rho_{BSA} = 100 \mu\text{g/mL} \times 100 = 10 \text{ mg/mL}$

1.3.5. Le tableau de digestion sous un volume final de 50 µL est donc le suivant :

Réactif	Volume	Justification
1 µg of pGPS2 <i>Not</i> I-linearized	10 µL	Le document 1 indique 1 µg de pGPS2, sa concentration est de 100 ng/µL, il faut donc $V_{\text{pGPS2}} = 1 / 0,100 = 10 \mu\text{L}$
BSA 100 X	0,5 µL	Il faut diluer la solution fournie au 1/100 ^{ème} , donc $V_{\text{BSA}} = 50/100 = 0,5 \mu\text{L}$
Buffer (2, 3 ou 4) 10X	5 µL	Il faut choisir un des tampons pour lesquels les activités sont maximales pour les 2 enzymes à la fois : 2, 3 ou 4 donnent 100 % d'activité de AsiS I et 50 % seulement pour I CreI, mais les autres sont de performances inférieures. Tampon 10 x, donc $V_{\text{Buffer}} = 50 / 10 = 5 \mu\text{L}$
AsiS I 1 U pour 100 %	1 µL	Cette enzyme aura une excellente activité
I-Cre I 2 U pour avoir 100 %	2 µL	Cette enzyme aura une bonne activité en plaçant 2 fois plus d'enzyme (elle n'est active qu'à 50 % dans le tampon choisi)
Eau de qualité « Biologie Moléculaire » (bidistillée)	31,5 µL	Ce volume permet de compléter à 50 µL.

Conditions de la digestion : durant 1 heure à T = 37°C.

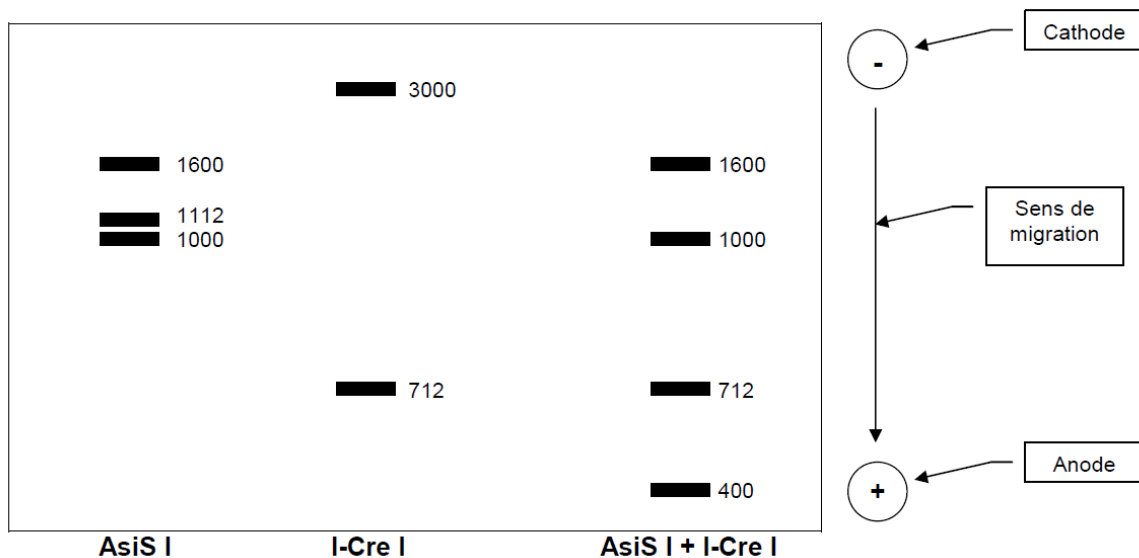
Ordre d'introduction des réactifs :

1 = eau « BM » en premier, car elle représente le volume le plus élevé, pour assurer la dilution de tous les réactifs et la possibilité de déposer les faibles volumes par aspiration/refoulement

2 = tampon 3 = ADN à digérer ou BSA 4 = BSA ou ADN à digérer

5 et 6 = les enzymes sont toujours ajoutées en dernier, afin d'être placées dans leurs conditions optimales de fonctionnement (tampon dilué 1X). Cette addition correspond au début de la digestion.

1.4. On devait trouver sur ce schéma les informations suivantes :



2.1.1. 5' tcg gga cgt cgt acg acg tcc cga 3'
NH₂ S G R R T T S R COOH

2.1.2. C'est le numéro d'accèsion dans les bases de données, il permet un accès rapide et précis aux séquences dans les banques génomiques et protéomiques.

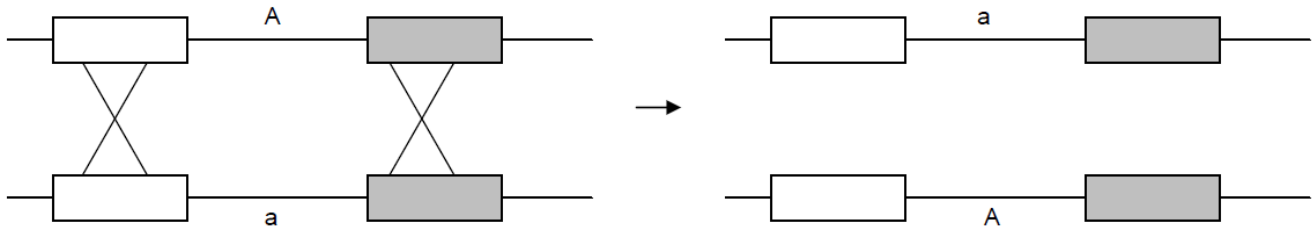
2.1.3. Mutation « non sens » par la transformation de UUA en codon stop UAA ou UGA
Mutation « faux sens » : elle transforme UUA en un codon pour un autre acide aminé, par exemple UUU (Phe)

Mutation silencieuse : le codon est différent mais l'acide aminé correspondant est identique et la protéine n'est donc pas modifiée, par exemple si UUA(Leu) → UUG (Leu)

2.2.1. Un schéma simple permet de placer les événements et éléments suivants :

- deux séquences d'ADN identiques ou proches
- une jonction covalente entre ces deux séquences
- coupure des deux régions homologues
- échange des brins entre les deux régions associées
- ligature des brins recombinés

D'où le bilan :



2.2.2. En hydrolysant l'ADN au site *cs*, I-Cre I crée un ADN linéaire. Les deux régions homologues des fragments de gène de la β -galactosidase (actos) s'alignent et le système de recombinaison homologue de la levure échange les deux séquences, ce qui conduit à la création d'un nouveau vecteur circulaire contenant le gène ayant retrouvé son intégrité. Donc la coupure du vecteur par I-Cre I permet d'obtenir une β -galactosidase active.

2.2.3. Les colonies positives sont colorées en bleu par l'hydrolyse, par la β -galactosidase, du substrat artificiel X-Gal (chromogène incolore) libérant un chromophore bleu intracellulaire.

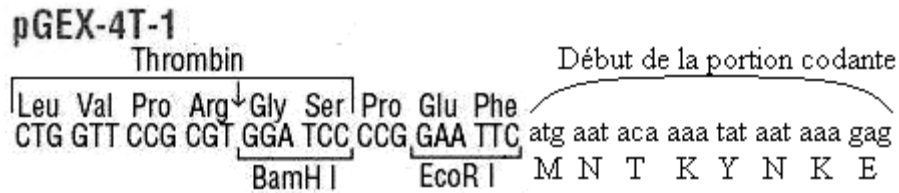
3.1. C'est une technique d'amplification par polymérisation en chaîne d'une séquence d'ADN double brin, utilisant une ADN polymérase thermostable et un couple d'amorces spécifiques des régions encadrant la séquence d'ADN cible à amplifier. Pour cela une succession de cycles constitués de trois étapes (voir question 3.3.) s'enchaînent.

3.2. Tampon adapté au fonctionnement optimal de l'enzyme
Enzyme : Taq polymérase ou ADN polymérase thermostable
dNTPs : mélange de désoxyribonucléotides triphosphates
 Mg^{2+} : cofacteur métallique indispensable à l'activité de l'ADN polymérase
ADN matrice : gène I-Cre I modifié
Couple d'amorces spécifiques de l'ADN cible (amorces sens et antisens)

3.3. Les 3 étapes du cycle :

- $T_1 = 90-95\text{ }^\circ\text{C}$: la dénaturation thermique provoque la rupture des liaisons hydrogène dans la matrice et donc permet d'obtenir des molécules simple brin
- $T_2 = T_{m_{\text{amorces}}} - (5 \text{ à } 10)\text{ }^\circ\text{C}$: la température proche mais inférieure au T_m des amorces favorise la formation d'assemblages double brin entre les brins de la matrice et les amorces
- $T_3 = 70-72\text{ }^\circ\text{C}$: l'élongation a lieu à la température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase thermostable utilisée.

- 3.4. Incompatibles : ce sont des enzymes de restriction générant des extrémités cohésives ne pouvant s'associer ensemble. De ce fait, l'insert ne peut se positionner que dans un seul sens dans le vecteur, c'est un clonage directionnel.
- 3.5. La phosphatase alcaline permet d'hydrolyser les phosphates en 5' des extrémités du vecteur ouvert pour éviter que la ligature ne puisse le refermer sur lui-même, et cela dans le cas où les deux extrémités seraient compatibles : dans le cas étudié ici, cela n'arrivera pas car les extrémités du vecteur sont générées par deux enzymes de restriction incompatibles.
- 3.6. La phase de lecture lors de la traduction n'est conservée qu'avec le vecteur pGEX-4T-1 :



- 3.7. Les éléments à commenter sont :
- *Amp^r* : marqueur de sélection qui confère la résistance à l'ampicilline, permettant de sélectionner les cellules efficacement transfectées par le pGEX
 - *LacI^q* : gène codant le répresseur très actif de l'opéron lactose, il se fixe sur la partie Plac du promoteur Ptac et inhibe la transcription
 - GST sert d'étiquette (« tag »), c'est une protéine qui se lie spécifiquement au glutathion, ce qui permet de purifier la protéine de fusion GST-I-Cre I par chromatographie d'affinité
- 3.8. **L'IPTG** est un inducteur gratuit qui neutralise le répresseur codé par *LacI*, d'où l'activation de la transcription du gène codant la protéine de fusion GST-I-Cre I.