

# **Annales du Brevet de Technicien Supérieur**

## **BIOTECHNOLOGIES**

**2016-2017**

**Éditions UPBM-ÉDILION**

La rédaction des Annales du BTS Biotechnologies Sessions 2016-2017 a été coordonnée par Brunehild SALLEN.

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

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

« Les remarques des fautes d'un ouvrage se feront avec modestie et civilité, et la correction en sera soufferte de la mesme sorte »

(*Statuts & Reglemens de l'Academie françoise du 22 février 1635, art. XXXIV*).

Illustration de couverture :

*Reconstitution 3D d'une cellule eucaryote avec son noyau en bleu et des vésicules d'encytose en jaune.*

Crédit des photos de couverture : © Institut Pasteur / Neetu GUPTA-ROSSI

---

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

## Table des matières

|   |     |
|---|-----|
| BTS Biotechnologies : Définition de la nature des épreuves .....      | 4   |
| Session 2016 : Sujets .....   | 5   |
| 2016 - U11 : Mathématiques.....                                       | 6   |
| 2016 - U12 : Sciences physiques et chimiques .....                    | 10  |
| 2016 - U2: Biologie moléculaire et génie génétique .....              | 18  |
| 2016 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines..... | 26  |
| 2016 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire .....                 | 33  |
| 2016 - U42 : Biologie cellulaire .....                                | 42  |
| Session 2016 : Éléments de corrigé.....                               | 48  |
| 2016 - U11 : Mathématiques.....                                       | 49  |
| 2016 - U12 : Sciences physiques et chimiques .....                    | 51  |
| 2016 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique .....             | 55  |
| 2016 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines..... | 59  |
| 2016 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire .....                 | 63  |
| 2016 – U42 : Biologie cellulaire .....                                | 67  |
| Session 2017 : Sujets .....   | 71  |
| 2017 - U11 : Mathématiques.....                                       | 72  |
| 2017 - U12 : Sciences physiques et chimiques .....                    | 76  |
| 2016 - U2: Biologie moléculaire et génie génétique .....              | 87  |
| 2016 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines..... | 93  |
| 2016 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire .....                 | 102 |
| 2016 - U42 : Biologie cellulaire .....                                | 109 |
| Session 2017 : Éléments de corrigé.....                               | 116 |
| 2017 - U11 : Mathématiques.....                                       | 117 |
| 2017 - U12 : Sciences physiques et chimiques .....                    | 120 |
| 2017 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique .....             | 124 |
| 2017 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines..... | 127 |
| 2017 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire .....                 | 130 |
| 2017 – U42 : Biologie cellulaire .....                                | 133 |
| Travaux Pratiques de Biotechnologies .....                            | 136 |
| U51 : TP de biologie moléculaire et génie génétique .....             | 137 |
| U52 : TP de biochimie structurale et fonctionnelle des protéines..... | 139 |
| U53 : TP de microbiologie et génie fermentaire .....                  | 141 |
| U54 : TP de biologie et technologies cellulaires .....                | 143 |
| Rapport de stage et soutenance .....                                  | 145 |
| U6 : Rapport de stage et soutenance .....                             | 146 |

# BTS Biotechnologies : Définition de la nature des épreuves

## TABLEAU DES ÉPREUVES

| Désignation  |   | Coefficients | Nature de l'épreuve | Durée  |
|--|---|--------------|---------------------|--------|
| <i>Épreuves écrites</i>                                    |   |              |                     |        |
| E1 : mathématiques et sciences physico-chimiques           | Mathématiques                           | 1            | écrite              | 2 h    |
|  | Sciences physiques et chimiques         | 1            | écrite              | 2 h    |
| E 2 : biologie moléculaire et génie génétique              |   | 1            | écrite              | 2 h    |
| E 3 : biochimie structurale et fonctionnelle des protéines |   | 1            | écrite              | 2 h    |
| E4 : Biologie des procaryotes et des eucaryotes            | Microbiologie et génie fermentaire      | 1            | écrite              | 2 h    |
|  | Biologie cellulaire                     | 1            | écrite              | 2 h    |
| <i>Épreuves pratiques</i>                                  |   |              |                     |        |
| E5 : travaux pratiques de biotechnologies :                | Biologie moléculaire et génie génétique | 1            | CCF / ponctuelle    | 2 x 3h |
|  | Biochimie des protéines                 | 1            | CCF / ponctuelle    | 2 x 3h |
|  | Microbiologie et génie fermentaire      | 1            | CCF / ponctuelle    | 2 x 3h |
|  | Biologie cellulaire                     | 1            | CCF / ponctuelle    | 2 x 3h |
| <i>Épreuves orales</i>                                     |   |              |                     |        |
| Rapport de stage et soutenance                             |   | 4            | Orale               | 50 min |
| TOTAL  |   | 14           |                     |        |

### *Épreuve facultative*

|  |   |       |        |
|--|---|-------|--------|
| Langue vivante étrangère (épreuve orale, seuls les points au dessus de la moyenne sont pris en compte) | 1 | Orale | 20 min |
|--|---|-------|--------|

# **Session 2016 : Sujets**

## 2016 - U11 : Mathématiques

*Durée 2 h – coefficient 1*

**Matériel autorisé :** Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

**Document à rendre avec la copie :** Annexe exercice 1

### EXERCICE 1 (11 points)

Le **Ténébrion meunier** (*Tenebrio molitor*) est un insecte de l'ordre des coléoptères, de la famille des ténébrionidés. Il est capable de vivre dans des denrées stockées très sèches, notamment dans la farine, d'où son nom de meunier. (Wikipédia).

De par la facilité de son élevage, cet insecte est très utilisé dans les laboratoires de recherches pour des études physiologiques sur son développement et sur son endocrinologie : sa nymphe est très sensible à l'hormone juvénile par exemple. Le vers est également un très bon appât notamment pour la pêche de la truite en étang.

**Les parties A, B et C peuvent être traitées de façon indépendante.**

#### Partie A

Kevin, un apprenti boulanger, décide d'élever des vers de farine pour son club de pêche. Il commence son élevage 7 mois avant l'ouverture de la saison de pêche. Dans un large bac adapté qu'il entrepose à 27°C, il dispose de la farine et 500 vers, il laisse se faire les choses. Il suit l'évolution du nombre de vers et obtient les résultats suivants :

|                              |     |     |      |      |      |      |      |      |       |       |
|------------------------------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| Nombre de quinzaines : $t_i$ | 0   | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8     | 9     |
| Nombre de vers : $N_i$       | 500 | 749 | 1122 | 1681 | 2518 | 3772 | 5650 | 8464 | 12678 | 18992 |

- Kevin se fait la remarque suivante : « chaque quinzaine la population augmente d'environ 50% ». Expliquer cette modélisation. Est-elle réaliste sur le long terme ?
- Kevin souhaite connaître le nombre de vers dont il disposera lors de l'ouverture de la prochaine saison. Il présente ses données à son professeur de mathématiques qui lui propose un nouveau modèle à partir du changement de variable suivant

$$y_i = \ln\left(\frac{33000}{N_i} - 1\right)$$

- Compléter le tableau donné en annexe. Arrondir au centième.
- Déterminer, à l'aide de la calculatrice, une équation de la droite d'ajustement  $\Delta$  de  $y$  en  $t$  par la méthode des moindres carrés. Arrondir les coefficients au centième.
- Parmi les propositions suivantes quelle est celle qui estime le mieux le nombre de vers pour l'ouverture de la saison de pêche? Justifier.

|       |        |      |       |
|-------|--------|------|-------|
| 33000 | 146000 | 9200 | 30300 |
|-------|--------|------|-------|

3. Maxime, un ami du club affirme qu'à ce rythme-là, le nombre de vers va dépasser 50 000. Kevin a déterminé que le nombre de vers en fonction du nombre de quinzaines  $t$  est donné approximativement par le nombre :

$$N(t) = \frac{33000}{1+75e^{-0,48t}}$$

Kévin peut-il confirmer l'affirmation de Maxime ? Justifier votre réponse.

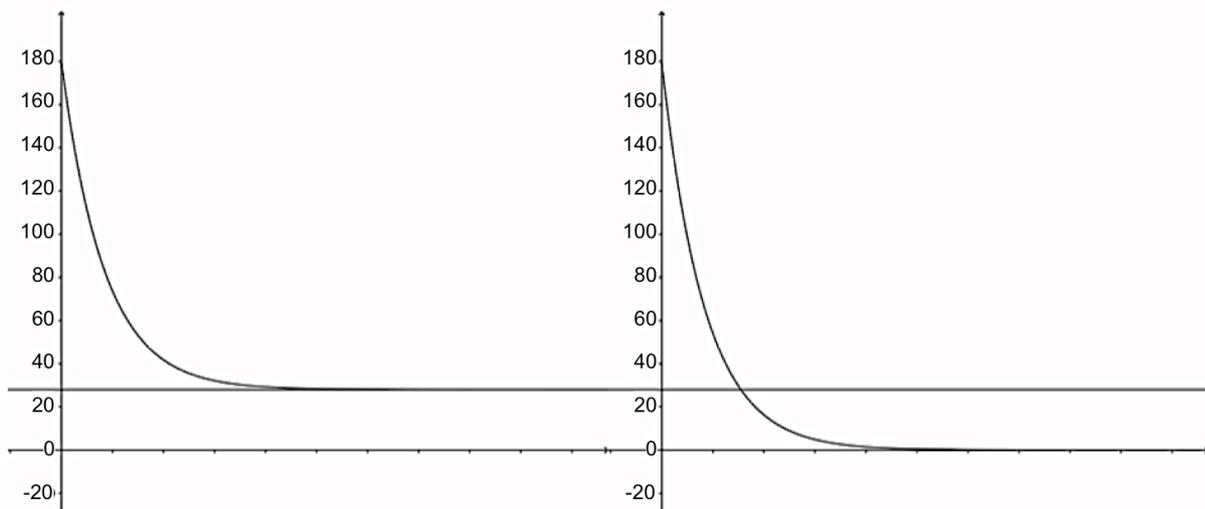
## Partie B

De retour à l'école, Kevin apprend que la température de refroidissement du pain à la sortie du four dépend du type de pain et de la température ambiante supposée constante de la pièce dans laquelle il est entreposé.

On note  $a$  cette température constante de la pièce, exprimée en degrés Celsius.

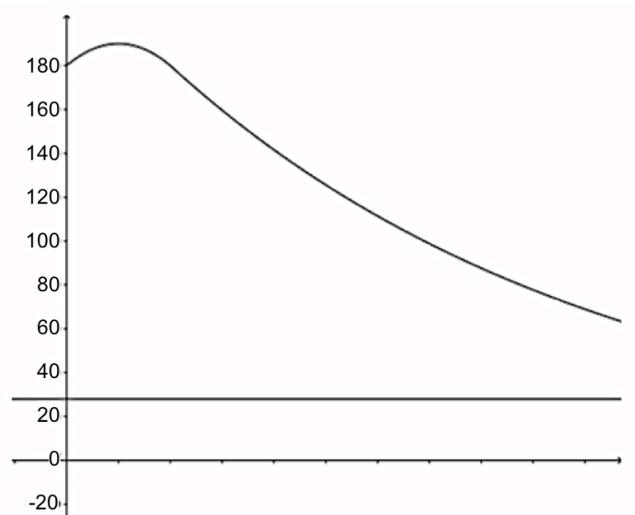
Pour  $t \geq 0$ , on désigne par  $y(t)$  la température du pain au bout d'un temps  $t$  après sa sortie du four. La durée  $t$  est exprimée en heures et la température  $y(t)$  est exprimée en degrés Celsius.

Question préliminaire : parmi les trois courbes suivantes, quelle est celle qui correspond à l'évolution de la température du pain à la sortie du four en fonction du temps ? Argumenter votre réponse.



Courbe 1

Courbe 2



Courbe 3

La fonction  $y$  vérifie l'équation différentielle :  $(E) : y'(t) + 6y(t) = 6a$ .

## I Résolution d'une équation différentielle

Dans cette partie on considère que le pain est entreposé dans une pièce dont la température constante est  $a$ . À la sortie du four, c'est-à-dire à l'instant  $t = 0$ , le pain est à une température de  $180^\circ\text{C}$ .

- Déterminer les solutions sur  $[0 ; +\infty[$  de l'équation  $(E_0) : y' + 6y = 0$ .
- Soit  $g$  la fonction définie sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  par  $g(t)=k$ , où  $k$  est une constante réelle dépendant de  $a$ . Déterminer  $k$  pour que la fonction  $g$  soit une solution particulière de l'équation différentielle  $(E)$ .
- En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle  $(E)$ .
- Démontrer que la fonction  $h$  définie sur l'intervalle  $[0 ; +\infty[$  par  $h(t) = (180 - a) e^{-6t} + a$  est la solution de  $(E)$  correspondant à la condition initiale donnée.

## II Étude d'une fonction

- Dans cette question, le pain est entreposé à une température de  $28^\circ\text{C}$ ,
  - Soit  $f$  définie pour tout  $t \geq 0$  par  $f(t) = 152e^{-6t} + 28$ .  
Vérifier que  $f$  est la solution de l'équation  $(E)$  dans le contexte proposé.
  - Étudier les variations de  $f$  sur l'intervalle  $[0 ; +\infty[$ .
  - Déterminer la température  $\theta$  du pain une demi-heure après la sortie du four.  
On donnera une valeur approchée de  $\theta$  à un degré près.
  - Le boulanger sort une fournée de pains du four. Déterminer par la méthode de votre choix au bout de quelle durée  $D$  le pain sera à une température de  $62^\circ\text{C}$ .  
On donnera une valeur approchée de  $D$  à une minute près.
- Quelle devrait être la température, au degré près, de la pièce dans laquelle est entreposé le pain afin que ce pain, sorti du four à 16h, soit à une température de  $30^\circ\text{C}$  à 16h30 ?

## EXERCICE 2 (9 points)

*La mesure précise des volumes est d'une grande importance au laboratoire. Elle peut être effectuée à l'aide d'une pipette jaugée ou graduée. Une pipette sert à prélever un volume précis d'un liquide (de 1 à 100 ml). Elles sont utilisées pour réaliser des dosages.*

### Partie A : défauts de fabrication et conformité

On rappelle que la probabilité qu'un événement  $E$  se réalise sachant que l'événement  $F$  (de probabilité non nulle) est réalisé se note  $P_F(E)$  et vérifie :

$$P_F(E) = \frac{P(E \cap F)}{P(F)}$$

L'entreprise AGOREX fabrique et distribue des pipettes jaugées en verre. Deux chaînes de production (A et B) permettent de répondre à la demande journalière.

- 55 % des pipettes viennent de la chaîne de production A et 2,6 % des pipettes de cette chaîne sont inutilisables ;
- 3,6 % des pipettes provenant de la chaîne de production B sont inutilisables.

On choisit au hasard une pipette dans le stock journalier de l'entreprise et on

note :

- A l'événement : « La pipette est sortie de la chaîne de production A » ;
- B l'événement : « La pipette est sortie de la chaîne de production B » ;
- I l'événement : « La pipette est inutilisable »

1. Calculer à  $10^{-3}$  près la probabilité qu'une pipette soit inutilisable.
2. On suppose que la probabilité (arrondie au centième) qu'une pipette soit inutilisable est égale à 0,03.  
On prélève au hasard un échantillon de 100 pipettes dans le stock de l'entreprise. Le nombre de pipettes produites est suffisamment important pour que l'on assimile ce prélèvement à un tirage avec remise de 100 pipettes. On considère la variable aléatoire  $X$  qui, à tout prélèvement de 100 pipettes, associe le nombre de pipettes inutilisables.
  - (a) Déterminer la loi suivie par  $X$  en précisant ses paramètres.
  - (b) Quelle est la probabilité de l'événement : «au moins une des pipettes est inutilisable» ?  
On arrondira cette probabilité au millième.
3. Pour répondre au cahier des charges de certains laboratoires, l'entreprise AGOREX est amenée à effectuer des tests de conformité. Une pipette utilisable est dite conforme si sa contenance est comprise entre 98 ml et 102 ml. On note  $C$  la variable aléatoire qui à chaque pipette prise au hasard dans le stock d'un laboratoire associe sa contenance (en millilitres). On admet que  $C$  suit une loi normale de moyenne 100 et écart type  $\sigma = 1,021$ . On prélève au hasard une pipette dans la production.
  - (a) Quelle est la probabilité, à  $10^{-4}$  près, pour que cette pipette soit conforme?
  - (b) Au final sur un lot de 1 000 pipettes produites combien seraient conformes ?

## Partie B : Estimation

Le laboratoire BIOMATOP effectuant des analyses se fournit en pipettes auprès de l'entreprise AGOREX.

Dans cette partie on considère une grande quantité de pipettes livrées au laboratoire. On considère un échantillon de 200 pièces prélevées au hasard dans cette livraison. La livraison est assez importante pour que l'on puisse assimiler ce tirage à un tirage avec remise. Dans cet échantillon, on constate que 5 pipettes sont cassées.

1. Donner une estimation ponctuelle de la proportion inconnue  $p_c$  des pipettes cassées de cette livraison.
2. Déterminer un intervalle de confiance de la proportion  $p_c$  avec le coefficient de confiance de 95%.

## Annexe : exercice 1

|                              |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| Nombre de quinzaines : $t_i$ | 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8     | 9     |
| Nombre de vers : $N_i$       | 500  | 749  | 1122 | 1681 | 2518 | 3772 | 5650 | 8464 | 12678 | 18992 |
| $Y_i$                        | 4,17 | 3,76 |      |      | 2,49 |      |      | 1,06 | 0,47  |       |

## 2016 - U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée 2 h – coefficient 1

**Matériel autorisé :** Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Cirulaire n°99-186, 16/11/1999).

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.

### I. ITER, UNE ÉNERGIE POUR NOTRE AVENIR (15 points)

**Les deux parties de l'exercice sont indépendantes.**

Le programme ITER (International Thermonuclear Experimental Reactor) à Cadarache, est un projet qui rassemble les États-Unis, l'Union européenne (UE), la Corée, l'Inde, la Chine, la Russie et le Japon. La phase d'exploitation est officiellement programmée de 2022 à 2042.

ITER a pour ambition de construire le premier réacteur de fusion qui puisse fournir plus d'énergie qu'il n'en consomme. Pour cela il faut reproduire les réactions nucléaires de fusion qui se produisent à l'intérieur des étoiles. Dans le cadre d'ITER, il s'agit de tester la fusion de deux atomes légers : le deutérium et le tritium, deux isotopes de l'hydrogène.

*Source : d'après [www.iter.org](http://www.iter.org)*

Données :

- unité de masse atomique  $1u = 1,66054 \times 10^{-27} \text{ kg}$
- célérité de la lumière dans le vide  $c = 2,998 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$
- constante d'Avogadro  $N_A = 6,023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
- méga-électron-volt  $1 \text{ MeV} = 1,602 \times 10^{-13} \text{ J}$
- dans le système international d'unités la puissance s'exprime en watt (W)
- mégawatt  $1 \text{ MW} = 1 \times 10^6 \text{ W}$
- l'énergie correspondant au fonctionnement pendant une durée  $\Delta t$  d'un dispositif de puissance  $P$  se calcule grâce à la relation :  $E = P \cdot \Delta t$  avec  $E$  en joule (J),  $\Delta t$  en seconde (s),  $P$  en watt (W).

|   | Neutron   | Hélium            | Deutérium        | Tritium          |
|---|-----------|-------------------|------------------|------------------|
| Symbole du noyau ou de la particule     | ${}_0^1n$ | ${}_2^4\text{He}$ | ${}_1^2\text{H}$ | ${}_1^3\text{H}$ |
| Masse en unité de masse atomique (u)    | 1,00866   | 4,00150           | 2,01355          | 3,01550          |
| Masse molaire (en $\text{g.mol}^{-1}$ ) | 1,09      | 4,00              | 2,01             | 3,02             |

#### 1. Autour du tritium

À la différence du deutérium, le tritium est radioactif. Il émet un rayonnement  $\beta^-$  de faible énergie. Sa demi-vie (ou période) est de 12,3 ans. Il est très rare à l'état naturel.

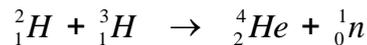
**1.1.** Donner la composition du noyau de tritium.

**1.2.** Indiquer la nature de la particule  $\beta^-$ .

- 1.3. Écrire l'équation de la désintégration du tritium  ${}^3_1\text{H}$ , sachant qu'il se forme un isotope de l'hélium  ${}^3_2\text{He}$ . Citer les lois utilisées.
- 1.4. Définir le temps de demi-vie (ou période)  $t_{1/2}$  d'un échantillon de noyaux radioactifs.
- 1.5. La constante radioactive du tritium vaut  $\lambda = 5,62 \times 10^{-2} \text{ an}^{-1}$ .  
À partir de la valeur de la constante radioactive, retrouver la valeur du temps de demi-vie (ou période)  $t_{1/2}$  donnée dans le texte. La démonstration de la relation utilisée n'est pas demandée.

## 2. Étude de la réaction de fusion

La réaction de fusion mise en œuvre dans le projet ITER entre un noyau de deutérium et un noyau de tritium est :



- 2.1. Donner l'expression littérale de la variation de masse ( $\Delta m$ ) au cours de cette réaction de fusion. Calculer sa valeur en unité de masse atomique ( $u$ ) puis en kilogramme ( $kg$ ).
- 2.2. Exprimer littéralement l'expression de l'énergie  $E_1$  produite par cette réaction de fusion entre un noyau de deutérium et un noyau de tritium. Calculer sa valeur en MeV.
- 2.3. Le réacteur ITER ne produira pas d'électricité. Un des principaux objectifs techniques est de démontrer que l'on peut atteindre une puissance de l'ordre de 500 MW pendant plusieurs centaines de secondes, à partir d'une puissance fournie pour faire fonctionner le dispositif dix fois plus faible. Montrer que le fonctionnement du réacteur pendant 400 secondes à la puissance de 500 MW libère une énergie  $E_2$  qui vaut  $1,25 \times 10^{24} \text{ MeV}$ .
- 2.4. Calculer le nombre de noyaux de tritium nécessaires pour obtenir cette énergie libérée.
- 2.5. En déduire la masse de tritium nécessaire, exprimée en kilogramme.
- 2.6. « Les réactifs dont le tritium (radioactif) sont utilisés en faibles quantités, surtout par comparaison avec les tonnes d'uranium des réacteurs à fission, [...] qui génèrent des produits de fission radioactifs. Les produits de la fusion, obtenus en faibles quantités, sont des neutrons et des noyaux d'hélium. »

Source : d'après [www.energethique.com](http://www.energethique.com)

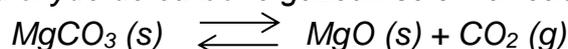
Indiquer si l'appellation de réacteur « propre » concernant la contamination radioactive, est correcte.

## II. OXYDE ET HYDROXYDE DE MAGNÉSIUM : THERMOCHIMIE ET SOLUBILITÉ (18 points)

Les parties 1 et 2 sont indépendantes.

### 1. Décomposition du carbonate de magnésium

Le carbonate de magnésium  $\text{MgCO}_3(s)$  est un solide de couleur blanche, qui se trouve à l'état minéral dans la nature. C'est le composant d'une roche appelée magnésite. Sous forme de poudre, le carbonate de magnésium est utilisé comme anti-transpirant dans de nombreux sports (haltérophilie, saut à la perche, ...). Il est improprement appelé magnésie. Chauffé à plus de 800 °C, le carbonate de magnésium se décompose en oxyde de magnésium solide et en dioxyde de carbone gazeux selon la réaction d'équation :



On donne dans le tableau ci-dessous les valeurs à 298 K des enthalpies standard de formation  $\Delta_f H_{298}^0$  et des entropies molaires standard  $S_{m,298}^0$  des espèces chimiques intervenant dans l'équation de réaction ci-dessus.

|                     | $\Delta_f H_{298}^0$ en $\text{kJ.mol}^{-1}$ | $S_{m,298}^0$ en $\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ |
|---------------------|--|--|
| $\text{MgCO}_3$ (s) | - 1095,8                                     | 65,8   |
| $\text{MgO}$ (s)    | - 601,6                                      | 26,9   |
| $\text{CO}_2$ (g)   | - 393,5                                      | 213,6  |

Constante des gaz parfaits :  $R = 8,31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

1.1. Enthalpie standard de réaction  $\Delta_r H_{298}^0$  relative à cette réaction à 298 K :

1.1.1. Exprimer littéralement l'enthalpie standard de réaction  $\Delta_r H_{298}^0$  relative à cette réaction à 298 K.

1.1.2. Calculer sa valeur. La réaction est-elle endothermique ou exothermique ? Justifier.

1.2. Entropie standard de réaction  $\Delta_r S_{298}^0$  relative à cette réaction à 298 K :

1.2.1. Exprimer littéralement l'entropie standard de réaction  $\Delta_r S_{298}^0$  relative à cette réaction à 298 K.

1.2.2. Calculer sa valeur. Son signe était-il prévisible ? Justifier.

1.3. Enthalpie libre standard  $\Delta_r G_{298}^0$  relative à cette réaction à 298 K et constante d'équilibre :

1.3.1. Déterminer la valeur de la constante d'équilibre  $K^0$  de cette réaction à 298 K. Indiquer si la réaction est favorisée à 298 K. Justifier.

1.3.2. Commenter le choix de températures supérieures à 800 °C pour réaliser cette transformation.

## 2. Étude de la solubilité de l'hydroxyde de magnésium

L'hydroxyde de magnésium est un composé inorganique de formule  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Cette base se présente sous la forme d'une poudre pratiquement insoluble dans l'eau. Le « lait de magnésie » est une suspension d'hydroxyde de magnésium dans sa solution saturée, d'aspect laiteux. Sa forme minérale naturelle est connue sous le nom de brucite. L'hydroxyde de magnésium est utilisé lors de thérapies comme antiacide (pour calmer les brûlures d'estomac) et comme laxatif.

Le pH d'une solution aqueuse de lait de magnésie vaut 10,5 à 25 °C.

Produit ionique de l'eau à 25 °C :  $K_e = [\text{HO}^- (\text{aq})].[\text{H}_3\text{O}^+ (\text{aq})] = 10^{-14}$

2.1. Déterminer la concentration molaire des ions  $\text{H}_3\text{O}^+ (\text{aq})$  et  $\text{HO}^- (\text{aq})$  présents dans cette solution aqueuse de lait de magnésie.

2.2. Écrire l'équation de réaction de dissolution de l'hydroxyde de magnésium solide dans l'eau. En déduire que la concentration en ions  $\text{Mg}^{2+} (\text{aq})$  dans ce lait de magnésie est de  $1,58 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .

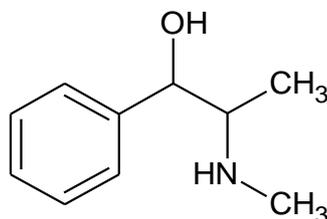
2.3. En déduire une valeur du produit de solubilité  $K_s$  de l'hydroxyde de magnésium.

### III. CHIMIE ORGANIQUE (17 points)

**L'exercice comprend trois parties indépendantes les unes des autres.**

L'éphédrine est un médicament qui a longtemps été utilisé comme décongestionnant nasal (effet vasoconstricteur). Sous contrôle médical, elle est encore utilisée pour lutter contre l'hypotension.

L'herbe chinoise Ma Huang (*Ephedra sinica*) contient de l'éphédrine, dont la formule topologique est donnée ci-dessous :

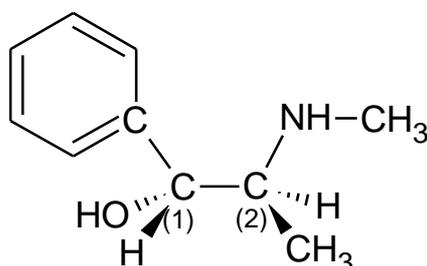


La structure chimique de l'éphédrine est proche de celle de la molécule d'adrénaline, ce qui explique que certaines personnes en font un usage détourné (dopant, stimulant), avec des risques de graves complications telles qu'un accident vasculaire cérébral ou un infarctus du myocarde...

Une synthèse multi-étapes de l'éphédrine est possible à partir du benzène. Un des composés intermédiairement formés est la propiophénone.

#### Partie 1 : aspect stéréochimique de la molécule d'éphédrine

Une représentation de Cram de la molécule d'éphédrine (forme lévogyre) est donnée ci-dessous :



1. Reproduire la molécule d'éphédrine sur votre copie puis repérer le ou les atome(s) de carbone asymétrique(s) par un astérisque \*. Expliquer.
2. Indiquer le nombre de stéréo-isomères de l'éphédrine. Expliquer.
3. L'atome de carbone (1) a la configuration absolue (R). Déterminer la configuration absolue (R ou S) de l'atome de carbone (2). Expliquer brièvement.

Données :

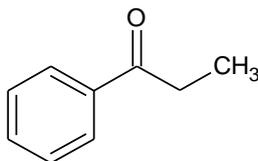
|                     |                   |   |   |   |   |
|---------------------|-------------------|---|---|---|---|
| Numéros atomiques : | Élément chimique  | H | C | N | O |
|                     | Numéro atomique Z | 1 | 6 | 7 | 8 |

4. Parmi les stéréo-isomères de l'éphédrine, on trouve la (1R,2R) - pseudoéphédrine. Les effets sur l'organisme de la (1R,2R) - pseudoéphédrine sont moins prononcés que ceux de l'éphédrine, car nos récepteurs biochimiques sont sensibles à la stéréochimie des molécules.

Les molécules d'éphédrine et de pseudoéphédrine sont-elles des énantiomères ? Expliquer.

## **Partie 2 : spectroscopies**

La formule de la propiophénone obtenue dans la première étape de synthèse de l'éphédrine est donnée ci-dessous :



Les spectres RMN (du proton  $^1\text{H}$  à 300 MHz) du benzène et de la propiophénone, ainsi que le tableau des déplacements chimiques sont donnés en annexe 1 page 7.

Le nombre de protons correspondant à un signal (résultat de la courbe d'intégration) est indiqué, pour certains d'entre eux, entre parenthèses.

Le spectre IR (infrarouge) de la propiophénone est donné en annexe 2 page 8. La table des nombres d'onde des vibrations de valence et de déformation est donnée en annexe 3 page 9.

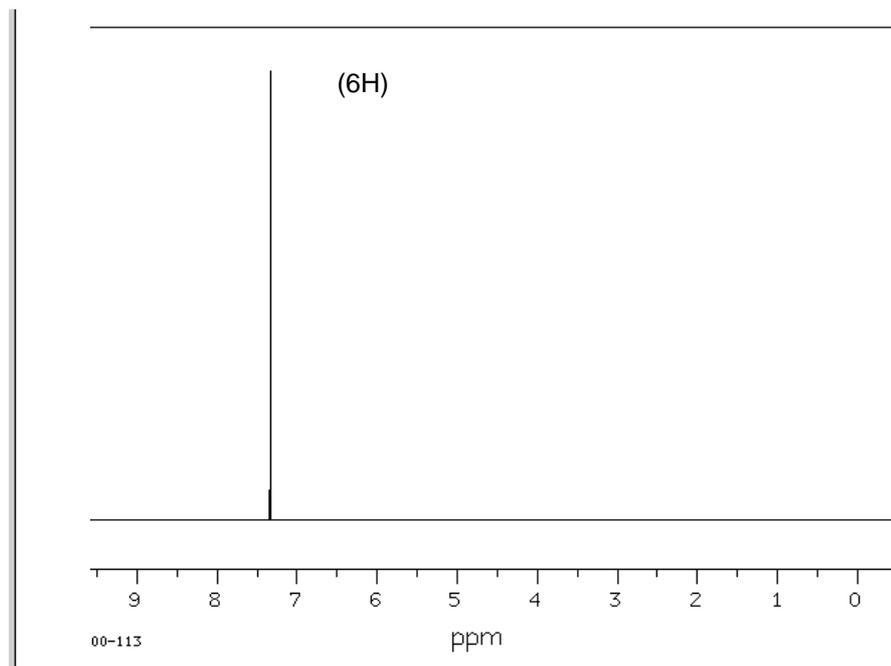
1. Identifier chacun des spectres RMN. Justifier très simplement.
2. Sur le spectre n°2, justifier brièvement la présence d'un *quadruplet* vers 3 ppm et d'un *triplet* vers 1 ppm.
3. Dans le spectre IR de la propiophénone en feuille annexe 2 page 8, expliquer à quoi est due la bande d'absorption située vers  $1700\text{ cm}^{-1}$  (liaison concernée et nature de la vibration).

## **Partie 3 : formation de la propiophénone**

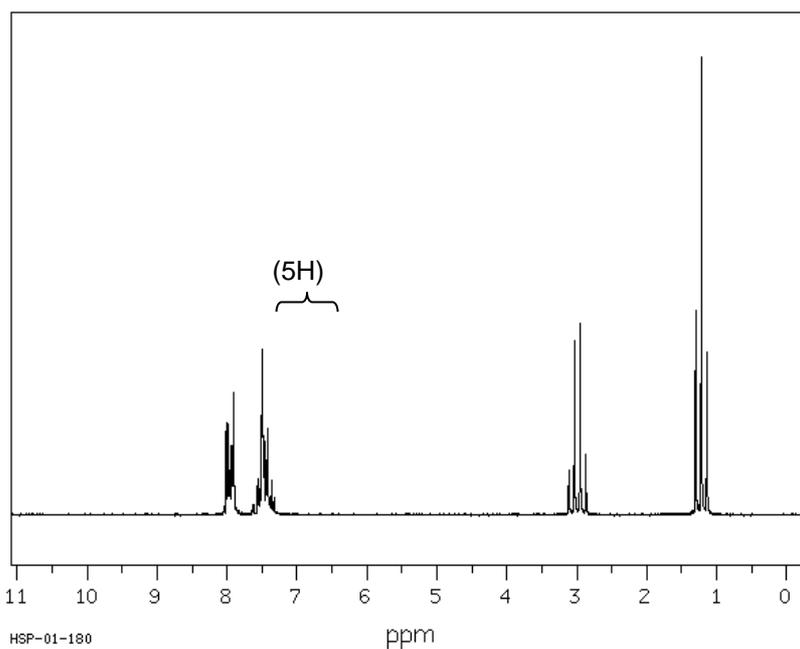
La molécule d'éphédrine peut être produite par une synthèse organique dont la première étape correspond à une réaction entre le benzène  $\text{C}_6\text{H}_6$  et le chlorure de propanoyle  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COCl}$  en présence de trichlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  (catalyseur). Le symbole  $\square$  désigne une lacune électronique.

1. Écrire la formule de Lewis du chlorure de propanoyle.
2. Une espèce électrophile se forme par réaction du chlorure de propanoyle  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COCl}$  avec le trichlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$ .  
Écrire la formule de cette espèce électrophile. Expliquer son mode de formation en écrivant le mécanisme correspondant, avec le formalisme des flèches courbes.
3. Écrire le mécanisme réactionnel de formation de la molécule de propiophénone (1- phénylpropan-1-one en nomenclature officielle) par action sur le benzène de l'espèce électrophile formée.
4. Comment s'appelle la réaction étudiée ici ?

**ANNEXE 1**

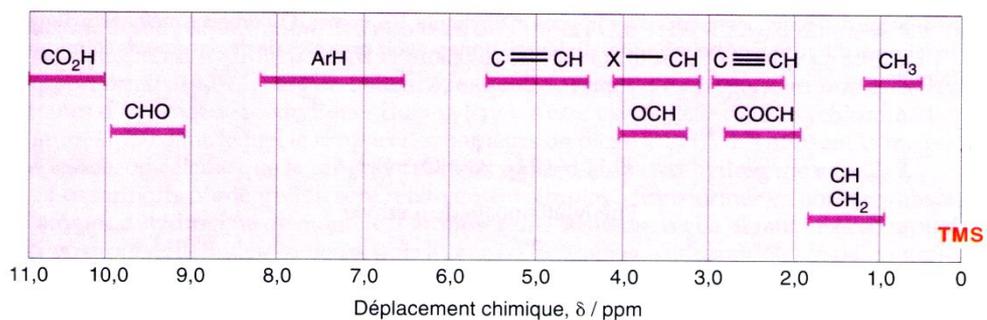


**Spectre 1**

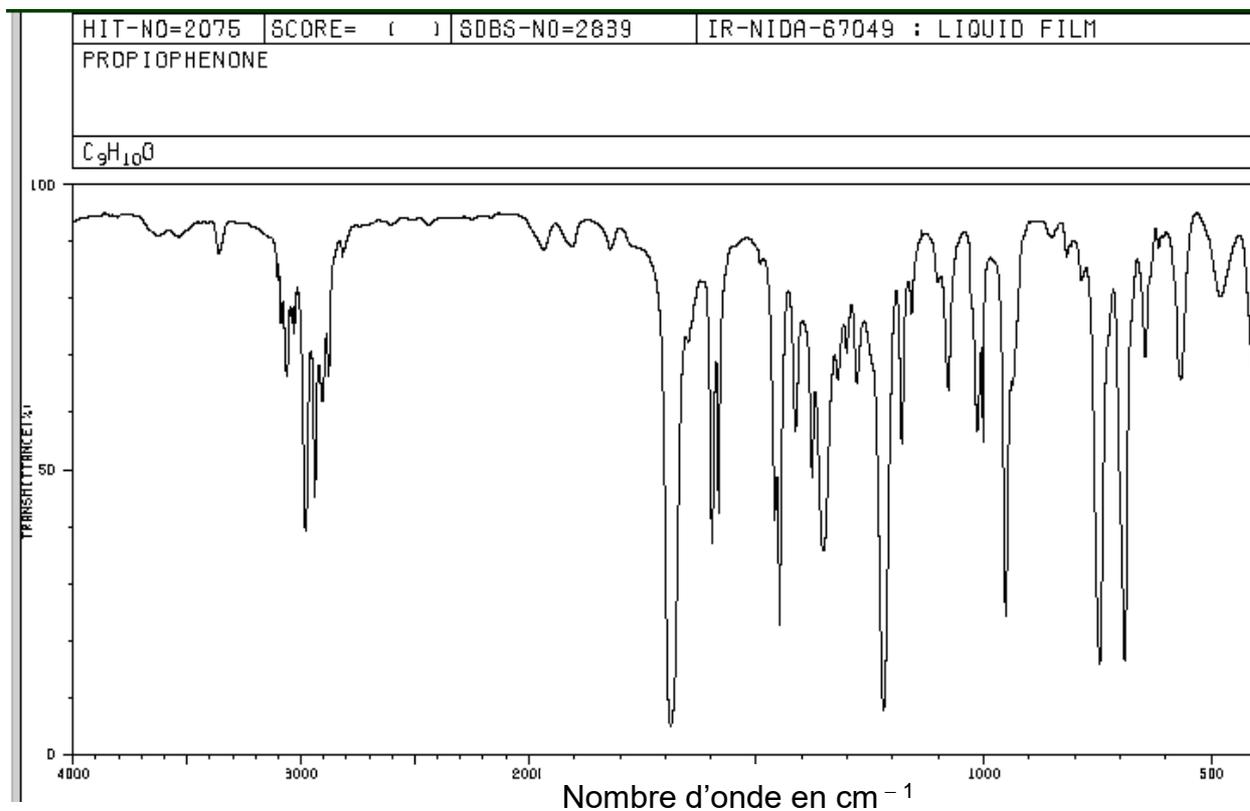


**Spectre 2**

**RMN <sup>1</sup>H**



D'après « Invitation à la chimie organique », Johnson (De Boeck)

**ANNEXE 2****Spectre IR (infrarouge) de la propiophénone**

*D'après « Spectral Database for Organic Compounds SDBS » (Japan)*

## ANNEXE 3

## SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Table des nombres d'onde des vibrations de valence et de déformation

| Liaison                                | Espèce                       | Nature des vibrations | Nombre d'onde $\text{cm}^{-1}$   | Intensité<br>F : fort ; m : moyen ; f : faible |
|--|------------------------------|-----------------------|--|--|
| O-H                                    | Alcool ou phénol libre       | Valence               | 3590-3650  | F (fine)                                       |
| O-H                                    | Alcool ou phénol lié         | Valence               | 3200-3600  | F (large)                                      |
| N-H                                    | Amine primaire               | Valence               | 3300-3500  | m (2 bandes)                                   |
| N-H                                    | Amine secondaire             | Valence               |  | m (1 bande)                                    |
| N-H                                    | Amide                        | Valence               | 3100-3500  | F  |
| C <sub>di</sub> -H                     | Alcyne                       | Valence               | ≈ 3300   | m ou f   |
| C <sub>tri</sub> -H                    | Alcène                       | Valence               | 3030-3100  | m  |
| C <sub>tri</sub> -H                    | Aromatique                   | Valence               | 3000-3100  | m  |
| C <sub>tet</sub> -H                    | Alcane                       | Valence               | 2850-3000  | F  |
| C <sub>tri</sub> -H                    | Aldéhyde                     | Valence               | 2700-2900  | m (2 bandes)                                   |
| OH                                     | Acide carboxylique           | Valence               | 2500-3200  | F à m (large)                                  |
| C≡C                                    | Alcyne                       | Valence               | 2100-2260  | f  |
| C <sub>tri</sub> =O                    | Aldéhyde et cétone           | Valence               | 1650-1730<br>abaissement de 20 à 30 $\text{cm}^{-1}$<br>si conjugaison | F  |
| C <sub>tri</sub> =O                    | Acide carboxylique           | Valence               | 1700-1725  | F  |
| C <sub>tri</sub> =O                    | Ester                        | Valence               | 1735-1750  | F  |
| C <sub>tri</sub> =O                    | Amide                        | Valence               | 1630-1700  | F  |
| C <sub>tri</sub> =C <sub>tri</sub>     | Alcène                       | Valence               | 1620-1690  | m  |
| C <sub>tri</sub> =C <sub>tri</sub>     | Aromatique                   | Valence               | 1450-1600  | Variable (3 ou 4 bandes)                       |
| N-H amine                              | Amine                        | Déformation           | 1560-1640  | F ou m   |
| -NO <sub>2</sub>                       | Groupe nitro                 | Valence               | 1540-1570 et 1340-1390   | F (2 bandes)                                   |
| C <sub>tet</sub> -H                    | Alcane                       | Déformation           | 1430-1480  | F  |
| C <sub>tet</sub> -H (CH <sub>3</sub> ) | Alcane                       | Déformation           | 1370-1390  | F (2 bandes)                                   |
| C <sub>tet</sub> -O                    | Alcool                       | Valence               | 1010-1200  | F  |
| C <sub>tet</sub> -N                    | Amine                        | Valence               | 1020-1250  | m  |
| C <sub>tri</sub> -H de -<br>HC=CH- (E) | Alcène                       | Déformation           | 960-970  | F  |
| (Z)                                    |                              | Déformation           | 670-730  | m  |
| C <sub>tri</sub> -H                    | Aromatique monosubstitué     | Déformation           | 730-770 et 680-720   | F (2 bandes)                                   |
| C <sub>tri</sub> -H                    | Aromatique 1,2-disubstitué   | Déformation           | 735-770  | F  |
|  | Aromatique 1,3-disubstitué   | Déformation           | 750-800 et 680-720   | F et m (2 bandes)                              |
|  | Aromatique 1,4-disubstitué   | Déformation           | 800-860  | F  |
| C-Cl                                   | Chlorure d'alkyle ou d'aryle | Valence               | 600-800  | F  |
| C-Br                                   | Bromure d'alkyle ou d'aryle  | Valence               | 500-750  | F  |
| C-I                                    | Iodure d'alkyle ou d'aryle   | Valence               | ≈ 500  | F  |



# 2016 - U2: Biologie moléculaire et génie génétique

Durée 2 h – coefficient 1

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

## L'interférence à ARN

Le processus d'interférence à ARN est un mécanisme naturel de défense de l'organisme (contre les attaques virales par exemple). La découverte et la compréhension de ce mécanisme ont permis d'en faire un outil de biologie moléculaire de plus en plus utilisé.

Le processus d'interférence à ARN est déclenché par la présence d'un ARN double brin dans la cellule. Cet ARN bicaténaire est découpé en présence d'une ribonucléase en petits fragments double brin appelés « siRNA » (small interfering RNA). Un complexe multiprotéique dégrade le brin sens du « siRNA » tandis que le brin anti-sens s'hybride avec un ARN messager de séquence complémentaire. L'ARN messager cible est alors hydrolysé par le complexe multiprotéique.

Une équipe de recherche utilise la technique d'interférence à ARN dans le cadre de l'étude des encéphalopathies épileptiques précoces chez l'être humain. Un défaut de l'enzyme glutamine synthétase pourrait être impliqué. Afin d'étudier les conséquences de l'absence de cette enzyme, une technique d'inhibition de la production de glutamine synthétase est mise en œuvre.

### 1. Recherche de la séquence de l'ARN messager (1 point)

La première étape consiste à concevoir la séquence d'un « siRNA ». Pour cela la séquence de l'ARN messager de la glutamine synthétase du rat (*Rattus norvegicus*) est recherchée.

**1.1** Indiquer un portail de bioinformatique pouvant être utilisé.

**1.2** Proposer, de manière, ordonnée les mots clés à saisir pour la recherche à partir de ce portail.

### 2. Construction d'un vecteur d'expression contenant la séquence du « siRNA » (7 points)

Une fois choisie, la séquence nucléotidique du « siRNA » est synthétisée puis doit être insérée dans un vecteur d'expression.

Le vecteur utilisé est le plasmide mU6Pro dont la carte est présentée dans le **document 1**.

**2.1** A partir de ce document, justifier l'appellation "vecteur d'expression".

Le plasmide mU6Pro est obtenu par maxipréparation selon le protocole du **document 2**.

**2.2** Exposer les évènements moléculaires qui ont lieu au cours des étapes 3 et 4 de ce protocole.

**2.3** Indiquer le rôle de la colonne utilisée à partir de l'étape 6.

L'ADN plasmidique obtenu est soumis à une digestion double par les endonucléases de restriction *Bbs* I et *Xba* I suivie d'une électrophorèse préparative en gel d'agarose. Le résultat obtenu est présenté dans le **document 3**.

**2.4** Indiquer l'électrode vers laquelle migrent les produits de digestion. Argumenter la réponse à l'aide de la structure de l'ADN.

**2.5** Identifier les deux bandes présentes sur la photographie du gel.  
Expliquer le raisonnement.

A partir de ce gel, le produit de digestion nécessaire à la construction du vecteur recombinant est purifié.

**2.6** Lister les étapes techniques permettant cette purification.

Après purification, la solution d'ADN obtenue est dosée par spectrophotométrie d'absorption.

**2.7** Préciser la longueur d'onde choisie pour la mesure et rappeler l'élément constitutif des nucléotides responsable de la propriété optique permettant la mesure.

La séquence nucléotidique du « siRNA » a une taille de 60 paires de bases et possède à ses extrémités les sites de restriction des endonucléases *Bbs* I et *Xba* I. Cette séquence, sous forme d'ADN double brin, est insérée dans le vecteur purifié grâce à l'activité d'une enzyme appelée ligase.

**2.8** Montrer en quoi l'utilisation de ces deux enzymes de restriction permet d'améliorer l'efficacité d'insertion.

**2.9** Ecrire le produit de la réaction catalysée par la ligase présentée dans le **document 4**.  
Nommer la liaison formée.

### **3. Transformation de cellules bactériennes et vérification des clones (3 points)**

Le vecteur recombinant est introduit dans des cellules bactériennes par transformation. Les bactéries transformées sont étalées sur des boîtes de milieu nutritif contenant de l'ampicilline. Un certain nombre de colonies est ainsi obtenu, après culture.

A partir de chaque colonie une minipréparation d'ADN plasmidique est effectuée et la qualité des clones vérifiée par hydrolyse enzymatique puis séquençage.

Le séquençage est réalisé par la méthode de Sanger automatisée. La composition qualitative du mélange réactionnel est la suivante :

- ADN à séquencer
- amorce
- Taq polymérase
- 4 dNTPs
- 4 ddNTPs marqués par quatre fluorochromes différents
- tampon approprié
- eau

**3.1** Rappeler la signification du sigle "ddNTP" et préciser la particularité structurale de cette molécule.

**3.2** A l'aide de schémas détaillés, exposer le principe du séquençage de Sanger automatisé à partir des séquences nucléotidiques suivantes :

matrice à séquencer : 5' – A C T T G C C A A G G A T C T – 3'

amorce : 5' – A G A T C C – 3'

#### **4. Transfection de cellules nerveuses de rat et expression en « siRNA » (1 point)**

L'ADN plasmidique des clones transformés est transfecté dans des cellules nerveuses de rat où le gène de la glutamine synthétase est naturellement exprimé.

4.1 Citer deux méthodes de transfection.

Le vecteur est exprimé dans les cellules transfectées : la séquence de l'insert, présentée dans le **document 5**, est transcrite en « siRNA ». La séquence sens de l'insert est fournie

4.2 Analyser cette séquence pour en déduire la structure secondaire de l'ARN formé.

#### **5. Quantification de l'expression du gène de la glutamine synthétase dans les cellules transfectées (6 points)**

La technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR), présentée dans le document 6 est fondée sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un fluorochrome, le SYBR®Green.

5.1 Expliquer les propriétés du SYBR®Green nécessaires à la réalisation de la PCR quantitative.

5.2 Préciser l'étape du cycle de PCR pendant laquelle le signal fluorescent est mesuré.

La qPCR permet de quantifier la concentration initiale en ADN. A cette fin, on réalise une gamme d'étalons de concentrations croissantes en ADN. Le **document 6** présente les courbes d'amplification obtenues pour trois concentrations en ADN en double essai.

5.3 A l'aide du **document 6**, expliquer la méthode de détermination du cycle seuil (Ct). Déterminer la valeur du Ct pour chaque solution étalon d'ADN.

Le **document 6b** exprime l'évolution du cycle seuil en fonction de la concentration en ADN :  $Ct = f(\log [ADN])$ .

5.4 Expliquer la raison pour laquelle le coefficient directeur de la droite d'étalonnage est négatif en PCR quantitative.

En fin de réaction, pour chaque essai, une courbe de fusion est réalisée afin de déterminer la spécificité de l'amplification. Le résultat est donné dans le **document 6**.

5.5 Déterminer la  $T_m$  pour chacun des tests et conclure.

5.6 Expliquer pourquoi l'utilisation du SYBR®Green rend cette étape obligatoire.

Pour vérifier l'efficacité des « siRNA », les ARN des cellules transfectées sont extraits et les ADN complémentaires (ADNc) obtenus ensuite par réaction de transcription inverse.

À partir de ces ADNc une (qPCR) permet de quantifier l'expression du gène de la glutamine synthétase.

Une qPCR est réalisée sur l'ADNc du vecteur mU6pro GFP+ et sur les ADNc des trois constructions de « siRNA » : siRNA-Glu-A, siRNA-Glu-B, siRNA-Glu-C.

Le **document 7** présente les résultats de l'expression relative du gène de la glutamine synthétase (Glu) pour chaque transfection.

Une construction est considérée comme efficace lorsque celle-ci permet une extinction de l'expression du gène supérieure à 80 %.

5.7 Analyser les résultats du **document 7** pour en déduire la construction la plus efficace.

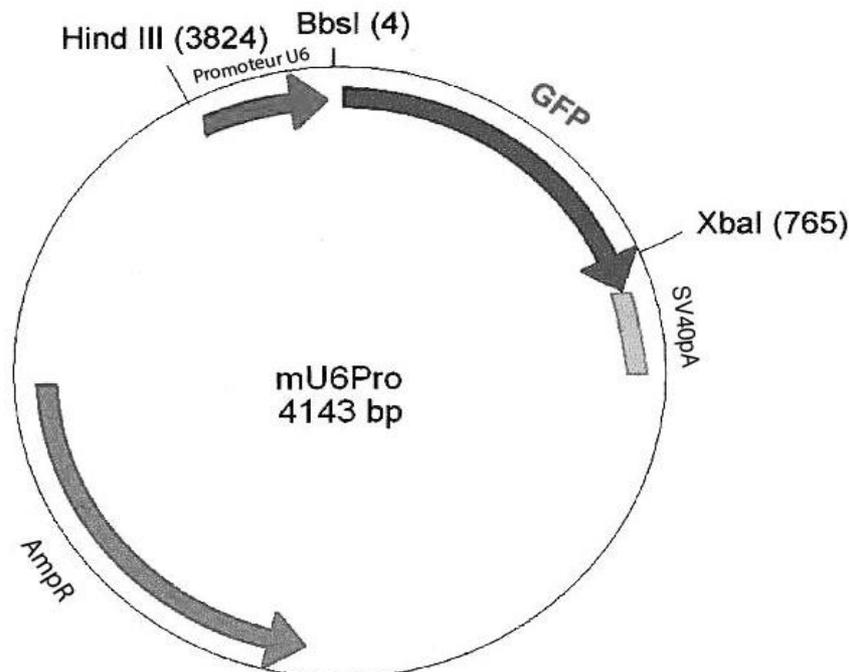
5.8 Proposer une technique permettant de vérifier l'impact de la diminution de la quantité d'ARNm au niveau protéique.

**Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)**

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

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

**Document 1 : Carte du vecteur mU6Pro**

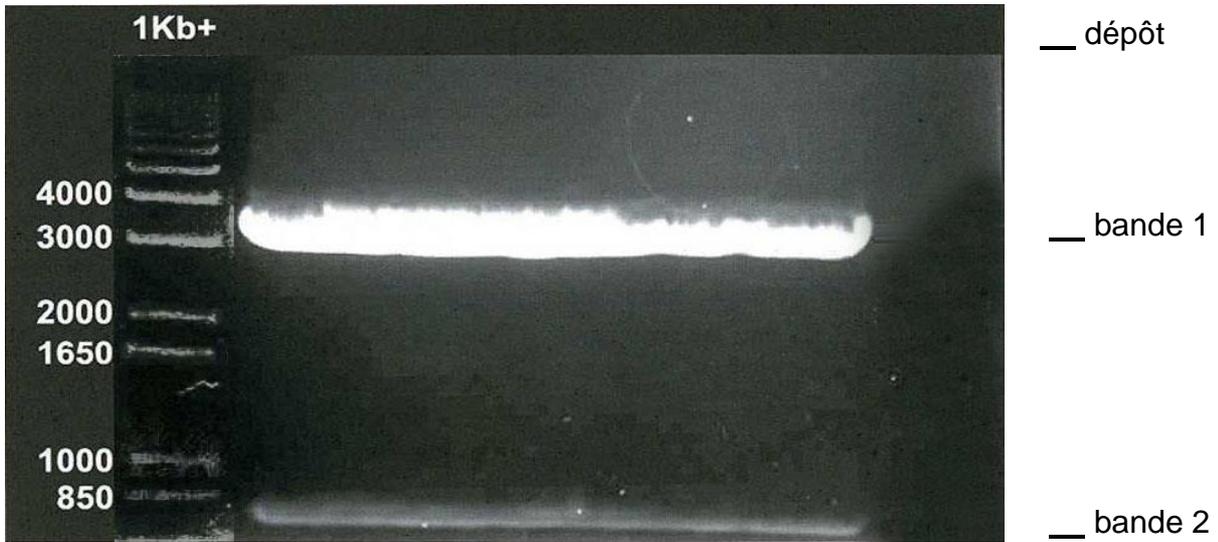


**Document 2 : Protocol for plasmid DNA purification**

(GeneJET Plasmid Maxiprep Kit - Thermo Scientific)

| Step | Procedure  |
|------|--|
| 1    | Grow up to 250 mL bacterial culture in LB medium to an OD <sub>600</sub> of 2-3. Harvest the cells by centrifugation for 10 min at 5000 g. Discard the supernatant.                                |
| 2    | Resuspend pelleted cells in 6 mL of <b>Resuspension Solution</b> .   |
| 3    | Add 6 mL of <b>Lysis Solution</b> (SDS, NaOH, pH 12) and mix gently by inverting the tube 4-6 times until the solution becomes viscous and slightly clear. Incubate for 3 min at room temperature. |
| 4    | Add 6 mL of <b>Neutralization Solution</b> (acetic acid, potassium acetate, pH 4,8) and mix immediately by inverting the tube 5-8 times. Centrifuge for 40 min at 5000 g.                          |
| 5    | Transfer the supernatant to a 50 mL tube. Add 6 mL of 96 % ethanol. Mix immediately by inverting the tube 5-6 times.   |
| 6    | Transfer part of the sample (approximately 20 mL) to the column. Centrifuge for 3 min at 2000 g. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.                 |
| 7    | Repeat step 6 to process any remaining lysate through the column.  |
| 8    | Add 8 mL of <b>Wash Solution I</b> to the column. Centrifuge for 2 min at 3000 g. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.                                |
| 9    | Add 8 mL of <b>Wash Solution II</b> to the column. Centrifuge for 2 min at 3000 g. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.                               |
| 10   | Repeat the column wash with <b>Wash Solution II</b> (step 10).   |
| 11   | Centrifuge for 5 min at 3000 g. Discard the collection tube containing the flow-through.   |
| 12   | Transfer the column to a fresh 50 mL collection tube. Add 1 mL of <b>Elution Buffer</b> . Incubate for 2 min at room temperature. Centrifuge for 5 min at 3000 g to elute plasmid DNA.             |

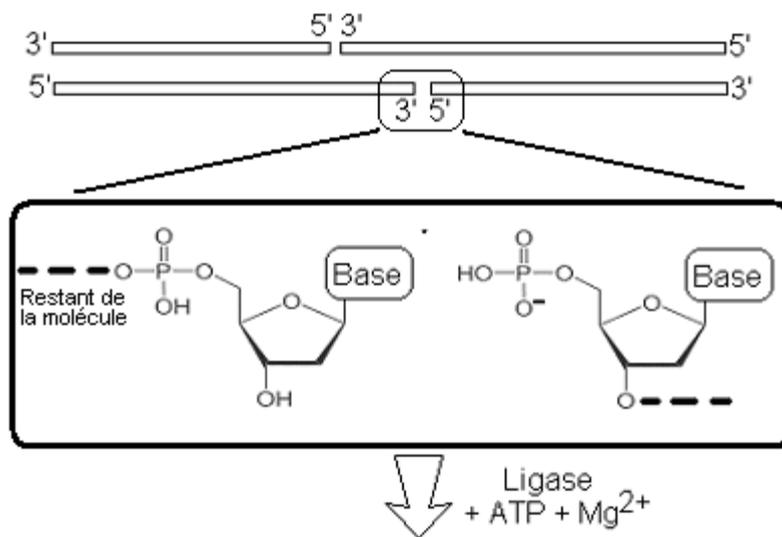
**Document 3 : Photographie du gel après électrophorèse du vecteur mU6Pro hydrolysé par *BbsI* et *XbaI***



Tampon de migration : Tris Borate EDTA, pH 8

Marqueur de taille : 1kb + Ladder (Invitrogen), les tailles sont indiquées en pb.

**Document 4 : Réaction de ligation entre deux polynucléotides**



**Document 5 : Séquence nucléotidique sens de l'insert (5' - 3')**

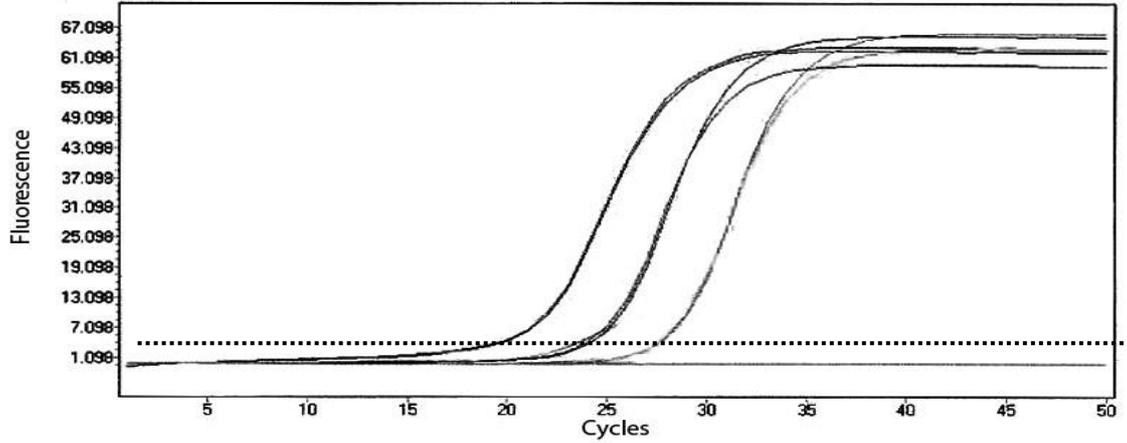
TTTGCAAGTCCCACTTGAACAAATTCAAGAGATTTGTTCAAGTGGGAACTTGCTTTT

Les séquences soulignées sont des séquences inversées répétées.

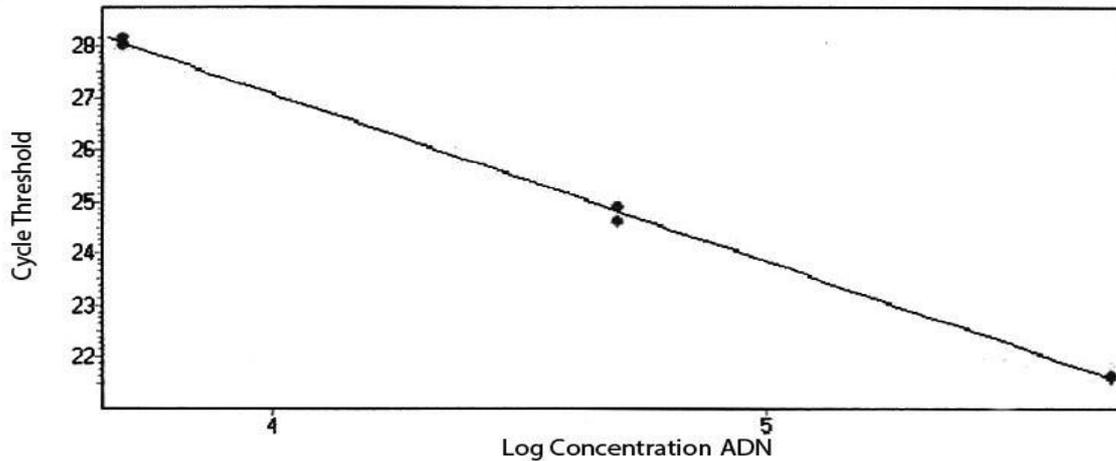
**Document 6 : Le principe de la PCR quantitative par la méthode au SYBR®Green**

Cette qPCR est réalisée à partir de 3 étalons réalisés en double essai.

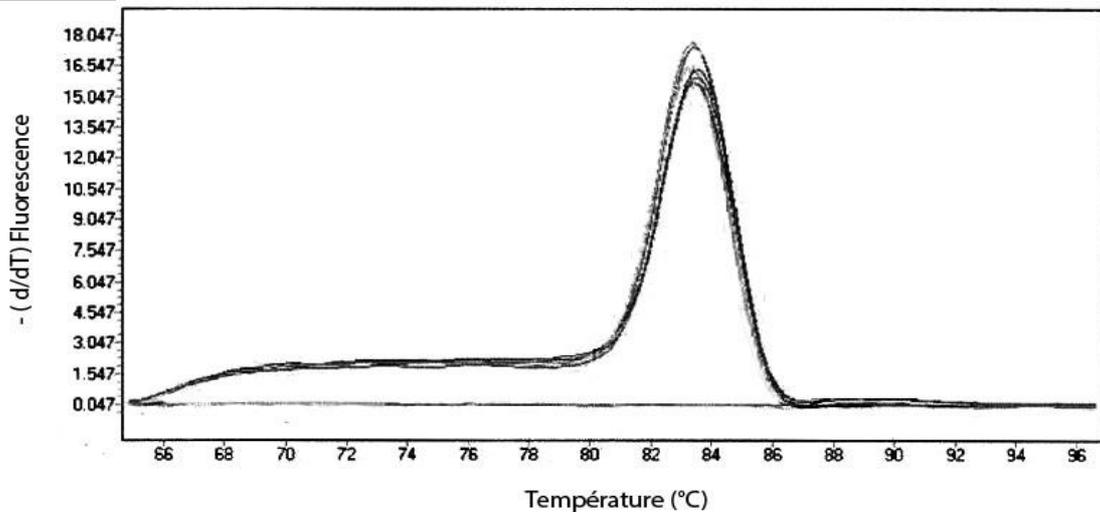
**Document 6a :** courbes d'amplification obtenues

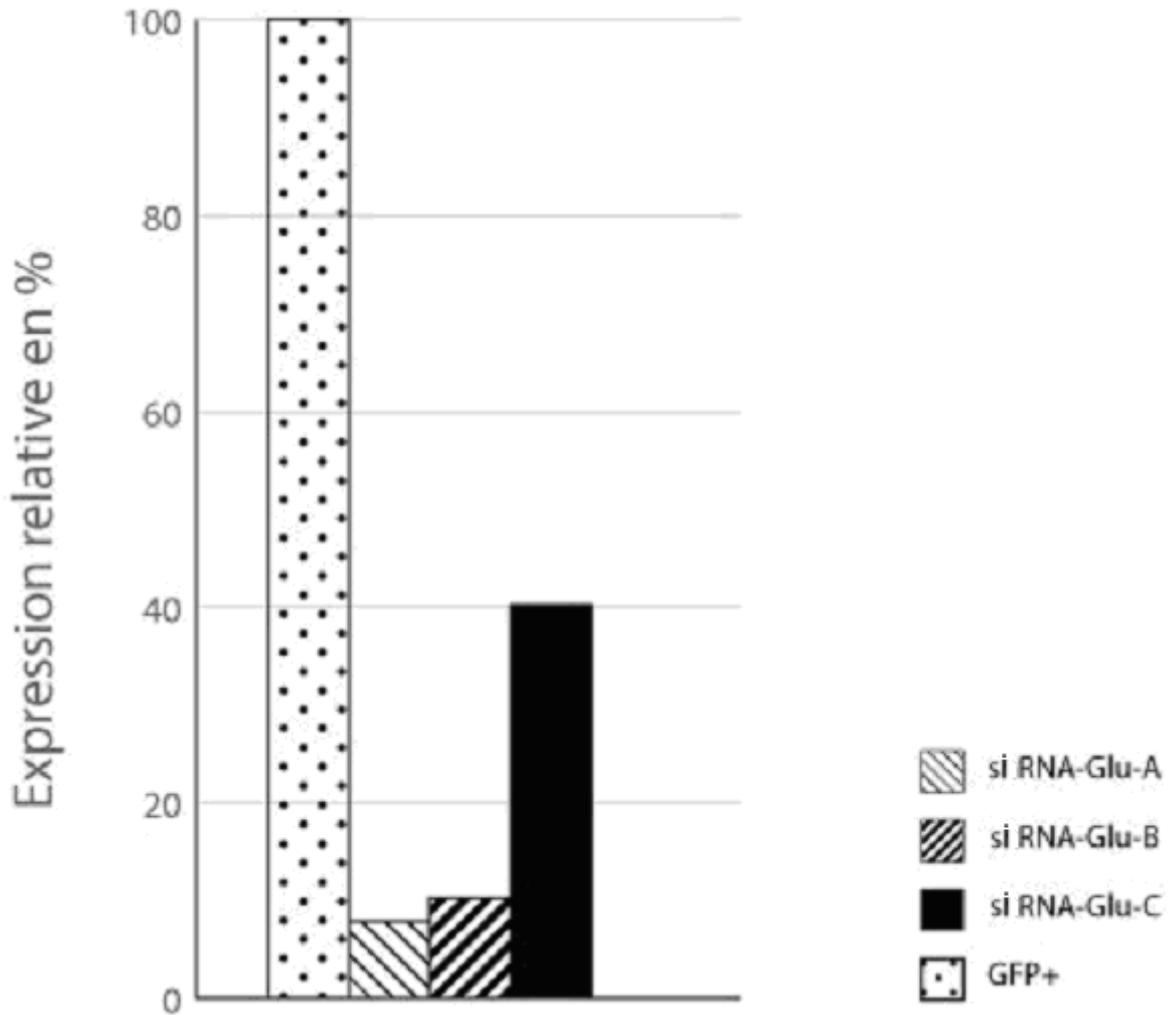


**Document 6b :** courbe d'étalonnage



**Document 6c :** courbes de fusion



**Document 7 : Expression relative du gène de la glutamine synthétase après transfection avec différents shRNA**

L'expression relative du gène de la glutamine synthétase est déterminée par rapport à un gène de ménage.

L'expression relative du gène de la glutamine synthétase est déterminée par rapport à un gène de ménage.

# 2016 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée 2 h – coefficient 1

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

**Documents à rendre avec la copie :** document 6

## La peroxydase du raifort (HRP)

### Une enzyme multifonctionnelle à l'avenir encore prometteur

Les peroxydases sont retrouvées dans de très nombreux organismes, notamment chez les plantes.

La peroxydase de raifort ou HRP pour *horseradish peroxidase*, est la plus étudiée. Elle constitue notamment un auxiliaire incontournable de nombreuses techniques d'analyse couramment utilisées dans les laboratoires de biotechnologies (kits de diagnostic médical, immuno-essais...).

Elle est également étudiée en tant qu'auxiliaire de dépollution des eaux usées riches en phénols. Elle semble également être un outil prometteur en vue du traitement ciblé de tumeurs cancéreuses.

#### 1. Caractéristiques structurales de la protéine HRP (6 points)

Le **document 1** présente les caractéristiques structurales de l'isoenzyme C1A de la peroxydase de raifort (**HRP**).

- 1.1. Indiquer la classe d'enzyme à laquelle appartient l'HRP.
- 1.2. Proposer un rôle pour le groupement prosthétique de l'HRP.
- 1.3. Décrire la structure de l'HRP.

Le **document 2** présente l'alignement des séquences de trois isoenzymes de l'HRP réalisé à l'aide du logiciel CLUSTAL.

- 1.4. Indiquer la signification des astérisques (\*) situés sous les séquences en vous appuyant sur l'analyse de la position 118 de l'isoenzyme dont le numéro d'accèsion est P00433.
- 1.5. Rappeler la nature et les propriétés de la chaîne latérale de la phénylalanine (F) et de celle de la tyrosine (Y).
- 1.6. Expliquer la signification des deux points (:) situés sous les séquences en vous appuyant sur l'analyse de la position 296 de l'isoenzyme dont le numéro d'accèsion est P00433.
- 1.7. Expliquer les termes « identity » et « similar positions » fournis par le logiciel CLUSTAL.
- 1.8. Indiquer les modifications post-traductionnelles que subit l'HRP.
- 1.9. En déduire une définition pour le terme d'isoenzyme.

## 2. Caractéristiques de la catalyse enzymatique médiée par l'HRP (5 points)

De nombreux substrats chromogènes ont été développés afin de suivre l'activité de la peroxydase. Les paramètres  $k_{cat}$  et  $K_M$  de trois d'entre eux (ABTS, TMB et gaïacol) sont indiqués dans le **document 3**.

- 2.1. Comparer l'affinité de l'enzyme pour les trois substrats. Justifier la réponse.
- 2.2. Considérant la signification de  $1/K_M$  et de la  $k_{cat}$ , indiquer la signification du rapport  $k_{cat}/K_M$ .
- 2.3. Calculer le rapport  $k_{cat}/K_M$  pour les trois substrats étudiés.
- 2.4. Identifier le substrat pour lequel l'enzyme est la plus efficace.

L'aminopyrine est un substrat alternatif utilisé pour déterminer l'activité de la peroxydase.

Le **document 4** présente un mode opératoire permettant de déterminer la concentration d'activité catalytique notée  $b$  de l'HRP.

- 2.5. Argumenter que la mesure de la vitesse initiale est déterminée en condition de  $V_{i\ max}$ .
- 2.6. Indiquer la signification d'une unité d'activité enzymatique utilisée dans cette procédure opératoire.
- 2.7. Indiquer les compositions qualitative et quantitative du milieu réactionnel et en déduire son volume.

La vitesse initiale (mesurée par un  $\Delta A/\Delta t$ ) est égale à  $0,06\ \text{min}^{-1}$ . L'équation aux grandeurs utilisée pour le calcul de la concentration d'activité catalytique  $b$  de l'HRP est :

$$b = 2 * \frac{\Delta A}{\Delta t} * \frac{1}{\epsilon * l} * V_{ML} * \frac{1}{V_E}$$

- 2.8. Justifier la présence du facteur 2 présent dans cette équation aux grandeurs.
- 2.9. Poser l'équation aux valeurs numériques et calculer la concentration d'activité catalytique  $b$  en unité (U) par millilitre de solution d'enzyme.

## 3. Développement d'outils de dépollution par immobilisation de l'HRP (4 points)

L'HRP est capable de transformer de nombreux polluants aromatiques en polymères moins dangereux et facilement éliminables. Son immobilisation devrait permettre de développer des bioréacteurs capables de traiter les effluents pollués.

Le **document 5** présente le procédé d'immobilisation de l'HRP sur des nanoparticules de magnétite.

- 3.1. Identifier le type d'immobilisation mis en jeu dans ce document.
- 3.2. Citer deux avantages et deux inconvénients de cette immobilisation.

Le **document 6** montre la représentation de Lineweaver-Burk pour la détermination des constantes cinétiques de l'HRP immobilisée.

**3.3.** Sur le **document 6** à rendre avec la copie, déterminer graphiquement les valeurs de  $K_M$  pour les formes libre et immobilisée de l'HRP.

**3.4.** Commenter les valeurs obtenues.

Après utilisation, les nanoparticules magnétiques sont recyclées par simple lavage à l'eau distillée. Le **document 7** présente les activités résiduelles relatives de l'HRP immobilisée après chacun des quatre cycles de récupération.

**3.5.** Analyser et interpréter les résultats.

#### **4. Utilisation de l'HRP comme outil thérapeutique (3 points)**

L'HRP est actuellement testée pour développer des outils de lutte anticancéreuse, par exemple la stratégie « ADEPT » (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy).

Cette stratégie permet de libérer un composé toxique au contact des cellules ciblées. Elle met en œuvre des anticorps conjugués à l'HRP, spécifiquement dirigés contre les cellules tumorales. L'acide indole acétique (IAA), substrat de l'enzyme, est employé comme prodrogue.

**4.1.** Schématiser une molécule d'anticorps de type Ig G mettant en évidence les chaînes polypeptidiques orientées et identifiées, les ponts disulfures, les domaines et les paratopes.

**4.2.** Illustrer la stratégie thérapeutique par un schéma annoté et commenté.

#### **Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)**

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

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

## **Document 1 : Caractéristiques structurales de l'isoenzyme C1A de la peroxydase de raifort**

### **1a : Horseradishperoxidase (HRP)**

Classification : EC Number : 1.11.1.7 (Peroxidase)

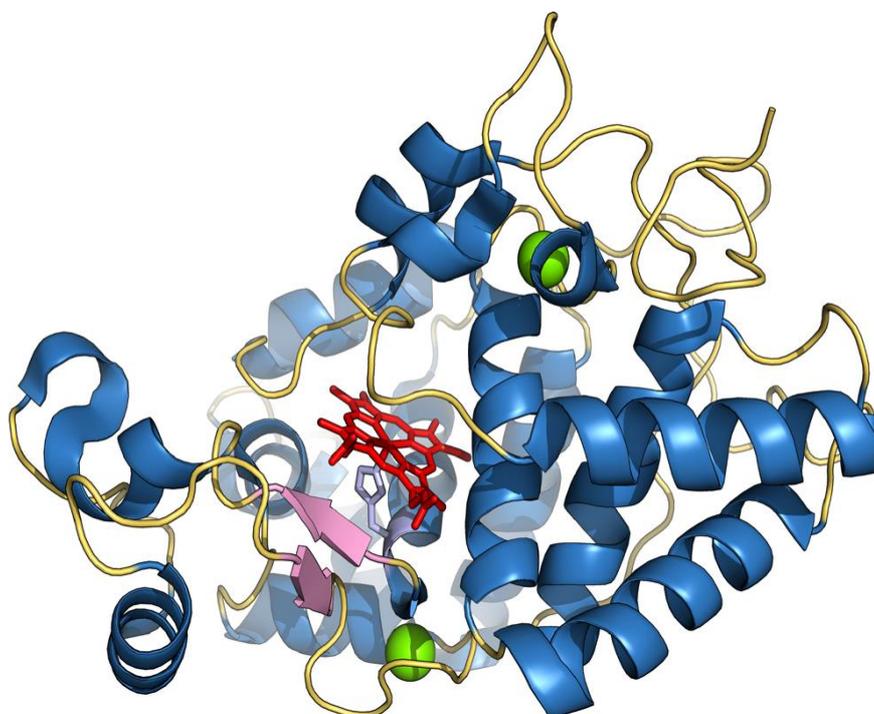
Reaction:  $2 \text{ phenolic donor} + \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{ phenoxyl radical of the donor} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

HRP exists in at least 15 different isoenzymes in the horseradish root, of which the isoenzyme C1A is the most abundant and thus the most studied.

The monomeric isoenzyme C1A is a 34 kDa polypeptide comprising 308 aminoacids.

It contains a heme-group (with a  $\text{Fe}^{3+}$  ion) as prosthetic groups and 2  $\text{Ca}^{2+}$  ions. It contains also four disulphide bridges.

### **1b : Structure of HRP C1A**



The two calcium ions are shown as spheres.

The heme group lies between the distal and the proximal domain.

**Florian W. Krainer & Anton Glieder** An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* (2015) 99:1611–1625

**Document 2 : Alignement des séquences de trois isoenzymes de l'HRP**<http://www.uniprot.org/align/>**CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment**

```

P00433 MHFSSSTLFTC--ITLIPLVCLILHASLSDAQLTPTFYDNSCPNVSNIVRDITIVNELRS 58
Q42517 --MKTQTKVMGG--HVLLTVFTLCMLCSAVRAQLSPDIYAKSCPPLLQIVRDQVKIALKA 56
P17180 MGF---SPLISCSAMGALILSCLLLQASNSNAQLRPFDFYFRTCPSPVFNIIIGDIIIVDELRT 57
      :   :  ::      :  : *  : .*  *** *  : *  .:***.:  :*: *  :   *  :
      :

P00433 DPRIAASILRLHFHDCFVNGCDASILLDNNTTSFRTEKDAFGNANSARGFPVIDRMKAAVE 118
Q42517 EIRMAASLIRLHFHDCFVNGCDASVLLDGTN---SEKLAIPNVNSVRGFEVIDTIKAAVE 113
P17180 DPRIAASLLRLHFHDCFVRGCDASILLDNNTSFRTEKDAAPNANSARGFGVIDRMKTSLE 117
      :  *:***: :*****.*****:***  :.      :** *  *.**.* **  *** :*:::*

P00433 SACPRTVSCADLLTIAAQQSVTLAGGPSWRVPLGRRDSLQAFLLANANLPAPFFFTLPQL 178
Q42517 NACPGVVSCADILTLAARDSVYLSGGPQWRVALGRKDGLVANQSS-ANNLPSPFEPDLAI 172
P17180 RACPRTVSCADVLTIASQISVLLSGGPWWVPLGRRDSVEAFFDLANTALPSPFFTLAQL 177
      *** .*****:***:~: ** *:*** * * ***:~: *  .      **:~** *  :

P00433 KDSFRNVGLNRSSDLVALSGGHTFGKNQCRFIMDRLYNFSNTGLPDPTLNNTTYLQTLRGL 238
Q42517 IAKFAAVGLNV-TDVVALSGAHTFGQAKCDLFSNRLFNFTGAGTPDSTLETTLLSDLQTV 231
P17180 KKAFADVGLNRPSDLVALSGGHTFGRAQCQFVTPRLYNFNGTNRPDPTLDPTYLVQLRAL 237
      *  ****  :~*****.*****: *  :.  **~**.:  *  ** : *  *  *  :

P00433 CPLNGNLSALVDFDLRTPTFIDNKYYVNLEEQKGLIQSDQELFSSPNATD-TIPLVRSFA 297
Q42517 CPIGGNGNKTAPLDRNSTDAFDNNYFKNLLEGGKLLSSDQILFSSDLAVNNTTKRLVEAYS 291
P17180 CPQNGNGTIVLVNFDVVTPTNTFDRQYYTNLRNGKGLIQSDQELFSTPGA-D-TIPLVNLYS 295
      **  **  .  . : *  :  **~:~: *  :  ***:~***  ***:  *  : *  **  .  :

P00433 NSTQTFNFNAFVEAMDRMGNITPLTGTQGQIRLNCRVVNSNSLLHDMVEVDFVSSM 353
Q42517 RSQYLFFRDFTCSMIRMGSL--VNGASGEVRTNCRVIN----- 327
P17180 SNTFAFFGAFVDAMIRMGNLRPLTGTQGEIRQNCRVVNSRIRG--MENDDGVVSSI 349
      .  **  *. : *  ***.:  :~*~:~*  ***:~*

```

Signal peptide is **framed**.Propeptide sequence is **underlined**.Post-translationally modified aminoacids are indicated in **bold**.

Identical positions : 141

Identity : 39,607 %

Similar positions : 85

Protein which is post-translationally modified by the cyclization of a N-terminal glutamine.

Protein containing covalently linked carbohydrates of various types.

Protein which is modified by the formation of four disulfur bonds.

**Document 3 : Paramètres cinétiques de l'HRP pour différents substrats**<http://www.brenda-enzymes.org/>

|         | $K_M$ (mM) | $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) |
|---------|------------|------------------------|
| ABTS    | 0,18       | 736                    |
| Gaïacol | 4,7        | 990                    |
| TMB     | 0,09       | 172                    |

ABTS: 2,2' azino bis 3'ethyl benthiazoline 6 sulfonic acid

TMB: 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine

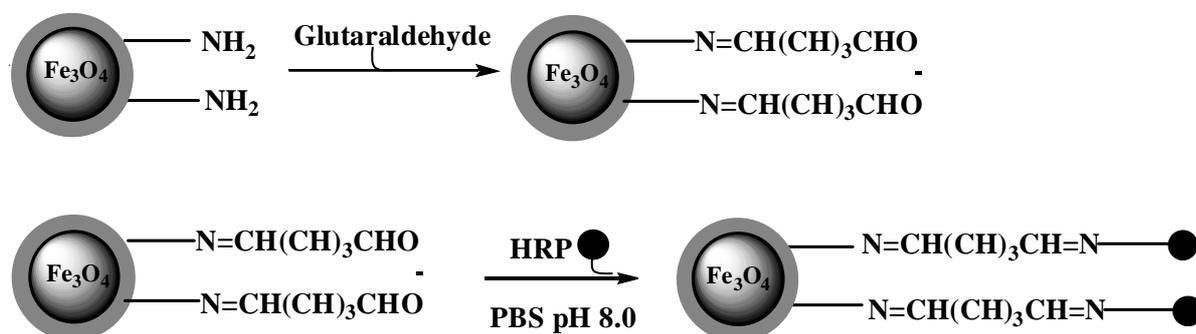
**Document 4 : Protocole de dosage de l'HRP**

Reaction



HRP enzyme activity was measured using phenol, 4-aminoantipyrine (AAP), and hydrogen peroxide as substrates. The assay mixture contained 250  $\mu\text{L}$  9.6 mM AAP, 100  $\mu\text{L}$  100 mM phenol, 100  $\mu\text{L}$  2 mM hydrogen peroxide, 450  $\mu\text{L}$  100 mM phosphate buffer pH 7.4, and 100  $\mu\text{L}$  enzyme solution. The approach in this assay was to provide all substrate concentrations at  $10 \cdot K_M$  or more. The rate of reaction was measured by monitoring the rate of formation of the product which absorbed light at a peak wavelength of 510 nm upon addition of the enzyme; thus, one unit of activity (U) used in this study is defined as the number of  $\mu\text{mol}$  peroxide converted per min at pH 7.4 and  $25^\circ\text{C}$ . The extinction coefficient for quinoneimine is  $6,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

WuY., TaylorK. E., BiswasN., and BewtraJ. K.. A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998. 22(5):315-322.

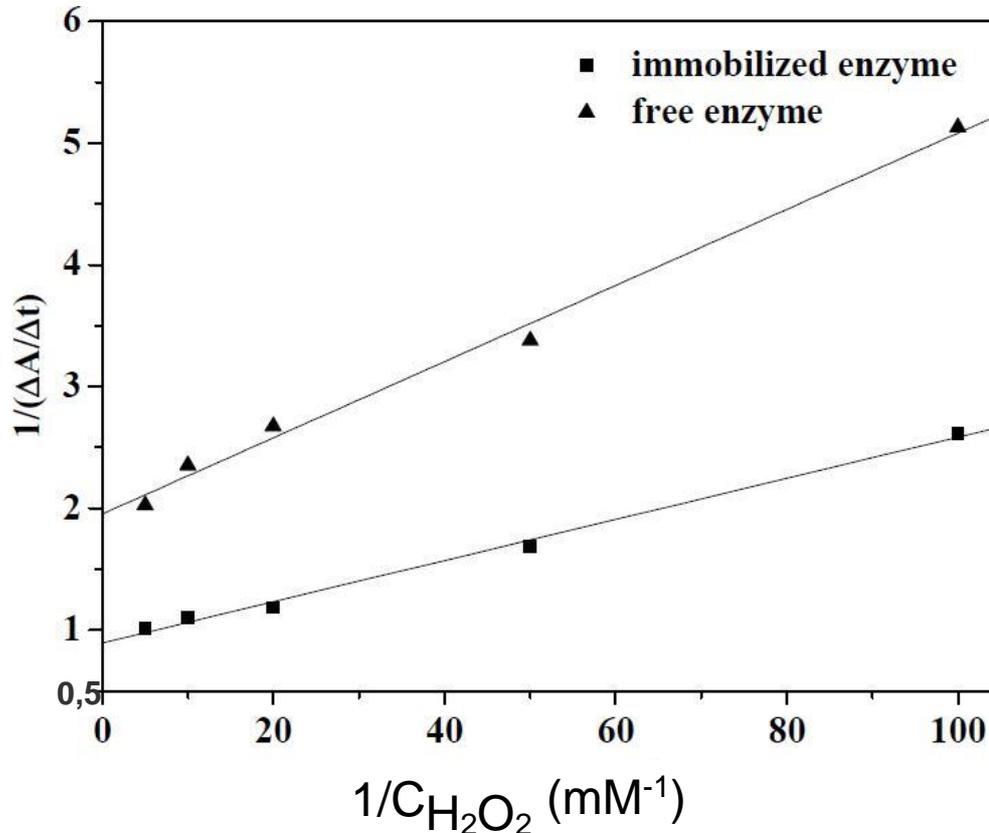
**Document 5 : Procédé d'immobilisation de l'HRP sur des nanoparticules magnétiques**

Des nanoparticules de magnétite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) sont recouvertes d'un polymère aminé puis soumises à l'action du glutaraldéhyde. L'HRP est finalement ajoutée en tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 8.

Chang, Q., Tang, H. Immobilization of Horseradish Peroxidase on NH<sub>2</sub>-Modified Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol. *Molecules*, 2014, 19, 15768-15782.

### Document 6 à rendre avec la copie

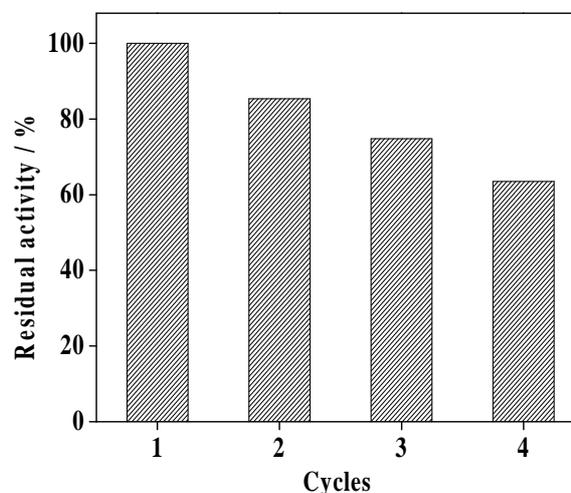
#### Document 6 : Détermination des constantes cinétiques de l'HRP immobilisée



Les activités enzymatiques ont été déterminées par une méthode colorimétrique.

Chang, Q., Tang, H. Immobilization of Horseradish Peroxidase on NH<sub>2</sub>-Modified Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol. *Molecules*, 2014, 19, 15768-15782.

#### Document 7 : Étude de l'activité enzymatique résiduelle après recyclage de l'HRP immobilisée



Chang, Q., Tang, H. Immobilization of Horseradish Peroxidase on NH<sub>2</sub>-Modified Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol. *Molecules*, 2014, 19, 15768-15782.

## 2016 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

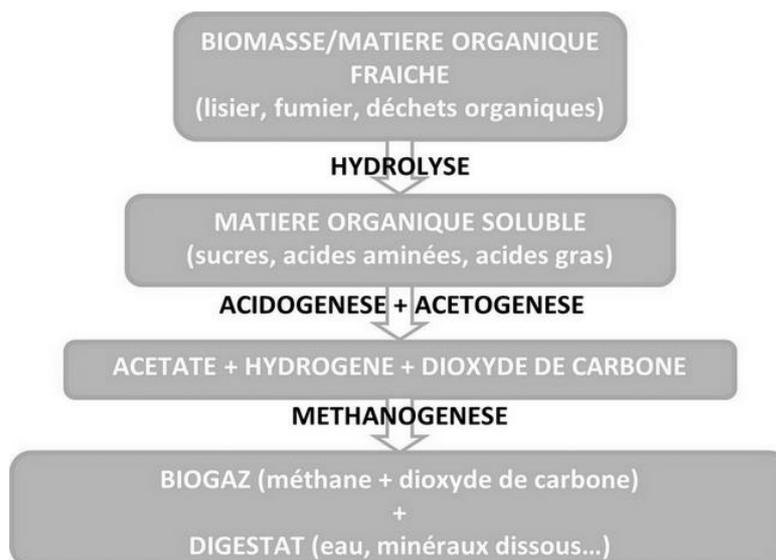
Durée 2 h – coefficient 1

**Matériel autorisé :** dictionnaire anglais/français, calculatrice autorisée.

### La méthanisation biologique

La méthanisation est un processus de digestion anaérobie dans laquelle un écosystème microbien complexe transforme la matière organique en compost, dioxyde de carbone et méthane. La méthanisation permet d'éliminer la pollution organique en générant une énergie renouvelable : le biogaz.

La méthanisation se déroule en plusieurs étapes :



#### 1. Les acteurs biologiques du procédé de méthanisation (8 points)

Les différentes étapes de la méthanisation sont réalisées par des Eubactéries et des Archées.

La première étape consiste à **hydrolyser la matière organique** complexe en monomères. Le composant principal de la matière organique issue des déchets agricoles est la cellulose. Pour améliorer les rendements de production en méthane, le biométhanisateur est également inoculé avec des souches cellulolytiques. Le **document 1** présente la méthode de sélection de souches cellulolytiques performantes (**1a**) et leur identification (**1b**).

- 1.1 Schématiser l'arbre phylogénétique du monde vivant en trois domaines.
- 1.2 Indiquer la nature du milieu de base.
- 1.3 Présenter les intérêts de compléter le milieu en carboxyméthyl cellulose (CMC).
- 1.4 Expliquer le principe de la mise en évidence de l'activité cellulolytique.
- 1.5 Indiquer les deux types de taxonomie auxquels les identifications du **document 1b** font référence.
- 1.6 Dans le cas des identifications résumées dans le tableau 2 du **document 1b**, préciser le principe physicochimique permettant de révéler les caractères positifs ou négatifs des fermentations.

**1.7** Identifier la souche la plus intéressante dans la problématique étudiée. Justifier le choix.

**La méthanogénèse** à partir de l'acétate peut suivre deux voies différentes présentées dans le **document 2** :

- la voie acétoclastique (AC), présentée en (1) et réalisée par exemple par *Methanosarcinaceae spp.*
- l'oxydation syntrophique de l'acétate (OSA) qui s'effectue en deux étapes (2) et (3) par des bactéries oxydant l'acétate comme *Clostridium ultunense* par exemple, en association syntrophique avec des méthanogènes hydrogénotrophes en général *Methanomicrobiales spp.*, *Methanobacteriales spp.* ...

**1.8** Proposer une définition de la syntrophie.

**1.9** Comparer les réactions (1) et (2) d'un point de vue énergétique.

**1.10** Montrer l'importance thermodynamique de la syntrophie dans le cas de la méthanogénèse OSA.

L'acétate produit au cours de l'étape d'acétogénèse peut être métabolisé par les bactéries sulfato-réductrices (BSR). Ce **métabolisme compétiteur** conduit à une diminution de la production de méthane et à la pollution du biogaz par H<sub>2</sub>S. Le métabolisme de ces bactéries est présenté dans le **document 3**.

**1.11** Citer les deux donneurs d'électrons pouvant être utilisés par les BSR. En déduire les types trophiques de ces bactéries.

**1.12** Préciser l'accepteur final d'électron. En déduire le type respiratoire des BSR.

## **2. Le procédé de biométhanisation (4 points)**

La succession des populations bactériennes pendant une digestion thermophile a été étudiée à partir d'une biométhanisation réalisée en biofermenteur de laboratoire.

Cette étude comporte l'évaluation en temps réel :

- de différents paramètres physicochimiques dans le bioréacteur (**document 4a**)
- des populations microbiennes au cours du processus de biométhanisation (**document 4b**).

**2.1** Décrire l'évolution de la concentration en acide acétique et en méthane (**document 4a**).

**2.2** Établir le lien entre les deux courbes analysées et les étapes de la méthanisation mises en évidence.

**2.3** Interpréter (**document 4b**) l'évolution de la population des Méthanosarcinales en fonction de la production des gaz.

**2.4.** A l'aide du **document 4b**, évaluer les paramètres de croissance des Méthanosarcinales entre 20 et 25 jours.

### 3. Décontamination du digestat (6 points)

La biomasse utilisée lors de la biométhanisation peut être contaminée par différents agents pathogènes comme les virus. Ces agents pathogènes risquent d'être conservés dans le digestat et épandus sur les sols cultivables. Il est donc impératif de le décontaminer en fin ou au cours du procédé de production du biogaz.

Une étude de désinfection du digestat par l'ammoniac a été menée afin d'éliminer des virus à ARN simple brin. Le **document 5** présente les différents virus soumis à désinfection et leurs conditions de culture. Les six types de virus sont préalablement cultivés au moyen de quatre lignées cellulaires différentes.

**3.1** Indiquer la caractéristique essentielle des lignées cellulaires utilisées.

**3.2** Présenter le schéma annoté du virus AIV.

Un exemple de cycle de multiplication d'un virus ARN (-) non segmenté est présenté **document 6**.

**3.3** Identifier les étapes 1 à 6 du cycle viral.

**3.4** Présenter le premier événement de l'étape 4 permettant l'expression du virus. Justifier de son importance par comparaison avec le cycle de multiplication d'un virus ARN (+).

L'action de l'ammoniac est testée sur les virus MS2 et FCoV. Le **document 7** présente certains des résultats collectés.

**3.5** Rappeler la signification de la grandeur D.

**3.6** Estimer la concentration minimale en  $\text{NH}_3$  permettant d'inactiver 90 % de la population des deux virus en moins de 10 h.

Donnée : un traitement de 10 h correspond à  $\log D = 1$

**3.7** A l'aide des données du **document 5**, émettre une hypothèse permettant d'expliquer la différence de résistance au traitement observée entre les deux virus.

#### **Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)**

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)  
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

**Document 1 :****1a. Sélection des souches cellulolytiques****Screening of cellulase-producing bacteria**

Each bacterial culture was inoculated onto CMC agar and was incubated at 30 °C for 7 days. The CMC agar plates were flooded with iodine\* at room temperature for 3 min; the excess was removed, and the diameter of the degradation halo around each colony was measured. The strains that formed hydrolysis zones were selected for use in subsequent assays. The positive control for cellulase activity was 0.5 U.mL<sup>-1</sup> cellulase from *Aspergillus niger*.

To flood = inonder

\* Le diode colore la cellulose en bleu.

Composition du milieu CMC agar (carboxymethyl cellulose) :

Milieu de base supplémenté avec 10 g.L<sup>-1</sup> de CMC.

Milieu de base :

|      |                   |                                       |
|------|-------------------|---------------------------------------|
| 1    | g.L <sup>-1</sup> | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       |
| 0,5  | g.L <sup>-1</sup> | MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O |
| 20   | g.L <sup>-1</sup> | NaCl                                  |
| 0,01 | g.L <sup>-1</sup> | FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O |
| 0,01 | g.L <sup>-1</sup> | MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O  |
| 0,3  | g.L <sup>-1</sup> | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>       |
| 15   | g.L <sup>-1</sup> | agar                                  |

---

*Applied and Environmental Microbiology, July 2014, Volume 80, Number 14, p. 4199–4206*

**Document 1 (suite)****1b. Résultats et identification des souches****DNA extraction and molecular identification using 16S rRNA genes**

The 16S rRNA gene was amplified. Then the products were sequenced. Sequences were analyzed, assembled and subsequently analyzed using BLASTN software against the nonredundant database available in GenBank.

| Bacterial strain | Host species              | Species with sequence homology <sup>a</sup> | E value | Similarity (%) | Identity (%) | Homolog GenBank accession no. | Diam of halo (cm) |
|------------------|---------------------------|---|---------|----------------|--------------|-------------------------------|-------------------|
| MC23             | <i>Mytilus chilensis</i>  | <i>Aeromonas bivalvium</i>                  | 0.0     | 100            | 99           | DQ504430.1                    | 1.1               |
| MC25             | <i>Mytilus chilensis</i>  | <i>Aeromonas salmonicida</i>                | 0.0     | 99             | 98           | AB472980.1                    | 1.5               |
| MA2              | <i>Mesodesma donacium</i> | <i>Aeromonas bivalvium</i>                  | 0.0     | 100            | 99           | DQ504430.1                    | 1.1               |
| MA5              | <i>Mesodesma donacium</i> | <i>Raoultella ornithinolytica</i>           | 0.0     | 100            | 99           | CP004142.1                    | 0.8               |
| MA11             | <i>Mesodesma donacium</i> | <i>Klebsiella</i> sp.                       | 0.0     | 100            | 99           | GU290323.1                    | 0.9               |

<sup>a</sup> Sequence homology was determined with BLASTN.

**Tableau 1 : Diamètre des halos de dégradation de la cellulose et identification des souches**

| Test                          | Reaction and/or enzyme  | <i>Aeromonas bivalvium</i> (MC23) | <i>Aeromonas salmonicida</i> (MC25) | <i>Aeromonas bivalvium</i> (MA2) | <i>Raoultella ornithinolytica</i> (MA5) | <i>Klebsiella</i> sp. (MA11) |
|-------------------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---|------------------------------|
| ONPG                          | $\beta$ -Galactosidase ( <i>ortho</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosidase) | +                                 | +                                   | +                                | +                                       | -                            |
| ADH                           | Arginine dihydrolase  | +                                 | +                                   | +                                | -                                       | -                            |
| LDC                           | Lysine decarboxylase  | -                                 | -                                   | -                                | +                                       | +                            |
| ODC                           | Ornithine decarboxylase   | -                                 | -                                   | -                                | -                                       | -                            |
| CIT                           | Citrate utilization   | -                                 | -                                   | -                                | +                                       | +                            |
| H <sub>2</sub> S              | H <sub>2</sub> S production   | -                                 | -                                   | -                                | -                                       | -                            |
| URE                           | Urease  | -                                 | -                                   | -                                | +                                       | +                            |
| TDA                           | Tryptophan deaminase  | +                                 | +                                   | +                                | +                                       | +                            |
| IND                           | Indole production   | +                                 | +                                   | +                                | +                                       | +                            |
| VP                            | Acetoin production (Voges-Proskauer test)   | -                                 | +                                   | +                                | +                                       | +                            |
| GEL                           | Gelatinase  | +                                 | +                                   | +                                | -                                       | -                            |
| GLU                           | Fermentation/oxidation (glucose)  | +                                 | +                                   | +                                | +                                       | +                            |
| MAN                           | Fermentation/oxidation (mannitol)   | +                                 | +                                   | +                                | +                                       | +                            |
| INO                           | Fermentation/oxidation (inositol)   | -                                 | -                                   | -                                | +                                       | +                            |
| SOR                           | Fermentation/oxidation (sorbitol)   | -                                 | -                                   | -                                | +                                       | +                            |
| RHA                           | Fermentation/oxidation (rhamnose)   | -                                 | -                                   | -                                | +                                       | +                            |
| SAC                           | Fermentation/oxidation (saccharose)   | +                                 | +                                   | +                                | +                                       | +                            |
| MEL                           | Fermentation/oxidation (melibiose)  | -                                 | -                                   | -                                | +                                       | +                            |
| AMY                           | Fermentation/oxidation (amygdalin)  | -                                 | -                                   | +                                | +                                       | +                            |
| ARA                           | Fermentation/oxidation (arabinose)  | +                                 | +                                   | +                                | +                                       | +                            |
| Nitrate reduction<br>GLU tube | NO <sub>2</sub> production  | -                                 | -                                   | +                                | +                                       | +                            |

**Tableau 2 : Profils biochimiques des souches isolées obtenus par API20E**

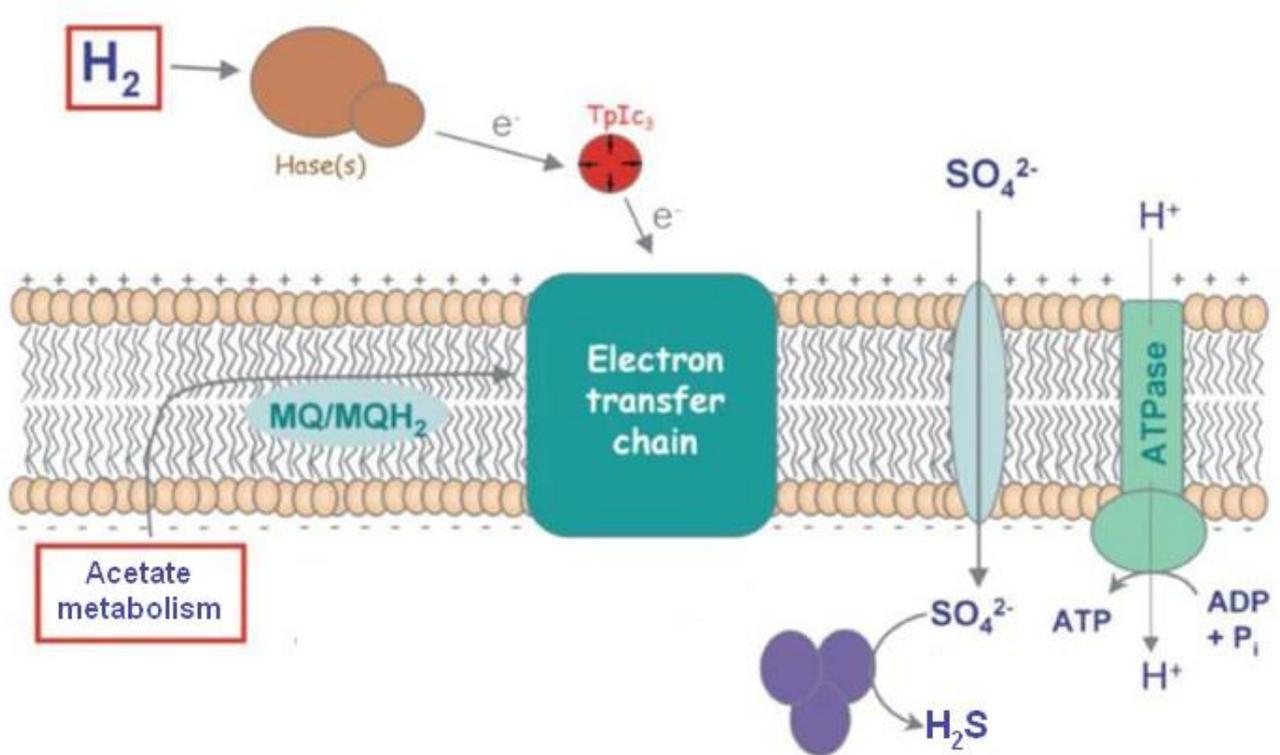
*Applied and Environmental Microbiology, July 2014, Volume 80, Number 14, p. 4199–4206*

**Document 2 Les réactions de méthanogénèse**

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| Voie AC            | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$<br>$\Delta G^{\circ'} = -31.0 \text{ kJ mol}^{-1}$                 | (1) |
| Voie OSA : étape 1 | $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+$<br>$\Delta G^{\circ'} = +104.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ | (2) |
| Voie OSA : étape 2 | $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$<br>$\Delta G^{\circ'} = -135.6 \text{ kJ mol}^{-1}$              | (3) |

FEMS Microbiol Ecol 83 (2013) 38–48

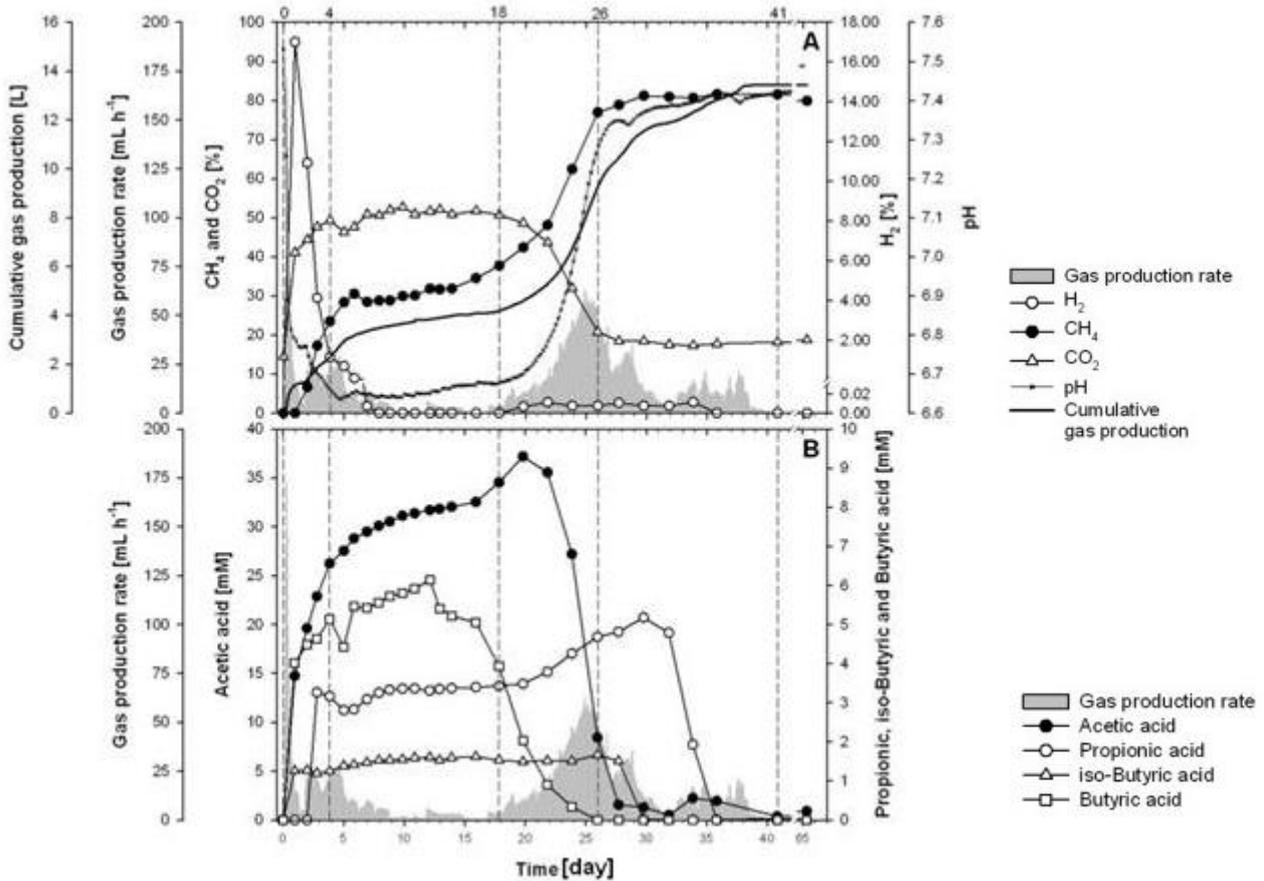
**Document 3 Représentation schématique de la production d'ATP chez les bactéries sulfatoréductrices (BSR)**



Energies 2015, 8, 399-429

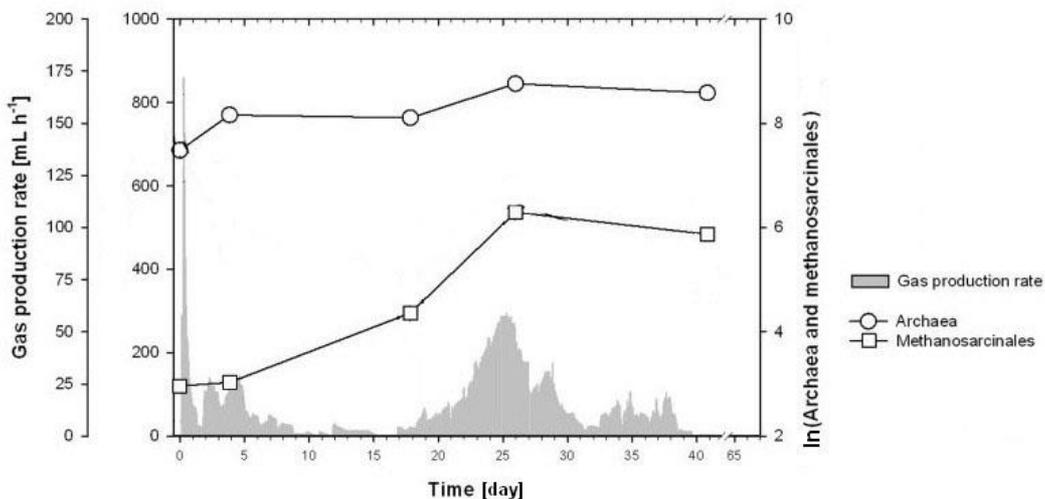
**Document 4**

**4a : Évolution des différents paramètres suivis dans le bioréacteur**



Fermenter performance. pH-values, qualitative and quantitative properties of biogas (A) and concentrations of volatil fatty acids (B) during the fermentation. Gas production rate (grey background) is given in A and B to ease the comparison. Dashed lines at t = 0, 4, 18, 26, 41 outline the samples which were additionally investigated by molecular approaches. To ease = faciliter

**4b : Évolution des populations bactériennes au cours du processus de biométhanisation**



Les Méthanosarcinales sont une sous population des Archées.

## Document 5 Propriétés des différents virus/bactériophages utilisés et leurs conditions de culture

The cell lines were grown to confluence in 25-cm<sup>2</sup> cell culture flasks in their respective cell culture medium (CCM), and the virus was inoculated and cultivated to a 80 to 100% cytopathogenic effect (CPE),

TABLE 1. Properties of the viruses/bacteriophage used in the study<sup>a</sup>

| Virus/phage | Shape                 | Family                  | Size (nm) | Envelope | Genome            |           |
|-------------|-----------------------|-------------------------|-----------|----------|-------------------|-----------|
|             |                       |                         |           |          | Type <sup>b</sup> | Size (kb) |
| AIV         | Spherical/pleomorphic | <i>Orthomyxoviridae</i> | 80–120    | Yes      | Segmented –ssRNA  | 10.0–14.6 |
| BPIV-3      | Spherical/pleomorphic | <i>Paramyxoviridae</i>  | 150–200   | Yes      | –ssRNA            | 15.4      |
| FCoV        | Spherical             | <i>Coronaviridae</i>    | 100–120   | Yes      | +ssRNA            | 27.6–31   |
| FCV         | Icosahedral           | <i>Caliciviridae</i>    | 27–40     | No       | +ssRNA            | 7.7       |
| MS2         | Icosahedral/spherical | <i>Leviviridae</i>      | 26        | No       | +ssRNA            | 3.6       |

<sup>a</sup> See references 24, 26, 27, 38, 43.

<sup>b</sup> –ssRNA, negative-sense single-stranded RNA; +ssRNA, positive-sense single-stranded RNA.

TABLE 2. Cultivation conditions for the viruses and bacteriophage used in the study

| Microorganism | Cell/bacterium (strain) | CCM <sup>f</sup>   | MOI <sup>a</sup> | Titer (log <sub>10</sub> ml <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> |
|---------------|-------------------------|--|------------------|--|
| LPAIV H5N3    | MDCK (ATCC CCL-34)      | EMEM with 2.5 mg L <sup>-1</sup> TPCK-trypsin <sup>c</sup> | 0.001            | 7.0  |
| HPAIV H7N1    | MDCK (ATCC CCL-34)      | EMEM with 2% (vol/vol) FBS <sup>d</sup>                    | 0.001            | 8.3  |
| BPIV-3        | BT <sup>g</sup>         | EMEM-Tricine with 2% (vol/vol) FBS <sup>e</sup>            | 0.1              | 7.0  |
| FCV           | Fcwf (ATCC CRL-2787)    | EMEM-Tricine with 2% (vol/vol) FBS                         | 0.1              | 6.6  |
| FCoV          | Fcwf (ATCC CRL-2787)    | EMEM-Tricine with 2% (vol/vol) FBS                         | 0.03             | 6.7  |
| MS2           | WG49 (ATCC 700730)      | Nutrient broth   | 1                | 10   |

<sup>a</sup> MOI, multiplicity of infection.

<sup>b</sup> TCID<sub>50</sub> for virus and number of PFU for bacteriophage.

<sup>c</sup> EMEM, Eagle's minimal essential medium with 120 mg liter<sup>-1</sup> penicillin G sodium salt and 100 mg liter<sup>-1</sup> streptomycin sulfate; TPCK-trypsin, trypsin treated with L-(tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ).

<sup>d</sup> FBS, fetal bovine serum (PAA Laboratories, Pasching, Austria).

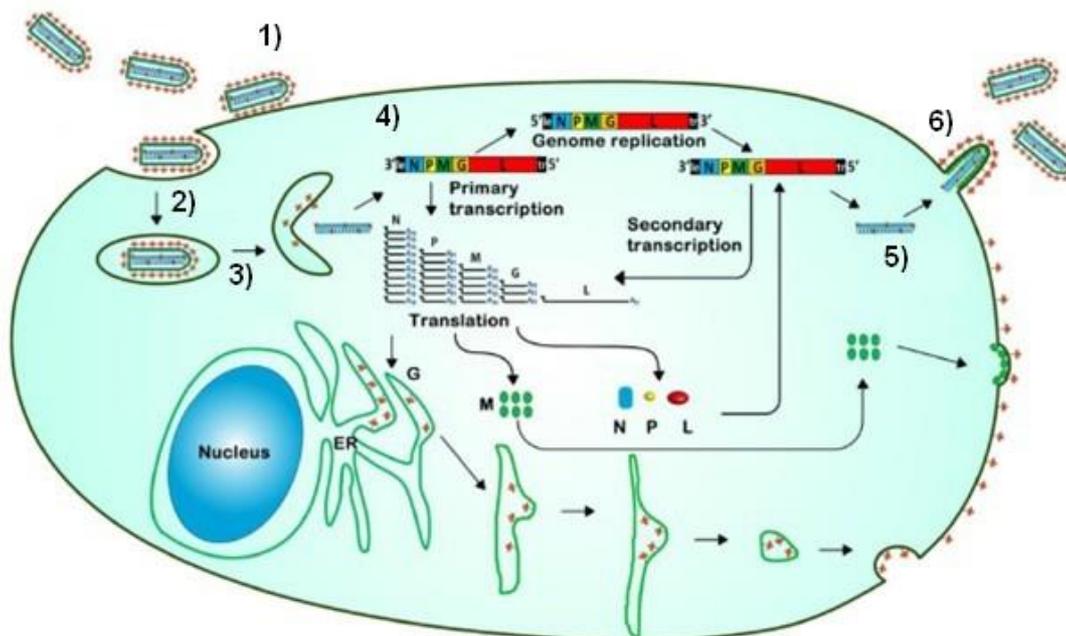
<sup>e</sup> EMEM-Tricine, EMEM with 3 g liter<sup>-1</sup> Tricine and 25 mg liter<sup>-1</sup> neomycin sulfate.

<sup>f</sup> SVA production, Uppsala, Sweden.

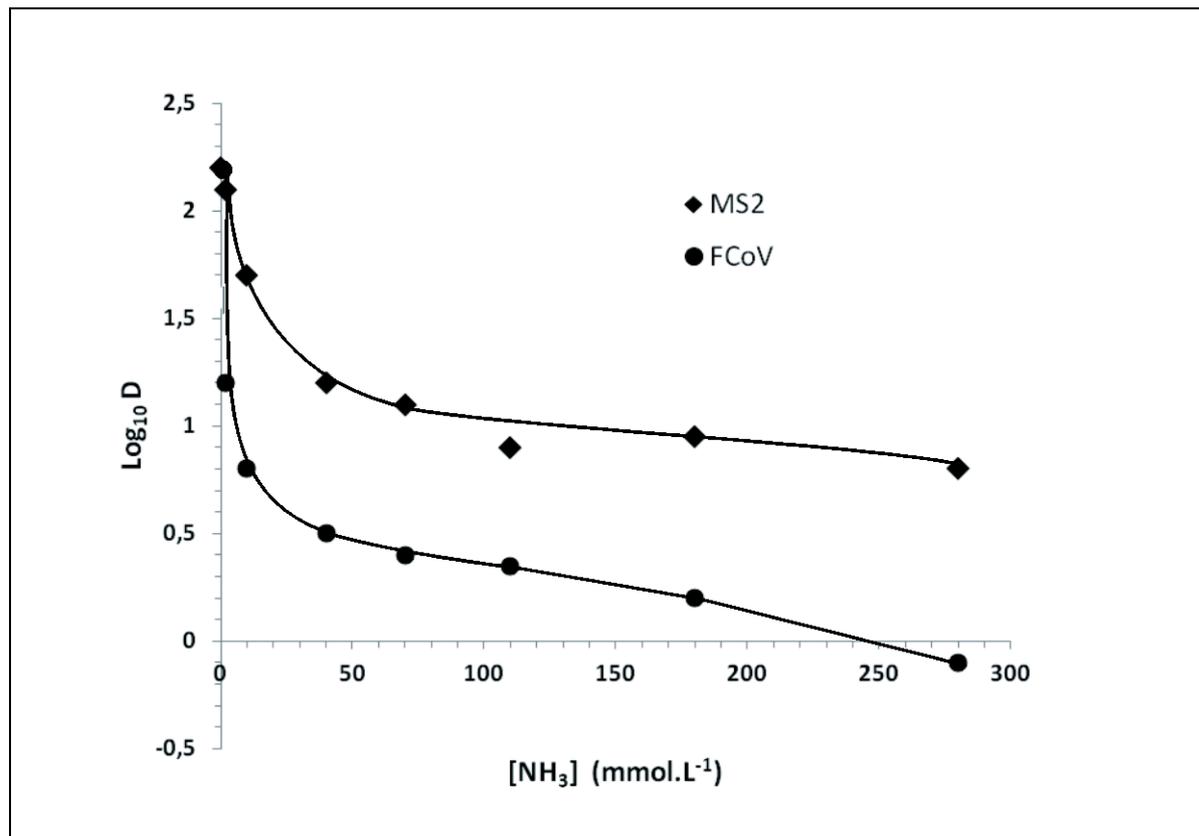
<sup>g</sup> BT, bovine turbinate.

*Applied and Environmental Microbiology, June 2011, Vol. 77, No. 12, p. 3960–3966*

## Document 6 : Exemple de cycle de multiplication d'un virus ARN (-)



Anica Dricu (Ed.), ISBN: 978-953-51-0881-8, InTech

**Document 7 Action de l'ammoniac sur les virus MS2 et FCoV**

Log D values (h) of ssRNA viruses as a function of ammonia concentration (mmol.L<sup>-1</sup>) in waste.

D values : the time required to reduce the population by 1 Log [90%].

---

*Applied and Environmental Microbiology, June 2011, Vol. 77, No. 12, p. 3960–3966*

---

## 2016 - U42 : Biologie cellulaire

---

Durée 2 h – coefficient 1

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

### Cancer et environnement tumoral

Un constat réalisé sur ces vingt-cinq dernières années montre que si l'incidence du cancer a considérablement augmenté, le risque de mortalité par cancer a diminué. Deux éléments ont joué un rôle majeur dans ce dernier aspect positif : l'augmentation de l'activité de dépistage et les efforts de recherche sur la connaissance de la cellule cancéreuse et son environnement.

#### 1. La cellule cancéreuse (8 points)

Un cancer survient à partir d'une cellule normale altérée par un certain nombre de mutations. Trois catégories de gènes peuvent participer à l'apparition du processus de cancérisation : les « proto-oncogènes », les « anti-oncogènes » et les gènes qui permettent à la cellule de réparer son ADN lorsqu'il est endommagé.

##### 1.1. Expliquer le terme proto-oncogène.

La transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse est un processus long, qui peut durer des dizaines d'années.

##### 1.2. Citer quatre caractéristiques fonctionnelles acquises par les cellules cancéreuses leur permettant d'être à l'origine d'une tumeur maligne.

Les observations histologiques sont à la base du diagnostic anatomopathologique de toute tumeur. Le **document 1** montre une section histologique de tumeur et précise la démarche technique mise en œuvre pour permettre cette observation.

##### 1.3. Identifier les quatre étapes de préparation de l'échantillon nécessaires à l'observation histologique présentée dans le **document 1**. Expliquer leurs rôles respectifs.

La cellule cancéreuse présente souvent un nombre anormal et variable de chromosomes. Cette particularité peut être révélée lors de l'établissement d'un caryotype.

##### 1.4. Indiquer à quel moment précis du cycle cellulaire les chromosomes sont observés pour établir un caryotype, justifier ce choix.

##### 1.5. Préciser le type de microscope utilisé pour visualiser les chromosomes lors de l'établissement d'un caryotype coloré au Giemsa.

##### 1.6. Annoter le **document 2**. Reporter les lettres A à C sur la copie et indiquer les légendes correspondantes.

Le processus de cancérisation trouve son origine dans des dérégulations du cycle cellulaire.

##### 1.7. Sur un seul graphique, représenter (à l'aide de deux courbes) les évolutions respectives au cours du temps de la quantité d'ADN par cellule et du nombre de chromosomes par cellule. Localiser sur le même graphique les étapes du cycle cellulaire.

##### 1.8. Décrire brièvement le mode d'action des cyclines et des CDK agissant conjointement aux points de contrôle du cycle cellulaire.

## 2. Environnement tumoral et étude du rôle de l'endocan (7,5 points)

La présence des mutations multiples n'est pas en soi suffisante pour induire la naissance à d'une tumeur. La cellule néoplasique a besoin d'un milieu propice pour pouvoir croître. La tumeur entretient en effet des relations étroites avec son environnement.

Les composants de la matrice extracellulaire tumorale peuvent être sécrétés par les cellules tumorales mais, ils sont principalement le produit des fibroblastes de l'environnement tumoral.

**2.1.** Citer les constituants biochimiques majeurs généralement rencontrés dans la matrice extracellulaire d'un tissu conjonctif.

Dans les tumeurs broncho-pulmonaires, une molécule provenant de l'environnement tumoral dénommée endocan (endo- pour endothélium et -can pour protéoglycane) a été clonée depuis environ 10 ans.

L'étude de l'activité *in vivo* de la molécule endocan, présentée dans le **document 3**, utilise un modèle de xénogreffe tumorale sous cutanée de cellules HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) chez la souris SCID (*severe combined immunodeficiency*). La lignée de cellules humaines 293 n'est pas spontanément tumorigène *in vivo*.

**2.2.** Analyser globalement les résultats de l'étude présentée dans le **document 3**. Proposer une conclusion.

Pour confirmer le rôle de l'endocan, un traitement par des anticorps monoclonaux (mAb) anti-endocan a été réalisé sur ce modèle de xénogreffe tumorale. Les résultats de cette étude sont consignés dans le **document 4**. Cette étude a nécessité l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

**2.3.** Analyser l'effet de l'anticorps anti-endocan nommé MEP 08.

**2.4.** Comparer l'effet des anticorps MEP 08 et MEP 14. Conclure sur le domaine impliqué dans l'action de l'endocan.

**2.5.** Expliquer en quoi l'utilisation d'un antisérum polyclonal spécifique de l'endocan aurait été contre-indiquée.

Les anticorps monoclonaux utilisés ont été obtenus à partir du surnageant de culture d'hybridomes.

**2.6.** Indiquer les moyens techniques utilisés pour :

- obtenir et sélectionner des hybridomes
- obtenir des clones d'hybridomes
- cribler les clones producteurs d'anticorps anti-endocan monoclonaux.

Les souris SCID utilisées dans ces expériences possèdent une mutation autosomale et récessive dans le gène codant pour une recombinaison responsable du réarrangement nécessaire à la production de toutes les immunoglobulines et de tous les récepteurs des cellules T. Cette mutation conduit à une absence totale de lymphocytes B et T matures.

**2.7.** Expliquer l'intérêt de connaître le caractère autosomal et récessif de la mutation pour l'obtention de souris SCID.

**2.8.** Préciser l'intérêt d'utiliser des souris SCID dans le cadre de l'étude décrite.

### 3. La signalisation cellulaire (1,5 points)

Les composants de la matrice extracellulaire interagissent avec certaines molécules d'adhérence appelées intégrines.

L'adhésion assurée par les intégrines conditionne certains événements moléculaires essentiels au contrôle du cycle cellulaire. La liaison des intégrines à leurs ligands matriciels active la cascade des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) au travers de plusieurs voies de transduction. La voie dépendante de la tyrosine kinase FAK (*focal adhesion kinase*) et de Ras est la plus fréquemment décrite.

3.1. Indiquer en quoi consiste la transduction dans une voie de signalisation.

3.2. Préciser l'activité catalytique d'une protéine kinase.

La Protéine Ras est la protéine exprimée par un proto-oncogène, le gène ras, il s'agit d'une protéine G.

3.3. Expliciter l'appellation de protéine « G ».

### 4. Traitement anti-cancéreux (2 points)

Dans la recherche des composés qui démontrent des propriétés anti-tumorales, un intérêt croissant s'est développé pour l'utilisation de composés naturels du fait de leur faible toxicité. Parmi eux, figure la curcumine, extraite du rhizome d'une plante herbacée, *Curcuma longa*, de la famille du gingembre (Zingibéracées). En effet, selon plusieurs études, la curcumine inhibe la croissance de nombreuses lignées cancéreuses (poumon, sein, peau, rein, ...).

Le **document 5** rapporte des résultats d'expériences effectuées pour évaluer l'action de la curcumine comme agent anti-cancéreux dans le traitement du cancer du cerveau.

L'impact de la curcumine a été étudié en première approche sur la croissance d'une lignée établie de cellules de glioblastomes (U87).

4.1. Expliquer l'expression « lignée cellulaire établie ».

4.2. Expliquer l'utilisation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans l'estimation de la prolifération cellulaire.

4.3. Déterminer la concentration inhibitrice (CI50) de la curcumine pour les cellules de gliomes U87 à partir des résultats présentés dans le **document 5**.

4.4. Indiquer une technique pouvant être utilisée dans les expériences du **document 5** pour évaluer la radioactivité.

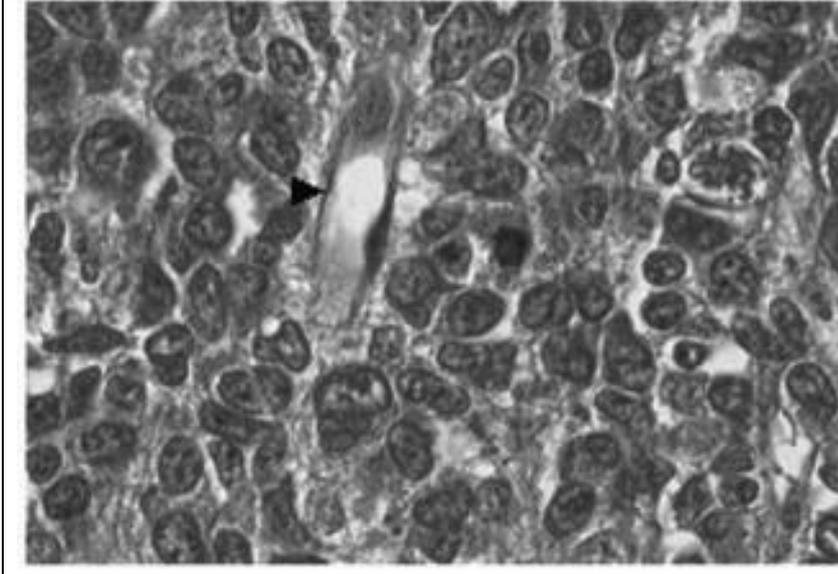
#### Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point) :

- justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire),
- clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture.

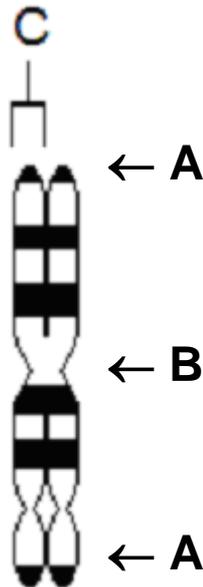
**Document 1 : Histological section of tumor**

Materials and methods for pathological analysis :

Selected organ specimens were fixed in 4% buffered formaldehyde for 2 h and additionally processed for paraffin embedding. Three- $\mu\text{m}$  thick paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin.



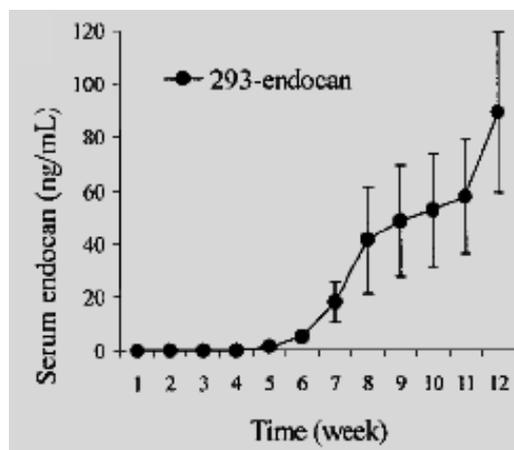
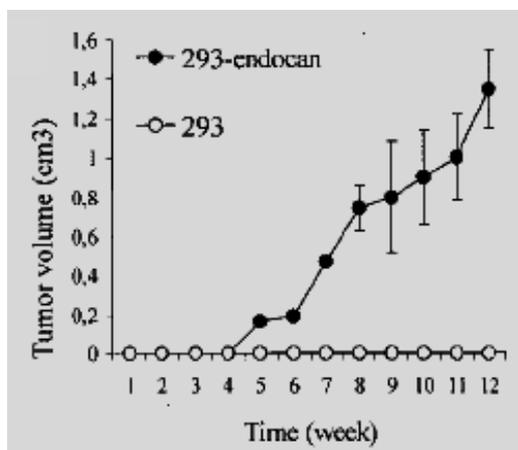
Histological section of tumor showing presence of tumoral cells with high nuclear/cytoplasmic ratio, multinucleated cells, abnormal mitoses and a nontumoral well-differentiated capillary (*arrowhead*). x400 magnification

**Document 2 : Schéma d'un chromosome mitotique**

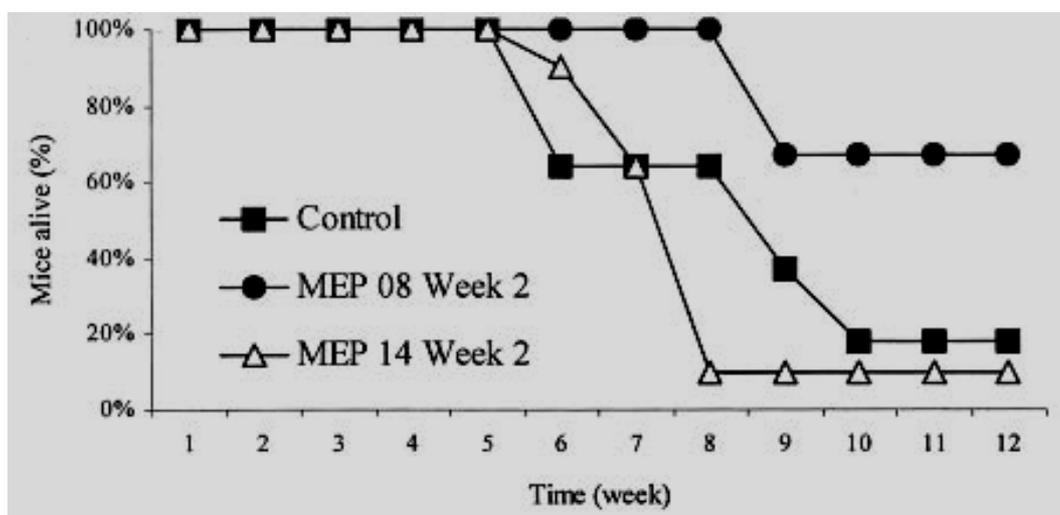
### Document 3 : Kinetics of tumor growth and serum endocan levels

Full-length human endocan cDNA was cloned into the pcDNA3 vector, and the resulting construct was stably transfected into HEK 293 cells. Two separate clones that secreted  $762 \pm 211$  ng endocan/day/106 cells or control clones (transfected with vector alone) were injected into the flank of male SCID mice.

Mouse blood endocan levels were measured by ELISA.



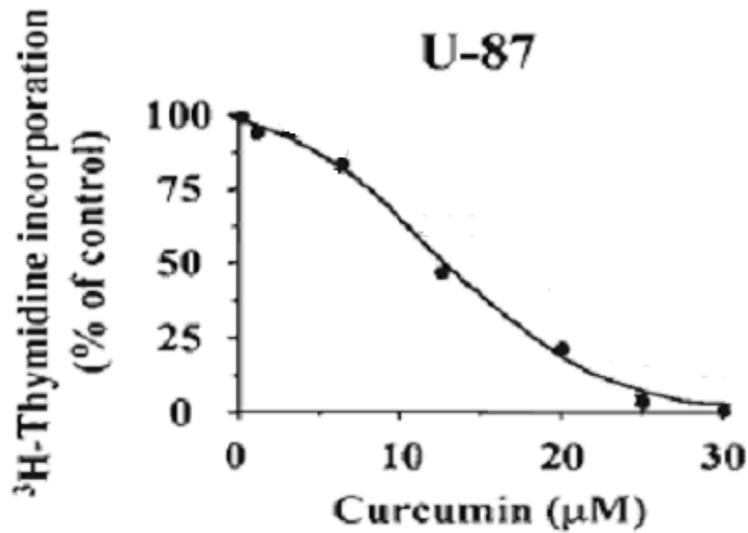
### Document 4 : Kinetics of survival of mice not treated (■) or treated with MEP 08 mAb (●) or MEP 14 mAb (△)



To confirm the role of the endocan polypeptide in mediating tumor growth, anti-endocan mAbs were tested as blocking agents.

Two mAbs, one that recognizes the phenylalanine-rich region at position 116 (MEP 08) and one that recognizes the COOH-terminal portion of endocan (MEP 14), are used. The MEP 08 (IgG2a,K) and MEP 14 (IgG2a,K) were purified from hybridoma cell cultures conditioned in serum-free medium.

Mice were inoculated with HEK 293-endocan cells and received weekly injections of MEP 08 or MEP 14 starting at week 2 and continuing until week 12.

**Document 5 : Effet de la curcumine sur la croissance des cellules tumorales cérébrales****Bibliographie :**

- Arnaud Scherpereel, Thibaut Gentina, Bogdan Grigoriu, Stéphanie Sénéchal, Anne Janin, Anne Tsicopoulos, François Plénat, David Béchar, André-Bernard Tonnel, and Philippe Lassalle. Overexpression of Endocan Induces Tumor Formation. *Cancer Research* 63, 6084–6089, September 15, 2003.  
([http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/40/75/21/PDF/these\\_non\\_protege.pdf](http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/40/75/21/PDF/these_non_protege.pdf))
- Marie-Claude Perry. Evaluation de la curcumine comme agent anti-cancéreux dans le traitement des tumeurs cérébrales. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en chimie, Université du Québec, Montréal, 2008.  
(<http://www.archipel.uqam.ca/874/1/M10213.pdf>)

# Session 2016 : Éléments de corrigé

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

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

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

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

*Pour certaines questions, des liens internet peuvent être proposés en complément.*

## 2016 - U11 : Mathématiques

### EXERCICE 1

#### Partie A

1.  $\frac{749}{500} \approx 1,5$  et  $\frac{1122}{749} \approx 1,5$ , donc Kévin a conjecturé une suite géométrique de raison 1,5 soit une augmentation par quinzaine de 50 %.

La limite d'une suite géométrique de raison supérieure à 1 est  $+\infty$ , donc avec ce modèle sur le long terme les vers seraient en quantité infinie ce qui n'est pas réaliste (manque de nourriture pour les vers, place dans le bac, etc.).

#### 2. (a)

|                            |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| Nombre de quinzaines $t_i$ | 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8     | 9     |
| Nombres de vers $N_i$      | 500  | 749  | 1122 | 1681 | 2518 | 3772 | 5650 | 8464 | 12678 | 18992 |
| $y_i$                      | 4,17 | 3,76 | 3,35 | 2,92 | 2,49 | 2,05 | 1,58 | 1,06 | 0,47  | -0,30 |

(b)  $\Delta : y = -0,48 t + 4,32$

- (c) L'ouverture de la pêche a lieu dans 7 mois donc dans 14 quinzaines. En utilisant l'ajustement affine précédent on obtient  $y = 0,48 \times 14 + 32$ , soit  $y = -2,4$

Or  $y = \ln\left(\frac{33000}{N} - 1\right)$  d'où  $\ln\left(\frac{33000}{N} - 1\right) = -2,4$  soit  $\frac{33000}{N} - 1 = e^{-2,4}$

Par transformation on obtient  $N = \frac{33000}{e^{-2,4} + 1} \approx 30255$

La proposition 30300 estime le mieux le nombre de vers pour l'ouverture de la saison de pêche.

3. Déterminons  $\lim_{t \rightarrow +\infty} N(t)$  avec  $N(t) = \frac{33000}{1 + 75 e^{-0,48t}}$

Si  $t \rightarrow +\infty$  alors  $-0,48t \rightarrow -\infty$ , d'où  $e^{-0,48t} \rightarrow 0$ .

Donc  $\lim_{t \rightarrow +\infty} N(t) = \frac{33000}{1} = 33000$

Kevin ne peut donc pas confirmer l'affirmation de Maxime.

#### Partie B

**Question préliminaire :** en sortant du four, le pain se refroidit directement (il ne se chauffe pas tout seul), donc ce n'est pas la courbe 3. Sa température va se stabiliser à la température ambiante, qui n'est pas de  $0^\circ\text{C}$ , donc ce n'est pas la courbe 2. L'évolution de la température du pain à la sortie du four en fonction du temps correspond à la courbe 1.

#### I Résolution d'une équation différentielle

- L'équation  $y' + 6y = 0$  est du modèle  $y' + ay = 0$  avec  $a = 6$ . Donc les solutions de  $(E_0)$  sont les fonctions de la forme  $C e^{-6t}$  avec  $C$  une constante.
- La fonction  $g(t) = k$  est solution de  $y' + 6y = 6a$ , donc  $g'(t) + 6g(t) = 6a$   
d'où  $0 + 6k = 6a$  soit  $k = a$ .
- Les solutions de l'équation différentielle  $(E)$  sont donc de la forme  $C \cdot e^{-6t} + a$
- Soit  $h(t) = C e^{-6t} + a$  solution de  $(E)$  vérifiant d'après le texte la condition  $h(t) = 180$ .  
D'où  $h(t) = C e^{-6 \times 0} + a = 180$  soit  $C = 180 - a$ . Donc  $h(t) = (180 - a) e^{-6t} + a$

**II Étude d'une fonction**

1. (a) Le pain est entreposé à une température de  $28^\circ\text{C}$  et  $a$  est la température de la pièce donc  $a = 28$ .  
Donc les solutions de (E) deviennent  $(180 - 28)e^{-6t} + 28$  soit  $152e^{-6t} + 28$   
 $f(t)$  est bien solution de (E) dans le contexte proposé.
- (b) Calculons  $f(t)$ .  $f(t) = 152 \times (-6)e^{-6} + 0 = -912e^{-6}$   
Pour tout  $t \in [0; +\infty[$ ,  $e^{-6t} > 0$  et  $-912 < 0$ , donc  $f'(t) < 0$  sur  $[0; +\infty[$ .  
La fonction  $f$  est donc décroissante sur  $[0; +\infty[$ .
- (c) Calculons  $f(0,5)$ .  $f(0,5) \approx 36$  donc  $\theta \approx 36^\circ\text{C}$ .
- (d) On peut résoudre  $f(t) = 62$  par calcul. On trouve  $t \approx 0,245$ , ce qui correspond à environ 15 minutes.
2. Dans cette question, on doit reprendre la fonction  $h(t) = (180 - a)e^{-6t} + a$ , avec  $a$  la température ambiante. D'après le texte on cherche donc  $a$  tel que  $h(0,5) = 30$ .  
On obtient l'équation  $(180 - a)e^{-6 \times 0,5} + a = 30$  soit  $(180 - a)e^{-3} + a = 30$ .  
Soit  $180e^{-3} - ae^{-3} + a = 30$   $a(-e^{-3} + 1) = 30 - 180e^{-3}$   
 $a = \frac{30 - 180e^{-3}}{-e^{-3} + 1} \approx 22$ . La température de la pièce devrait être d'environ  $22^\circ\text{C}$ .

**EXERCICE 2****Partie A : défauts de fabrication et conformité**

1. D'après l'énoncé,  $P(A) = 0,55$ ,  $P_A(I) = 0,026$  et  $P_B(I) = 0,036$ .  
Calculons  $P(I)$  soit  $P(A \cap I) + P(B \cap I)$ .  
Or  $P(A \cap I) = P(A) \times P_A(I) = 0,55 \times 0,026$  et  
 $P(B \cap I) = (1 - P(A)) \times P_B(I) = (1 - 0,55) \times 0,036$   
D'où  $P(I) = 0,55 \times 0,026 + 0,45 \times 0,036 = 0,0305$
2. (a) Chacun des 100 tirages est identique et indépendant des autres (assimilation à un tirage avec remise). Chaque tirage a deux issues possibles : succès (pipette inutilisable) avec une probabilité de 0,03 et échec. Donc  $X$  suit donc une loi binomiale de paramètres  $n = 100$  et  $p = 0,03$ .
- (b) Il faut calculer  $P(X \geq 1)$ , c'est à dire  $1 - P(X = 0)$ .  
 $P(X = 0) \approx 0,04755$  d'où  $P(X \geq 1) \approx 0,952$
3. La variable aléatoire  $C$  suit une loi normale de paramètres 100 et 1,021.
- (a)  $P(\text{Conforme}) = P(98 \leq C \leq 102) \approx 0,9499$ .
- (b) D'après la question 1 sur les 1000 pipettes produites il y aura  $1000 \times (1 - 0,0305)$  pipettes utilisables.  
D'après la question 3 (a), il y aura donc  $(1000 \times (1 - 0,0305)) \times 0,9499$  pipettes conformes, soit environ 921.

**Partie B : Estimation**

1. La proportion de pipettes cassées dans le lot est de  $\frac{5}{200}$  soit 0,025. On estime donc la proportion  $p_c$  dans la livraison à 0,025.
2.  $\text{IC}_{95\%} = \left( 0,025 - 1,96 \times \sqrt{\frac{0,025(1-0,025)}{200-1}} \right); \left( 0,025 + 1,96 \times \sqrt{\frac{0,025(1-0,025)}{200-1}} \right)$   
Soit  $\text{IC}_{95\%} = [0,0033; 0,0467]$ .

## 2016 - U12 : Sciences physiques et chimiques

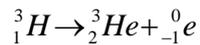
### I. ITER, UNE ENERGIE POUR NOTRE AVENIR

#### 1. Autour du tritium

1.1. Le noyau est composé d'un proton ( $Z = 1$ ) et de deux neutrons (neutrons =  $A - Z$ ).

1.2. La particule  $b^-$  est un électron.

1.3. L'équation de désintégration du tritium est :



On utilise pour cela les lois de Soddy soit :

- la conservation de la charge ( $Z$ ) :  $1 = 2 - 1$
- la conservation du nombre de nucléons ( $A$ ) :  $3 = 3 + 0$

1.4. Le temps de demi-vie  $t_{1/2}$  est la durée au bout de laquelle la moitié des noyaux initialement présents s'est désintégrée.

1.5. On sait que  $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$ . L'application numérique donne bien  $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{5,62 \cdot 10^{-2}} = 12,3$  ans.

#### 2. Etude de la réaction de fusion

2.1. L'expression littérale de la variation de masse est  $\Delta m = m(\text{produits}) - m(\text{réactifs})$ .

$$\text{Soit } \Delta m = (4,00150 + 1,00866) - (2,01355 + 3,01550) = -1,88900 \times 10^{-2} \text{ u}$$

$$\text{Ou encore, } \Delta m = -3,13676 \times 10^{-29} \text{ kg.}$$

2.2. On a  $E_1 = \Delta m \cdot c^2$

$$\underline{\text{AN}} \quad E_1 = -3,13676 \times 10^{-29} \times (2,998 \times 10^8)^2 = -2,819 \times 10^{-12} \text{ J} = -17,60 \text{ MeV}$$

En utilisant la variation de masse  $\Delta m$  en valeur absolue, l'énergie  $E_1$  sera positive (le signe - indiquant simplement qu'il s'agit d'une énergie cédée par le système).  $E_1$  représente l'énergie libérée lors de la désintégration  $\beta^-$  d'un noyau de tritium.

2.3. L'énergie libérée vaut  $E_2 = P \times \Delta t$

$$\underline{\text{AN}} \quad E_2 = 500 \times 10^6 \times 400 = 2,00 \times 10^{11} \text{ J}$$

$$\text{en MeV: } E_2 = \frac{2,00 \cdot 10^{11}}{1,602 \cdot 10^{-13}} = 1,25 \cdot 10^{24} \text{ MeV} \quad \text{conformément à la valeur de l'énoncé.}$$

2.4. Le nombre de noyaux de tritium nécessaires pour obtenir cette énergie vaut :

$$N = \frac{E_2}{E_1} \quad \underline{\text{AN}} \quad N = \frac{1,25 \cdot 10^{24}}{17,60} = 7,10 \cdot 10^{22} \text{ noyaux.}$$

2.5. On en déduit la masse nécessaire :

$$m = \frac{N \cdot M}{N_A} \quad \underline{\text{AN}} \quad m = \frac{7,10 \times 10^{22} \times 3,01550}{6,023 \times 10^{23}} = 3,56 \times 10^{-4} \text{ kg}$$

2.6. Oui, l'appellation de réacteur « propre » en ce qui concerne la contamination radioactive, est correcte.

## II. OXYDE ET HYDROXYDE DE MAGNESIUM : THERMOCHEMIE ET SOLUBILITE

### 1. Décomposition du carbonate de magnésium

1.1.1. D'après la loi de Hess :  $D_r H_{298}^0 = D_f H_{298}^0(MgO) + D_f H_{298}^0(CO_2) - D_f H_{298}^0(MgCO_3)$

1.1.2.  $D_r H_{298}^0 = -601,6 - 393,5 - (-1095,8) = 1,007 \times 10^2 \text{ kJ mol}^{-1}$

$D_r H_{298}^0 > 0$ , la réaction est donc endothermique.

1.2.1. Par définition :  $D_r S_{298}^0 = S_{m,298}^0(MgO) + S_{m,298}^0(CO_2) - S_{m,298}^0(MgCO_3)$

1.2.2.  $D_r S_{298}^0 = 26,9 + 213,6 - 65,8 = 1,75 \times 10^2 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

Le nombre de moles de gaz augmente, donc l'entropie augmente car elle mesure le désordre du système (l'état gazeux étant dispersé et désordonné).

1.3.1.  $\Delta_r G_{298}^0 = \Delta_r H_{298}^0 - T \cdot \Delta_r S_{298}^0$

AN  $\Delta_r G_{298}^0 = 1,007 \times 10^5 - 298 \times 1,75 \times 10^2 = 4,86 \times 10^4 \text{ J mol}^{-1} = 48,6 \text{ kJ mol}^{-1}$

A l'équilibre,  $\Delta_r G = 0$  ce qui donne la loi de Guldberg et Waage :

$$D_r G_{298}^0 + RT \ln K^0 = 0$$

$$K^0 = \exp\left(-\frac{D_r G_{298}^0}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{4,86 \times 10^4}{8,31 \times 298}\right) = 3,00 \times 10^{-9} \text{ (sans unité)}$$

$K^0 \ll 1$ , on en conclut donc que la réaction est très limitée à 298 K.

1.3.2. D'après la loi de Van't Hoff, une réaction endothermique est favorisée par une augmentation de la température de réaction. Pour  $T > 800^\circ\text{C}$ , l'équilibre sera déplacé dans le sens direct ( $K^0$  augmentera)

### 2. Étude de la solubilité de l'hydroxyde de magnésium

2.1. Par définition  $[H_3O^+] = 10^{-pH}$ , ce qui donne  $[H_3O^+] = 10^{-10,5} = 3,16 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ .

D'après le produit ionique de l'eau  $[H_3O^+] \times [HO^-] = K_e$ , soit :

$$[HO^-] = \frac{K_e}{[H_3O^+]} = \frac{10^{-14}}{3,16 \times 10^{-11}} = 3,16 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

2.2.  $Mg(OH)_2(s) = Mg^{2+}(aq) + 2HO^-(aq)$

On en déduit  $[Mg^{2+}] = \frac{[HO^-]}{2} = \frac{3,16 \times 10^{-4}}{2} = 1,58 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

2.3. Par définition le produit de solubilité a pour expression :  $K_s = [Mg^{2+}] \times [HO^-]^2$

AN  $K_s = 1,58 \times 10^{-4} \times (3,16 \times 10^{-4})^2 = 1,58 \times 10^{-11} \text{ (sans unité)}$ .

### III. CHIMIE ORGANIQUE

#### Partie 1 : Aspect stéréochimique de la molécule d'éphédrine

1. Les carbones  $C_{(1)}$  et  $C_{(2)}$  sont des carbones asymétriques. On définit un carbone asymétrique par un atome de carbone lié à 4 substituants différents.
2. Pour  $n=2$  carbones asymétriques, on aura  $2^n$  stéréoisomères soit 4 pour l'éphédrine.
3. On utilise les règles de CIP (Cahn-Ingold-Prelog) pour classer les substituants de  $C_{(2)}$ .  $NH - CH_3 > C_{(1)} > CH_3 > H$  (le signe  $>$  signifie : « est prioritaire devant »).

On obtient alors l'ordre de priorité :

(1) : -NH-CH<sub>3</sub>

(2) : -C(1)

(3) : -CH<sub>3</sub>

(4) : -H

On regarde ensuite la molécule dans l'axe  $C_{(2)} - H$ , l'atome  $H$  (substituant (4)) étant situé à l'arrière. Le sens de rotation pour aller du (1) au (3) est le sens antihoraire, il s'agit ainsi d'une configuration S pour le carbone  $C_{(2)}$ .

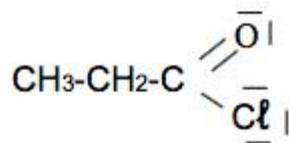
4. La (1R,2S) - éphédrine et la (1R,2R) - pseudoéphédrine ne sont pas images l'une de l'autre dans un miroir et ne sont donc pas des énantiomères, mais des diastéréo-isomères.

#### Partie 2 : Spectroscopies

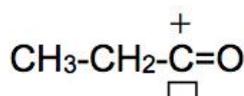
1. Le spectre 1 est celui du benzène car on n'observe qu'un signal singulet (les 6H du benzène sont équivalents).  
Le spectre 2 correspond donc à celui du propiophénone.
2. Il s'agit d'un couplage de spin.  
Les H de -CH<sub>3</sub> ont 2H voisins équivalents donnant un signal triplet.  
Les H de -CH<sub>2</sub>- ont 3H voisins équivalents correspondant au signal quadruplet.
3. La bande d'absorption à  $1700\text{ cm}^{-1}$  est due la vibration de valence de la liaison C=O.

#### Partie 3 : Formation de la propiophénone

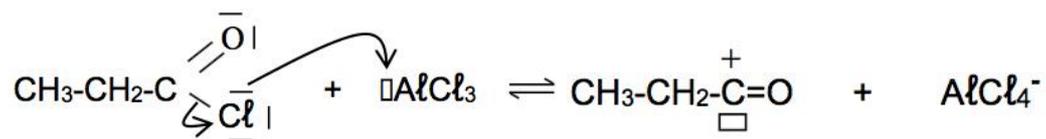
1. La formule de Lewis du chlorure de propanoyle est :



2. L'espèce électrophile s'écrit ainsi:

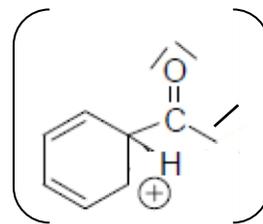
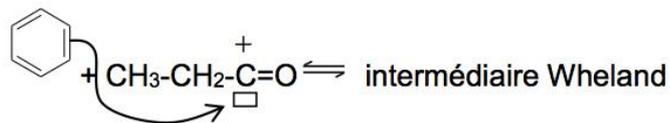


Son mécanisme de formation étant :

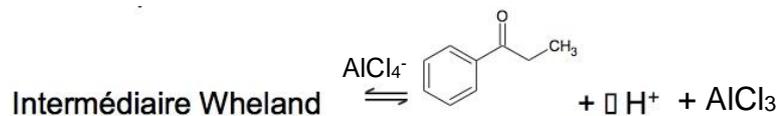


3. Mécanisme de la réaction :

1<sup>ère</sup> étape formation de l'intermédiaire de Wheland



2<sup>ème</sup> étape perte du proton et régénération du catalyseur (AlCl<sub>3</sub>)



4. Il s'agit d'une substitution électrophile aromatique.

# 2016 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

## L'interférence à ARN

### 1. Recherche de la séquence de l'ARN messenger

- 1.1. Exemple de portail de bioinformatique : NCBI, EBI.
- 1.2. Mots clés : mARN sequence, glutamin synthetase, *rattus norvegicus*.

### 2. Construction d'un vecteur d'expression contenant la séquence du « siRNA »

- 2.1 Le vecteur mU6Pro contient le promoteur U6 et le signal de polyadénylation SV40pA. Ces éléments permettent l'initiation de la transcription des séquences en aval du promoteur, ainsi que la terminaison de la transcription et la polyadénylation de l'ARN transcrit, respectivement.
- 2.2 Étape 3 : désorganisation des membranes cellulaires par l'action de SDS conduisant à la lyse des cellules, dénaturation des acides nucléiques par la soude (pH 12), dénaturation des protéines par l'action conjuguée du SDS et de la soude. Cette étape de lyse alcaline est ménagée (temps d'action de la solution de lyse limité à 3 minutes), de façon à ce que l'ADN plasmidique, compact et de petite taille, ne soit pas irréversiblement dénaturé.  
Étape 4 : neutralisation de la soude par ajout d'une solution tampon saline (acide acétique, acétate de potassium pH 4,8). L'ADN plasmidique, de petite taille, est renaturé et passe en solution, l'ADN chromosomique précipite avec les débris cellulaires. Après centrifugation, l'ADN chromosomique est piégé dans le culot, seul l'ADN plasmidique est récupéré dans le surnageant.
- 2.3 La colonne utilisée permet de retenir l'ADN plasmidique préalablement extrait, et donc de le purifier.
- 2.4 L'ADN est chargé négativement en raison de la présence de groupements phosphate dans le squelette phosphoribosyl de l'ADN. Il migre donc vers l'électrode chargée positivement (anode).
- 2.5 D'après le document 1, la double digestion de mU6Pro par Bbs I et Xba I produit deux fragments, l'un de 761 pb (= 765 – 4), correspondant au gène codant la GFP, l'autre de 3382 pb (= 4143 – 761), correspondant au vecteur mU6Pro vide.  
Sur le gel, on observe deux bandes. La première se situe à environ 3 300 pb (entre les bandes 3 000 et 4 000 pb du marqueur de taille), et correspond donc au vecteur vide. La deuxième a une taille inférieure à 850 pb, et correspond donc au fragment portant le gène de la GFP.
- 2.6 Les étapes de purification sont : découpage de la bande d'intérêt (d'environ 3 300 pb) dans le gel, puis élution de l'ADN. L'élution doit permettre la séparation de l'ADN de l'agarose (dissolution de l'agarose) puis la purification de l'ADN (sur colonne de silice ou par précipitation éthanolique).
- 2.7 La solution d'ADN est dosée par spectrophotométrie à 260 nm, longueur d'onde d'absorption maximale des bases azotées.
- 2.8 L'utilisation de deux enzymes de restriction permet d'effectuer un clonage orienté si les extrémités générées par Bbs I et Xba I sont cohésives et non compatibles, ce que l'on peut supposer ici.



#### 4. Transfection de cellules nerveuses de rat et expression en « siRNA »

- 4.1 Deux méthodes de transfection, par exemple lipofection, co-précipitation au phosphate de calcium, micro-injection, électroporation, biolistique.
- 4.2 La séquence nucléotidique comporte deux séquences inversées répétées séparées par 9 nucléotides, et des extrémités de 4 nucléotides. Les séquences répétées inversées s'associent par complémentarité des bases, ce qui confère à l'ARN transcrit une structure secondaire en épingle à cheveu ou tige – boucle (il s'agit d'un shRNA = short hairpin RNA).

#### 5. Quantification de l'expression du gène de la glutamine synthétase dans les cellules transfectées

- 5.1 Le SYBR®Green est un composé fluorescent lorsqu'il est logé dans le petit sillon de l'ADN double brin. Dans le cadre d'une PCR quantitative, le SYBR®Green permet donc de détecter les amplicons formés.  
De plus, la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de SYBR®Green incorporé. Dans le cadre d'une PCR quantitative, la fluorescence est donc proportionnelle à la quantité d'amplicons, ce qui permet de quantifier le nombre de copies à chaque cycle.
- 5.2 Le signal fluorescent est mesuré à la fin de l'étape d'élongation, lorsque les amplicons formés sont sous forme de double brin.
- 5.3 Le cycle seuil (Ct) correspond au nombre de cycles nécessaire pour observer une amplification significative (donc lorsque l'intensité de fluorescence est située au-dessus du seuil) et quantitative (donc lorsque l'amplification est encore en phase exponentielle).  
Sur la courbe fluorescence = f(nombre de cycles) présentée dans le document 6a, à partir du point d'intersection entre le seuil et la courbe d'amplification, on identifie le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil.  
Ici, pour chaque étalon, les valeurs de Ct sont environ 20, 24 et 27 cycles.  
Remarque : on peut vérifier la fiabilité de lecture de ces valeurs à l'aide de la courbe Cycle Seuil = f(log de concentration en ADN) présentée dans le document 6b (valeurs de Ct égales à environ 21,8, 24,9 et 28,1 cycles).
- 5.4 Plus le nombre initial de copies d'ADN matrice est faible, plus le nombre de cycles nécessaire pour atteindre le seuil est élevé, et donc plus le cycle seuil est élevé. Lorsque le nombre de copies initial d'ADN augmente, le nombre de cycles nécessaire pour atteindre le seuil diminue.  
La pente de la courbe Cycle Seuil = f(log de concentration en ADN) est donc négative.
- 5.5 La température de fusion des amplicons est égale à 83°C. Elle est identique pour chacun des étalons, ce qui signe la présence d'un unique amplicon, et permet d'affirmer que les conditions d'amplification sont spécifiques.
- 5.6 Le SYBR®Green s'intercale dans tous les ADN double brin, sans spécificité de séquence. Tous les amplicons seront détectés, y compris les fragments issus des amplifications non spécifiques, si elles existent. Dans ces conditions, la fluorescence observée ne sera pas proportionnelle au nombre de copies de la seule séquence étudiée.  
La courbe de fusion permet de vérifier que la fluorescence observée a pour seule origine l'amplification de la séquence étudiée.

5.7 Dans le cas de la transfection par le vecteur portant le gène de la GFP, le taux d'expression du gène de la glutamine synthétase est de 100 %, ce qui traduit une absence d'interférence à l'ARN. Ce résultat est cohérent avec le fait que le vecteur ne porte pas de séquence codant pour un siARN.

Dans le cas de la transfection par le vecteur contenant l'une des séquences Glu-A, Glu-B ou Glu-C, le taux d'expression de la glutamine synthétase est diminué, ce qui traduit l'extinction partielle de l'expression de ce gène par les séquences codant les shRNA.

Les shRNA Glu-A, Glu-B et Glu-C permettent de diminuer l'expression de la glutamine synthétase de 92 % (8 % d'expression résiduelle), 90 % (10 % d'expression résiduelle) et 60 % (40 % d'expression résiduelle), respectivement.

La construction la plus efficace est donc celle qui porte le shRNA Glu-A (et/ou Glu-B).

5.8 L'impact de la diminution de la quantité d'ARNm au niveau protéique peut être étudié par Western Blot avec un anticorps spécifiquement dirigé contre cette enzyme, ou par détermination de l'activité enzymatique de la glutamine synthétase.

# 2016 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

---

## La peroxydase du raifort (HRP) Une enzyme multifonctionnelle à l'avenir encore prometteur

### 1. Caractéristiques structurales de la protéine HRP

- 1.1. Le premier chiffre du numéro d'identification attribué par la commission internationale (EC number) indique la classe de l'enzyme. La HRP appartient à la classe 1, il s'agit donc d'une oxydoréductase.
- 1.2. Le groupement prosthétique est un hème contenant des ions  $\text{Fe}^{3+}$ . Il agit comme accepteur d'électrons issus du donneur phénolique puis comme donneur d'électrons vers l'accepteur  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- 1.3. La peroxydase est une protéine globulaire monomérique de 308 acides aminés (34 kDa), possédant un groupement prosthétique (hème) localisé entre les domaines proximal et distal de la protéine. Elle contient également deux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Sa conformation spatiale est essentiellement composée d'hélices alpha (et de deux petits feuillets bêta antiparallèles), et est stabilisée par quatre ponts disulfure.
- 1.4. L'astérisque signale des positions pour lesquelles les acides aminés sont identiques. La position 118 de la séquence P00433 correspond à l'acide aminé E (acide glutamique), ce qui est également le cas des deux autres séquences (position 113 de la séquence Q42517 et position 117 de la séquence P17180)
- 1.5. Les chaînes latérales de phénylalanine et de la tyrosine contiennent un cycle aromatique, ce qui leur confère des propriétés d'absorption dans les UV. La phénylalanine est un acide aminé hydrophobe, la tyrosine étant plus hydrophile en raison de la présence du radical hydroxyle sur le cycle aromatique.
- 1.6. Les deux points (:) indiquent des positions pour lesquelles les acides aminés sont différents mais possèdent des propriétés similaires. La position 296 de la séquence P00433 correspond à la phénylalanine (F), les deux autres séquences portant une tyrosine (Y) (position 290 de la séquence Q42517 et position 236 de la séquence P17180).
- 1.7. Le terme « identity » correspond au pourcentage d'acides aminés identiques entre séquences.  
Le terme « similar positions » indique le nombre d'acides aminés similaires (non identiques mais possédant des propriétés similaires).
- 1.8. Les modifications post-traductionnelles incluent l'élimination du peptide signal et du propeptide (séquence P00433), des glycosylations, la cyclisation de la fonction amide terminale de la glutamine N terminale, et la formation de quatre ponts disulfure.
- 1.9. Les isoenzymes sont des enzymes catalysant la même réaction chimique, codées par des gènes différents, et possédant des propriétés physico-chimiques et catalytiques différentes.

### 2. Caractéristiques de la catalyse enzymatique médiée par l'HRP

- 2.1. La constante de Michaelis  $K_M$  correspond à l'inverse de l'affinité d'une enzyme pour son substrat.

Le TMB est le substrat pour lequel l'HRP a la plus grande affinité ( $K_M$  le plus faible). Elle a une affinité deux fois plus faible pour l'ABTS, et 52 fois plus faible pour le gaïacol.

2.2. Le rapport  $k_{cat}/K_M$  traduit l'efficacité enzymatique. Ce rapport sera d'autant plus élevé que l'enzyme a d'affinité pour son substrat et le transforme rapidement.

En effet,  $k_{cat}$ , constante d'activité catalytique, mesure la capacité de transformation du substrat par une mole d'enzyme, et  $1/K_M$  rend compte de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

2.3.

|         | $k_{cat}/K_M$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) |
|---------|--|
| ABTS    | 4089   |
| Gaïacol | 211  |
| TMB     | 1911   |

2.4. L'ABTS est le substrat pour lequel l'HRP est la plus efficace (environ deux fois plus que le TMB, et 40 fois plus que le gaïacol).

2.5. Le texte indique que tous les substrats sont fournis à une concentration de  $10 K_M$  ou plus. Chaque substrat est donc à concentration saturante, ce qui permet une mesure de vitesse initiale dans des conditions de  $V_{\text{max}}$ .

2.6. L'unité d'activité utilisée dans cette étude est définie par la quantité d'enzyme catalysant la conversion de  $1 \mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par minute à pH 7,4 et  $25^\circ\text{C}$ .

2.7. Le volume de milieu réactionnel est de 1 mL.

|                                     | Volume ( $\mu\text{L}$ ) |
|-------------------------------------|--------------------------|
| AAP 6 mM                            | 250                      |
| Phénol 100 mM                       | 100                      |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ 2 mM         | 100                      |
| Tampon phosphate pH 7 100 mM        | 450                      |
| HRP                                 | 100                      |
| <b>Volume de milieu réactionnel</b> | <b>1 000</b>             |

2.8. La réaction est suivie par apparition du produit, la quinonéimine. L'unité d'enzyme se rapporte à la conversion du substrat,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Or, deux moles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont nécessaires pour la production d'une mole de quinonéimine. Il est donc nécessaire de multiplier par deux le nombre de moles de produit apparu pour obtenir le nombre de moles de substrat transformé.

2.9.  $b = 2 \times 0,06 \text{ min}^{-1} / (6\,000 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}) \times 1 \cdot 10^{-3} \text{ L} / 0,1 \text{ mL} = 0,2 \text{ U/mL}$  d'enzyme.

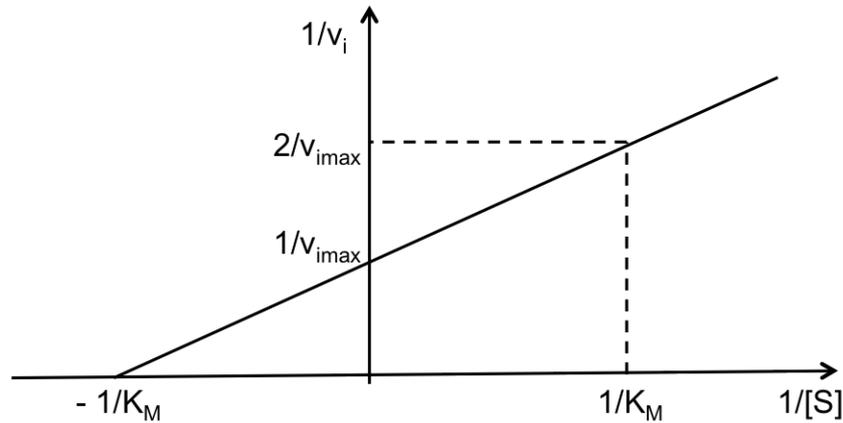
### 3. Développement d'outils de dépollution par immobilisation de l'HRP

3.1. Il s'agit d'une immobilisation par liaison covalente avec un agent réticulant, le glutaraldéhyde.

3.2. Avantages : pas de risque de perte d'enzyme au cours d'éventuels recyclages ; stabilisation de l'enzyme immobilisée, notamment thermique.

Inconvénients : déformation de l'enzyme conduisant à une perte d'activité (augmentation  $K_M$ , diminution  $k_{cat}$ ) ; dépendante par rapport à la séquence en acides aminés de l'enzyme ; toxicité du glutaraldéhyde.

- 3.3. La courbe présentée dans le document 6 est une représentation de Lineweaver-Burke, dite en double inverse, de l'équation de Michaelis, sur laquelle il est possible de déterminer  $K_M$  par différentes méthodes.



Pour l'enzyme soluble :  $K_M = 1 / (52 \text{ mM}) = 0,019 \text{ mM}$   
 Pour l'enzyme immobilisée :  $K_M = 1 / (62 \text{ mM}) = 0,016 \text{ mM}$

- 3.4. Le  $K_M$  apparent de l'HRP varie peu lors de l'immobilisation, ce qui traduit le fait que l'immobilisation semble peu affecter l'affinité de l'enzyme pour son substrat. En général, lorsque le  $K_M$  est affecté après une immobilisation, la variation traduit une perte d'affinité (augmentation du  $K_M$  apparent).
- 3.5. Chaque cycle d'utilisation provoque une perte d'activité de l'ordre de 15 %, pour atteindre environ 60 % de l'activité initiale après le quatrième cycle de récupération. La perte d'activité observée peut être liée à une dénaturation progressive de l'enzyme au cours de l'utilisation et/ou des lavages lors des recyclages. La perte d'activité est importante, il faudrait essayer d'optimiser le recyclage, peut-être en lavant les billes dans un autre solvant que de l'eau pure.

#### 4. Utilisation de l'HRP comme outil thérapeutique

- 4.1. Schéma d'un anticorps de type IgG

Rectangles gris : chaînes lourdes (H pour Heavy),

Rectangles blancs : chaînes légères (L pour light),

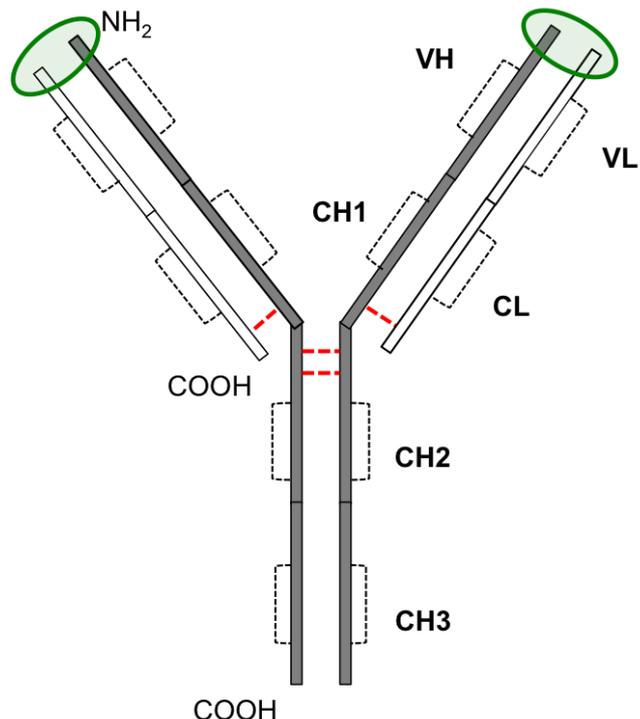
$\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$  : orientation des chaînes peptidiques,

Pointillés fins et épais : ponts disulfures intra- et inter-caténaires,

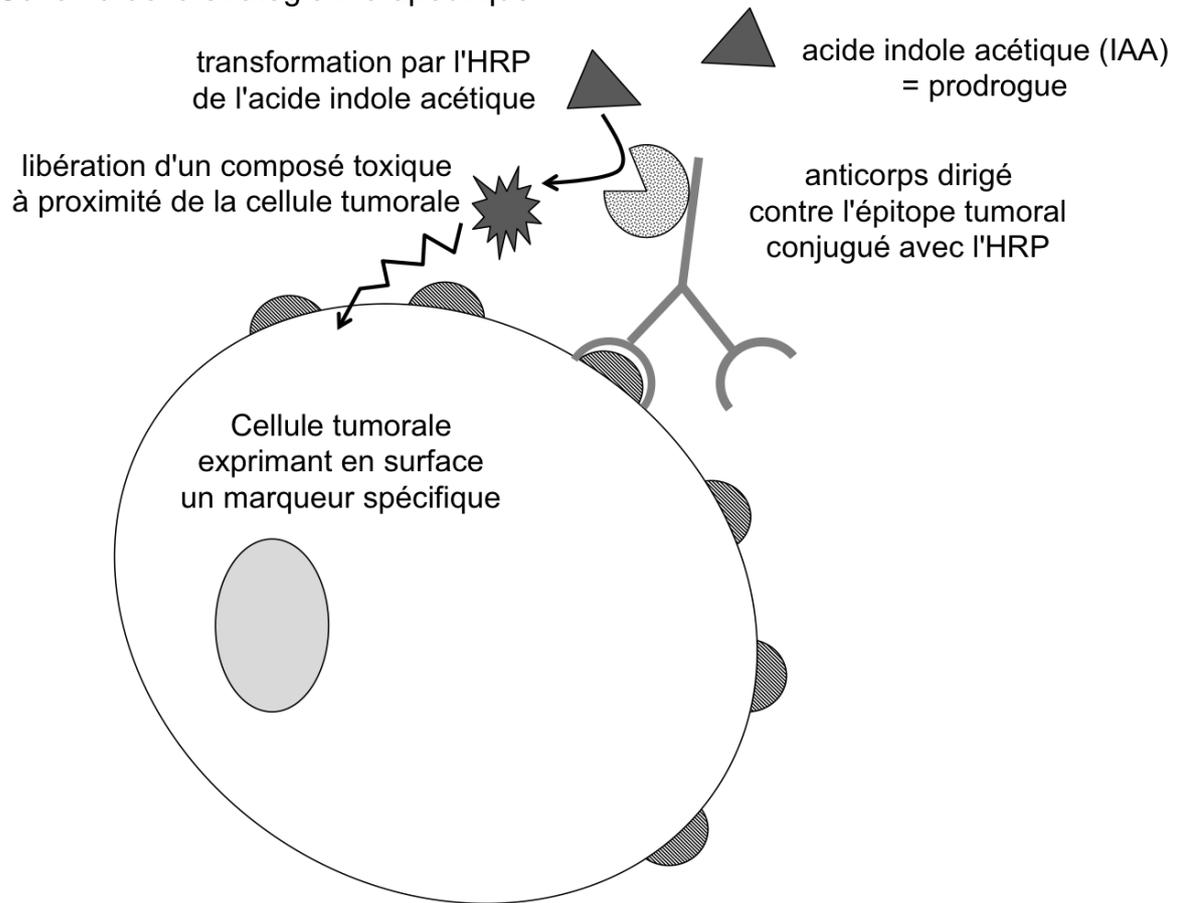
VH, CH1, CH2, CH3 : domaines variable (V) et constants (C) de la chaîne lourde;

VL, CL : domaines variable et constant de la chaîne légère.

Ellipse au niveau des domaines variables : paratope.



#### 4.2. Schéma de la stratégie thérapeutique



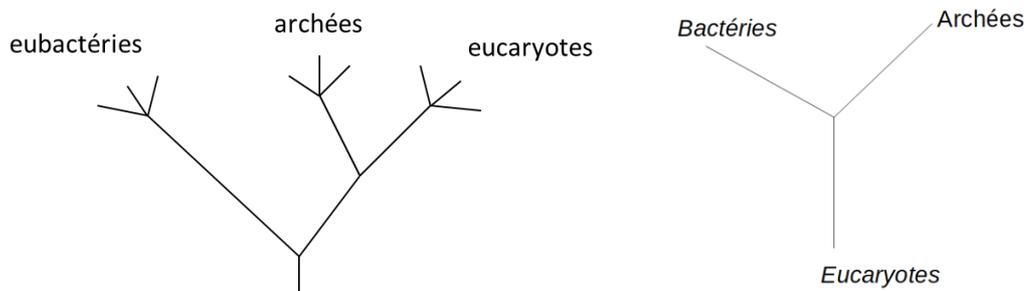
# 2016 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire

## La méthanisation biologique

### 1. Les acteurs biologiques du procédé de méthanisation

#### 1.1. Représentation schématique de l'arbre du vivant :

Plusieurs possibilités acceptées faisant apparaître les domaines des eubactéries (bactéries), des archées et des eucaryotes.



- 1.2. Le milieu de base est un milieu synthétique (composition qualitative et quantitative est parfaitement connue) et minéral (pas de matière organique).
- 1.3. La complémentation du milieu de base avec de la carboxyméthyl cellulose permet :
  - d'apporter une source de carbone au milieu de base qui en est exempt, de façon à ne cultiver que les souches cellulolytiques,
  - d'estimer l'importance de l'activité cellulolytique (par mesure du diamètre du halo d'hydrolyse de la CMC), et donc de choisir les souches les plus performantes pour l'activité cellulolytique.
- 1.4. Après culture des bactéries sur CMC-agar, la boîte est inondée avec du diiode qui colore la cellulose en bleu. Lorsque la cellulose est hydrolysée, elle n'est plus colorée par le diiode. Autour des colonies à activité cellulolytique, un halo de décoloration sera donc visible, dont le diamètre sera fonction de l'importance de l'activité cellulolytique.
- 1.5. Le premier tableau du document 1.b fait référence à la classification phylogénétique, basée sur l'alignement des séquences des gènes codant l'ARN 16S de la souche. Le deuxième tableau fait référence à la classification phénotypique, basée sur la mise en évidence de caractères biochimiques.
- 1.6. Les fermentations sont caractérisées par la production d'acides organiques (non volatils) qui acidifient le milieu. Dans les galeries API, l'ajout d'un indicateur de pH permet de mettre en évidence cette acidification.
- 1.7. La souche MC25 présente le plus grand halo de décoloration (1,5 cm d'après le tableau 1 du document 1b) lors du test à l'iode, il s'agit donc de la souche la plus intéressante dans ce contexte.
- 1.8. Syntrophie : mode de vie coopératif non obligatoire entre différentes souches de microorganismes, et pour lequel les produits du métabolisme de certaines souches sont utilisés comme substrats par d'autres souches.
- 1.9. La réaction (1) possède un  $\Delta_r G^{0'}$  négatif : elle est exergonique, donc thermodynamiquement (énergétiquement) favorable dans les conditions standards. La réaction (2) possède un  $\Delta_r G^{0'}$  positif : elle est donc endergonique, thermodynamiquement (énergétiquement) défavorable dans les conditions standards.

- 1.10. La syntrophie permet le « couplage énergétique » des deux réactions de la méthanogénèse de la voie OSA. La réaction (3) tire la réaction (2) en maintenant la concentration des produits de la réaction (2) ( $H_2$  et  $HCO_3^-$ ) très faible.  
 Dans les conditions standards, le calcul de l'additivité des  $\Delta_r G^0$  qui donne un  $\Delta_r G^0$  global de la voie OSA de  $-31 \text{ kJ.mol}^{-1}$  ( $+104,6 - 135,6$ ) permet de supposer que les concentrations réelles et donc le  $\Delta_r G$  réel est bien négatif permettant la syntrophie.
- 1.11. Les BSR tirent leur énergie de réactions rédox mettant en jeu des molécules chimiques, elles sont donc chimirotrophes. D'après le document 3, les deux donneurs d'électrons utilisables par les BSR sont le dihydrogène (minéral) et l'acétate (organique) : elles sont donc lithotrophes et organotrophes (mixotrophes).
- 1.12. Les ions sulfates sont les accepteurs finaux d'électrons. Ces bactéries n'utilisent pas le dioxygène et sont donc anaérobies.

## 2. Le procédé de biométhanisation

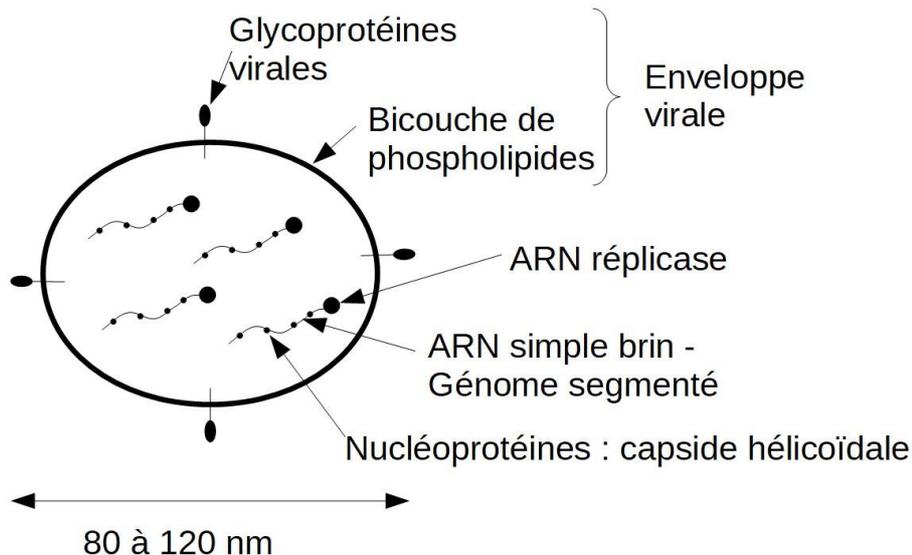
- 2.1 La cinétique de production de l'acide acétique montre d'abord une augmentation irrégulière en trois phases jusqu'à une concentration d'environ 37mM au bout de 20 jours, suivie d'une chute brutale pour atteindre des valeurs très basses, inférieures à 5 mM, à partir du 27<sup>ème</sup> jour.  
 La cinétique de production du méthane montre globalement deux phases : une phase de production initiale atteignant une concentration de 30 % au 5<sup>ème</sup> jour, suivie d'un plateau jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour, puis une deuxième phase de production rapide atteignant une concentration de 80 % suivie d'un plateau à partir du 27<sup>ème</sup> jour.
- 2.2 La première étape de production d'acide acétique (jusqu'au 20<sup>ème</sup> jour) correspond à la fermentation primaire des composés issus de l'hydrolyse de la matière organique. Cette phase correspond donc à un métabolisme acétogène (acétogénèse).  
 Cette fermentation primaire s'accompagne d'une première phase de production de méthane (entre 0 et 5 jours). NB : explicable par l'intervention d'un autre métabolisme méthanogène (probablement méthanogénèse hydrogénotrophe :  $CO_2 + 4 H_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$ , non évoqué dans le sujet).  
 La disparition rapide de l'acide acétique qui se manifeste ensuite (à partir du 20<sup>ème</sup> jour) coïncide avec la production de méthane. Dans cette deuxième phase, les bactéries méthanogènes utilisent l'acide acétique précédemment formé, pour produire du méthane par la voie acétoclastique et par oxydation syntrophique de l'acétate.
- 2.3. La prolifération rapide des Méthanosarcinales entre le 18<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> jour est associée à la fois à un taux élevé de production de gaz (courbe grisée présentant le taux de production de gaz, dans le document 4b) et à la consommation d'acide acétique (cf. courbe B du document 4a).  
 L'augmentation de la population de Méthanosarcinales s'accompagne donc de la production de méthane.
- 2.4. Par lecture directe de la courbe de croissance  $\ln(X) = f(\text{temps})$ , avec X la biomasse des Méthanosarcinales, on obtient :
- pour  $t = 20$  jours :  $\ln(X_{20}) = 4,5$   
 pour  $t = 25$  jours :  $\ln(X_{25}) = 6$
- D'où le calcul :

$$Q_X = \frac{\ln(X_{25}) - \ln(X_{20})}{t_{25} - t_{20}} = \frac{6 - 4,5}{5} = 0,3 \text{ j}^{-1}$$

$$G = \frac{\ln(2)}{Q_x} = \frac{\ln(2)}{0,3} = 2,3j$$

### 3. Décontamination du digestat

- 3.1. Les lignées cellulaires utilisées pour la production des virus doivent être sensibles et permissives pour ces virus.
- 3.2. Schéma du virus AIV : d'après le document 5, le virus AIV est un virus enveloppé, sphérique, dont le génome est constitué de plusieurs fragments d'ARN simple brin de polarité négative.



*Remarque : le schéma proposé comporte des éléments dont la présence n'est pas spécifiée dans le document 5, mais néanmoins indispensables à la constitution du virus (ARN répliquase, nucléoprotéines, glycoprotéines de surface).*

#### 3.3. Étapes du cycle viral :

1. Adsorption : liaison biospécifique du virus sur les récepteurs cellulaires
2. Pénétration du virus par endocytose
3. Décapsidation : libération du génome viral dans le cytoplasme (fusion membranaire de l'enveloppe et de l'endosome)
4. Réplication du génome viral et expression des protéines régulatrices et structurales : phase d'éclipse.
5. Encapsidation : assemblage des nouveaux virions
6. Libération des virions par bourgeonnement

3.4. Le virus présenté est un virus à ARN simple brin d'orientation négative. La première étape de l'expression du virus consiste donc à produire le brin complémentaire d'orientation positive (ARN<sub>m</sub>) par une ARN polymérase ARN dépendante virale. Cet ARN<sup>+</sup> est un ARN<sub>m</sub> qui pourra être traduit par les ribosomes de la cellule (et servira de matrice pour la réplication virale).

Le génome des virus à ARN simple brin (+) peut au contraire être traduit directement suite à sa pénétration dans la cellule. Cette première étape n'est donc pas nécessaire.

3.5. D est le temps de réduction décimale : temps nécessaire pour réduire la population d'un facteur 10, ou encore temps nécessaire pour détruire 90 % de la population initiale.

3.6. Le temps de réduction décimale D doit être inférieur à 10 (heures), il faut donc que  $\log_{10}D$  soit inférieur à 1. Pour trouver les concentrations efficaces, il faut lire les valeurs de concentrations pour lesquelles les courbes d'inactivation se situent sous la droite d'équation  $\log_{10}D = 1$ .

La concentration minimale en ammoniac pour éliminer 90 % des virus est d'environ 10 mM pour FCoV et 125 mM pour MS2. Pour éliminer les deux virus, il faut donc prendre une concentration supérieure à 125 mM.

3.7. Le virus FCoV est sensible à des concentrations en ammoniac 12 fois plus petites que le virus MS2.

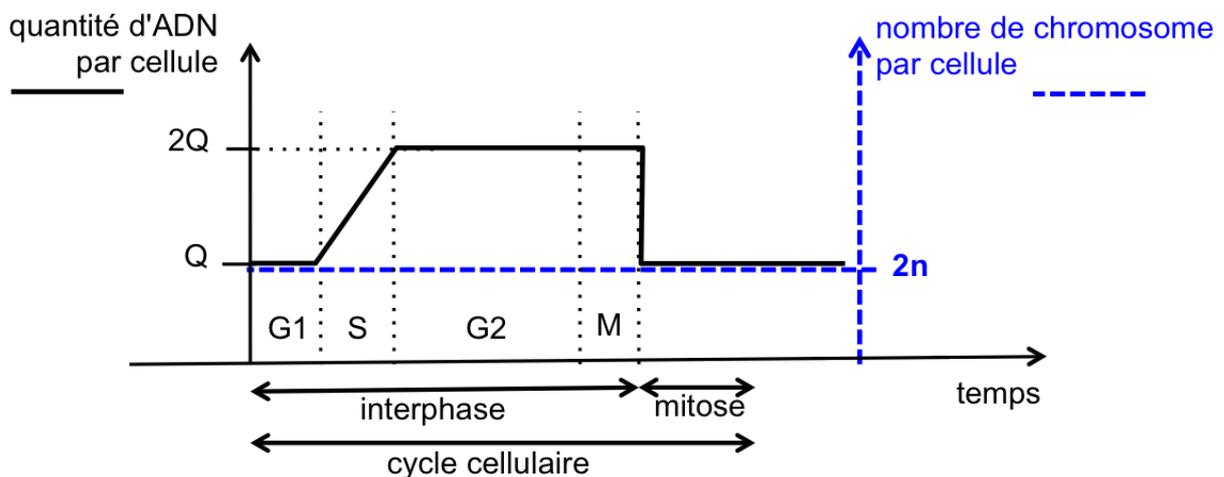
Le document 5 indique que MS2 est un virus nu, alors que FCoV est un virus enveloppé. La présence de l'enveloppe rend les virus enveloppés, comme FCoV, plus fragiles que les virus nus (du type MS2).

## 2016 – U42 : Biologie cellulaire

### Cancer et environnement tumoral

#### 1. La cellule cancéreuse

- 1.1 Un proto-oncogène est un gène cellulaire qui a pour rôle de favoriser la prolifération normale des cellules et qui après mutation peut entraîner la formation de tumeurs.
- 1.2 Les caractéristiques fonctionnelles acquises par la cellule cancéreuse sont :
- l'immortalité, c'est-à-dire une capacité illimitée de prolifération ;
  - une multiplication indépendante des signaux de croissance externes tels que des facteurs de croissance
  - la perte de la nécessité d'ancrage sur un support et de l'inhibition de contact
  - l'inhibition des voies de la mort cellulaire programmée (échappement à l'apoptose)
  - la capacité d'induire une néo-angiogenèse permettant d'acquérir une vascularisation efficace
  - la capacité d'invasion et de formation de métastases.
- 1.3 La préparation de l'échantillon pour l'observation histologique présentée dans le document 1 comporte quatre étapes :
- la fixation par le formaldéhyde, dont le rôle est de consolider les structures cellulaires et éviter leur altération lors des traitements ultérieurs ;
  - l'inclusion en paraffine, permettant de durcir le tissu pour la réalisation de coupes ;
  - la réalisation de coupes fines au microtome ; en effet l'observation microscopique nécessite des coupes suffisamment fines pour être traversées par la lumière ;
  - la coloration permet d'accentuer le contraste et/ou d'identifier des structures cellulaires particulières.
- 1.4 Les cellules sont observées en métaphase de la mitose car c'est à ce stade de la division cellulaire que les chromosomes sont à l'état le plus condensé donc plus facilement observables.
- 1.5 Le microscope utilisé est un microscope photonique.
- 1.6 A = télomère ; B = centromère ; C = chromatide
- 1.7 La quantité d'ADN double au cours de la phase S et est réduite de moitié au cours de la mitose. Le nombre de chromosomes reste constant tout au long du cycle cellulaire, mais le nombre de chromatides de chaque chromosome est multiplié par deux entre les phases S et la mitose.



- 1.8 Les CDK (Cyclin Dependant Kinase) sont des enzymes qui phosphorylent des protéines cibles impliquées dans le déroulement du cycle cellulaire, en régulant les points de contrôle au niveau des transitions de phase. Le domaine catalytique des CDK est activé uniquement lorsque les cyclines qui leur sont associées ont reconnu et se sont liées avec les CDK.

## 2. Environnement tumoral et étude du rôle de l'endocan.

- 2.1 Les constituants biochimiques majeurs rencontrés dans la matrice extracellulaire du tissu conjonctif sont :
- les protéines fibreuses : le collagène et l'élastine.
  - les glycosaminoglycanes (GAG) généralement liés de façon covalente à une protéine pour former des protéoglycanes
- 2.2 Le document 3 montre que seules les cellules HEK 293 portant le gène codant l'endocan et exprimant cette protéine induisent le développement d'une tumeur au site d'injection des cellules.  
De plus, l'évolution du taux sérique d'endocan est superposable à la cinétique de croissance de la tumeur.  
L'endocan produit par les cellules HEK 293 transfectées (cette lignée n'étant normalement pas tumorigène *in vivo*) est donc capable d'induire le développement d'une tumeur.
- 2.3 Après 12 semaines, aucune souris du lot contrôle n'a survécu, contrairement aux souris du lot traité par l'anticorps MEP 08, dans lequel 60 % des souris ont survécu. D'autre part, la mortalité des souris du lot contrôle est plus précoce (à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine) que celle des souris du lot traité par MEP 08 (à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine).  
Ainsi, l'anticorps anti-endocan MEP 08 réduit et retarde la mortalité des souris traitées, en diminuant l'incidence et la croissance des tumeurs.
- 2.4 L'anticorps monoclonal MEP 14 n'a pas d'effet que la mortalité des souris traitées par rapport au contrôle, et n'a donc pas d'effet de neutralisation de l'endocan, contrairement à MEP 08.  
Par conséquent la région riche en phénylalanine en position 116, reconnue par l'anticorps MEP 08, est un épitope de l'endocan déterminant dans l'induction des tumeurs. En revanche, la région COOH-terminale reconnue par l'anticorps MEP 14 n'est pas essentielle à l'action de l'endocan.
- 2.5 Un sérum polyclonal renferme plusieurs types d'anticorps de spécificité générale anti-endocan, chaque type d'anticorps étant dirigé contre des épitopes différents de l'antigène endocan. L'utilisation d'un tel mélange n'aurait donc pas permis de mettre en évidence le domaine impliqué dans l'action de l'endocan.
- 2.6 Les hybridomes sont des cellules hybrides obtenues par fusion de cellules de myélome (plasmocytes tumoraux non sécréteurs d'anticorps) avec des lymphocytes B sensibilisés provenant de la rate d'un animal immunisé par l'antigène endocan. Ils sont sélectionnés par un milieu sélectif sur lequel seules les cellules hybrides peuvent se multiplier.  
Les clones d'hybridomes sont obtenus par la technique de dilution limite : des dilutions sont effectuées de telle sorte que chaque fraction mise en culture contienne statistiquement une seule cellule, qui après multiplication forme un clone cellulaire.  
Le criblage des clones producteurs des anticorps anti-endocan est effectué par technique ELISA, sur les surnageants des puits contenant des clones.

- 2.7 La mutation conférant le phénotype SCID est autosomale et récessive, donc les souris atteintes de SCID sont homozygotes mutées. Le croisement de deux souris hétérozygotes permet d'obtenir des souris normales (homozygotes non mutées et de phénotype normal), des souris hétérozygotes (de phénotype normal) et des souris homozygotes mutées (atteintes de SCID). Les souris SCID homozygotes doivent donc être sélectionnées par génotypage.
- 2.8 Du fait de leur système immunitaire déficient, les souris SCID sont tolérantes aux greffes de cellules décrites dans les documents 3 et 4. D'autre part, elles ne produisent pas d'anticorps contre des molécules étrangères, il ne peut donc y avoir d'interférence avec les manipulations du document 4 qui utilisent des anticorps monoclonaux.

### 3. La signalisation cellulaire

- 3.1 La transduction désigne la conversion d'un signal extracellulaire en un signal intracellulaire.
- 3.2 Une protéine kinase est une enzyme qui catalyse une réaction de phosphorylation par l'ajout d'un groupement phosphate à une protéine cible.
- 3.3 Les protéines G sont des protéines impliquées dans des voies de transduction et qui présentent une activité GTPase (hydrolyse du GTP).

### 4. Traitement anti-cancéreux

- 4.1 Une lignée cellulaire établie est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, à durée de vie illimitée et que l'on peut entretenir *in vitro* par repiquages successifs.
- 4.2 La thymidine est un constituant spécifique de l'ADN. L'incorporation par les cellules de ce précurseur radioactif permet donc de quantifier la réplication de l'ADN, elle-même directement corrélée à la prolifération cellulaire.
- 4.3 La concentration inhibitrice CI50 correspond à la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire. D'après le document 5, la CI50 de la curcumine est d'environ 12-13  $\mu\text{M}$ .
- 4.4 La radioactivité a pu être évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide ou par autoradiographie.



# **Session 2017 : Sujets**

## 2017 - U11 : Mathématiques

Durée 2 h – coefficient 1

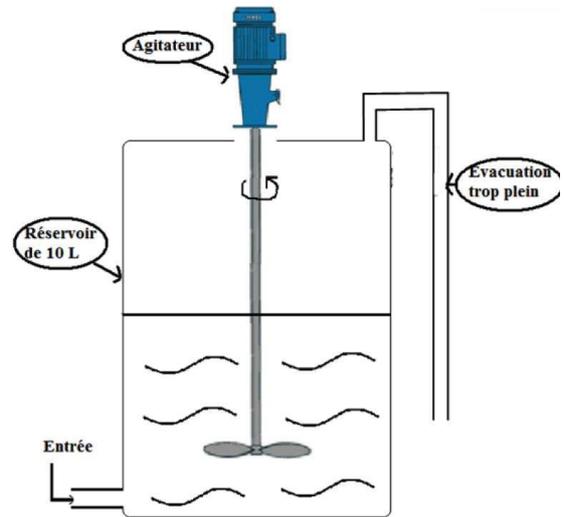
**Matériel autorisé :** Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Cirulaire n°99-186, 16/11/1999).

### EXERCICE 1 (10 points)

Un réservoir d'une capacité de 10 litres contient 2 litres d'un concentré de parfum. On y introduit, à partir de l'instant  $t=0$ , de l'éthanol, avec un débit de  $20 \text{ cm}^3$  par seconde. Le liquide présent dans le réservoir est mélangé en permanence par un agitateur.

Dans tout le problème,  $Q(t)$  désigne la quantité, en  $\text{cm}^3$ , d'éthanol présente dans le réservoir, à l'instant  $t$  exprimé en seconde.

On rappelle qu'un litre vaut  $1000 \text{ cm}^3$ .

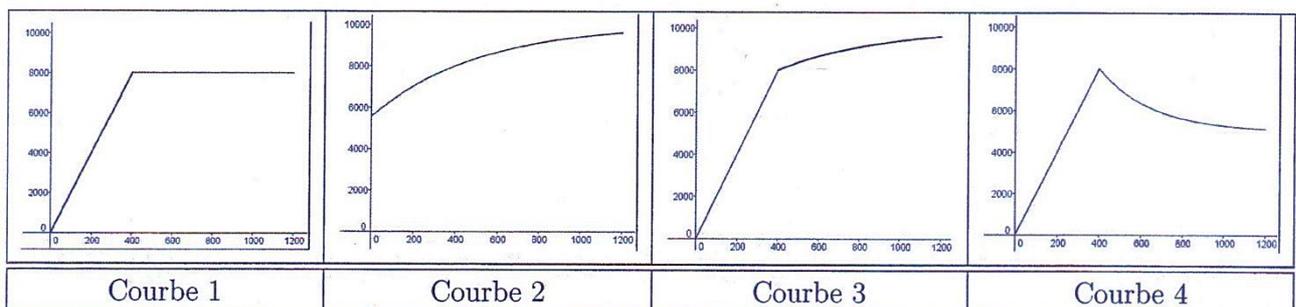


#### Partie A : Étude qualitative du problème

- (a) Vérifier que le réservoir contient 5 litres de mélange concentré-éthanol au bout de 150s.  
(b) Au bout de combien de temps le réservoir est-il plein ?
- Alors que le réservoir est plein, suite à un incident, la pompe continue à l'alimenter dans les mêmes conditions. Un système de trop-plein a été prévu dans ce cas de figure, et dès cet instant, chaque seconde,  $20 \text{ cm}^3$  de liquide homogène s'échappe par ce système.

**On s'intéresse à la quantité  $Q$  d'éthanol présente dans le récipient depuis l'instant initial, moment où commence le remplissage du réservoir.**

- D'après vous, comment varie cette quantité  $Q$  en fonction du temps ? Argumenter.
- Parmi les quatre courbes ci-dessous (l'axe des abscisses représente le temps exprimé en secondes, l'axe des ordonnées, la quantité  $Q$  exprimée en  $\text{cm}^3$ ), une seule représente la quantité d'éthanol présente dans le réservoir en fonction du temps. Laquelle ? Justifier votre choix.



**Dans la suite du problème, on va modéliser plus précisément la quantité  $Q$ , suite à l'incident.**

### Partie B : Une équation différentielle.

On admet que, pour tout instant  $t \geq 400$ , la quantité d'éthanol présente dans le réservoir vérifie l'équation différentielle :

$$Q'(t) + 0,002 Q(t) = 20, \text{ avec } Q(400) = 8000.$$

On considère l'équation différentielle suivante :

$$(E) : y' + 0,002 y = 20$$

où l'inconnue  $y$  est une fonction de la variable  $t$ , avec  $t \in [400 ; +\infty [$ .

1. Déterminer l'ensemble des solutions de l'équation différentielle homogène associée

$$(E_0) : y' + 0,002 y = 0.$$

2. Déterminer le réel  $a$  tel que la fonction constante  $t \rightarrow a$  soit une solution particulière de  $(E)$ .
3. En déduire l'ensemble des solutions de  $(E)$ .
4. Déterminer la fonction  $Q$  répondant au problème posé.

### Partie C : Étude d'une fonction.

On considère la fonction  $Q_1$  définie pour tout réel  $t$  de l'intervalle  $[400 ; +\infty[$  par :

$$Q_1(t) = 10000 - 4451,1 e^{-0,002t}$$

On admet que cette fonction exprime la quantité d'éthanol présente dans le récipient pour  $t \geq 400$ .

1. Calculer la limite de  $Q_1$  en  $+\infty$ . Interpréter ce résultat.
2. En étudiant les variations de la fonction  $Q_1$ , vérifier mathématiquement le résultat de la partie A question 2 (a).
3. On veut déterminer l'instant  $t$  où la proportion d'éthanol dans le réservoir vaut 85%. Par la méthode de votre choix, déterminer une valeur approchée à l'unité près de la solution.  
On donnera une description de la méthode utilisée.
4. Cette question fait l'objet d'un QCM : on écrira l'unique réponse correcte sur la copie, aucune justification n'est demandée.  
On considère l'algorithme suivant :

Demander  $A$  un nombre réel compris strictement entre 8000 et 10000  
Mettre 400 dans  $T$   
Tant que  $10000 - 4451,1 e^{-0,002T} < A$   
Mettre  $T + 10$  dans  $T$   
Fin du Tant que  
Afficher  $T$

Cet algorithme a pour but de :

**Réponse (a) :** Déterminer la valeur exacte de l'équation  $Q_1(t) = A$  dans l'intervalle  $[400 ; +\infty [$ .

**Réponse (b) :** Déterminer une valeur approchée par défaut à 10 près de l'équation  $Q_1(t) = A$  dans l'intervalle  $[400 ; +\infty [$ .

**Réponse (c) :** Déterminer une valeur approchée par excès à 10 près de l'équation  $Q_1(t) = A$  dans l'intervalle  $[400 ; +\infty [$ .

**Réponse (d) :** Déterminer les solutions de l'inéquation  $Q_1(t) > A$  dans l'intervalle  $[400 ; +\infty [$ .

## EXERCICE 2 (10 points)

Les parties A, B, C et D suivantes peuvent être traitées de façon indépendante.

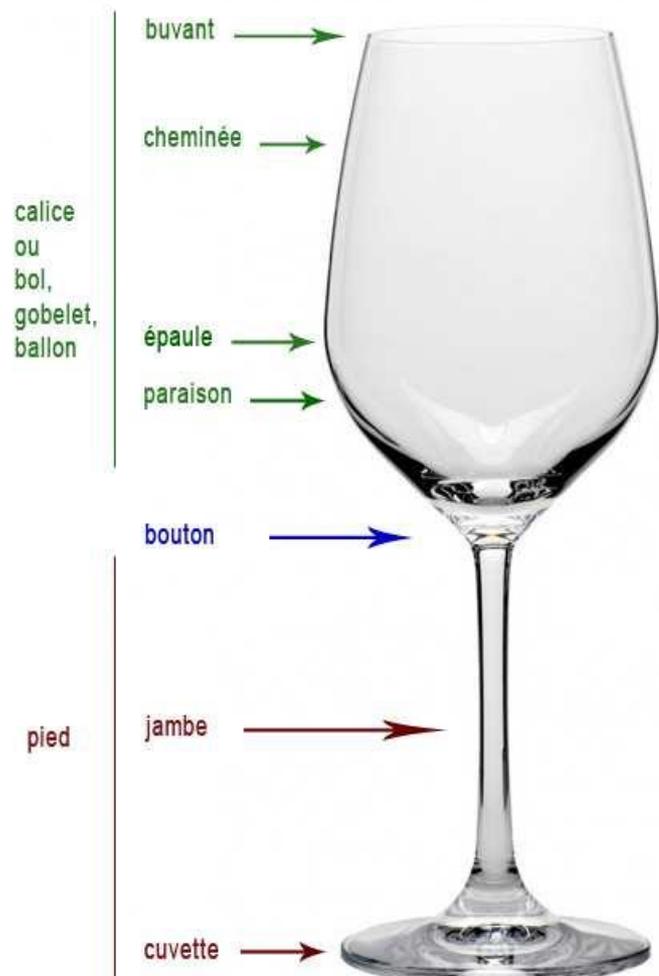
### Partie A : Défaut de fabrication.

Un verre à pied est constitué de deux parties : le calice (ou bol) et le pied. Ces deux parties sont assemblées à chaud et fabriquées par deux procédés différents. Elles peuvent présenter des défauts indépendamment l'une de l'autre.

On a constaté que la machine qui fabrique les calices produit 5 % de calices défectueux et que la machine qui fabrique les pieds produit 2 % de pieds défectueux. On appelle A l'événement « le calice est défectueux » et B l'événement « le pied est défectueux ».

On prélève un verre au hasard dans la production.

1. Calculer la probabilité pour que le verre ait les deux défauts.
2. Calculer la probabilité pour que le verre soit défectueux c'est-à-dire que le verre ait au moins un des deux défauts.



### Partie B : Vérification d'un lot.

Dans un stock important de verres à pied, on en prélève 20 au hasard pour vérification. Le stock est assez important pour qu'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 20 verres. On considère la variable aléatoire  $X$  qui à tout prélèvement de 20 verres associe le nombre de verres défectueux. On suppose que la probabilité qu'un verre soit défectueux est de  $p = 0,069$ .

1. Justifier que  $X$  suit une loi binomiale dont on précisera les paramètres.
2. Calculer à  $10^{-2}$  près la probabilité de l'événement « dans un tel prélèvement, cinq verres au moins sont défectueux ».

### Partie C : Diamètre du buvant du verre.

Dans cette question on s'intéresse au diamètre, exprimé en millimètre, d'ouverture du verre appelée « buvant » du verre.

On note  $D$  la variable aléatoire qui à chaque verre associe le diamètre de son « buvant ». On admet que  $D$  suit la loi normale de paramètres  $m = 46$  et  $\sigma = 0,3$

On prélève au hasard un verre dans la production.

1. Calculer à  $10^{-2}$  près la probabilité que le diamètre de ce verre soit compris entre 45,8 et 46,3.
2. Déterminer, par la méthode de votre choix, une valeur approchée à  $10^{-1}$  du nombre réel  $a$  tel que  $P(46 - a \leq D \leq 46 + a) = 0,95$ .

### Partie D : Brilliance des verres.

La brillance des verres est contrôlée par un dispositif électronique qui analyse les reflets du verre. La durée de bon fonctionnement de ce dispositif, exprimée en mois, est modélisée par une variable aléatoire  $T$  qui suit une loi exponentielle de paramètre  $\lambda$  avec  $\lambda > 0$ . Ainsi, pour tout réel  $t$  positif, la probabilité que le dispositif ait un temps de bon fonctionnement inférieur ou égal à  $t$  mois, est donnée par:

$$P(T \leq t) = \int_0^t \lambda e^{-\lambda x} dx$$

1. Montrer que  $P(T \leq t) = 1 - e^{-\lambda t}$
2. Sachant que  $P(T \leq 24) = 0,93$ , montrer que la valeur arrondie au centième de  $\lambda$  est 0,11.
3. Quelle est l'espérance de la durée de bon fonctionnement de ce dispositif ? On arrondira à l'unité et on interprétera le résultat.
4. La probabilité que la durée de vie soit supérieure à 4 ans est-elle supérieure à 1% ? Justifier.

On rappelle que  $e^u$  est une primitive de  $u'e^u$ .

## 2017 - U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée 2 h – coefficient 1

**Matériel autorisé :** Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

**Document à rendre avec la copie :** annexe 2

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.

En viticulture, les biotechnologies interviennent à de multiples stades : protection de la vigne contre les maladies, contrôle de la maturité du raisin avant les vendanges, suivi des fermentations alcoolique et monolactique...

### I. UTILISATION DU RÉFRACTOMÈTRE EN VITICULTURE (13 points)

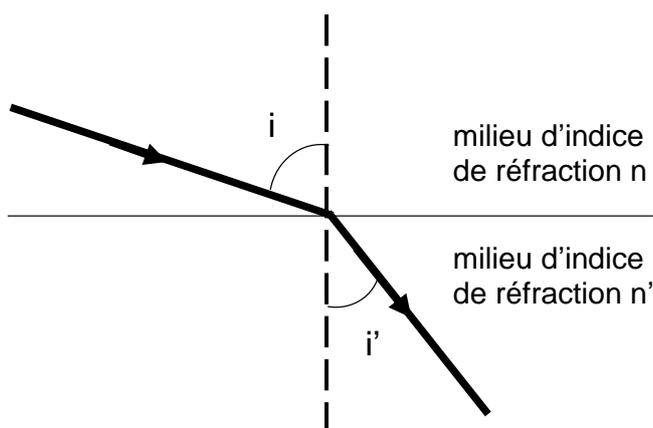
**Les deux parties de l'exercice sont indépendantes.**

Le réfractomètre d'Abbe (**schéma 1 en annexe 1 page 8**) est un instrument d'optique utilisé par les viticulteurs pour prévoir le degré alcoolique d'un vin à partir de la mesure de l'indice de réfraction du jus des raisins vendangés.

Lors du passage d'un milieu d'indice de réfraction  $n$  à un milieu d'indice de réfraction  $n'$ , la lumière subit un changement de direction appelé phénomène de réfraction. Les angles d'incidence  $i$  et de réfraction  $i'$  sont reliés par la relation suivante, faisant intervenir les indices de réfraction des milieux,  $n$  et  $n'$  :

$$n \cdot \sin i = n' \cdot \sin i' \quad \text{2}^{\text{ème}} \text{ loi de Descartes}$$

Schéma illustrant le phénomène de réfraction de la lumière dans le cas où  $n' > n$  :



**Données :**

- Indice de réfraction de l'air pour la raie D du sodium :  $n_{\text{air}} = 1,000$
- Indice de réfraction du prisme P pour la raie D du sodium :  $n_P = 1,700$
- Angle au sommet du prisme P :  $A = 60,00^\circ$
- Avec les notations du **schéma 1 en annexe 1 page 8**, dans le prisme P :  $A = r_1 + i_2$

## 1. Principe de fonctionnement d'un réfractomètre d'Abbe

L'indice de réfraction  $n$  d'un milieu dépend de la longueur d'onde  $\lambda$  de la lumière selon la loi de Cauchy :  $n = A + \frac{B}{\lambda^2}$  avec  $A$  et  $B$  constantes positives caractéristiques du milieu.

Plus l'indice de réfraction d'un milieu est élevé, plus le milieu réfracte la lumière.

Les indices de réfraction des liquides sont donnés à 20 °C pour la raie D, jaune, du sodium correspondant à une longueur d'onde de 589,3 nm. Mais en pratique, le prisme P du réfractomètre d'Abbe étudié ici est souvent éclairé en lumière blanche.

- 1.1. Un prisme est un milieu dispersif. Définir ce qu'est un milieu dispersif.
- 1.2. On s'intéresse à deux radiations de la lumière blanche : une radiation bleue et une radiation rouge. Lors du passage à travers le prisme, la radiation bleue est la plus réfractée.  
Justifier cette observation sans calcul à l'aide de la loi de Cauchy.
- 1.3. Indiquer pourquoi la lumière blanche semble *a priori* inadaptée à la mesure de l'indice de réfraction d'un échantillon.
- 1.4. À l'aide du **schéma 1 de l'annexe 1 page 8**, citer l'élément du réfractomètre permettant néanmoins de travailler en lumière blanche.

## 2. Détermination du degré alcoolique d'un vin par réfractométrie

Un viticulteur souhaite produire un vin portant la mention « sélection grains nobles ». Un tel vin est produit à partir d'une sélection rigoureuse des grains de raisin atteints de pourriture noble due au champignon *Botrytis cinerea*.

Pour obtenir la mention « sélection grains nobles », un vin issu d'une fermentation totale des sucres du jus de raisin doit afficher un pourcentage en volume d'alcool supérieur ou égal à 16,6 %.

Pour estimer le pourcentage en volume d'alcool d'un vin, le viticulteur s'appuie sur la relation empirique suivante : « Une teneur de 17 g.L<sup>-1</sup> de sucres dans le jus de raisin conduit à une teneur en alcool de 1 % en volume après fermentation alcoolique totale ».

La concentration massique en sucres peut être déterminée par la mesure de l'indice de réfraction du jus de raisin à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe. Une goutte de jus de raisin est déposée entre les prismes P et P' (**schéma 1 en annexe 1 page 8**).

Lorsque la lumière blanche arrive en incidence rasante au point I sur le prisme P, le rayon réfracté ne peut dépasser une valeur maximale correspondant à l'angle de réfraction limite  $r_1$  donné par la relation (1) suivante :

$$\sin r_1 = \frac{n_{\text{jus}}}{n_p} \quad \text{relation (1)}$$

- 2.1. On mesure à la sortie du prisme P un angle  $r_2$  égal à 9,98°. On veut montrer que la mesure de l'angle  $r_2$  permet de déterminer la valeur de l'indice de réfraction  $n_{\text{jus}}$  du jus de raisin.
  - 2.1.1. Calculer la valeur de l'angle  $i_2$  en appliquant la deuxième loi de Descartes au point J.
  - 2.1.2. En déduire que la valeur de l'angle  $r_1$  est 54,15°, en utilisant des données sur le prisme.
  - 2.1.3. À l'aide de la relation (1), calculer la valeur de l'indice de réfraction  $n_{\text{jus}}$  du jus de raisin.

- 2.2. À l'aide du **document 1 de l'annexe 2 page 9 à rendre avec la copie**, déterminer si un vin obtenu par fermentation d'un jus de raisin d'indice de réfraction  $n_{\text{jus}} = 1,378$  peut obtenir la mention « sélection grains nobles ». Justifier la réponse.

## II. LA BOUILLIE BORDELAISE POUR PROTÉGER LA VIGNE (20 points)

**Les deux parties de l'exercice sont indépendantes.**

Le mildiou est une maladie de la vigne due au champignon *Plasmopara viticola* qui provoque des dommages sur les feuilles et une baisse de la qualité du vin, et contre laquelle on lutte à l'aide de la bouillie bordelaise.

Des recherches menées par l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) en collaboration avec l'IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) ont permis de développer des plants de vignes comportant plusieurs gènes de résistance au mildiou.

En attendant la commercialisation et l'exploitation de ces cépages de vignes prévue pour l'année 2017, la bouillie bordelaise reste le produit phytosanitaire le plus utilisé pour lutter contre le mildiou.

La bouillie bordelaise est un mélange de chaux solide  $\text{Ca}(\text{OH})_2 (\text{s})$  et de sulfate de cuivre (II) solide  $\text{CuSO}_4 (\text{s})$  aux propriétés fongicides.

Données :

- Couples oxydant / réducteur :  $\text{I}_2 (\text{aq}) / \text{I}^- (\text{aq})$  ;  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-} (\text{aq}) / \text{S}_2\text{O}_3^{2-} (\text{aq})$
- Masse molaire :  $M (\text{CuSO}_4) = 159,6 \text{ g.mol}^{-1}$
- Numéro atomique :  $N : Z = 7$

### 1. Dosage de la bouillie bordelaise par titrage indirect

L'étiquette d'un paquet de bouillie bordelaise indique un pourcentage massique de 20 % en sulfate de cuivre (II)  $\text{CuSO}_4 (\text{s})$ . On souhaite vérifier cette indication en réalisant un dosage par titrage indirect.

La solution aqueuse S est préparée en dissolvant 1,00 g de bouillie bordelaise dans 100 mL d'eau distillée. L'ajout d'un large excès d'iodure de potassium solide  $\text{KI} (\text{s})$  à la solution aqueuse S provoque la formation de l'ion complexe incolore diiodocuprate (I)  $[\text{CuI}_2]^- (\text{aq})$  et de diiode  $\text{I}_2 (\text{aq})$ .

L'équation de la réaction modélisant cette transformation supposée totale s'écrit :



On admet que l'addition d'iodure de sodium solide n'entraîne aucune variation de volume. La solution aqueuse S' obtenue est limpide et de couleur brune.

On réalise le titrage colorimétrique du diiode  $\text{I}_2 (\text{aq})$  contenu dans la solution aqueuse S' par une solution aqueuse titrante de thiosulfate de sodium ( $2 \text{Na}^+ (\text{aq}) + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} (\text{aq})$ ) de concentration molaire  $C = 2,00 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Le volume de solution aqueuse S' dosée est  $V_{\text{S}'} = 25,0 \text{ mL}$  et le volume de solution aqueuse titrante versée à l'équivalence est  $V_{\text{E}} = 15,60 \text{ mL}$ .

Toutes les espèces chimiques mises en jeu dans ce dosage sont incolores à l'exception du diiode.

- 1.1. Indiquer en quoi le **document 2 de l'annexe 2 page 9 à rendre avec la copie** fournit un élément de justification du travail de recherche réalisé par l'INRA.
- 1.2. Indiquer la verrerie nécessaire à la réalisation de ce titrage.
- 1.3. Établir en détaillant la démarche l'équation de la réaction entre le diiode  $I_{2(aq)}$  et les ions thiosulfate  $S_2O_3^{2-}(aq)$ .
- 1.4. Indiquer comment repérer l'équivalence avec la méthode proposée.
- 1.5. Écrire la relation entre la quantité de matière de diiode titrée  $n(I_2)$  et la quantité de matière d'ions thiosulfate  $n(S_2O_3^{2-})$  ajoutée pour atteindre l'équivalence.
- 1.6. Vérifier que la quantité de matière de diiode titrée vaut  $n(I_2) = 1,56 \times 10^{-4}$  mol.

L'équation (1) page 4 permet d'écrire la relation suivante :

$$n(I_{2(aq)}) = \frac{n(Cu^{2+}_{(aq)})}{2}$$

- 1.7. Calculer la masse de sulfate de cuivre (II) dans 100 mL de la solution S.
- 1.8. Déterminer le pourcentage massique en sulfate de cuivre (II) de la bouillie bordelaise.
- 1.9. Indiquer s'il est en accord avec l'indication de l'étiquette.

## 2. Dosage de la bouillie bordelaise par spectrophotométrie

La solution aqueuse S de bouillie bordelaise préparée dans la partie 1 est quasiment incolore.

Pour réaliser un dosage spectrophotométrique par étalonnage des ions cuivre (II), un protocole expérimental indique d'ajouter une solution aqueuse d'ammoniac  $NH_{3(aq)}$  à la solution aqueuse S afin d'obtenir une solution aqueuse de couleur bleu céleste.

Cette couleur intense est due à la formation de l'ion complexe tétraamminecuivre (II)  $[Cu(NH_3)_4]^{2+}_{(aq)}$  dans lequel l'ammoniac joue le rôle de ligand.

- 2.1. Écrire la structure électronique de l'atome d'azote.
- 2.2. Écrire la formule de Lewis de la molécule d'ammoniac.
- 2.3. Expliquer pourquoi l'ammoniac peut jouer le rôle de ligand.
- 2.4. Justifier la couleur de l'ion complexe formé à l'aide des **documents 3 et 4 de l'annexe 3 page 10**.
- 2.5. Nommer la loi utilisée lors d'un dosage spectrophotométrique.

### III. LES PHÉROMONES CONTRE LES CHENILLES NUISIBLES DE LA VIGNE (17 points)

**Les deux parties de l'exercice sont indépendantes.**

L'eudémis (*Lobesia botrana*) est une chenille nuisible pour la vigne : elle perfore les grains de raisin, ce qui favorise l'apparition de pourriture.

La confusion sexuelle par phéromones de synthèse est une méthode efficace pour lutter contre ces chenilles nuisibles et pour limiter le recours aux insecticides.

Les phéromones sont des molécules supports de la communication propre à une espèce. Il existe des phéromones sexuelles, de regroupement, d'alarme, de piste, de régulation sociale...

Des diffuseurs de phéromones sexuelles de synthèse d'eudémis femelles sont utilisés dans les parcelles de vignes pour désorienter les mâles. Les papillons mâles deviennent incapables de localiser les papillons femelles à cause de la grande quantité de phéromones sexuelles présente dans l'atmosphère. Les papillons ne peuvent plus s'accoupler, ce qui conduit à une réduction des populations de chenilles.

Données :

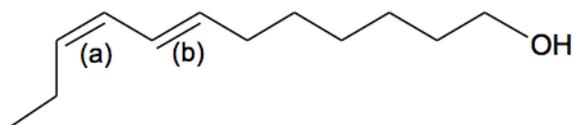
- Électronégativités selon l'échelle de Pauling :  $\chi_{\text{Mg}} = 1,31$  ;  $\chi_{\text{C}} = 2,55$

#### 1. Stéréochimie de phéromones d'insectes

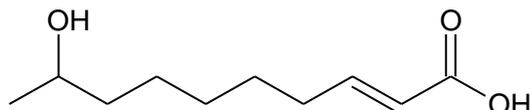
L'activité spécifique d'une phéromone dépend de sa stéréochimie.

On s'intéresse aux phéromones suivantes :

Phéromone sexuelle d'eudémis



Phéromone de regroupement de l'abeille



- 1.1. Déterminer la stéréochimie des doubles liaisons notée (a) et (b) de la phéromone sexuelle d'eudémis. Justifier.
- 1.2. Recopier la formule de la phéromone de regroupement de l'abeille. Entourer et nommer les groupes fonctionnels.
- 1.3. Justifier que la phéromone de regroupement de l'abeille est une molécule chirale.
- 1.4. Donner la représentation de Cram de l'énantiomère de configuration absolue (R) de la phéromone de regroupement de l'abeille. Justifier brièvement.

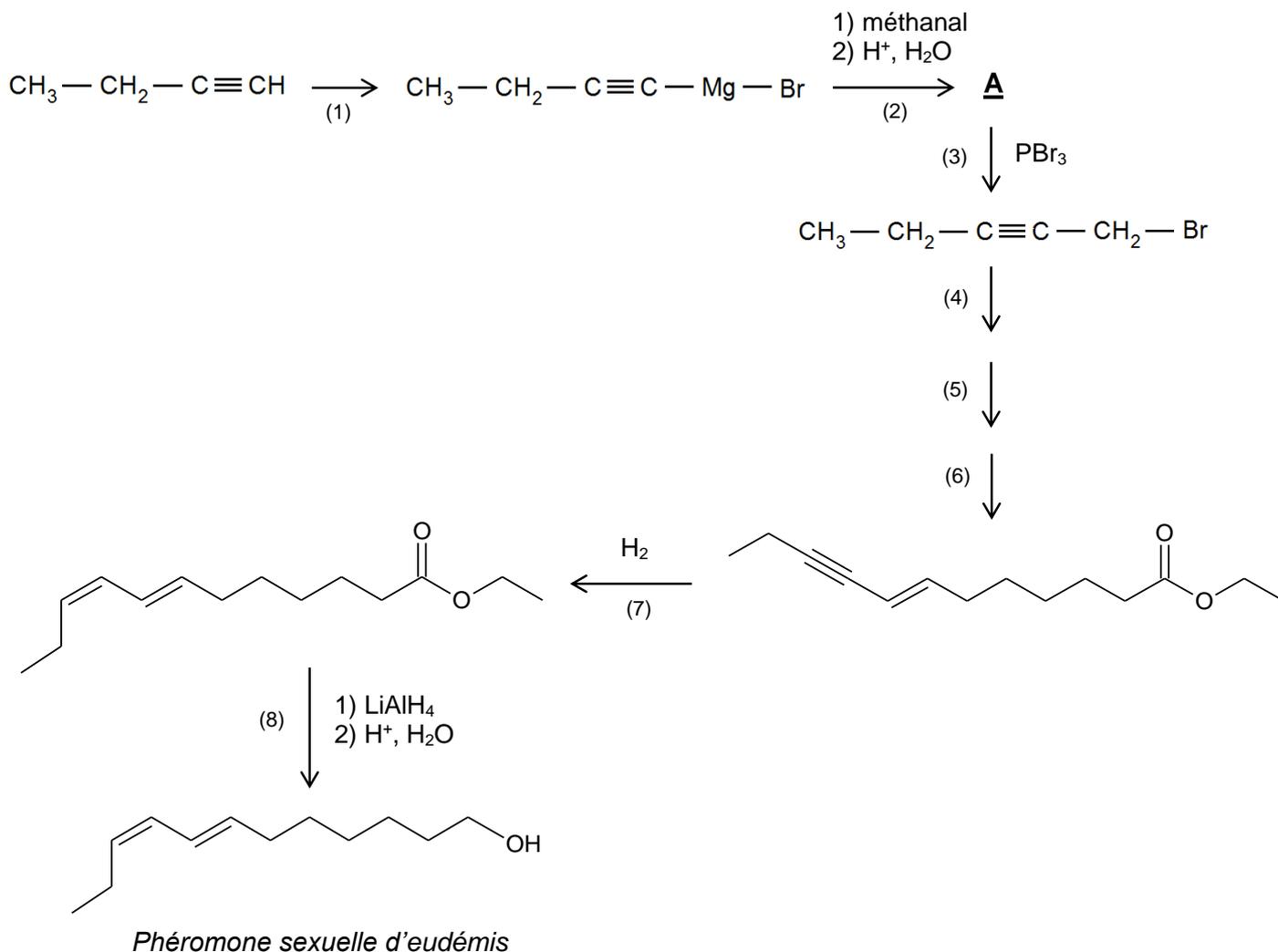
Données :

|                   |   |   |   |
|-------------------|---|---|---|
| Élément chimique  | H | C | O |
| Numéro atomique Z | 1 | 6 | 8 |

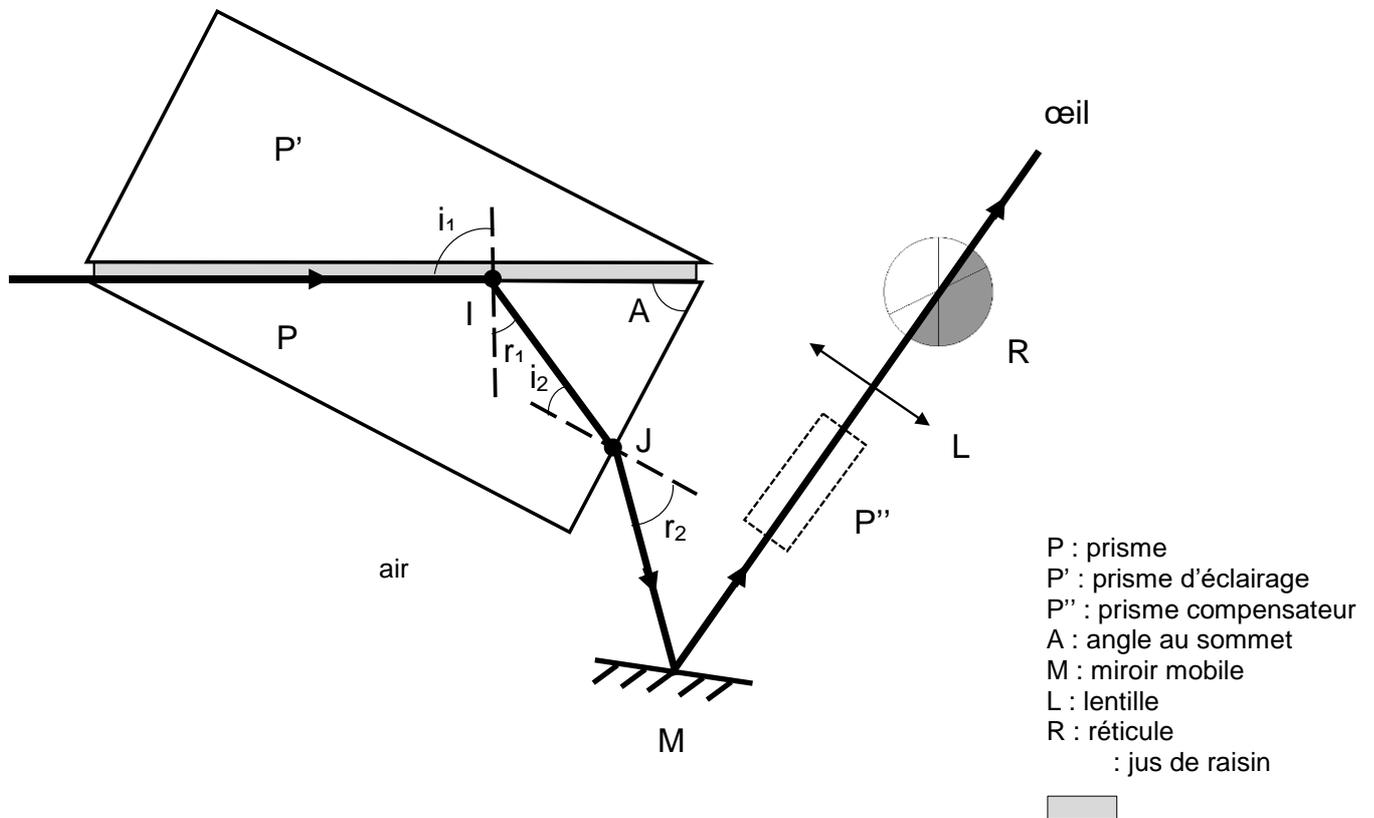
## 2. Synthèse de la phéromone sexuelle d'eudémis

Au vu des très faibles quantités émises naturellement par les femelles eudémis, la lutte contre les chenilles nuisibles de la vigne nécessite de recourir à des phéromones de synthèse.

La phéromone sexuelle d'eudémis peut être obtenue par la séquence réactionnelle suivante :



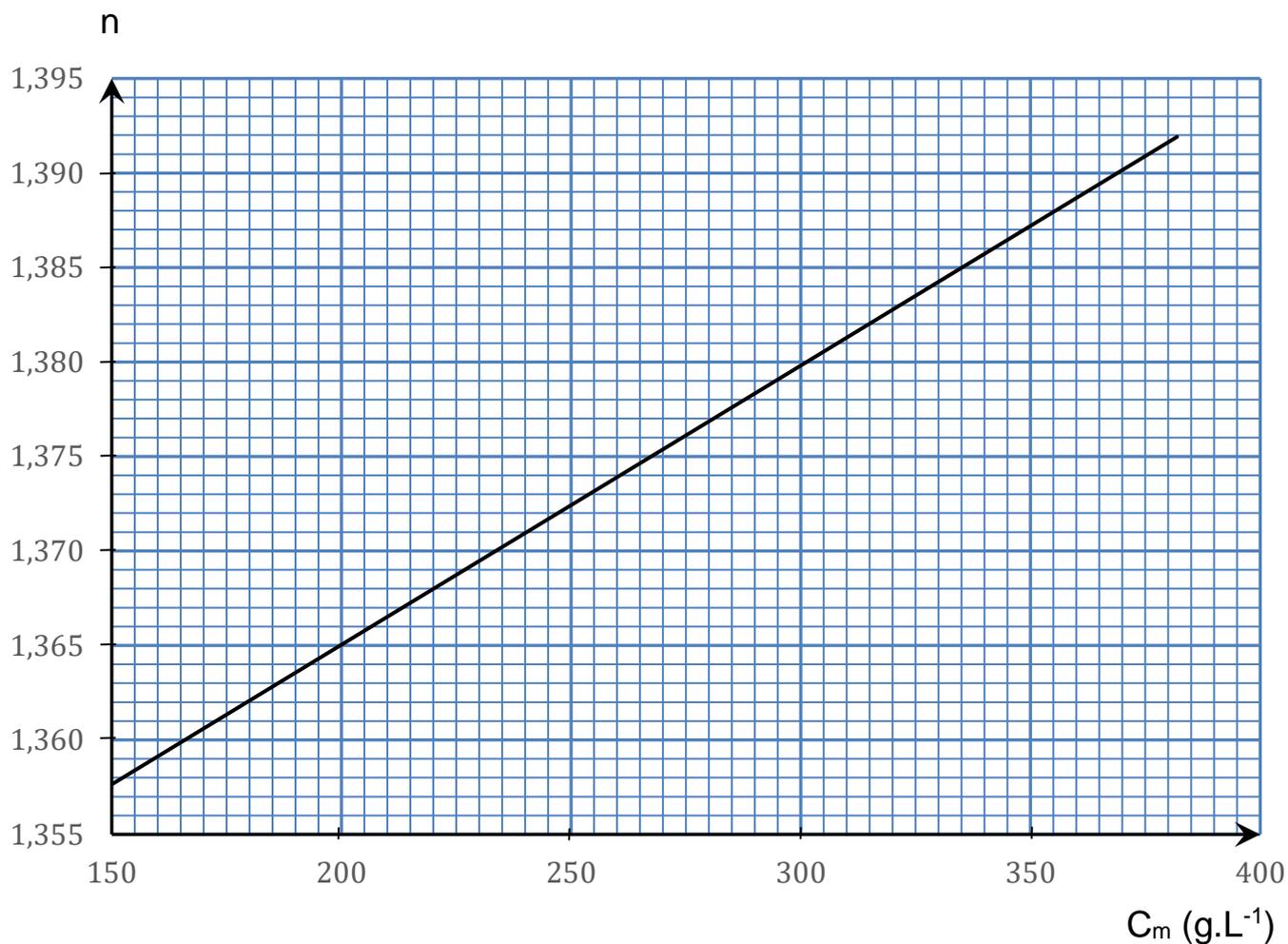
- 2.1. Indiquer la polarité de la liaison C – Mg. Justifier la réponse.
- 2.2. Écrire la formule développée du méthanal.
- 2.3. Donner la formule semi-développée de la molécule **A**.
- 2.4. Le spectre infrarouge de la molécule **A** présente une bande large vers  $3300 \text{ cm}^{-1}$ . À l'aide de l'**annexe 4 page 11**, identifier la liaison ainsi caractérisée.
- 2.5. Indiquer la modification de la molécule qui a lieu lors de l'étape 7.
- 2.6. À l'aide de l'**annexe 5 page 12**, proposer un catalyseur adapté à l'étape 7 de la synthèse de la phéromone sexuelle d'eudémis. Justifier.
- 2.7. Indiquer si l'étape 8 est une réaction d'oxydation ou de réduction. Justifier.

**ANNEXE 1****Schéma 1** : schéma simplifié d'un réfractomètre d'Abbe

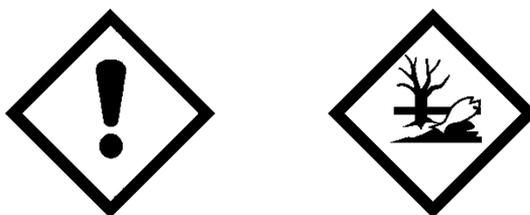
L'orientation du miroir mobile est ajustée de sorte à observer sur le réticule deux plages nettes : une plage éclairée jaune et une plage sombre.

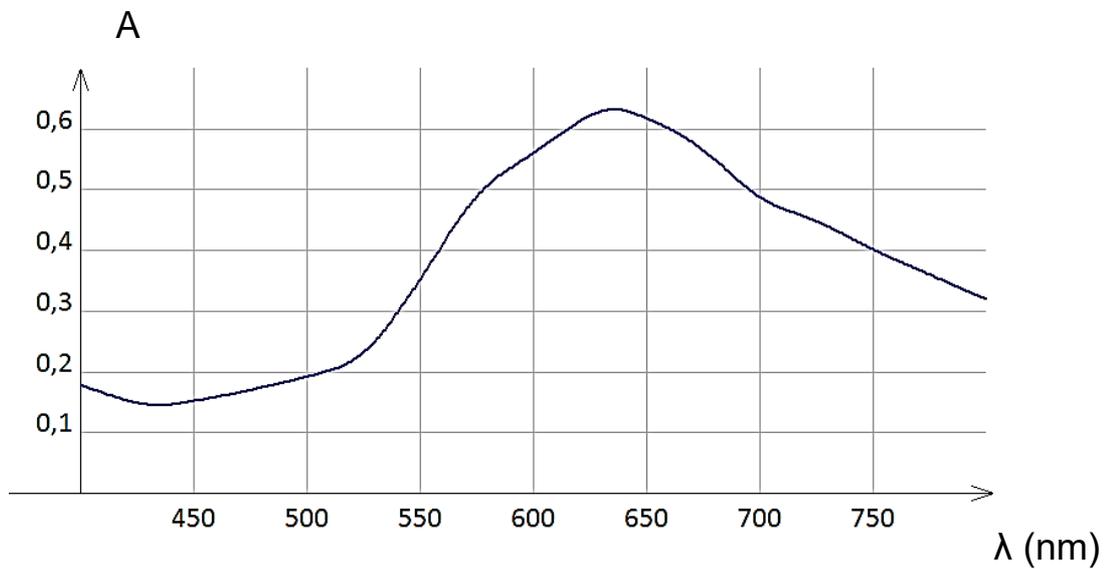
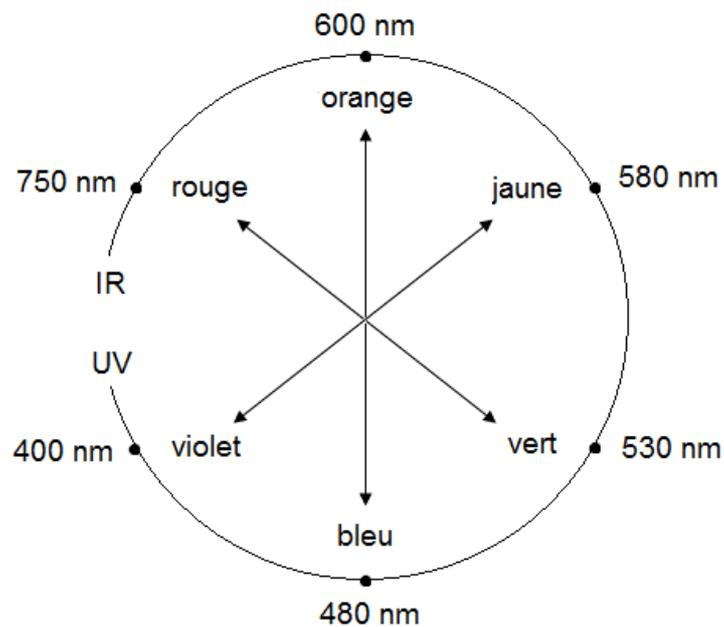
**ANNEXE 2****À RENDRE AVEC LA COPIE**

**Document 1** : Évolution de l'indice de réfraction de jus de raisin en fonction de la concentration massique en sucres



**Document 2** : pictogrammes de sécurité du sulfate de cuivre



**ANNEXE 3****Document 3** : spectre d'absorption du complexe  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  dans l'eau**Document 4** : diagramme des couleurs complémentaires

## ANNEXE 4

## SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Table des nombres d'onde des vibrations de valence et de déformation

| Liaison                                | Espèce                   | Nature des vibrations | Nombre d'onde $\text{cm}^{-1}$  | Intensité<br>F : fort ; m :<br>moyen ; f :<br>faible |
|--|--------------------------|-----------------------|---|--|
| O-H                                    | Alcool ou phénol libre   | Valence               | 3590-3650   | F (fine)   |
| O-H                                    | Alcool ou phénol lié     | Valence               | 3200-3600   | F (large)  |
| N-H                                    | Amine primaire           | Valence               | 3300-3500   | m (2 bandes)   |
| N-H                                    | Amine secondaire         | Valence               |   | m (1 bande)  |
| N-H                                    | Amide                    | Valence               | 3100-3500   | F  |
| C <sub>di</sub> -H                     | Alcyne                   | Valence               | ≈ 3300  | m ou f   |
| C <sub>tri</sub> -H                    | Alcène                   | Valence               | 3030-3100   | m  |
| C <sub>tri</sub> -H                    | Aromatique               | Valence               | 3000-3100   | m  |
| C <sub>tet</sub> -H                    | Alcane                   | Valence               | 2850-3000   | F  |
| C <sub>tri</sub> -H                    | Aldéhyde                 | Valence               | 2700-2900   | m (2 bandes)   |
| OH                                     | Acide carboxylique       | Valence               | 2500-3200   | F à m (large)  |
| C≡C                                    | Alcyne                   | Valence               | 2100-2260   | f  |
| C <sub>tri</sub> =O                    | Aldéhyde et cétone       | Valence               | 1650-1730<br>abaissement de<br>20 à 30 $\text{cm}^{-1}$ si<br>conjugaison | F  |
| C <sub>tri</sub> =O                    | Acide carboxylique       | Valence               | 1700-1725   | F  |
| C <sub>tri</sub> =O                    | Ester                    | Valence               | 1735-1750   | F  |
| C <sub>tri</sub> =O                    | Amide                    | Valence               | 1630-1700   | F  |
| C <sub>tri</sub> =C <sub>tri</sub>     | Alcène                   | Valence               | 1620-1690   | m  |
| C <sub>tri</sub> =C <sub>tri</sub>     | Aromatique               | Valence               | 1450-1600   | Variable (3 ou 4 bandes)                             |
| N-H amine                              | Amine                    | Déformation           | 1560-1640   | F ou m   |
| -NO <sub>2</sub>                       | Groupe nitro             | Valence               | 1540-1570 et<br>1340-1390   | F (2 bandes)   |
| C <sub>tet</sub> -H                    | Alcane                   | Déformation           | 1430-1480   | F  |
| C <sub>tet</sub> -H (CH <sub>3</sub> ) | Alcane                   | Déformation           | 1370-1390   | F (2 bandes)   |
| C <sub>tet</sub> -O                    | Alcool                   | Valence               | 1010-1200   | F  |
| C <sub>tet</sub> -N                    | Amine                    | Valence               | 1020-1250   | m  |
| C <sub>tri</sub> -H de -<br>HC=CH- (E) | Alcène                   | Déformation           | 960-970   | F  |
| (Z)                                    |                          | Déformation           | 670-730   | m  |
| C <sub>tri</sub> -H                    | Aromatique monosubstitué | Déformation           | 730-770 et 680-720  | F (2 bandes)   |

|                     |  |   |  |                             |
|---------------------|--|---|--|-----------------------------|
| C <sub>tri</sub> -H | Aromatique 1,2-disubstitué<br>Aromatique 1,3-disubstitué<br>Aromatique 1,4-disubstitué | Déformation<br>Déformation<br>Déformation | 735-770<br>750-800 et 680-720<br>800-860 | F<br>F et m (2 bandes)<br>F |
| C-Cl                | Chlorure d'alkyle ou d'aryle   | Valence                                   | 600-800                                  | F                           |
| C-Br                | Bromure d'alkyle ou d'aryle  | Valence                                   | 500-750                                  | F                           |
| C-I                 | Iodure d'alkyle ou d'aryle   | Valence                                   | ≈ 500                                    | F                           |



## ANNEXE 5

### Catalyseurs de réactions d'hydrogénation

| Catalyseurs                                    | Transformations chimiques   |
|--|---|
| Platine sur charbon actif                      | $\text{—C}\equiv\text{C—} + 2\text{H}_2 \longrightarrow \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\   \quad   \\ \text{—C—C—} \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$        |
| Catalyseur de Lindlar<br>(palladium désactivé) | $\text{—C}\equiv\text{C—} + \text{H}_2 \longrightarrow \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \end{array}$   |
| Sodium dissous dans de<br>l'ammoniac           | $\text{—C}\equiv\text{C—} + \text{H}_2 \longrightarrow \begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagup \quad \quad \text{H} \end{array}$ |

# 2016 - U2: Biologie moléculaire et génie génétique

Durée 2 h – coefficient 1

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

## Les enzymes TALEN : des outils pour agir spécifiquement sur les gènes

Depuis la découverte des enzymes de restriction, la manipulation *in vitro* des séquences d'ADN a permis d'immenses progrès dans la compréhension des mécanismes génétiques. De nouveaux outils plus performants sont apparus récemment comme les méganucléases, les protéines à doigts de zinc, les CRISPR-Cas9 nucléases, et les TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*). Toutes ces enzymes sont des endonucléases spécifiques, dont le site de liaison à la séquence d'ADN reconnue (*binding domain = BD*) peut être adapté en fonction des besoins. Plusieurs méthodes basées sur la PCR ont été élaborées pour faciliter la construction de ce domaine de liaison.

Les enzymes TALEN (N pour nucléase) sont obtenues par modification d'une protéine bactérienne nommée TALE (*Transcription Activator-Like Effector*).

### 1. Étude de quelques caractéristiques de la protéine TALE (6 points)

La protéine TALE est produite naturellement chez certaines bactéries phytopathogènes du genre *Xanthomonas*. Sa séquence codante est contenue dans un opéron, dont l'expression est activée lorsque la bactérie adhère sur la paroi d'une cellule végétale (document 1). Cet opéron contient trois ORF (*open reading frame*), dont l'un code la protéine TALE. Le numéro d'accèsion (accession number) X8975444 a été attribué à la séquence du gène de la protéine TALE.

**1.1 Indiquer** l'intérêt d'associer un « accession number » à une séquence.

**1.2 Représenter** un opéron par un schéma annoté en faisant apparaître les séquences nécessaires à la transcription et à la traduction des 3 protéines. Sur le schéma de l'opéron, **délimiter** un ORF.

**1.3 À partir du document 1a, décrire** les étapes du mécanisme d'action de la protéine TALE. **Justifier** le nom donné à cette protéine (Transcription Activator-Like-Effector).

**1.4 À partir du document 1b, présenter** les particularités du domaine de liaison à l'ADN de la protéine TALE. **Déterminer** la longueur de la séquence d'ADN reconnue par la protéine TALE. **Comparer** cette longueur avec celle généralement reconnue par une enzyme de restriction de type II et **conclure** sur la spécificité de la protéine TALE.

### 2. La création du domaine de liaison sur mesure par PCR (7 points)

Les caractéristiques du domaine de fixation à l'ADN de la protéine TALE en font un outil intéressant en génie génétique. Pour cela, son domaine de liaison à l'ADN a été fusionné à celui responsable du clivage de l'ADN en présence de l'enzyme de restriction Fok I. La protéine de fusion obtenue est appelée TALEN.

Le document 2 présente les différentes étapes de la construction d'un domaine de liaison à l'ADN d'une protéine TALEN. Chaque module de liaison à une base azotée est assemblé au suivant dans un ordre déterminé par la nature des amorces de PCR utilisées (document 2a).

**2.1 Expliquer** comment la PCR permet d'incorporer des séquences non spécifiques à l'extrémité d'un amplicon.

**2.2** À partir du document 2a, **dresser** la liste des enzymes à site palindromique et des groupes d'enzymes à sites compatibles. **Indiquer** la particularité du positionnement du site de coupure de l'enzyme Bsal.

Le document 2b présente les étapes du clonage ordonné médié par PCR. Le site de restriction Bsal a été ajouté aux extrémités 5' de chaque amorce.

Les nucléotides N correspondent à une séquence choisie et différente pour chaque amorce.

Chaque amplicon est ensuite digéré par Bsal et purifié avant l'étape de ligature. La purification du produit de digestion est réalisée par une électrophorèse préparative combinée à une chromatographie sur colonne de silice.

**2.3 Préciser** l'intérêt de la purification avant ligature dans ce contexte. **Présenter** les étapes d'extraction et de purification d'un produit de digestion.

**2.4** À partir du document 2b, **expliquer** en quoi ce clonage permet d'ordonner les modules dans la construction finale.

**2.5 Argumenter** l'intérêt de réaliser un clonage ordonné dans le contexte d'utilisation de la protéine TALE.

### **3. Utilisation des enzymes TALEN pour l'invalidation de gènes (5 points)**

Le vecteur de clonage contenant l'ADN codant la protéine de fusion TALEN obtenue est introduit dans des organismes procaryotes cultivés sur milieu sélectif pour en produire des quantités importantes. Les vecteurs recombinés sont obtenus à partir de ces cellules et utilisés pour transférer des cellules eucaryotes en culture.

Le document 3a présente le vecteur utilisé pour le clonage de la protéine TALEN.

**3.1** A partir du document 3a, **argumenter** le choix du type cellulaire utilisé pour produire le vecteur recombinant. **Expliquer** le rôle du gène *ccdB* dans la sélection des recombinants. **Indiquer** les éléments du vecteur qui permettent l'expression du gène codant la protéine TALEN dans une cellule eucaryote.

Deux protéines TALEN différentes sont utilisées (document 3b), pour couper un locus contenant un gène de fonction inconnue (document 4). Deux vecteurs TALEN sont introduits dans des cellules embryonnaires (cellules ES, Embryonic Stem) de souris en culture.

**3.2** A l'aide des documents 3b et 4, **expliquer** la conséquence moléculaire de la fixation des deux protéines TALEN sur le gène d'intérêt.

Après action des protéines TALEN sur le génome, le système NHEJ va réparer le génome.

**3.3 Evaluer** les conséquences pour le gène d'intérêt de l'action du système NHEJ.

**3.4 Discuter** de l'intérêt de l'utilisation des protéines TALEN en génie génétique.

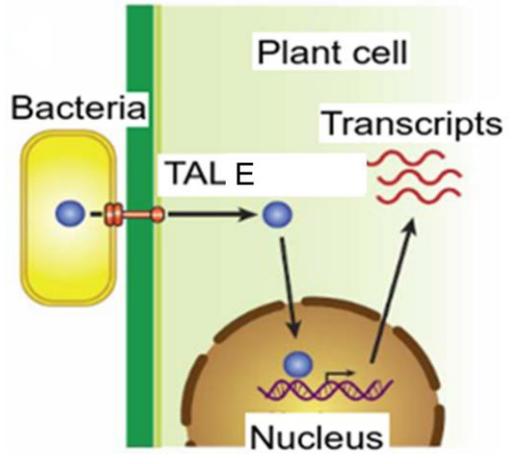
#### **Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)**

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

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

**Document 1 : mode d'action et caractéristiques de la protéine TALE**

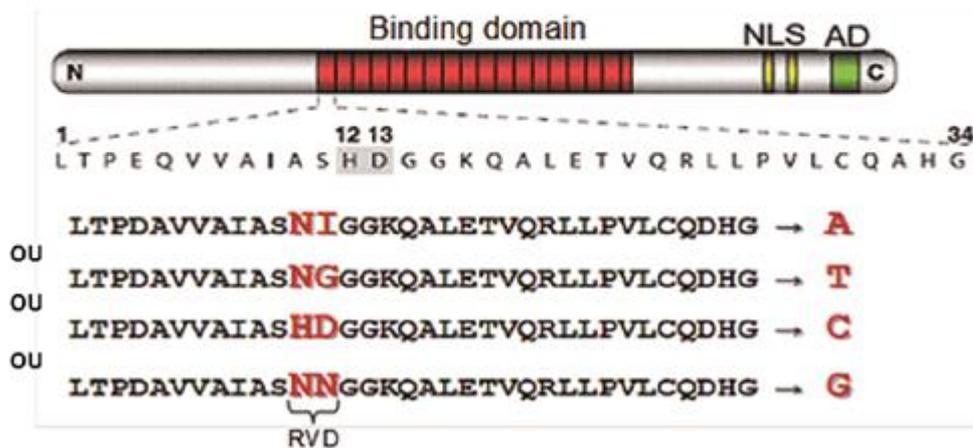
**1a. Étapes du mécanisme d'action de la protéine TALE *in vivo***



**1b. Caractéristiques moléculaires des différentes TALE**

**Identification of TALE and code cracking**

TALE: Transcription Activator-Like Effector



- AD : activator domain
- NLS : Nuclear Localisation Signal
- RVD : repeat variable di-residue
- : interagit avec

La protéine TALE est constituée dans sa partie centrale de micro-domaines similaires, répétés entre 18 et 22 fois, sous la forme de modules de 34 acides aminés très conservés.

**Document 2 : une méthode de construction d'un gène codant pour une protéine TALE**

**2.a. Enzymes de restriction**

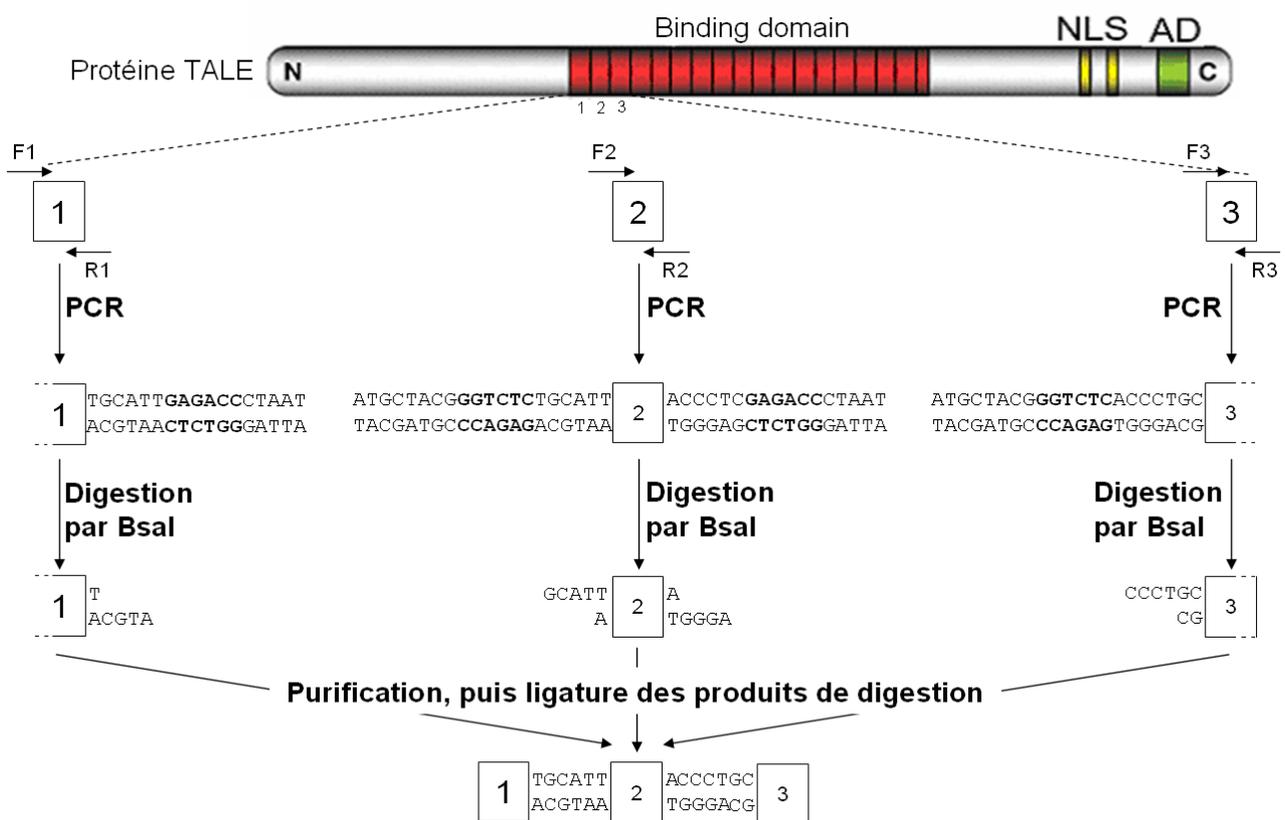
| Nom         | Site d'hydrolyse                           | Séquence débordante |
|-------------|--|---------------------|
| AoxI        | /GGCC                                      | 5' -GGCC            |
| <u>NotI</u> | GC/GGCCGC                                  | 5' -GGCC            |
| EcoRI       | G/AATTC                                    | 5' -AATT            |
| HhaI        | GCG/C                                      | CG-3'               |
| FokI        | GGATGNNNNNNNNN/NNNN<br>CCTACNNNNNNNNNNNNN/ | 5' -NNNN            |
| BsaI        | GGTCTCN/NNNN<br>CCAGAGNNNNN/               | 5' -NNNN            |

**2.c. Séquences 5' de quelques amorces utilisées dans le document 2.b**

| Nom de l'amorce (primer) | Séquences de la partie 5' non spécifique    |
|--------------------------|---|
| R1 (amplicon 1)          | 5'ATTAG <u>GGTCTCA</u> /ATGCA <sub>3'</sub> |
| F2 (amplicon 2)          | 5'ATGCTACGGTCTCT/GCATT <sub>3'</sub>        |
| R2 (amplicon 2)          | 5'ATTAG <u>GGTCTCG</u> /AGGGT <sub>3'</sub> |
| F3 (amplicon 3)          | 5'ATGCTACGGTCTCA/CCCTGC <sub>3'</sub>       |

La partie soulignée de chaque séquence d'amorce désigne les sites respectivement reconnus et coupés par l'enzyme BsaI

**2.b. Première étape : construction par PCR, digestion, puis ligature d'une séquence d'ADN codant des domaines de liaison d'une protéine TALE à un ADN**



La séquence des modules 1 ; 2 ; et 3 code un des quatre micro-domaines de liaison à une des quatre bases (**document 1.b**).

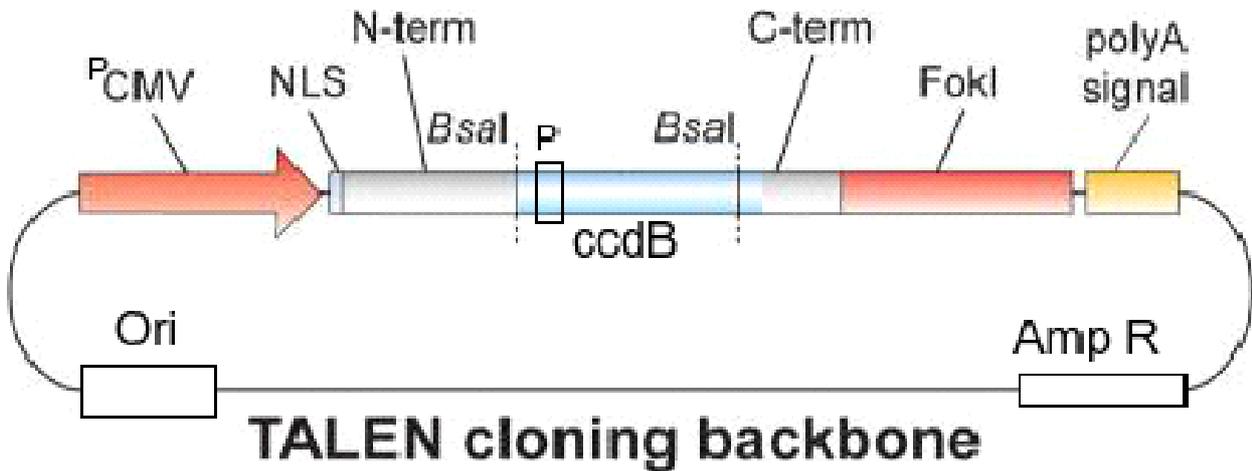
Les amplicons sont obtenus par PCR en présence de couples d'amorces F pour forward et R pour reverse (**document 2.c**). Ils sont digérés par l'enzyme de restriction BsaI.

Les produits de digestion, après purification, sont ligaturés dans un seul tube réactionnel.

### Document 3 : production et utilisation des enzymes TALEN

Une fois que la séquence d'ADN codant la séquence protéique d'intérêt est construite (de 18 à 22 modules codant chacun pour 34 acides aminés), elle est clonée dans le vecteur représenté ci-dessous. Des sites spécifiques conçus pour l'enzyme *Bsal* permettent d'orienter correctement l'insert au sein de ce vecteur.

#### 3.a. Vecteur de clonage



NLS = *Nuclear localisation signal*

P = promoteur

CMV = cyto-mégalo-virus

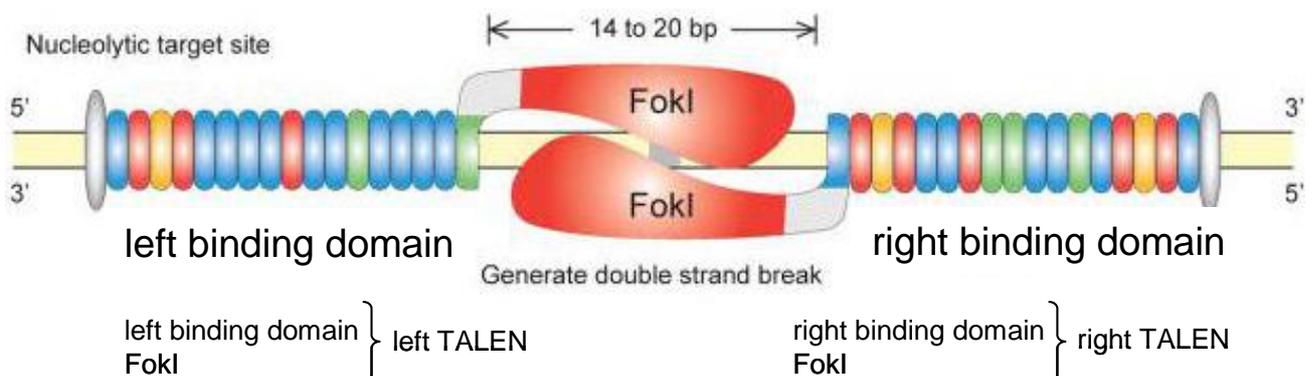
*Bsal*, *FokI* = endonucléases de restriction (voir **document 2.a**)

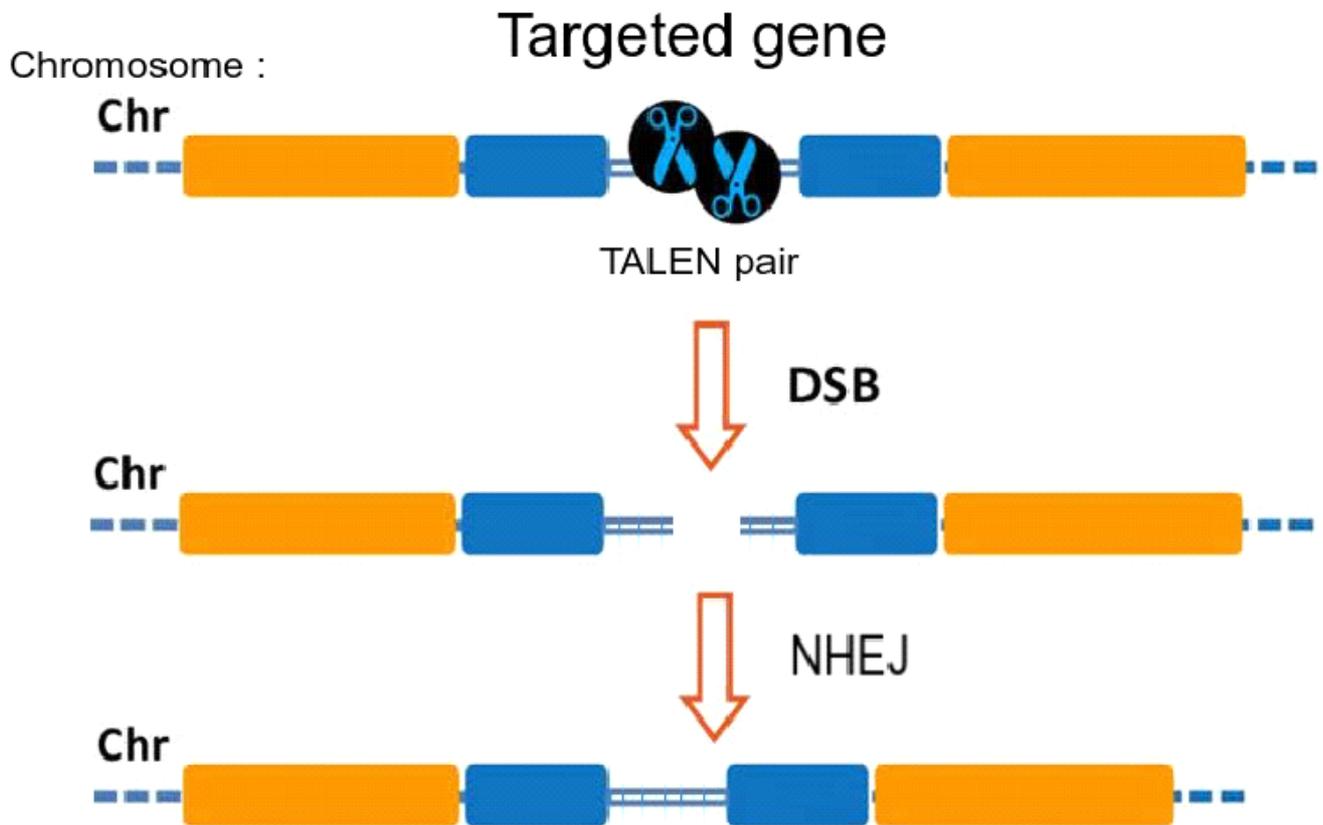
*ccdB* : gène dont l'expression est létale chez *E. coli* wt (*wildtype*)

ori = pBR322 ori

Amp R = *beta lactamase gene*.

#### 3.b. Interaction entre le complexe protéique constitué de deux protéines TALEN et la séquence cible du génome



**Document 4 : Invalidation d'un gène d'intérêt par utilisation de deux protéines TALEN**

DSB : *double strand break*

NHEJ : *Non Homologous End Joining* (système de réparation des cassures double brin d'une molécule d'ADN)

# 2016 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée 2 h – coefficient 1

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

## Kératinases, outils de valorisation des déchets kératiniques

Synthétisée et utilisée par de nombreux êtres vivants comme élément de structure, la kératine représente l'exemple-type de protéine fibreuse. C'est le constituant principal des phanères (poils, plumes, cornes, ongles, becs de nombreux animaux,...).

Les composés riches en kératine sont abondants dans la nature. Ils pourraient ainsi représenter une source de protéines et d'acides aminés et trouver des applications en tant qu'additifs alimentaires pour les animaux ou source d'azote pour les plantes. Cependant, dans la pratique, l'utilisation de tels déchets est limitée du fait de la haute résistance de la kératine à la dégradation en présence de la majorité des enzymes protéolytiques classiques.

De nombreux micro-organismes sont capables de produire des kératinases, enzymes extracellulaires à activité kératolytique. Une biodégradation des déchets kératiniques à l'aide de tels micro-organismes pourrait représenter une méthode intéressante pour valoriser ces composés.

### 1. Structure et mode d'action des kératinases (3 points)

Les kératinases sont des protéases dont le mécanisme d'action n'est pas connu avec certitude. Des études récentes, ont néanmoins montré qu'elles présentent une très forte homologie avec les phosphatases alcalines. Elles sont donc aujourd'hui considérées comme des protéases à sérine.

Le document 1 présente la structure tridimensionnelle d'une kératinase bactérienne.

**1.1. Indiquer** la classe d'enzymes à laquelle appartiennent les kératinases.

**Reporter** sur la copie les noms des structures secondaires repérées par les numéros 1 et 2 du document 1. **Préciser** la nature des interactions stabilisant ces structures.

**Indiquer** la technique ayant permis de déterminer la structure de cette kératinase.

**1.2.** La structure montre la présence de quatre domaines protéiques. **Proposer** une définition de la notion de domaine protéique.

### 2. Purification de la kératinase d'*Aspergillus oryzae* (10 points)

Une souche d'*Aspergillus oryzae* isolée de sédiments marins produit une kératinase extracellulaire de 60 kDa qui présente des caractéristiques singulières. L'étude approfondie de cette enzyme nécessite au préalable sa purification.

Une production de kératinase a été réalisée grâce à la mise en culture d'une souche d'*Aspergillus oryzae* dans 50 mL de milieu pendant 5 jours à 30 °C.

**2.1. Proposer** une méthode permettant d'obtenir un extrait brut de kératinase à partir de la culture d'*Aspergillus oryzae*.

Les protéines de l'extrait brut obtenu sont alors séparées par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. Le document 2 présente les résultats de cette première étape de purification.

**2.2. Indiquer** la fraction qui doit être retenue pour la suite de la purification. **Justifier** la réponse.

La dialyse réalisée permet le dessalage des différentes fractions.

**2.3. Présenter**, sous la forme d'un schéma annoté, le principe de la dialyse.

Les protéines de la fraction dialysée, notée « FA », sont ensuite séparées par une chromatographie gel-filtration sur colonne Sephadex-75. Le chromatogramme obtenu est présenté en document 3.

**2.4. Proposer** les numéros de fractions à collecter pour la suite de la purification. **Argumenter** le choix.

Les fractions retenues sont alors regroupées et constituent la fraction « FB » qui est soumise à une chromatographie échangeuse d'ions sur colonne DEAE Sephadex-A50. Le chromatogramme obtenu est présenté en document 4.

**2.5. Expliquer** la méthode d'élution des protéines. **Proposer** une autre méthode d'élution possible.

Les fractions d'intérêt sont regroupées et concentrées par ultrafiltration afin d'obtenir la fraction « FC ».

Un fournisseur de matériels de laboratoire commercialise différentes « unités de filtration » composées de membrane ayant des seuils de coupure de 3 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa et 100 kDa.

**2.6. Proposer** parmi ces « unités de filtration », celle dont le seuil de coupure permettra la concentration de l'enzyme d'intérêt. **Argumenter** ce choix.

Le document 5 regroupe les résultats de l'évaluation de deux des étapes de la purification de la kératinase.

**2.7.** A partir des données de ce document, **calculer** :

- le rendement global
- le taux de purification ou enrichissement global (équations aux grandeurs et aux valeurs numériques exigées).

**Commenter** les résultats du rendement et du taux de purification.

Le document 6 présente l'électrophorégramme (SDS-PAGE) obtenu pour contrôler la fraction purifiée de kératinase obtenue.

**2.8.** A partir du document 6, **conclure** sur la qualité de la purification et la structure de la kératinase d'*Aspergillus oryzae*.

### 3. Caractérisation de l'activité enzymatique de la kératinase d'*Aspergillus oryzae* (5 points)

La fraction « FC » est utilisée pour étudier l'influence de différents effecteurs sur l'activité de la kératinase. Le document 7 indique les activités relatives de la kératinase en présence de différentes molécules.

**3.1. Qualifier** la nature des effets de chaque molécule testée sur l'activité kératinolytique. **Proposer** le mode d'action de l'EDTA sur l'activité de l'enzyme, sachant que la kératinase nécessite une concentration minimale en ions calcium,

L'utilisation industrielle de la kératinase immobilisée d'*Aspergillus oryzae* est envisagée dans le cadre de la valorisation des déchets riches en kératine. Une étude préalable de sa variation d'activité après immobilisation sur différents supports est indispensable afin de choisir la technique la plus adaptée. Le document 8 présente les résultats obtenus pour différentes techniques d'immobilisation.

**3.2. Identifier** le support d'immobilisation le plus approprié. **Argumenter** la réponse.

Après immobilisation de la kératinase sur ce support, la valeur de la constante de Michaelis  $K_M$  apparente est supérieure à la valeur du  $K_M$  de la forme libre de l'enzyme.

**3.3. Rappeler** la signification du paramètre cinétique  $K_M$ . **Proposer** une hypothèse expliquant l'augmentation de la valeur apparente du  $K_M$  de l'enzyme immobilisée.

Une étude de l'influence de l'immobilisation sur les propriétés enzymatiques est réalisée. Les résultats de l'influence de l'immobilisation de la kératinase sur sa stabilité thermique sont présentés dans le document 9.

**3.4. Déterminer** la « température optimale » des formes libre et immobilisée de la kératinase.

Le document 9b montre que l'immobilisation de la kératinase augmente sa stabilité thermique.

**3.5. Argumenter** cette affirmation.

#### Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)  
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

## Document 1 : Crystal structure of keratinase from *Fervidobacterium pennivorans*



“ To understand the keratin degradation in detail, we describe the first crystal structure of a keratin-degrading enzyme (keratinase) from *Fervidobacterium pennivorans* as an immature form with propeptide (PD)-bound. The 1.7Å resolution crystal structure shows that the protease is composed of four domains: a catalytic domain (CD), two beta-sandwich domains (SDs), and the PD domain. ”

Kim, J.S., Kluskens, L.D., de Vos, W.M., Huber, R., van der Oost, J.

**Journal:** (2004) *J.Mol.Biol.* **335**: 787-797

## Document 2 : Fractional precipitation of keratinase from *A. oryzae* cultures using ammonium sulfate

Ammonium sulfate was added to 100 mL of the crude extract at different concentrations to obtain various fractions at 25, 35, 50, 65, 75, 85 and 95 % saturation. Each precipitate was dissolved in a certain amount of distilled water and dialyzed against distilled water at 4 °C overnight.

Protein content and keratinase activity were determined on each fraction.

| Agent concentration (%) | Ammonium sulfate |       |       |       |
|-------------------------|------------------|-------|-------|-------|
|                         | PC               | RP    | KA    | RA    |
| Crude                   | 62.80            | 100   | 26.35 | 100   |
| 25                      | 0.69             | 1.09  | 13.95 | 0.58  |
| 35                      | 0.96             | 1.53  | 20.83 | 1.21  |
| 50                      | 2.30             | 3.66  | 28.26 | 3.93  |
| 65                      | 3.40             | 5.41  | 28.82 | 5.92  |
| 75                      | 5.66             | 9.01  | 33.04 | 11.3  |
| 85                      | 7.38             | 11.75 | 88.07 | 39.27 |
| 95                      | 4.80             | 7.64  | 19.58 | 5.68  |
| Total                   | 25.19            | 40.09 |       | 67.89 |

$$RP = \frac{PC_{fraction}}{PC_{crude}} \times 100$$

$$RA = \frac{KA_{fraction}}{KA_{crude}} \times 100$$

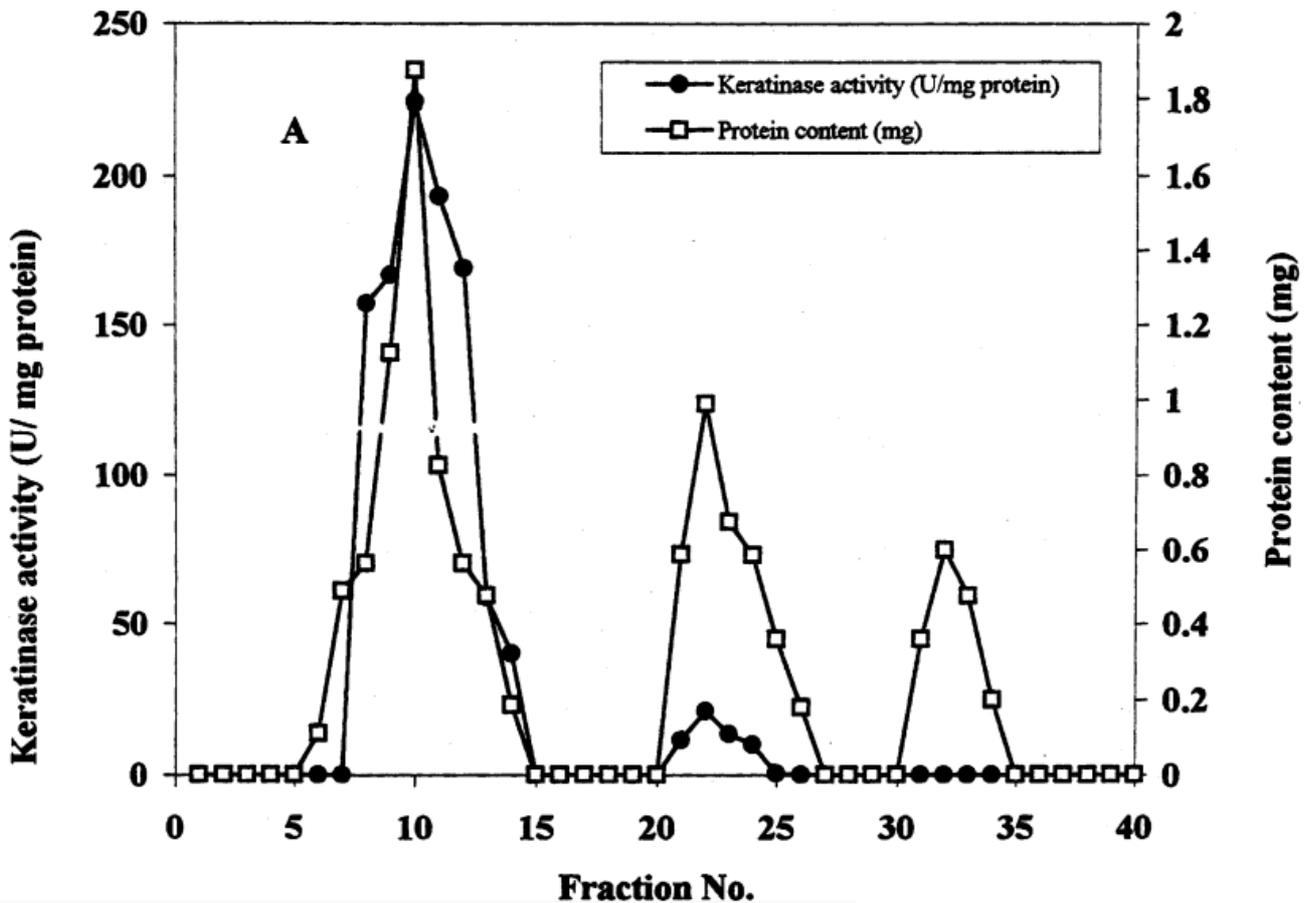
PC: protein content (mg), RP: relative protein (%), KA: keratinase activity (U/mg protein), RA: relative activity (%).

### Document 3 : Gel filtration in Sephadex G-75 of the partially purified keratinase preparation

A glass column was packed with Sephadex G-75 and equilibrated with 400 mL of 0,02 M phosphate buffer at pH 8,0. A flow rate of 60 mL/h was maintained.

A portion (10 mL) of the interest fraction was then applied to the Sephadex G-75 gel bed and protein was eluted with 0,02 M phosphate buffer. Protein content and enzyme activity in each fraction were measured.

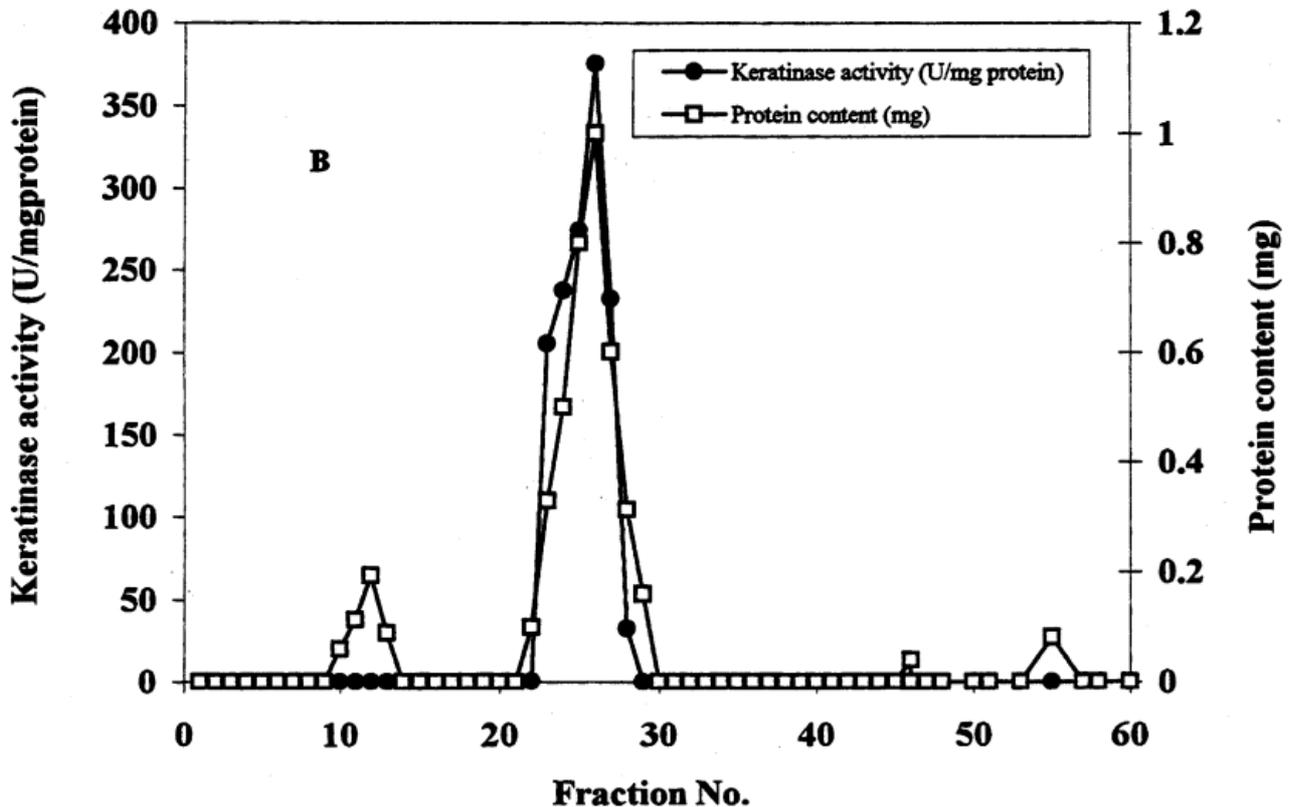
The fractions which showed highest protein and enzyme activity were collected and pooled.



### Document 4 : Ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of the major activity keratinase peak obtained by gel filtration

A column was packed with a slurry of diethylaminoethyl (DEAE) Sephadex A-50 and equilibrated with 200 mL of 0,02 M phosphate buffer at pH 8,0. The fraction resulting from Gel-filtration applied to the DEAE Sephadex A-50 column. Elution was performed with 0,05 M phosphate buffer pH 8,0, followed by 0,05 M NaCl in 0,05 M phosphate buffer at pH 8,0, at a flow rate of 60 mL/h.

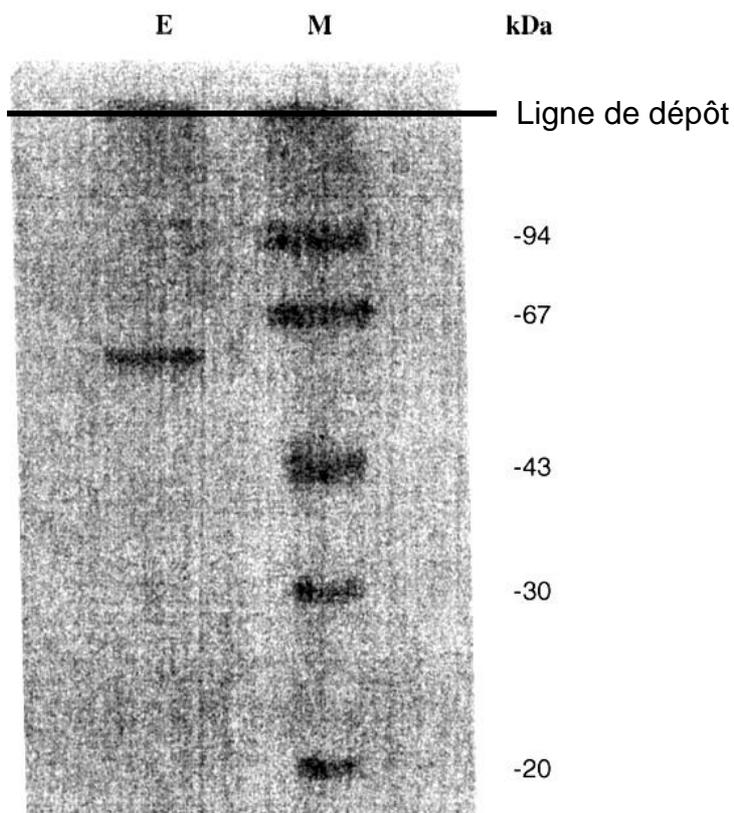
Fractions (5 mL) were collected, protein content and keratinase activity for each fraction were monitored.



### Document 5 : Évaluation de la purification de la kératinase d'*Aspergillus oryzae*

| Fraction        | Masse de protéines (en mg) | Activité catalytique (en U) |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| Extrait brut    | 314                        | 8275                        |
| Fraction « FC » | 9,09                       | 2760                        |

**Document 6 : Photographie du résultat de la SDS-PAGE (en présence de 2-mercaptoéthanol) de la fraction « FC » colorée au bleu de Coomassie**



**Légende :**

E : fraction « FC »  
M : Marqueur de taille

**Document 7 : Influence d'effecteurs sur l'activité enzymatique de la kératinase**

| Molécule testée   | Activité kératinolytique relative (en %) |
|-------------------|--|
| aucune            | 100,0                                    |
| CaCl <sub>2</sub> | 170,1                                    |
| KCl               | 117,3                                    |
| HgCl <sub>2</sub> | 71,2                                     |
| EDTA *            | 24,7                                     |

\* EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

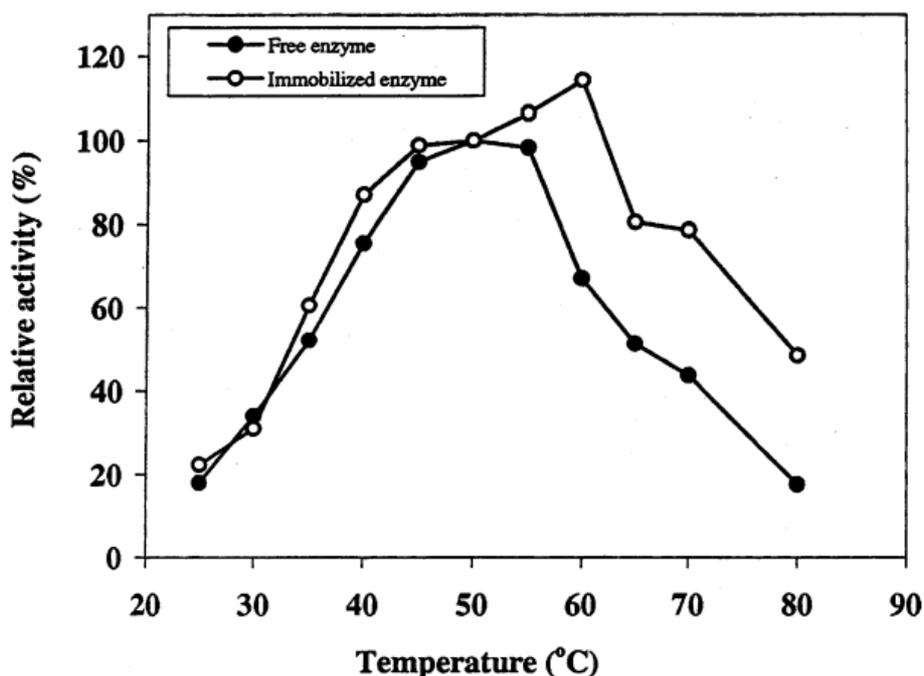
## Document 8 : Caractérisation de l'immobilisation de la kératinase d'*Aspergillus oryzae* sur différents supports

L'immobilisation sur les différents supports a été réalisée avec la même quantité d'enzymes initiale.

| Support d'immobilisation | Type d'immobilisation | Rendement d'immobilisation (en %) | Activité spécifique de la kératinase immobilisée (en U.mg <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|---|
| Gel de silice            | adsorption            | 64,2                              | 126,97  |
| Billes de verre fritté   | adsorption            | 63,6                              | 163,33  |
| Chitine                  | liaison covalente     | 59,2                              | 111,76  |
| DEAE-cellulose           | adsorption ionique    | 56,3                              | 104,29  |
| Billes d'alginate        | inclusion             | 43,0                              | 64,00   |

## Document 9 : Influence de l'immobilisation sur l'activité enzymatique de la kératinase d'*Aspergillus oryzae*

### 9a. Étude de l'activité des formes libre et immobilisée de la kératinase d'*Aspergillus oryzae* en fonction de la température



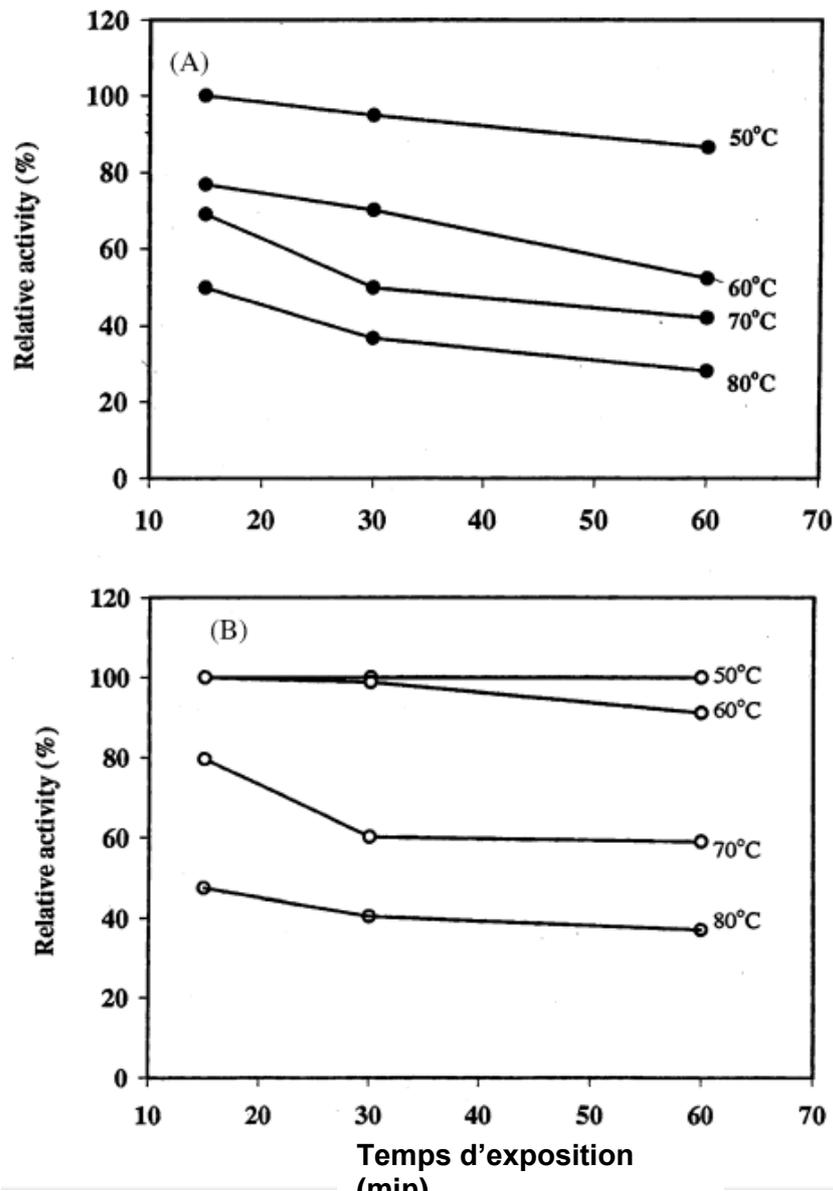
## 9b. Comparaison de la stabilité thermique des formes libre et immobilisée de la kératinase d'*A. oryzae*

L'étude de la stabilité thermique des formes libre et immobilisée de la kératinase a été réalisée au pH optimum de chaque forme. Des solutions enzymatiques identiques préparées en tampon phosphate ont été préchauffées séparément à différentes températures (50, 60, 70 et 80 °C) pendant des temps variables d'incubation (15, 30 et 60 min).

L'activité résiduelle a ensuite été déterminée pour chaque échantillon, après ajout du substrat, dans des conditions optimales.

(A) : enzyme libre

(B) : enzyme immobilisée



Aida M. Farag, Maha A. Hassan

Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*

**Journal:** (2004) *Enzyme and Microbial Technology* **34**: 85-93

## 2016 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée 2 h – coefficient 1

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

### La lutte biologique

L'Organisation Internationale de Lutte Biologique et Intégrée définit la lutte biologique comme « l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs ».

La lutte biologique est un procédé biotechnologique car elle est basée sur l'exploitation par l'être humain d'une relation naturelle entre deux êtres vivants.

La cible est l'organisme nuisible que l'être humain souhaite contrôler. Il peut s'agir d'un ravageur d'une plante cultivée, d'une mauvaise herbe ou encore d'un parasite du bétail.

L'agent de lutte est, le plus souvent, un parasite, un prédateur ou un agent pathogène de la cible, qui la tue ou limite son développement.

Pour protéger ses cultures, l'agriculteur peut ainsi recourir à des moyens biologiques. La lutte biologique est donc une alternative à l'utilisation de produits chimiques phytosanitaires, polluants pour l'environnement, dangereux pour le consommateur comme pour l'agriculteur et dans certains cas, peu efficaces.

L'objet de cette étude est de présenter trois agents de la lutte biologique.

#### 1. Étude de *Trichoderma* dans la lutte biologique contre *Botrytis* (6 points)

Le genre *Trichoderma* regroupe un ensemble de champignons saprophytes qui se retrouvent couramment dans le sol. *Trichoderma* a la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action.

La moisissure *Botrytis* est un champignon phytopathogène capable de parasiter plus de 200 végétaux différents. *Botrytis cinerea* est responsable de la pourriture grise, notamment des vignes et des fraisiers. *Botrytis fabae* est l'agent de la maladie des tâches de chocolat chez les fèves.

Le document 1 présente un schéma d'observation microscopique de *Botrytis cinerea*.

**1.1 Reporter** sur la copie les numéros 1 à 4 et **indiquer** leur signification.

**1.2 Présenter** la démarche d'identification d'une moisissure.

La composition du milieu utilisé pour la culture de *Botrytis cinerea* est donnée dans le document 2.

**1.3 Expliquer** le rôle des constituants soulignés. **Déduire** de cette composition les types trophiques et une des conditions optimales de culture de la moisissure.

Trois espèces de *Trichoderma*, sont comparées *in vitro* dans la lutte contre *Botrytis*.

La capacité de chaque souche de *Trichoderma* à réduire la croissance de *Botrytis* est évaluée par un test de confrontation directe (document 3a).

**1.4** A partir du document 3a, **analyser** l'effet des trois souches de *Trichoderma* sur la croissance du mycélium de *Botrytis*. **Proposer** une hypothèse sur le mode d'action des *Trichoderma*.

Le document 3b présente l'effet de la souche *Trichoderma viride* sur la sporulation de *Botrytis cinerea* et *Botrytis fabae*.

**1.5 Interpréter** les résultats de l'expérience. En **déduire** le mode d'action de *Trichoderma* en lien avec le rôle de la spore asexuée chez la moisissure.

## 2. Le bioinsecticide de *Bacillus thuringiensis* (9 points)

*Bacillus thuringiensis* produit une toxine qui est un cristal protéique aux propriétés insecticides sur les lépidoptères, coléoptères et diptères, connue depuis 1920.

Les larves d'insectes (chenilles) ingèrent un complexe formé de cristaux protéiques et de spores de la bactérie entraînant leur mort.

Aujourd'hui, les produits à base de spores de *Bacillus thuringiensis* font partie des insecticides les plus couramment utilisés dans le monde. Ils représentent plus de 50 % du marché des bio-insecticides. Ils sont fabriqués à une échelle industrielle dans des fermenteurs par des procédés de culture semi-continue (fed-batch) qui permettent d'obtenir les meilleurs rendements de production en cristaux protéiques toxiques.

**2.1 Présenter** les conditions environnementales qui conduisent au processus de sporulation.

Le document 4 présente les résultats d'une étude cinétique de la production de cristaux toxiques en fermenteur de laboratoire par un procédé en milieu non renouvelé (batch).

**2.2 Identifier** la phase de croissance au cours de laquelle a lieu la production de toxine. **Indiquer** le phénomène physiologique qui se produit simultanément. **Argumenter** la réponse.

**2.3** A partir du document 4, **démontrer** que une bonne oxygénation du milieu est un facteur déterminant pour la croissance de *Bacillus thuringiensis* et la production de toxine.

**2.4 Proposer** une hypothèse expliquant la réoxygénation du milieu après 30 heures.

L'étude cinétique du document 4 a été opérée avec un coefficient volumétrique de transfert d'oxygène,  $K_{La}$ , de  $13,3 \text{ h}^{-1}$ . Dans un fermenteur, plusieurs paramètres peuvent affecter le  $K_{La}$ .

**2.5 Présenter** deux paramètres qui influencent l'oxygénation d'un milieu de culture.

Le glucose est le substrat préférentiel pour la croissance de *Bacillus thuringiensis*. Cependant, de trop fortes concentrations en glucose inhibent la production de toxine et nécessitent le recours à un procédé en fed-batch.

**2.6 Représenter** schématiquement le procédé de fermentation par fed-batch. **Expliquer** l'intérêt d'un procédé de fermentation en fed-batch pour éviter le problème de la concentration en glucose.

Afin de valoriser une source de glucides, le son de blé, disponible à proximité du site de l'usine de production de la toxine, un industriel réalise une étude comparative entre plusieurs milieux de culture. Le document 5 présente un tableau de synthèse de cette étude.

**2.7** A partir des données du document 5, **calculer** le rendement de conversion du substrat glucidique en protéines toxiques,  $R_{P/S}$  dans le milieu au son de blé. **Argumenter** le choix du milieu le mieux adapté à la production de la toxine bio-insecticide.

### 3. Une nouvelle piste dans la lutte biologique : *Photorhabdus luminescens* (3 points)

*Photorhabdus luminescens* est une protéobactérie appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle vit en symbiose à l'intérieur du tube digestif de son hôte, un ver nématode. Elle est bioluminescente et pathogène pour certains insectes. Son génome vient d'être entièrement séquencé par une équipe de l'Institut Pasteur. Son analyse révèle toute une variété de gènes, codant pour des toxines entomopathogènes, qui pourront être utiles à la lutte contre les insectes nuisibles.

*Photorhabdus luminescens* est une bactérie symbiotique.

**3.1** A partir du document 6, **dégager** les caractéristiques de la relation symbiotique entre la bactérie *Photorhabdus luminescens* et son ver nématode hôte.

*Photorhabdus luminescens* est une bactérie bioluminescente.

*Photorhabdus* is the only terrestrial bacteria known to exhibit bioluminescence. They luminesce only during their mutualistic phase, inside the insect cadaver. What use is this? There is evidence suggesting that this may be a non-functional trait, recently acquired by horizontal gene transfer from *Vibrio*.

March 30, 2009 in Pathogens, Symbioses, Teachers Corner

**3.2** **Citer** les différents modes de transferts horizontaux bactériens.

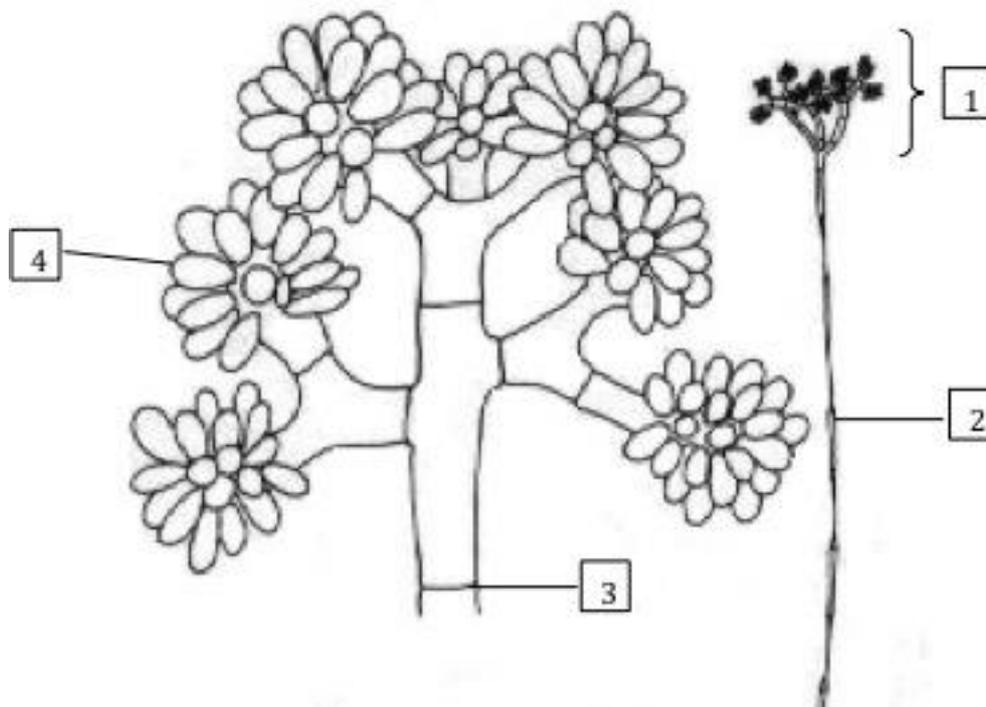
*Photorhabdus luminescens* est une bactérie entomopathogène. Un gène de *Photorhabdus luminescens* codant pour l'une des toxines entomopathogènes constitue un gène d'intérêt qui peut être introduit dans une plante afin de la rendre résistante à l'insecte cible de la toxine.

**3.3** **Présenter** la méthode utilisant les propriétés naturelles de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* afin d'obtenir cette plante génétiquement modifiée.

#### **Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)**

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

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

**Document 1 : Schéma d'observation microscopique de *Botrytis cinerea***

<http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Botrytis.html>

**Document 2 : Composition du milieu DRBC**

La gélose Dichloran Rose-Bengale Chloramphénicol est un milieu sélectif pour l'isolement et la numération des levures et moisissures présentes dans les aliments avariés.

| <b>COMPOSITION</b>                       | <b>(g·L<sup>-1</sup>)</b> |
|--|---------------------------|
| <u>Peptones</u>                          | 5,0                       |
| Glucose                                  | 10,0                      |
| <u>Dihydrogénophosphate de potassium</u> | 1,0                       |
| Sulfate de magnésium                     | 0,5                       |
| Dichloran                                | 0,002                     |
| Rose-bengale                             | 0,025                     |
| Agar                                     | 15,0                      |
| pH 5,6 ± 0,2                             |                           |
| <u>Chloramphénicol</u>                   | 50 mg                     |

King D.A. Jr., Hocking A.D. and Pitt J.I. (1979) *J. Appl. & Environ. Microbiol.*, 37. 959-964.

### Document 3 : Direct confrontation test

Confrontations are performed *in vitro* using the method of Patel and Brown (1969). In Petri dishes (90 mm diameter), containing 15 ml of PDA medium, two agar slices (6 mm in diameter) are placed 5 cm from each other (Fig. 1). One with the strain of *Trichoderma* and the other with the pathogen. Incubation is carried out under alternating 12 hours light and 12 hours dark at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  for 7 days. Each treatment is replicated 4 times.

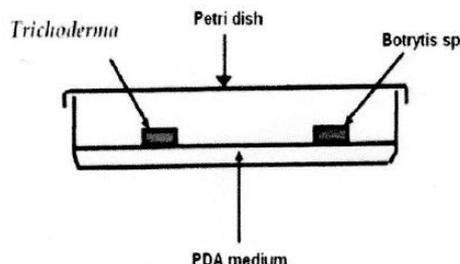


Fig. 1: Confrontation between *Botrytis* and *Trichoderma* strain by direct contact in PDA medium.

#### 3a Evaluation of mycelial growth:

Mycelial growth of *Botrytis* was evaluated every 24 hours during 7 days by measuring the radius of the parasite on the side of the antagonist. Control is realized without *Trichoderma*.

Table 1 : Results of *Trichoderma* species effect on mycelial growth of *Botrytis* isolates.

| Confronted isolates                | Mycelial growth after 7 days (mm) |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| Control                            | 39.81                             |
| <i>Trichoderma viride</i>          | 26.93                             |
| <i>Trichoderma harzianum</i>       | 12.25                             |
| <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | 11.87                             |

#### 3b Evaluation of sporulation:

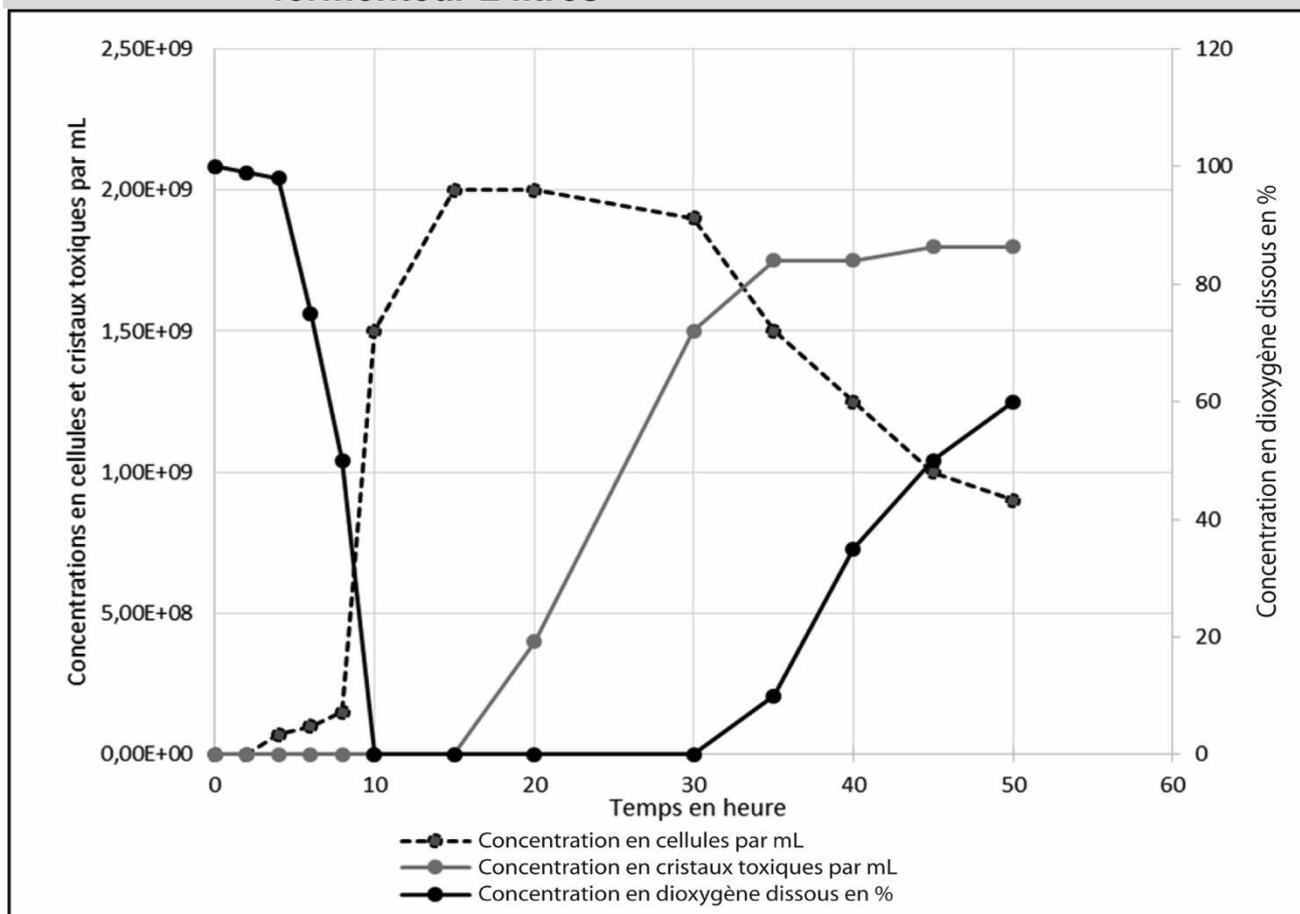
Assessment of sporulation is performed according to the principle of the method used by Maslouhy (1989). Every box sporulation is evaluated on the 12th day. Using a pastry cutter disinfected, we collected 10 slices (6 mm in diameter) on the periphery of the colonies of *Botrytis* side of the antagonist. These slices are then placed in 10 ml of an acetic acid solution N/10. Heating ( $45-50^\circ\text{C}$ ) for several minutes freeing the conidia. The concentration expressed in number of spores per ml was estimated using the Malassez cell. Witnesses are realized by taking slices to the periphery of the colonies of *Botrytis* inoculated alone.

Table 2 : Results of *Trichoderma viride* effect on sporulation of *Botrytis* isolates.

| Confronted isolates        | Mycelial growth (conidia/ml) |
|----------------------------|------------------------------|
| Control                    | 28632                        |
| <i>Botrytis cinerea</i> C1 | 28548                        |
| <i>Botrytis cinerea</i> C3 | 25572                        |
| <i>Botrytis fabae</i> F3   | 8249                         |
| <i>Botrytis fabae</i> F2   | 4354                         |

D'après Antagonism of three *Trichoderma* species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of chocolate spot of faba bean University of Mostaganem, Algeria

### Document 4: Étude cinétique de la production de cristaux toxiques en fermenteur 2 litres



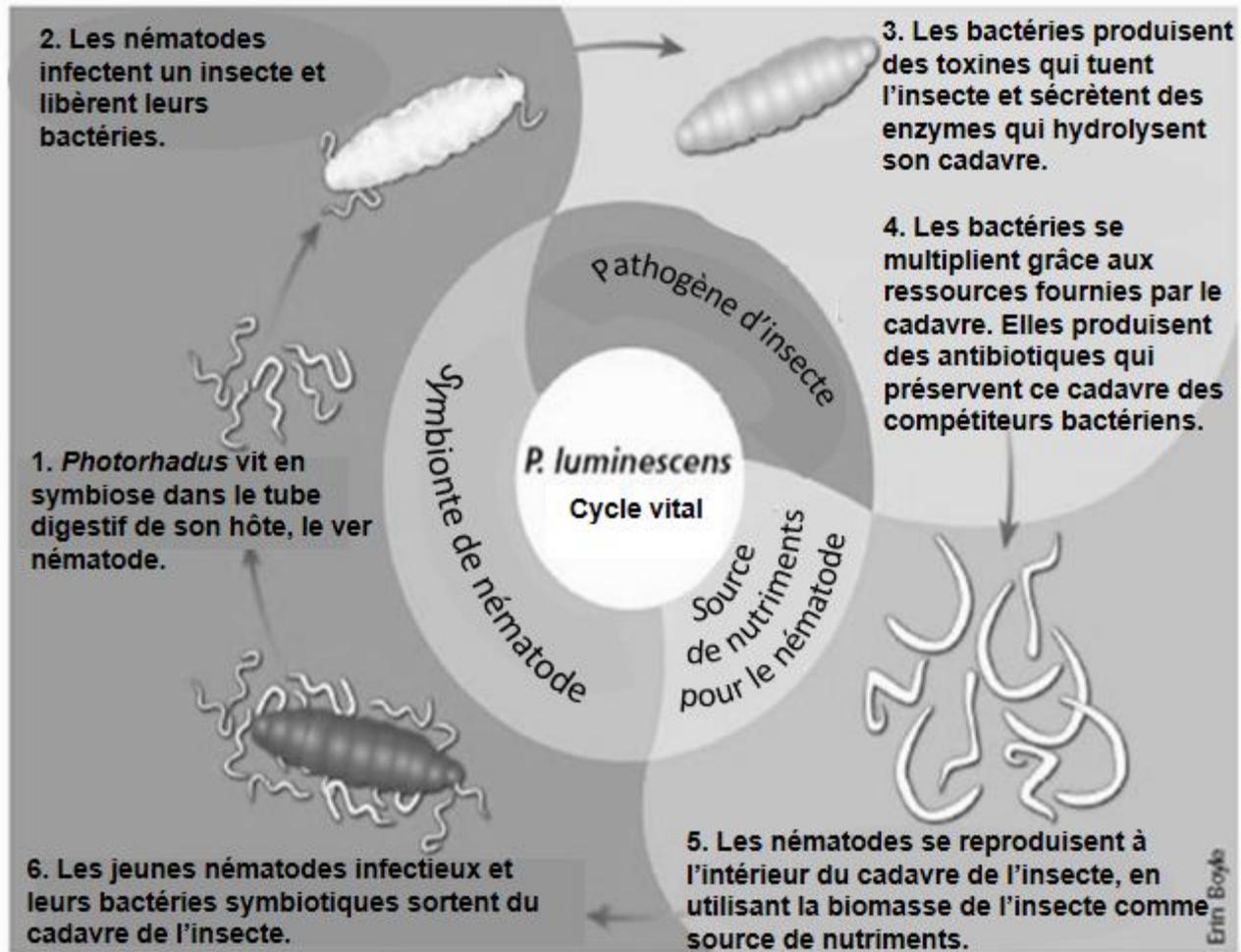
D'après Jihane Rahbani, Institut National polytechnique de Toulouse, février 2015

### Document 5: Étude comparative de plusieurs milieux de culture pour la production industrielle de bioinsecticide en batch

| Milieux   | Milieu de Anderson<br>10 g·L <sup>-1</sup> | Milieu de Anderson<br>20 g·L <sup>-1</sup> | Milieu semi-synthétique   | Milieu au son de blé |
|---|--|--|---------------------------|----------------------|
| Substrat glucidique initial en g·L <sup>-1</sup>  | Glucose (10)                               | Glucose (20)                               | Glucose (5)<br>Amidon (5) | Son de blé (30)      |
| Protéines toxiques finales en g·L <sup>-1</sup>   | 1,00                                       | 1,56                                       | 1,56                      | 2,40                 |
| Glucose (ou équivalent) consommé en g·L <sup>-1</sup>                                   | 9,91                                       | 19,94                                      | 8,95                      | 18,00                |
| Rendement (R <sub>P/S</sub> ) en mg de protéines toxiques par g de glucose              | 100,8                                      | 78,2                                       | 174,5                     |                      |
| Productivité volumique horaire totale en toxines en mg·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> | 30,3                                       | 32,5                                       | 43,4                      | 50,0                 |
| Coût pour 1 L de milieu en dollar   | 1,8  | 2,0  | 3,9                       | 0,006                |

D'après Jihane Rahbani, Institut National polytechnique de Toulouse, février 2015

## Document 6 : Cycle vital de *Photorhabdus luminescens*



D'après : *The representation of complex life cycle of Photorhabdus luminescens* (Williamson et al. 2003, *Nature*, 21, 1294-1295) et <http://www.nosopharm.com/fr/xenorhabdus-photorhabdus>

---

## 2016 - U42 : Biologie cellulaire

---

Durée 2 h – coefficient 1

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

### Étude d'une maladie génétique : la dystrophie musculaire de Duchenne

Les dystrophies musculaires sont un groupe de maladies génétiques qui se caractérisent par une faiblesse et une dégénérescence progressive des muscles du corps.

Les muscles touchés sont principalement les muscles squelettiques, conduisant notamment à une perte progressive de la marche.

La plus connue et la plus fréquente de ces pathologies est la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou myopathie de Duchenne.

Elle est due à une mutation du gène qui intervient dans la synthèse d'une protéine cytosquelettique appelée dystrophine.

Il n'existe pas encore de traitement pour la dystrophie musculaire de Duchenne. Cependant, plusieurs approches scientifiques sont tentées afin de réduire les symptômes et guérir les patients.

#### 1. Étude de la transmission de la dystrophie musculaire de Duchenne (5 points)

L'arbre généalogique d'une famille atteinte de la DMD est présenté sur le document 1.

Un allèle a été identifié comme responsable de la maladie.

- 1.1 **Proposer** une définition du terme « allèle » et **déduire** de l'analyse du document 1 le caractère dominant ou récessif de cet allèle et le type d'hérédité.
- 1.2 **Ecrire** les génotypes des individus III 4 et III 5. A l'aide d'un échiquier de croisement, **déterminer** la probabilité pour ces individus d'avoir un nouvel enfant malade, dans le cas d'un garçon et dans le cas d'une fille.

La reproduction sexuée, grâce à la méiose et à la fécondation, aboutit à une immense diversité génétique entre les individus.

- 1.3 **Repositionner** les photographies 1 à 8 du document 2 dans l'ordre chronologique de la méiose et **identifier** ces différents stades. **Comparer** la cellule initiale et les cellules formées à l'issue de la méiose.

#### 2. Atteintes cellulaires et tissulaires liées à l'absence de dystrophine (4 points)

La dystrophine est une très grande protéine (427 kDa) située sur la face cytoplasmique du sarcolemme (membrane plasmique). Elle est associée à un groupe de glycoprotéines qui intervient dans le maintien de l'intégrité membranaire des fibres musculaires, ou cellules musculaires (document 3).

La liaison des fibres musculaires à la matrice extracellulaire est indispensable au fonctionnement normal du muscle.

- 2.1 **Indiquer** deux composants majeurs de la matrice extracellulaire.
- 2.2 A l'aide du document 3, **expliquer** les conséquences de l'absence de dystrophine dans le muscle squelettique.

Dans un muscle squelettique sain, les fibres musculaires, cellules multinucléées, sont accolées et séparées par une très fine couche de tissu conjonctif.

Des coupes histologiques transversales de muscle squelettique, sain et malade (DMD) sont observées au microscope photonique après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (document 4).

**2.3** A l'aide d'un schéma annoté, **présenter** le principe de fonctionnement du microscope photonique.

**2.4 Comparer** les photographies du document 4. **En déduire** les aspects cellulaire et tissulaire caractérisant la dégénérescence musculaire d'un patient souffrant de DMD.

### **3. Modèles animaux expérimentaux : exemple de la souris *mdx* (4 points)**

Le modèle murin est indispensable pour les études physiopathologiques et la mise au point de traitements.

La souris *mdx* possède une mutation du gène codant la dystrophine. Le produit du gène muté de la dystrophine est tronqué et ne possède pas la capacité fonctionnelle de s'attacher au sarcolemme.

Un laboratoire a découvert récemment les effets bénéfiques de certaines laminines, protéines de la matrice extracellulaire. Elles empêcheraient le développement de la maladie chez la souris *mdx* et pourraient alors être utilisées comme agent thérapeutique contre la DMD. La laminine-111 est l'isoforme la plus étudiée. Elle est exprimée durant le développement embryonnaire mais est absente dans le muscle squelettique sain ou pathologique.

Les documents 5 et 6 présentent les protocoles utilisés et les résultats obtenus par ce laboratoire.

**3.1** En utilisant les données du document 5, **réaliser** un schéma annoté de l'édifice moléculaire correspondant à une détection positive de la dystrophine.

**3.2** À l'aide des résultats du document 5, **argumenter** que la souris *mdx* est bien un modèle de la myopathie étudié.

**3.3** À l'aide des documents 3 et 5, **déterminer** la localisation de la dystrophine et de la laminine.

**3.4 Analyser** les résultats du document 6 et **en déduire** l'effet de la laminine sur la pathologie DMD.

### **4. Vers de nouvelles thérapies (5 points)**

La thérapie cellulaire est l'une des stratégies qui permettrait de rétablir l'expression de dystrophine. Il s'agit de greffer des cellules myogéniques saines à l'intérieur d'un muscle dystrophique pour que celles-ci fusionnent avec les fibres environnantes et permettent une nouvelle production de dystrophine.

Cependant, la transplantation de cellules myogéniques ne s'effectue pas sans obstacles. Les cellules injectées meurent rapidement et font face à un rejet immunitaire impliquant les lymphocytes T cytotoxiques.

Les mécanismes de cytotoxicité que possède le lymphocyte T cytotoxique (LTc) aboutissent tous à l'activation de l'apoptose.

**4.1 Expliquer** le rôle de la perforine produite par le LTc dans cette cytotoxicité.

Les facteurs de croissance représentent des candidats potentiels pour diminuer certains des problèmes liés à la transplantation de cellules myogéniques, puisqu'ils peuvent moduler la survie des cellules transplantées.

Certains scientifiques ont montré qu'un peptide issu de la maturation de l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), appelé peptide MGF, joue un rôle dans la prolifération de cellules transplantées murines et humaines.

Des injections intramusculaires du peptide MGF ont été réalisées suite à la greffe de cellules myogéniques dans le tibia antérieur de souris SCID (« severe combined immunodeficiency », souris sans lymphocytes T et B). Le protocole et les résultats obtenus sont présentés dans le document 7.

- 4.2 Expliquer** l'intérêt de l'ajout du SVF et du mélange penicilline/streptomycine dans le milieu de culture des cellules myogéniques, ainsi que celui d'utiliser la souris SCID dans cette expérimentation.
- 4.3 Expliquer** la réalisation du contrôle et **en déduire** son rôle.
- 4.4 Analyser** les résultats obtenus. **En déduire** l'effet du peptide MGF dans la greffe des cellules myogéniques.

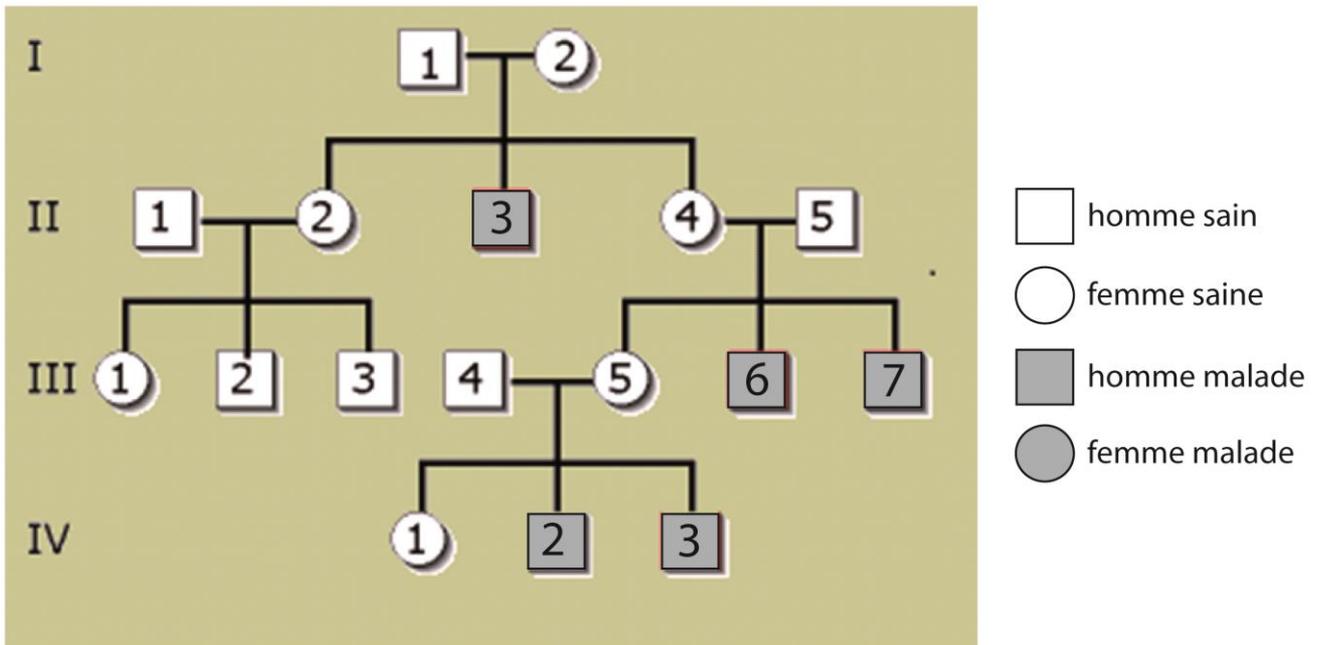
**Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)**

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

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

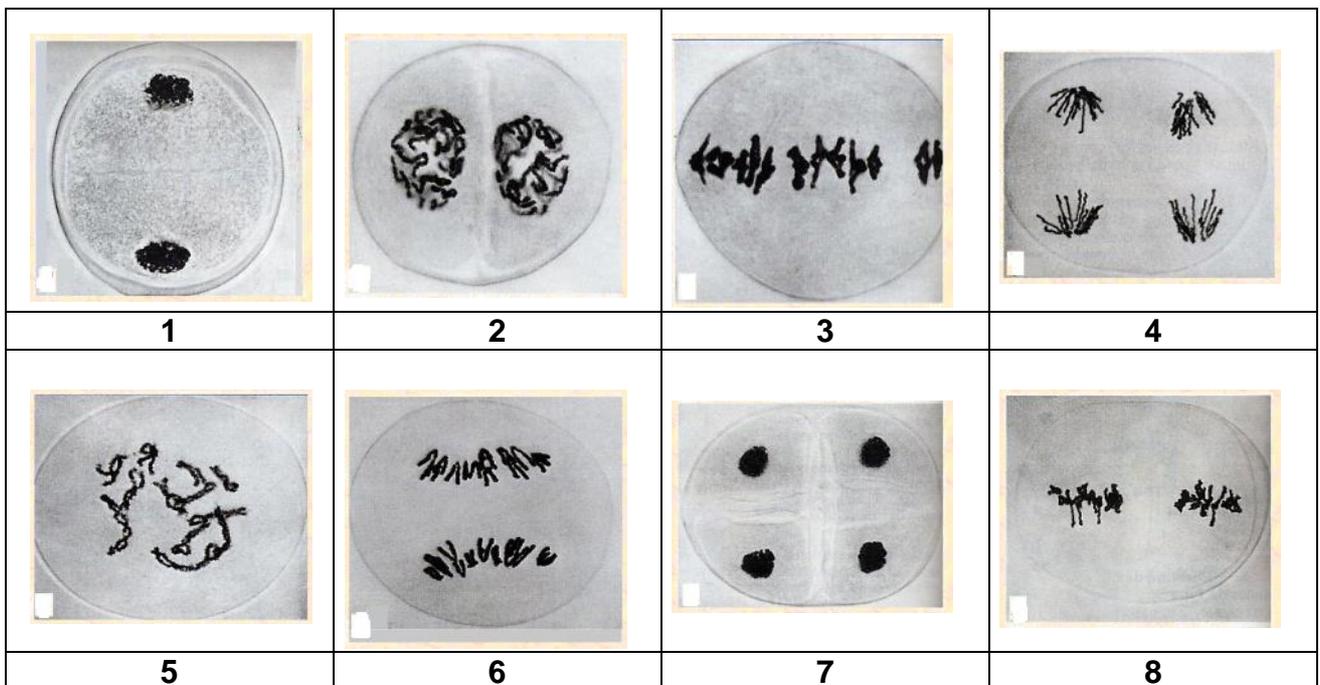
**Document 1 : Arbre généalogique d'une famille atteinte de la DMD**

Disponible sur : <http://svt.tice.ac-orleans-tours.fr> (consulté le 18 novembre 2016).



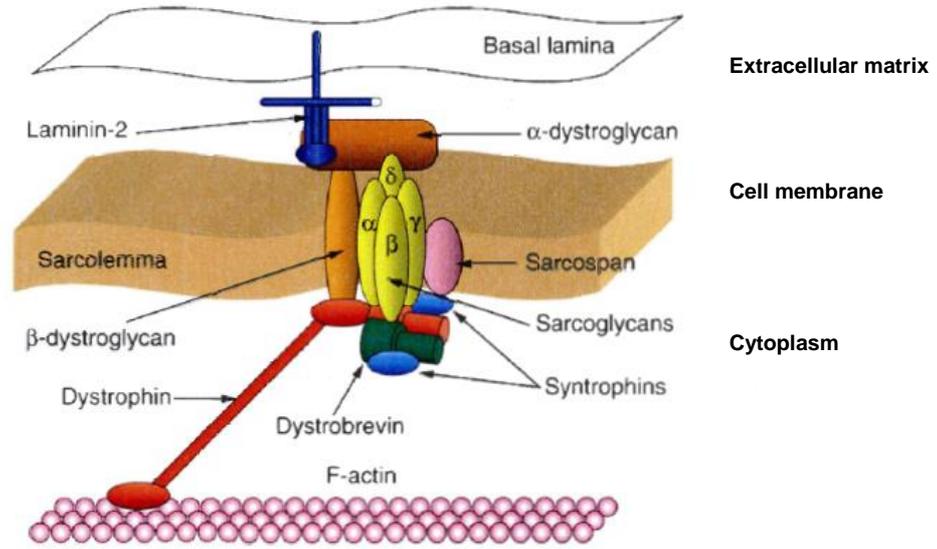
**Document 2 : Différents stades de la méiose chez une plante à fleurs**

Disponible sur : <http://www.incertae-sedis.fr> (consulté le 18 novembre 2016).

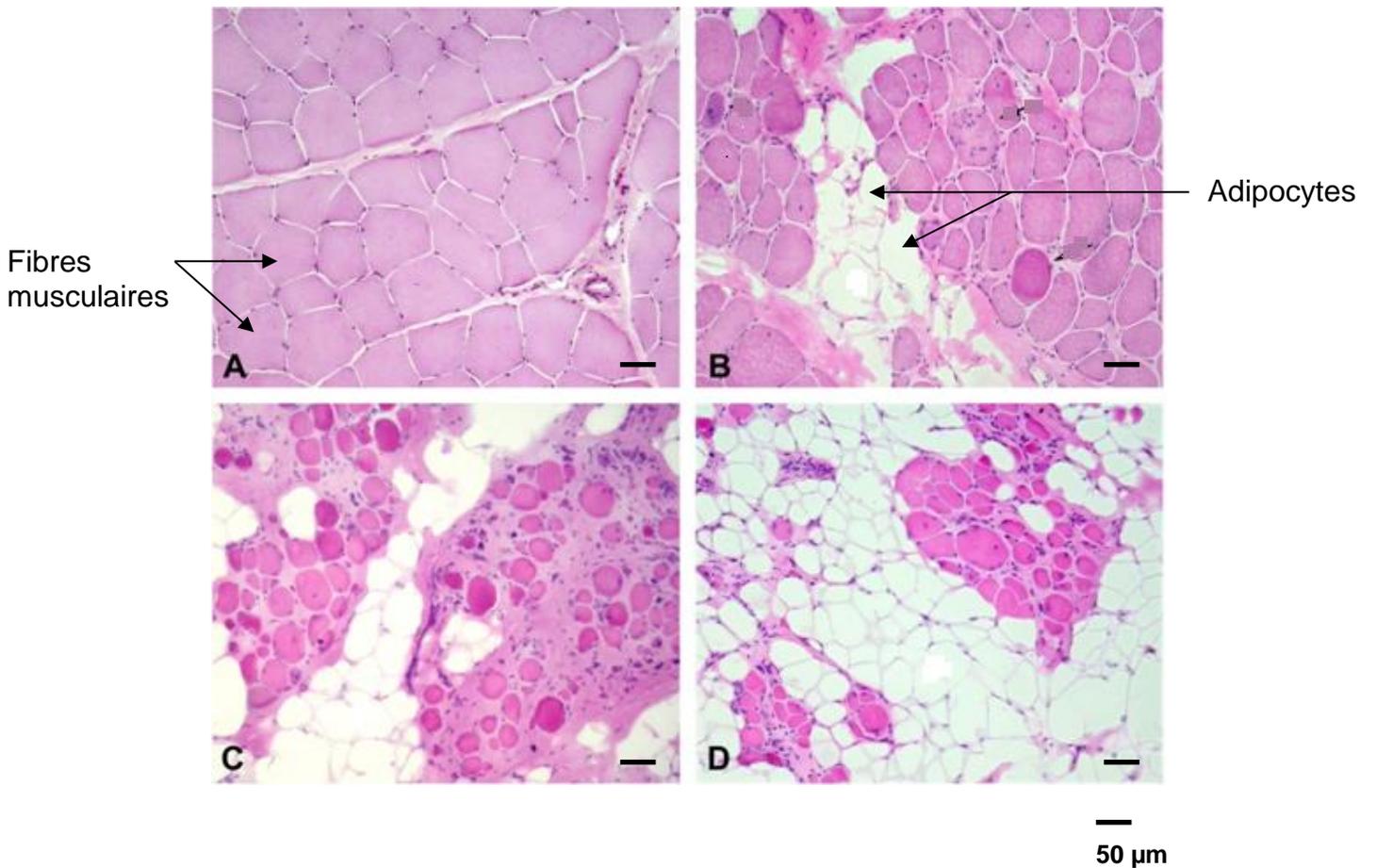


**Document 3 : Dystrophine et protéines associées dans le muscle squelettique**

(Marie-Anne Forest, *Mémoire*, 2009, Faculté des études supérieures de l'Université Laval)



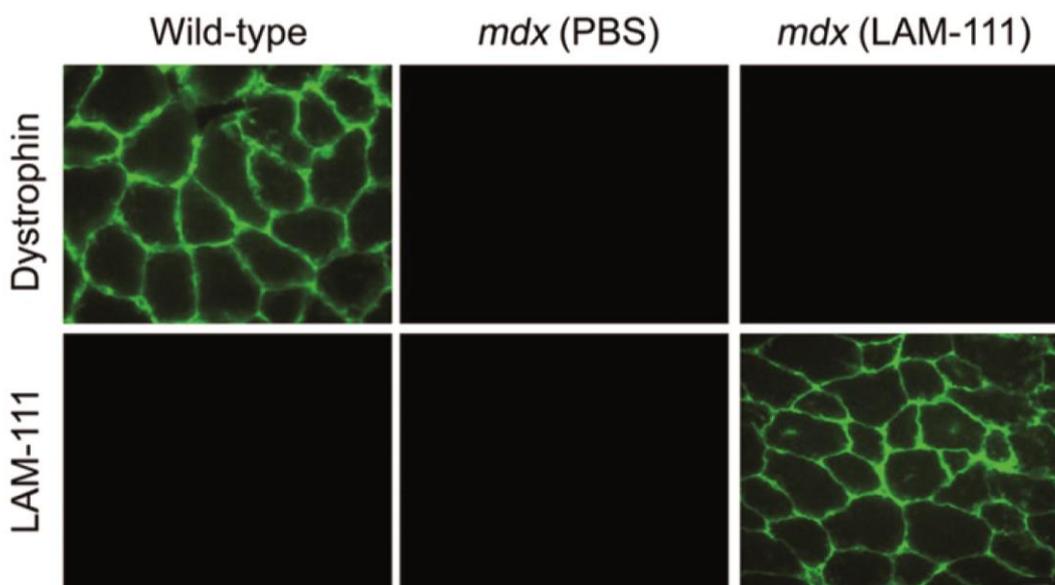
**Document 4 : Histologie d'un muscle squelettique sain (A) et d'un muscle squelettique à un stade de plus en plus avancé de la maladie (DMD) (B, C et D).**



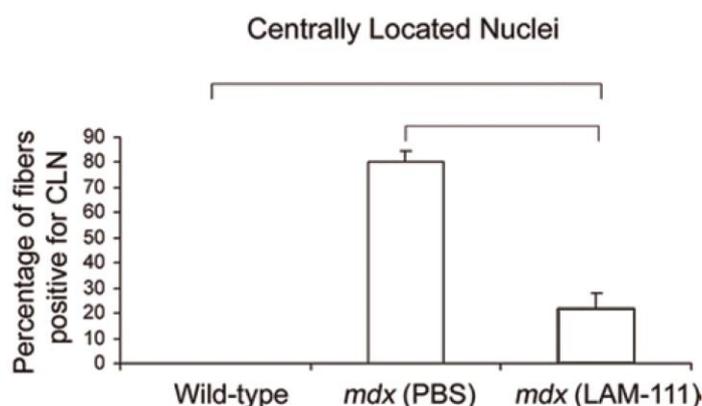
## Document 5 : Immunofluorescence of the TA muscles of control and laminin-111-treated mice (LAM-111)

(Rooney J E et al. *PNAS*, 2009;106:7991-7996)

The left tibialis anterior (TA) muscles of 10-day-old *mdx* mice were injected with 100  $\mu$ L of 100 nM laminin-111, whereas the right TA muscles were injected with 100  $\mu$ L of PBS and served as the contralateral control. At 5 weeks of age, mice were killed, and the TA muscles were harvested. Ten- $\mu$ m sections were cut using a Leica CM1850 cryostat and placed onto microscope slides. The laminin was detected with a 1:500 dilution of the rat monoclonal antibody MAB1903 followed by a 1:1,000 dilution of FITC-conjugated anti-rat secondary antibody. The dystrophin was detected with the rabbit anti-mouse dystrophin antibody and a 1:500 dilution of FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody. Fluorescence was observed with a Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescent microscope and images were captured with a Zeiss AxioCam HRc digital camera and Axiovision software.



## Document 6 : Effets de la laminine sur la pathologie chez la souris *mdx*



Centrally located nuclei (CLN), characteristic of necrosis myofiber, were counted at 630 $\times$  magnification by bright-field microscopy. In normal muscles, the myofiber nuclei are located at the periphery of the cells. The number of central nuclei per muscle fiber was determined by counting 700 muscle fibers for tibialis anterior muscle per animal. At least five animals from each genotype (wild-type, *mdx*) were analyzed.

## Document 7 : Injections intramusculaires du peptide MGF suivant la greffe de cellules myogéniques

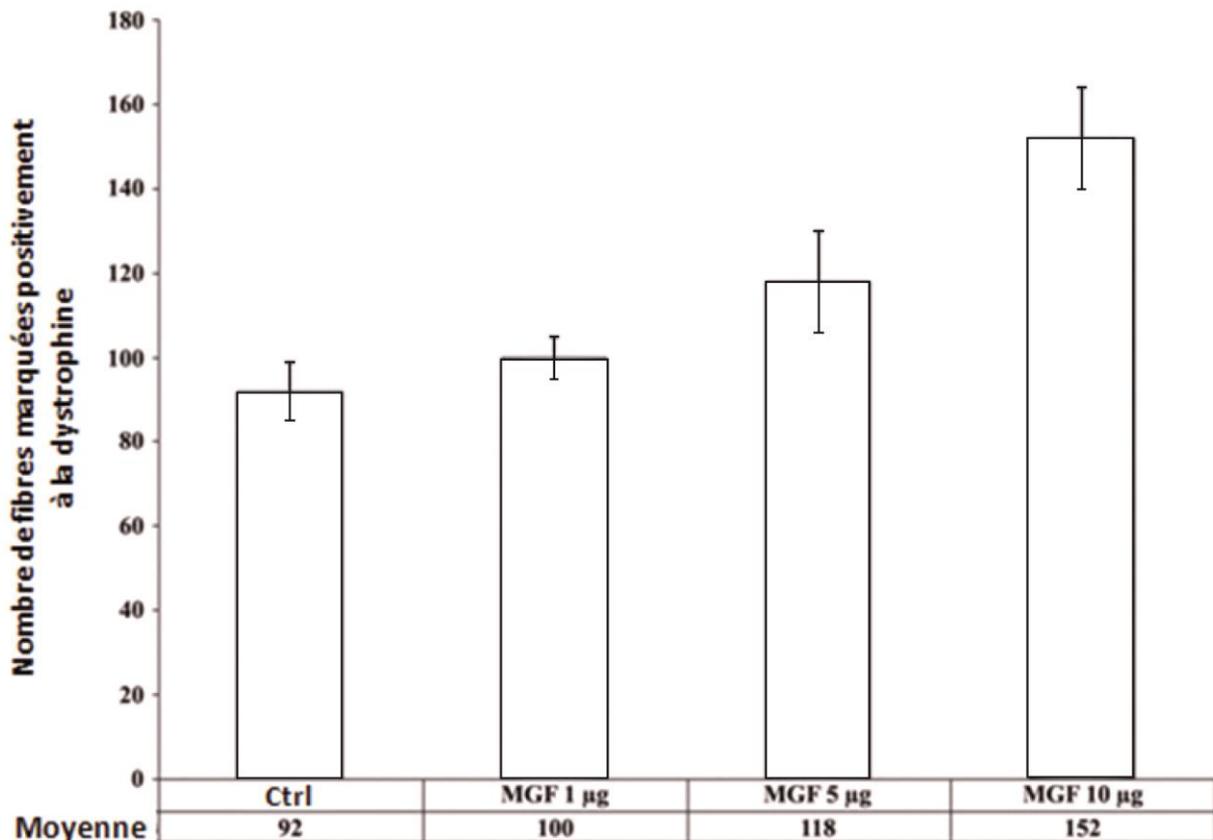
(Jean-Christophe Dominique, *Mémoire*, 2009, Faculté des études supérieures de l'Université Laval)

Les cellules myogéniques humaines sont obtenues à partir d'une biopsie post-mortem d'un bébé de 13 mois. Elles sont cultivées dans du milieu pour cellules humaines MB-1 (supplémenté par 15 % de SVF (sérum de veau foetal), 10 ng/ml de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et 1 % de pénicilline/streptomycine). Les cellules sont cultivées en bas passages (toujours inférieur à 5) et gardées à confluence égale ou inférieure à 80%. Une immunocytochimie contre la desmine, un des marqueurs des cellules myogéniques, révélait un taux positif de 85 à 90 % confirmant la présence en majorité de cellules myogéniques.

$5 \times 10^5$  cellules sont injectées dans le *Tibialis anterior* de souris SCID. Les muscles greffés sont par la suite traités par des injections intramusculaires de MGF à différentes concentrations aux jours 3, 7, 14 et 21. Le groupe contrôle est traité avec le tampon servant à diluer le facteur de croissance.

Un mois suivant la transplantation, les souris sont sacrifiées et les muscles prélevés et congelés. Une immunohistochimie contre la dystrophine humaine est ensuite réalisée sur différentes coupes musculaires. Les fibres marquées positivement pour la dystrophine sont comptées.

Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des différentes moyennes calculées pour les différents groupes (n=5 pour chaque groupe).



# Session 2017 : Éléments de corrigé

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

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

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

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

*Pour certaines questions, des liens internet peuvent être proposés en complément.*

## 2017 - U11 : Mathématiques

### EXERCICE 1

#### Partie A : Étude quantitative du problème

1. (a) Avec un débit de  $20 \text{ cm}^3$  par seconde, on met  $20 \times 150$  soit  $3\,000 \text{ cm}^3$  au bout de 150 s. Donc 3 litres ont été ajoutés dans le réservoir aux 2 litres de concentré de parfum. Au total, il y aura bien 5 litres dans ce réservoir au bout de 150s.
- (b) Pour remplir totalement ce réservoir il faut ajouter 8 litres d'éthanol soit  $8\,000 \text{ cm}^3$ .  
Il faudra donc  $\frac{8000}{20}$  soit 400 s pour remplir cette cuve.
2. (a) Pendant les 400 premières secondes le réservoir se remplit donc la quantité d'éthanol  $Q$  augmente. Ensuite de l'éthanol pur entre toujours mais un mélange d'éthanol-parfum en ressort par le trop-plein. Il y a donc encore une augmentation de la quantité d'éthanol. Conclusion la quantité  $Q$  en fonction du temps augmente. Cette fonction sera donc croissante.
- (b) C'est la courbe n°3 qui représente la quantité  $Q$  en fonction du temps.  
Dans une première phase (le remplissage) la quantité augmente de façon linéaire (proportionnalité entre quantité et temps grâce au débit constant) puis dans un second temps (trop-plein) la quantité d'éthanol augmente toujours comme indiquée à la question précédente.

#### Partie B : Une équation différentielle

1. L'équation différentielle ( $E_0$ ) est du modèle  $y' + a y = 0$  avec  $a = 0,002$ . Donc d'après le cours, les solutions de ( $E_0$ ) sont les fonctions de la forme  $k e^{-0,002 t}$  avec  $k$  une constante réelle.
2. La fonction constante  $a$  est solution particulière de ( $E$ ) donc elle vérifie cette équation.  
D'où  $0 + 0,002 a = 20$  soit  $a = \frac{20}{0,002} = 10\,000$
3. Les solutions de l'équation différentielle ( $E$ ) sont donc de la forme  $k e^{-0,002 t} + 10\,000$ .
4. La fonction  $Q$  solution de ( $E$ ) vérifie la condition  $Q(400) = 8\,000$ .  
D'où  $k e^{-0,002 \times 400} + 10\,000 = 8\,000$  soit  $k \approx -4451,1$ .  
Conclusion  $Q(t) = 10\,000 - 4451,1 e^{-0,002 t}$

#### Partie C : Étude d'une fonction

1. Si  $t \rightarrow +\infty$ , alors  $- \square \square \square \square t \square \rightarrow -\infty \square \square \square$  d'où  $e^{-0,002 t} \rightarrow 0$ , donc  $Q_1(t) \rightarrow 10\,000$ .  
La droite d'équation  $y = 10\,000$  est donc asymptote horizontale à la représentation graphique de  $Q_1$ .
2. Calculons la dérivée de  $Q_1$ :  
 $Q_1'(t) = 0 - 4451,1 \times 0,002 e^{-0,002 t} = 8,9022 e^{-0,002 t}$ .  
Étudions le signe de cette dérivée :

$e^{-0,002 t}$  et 8,9022 sont toujours strictement positifs, donc la dérivée est strictement positive.

La fonction est donc strictement croissante sur  $[400 ; +\infty[$ .

On vérifie ainsi la réponse donnée à la question A-2-(a).

3. Il faut donc chercher  $t$  tel que  $\frac{Q_1(t)}{10000} = 0,85$ .

En résolvant cette équation, en utilisant une table ou en utilisant la fonction trace d'une calculatrice etc. on obtient  $t = 544$ .

La proportion d'éthanol dans le réservoir vaut 85% au bout d'environ 544 secondes.

4. Réponse (c).

Vérification non demandée dans le sujet

Par exemple avec  $A = 8\ 100$ , on obtient pas à pas avec cet algorithme

|                    |                  |                  |                  |                  |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| T                  | 400              | 410              | 420              | 430              |
| $Q_1(T)$           | $\approx 8\ 000$ | $\approx 8\ 040$ | $\approx 8\ 078$ | $\approx 8\ 116$ |
| Condition Tant que | Vrai             | Vrai             | Vrai             | Faux             |

L'algorithme affiche alors 430 qui est une valeur approchée par excès de l'équation  $Q_1(t) = 8\ 100$

## EXERCICE 2

### Partie A : Défauts de fabrication

1. Il faut calculer  $P(A \cap B)$ .

Or les événements sont indépendants donc  $P(A \cap B) = P(A) \times P(B)$

On obtient alors avec les données de texte  $P(A \cap B) = 0,05 \times 0,02$  soit 0,001.

2. Au moins un défaut est l'événement  $A \cup B$ .

Or  $P(A \cup B) = P(A) + P(B) - P(A \cap B)$ .

D'où la probabilité que le verre soit défectueux est de  $0,05 + 0,02 - 0,001$  soit de 0,069.

### Partie B : Vérification du lot

1. Expérience à deux issues possibles : « verre défectueux » (succès) ou « verres sans défaut » (échec). Donc  $P(\text{succès}) = p = 0,069$ .

Expériences identiques et indépendantes répétées 20 fois (*assimilation à un tirage avec remise*).

D'où  $X$  suit une loi binomiale de paramètres 20 et 0,069.

2. Il faut calculer  $P(X \geq 5)$  soit  $1 - P(X \leq 4)$  pour pouvoir utiliser au mieux la calculatrice.

$P(X \geq 5) = 1 - 0,9899 \approx 0,01$ .

### Partie C : Diamètre du buvant du verre

1. À la calculatrice, on obtient  $P(45,8 \leq D \leq 46,3) \approx 0,59$ .

2. On estime qu'avec une loi normale de paramètres  $m$  et  $\sigma$ ,  $P(m - 2\sigma \leq D \leq m + 2\sigma) \approx 0,95$ .

Donc  $a \approx 2 \times 0,3$  soit  $a \approx 0,6$

## Partie D : Brillance des verres

- $P(T \leq t) = F(t) - F(0)$  où  $F$  est une primitive de  $\lambda e^{-\lambda t}$ .

$$F(t) = -e^{-\lambda t} \quad \text{d'où } P(T \leq t) = (-e^{-\lambda t}) - (-e^{-\lambda \times 0}) = (-e^{-\lambda t}) - (-1) = 1 - e^{-\lambda t}$$
- $P(T \leq 24) = 0,93$  donc  $1 - e^{-\lambda \times 24} = 0,93$  soit  $e^{-\lambda \times 24} = 0,07$

En utilisant le logarithme népérien on obtient  $-24\lambda = \ln(0,07)$  soit  $\lambda \approx 0,11$ .
- On sait que pour une loi exponentielle de paramètre  $\lambda$ , l'espérance mathématique est  $\frac{1}{\lambda}$ .

Donc  $E(T) \approx 9$ .

En moyenne ce dispositif fonctionne correctement pendant 9 mois.
- Quatre ans correspondent à 48 mois.

Calculons donc  $P(T > 48)$  soit  $1 - P(T \leq 48) = 1 - (1 - e^{-\lambda \times 48})$

D'où  $P(T > 48) = e^{-5,28} \approx 0,005$

La probabilité que la durée de vie soit supérieure à 4 ans n'est donc pas supérieure à 1%.

## 2017 - U12 : Sciences physiques et chimiques

### I. UTILISATION DU REFRACTOMÈTRE EN VITICULTURE

#### 1. Principe de fonctionnement d'un réfractomètre d'Abbe

1.1. Le prisme est un milieu dispersif car il est capable de décomposer une lumière polychromatique (constituée de plusieurs longueurs d'onde) en ses différentes radiations.

Ceci est possible car le matériel utilisé lors de sa construction a un indice de réfraction dont la valeur varie avec la longueur d'onde de la radiation incidente. Les radiations seront ainsi plus ou moins réfractées par le prisme, en fonction de leur longueur d'onde respective.

1.2. D'après la loi de Cauchy, l'indice de réfraction d'un milieu dispersif est inversement proportionnel à la longueur d'onde ( $\lambda$ ) de la radiation incidente : plus  $\lambda$  est faible plus l'indice de réfraction  $n$  sera grand, plus la radiation sera réfractée (selon la deuxième loi de Descartes).

Or  $\lambda_{\text{bleue}} < \lambda_{\text{rouge}}$ , d'où la phrase "la radiation bleue est la plus réfractée".

1.3. La mesure de l'indice de réfraction d'un échantillon est réalisée à une température donnée en utilisant comme source de lumière une lumière la raie D, jaune, du Na (lumière monochromatique de  $\lambda = 589,3$  nm). L'utilisation de la lumière blanche est *a priori* inadaptée car il s'agit d'une lumière polychromatique et pas monochromatique.

1.4. L'élément permettant de travailler en lumière blanche est le prisme compensateur P".

#### 2. Détermination du degré alcoolique d'un vin par réfractométrie

2.1.1. D'après la deuxième loi de Descartes appliquée au point J du schéma 1 (*Annexe 1*) :

$$n_p \cdot \sin i_2 = n_{\text{air}} \cdot \sin r_2 \quad \left\{ \begin{array}{l} n_p = \text{indice de réfraction du prisme} = 1,700 \\ n_{\text{air}} = \text{indice de réfraction air} = 1,000 \\ i_2 = \text{angle d'incidence au point J} \\ r_2 = \text{angle à la sortie du prisme} = 9,98^\circ \end{array} \right.$$

$$i_2 = \sin^{-1} \left( \frac{n_{\text{air}} \cdot \sin r_2}{n_p} \right)$$

$$\underline{\text{AN}} \quad i_2 = \sin^{-1} \left( \frac{1,000 \cdot \sin 9,98}{1,700} \right) = \underline{5,85^\circ}$$

2.1.2. D'après le schéma 1 (*Annexe 1*), pour le triangle AIJ :

$$A + I + J = 180^\circ \quad \text{avec } I = 90 - r_1 ; J = 90 - i_2$$

$$A = r_1 + i_2$$

$$r_1 = A - i_2$$

$$\underline{\text{AN}} \quad r_1 = 60,00 - 5,85 = \underline{54,15^\circ}$$

**2.1.3.** La relation (1) nous permet de calculer la valeur de l'indice de réfraction  $n_{\text{jus}}$  du jus de raisin :

$$n_{\text{jus}} = n_{\text{p}} \cdot \sin r_1$$

**AN**  $n_{\text{jus}} = 1,700 \cdot \sin 54,15 = \underline{1,378}$

**2.2.** D'après le document 1 (*Annexe 2*) on obtient par lecture graphique :

$$C_m = 285 \text{ g.L}^{-1} \quad \text{pour } n = 1,378$$

Pour obtenir la mention "sélection grains nobles" un vin doit afficher un pourcentage en volume d'alcool supérieur ou égal à 16,6%.

Sachant que 17 g.L<sup>-1</sup> de sucres correspond à une teneur de 1%, on peut déduire que 285 g.L<sup>-1</sup> de sucres correspond à  $285 / 17 = 16,8\%$ .

La valeur trouvée (16,8%) étant supérieure à 16,6%, le vin en question peut porter la mention "sélection grains nobles".

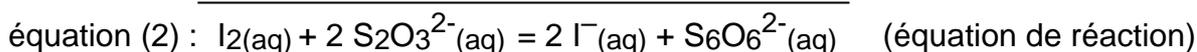
## II. LA BOUILLIE BORDELAISE POUR PROTÉGER LA VIGNE

### 1. Dosage de la bouillie bordelaise par titrage indirect

**1.1.** D'après le document 2 (*Annexe 2*) le sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4(\text{s})$  est un composé nocif / irritant (ancien pictogramme ) et dangereux pour les organismes aquatiques. Son utilisation n'est donc pas anodine ce qui explique le travail de recherche réalisé par l'INRA.

**1.2.** Pour réaliser le titrage indirect du  $\text{CuSO}_4(\text{s})$  on utilise : une burette graduée, une pipette jaugée et un bécher/erlenmeyer.

**1.3.** Le diiode  $\text{I}_2(\text{aq})$  est réduit par les ions thiosulfate ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}(\text{aq})$ ) selon l'équation d'oxydoréduction ci-dessous :



**1.4.** A l'équivalence, on observe un changement de couleur de la solution S'. La solution S' de couleur brune (due à la présence de  $\text{I}_2$ ) au début du dosage devient incolore à l'équivalence lorsque tout le diiode a été transformé en ions  $\text{I}^-$ .

**1.5.** A l'équivalence les réactifs ont été introduits dans les proportions stœchiométriques.

Selon l'équation (2):  $n(\text{I}_2) = \frac{n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})}{2}$

**1.6.** A partir de :  $n(\text{I}_2) = \frac{n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})}{2}$

$$n(\text{I}_2) = \frac{n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})}{2} = \frac{C \cdot V_E}{2} \quad \left\{ \begin{array}{l} C = 2,00 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1} \\ V_E = 15,60 \text{ mL} \end{array} \right.$$

**AN**  $n(\text{I}_2) = \frac{2,00 \cdot 10^{-2} \cdot 15,60 \cdot 10^{-3}}{2} = \underline{1,56 \cdot 10^{-4} \text{ mol}}$

1.7. D'après l'équation (1) :  $n(I_{2(aq)}) = \frac{n(Cu^{2+}_{(aq)})}{2}$

$$n(Cu^{2+}_{(aq)}) = 2 n(I_{2(aq)})$$

$$m(Cu^{2+}_{(aq)}) = 2 n(I_{2(aq)}) \times M(CuSO_4)$$

**AN**  $m(Cu^{2+}_{(aq)}) = 2 \times 1,56 \cdot 10^{-4} \times 159,6 = 4,98 \cdot 10^{-2} \text{ g.}$

La masse de  $CuSO_4$  trouvée correspond à un volume titré de 25 mL de solution S.

Pour un volume de 100 mL, la masse de  $CuSO_4$  sera 4 fois supérieure, soit

$$4 \times 4,98 \cdot 10^{-2} = \underline{0,199 \text{ g.}}$$

1.8. % massique en  $CuSO_4$  dans la bouillie bordelaise  $\frac{m(CuSO_4)}{m(\text{bouillie bordelaise})} \times 100$

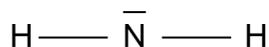
**AN** % massique =  $\frac{0,199}{1,00} \times 100 = 19,9 \%$

1.9. L'étiquette indique un pourcentage massique de 20 % en sulfate de cuivre dans la bouillie bordelaise, la valeur trouvée de 19,9 % est en accord avec la valeur de l'étiquette.

## 2. Dosage de la bouillie bordelaise par spectrophotométrie

2.1. Configuration électronique de l'atome d'azote ( $Z = 7$ ) :  $(1s)^2 (2s)^2 (2p)^3$

2.2. La molécule d'ammoniac de formule brute  $NH_3$  a la formule de Lewis suivante :



2.3. Un ligand doit posséder une fonction chimique lui permettant de se lier à un atome/ion central lors de la formation d'un complexe. L'ammoniac peut jouer le rôle de ligand grâce au doublet non liant de l'atome d'azote qui lui permet de se fixer sur les ions  $Cu^{2+}$ .

2.4. D'après le document 3 (*Annexe 3*), le complexe  $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$  présente un maximum d'absorbance à 630 nm. D'après le document 4 (*Annexe 3*), la couleur correspondant à

$\lambda = 630 \text{ nm}$  est la couleur orange. La couleur absorbée étant l'orange, la solution sera de couleur bleue (couleur complémentaire de l'orange).

2.5. La loi exploitée lors d'un dosage spectrophotométrique est la loi de Beer-Lambert.

## III. LES PHEROMONES CONTRE LES CHENILLES NUISIBLES DE LA VIGNE

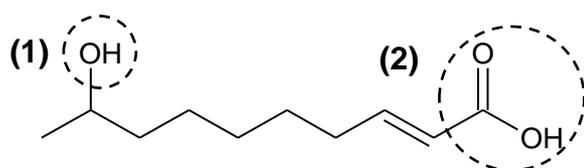
### 1. Stéréochimie de phéromones d'insectes

1.1. Stéréochimie de la phéromone sexuelle d'eudémis :

Liaison (a) : stéréochimie (Z), les deux groupes prioritaires sont du même côté de la double liaison

Liaison (b) : stéréochimie (E), les deux groupes prioritaires sont du côté opposé de la double liaison.

1.2.

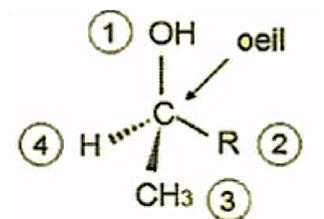


(1) Hydroxyle (fonction alcool)

(2) Carboxyle (fonction acide carboxylique)

1.3. La phéromone de regroupement de l'abeille est une molécule chirale car elle possède un atome de carbone asymétrique (C<sub>9</sub>).

1.4. Selon les règles de priorité de CIP : OH > R (C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>) > CH<sub>3</sub> > H. Sens de rotation horaire pour aller du (1) au (3), le groupement (4) étant vers l'arrière.

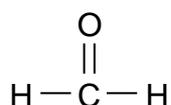


Stéréoisomère (R)

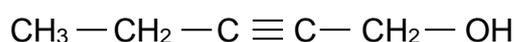
## 2. Synthèse de la phéromone sexuelle d'eudémis

2.1 D'après l'échelle d'électronégativité de Pauling, le carbone étant plus électronégatif que le magnésium ( $\chi_C > \chi_{Mg}$ ), le C est polarisé  $\delta^-$  alors que le Mg est polarisé  $\delta^+$ .

2.2 Formule développée du méthanal :



2.3. Formule développée de la molécule **A** :



2.4. La présence d'une bande vers  $3300\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre IR de la molécule **A** est caractéristique d'un groupement hydroxyle (-OH), voir *Annexe 4*.

2.5. Lors de l'étape 7 de la synthèse de la phéromone sexuelle d'eudémis, la triple liaison C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> est transformée en double liaison par addition de dihydrogène.

2.6. L'étape 7 porte à la formation d'une double liaison de stéréoisomérisation (E) entre C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>. Des trois catalyseurs proposés dans l'*Annexe 5*, le plus adapté est le palladium de Lindlar : le platine sur charbon actif porterait à la formation d'un alcane, alors que l'utilisation de sodium dissous dans l'ammoniac formerait le stéréoisomère (E).

2.7. L'étape 8 est une réaction de réduction : la fonction ester est transformée en fonction alcool par LiAlH<sub>4</sub> (réducteur).

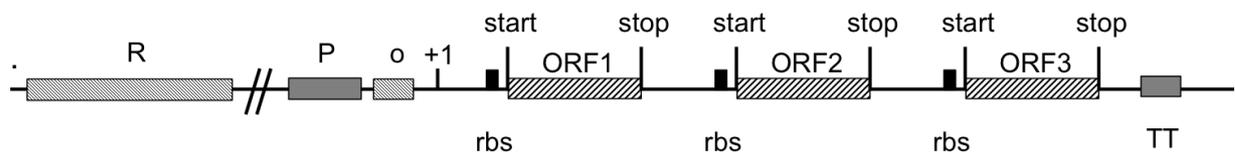
## 2017 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

### Les enzymes TALEN : des outils pour agir spécifiquement sur les gènes

#### 1. Étude de quelques caractéristiques de la protéine TALE

1.1. L'attribution d'un numéro d'accèsion à une séquence permet de l'identifier, et ainsi de la rechercher plus facilement dans les bases de données.

1.2



P : promoteur ; +1 : position d'initiation de la transcription ; TT : signal de terminaison de la transcription ; rbs : site de fixation du ribosome (ribosome binding site) (ou séquence de Shine-Dalgarno) ; start : codon d'initiation de la traduction (en général ATG) ; stop : codon de terminaison de la traduction ; ORF : open reading frame (*ici il s'agit plutôt de cds : coding DNA sequence, séquence codant une protéine*) ; R : gène codant une protéine régulatrice ; o : séquence opératrice sur laquelle se fixe la protéine régulatrice.

1.3. La protéine TALE est tout d'abord injectée dans le cytoplasme de la cellule végétale. Elle est ensuite adressée au noyau, où elle se fixe sur des séquences régulatrices situées en amont des séquences promotrices de certains gènes. Cette fixation provoque l'activation de la transcription de ces gènes.

La protéine TALE est un activateur de transcription se fixant sur des séquences d'ADN de cellules végétales. Elle est cependant produite par une bactérie, ce qui justifie le terme « like », car elle ressemble (par son mode d'action et peut-être sa structure) aux facteurs de transcription végétaux.

1.4. Le domaine de liaison à l'ADN de la protéine TALE est composé d'une succession de 18 à 22 micro-domaines. Chaque micro-domaine est constitué d'une séquence de 34 acides aminés conservés, sauf sur les positions 12 et 13, pour lesquelles les acides aminés sont variables (ces positions sont aussi appelées RVD pour Repeat Variable di-Residue). La nature des acides aminés présents sur ces positions définit la reconnaissance spécifique d'une base particulière. Par exemple, la séquence H-D (His-Glu) permet la reconnaissance spécifique de la cytosine.

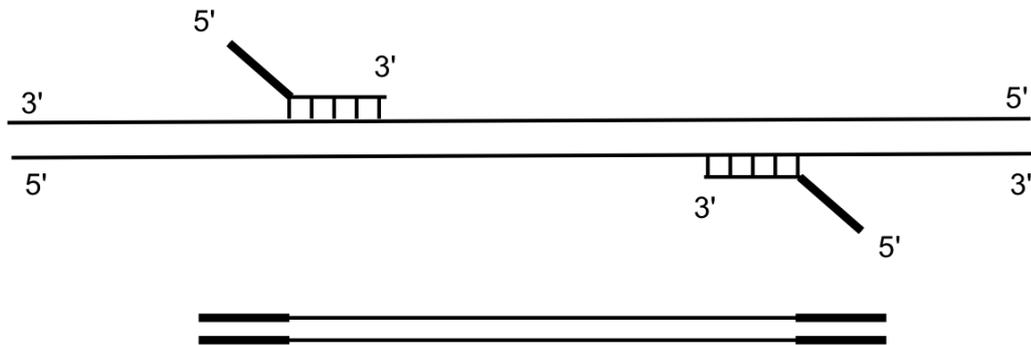
Le nombre de répétitions des micro-domaines définit la longueur de la séquence d'ADN reconnue, soit de 18 à 22 nucléotides.

Les enzymes de restriction de type II reconnaissent des séquences de 4 à 8 nucléotides. Des séquences de cette longueur sont statistiquement fréquentes dans le génome, ce qui explique la forte fréquence de reconnaissance (et de coupure) des enzymes de restriction de type II. En revanche, les séquences reconnues par la protéine TALE sont bien plus longues (18 à 22 nucléotides), et sont donc statistiquement beaucoup moins fréquentes (voire uniques). Les protéines TALE, capables de reconnaître spécifiquement des séquences de grande taille, sont donc capables de reconnaître des séquences faiblement représentées dans le génome, telles que des séquences régulatrices de la transcription.

## 2. La création du domaine de liaison sur mesure par PCR

2.1 Pour incorporer des séquences non spécifiques à un fragment d'ADN par PCR, chaque amorce d'amplification doit être conçue de telle sorte que son extrémité 3' soit complémentaire de l'ADN cible, et que son extrémité 5' corresponde à la séquence à ajouter non spécifique (extrémité flottante).

Au cours des étapes d'élongation, l'ADN polymérase synthétise les séquences complémentaires des extrémités non spécifiques à la suite de la séquence de l'ADN cible, générant des fragments d'ADN constitués de la séquence cible additionnée de la séquence non spécifique.



2.2 Les enzymes à sites palindromiques sont Aox I, Not I, EcoR I et Hha I.

Les sites de restriction des enzymes Aox I et Not I sont compatibles : les fragments générés par ces enzymes présentent des extrémités complémentaires (5' GGCC).

Fok I et Bsa I peuvent également générer des fragments aux extrémités complémentaires, à condition que les séquences débordantes de 4 nucléotides en 5' soient complémentaires.

Le site de coupure de Bsa I (et de Fok I) est décalé par rapport au site de reconnaissance de cette enzyme.

2.3 La purification du produit de digestion des amplicons permet d'éliminer les petits fragments issus de la digestion, de façon à augmenter le rendement de ligature entre fragments. D'autre part, la purification permet également d'éliminer d'éventuels fragments issus d'une amplification non spécifique lors de la PCR.

À partir du gel d'électrophorèse, la bande d'intérêt est repérée par la taille du fragment d'ADN qu'elle contient, puis découpée. L'ADN est alors séparé du gel d'agarose, par exemple par solubilisation de l'agarose, puis déposé sur une colonne de silice sur laquelle il s'adsorbe. Après lavages de la colonne, l'ADN est élué par une solution adéquate.

2.4 Chaque module généré par amplification par PCR et digestion par Bsa I possède des extrémités débordantes en 5' dont la séquence est unique.

De plus, ces bouts cohésifs sont conçus de telle sorte que l'extrémité droite du module n ne peut s'hybrider qu'avec l'extrémité gauche du module n+1.

Au final, la ligature des différents modules ne peut être effectuée que dans l'ordre choisi.

2.5 L'objectif du clonage est de créer des domaines de liaison à l'ADN sur mesure, grâce à l'enchaînement dans un ordre précis des différents micro-domaines dans la protéine TALEN. Il est donc nécessaire de garantir l'ordre d'enchaînement des micro-domaines, ce que permet le clonage ordonné proposé.

### 3. Utilisation des enzymes TALEN pour l'inactivation de gènes

- 3.1 Le vecteur recombinant est produit dans des cellules procaryotes, dont la culture est facile et rapide, et permet donc une amplification rapide de ce vecteur. Cette production est rendue possible par la présence dans le vecteur d'une origine de réplication bactérienne (pBR322 ori) et d'un gène de résistance à l'ampicilline (Amp R codant une beta lactamase) permettant la sélection des transformants.

Le gène *ccdB* code une protéine létale pour les bactéries *E. coli* de phénotype sauvage. Lors de la construction du vecteur, une partie de la séquence de ce gène est remplacée par la séquence codant le domaine de liaison à l'ADN, ce qui conduit à la perte de sa fonction. Par conséquent, seules les bactéries transformées par le vecteur recombiné pourront cultiver, les bactéries ayant été transformées par le vecteur vide subissant l'effet létal du gène *ccdB*.

Le vecteur d'expression possède les séquences nécessaires à l'expression dans une cellule eucaryote : un promoteur issu d'un virus eucaryote, le cytomégalovirus (P<sub>CMV</sub>), un signal de polyadénylation (polyA signal) permettant la maturation de l'ARN messager.

*Le vecteur possède de plus une séquence d'adressage nucléaire (NLS) permettant à la protéine TALEN d'entrer dans le noyau avant de se fixer sur la séquence ciblée.*

- 3.2 Chacune des protéines TALEN reconnaît une séquence spécifique du gène cible par son domaine de liaison. Cette double fixation permet la dimérisation des domaines endonucléasiques Fok I, provoquant une coupure double brin de l'ADN cible.
- 3.3 Le système NHEJ permet la réparation des coupures d'ADN double brin, par réassemblage de deux extrémités d'ADN ne présentant pas de complémentarité de séquences (extrémités franches ou extrémités débordantes non complémentaires). Cette réparation est le plus souvent mutagène, par perte ou ajout de nucléotides dans la séquence au niveau de la jonction.  
La réparation de la cassure double brin dans le gène d'intérêt par le système NHEJ conduit donc à l'inactivation de ce gène, soit par décalage du cadre de lecture, soit par perte d'acides aminés essentiels à la fonction de la protéine codée par le gène, soit par production d'une protéine tronquée par insertion d'un codon stop dans la séquence.
- 3.4 L'intérêt de l'utilisation des protéines TALEN réside dans le fait qu'elles permettent l'inactivation ciblée d'un gène d'intérêt au sein de génomes entiers, par la reconnaissance spécifique de séquences uniques. Il s'agit d'outils permettant la réécriture du génome, ou « genome editing ».

# 2017 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

## Kératinases, outils de valorisation des déchets kératiniques

### 1. Structure et mode d'action des kératinases

#### 1.1. Les kératinases appartiennent à la classe des hydrolases (classe 3)

Structure secondaire n°1 = feuillet beta ; structure secondaire n°2 = hélice alpha.

Les structures secondaires des protéines sont stabilisées par des liaisons hydrogènes intervenant entre les groupements –CO et –NH de la liaison peptidique.

La structure tridimensionnelle a été obtenue par cristallographie et diffraction des rayons X.

#### 1.2. Un domaine protéique est une unité de repliement indépendant, formant une région délimitée du reste de la protéine, et associé à une fonction particulière.

### 2. Purification de la kératinase d'*Aspergillus oryzae*

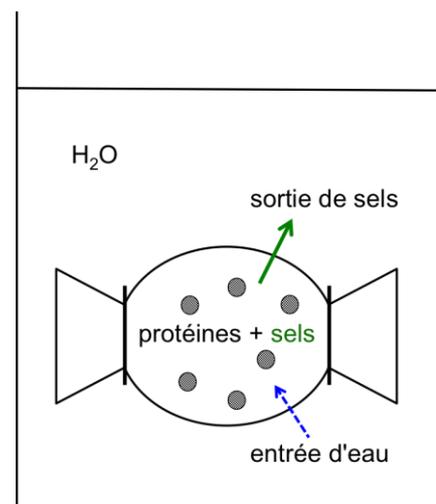
#### 2.1. Il est possible d'obtenir un extrait brut de la kératinase par centrifugation ou filtration de la culture d'*Aspergillus oryzae*, puisqu'il s'agit d'une enzyme extracellulaire.

#### 2.2. La fraction à retenir est celle qui possède la plus forte activité kératinolytique (KA). Il s'agit ici de la fraction obtenue à 85 % de saturation en sulfate d'ammonium, pour laquelle KA = 88,07 U/mg.

#### 2.3.

La solution à dialyser est enfermée dans un boudin de dialyse limité par une membrane hémiperméable (perméable aux ions et à l'eau et imperméable aux grosses molécules).

Le boudin de dialyse est placé dans un grand volume d'eau. Les sels sortent du boudin de dialyse par diffusion passive, les protéines restant confinées à l'intérieur de la membrane.



#### 2.4. Les fractions à conserver sont celles qui présentent une forte activité kératinolytique, donc les fractions 8 à 14.

#### 2.5. Les solutions d'éluion sont d'abord un tampon phosphate 0,05 M pH 8,0, puis une solution de NaCl 0,05 M en tampon phosphate 0,05 M pH 8,0.

Il s'agit donc d'une éluion par compétition avec les sels : les ions Cl<sup>-</sup> se fixent sur les résidus chargés positivement de la colonne DEAE (DiEthylAminoEthyl), déplaçant ainsi les protéines préalablement fixées sur la colonne, dont la charge est négative à pH 8,0.

L'éluion pourrait également être menée par modification du pH, de façon à modifier la charge globale des protéines, qui ne seraient alors plus retenues sur les résidus

ionisés de la colonne. Plus précisément, une diminution du pH provoquerait le passage d'une charge globale négative (à pH 8,0) à une charge positive (à un pH inférieur).

**2.6.** La masse moléculaire de la kératinase à purifier est de 60 kDa. Il faut donc choisir une membrane ayant un seuil de coupure de 50 kDa, permettant la rétention de la kératinase et des protéines de masse moléculaire supérieure à 50 kDa, et élimine les molécules de masse moléculaire inférieure.

**2.7.** Le calcul du rendement R et de l'enrichissement E donne les résultats suivants :

|  | Équations aux grandeurs               | Équations aux valeurs numériques                            |
|--|---------------------------------------|---|
| Rendement R (%)                                    | $R = \frac{Z_{FC}}{Z_{EB}}$           | $R = \frac{2760}{8275} = 0,33 = 33 \%$                      |
| Activité spécifique $Z_{sp}$ (U.mg <sup>-1</sup> ) | $Z_{sp} = \frac{Z}{m_{protéines}}$    | $Z_{sp}^{EB} = \frac{8275}{314} = 26,4 \text{ U.mg}^{-1}$   |
|  |                                       | $Z_{sp}^{FC} = \frac{2760}{9,09} = 303,6 \text{ U.mg}^{-1}$ |
| Enrichissement E                                   | $E = \frac{Z_{sp}^{FC}}{Z_{sp}^{EB}}$ | $E = \frac{303,6}{26,4} = 11,5$                             |

Le rendement est de 33 %, soit une perte d'environ deux tiers de l'activité kératinase. Ce rendement est médiocre, mais explicable par le nombre d'étapes important, et pour lesquelles des pertes sont observables (présence d'activité kératinolytique dans les précipités au sulfate d'ammonium, présence d'un second pic d'activité dans la chromatographie gel-filtration).

La fraction FC est 11,5 fois plus pure que l'extrait brut, ce qui est un enrichissement satisfaisant.

**2.8.** L'électrophorèse réalisée est une électrophorèse dénaturante (présence de SDS) dans laquelle les ponts disulfure ont été réduits (présence de beta-mercaptoéthanol). L'électrophorégramme présente une bande correspondant à une chaîne peptidique d'environ 60 kDa (légèrement inférieure à la bande à 67 kDa du marqueur de masse moléculaire), très probablement la kératinase.

La présence d'une seule bande montre d'une part que la kératinase est une enzyme monomérique (constituée d'une seule chaîne peptidique), et d'autre part que la qualité de la purification est bonne (absence apparente de protéines contaminantes).

### 3. Caractérisation de l'activité enzymatique de la kératinase d'*Aspergillus oryzae*

**3.1.** CaCl<sub>2</sub> et KCl augmentent l'activité kératinolytique, il s'agit donc d'activateurs. HgCl<sub>2</sub> et EDTA diminuent l'activité enzymatique, il s'agit donc d'inhibiteurs.

L'EDTA chélate les cations divalents, ce qui limite la disponibilité des ions activateurs Ca<sup>2+</sup>, et inhibe de ce fait l'activité de la kératinase.

**3.2.** Les meilleurs rendements d'immobilisation sont obtenus par l'immobilisation sur gel de silice et sur billes de verre fritté (64,2 % et 63,6 %, respectivement).

L'activité spécifique la plus forte est obtenue par immobilisation sur billes de verre fritté (163,33 U.mg<sup>-1</sup>).

Le support d'immobilisation le plus approprié est donc les billes de verre fritté.

- 3.3.** La valeur de la constante de Michaelis  $K_M$  est un moyen d'évaluer l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.  
L'augmentation du  $K_M$  traduit donc une diminution de l'affinité apparente de l'enzyme, qui peut être expliquée soit par des problèmes de diffusion du substrat, soit par une déformation de la structure de l'enzyme après adsorption sur le support.
- 3.4.** La température pour laquelle l'activité de la kératinase est maximale est d'environ 50°C pour l'enzyme soluble et de 60°C pour l'enzyme immobilisée.
- 3.5.** À 50°C et 60°C, l'enzyme immobilisée ne présente quasiment aucune perte d'activité après 1 heure d'exposition (0 % à 50°C, 10 % à 60°C), alors que la forme libre de l'enzyme est plus rapidement dénaturée (10 % de perte d'activité après 1 heure à 50°C, et environ 40 % à 60°C).  
De même, après 1 heure à 70°C, la perte d'activité observée pour la forme soluble est de 50 %, contre 40 % pour la forme immobilisée.  
Enfin, après 1 heure à 80°C, la perte d'activité observée pour la forme soluble est de 70 %, contre 60 % pour la forme immobilisée.  
L'analyse de ces résultats permet donc d'affirmer que l'immobilisation de la kératinase augmente sa stabilité thermique.

## 2017 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire

### La lutte biologique

#### 1. Étude de *Trichoderma* dans la lutte biologique contre *Botrytis*

1.1 1 : appareil sporifère ; 2 : hyphe ; 3 : septum (ou cloison) ; 4 : conidie (ou spore)

1.2 La démarche d'identification des moisissures est basée sur l'observation macroscopique de la culture (recto-verso), et l'observation microscopique à l'état frais, permettant de décrire précisément l'appareil végétatif et l'appareil sporifère s'il existe.

1.3 Peptones : source de carbone, d'azote et d'énergie, léger effet tampon ;  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : source de phosphates, régulation du pH ;  
Chloramphénicol : agent sélectif (antibiotique) inhibant la croissance bactérienne, et rendant le milieu sélectif des mycètes.

Les microorganismes cultivant sur le milieu DRBC sont chimio-organo-hétérotrophe : leur source d'énergie est chimique (chimio-) ; les donneurs d'électrons utilisés sont de nature organique (organo-) ; la source de carbone est organique (hétéro-).

Ces microorganismes cultivent à pH acides, comme l'indique le pH du milieu (5,6).

1.4 En absence de *Trichoderma*, la croissance du mycélium de *Botrytis* est d'environ 40 mm (condition contrôle). En présence des différentes souches de *Trichoderma*, la croissance du mycélium de *Botrytis* est fortement limitée : de 12 mm pour la souche *T. longibrachiatum* (75 % d'inhibition) à 27 mm pour la souche *T. viride* (25 % d'inhibition).

La croissance du mycélium de *Botrytis* est donc inhibée par *Trichoderma*.

L'inhibition observée peut être due soit à une compétition trophique entre les deux espèces, soit à la synthèse par *Trichoderma* de molécules inhibitrices diffusant dans la gélose.

1.5. Le nombre de spores produites par *Botrytis* cultivé en absence de *Trichoderma viride* est d'environ 28 000/mL. Le nombre de spores produites par *B. cinerea* en présence de *T. viride* est du même ordre de grandeur (25 000 à 28 000 /mL), ce qui traduit une absence d'effet inhibiteur de la sporulation de *B. cinerea* par *T. viride*. En revanche, la sporulation de *B. fabae* est fortement inhibée par la présence de *T. viride* : le nombre de spores par mL est compris entre 4 000 et 8 000, soit 3 à 4 fois moins que dans l'expérience contrôle.

*Trichoderma* inhibe la production de spores asexuées de certaines souches de *Botrytis*, ce qui limite les capacités de ce champignon phytopathogène à coloniser son environnement.

#### 2. Le bioinsecticide de *Bacillus thuringiensis*

2.1 Les bactéries sporulent lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables à la croissance : carences en nutriments, manque d'eau...

2.2 D'après le document 4, la toxine est produite lors de la phase stationnaire de la croissance de la souche, entre 15 heures et 30 heures. Entre la 30<sup>ème</sup> et la 50<sup>ème</sup> heure, la concentration en toxine reste stable, ce qui traduit l'arrêt de sa production, alors que la concentration cellulaire diminue lentement.

L'arrêt de la multiplication bactérienne en phase stationnaire est dû à l'épuisement d'un ou plusieurs nutriments du milieu de culture ou à l'apparition de conditions

physicochimiques inhibant la croissance (pH). Ces conditions de stress provoquent la sporulation de *Bacillus*, objectivée par la diminution de la concentration en formes végétatives à partir de la 30<sup>ème</sup> heure.

Les cristaux toxiques sont donc produits pendant la phase stationnaire, au cours de la sporulation.

**2.3** La croissance exponentielle de *B. thurengiensis* (de 0 à 10 heures) est associée à la chute rapide de la concentration en dioxygène dissous dans le milieu de culture, le dioxygène restant limitant jusqu'à 30 heures (OUR > OTR). La phase de multiplication végétative de *Bacillus* nécessite donc du dioxygène.

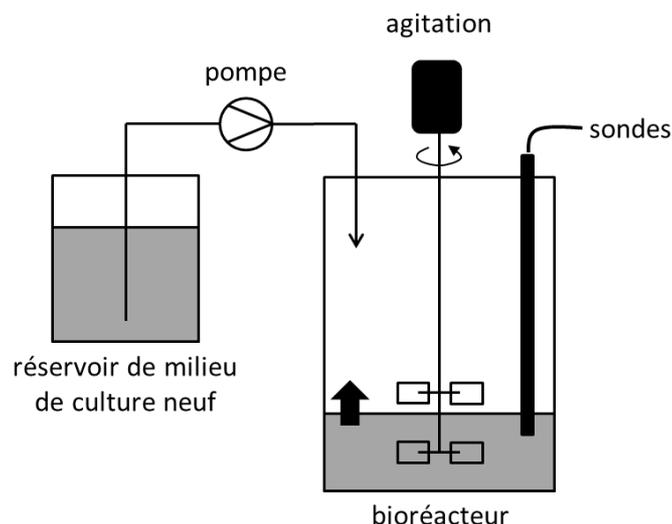
Après 30 heures, la ré-oxygénation du milieu s'accompagne de l'arrêt de la production de toxine, elle-même liée à la disparition des formes végétatives par sporulation.

Le maintien d'une bonne oxygénation est donc un paramètre important pour obtenir une biomasse importante, et donc une forte production de cristaux toxiques au cours de l'étape de sporulation finale.

**2.4** Après 30 heures, la concentration en dioxygène dissous remonte : la vitesse de transfert de dioxygène par le bioréacteur (OTR) devient supérieure à sa consommation par les cellules (OUR). Cette ré-oxygénation du milieu peut s'expliquer par la disparition des formes végétatives, seules consommatrices de dioxygène, pour former des spores métaboliquement inactives, donc non consommatrices d'oxygène.

**2.5** Les paramètres influençant la valeur du  $K_{La}$  sont entre autres le débit d'air dans le fermenteur (VVM), la vitesse d'agitation du milieu (fractionnement des bulles donc augmentation de la surface d'échange), la teneur en dioxygène dans l'air entrant dans le fermenteur, la température d'incubation (la solubilité des gaz diminue lorsque la température augmente).

**2.6** Schéma d'un procédé de type fed-batch :



Le procédé fed-batch, en alimentant progressivement les cellules, permet de conserver une concentration en substrat faible et constante. Ceci permet de limiter d'éventuels effets d'inhibition par le substrat, ici le glucose.

**2.7** Calcul du rendement de conversion du substrat en protéines toxiques :

$$R_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_{final} - P_0}{S_0 - S_{final}}$$

avec S : concentration en substrat glucidique consommé ; P : concentration en protéines toxiques

D'après le document 5, la concentration en glucose consommé  $\Delta S$  est égale à 18,0 g/L, et la concentration en protéines toxiques produites  $\Delta P$  est égale à 2,4 g/L (en supposant  $P_0 = 0$  g/L), ce qui donne :

$$R_{P/S} = \frac{2,4 \times 10^3}{18,0} = 133 \text{ mg/g}$$

Le milieu au son de blé se place donc en deuxième position des rendements de conversion, après le milieu synthétique. Cependant son coût de production est beaucoup plus faible que celui des autres milieux étudiés. Il constitue donc le meilleur compromis pour une production industrielle de protéines toxiques.

### 3. Une nouvelle piste dans la lutte biologique : *Photorhabdus luminescens*

3.1 L'association symbiotique décrite ici est bénéfique pour chacun des deux protagonistes et inclut une interdépendance métabolique. Il n'est en revanche pas précisé si elle a un caractère obligatoire.

Ainsi, lorsqu'il est à l'état libre, le ver nématode héberge *Photorhabdus* dans son tube digestif, lui apportant un environnement stable et protecteur, et un accès aux nutriments.

De son côté, *Photorhabdus* permet la reproduction du ver nématode après infection d'un insecte. Les bactéries libérées dans le corps de l'insecte facilitent l'accès aux nutriments (production de toxines létales pour l'insecte, sécrétion d'exo-enzymes digérant la matière organique du cadavre) et synthétisent des antibiotiques, préservant ainsi les ressources nutritives du cadavre pour leur bénéfice propre et celui du ver nématode.

3.2 Les modes de transfert horizontaux de matériel génétiques chez les bactéries sont la conjugaison, la transformation et la transduction (et éventuellement la transposition).

3.3 *Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie capable d'infecter des plantes puis d'intégrer dans le génome des cellules végétales un fragment d'ADN, l'ADN-T. L'ADN-T, localisé sur le plasmide Ti, est responsable des effets pathogènes observés chez la plante (tumoration et production d'opines). La transfection des cellules végétales par agrofection repose sur l'utilisation de ce processus infectieux naturel.

Pour cela, un vecteur Ti recombiné est obtenu en recombinant le plasmide Ti désarmé qui ne contient que les gènes de virulence permettant l'infection et un plasmide plus petit contenant le transgène d'intérêt et des marqueurs de sélection bactérien et végétal.

Une souche d'*A. tumefaciens* transformée par ce vecteur recombinant est utilisée pour infecter des cellules végétales. À l'issue de ce processus, le transgène sera intégré dans leur génome.

## 2017 – U42 : Biologie cellulaire

### Étude d'une maladie génétique : la dystrophie musculaire de Duchenne

#### 1. Étude de la transmission de la dystrophie musculaire de Duchenne

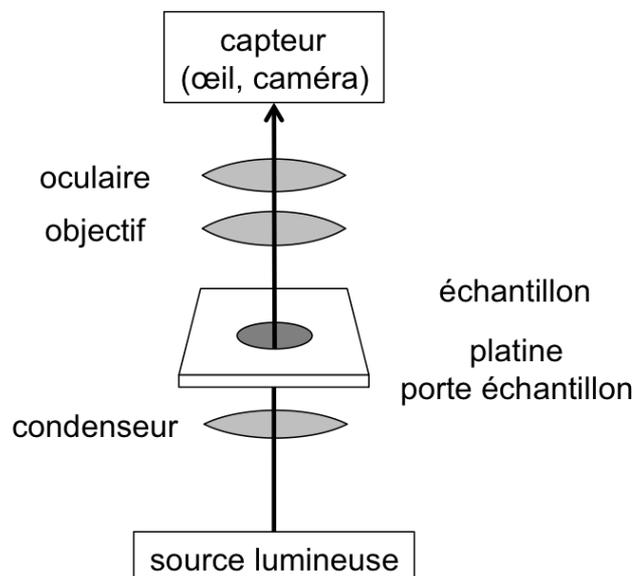
- 1.1** Un allèle est l'une des multiples versions différentes qu'un gène peut avoir. On observe sur l'arbre généalogique de cette famille que les enfants sont atteints par la maladie alors que les parents sont sains : l'allèle est donc récessif puisque la maladie saute des générations (cas de l'individu II 3 malade, parents I 1 et I 2 sains). La maladie ne touche que les hommes, l'allèle malade est donc vraisemblablement lié aux gonosomes. Si l'allèle malade était porté par le chromosome Y, alors un garçon atteint aurait son père forcément atteint, ce qui n'est pas le cas. On en déduit donc que l'allèle malade est porté par le chromosome X.
- 1.2** On note  $X^S$  l'allèle sain car dominant,  $X^m$  l'allèle malade récessif. Le génotype de l'individu III 4 est ( $X^S/Y$ ), celui de l'individu III 5 est ( $X^S/X^m$ ). L'échiquier de croisement entre les individus III 4 et III 5 montre pour les garçons une probabilité d'être atteint de 50 % et de 0 % pour les filles.
- 1.3** L'ordre chronologique de déroulement de la méiose est  
 5 : prophase I, 3 : métaphase I, 6 : anaphase I, 1 : télophase I,  
 2 : prophase II, 8 : métaphase II, 4 : anaphase II, 7 : télophase II.  
 La cellule initiale est diploïde (2n chromosomes) et les cellules formées sont haploïdes (n chromosomes).

#### 2. Atteintes cellulaires et tissulaires liées à l'absence de dystrophine

- 2.1** Les composants majeurs de la matrice extracellulaire sont le collagène, l'élastine, la fibronectine, les protéoglycanes et la laminine.
- 2.2** L'absence de dystrophine dans le muscle squelettique entraîne la perte de la liaison entre les filaments d'actine et le complexe glycoprotéique du sarcolemme. La membrane des cellules musculaire est donc fragilisée, ainsi que l'ensemble du muscle.
- 2.3** Un dispositif permet l'éclairage de l'échantillon (source de rayonnement lumineux, condenseur, diaphragme, platine porte-objet).

La lumière traverse l'objet à observer, celui-ci étant suffisamment transparent pour permettre le passage de la lumière (coupe mince).

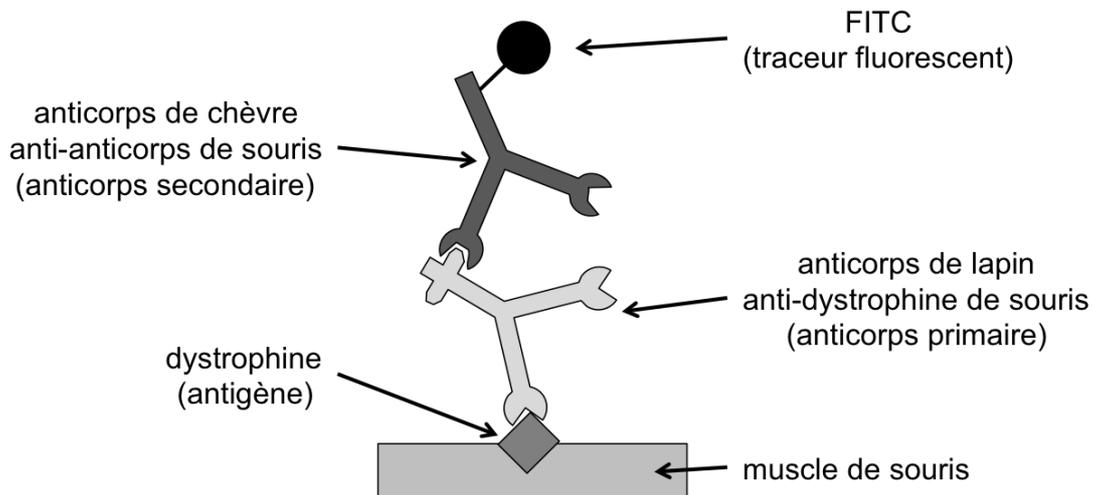
L'image formée est agrandie par un système optique comportant plusieurs lentilles (objectif, oculaires), puis directement observée (œil) ou enregistrée (caméra).



**2.4** Dans un muscle squelettique normal (A) les fibres musculaires sont organisées en faisceaux bien individualisés, les cellules ont un diamètre d'environ 100µm et sont accolées et séparées les unes des autres. Au fur et à mesure de l'avancement de la maladie (B et C), les fibres musculaires sont plus petites, leur nombre diminue, l'organisation en faisceau disparaît (C) et les fibres endommagées sont remplacées par du tissu adipeux (prédominant sur l'image D).

### 3. Modèles animaux expérimentaux : exemple de la souris *mdx*

#### 3.1



**3.2** On observe sur les photographies du document 5, une absence de signal fluorescent donc une absence de dystrophine dans les muscles de souris *mdx* traitées ou non avec de la laminine 111, contrairement aux muscles de souris sauvage. Les souris *mdx* sont un bon modèle de la myopathie de Duchenne.

**3.3** Les images du document 5 montrent que les signaux fluorescents mettant en évidence la dystrophine d'une part et la laminine d'autre part sont situés dans la même région périphérique des fibres musculaires, ce qui implique que les deux protéines sont proches du sarcolemme. Le document 3 confirme cette localisation.

**3.4** Le document 6 montre tout d'abord que les noyaux des fibres musculaires normales sont situés en périphérie de la cellule alors que dans les fibres musculaires endommagées les noyaux sont localisés au centre de la cellule. L'analyse des résultats du document 6 montre que le muscle normal (0 % CLN) et le muscle *mdx* traité avec la laminine (20 % CLN) ne présentent pas ou peu de fibres musculaires avec noyaux localisés au centre de la cellule en comparaison avec le muscle *mdx* traité avec du PBS (80 % CLN). La laminine empêche la nécrose des fibres musculaires des souris *mdx*.

### 4. Vers de nouvelles thérapies

**4.1** L'exocytose de perforine par le LTC aboutit la formation d'un canal transmembranaire de polyperforine dans la membrane de la cellule cible. Ce canal permet l'entrée dans la cellule de granzymes, molécules activant les caspases cellulaires et par conséquent induisant l'apoptose de la cellule cible.

**4.2** Le SVF apporte des facteurs mitogènes (facteurs de croissance et hormones) et des facteurs protéiques favorisant l'adhérence cellulaire. Le mélange d'antibiotiques pénicilline/streptomycine empêche la contamination bactérienne des cultures.

L'utilisation de souris SCID dans cette expérience évite le rejet des cellules myogéniques greffées.

**4.3** Le contrôle consiste à injecter du tampon à la place du MGF dans le tibia des souris SCID greffées avec des cellules myogéniques.

Ce contrôle sert de référence pour l'expérience car il permet de quantifier le taux de base de fibres musculaires dystrophine + apparues dans les souris après la greffe de cellules myogéniques. Il permet donc de quantifier l'effet du MGF sur les cellules myogéniques.

**4.4** Les injections de peptide MGF chez les souris greffées ont permis d'augmenter de façon significative le taux de fibres musculaires dystrophine + pour les doses de 5 et 10 µg. La dose de 1 µg n'est pas efficace car le résultat est équivalent à celui du contrôle.

Le peptide MGF augmente donc le taux de greffe c'est-à-dire la survie et la multiplication des cellules myogéniques greffées.

# Travaux Pratiques de Biotechnologies

# U51 : TP de biologie moléculaire et génie génétique

Coefficient 1 – CCF

## Compétences évaluables

| Compétences terminales Globales  | Compétences terminales élémentaires |   |
|--|-------------------------------------|---|
| <b>C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail</b>                            | C1.1.1.                             | Préparer et conditionner solutions de travail et réactifs   |
|  | C1.1.2.                             | Préparer des milieux de culture   |
|  | C1.1.3.                             | Étalonner les solutions titrantes   |
| <b>C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques</b>                       | C1.2.1.                             | Préparer les échantillons biologiques   |
|  | C1.2.2.                             | Prétraiter les échantillons biologiques   |
|  | C1.2.3.                             | Conditionner le matériel biologique   |
| <b>C1.3- Mettre en œuvre des techniques en biochimie et biophysique</b>                |                                     | <b>Techniques préparatives</b>  |
|  | C 1.3.1                             | Choisir un protocole adapté aux caractéristiques biochimiques et/ou biophysiques du lot ou de l'échantillon |
|  | C 1.3.2.                            | Appliquer sur le lot ou l'échantillon le protocole adapté   |
|  | C 1.3.3.                            | Conserver la préparation purifiée   |
|  |                                     | <b>Techniques analytiques</b>   |
|  | C 1.3.4                             | Choisir un étalon ou un matériel de référence   |
|  | C 1.3.5                             | Choisir un protocole adapté.  |
|  | C 1.3.6                             | Appliquer sur l'échantillon et l'étalon, le protocole adapté  |
|  | C 1.3.7                             | Caractériser un échantillon   |
| <b>C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps</b>                    | C1.5.1                              | Choisir un protocole adapté.  |
|  | C1.5.2                              | Prévoir des témoins et des échantillons de référence  |
|  | C1.5.3                              | Appliquer sur les échantillons et les témoins le protocole choisi   |
| <b>C1.6- Mettre en œuvre des techniques en biologie moléculaire et génie génétique</b> | C1.6.1                              | Rechercher une séquence ou une donnée dans une banque   |
|  | C1.6.2                              | Analyser une séquence ou un ensemble de séquences   |
|  | C1.6.3                              | Préparer la mise en œuvre en fonction des caractéristiques et du nombre d'échantillons à traiter            |
|  | C1.6.4                              | Appliquer aux acides nucléiques les protocoles adaptés  |
|  | C1.6.5                              | Appliquer aux cellules procaryotes, eucaryotes, et aux virus les protocoles adaptés                         |
|  | C1.6.6                              | Exploiter et valider les résultats  |
|  | C1.6.7                              | Conserver et stocker le matériel biologique d'intérêt   |

|  |        |   |
|--|--------|---|
| <b>C2.1- Organiser son activité de travail</b>   | C2.1.1 | Recenser et planifier les travaux à réaliser  |
|  | C2.1.2 | Inventorier les besoins en matériels et en réactifs   |
|  | C2.1.3 | Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables   |
|  | C2.1.4 | Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables   |
|  | C2.1.5 | Organiser son espace de travail   |
|  | C2.1.6 | Remettre en ordre son espace de travail   |
|  | C2.1.7 | Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires  |
| <b>C2.2- Préparer les équipements et les matériels</b>   | C2.2.1 | Vérifier le bon état du matériel ou des installations   |
|  | C2.2.2 | Réaliser le montage des appareils et de leurs accessoires   |
|  | C2.2.3 | Vérifier la présence et le fonctionnement des équipements collectifs de sécurité  |
|  | C2.2.4 | Vérifier la présence et l'état des protections individuelles de sécurité  |
|  | C2.2.5 | Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires  |
|  | C2.2.6 | Vérifier ou étalonner les appareils de mesure   |
| <b>C 2.4 Gérer la santé et la sécurité au travail.<br/>Organiser le travail dans le temps et dans l'espace</b> | C2.4.1 | Identifier les dangers  |
|  | C2.4.2 | Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation   |
|  | C2.4.3 | Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés   |
|  | C2.4.4 | Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés   |
|  | C2.4.5 | Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement   |
|  | C2.4.6 | Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident   |
|  | C2.4.7 | Pour toute personne entrante :<br>vérifier son autorisation d'entrée,<br>informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés<br>veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs |
|  | C2.4.8 | Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées  |
| <b>C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats</b>  | C3.1.1 | Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique   |
|  | C3.1.2 | Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie  |
| <b>C4-3- Rendre compte et transmettre l'information</b>  | C4.3.1 | Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué  |

# U52 : TP de biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Coefficient 1 – CCF

## Compétences évaluables

| Compétences terminales Globales   | Compétences terminales élémentaires |   |
|---|-------------------------------------|---|
| <b>C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail</b>             | C1.1.1.                             | Préparer et conditionner solutions de travail et réactifs   |
|   | C1.1.2.                             | Préparer des milieux de culture   |
|   | C1.1.3.                             | Étalonner les solutions titrantes   |
| <b>C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques</b>        | C1.2.1.                             | Préparer les échantillons biologiques   |
|   | C1.2.2.                             | Prétraiter les échantillons biologiques   |
|   | C1.2.3.                             | Conditionner le matériel biologique   |
| <b>C1.3- Mettre en œuvre des techniques en biochimie et biophysique</b> |                                     | <b>Techniques préparatives</b>  |
|   | C 1.3.1                             | choisir un protocole adapté aux caractéristiques biochimiques et/ou biophysiques du lot ou de l'échantillon |
|   | C 1.3.2.                            | appliquer sur le lot ou l'échantillon le protocole adapté   |
|   | C 1.3.3.                            | conserver la préparation purifiée   |
|   |                                     | <b>Techniques analytiques</b>   |
|   | C 1.3.4                             | choisir un étalon ou un matériel de référence   |
|   | C 1.3.5                             | choisir un protocole adapté.  |
|   | C 1.3.6                             | appliquer sur l'échantillon et l'étalon, le protocole adapté  |
|   | C 1.3.7                             | caractériser un échantillon   |
| <b>C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps</b>     | C1.5.1                              | Choisir un protocole adapté.  |
|   | C1.5.2                              | Prévoir des témoins et des échantillons de référence  |
|   | C1.5.3                              | Appliquer sur les échantillons et les témoins le protocole choisi   |
| <b>C.1.8- Mettre en œuvre des techniques en génie enzymatique</b>       | C.1.8.1                             | Réaliser et évaluer les étapes d'une purification d'enzyme  |
|   | C.1.8.2                             | Réaliser une immobilisation d'enzyme  |
|   | C.1.8.3                             | Évaluer les performances d'une immobilisation et les caractéristiques d'une enzyme immobilisée              |
|   | C.1.8.4                             | Utiliser un biocapteur  |
| <b>C2.1- Organiser son activité de travail</b>                          | C2.1.1                              | Recenser et planifier les travaux à réaliser  |
|   | C2.1.2                              | Inventorier les besoins en matériels et en réactifs   |
|   | C2.1.3                              | Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables                                   |
|   | C2.1.4                              | Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables           |
|   | C2.1.5                              | Organiser son espace de travail   |
|   | C2.1.6                              | Remettre en ordre son espace de travail   |
|   | C2.1.7                              | Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires                          |

|   |        |   |
|---|--------|---|
| <b>C2-2- Préparer les équipements et les matériels</b>  | C2.2.1 | Vérifier le bon état du matériel ou des installations   |
|   | C2.2.2 | Réaliser le montage des appareils et de leurs accessoires   |
|   | C2.2.3 | Vérifier la présence et le fonctionnement des équipements collectifs de sécurité  |
|   | C2.2.4 | Vérifier la présence et l'état des protections individuelles de sécurité  |
|   | C2.2.5 | Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires  |
|   | C2.2.6 | Vérifier ou étalonner les appareils de mesure   |
| <b>C 2.4- Gérer la santé et la sécurité au travail.<br/>Organiser le travail dans le temps et dans l'espace</b> | C2.4.1 | Identifier les dangers  |
|   | C2.4.2 | Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation   |
|   | C2.4.3 | Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés   |
|   | C2.4.4 | Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés   |
|   | C2.4.5 | Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement   |
|   | C2.4.6 | Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident   |
|   | C2.4.7 | Pour toute personne entrante :<br>vérifier son autorisation d'entrée,<br>informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés<br>veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs |
|   | C2.4.8 | Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées  |
| <b>C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats</b>   | C3.1.1 | Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique   |
|   | C3.1.2 | Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie  |
| <b>C4-3- Rendre compte et transmettre l'information</b>   | C4.3.1 | Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué  |

# U53 : TP de microbiologie et génie fermentaire

Coefficient 1 – CCF

## Compétences évaluables

| Compétences terminales Globales                                     | Compétences terminales élémentaires |   |
|---|-------------------------------------|---|
| <b>C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail</b>         | C1.1.1.                             | Préparer et conditionner solutions de travail et réactifs   |
|   | C1.1.2.                             | Préparer des milieux de culture   |
|   | C1.1.3.                             | Etalonner les solutions titrantes   |
| <b>C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques</b>    | C1.2.1.                             | Préparer les échantillons biologiques   |
|   | C1.2.2.                             | Prétraiter les échantillons biologiques   |
|   | C1.2.3.                             | Conditionner le matériel biologique   |
| <b>C1.4- Mettre en œuvre des techniques en microbiologie</b>        | C1.4.1                              | Mettre en œuvre un examen microscopique   |
|   | C1.4.2                              | Cultiver des agents biologiques   |
|   | C1.4.3                              | Identifier par méthodes biochimiques, immunologiques, moléculaires                                |
|   | C1.4.4                              | Mettre en œuvre un typage de souche   |
|   | C1.4.5                              | Dénombrer les agents biologiques  |
|   | C1.4.6                              | Conserver et stocker les agents biologiques   |
| <b>C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps</b> | C1.5.1                              | Choisir un protocole adapté.  |
|   | C1.5.2                              | Prévoir des témoins et des échantillons de référence  |
|   | C1.5.3                              | Appliquer sur les échantillons et les témoins le protocole choisi                                 |
| <b>C1.7- Mettre en œuvre des techniques en génie fermentaire</b>    | C1.7.1                              | Préparer et organiser une unité de fermentation (2 à 10 litres)                                   |
|   | C1.7.2                              | Préparer et stériliser les différents milieux, réactifs, solutions et matériels                   |
|   | C1.7.3                              | Réaliser la préculture et ensemercer le milieu de fermentation                                    |
|   | C1.7.4                              | Conduire la fermentation  |
|   | C1.7.5                              | Traiter des données cinétiques  |
|   | C1.7.6                              | Effectuer le traitement primaire du moût en fin de fermentation : séparation de la biomasse       |
|   | C1.7.7                              | Conserver et stocker le matériel collecté   |
|   | C1.7.8                              | Assurer l'élimination des cultures et des consommables  |
|   | C1.7.9                              | Décontaminer et nettoyer l'unité de fermentation et les périphériques                             |
| <b>C2.1- Organiser son activité de travail</b>                      | C2.1.1                              | Recenser et planifier les travaux à réaliser  |
|   | C2.1.2                              | Inventorier les besoins en matériels et en réactifs   |
|   | C2.1.3                              | Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables                         |
|   | C2.1.4                              | Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables |
|   | C2.1.5                              | Organiser son espace de travail   |
|   | C2.1.6                              | Remettre en ordre son espace de travail   |
|   | C2.1.7                              | Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires                |

|   |        |   |
|---|--------|---|
| <b>C 2.4- Gérer la santé et la sécurité au travail.<br/>Organiser le travail dans le temps et dans l'espace</b> | C2.4.1 | Identifier les dangers  |
|   | C2.4.2 | Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation   |
|   | C2.4.3 | Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés   |
|   | C2.4.4 | Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés   |
|   | C2.4.5 | Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement   |
|   | C2.4.6 | Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident   |
|   | C2.4.7 | Pour toute personne entrante :<br>vérifier son autorisation d'entrée,<br>informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés<br>veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs |
|   | C2.4.8 | Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées  |
| <b>C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats</b>   | C3.1.1 | Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique   |
|   | C3.1.2 | Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie  |
| <b>C4-3- Rendre compte et transmettre l'information</b>   | C4.3.1 | Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué  |

# U54 : TP de biologie et technologies cellulaires

Coefficient 1 – CCF

## Compétences évaluables

| Compétences terminales Globales                                     | Compétences terminales élémentaires |   |
|---|-------------------------------------|---|
| <b>C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail</b>         | C1.1.1.                             | Préparer et conditionner solutions de travail et réactifs   |
|   | C1.1.2.                             | Préparer des milieux de culture   |
|   | C1.1.3.                             | Etalonner les solutions titrantes   |
| <b>C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques</b>    | C1.2.1.                             | Préparer les échantillons biologiques   |
|   | C1.2.2.                             | Prétraiter les échantillons biologiques   |
|   | C1.2.3.                             | Conditionner le matériel biologique   |
| <b>C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps</b> | C1.5.1                              | Choisir un protocole adapté.  |
|   | C1.5.2                              | Prévoir des témoins et des échantillons de référence  |
|   | C1.5.3                              | Appliquer sur les échantillons et les témoins le protocole choisi                                 |
| <b>C1-9- Mettre en œuvre des techniques de génie cellulaire</b>     | C1.9.1                              | Préparer les milieux de culture   |
|   | C1.9.2                              | Préparer une culture primaire de cellules eucaryotes supérieures                                  |
|   | C1.9.3                              | Entretenir une culture de cellules eucaryotes supérieures   |
|   | C1.9.4                              | Utiliser des cellules eucaryotes supérieures comme support d'expérimentation ou de production     |
|   | C1.9.5                              | Conserver et stocker des lignées cellulaires et les clones  |
|   | C1.9.6                              | Assurer l'élimination des cultures et du matériel contaminés                                      |
| <b>C2.1- Organiser son activité de travail</b>                      | C2.1.1                              | Recenser et planifier les travaux à réaliser  |
|   | C2.1.2                              | Inventorier les besoins en matériels et en réactifs   |
|   | C2.1.3                              | Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables                         |
|   | C2.1.4                              | Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables |
|   | C2.1.5                              | Organiser son espace de travail   |
|   | C2.1.6                              | Remettre en ordre son espace de travail   |
|   | C2.1.7                              | Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires                |

|  |        |   |
|--|--------|---|
| <b>C 2.4 Gérer la santé et la sécurité au travail.<br/>Organiser le travail dans le temps et dans l'espace</b> | C2.4.1 | Identifier les dangers  |
|  | C2.4.2 | Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation   |
|  | C2.4.3 | Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés   |
|  | C2.4.4 | Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés   |
|  | C2.4.5 | Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement   |
|  | C2.4.6 | Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident   |
|  | C2.4.7 | Pour toute personne entrante :<br>vérifier son autorisation d'entrée,<br>informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés<br>veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs |
|  | C2.4.8 | Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées  |
| <b>C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats</b>  | C3.1.1 | Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique   |
|  | C3.1.2 | Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie  |
| <b>C4-3- Rendre compte et transmettre l'information</b>  | C4.3.1 | Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué  |

# **Rapport de stage et soutenance**

---

## U6 : Rapport de stage et soutenance

---

### *Extraits du référentiel :*

#### **1. Objectifs et modalités des stages**

Les stages en entreprise doivent permettre :

- d'apprendre à travailler en situation réelle,
- de s'insérer dans une équipe de professionnels et de percevoir l'importance des facteurs humains et des relations sociales au sein de l'entreprise,
- d'acquérir ou d'approfondir ou d'appliquer des méthodologies ou des techniques inscrites au référentiel de certification,
- de conduire une réflexion critique sur les résultats obtenus.

La durée totale des stages sera de 15 semaines soit 5 à 6 semaines en 1ère année et 9 à 10 semaines en 2ème année.

#### **2. Choix du terrain de stage**

Le terrain de stage doit être obligatoirement en adéquation avec les objectifs de la formation professionnelle du BTS Biotechnologies. Il est également impératif que les activités principales du stagiaire comportent la mise en œuvre de techniques en relation avec les travaux de l'équipe d'accueil. S'agissant d'entreprises de production, des regroupements ponctuels organisés en partenariat avec les entreprises de Biotechnologie seront l'occasion d'une première approche de la démarche – qualité (référentiels et normes).

Bien que pouvant être conseillé par l'équipe pédagogique, le candidat doit rester responsable du choix de son terrain de stage.

#### **3. Rédaction des rapports de stage :**

Hors figures, bibliographie, index, lexiques et annexes diverses, le corps de chacun des rapports (1ère ou 2ème année) ne devra pas dépasser 20 pages dactylographiées, en format A4, police de type Times 11 ou 12, marges de 2 cm et texte justifié, interligne simple. Le volume des annexes ne devra pas excéder 10 pages. Les illustrations seront disposées en regard des textes.

Le rapport comportera, en quatrième de couverture, un résumé en anglais de 20 lignes. Tout en bénéficiant de conseils de la part des enseignants ou du maître de stage, la rédaction du rapport doit rester un travail personnel et original du candidat.

#### **4. Contenu de l'épreuve :**

L'épreuve de soutenance doit permettre d'évaluer les qualités d'expression, de communication et de réflexion des candidats ainsi que la maîtrise des connaissances scientifiques et techniques correspondant au sujet traité. L'exposé oral ne doit pas excéder 20 minutes. Il comportera la présentation en anglais du résumé du rapport de stage.

Cet exposé sera suivi d'un questionnement qui doit permettre d'apprécier les capacités du candidat à répondre de façon argumentée à des questions techniques sur le sujet choisi. L'étudiant sera en outre interrogé sur ses prestations écrites et orales en anglais. La durée totale du questionnement n'excédera pas 30 minutes.

## 5. Évaluation :

L'évaluation portera sur les points suivants :

- Les contenus scientifiques et techniques (évalués dans le rapport et lors de la soutenance) :
  - adéquation du thème du stage aux objectifs de formation,
  - cohérence du plan,
  - place du travail réalisé dans le projet ou la thématique du laboratoire,
  - présentation claire et correcte des techniques,
  - pertinence et qualité de la réflexion sur l'analyse critique des résultats et leur exploitation ,
  - prolongements possibles et mise en perspective.
- Le travail rédactionnel (évalué dans le rapport) :  
présentation matérielle du rapport de stage, qualité des illustrations, expression française (orthographe, syntaxe...), pertinence et qualité des documents présentés lors de la soutenance ;
- La communication (évaluée lors de la soutenance) :  
présentation pertinente du rapport, expression orale, respect du temps imparti, aptitude au dialogue.
- L'expression en langue anglaise.

Le jury sera obligatoirement composé d'un professeur de biochimie-génie biologique, d'un professionnel (qui n'est pas le tuteur du candidat) d'un professeur de Français et d'un professeur d'anglais.

Le maître de stage peut assister à la soutenance en qualité d'observateur. En aucun cas, il ne participera à l'évaluation de l'épreuve.