

Brevet de technicien supérieur

Biotechnologies

Sujets et corrigés
Sessions 2018 - 2019

UPBM-Édition
Publications de l'UPBM

La rédaction des Annales du BTS Biotechnologies Sessions 2018-2019 a été coordonnée par **Brunehild SALLEN**.

Remerciements aux collègues qui ont bien voulu collaborer à la réalisation de ces Annales, en collectant des sujets et/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 :

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

Table des matières

BTS Biotechnologies : Définition de la nature des épreuves.....	4
Session 2018 : Sujets.....	5
2018 - U11 : Mathématiques.....	6
2018 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	12
2018 - U2: Biologie moléculaire et génie génétique.....	22
2018 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	30
2018 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	36
2018 - U42 : Biologie cellulaire	42
Session 2018 : Éléments de corrigé.....	48
2018 - U11 : Mathématiques.....	49
2018 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	51
2018 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	56
2018 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	58
2018 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire.....	61
2018 – U42 : Biologie cellulaire.....	64
Session 2019 : Sujets.....	67
2019 - U11 : Mathématiques.....	68
2019 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	73
2019 - U2: Biologie moléculaire et génie génétique.....	81
2019 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	90
2019 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	97
2019 - U42 : Biologie cellulaire	104
Session 2019 : Éléments de corrigé.....	110
2019 - U11 : Mathématiques.....	111
2019 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	113
2019 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	118
2019 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	121
2019 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire.....	125
2019 – U42 : Biologie cellulaire	129
Travaux Pratiques de Biotechnologies.....	132
U51 : TP de biologie moléculaire et génie génétique	133
U52 : TP de biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	135
U53 : TP de microbiologie et génie fermentaire	137
U54 : TP de biologie et technologies cellulaires.....	139
Rapport de stage et soutenance	141
U6 : Rapport de stage et soutenance	142

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 3 h
	Biochimie des protéines	1	CCF / ponctuelle	2 x 3 h
	Microbiologie et génie fermentaire	1	CCF / ponctuelle	2 x 3 h
	Biologie cellulaire	1	CCF / ponctuelle	2 x 3 h
<i>Épreuves orales</i>				
Rapport de stage et soutenance		4	Orale	50 min
TOTAL		14		

<i>Épreuve facultative</i>			
Langue vivante étrangère (épreuve orale, seuls les points au-dessus de la moyenne sont pris en compte)	1	Orale	20 min

Session 2018 :

Sujets

2018 - U11 : Mathématiques

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : L'usage de tout modèle de calculatrice de poche, avec ou sans mode examen, est autorisé.

EXERCICE 1 : (9 points)

La scanographie est un procédé radiologique, réalisé à l'aide d'un scanner, qui permet de reconstruire informatiquement l'image d'une coupe du corps humain à partir d'une série d'analyses. Elle permet notamment de détecter des tumeurs. Dans cet exercice, on s'intéresse aux scanographies réalisées dans un hôpital.

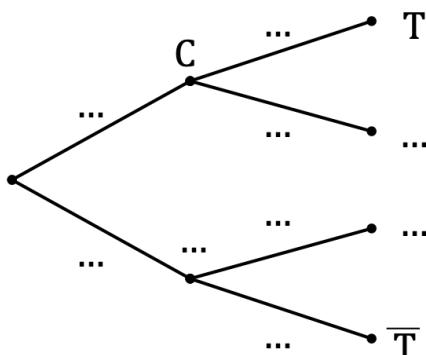
Partie A

Une étude effectuée dans cet hôpital montre que :

- 60 % des scanographies effectuées concernent le cerveau et, parmi celles-ci, 20 % détectent une tumeur ;
- 90 % des autres scanographies effectuées ne détectent pas de tumeur au patient.

Parmi les patients de l'hôpital qui ont besoin d'une scanographie, on en choisit un au hasard. On note C l'événement « le patient fait une scanographie du cerveau » et T l'événement « le patient a une tumeur ».

1. Recopier et compléter l'arbre pondéré ci-contre :



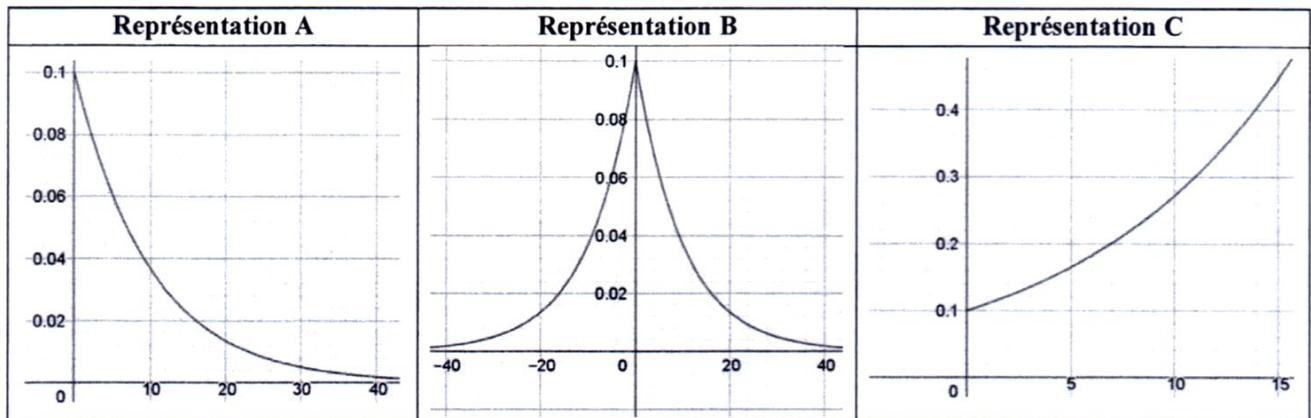
- Montrer que la probabilité que le patient a une tumeur est égale à 0,16.
- La scanographie permet de détecter une tumeur au patient. Quelle est la probabilité que cette tumeur ait été détectée au cerveau ?
- Sur un échantillon de 40 patients atteints d'une tumeur au cerveau, un médecin constate que 25 patients ont été guéris après un traitement approprié.
 - Donner une estimation ponctuelle f de la proportion inconnue p de patients guéris d'une tumeur au cerveau après un traitement approprié.
 - Estimer maintenant cette proportion p par un intervalle de confiance au seuil de 95 % (on prendra des valeurs approchées à 10^{-3} près pour les bornes de l'intervalle).

Partie B

On admet que le délai d'attente en jours pour réaliser une scanographie à cet hôpital suit une loi exponentielle de paramètre λ et que le délai d'attente moyen est égal à 10 jours.

- Déterminer la valeur de λ .

2. Parmi les trois représentations graphiques ci-dessous, une seule représentation correspond à la densité de probabilité de cette loi exponentielle. Sans justifier la réponse, indiquer la représentation correspondante.



3. On rappelle que, si T est une variable aléatoire qui suit la loi exponentielle de paramètre λ , alors pour tout réel t de $[0; + \infty[$, on a : $P(T \leq t) = 1 - e^{-\lambda t}$.
Déterminer alors la probabilité, arrondie au millième, que le délai d'attente d'un patient pour une scanographie ne dépasse pas 8 jours.

Partie C

Cette partie est un questionnaire à choix multiples. Pour chacune des questions, trois réponses sont proposées, dont une seule est exacte. Le candidat portera sur la copie le numéro de la question suivi de la réponse choisie. On ne demande pas de justification. Aucun point n'est enlevé en l'absence de réponse ou en cas de réponse fausse.

On admet que la probabilité, arrondie au centième, que le délai d'attente d'un patient pour une scanographie ne dépasse pas 8 jours est égale à 0,55.

On construit aléatoirement un échantillon de 200 patients de l'hôpital, qui se voient prescrire une scanographie. On appelle X la variable aléatoire égale au nombre de ces patients dont le délai d'attente ne dépasse pas 8 jours.

Question 1 :

La variable aléatoire X suit :

- A) la loi binomiale de paramètres 200 et 0,55 ;
- B) la loi normale de paramètres 200 et 0,55 ;
- C) la loi exponentielle de paramètres 200 et 0,55.

Question 2 :

La probabilité que le quart de ces 200 patients ait un délai d'attente qui ne dépasse pas 8 jours est égale à :

- A) $P(X \leq 8)$;
- B) $P\left(X = \frac{1}{4}\right)$
- C) $P(X=50)$.

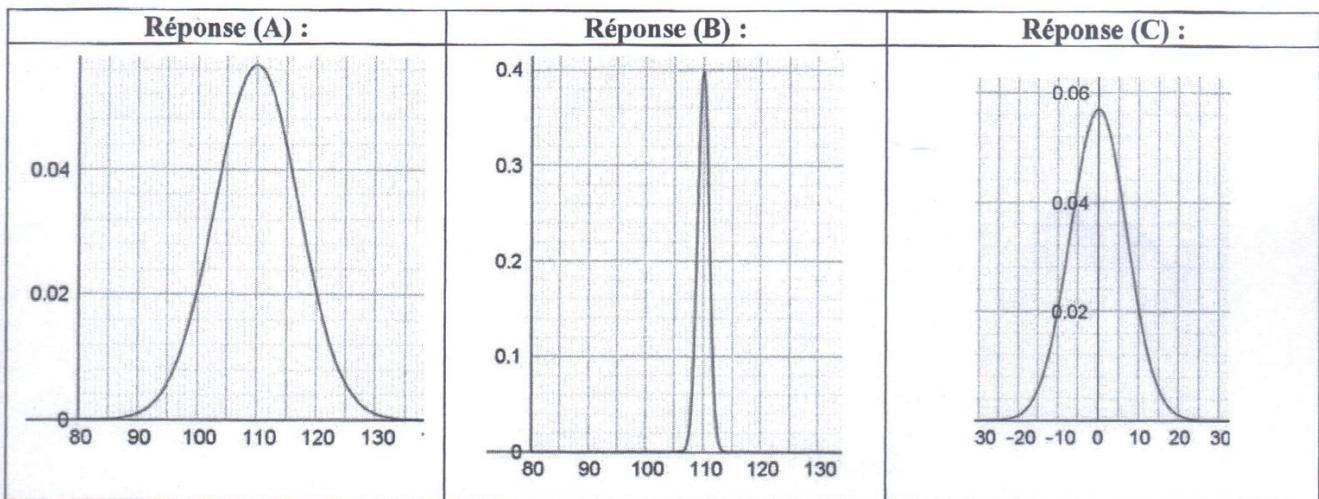
Question 3 :

La probabilité que moins de la moitié des 200 patients ait un délai d'attente qui ne dépasse pas 8 jours est égale à 10^{-3} près à :

- A) 0,021 ;
- B) 0,068 ;
- C) 0,932.

Question 4 :

On admet que la loi suivie par la variable aléatoire X peut-être approchée par une loi normale. La représentation graphique de cette loi normale est alors :



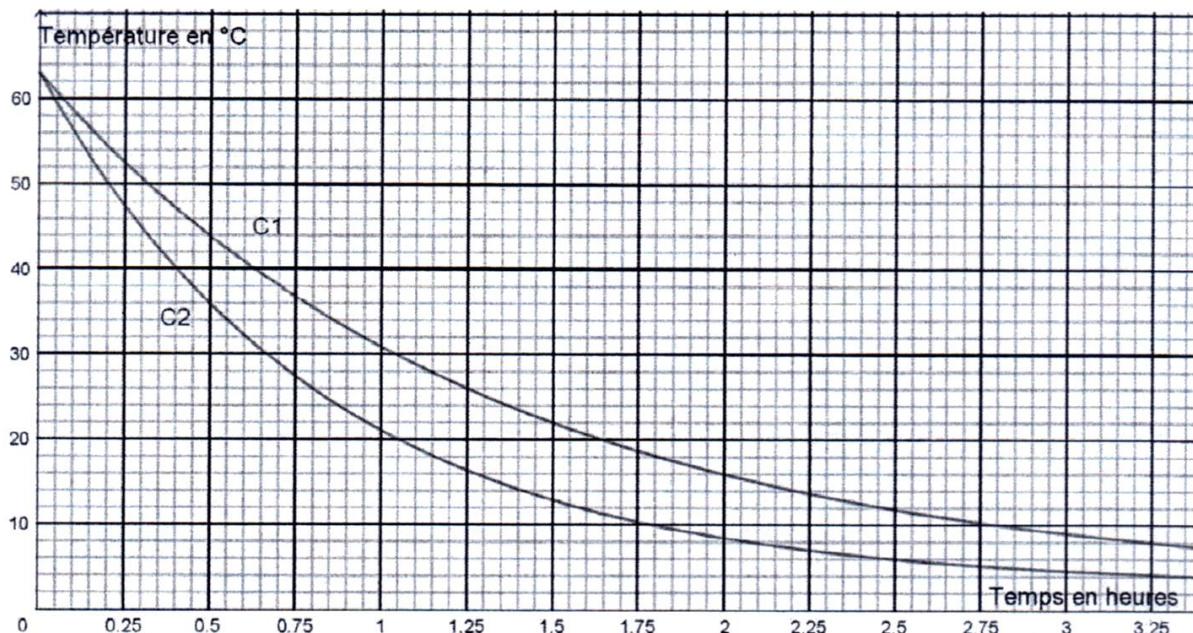
EXERCICE 2 : (11 points)

Lors du processus de fabrication de plats cuisinés en restauration collective, le refroidissement est une phase cruciale pour éviter la croissance de germes. La réglementation impose que le refroidissement rapide des barquettes de plats cuisinés soit opéré de telle manière que leur température ne demeure pas à des valeurs comprises entre $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $+63\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant plus de 2 heures (arrêté du 8 octobre 2013, dispositions particulières applicables aux établissements de restauration collective).

Une entreprise de restauration collective fabrique des barquettes de plats cuisinés, soumises à une attention particulière : lorsqu'elles ont atteint une température de $+63\text{ }^{\circ}\text{C}$, elles sont placées dans une cellule de refroidissement rapide, et cela afin de respecter la réglementation précédente.

Partie A

On procède à deux réglages différents de la cellule de refroidissement rapide (réglage n° 1 et réglage n° 2). Sur le graphique ci-dessous, sont représentées les courbes C1 et C2, qui correspondent respectivement à la température d'une barquette placée dans la cellule en fonction du temps pour le réglage n° 1 et pour le réglage n° 2.



1. Indiquer la température de la barquette au bout de 90 minutes dans la cellule de refroidissement rapide avec le réglage n° 1.
2. a) Le réglage n° 1 satisfait-il à la réglementation définie ci-dessus ? Justifier.
b) Le réglage n° 2 satisfait-il à la réglementation définie ci-dessus ? On estimera, avec ce réglage, combien de temps la barquette doit rester dans la cellule de refroidissement rapide pour atteindre une température de + 10 °C.
3. Un employé en charge du réglage de la cellule de refroidissement rapide affirme que la température de la barquette baisse de 5 % toutes les minutes avec le réglage n° 2. Expliquer pourquoi cette affirmation est en contradiction avec la courbe C2.
4. Dans cette question, on admet que la température de la barquette baisse de 2 % toutes les minutes avec un réglage n° 3. Recopier et compléter les lignes 3, 4 et 5 de l'algorithme ci-dessous afin que ce dernier permette de déterminer au bout de combien de temps la température de la barquette sera inférieure à + 10 °C :

1	$N \leftarrow 0$
2	$T \leftarrow 63$
3	Tant que.....
4	Affecter à N la valeur
5	Affecter à T la valeur
6	Fin Tant que

Partie B

Dans toute cette partie, la température de la cellule de refroidissement rapide est réglée à $+ 3^{\circ}\text{C}$ (afin que la température de la barquette ne soit jamais inférieure à $+ 3^{\circ}\text{C}$). Pour le réglage n° 2, la température de la barquette est modélisée par une fonction f qui, à tout temps t en heures, associe la température $f(t)$ de la barquette en $^{\circ}\text{C}$.

1. On admet que la fonction f est solution de l'équation différentielle $y' = -1,2(y - 3)$ sur $[0; + \infty[$.
 - a) Démontrer que cette équation différentielle s'écrit encore sous la forme (E) : $y' + 1,2y = 3,6$.
 - b) Déterminer les solutions de l'équation différentielle $y' + 1,2y = 0$ sur $[0 ; + \infty[$.
 - c) Vérifier que la fonction constante $t \rightarrow 3$ est une solution particulière de l'équation différentielle (E). En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E).
 - d) Expliquer pourquoi $f(0) = 63$. Déduire de ce qui précède une expression de $f(t)$ pour tout réel t de $[0 ; + \infty[$.

Dans ce qui suit, on admet que, pour tout réel t de $[0; + \infty[$, $f(t) = 60e^{-1,2t} + 3$.

2. Donner la valeur arrondie à 10^{-2} de $f(2)$. Interpréter dans le contexte de l'exercice.
3. Déterminer la limite de la fonction f en $+\infty$. Interpréter dans le contexte de l'exercice.
4. Avec un logiciel de calcul formel, on obtient : $\frac{1}{1,5-0} \int_0^{1,5} f(t)dt \approx 30,8$ (à 10^{-1} près). Interpréter ce résultat dans le contexte de l'exercice.
5. Pour le réglage n° 1, la température de la barquette est modélisée par une fonction g , qui, à tout temps t en heures, associe la température $g(t)$ de la barquette en $^{\circ}\text{C}$. On admet que la courbe C1 est la représentation graphique de cette fonction g .

En s'inspirant de la forme de l'expression de la fonction f proposer une expression de $g(t)$ pour tout réel t de $[0; + \infty[$. Expliquer la démarche.

Formulaire

Intervalle de confiance d'une proportion

On mesure une fréquence f d'un caractère d'un échantillon de taille n et on souhaite estimer la proportion p inconnue de la population toute entière. L'intervalle de confiance à 95% de la proportion p inconnue est l'intervalle centré sur f :

$$f - 1,96 \sqrt{\frac{f(1-f)}{n}}; f + 1,96 \sqrt{\frac{f(1-f)}{n}}$$

Lois de probabilités suivies par la variable aléatoire X

<i>Nom de la loi</i>	<i>Paramètre(s)</i>	<i>Espérance $E(X)$</i>	<i>Écart type $\sigma(X)$</i>
Binomiale	n et p	np	$\sqrt{np(1-p)}$
Normale	μ et σ	μ	σ
Poisson	λ	λ	$\sqrt{\lambda}$
Exponentielle	λ	$\frac{1}{\lambda}$	$\frac{1}{\lambda}$

Équation différentielle : $ay' + by = 0$

Les solutions sont les fonctions de la forme $f(t) = ke^{-\frac{b}{a}t}$ où k est une constante réelle.

2018 - U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé

Documents à rendre avec la copie : annexe 1 et annexe 4

Les différentes parties des exercices sont indépendantes.

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. HYDROLYSE DU SACCHAROSE (19 points)

Dans certaines raffineries de sucre, le saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$ est extrait de la betterave. Une partie du saccharose extrait sert à produire par hydrolyse du sucre dit « inverti ».

En solution aqueuse, le saccharose subit une hydrolyse conduisant à deux isomères de formule brute $C_6H_{12}O_6$: le glucose et le fructose. Cette réaction, lente, est catalysée en milieu acide par les ions $H_3O^{+(aq)}$ ou en milieu biochimique par une enzyme, l'invertase, sécrétée par la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Les deux molécules produites lors de la réaction d'hydrolyse du saccharose sont représentées sous forme linéaire (chaîne ouverte) dans l'**annexe 1 page 10 à rendre avec la copie**.

1. Aspect stéréochimique du glucose

- Sur l'**annexe 1 page 10 à rendre avec la copie**, repérer par des astérisques (*) les atomes de carbone asymétriques de la molécule de glucose.
- Indiquer le nombre de stéréo-isomères du glucose. Justifier la réponse.
- Indiquer si la molécule de glucose est chirale.
- Sur l'**annexe 1 page 10 à rendre avec la copie**, représenter en projection de Fischer l'énanthiomère du D-glucose. Nommer cet énanthiomère.
- Sur l'**annexe 1 page 10 à rendre avec la copie**, dessiner la représentation de Cram de la molécule de glucose dans laquelle l'atome de carbone n°5 est de configuration absolue R. Justifier brièvement.

Données :

Élément chimique	H	C	O
Numéro atomique Z	1	6	8

2. Suivi de la réaction d'hydrolyse par polarimétrie

2.1. Le polarimètre

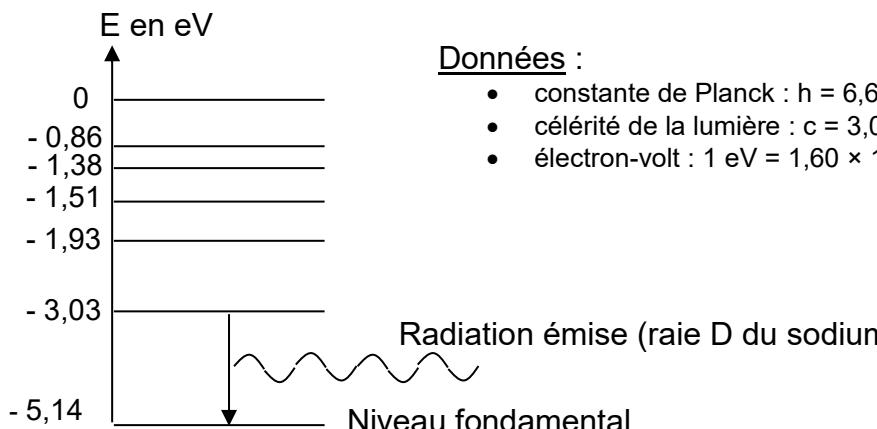
Un polarimètre permet de mesurer le pouvoir rotatoire d'une solution optiquement active. Il est constitué d'une lampe à vapeur de sodium produisant une lumière monochromatique, de deux polariseurs, d'un tube à échantillon, d'un analyseur d'intensité lumineuse, d'un dispositif de mesure d'angle et de divers éléments d'optique.

2.1.1. Exploiter le diagramme des niveaux d'énergie du sodium (**page 3**) pour calculer la longueur d'onde λ de la radiation émise par la lampe à vapeur de sodium (raie D du sodium).

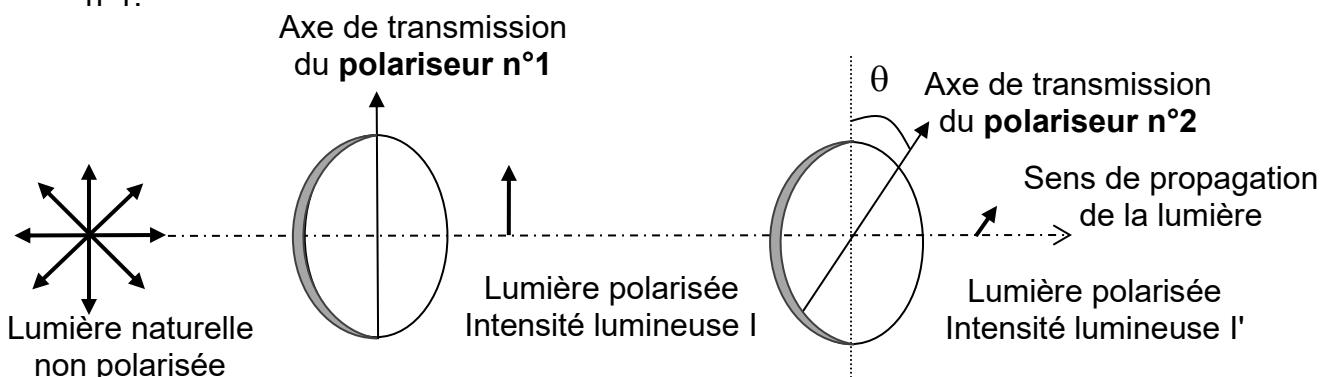
On rappelle qu'une transition radiative d'un niveau d'énergie E_2 vers un niveau d'énergie E_1 inférieur se traduit par un rayonnement électromagnétique de fréquence ν tel que :

$$E_2 - E_1 = h \cdot \nu$$

Diagramme des niveaux d'énergie du sodium :



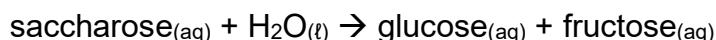
2.1.2. Le schéma suivant représente deux polariseurs rectilignes identiques et leurs axes de transmission respectifs. Le polariseur n°2 peut tourner par rapport au polariseur n°1.



Indiquer la valeur de l'angle θ en degré dans les deux cas suivants : $I' = I$ et $I' = 0$.

2.2. Exploitation des mesures polarimétriques

L'hydrolyse du saccharose est une transformation chimique quantitative qui est traduite par l'équation de réaction :



Du fait de la réaction d'hydrolyse, le pouvoir rotatoire α d'une solution de saccharose évolue au cours du temps.

Une solution de saccharose de concentration massique initiale $C = 6,00 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ est hydrolysée, en milieu tamponné à $\text{pH} = 3,5$ et à la température de 20°C .

L'évolution du pouvoir rotatoire de la solution est suivie à l'aide d'un polarimètre dont le tube à échantillon est de longueur $L = 1,00 \text{ dm}$.

La courbe correspondante est donnée dans l'**annexe 2 page 11**.

La quantité d'eau, qui est aussi le solvant, consommée par la réaction d'hydrolyse est négligeable : le volume du mélange sera considéré comme constant.

Données : loi de Biot pour un seul soluté : $\alpha = [\alpha] \cdot L \cdot C$

avec :

$[\alpha]$: pouvoir rotatoire spécifique en ${}^{\circ}\text{dm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{cm}^3$

L : longueur du trajet optique en dm

C : concentration massique en gcm^{-3}

Dans le cas d'un mélange de plusieurs solutés, les pouvoirs rotatoires s'additionnent.

Espèces chimiques optiquement actives	Pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]$ à 20 °C pour la raie D du sodium (en ${}^{\circ}\text{dm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{cm}^3$)	Masse molaire (en gmol^{-1})
Saccharose	+ 66,5	342
Glucose	+ 52,7	180
Fructose	- 92,2	180

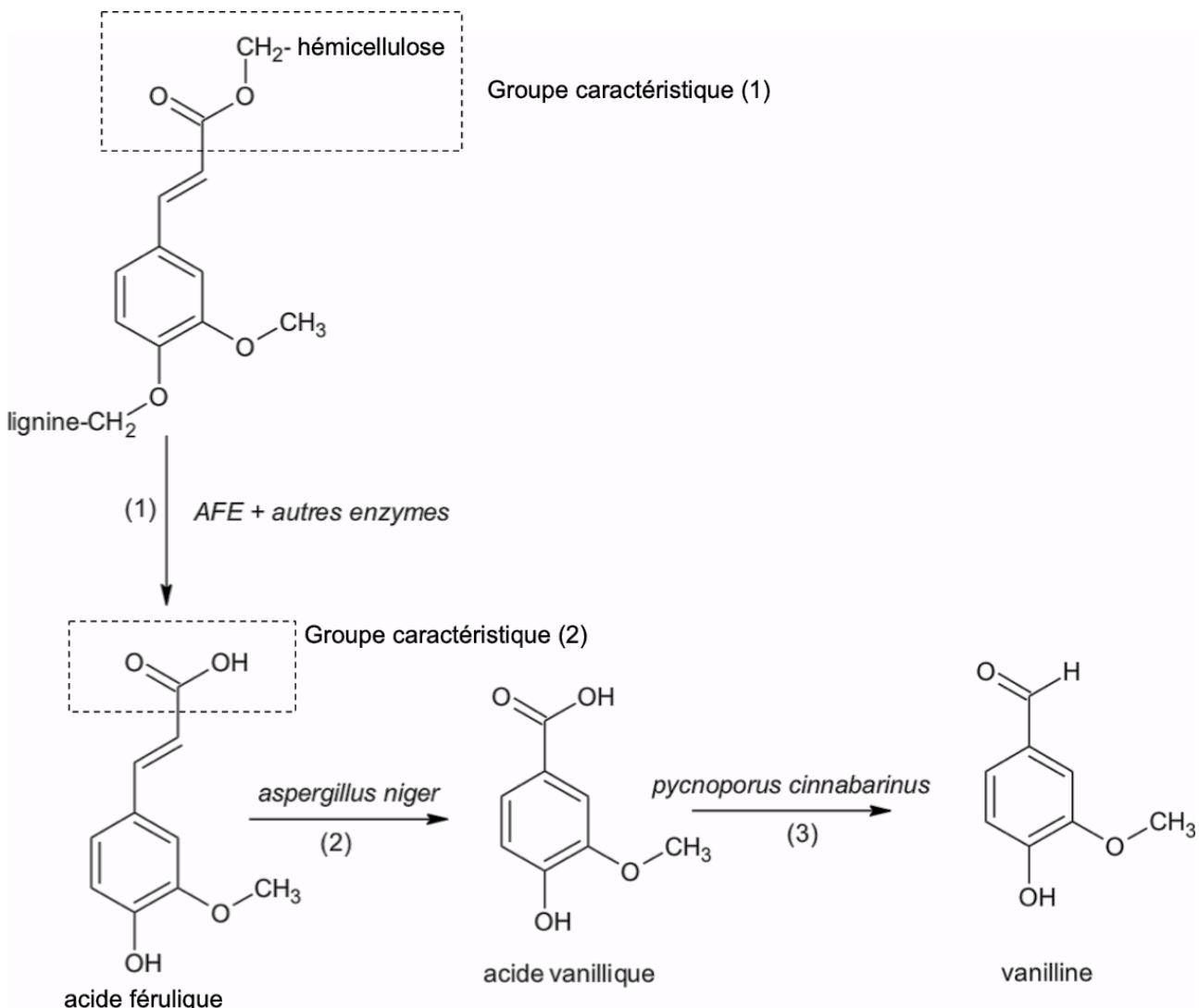
- 2.2.1. Retrouver, par un calcul, la valeur mesurée du pouvoir rotatoire (α_0) de la solution à l'instant $t = 0$ h (lancement des mesures).
- 2.2.2. Déterminer la concentration molaire initiale de saccharose en molcm^{-3} . En déduire les concentrations massiques en glucose et fructose présents dans le milieu à la fin de l'hydrolyse, que l'on considérera comme totale.
- 2.2.3. Calculer la valeur attendue α_F du pouvoir rotatoire de la solution à la fin de l'hydrolyse. Comparer au résultat lu sur la courbe de **l'annexe 2 page 11**. En déduire que la réaction étudiée est bien totale.
- 2.2.4. Justifier l'appellation « inversion » du saccharose donnée habituellement à cette réaction.
- 2.2.5. Dans l'industrie sucrière, l'hydrolyse enzymatique du saccharose en présence de l'enzyme invertase nécessite moins d'une heure dans les mêmes conditions de concentration, de pH et de température. Commenter brièvement cette information.

II. SYNTHÈSES DE LA VANILLINE (15 points)

1. Synthèse de la vanilline par bioconversion de la pulpe de betterave

De plus en plus, l'industrie sucrière essaie de valoriser les résidus de pulpe de betterave, par bioconversion, afin d'obtenir des produits à haute valeur ajoutée tels que la vanilline. Les parois cellulaires des végétaux comme la betterave contiennent des biopolymères : des celluloses, des hémicelluloses et beaucoup de lignines. Les hémicelluloses et les lignines sont raccordées entre elles par l'intermédiaire de l'acide férulique. Un traitement des résidus de pulpe de betterave consiste en l'utilisation de microorganismes secrétant l'enzyme acide férulique estérase (AFE), qui par action synergique avec d'autres enzymes, libère l'acide férulique. Par voie biotechnologique, l'acide férulique ainsi extrait est ensuite transformé en vanilline.

Le schéma global et simplifié du processus est le suivant :



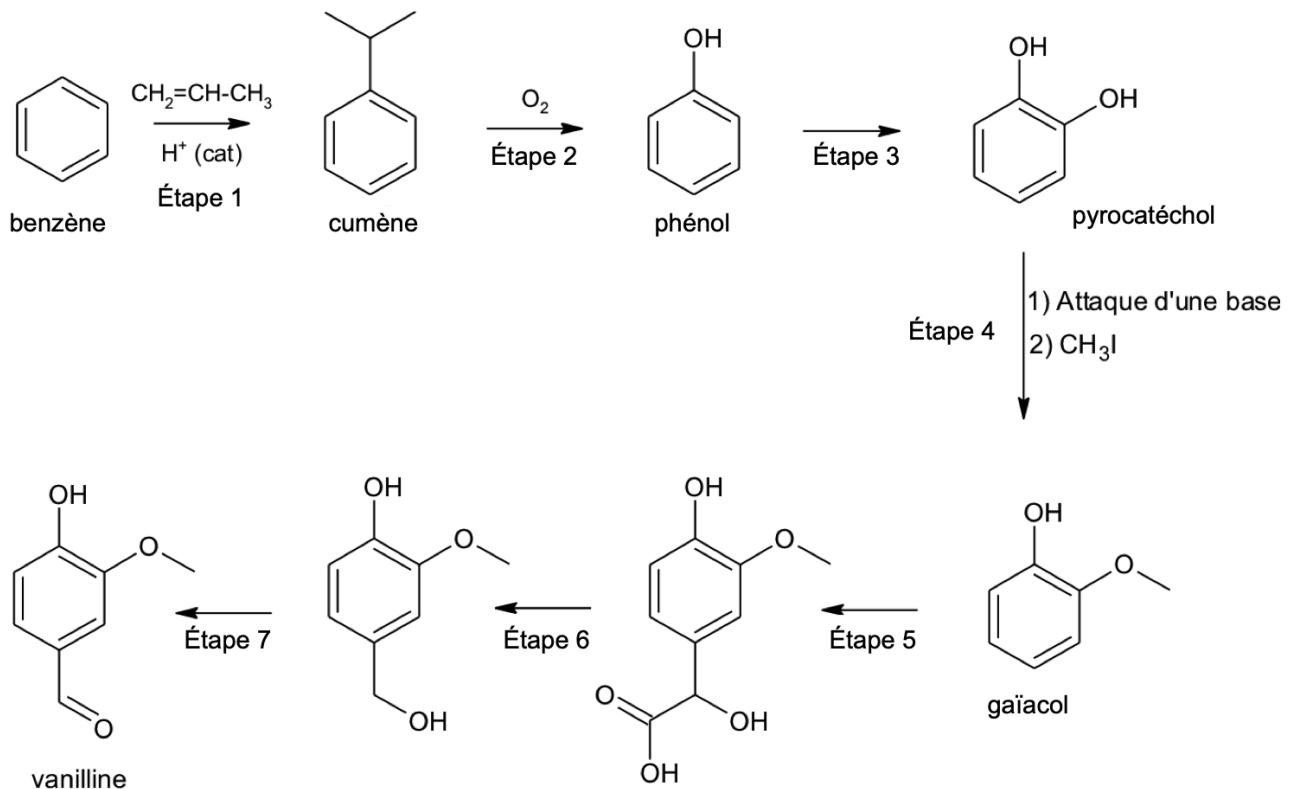
- 1.1. Dans l'étape (1), on observe une modification du groupement caractéristique (1) en groupement caractéristique (2). Nommer ces deux groupements caractéristiques.
- 1.2. Caractériser la réaction chimique de l'étape (3) en utilisant l'un des termes suivants : addition, élimination, oxydation, réduction.
- 1.3. Un contrôle qualité par spectrométrie de masse donne le spectre du produit obtenu dans le bioréacteur (**annexe 3 page 11**). Montrer, en identifiant le pic de l'ion moléculaire (pic parent), que le produit peut bien être de la vanilline C₈H₈O₃.

Données :

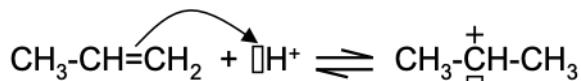
Élément chimique	H	C	O
Masse molaire en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	1,00	12,0	16,0

2. Synthèse de la vanilline par voie chimique

La vanilline peut être obtenue à partir du benzène par la séquence réactionnelle suivante :



2.1. La réaction se produisant dans l'étape 1 est une substitution électrophile. Il se forme dans un premier temps un carbocation $\text{CH}_3-\overset{+}{\text{CH}}-\text{CH}_3$ selon la première étape du mécanisme réactionnel ci-dessous :



Écrire la fin du mécanisme réactionnel conduisant au cumène en utilisant le formalisme des flèches courbes.

2.2. L'étape 2 consomme du dioxygène et produit également de la propanone. Écrire une équation de réaction ajustée en utilisant une représentation topologique pour les molécules organiques.

2.3. Lors de l'étape 3, un isomère du pyrocatechol pourrait se former. Expliquer pourquoi. Donner sa représentation topologique.

2.4. Identifier la fonction chimique modifiée lors de l'étape 7. Pour cette étape un oxydant a été utilisé en défaut. Donner ce qui aurait été obtenu si l'oxydant avait été utilisé en excès. Citer un oxydant possible.

III. DOSAGES DU GLUCOSE (16 points)

Il existe différentes techniques de dosage du glucose en solution aqueuse. La méthode de Bertrand est une technique de dosage de certains sucres, dont le glucose. Elle nécessite l'emploi de la liqueur de Fehling, solution très basique ($\text{pH} > 13$) contenant des ions Cu^{2+} complexés par des ions tartrate.

1. Rôle des ions tartrate dans la liqueur de Fehling

La composition de la liqueur de Fehling est donnée dans le tableau suivant :

Pour un litre de solution aqueuse :		
Espèce chimique	Formule	Masse en g
Sulfate de cuivre pentahydraté	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	20
Hydroxyde de sodium	NaOH	75
Tartrate mixte de sodium et de potassium	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4\text{NaK}$	100
Eau	H_2O	Quantité suffisante pour 1 L

Données : Masse molaire $\text{M}(\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}) = 249,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
 à 25 °C : $\text{pK}_s(\text{Cu}(\text{OH})_2) = 19,7$
 produit ionique de l'eau $\text{K}_E = 1,0 \times 10^{-14}$

On considère une solution aqueuse (S) de même concentration massique en sulfate de cuivre pentahydraté que la liqueur de Fehling, ce qui correspond à une concentration molaire en ions cuivre (II) $[\text{Cu}^{2+} \text{(aq)}] = 8,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

- 1.1. Donner l'expression littérale du produit de solubilité K_s de l'hydroxyde de cuivre (II) $\text{Cu}(\text{OH})_2 \text{(s)}$.
- 1.2. Montrer que le pH de début de précipitation de l'hydroxyde de cuivre (II) $\text{Cu}(\text{OH})_2 \text{(s)}$, dans la solution (S) précédente, vaut $\text{pH} = 4,7$.
- 1.3. En déduire, sans calcul supplémentaire, le rôle des ions tartrate dans la liqueur de Fehling.

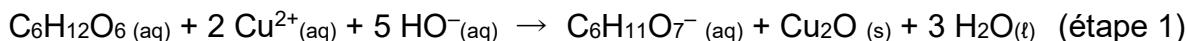
2. Dosage chimique du glucose par la méthode de Bertrand

Le mode opératoire est le suivant :

- Étape 1 : dans un erlenmeyer, faire réagir une prise d'essai d'un volume $V = 20,0 \text{ mL}$ de solution aqueuse de glucose $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (sérum sanguin par exemple) avec un volume de 40 mL de liqueur de Fehling, à ébullition pendant une durée de 3 min. Une partie des ions Cu^{2+} (complexés par les ions tartrate) se transforme en oxyde de cuivre (I) $\text{Cu}_2\text{O}_{\text{(s)}}$ de couleur rouge, stable en milieu fortement basique.
- Étape 2 : refroidir le mélange réactionnel en le plaçant dans un bain-marie d'eau froide.
- Étape 3 : récupérer l'oxyde de cuivre (I) $\text{Cu}_2\text{O}_{\text{(s)}}$ par filtration sur un entonnoir en verre fritté (poreux), en évitant de laisser le solide au contact de l'air. Laver le précipité à l'eau.
- Étape 4 : dissoudre l'oxyde de cuivre (I) $\text{Cu}_2\text{O}_{\text{(s)}}$ récupéré dans une solution aqueuse d'ions $\text{Fe}^{3+} \text{(aq)}$ en excès : une partie des ions $\text{Fe}^{3+} \text{(aq)}$ se transforme en ions $\text{Fe}^{2+} \text{(aq)}$.
- Étape 5 : acidifier le milieu par addition d'un volume de 10 mL d'acide sulfurique concentré et doser les ions $\text{Fe}^{2+} \text{(aq)}$ formés dans l'étape 4 par les ions permanganate $\text{MnO}_4^- \text{(aq)}$.

Cette technique permet, par exemple, de doser le glucose dissous dans le sang.

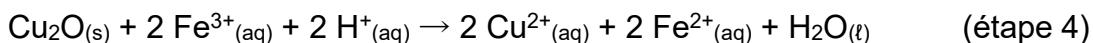
La réaction d'oxydation du glucose par les ions $\text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})}$ apportés par la liqueur de Fehling se traduit, en milieu basique, par l'équation :



Du fait d'une réaction chimique concurrente, la quantité de matière de glucose consommée et la quantité d'oxyde de cuivre (I) formée **ne sont pas égales**.

C'est pourquoi il faut utiliser une courbe de correspondance (courbe de Bertrand) donnée en **annexe 4 à rendre avec la copie** pour exploiter cette étape du mode opératoire.

La réaction d'oxydoréduction entre l'oxyde de cuivre (I) et les ions $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$ se traduit, en milieu acide, par l'équation de réaction :



Le dosage des ions $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ ainsi formés a nécessité un volume $V_E = 8,55 \text{ mL}$ de solution aqueuse d'ions permanganate $\text{MnO}_4^{-}_{(\text{aq})}$ de concentration $C = 0,0205 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.1. Cette réaction implique les couples $\text{MnO}_4^{-}_{(\text{aq})} / \text{Mn}^{2+}_{(\text{aq})}$ et $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})} / \text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$.

Écrire les deux demi-équations associées à chacun de ces couples, puis l'équation de la réaction d'oxydoréduction entre les ions $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ et les ions permanganate $\text{MnO}_4^{-}_{(\text{aq})}$ en milieu acide.

2.2. Calculer la quantité de matière $n(\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})})$ dosée. Justifier la réponse.

2.3. La masse d'ions $\text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})}$ qui a réagi avec le glucose vaut 55,6 mg.

À l'aide de la courbe de Bertrand donnée dans **l'annexe 4 page 12 à rendre avec la copie**, déterminer la masse de glucose contenue dans l'échantillon étudié, puis déterminer la concentration massique de la solution de glucose dosée. Commenter la valeur trouvée sachant qu'une glycémie normale à jeun est comprise entre $0,70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $1,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

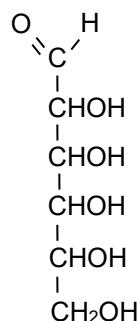
3. Dosage spectrophotométrique du glucose par voie enzymatique

Cette technique de dosage, spécifique au glucose, se fait en deux étapes. Le glucose aqueux $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ est d'abord oxydé par le dioxygène de l'air, à température ambiante, en présence de l'enzyme glucose-oxydase (GOD) pour former de l'acide gluconique $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$ et de l'eau oxygénée H_2O_2 . Puis, l'eau oxygénée H_2O_2 formée réagit avec le phénol et la 4-aminoantipyrine, à température ambiante, en présence de l'enzyme peroxydase (POD) pour former une quinonéimine (espèce chimique colorée dont le maximum d'absorption se situe entre 500 nm et 510 nm).

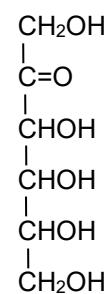
Le mode opératoire consiste à prélever 10 μL de l'échantillon à analyser, à y rajouter, sous hotte ventilée, 1 mL des réactifs en kit (contenant phénol, 4-aminoantipyrine, tampon phosphate et les enzymes GOD, POD, dans les proportions optimales), à laisser agir 15 min à température ambiante et enfin à mesurer l'absorbance du mélange avec un spectrophotomètre pour en déduire la concentration molaire en glucose.

Question :

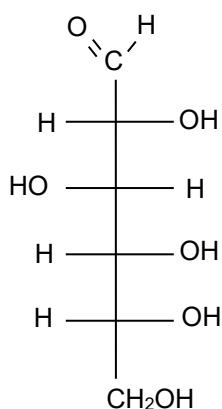
En laboratoire d'analyse, cette méthode est privilégiée par rapport à la méthode de Bertrand. Justifier cette affirmation en analysant les facteurs suivants : durée, sécurité et sélectivité du dosage.

ANNEXE 1 À RENDRE AVEC LA COPIE

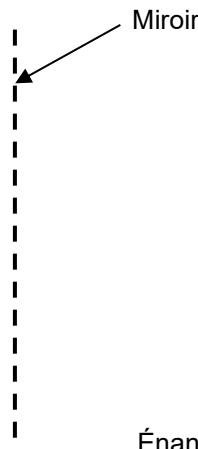
Glucose



Fructose

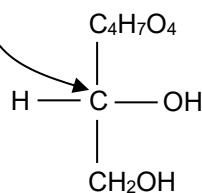


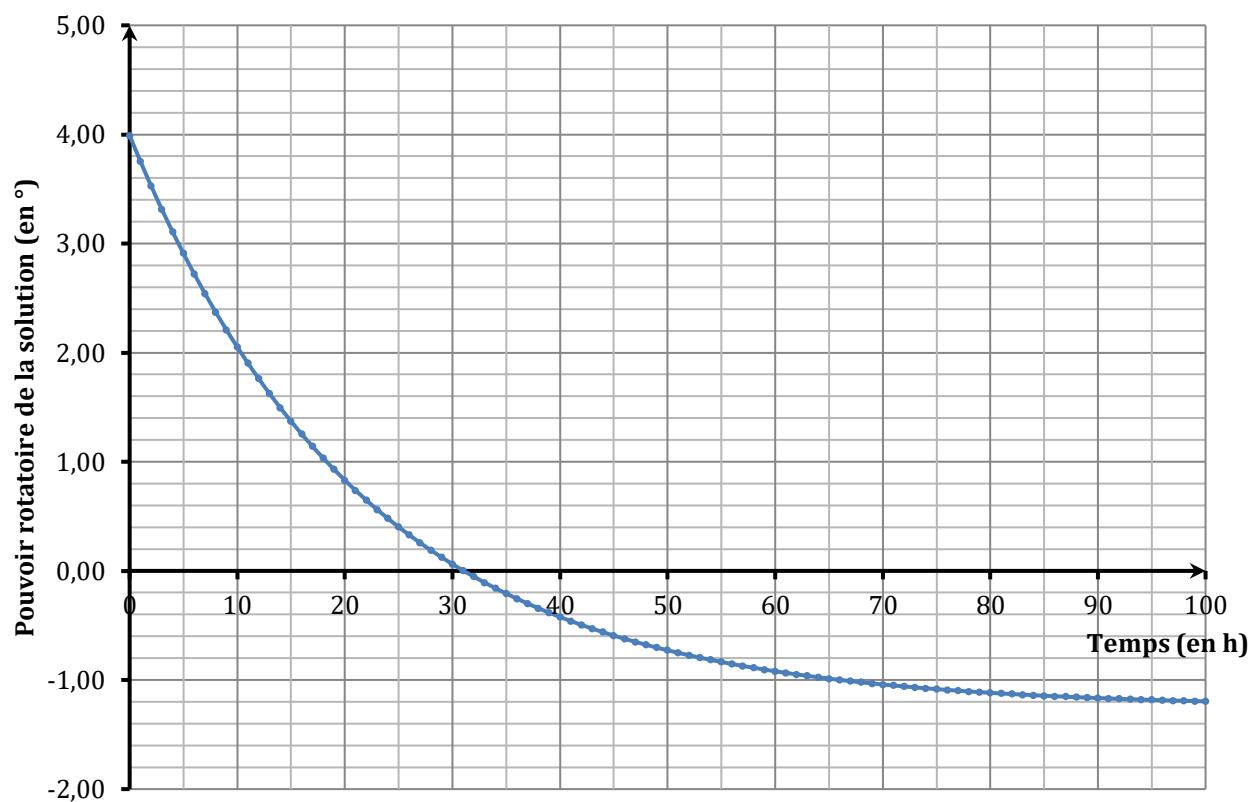
Représentation de Fischer du D-glucose

Énantiomère du D-glucose :
(à représenter et à nommer)

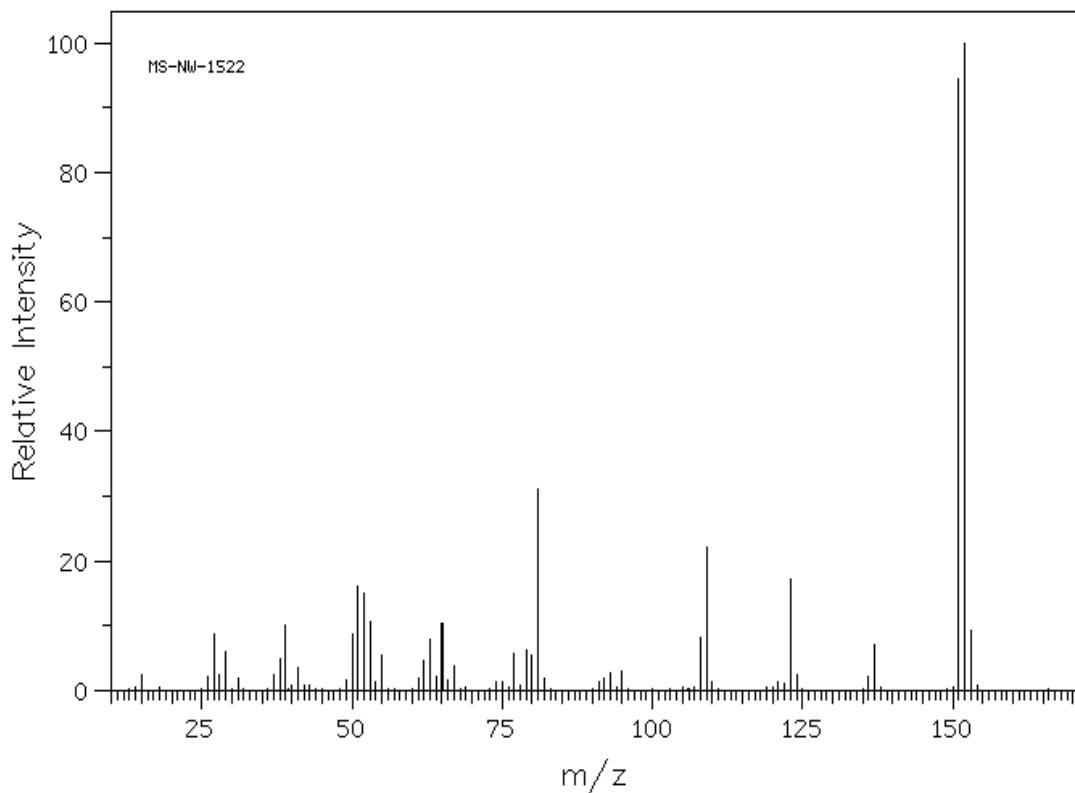
Molécule de glucose avec l'atome de carbone n°5 de configuration absolue R (à dessiner en représentation de Cram dans ce cadre) :

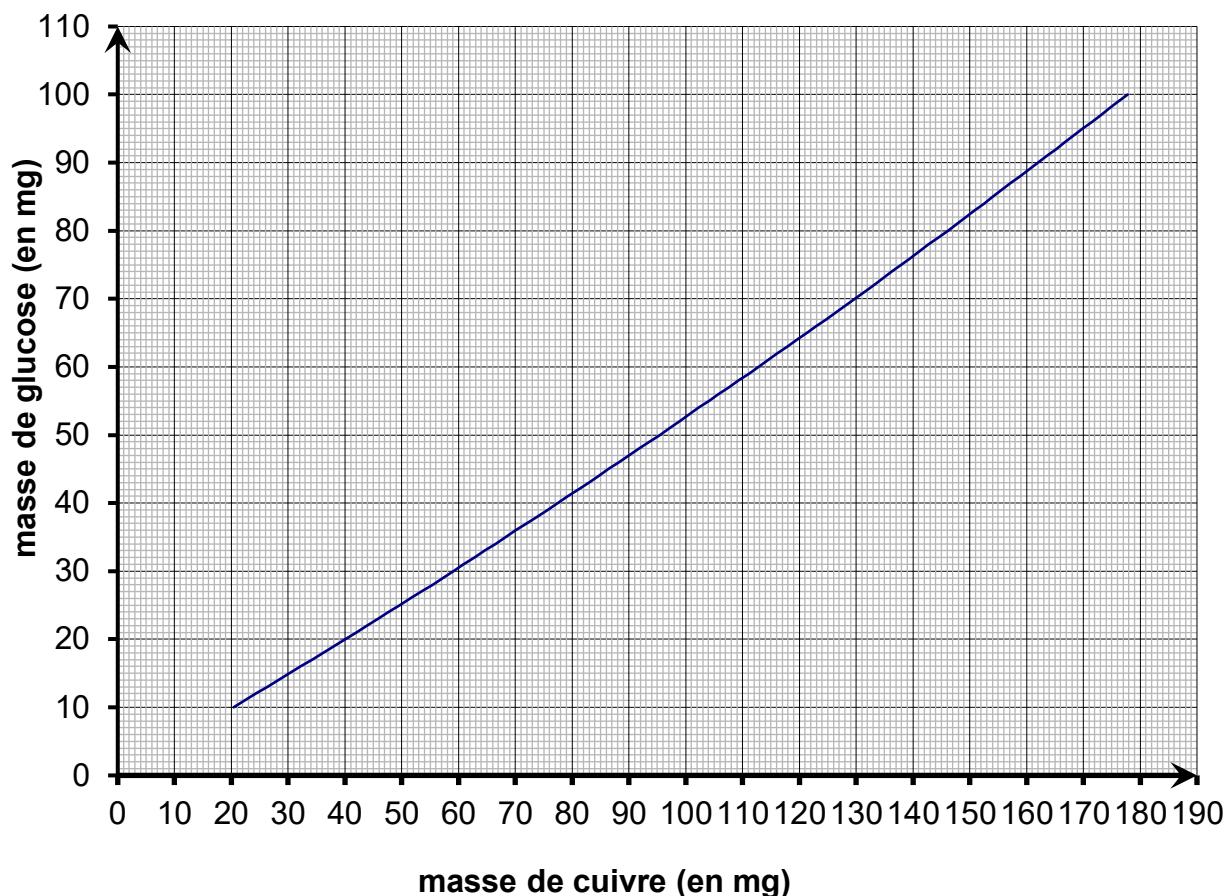
Atome de carbone n°5



ANNEXE 2**ANNEXE 3**

Spectre de masse (d'après Spectral Database for Organic Compounds SDBS / Japan)



ANNEXE 4 À RENDRE AVEC LA COPIE**Courbe de Bertrand**

2018 - U2: Biologie moléculaire et génie génétique

Durée 2 h – coefficient 1

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

CRISPR/Cas9, un outil de modification de l'ADN génomique

Le système CRISPR/Cas9 est à l'origine, un système bactérien de protection contre l'infection phagique, qui détruit l'ADN exogène viral. Ses particularités le rendent intéressant comme outil du génie génétique notamment pour réaliser la modification ciblée de séquences choisies de l'ADN génomique d'organismes procaryotes ou eucaryotes.

1. Fonctionnement de l'outil CRISPR/Cas9 (2 points)

L'outil CRISPR/Cas9 repose sur l'action de deux composantes moléculaires : l'ARN guide et l'enzyme Cas9.

Le document 1 présente le mode de fonctionnement de cet outil.

- 1.1 Expliquer le rôle de l'ARN spécifique dans l'ARN guide.
- 1.2 Indiquer le type d'enzyme auquel appartient Cas9 puis préciser le type de liaison covalente clivé par ce type d'enzyme.
- 1.3 Désigner le processus par lequel la coupure double brin de l'ADN génomique cible est réparée dans la cellule hôte.

2. Production des composantes de l'outil CRISPR/Cas9 au laboratoire de génie génétique (9,5 points)

Le document 2 présente des extraits du manuel d'utilisation du coffret «GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit» commercialisé par le fournisseur Invitrogen™. Ce coffret contient un vecteur plasmidique qui permet la production des deux composantes de l'outil CRISPR/Cas9, l'ARN guide et l'enzyme Cas9, dans les cellules eucaryotes cibles.

La première étape consiste à construire le vecteur permettant la synthèse de l'ARN guide, spécifique de la séquence d'ADN génomique cible.

Un oligonucléotide double brin est inséré dans la cassette d'expression de l'ARN guide présentée dans le document 2.

- 2.1 Expliquer le rôle du promoteur U6 et du terminateur Pol III. Schématiser et orienter l'ARN produit.
- 2.2 Expliquer, à partir de la carte du vecteur « GeneArt® CRISPR Nuclease OFP Reporter », l'intérêt des extrémités utilisées dans ce cas précis.

Le vecteur recombinant est ensuite introduit dans des cellules bactériennes par transformation par choc thermique.

- 2.3 Rappeler les étapes clés à réaliser pour la transformation des bactéries *E. coli* et indiquer un milieu gélosé permettant de sélectionner les colonies de transformants.

Après la vérification de la qualité des clones obtenus par séquençage, une minipréparation d'ADN plasmidique est effectuée à partir des clones recombinés. L'ADN plasmidique est ensuite transfété dans les cellules eucaryotes cibles.

- 2.4 Citer deux méthodes de transfection des cellules eucaryotes animales puis présenter succinctement leur principe.
- 2.5 À partir de la carte du vecteur, identifier les séquences qui permettent l'expression de Cas9 dans une cellule eucaryote et rappeler leur rôle.
- 2.6 Schématiser la protéine de fusion orientée, produite à partir du vecteur dans les cellules eucaryotes. Expliquer l'importance de la séquence NLS pour l'activité de Cas9.
- 2.7 Préciser comment repérer les cellules transfectées exprimant cette protéine de fusion.

3. Mise au point de l'outil CRISPR/Cas9 pour modifier l'ADN génomique du ver *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (6,5 points)

L'utilisation de l'outil CRISPR/Cas9 pour la modification de l'ADN génomique des cellules du nématode *C. elegans* nécessite plusieurs étapes de mise au point.

Les chercheurs ont notamment testé l'efficacité d'une insertion ciblée (Knock-in) du gène codant la protéine fluorescente verte (« green fluorescent protein » ou GFP) dans le gène d'une protéine musculaire du ver, *NMY-2*.

Le document 3 présente la stratégie de modification de l'ADN génomique du ver.

3.1 Expliquer les étapes de l'insertion ciblée du gène *gfp* dans le gène *nmy-2* de *C. elegans*.

La vérification de l'intégration correcte du gène *gfp* dans le gène *nmy-2* de *C. elegans* est réalisée sur trois lignées de cellules de vers par génotypage.

La première étape du génotypage consiste en l'extraction de l'ADN génomique des vers selon le protocole fourni dans le document 4.

3.2 Expliquer le rôle des réactifs indiqués en gras dans le protocole d'extraction de l'ADN génomique.

La deuxième étape du génotypage consiste en une PCR.

Les résultats obtenus pour le génotypage réalisé sur les vers A, B et C, avec les amorces de PCR 1, 2, 3 ou 4, sont présentés dans le document 5.

3.3 Estimer la taille de chaque amplicon produit par PCR à partir des ADN extraits des vers A, B et C. Interpréter les résultats et identifier le ou les vers possédant la construction finale attendue *nmy-2 :: gfp*.

L'efficacité de la technologie CRISPR/Cas9 est comparée à une simple transfection de l'ADN *gfp :: nmy-2* par biolistique. La protéine de fusion NMY-2 - GFP est observée en microscopie optique au même stade du développement embryonnaire de *C. elegans*. Les clichés sont présentés dans le document 6.

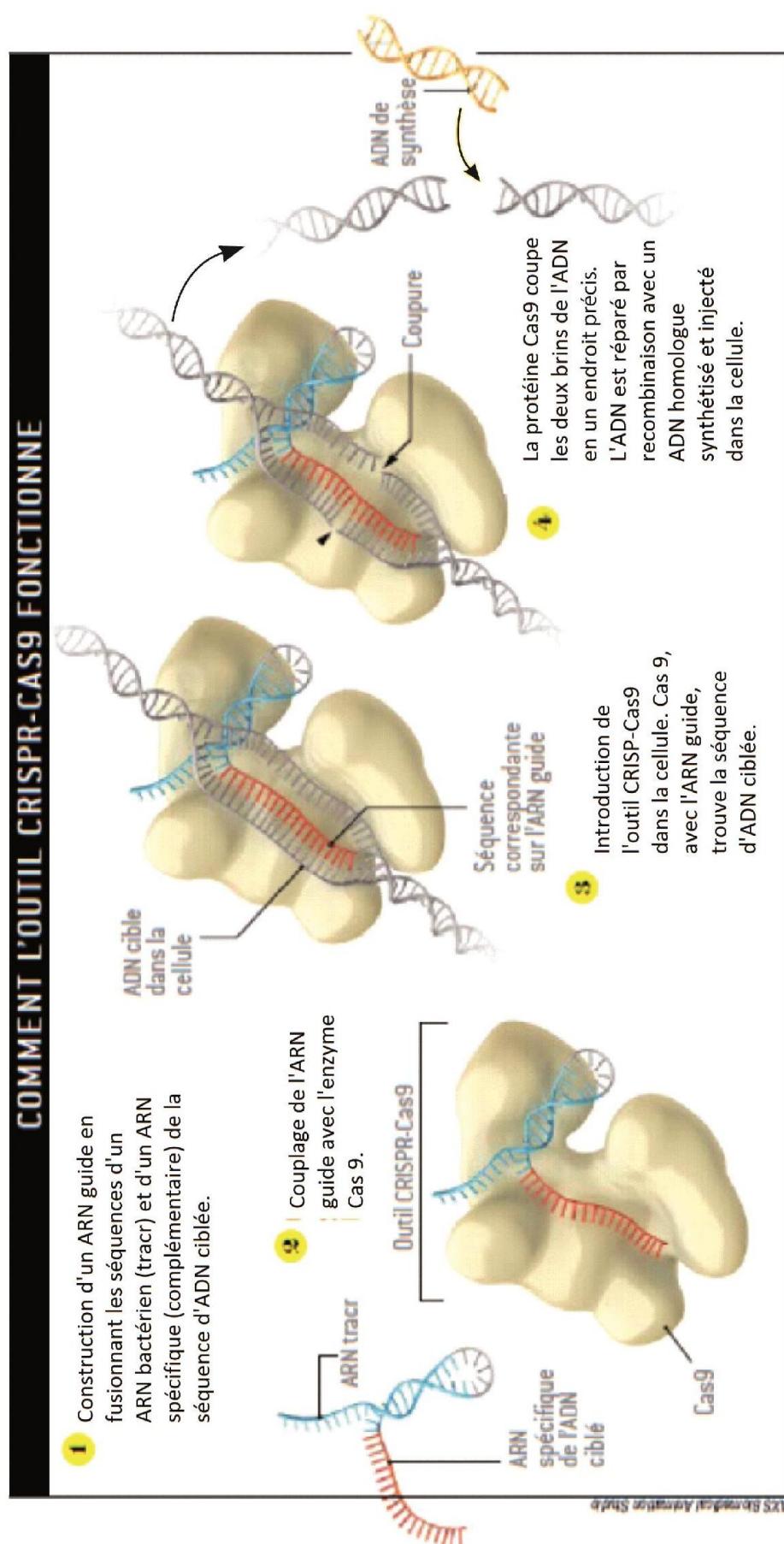
3.4 À partir de l'analyse des images, conclure quant à l'efficacité de l'outil CRISPR/Cas9 dans cette expérience.

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

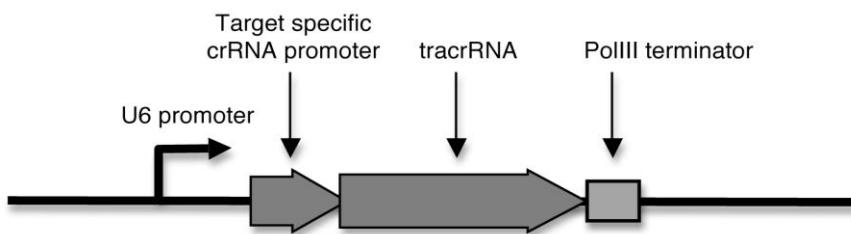
Document 1 : Fonctionnement de l'outil CRISPR/Cas9



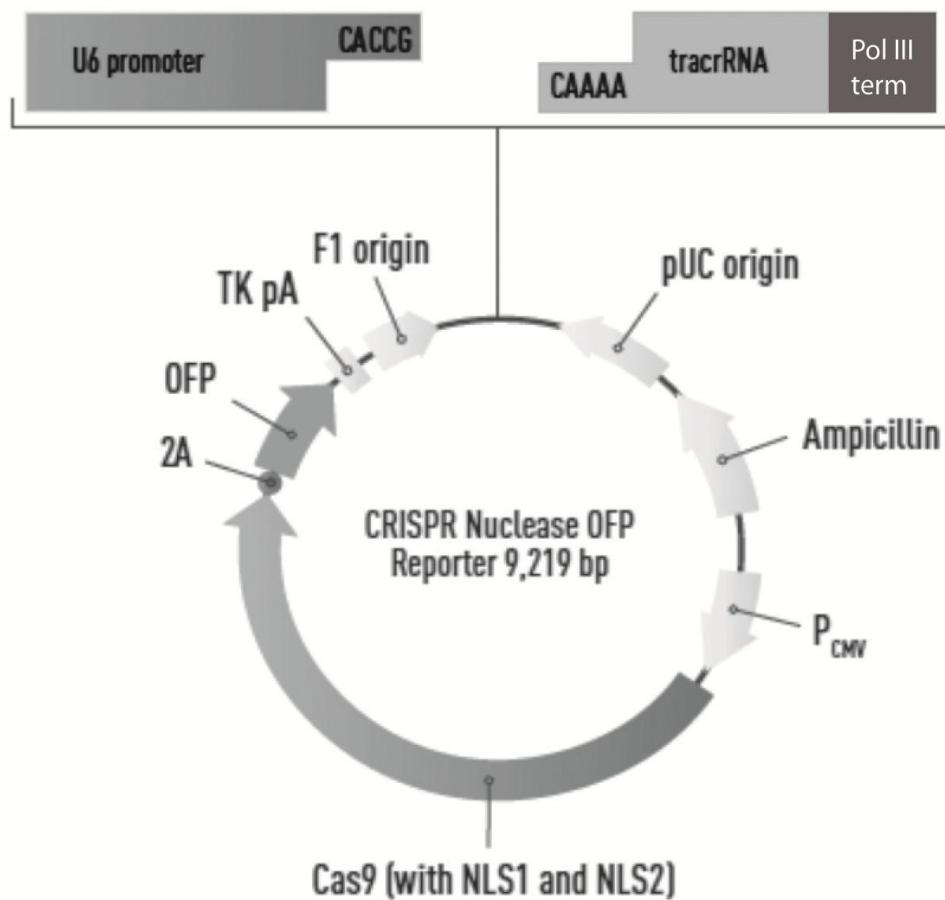
CHARPENTIER Emmanuelle, KALDY Pierre. CRISPR/Cas9, l'outil qui révolutionne la génétique. Pour la Science, 2015, n° 456, page 29.

Document 2 : Extraits du manuel d'utilisation du coffret “GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit” du fournisseur Invitrogen™

Cassette d'expression de l'ARN guide



Carte du vecteur “GeneArt® CRISPR Nuclease OFP Reporter”



Légende :

P_{CMV} = promoteur provenant du cytomégalo virus

2A : séquence codant le peptide 2A. Site de clivage par une protéase.

OFP = gène codant une protéine fluorescente orange

TK pA = séquence de polyadénylation du gène de la thymidine kinase

U6 promoter = promoteur provenant du gène de type III U6

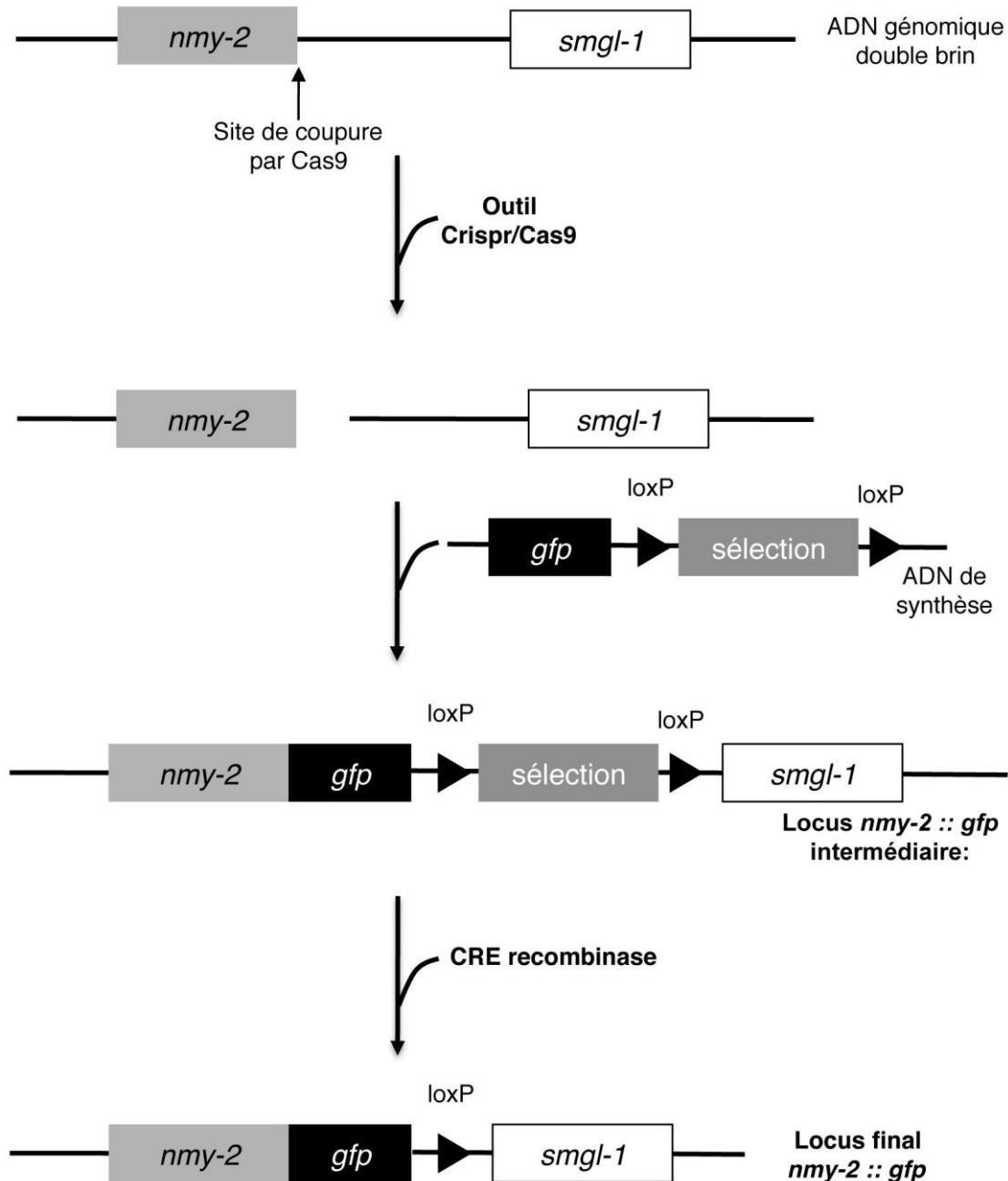
Pol III term = terminateur spécifique de l'ARN polymérase III

NLS = séquence de localisation nucléaire

LIFE TECHNOLOGIES. GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit. **Manuel technique.** 2014, pages 2, 3 et 13.

Document 3 : Modification de l'ADN génomique de *C. elegans* par l'outil CRISPR/Cas9

La stratégie de modification consiste à insérer le gène *gfp* dans le gène *nmy-2* de *C. elegans* pour obtenir le locus *nmy-2 :: gfp*.



Légende :

gfp : gène codant la GFP

sélection : gène de sélection des vers hébergeant la construction génétique

lox P : site de coupure par une enzyme, la Cre recombinase

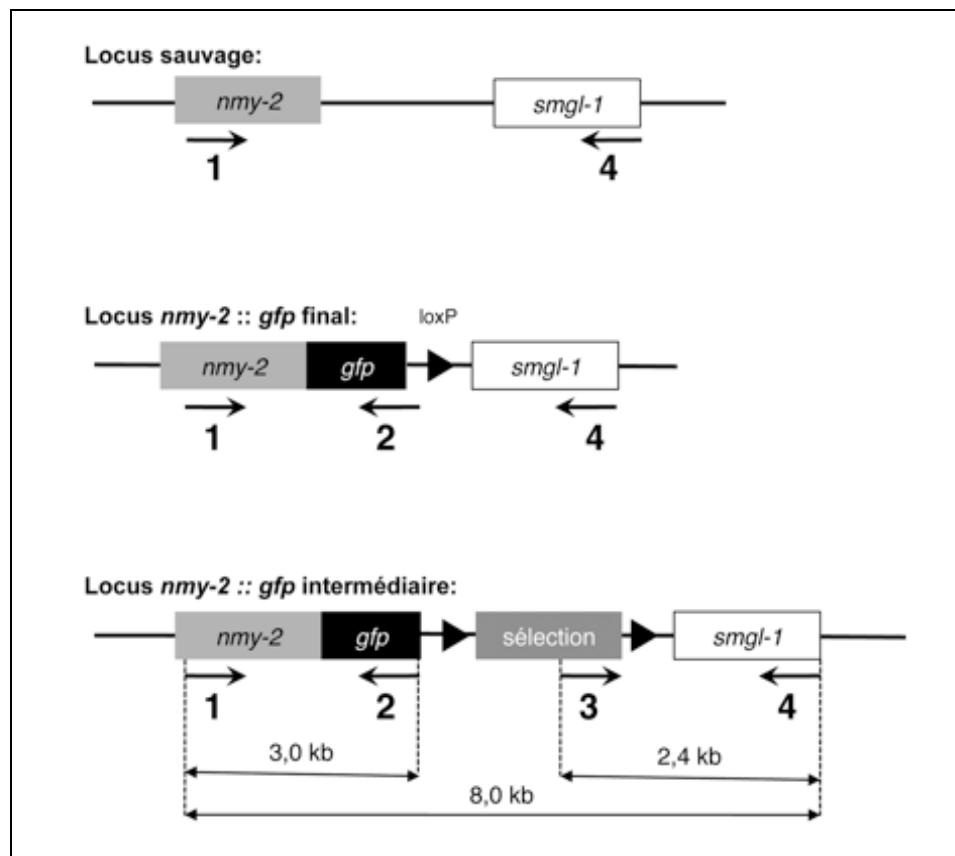
Document 4 : Protocole d'extraction de l'ADN génomique du ver *C. elegans*

- 1 Collect worms from a recently starved plate into a glass conical tube by rinsing off with 3 mL of H₂O. Use glass since worms will stick to plastic.
- 2 Wash worms twice with H₂O to get rid of bacteria, then transfer to an Eppendorf tube using a 1 mL glass pipette.
- 3 Spin, remove as much liquid as possible and freeze.
- 4 Thaw worm pellet and add 200 µL TENSKB (50 mmol•L⁻¹ Tris pH 7,5 ; 10 mmol•L⁻¹ **EDTA** ; 100 mmol•L⁻¹ NaCl ; 0,5 % SDS ; 0,05 mg•mL⁻¹ proteinase K ; 0,5% 2-mercapto-ethanol).
- 5 Resuspend by inverting and place at 60 °C until carcasses dissolve (1-2 hours), mixing by inverting tube every 30 minutes.
- 6 Dilute to 400 µL with H₂O. Extract with equal volume **phenol/chloroform**. Mix by vigorous shaking by hand rather than vortexing to reduce the shearing of DNA. Spin 5 minutes and remove supernatant gently with a cut off 1000 µL Eppendorf pipette tip.
- 7 CHCl₃ extract once.
- 8 Ethanol precipitate by adding 40 µL of 3 mol•L⁻¹ sodium acetate (pH 5,2-6,0) and 1 mL of **ethanol 100 % (v/v)**. Spin 10 minutes at 4 °C at full speed in microfuge.
- 9 Wash pellet with 70 % ethanol to remove salts.
- 10 Re-suspend in 100 µL TE. Add 0,5 µL 10 mg•mL⁻¹ RNase. Incubate 30 minutes at 37 °C.

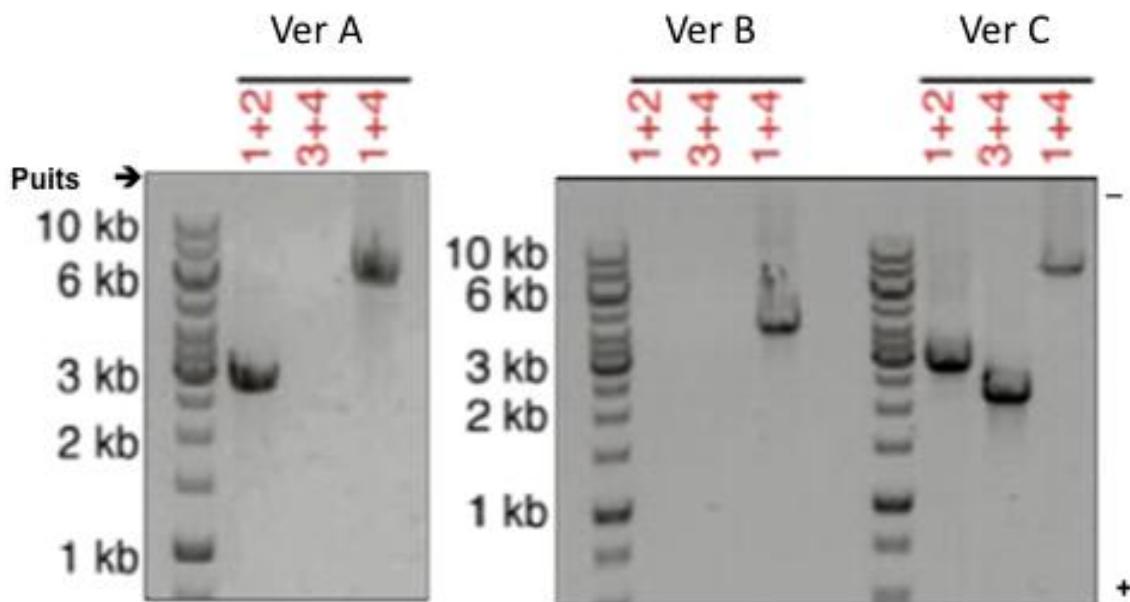
D'après LISSEMORE JL and col.. Isolation of *C. elegans* genomic DNA and detection of deletions in the unc-93 gene using PCR. *Biochem Mol Biol Educ.* 2005, May;33(3):219-26.

Document 5 : PCR lors du génotypage des vers A, B et C

Positionnement des amorces de PCR pour le génotypage des vers

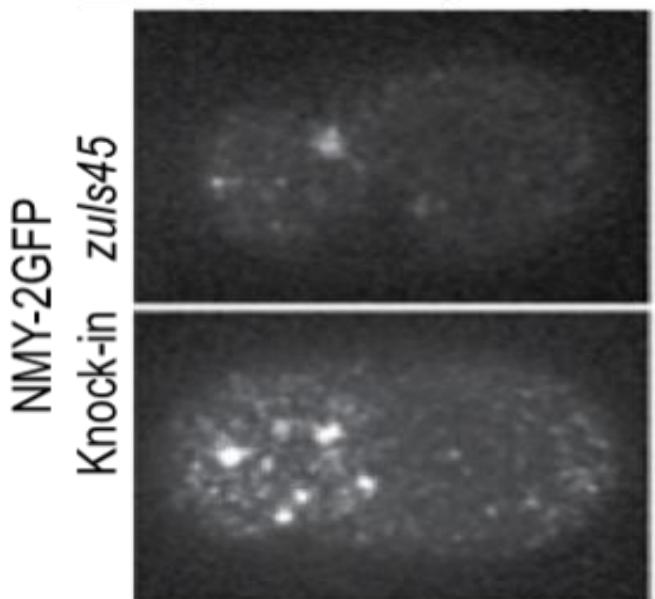


Photographies des gels d'électrophorèse obtenus après migration des produits de PCR du génotypage



Taille des bandes du marqueur (en pb) : 1000 ; 1500 ; 2000 ; 2500 ; 3000 ; 3500 ; 4000 ; 5000 ; 6000 ; 8000 ; 10000

Document 6 : Microphotographies optiques d'embryons de deux souches de *C. elegans* au même stade de développement.



- *zul/s45* : Souche de *C. elegans* exprimant la protéine de fusion NMY-2 – GFP après transfection d'un vecteur d'expression par biolistique.
- Knock-in : Souche de *C. elegans* modifiée par l'outil CRISPR/Cas9

DICKINSON DJ, WARD JD, REINER DJ, GOLDSTEIN B. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods.* 2013 Oct ; 10(10):1028-34.

2018 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée 2 h – coefficient 1

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

La L-asparaginase : biomolécule thérapeutique

L'effet antitumoral de la L-asparaginase (L-ASNase) a été mis en évidence dans les années 1950. Depuis, l'enzyme a été extraite des bactéries *Escherichia coli* ou *Erwinia carotovora* et commercialisée. Une troisième forme commerciale a été développée par liaison de l'ASNase issue d'*Escherichia coli* à des molécules de polyéthylène glycol. Récemment, une société biopharmaceutique française s'est également lancée dans le développement de L-asparaginase encapsulée dans des globules rouges, qui a l'avantage de présenter une toxicité moins importante.

On se propose d'étudier quelques caractéristiques de cette enzyme.

1. Étude de L-asparaginase encapsulée (3 points)

Le document 1 présente le principe d'action du médicament utilisé dans le traitement, à la L-asparaginase, de certains cancers du sang.

L'asparaginase (E.C.3.5.1.1) encapsulée à l'intérieur des globules rouges contribue à un traitement anti-cancéreux original et efficace. L'encapsulation réduit significativement les effets secondaires (réactions allergiques, toxicité sur cellules non tumorales, ...).

- 1.1 Écrire la réaction catalysée par la L-asparaginase. Préciser la classe d'enzyme à laquelle appartient la L-asparaginase.
- 1.2 Expliquer l'intérêt d'utiliser la L-asparaginase dans ce traitement.

L'encapsulation est une technique d'immobilisation des enzymes par rétention physique. Elle diminue l'apparition des phénomènes de résistance au médicament.

- 1.3 Expliquer l'intérêt d'encapsuler la L-asparaginase. Présenter sommairement une méthode d'immobilisation autre que par rétention physique.
Rappeler les principaux avantages et inconvénients de l'immobilisation des enzymes.

2. Extraction et purification de la L-asparaginase d'*Erwinia carotovora* (8 points)

La L-asparaginase issue d'*Erwinia carotovora* semblerait être mieux tolérée que celle d'*Escherichia coli*. Cette protéine, de masse moléculaire de 150 kDa, présente une structure et un comportement électrophorétique différents de ceux de la L-asparaginase d'*Escherichia coli*.

Le document 2 présente les étapes de la purification de cette enzyme. Le pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium nécessaire à la précipitation de la L-asparaginase est de 70%.

- 2.1 Expliquer le principe de la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 2.2 Calculer la masse de sulfate d'ammonium à ajouter à 100 mL d'extrait brut pour atteindre ce pourcentage de saturation.
(La quantité de sels présents dans le milieu avant précipitation est négligeable.)

Le document 2 présente des informations techniques utiles au choix d'une phase stationnaire adaptée pour la conduite de la gel filtration.

2.3 Argumenter la nécessité d'une étape de gel filtration consécutive à la précipitation au sulfate d'ammonium.

À l'aide des valeurs des domaines de fractionnement, prévoir le comportement de la L-ASNase dans chacune des deux phases stationnaires.

Montrer que les volumes d'élution obtenus dans les deux cas sont cohérents avec ce comportement. Discuter du choix de la phase stationnaire.

2.4 Calculer l'activité spécifique z_{sp} (en $\text{UI} \cdot \text{mg}^{-1}$) pour l'extrait brut et pour la fraction purifiée finale après chromatographie sur DEAE Sephadex (équations aux grandeurs et aux valeurs numériques exigées).

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

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS PAGE) et en conditions réductrices a été réalisée lors du suivi de la purification. Les résultats sont présentés dans le document 3.

2.5 Estimer la masse moléculaire correspondant à la bande obtenue après purification. Montrer que la L-asparaginase est un homotétramère. Comparer les résultats obtenus pour l'extrait brut et pour la fraction purifiée. Conclure.

2.6 Expliquer les informations complémentaires apportées par la réalisation d'une électrophorèse SDS PAGE en conditions non réductrices.

3. Étude de l'influence de quelques composés sur les paramètres cinétiques de la L-asparaginase (4 points)

Une amélioration de l'efficacité du traitement pourrait passer par l'ajout de certains composés à la L-asparaginase encapsulée.

Dans cette perspective, l'influence de quelques cations et d'un composé organique a tout d'abord été étudiée. Les conditions de mesure de l'activité enzymatique et les résultats obtenus sont rassemblés dans le document 4.

3.1 Analyser les résultats obtenus en présence des ions Mg^{2+} et K^+ pour en déduire l'effet de chacun de ces ions sur l'enzyme.

Sachant que l'EDTA est un agent chélateur, proposer une explication des résultats obtenus en présence de ce réactif.

Une attention plus particulière s'est ensuite portée sur l'influence des groupements thiols. Les groupements thiols caractérisent une famille de composés organiques comportant un groupement SH lié à un atome de carbone.

Dans cette famille on trouve des molécules telles que la L-cystéine ou le glutathion réduit. La constante de Michaélis (K_M) et la vitesse initiale maximale de la réaction (v_{imax}), ont été déterminées en présence ou en absence de ces composés (document 5).

3.2 Analyser les résultats présentés et conclure quant aux actions des deux effecteurs testés sur les paramètres cinétiques de l'enzyme (K_M et v_{imax}).

Le document 6 présente un modèle de mécanisme d'action des composés organiques comportant des groupements thiol (T) sur la L-asparaginase.

3.3 Montrer que la modification de l'affinité mesurée en présence des effecteurs est en adéquation avec le modèle proposé.

4. Dosage des anticorps anti-L-asparaginase dans le plasma des patients traités par l'enzyme (3 points)

Dans certains cas, l'inefficacité du traitement au médicament est due à la production d'anticorps anti L-asparaginase par l'organisme. Un test ELISA a été mis au point pour déterminer la concentration en anticorps plasmatiques.

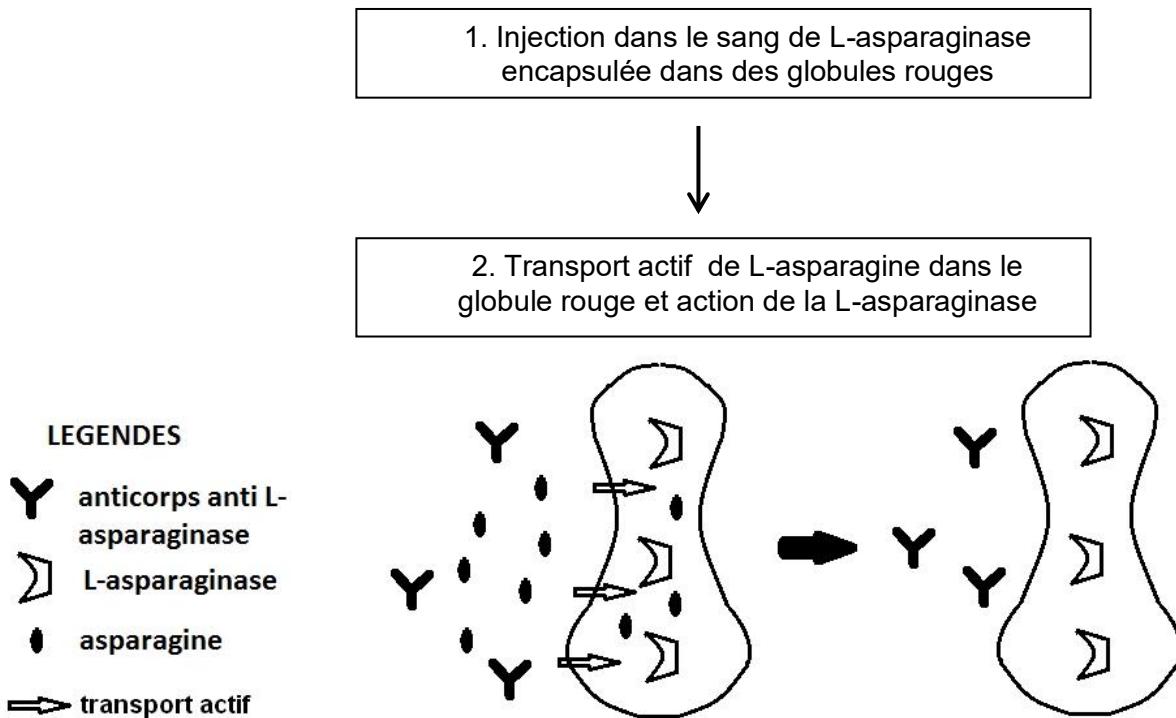
Le document 7 présente le protocole utilisé.

- 4.1 Réaliser un schéma annoté montrant le contenu moléculaire d'une cupule positive. Présenter les caractéristiques de l'anticorps conjugué utilisé, en précisant son site de fixation.
- 4.2 Expliquer l'évolution attendue du signal en fonction de la concentration en anticorps anti L-asparaginase du plasma.

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 : Principe d'action du médicament : L-asparaginase encapsulée



Le principe du traitement est d'éliminer l'asparagine circulante, nutriment important des cellules cancéreuses, en utilisant une enzyme spécifique : la L-asparaginase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de la L-asparagine en acide L-aspartique et ammoniac (NH_3).

Document 2 : Purification de la L-asparaginase de *Erwinia carotovora*.

Les différentes étapes de la purification

Étapes de purification	Activité catalytique totale z (UI)	Masse de protéines totales (mg)
Extrait brut	10000	5000
Précipitation au sulfate d'ammonium	5000	1400
Gel filtration sur Sephadex G-75	4100	249
Chromatographie CM cellulose	3172	10
Chromatographie DEAE Sephadex	3000	3

Masse (g) de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution protéique pour atteindre le pourcentage de saturation désiré.

Le tableau indique les masses de sulfate d'ammonium (en gramme) à ajouter à un litre de solution pour obtenir le pourcentage de saturation désiré en fonction du pourcentage de saturation de la solution initiale.

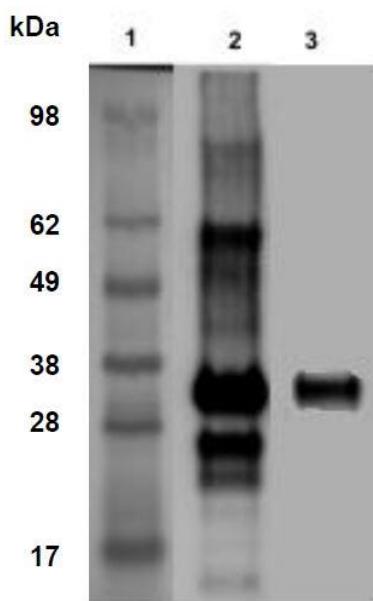
% de saturation initial	% de saturation final						
	55 %	60 %	65 %	70 %	75 %	80 %	100 %
0 %	351 g	390 g	430 g	472 g	516 g	561 g	767 g
10 %	288 g	326 g	365 g	406 g	449 g	494 g	694 g
15 %	256 g	294 g	333 g	373 g	415 g	459 g	657 g
20 %	225 g	262 g	300 g	340 g	382 g	424 g	619 g
25 %	193 g	230 g	267 g	307 g	348 g	390 g	583 g

2.c : Informations techniques relatives à la conduite de l'étape de gel filtration

Phases stationnaires testées	V mort (mL)	V total (mL)	V élation Asparaginase (mL)	Débit (mL•min ⁻¹)	Dimensions colonne	Domaines de fractionnement (kDa)
Sephadex G-75	100	265	101	2	2,6 cm x 60 cm	3 à 80
Superdex 200	112	250	158	2		10 à 1300

Composition de la phase mobile : tampon TrisHCl à 50 mM + KCl 100 mM, à pH 8,5

Document 3 : Analyse des fractions de purification sur SDS PAGE en conditions réductrices



Piste 1 : Marqueurs de masse moléculaire.
 Piste 2 : Extrait brut.
 Piste 3 : Fraction protéique après purification sur DEAE Sephadex.

Document 4 : Influence de différents composés sur l'activité L-asparaginase

Réactif	Concentration du réactif (mmol·L ⁻¹)	Activité L-asparaginase relative (%)
aucun	0	100
Mg ²⁺	1,0	24
K ⁺	1,0	133
EDTA	0,5	117

Une préincubation de l'enzyme de 20 minutes à 37 °C en présence du composé testé est réalisée.

L'activité résiduelle est ensuite déterminée dans des conditions optimales de concentration en L-asparagine.

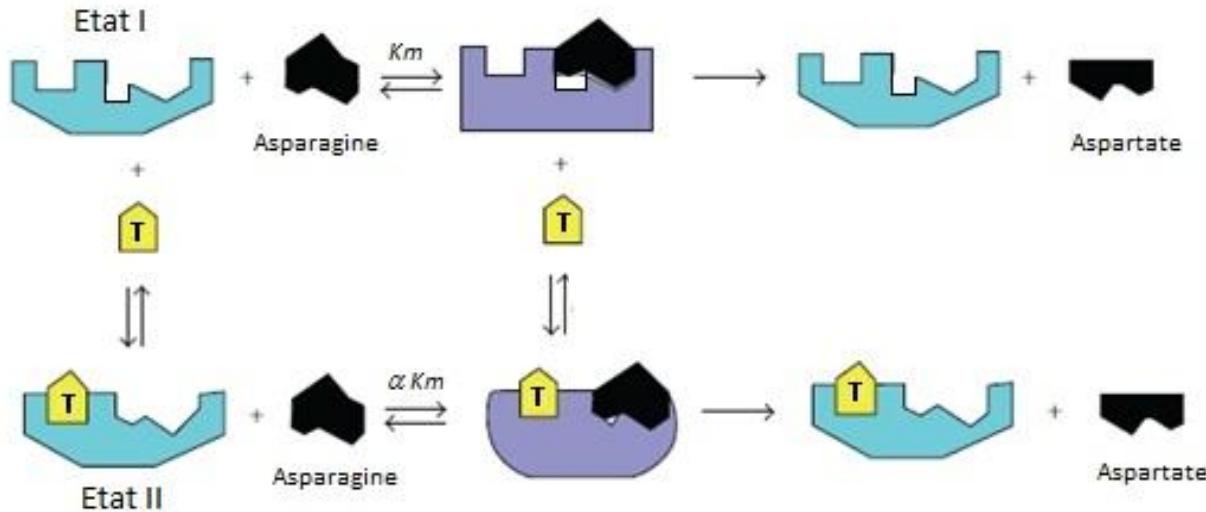
Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité de l'enzyme en absence d'effecteur.

Document 5 : Effet des composés à groupements thiols sur les paramètres cinétiques de l'enzyme.

Effecteur testé	K _M (mmol·L ⁻¹)	V _{imax} (μmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)
Témoin*	0,098	1700
Cystéine	0,086	2000
Glutathion (forme réduite)	0,055	2500

* Témoin réalisé sans effecteur

Document 6 : Modèle de mécanisme d'action des composés organiques comportant des groupements thiols sur la L-asparaginase.



Document 7 : Protocole de dosage des anticorps anti L-asparaginase par technique ELISA

Ninety-six-well plates were coated with 50 μ L/well L-asparaginase diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4 °C.

Plates were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20 (PBS/Tween), and then blocked with 100 μ L/well of 4% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at room temperature.

After washing, 50 μ L of patient plasma diluted as indicated in PBS/Tween/1% BSA were pipetted into wells and incubated overnight at 4 °C. Plasma samples were subsequently removed, and plates were washed three times prior to the addition of 100 μ L/well of sheep anti- IgG conjugated to horseradish peroxidase diluted in PBS/Tween/1% BSA.

After 2 h incubation at room temperature, the plates were washed three times again and all wells were then reacted with 100 μ L of ABTS Single Solution chromogen/substrate for 20 min in the dark.

The reaction was halted by the addition of 100 μ L/well of stop solution (0.01% sodium azide, 1% SDS). The absorbance of each well was measured at 415 nm.

Sources :

Document 1 :

ERYTECH PHARMA

Documents 2 à 6 :

Suchita C. et al. (2010), *Purification, characterisation, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase*, Enzyme Research, vol. 2010.

Document 7 :

Kidd J.A et al (2014), *Development of an ELISA to detect circulating anti-asparaginase antibodies in dogs with lymphoid neoplasia treated with *E. coli* L-asparaginase*, Vet. Comp. Oncol.

2018 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français, tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

***Komagataella pastoris* : Production l'antigène HBs du virus de l'hépatite B**

Malgré l'existence d'un vaccin efficace à base de l'antigène de surface (HBs) du virus, l'hépatite B est une maladie chronique qui affecte près de deux milliards de personnes dans le monde. Les vaccins actuels sont trop coûteux à produire pour des pays en voie de développement. Cependant, il serait possible de produire un vaccin à moindre coût en améliorant les techniques actuelles de production utilisant la levure *Komagataella pastoris* génétiquement modifiée.

1. Le virus de l'hépatite B (VHB) (3,5 points)

C'est un virus enveloppé particulièrement résistant. Sa structure est présentée sur le [document 1](#).

La classification virale selon Baltimore est présentée sous forme schématique par le [document 2](#).

1.1 Identifier la place du VHB dans la classification de Baltimore et indiquer la principale différence avec la famille des rétrovirus.

Les différentes étapes du cycle de la réplication virale sont présentées sur le [document 3](#).

1.2 Proposer deux étapes du cycle viral de l'hépatite B pouvant faire l'objet d'un ciblage thérapeutique pour inhiber la prolifération du virus.

Le processus de réplication virale conduit à la formation de particules virales et de particules appelées « Virus-Like Particles » présentées dans le [document 1](#). Ce sont ces dernières, purifiées à partir de prélèvements de porteurs sains, qui ont servi comme vaccin avant l'apparition du Génie Génétique. En effet, elles contiennent l'antigène HBs (HBs Ag), une glycoprotéine de 226 acides aminés permettant la production d'anticorps neutralisants.

1.3 Argumenter le choix d'utiliser des « Virus-Like Particles » comme vaccin.

1.4 Montrer la nécessité d'utiliser la levure plutôt qu'une bactérie comme *E. coli* pour la production des protéines sécrétées.

2. La levure *Komagataella pastoris* (6,5 points)

La levure *Komagataella pastoris* aussi appelée *Pichia pastoris* appartient à l'embranchement des ascomycètes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*. C'est une levure homothallique, mésophile, aérobiose stricte.

Son cycle de vie est présenté [document 4](#).

2.1 Reporter les numéros sur la copie et proposer une légende pour chacun d'eux. Argumenter que cette levure est une levure homothallique.

La ploïdie de *Ko. pastoris* est stable, mais la mitose et la méiose peuvent être induites par des conditions environnementales.

2.2 Préciser la condition environnementale permettant d'induire la fusion des cellules haploïdes et la méiose pour cette levure.

Cette levure est méthylotrophe, c'est à dire qu'elle est capable de cultiver sur des substrats monocarbonés (méthanol, formaldéhyde...) comme seule source de carbone et d'énergie. Le métabolisme du méthanol a lieu dans le péroxyosome, un compartiment cellulaire dont la quantité de vésicules est induite par ces substrats. Ce métabolisme est présenté dans le document 5.

Le méthanol (CH_3OH) est oxydé en formaldéhyde qui est à un carrefour métabolique entre deux voies A et B. Ce métabolisme est étroitement associé à celui de l'oxygène.

2.3 Identifier les molécules produites par ces deux voies métaboliques et dégager le rôle de chacune des voies.

2.4 Identifier l'enzyme X et préciser son importance biochimique.

Ces voies métaboliques sont réprimées en présence de glucides comme le glucose.

2.5 Représenter et commenter la courbe de croissance attendue dans le cas d'une culture dans un milieu contenant à la fois du glucose et du méthanol. Nommer le phénomène observé.

3. Production de l'Antigène HBs (8 points)

Dans le but d'obtenir la production d'antigènes HBs (HBs Ag), une souche de *Ko. pastoris* a été construite par génie génétique. Le gène codant pour HBs Ag a été placé sous la dépendance du promoteur inductible au méthanol AOX1.

La production est réalisée en culture discontinue alimentée (fed-batch) selon le protocole présenté dans le document 6. La culture est conduite en deux phases.

3.1 Déterminer la source de carbone et d'énergie pour chacune des deux phases. Expliquer le rôle de ces deux phases. Relever la durée de la première phase.

Les données de suivi sont présentées dans le document 7.

3.2 À partir de la figure B, déterminer la vitesse spécifique maximale de croissance ainsi que le temps de génération lors de la première phase.

3.3 À partir de la figure A, repérer la valeur de la concentration en biomasse au début de la phase d'alimentation et calculer le rendement de production de biomasse par rapport au substrat glycérol ($R_{X/S}$).

Des résultats de régulation du pH et du suivi de l'apport en ammoniacal sont présentés dans la figure C du document 7.

3.4 Dégager le rôle de la solution d'ammoniacal.

Ko. pastoris est une levure aérobiose stricte. L'oxygénation du milieu est un paramètre critique régulé.

3.5 Justifier l'importance de cette régulation. Citer deux actionneurs (effecteurs) classiques utilisables pour réguler le dioxygène dissous des bioréacteurs.

3.6 Sur la figure D, montrer que la concentration en dioxygène dans le milieu est régulée par le procédé et indiquer l'effecteur de régulation utilisé dans le cas présent. Calculer le débit d'aération par volume de milieu en début de process.

La figure B présente les résultats de la production de l'antigène HBs par *Ko. pastoris* en fonction de la croissance de la levure.

Après la lyse des levures les concentrations en antigène HBs totaux et solubles sont déterminées. Les antigènes solubles sous la forme de « Virus-like particles » sont purifiés pour faire les vaccins.

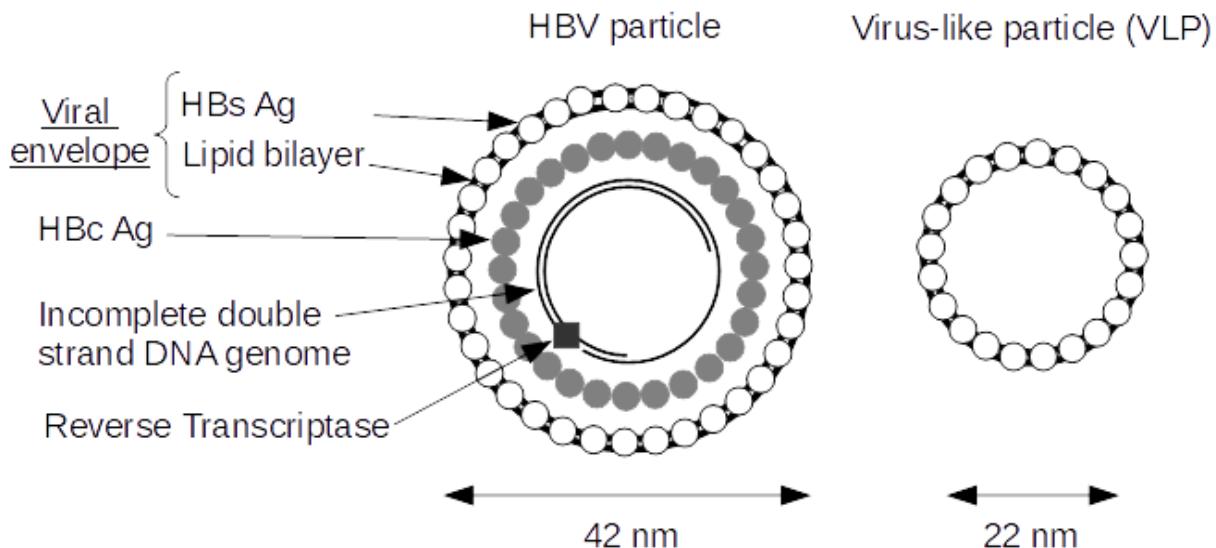
3.7 En considérant que la concentration initiale en antigène HBs est nulle, déterminer la productivité volumique horaire en antigènes HBs solubles de l'inoculation à la fin de production après 200 h. Choisir le temps d'arrêt de production de manière à optimiser ce paramètre et déterminer le gain de productivité volumique horaire.

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

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

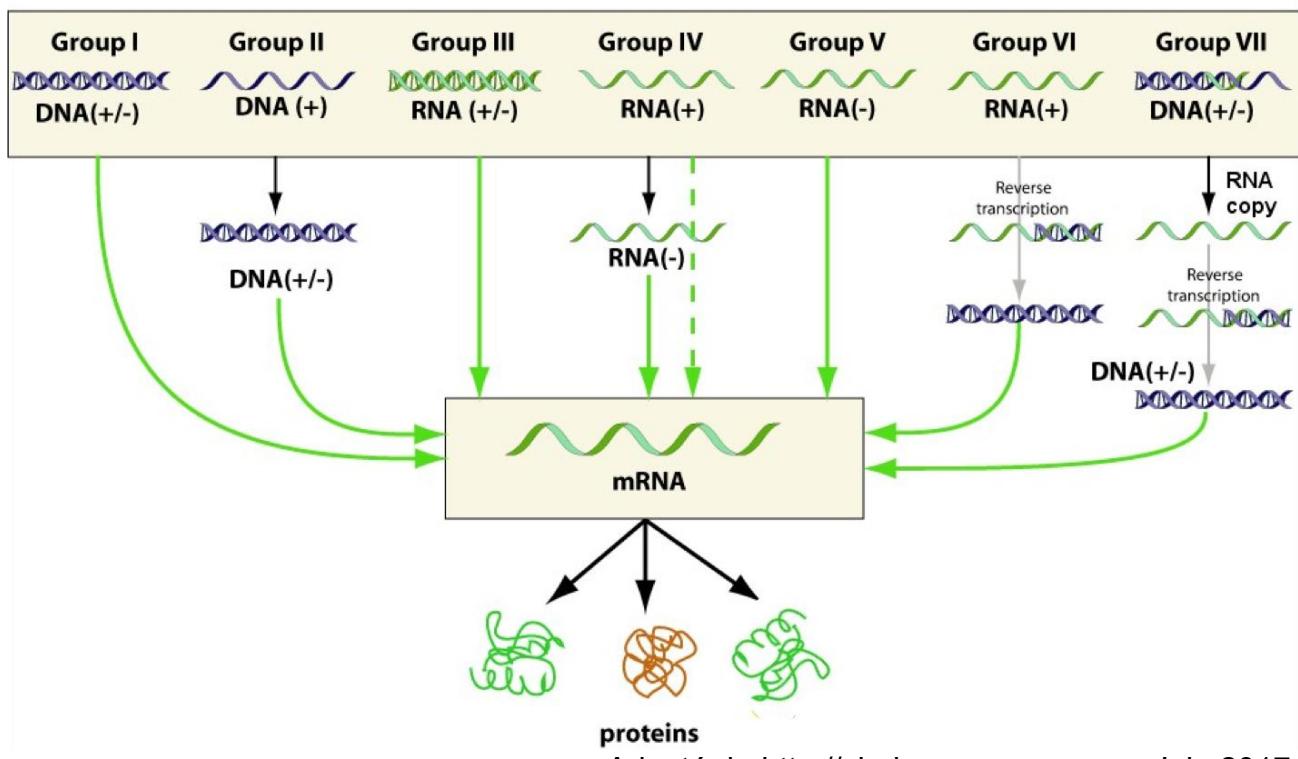
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1 : Hepatitis B virus and virus-like particle



Document 2 : Représentation schématique de la classification des virus selon Baltimore

Genetic material present in the virion



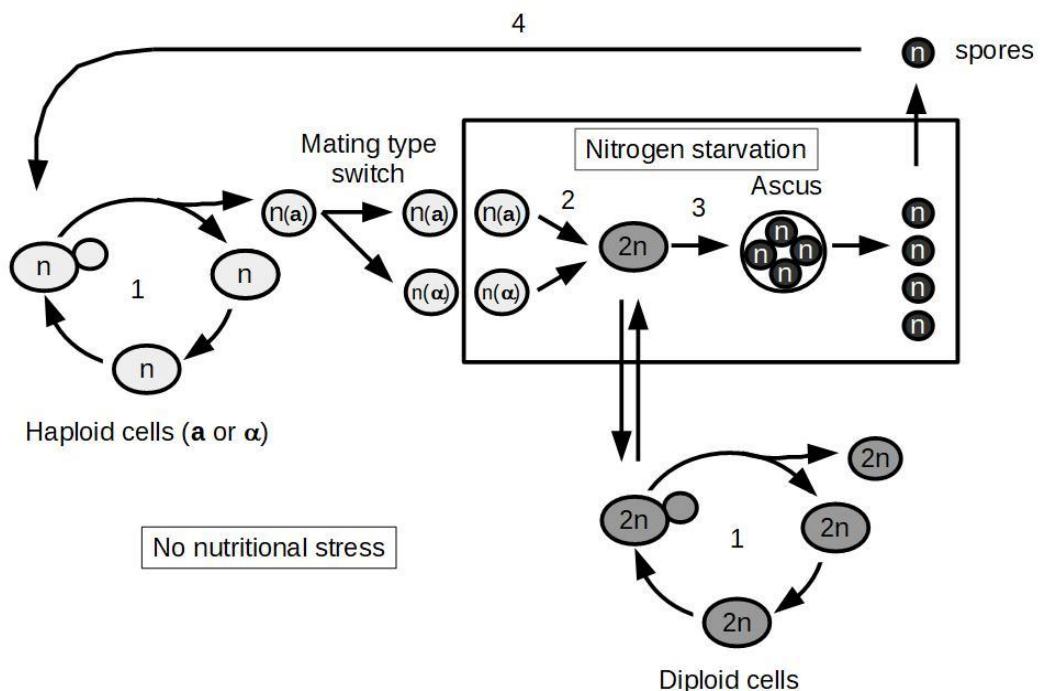
Adapté de <http://viralzone.expasy.org>. Juin 2017

Document 3 : étapes du cycle de réPLICATION du VHB

- Le virus de l'hépatite B se fixe aux récepteurs de l'hôte par le biais d'un antigène de surface et pénètre dans la cellule.
- L'ADN génomique sous forme circulaire relâchée (ADN-CR) et la capside sont transportés jusqu'au noyau dans lequel l'ADN pénètre par un pore nucléaire. L'ADN-CR est réparé pour former de l'ADN circulaire fermé par liaison covalente (ADN-CC).
- L'ADN-CC est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire en ARNm viral et en ARN pré-génomique (ARNpg).
- L'ARN pré-génomique quitte le noyau par exportation à travers les pores nucléaires.
- Dans le cytoplasme, l'ARN pré-génomique est encapsulé et rétro-transcrit à l'intérieur de la nucléocapside pour former un nouvel ADN génomique relâché (ADN-CR).
- Les nucléocapsides contenant l'ADN-CR sont enveloppées à partir du réticulum endoplasmique et les nouveaux virions enveloppés sont libérés par exocytose.

Document 4 : Cycle de reproduction de *Komagataella pastoris*

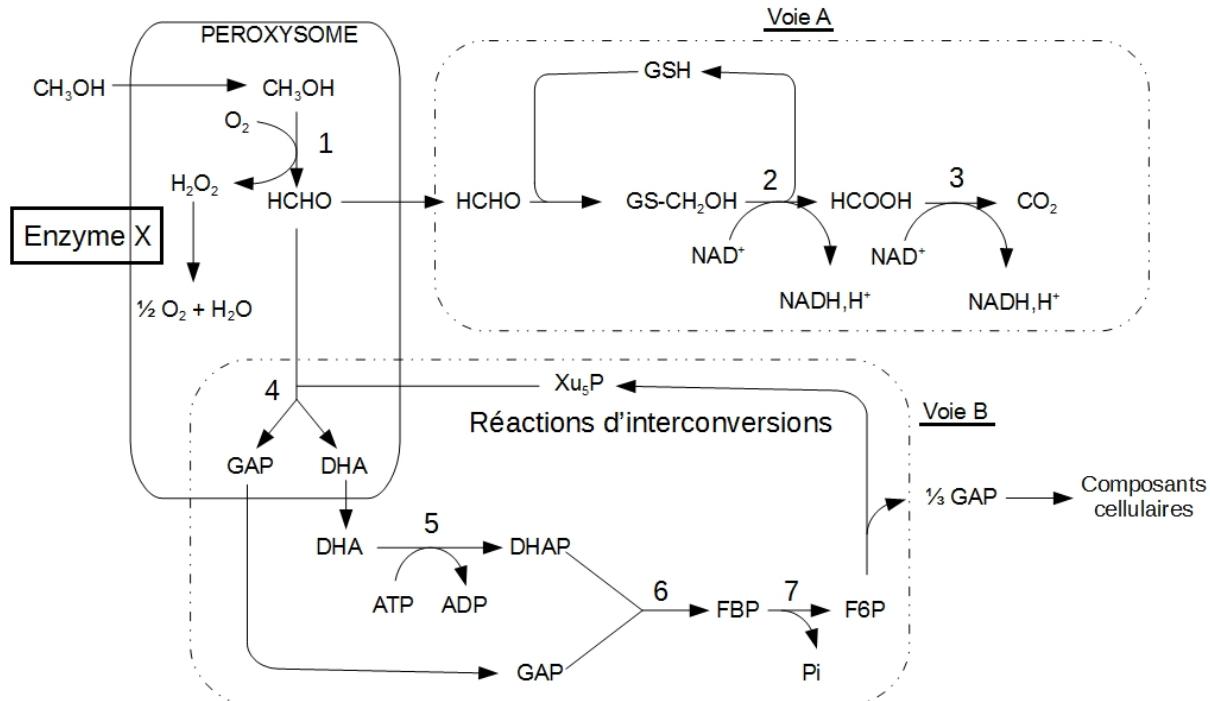
Yeast cells can exist in both a haploid (a) and diploid (b) state. Haploid cells have either mating type **a** or mating type **α**, making them capable of mating with a cell of the opposite mating type only in starvation condition (nitrogen starvation for example). In nutrient-rich conditions, both haploid and diploid cells can proliferate asexually by budding. Diploid cells are heterozygous for the mating type locus (mating type **a/α**), which makes diploids incapable of mating. When exposed to some nutrient-poor conditions, diploids undergo sporulation (meiosis followed by spore formation), resulting in the conversion of a diploid cell into four haploid spores, two possessing mating type **a** and two having mating type **α**, which can germinate into haploid cells when conditions improve. In homothallic strains, the haploid derivatives can undergo a mating type switch together with the mother cell.



Document 5 : Voie métabolique du méthanol chez *Ko. pastoris*

Enzymes : 1, Alcool oxydase ; 2, Formaldéhyde déshydrogénase ; 3, Formate déshydrogénase ; 4, Dihydroxyacétone synthase ; 5, Dihydroxyacétone kinase ; 6, Fructose 1,6 biphosphate aldolase ; 7, Fructose 1,6 biphosphatase

Métabolites : GSH, glutathion ; GAP, Glycéraldéhyde 3-phosphate ; DHA, Dihydroxyacétone ; DHAP, Dihydroxyacétone phosphate ; FBP, Fructose 1,6 biphosphate ; Xu5P, Xylulose 5-monophosphate



Document 6 : High-cell density fed-batch cultivation, culture conditions and control

Cultivation was carried out in a 15 L bioreactor. A 1 L inoculum was transferred to the bioreactor containing 9 L growth medium. Initial biomass is $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (cell dry biomass).

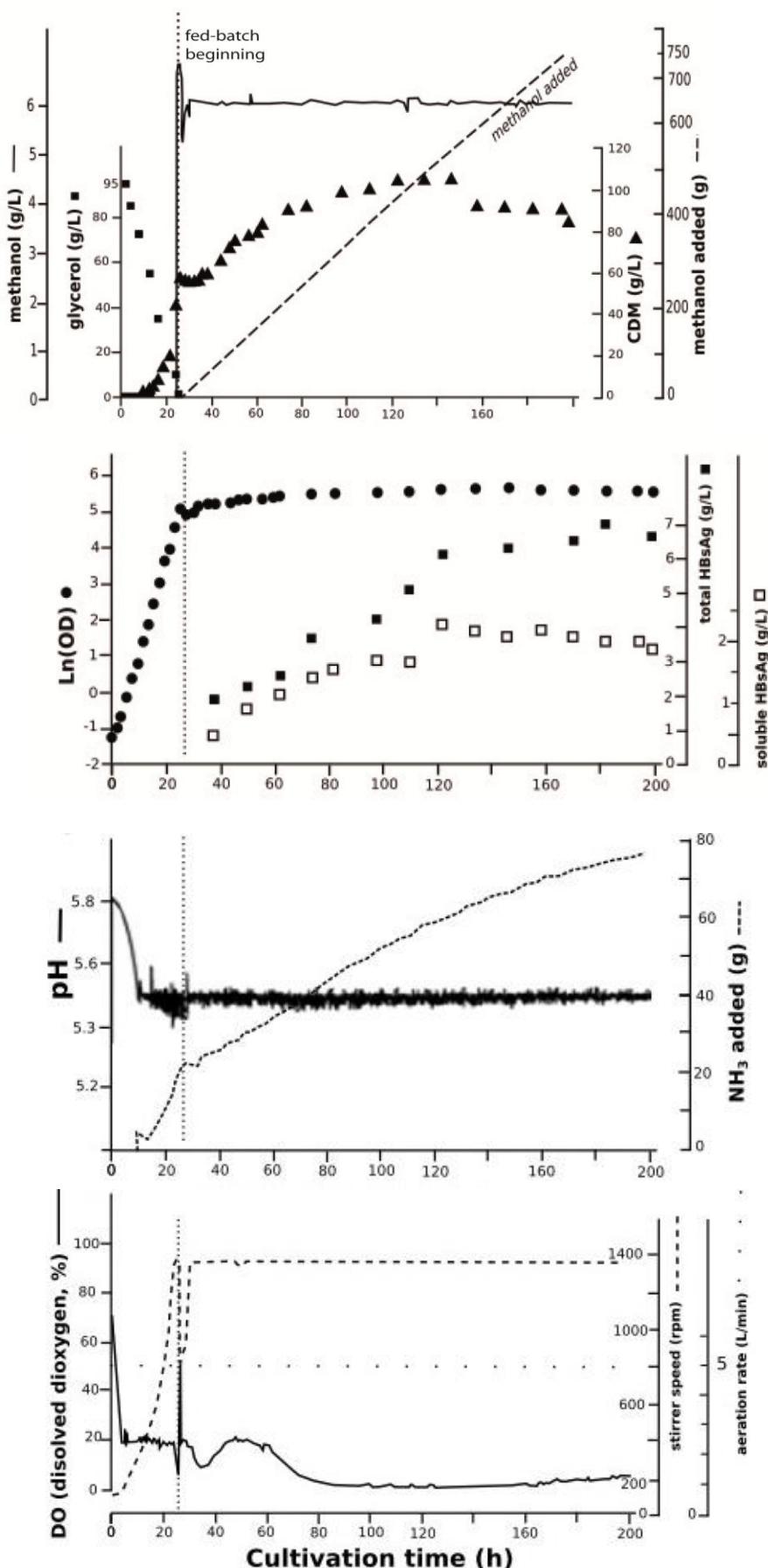
The growth medium contained per liter: glycerol, 95.2 g; potassium di-hydrogen phosphate, 9.4 g; yeast trace metal (YTM) solution, 1.14 g; ammonium sulfate, 15.7 g; magnesium sulfate hepta-hydrate, 1.83 g; calcium chloride dihydrate, 0.28 g; and biotin, 0.4 mg.

Temperature was maintained at 30°C and pH at 5.5 with 12.5 % (v/v) NH_3 solution. Aeration rate of 5 L min^{-1} was constant throughout the process.

After consumption of glycerol (26 h), indicated by an increase of the dioxygen (DO) concentration, production of recombinant HBs Ag was initiated by the addition of a methanol solution [98.6% (w/w) methanol and 1.4 % (w/w) YTM] to a final methanol concentration of $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. For the remainder of the cultivation, the methanol concentration was kept at $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in the culture.

Documents 6 et 7 adaptés de Gurramkonda C. et al. ; Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with *Pichia pastoris*: Application to intracellular production of Hepatitis B surface antigen. Microbial Cell Factories. 2009, 8 :13. Disponible sur : <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com>

Document 7 : Culture discontinue alimentée de *Ko. pastoris*



(A) Concentration en glycérol (carrés pleins) et biomasse (biomasse sèche, CDM, triangles pleins). Concentration en méthanol (ligne continue) et quantité de méthanol ajoutée dans le bioréacteur (ligne discontinue).

(B) Croissance cellulaire (OD pour « optical density », cercles pleins) et accumulation de l'antigène HBs (HBs Ag), (HBs Ag total ; carrés pleins et HBs Ag soluble : carrés vides).

(C) pH du milieu (ligne continue) et quantité d'ammoniaque ajoutée dans le bioréacteur (ligne discontinue).

(D) Concentration en dioxygène dissous (DO, « dissolved oxygen », ligne continue), débit d'aération (ligne de points) et vitesse d'agitation (ligne discontinue).

Les lignes pointillées verticales indiquent la fin de la croissance sur glycérol et le début de l'alimentation en méthanol.

2018 - U42 : Biologie cellulaire

Durée 2 h – coefficient 1

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

Une nouvelle technologie en culture cellulaire

L'essor des cultures cellulaires animales implique une grande diversité des milieux, des contenants et des supports de culture. La culture de cellules adhérentes a généralement pour objectif de mimer les conditions physiologiques de vie des cellules. Le support doit reproduire les structures moléculaires avec lesquelles les cellules interagissent dans l'organisme, mais ces structures diffèrent selon les tissus et les types cellulaires. La plupart des cellules adhérentes sont capables de se fixer sur de nombreux supports, mais certaines lignées cellulaires nécessitent des conditions particulières pour adhérer aux supports.

1. Culture des cellules adhérentes (10 points)

Les cellules adhérentes, lorsqu'elles sont jointives, forment entre elles des jonctions membranaires. L'une d'entre elles est présentée sur l'électronographie du document 1.

- 1.1 Réaliser un schéma de l'ultrastructure de la membrane plasmique incluant les principaux constituants. Identifier sur ce schéma les molécules membranaires responsables de l'adhérence.
- 1.2 Exposer le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission.
- 1.3 Identifier la jonction observée sur le document 1. Annoter ce document, en reportant les lettres A, B, C et D sur la copie. Nommer la protéine transmembranaire impliquée dans cette jonction.

Le document 2 présente un protocole de culture de cellules nerveuses de souris.

- 1.4 Identifier les numéros des étapes correspondant à la dissection, à la dissociation et à la mise en culture des neurones.
- 1.5 La culture cellulaire préparée est une culture primaire. Justifier cette affirmation. Préciser les rôles respectifs de la collagénase, de la trypsine et de l'EDTA.
- 1.6 Analyser l'étape 5 du protocole opératoire pour identifier la méthode de culture cellulaire mise en œuvre. Proposer une explication à la nécessité d'ajouter la D,L-poly ornithine et la laminine sur le support.

L'incubation des cellules nerveuses est réalisée à 37 °C sous 5 % de CO₂ pendant quelques jours. Après une phase active de multiplication cellulaire, lorsque le tapis cellulaire est arrivé à confluence, la croissance s'arrête. Il existe donc une régulation du cycle cellulaire.

- 1.7 Réaliser un schéma du cycle cellulaire présentant l'enchaînement des différentes phases. Nommer chacune des phases. Localiser sur le schéma effectué les points de contrôle du cycle cellulaire.

Le document 3 présente une cellule hybride résultant de la fusion d'une cellule en phase S avec une cellule en phase G1.

- 1.8 Analyser et proposer une interprétation à l'expérience présentée.

2. Étude d'un nouveau support de culture cellulaire (8 points)

La culture de cellules peut se faire directement sur du verre ou du polystyrène. Elle peut nécessiter un traitement préalable des supports. Ces traitements peuvent utiliser des molécules de synthèse ou des extraits de matrices extracellulaires physiologiques. Ils visent généralement à améliorer l'adhérence des cellules.

Le document 4 présente un extrait du catalogue d'un fournisseur en matériel de culture cellulaire.

2.1 Argumenter le choix des supports adaptés pour chacune des cultures cellulaires suivantes :

- des cellules normalement adhérentes ;
- des cellules peu adhérentes, utilisant un support de synthèse ;
- des cellules peu adhérentes, utilisant un support physiologique.

Le poly-N-isopropylacrylamide ou PNIPAM est un polymère thermosensible qui, en milieu aqueux, subit un changement de conformation autour d'une température critique de 32 °C. En dessous de cette température, il est hydrophile et se déploie en solution. Au dessus, il est modérément hydrophobe et possède une structure compacte qui permet aux cellules d'adhérer au support. À 37 °C, le PNIPAM est donc un revêtement possible pour la culture des cellules de mammifère et son changement de conformation lui confère des propriétés intéressantes pour la récolte des cellules.

Le document 5 présente trois protocoles de récolte des cellules adhérentes et les résultats obtenus.

2.2 Dégager le principe de chacun des protocoles de décollement des cellules.

2.3 À partir de l'analyse des résultats présentés, conclure sur l'intérêt de la culture sur PNIPAM.

Les cellules récoltées sont analysées par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps marqués par un fluorochrome.

Le document 6 présente les protocoles et les résultats obtenus de cette analyse.

2.4 Indiquer les propriétés spectrales d'un fluorochrome.

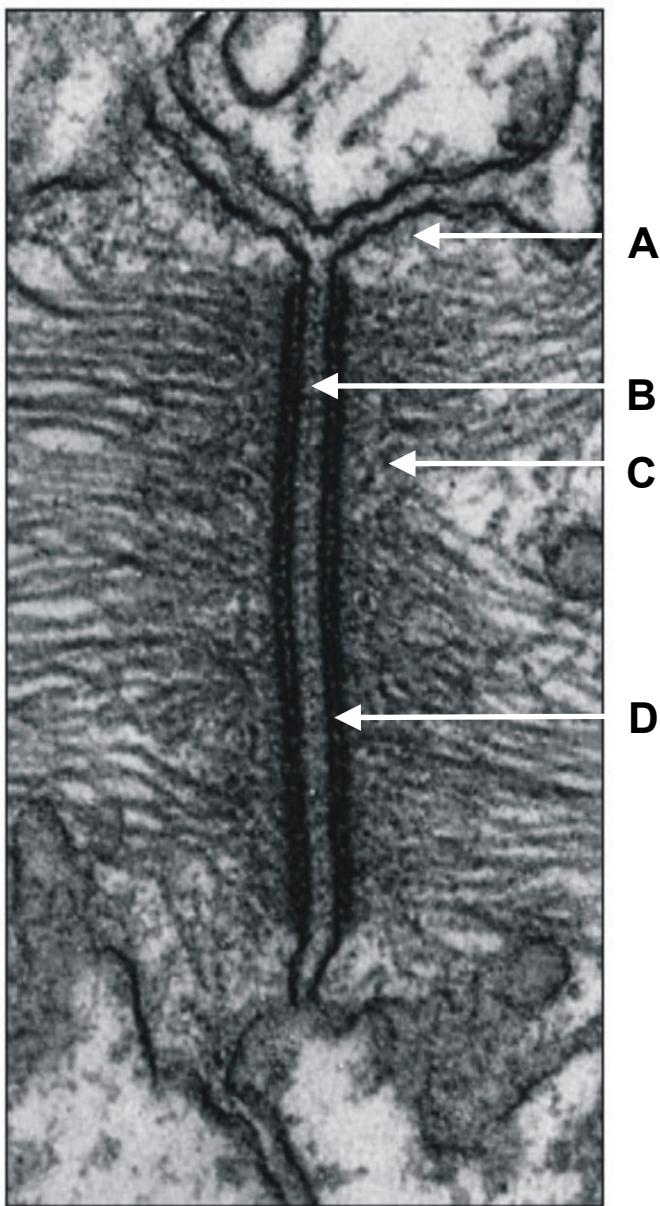
2.5 Présenter le principe du cytomètre en flux analyseur.

2.6 Préciser le rôle du contrôle négatif. Analyser les résultats de la cytométrie de flux et en déduire l'intérêt du PNIPAM par rapport à la trypsine.

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 : Électronographie d'une jonction membranaire

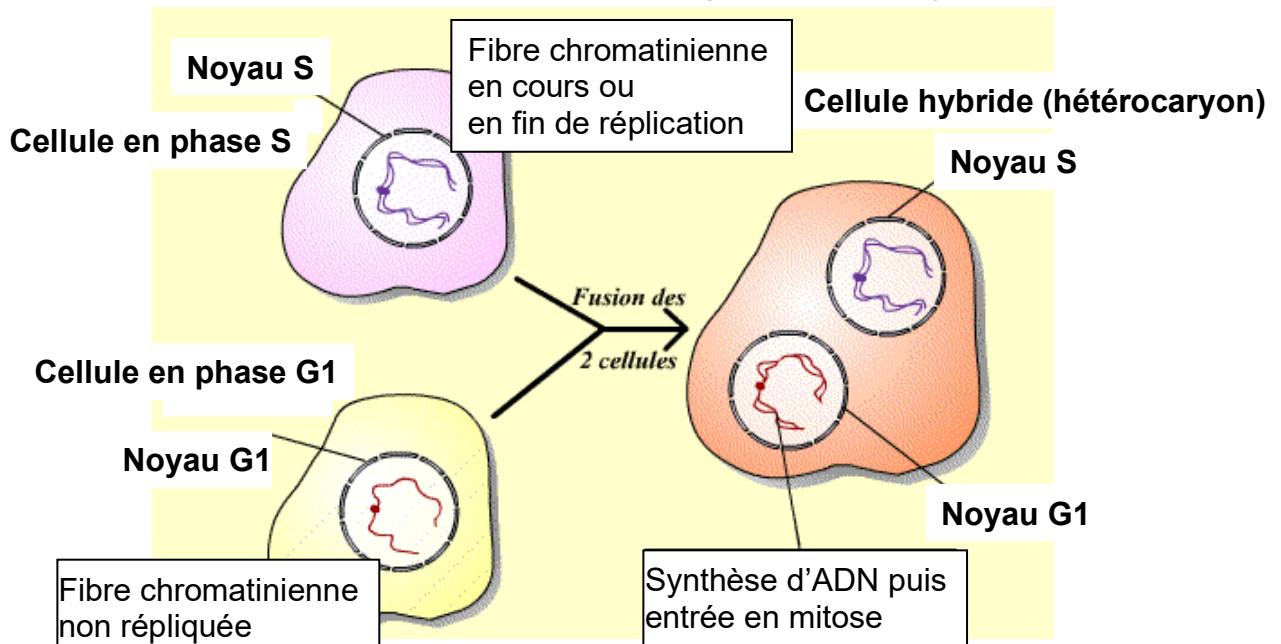
Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr> (consulté le 18 novembre 2016).

Document 2 : Protocole de préparation d'une culture de neurones

1. Adult female Swiss mice were sacrificed by cervical dislocation. Lumbar dorsal root ganglia were collected in sterile conditions.
2. Ganglia were successively treated by two incubations with collagenase A (1 mg/ml, Roche Diagnostic) for 45 minutes each (37 °C) and then with trypsin-EDTA (0.25 %, Sigma) for 30 minutes.
3. They were mechanically dissociated by passing 8 to 10 times through the tip of a fire-polished Pasteur pipette in neurobasal (Life Technologies) culture medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS).
4. Isolated cells were collected by centrifugation and suspended in neurobasal culture medium not supplemented with FBS.
5. Dissociated neurons were counted with a Malassez cell and plated on D,L-polyornithine (0.5 mg/ml)-laminin (5 µg/ml)-coated glass coverslips at a density of 2500 neurons per coverslip, in 4-wells culture-treated polystyrene plates with neurobasal culture medium not supplemented with FBS, 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin (20 U/ml, 0.2 mg/ml).
6. Plates were incubated in an incubator with a humidified 95 % air/ 5 % CO₂ atmosphere.

J Neurophysiol. 2003 Dec ; 90(6):3764-73.

Document 3 : Étude expérimentale de la régulation du cycle cellulaire



Disponible sur : <http://xarquon.jcu.cz> (consulté le 18 novembre 2016).

Document 4 : Différents supports de culture

6-well Flat-bottom culture plates		
SURFACE	QTY./CASE	CAT. NO.
Standard	50	143
Poly-D-Lysine	30	470
Collagen	10	500
Fibronectin	10	501
Laminin	10	502

Extrait du catalogue BDbiosciences culture tools.

Document 5 : Méthodes de récolte des cellules adhérentes

5a : Protocoles

Mouse peritoneal macrophages in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) were seeded in one dish with PNIPAM Surface and two traditional cultureware dishes at 2.4×10^5 cells/cm².

The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ in air.

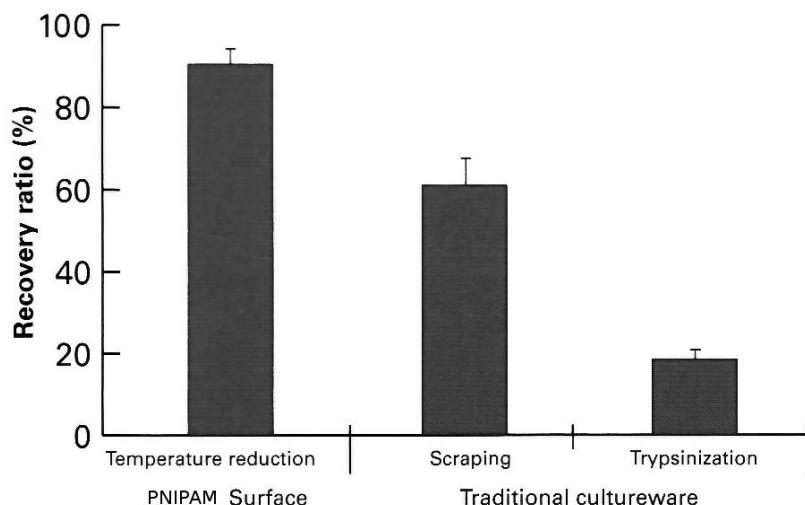
Cells were then cultured for 2 days in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS and harvested using one of the following procedures :

Protocol 1 : temperature reduction on PNIPAM surface	Protocol 2 : trypsinization	Protocol 3 : scraping*
<ol style="list-style-type: none"> Cells were washed with Ca²⁺– and Mg²⁺– free PBS 4.0 mL RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS was added and the dish was incubated at 20 °C for 30 min. Detached cells were harvested 	<ol style="list-style-type: none"> Cells were washed with Ca²⁺– and Mg²⁺– free PBS 1.0 mL of 0.25% trypsin/EDTA was added, and the dish was incubated at 37 °C for 5 min. 3.0 mL RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS was added Detached cells were harvested 	<ol style="list-style-type: none"> Cells were washed with Ca²⁺– and Mg²⁺– free PBS 4.0 mL of 2.5 mM EDTA/PBS was added and the dish was incubated on ice for 20 min The cells were detached by scraping and harvested

The harvested cells were counted and the recovery ratio ((detached cells / total cells) x 100) was calculated.

* to scrap : gratter

5b : Résultats



D'après la brochure
« *Cell Harvesting by Temperature Reduction* », THERMOscientific.

Document 6 : Analyse des protéines membranaires par cytométrie en flux

6a : Protocoles

Des cellules de moelle osseuse humaines sont distribuées à une densité de $6,8 \times 10^3$ cellules/cm² dans une boîte de Pétri de 6 cm traitée au PNIPAM ainsi que dans une boîte de Pétri de 6 cm standard.

Les cellules sont incubées 24 heures à 37 °C sous 5 % CO₂, puis récoltées suivant un des protocoles indiqués :

Protocole 1 : réduction de température sur la surface traitée au PNIPAM	Protocole 2 : trypsination
---	----------------------------

Les cellules récoltées sont lavées, centrifugées et des aliquots de $5,0 \times 10^5$ cellules sont incubés avec :

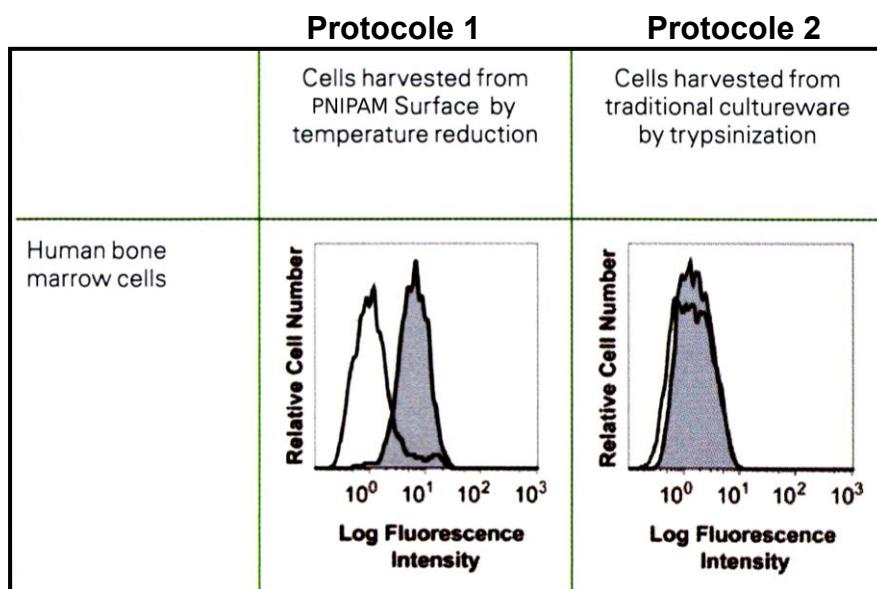
- soit des anticorps monoclonaux murins marqués à la PE*, dirigés contre l'antigène de surface CD140a, présent à la surface des cellules de moelle osseuse humaines

- soit des anticorps murins de contrôle négatif marqués à la PE.

Après 60 min d'incubation à 4 °C, les cellules sont lavées au PBS et analysées par cytométrie en flux. Les résultats de ces deux incubations sont superposés dans le document 6b.

* : PE : phycoérythrine, un fluorochrome

6b : Résultats



Grey : anti-CD140a

White : isotype control for non-specific binding (background)

D'après la brochure
 « Cell Harvesting by Temperature Reduction », THERMOscientific.

Session 2018 : Éléments de corrigé

Ces 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.

Ils 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.

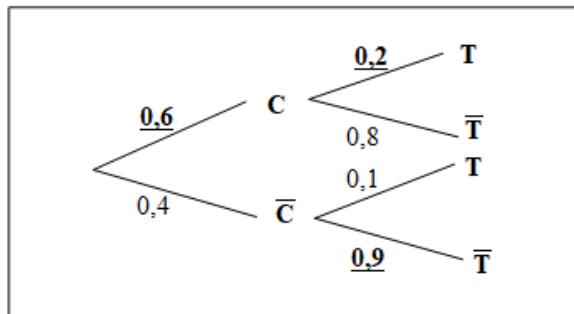
Pour certaines questions, des liens internet peuvent être proposés en complément.

2018 - U11 : Mathématiques

EXERCICE 1

Partie A

1. Arbre pondéré complété (les valeurs du texte sont écrites en gras souligné) :



2. $P(T) = P(C \cap T) + P(\bar{C} \cap T) = 0,6 \times 0,2 + 0,4 \times 0,1 = 0,16$.

3. Calculons $P_C(T) = \frac{P(C \cap T)}{P(T)} = \frac{0,6 \times 0,2}{0,16} = 0,75$

4. a) Comme estimation ponctuelle de p on prend la fréquence observée dans l'échantillon soit $f = \frac{25}{40} = 0,625$

b) $p \in \left[0,625 - 1,96 \sqrt{\frac{0,625 \times (1-0,625)}{40}}, 0,625 + 1,96 \sqrt{\frac{0,625 \times (1-0,625)}{40}}\right] \approx [0,475; 0,775]$.

Partie B

1. Pour une loi exponentielle, comme rappelé dans le formulaire distribué, $E(X) = \frac{1}{\lambda}$
Dans le texte le délai moyen est de 10 jours donc $\lambda = 0,1$.

2. La représentation A correspond à la densité de probabilité de cette loi exponentielle.

3. $P(T \leq 8) = 1 - e^{-0,1 \times 8} \approx 0,551$.

Partie C

Question 1 : réponse A
Question 2 : réponse C
Question 3 : réponse B
Question 4 : réponse A

EXERCICE 2

Partie A

1. 90 minutes correspondent à 1,5 heure. D'après le graphique pour un temps de 1,5, on obtient une température de 22 °C.

2. a) Non car au bout de 2 h la température est toujours au-dessus de 10 °C
b) Oui. Pour atteindre 10 °C, il faut environ 1,75 h soit 1 h et 45 minutes.

3. Par exemple avec une baisse de 5 % sur 15 minutes on aurait une température de $63 \times 0,95^{15} \approx 29$ °C, en utilisant la formule explicite d'une suite géométrique. Or avec la courbe C2, on a environ 47 °C.

4.

1	$N \leftarrow 0$
2	$T \leftarrow 63$
3	Tant que $T > 10$
4	Affecter à N la valeur $N + 1$
5	Affecter à T la valeur $T \times 0,98$
6	Fin Tant que

Partie B

1. a) $y' = -1,2(y - 3)$ s'écrit aussi $y' = -1,2y + 3,6$ soit $y' + 1,2y = 3,6$.

b) L'équation différentielle $y' + 1,2y = 0$ est du modèle $y' + a y = 0$ avec $a = 1,2$.
Donc d'après le cours les solutions sont les fonctions de la forme $t \mapsto k e^{-1,2t}$ avec k une constante réelle.

c) La fonction constante $t \mapsto 3$ est solution particulière de (E) donc elle doit vérifier cette équation.
Or $0 + 1,2 \times 3 = 3,6$. Les solutions de l'équation différentielle (E) sont donc de la forme : $t \mapsto k e^{-1,2t} + 3$.

d) D'après le texte, on place les barquettes dans la cellule de refroidissement au temps $t = 0$, lorsque la température du plat cuisiné atteint + 63 °C. D'où $f(0) = 63$.
La fonction f solution de (E) vérifie donc la condition $f(0) = 63$, d'où $k e^{-1,2 \times 0} + 3 = 63$, soit $k = 60$.
En conclusion : $f(t) = 60 e^{-1,2t} + 3$.

2. À la calculatrice, on obtient $f(2) \approx 8,44$. Au bout de 2 h la température de la barquette est d'environ 8,44 °C.

3. Si $t \rightarrow +\infty$ alors $-1,2t \rightarrow -\infty$ d'où $e^{-1,2t} \rightarrow 0$ donc $f(t) \rightarrow 3$. Si on laisse la barquette dans la cellule de refroidissement sa température se stabilisera à 3 °C.

4. Ce résultat correspond à la valeur moyenne de la fonction entre 0 et 1,5. La température moyenne de la barquette au cours de la première heure et demie sera de 30,8 °C.

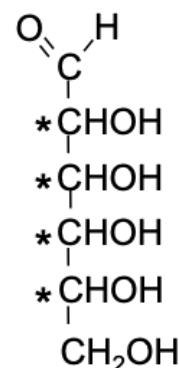
5. Graphiquement la fonction g possède les mêmes propriétés que la fonction f , c'est-à-dire $g(0) = 63$ et sa limite en $+\infty$ serait 3.
Donc on peut admettre que $g(t)$ est de la forme $60 e^{at} + 3$, avec a une constante.
D'après la courbe on aurait $g(1,5) = 22$, d'où $60 e^{1,5 \times a} + 3 = 22$. D'où on obtient $a \approx -0,77$.
On peut donc proposer $g(t) = 60e^{-0,77t} + 3$.
Avec la calculatrice on constate que la représentation graphique de la fonction ainsi définie « correspond » bien à la courbe C2.

2018 - U12 : Sciences physiques et chimiques

I. HYDROLYSE DU SACCHAROSE

1. Aspect stéréochimique du glucose

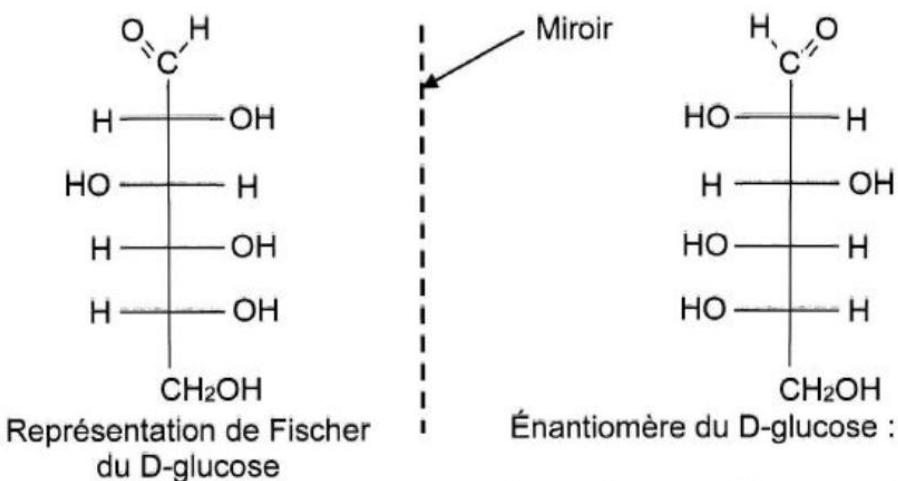
1.1. Carbones asymétriques de la molécule de glucose



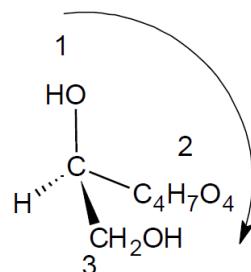
1.2. La molécule de glucose possède 4 carbones asymétriques donc on a $2^4 = 16$ stéréoisomères

1.3. La molécule de glucose est chirale car elle possède des carbones asymétriques et ne possède pas de centre ou de plan de symétrie.

1.4. Représentation en projection de Fischer de l'énanthiomère du D-glucose = L-glucose



1.5. Représentation de Cram de la molécule de glucose avec l'atome C₅ de configuration absolue R.



D'après les règles CIP, OH > C₄H₇O₄ > CH₂OH > H (classification par numéro atomique décroissant). On passe de 1 à 3 dans le sens des aiguilles d'une montre, l'atome de hydrogène vers l'arrière. Donc, il s'agit bien d'une configuration R.

2. Suivi de la réaction d'hydrolyse par polarimétrie

2.1. Le polarimètre

2.1.1. D'après le diagramme des niveaux d'énergie du sodium : $E_1 = -5,14 \text{ eV}$ et $E_2 = -3,03 \text{ eV}$.

L'énergie du photon émis est donnée par la relation de Planck :

$$E_2 - E_1 = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{donc} \quad \lambda = \frac{hc}{E_2 - E_1} = \frac{6,63 \times 10^{-34} \times 3 \times 10^8}{(-3,03 + 5,14) \times 1,6 \times 10^{-19}} = 5,89 \times 10^{-7} \text{ m}$$

2.1.2. Lorsque $I = I'$ alors $\theta = 0^\circ$ et lorsque $I' = 0$ alors $\theta = 90^\circ$.

2.2. Exploitation des mesures polarimétriques

2.2.1. Au départ, le pouvoir rotatoire de la solution est uniquement dû à la présence de saccharose. D'après la loi de Biot :

$$\alpha_0 = [\alpha]_{\text{Saccharose}} \times L \times C_m(\text{Saccharose}) = 66,5 \times 1 \times 6,00 \times 10^{-2} = 3,99^\circ$$

Cette valeur correspond bien à la valeur sur le graphique de l'Annexe 2 à $t = 0 \text{ h}$.

D'après le graphique, à $t = 0 \text{ h}$, $\alpha = 4^\circ$.

2.2.2. Calcul de la concentration molaire $C_{(\text{Saccharose})}$ à l'instant initial :

$$C_{(\text{Saccharose})} = \frac{C_m}{M} = \frac{6,00 \times 10^{-2}}{342} = 1,75 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$$

La réaction d'hydrolyse étant totale, en fin de réaction on a :

$$C_{(\text{Fructose})} = C_{(\text{Glucose})} = 1,75 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$$

2.2.3. On calcule tout d'abord les concentrations massiques C_m du fructose et du glucose en fin de réaction :

$$C_m(\text{Fructose}) = C_{(\text{Fructose})} \times M_{(\text{Fructose})} = 1,75 \times 10^{-4} \times 180 = 3,15 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$$

$$C_m(\text{Glucose}) = C_{(\text{Glucose})} \times M_{(\text{Glucose})} = 1,75 \times 10^{-4} \times 180 = 3,15 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$$

A la fin de l'hydrolyse, il n'y a plus de saccharose. Le pouvoir rotatoire de la solution est dû à la présence du fructose et du glucose soit :

$$\alpha_F = [\alpha]_{\text{Fructose}} \times L \times C_m(\text{Fructose}) + [\alpha]_{\text{Glucose}} \times L \times C_m(\text{Glucose})$$

$$\alpha_F = -92,2 \times 1 \times 3,15 \times 10^{-2} + 52,7 \times 1 \times 3,15 \times 10^{-2} = -1,24^\circ$$

Cette valeur calculée est identique à celle de la courbe de l'Annexe 2 (à $t = 100 \text{ h}$, $\alpha_F = -1,2^\circ$). La réaction est bien totale.

2.2.4. Cette réaction est habituellement appelée "inversion du saccharose" car on passe d'un pouvoir rotatoire positif en début de réaction à un pouvoir rotatoire négatif en fin de réaction.

2.2.5. L'utilisation d'un catalyseur permet d'accélérer la réaction. La réaction se déroule en 1 heure au lieu de 100 heures.

II. SYNTHÈSES DE LA VANILLINE

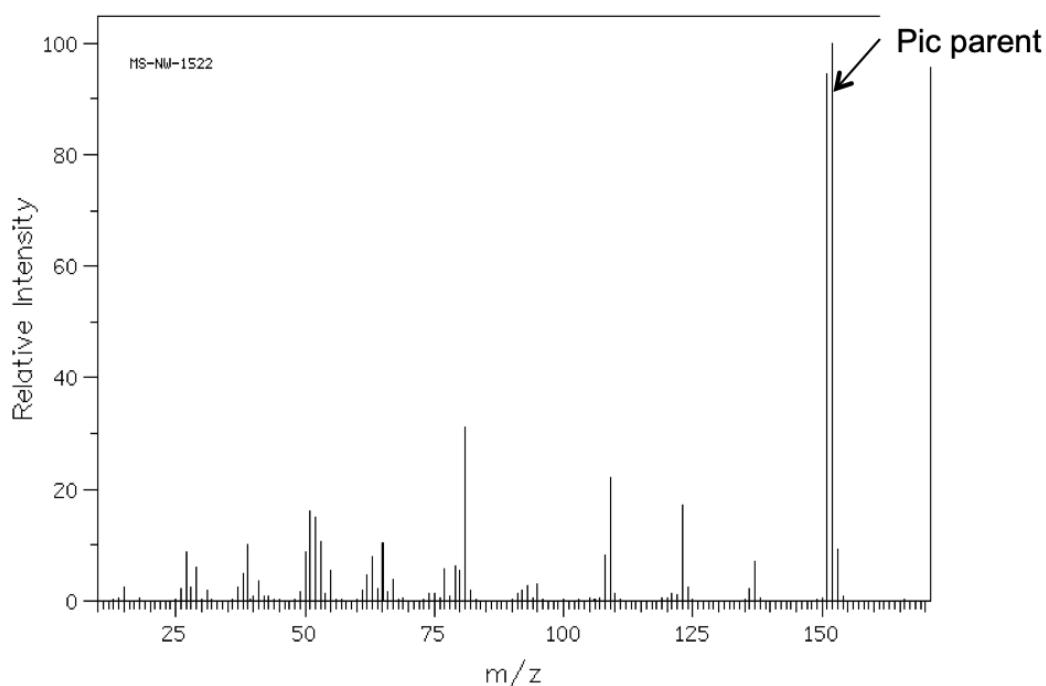
1. Synthèse de la vanilline par bioconversion de la pulpe de betterave

1.1. Le groupe caractéristique (1) est un groupement "alkoxy" de la fonction ester et le groupe caractéristique (2) est un groupement "carboxyle" d'une fonction acide carboxylique.

1.2. La réaction chimique de l'étape (3) est une réduction.

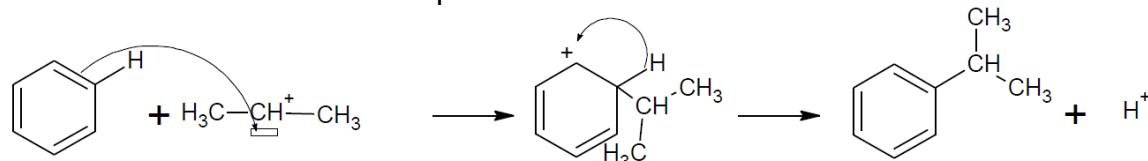
1.3. La masse molaire de la vanilline M ($C_8H_8O_3$) est de $152 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

D'après le spectre de masse, le pic parent a pour abscisse $152 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Il correspond bien à la masse molaire de la vanilline. Le produit peut bien être de la vanilline.

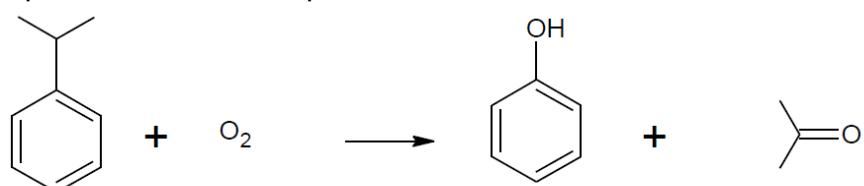


2. Synthèse de la vanilline par voie chimique

2.1. Mécanisme réactionnel de l'étape 1 :



2.2. Équation bilan de l'étape 2 :



2.3. Lors de l'étape 3, le groupement OH se fixe en position « ortho » mais il peut aussi se fixer en position « para ».



2.4. Lors de l'étape 7, il s'agit de la fonction alcool qui a été modifiée. Si on avait utilisé un oxydant en excès, on aurait obtenu une fonction acide carboxylique à la place de la fonction aldéhyde. On peut utiliser du permanganate de potassium pour cette réaliser cette réaction.

III. DOSAGES DU GLUCOSE

1. Rôle des ions tartrate dans la liqueur de Fehling

1.1. Équilibre de dissolution du dioxyde de cuivre (II) : $\text{Cu}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + 2\text{OH}^-$
 Produit de solubilité $K_S = [\text{Cu}^{2+}]_{\text{eq}} \times [\text{OH}^-]_{\text{eq}}^2$

1.2. En début de précipitation, on a $K_S = [\text{Cu}^{2+}]_{\text{eq}} \times [\text{OH}^-]_{\text{eq}}^2$
 On sait que :

$$[\text{H}_3\text{O}^+] \times [\text{OH}^-] = 10^{-14} \quad \text{donc} \quad [\text{OH}^-] = \frac{10^{-14}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$$

En remplaçant dans l'expression du produit de solubilité :

$$K_S = [\text{Cu}^{2+}] \times \left(\frac{10^{-14}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \right)^2 = [\text{Cu}^{2+}] \times \frac{10^{-28}}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+]^2 = \frac{[\text{Cu}^{2+}] \times 10^{-28}}{K_S} \quad \text{donc}$$

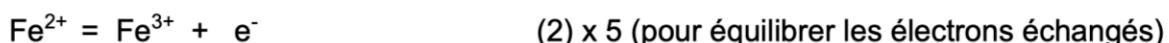
$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \sqrt{\frac{[\text{Cu}^{2+}] \times 10^{-28}}{K_S}} = \sqrt{\frac{8 \times 10^{-2} \times 10^{-28}}{10^{-19,7}}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

On calcule alors la valeur du pH :

$$pH = -\log[\text{H}_3\text{O}^+] = -\log(2 \times 10^{-5}) = 4,7$$

1.3. Les ions tartrate permettent de complexer les ions cuivre et ainsi d'éviter la formation d'hydroxyde de cuivre

2. Dosage chimique du glucose par la méthode de Bertrand

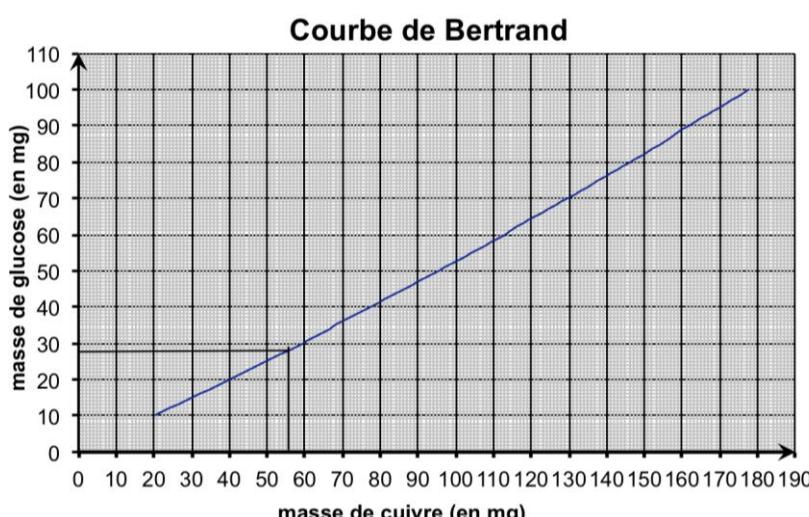


2.2. D'après la réaction précédente (3), à l'équivalence, on a la relation :

$$n(\text{Fe}^{2+}) = 5 \times n(\text{MnO}_4^-) = 5 \times C \times V_E$$

$$\text{AN: } n(\text{Fe}^{2+}) = 5 \times 0,0205 \times 8,55 \times 10^{-3} = 8,76 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

2.3. D'après la courbe de Bertrand, pour une masse d'ions Cu^{2+} de 55,6 mg, la masse de glucose est de 28 mg.



La solution de glucose a un volume de 20 mL, donc la concentration massique est :

$$C_m = \frac{m}{V} = \frac{28 \times 10^{-3}}{20 \times 10^{-3}} = 1,4 \text{ g. L}^{-1}$$

Ce patient a une glycémie anormale car la valeur calculée est en dehors de l'intervalle pour une glycémie normale.

3. Dosage spectrophotométrique du glucose par voie enzymatique

En laboratoire, cette méthode est à privilégier par rapport à la méthode Bertrand car :

- elle est plus rapide (15 min), la méthode de Bertrand nécessite de nombreuses étapes comme les filtrations ;
- elle pose moins de problèmes de sécurité, la méthode de Bertrand nécessite de porter le mélange à ébullition et d'utiliser de l'acide sulfurique concentré (risques de brûlures) ;
- tout le glucose est dosé (technique spécifique au glucose), la méthode de Bertrand ne permet pas de doser tout le glucose à cause d'une réaction parasite qui consomme une partie du glucose

2018 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

CRISPR/Cas9, un outil de modification de l'ADN génomique

1. Fonctionnement de l'outil CRISPR/Cas9

- 1.1 L'ARN spécifique dans l'ARN guide est complémentaire de la séquence à modifier dans l'ADN génomique. Il permet de cibler spécifiquement la séquence à modifier.
- 1.2 Cas9 est une endonucléase de restriction, elle hydrolyse les liaisons phosphoester entre nucléotides.
- 1.3 La coupure générée par Cas9 est réparée par recombinaison homologue entre l'ADN cible et un ADN de synthèse injecté dans la cellule.

2. Production des composantes de l'outil CRISPR/Cas9 au laboratoire de génie génétique

2.1 Le promoteur U6 permet d'initier la transcription des séquences situées en aval (fixation de l'ARN polymérase). Le terminateur Pol III permet d'arrêter la transcription en relâchant l'ARN polymérase.



2.2 Les extrémités utilisées pour la ligature sont cohésives et non complémentaires, ce qui permet d'orienter l'ADN codant l'ARN spécifique dans le vecteur.

2.3 Les étapes de transformation des bactéries *E. coli* sont les suivantes :

- la préparation des bactéries compétentes (par exemple par traitement au CaCl_2)
- le mélange des bactéries compétentes avec le vecteur, en glace
- un choc thermique (à 42 °C par exemple)
- une régénération des membranes à 37 °C dans un milieu non sélectif, permettant également l'expression de la résistance à l'antibiotique de sélection
- un isolement des bactéries transformées sur milieu sélectif, contenant un antibiotique

Le vecteur CRISPR Nuclease OFF Reporter portant un gène de résistance à l'ampicilline, il est possible d'utiliser un milieu LB + ampicilline.

2.4 Deux méthodes de transfection des cellules eucaryotes animales :

- lipofection : complexation de l'ADN vecteur avec des lipides cationiques, qui interagissent avec les membranes cellulaires chargées négativement ; l'entrée dans la cellule s'effectue par endocytose.
- électroporation : mise en contact de l'ADN vecteur avec les cellules à transfacter, puis application d'un champ électrique court et intense, ce qui crée des nanopores réversibles et permet l'entrée de l'ADN dans les cellules
- co-précipitation au phosphate de calcium : formation d'un co-précipité entre l'ADN vecteur, puis mise en contact avec les cellules à transfacter ; l'entrée dans la cellule s'effectue par endocytose
- ou biolistique, microinjection, ...

2.5 Les séquences permettant l'expression de Cas9 dans des cellules eucaryotes sont

- le promoteur viral P_{CMV} permettant l'initiation de la transcription dans les cellules eucaryotes
- la séquence TK pA permettant la terminaison de la transcription et l'ajout de la queue polyA sur l'ARN messager produit.



2.7 L'expression de Cas9 est liée celle de la protéine OFP, qui émet une fluorescence orange. Les cellules exprimant Cas9 sont donc repérées par cette fluorescence.

3. Mise au point de l'outil CRISPR/Cas9 pour modifier l'ADN génomique du ver *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

3.1 L'insertion ciblée du gène *gfp* comprend trois étapes :

- coupure double brin de l'ADN spécifiquement ciblé par l'ARN guide, grâce à l'activité Cas9
- réparation de la coupure par recombinaison homologue avec la construction *gfp*-loxP-sélection-loxP
- élimination du gène de sélection par la recombinase Cre, qui reconnaît spécifiquement les séquences LoxP.

3.2 EDTA : agent chélateur des cations divalents tels que Mg^{2+} nécessaires à l'activité des DNases => inhibition des DNases

Phénol-chloroforme : solvant organique provoquant la dénaturation et la précipitation des protéines => déprotéinisation de l'ADN

Éthanol 100% (70 % final) : permet la précipitation de l'ADN (en présence de sels)

3.3 Tableau récapitulatif

Amorces	Ver A	Ver B	Ver C
1 + 2	1 bande \approx 3 kb => taille attendue si présence de <i>nmy-2</i> et <i>gfp</i>	pas d'amplification => absence de <i>gfp</i>	1 bande \approx 3 kb => taille attendue si présence de <i>nmy-2</i> et <i>gfp</i>
3 + 4	pas d'amplification => absence du gène de sélection	pas d'amplification => absence du gène de sélection	1 bande \approx 2,3 kb => taille attendue si présence du gène de sélection
1 + 4	1 bande \approx 6,2 kb => taille compatible si absence du gène de sélection	1 bande \approx 4,2 kb => taille compatible avec le locus sauvage	1 bande \approx 8 kb => taille attendue si présence de <i>gfp</i> et du gène de sélection
Interprétation	Le ver A porte la construction finale <i>nmy-2 ::gfp</i>	Le ver B porte le locus sauvage	Le ver C porte la construction intermédiaire avant recombinaison par la Cre recombinase

3.4 Après transfection par biolistique, le signal fluorescent (matérialisé par les points blancs) est faible, traduisant une faible efficacité de transfection et/ou de recombinaison du vecteur avec l'ADN génomique de *C. elegans*.

Après transfection par l'outil CRISPR-Cas9, le nombre de cellules fluorescentes et l'intensité de fluorescence est beaucoup plus élevé.

L'outil CRISPR-Cas9 semble donc beaucoup plus efficace que la biolistique pour obtenir une recombinaison permettant la production de la protéine de fusion NMY-2 - GFP.

2018 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

La L-asparaginase : biomolécule thérapeutique

1. Étude de L-asparaginase encapsulée

1.1 L'asparaginase appartient à la classe des hydrolases (classe 3).



1.2 L'asparagine est un nutriment important des cellules cancéreuses, qui la puisent dans le sang. En hydrolysant l'asparagine circulant dans le sang, les cellules tumorales sont privées d'un nutriment essentiel à leur survie.

1.3 L'asparaginase est immunogène, comme toutes les protéines. Son encapsulation permet d'éviter la formation d'anticorps dirigés contre elle, et si ces anticorps sont déjà présents chez le patient traité, de protéger cette enzyme de leur action neutralisante.

Exemples de procédés d'immobilisation autre que par rétention physique :

- adsorption ionique : l'asparaginase est mise en contact avec un support dont la charge est opposée à celle de l'asparaginase au pH de travail
- immobilisation par liaisons covalentes : fixation de l'asparaginase sur un support activé par du bromure de cyanogène ou réticulation par du glutaraldéhyde.

Avantages de l'immobilisation : meilleure stabilité (notamment thermique), réutilisation possible ;

Inconvénients de l'immobilisation : perte d'activité, difficulté et coût de mise en œuvre, toxicité de certains réactifs...

2. Extraction et purification de la L-asparaginase d'*Erwinia carotovora*

2.1 L'augmentation de la concentration en sels diminue la disponibilité de l'eau permettant la solvatation des protéines ; les protéines interagissent alors entre elles, par des liaisons hydrophobes (exposition des groupements hydrophobes à leur surface).

2.2 Il faut ajouter 472 g de sulfate d'ammonium à 1 L de solution ne contenant initialement pas de sels. Pour 100 mL de solution, il faut donc ajouter 47,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (= 472 g \times 0,1 L).

2.3 L'étape de gel filtration permet d'éliminer les sels présents en grande quantité après la précipitation au sulfate d'ammonium. Ce dessalage est nécessaire pour préparer l'étape suivante de purification, par chromatographie d'échange d'ions, puisque l'adsorption ionique sur le support n'est possible qu'à faible concentration en sels.

L'asparaginase a une masse moléculaire de 150 kDa, et est donc totalement exclue sur Sephadex G-75, dont le domaine de fractionnement est compris entre 3 et 80 kDa. Le volume d'élution de l'asparaginase sera égal au volume mort, soit 100 mL. Le volume d'élution obtenu est de 101 mL, ce qui est cohérent avec une exclusion totale de la protéine.

Dans le cas du gel Superdex 200, la masse moléculaire de l'asparaginase est comprise dans le domaine de fractionnement (10 kDa < 150 kDa < 1 300 kDa), ce qui conduit à une exclusion partielle des billes de gel. Le volume d'élution sera compris entre le volume mort (100 mL) et le volume total (250 mL), et dépend du

coefficient de fractionnement. Le volume d'élution observé est de 158 mL, comme attendu.

Pour dessaler une solution, le gel Sephadex G-75 est adaptée : obtention rapide de la fraction d'intérêt, avec élimination des sels. Le gel Superdex 200 permet en plus d'éliminer une partie des protéines contaminantes, constituant ainsi une étape de purification supplémentaire.

2.4

$$Z_{sp} = \frac{Z_{tot}}{m_{protéines}}$$

$$UI \cdot mg^{-1} = \frac{UI}{mg}$$

$$Z_{sp}^{EB} = \frac{10000}{5000} = 2 \text{ } UI \cdot mg^{-1}$$

$$Z_{sp}^{DEAE} = \frac{3000}{3} = 1000 \text{ } UI \cdot mg^{-1}$$

$$E = \frac{Z_{sp}^{DEAE}}{Z_{sp}^{EB}} = \frac{1000}{2} = 500 \text{ fois}$$

$$\emptyset = \frac{UI \cdot mg^{-1}}{UI \cdot mg^{-1}}$$

$$R = \frac{Z_{tot}^{DEAE}}{Z_{tot}^{EB}} = \frac{3000}{1000} = 0,3 = 30 \text{ \%}$$

$$\emptyset = \frac{UI}{UI}$$

2.5 La bande après purification (piste 3) est située entre les bandes 28 et 38 kDa, sa masse moléculaire est d'environ 35 kDa.

La masse moléculaire de l'asparaginase native est de 150 kDa, soit environ 4 fois 35 kDa ($4 \times 35 = 140$), ce qui est cohérent avec une structure quaternaire tétramérique.

Sur la piste 2, correspondant au dépôt de l'extrait brut, on observe de nombreuses bandes correspondant à de nombreuses protéines. Ce résultat est cohérent avec la présence de nombreuses protéines après extraction. La bande autour de 35 kDa est nettement plus intense que les autres bandes, et paraît donc surexprimée.

Sur la piste 3, correspondant à la fraction purifiée, une seule bande est visible. L'activité asparaginase dans cette fraction est élevée (3 000 UI, cf. tableau de suivi de purification du document 2), la protéine présente sur le gel est donc bien l'asparaginase « pure ».

L'asparaginase est donc très pure : une seule bande protéique observée sur SDS PAGE, et fort enrichissement (500 fois).

2.6 L'électrophorèse en conditions non réductrices permet le maintien des éventuels ponts disulfures présents dans la protéine. Elle permet donc de déterminer si des ponts disulfures stabilisent les structures quaternaire ou tertiaires de l'asparaginase.

3. Etude de l'influence de quelques composés sur les paramètres cinétiques de la L-asparaginase

3.1 Les ions Mg^{2+} diminuent l'activité de la L-asparaginase de 75 %, alors que les ions K^+ augmentent son activité de 33 %. Les ions Mg^{2+} sont des inhibiteurs et les ions K^+ sont des activateurs de cette enzyme.

L'EDTA chélate les cations divalents, dont les ions Mg^{2+} . L'EDTA lève l'inhibition due à la présence de Mg^{2+} dans le milieu réactionnel.

3.2 La cystéine et le glutathion réduit provoquent d'une part une diminution du K_M , traduisant une plus grande affinité de l'enzyme pour son substrat. D'autre part, la V_{max} en présence de ces deux composés est augmentée, traduisant une augmentation de la vitesse de catalyse.

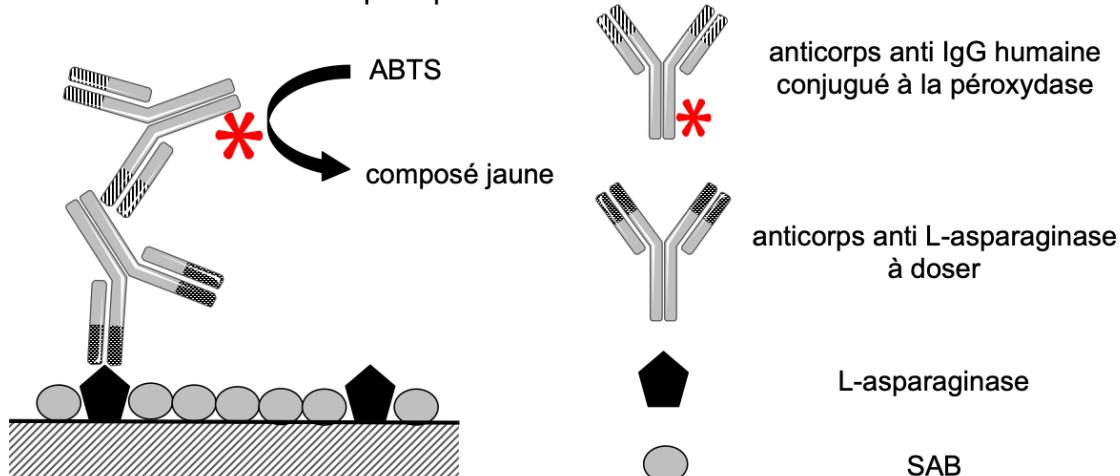
L'efficacité catalytique de l'enzyme en présence de cystéine et de glutathion est donc augmentée, avec un effet plus marqué pour le glutathion : plus forte diminution du K_m et plus forte augmentation de V_{max} .

3.3 Selon le modèle proposé, les groupements thiols s'associent à la L-asparaginase sur un site spécifique distinct du site actif de l'enzyme. La liaison des groupements thiols sur la L-asparaginase provoque un changement de conformation de l'enzyme, qui passe d'un état I (tendu) à un état II (relâché), dans lequel la fixation du substrat (L-asparagine) sur le site actif est facilitée. Le K_m de l'enzyme dans l'état II est inférieur au K_m de l'enzyme dans l'état I ($\alpha K_m < K_m$), ce qui traduit une meilleure affinité de l'enzyme pour son substrat lorsque l'enzyme est liée à des groupements thiols, comme observé précédemment.

Les groupements thiols agissent donc comme des effecteurs allostériques de la L-asparaginase, avec un effet hétérotrope positif sur cette enzyme.

4. Dosage des anticorps anti-L-asparaginase dans le plasma des patients traités par l'enzyme (3 points)

4.1 Schéma annoté d'une cupule positive



L'anticorps conjugué est produit chez le mouton, dirigé contre la fraction constante des IgG humaines et couplé avec la peroxydase.

4.2 L'absorbance à 405 nm augmente lorsque la concentration en anticorps plasmatiques anti L-asparaginase augmente.

2018 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Komagataella pastoris : Production l'antigène HBs du virus de l'hépatite B

1. Le virus de l'hépatite B (VHB)

- 1.1 Le virion présenté dans le document 1 est un virus à ADN double brin hébergeant dans sa capsidé une réverse transcriptase, son cycle de multiplication fait donc intervenir une étape de transcription inverse. D'après le document 2 présentant la classification de Baltimore, ce virus fait partie de la classe VII. Il diffère des rétrovirus (classe VI) de par la nature de son information génétique : ADN pour VHB vs. ARN pour les rétrovirus.
- 1.2 Les étapes du cycle viral de VHB pouvant faire l'objet d'un ciblage thérapeutique doivent empêcher la multiplication du virus sans porter atteinte au fonctionnement normal des cellules. D'après le document 3, seules les étapes 1 (reconnaissance et fixation sur ses cellules cibles) et 5 (transcription réverse du génome viral avant encapsidation) répondent à ces critères.
- 1.3 Les « *virus-like particles* » portent les antigènes HBs à leur surface et permettent donc au système immunitaire de produire des anticorps neutralisants dirigés contre le VHB. Cependant, comme elles ne comportent pas l'information génétique virale, elles ne sont pas infectieuses. Ces deux caractéristiques (immunogénicité et innocuité) permettent d'envisager leur utilisation comme vaccin.
- 1.4 L'antigène HBs est une glycoprotéine, or *E. coli* ne possède pas l'appareillage enzymatique nécessaire à la glycosylation des protéines, contrairement aux cellules eucaryotes. Il est donc plus pertinent d'utiliser un système eucaryote pour la production de HBs, tel que la levure (même si les profils de glycosylation sont souvent différents de ceux d'une cellule de mammifère).

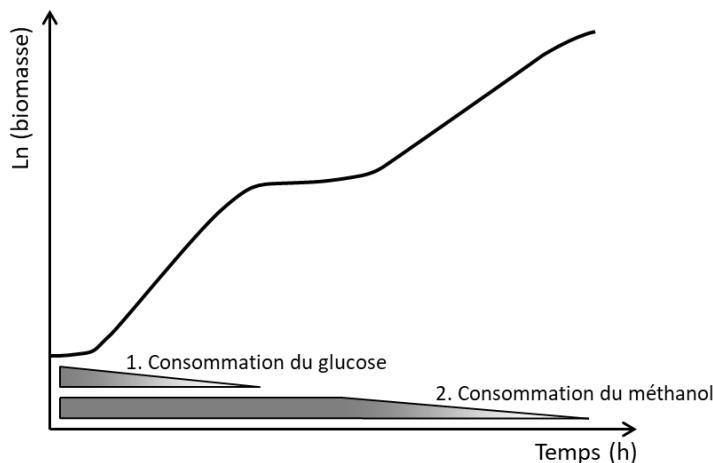
2. La levure *Komagataella pastoris*

- 2.1 Légendes du document 4 :
 - 1 : cycle de reproduction asexué haploïde ; 2 : conjugaison de deux cellules haploïdes de type sexuel compatible ; 3 : méiose et sporulation ; 4 : germination.

Le document 4 montre que les cellules haploïdes sont capables de changer de type sexuel pour mettre en place une conjugaison avec d'autres cellules issues du même clone, ce qui prouve que cette levure est homothallique.
- 2.2 Une carence nutritionnelle, par exemple un appauvrissement du milieu en source d'azote, provoque la fusion des cellules haploïdes ou bien la sporulation des cellules diploïdes (méiose suivie de la formation des spores).
- 2.3 La voie A conduit à la formation de coenzymes réduits (NADH, H^+), une monnaie énergétique cellulaire (et de CO_2 , déchet métabolique). Il s'agit donc d'une voie catabolique, l'oxydation du méthanol permet la production d'énergie. La voie B conduit à la formation un triose (glycéraldéhyde-3-phosphate) en consommant de l'énergie sous forme d'ATP. Il s'agit donc d'une voie anabolique permettant la synthèse des composants cellulaires.
- 2.4 L'enzyme X catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène produit par le métabolisme en $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Cette enzyme est donc une peroxydase (catalase)

probablement dans le cas présent). Elle permet à la cellule de se protéger de cette espèce chimique réactive de l'oxygène et d'avoir un mode de vie aérobie.

2.5 La culture de cette levure en présence de glucose et de méthanol présentera une courbe de croissance ayant l'allure suivante :



La courbe présentera deux phases de croissance : une première phase correspondant à la croissance liée à la consommation de glucose (répression catabolique de la production des enzymes nécessaires à la consommation du méthanol), suivie d'une phase stationnaire transitoire (levée de la répression catabolique et induction des enzymes appropriées), et d'une deuxième phase de croissance liée à la consommation du méthanol.

Il s'agit du phénomène de diauxie.

3. Production de l'Antigène HBs

3.1 Au cours de la première phase, d'une durée de 26 heures, le glycérol est utilisé comme source de carbone et d'énergie, ce qui assure la production d'une biomasse suffisante.

La deuxième phase débute avec l'ajout de méthanol dans le milieu, après épuisement du glycérol. Elle permet le maintien de la culture (source de carbone et d'énergie) ainsi que l'induction de la production de protéines HBs grâce à l'activation du promoteur inducible *AOX1*.

3.2 Calcul de $Q_{X \text{ expo}}$ et de G lors de la première phase :

$$Q_{X \text{ expo}} = \frac{d \ln X}{dt} = \frac{\ln X_{26h} - \ln X_0}{26 - 0} = \frac{5,1 - (-1,2)}{26} = 0,24 \text{ } h^{-1}$$

$$G = \frac{\ln 2}{Q_X} = \frac{\ln 2}{0,24} = 2,9 \text{ } h$$

3.3 La valeur de la concentration en biomasse sèche au début de la phase d'alimentation est d'environ 60 g.L^{-1} . La courbe A du document 7 montre que tout le glycérol est consommé pendant cette première phase de la culture. On peut donc calculer $R_{X/S}$:

$$R_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_{26h} - X_0}{S_0 - S_{26h}} = \frac{60 - 0,2}{95,2} = 0,63 \text{ g de biomasse} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de glycérol consommé}$$

3.4 La solution d'ammoniaque (base) est un régulateur de pH : son ajout permet de maintenir le pH au point de consigne à 5,5 (le métabolisme est acidifiant).

3.5 La régulation de l'oxygénation du milieu est importante pour éviter de descendre en dessous d'une concentration critique en dioxygène dissous qui limiterait la croissance de la souche.

Différents actionneurs classiques de régulation peuvent être mis en place : vitesse d'agitation du milieu, débit d'aération, richesse en dioxygène de l'air d'aération...

3.6 La concentration en dioxygène est régulée car sa valeur diminue lors de la première phase et se stabilise à 20 %, parallèlement à l'augmentation de la vitesse d'agitation (le débit d'air reste constant). L'agitation est donc le paramètre régulant la concentration en O₂.

En début de procédé le volume de milieu est de 10 L au total (= 9 L + 1 L d'inoculum) et le débit d'aération est fixé au départ à 5 L•min⁻¹

$$VVM = \frac{\text{Débit d'air}}{V_{milieu}} = \frac{5}{10} = 0,5 \text{ L d'air} \cdot L^{-1} \text{ de milieu} \cdot min^{-1}$$

3.7 Calcul de la productivité volumique horaire totale (PVHT) en antigènes HBs solubles :

$$PVHT = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{[HBs]_{finale} - [HBs]_0}{durée totale de production} = \frac{2 - 0}{200} = 0,01 \text{ g} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$$

Pour optimiser la production il faut arrêter le procédé lorsque la concentration en produit est maximale et n'évolue plus. Cette durée de production permet de calculer la productivité volumique horaire maximale (PVHM).

Ici on constate sur la courbe B du document 7 que le pic de production correspond au temps 120 h. Si on arrêtait le procédé après 120 h, on obtiendrait :

$$PVHM = \frac{[HBs]_{120h} - [HBs]_0}{durée optimale} = \frac{2,3}{120} = 0,019 \text{ g} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$$

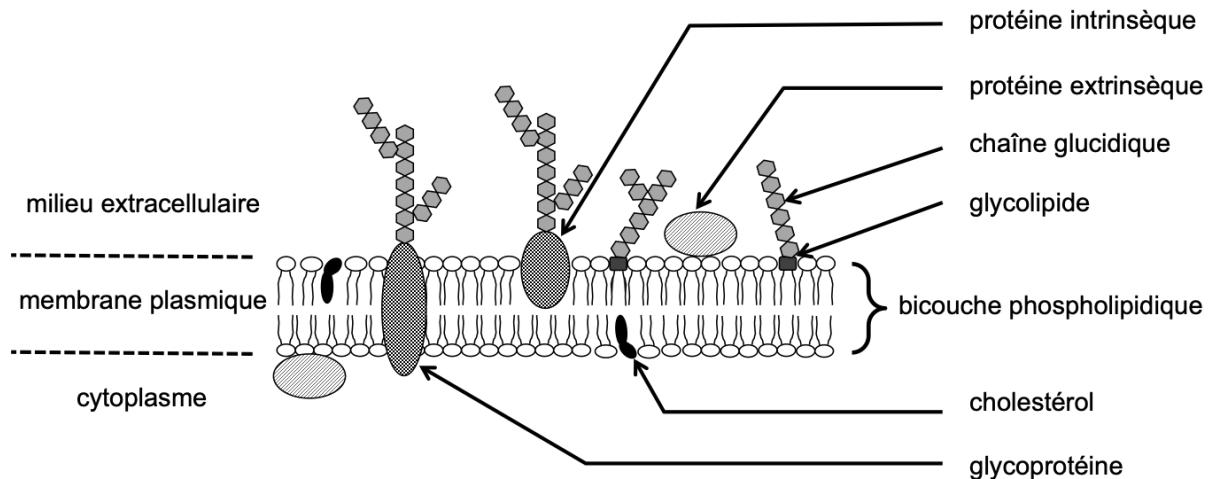
L'arrêt du procédé après 120 h permettrait de quasiment doubler la productivité totale en antigène HBs.

2018 – U42 : Biologie cellulaire

Une nouvelle technologie en culture cellulaire

1. Culture des cellules adhérentes (10 points)

1.1 Schéma de la membrane plasmique



Les protéines intrinsèques ou transmembranaires sont responsables de l'adhérence.

1.2 Le principe d'un microscope électronique à transmission repose sur l'émission d'électrons à partir d'un canon à électrons sous vide d'air. Ce faisceau d'électrons est concentré sur la préparation via le condenseur (lentille électromagnétique). Après traversée de l'échantillon, les électrons sont transmis ou non vers d'autres lentilles de nature électromagnétique pour obtenir une image agrandie sur un écran phosphorescent. Les structures opaques aux électrons apparaissent sombres sur l'écran (diffraction des électrons), les structures non opaques aux électrons apparaissent claires sur l'écran (transmission).

1.3 La jonction du document 1 est un desmosome, assurant la jonction entre cellules par l'intermédiaire de cadhérines, protéines transmembranaires.

A : membrane plasmique ; B : espace intercellulaire (ou intermembranaire) ; C : filaments intermédiaires ; D : plaque cytoplasmique.
Les filaments intermédiaires s'attachent à la cadhérine.

1.4 Dissection : étape 1 ; dissociation : étapes 2 (dissociation enzymatique) et 3 (dissociation mécanique) ; mise en culture : étapes 5 (comptage et ajout du milieu de culture) et 6 (incubation).

1.5 Une culture primaire correspond à la mise en culture de cellules directement à partir d'un organe prélevé sur l'organisme dont elles sont issues, ce qui est le cas ici (mise en culture à partir de ganglions nerveux dorso-lombaires de souris).

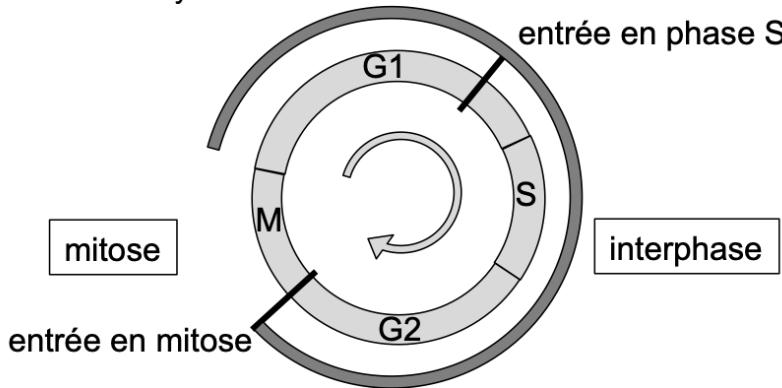
La collagénase permet d'hydrolyser le collagène, principal constituant de la matrice extracellulaire, elle permet la dissociation du tissu conjonctif. La trypsine hydrolyse les protéines d'adhérence permettant aux cellules de se détacher de la matrice extracellulaire et des cellules voisines. L'EDTA est un agent chélatant les cations divalents, en particulier le calcium, dont la présence est nécessaire pour certaines protéines intervenant dans les jonctions cellulaires.

Ces trois molécules permettent de dissocier les liaisons associant les cellules au tissu conjonctif et entre elles.

1.6 L'étape 5 du document 2 indique que la suspension de cellules nerveuses est déposée sur une lamelle sensibilisée par de la D,L-polyornithine et de la laminine, elle-même placée dans un puits d'une plaque : les cellules nerveuses sont donc des cellules adhérentes qui se développent en monocouche sur un support solide.

Le milieu de culture ne contenant pas de sérum de veau fœtal (FBS), donc pas de facteurs d'adhérence, l'ornithine et la laminine permettent aux cellules d'adhérer au support.

1.7 Schéma du cycle cellulaire



Il existe deux points de contrôle du cycle cellulaire, l'un dans la phase G1, permettant d'initier le début de la réplication de l'ADN (transition G1/S), l'autre en fin de G2, permettant d'entrer en mitose (transition G2/M).

1.8 Lorsqu'une cellule en phase S (dont l'ADN est en cours de réplication) est fusionnée à une cellule en phase G1, l'ADN contenu dans le noyau de la cellule en phase G1 commence à se répliquer (entrée en phase S). La transition G1 / S a donc été déclenchée par un facteur soluble présent dans la cellule en phase S et transmis à la cellule en phase G1.

2. Étude d'un nouveau support de culture cellulaire (8 points)

2.1 Les cellules normalement adhérentes ne nécessitent pas d'utiliser un traitement particulier, il est donc possible d'utiliser un support de culture standard.

La poly-D-Lysine est un polypeptide artificiel chargé positivement, et permet donc la culture de cellules peu adhérentes utilisant un support de synthèse.

Les supports adaptés à la culture de cellules peu adhérentes utilisant un support physiologique comportent des protéines naturellement présentes dans la matrice extracellulaire, telles que le collagène, la fibronectine ou la laminine.

2.2 Le protocole 1 utilise les propriétés du polymère PNIPAM : à 37 °C, les cellules adhèrent sur le PNIPAM qui est sous une forme compacte et modérément hydrophobe. Les cellules sont alors incubées à 20 °C, température qui permet le déploiement du polymère, sur lequel les cellules ne sont plus capables d'adhérer, ce qui provoque leur dissociation du support.

Le protocole 2 est un protocole de dissociation enzymatique par la trypsine, qui hydrolyse les protéines membranaires responsables de l'adhésion des cellules au support. L'EDTA permet de lier le calcium intervenant dans les jonctions cellulaires.

Le protocole 3 consiste en une dissociation mécanique des cellules par grattage, en présence d'EDTA qui permet de chélater les ions Ca^{2+} .

2.3 Les protocoles classiques de dissociation des cellules ne permettent pas de récupérer plus de 60% des cellules (environ 20 % dans le cas d'un traitement à la trypsine, et environ 60 % dans le cas d'un grattage simple). Le protocole mettant en jeu le PNIPAM permet de récupérer 90 % des cellules, ce qui est bien meilleur.

La culture des cellules sur le polymère PNIPAM permet donc de récupérer plus efficacement les cellules lors des repiquages.

2.4 Un fluorochrome, lorsqu'il est excité à une longueur d'onde donnée (longueur d'onde d'excitation : λ excitation) est capable de réémettre de la lumière à une longueur d'onde supérieure (longueur d'onde d'émission : λ émission). (λ émission > λ excitation).

2.5 Dans un cytomètre en flux analyseur, les cellules passent une à une dans une gaine liquide. Au cours de ce passage, les cellules sont éclairées par un laser : les déviations aux petits et grands angles permettent de déterminer la taille et la granulosité de la cellule, les cellules marquées par un fluorochrome sont excitées par le laser et la fluorescence émise est amplifiée et détectée par des capteurs. Les signaux obtenus sont ensuite traités informatiquement.

2.6 Le contrôle négatif consiste en un marquage des cellules par des anticorps non spécifiques conjugués à la phycoérythrine, de façon à vérifier la spécificité de la détection par les anticorps anti140a conjugués à la phycoérythrine, et la qualité des protocoles de lavages. Le résultat attendu pour le marquage par ces anticorps est une absence (ou très faible) fluorescence.

Les graphes montrent effectivement une faible fluorescence pour les témoins négatifs, quelle que soit la méthode utilisée pour récolter les cellules, ce témoin est donc conforme.

Les cellules récoltées par trypsination présentent une faible fluorescence : la courbe est quasiment superposée à celle du témoin négatif, ce qui traduit une altération de l'antigène de surface CD104a, de nature protéique et donc partiellement hydrolysé par la trypsine. Les cellules cultivées sur PNIPAM et récoltées par réduction de la température présentent une forte fluorescence, environ 10 fois plus importante que dans le cas du témoin négatif. L'antigène de surface CD104a est donc intégré.

En conclusion, la culture sur PNIPAM permet à la fois une meilleure récupération des cellules, et une meilleure intégrité des cellules récoltées.

Session 2019 :

Sujets

2019 - U11 : Mathématiques

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : L'usage de tout modèle de calculatrice de poche, avec ou sans mode examen, est autorisé.

Document à rendre avec la copie : Annexe 1 exercice 1 Question B.1

EXERCICE 1 (10 points)

Staphylococcus Aureus (SA), plus communément appelé staphylocoque doré, est une bactérie responsable de nombreuses intoxications alimentaires. Elle est naturellement présente chez l'homme. Déposée sur un aliment et sous certaines conditions (comme notamment la présence suffisante de nutriments), elle se développe très fortement et produit des toxines. Ces toxines, une fois ingérées, sont responsables de troubles alimentaires, qui peuvent aller, dans certains cas extrêmes, jusqu'à la mort de la personne touchée.

Partie A : Équation différentielle

1. Déterminer les solutions sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$ de l'équation différentielle $20y' - 20,8y = 0$ où y est une fonction de la variable réelle t , définie et dérivable sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$.
2. En déduire la fonction f solution de cette équation différentielle qui vérifie $f(0) = 10$.

Partie B : Modèle exponentiel

On souhaite étudier la croissance de bactéries SA à température ambiante sur un échantillon de mix (le mix est un mélange contenant en grande partie du lait permettant la fabrication de glaces à l'italienne).

On suppose que 10 bactéries sont déposées en même temps sur 1 g de mix. Voici les relevés du nombre de bactéries SA heure par heure, mesuré à partir du moment où les bactéries sont déposées sur le mix.

Heure (t_i)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de bactéries SA (N_i)	10	27	78	232	650	1800	5100	14100	39000

1. On effectue un changement de variable de type logarithmique $z_i = \ln(N_i)$. Compléter le tableau donné en **annexe 1 à rendre avec la copie**. On arrondira les valeurs au centième.
2. À l'aide de la calculatrice, déterminer une équation de la droite d'ajustement Δ du nuage de points (t_i, z_i) par la méthode des moindres carrés sous la forme $z = at + b$. On arrondira les valeurs de a et b au millième.
3. En utilisant la question précédente, déterminer une expression de la fonction N qui modélise le nombre de bactéries SA à l'instant t exprimé en heures.

Dans la suite, on prendra $N(t) = 10 e^{1,04t}$ pour tout réel t de l'intervalle $[0 ; +\infty[$. On admet que la fonction N modélise le nombre de bactéries SA relevées sur le mix en fonction du temps.

4. Une population donnée de bactéries voit son effectif doubler au bout d'un temps appelé «temps de génération bactérienne » et noté G . Estimer cette durée G en minutes.
5. Calculer la limite de N en $+\infty$.

PARTIE C : Modèle logistique

Dans cette partie, on étudie et on utilise un deuxième modèle, appelé modèle logistique et défini par une fonction M , qui, à tout instant t exprimé en heures, associe le nombre $M(t)$ de bactéries de SA à l'instant t donné par :

$$M(t) = \frac{13\,500}{1\,350 \times e^{-1,04t} + 1}$$

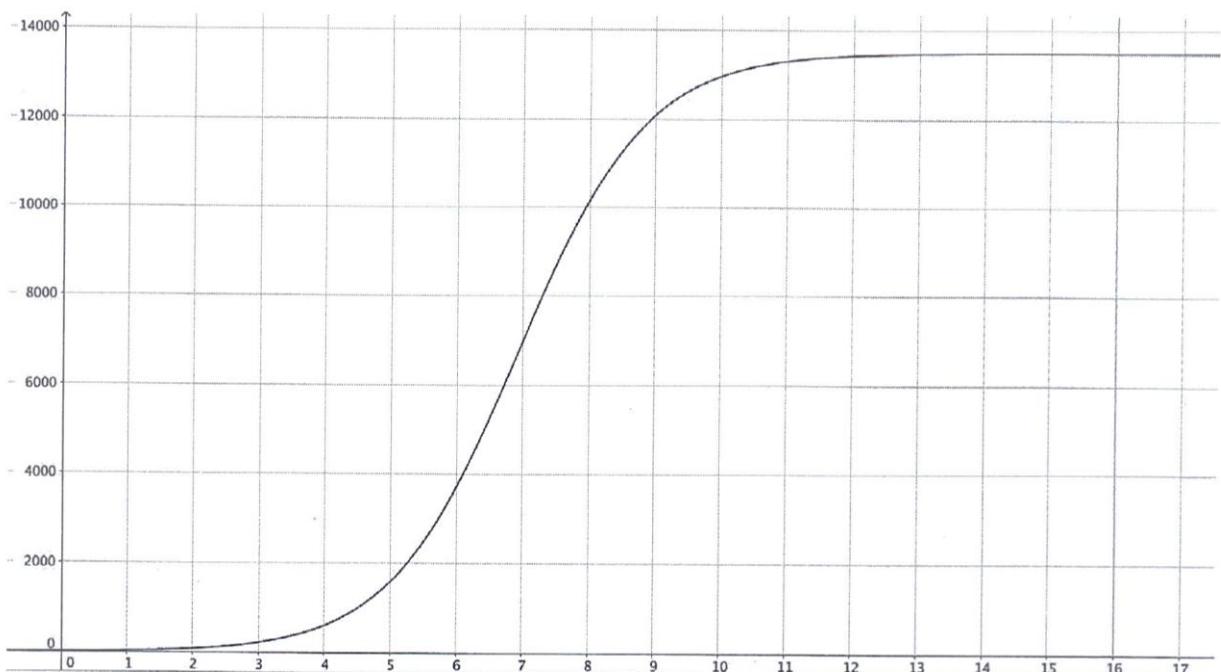
1. La dérivée de M est fournie par un logiciel de calcul formel :

$$M'(t) = \frac{13\,500 \times 1\,350 \times 1,04 \times e^{-1,04t}}{(1\,350 \times e^{-1,04t} + 1)^2}$$

Étudier les variations de la fonction M sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$.

2. a. Déterminer la limite de M en $+\infty$.
b. L'un des modèles de croissance de bactéries SA (exponentiel ou logistique) est plus vraisemblable. Lequel ?

La courbe représentative de la fonction M est présentée ci-dessous.



3. Déterminer le temps nécessaire pour que le nombre de bactéries SA dépasse 10 000. Arrondir à l'heure.

Pour tout instant t exprimé en heures, le réel $M'(t)$ est appelé vitesse de prolifération bactérienne.

4. Dans cette question, on s'intéresse à l'instant où la vitesse de prolifération bactérienne est maximale. Parmi les quatre propositions suivantes, une seule d'entre elles correspond à une valeur approchée de cet instant. Laquelle ? Pourquoi ?

a. $t = 4$ h b. $t = 7$ h c. $t = 9$ h d. $t = 16$ h

EXERCICE 2 (10 points)

Dans cet exercice, les probabilités seront données en valeurs décimales à 10^{-4} près.

Les parties A, B et C peuvent se traiter de façon indépendante.

On s'intéresse à la production industrielle de bouteilles d'eau minérale naturelle ou d'eau de source. On s'intéresse à la qualité de l'eau contenue dans les bouteilles produites : plusieurs paramètres sont pris en compte, notamment microbiologiques (présence de bactéries, de coliformes, de germes...) et physico-chimiques (présence d'arsenic, de nickel...).

PARTIE A : Eau de source et eau minérale naturelle

En 2017, des analyses identiques ont été menées sur la qualité de l'eau de 126 000 bouteilles produites. Ainsi 37 000 bouteilles d'eau minérale naturelle et 89 000 bouteilles d'eau de source ont été analysées.

Parmi les analyses portant sur les bouteilles d'eau minérale naturelle, on constate que 0,12 % des analyses révèlent une eau non conforme. Parmi celles portant sur les bouteilles d'eau de source, on constate que 0,08 % des analyses révèlent une eau non conforme.

On choisit le résultat d'une analyse d'une bouteille d'eau au hasard parmi toutes celles qui ont été réalisées.

Dans la suite, on notera les événements suivants :

M : « L'analyse porte sur une bouteille d'eau minérale naturelle » ;

S : « L'analyse porte sur une bouteille d'eau de source » ;

N : « L'analyse révèle une eau non conforme ».

1. Calculer les probabilités $P(M)$ et $P(S)$.

Pour les deux questions suivantes, on pourra s'aider d'un arbre pondéré.

2. Calculer la probabilité de choisir une analyse qui révèle une eau non conforme.
3. Calculer la probabilité qu'une analyse porte sur une bouteille d'eau minérale naturelle, sachant qu'elle révèle une eau non conforme.

PARTIE B : Étude du nitrate présent dans l'eau

Une entreprise produisant des bouteilles d'eau minérale naturelle affirme que la moyenne du taux de nitrate de sa production est égale à 4,5 mg/L. L'objectif de cette partie est de juger de la véracité de cette affirmation.

On note μ la moyenne, mesurée en mg/L, du taux de nitrate de la production, et σ son écart type.

On réalise 600 prélèvements dans la production. Les résultats sont les suivants :

Taux de nitrate (en mg/L)	[4,2 ; 4,3 [[4,3 ; 4,4 [[4,4 ; 4,5 [[4,5 ; 4,6 [[4,6 ; 4,7 [[4,7 ; 4,8 [
Nombre de prélèvements	5	57	181	233	110	14

1. En faisant l'hypothèse que les valeurs observées sont respectivement celles du centre de chaque classe, déterminer, à l'aide de la calculatrice, la moyenne \bar{x} et l'écart type s de cet échantillon. On donnera les résultats à 10^{-4} près.

2. Vérifier que $s = 0,0976$ est un estimateur de l'écart type σ .
3. On souhaite réaliser le test bilatéral suivant, au seuil de 5 % :

$$H_0 : \mu = 4,5 \text{ contre } H_1 : \mu \neq 4,5.$$

Soit \bar{X} la variable aléatoire qui à tout échantillon de 600 prélèvements associe la moyenne du taux de nitrate de ces prélèvements. On considère que \bar{X} suit la loi normale d'espérance μ et d'écart type $\frac{\sigma}{\sqrt{600}}$.

Dans la suite, on remplace σ par son estimateur $s = 0,0976$. Sous l'hypothèse H_0 , \bar{X} suit donc approximativement la loi normale d'espérance 4,5 et d'écart type 0,004.

- a) On a présenté **en annexe 2** les représentations de trois densités de probabilité. Laquelle de ces trois représentations est associée à la variable aléatoire \bar{X} ? Justifier la réponse.
- b) Donner un nombre réel a à 10^{-3} près vérifiant :

$$P(4,5 - a \leq \bar{X} \leq 4,5 + a) \approx 0,95.$$
- c) Énoncer la règle de décision de ce test.
- d) D'après les résultats obtenus dans l'échantillon donné, peut-on accepter l'hypothèse $\mu = 4,5$?

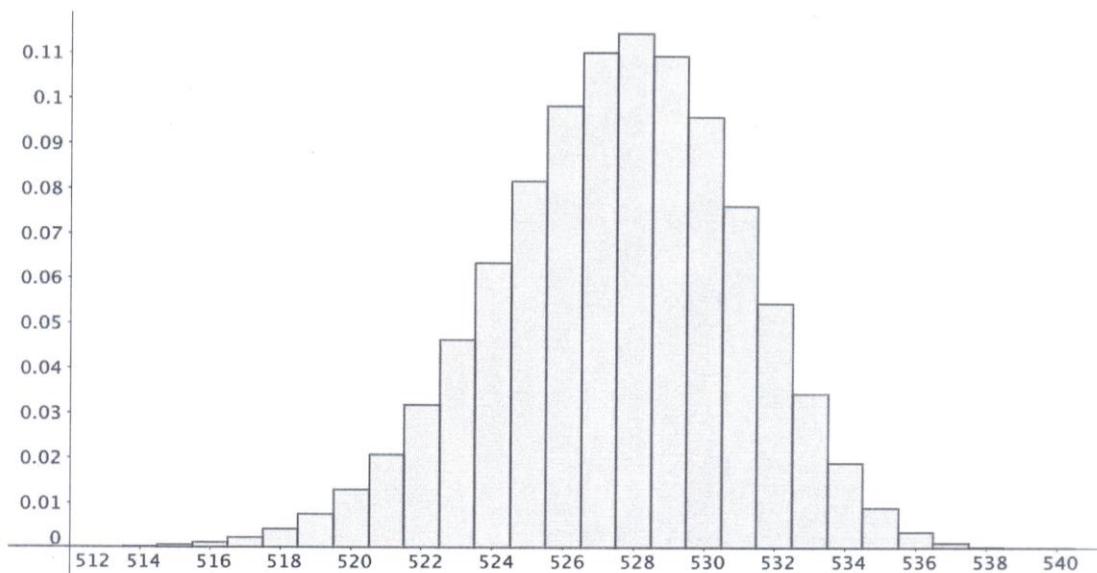
PARTIE C : Distribution

L'entreprise précédente fournit une grande surface en eau minérale. Chaque semaine, 540 bouteilles contenant un litre d'eau minérale sont réceptionnées par la grande surface.

Une bouteille d'eau minérale d'un litre est de très bonne qualité si elle contient moins de 4,7 mg de nitrate.

On prélève au hasard un lot de 540 bouteilles dans la production, jugée suffisamment importante pour assimiler ce choix à un tirage avec remise. On note alors Y la variable aléatoire qui, à chaque lot de 540 bouteilles, associe le nombre de bouteilles de très bonne qualité du lot.

On admet que Y suit une loi binomiale dont une représentation graphique est fournie ci-dessous :

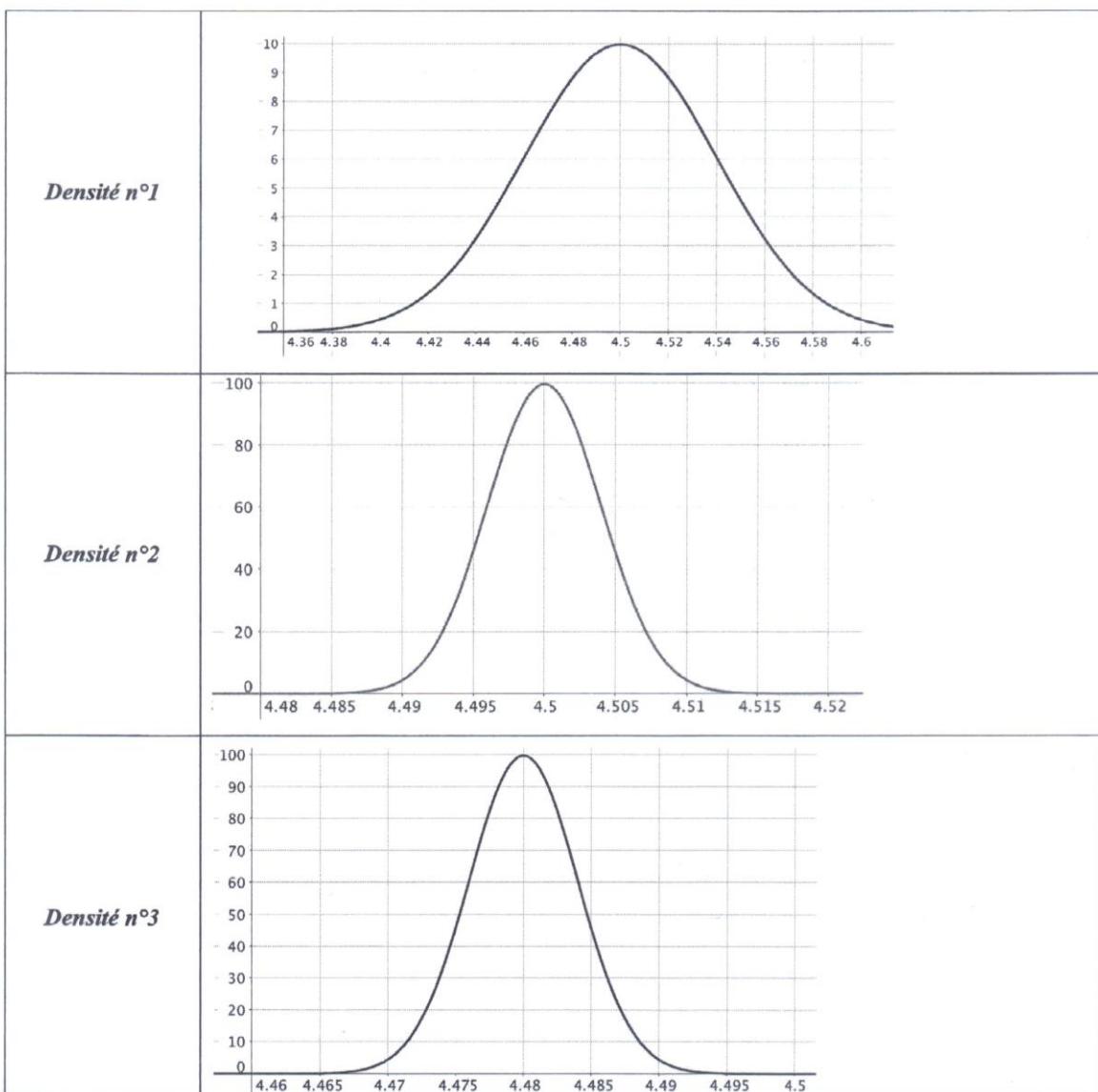


1. Au vu de ce graphique, un biologiste estime que la probabilité qu'un lot de 540 bouteilles prélevé au hasard dans la production contienne moins de 520 bouteilles de très bonne qualité est environ égale à 0,005. A-t-il raison ? Justifier la réponse.
2. On admet que le nombre moyen de bouteilles de très bonne qualité sur l'ensemble des échantillons de 540 bouteilles est égal à 528. Donner alors les paramètres n et p de la loi binomiale suivie par la variable aléatoire Y . On arrondira p à 10^{-3} .

Annexe 1 : Exercice 1- question B.1- À rendre avec la copie

Heure (t_i)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Quantité de SA (N_i)	10	27	78	232	650	1800	5100	14100	39000
$Z_i = \ln(N_i)$									

Annexe 1 : Exercice 2- question B.3.a



2019 - U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

Document à rendre avec la copie : annexe 1 et 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.

I. PHYSIQUE :

UTILISATION DE SONDES RADIOACTIVES ET FLUORESCENTES (17 points)

Le southern blot est un protocole permettant de détecter une séquence spécifique de l'ADN génomique afin, par exemple, de mettre en évidence une mutation ou au contraire d'écartier l'hypothèse d'une mutation dans un gène donné.

Au cours de ce protocole, on utilise un milieu d'hybridation qui contient des sondes radioactives ou fluorescentes d'ADN simple brin.

Données :

Tableau n°1 : extrait de la classification périodique des éléments

₁₃ Al	₁₄ Si	₁₅ P	₁₆ S	₁₇ Cl	₁₈ Ar
------------------	------------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------

Tableau n°2 : masses atomiques

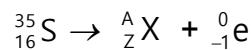
Symbol du noyau ou de la particule	₃₅ ¹⁶ S	_Z ^A X	₋₁ ⁰ e
Masse en unité de masse atomique (u)	34,96027	34,95954	$5,48560 \times 10^{-4}$

- unité de masse atomique
- célérité de la lumière dans le vide
- constante de Planck
- électron-volt

$1 \text{ u} = 1,66054 \times 10^{-27} \text{ kg}$
 $c = 3,00 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$
 $h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$
 $1 \text{ eV} = 1,60 \times 10^{-19} \text{ J}$

1. Étude d'une sonde radioactive

La sonde radioactive est réalisée en marquant un fragment d'ADN à l'aide d'un nucléotide radioactif. Le nucléotide radioactif utilisé est le soufre 35 (₁₆³⁵ S). Le noyau fils obtenu lors de la désintégration du soufre 35 est noté _Z^A X. L'équation de désintégration du soufre 35 s'écrit :

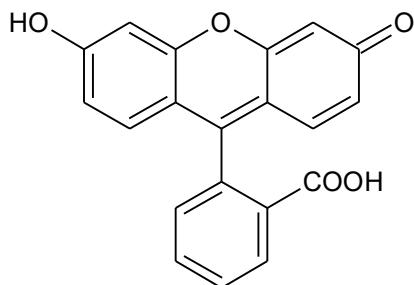


- Donner la composition du noyau de soufre 35.
- Donner le nom de la particule émise lors de la désintégration du soufre 35.
- Indiquer le type de radioactivité du soufre 35.
- Donner les valeurs de A et de Z du noyau fils _Z^A X en précisant pour chaque valeur la loi utilisée.

- 1.5. Identifier l'élément X et donner son symbole.
- 1.6 La fiche du soufre 35 donnée par l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité) indique que l'énergie libérée au cours de la désintégration de ce radionucléide est de 169 keV.
 - 1.6.1. Calculer en unité de masse atomique la variation de masse Δm accompagnant la réaction de désintégration du soufre 35, en utilisant les valeurs des masses atomiques du tableau n°2 figurant dans les données ci-dessus.
 - 1.6.2. Déterminer l'énergie E libérée au cours de la désintégration du soufre 35. Dire si la valeur obtenue est en accord avec la donnée de la fiche de l'INRS.
- 1.7. Les déchets à vie très courte (VTC), dont la demi-vie $t_{1/2}$ (ou la période radioactive) est inférieure à 100 jours, sont entreposés un temps suffisant pour que leur radioactivité diminue avant élimination dans les filières conventionnelles. Montrer, en utilisant le **document de l'annexe 1 page 7 à rendre avec la copie**, que le soufre 35 est un déchet à vie très courte (VTC).
- 1.8. L'activité initiale du soufre 35 est de 259 MBq.
 - 1.8.1. Donner la définition de l'activité d'une source radioactive.
 - 1.8.2. Au bout d'une durée correspondant à dix demi-vies (dix périodes), le radioélément concerné peut être éliminé par le circuit habituel des déchets. Calculer la valeur de l'activité A du soufre 35 au bout de cette durée de 10 demi-vies. Commenter cette valeur.

2. Étude d'une sonde fluorescente

La sonde fluorescente est un fragment d'ADN marqué par un fluorochrome comme la fluorescéine dont la formule semi-développée est la suivante :

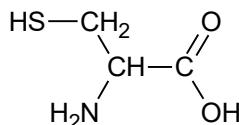


Le document en **annexe 2 page 7 à rendre avec la copie**, représente le spectre d'émission et d'excitation de la fluorescéine.

- 2.1. La molécule de fluorescéine peut être fluorescente. Calculer l'énergie E d'un photon émis à la longueur d'onde d'émission.
- 2.2. Le déplacement de Stokes correspond à la différence, en longueur d'onde, entre les deux maxima du spectre d'émission et d'excitation du fluorochrome. Si ce déplacement est faible, il est difficile de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission au moyen de filtres. En pratique, ce déplacement doit être supérieur à 20 nm pour pouvoir séparer les longueurs d'onde de la forte lumière incidente et de la faible fluorescence émise. Estimer la valeur du déplacement de Stokes. Commenter cette valeur.

II. CHIMIE ORGANIQUE : ÉTUDE DE LA CYSTÉINE (16 points)

Le soufre 35 peut également être utilisé pour marquer des acides aminés soufrés comme la cystéine. La formule semi-développée de la cystéine est la suivante :



1. Structure de la cystéine

Données : numéros atomiques : H : Z = 1 C : Z = 6 N : Z = 7 O : Z = 8 S : Z = 16

- 1.1. Donner les noms des trois fonctions organiques présentes dans la molécule de cystéine.
- 1.2. Expliquer pourquoi la molécule de cystéine est chirale.
- 1.3. Représenter l'énanthiomère R (en représentation de Cram) de la molécule de cystéine.
Justifier succinctement.
- 1.4. Le spectre infrarouge de la cystéine présente une forte bande d'absorption à 1580 cm^{-1} et une autre bande large et d'intensité forte entre 2500 cm^{-1} et 3200 cm^{-1} .
Indiquer, en utilisant le document de **l'annexe 3 page 8**, les groupements fonctionnels dont ces deux bandes révèlent la présence.

2. Oxydation de la cystéine

Dans cette partie, on simplifiera l'écriture de la cystéine par Cys-SH.

On fait réagir la cystéine avec une solution aqueuse de diiode. Il se forme de la cystine.

Données :

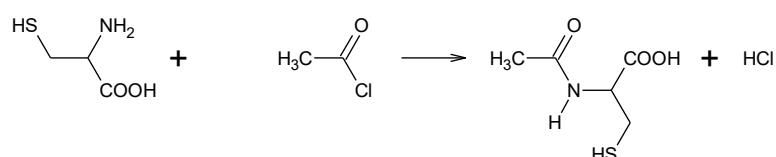
couples oxydant / réducteur : $I_2(aq) / I^-(aq)$

Cys-S-S-Cys (aq) / Cys-SH (aq)
(cystine / cystéine)

- 2.1. Écrire les demi-équations d'oxydo-réduction associées aux deux couples oxydant / réducteur ci-dessus.
- 2.2. Écrire l'équation de la réaction entre le diiode et la cystéine.
- 2.3. Donner le nom de la liaison formée au cours de cette réaction.

3. Étude du groupe fonctionnel $-\text{NH}_2$ de la cystéine

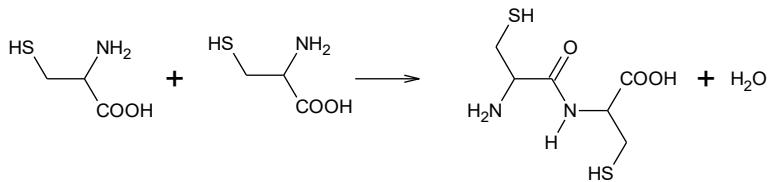
On fait réagir la cystéine avec le chlorure d'éthanoyle de formule CH_3COCl . On a, au préalable, procédé à la protection du groupement $-\text{SH}$ pour l'empêcher de réagir. L'équation de la réaction entre la cystéine et le chlorure d'éthanoyle est la suivante :



Donner le nom de la fonction organique formée au cours de cette réaction.

4. Étude du groupe fonctionnel –COOH de la cystéine

4.1. On réalise la réaction entre deux molécules de cystéine. On a, au préalable, procédé à la protection des groupements –SH pour les empêcher de réagir. L'équation de la réaction entre les deux molécules de cystéine est la suivante :



Donner le nom de la liaison formée au cours de cette réaction.

4.2. Lors de la réaction précédente vue à la question 3, il peut être nécessaire de bloquer le groupe fonctionnel – COOH d'une molécule de cystéine. Pour cela, on fait réagir la cystéine avec le 2-méthylpropan-2-ol. Le spectre de RMN du proton de cette molécule est donné en **annexe 4 page 9** (spectre simulé).

4.2.1. Écrire la formule semi-développée de la molécule de 2-méthylpropan-2-ol.

4.2.2. Dire si le 2-méthylpropan-2-ol est sensible à l'oxydation. Justifier.

4.2.3. Le signal RMN du proton situé à 1,26 ppm, correspondant à neuf noyaux d'hydrogène, est un singule. Expliquer pourquoi il n'y a qu'un signal pour ces neuf noyaux d'hydrogène et pourquoi ce signal est un singule.

4.2.4. Donner le nom de la fonction organique formée au cours de la réaction entre la cystéine et le 2-méthylpropan-2-ol.

4.2.5. Donner deux caractéristiques de cette réaction.

III. CHIMIE GÉNÉRALE : LE SOUFRE ET SES COMPOSÉS (17 points)

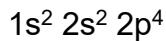
Le soufre dans les conditions standard est un solide jaune. L'isotope le plus répandu à l'état naturel est le soufre 32. À l'état naturel il peut être également présent sous forme de composés soufrés comme, par exemple, le sulfure d'hydrogène gazeux présent dans les gisements méthaniers. Le soufre solide peut être également oxydé en dioxyde de soufre, puis en trioxyde de soufre. Le trioxyde de soufre réagit avec l'eau pour former de l'acide sulfurique.

1. Structure du soufre et de ses composés

Données : numéros atomiques : O : Z = 8 S : Z = 16

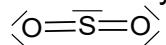
1.1. Écrire la configuration électronique de l'atome de soufre dans son état fondamental.

1.2. La configuration électronique de l'atome d'oxygène dans son état fondamental est :



Expliquer pourquoi le soufre et l'oxygène se trouvent dans la même colonne de la classification périodique.

1.3. Le schéma de Lewis de la molécule de dioxyde de soufre SO₂ est :

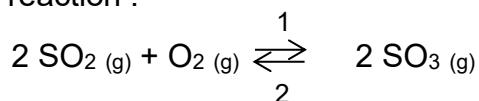


Le soufre ne respecte pas la règle de l'octet. Néanmoins les règles de la méthode VSEPR restent valables.

Déterminer la géométrie de la molécule de dioxyde de soufre en la justifiant succinctement.

2. Oxydation du dioxyde de soufre

En phase gazeuse l'oxydation du dioxyde de soufre conduit à la formation de trioxyde de soufre selon l'équation de la réaction :



Données :

- Constante des gaz parfaits à 298 K $R = 8,31 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

Espèce chimique	Enthalpie standard de formation à 298 K $\Delta_f H^\circ \text{ (kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{)}$
$\text{SO}_2 \text{ (g)}$	- 296,8
$\text{O}_2 \text{ (g)}$	0
$\text{SO}_3 \text{ (g)}$	- 395,7

- Calculer l'enthalpie standard de réaction, notée $\Delta_r H^\circ$, de la réaction de synthèse du trioxyde soufre gazeux à 298 K.
- En déduire si la réaction dans le sens 1 est endothermique ou exothermique. Justifier.
- La valeur de l'enthalpie libre standard de réaction, notée $\Delta_r G^\circ$, de la réaction de synthèse du trioxyde de soufre gazeux à 298 K est de $- 141,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Calculer la valeur de la constante d'équilibre K° à la température de 298 K.
- Les conditions industrielles de l'amorçage de cette oxydation sont : $P = 1 \text{ bar}$ et $T = 703 \text{ K}$. La température atteint rapidement 873 K. Justifier le choix de la température d'amorçage et expliquer son évolution.

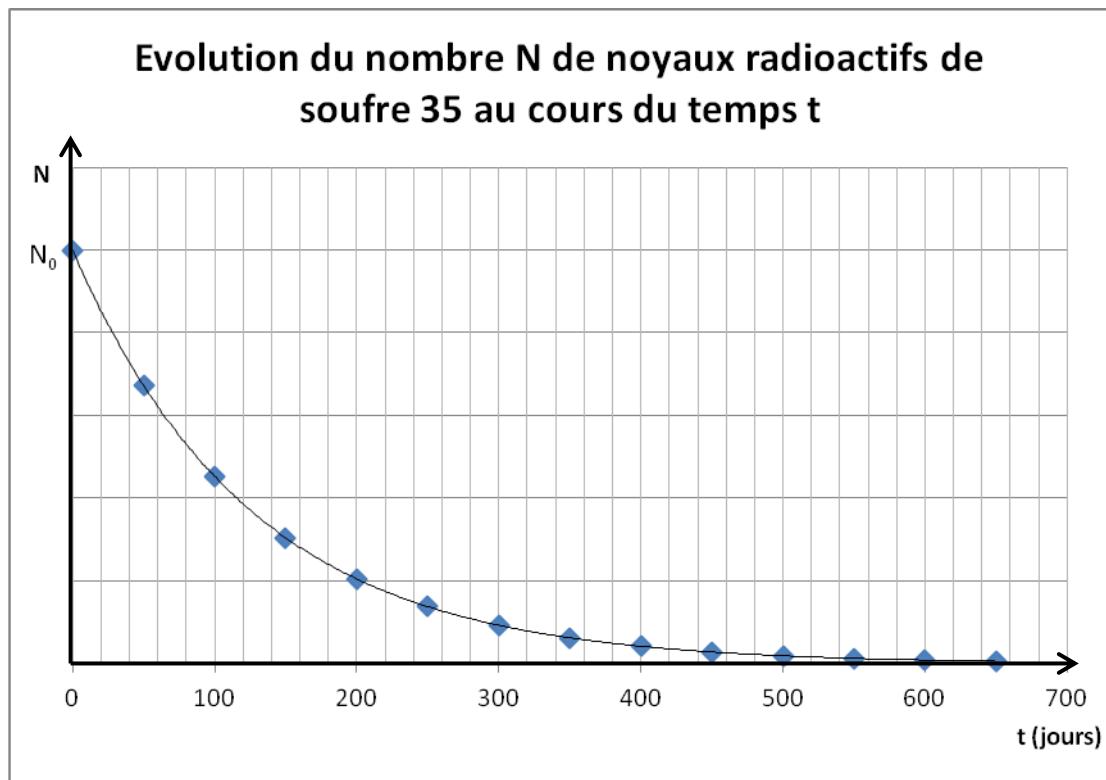
3. Dissolution du trioxyde de soufre

Donnée : Formule de l'acide sulfurique : H_2SO_4

On dissout du trioxyde de soufre dans l'eau, il se forme une solution aqueuse d'acide sulfurique dont la concentration molaire est $C = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

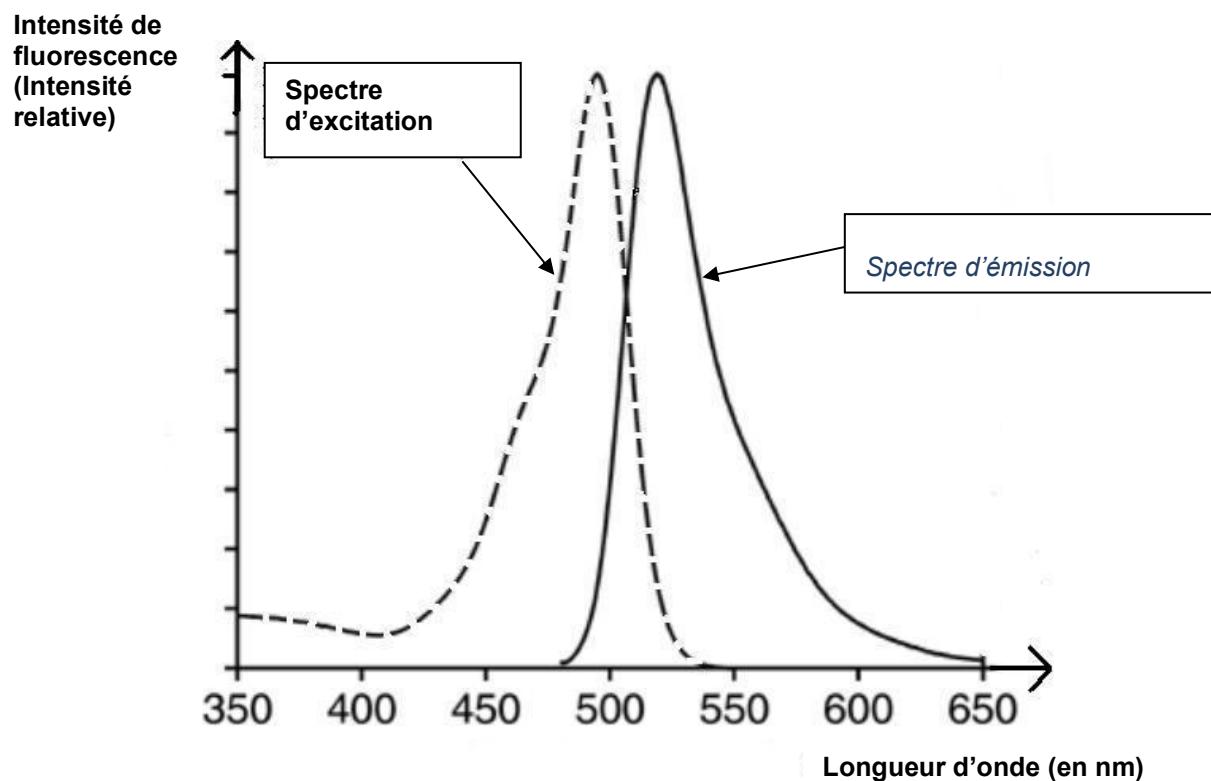
- On considère que l'acide sulfurique est un diacide fort.
 - Écrire l'équation de la réaction entre l'acide sulfurique et l'eau.
 - Calculer le pH de cette solution aqueuse d'acide sulfurique.
 - On réalise le dosage d'un volume $V = 10,0 \text{ mL}$ de cette solution aqueuse d'acide sulfurique par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium de concentration molaire $C_b = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.
Déterminer la valeur du volume V_b de solution aqueuse de soude versé à l'équivalence.
Donner la valeur du pH de la solution à l'équivalence.
Représenter l'allure du graphe de l'évolution du pH en fonction du volume de la solution aqueuse d'hydroxyde de sodium versée.
- En fait, l'acide sulfurique est un diacide dont la première acidité est forte pour le couple $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ (aq)} / \text{HSO}_4^- \text{ (aq)}$ et dont la seconde acidité est caractérisée par un $\text{pK}_a = 2$ pour le couple $\text{HSO}_4^- \text{ (aq)} / \text{SO}_4^{2-} \text{ (aq)}$. La valeur calculée du pH à la question 3.1.2. n'est pas celle que l'on mesure.
Dire si la valeur mesurée est plus faible ou plus élevée que celle calculée. Justifier brièvement.

ANNEXE 1 (à rendre avec la copie)



ANNEXE 2 (à rendre avec la copie)

SPECTRE D'ÉMISSION ET D'EXCITATION DE LA FLUORESCÉINE



ANNEXE 3

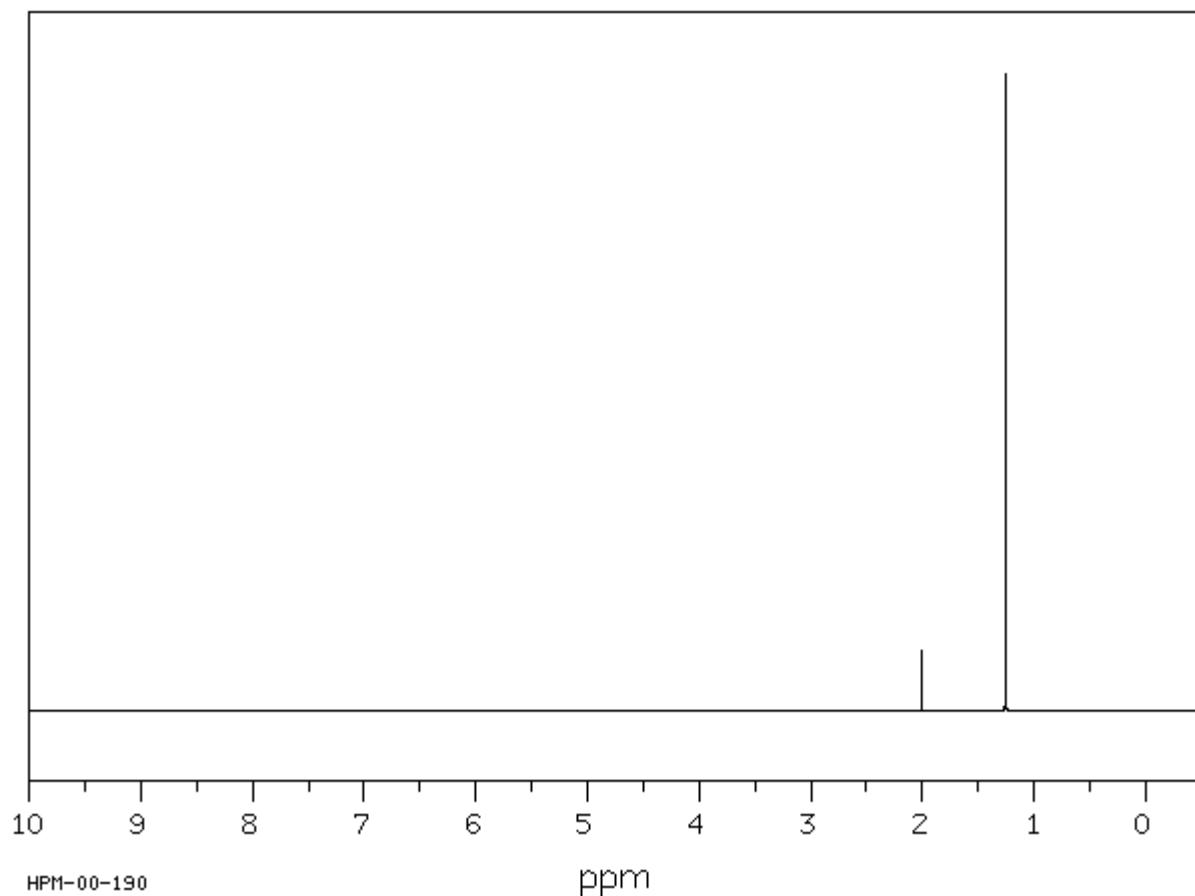
SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

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

Liaison	Espèce	Nature des vibrations	Nombre d'onde cm^{-1}	Intensité 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		m (2 bandes)
N-H	Amine secondaire	Valence	3300-3500	m (1 bande)
N-H	Amide	Valence	3100-3500	F
C _{di} -H	Alcyne	Valence	≈ 3300	m ou f
C _{tri} -H	Alcène	Valence	3030-3100	m
C _{tri} -H	Aromatique	Valence	3000-3100	m
C _{tet} -H	Alcane	Valence	2850-3000	F
C _{tri} -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 _{tri} =O	Aldéhyde et cétone	Valence	1650-1730 abaissement de 20 à 30 cm^{-1} si conjugaison	F
C _{tri} =O	Acide carboxylique	Valence	1700-1725	F
C _{tri} =O	Ester	Valence	1735-1750	F
C _{tri} =O	Amide	Valence	1630-1700	F
C _{tri} =C _{tri}	Alcène	Valence	1620-1690	m
C _{tri} =C _{tri}	Aromatique	Valence	1450-1600	Variable (3 ou 4 bandes)
N-H amine	Amine	Déformation	1560-1640	F ou m
-NO ₂	Groupe nitro	Valence	1540-1570 et 1340-1390	F (2 bandes)
C _{tet} -H	Alcane	Déformation	1430-1480	F
C _{tet} -H (CH ₃)	Alcane	Déformation	1370-1390	F (2 bandes)
C _{tet} -O	Alcool	Valence	1010-1200	F
C _{tet} -N	Amine	Valence	1020-1250	m
C _{tri} -H de -HC=CH- (E) (Z)	Alcène	Déformation Déformation	960-970 670-730	F m
C _{tri} -H	Aromatique monosubstitué	Déformation	730-770 et 680-720	F (2 bandes)
C _{tri} -H	Aromatique 1,2-disubstitué Aromatique 1,3-disubstitué Aromatique 1,4-disubstitué	Déformation Déformation Déformation	735-770 750-800 et 680-720 800-860	F F et m (2 bandes) 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 4
SPECTRE RMN DU 2-MÉTHYLPROPAN-2-OL



2019 - U2: Biologie moléculaire et génie génétique

Durée 2 h – coefficient 1

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

Étude *in vitro* de l'activité transcriptionnelle d'une version mutée du récepteur de l'hormone thyroïdienne TR α 1

L'émergence du séquençage à haut débit a permis, entre autres, la découverte chez l'être humain d'un nouveau type de résistance à l'hormone thyroïdienne. Celle-ci est attribuée à des mutations du facteur de transcription TR α 1 dont l'activité est dépendante de l'hormone thyroïdienne, dont il est le récepteur nucléaire.

Les patients atteints de cette pathologie présentent un phénotype similaire à ceux atteints d'hypothyroïdie : petite taille due à un retard de croissance osseuse, constipation, visage rond et plat, macrocéphalie et défauts du développement neurologique (A. Tylki-Szymanska, *JMG Online First* 2015).

Différentes lignées de souris incorporant des mutations du gène codant TR α 1 ont été construites. La lignée murine TR α 1CR1 porte une mutation au niveau de l'hélice α 12 de la protéine TR α 1. Cette lignée est utilisée dans cette étude dans le but d'analyser *in vitro* l'activité transcriptionnelle du récepteur TR α 1.

1. Extraction des ARN totaux de cœurs de souris (3 points)

Les ARN totaux de la lignée mutée (TR α 1CR1) sont purifiés à partir des cœurs de souris dans lesquels les récepteurs aux hormones thyroïdiennes sont fortement exprimés. Le coffret NucleoSpin® est utilisé selon le protocole présenté dans le **document 1**.

1.1. Expliquer le rôle des réactifs utilisés lors de la lyse (étape 2 du protocole).

La purification qui suit l'étape de lyse s'effectue par chromatographie à l'aide d'une mini-colonne.

1.2. Identifier le type de chromatographie mise en jeu.

Une purification des ARN polyA+ est ensuite réalisée à partir des solutions d'ARN totaux obtenues.

1.3. Expliquer l'intérêt de cette étape.

1.4. Proposer une méthode adaptée pour la purification des ARN polyA+.

2. Transcription inverse et amplification par PCR (3,5 points)

Une étape de transcription inverse est réalisée à partir des ARN purifiés précédemment, en présence d'amorces aléatoires, de dNTPs et de transcriptase inverse.

2.1. Expliquer en quoi la transcriptase inverse est une ADN polymérase particulière.

A l'issue de l'étape de transcription inverse, des amorces spécifiques sont utilisées pour amplifier par PCR la partie 3' du cadre ouvert de lecture (ORF) du récepteur TR α 1 muté. Le **document 2** présente la séquence de l'ORF du récepteur TR α 1 et la position des séquences cibles des amorces sens et anti-sens encadrant la séquence codant pour l'hélice α 12.

2.2. Identifier le format de séquence utilisé et rappeler les caractéristiques de ce type de format.

2.3. Écrire sur la copie la séquence des amorces sens et anti-sens, en les orientant, selon la convention d'écriture.

La PCR est réalisée en mode « Touch Down ». Le programme du thermocycleur est présenté dans le document 2.

2.4. Expliquer l'intérêt des étapes 2 et 3, caractéristiques d'une PCR « Touch Down ».

3. Clonage du produit de PCR dans le vecteur pGEM-T (5,5 points)

Le produit de PCR est directement cloné dans le vecteur pGEM-T, présenté dans le **document 3** en présence d'ADN ligase T4. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, le produit de ligature est mis en présence de bactéries JM109 compétentes pour une transformation.

3.1. Expliquer pourquoi le vecteur pGEM-T est particulièrement adapté au clonage de produits de PCR amplifiés par la Taq polymérase.

Le vecteur pGEM-T permet un criblage « Blanc / Bleu » des clones recombinés basé sur le principe de l'α-complémentation. Le génotype de la souche JM109 est présenté dans le document 3.

3.2. Dégager la caractéristique génétique de cette souche, indispensable à la réalisation de l'α-complémentation.

3.3. Proposer une composition pour le milieu de culture utilisé lors du criblage des clones recombinés dans le cadre de cette manipulation. Argumenter ce choix.

3.4. Expliquer ou schématiser le principe détaillé du criblage visuel « Blanc / Bleu ».

4. Obtention d'un vecteur d'expression du récepteur muté TR α 1CR1 (2 points)

Le vecteur d'expression pSG5/TR α 1 présent dans le **document 4**, contient une version sauvage du gène TR α 1. Il est digéré par les enzymes EcoR I et Bgl II afin de remplacer la séquence sauvage par la séquence mutée. Cette séquence portant la mutation CR1 affectant l'hélice α 12 est obtenue par double digestion (EcoR I et Bgl II) d'un vecteur d'amplification pGEM-T recombiné, sélectionné et vérifié. Après ligature, on obtient le vecteur d'expression pSG5/TR α 1CR1.

4.1. Repérer les éléments indispensables à l'expression du gène codant TR α 1 chez un organisme eucaryote. Expliquer leur rôle.

4.2. Identifier les éléments permettant d'attribuer au vecteur pSG5/TR α 1 la qualité de vecteur navette. Argumenter.

5. Etude de l'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvages et mutants (4 points)

L'hormone thyroïdienne T3 est capable de moduler l'expression de très nombreux gènes cibles via sa fixation sur son récepteur TR α 1. Le **document 5** présente l'activité transcriptionnelle de TR α 1. Celle-ci nécessite la formation d'un complexe TR α 1-TRE.

Afin de tester les conséquences de la mutation CR1 sur l'activité transcriptionnelle du récepteur TR α 1, des cellules épithéliales humaines HEK 293 sont co-transférées par deux plasmides :

- pSG5/TR α 1 exprimant la version sauvage ou mutée du récepteur à l'hormone T3 ;
- pTRE-luc exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle d'un élément régulateur TRE enhancer.

Après co-transfection, les cellules sont incubées en présence d'hormone T3 pendant 24 h, puis le niveau d'expression de la luciférase est évalué par luminométrie à 560 nm. Les principes et résultats sont présentés dans le **document 5**.

- 5.1. Présenter les caractéristiques d'un gène rapporteur.
- 5.2. Expliquer comment l'hormone T3 permet de moduler l'expression de certains gènes.
- 5.3. Analyser les résultats obtenus en lien avec la structure des plasmides utilisés.
- 5.4. Proposer deux fonctions possibles de l'hélice α 12.

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 : Extrait de la fiche technique du kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel).

The basic principle

One of the most important aspects in the isolation of RNA is to prevent degradation during the isolation procedure. With the **NucleoSpin® RNA** methods, cells are lysed by incubation in a solution containing large amounts of chaotropic ions. The RA1 lysis buffer immediately inactivates RNases – which are present in virtually all biological materials – and creates appropriate binding conditions which favor adsorption of RNA to the silica membrane. Contaminating DNA, which is also bound to the silica membrane, is removed by an rDNase solution which is directly applied onto the silica membrane during the preparation (RNase-free rDNase is supplied with the kit). Simple washing steps with two different buffers remove salts, metabolites and macromolecular cellular components. Pure RNA is finally eluted under low ionic strength conditions with RNase free H₂O (supplied).

Component	Hazard contents	GHS symbol	Hazard phrases	Precaution phrases
Inhalt	Gefahrstoff	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
rDNase, RNase-free	rDNase, lyophilized <i>rDNase, lyophilisiert</i> CAS 9003-98-9	 DANGER GEFAHR	317, 334	261, 280, 302+352, 304+340, 333+313, 342+311, 363
RA1	guanidinium thiocyanate 30–60% <i>Guanidinthiocyanat 30–60 %</i> CAS 593-84-0	 WARNING ACHTUNG	302, 412, EUH031	260, 273, 301+312, 330

1	Homogenize sample		30 mg			
2	Lyse cells		350 µL RA1 3.5 µL β-mercaptoethanol Mix			
3	Filtrate lysate		 11,000 x g, 1 min	7	Digest DNA	 95 µL DNase reaction mixture RT, 15 min
4	Adjust RNA binding conditions		350 µL 70 % ethanol Mix	8	Wash and dry silica membrane	 1 st wash 200 µL RAW2 2 nd wash 600 µL RA3 3 rd wash 250 µL RA3 1 st and 2 nd  3 rd  11,000 x g, 30 s 11,000 x g, 2 min
5	Bind RNA		 Load sample 11,000 x g, 30 s	9	Elute highly pure RNA	 60 µL RNase-free H ₂ O 11,000 x g, 1 min
6	Desalt silica membrane		 350 µL MDB 11,000 x g, 1 min			

Document 2 : Amplification par PCR de la partie 3' de l'ORF du récepteur TR α 1.

Séquence de l'ORF du récepteur sauvage TR α 1 de souris.

```
>gi|928589392:519-1997 Mus musculus thyroid hormone receptor alpha
(TR $\alpha$ 1), transcript variant 1
ATGGAACAGAAGCCAAGCAAGGTGGAGTGTGGGTCAAGACCCAGAGGAGAACAGTGC
CAGGTACCCA
GATGGAAAGCGAAAAAGAAAGAACGGCCAATGTCCCCTGAAAAGCAGCATGTCAGGGTATATCCCT
AGTTACCTGGACAAAGACGAGCAGTGTGTCGTGACAGGCAAGGCCACCGTTATCACTACCGC
TGTATCACTTGTGAGGGCTGCAAGGGCTTCTTCGCCGCACAATCCAGAAGAATCTCCATCCCACC
TATTCTGCAAGTATGACAGCTGCTGTGTCATCGACAAGATCACCGGAATCAGTGCCAGCTGTGC
CGCTTCAAGAAGTCATTGCTGTGGCATGGCATTGGACTGGTTCTAGATGATTGAAAGCGGGTG
GCCAAACGCAAGCTGATTGAGCAGAACCGGGAGAGGAGGGCGAAAGGAGGAGATGATTGCTCACTG
CAGCAGCGACCAGAGCCCCACTCTGAAGAGTGGACATGACATGTTGCTACAGAGGCCATCGC
AGCACTAACGCCAACGGGCAGCCATTGGAAACAGAGGCAGAAATTCTGCCGGATGACATTGCCAG
TCACCTATTGCTCCATGCCGACGGAGACAAGGTAGACCTAGAGGCCTTCAGCGAGTTACCAAG
ATCATCACCCCCGGCCATCACGCGCTGGACTTGCACAAAAACTGCCATGTTCTCCGAGCTG
CCTTGCGAATTC GACCAGATCATCCTCTGAAGGGCTGCTGCATGATCATGTCCTGCAGGAGCT
GTCCGCTACGACCCCTGAGAGTGACACCTGACCCCTGAGTGGGAGATGGCGGTTAACGGGAAACAG
CTCAAGAATGGTGGCTGGGTGTGGTCTCTGACGCCATCTTGAACTGGCAAGTCACTCTGCC
TTAACCTGGATGACACGGAAGTGGCTCTGCTGCAGGCTGTGCTAATGTCAACAGACCGCTCC
GGCCTGCTGTGCGTGGACAAGATCGAGAAGAGTCAGGAGGCCACCTGCTGGCGTTGAGCACTAC
GTCAACCACCGCAAACACAACATTCCGCACTCTGCCAACAGCTGCTGATGAAGGAGAGAGAAGTG
CAGAGTCGATTCTGTACAAGGGGGCAGCGGCAGAACGGCCGGCGGGTCACTGGCGTCCAC
CCGGAAAGGACAGCAGCTCTGGATCATGTTGTCAGGGTCCGCAGGTCCGGCAGCTTGAGCAGCA
GCTTAAGGTGAAGCAGGGAAAGTCTCCGAGGGCCGGTTCTCAGCACCAGAGCCCAGAGGCCAG
CAGCGTCTCCTGGAGCTGCTCCACGAAGCGGAGTTCTCCATTCCGAGCGGTCTGGGGAAGAT
CTCGACAGCAGGGCGAGCTCCCTGAGCTCCTCTGACACGGAGGACACGGAGGTCTGCGAGGAC
CAGGCAGGCAAGGCAGCCTCTCCCTGA
```

Données :

Les sites *EcoRI* (GAATTC) et *Bg*/II (AGATCT) apparaissent en gras.

La position de l'amorce sens (FWD) est soulignée par une ligne pointillée.

La position de l'amorce anti-sens (REV) est soulignée par un double trait.

L'outil « Tm calculator » fournit les données suivantes :

Amorce sens Tm = 64,6 °C Amorce anti-sens Tm = 62,2 °C

Température d'hybridation recommandée : 57,2 °C

Programme du thermocycleur :

Étape 1	95 °C : 3 min	
Étape 2	95 °C : 30 s	9 cycles
	68 °C : 30 s	
	72 °C : 30 s	
Étape 3	95 °C : 30 s	24 cycles
	58 °C : 30 s	
	72 °C : 30 s	
Étape 4	72 °C : 5 min	

Document 3 : Extrait de la fiche technique du système pGEM-T (Promega™).

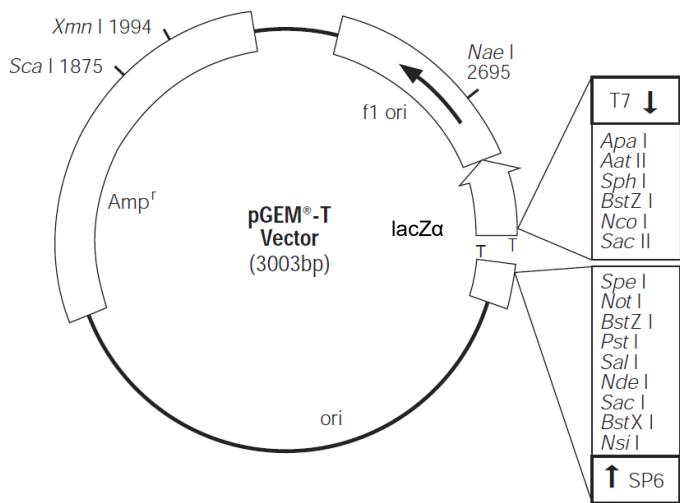
pGEM®-T Vector Systems

The pGEM®-T Vector Systems are convenient systems to clone PCR products. The pGEM®-T Vector is prepared by cutting the pGEM®-5Zf(+) Vector with EcoRV and adding a 3' terminal thymidine to both ends. These single 3'-T overhangs at the insertion site greatly improve the efficiency of ligation of a PCR product into the plasmid by preventing recircularization of the vector and providing a compatible overhang for ligation of PCR products generated by thermostable polymerases that add a single deoxyadenosine, in a template-independent fashion, to the 3'-ends of amplified fragments.

Features - Benefits

- Rapid Ligation:** The provided 2X Rapid Ligation Buffer allows reactions to be completed in 1 hour at room temperature.
- Blue/White Screening:** T7 and SP6 RNA polymerase promoters flank a multiple cloning region within the α -peptide coding region for β -galactosidase. Insertional inactivation of the α -peptide allows recombinant clones to be directly identified by color screening on indicator plates.

pGEM-T Vector Circle Map and Sequence Reference Points



pGEM®-T Vector Sequence reference points:

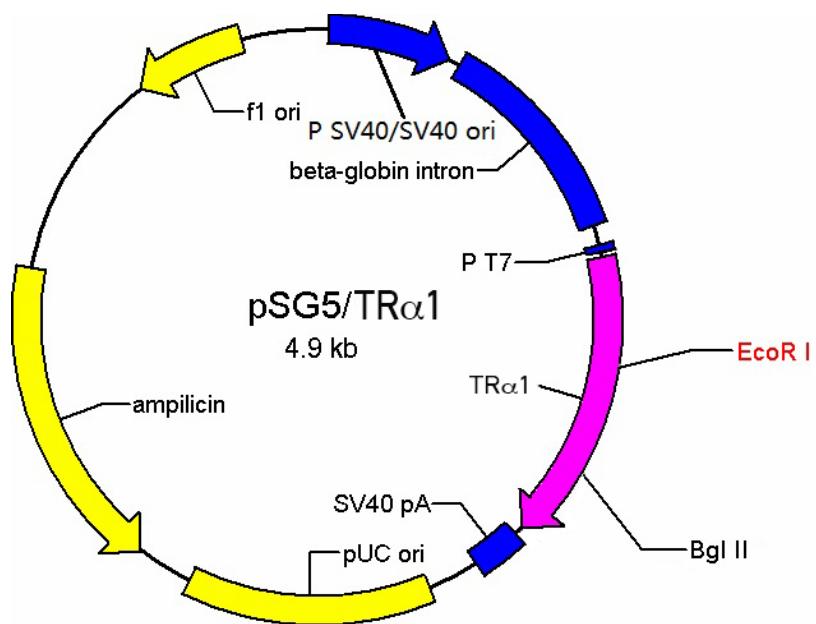
T7 RNA Polymerase transcription initiation site	10–1
multiple cloning region	124–1
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	161–1
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	1
lacZ α start	185–2
lac operator	1322–21
β -lactamase coding region	2365–28
phage f1 region	2821–2981, 151–3
lac operon sequences	2941–29
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2984
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	

f1 Origin of Replication: Allows preparation of single-stranded DNA.

Table 1. Genotypes of *E. coli* Competent Cells Offered by Promega.

Strain	Genotype
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3), pLysS, Cm ^r
HB101	F ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> (str ^r), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i>
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZΔM15</i>]
Pro 5-alpha	<i>fhuA2</i> , Δ (<i>argF-lacZ</i>), U169, <i>phoA</i> , <i>glnV44</i> , ϕ 80, Δ (<i>lacZ</i>)M15, <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i>

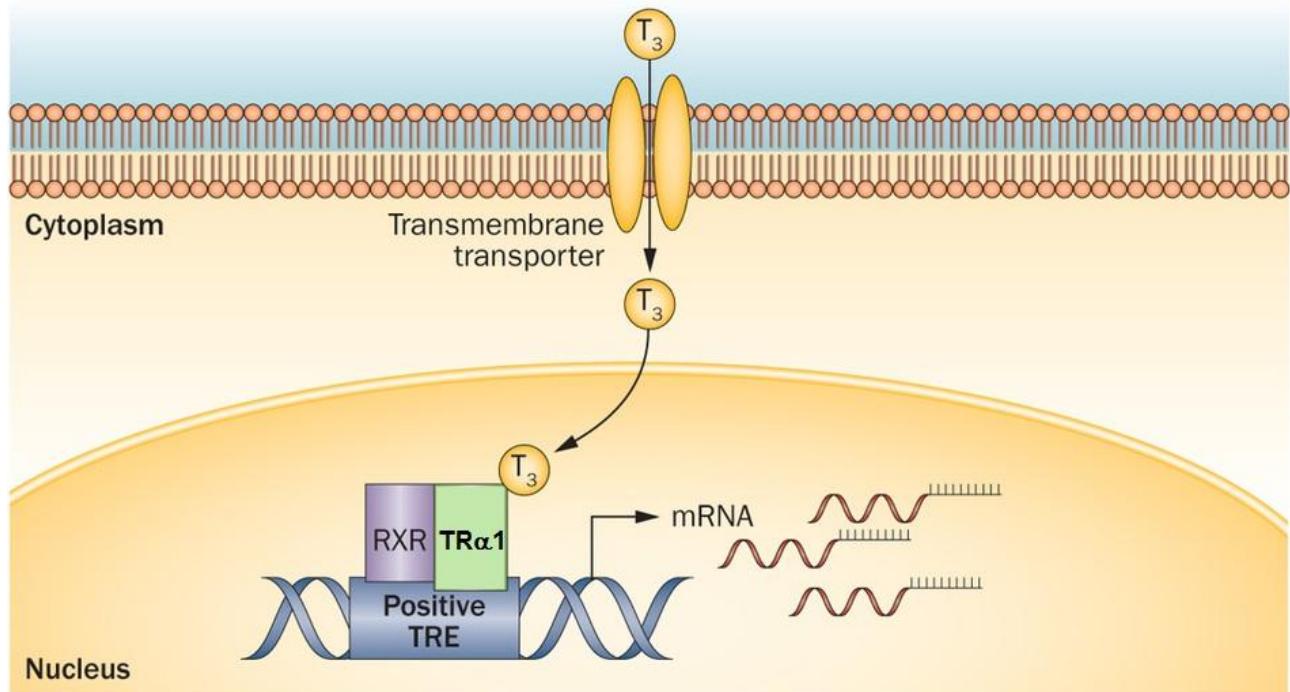
Document 4 : Vecteur d'expression pSG5/TR α 1 (d'après Addgene™)



Feature	Nucleotide Position
SV40 promoter and SV40 origin of replication	28–366
β -globin intron	395–967
T7 promoter	1022–1040
EcoR I	1043
BamH I	1049
Bgl II	1055
SV40 polyA signal	1069–1202
pUC origin of replication	1342–2009
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	2160–3017
f1 origin of ss-DNA replication	3587–3893

Document 5 : Modulation de l'activité transcriptionnelle par le couple T3/TR α 1, *in vivo* et *in vitro*.

5A : Molecular model of T3 target genes activation

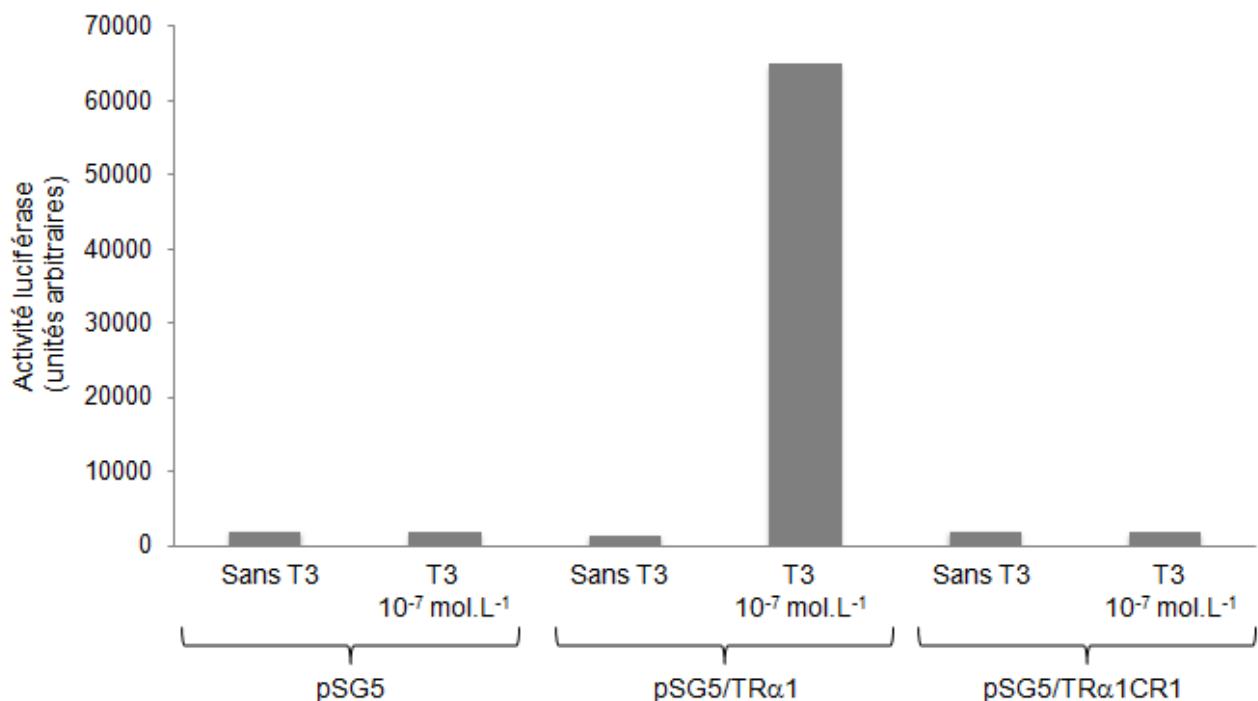


Gene regulation by T₃ hormone is achieved through activation of the Thyroid Hormone receptor (TR α 1). Heterodimeric RXR/TR α 1 complex can bind to thyroid hormone response elements (TRE) in DNA. In the presence of T₃ hormone, a conformational change in TR α 1 occurs permitting activation of target genes.

5B : Mesure de l'activité luciférase dans les cellules HEK 293 transfectées, en présence d'hormone T3.

Les cellules ont été systématiquement co-transfектées par :

- le vecteur pTRE-luc exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle d'un élément régulateur TRE enhancer,
- et un vecteur d'expression pSG5,
 - soit le vecteur pSG5 vide (pSG5),
 - soit le vecteur pSG5 exprimant le récepteur TR α 1 sauvage (pSG5/TR α 1),
 - soit le vecteur pSG5 exprimant le récepteur muté (pSG5/TR α 1CR1).



2019 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée 2 h – coefficient 1

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

Implication de l'activité lysyl oxydase (LOX) dans le développement des métastases cancéreuses

La lysine oxydase (LOX) est une enzyme extracellulaire, synthétisée notamment par les fibroblastes des tissus conjonctifs. Elle est impliquée dans une étape de maturation des fibres de collagène. Cette étape est essentielle à leur résistance à l'étirement.

La lysyl oxydase est surexprimée dans les tissus cancéreux. La LOX, en intervenant sur le remodelage de la matrice extracellulaire, stabiliserait l'implantation des foyers métastasiques.

Une stratégie de traitement pour ces cancers serait d'inhiber la lysyl oxydase. Un inhibiteur, le BAPN (beta-amino propionitrile) est testé chez la souris.

1. Le collagène, un substrat naturel de la lysyl oxydase (5 points)

Constituant majoritaire de la matrice extracellulaire, le collagène est une protéine fibreuse, insoluble et particulièrement résistante à l'étirement. Les fibres de collagène sont formées par l'assemblage extracellulaire d'un grand nombre de molécules de tropocollagène. La résistance mécanique des fibres est due, entre autres, à la présence dans la molécule de tropocollagène de régions en triple hélice constituées de répétitions de séquences Gly-Pro-X où X désigne un acide aminé quelconque.

Le **document 1** donne les formules des acides aminés glycine et proline, particulièrement abondants dans le collagène.

1.1 Écrire la formule générale semi-développée d'un acide aminé naturel. Dégager la particularité structurale de chaque acide aminé présenté (glycine, proline) et son incidence sur la structure secondaire du collagène.

Le **document 2** présente les structures d'une hélice alpha et d'une section en triple hélice d'une molécule de tropocollagène.

1.2 Sur le **document 2b**, à rendre avec la copie, entourer et légendier un résidu proline et un résidu glycine, une liaison peptidique et une liaison hydrogène.

1.3 Construire et compléter un tableau comparatif des structures de l'hélice alpha et de la triple hélice du tropocollagène, portant sur les critères suivants :
- nombre de chaînes peptidiques,
- positionnement des interactions hydrogènes stabilisatrices.

1.4 Proposer au moins un argument pour expliquer que la structure en triple hélice du tropocollagène permet une plus grande résistance à la traction.

2. Étude du niveau d'expression de la protéine LOX en condition d'hypoxie (6 points)

Il a été montré que l'hypoxie observée lors du développement initial des tumeurs est liée au développement de métastases.

Le **document 3** présente les travaux de l'équipe de Ling Wei, qui a étudié par western blot, l'effet de l'hypoxie sur le niveau d'expression de la protéine LOX.

- 2.1 Expliquer le rôle de l'étape de SDS-PAGE.
- 2.2 Construire les deux schémas légendés des édifices moléculaires impliqués dans l'immuno-détection sur la membrane de PVDF (PolyVinyliDene Fluoride) :
 - de la LOX,
 - de la β -actine.
- 2.3 Expliquer le rôle de l'étape n°2 du Western blot et le rôle des étapes de lavage.
- 2.4 La β -actine étant une protéine à expression constante, expliquer l'intérêt de sa détection dans le cadre de cette étude.
- 2.5 Argumenter la nécessité d'incuber la membrane avec l'anticorps conjugué de chèvre anti-Ig G de lapin (étape n°5), avant l'incubation avec l'anticorps conjugué de lapin anti-IgG de souris (étape n°7).
- 2.6 Analyser les résultats présentés et conclure quant à l'effet de l'hypoxie sur le niveau d'expression de la LOX.

3. Détermination de l'activité de la lysyl oxydase (7 points)

Un kit de dosage de l'activité LOX dans des échantillons biologiques est utilisé pour mesurer l'efficacité d'un traitement par le BAPN, inhibiteur de la LOX.

Le **document 4** présente les deux réactions mises en jeu dans le kit de dosage de l'activité LOX.

Le **document 5** donne des informations techniques sur le mode d'emploi du kit de dosage.

- 3.1 Préciser les composants présents dans un puits de mesure de l'activité LOX d'un surnageant de culture cellulaire.

Dans le kit de dosage de l'activité LOX, la solution « HRP substrate » est préparée à 250X. Elle sera finalement utilisée à 1X lors du dosage.

- 3.2 Donner la signification du « X ».
- 3.3 Justifier l'utilisation de cette solution à 250X dans le kit.
- 3.4 Exposer le principe de la fluorescence et préciser les longueurs d'onde de réglage de l'appareil de mesure.
- 3.5 Expliquer comment la réaction indicatrice catalysée par la HRP est couplée à la réaction catalysée par la LOX.

L'équipe de Janine T. Erler a étudié chez des souris cancéreuses l'effet d'un inhibiteur de la LOX (le BAPN). Des expériences ont montré que le BAPN est un inhibiteur compétitif de la LOX.

- 3.6 Proposer une représentation graphique annotée mettant en évidence les paramètres cinétiques de la LOX en présence et en absence de BAPN.

Le **document 6** présente le protocole de traitement des souris et les résultats obtenus.

- 3.7 Préciser si la différence d'activité enzymatique de LOX observée entre le témoin et le lot 1 est significative.
- 3.8 Analyser l'ensemble des résultats et conclure sur l'efficacité de l'inhibition.
- 3.9 Argumenter l'intérêt d'utiliser le BAPN dans la lutte contre le développement des cancers.

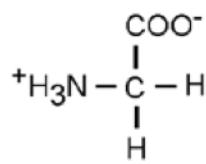
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)

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

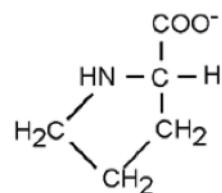
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Annexe A : document 2b à compléter et page 5 à rendre avec la copie

Document 1 : Formules de la glycine et de la proline



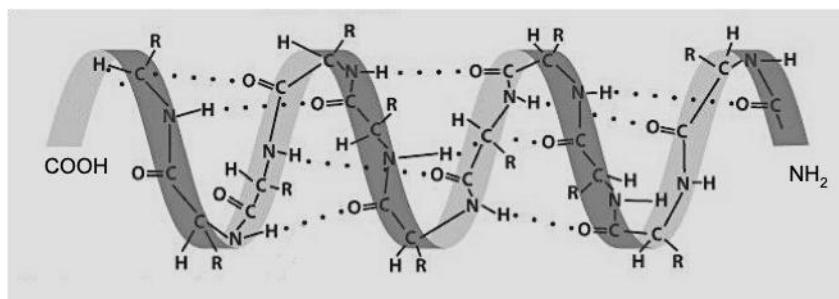
Glycine



Proline

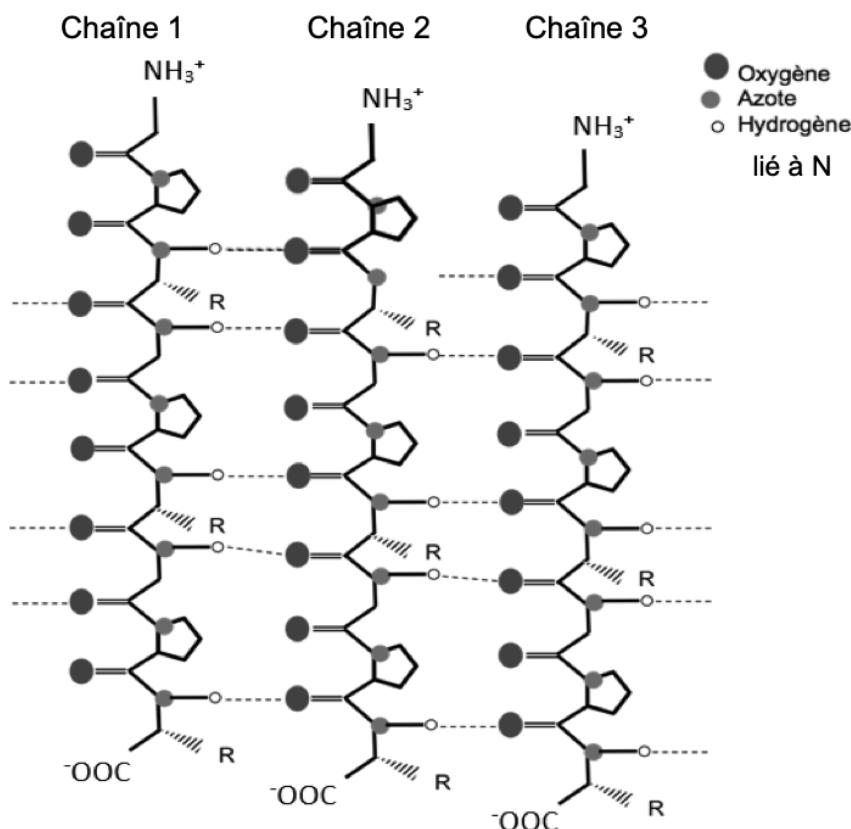
Document 2 : Structures d'une hélice alpha et d'une fraction de la région en triple hélice d'une molécule de tropocollagène

2a. Structure 3D d'une hélice α (hélice droite)

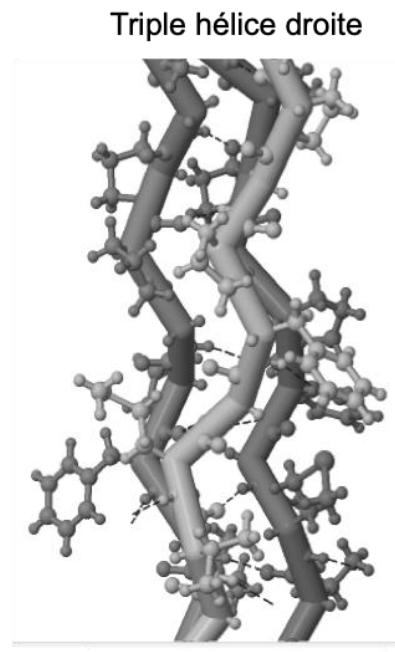


2b. Projection (A) et modèle 3D (B) d'un court segment de triple hélice de tropocollagène de type I

A.



B.



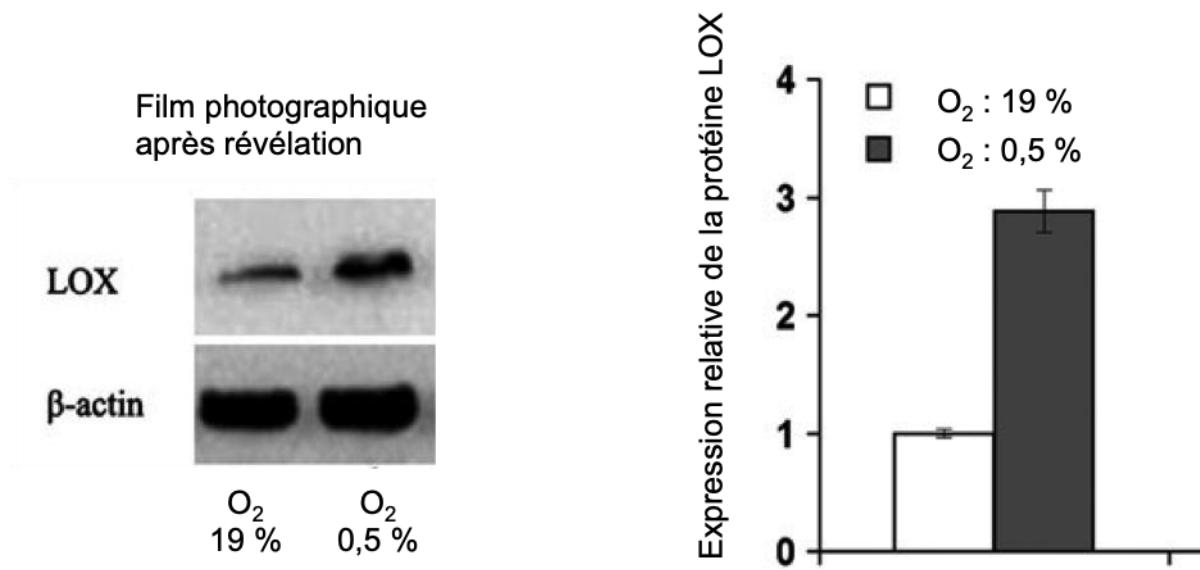
Chaque chaîne est en hélice gauche

Document 3 : Effet de l'hypoxie sur le niveau d'expression de la protéine LOX par des cellules cancéreuses de lignée pulmonaire en culture

➤ **Conditions expérimentales et mise en œuvre du western blot**

- Cellules cultivées pendant 24 h dans deux conditions :
 - O_2 à 19 % (normoxie).
 - O_2 à 0,5 % (hypoxie).
- Extraction des protéines et quantification par méthode de Bradford.
- Électrophorèse SDS PAGE (dépôt de 50 μ g de protéines par puits)
- Western blot (étapes) :
 1. Électrotransfert sur membrane de PVDF (PolyVinyliDene Fluoride).
 2. Incubation de la membrane dans un tampon PBS (s) à 5 % de lait pendant 2 h à température ambiante.
 3. Incubation de la membrane avec un mélange d'anticorps de lapin anti LOX humaine et d'anticorps de souris anti β -actine humaine, toute une nuit à 4 °C
 4. 3 lavages en PBS Tween 0,1 %.
 5. Incubation de la membrane avec un anticorps de chèvre anti IgG de lapin conjugué à l'HRP (*Horse Radish Peroxydase*) pendant 2 h à température ambiante.
 6. 3 lavages en PBS Tween 0,1 %.
 7. Incubation de la membrane avec un anticorps de lapin anti IgG de souris conjugué à l'HRP, 2 h à température ambiante.
 8. 3 lavages en PBS Tween 0,1 %.
 9. Révélation par chimioluminescence.

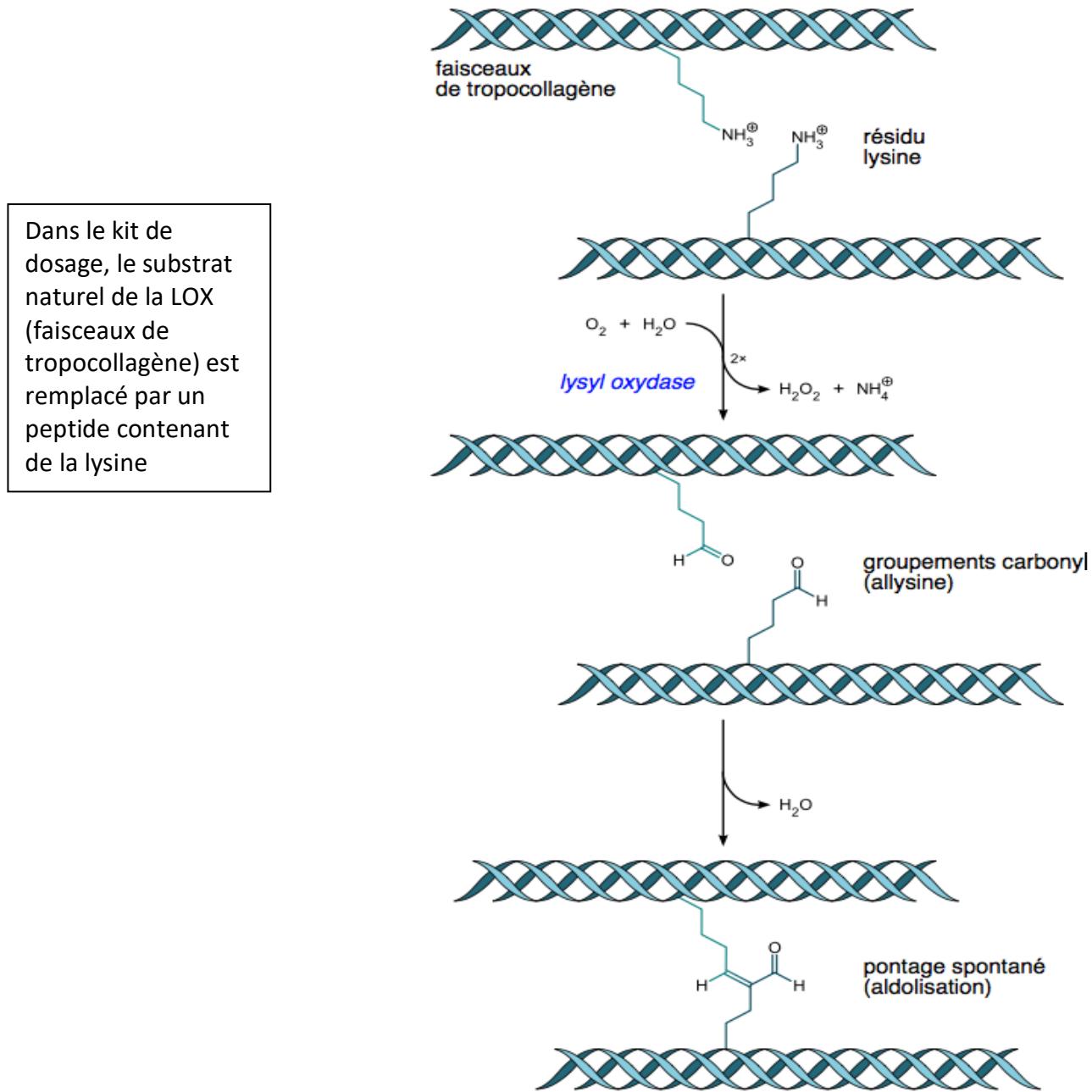
➤ **Résultats**



Ling Wei, Xian-Rang Song, Ju-Jie Sun, Xing-Wu Wang, Li Xie, and Li-Yan Ly. Lysyl Oxidase May Play a Critical Role in Hypoxia-Induced NSCLC Cells Invasion and Migration. ***Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals***, 2012 Dec; 27(10): 672-677.

Document 4 : Réactions mises en jeu dans le kit de dosage de l'activité de la LOX

1) Action de la lysyl oxydase (LOX) sur son substrat naturel, le tropocollagène



2) Réaction catalysée par la peroxydase de raifort (HRP)



Document 5 : Données de la fiche technique du kit de dosage de LOX par fluorimétrie :
(Lysyl Oxydase Activity Assay kit Fluorometric)

- Prepare 2X LOX Reaction Mix as described below and equilibrate at room temperature. (The volumes given are enough for 1 x 96-well plate)

Component	Vol
250X HRP substrate	40 μ L
50 U/mL HRP stock solution	20 μ L
Assay Buffer containing peptidic substrate of the LOX enzyme	adjust volume to 5 mL

- Set up reaction wells

Blank control : 50 μ L PBS + 0.1 % BSA

Standard wells : 50 μ L LOX standard dilutions with PBS + 0.1 % BSA

Sample wells : 1-50 μ L samples (adjust volume to 50 μ L / well with PBS + 0.1 % BSA)

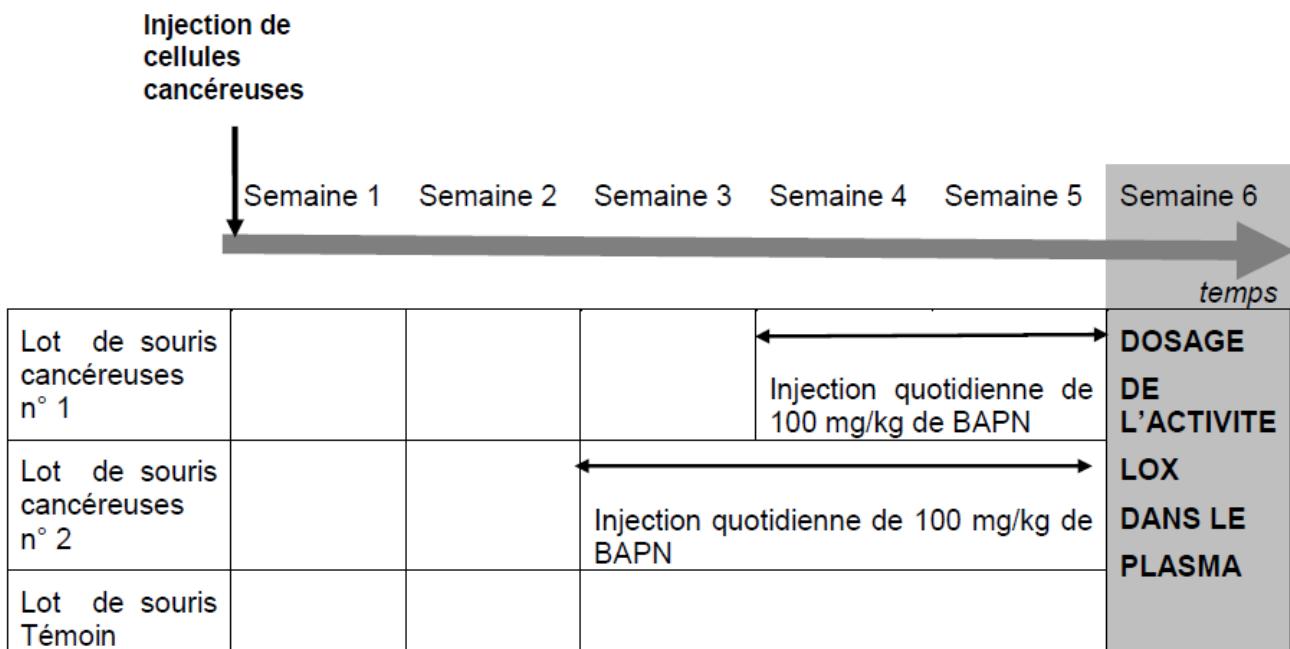
- Add 50 μ L of LOX Reaction Mix into each well to make the total assay volume of 100 μ L. Mix and incubate at 37 °C for 10-40 min protected from light.
- Monitor fluorescence on a microplate reader at Ex / Em = 540 / 590 nm.
- Subtract the blank control from all other wells.

Document 6 : Mesure fluorimétrique de l'activité LOX dans le plasma de souris cancéreuses et traitées par l'inhibiteur BAPN

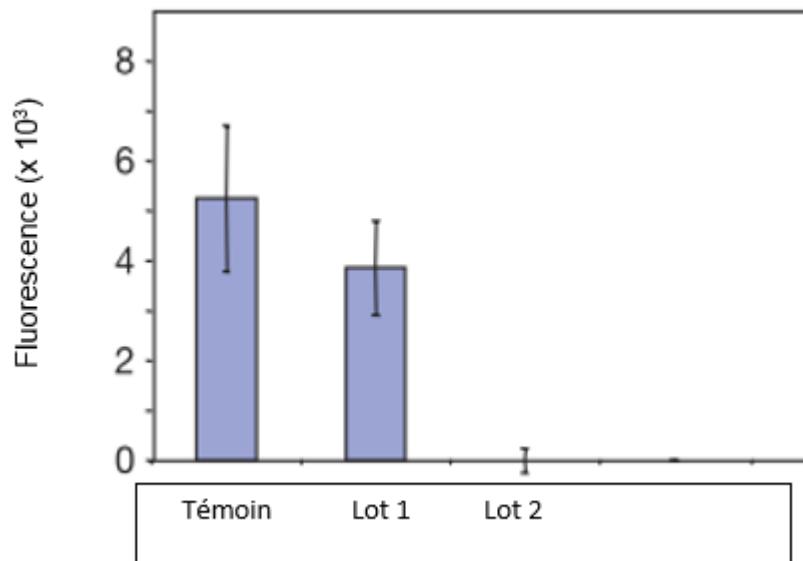
➤ Présentation du protocole de l'étude

Des souris subissent une injection intradermrale de cellules cancéreuses induisant le développement de tumeurs sous-cutanées en quelques semaines, puis elles sont divisées en trois lots.

Ces souris sont ensuite traitées selon le protocole suivant :



➤ Résultats de l'étude : Dosage de l'activité LOX par le kit « Lysyl Oxydase Activity Assay »



D'après Erler JT1, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 2006 Apr 27;440(7088):1222-6.

2019 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée 2 h – coefficient 1

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

Le microbiote intestinal

L'être humain est une symbiose intime qui associe quelque 50 000 milliards de cellules et, au moins, autant de bactéries. Ces microorganismes constituent une partie du microbiote composé également d'archées, champignons, levures, virus, dont la plus grande communauté est hébergée dans l'intestin.

Comme le microbiote se met en place dès la naissance et continue d'évoluer en fonction de l'alimentation de l'hôte, l'idée a alors émergé que le régime alimentaire et la prise de probiotiques pouvaient moduler le microbiote intestinal pour prévenir les dysbioses (déséquilibres du microbiote).

1. Effet de l'antibiothérapie sur l'équilibre du microbiote (6 points)

De nombreux patients entrant à l'hôpital avec une flore intestinale normale diversifiée subissent des traitements antibiotiques qui appauvissent celle-ci. Le **document 1** présente quatre structures chimiques de molécules de la famille des béta-lactamines.

1.1. Identifier et reproduire sur la copie la structure chimique commune aux béta-lactamines.

Il existe différentes modalités de résistance aux antibiotiques. Le **document 2** en présente quelques exemples.

1.2. Dégager et expliquer les principes des trois modalités de résistance illustrées dans le document. Proposer un quatrième mécanisme de résistance.

Certaines bactéries possèdent dans leur génome le gène *bla* codant une béta-lactamase.

1.3. En s'appuyant sur les réponses précédentes, rappeler le mécanisme de résistance mis en jeu dans ce cas.

La bactérie *Clostridium difficile*, résistante à de nombreux antibiotiques, colonise l'intestin, provoquant des colites avec diarrhées, vomissement et fièvre. *Clostridium difficile* est un bacille Gram positif capable de sporuler. Le **document 3** présente une analyse comparée des caractéristiques de la cellule végétative et de l'endospore.

1.4. Repérer les arguments montrant que l'endospore est une forme de dormance cellulaire.

Le **document 4** rappelle les cibles moléculaires principales des antibiotiques.

1.5. Expliquer en quoi l'endospore participe à la résistance de *Clostridium difficile* aux antibiotiques.

1.6. Rédiger une synthèse expliquant comment une administration d'antibiotiques peut conduire à un déséquilibre du microbiote par *Clostridium difficile*.

2. Effet protecteur de *Bifidobacterium longum* sur les cellules intestinales (4 points)

Afin de pallier le déséquilibre du microbiote causé par une antibiothérapie, des probiotiques peuvent être administrés. Des études s'appuient sur l'utilisation de *Bifidobacterium longum* pour limiter les effets cytopathogènes engendrés par les toxines produites par *Clostridium difficile*.

La technique xCELLigence® utilisée pour mesurer la viabilité des cellules est décrite dans le **document 5**.

2.1. Expliquer la notion de « *cell index* ». Repérer la relation existant entre une diminution du « *cell index* » et la viabilité des cellules.

Des surnageants de culture de *C. difficile* contenant des toxines sont mis en présence ou non de *Bifidobacterium longum* pendant 48 h. Après centrifugation, le surnageant résultant de ce traitement est ajouté à une culture de cellules épithéliales intestinales humaines. Les résultats obtenus par la technique xCELLigence® sont présentés dans le **document 6**.

2.2. Analyser l'expérience de façon globale en comparant notamment les valeurs de cell index à 22 h. Conclure sur l'effet de *Bifidobacterium longum* sur les cellules intestinales.

3. Production de *Bifidobacterium* (8 points)

Compte tenu des effets protecteurs de la présence de *Bifidobacterium longum* dans le microbiote intestinal, la production à grande échelle de ces bactéries intéresse certaines industries.

Le **document 7** présente des expériences de fermentation en batch avec ou sans maintien de pH, réalisées avec une culture de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, en milieu MRS classique (**document 8**) ou MRS – WP supplémenté en lactosérum.

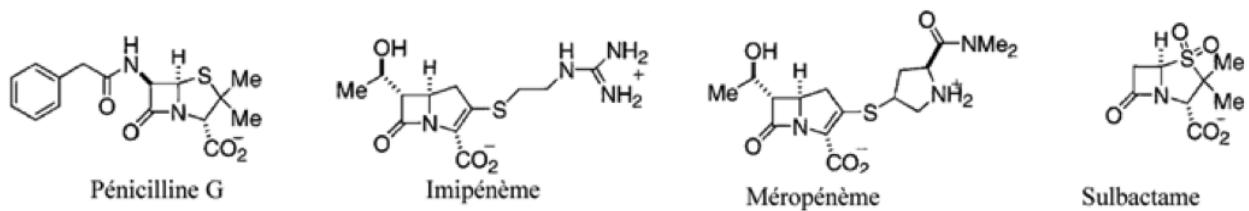
- 3.1. Caractériser le milieu MRS. En déduire le type trophique de *Bifidobacterium longum*.
- 3.2. Réaliser un schéma légendé du bioréacteur sur lequel figure les éléments permettant le maintien du pH.
- 3.3. Calculer les productivités volumiques horaires totales (PVHT) en acide lactique et en acide acétique dans le milieu MRS ajusté à pH 5,5. Préciser le type de fermentation mise en jeu au cours de ce batch.
- 3.4. Calculer le rendement de croissance total Rx/s dans le milieu MRS ajusté à pH 5,5.
- 3.5. Synthétiser les données pertinentes sous forme de tableau. Argumenter le choix des conditions de culture pour une production optimale de *Bifidobacterium longum*.

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

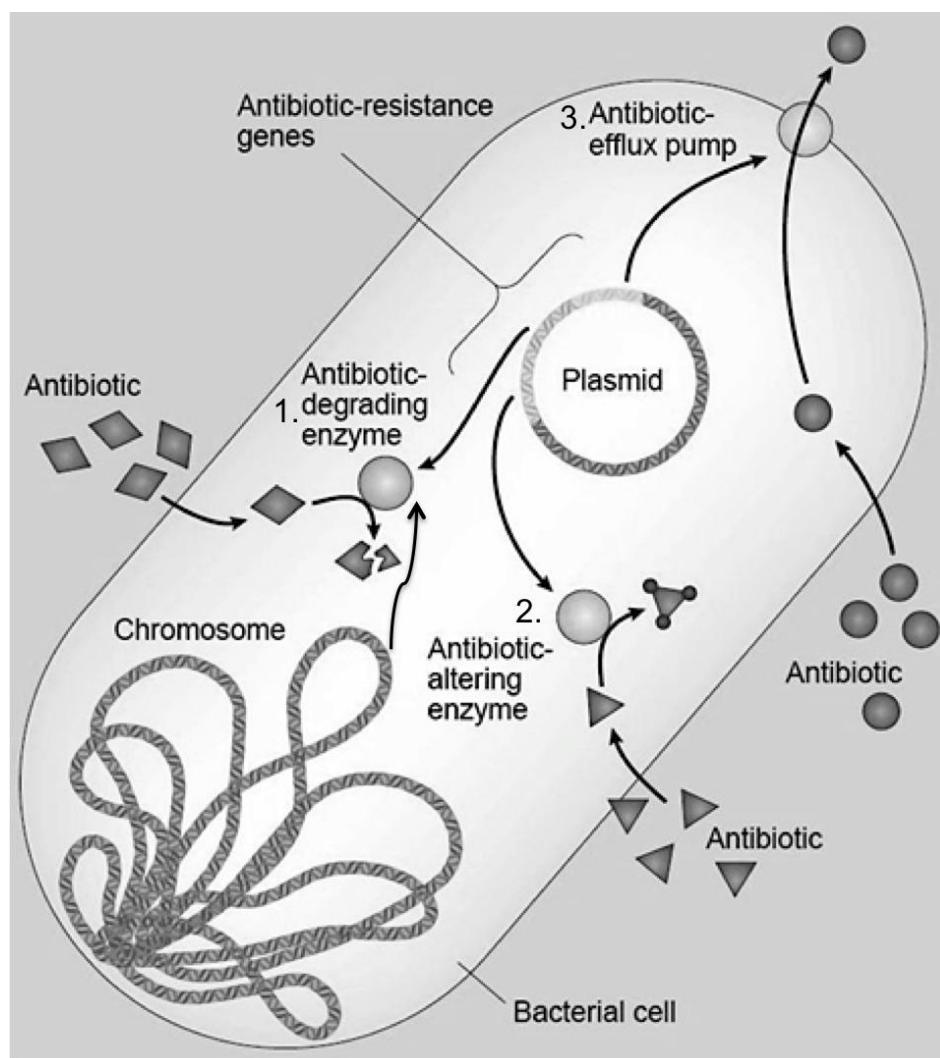
Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

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

Document 1 : Structure chimique de quatre molécules de la famille des béta-lactamines



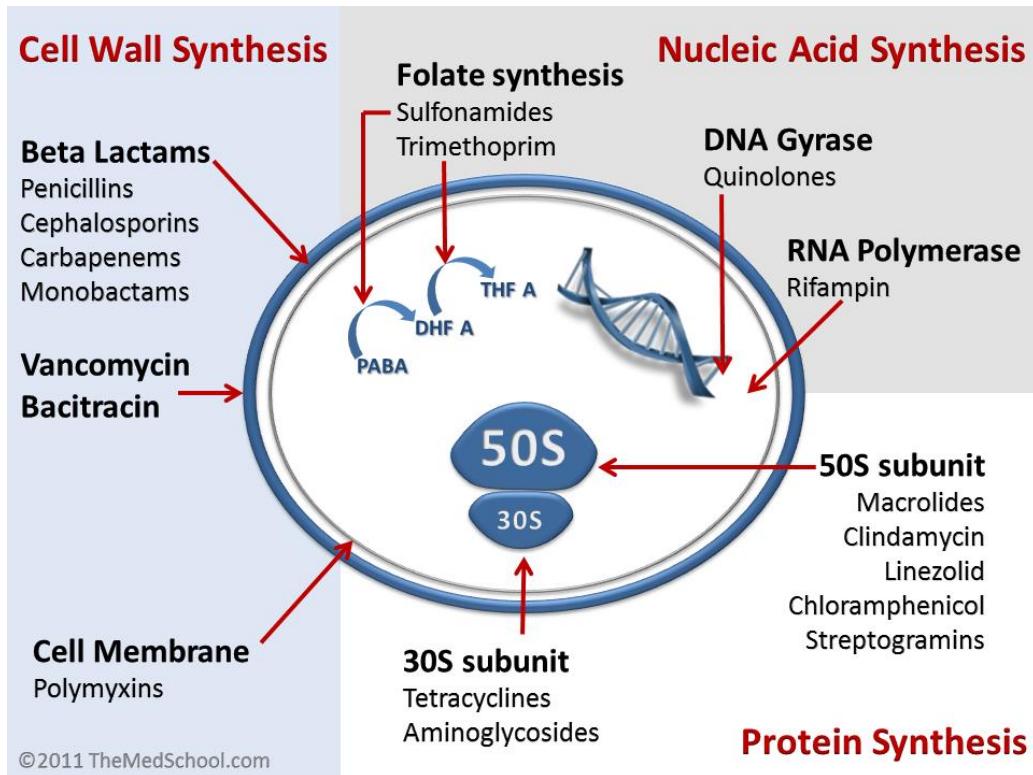
Document 2 : Three bacterial antibiotic resistances



Document 3 : Comparative composition analysis of vegetative cell vs. endospore

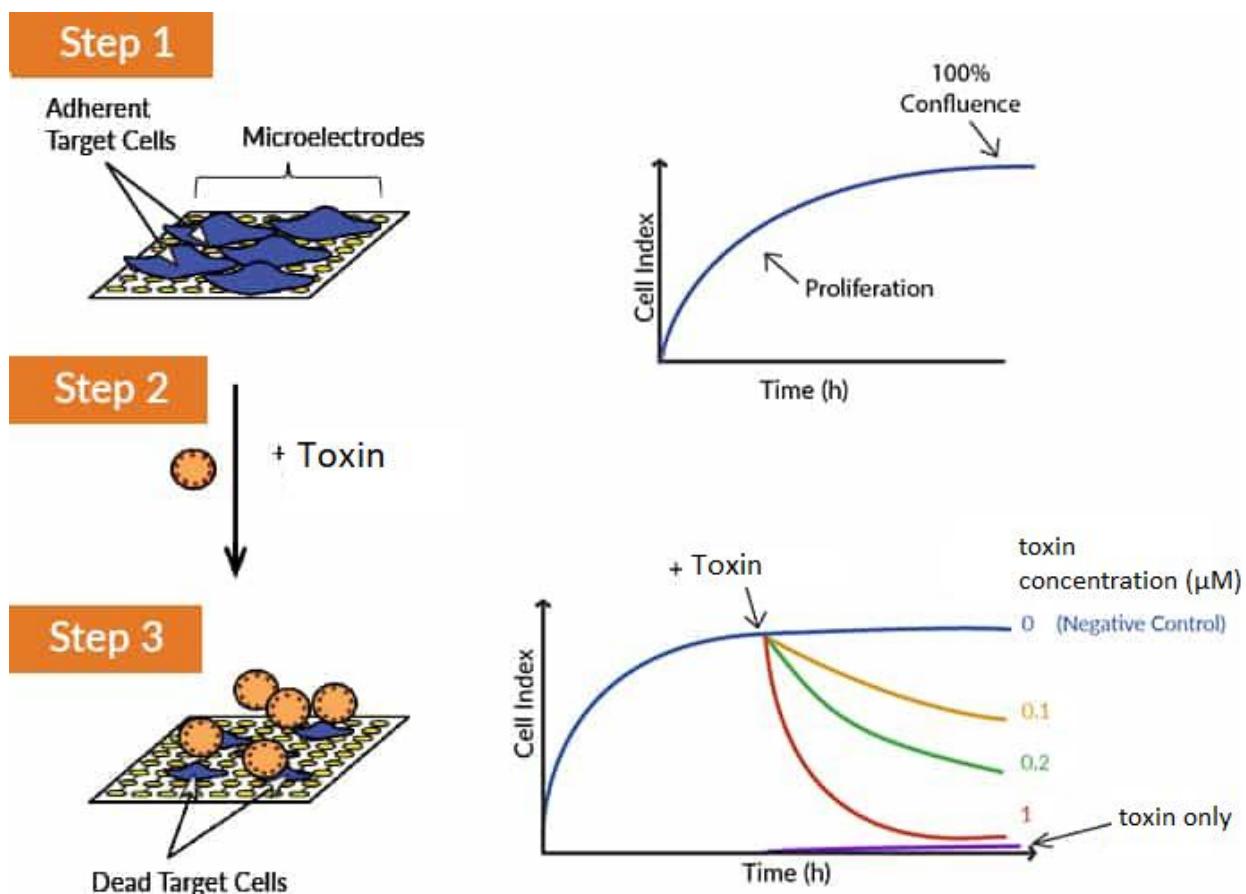
Characteristic	Vegetative cell	Endospore
Structure	Typical gram-positive cell	Thick spore cortex Spore coat Exosporium
Microscopic appearance	Nonrefractile	Refractile
Calcium content	Low	High
Dipicolinic acid	Absent	Present
Water content	High	Low
Cytoplasmic pH	About pH 7	About pH 5,5 – 6,0 in core
Enzyme activity	High	Low
Macromolecular synthesis	Present	Absent
mRNA	Present	Low or absent
Heat resistance	Low	High
Radiation resistance		
Resistance to chemicals and acids		
Resistance to lysosome		

Document 4 : Antibiotics mechanisms of action



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antibiotics_Mechanisms_of_action.png

Document 5 : Principe de la technologie xCELLigence®



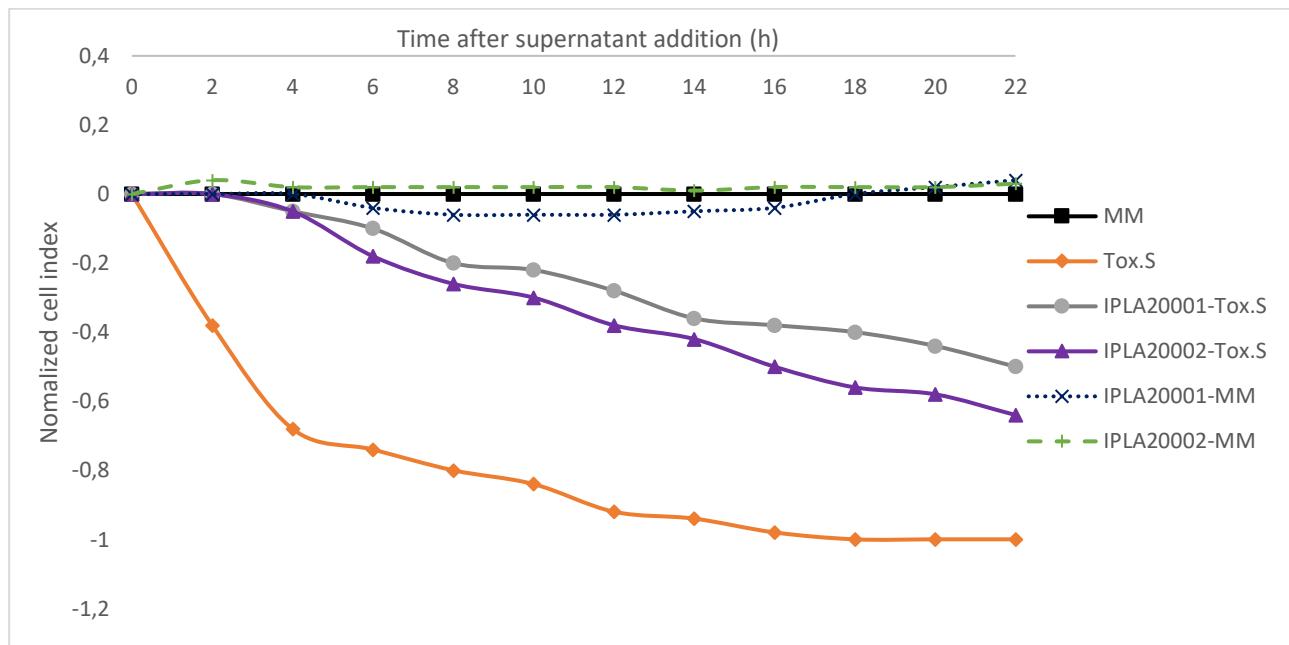
ACEA's xCELLigence® Real-Time Cell Analysis (RTCA) instruments utilize gold microelectrodes embedded in the bottom of microtiter wells to non-invasively monitor cell status including cell number, shape/size and attachment. The major distinguishing features of this technology include enhanced sensitivity, the preclusion of labels and, importantly, kinetic measurement of cell health/behavior.

Step 1 : Adherent cells (i.e. intestinal cell line) are first seeded in the wells of an electronic microtiter plate (E-Plate®). Adhesion of cells to the gold microelectrodes impedes the flow of electric current between electrodes. This impedance value, plotted as a unitless parameter called "Cell Index", increases as cells proliferate and then plateaus as cells approach 100 % confluence.

Step 2 : When added subsequently, non-adherent effector cells (i.e. immune cells) or toxic molecules (i.e. *C. difficile* toxine) in suspension do not cause impedance changes in and of themselves (due to lack of adherence to the gold microelectrodes).

Step 3 : If toxines induce the destruction of the target adherent intestinal cells, the corresponding cytolytic activity can be sensitively and precisely detected by a decrease in cell index.

Document 6 : Effets de l'ajout de différents surnageants sur l'état physiologique de cellules épithéliales intestinales humaines



Normalized Cell Index : Impédance de la condition testée – impédance de la condition contrôle (MM : milieu de culture des cellules épithéliales).

Tox.S	Surnageant d'une culture de <i>Clostridium difficile</i> contenant les toxines produites par la souche.
IPLAxxxx	Référence des souches de <i>Bifidobacterium longum</i> étudiées.
IPLAxxxx-Tox.S	Surnageant d'une culture de <i>Bifidobacterium longum</i> préalablement incubée avec les surnageants toxiques.
IPLAxxxx-MM	Surnageant d'une culture de <i>Bifidobacterium longum</i> préalablement incubée avec le milieu témoin.

Document 7 : Étude de la production de *B. longum* ATCC 15707 après 12 heures de fermentation en batch avec ou sans contrôle du pH en milieu MRS ou en milieu MRS supplémenté en lactosérum (MRS – WP)

pH Milieu	5,5 MRS	5,5 MRS - WP	Non régulé MRS - WP
Biomasse initiale (cellules $\cdot 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$)	8,0	8,0	8,0
Biomasse finale (cellules $\cdot 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$)	8,7	17,3	3,3
Glucose initial (g $\cdot \text{L}^{-1}$)	19,5	19,5	19,5
Glucose final (g $\cdot \text{L}^{-1}$)	0	7,5	11,7
Lactose initial (g $\cdot \text{L}^{-1}$)	-	20,9	20,9
Lactose final (g $\cdot \text{L}^{-1}$)	-	0,4	14,5
Galactose initial (g $\cdot \text{L}^{-1}$)	-	1,4	1,4
Galactose final (g $\cdot \text{L}^{-1}$)	-	2,0	1,1
Acide lactique produit (g $\cdot \text{L}^{-1}$)	7,2	11,8	5,6
Acide acétique produit (g $\cdot \text{L}^{-1}$)	8,6	11,3	4,9
PVHT acide lactique (g $\cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	à déterminer	0,98	0,47
PVHT acide acétique (g $\cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	à déterminer	0,94	0,41
Rendement biomasse Rx/s (cellules $\cdot 10^5 \cdot \text{g}^{-1}$ de glucides consommés)	à déterminer	5,7	2,6

Document 8 : Composition du milieu MRS (Man Rogosa Sharpe)

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone..... 10,00 g
- Extrait de viande 10,00 g
- Extrait autolytique de levure 5,00 g
- Glucose 20,00 g
- Tween 80 1,08 g
- Phosphate dipotassique 2,00 g
- Acétate de sodium 5,00 g
- Citrate d'ammonium 2,00 g
- Sulfate de magnésium 0,20 g
- Sulfate de manganèse 0,05 g
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25 °C : 6,4 ± 0,2

2019 - U42 : Biologie cellulaire

Durée 2 h – coefficient 1

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

Extraits végétaux et multirésistance à la chimiothérapie des cancers

La résistance à la chimiothérapie est un obstacle majeur pour le traitement de nombreuses pathologies malignes, dont les leucémies, les sarcomes (tumeurs malignes des tissus conjonctifs) et la plupart des carcinomes (tumeurs malignes des tissus épithéliaux).

Par conséquent, la recherche de nouveaux médicaments anticancéreux est essentielle pour améliorer le pronostic vital des patients. À ce titre, les produits naturels extraits des plantes médicinales traditionnelles sont de bons candidats.

Connue pour sa production de fruits comestibles, la plante *Annona glabra* a attiré l'attention des chercheurs du fait de son utilisation en médecine chinoise, pour le traitement de certains cancers.

Des extraits de cette plante ont été testés sur des lymphocytes circulants et sur différentes lignées leucémiques, afin d'évaluer leur potentielle cytotoxicité et d'en comprendre le mécanisme.

1. Micropropagation d'*Annona glabra* (6,5 points)

La culture naturelle d'*Annona glabra* à partir des graines est difficile à cause d'une germination lente et non uniforme aboutissant à l'obtention de plants très hétérogènes pouvant présenter des caractéristiques agronomiques indésirables. La micropropagation permet de remédier à ces difficultés de multiplication. L'initiation de la culture *in vitro* d'*A. glabra* est réalisée à partir de bourgeons axillaires.

1.1. Rappeler le nom du tissu indifférencié présent dans ce type d'explant.

Le **document 1** présente les recherches menées pour établir un système complet de micropropagation d'*A. glabra* en utilisant des explants de jeunes plantules.

- 1.2. Identifier les phytohormones utilisées dans le protocole et préciser celle qui induit la rhizogénèse.
- 1.3. Dégager le nom de chaque étape chronologique de la micropropagation d'*A. glabra* et indiquer sa durée respective.
- 1.4. En déduire une définition de la technique de micropropagation des végétaux.
- 1.5. Rappeler la nature biochimique du saccharose et de la glycine. Repérer un exemple de molécule appartenant à chacune des catégories suivantes : macroéléments, microéléments et vitamines.
- 1.6. Analyser l'impact de BAP et GA3 sur la croissance. Conclure quant aux concentrations optimales de BAP et de GA3.

2. Évaluation de la cytotoxicité des extraits (6 points)

Des extraits des plantes obtenues sont ensuite testés sur différents types de cellules.

Les tests sont menés sur :

- une lignée cellulaire leucémique lymphoblastique humaine sensible appelée CEM ;
- une lignée dérivée de CEM exprimant le phénotype MDR (pour « *multidrug resistance* ») appelée CEM/VLB en raison de sa résistance à la vinblastine ;
- des lymphocytes normaux issus de prélèvements sanguins humains.

Le **document 2** présente la purification des lymphocytes à partir de sang.

2.1 Expliquer le principe de la séparation des cellules sanguines sur milieu Histopaque 1077®.

La culture *in vitro* des lymphocytes normaux est délicate contrairement aux lignées cellulaires continues.

2.2. Exposer les avantages que présente l'utilisation des lignées cellulaires continues en culture *in vitro*.

2.3. Expliquer l'utilité du contrôle des paramètres de température, pression partielle en CO₂ et hygrométrie, lors de la culture des lignées cellulaires.

L'estimation de la cytotoxicité repose sur la détermination de la viabilité cellulaire par un test colorimétrique utilisant le MTT (bromure de diméthylthiazol-diphényltétrazolium). Les déshydrogénases mitochondrielles des cellules vivantes réduisent le MTT en formazan. L'intensité de la coloration violette mesurée par spectrophotométrie est fonction du nombre de cellules vivantes.

La méthode et les résultats des tests de cytotoxicité utilisant des extraits de diverses parties de la plante d'*Annona glabra* (feuille, pulpe du fruit et graine) sont présentés dans le **document 3**.

2.4. Proposer une définition de l'IC50 et déterminer l'IC50 de l'extrait de feuille d'*Annona glabra* sur la lignée CEM/VLB à partir du graphe.

2.5. Montrer que l'extrait n'est pas cytotoxique pour les lymphocytes normaux.

Identifier l'extrait d'*Annona glabra* le plus cytotoxique sur la lignée CEM/VLB. Argumenter la réponse.

3. Étude de l'induction de l'apoptose (5,5 points)

L'induction de l'apoptose pourrait être à l'origine de l'effet cytotoxique des extraits. Une étude est menée pour explorer cette hypothèse.

L'analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux après marquage fluorescent de l'ADN montre que la répartition des cellules de la lignée CEM/VLB dans les différentes phases du cycle cellulaire est affectée en présence d'extrait de graine d'*A. glabra* (**document 4**).

3.1. Représenter sur un graphe, l'évolution de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire. En déduire la (ou les) phase(s) du cycle cellulaire dans lesquelles se trouvent les populations cellulaires 1, 2 et 3.

3.2. Comparer les processus cellulaires d'apoptose et de nécrose.

3.3. Comparer les deux cytogrammes et conclure sur l'effet de l'extrait de graines.

L'induction de l'apoptose dans les cellules de la lignée CEM/VLB traitées ou non par un extrait de graines d'*A. glabra* est étudiée en cytométrie de flux après marquage préalable des cellules avec deux réactifs fluorescents : l'iodure de propidium et l'annexine-V-EGFP, souvent nommée « Annexine V » (**documents 5 et 6**).

3.4. Montrer l'intérêt de l'utilisation de l'iodure de propidium et de l'annexine V pour identifier l'apoptose précoce et l'apoptose tardive. En déduire l'état physiologique des populations cellulaires des quadrants A, C et D.

3.5. Conclure sur l'intérêt potentiel de la plante *Annona glabra* dans la lutte contre les cancers multirésistants.

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 : Effet de l'addition de BAP et de GA3 sur les plantules d'*Annona glabra*

Protocol of micropropagation of *Annona glabra*

For the phase of axillary bud proliferation (duration 30 days), cuttings of nodal segments removed from juvenile plants were cultured in a basic medium MS supplemented with various concentrations of Benzylaminopurin (BAP), used isolated or in combination with various concentrations of Indol acetic acid (IAA), and with or without 1.0 mg.L⁻¹ of Gibberellic acid (GA3). At the end of this phase, the average number of shoots obtained by explants and their average size were measured for each treatment. For the rooting of shoots obtained at the end of this proliferation phase, various concentrations of IAA and different pH were tested in the medium (duration 15 days). At the end of this phase, the average number of roots obtained by shoots and their average size were evaluated. The acclimatization of the microplants was then followed in controlled conditions for 21 days.

MS : Murashige and Skoog

Milieu de Murashige et Skoog (MS)

Acide borique (H ₃ Bo ₃)	6,2 mg.L ⁻¹	Nitrate de potassium (KNO ₃).....	1900 mg.L ⁻¹
Acide nicotinique	0,5 mg.L ⁻¹	Phosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	170 mg.L ⁻¹
Agar	10 g.L ⁻¹	Pyridoxine / HCl	0,5 mg.L ⁻¹
Chlorure de calcium (CaCl ₂ .2H ₂ O).....	440 mg.L ⁻¹	Saccharose	20 g.L ⁻¹
Chlorure de cobalt (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,025 mg.L ⁻¹	Sulfate de cuivre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,025 mg.L ⁻¹
Glycine (recristallisée)	2,0 mg.L ⁻¹	Sulfate de fer (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27,8 mg.L ⁻¹
Inositol	100 mg.L ⁻¹	Sulfate de magnésium (MgSO ₄ .7H ₂ O)	370 mg.L ⁻¹
Iodure de potassium (KI).....	0,83 mg.L ⁻¹	Sulfate de manganèse (MnSO ₄ .4H ₂ O)	22,3 mg.L ⁻¹
Molybdate de sodium (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O) .	0,25 mg.L ⁻¹	Sulfate de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8,6 mg.L ⁻¹
Na ₂ EDTA (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	37,2 mg.L ⁻¹	Thiamine / HCl	0,1 mg.L ⁻¹
Nitrate d'ammonium (NH ₄ NO ₃).....	1650 mg.L ⁻¹		

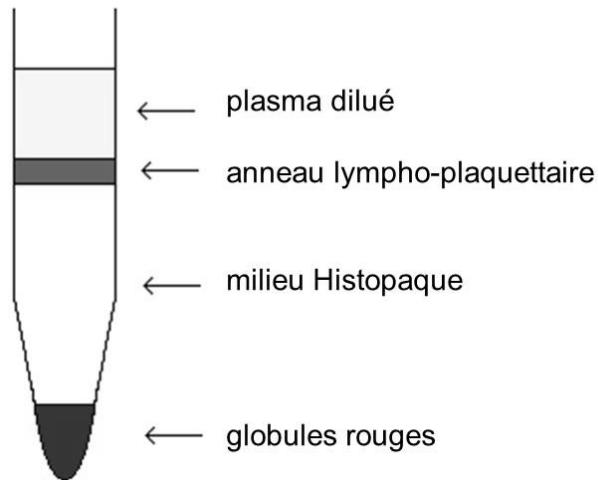
Résultats

Les plantules sont issues de la micropropagation de bourgeons axillaires. La taille des tiges est mesurée après 45 jours de culture *in vitro* (moyenne calculée à partir de 10 répétitions par traitement).

Régulateur de croissance (mg.L ⁻¹)		Longueur moyenne des tiges (cm)
BAP	GA3	
0,00	0,0	1,12 ± 0,3
0,05	0,0	1,45 ± 0,3
0,05	1,0	0,79 ± 0,2
0,50	0,0	2,12 ± 0,8
0,50	1,0	0,68 ± 0,1
1,00	0,0	0,80 ± 0,2
1,00	1,0	0,68 ± 0,2
1,50	0,0	1,19 ± 0,6
1,50	1,0	0,44 ± 0,4

Document 2 : Purification de lymphocytes à partir d'un prélèvement sanguin

Le sang dilué au demi en tampon phosphate salin est déposé sur milieu Histopaque 1077® (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Le milieu Histopaque 1077® présente une densité de $1,077 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et contient un agent agrégeant des globules rouges. Après centrifugation, le tube présente l'aspect suivant.



Document 3 : Analysis of cytotoxicity

Cytotoxicity assays of *A. glabra* extracts against different leukocyte cell lines

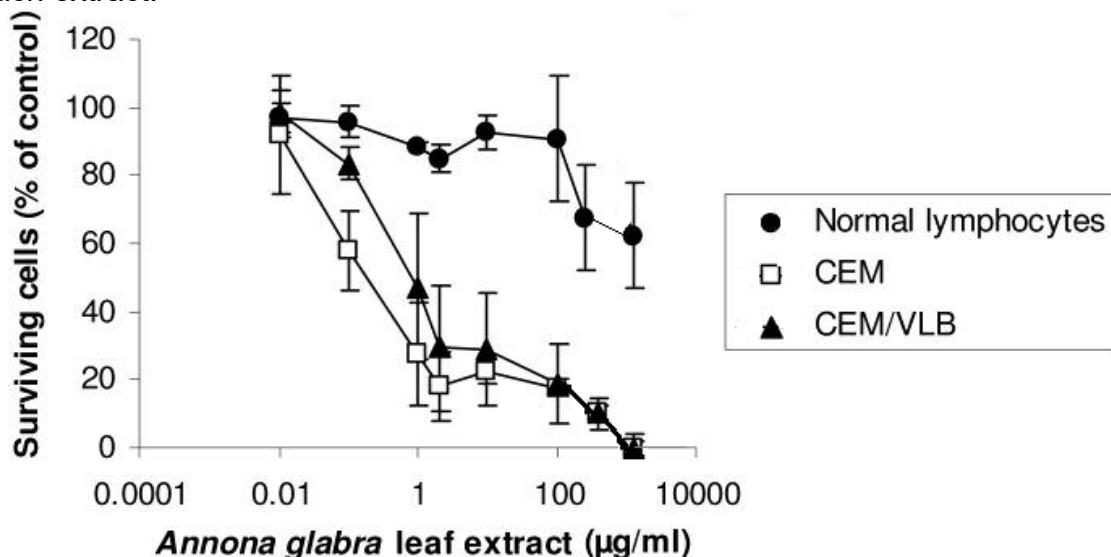
Cytotoxicity assays of *A. glabra* extracts against drug-sensitive leukemia cell line (CEM), multidrug-resistant leukemia cell line (CEM/VLB) and normal human lymphocytes were performed using the cell proliferation kit I (MTT) from Roche Biochemicals (Indianapolis, IN, USA).

The cells were plated in 96-well plates at 10^4 cells/100 $\mu\text{l}/\text{well}$ for CEM and CEM/VLB, and 8×10^4 cells/100 $\mu\text{l}/\text{well}$ for the normal lymphocytes.

The leaf, pulp and seed extracts (0.01 to $5.00 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{ml}$) were added in triplicates.

The plates were incubated at 37°C for 48 hours and the MTT assay was performed according to the manufacturer's protocol.

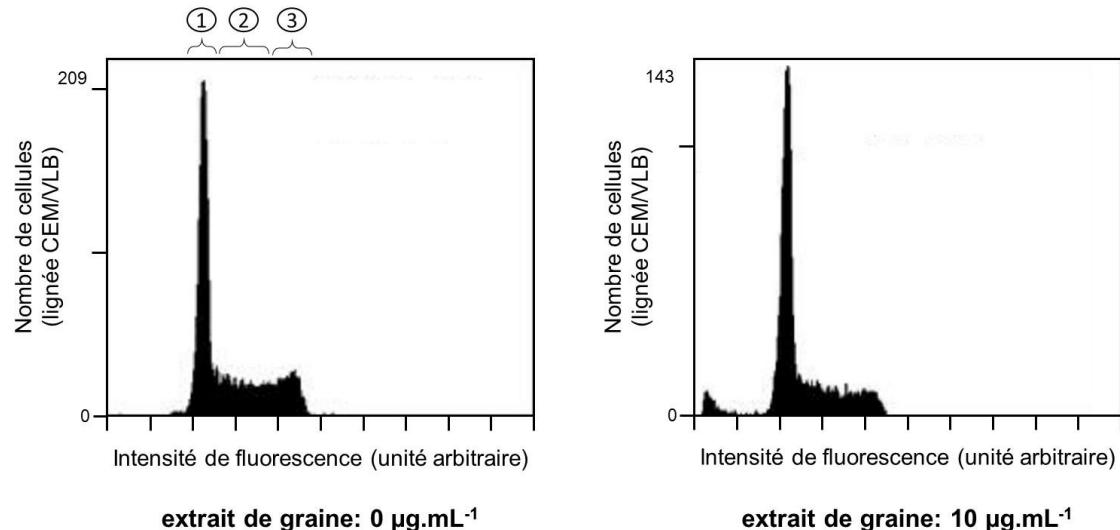
The percentage of surviving cells based on control treatment (untreated) was calculated and plotted against extract concentrations. The values from three separate experiments were averaged and the mean IC₅₀ as well as standard deviation values were calculated for each extract.



Cytotoxicity of normal lymphocytes and human leukemia cell lines using alcoholic extracts of leaf, pulp and seed from *Annona glabra*

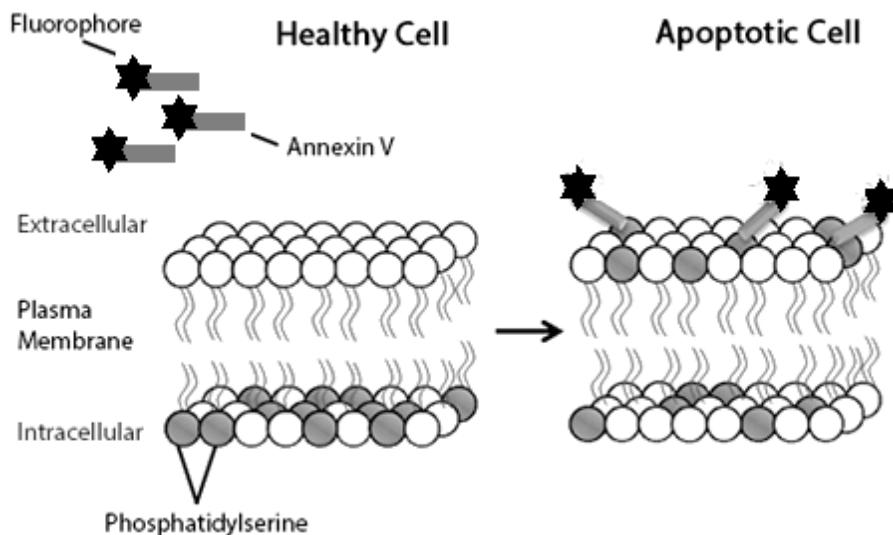
Cells	IC50 values of <i>A. glabra</i> extract ($\mu\text{g/mL}$)		
	Leaf	Pulp	Seed
Human lymphocytes	$>5.00 \cdot 10^3 \pm 0.09 \cdot 10^3$	$>5.00 \cdot 10^3 \pm 0.06 \cdot 10^3$	$>5.00 \cdot 10^3 \pm 0.09 \cdot 10^3$
CEM	0.30 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.07 ± 0.00
CEM/VLB	1.00 ± 0.07	0.65 ± 0.06	0.10 ± 0.01

Document 4 : Analyse du cycle cellulaire



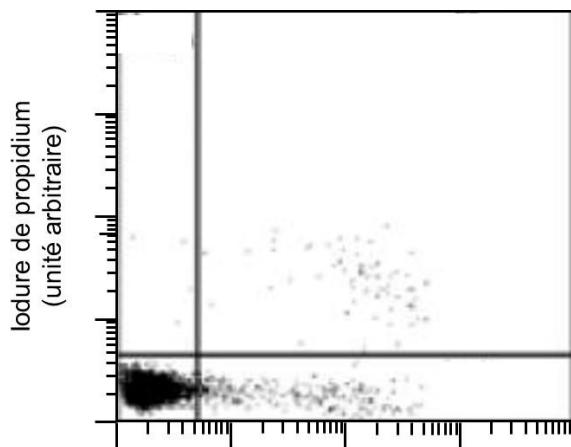
Document 5 : Marquage différentiel à l'annexine-V et à l'iodure de propidium

Annexine-V

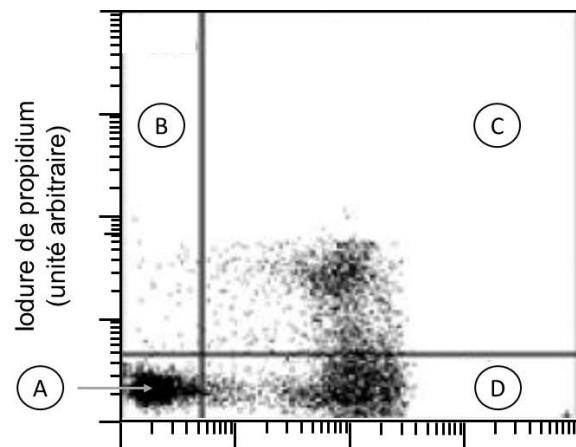


Iodure de propidium (IP) : c'est un colorant cationique et un agent intercalant des acides nucléiques sans spécificité de base (réagit avec l'ADN ou l'ARN). Excité par le laser bleu (488 nm), il émet une fluorescence rouge (617 nm) quand il est lié à l'ADN. Son utilisation en cytométrie en flux est liée à sa lipophobie (ou hydrophilie) relativement élevée, qui l'empêche de traverser facilement les membranes plasmiques, sauf celles endommagées. Ceci fait de lui un puissant marqueur de la viabilité cellulaire. Dans le cas d'une cellule viable, l'IP ne peut pénétrer et se lier à l'ADN de la cellule, contrairement à une cellule morte qui présente une membrane perméabilisée/fragilisée.

Document 6 : Analyse de l'induction de l'apoptose



extraït de graine: 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



extraït de graine: 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Session 2019 : Éléments de corrigé

Ces 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.

Ils 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.

2019 - U11 : Mathématiques

EXERCICE 1

Partie A : Équation différentielle

- Soit t un réel positif. Cette équation différentielle équivaut à : $y' - \left(\frac{20,8}{20}\right)y = 0$ soit $y' - 1,04y = 0$.
Les solutions de cette équation sont donc les fonctions du type $y(t) = ke^{1,04t}$ où k est une constante réelle.
- Avec la condition $f(0) = 10$, en la remplaçant dans l'équation précédente, on obtient : $ke^{1,04 \times 0} = 10$, soit $k = 10$, donc $f(t) = 10e^{1,04t}$

Partie B : Modèle exponentiel

- Tableau des valeurs

Heure (t_i)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Quantité de SA (N_i)	10	27	78	232	650	1800	5100	14100	39000
$Z_i = \ln(N_i)$	2,30	3,30	4,36	5,45	6,48	7,50	8,54	9,55	10,57

- A l'aide de la calculatrice, on trouve : $z(t) = 1,037t + 2,031$
- Comme $z_i = \ln(N_i)$, alors $N_i = e^{z_i}$, donc $N(t) = e^{1,037t + 2,031}$
- On résout l'équation $N(t) = 20$ donc $10^{1,04t} = 20$
soit $e^{1,04t} = 2 \Rightarrow 1,04t = \ln 2 \Rightarrow t = \frac{\ln 2}{1,04} \approx 0,666$
On obtient environ $G \approx 60 \times 0,666 \approx 40$ minutes
- Comme $t \rightarrow +\infty$ alors $1,04t \rightarrow +\infty$ $e^{1,04t} \rightarrow +\infty$ et $10e^{1,04t} \rightarrow +\infty$
donc la limite de N en $+\infty$ est $+\infty$.

PARTIE C : Modèle logistique

- Afin de trouver le sens de variation de la fonction M sur $[0; +\infty]$, on étudie le signe de sa dérivée M' : le dénominateur est strictement positif du fait que ce soit un carré, et le numérateur est également strictement positif puisque c'est le produit de constantes positives et $e^{1,04t} > 0$.
Ainsi $M'(t) > 0$ donc la fonction M est strictement croissante sur $[0; +\infty]$.
- a. Quand t tend vers $+\infty$, alors $-1,04t \rightarrow -\infty$, $e^{-1,04t} \rightarrow 0$ donc $1350e^{-1,04t} + 1 \rightarrow 1$.
Ainsi la limite de M en $+\infty$ est 13500.
b. Dans la réalité, le nombre de bactéries ne peut pas augmenter de manière illimitée. C'est le modèle logistique de la fonction M qui semble le plus vraisemblable comparé au modèle exponentiel où la fonction a pour limite $+\infty$ quand t tend vers $+\infty$.
- Par lecture graphique, on voit que cela correspond à 8 heures.
- La réponse b. est la réponse correcte. En effet, c'est à 7 heures que la courbe de la fonction M admet la tangente la plus pentue, c'est à dire avec le coefficient directeur le plus élevé.

EXERCICE 2

PARTIE A : Eau de source et eau minérale naturelle

$$1. P(M) = \frac{37000}{126000} \approx 0,2937 \quad \text{et} \quad P(S) = \frac{89000}{126000} \approx 0,7063.$$



2. À l'aide de la formule des probabilités totales, on obtient :

$$P(N) = P(M) \times P_M(N) + P(S) \times P_S(N) = 0,2937 \times 0,0012 + 0,7063 \times 0,0008 \approx 0,0009.$$

$$3. P_N(M) = \frac{P(M \cap N)}{P(N)} = \frac{\frac{37}{126} \times 0,0012}{\frac{37}{126} \cdot 0,0012 + \frac{89}{126} \cdot 0,0008} \approx 0,3841.$$

PARTIE B : Étude du nitrate présent dans l'eau

1. La moyenne pour cette série donne $\bar{x} \approx 4,5213$ et l'écart-type $s' \approx 0,0975$

2. La valeur estimée de σ est égale à $s = s' \sqrt{\frac{600}{599}} \approx 0,0976$.

- Le graphique choisi est celui qui a son pic dont l'abscisse est située à 4,5, ce qui correspond à la moyenne (n°1 et n°2). De plus, l'écart-type étant de 0,004, on sait que 99% des valeurs se situent dans l'intervalle $[\mu - 3\sigma; \mu + 3\sigma] \approx [4,512; 4,488]$. On en déduit qu'il s'agit de la courbe n°2.
- Pour que cette probabilité soit environ égale à 0,95, ce nombre « a » doit être égal à 2σ , donc à 0,008.
- Si le taux moyen de nitrate de l'échantillon appartient à l'intervalle $[4,5 - 0,008; 4,5 + 0,008]$ soit $[4,492; 4,508]$ alors on accepte l'hypothèse H_0 sinon on accepte H_1 .
- $\bar{x} \approx 4,5213$ donc l'hypothèse que le taux moyen de nitrate de la production soit égal à 4,5 est rejetée au risque de se tromper de 5%.

PARTIE C : Distribution

1. Le biologiste semble avoir tort car pour considérer la probabilité qu'un lot de 540 bouteilles prélevées au hasard contienne moins de 520 bouteilles de très bonne qualité, il faut additionner les probabilités liées à 0, 1, ... 518, 519 bouteilles de très bonne qualité. Graphiquement, on constate qu'en additionnant, on dépasse les 0,005.

2. $n=540$ car on peut obtenir au maximum 540 bouteilles de très bonne qualité. De plus, on sait que l'espérance de Y correspond au nombre moyen de bouteilles de très bonne qualité car on considère que la production est jugée suffisamment importante.

$E(Y) = n p = 528$ donc $p = 528/540$ soit environ 0,978. Ainsi Y suit la loi binomiale $B(540, 0,978)$.

2019 - U12 : Sciences physiques et chimiques

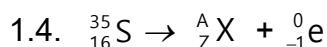
I. PHYSIQUE :

UTILISATION DE SONDES RADIOACTIVES ET FLUORESCENTES

1.1. Un noyau de soufre est composé de 35 nucléons dont 16 protons et 19 neutrons.

1.2. Lors de la désintégration du soufre 35 il y a émission d'un électron (${}_{-1}^0e$).

1.3. Il s'agit d'une radioactivité de type β^- .



D'après l'expression de la désintégration radioactive du soufre 35 et selon les lois de Soddy :

$A = 35$ (conservation du nombre de masse)

$Z = 17$ (conservation du nombre de charge)

1.5. Le noyau fils (indiqué par la lettre X) sera donc du chlore de symbole : ${}_{17}^{35}Cl$.

1.6.1.
$$\Delta m = m_{\text{finale}} - m_{\text{initiale}} = m({}_Z^AX) + m({}_{-1}^0e) - m({}_{16}^{35}S)$$

AN :
$$\Delta m = 34,95954 + 5,48560 \times 10^{-4} - 34,96027$$

$$= -1,81440 \times 10^{-4} \text{ u}$$

(On attend une valeur de Δm négative suite à la perte de masse reliée à la désintégration).

Autre possibilité de calcul : $\Delta m = m_{\text{initiale}} - m_{\text{finale}} = m({}_{16}^{35}S) - m({}_Z^AX) - m({}_{-1}^0e)$

$$\text{d'où } \Delta m = +1,81440 \times 10^{-4} \text{ u}$$

1.6.2. D'après la relation d'Einstein : $\Delta E = \Delta m \cdot c^2$

AN :
$$\Delta E = -1,81440 \times 10^{-4} \times (3,00 \times 10^8)^2 \times (1,66054 \times 10^{-27})$$

$$= -2,71 \times 10^{-14} \text{ J}$$

L'énergie libérée vaut $2,71 \times 10^{-14} \text{ J}$, soit $\frac{2,71 \times 10^{-14}}{1,60 \times 10^{-19}} = 1,69 \times 10^5 \text{ eV} = 169 \text{ keV}$.

La valeur trouvée est en accord avec la valeur donnée dans le texte.

1.7. La demi-vie est égale à la durée au bout de laquelle la moitié des noyaux radioactifs initialement présents se sont désintégrés.

D'après le document en Annexe 1, on lit pour $\frac{N_0}{2}$ la valeur $t_{1/2} = 88 \text{ j}$.

Donc le soufre 35 est bien un déchet à vie très courte car $t_{1/2} < 100 \text{ j}$.

1.8.1. L'activité d'une source radioactive est le nombre de désintégration par unité de temps.

1.8.2. D'après la loi de décroissance de l'activité A d'un échantillon :

$$A = A_0 \exp(-\lambda t) = A_0 \exp\left(-\frac{\ln 2}{t_{1/2}}\right) \text{ avec } \lambda = \frac{-\ln 2}{t_{1/2}}$$

Pour $t = 10 t_{1/2}$, $A = 259 \times \exp(-\ln 2 \times 10) = 0,253 \text{ MBq}$

On peut utiliser également l'expression $A(n) = A_0/2^n$ avec $n = \text{nombre de demi-vies}$.

L'activité en dix demi-vies représente donc $A_0/2^{10} = A_0/1024 = 0,253 \text{ MBq}$.

L'activité du Soufre 35 est fortement réduite au bout de 10 demi-vies.

2. Étude d'une sonde fluorescente

2.1. D'après le document en Annexe 2 (spectre d'émission), l'intensité de fluorescence sera maximale pour $\lambda = 521 \times 10^{-9} \text{ m}$ ($520 \times 10^{-9} \text{ m} < \lambda < 530 \times 10^{-9} \text{ m}$).

L'énergie du photon émis est donnée par la relation de Planck : $E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$

$$\text{AN : } E = \frac{6,63 \times 10^{-34} \times 3,00 \times 10^8}{521 \times 10^{-9}} = 3,82 \times 10^{-19} \text{ J}$$

2.2. D'après le document en Annexe 2, le déplacement de Stokes vaut :

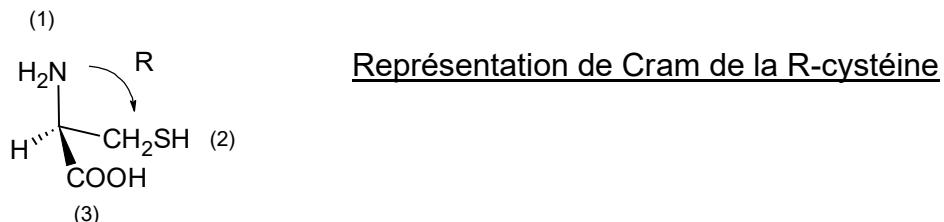
$$\Delta\lambda = 521 - 490 = 31 \text{ nm}$$

Il est possible de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission car $\Delta\lambda > 20 \text{ nm}$

II. CHIMIE ORGANIQUE : ÉTUDE DE LA CYSTÉINE

1. Structure de la cystéine

- 1.1. - SH : groupe caractéristique de la fonction thiol ;
- NH₂ : groupe caractéristique de la fonction amine ;
- COOH : groupe caractéristique de la fonction acide carboxylique
- 1.2. La molécule de cystéine est chirale car elle n'a ni plan ni centre de symétrie (elle possède un atome de carbone asymétrique).
- 1.3. D'après les règles CIP : NH₂ > CH₂SH > COOH > H (ordre de priorité)



Le classement se fait par numéro atomique Z décroissant des atomes directement reliés au C* étudié.

Quand deux substituants sont liés au C* par des atomes identiques (par exemple, un carbone pour - CH₂SH et - COOH), on considère les atomes du second ordre c'est-à-dire les atomes directement reliés aux atomes sur lesquels porte l'indétermination, les atomes de C dans ce cas. Le C du groupement -CH₂SH étant relié un atome de S (Z=16) est donc prioritaire par rapport au groupement -COOH où le C est relié des O (Z=8).

En plaçant le substituant (4) vers l'arrière, pour passer de (1) à (2) à (3) on tourne dans le sens des aiguilles d'une montre alors on obtient bien l'énanthiomère R de la cystéine

- 1.4. Forte bande d'absorption à 1580 cm^{-1} : liaison N-H du groupement amine NH₂.
Bande large de forte intensité entre 2500 et 3200 cm^{-1} : liaison O-H du groupement acide carboxylique COOH.

2. Oxydation de la cystéine

- 2.1. $I_2 \text{ (aq)} + 2e^- = 2I^- \text{ (aq)}$ (demi-équation d'oxydation)
 $2 \text{ Cys-SH (aq)} = \text{Cys-S-S-Cys (aq)} + 2H^+ \text{ (aq)} + 2e^-$ (demi-équation de réduction)

2.2. Équation d'oxydoréduction entre le diiode et la cystéine :
 $I_2 \text{ (aq)} + 2\text{Cys-SH (aq)} \rightarrow \text{Cys-S-S-Cys (aq)} + 2\text{H}^+ \text{ (aq)} + 2\text{I}^- \text{ (aq)}$

2.3. La liaison formée au cours de la réaction est un pont disulfure –S-S– (liaison disulfure).

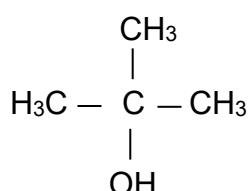
3. Étude du groupe fonctionnel –NH₂ de la cystéine

Une fonction amide se forme au cours de cette réaction.

4. Étude du groupe fonctionnel –COOH de la cystéine

4.1. Il y a formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés.

4.2.1. Formule semi-développée du 2-méthylpropan-2-ol :



4.2.2. Le 2-méthylpropan-2-ol n'est pas sensible à l'oxydation car c'est un alcool tertiaire.

4.2.3. Le singulet correspond aux 9 noyaux d'hydrogène des groupements -CH₃. Ces 9 noyaux d'hydrogène sont équivalents car ils ont le même environnement chimique. Ils ne sont pas couplés avec d'autres H (pas d'atomes de H voisins) d'où le singulet.

4.2.4. Une fonction ester se forme au cours de cette réaction.

4.2.5. La réaction d'estérification entre un acide carboxylique et un alcool est une réaction lente, limitée et athermique.

III. CHIMIE GÉNÉRALE : LE SOUFRE ET SES COMPOSÉS

1. Structure du soufre et de ses composés

1.1. S (Z=16) : 1s² 2s² 2p⁶ 3s² 3p⁴

1.2. L'oxygène a la même structure électronique externe, ns² np⁴, que le soufre (avec n=2 pour l'oxygène et n=3 pour le soufre), donc ils se trouvent dans la même colonne de la classification périodique.

1.3. La molécule de dioxyde de soufre SO₂ est de type AX₂E, où A=atome centrale de S, X₂= 2 atomes d'O reliés au soufre, E = le doublet non-liant porté par S. D'après les règles VSEPR, il s'agit donc d'une géométrie triangulaire coudée, ou géométrie coudée en V.

2. Oxydation du dioxyde de soufre

$$\Delta_r H^0 = 2 \Delta_f H_{SO_3}^0 - 2 \Delta_f H_{O_2}^0 - 2 \Delta_f H_{SO_2}^0$$

$$\Delta_r H^0 = -2 \times 395,7 - 0 + 2 \times 296,8$$

$$\Delta_r H^0 = -197,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

2.2. $\Delta_r H^0 < 0$, donc la réaction est exothermique dans le sens 1 (sens direct).

$$2.3. \quad K^0 = \exp\left(-\frac{\Delta_r G^0}{RT}\right)$$

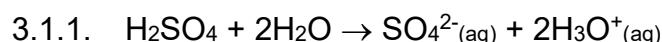
$$K^0 = \exp\left(\frac{141,7 \times 10^3}{8,31 \times 298}\right)$$

$$K^0 = 7,09 \times 10^{24}$$

2.4. On choisit une température d'amorçage élevée car la température est un facteur cinétique. Plus la température est élevée, plus il y a d'agitation thermique, plus les molécules s'entrechoquent et réagissent.

Au cours de la réaction, la température augmente car il s'agit d'une réaction exothermique, elle libère de l'énergie.

3. Dissolution du trioxyde de soufre



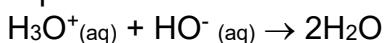
Le texte précise que l'on considère l'acide sulfurique comme un acide fort, les deux H acides de la molécule H_2SO_4 sont perdus simultanément pour former la base conjuguée SO_4^{2-} .

3.1.2. D'après l'équation précédente, on a :

$$n_{H_3O^+} = 2 n_{H_2SO_4} \text{ donc } [H_3O^+] = 2[H_2SO_4] = 2 \times 1,0 \times 10^{-2} \\ = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$pH = -\log[H_3O^+] = -\log(2,0 \times 10^{-2}) = 1,7$$

3.1.3. Équation de réaction du dosage acide fort/base forte :



À l'équivalence les réactifs ont été introduits dans les proportions stœchiométriques, donc :

$$n_{H_3O^+} = n_{HO^-}$$

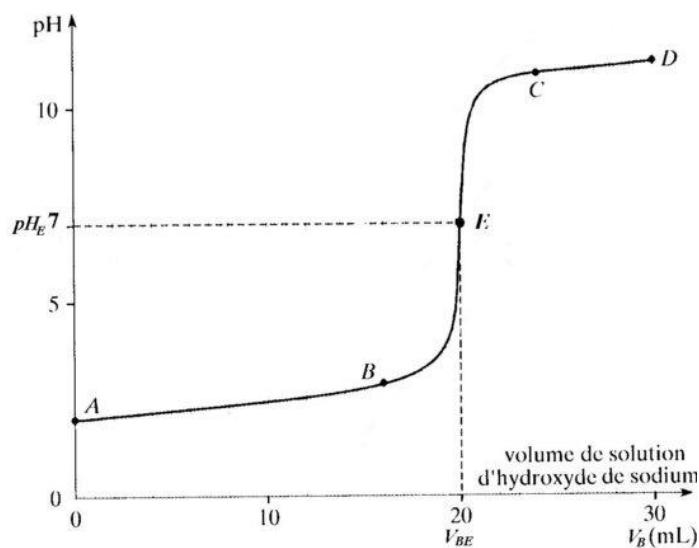
$$2n_{H_2SO_4} = n_{HO^-}$$

$$C_b V_b = 2C \cdot V$$

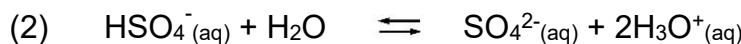
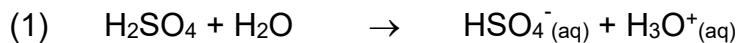
$$V_b = \frac{2C \cdot V}{C_b} = 20 \text{ mL}$$

Le pH à l'équivalence sera de 7 car on obtient alors une solution de sulfate de sodium Na_2SO_4 neutre (ou bien H_2O , sans prise en compte des ions spectateurs Na^+ et SO_4^{2-}).

Tracé de l'allure de la courbe :



3.2. En fait, l'acide sulfurique est un diacide dont la première acidité (1) est forte et la seconde acidité (2) est faible ($pK_a = 2$)



La deuxième acidité de l'acide sulfurique n'est pas forte, le deuxième hydrogène n'est pas complètement libéré. Le pH mesuré sera donc plus élevé (solution moins acide).

En fait, l'acide sulfurique est un diacide dont la première acidité est forte pour le couple $H_2SO_4 \text{ (aq)} / HSO_4^{-\text{(aq)}}$ et dont la seconde acidité est caractérisée par un $pK_a = 2$ pour le couple $HSO_4^{-\text{(aq)}} / SO_4^{2-\text{(aq)}}$.

La valeur calculée du pH à la question 3.1.2. n'est pas celle que l'on mesure.

2019 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Étude in vitro de l'activité transcriptionnelle d'une version mutée du récepteur de l'hormone thyroïdienne $\tau\alpha 1$

1. Extraction des ARN totaux de cœurs de souris

- 1.1. Réactifs utilisés : β -mercaptopropanoïde (agent réducteur des ponts disulfure des protéines) et guanidium isothiocyanate (agent chaotropique). Ces agents désorganisent les membranes cellulaires et dénaturent les protéines, provoquant la lyse cellulaire et l'inactivation des RNases.
- 1.2. Il s'agit d'une chromatographie d'adsorption sur gel de silice.
- 1.3. Les ARN polyA+ sont des ARN messagers. Cette étape permet d'éliminer tous les ARN non polyadénylés (dont les ARN ribosomiques majoritaires), pour ne conserver que les ARN messagers polyadénylés.
- 1.4. Chromatographie d'affinité sur un support greffé par des oligodT.

2. Transcription inverse et amplification par PCR

- 2.1. La transcriptase inverse est une ADN polymérase ARN dépendante, capable de synthétiser un brin d'ADN à partir d'une matrice ARN (et d'une amorce).
- 2.2. La séquence est présentée au format FASTA, caractérisée par une écriture sur deux lignes : la première ligne débute par le signe « > » et porte le nom de la séquence, la deuxième contenant la séquence nucléotidique.
- 2.3. La séquence au format FASTA est orientée de 5' => 3', et la polymérisation s'effectue également dans le sens 5' => 3'.
La séquence de l'amorce sens s'hybride donc sur le brin complémentaire de la séquence fournie, sa séquence est donc identique à la séquence fournie : 5' AGCTGCCTTGCATTGACCA 3'.
La séquence de l'amorce antisens s'hybride sur le brin fourni, sa séquence en est donc l'inverse complémentaire : 5' GGGAAAGATCTCGACAGCAGG 3'
- 2.4. La première série de 9 cycles est réalisée à une température d'hybridation de 68 °C (forte stringence), supérieure à la température optimale d'hybridation des amorces (annoncée à 57,2 °C) => la spécificité est forte, l'efficacité d'amplification est probablement médiocre. À l'issue de cette étape, la séquence cible est majoritaire.
La deuxième série de 24 cycles utilise une température d'hybridation de 58 °C, égale à la température d'hybridation recommandée => la spécificité reste correcte et l'efficacité de l'amplification est plus élevée. À l'issue de cette étape, la séquence cible est fortement amplifiée.

3. Clonage du produit de PCR dans le vecteur pGEM-T

- 3.1. Le vecteur pGEM-T porte un T débordant en 3', et le produit d'amplification porte un A débordant en 3', par la Taq polymérase. Il y a complémentarité entre le 3' T du vecteur et le 3' A de l'amplicon généré par PCR, ce qui augmente l'efficacité de la ligature.
D'autre part, la présence des 3'T débordant sur le vecteur permet de limiter sa recircularisation en absence d'insert.
- 3.2. La souche JM109 possède le génotype Lac Δ M15, qui correspond à la séquence codant la β -galactosidase, mais avec une délétion sur les codons des premiers

acides aminés de cette protéine. Le fragment ω (oméga) produit ne possède pas d'activité enzymatique. Cette activité enzymatique est reconstituée lorsque le peptide α (codé par le vecteur) est présent dans la cellule.

3.3. Le milieu doit contenir

- de l'ampicilline pour sélectionner les bactéries transformées par le vecteur pGEM-T, et donc portant le gène de résistance à l'ampicilline, Amp R .
- de l'IPTG, analogue structural du lactose et permettant la levée de la répression du promoteur P_{Lac} contrôlant la synthèse du gène LacZ α codé par le vecteur.
- du X-Gal, substrat chromogène de la β -galactosidase dont l'hydrolyse génère un précipité bleu.
- tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance bactérienne.

3.4. En absence de recombinaison (= absence d'insert), le gène LacZ α porté par le vecteur pGEM-T permet la synthèse du peptide α . Ce peptide α s'associe au fragment ω codé par la souche hôte, reconstituant ainsi une β -galactosidase complète : c'est l' α -complémentation. Le substrat X-Gal est hydrolysé et les colonies apparaissent bleues, traduisant la présence d'un vecteur vide dans la bactérie transformée.

Lorsque le vecteur est recombiné, le gène LacZ α est interrompu puisque le site de recombinaison est situé à l'intérieur du gène LacZ α . Dans ce cas, le fragment ω seul ne permettant pas l'hydrolyse du X-Gal, les colonies apparaissent blanches, traduisant la présence d'un insert dans le vecteur.

4. Obtention d'un vecteur d'expression du récepteur muté TR α 1CR1

- 4.1. Le vecteur pSG5/TR α 1 porte le promoteur SV40 (P SV40), permettant l'initiation de la transcription dans des cellules de mammifères et le signal de polyadénylation (SV40 pA), tous deux issus du virus simien 40, et permettant l'expression des gènes dans des cellules de mammifères.
- 4.2. Le vecteur pSG5/TR α 1 porte une origine de réplication bactérienne (pUC ori) et une origine de réplication eucaryote SV40 ori, le gène « ampicillin » permettant la sélection de bactéries, ainsi que des séquences d'expression dans une cellule eucaryote (P SV40 et SV40 pA). Comme il comporte à la fois des éléments d'origine eucaryote et procaryote, il s'agit d'un vecteur navette.

5. Etude de l'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvages et mutants

- 5.1. Un gène rapporteur est un gène non exprimé de façon endogène, codant une protéine dont la présence est facilement détectable.
- 5.2. Le complexe RXR-TR α 1 se fixe sur la séquence de réponse TRE. La fixation de l'hormone T3 sur TR α 1 provoque un changement de conformation du complexe permettant d'activer l'expression des gènes situés en aval.
- 5.3. Les cellules transfectées avec le vecteur vide constituent un témoin négatif, car TR α 1 n'est pas présent. On observe une très faible activité luciférase (environ 1 000 ua) en présence ou absence de T3, traduisant une très faible expression du gène rapporteur *luc*.

Les cellules transfectées avec le vecteur portant l'allèle sauvage de TR α 1 constituent un témoin positif. Elles présentent une très faible activité luciférase en absence de T3 (environ 1 000 ua, identique à celle du témoin négatif). En présence de T3, l'activité luciférase est très importante : environ 60 000 ua, soit 60 fois plus

qu'en absence de T3. La protéine codée par TR α 1 permet d'activer la transcription du gène rapporteur *luc* seulement en présence de l'hormone T3, comme attendu.

Pour les cellules transfectées avec le vecteur portant l'allèle muté TR α 2/CR1, l'activité luciférase est très faible (environ 1 000 ua, identique à celle du témoin négatif), que ce soit en présence ou en absence de T3. La protéine codée par l'allèle muté TR α 2/CR1 ne permet pas d'activer l'expression du gène rapporteur *luc*. La mutation a donc provoqué la perte de la fonction de régulation de l'expression des gènes situés en aval.

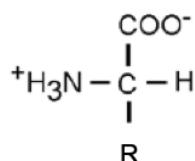
5.4. La protéine TR α 1/CR1 porte une mutation sur une hélice α , qui provoque la perte de fonction de cette protéine. Cette mutation entraîne donc soit un défaut de fixation de TR α 1 sur la séquence d'ADN cible, soit un défaut de dimérisation de TR α 1/CR1 avec la protéine RXR, soit un défaut de fixation de l'hormone T3 sur TR α 1/CR1, soit un défaut d'interaction avec la machinerie de transcription.

2019 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Implication de l'activité lysyl oxydase (LOX) dans le développement des métastases cancéreuses

1. Le collagène, un substrat naturel de la lysyl oxydase

1.1

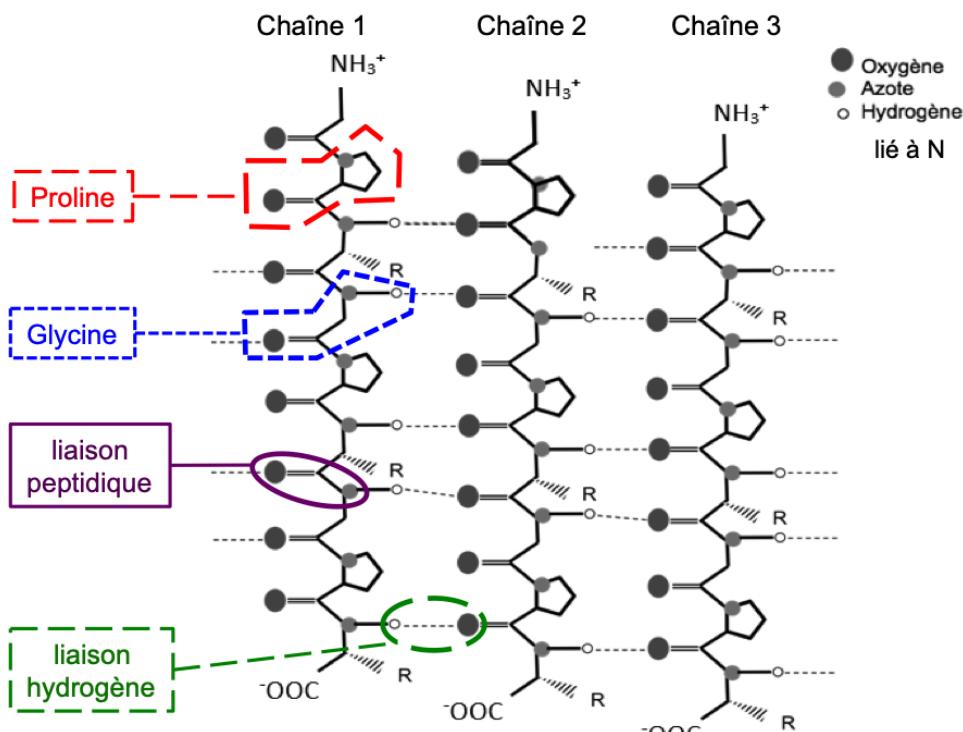


Structure générale d'un acide aminé

La chaîne latérale de la glycine est constituée d'un seul atome d'hydrogène (elle ne possède pas de carbone asymétrique), ce qui lui confère un faible encombrement stérique et facilite la formation de la triple hélice observée dans le collagène.

La chaîne latérale de la proline est liée au groupement amine du carbone alpha, ce qui confère à la liaison peptidique une rigidité particulière permettant la formation d'une hélice engageant trois chaînes protéiques.

1.2



1.3

	Hélice alpha	Triple hélice du tropocollagène
Nombre de chaînes peptidiques	1	3
Positionnement des interactions hydrogène stabilisatrices	Entre groupements $-\text{C}=\text{O}$ et $-\text{NH}$ des liaisons peptidiques de la même chaîne protéique	Entre groupements $-\text{C}=\text{O}$ et $-\text{NH}$ des liaisons peptidiques de chaînes protéiques différentes

1.4 La plus grande résistance à la traction du tropocollagène peut être expliquée par

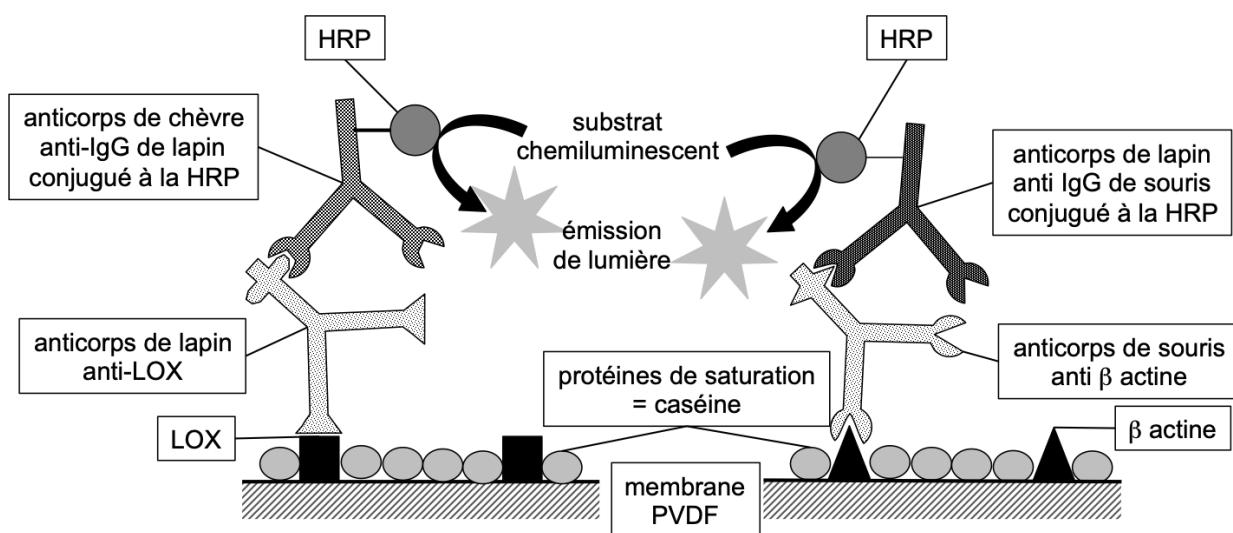
- la présence de trois chaînes peptidiques
- la présence de nombreuses liaisons hydrogène associant ces chaînes peptidiques
- la présence de nombreux résidus prolyl rigidifiant le squelette peptidique.

D'autre part, chaque chaîne peptidique est en hélice gauche, alors que la triple hélice est droite (orientation inverse des chaîne peptidiques et de la triple hélice), ce qui rend également la triple hélice moins étirable.

2. Étude du niveau d'expression de la protéine LOX en condition d'hypoxie

2.1 La SDS-PAGE permet de séparer les protéines selon leur masse moléculaire.

2.2



2.3 L'étape n°2 du Western blot correspond à la saturation des sites de fixation non spécifique de la membrane par des protéines de lait (caséine).

Les lavages permettent l'élimination des réactifs en excès (anticorps primaires puis anticorps secondaires conjugués à la HRP).

2.4 La révélation de la β actine permet de normaliser l'expression de la LOX entre les différents échantillons. En effet, la β actine étant une protéine à expression constante, une différence d'intensité des bandes de β actine montrerait une différence de quantité de protéine déposée dans chacun des puits. Il est ainsi possible de corriger les variations de signal de LOX en se ramenant à une quantité fixe de protéines déposées dans les puits de SDS PAGE.

2.5 L'anticorps conjugué de chèvre anti IgG de lapin (anticorps secondaire permettant la révélation de la LOX) est capable de reconnaître la fraction constante des IgG de lapin, donc les anticorps primaires de lapin anti-LOX, mais aussi les anticorps secondaires de lapin anti IgG de souris (anticorps secondaire permettant la révélation de la β actine).

Si l'anticorps secondaire de lapin anti IgG de souris est déjà présent sur la membrane (complexé aux anticorps primaires anti-β actine), il sera également révélé par l'anticorps conjugué de chèvre anti IgG de lapin, ce qui faussera les résultats.

2.6 Le film photographique montre que les bandes de β actine présentent une intensité similaire dans les deux conditions (19 % O₂ et 0,5 % O₂), ce qui montre que les quantités de protéines totales déposées sont égales et permet de normaliser l'expression de la LOX par rapport à la β actine dans les deux conditions. L'intensité

de la bande LOX est plus importante dans la condition d'hypoxie (0,5 % O₂), traduisant une expression plus forte de la LOX dans cette condition. L'histogramme présente les résultats de l'expression normalisée de LOX par rapport à la β actine. En hypoxie (0,5 % O₂), la LOX est environ 3 fois plus exprimée qu'en normoxie (19 % O₂).

3. Détermination de l'activité de la lysyl oxydase

3.1 Composants présents dans un puits de mesure de l'activité LOX : substrat peptidique de la LOX, surnageant de culture cellulaire (contenant la LOX) avec éventuellement ajout de PBS et BSA 0,1 % (pour compléter le volume d'échantillon ou d'étoile à 50 μ L), HRP (enzyme catalysant la réaction indicatrice), substrat fluorogène de la HRP, tampon adapté à l'activité de la LOX et de la HRP,

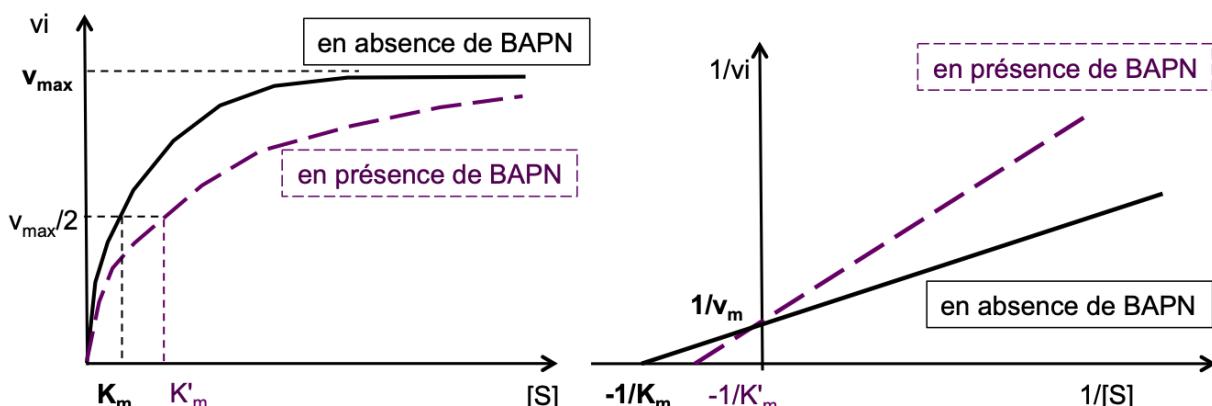
3.2 Le « X » indique que la solution mère est un certain nombre de fois (X) plus concentrée que la concentration utilisées dans les essais, la concentration utilisée pour les essais étant de 1 X.

3.3 Il s'agit de montrer que la solution « HRP substrate » est bien à une concentration de 1X dans le milieu réactionnel. Le mode opératoire indique l'ajout de 40 μ L de « 250X HRP substrate » dans 5 mL de tampon contenant le substrat peptidique de la LOX, ce qui permet d'obtenir une concentration finale de 2X dans le « LOX Reaction Mix » (40 μ L x 250 X / 5 000 μ L = 2X). Le mélange volume à volume (50 μ L + 50 μ L) du « 2X LOX Reaction Mix » et d'échantillon à tester conduit à une dilution au demi, soit une concentration finale de la solution « HRP substrate » égale à 1X dans le milieu réactionnel.
La solution « HRP substrate » est fortement concentrée, de façon à ce que le volume à ajouter puisse être négligé devant le volume total de réaction.

3.4 La fluorescence est la propriété d'un composé capable d'absorber de l'énergie lorsqu'il est excité par une radiation électromagnétique de longueur d'onde donnée, et d'en restituer une partie en émettant un photon correspondant à une radiation électromagnétique de longueur d'onde supérieure à celle de la radiation d'excitation (énergie restituée inférieure à l'énergie absorbée).
Réglages de l'appareil de mesure : longueur d'onde d'excitation = 540 nm ; longueur d'onde de lecture (= d'émission) = 590 nm.

3.5 L'oxydation du substrat peptidique par la LOX (réaction principale) produit du peroxyde d'hydrogène H₂O₂, ce dernier étant l'un des substrats utilisés par la HRP (réaction indicatrice).

3.6 En présence d'un inhibiteur compétitif, la vitesse maximale est inchangée et la constante de Michaelis est augmentée (affinité apparente pour le substrat diminuée).



3.7 L'histogramme de résultats montre que la fluorescence du témoin est comprise entre 4 000 et 6 000 ua (par lecture des barres d'erreurs), celle du lot 1 étant comprise entre 3 000 et 5 000 ua. La différence n'est statistiquement pas significative, puisqu'il y a chevauchement des barres d'erreur. (ua : unités arbitraires)

3.8 Pour les souris cancéreuses du lot témoin, l'activité LOX est élevée, de l'ordre de 5 000 ua. Pour les souris du lot 1, traitées pendant 2 semaines (semaines 2 à 5), l'activité LOX reste élevée (4 000 ua, écart non significatif par rapport au témoin). Pour les souris du lot 2, traitées pendant 3 semaines (semaines 3 à 5), l'activité LOX est totalement inhibée.
L'inhibition de la LOX par le BAPN est efficace lorsque le traitement commence deux semaines après l'injection des cellules cancéreuses et s'il correspond au moins à trois semaines d'injections quotidiennes.

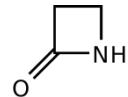
3.9 Le BAPN semble être un inhibiteur efficace de l'activité de la LOX in vivo. La LOX étant impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans l'adhésion des cellules cancéreuses lors de disséminations métastatiques, son blocage pourrait permettre de limiter le développement de métastases.

2019 – U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Le microbiote intestinal

1. Effet de l'antibiothérapie sur l'équilibre du microbiote

1.1. Structure commune aux béta-lactamines = noyau béta-lactame :



1.2. Les trois modalités de résistance présentées sont les suivantes :

- production d'une enzyme hydrolysant l'antibiotique, le rendant inactif
- production d'une enzyme modifiant la structure chimique de l'antibiotique souvent par ajout d'un groupement (acétylation...), le rendant inactif
- production d'un système de pompe d'efflux expulsant l'antibiotique hors de la cellule, dont concentration intracellulaire devient trop faible pour agir sur la cible cellulaire.

Quatrième mécanisme possible : modification de la cible cellulaire de l'antibiotique, qui devient incapable de la reconnaître, diminution de la perméabilité membranaire à l'antibiotique, hyperproduction de la cible.

1.3. Le gène *bla* code une béta-lactamase, enzyme hydrolysant le noyau béta-lactame. Les béta-lactamines sont des analogues structuraux du dipeptide D-Ala-D-Ala, reconnu par la transpeptidase lors de la synthèse du peptidoglycane.

L'antibiotique modifié perd cette analogie structurale avec le dipeptide D-Ala-D-Ala et n'inhibe plus la synthèse de la paroi bactérienne.

Ce mécanisme de résistance appartient à la première catégorie présentée dans le document 2.

1.4. L'endospore est une forme de dormance cellulaire car elle présente une faible teneur en eau (déshydratation), une faible activité enzymatique, une quasi-absence de réaction anaboliques, et une absence de transcription (peu d'ARNm).

1.5. La spore participe à la résistance de *C. difficile* aux antibiotiques en raison :

- de la présence d'enveloppes épaisses (cortex, manteau, exosporium) qui limitent la pénétration des antibiotiques jusqu'à la cellule (rôle de barrière), et conférant à la spore une résistance aux substances chimiques et aux acides
- du ralentissement du métabolisme (dormance cellulaire), alors que de nombreux antibiotiques n'agissent que sur des cellules métaboliquement actives : au niveau de la traduction (sous unités des ribosomes), de la transcription (ARN polymérase), de la réplication (gyrases), de la synthèse de la paroi (peptidoglycane)...

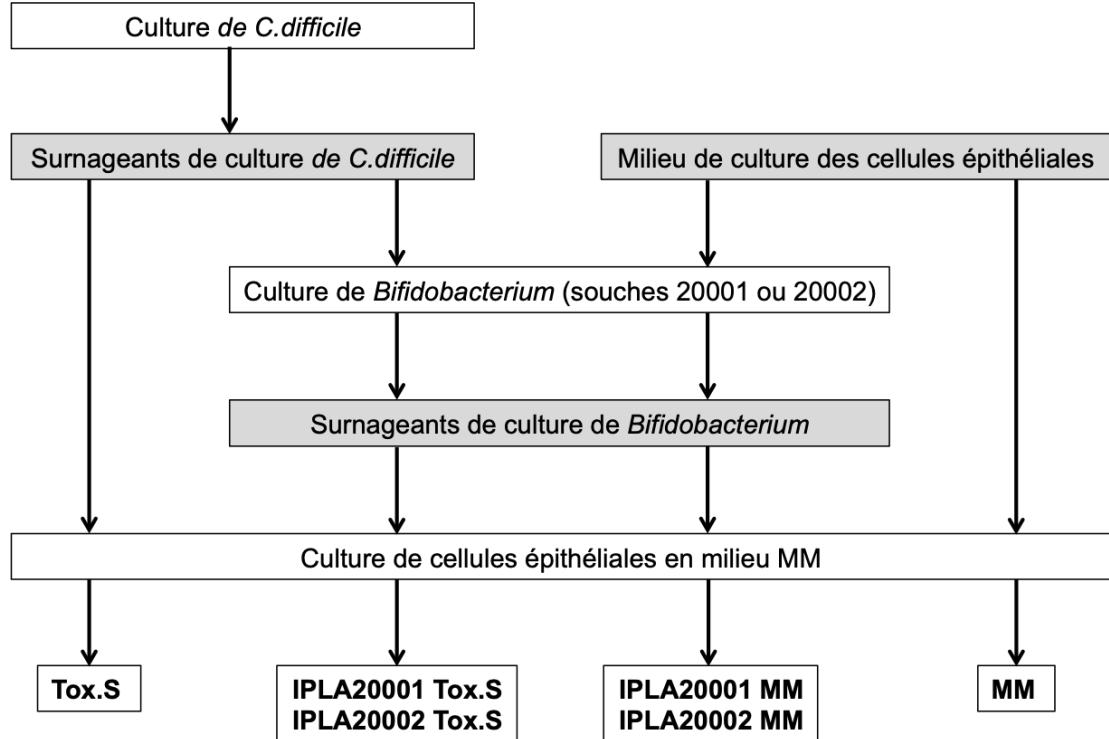
1.6. L'administration d'antibiotiques mal ciblés / surdosés / à spectre trop large, par voie orale, aura pour effet de détruire ou d'inhiber la croissance de nombreuses espèces bactériennes contribuant à la richesse du microbiote. Les bactéries résistantes comme *C. difficile*, notamment grâce à sa capacité à sporuler, auront alors le champ libre pour coloniser les niches laissées vacantes par les espèces disparues. Leur proportion augmentera donc au sein du microbiote intestinal, entraînant un déséquilibre de ce dernier.

2. Effet protecteur de *Bifidobacterium longum* sur les cellules intestinales

2.1. Le « cell index », exprimé en unités arbitraires, mesure l'impédance du courant électrique parcourant une électrode en or sur laquelle se développent les cellules. Plus la surface occupée par les cellules augmente (soit parce qu'elles se multiplient, soit parce qu'elles grossissent), plus l'impédance, et donc le « cell index », augmente.

Si les cellules meurent, elles se détachent du support et l'appareil enregistre alors une chute du « cell-index ».

2.2. Récapitulatif des conditions d'obtention des courbes (*non demandé dans le sujet*) :



Analyse des courbes :

- courbe MM = témoin de viabilité des cultures ; le cell index n'évolue pas, traduisant la viabilité des cellules => témoin conforme.
- courbes *IPLA*20001-MM et *IPLA*20002-MM = témoin d'innocuité des surnageants de *Bifidobacterium* pour les cellules, en absence de toxine de *C. difficile* ; le cell index n'évolue pas de façon significative, traduisant la viabilité des cellules => témoin conforme
- courbe Tox.S = témoin de toxicité de la toxine de *C. difficile* pour les cellules ; chute rapide du cell index jusqu'à une valeur de -1 après 22 h, ce qui traduit la mort des cellules épithéliales exposées à la toxine => témoin conforme.
- courbes *IPLA*20001-Tox.S et *IPLA*20002-Tox.S = courbes essais ; le cell index diminue au cours du temps, mais plus lentement qu'en présence de toxine seule. La chute atteint une valeur comprise entre -0,4 et -0,6 après 22 h.

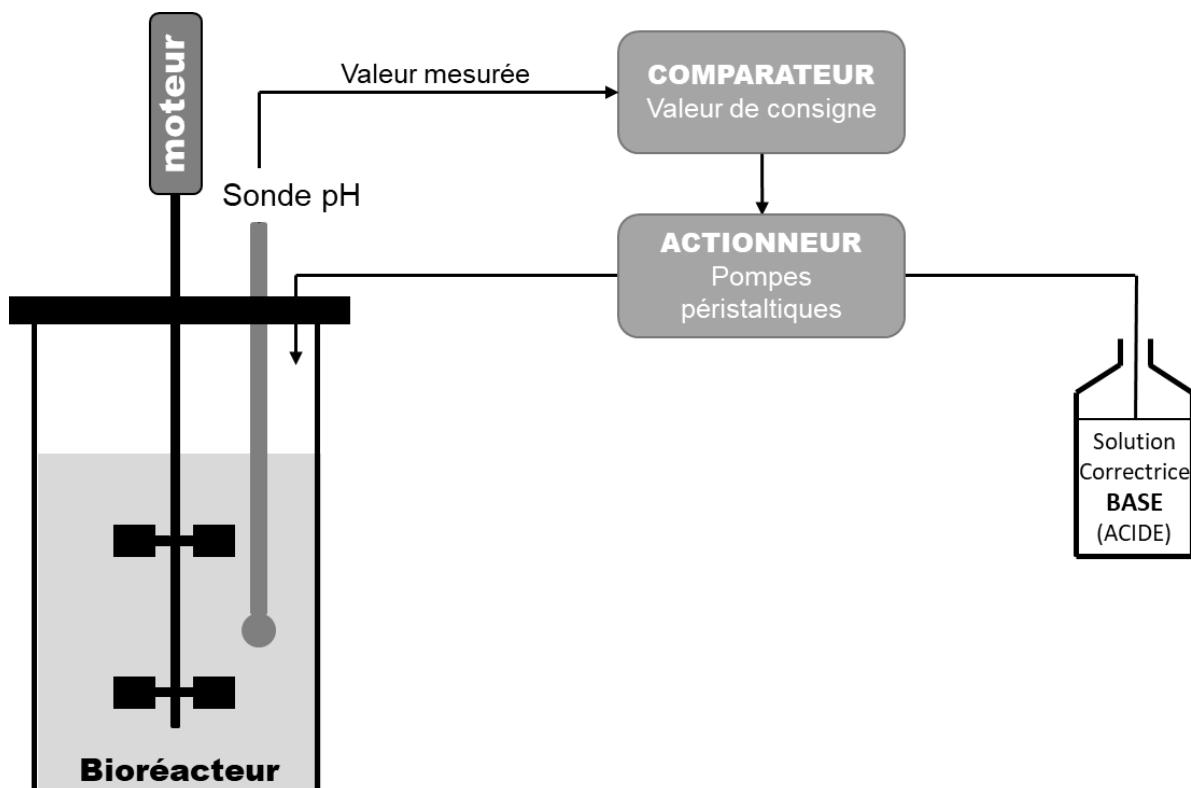
Conclusion : le surnageant de culture des *Bifidobacterium* cultivées au contact des toxines de *C. difficile* atténue l'effet de la toxine de *C. difficile* sur les cellules épithéliales, soit par la production d'un composé neutralisant la toxine, soit par dégradation de celle-ci.

3. Production de *Bifidobacterium*

3.1. Le milieu MRS est un milieu semi-synthétique, contenant des substances chimiques dont la nature et les proportions sont définies (glucose, phosphate dipotassique...), et des composés naturels de composition moins précise (polypeptides, extrait de viande, extrait autolytique de levure). Il s'agit d'un milieu complet (il contient tous les éléments nécessaires à la croissance) et riche (il contient plusieurs sources de facteurs de croissance : extrait de viande, extraits de levure).

Bifidobacterium longum tire son énergie de l'oxydation de substrats organiques réduits, sans intervention de lumière, cette espèce est donc chimio-organotrophe. Sa source de carbone est également organique, elle est donc hétérotrophe. *Le milieu contient plusieurs sources de facteurs de croissance, la souche est donc probablement aussi (poly)auxotrophe.*

3.2. Schéma du bioréacteur :



3.3. La fermentation mise en jeu produit de l'acide acétique et de l'acide lactique, elle est donc hétérolactique.

$$PVHT = \frac{\Delta \text{produit}}{\Delta \text{temps}}$$

$$PVHT \text{ lactate} = \frac{7,2}{12} = 0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$PVHT \text{ acétate} = \frac{8,6}{12} \sim 0,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

3.4. Calcul du rendement :

$$R_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{8,7 \cdot 10^9 - 8,0 \cdot 10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}}{19,5 - 0}$$

$$R_{X/S} \approx \frac{8,7 \cdot 10^{12} \text{ cell} \cdot \text{L}^{-1}}{19,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}} \approx \frac{90 \cdot 10^{11}}{20} = 4,5 \cdot 10^{11} \text{ cellules} \cdot \text{g}^{-1}$$

L'ordre de grandeur de ce résultat est anormalement élevé.

3.5. Tableau de synthèse (objectif = production de biomasse) :

Critère	MRS régulé à 5,5	MRS régulé à 5,5 + lactosérum	MRS non régulé + lactosérum
Biomasse finale (10^9 cellules•mL $^{-1}$)	8,7	17,3	3,3
R _{x/s} (10^{11} cellule•g $^{-1}$)	4,4	5,7	2,6
Coût	++	+++	+++
Facilité de mise en œuvre	++	++	+++

La condition de culture qui semble regrouper le plus d'avantages est la condition de culture en milieu MRS complémenté en lactosérum et dont le pH est régulé à 5,5 : meilleure productivité globale pour un coût modérément plus élevé que le MRS régulé à pH 5,5 sans ajout de lactosérum.

2019 - U42 : Biologie cellulaire

Extraits végétaux et multirésistance à la chimiothérapie des cancers

1. Micropagation d'*Annona glabra*

- 1.1. Le tissu indifférencié présent dans un bourgeon axillaire est le méristème.
- 1.2. La benzylaminopurine (BAP) est une cytokinine
L'acide indole acétique (IAA) est une auxine
L'acide gybbérellique (GA3) est une gybbérelline
La rhizogenèse est induite par l'acide indole acétique (IAA).
- 1.3. Multiplication cellulaire, formation de jeunes pousses avec des tiges (caulogenèse) pendant 30 jours.
Formation de racines (rhizogenèse) pendant 15 jours
Acclimatation de la plantule dans des conditions contrôlées pendant 21 jours.
- 1.4. La micropagation des végétaux consiste, à partir d'un explant végétal formé de tissus différenciés, à activer *in vitro* la multiplication cellulaire, la dédifférenciation puis la différenciation cellulaire, à stimuler séquentiellement la caulogenèse puis la rhizogenèse, afin d'obtenir une plante entière génétiquement identique à la plante mère.
- 1.5. Le saccharose est un sucre (diholoside), la glycine est un acide aminé.
Exemples de macroéléments (sels minéraux présents à fortes concentrations dans le milieu) : chlorure de calcium, nitrate d'ammonium, nitrate de potassium, phosphate de potassium, sulfate de magnésium
Exemples de microéléments (sels minéraux présents à faibles concentrations dans le milieu) : acide borique, chlorure de cobalt, iodure de potassium, molybdate de sodium, sulfate de cuivre, sulfate de zinc, Na₂EDTA, sulfate de fer, sulfate de manganèse
Exemples de vitamines (molécules organiques précurseurs d'enzymes ou coenzymes) : acide nicotinique, inositol, pyridoxine, thiamine
- 1.6. En présence de BAP à concentrations croissantes et en absence de GA3, la longueur moyenne des tiges augmente : 1,12 cm – 1,45 cm – 2,12 cm – 0,8 cm – 1,19 cm. L'hormone BAP semble stimuler la caulogenèse (les écarts sont peu significatifs, comme le montrent les incertitudes associées aux mesures).
En présence de GA3 à concentration fixe (1 mg•L⁻¹), la longueur moyenne des tiges est plus faible quelle que soit la concentration en BAP : 1,12 cm – 0,79 cm – 0,68 cm – 0,68 cm – 0,44 cm. L'hormone GA3 inhibe la caulogenèse (les écarts de longueur moyenne des tiges en absence et en présence de GA3, à concentration égale en BAP, sont tous significatifs).
En conclusion, pour une croissance optimale des tiges des plantules, il faut utiliser 0,50 mg•L⁻¹ de BAP et ne pas ajouter de GA3.

2. Évaluation de la cytotoxicité des extraits

- 2.1 La séparation des cellules sanguines est effectuée par centrifugation de sang sur milieu Histopaque 1077®, de densité 1,077 g•L⁻¹. Le plasma sanguin, de densité inférieure à 1,077 g•L⁻¹, se positionne dans la partie supérieure du tube. Les éléments de densité inférieure à 1,077 g•L⁻¹ se situent à l'interface entre le milieu

Histopaque 1077® et le plasma. Les éléments de densité supérieure à $1,077 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sédimentent au fond du tube.

Parmi les cellules sanguines, les lymphocytes et les plaquettes forment un anneau à l'interface entre les deux milieux, alors que les globules rouges, sous l'effet de l'agent agrégeant du milieu Histopaque 1077®, forment des amas denses et sédimentent au fond du tube.

2.2. Les lignées cellulaires continues ont une durée de vie illimitée et se repiquent à l'infini, elles ont une croissance rapide, sont peu exigeantes et cultivent en absence de sérum de veau fœtal.

2.3. Lors de la culture de lignées cellulaires, il est nécessaire de maintenir les cellules dans des conditions proches de celles des organismes dont elles sont issues. Il est donc nécessaire de contrôler :

- la température, afin de la maintenir à une valeur proche de la température physiologique des cellules humaines, 37°C
- la pression partielle en CO_2 , de façon à maintenir un pH physiologique (système tampon $\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$)
- la teneur en eau de l'atmosphère de culture (hygrométrie), de façon à limiter l'évaporation et conserver un milieu de culture isotonique (si l'évaporation de l'eau était excessive, les concentrations des constituants seraient modifiées).

2.4. $\text{IC50} = \text{concentration inhibitrice 50 \%} = \text{concentration en extrait de feuille produisant la mort de 50 \% des cellules mises à son contact.}$

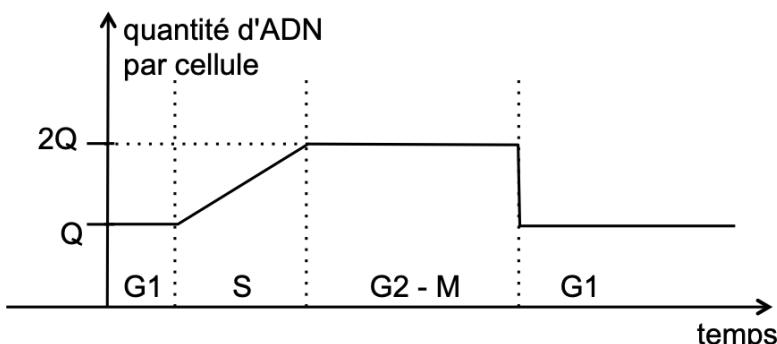
Graphiquement, tracer la droite d'équation $y = 50 \%$, et lire la valeur de x à l'intersection avec la courbe CEM/VLB. Ici $\text{IC50} = 1,00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.5. Le tableau du document 3 indique que l' IC50 de chaque extrait vis-à-vis des lymphocytes normaux est supérieure à $5,00 \cdot 10^3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Les différents extraits d'*Annona glabra* ne sont donc pas toxiques pour ces cellules.

Pour la lignée CEM/VLB, l'extrait le plus toxique correspond à celui dont l' IC50 est le plus faible. Il s'agit de l'extrait de graines, dont l' $\text{IC50} = 0,1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3. Étude de l'induction de l'apoptose

3.1.



Dans le document 4, l'abscisse correspond à l'intensité de fluorescence, qui est proportionnelle à la quantité d'ADN. Les cellules situées dans le pic \odot contiennent une quantité d'ADN équivalente à q (intensité de fluorescence d'environ 2,2 unités arbitraires), ce sont des cellules en phase G1. Les cellules du pic \odot ont une quantité d'ADN comprise entre q et $2q$ (intensité de fluorescence de 2,2 à 4,4 UA), ce sont des cellules en phase S (ou en fin de phase M). Les cellules du pic \odot ont une quantité d'ADN équivalente à $2q$ (intensité de fluorescence d'environ 4,4 UA), ce sont des cellules en phases G2 (ou en début de phase M).

3.2. L'apoptose correspond à la mort cellulaire programmée, elle aboutit à la fragmentation de l'ADN, à la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés, elle ne provoque pas d'inflammation.
La nécrose correspond à une mort accidentelle, la membrane plasmique est lysée, le contenu cytoplasmique est déversé dans le milieu extracellulaire provoquant une inflammation.

3.3. D'après le document 4, le cytogramme en absence d'extrait de graine montre un profil caractéristique de cellules dans différentes phases du cycle cellulaire : nombreuses cellules en phase G1, ainsi que des cellules en phase S et en phase G2 en quantité moins élevée.
Le cytogramme en présence d'extrait de graine à $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ présente les mêmes caractéristiques, mais avec un pic supplémentaire d'intensité de fluorescence plus faible (à environ 0,3 unités arbitraires, inférieure à 2,2 unités arbitraires) : ce sont des fragments de cellules avec de l'ADN en quantité inférieure à q : ce pic correspond à des corps apoptotiques. L'extrait de graine provoque donc l'apoptose des cellules.

3.4. L'apoptose précoce est caractérisée par l'exposition de la phosphatidylsérine dans le feuillet extracellulaire de la membrane plasmique, sans que celle-ci ne soit fragilisée. Ainsi l'annexine V peut se fixer sur la membrane plasmique (sur la phosphatidylsérine), mais l'iodure de propidium ne peut pénétrer dans la cellule et marquer l'ADN.
L'apoptose tardive est caractérisée par la présence de phosphatidylsérine dans le feuillet extracellulaire de la membrane plasmique et par la fragilisation de cette dernière. L'iodure de propidium peut alors pénétrer dans la cellule et marquer l'ADN : les deux marquages annexine V et iodure de propidium sont positifs.
Les cellules du quadrant A ne sont marquées ni par l'annexine V ni par l'iodure de propidium. Ces cellules ne sont donc pas en apoptose (pas d'exposition de la phosphatidylsérine ni d'altération de la membrane plasmique).
Les cellules du quadrant C sont marquées par l'annexine V et par l'iodure de propidium, ces cellules sont donc en apoptose tardive.
Les cellules du quadrant D sont marquées par l'annexine V mais pas par l'iodure de propidium : ces cellules sont en apoptose précoce.

3.5. Les cellules de la lignée CEM/VLB sont des cellules tumorales très résistantes à différents traitements chimiques (phénotype MDR : MultiDrug Resistance). Or les extraits de graines d'*Annona glabra* sont à la fois très toxiques pour ces cellules même à faible dose (par induction de l'apoptose) et sans effet sur les lymphocytes normaux. Les extraits de graines pourraient donc être utilisés dans le traitement de leucémies multirésistantes, en ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses.

Travaux Pratiques de Biotechnologies

U51 : TP de biologie moléculaire et génie génétique

Coefficient 1 – CCF

Compétences évaluables

Compétences terminales Globales	Compétences terminales élémentaires	
C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail	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
C1.2- Préparer ou prétraiiter les échantillons biologiques	C1.2.1.	Préparer les échantillons biologiques
	C1.2.2.	Prétraiiter les échantillons biologiques
	C1.2.3.	Conditionner le matériel biologique
C1.3- Mettre en œuvre des techniques en biochimie et biophysique	Techniques préparatives	
	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
	Techniques analytiques	
	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
C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps	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
C1.6- Mettre en œuvre des techniques en biologie moléculaire et génie génétique	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

C2.1- Organiser son activité de travail	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
C2.2- Préparer les équipements et les matériels	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
C 2.4 Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	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 : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés 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
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	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
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	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	
C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail	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
C1.2- Préparer ou prétraiiter les échantillons biologiques	C1.2.1.	Préparer les échantillons biologiques
	C1.2.2.	Prétraiiter les échantillons biologiques
	C1.2.3.	Conditionner le matériel biologique
C1.3- Mettre en œuvre des techniques en biochimie et biophysique	Techniques préparatives	
	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
	Techniques analytiques	
	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
C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps	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
C.1.8- Mettre en œuvre des techniques en génie enzymatique	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
C2.1- Organiser son activité de travail	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

C2-2- Préparer les équipements et les matériels	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
C 2.4- Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	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 : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés 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
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	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
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	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	
C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail	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
C1.2- Préparer ou prétraiiter les échantillons biologiques	C1.2.1.	Préparer les échantillons biologiques
	C1.2.2.	Prétraiiter les échantillons biologiques
	C1.2.3.	Conditionner le matériel biologique
C1.4- Mettre en œuvre des techniques en microbiologie	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
C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps	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
C1.7- Mettre en œuvre des techniques en génie fermentaire	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 ensemencer 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
C2.1- Organiser son activité de travail	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

C 2.4- Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	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 : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés 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
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	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
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	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	
C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail	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
C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques	C1.2.1.	Préparer les échantillons biologiques
	C1.2.2.	Prétraiter les échantillons biologiques
	C1.2.3.	Conditionner le matériel biologique
C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps	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
C1.9- Mettre en œuvre des techniques de génie cellulaire	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
C2.1- Organiser son activité de travail	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

C 2.4 Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	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 : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés 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
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	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
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	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.