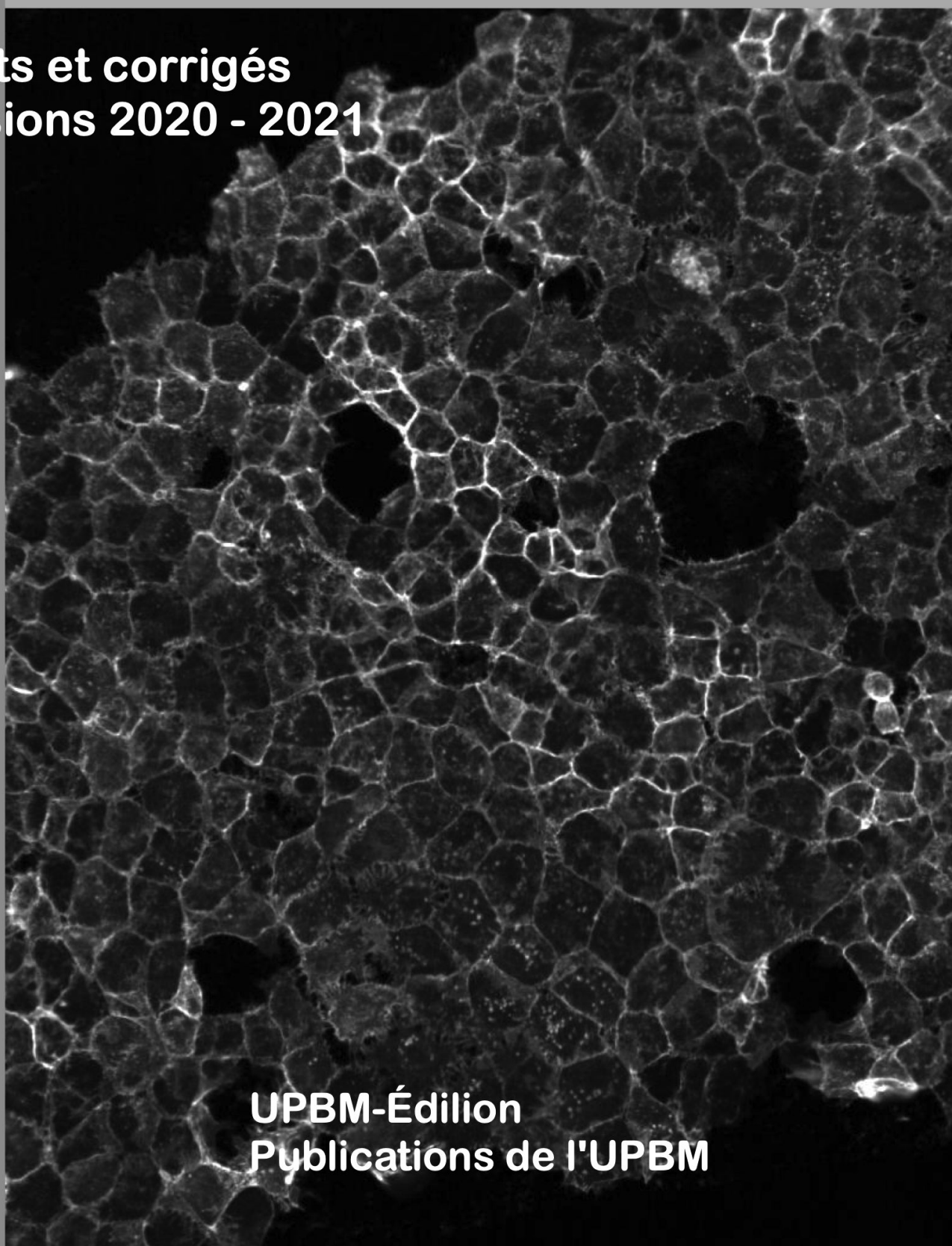


Brevet de technicien supérieur

Biotechnologies

**Sujets et corrigés
Sessions 2020 - 2021**

**UPBM-Édition
Publications de l'UPBM**



Annales du Brevet de Technicien Supérieur

BIOTECHNOLOGIES

2020-2021

Éditions UPBM-ÉDILION

La rédaction des Annales du BTS Biotechnologies Sessions 2020-2021
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 :

Fabien CONCHONNAUD, Isabelle ÉTIENNE, François GUILLOU, Jean-Luis LÉCRIVAIN,
Patrick LEMENICIER, Daniela MASTROFINI, Romain MITRE, Paule RENVOISE.

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 même sorte »

(*Statuts & Règlements de l'Académie française du 22 février 1635, art. XXXIV*).

Illustration de couverture :

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

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

Table des matières

BTS Biotechnologies : Définition de la nature des épreuves	4
Session 2020 : Sujets	5
2020 - U11 : Mathématiques	6
2020 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	11
2020 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique	21
2020 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	27
2020 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	35
2020 - U42 : Biologie cellulaire.....	44
Session 2020 : Éléments de corrigé	50
2020 - U11 : Mathématiques	51
2020 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	55
2020 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	60
2020 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	64
2020 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	68
2020 - U42 : Biologie cellulaire.....	71
Session 2021 : Sujets	75
2021 - U11 : Mathématiques	76
2021 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	81
2021 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	88
2021 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	98
2021 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	106
2021 - U42 : Biologie cellulaire.....	114
Session 2021 : Éléments de corrigé	122
2021 - U11 : Mathématiques	123
2021 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	126
2021 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique.....	130
2021 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	133
2021 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	137
2021 - U42 : Biologie cellulaire.....	140
Travaux Pratiques de Biotechnologies	143
U51 : TP de biologie moléculaire et génie génétique	144
U52 : TP de biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	146
U53 : TP de microbiologie et génie fermentaire	148
U54 : TP de biologie et technologies cellulaires.....	150
Rapport de stage et soutenance	152
U6 : Rapport de stage et soutenance.....	153

BTS Biotechnologies : Définition de la nature des épreuves

TABLEAU DES ÉPREUVES

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

<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 2020 : Sujets

2020 - 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*

EXERCICE 1 (12 points)

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

A. Évolution de la population de poissons au fil des mois dans certains aquariums

Les deux questions suivantes sont des QCM (questionnaire à choix multiples). Dans chaque question, une seule proposition est correcte. Indiquer la bonne proposition. Aucune justification n'est demandée.

1. Dans un aquarium, il y a initialement 10 poissons. On admet que la population de poissons augmente de 30 % chaque mois. Quel est le nombre de poissons au bout de 5 mois ? Le résultat a été arrondi à l'unité.
 a. 12 b. 50 c. 160 d. 37
2. Dans un aquarium, au temps $t = 0$, on compte 10 poissons. On modélise le nombre de poissons présents dans l'aquarium par une fonction g . On admet que la fonction g est la solution de l'équation différentielle $y' + 0,3y = 0$ vérifiant la condition initiale $g(0) = 10$. Alors g est définie par
 a. $g(t) = 10e^{0,3t}$ b. $g(t) = 10e^{-0,3t}$ c. $g(t) = 10 + e^{0,3t}$ d. $g(t) = 10 + e^{-0,3t}$

B. Étude statistique

On cherche à évaluer l'effet d'un pesticide que l'on peut trouver dans les rivières, sur la diminution de la fertilité d'une population de poissons. Pour cela un laboratoire va disposer huit aquariums, contenant chacun dix poissons de la même espèce et de l'eau avec différentes quantités de ce pesticide. Au bout d'un mois on relève le nombre total d'œufs pondus par les poissons des différents aquariums et on obtient les résultats suivants :

Numéro de l'aquarium	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration en pesticide (en mg/L) (x_i)	0	1	4	5	6	7	8	10
Nombre d'œufs pondus dans le mois (N_i)	249	248	246	230	130	50	40	35

Un ajustement affine ne semblant pas approprié, on effectue le changement de variable

$$y = -\ln\left(\frac{250}{N} - 1\right)$$

1. Compléter le tableau en annexe à rendre avec la copie. On arrondira les résultats à 10^{-3} .

2. À l'aide de la calculatrice, déterminer le coefficient de corrélation linéaire de la série statistique $(x_i; y_i)$. Arrondir à 10^{-3} . Interpréter le résultat.
3. À l'aide de la calculatrice, déterminer une équation de la droite d'ajustement de la série statistique $(x_i; y_i)$ par la méthode des moindres carrés sous la forme $y = ax + b$. On arrondira a et b à 10^{-3} .
4. On note $N(x)$ la fonction modélisant le nombre d'œufs pondus dans un aquarium en un mois, en fonction de la concentration x en pesticide (en mg/L).
 - a. En s'aidant du changement de variables $y = -\ln\left(\frac{250}{N} - 1\right)$, vérifier que $N(x)$ est solution de l'équation $\frac{250}{N(x)} - 1 = e^{0,857x-5,905}$
 - b. En déduire que l'expression de la fonction N est :

$$N(x) = \frac{250}{1 + e^{0,857x-5,905}}$$

C. Étude de la fonction

On considère la fonction f définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par :

$$f(x) = \frac{250}{1 + 0,003e^{0,9x}}$$

1. Calculer $\lim_{x \rightarrow +\infty} f(x)$
2. a. Vérifier que, pour tout x appartenant à $[0; +\infty[$, $f'(x) = \frac{-0,675e^{0,9x}}{(1+0,003e^{0,9x})^2}$
 b. Étudier le signe de $f'(x)$ et donner le sens de la variation de f sur l'intervalle $[0; +\infty[$.
3. Tracer dans le repère fourni en **annexe** la courbe représentative de la fonction f .

Pour la suite, on admet que la fonction f modélise le nombre d'œufs pondus par mois dans un aquarium, en fonction de la concentration x en pesticide (en mg/l) sur l'intervalle $[0; 50]$.

4. La concentration efficace médiane notée CE50 est la concentration qui correspond à une diminution de 50 % du nombre d'œufs pondus par mois par rapport à une eau sans pesticide.
Déterminer cette concentration CE50 à 10^{-1} près. Expliquer votre démarche.
5. Une primitive F de f est calculée par le logiciel de calcul formel :

$$F(x) = -\frac{2500}{9} \ln(e^{-0,9x} + 0,003)$$

Estimer, à l'unité près, le nombre moyen d'œufs pondus par mois, pour des concentrations en pesticide comprises entre 4 et 6 mg/l.

On rappelle que la valeur moyenne d'une fonction f sur un intervalle $[a; b]$ est :

$$\frac{1}{b-a} \int_a^b f(x) dx$$

EXERCICE 2 (8 points)

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

A. Étude du taux d'hémoglobine chez la femme en France

L'anémie se définit par un taux d'hémoglobine dans le sang inférieur aux valeurs normales.

Une femme est en anémie lorsque son taux d'hémoglobine est inférieur ou égal à 12 g/dl.

Une femme est en polyglobulie si son taux d'hémoglobine est supérieur ou égal à 16 g/dl.

Soit T la variable aléatoire qui, à chaque femme de la population française, associe son taux d'hémoglobine en grammes par décilitre (g/dl). On admet que T suit la loi normale d'espérance $\mu = 14$ et d'écart type $\sigma = 1,15$.

1. Déterminer la probabilité qu'une femme choisie au hasard dans la population française soit en anémie. On arrondira le résultat à 10^{-3} .
2. En déduire, sans utiliser la calculatrice, la probabilité qu'une femme choisie au hasard dans la population française soit en polyglobulie. Expliquer votre démarche. On pourra s'aider d'un schéma.

B. Prévisions d'erreurs d'analyses

Un laboratoire procède à 300 analyses de taux d'hémoglobine chaque mois.

On suppose que la probabilité qu'une analyse soit erronée est 0,005.

On note X la variable aléatoire qui, à tout échantillon de 300 analyses, associe le nombre d'analyses erronées de cet échantillon. On suppose que la constitution d'un tel échantillon peut être assimilée à un tirage avec remise de 300 analyses.

1. Quelle loi suit la variable aléatoire X ? En préciser les paramètres.
2. Un tableur fournit les résultats suivants :

	A	B
1	k	$P(X=k)$
2	0	0,2222922
3	1	0,335113869
4	2	0,251756399
5	3	0,125667348
6	4	0,046888445
7	5	0,013948723
8	6	0,003446293
9	7	0,000727358
10	8	0,000133867
11	9	2,18253E-05

En utilisant cet extrait, déterminer en arrondissant les valeurs demandées à 10^{-2} :

- a. La probabilité qu'aucune des 300 analyses de l'échantillon ne soit erronée.
- b. $P(2 \leq X \leq 4)$. Interpréter le résultat dans le contexte de l'exercice.

C. Délai des résultats des analyses du taux d'hémoglobine

Un laboratoire qui pratique des analyses affirme que le délai moyen pour fournir les résultats d'une analyse du taux d'hémoglobine est de 60 minutes.

On souhaite tester cette hypothèse à l'aide d'un test bilatéral au seuil de confiance de 95 %.

On note m le délai moyen pour fournir le résultat d'une analyse et on définit les hypothèses nulle et alternative suivantes :

$$H_0 : m = 60 \text{ et } H_1 : m \neq 60$$

Soit $\bar{Y}$ la variable aléatoire qui à tout échantillon de 100 analyses associe le délai moyen pour fournir les résultats de ces analyses.

On admet que $\bar{Y}$ suit la loi normale d'espérance m et d'écart type 1,5.

Donc sous l'hypothèse « H_0 est vraie », $\bar{Y}$ suit la loi normale d'espérance 60 et d'écart type 1,5.

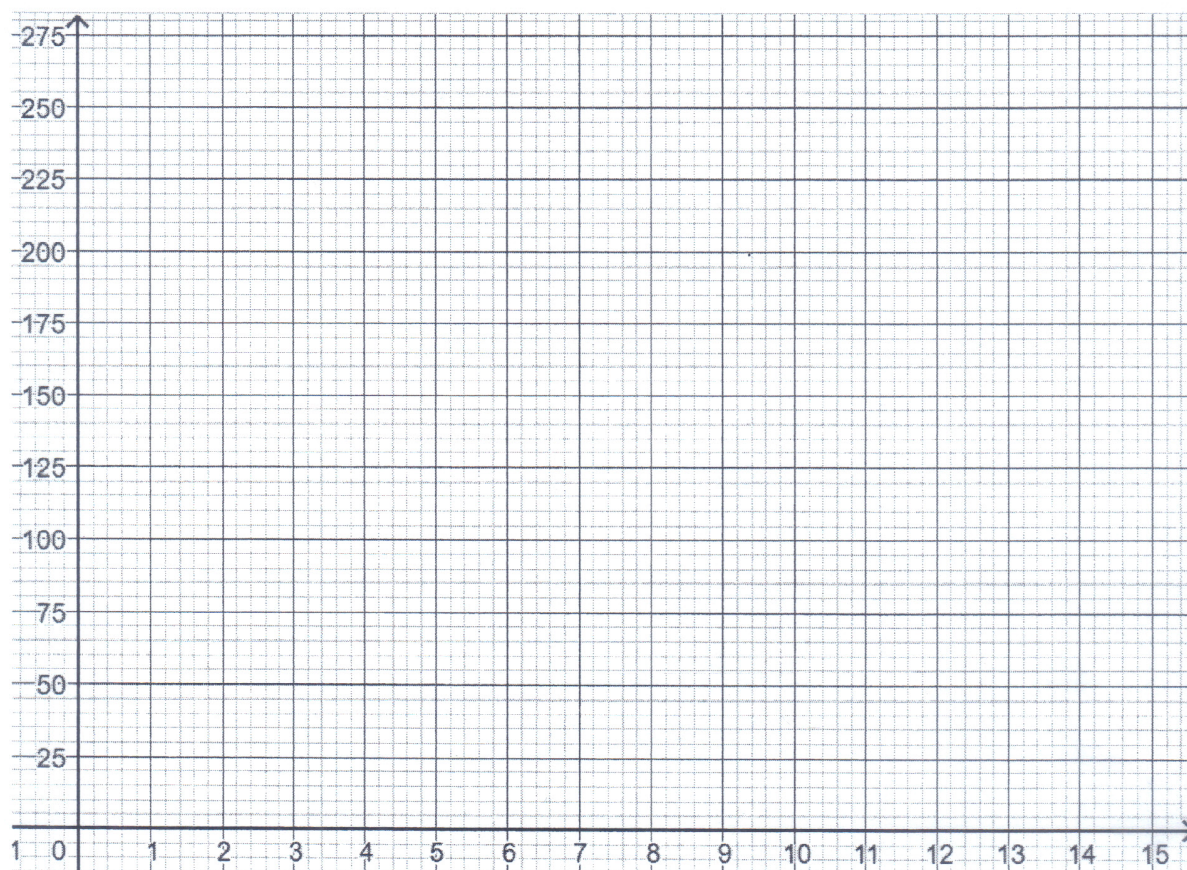
1. Déterminer l'arrondi au centième du nombre réel h vérifiant $P(60 - h \leq \bar{Y} \leq 60 + h) = 0,95$.
2. Énoncer la règle de décision du test.
3. On prélève un échantillon de 100 analyses et on trouve un délai moyen pour fournir les résultats de $\bar{Y} = 62,5$ minutes. Que peut-on en conclure ?

ANNEXE

Exercice 1 - Partie B - Question 1

Concentration en pesticide (en mg/L) (x_i)	0	1	4	5	6	7	8	10
Nombre d'œufs pondus dans le mois (N_i)	249	248	246	230	130	50	40	35
$y = -\ln\left(\frac{250}{N_i} - 1\right)$	5,52				0,08			

Exercice 1 - Partie C - Question 3



2020 - U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : L'usage de la calculatrice avec mode examen actif ou de la calculatrice sans mémoire, « type collège » est autorisé

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.

La cristallographie des protéines (et plus généralement la bio-cristallographie) est devenue un outil incontournable de la détermination des structures en trois dimensions (3D) des protéines (et des autres macromolécules biologiques). Elle se pratique couramment dans des centres de rayonnement synchrotron comme SOLEIL situé en région parisienne.

Ces centres de recherche (environ une cinquantaine dans le monde) produisent et utilisent la lumière émise par des électrons de grande énergie. Cette lumière, appelée rayonnement synchrotron, couvre un large spectre continu allant du début du domaine de l'infrarouge à la fin du domaine des rayons X.

La cristallographie des protéines nécessite la sélection d'une longueur d'onde adaptée et utilise le phénomène de diffraction.

Le sujet comprend trois parties portant sur :

- l'étude du phénomène de diffraction et des réseaux d'un monochromateur ;
- le dosage pH-métrique, et le dosage conductimétrique d'un acide α -aminé ;
- la chimie des acides α -aminés.

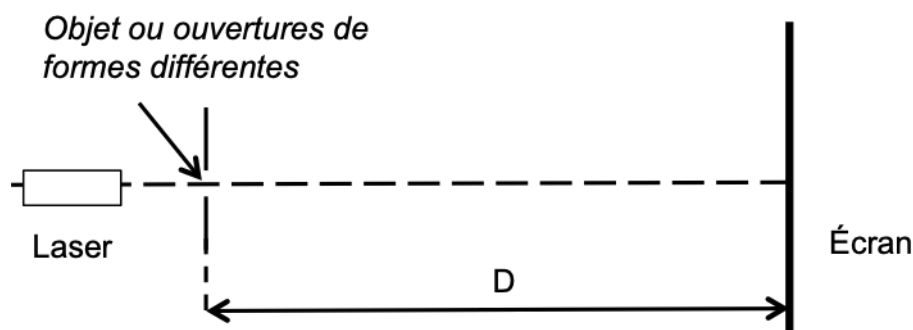
I. DIFFRACTION ET SÉLECTION D'UNE LONGUEUR D'ONDE (14 points)

Les deux parties sont indépendantes.

1. Du phénomène de diffraction à la structure d'une protéine

1.1. Diffraction à travers une fente

En salle de travaux pratiques, on réalise une expérience de diffraction à travers une fente à l'aide du dispositif expérimental schématisé ci-dessous :



La relation donnant la largeur d de la tache centrale de diffraction à travers une fente de largeur a est :

$$d = \frac{2\lambda \cdot D}{a}$$

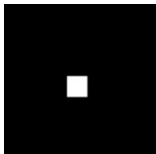
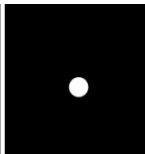
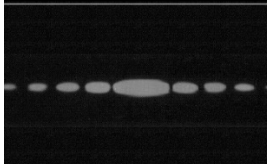
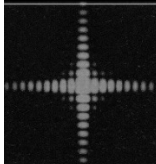
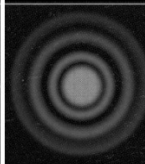
Lors de cette expérience, on utilise un laser émettant une radiation de longueur d'onde $\lambda = 635 \text{ nm}$ et une fente de largeur a inconnue. L'écran est placé à une distance $D = 1,0 \text{ m}$ de la fente.

1.1.1. La largeur d de la tache centrale de diffraction est de $2,1 \text{ cm}$.

Déterminer la valeur de la largeur a de la fente utilisée pour réaliser l'expérience. $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$

1.1.2. Indiquer comment évolue la largeur d de la tache de diffraction lorsque la largeur a de la fente augmente. Justifier la réponse.

1.2. Le même dispositif expérimental est utilisé pour observer les figures de diffraction obtenues avec différents objets. Le document suivant montre les figures obtenues :

Forme de l'objet éclairé par un rayonnement laser			
Figure de diffraction observée			

Source : d'après Mallette pédagogique « Optique » synchrotron SOLEIL
<https://www.synchrotron-soleil.fr>

Ces figures de diffraction dépendent d'au moins deux caractéristiques de l'objet interposé sur le trajet de la lumière.

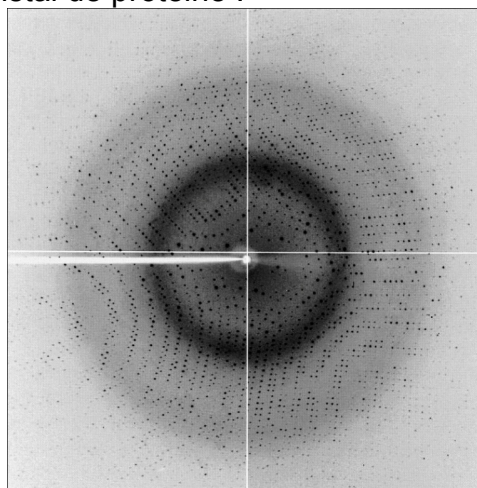
Citer ces deux caractéristiques en vous aidant de la question 1.1.2. et du document ci-dessus.

1.3. Application à la cristallographie des protéines

Document 1 :

Afin d'obtenir des figures de diffraction exploitables et pouvoir déterminer la structure 3D d'une protéine, une molécule unique n'est pas suffisante, on doit disposer d'un cristal de protéines de bonne qualité, d'où le nom de « cristallographie des protéines ». Dans ces cristaux, les protéines sont empilées de façon identique dans les trois directions de l'espace. Leur obtention peut parfois demander plusieurs mois.

Figure de diffraction d'un cristal de protéine :



Source : d'après synchrotron SOLEIL <https://www.synchrotron-soleil.fr>

Document 2 :

Pour que le phénomène de diffraction de la lumière par un objet soit correctement observable, la longueur d'onde de la lumière utilisée doit être du même ordre de grandeur que les dimensions de l'objet ou des détails de l'objet étudié.

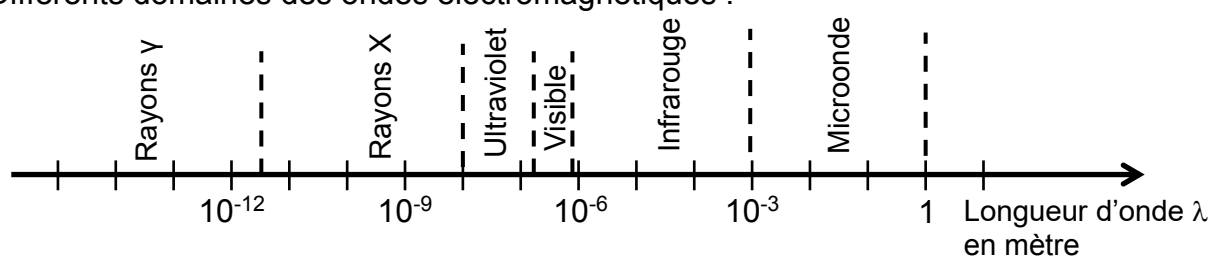
Ordres de grandeur des dimensions de quelques « objets de la chimie et de la biochimie » :

- diamètre d'un atome : 10^{-10} m ;
- dimension d'une protéine en général de 10^{-9} m à 10^{-10} m.

Les clichés de diffraction des cristaux de protéine doivent permettre d'obtenir les distances entre les atomes afin de remonter aux différents acides aminés et à leur enchaînement dans la protéine.

Document 3 :

Différents domaines des ondes électromagnétiques :



Justifier, à partir des documents 1, 2, 3, l'utilisation des rayons X pour obtenir des clichés de diffraction exploitables et ainsi pouvoir remonter à la structure des protéines.

2. Comment sélectionner une longueur d'onde ?

L'élément dispersif du monochromateur servant à sélectionner des rayons X pour la cristallographie des protéines est compliqué à modéliser. Pour simplifier, cette partie portera sur l'étude du réseau d'un monochromateur travaillant dans le domaine des rayons ultraviolets.

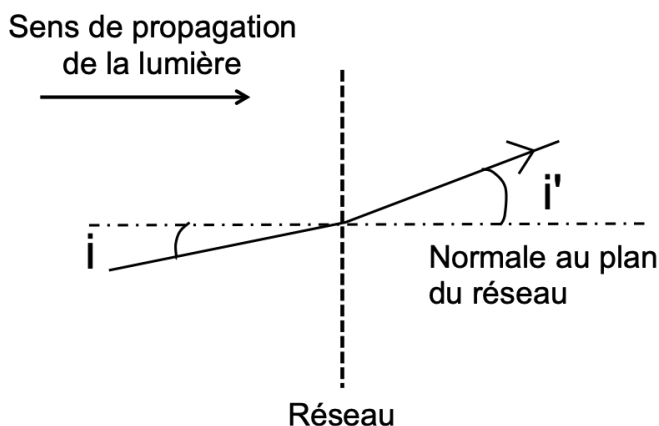
En fonction des besoins, le monochromateur étudié peut utiliser plusieurs réseaux différents :

- réseau 1 : 400 traits par millimètre ;
- réseau 2 : 2 400 traits par millimètre ;
- réseau 3 : 4 500 traits par millimètre.

Données :

Dans le domaine des rayons ultraviolets on utilise des réseaux par réflexion, mais par souci de simplification, le raisonnement se fera ici avec des réseaux par transmission.

- formule des réseaux par transmission : $\sin i' - \sin i = k \cdot n \cdot \lambda$;
- k : ordre de diffraction ;
- n : nombre de traits par mètre ;
- λ : longueur d'onde en mètre.



- énergie d'un photon : $E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$
- constante de Planck : $h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$;
- célérité de la lumière dans le vide $c = 3,00 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$;
- électron-volt : $1 \text{ eV} = 1,60 \times 10^{-19} \text{ J}$

On se placera en incidence normale ($i = 0^\circ$).

Le réglage de la source de lumière permet l'émission de photons d'énergie comprise entre $E_1 = 13,5 \text{ eV}$ et $E_2 = 14,5 \text{ eV}$.

- 2.1. Montrer que les longueurs d'onde correspondantes à ces énergies sont comprises entre $\lambda_1 = 92,1 \text{ nm}$ et $\lambda_2 = 85,7 \text{ nm}$.
- 2.2. Le réseau utilisé comporte 2 400 traits par millimètre (réseau 2).
Pour l'ordre $k = 1$, déterminer les angles d'émergence, en degré, pour chacune des deux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 .
- 2.3. En déduire que l'écart angulaire correspondant est de $0,9^\circ$.
- 2.4. En utilisant le réseau 3 on obtient un écart angulaire de $1,8^\circ$. Donner l'intérêt d'utiliser le réseau 3 plutôt que le réseau 2 dans le monochromateur.
- 2.5. Pour sélectionner une longueur d'onde dans le domaine des rayons X de haute énergie, il faudrait utiliser des réseaux dont le nombre de traits par millimètre est beaucoup plus grand.
Justifier cette affirmation.

Un tel réseau est techniquement irréalisable, ceci explique que l'élément dispersif du monochromateur n'est pas un réseau pour ce domaine de longueur d'onde, mais un cristal de silicium.

II. LA GLYCINE (18 points)

Les trois parties sont indépendantes.

La glycine est un acide α -aminé qui est produit naturellement par l'organisme, et qui intervient dans la formation de protéines.

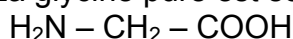
1. Étude de la molécule de glycine

Données :

Les numéros atomiques de différents atomes sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Atome	H	C	N	O
Numéro atomique	1	6	7	8

La glycine pure est sous la forme d'un solide blanc de formule semi-développée :



- 1.1. Représenter la formule de Lewis de cette molécule.
- 1.2. En utilisant la méthode VSEPR (ou règle de Gillespie), donner la géométrie autour de l'atome d'azote.
- 1.3. En solution aqueuse la glycine se trouve sous la forme de zwitterion (ou amphion) noté $\text{AH}^{+-}_{(\text{aq})}$. Représenter la formule semi-développée de ce zwitterion.

2. La glycine en solution aqueuse

Dans cette partie, le zwitterion sera toujours noté $\text{AH}^{+-}_{(\text{aq})}$.

Données :

Toutes les valeurs des grandeurs ci-dessous sont données à 25 °C.

Deux couples acide / base sont associés à la glycine dont les pK_A sont :

- couple $\text{AH}^+_{2(\text{aq})} / \text{AH}^{+-}_{(\text{aq})}$: $\text{pK}_{\text{A1}} = 2,3$;
- couple $\text{AH}^{+-}_{(\text{aq})} / \text{A}^-_{(\text{aq})}$: $\text{pK}_{\text{A2}} = 9,6$;
- constante d'autoprotolyse de l'eau ou produit ionique de l'eau : $K_\text{e} = 1,00 \times 10^{-14}$.

- 2.1. Représenter sur un axe de pH les domaines de prédominance des différentes formes acido-basiques de la glycine.
- 2.2. Montrer par un calcul que le pH d'une solution aqueuse de glycine est égal à 6,0.

3. Dosage de la forme acide de la glycine $\text{AH}^+_{2(\text{aq})}$

On réalise le dosage d'une solution aqueuse contenant la forme acide de la glycine $\text{AH}^+_{2(\text{aq})}$ par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (ou soude) ($\text{Na}^+_{(\text{aq})} + \text{HO}^-_{(\text{aq})}$).

Pour cela, on prélève un volume $V_\text{A} = 10,0 \text{ mL}$ de la solution aqueuse contenant la forme acide de la glycine $\text{AH}^+_{2(\text{aq})}$ et on y ajoute un volume conséquent d'eau distillée pour faciliter le titrage.

Le titrage est réalisé avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (ou soude) de concentration molaire $C_\text{B} = 1,00 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et est suivi par pH-métrie et par conductimétrie.

Les courbes de titrage sont fournies en **ANNEXE 1 à rendre avec la copie**.

3.1. On s'intéresse à la première équivalence.

3.1.1. Écrire l'équation de la réaction support du dosage pour cette première équivalence.

3.1.2. Exprimer la constante K de cette réaction, puis donner sa valeur.

3.1.3. En déduire que cette réaction peut effectivement être utilisée pour un dosage. Justifier.

3.1.4. En utilisant l'une ou l'autre des courbes en **ANNEXE 1 à rendre avec la copie**, déterminer la concentration de la solution en $\text{AH}_2^+(\text{aq})$. Expliquer la démarche utilisée.

3.1.5. Indiquer l'espèce chimique majoritaire à la première équivalence. Justifier.

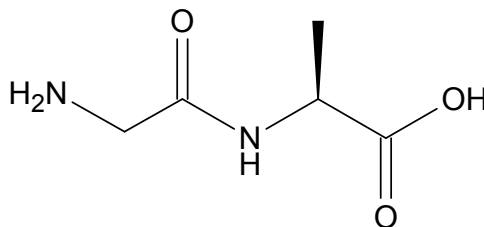
3.2. Entre le graphe représentant le pH en fonction de V_B et celui donnant la conductance G en fonction de V_B en **ANNEXE 1 à rendre avec la copie**, indiquer le graphe qu'il est préférable de choisir pour déterminer la seconde équivalence. Justifier brièvement.

III. LA CHIMIE ORGANIQUE AUTOUR DES ACIDES α -AMINÉS (18 points)

La première synthèse d'une hormone a été réussie en 1953. C'est celle de l'ocytocine, un peptide composé de neuf acides aminés. Elle agit principalement sur les muscles lisses de l'utérus et des glandes mammaires et joue un rôle dans le déclenchement de l'accouchement.

Dans cette partie seulement deux acides α -aminés seront associés.

On souhaite former le dipeptide suivant à partir de la glycine et de l'alanine :



On étudiera la synthèse de la glycine, la molécule d'alanine, et la formation de la liaison peptidique entre la glycine et l'alanine.

Les trois parties sont indépendantes.

1. Synthèse de la glycine

La glycine a pour formule semi-développée : $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$

L'une des voies de synthèse de la glycine fait intervenir la réaction entre l'ammoniac NH_3 et l'acide chloroéthanoïque $\text{CH}_2\text{Cl} - \text{COOH}$.

1.1. Sur l'**ANNEXE 2 à rendre avec la copie**, compléter le mécanisme de la réaction en indiquant par des flèches courbes les déplacements des doublets d'électrons.

1.2. Écrire l'équation de cette réaction.

1.3. Préciser s'il s'agit-il d'une réaction d'addition, de substitution nucléophile, de substitution électrophile, d'élimination, d'oxydation ou de réduction.

2. La molécule d'alanine

Données :

Les numéros atomiques de différents atomes sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Atome	H	C	N	O
Numéro atomique	1	6	7	8

L'alanine a pour formule $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{COOH}$

2.1.

2.1.1. Indiquer le nombre de stéréoisomères que possède cette molécule. Justifier.

2.1.2. Ces stéréoisomères sont des énantiomères. Justifier.

2.2. Donner la représentation de Fischer de la molécule de (L) - alanine. Expliquer brièvement cette représentation.

2.3. La molécule de (L) - alanine est de configuration S. Donner sa représentation de Cram. Expliquer brièvement les règles utilisées pour déterminer cette configuration.

2.4. Interprétation du spectre RMN de la molécule de (L) - alanine.

Le spectre RMN de la molécule de (L) - alanine est donné en **ANNEXE 4** et la table des déplacements chimiques en **ANNEXE 5**.

Les spectres RMN des acides α -aminés sont réalisés en présence d'une petite quantité d'eau lourde D_2O pour supprimer les signaux relatifs aux noyaux d'hydrogène des groupes $-\text{NH}_2$ et $-\text{COOH}$ (D représente l'isotope de l'hydrogène ^2_1H qui n'est pas actif en RMN).

Tout se passe comme si ces atomes d'hydrogène n'étaient pas présents et l'interprétation du spectre s'en trouve simplifiée.

Attribuer les deux groupes de signaux observés sur le spectre RMN de la molécule de L - Alanine, aux différents noyaux d'hydrogène de la molécule. Expliquer la multiplicité des signaux.

3. Formation de la liaison peptidique entre la glycine et l'alanine

3.1. Sur l'**ANNEXE 3 à rendre avec la copie**, entourer la liaison peptidique.

3.2. Écrire en utilisant les formules semi-développées, l'équation de la réaction qui conduit à la formation de ce dipeptide à partir de la glycine et de l'alanine.

3.3. Le produit de la réaction n'est malheureusement pas unique si on mélange sans précautions particulières les deux acides α -aminés. Trois autres dipeptides peuvent également être formés.

Donner la formule semi-développée de l'un d'entre eux.

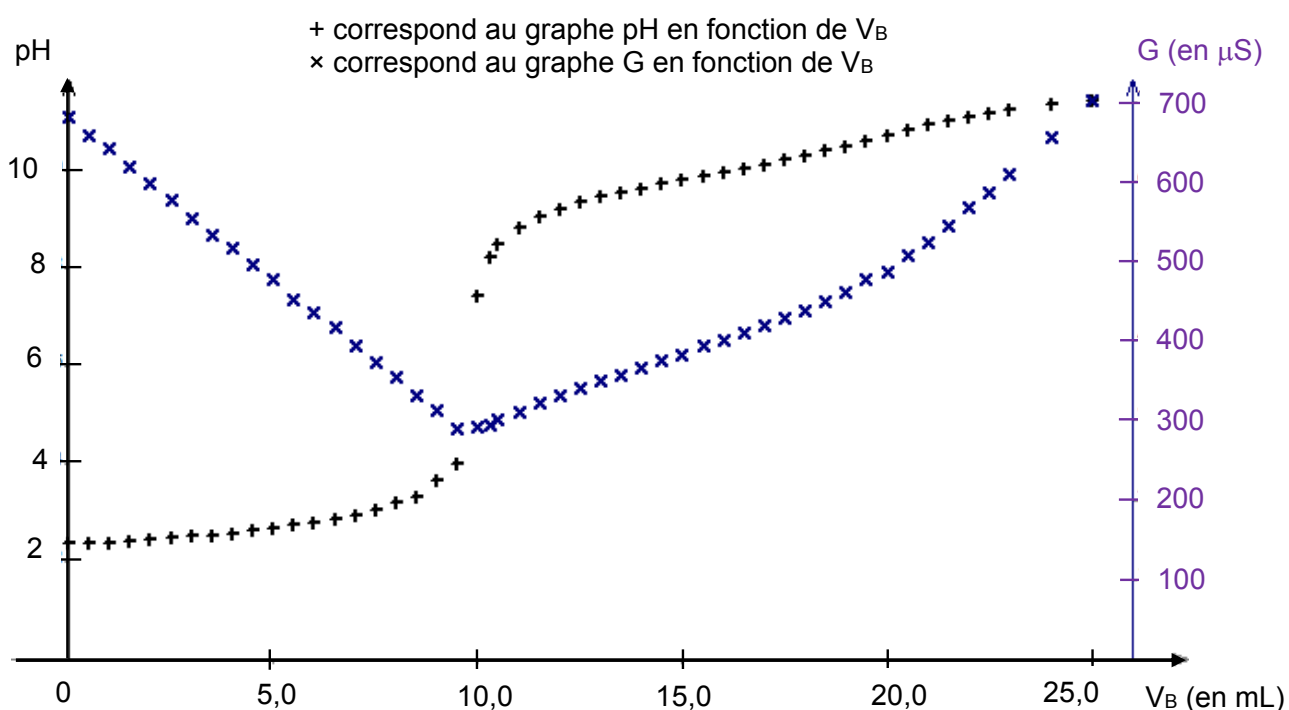
3.4. Pour être certain de n'avoir que le produit souhaité, il faut protéger (bloquer) l'une des fonctions sur chacun des acides α -aminés puis les débloquent (libérer) lorsque la réaction souhaitée est réalisée. Seule sera étudiée la protection du groupe carboxyle de l'alanine en utilisant une réaction qui fait intervenir ce groupement carboxyle. On fait donc réagir l'alanine avec l'alcool benzylique de formule $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{OH}$.

3.4.1. Écrire l'équation de cette réaction.

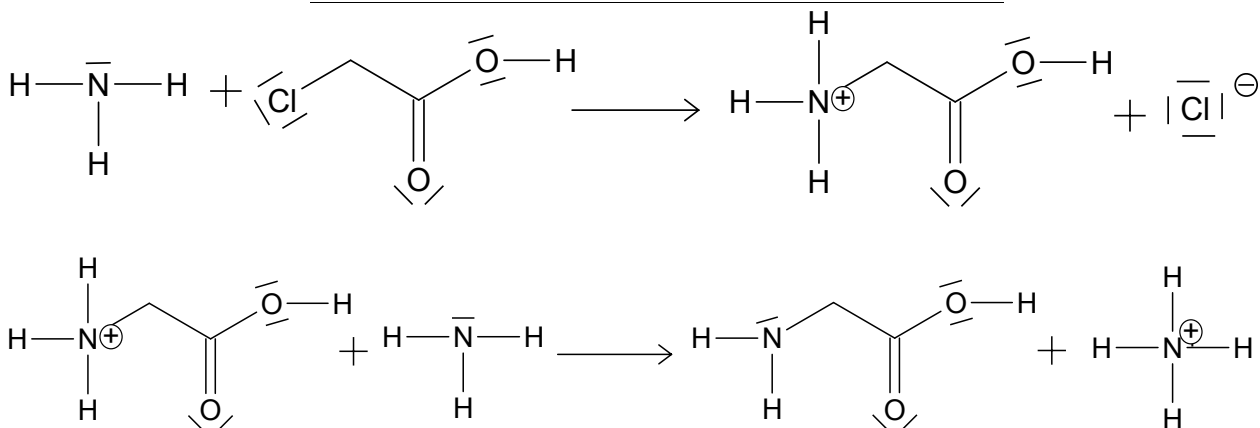
- 3.4.2. Donner le nom de cette réaction.
- 3.4.3. Citer deux des caractéristiques de cette réaction.
- 3.4.4. Donner le nom de la fonction à bloquer sur la glycine pour être certain d'obtenir le dipeptide souhaité.

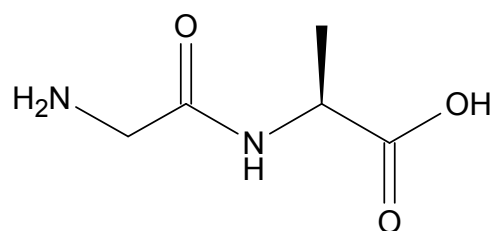
ANNEXE 1 À RENDRE AVEC LA COPIE

Courbes expérimentales de titrage pH-métrique et conductimétrique de la forme acide de la glycine $\text{AH}_2^+(\text{aq})$ par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (ou soude) de concentration molaire $C_B = 1,00 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

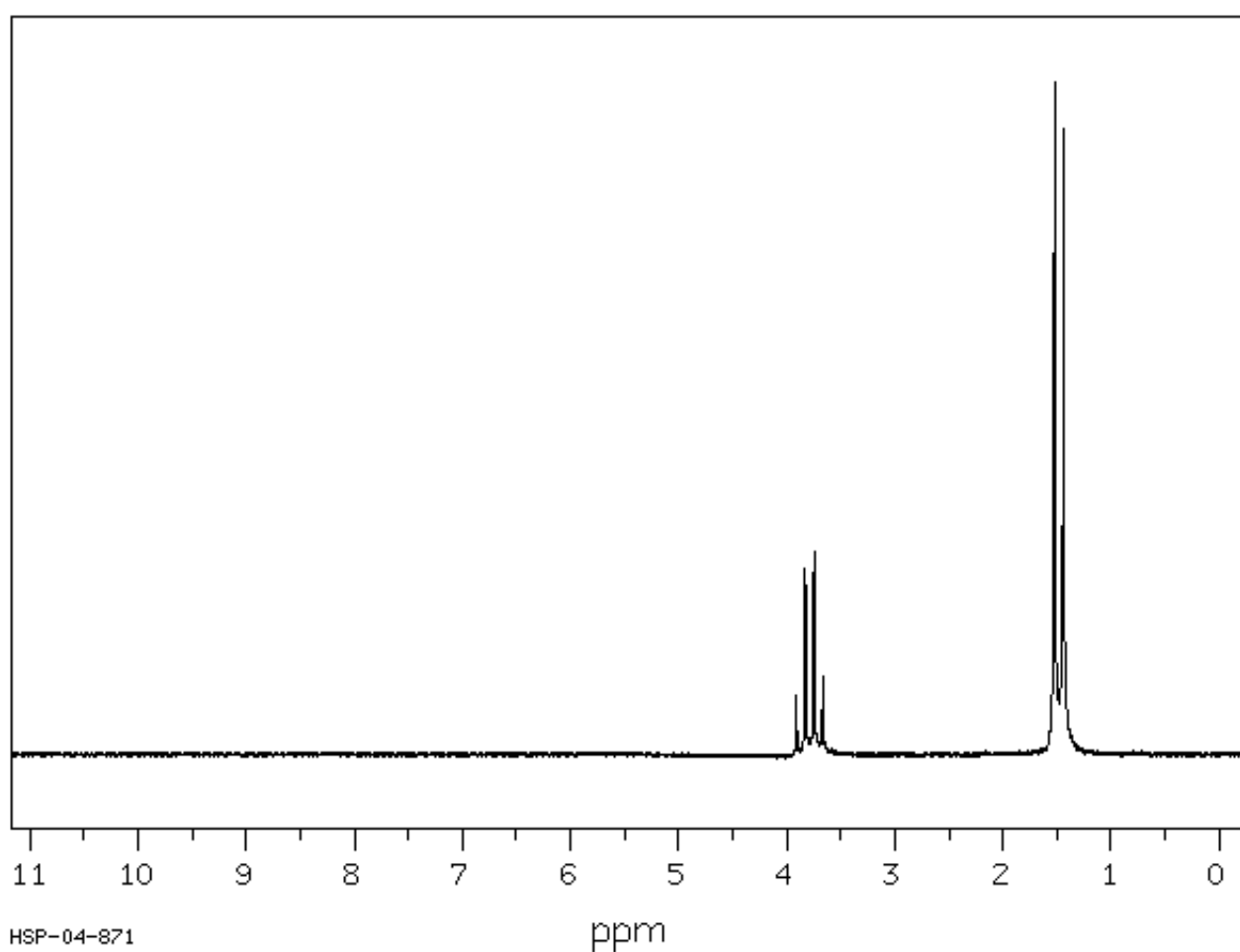


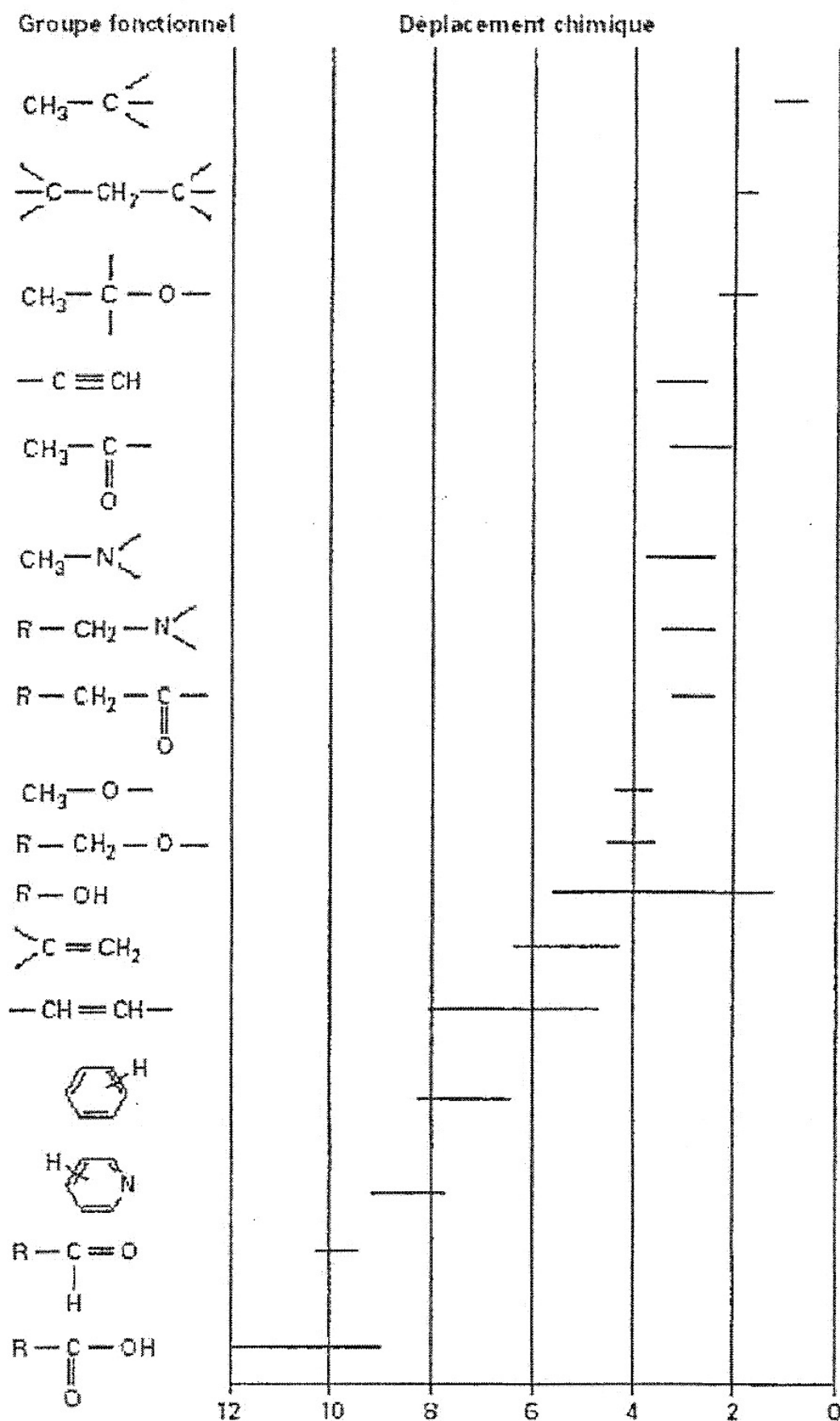
ANNEXE 2 À RENDRE AVEC LA COPIE



ANNEXE 3 À RENDRE AVEC LA COPIE**ANNEXE 4**

Le spectre RMN de la molécule de (L)-alanine est donné ci-dessous.



ANNEXE 5**Table des déplacements chimiques dans le TMS en RMN ^1H** 

2020 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Durée 2 h – coefficient 1

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

Étude des mécanismes de résistance d'une bactérie entomopathogène aux peptides antimicrobiens de son hôte

Dans le but de limiter l'utilisation de pesticides dans les cultures, les nématodes (vers microscopiques) s'avèrent être des outils de lutte biologique efficaces contre certains insectes nuisibles, par leur capacité à libérer dans l'hémolymphe (plasma de l'insecte) des bactéries entomopathogènes telles que *Photorhabdus luminescens*. Or, en réponse à l'infection, certains insectes produisent des peptides antimicrobiens (PAMs) actifs sur ces bactéries.

L'espèce *Photorhabdus luminescens* (*P. luminescens*) a développé des stratégies qui lui permettent de résister à ces peptides antimicrobiens (PAMs), dont la pompe à efflux MdtABC, pour « Multidrug Transporter ABC », codée par l'opéron *mdtABC*.

1. Caractérisation de l'opéron *mdtABC* de *P. luminescens* (3,5 points)

L'analyse informatique des séquences génomiques de *P. luminescens* permettant la caractérisation du locus *mdtABC* est présentée dans le **document 1**. Chez *E. coli*, le locus *mdtABC* correspond à un opéron codant les protéines constitutives de la pompe à efflux MdtABC.

- 1.1. Expliquer la démarche suivie par les chercheurs pour caractériser le locus *mdtABC* chez *P. luminescens*. Indiquer des logiciels de bioinformatique utilisables dans ce cadre.
- 1.2. Expliquer l'expression « open reading frame ».
- 1.3. Préciser l'intérêt de déterminer l'E-value lors d'un alignement de séquences.
- 1.4. Argumenter le rôle attribué aux protéines codées par le locus *mdtABC* chez *P. luminescens*.
- 1.5. Proposer une définition pour le terme « opéron ».

2. Production d'une souche de *P. luminescens* mutée sur *mdtA* (10 points)

Pour caractériser l'implication de la pompe à efflux *mdtABC* dans la résistance aux PAMs, les chercheurs ont réalisé la construction d'un mutant stable de *P. luminescens* : *P. luminescens* Δ *mdtA*.

Ce mutant a été obtenu par échange allélique mettant en jeu une recombinaison homologue. Les étapes de la construction du vecteur utilisé pour cet échange sont présentées dans le **document 2**.

L'expérimentation débute par l'extraction de l'ADN génomique de *P. luminescens* par la méthode au phénol chloroforme en présence de RNases.

- 2.1. Indiquer le rôle des trois composés soulignés ci-dessus, utilisés pour l'extraction de l'ADN génomique de *P. luminescens*.
- 2.2. Schématiser les deux amplicons produits à l'issue de l'étape 1, *mdtA5'* et *mdtA3'*, en indiquant pour chacun les différents sites de restriction mis en jeu.

2.3. Schématiser la cassette *mdtA5'-ΩCm-mdtA3'* obtenue à l'issue de l'étape 2 en indiquant sa taille approximative et les sites de restriction.

2.4. Identifier les enzymes de restriction utilisées pour intégrer la cassette *mdtA5'-ΩCm-mdtA3'* dans le plasmide pJQ200SK.

Le vecteur recombiné, nommé pJQ-mdtA-ΩCm, est utilisé pour transformer une souche d'*E.coli*.

2.5. Nommer une technique de transformation bactérienne et en exposer le principe.

Le vecteur pJQ-mdtA-ΩCm est ensuite transféré de la souche d'*E. coli* à une souche de *P. luminescens* par conjugaison.

Un échange allélique par recombinaison homologue peut alors avoir lieu entre la séquence du gène *mdtA* présente dans le génome de *P. luminescens* et les séquences *mdtA5'* et *mdtA3'* du vecteur pJQ-mdtA-ΩCm.

2.6. Schématiser la recombinaison homologue et son résultat.

Justifier le terme « $\Delta mdtA$ » utilisé pour nommer le mutant obtenu.

2.7. Indiquer la conséquence de la recombinaison sur le phénotype de la souche *P. luminescens* $\Delta mdtA$.

En déduire le composé à ajouter au milieu de culture en vue de sélectionner ces colonies.

Afin de vérifier que les colonies d'intérêt sont bien porteuses de la mutation attendue, les chercheurs quantifient l'expression de *mdtA* chez ces dernières par RT-qPCR après extraction des ARN totaux.

2.8. Citer une technique qui permet de vérifier la qualité d'extraits d'ARN totaux et une technique qui permet de vérifier la concentration des extraits à utiliser pour la transcription inverse.

L'étape de transcription inverse utilise des amorces de type « random hexamers ».

2.9. Expliquer le rôle de ces amorces.

Suite à la transcription inverse, les ADNc simple brin sont amplifiés par PCR en présence de Sybr[®]Green et d'amorces spécifiques. L'amplification est suivie en temps réel dans un thermocycleur comportant un module fluorimétrique.

2.10. Préciser comment la spécificité de l'amplification peut être vérifiée en PCR quantitative utilisant du Sybr[®]Green.

2.11. Représenter sur un même graphique l'allure des courbes attendues pour les souches de *P. luminescens* sauvage et mutante $\Delta mdtA$ (gène *mdtA* non transcrit). Positionner le cycle seuil (Ct) pour chaque courbe.

3. Étude de l'expression de l'opéron *mdtABC* et de son rôle dans la pathogénicité de *P. luminescens* (4,5 points)

Afin de déterminer les conditions d'expression de l'opéron *mdtABC*, la séquence codant la GFP (*green fluorescent protein*) a été placée soit sous le contrôle du promoteur de l'opéron *mdtABC* (*p_{mdtA}-gfp*), soit sous le contrôle d'un promoteur lac constitutif (*p_{lac}-gfp*) dans deux souches de *P. luminescens*.

Ces deux souches sont ensuite utilisées pour étudier l'activité du promoteur *mdtA* :

- *in vivo* par l'infection de larves du criquet migrateur *Locusta migratoria* par *P. luminescens*
- *in vitro* par l'ajout d'extraits tissulaires d'insectes à des cultures de *P. luminescens*

Les protocoles et résultats sont présentés dans les **documents 3 et 4**.

- 3.1. Préciser les intérêts de l'utilisation de la GFP dans les expériences *in vivo*.
- 3.2. Donner la caractéristique principale d'un promoteur constitutif.
En déduire un rôle de la souche de *P. luminescens* porteuse de $p_{lac-gfp}$ dans l'analyse de ces expériences.
- 3.3. Analyser les résultats présentés dans le **document 3**.
Conclure quant à l'activité du promoteur p_{mdtA} .
- 3.4. Montrer que les résultats présentés dans le **document 4** confortent cette conclusion.
- 3.5. Proposer un mécanisme moléculaire d'activation du promoteur p_{mdtA} .

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. Caractérisation du locus *mdtABC* chez *P. luminescens*

Analysis of the *P. luminescens* TT01 genome sequence revealed the presence of a *mdt* locus containing three open reading frames, *mdtA*, *mdtB* and *mdtC*.

The *mdtA* gene encodes a 401-amino acid putative membrane protein 70 % identical to the MdtA protein of *E. coli* (E-value of $1e-166$). Both *mdtB* and *mdtC* genes encode transporter proteins MdtB and MdtC and are 78 % (E-value of 0,0) and 76 % (E-value of 0,0) identical to MdtB and MdtC of *E. coli*, respectively.

According to Joshi and Xu (2007), if two proteins have more than 70 % of sequence identity, they have about 90 % probability or more to share the same biological process.

Document 2. Construction du vecteur pJQ-*mdtA*- Ω Cm nécessaire à l'obtention de la souche mutante de *P. luminescens*

La construction du vecteur pJQ-*mdtA*- Ω Cm a été obtenue en 3 étapes :

Étape 1 : amplification par PCR des régions 5' et 3' du gène *mdtA* à partir de l'ADN génomique de *P. luminescens*.

Localisation des séquences cibles des produits de PCR *mdtA*5' et *mdtA*3' :



Couple d'amorce pour la région 5' du gène *mdtA* (*mdtA*5') :

5'-GCGC**TCTAGA**ATCATCGGAAGCCGTATCTG-3' Amorce sens
5'-CGC**GGATCC**GGGGGGTAAAGGGGAATGTCT-3' Amorce antisens

Couple d'amorce pour la région 3' du gène *mdtA* (*mdtA*3') :

5'-CGC**GGATCC**GGTTGTTAGTGCCTGGGATCG-3' Amorce sens
5'-GCGC**GAGCTC**CCACTTCCGGTAATGCAGAC-3' Amorce antisens

Nom	Sites de restriction et position de la coupure (/)
<i>Xba</i> I	5' T/CTAGA 3'
<i>Bam</i> HI	5' G/GATCC 3'
<i>Sac</i> I	5' GAGCT/C 3'

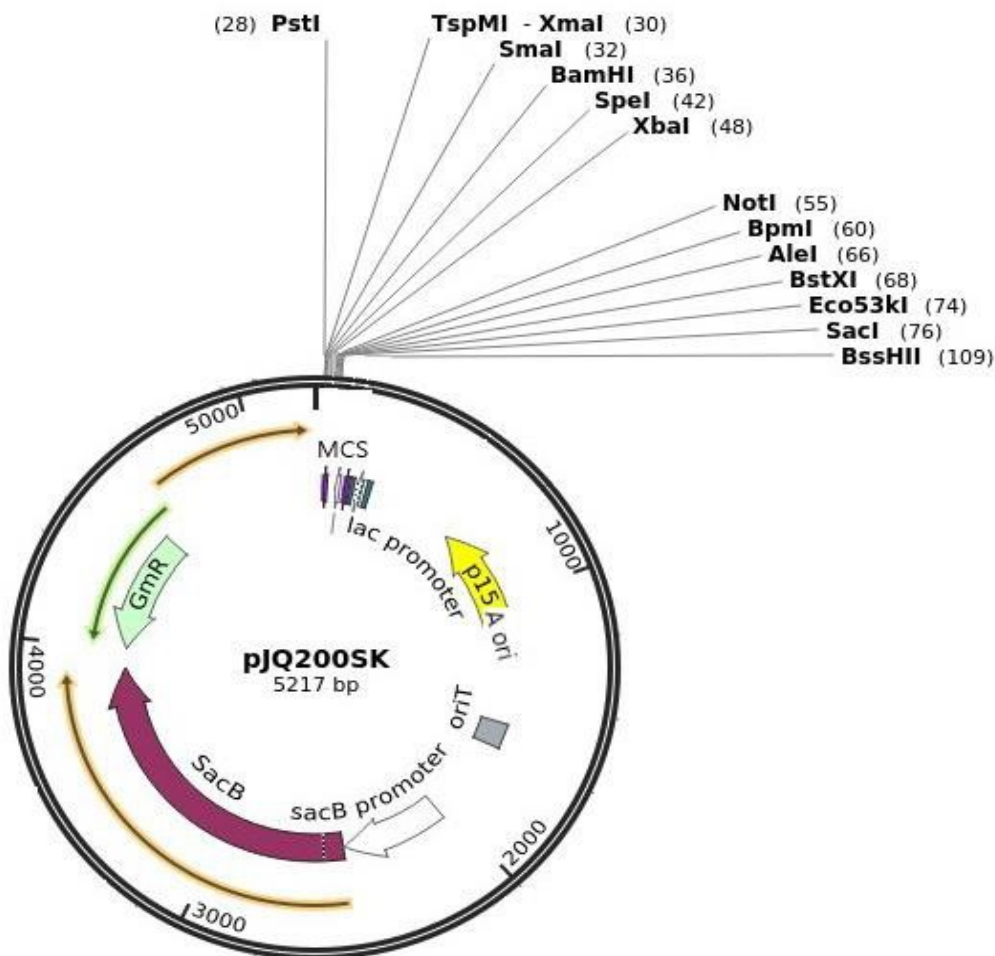
Étape 2 : construction de la cassette *mdtA5'*-ΩCm-*mdtA3'*

Les produits de PCR *mdtA5'* et *mdtA3'* sont digérés avec les enzymes *XbaI/BamHI* et *BamHI/SacI* respectivement (les sites de reconnaissance sont soulignés et en gras). La cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol, ΩCm (3.5 kb), a été isolée à partir d'un autre plasmide, par digestion avec l'enzyme *BamHI*. Ce fragment est ensuite ligaturé dans les sites *BamHI*, entre les produits de PCR *mdtA5'* et *mdtA3'*.

Étape 3 : insertion de la cassette *mdtA5'*-ΩCm-*mdtA3'* dans le vecteur pJQ200SK

Le fragment d'ADN obtenu, *mdtA5'*-ΩCm-*mdtA3'*, est ensuite purifié sur gel, puis digéré avec les enzymes appropriées et enfin inséré aux sites de restriction correspondant du vecteur pJQ200SK. La construction obtenue est notée pJQ-*mdtA*-ΩCm.

Cm : Chloramphénicol



MCS : Multiple cloning site

p15A ori : plasmid containing the p15A origin of replication can be propagated in *E.coli* cells that contain a second plasmid with ColE1 origin.

GmR : confers resistance to gentamicin

Ori T : origin of transfer

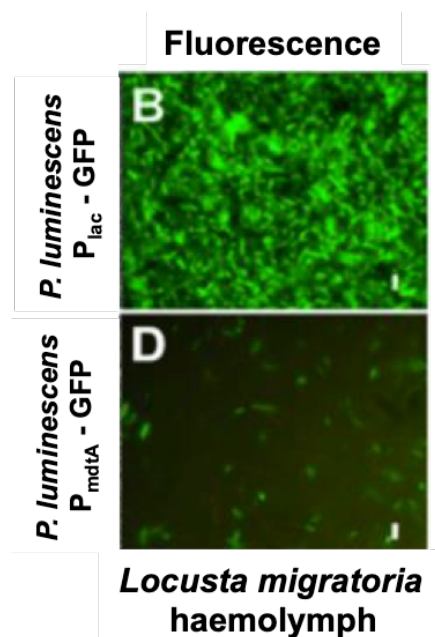
Document 3. Comparaison de l'expression *in vivo* de l'opéron *mdtABC* et d'une GFP constitutive chez *P. luminescens* dans les larves de *Locusta migratoria*

3a. Expression dans l'hémolymphe de *Locusta migratoria*

Les larves de *L. migratoria* sont infectées avec *P. luminescens* porteuse de la fusion transcriptionnelle p_{lac} -gfp (B) ou p_{mdtA} -gfp (D).

De l'hémolymphe est régulièrement prélevée durant l'infection et puis observée au microscope à fluorescence (B et D).

Les observations montrées ont été réalisées 30 heures après infection des larves.

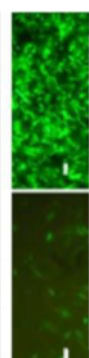
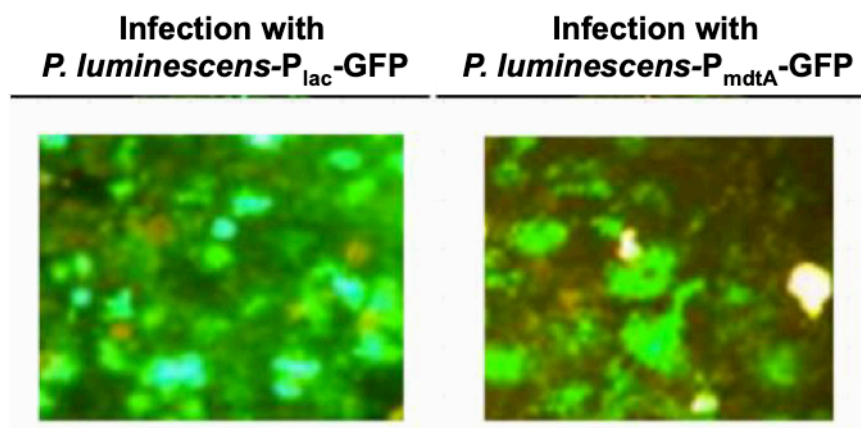


3b. Expression dans l'organe hématopoïétique de *Locusta migratoria*

Les larves de *L. migratoria* sont infectées avec *P. luminescens* porteuse de la fusion transcriptionnelle p_{lac} -gfp ou p_{mdtA} -gfp.

Les tissus de l'organe hématopoïétique sont observés en fluorescence.

Les observations montrées ont été réalisées 30 heures après infection des larves.

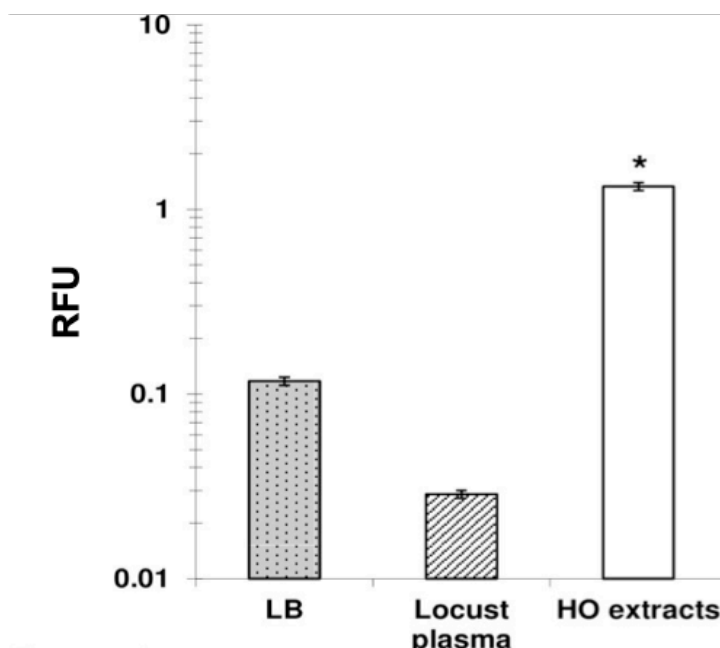


90 % de
fluorescence

5 % de
fluorescence

Aide à la lecture du document 3

Document 4. Niveau d'expression *in vitro* de l'opéron mdtABC de *P. luminescens* dans le plasma de *Locusta migratoria* et dans un milieu contenant des extraits d'organe hématopoïétique (HO)



Des cultures de 24 heures de souches de *P. luminescens* porteuses de la construction p_{mdtA} -gfp sont diluées dans des plaques 96 puits contenant un des milieux suivants : milieu LB (LB), plasma de criquet (hémolymphes dépourvues de cellules : Locust plasma) ou milieu LB supplémenté avec de l'extrait d'organe hématopoïétique (HO extracts). L'absorbance à 600 nm et la fluorescence de la GFP sont mesurées en temps réel. RFU correspond au Ratio de Fluorescence spécifique. L'astérisque indique un résultat significatif.

$$RFU = \frac{\text{Fluorescence GFP exprimée sous contrôle du promoteur } p_{mdtA}}{\text{Fluorescence GFP exprimée sous contrôle du promoteur } p_{lac}}$$

2020 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée 2 h – coefficient 1

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

Conception d'une xylanase multimodulaire

Les déchets végétaux issus de l'agriculture sont constitués majoritairement de « biomasse lignocellulosique ». Chaque année plus de 1,5 milliard de tonnes de ces résidus agricoles sont produits sans valorisation. Cette biomasse lignocellulosique est composée de différents polysaccharides végétaux parmi lesquels on trouve les xylanes.

L'utilisation de cette biomasse en bioréacteur pour produire des agrocarburants ou des protéines alimentaires nécessite au préalable de désorganiser la matrice lignocellulosique. Les xylanases se présentent comme une alternative aux traitements physiques et chimiques actuels très énergivores. Elles déstabilisent la structure en hydrolysant les xylanes, éléments structurant de la paroi des végétaux.

1. Caractérisation de la xylanase de *Neocallimastix patriciarum* (3 points)

Le « champignon » anaérobie *Neocallimastix patriciarum*, isolé à partir du rumen du mouton, produit une xylanase particulièrement efficace nommée *NpX* ou EC 3.2.1.8. La réaction catalysée par *NpX* est présentée dans le **document 1**. L'organisation structurale de l'enzyme est détaillée dans le **document 2**.

- 1.1. Montrer que la xylanase appartient à la classe 3 des enzymes.
- 1.2. Identifier les différentes structures secondaires présentes dans la xylanase *NpX*.
Présenter l'organisation spatiale de chacune de ces structures. Nommer les liaisons permettant la stabilisation de ces structures.

Le **document 2** regroupe également des éléments permettant d'approcher le fonctionnement catalytique de la xylanase *NpX*.

- 1.3. Identifier les deux acides aminés impliqués dans la catalyse. Indiquer la principale propriété de leur chaîne latérale dans l'environnement du site actif des enzymes.

2. Construction d'une xylanase multimodulaire via le système Jo-In (9 points)

Le substrat naturel de *NpX*, le xylane, est un polymère osidique assez peu soluble, relativement linéaire contenant jusqu'à plus de 200 résidus osidiques. Il peut présenter quelques ramifications latérales le long de son axe principal.

Certaines enzymes microbiennes qui dégradent la paroi cellulaire végétale disposent d'un ou plusieurs domaine(s) non catalytique(s) de type *Carbohydrate Binding Module* (CBM). Ces domaines CBM sont des modules qui se lient spécifiquement aux polysaccharides de la paroi végétale. L'association d'un domaine protéique CBM à la xylanase *NpX* est envisagée dans le but d'améliorer l'accessibilité de l'enzyme à son substrat.

- 2.1. Présenter le concept de « domaine protéique ».

Une équipe de recherche a fusionné le domaine catalytique de la xylanase *NpX* avec différents domaines CBM par la stratégie « Jo-In ». La protéine ainsi obtenue est qualifiée de « multimodulaire ».

Les résultats obtenus avec le domaine CBM3a issu de *Clostridium thermocellum* sont étudiés ici. Le **document 3** présente la stratégie « Jo-In ».

2.2. Réaliser un schéma permettant de résumer l'ensemble des étapes ayant permis l'obtention de la xylanase multimodulaire.

Les protéines de fusion In*NpX* (41 kDa) et JoCBM3a (29 kDa) ont été produites séparément par des souches d'*Escherichia coli* recombinantes. Pour faciliter leur purification, les deux protéines de fusion ont été marquées par une étiquette histidine - HisTag – constituée d'une dizaine de résidus histidine successifs.

Après sonication du milieu de culture suivie d'une centrifugation, les protéines du surnageant sont purifiées par chromatographie d'affinité d'ions métalliques immobilisés ou IMAC. Le **document 4** présente le fonctionnement de la résine Talon® de Clontech®.

2.3. Expliquer le fonctionnement de la résine TALON® dans le cadre de cette purification avec « élution par compétition ».

2.4. Réaliser un schéma de principe des trois étapes détaillées dans le protocole de purification.

Des fractions sont collectées aux différentes étapes de la purification et sont déposées sur gel SDS PAGE pour valider la démarche. Le **document 5** présente les résultats obtenus pour JoCBM3a à différentes étapes de la purification.

2.5. Expliquer comment la SDS PAGE permet de séparer les protéines uniquement par leur différence de masse moléculaire.

2.6. Analyser les résultats et conclure sur :

- l'efficacité de la production de la protéine de fusion JoCBM3a par *Escherichia coli*,
- l'efficacité de la purification par chromatographie d'affinité d'ions métalliques immobilisées IMAC.

3. Évaluation de l'efficacité catalytique de la xylanase multimodulaire (6 points)

Les activités spécifiques de la xylanase multimodulaire In*NpX*-JoCBM3a et celle de la xylanase sauvage ont été mesurées dans un premier temps sur un substrat de synthèse, le pNP-X₃. Les résultats sont présentés en **document 6**.

3.1. Comparer les activités spécifiques z_{sp} obtenues pour les deux xylanases sur le substrat de synthèse, sachant que le degré de pureté des lots de xylanase est identique.

Dans un second temps, les deux xylanases ont été testées sur de la biomasse ligno-cellulosique naturelle.

L'activité mesurée pour la xylanase multimodulaire s'est révélée particulièrement faible.

De manière à identifier l'origine de cette perte importante d'activité, il a été entrepris de déterminer les paramètres cinétiques de In*NpX* avant sa liaison avec JoCBM3a.

Les résultats sont présentés dans le **document 7**.

3.2. Vérifier l'ordre de grandeur des K_M proposés dans la publication à partir des représentations graphiques de Michaelis Menten fournies. Expliquer la démarche en reproduisant une de ces représentations graphiques sur la copie.

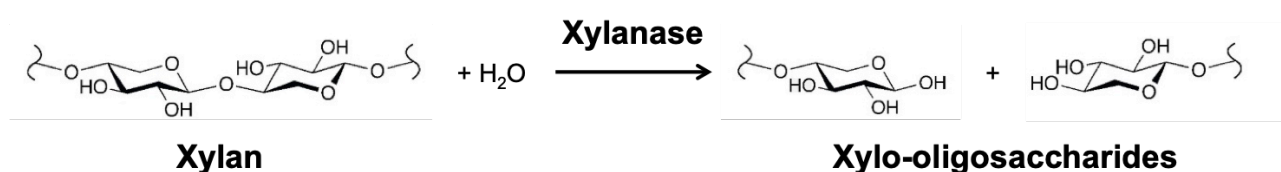
3.3. Comparer les K_M apparents. Rappeler l'information apportée par la comparaison des K_M . Conclure.

- 3.4. Justifier la différence des k_{cat} calculés malgré des concentrations en enzymes mises en œuvre relativement proches.
- 3.5. Préciser l'intérêt du rapport k_{cat}/K_M . Comparer les rapports obtenus pour la xylanase sauvage *NpX* et la protéine de fusion *InNpX*. Commenter la différence observée.
- 3.6. Proposer une hypothèse permettant d'expliquer la perte d'activité de la xylanase multimodulaire *InNpX*-JoCBM3a sur biomasse lignocellulosique naturelle.

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

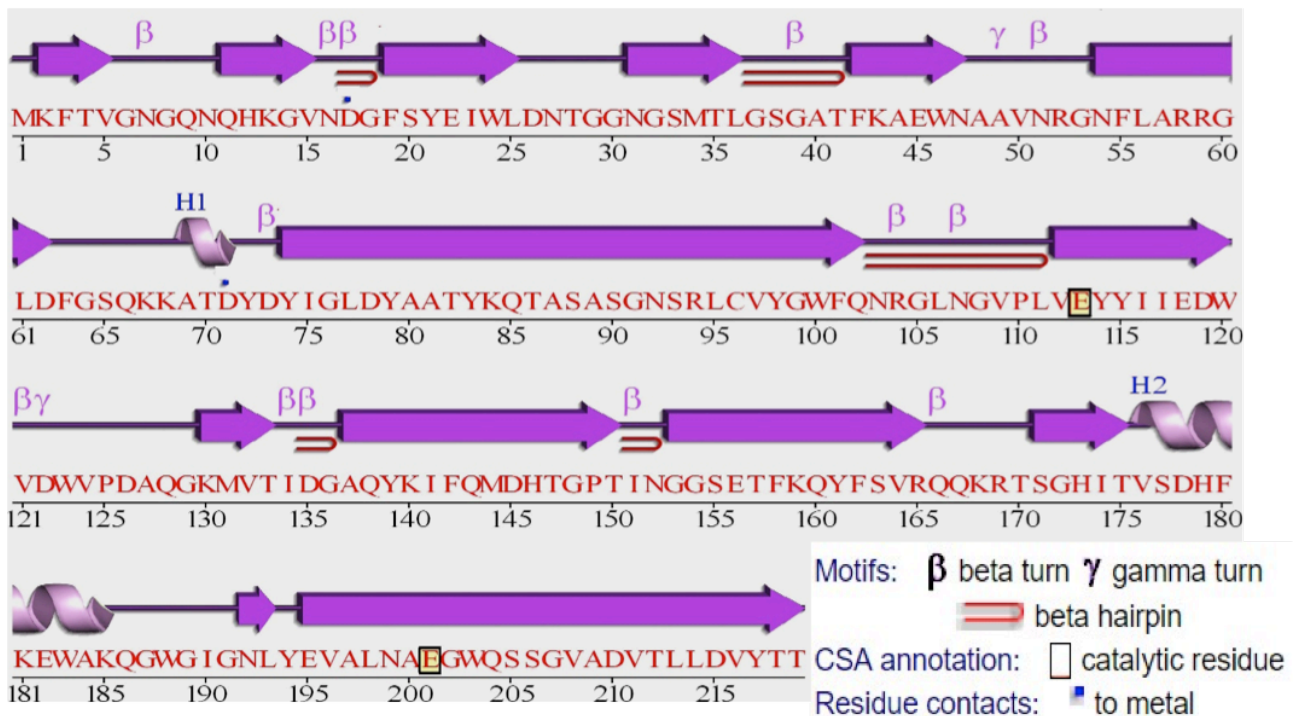
Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

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

Document 1. Réaction catalysée par la xylanase *NpX*

Document 2. Structure et organisation moléculaire de la xylanase *NpX*

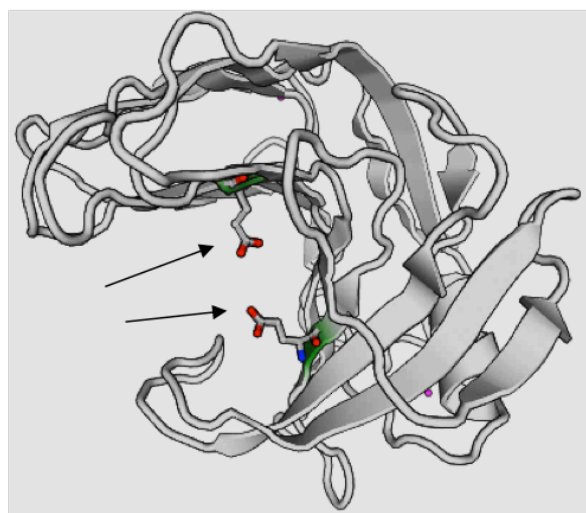
2-a. Structure primaire de la xylanase *NpX*



Single letter amino acid code :

A - Alanine (Ala), C - Cysteine (Cys), D - Aspartic Acid (Asp), E - Glutamic Acid (Glu), F - Phenylalanine (Phe), G - Glycine (Gly), H - Histidine (His), I - Isoleucine (Ile), K - Lysine (Lys), L - Leucine (Leu), M - Methionine (Met), N - Asparagine (Asn), P - Proline (Pro), Q - Glutamine (Gln), R - Arginine (Arg), S - Serine (Ser), T - Threonine (Thr), V - Valine (Val), W - Tryptophan (Trp), Y - Tyrosine (Tyr).

2-b. Représentations spatiales de la xylanase *NpX*



Les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la phase catalytique sont repérées par une flèche.

European Molecular Biology Laboratory - The European Bioinformatics Institute,
Pictorial database of 3D structures in the Protein Data Bank

Document 3. Principe général et mise en œuvre de la technique Jo-In

Les protéines **Jo** et **In** sont des fragments d'une même protéine, l'adhésine RrgA de *Streptococcus pneumoniae*. Jo et In peuvent s'associer de manière spontanée en créant une liaison covalente intramoléculaire entre la lysine 191 de **Jo** et l'asparagine 695 de **In** formant ainsi le complexe **Jo-In** (Izoré et al., 2010).

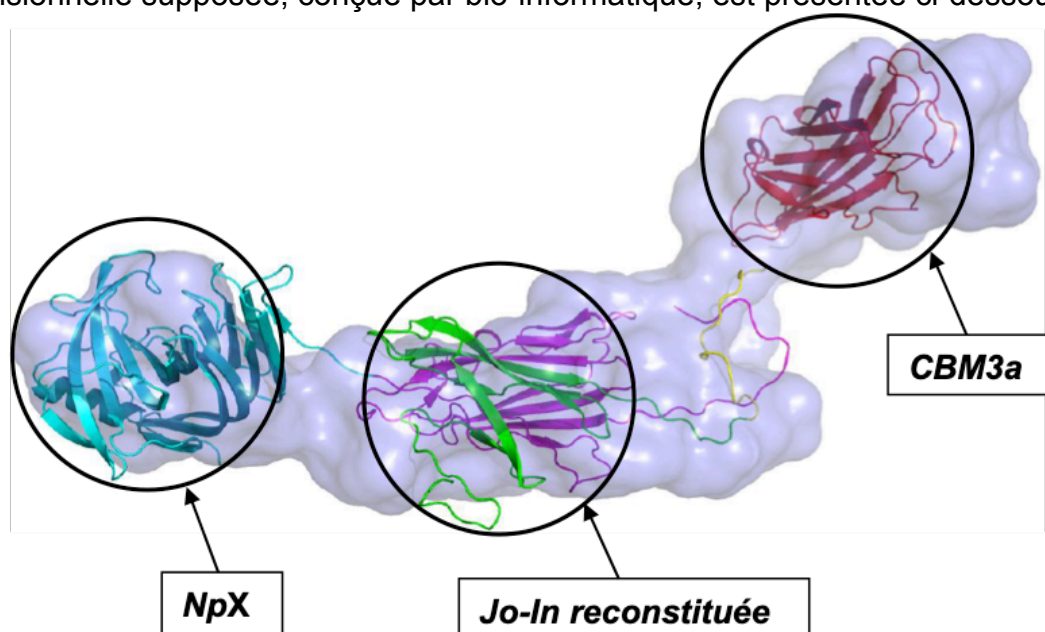
Dans le cadre de notre étude, deux vecteurs d'expression ont permis de produire chez *Escherichia coli* :

- d'une part, la xylanase *NpX* fusionnée avec la protéine In.
- d'autre part, le domaine de ciblage CBM3a fusionné avec la protéine Jo.

Ces deux protéines de fusion In*NpX* et JoCBM3a ont été produites séparément puis purifiées par chromatographie d'affinité.

La formation du complexe Jo-In à partir des protéines de fusion In*NpX* et JoCBM3a purifiées, a permis l'obtention d'une enzyme présentant à la fois l'activité catalytique de la xylanase et le domaine de liaison à la paroi CBM3a.

La xylanase multimodulaire ainsi produite est dénommée In*Np*-JoCBM3a. Sa structure tridimensionnelle supposée, conçue par bio-informatique, est présentée ci-dessous.

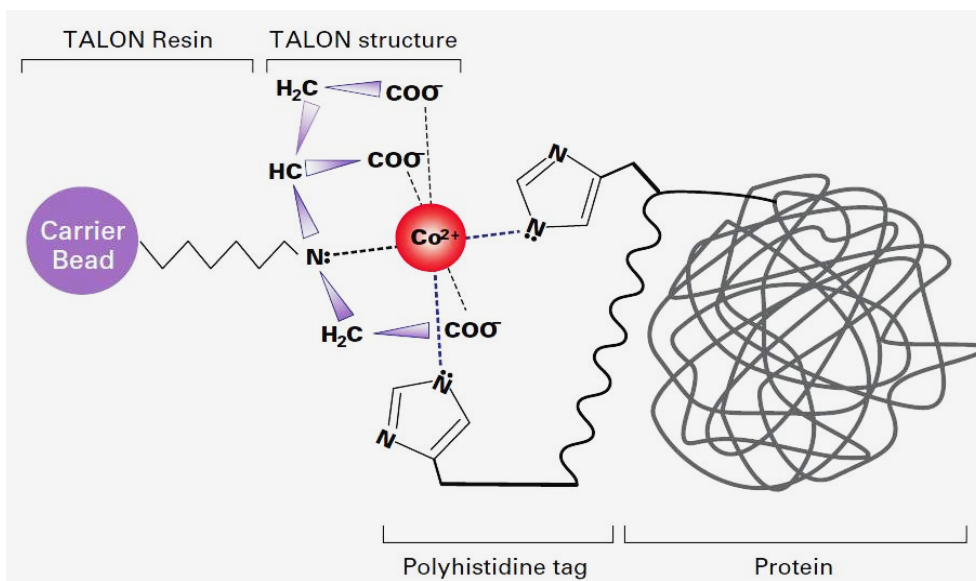


Louise Badruna.

Création d'enzymes multimodulaires à façon dédiées à la dégradation de substrats complexes.
Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse. INSA de Toulouse, nov 2017.

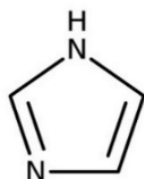
Document 4. Principe de fonctionnement de la résine TALON®

4-a. Interactions de la résine au cobalt avec son environnement



TALON® Metal Affinity Resins User Manual. Clontech Laboratories Inc.
Mountain view, CA 94043, USA

4-b. Formule semi-développée de l'imidazole



4-c. Protocol: Batch/Gravity-Flow Column Purification

For IMAC columns using TALON, we recommend a hybrid batch/gravity-flow procedure. This method combines the speed and convenience of a batch procedure with the higher purity of the gravity-flow column method. In this hybrid procedure, the binding and initial washing steps are performed in a batch format to save time, eliminate extraneous debris, and avoid column clogging. After the initial washes, the resin is transferred to a column for additional washing and protein elution.

1. Sample Application

- Add crude lysate or clarified sample to the equilibrated resin in a centrifuge tube.
- Gently agitate at room temperature or on ice for 20 min on a platform shaker to allow the his-tagged protein to bind the resin.

NOTE: Incubation on ice will decrease proteolysis.

- Centrifuge at 700 x g for 5 min. Carefully remove as much supernatant as possible without disturbing the resin pellet.

2. Washing

- Wash the resin by adding 10–20 bed volumes¹ of Equilibration Buffer. Gently agitate the suspension at room temperature or on ice for 10 min on a platform shaker for thorough washing.

¹ Bed volume : Volume occupé par la phase stationnaire de la colonne.

- b. Centrifuge at 700 x g for 5 min.
- c. Remove and discard the supernatant.
- d. Repeat Steps a–c with 10–20 bed volumes of Equilibration Buffer
- e. Add one bed volume of Equilibration Buffer to the resin, and resuspend by vortexing.
- f. Transfer the resin to a 2 ml gravity-flow column with an end-cap in place, and allow the resin to settle out of suspension.
- g. Remove the end-cap and allow the buffer to drain until it reaches the top of the resin bed, making sure no air bubbles are trapped in the resin bed.
- h. Wash column once with 5 bed volumes of Wash Buffer.

3. Elution & Analysis

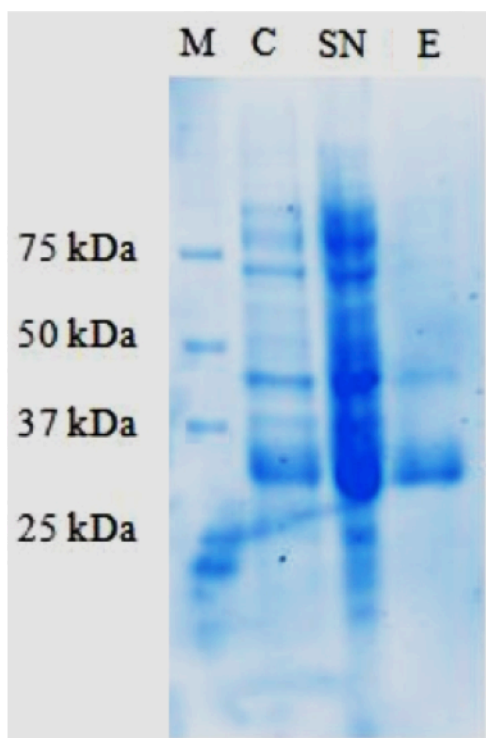
- a. Elute the his-tagged protein by adding 5 bed volumes of Elution Buffer (imidazole 500 mM) to the column. Collect the eluate in 500 µl fractions.

NOTE: Under most conditions, the majority of the his-tagged protein will be recovered in the first two bed volumes.

- b. Use spectrophotometric and SDS-PAGE analysis to determine which fraction(s) contain(s) the majority of the his-tagged protein.

NOTE: Use a Bradford protein assay (Bradford, 1976) or UV absorbance at 280 nm.

Document 5. Validation de la purification de JoCBM3a marquée à l'histidine par électrophorèse SDS PAGE



Gel d'électrophorèse SDS-PAGE réalisé à partir de différentes fractions de purification de la protéine de fusion JoCBM3a (marquée à l'histidine). Révélation au bleu de Coomassie.

- M : Marqueurs de taille ;

Après sonication puis centrifugation :

- C : Culot ;
- SN : Surnageant ;

Après dépôt sur colonne d'affinité TALON :

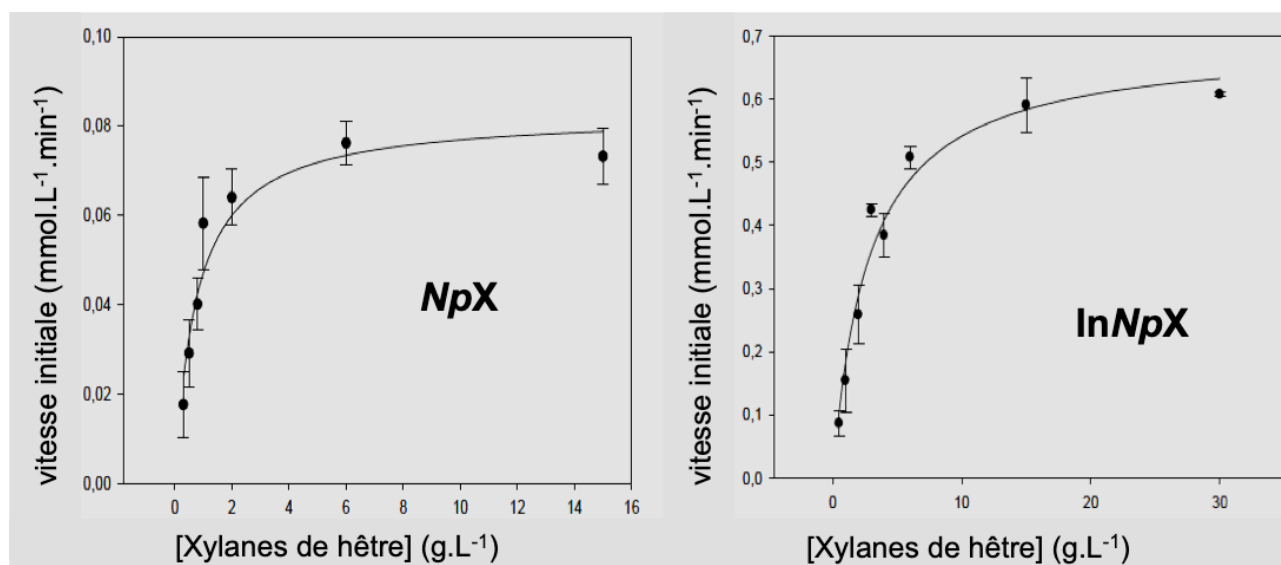
- E : Fraction récupérée suite à l'ajout d'une solution d'imidazole à 500 mM.

Louise Badruna.

Création d'enzymes multimodulaires à façon dédiées à la dégradation de substrats complexes.
Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse. INSA de Toulouse, nov 2017.

Document 6. Activités spécifiques déterminées avec le substrat pNP-X₃

Enzyme	z_{sp} (U · mg ⁻¹)	Nombre de lots protéiques testés
<i>NpX</i> <i>Xylanase sauvage</i>	5,04 ± 2,20	4
In <i>NpX</i> -JoCBM3a <i>Xylanase multimodulaire</i>	1,94 ± 0,34	4

Document 7. Etude de l'impact de la fusion des protéines « In » et de « NpX » sur ses paramètres cinétiques

Représentation de Michaelis Menten pour *NpX* et In*NpX*.

Les paramètres cinétiques extraits de la publication sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Expérience réalisée en triplicat à 37 °C en tampon Tris HCl 50 mM pH 7,5.

Les concentrations en enzyme mises en œuvre sont estimées à :

- 3,3.10⁻⁶ mmol.L⁻¹ pour *NpX*
- 4,2.10⁻⁶ mmol.L⁻¹ pour In*NpX*

	<i>NpX</i>	In <i>NpX</i>
Nature du substrat	Xylanes de hêtre	Xylanes de hêtre
K_M apparent (g.L ⁻¹)	0,75 ± 0,14	2,76 ± 0,51
$v_{i\ max}$ (mmol.L ⁻¹ .min ⁻¹)	0,079 ± 0,014	0,61 ± 0,12
k_{cat} (min ⁻¹)	2,40.10 ⁴ ± 1,51.10 ³	14,5.10 ⁴ ± 1,05.10 ³
k_{cat} / K_M app (L.min ⁻¹ .g ⁻¹)	3,25.10 ⁴ ± 5,22.10 ³	5,06.10 ⁴ ± 3,58.10 ³

2020 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français, calculatrice avec mode examen actif ou calculatrice sans mémoire, « type collège ».

Étude d'exopolysaccharides (EPS) issus de bactéries marines

Depuis quelques années, l'exploration de la biodiversité marine et notamment d'exopolysaccharides (EPS) marins constituent un enjeu majeur en recherche biomédicale (chirurgie réparatrice, thérapie cellulaire ingénierie tissulaire, activités anticoagulante ou antivirale) ainsi qu'en fabrication par des procédés biotechnologiques (fabrication d'additifs alimentaires, dentifrices, textiles...).

La souchothèque d'intérêt est maintenant grande ouverte avec la possibilité d'explorer des souches bactériennes issues des grands fonds marins. Les EPS produits les plus étudiés sont notamment ceux de l'espèce *Alteromonas macleodii*.

L'origine bactérienne de ces polyosides facilite grandement leur production et leur purification à l'échelle industrielle, sans les problèmes liés à l'utilisation des cellules animales (agents transmissible, virus...).

Les objectifs de cette étude seront ainsi de caractériser les propriétés structurales et métaboliques d'une des souches marine d'intérêt, d'optimiser la production en bioréacteur d'un EPS et enfin de mettre en évidence une application biotechnologique de ce polyoside.

1 Sélection et propriétés d'une souche marine d'intérêt (6 points)

Le **document 1** présente l'origine et la diversité des bactéries issues des grands fonds marins.

- 1.1. Expliquer le terme « extrêmophile » qualifiant les bactéries isolées des fonds marins et identifier deux applications biotechnologiques mettant en jeu les EPS extraits de ces bactéries.

Une souche du genre *Alteromonas* a été collectée en 1987 par le Nautille (sous-marin habité), à 13° Nord sur la dorsale Est du Pacifique, à 2600 m de profondeur. Elle a été prélevée sur un annélide polychète (ver marin) et cultivée sur le milieu Zobell E dont la composition figure sur le **document 2**.

- 1.2. Préciser le rôle des peptones et de l'extrait de levure, déduire la nature du milieu Zobell E.
- 1.3. Déterminer les types trophiques de la bactérie *Alteromonas macleodii*.

Le **document 3** présente l'étude des caractéristiques physico-chimiques de croissance de cette bactérie.

- 1.4. Définir le temps de génération, puis déduire les paramètres optimum de croissance de la bactérie.
- 1.5. Argumenter le caractère extrêmophile de cette souche.

Les EPS sont des polysaccharides bactériens synthétisés et sécrétés dans le milieu extracellulaire, ou directement synthétisés à l'extérieur par des enzymes ancrées dans la membrane. L'EPS HYD 1545 produit par *A. macleodii* confère un aspect mucoïde aux colonies (type M).

- 1.6. Nommer la structure bactérienne à laquelle appartiennent les EPS et exposer deux avantages que cette structure confère aux bactéries.

2 Culture en batch – optimisation de production de l'EPS HYD 1545 (7 points)

L'EPS nommé HYD 1545 a pu être isolé d'*Alteromonas macleodii* et étudié. Une production en bioréacteur dont le modèle est présenté dans le **document 4** est envisagée et une optimisation des paramètres de production est mise en place.

- 2.1. Indiquer sur la copie les noms des éléments légendés du bioréacteur utilisé pour produire l'EPS HYD 1545. Préciser leur rôle respectif.

Le **document 5** présente l'influence de la concentration en glucose additionné au milieu Zobell E sur la production de l'EPS HYD 1545.

- 2.2. Analyser les résultats de la production d'EPS et indiquer l'intervalle de concentration en glucose optimal à ajouter au milieu pour cultiver la bactérie et produire l'EPS.

Le **document 6** présente les résultats de la production en *batch* de l'EPS.

- 2.3. Expliquer, à l'aide d'un schéma, le fonctionnement de la boucle de régulation du pH mise en jeu pour cette culture d'*Alteromonas macleodii*.
- 2.4. Identifier la phase exponentielle de croissance et donner le type de métabolite que sont les EPS HYD 1545 d'*A. macleodii*.
- 2.5. Déterminer le rendement global de conversion en EPS HYD 1545 ($R_{\text{EPS/S}}$ ou $Y_{\text{EPS/S}}$) en g d'EPS par g de glucose.
- 2.6. Discuter l'intérêt d'utiliser cette souche d'*A. macleodii* en comparant sa productivité volumique horaire totale (P_{vht}) en EPS à celle minimale attendue de $0,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

3 Application biotechnologique de l'EPS HYD 1545 à la lutte contre les biofilms (5 points)

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) s'intéresse aux propriétés de l'EPS HYD 1545 produit par *Alteromonas macleodii*. L'objectif est d'inventer un produit capable de prévenir la formation de biofilms de microorganismes indésirables tout en étant sans danger pour l'environnement (aucune activité antimicrobienne, non perturbation de la faune et flore de l'environnement marin notamment).

Les applications anti-biofilm potentielles sont nombreuses dans l'industrie, la santé et l'environnement où l'on cherche à diminuer la colonisation des matériaux par des bactéries.

Une surface à traiter pourrait ainsi être mise en contact, ponctuellement ou à intervalles réguliers, avec des EPS, de préférence en solution. Les EPS sont capables de former sur cette surface un film protecteur empêchant la fixation d'autres microorganismes.

- 3.1. À partir du **document 7**, expliquer les étapes de formation d'un biofilm en mettant en évidence les structures bactériennes impliquées, en déduire les modalités d'action anti-biofilm attendues de l'EPS HYD 1545.

Les **documents 8 et 9** présentent les résultats d'études menées par l'IFREMER.

3.2. Analyser les résultats du **document 8** et montrer que l'EPS HYD 1545 est efficace pour limiter la contamination des surfaces immergées par un biofilm indésirable.

Le **document 9** présente le mode opératoire et les résultats de détermination de la CMI de différents EPS sur trois souches bactériennes. Le témoin à réaliser ne figure pas dans le document.

3.3. Définir la notion de CMI. Proposer la composition d'un témoin adéquat et expliquer son rôle.

3.4. Analyser les résultats et montrer que l'EPS HYD 1545 est dépourvu d'activité antimicrobienne.

4. **Conclusion** : reprendre l'ensemble des résultats de l'étude afin de montrer les avantages d'*Alteromonas macleodii* et de l'EPS HYD 1545 en vue d'élaborer un produit anti-biofilm.

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. Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and their biomolecules

Extreme marine environments have been the subject of many studies and scientific publications. For many years, these environmental niches, which are characterized by high or low temperatures, high-pressure, low pH, high salt concentrations and also two or more extreme parameters in combination, have been thought to be incompatible to any life forms. Thanks to new technologies such as metagenomics, it is now possible to detect life in most extreme environments. Starting from the discovery of deep sea hydrothermal vents up to the study of marine biodiversity, new microorganisms have been identified, and their potential uses in several applied fields have been outlined. Thermophile, halophile, alkalophile and psychrophile microorganisms have been isolated from these marine environments ; they proliferate thanks to adaptation strategies involving diverse cellular metabolic mechanisms. Therefore, a vast number of new biomolecules such as enzymes, exopolysaccharides and osmolytes from the inhabitant microbial community of the sea have been studied, and there is a growing interest in the potential returns of several industrial production processes concerning the pharmaceutical, medical, environmental and food fields.

Several interesting examples of biologically and biotechnologically useful exopolysaccharides (EPSs) from extremophilic microorganisms have been described recently :

	Microorganisms	Isolation sites	Enzymes or EPS applications
Thermophilic	<i>Thermococcus litoralis</i>	Deep-sea hydrothermal springs	Poultry industry (Serine peptidase), Detergent (Lipase)
	<i>Bacillus licheniformis</i>		Antiviral activity
	<i>Vibrio diabolicus</i>		Regenerating activity on bone and skin
Psychrophilic	<i>Psychrobacter sp</i>	Deep-sea sediment West pacific	Detergent (Lipase)
	<i>Pseudoalteromonas</i>	Marine Antarctica	Antiviral activity against HSV1
	<i>Pseudomonas strain CAM025</i>	Sea ice	Cryo-protection and trace metal binding
Halophilic	<i>Halomonas sp</i>	Saltern area, Turkey	Starch conversion (Alpha-amylase) Detergent (Lipase)
	<i>Alteromonas infernus</i>	Deep-sea hydrothermal springs	Cartilage tissue engineering Heparine-like behavior
	<i>Alteromonas macleodii</i> HYD1545	Hydrothermal vent polychaete annelid	Anti-biofilm forming

Note : “deep sea hydrothermal vents” = cheminées hydrothermales volcaniques des fonds marins

Poli A. and Co, *Microorganisms* 2017, 5, 25
Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and their Biomolecules

Document 2. Composition de la gélose marine Zobell E

PRINCIPE

La gélose marine est formulée selon la description originale de ZoBell et reprend l'essentiel des concentrations de minéraux de l'eau de mer. L'agar est ajouté comme agent de solidification.

FORMULE

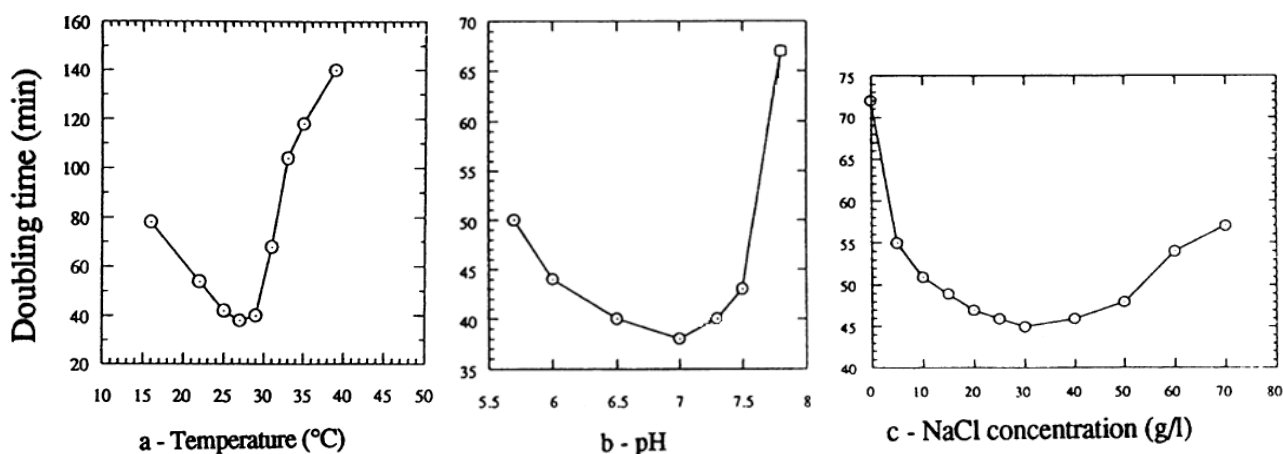
Ingrédients en grammes pour un litre d'eau pure.

Peptone de viande	5,0000	Sulfate de sodium	3,2400
Extrait de levure	1,0000	Bicarbonate de sodium	0,1600
Chlorure de sodium	19,4500	Silicate de sodium	0,0040
Citrate de fer	0,1000	Fluorure de sodium	0,0024
Chlorure de calcium	1,8000	Phosphate disodique	0,0080
Chlorure de magnésium	8,8000	Chlorure de potassium	0,5500
Chlorure de strontium	0,0340	Bromure de potassium	0,0800
Nitrate d'ammonium	0,0016	Acide borique	0,220
Agar	15,0000		

pH final à 25°C : $7,6 \pm 0,2$

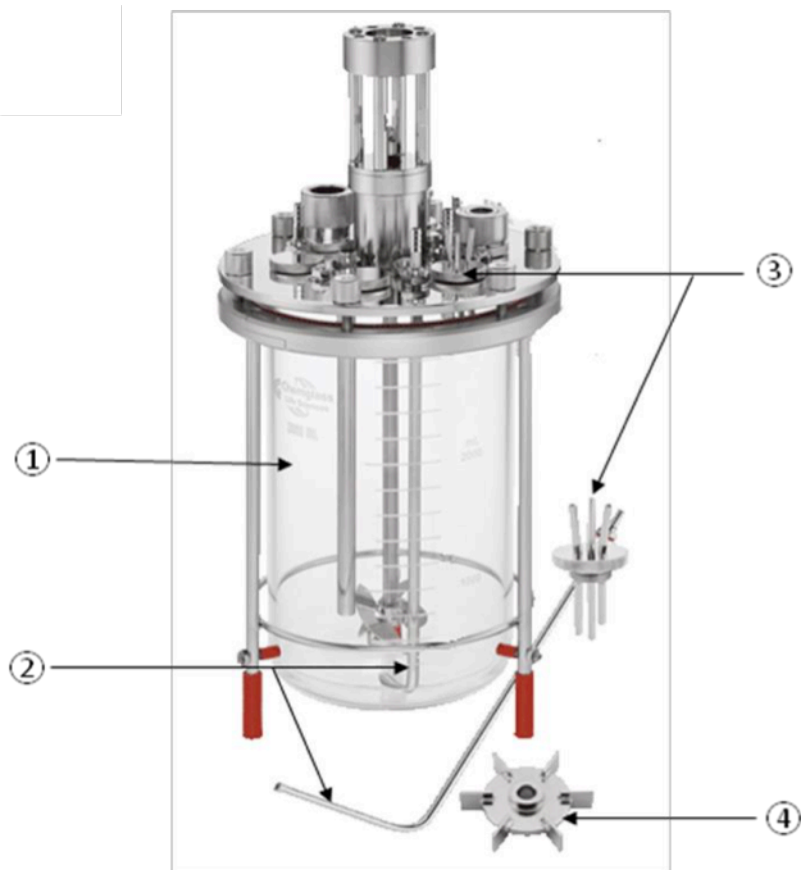
Fiche technique Incidia production – version 01.2015

Document 3. Influence des conditions d'incubation sur le temps de génération d'*Alteromonas macleodii* – souche HYD 1545



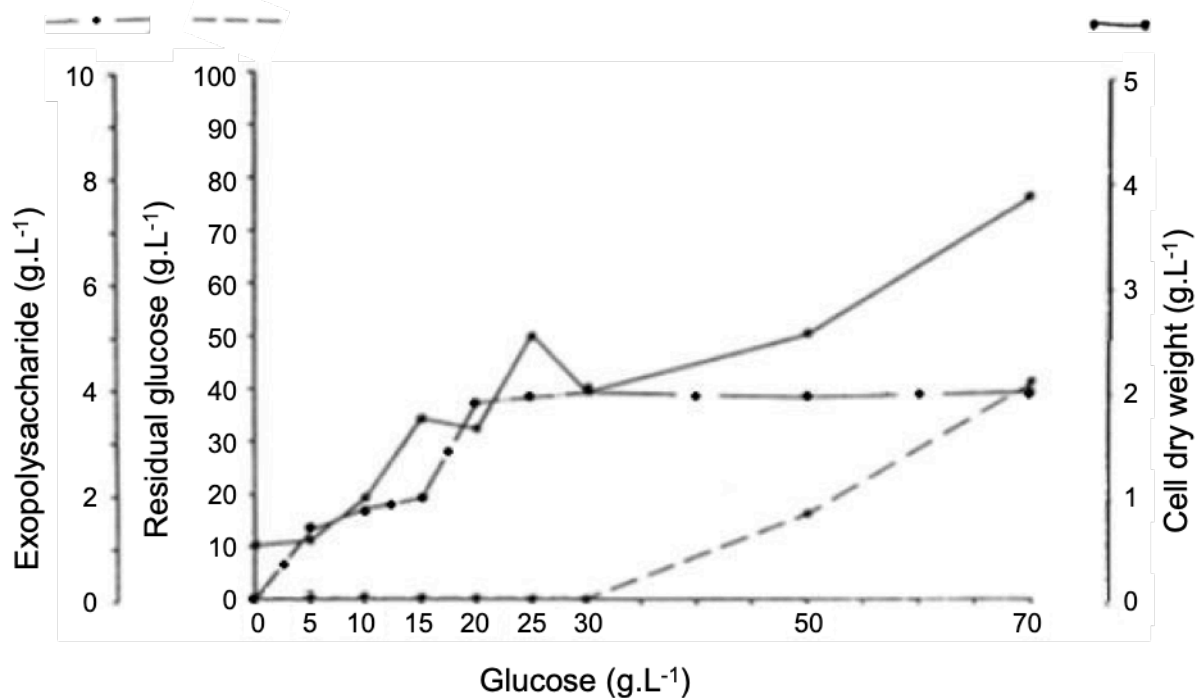
P. Vincent and Co, *Appl. Environ. Microbiol.*, Nov 1994 - Vol 60 - n°11 p4134-4141
 Production and Characterization of an Exopolysaccharide Excreted by a Deep-Sea Hydrothermal Vent Bacterium Isolated from the Polychaete Annelid *Alvinella pompejan*

Document 4. Modèle de bioréacteur utilisé pour la production de l'EPS HYD 1545



The BioNet® Bioreactor - disponible sur <https://www.indiamart.com/> (consulté en novembre 2019)

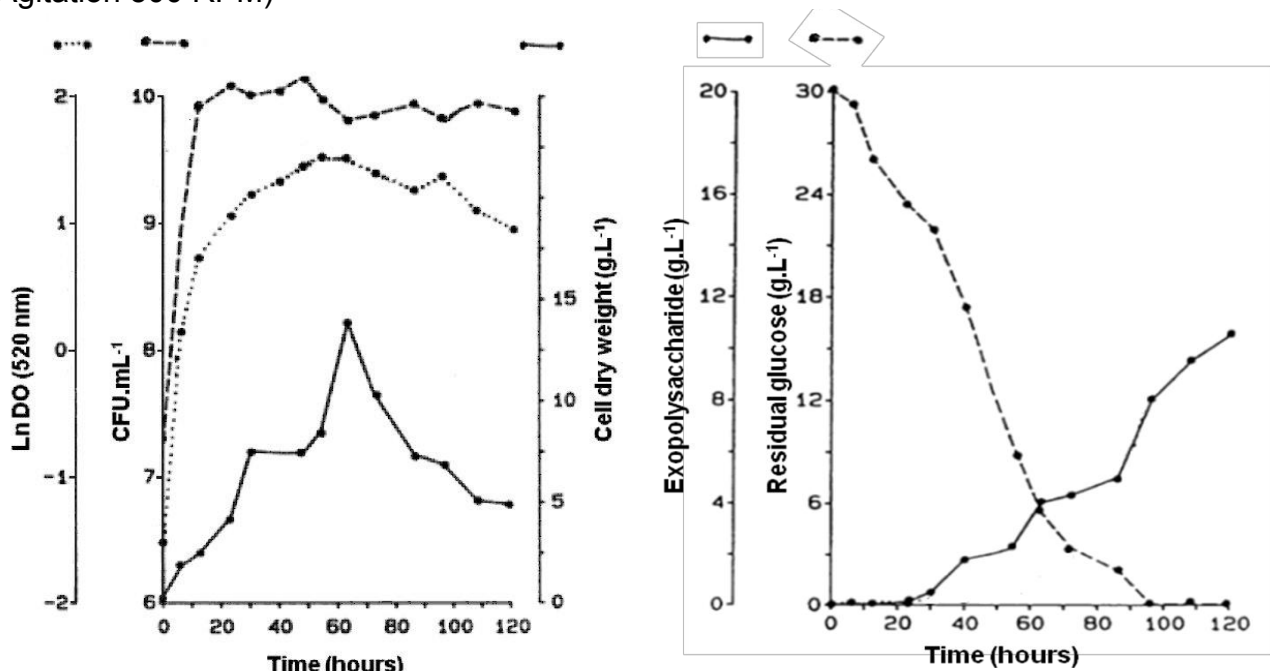
Document 5. Effet de la concentration initiale en glucose du milieu de culture sur la production d'EPS HYD 1545 par *A. macleodii*.



P. Vincent and Co, Appl. Environ. Microbiol., Nov 1994 - Vol 60 - n°11 p4134-4141

Document 6. Production de l'EPS HYD 1545 en culture *batch* aérobie

(1,4 L milieu Zobell E + 30 g.L⁻¹ glucose – T° = 25°C – Air = 0,7 VVM – pH ajusté à 7,2 – Agitation 500 RPM)

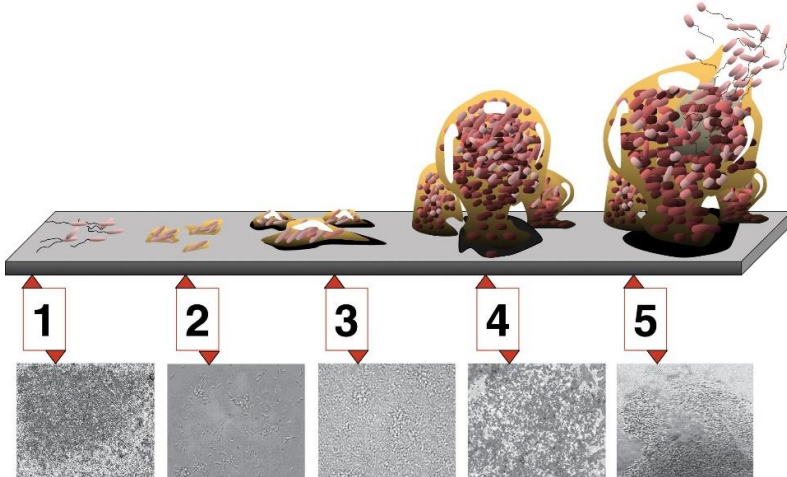


P. Vincent and Co, Appl. Environ. Microbiol., Nov 1994 - Vol 60 - n°11 p4134-4141

Document 7. Stages of biofilm development

The formation of a biofilm begins with the attachment of free-floating microorganisms to a surface. The first colonist bacteria of a biofilm may adhere to the surface initially by the weak van der Waals forces and hydrophobic effects. If the colonists are not immediately separated from the surface, they can anchor themselves more permanently using cell adhesion structures such as pili.

During surface colonization bacteria cells are able to communicate using quorum sensing (QS) products such as N-acyl homoserine lactone (AHL). Once colonization has begun, the biofilm grows by a combination of cell division and recruitment. Polysaccharide matrices typically enclose bacterial biofilms. In addition to the polysaccharides, these matrices may also contain material from the surrounding environment, including but not limited to minerals, soil particles, and blood components, such as erythrocytes and fibrin. The final stage of biofilm formation is known as dispersion, and is the stage in which the biofilm is established and may only change in shape and size.



Each stage of development in the diagram is paired with a photomicrograph of a developing *P. aeruginosa* biofilm. All photomicrographs are shown to the same scale.

<https://en.wikipedia.org/> consulté en novembre 2019

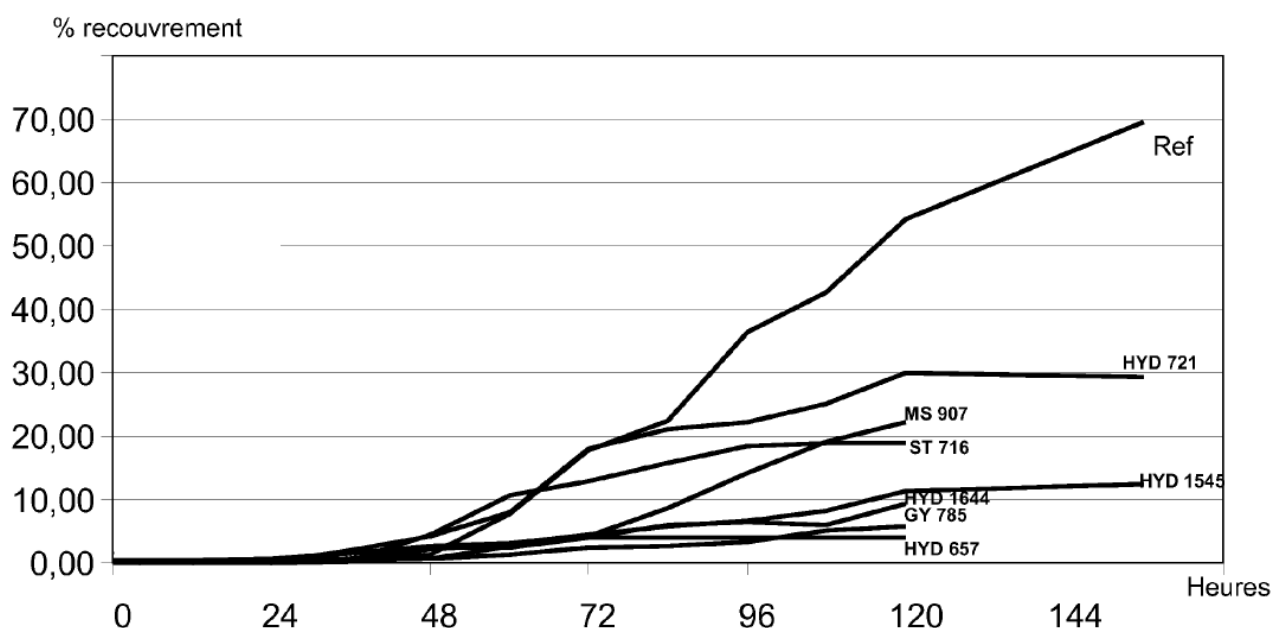
Document 8. Tests d'efficacité des EPS pour limiter la contamination par biofilm bactérien indésirable

Pré-conditionnement : des échantillons d'acier inoxydable 316L ont été utilisés pour les études portant sur l'influence d'un prétraitement des surfaces par des biopolymères issus de fermentation bactérienne (EPS). Les échantillons d'acier ont été conditionnés par immersion dans une eau osmosée additionnée d'exopolysaccharides bactériens résultant de procédés biotechnologiques de fermentation à une concentration de $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (soit 0,02 % poids/volume).

Après deux heures de contact à une température constante de 20°C , les différents échantillons ont été rincés avec 200 mL d'eau physiologique puis séchés sous hotte à flux laminaire avant expérimentation. Des échantillons non conditionnés ont été utilisés comme références (Ref).

Expérimentation : les essais de colonisation bactérienne (formation de biofilm) en régime dynamique ont été réalisés en utilisant une eau de mer circulante non renouvelée pendant 5 à 7 jours.

Lecture : le suivi de la colonisation bactérienne (% de recouvrement) des échantillons non conditionnés et conditionnés par différents EPS a été réalisé via un microscope électronique équipé d'une caméra relié à un ordinateur et en utilisant des cellules d'adhésion en dynamique.



Document 9. Tests démontrant l'absence d'activité antimicrobienne du film d'EPS

Principe : une culture bactérienne diluée est mise en contact dans des micropuits, avec une solution d'EPS à des concentrations connues. Le résultat est obtenu par mesure opacimétrique et la concentration minimale inhibitrice (CMI) est ensuite déterminée. Les tests sont réalisés sur 3 bactéries différentes : *Escherichia coli* SBS 363, *Micrococcus luteus* CIP 53.45, *Pseudomonas* sp.

Mode opératoire : une solution d'EPS à concentration élevée ($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) est diluée jusqu'à $3,125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en suivant une progression géométrique de raison $\frac{1}{2}$ en eau physiologique puis 100 μL de milieu Zobell E préalablement inoculé avec la souche à tester sont ajoutés dans chaque micropuits pour un volume final de 200 μL . Les résultats de croissance bactérienne sont obtenus par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm dans les micropuits après 18 h de culture à 30°C.

Tableau récapitulatif des résultats

EPS	Concentrations testées	Activité antibactérienne (CMI $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
		<i>E. coli</i> SBS 363	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>M. luteus</i> CIP 5345
GY 785	de $3,125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ à $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	> 100	> 100	> 100
HYD 1545		> 100	> 100	> 100
HYD 1644		> 100	> 100	> 100
HYD 657		> 100	> 100	> 100

Source : demande de brevet européen de l'IFREMER – EP 2 402 403 A1 –
Exopolysaccharides pour la prévention et la lutte contre la formation de biofilms

2020 - U42 : Biologie cellulaire

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français, calculatrice avec mode examen actif ou calculatrice sans mémoire, « type collège ».

Étude de l'influence de la protéine FIGNL1 sur la fertilité du riz

Le riz est la céréale la plus consommée sur la planète car elle représente la base de l'alimentation pour plus de la moitié de la population mondiale. L'étude du génome de la plante sauvage et de ses divers mutants est donc primordiale pour assurer et optimiser l'alimentation d'une population toujours croissante.

L'équipe de Zhang a réalisé en 2017 l'étude d'un mutant homozygote du gène *fign1*, nommé *osfign1*. L'aspect végétatif de la plante est normal mais elle est incapable de se reproduire.

Le but de l'étude est d'identifier les causes de la stérilité chez le mutant *osfign1*.

1. Étude génétique et phénotypique du mutant *osfign1* (9 points)

Le **document 1** présente la structure florifère du riz.

- 1.1. Identifier les annotations correspondant aux éléments 1 à 4.
Préciser les structures contenant les gamétophytes mâle et femelle.

Le **document 2** présente les croisements effectués par l'équipe de Zhang.

- 1.2. Proposer une hypothèse, concernant les gamètes, permettant d'expliquer les résultats obtenus en F1 pour les deux croisements.
- 1.3. Sachant que la mutation est récessive autosomale, construire l'échiquier de croisement de F1 par F1 (croisement 2).
Calculer le nombre de plantes hétérozygotes, le nombre de plantes homozygotes sauvages et le nombre total de descendants obtenus en F2.

Le pollen du mutant *osfign1* est observé en microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB). Le protocole de préparation des échantillons pour la MET est fourni dans le **document 3**. Les résultats obtenus sont visibles dans le **document 4**.

- 1.4. Identifier les différentes étapes de préparation des échantillons et en préciser le rôle.
- 1.5. Pour les quatre électronographies présentées, argumenter pour chacune d'elles le type de microscopie électronique utilisé.
- 1.6. Comparer les résultats observés pour la plante mutante *osfign1* et pour la plante sauvage.

2. Étude de la gamétogenèse mâle du mutant *osfign1* (3 points)

La méiose des mutants mâles *osfign1* a été étudiée par microscopie à épifluorescence après marquage par le DAPI. Les résultats sont présentés dans le **document 5**.

- 2.1. Représenter sur un graphique la quantité d'ADN contenue dans une cellule au cours de la méiose en fonction du temps.
Préciser sur ce graphe la caractéristique de chacune des deux divisions de la méiose.

- 2.2. Comparer les résultats d'épifluorescence entre la plante mutante mâle *osfign1* et la plante sauvage.
Proposer une hypothèse sur les conséquences de la mutation dans le processus de la méiose chez le mâle.

3. Localisation subcellulaire de FIGNL1 et interaction avec la protéine RAD51 (6 points)

Afin de mettre en évidence la localisation subcellulaire de la protéine FIGNL1, des protoplastes de riz ont été transformés avec une construction issue de la fusion du gène *fign1* avec le gène codant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein).
Les résultats obtenus par microscopie sont présentés dans le **document 6**.

- 3.1. Indiquer la particularité structurale des protoplastes.
3.2. Nommer les enzymes utilisées pour obtenir des protoplastes. Préciser la caractéristique principale d'une solution permettant de maintenir l'intégrité des protoplastes.
3.3. Analyser les résultats obtenus et déduire la localisation subcellulaire de la protéine FIGNL1.

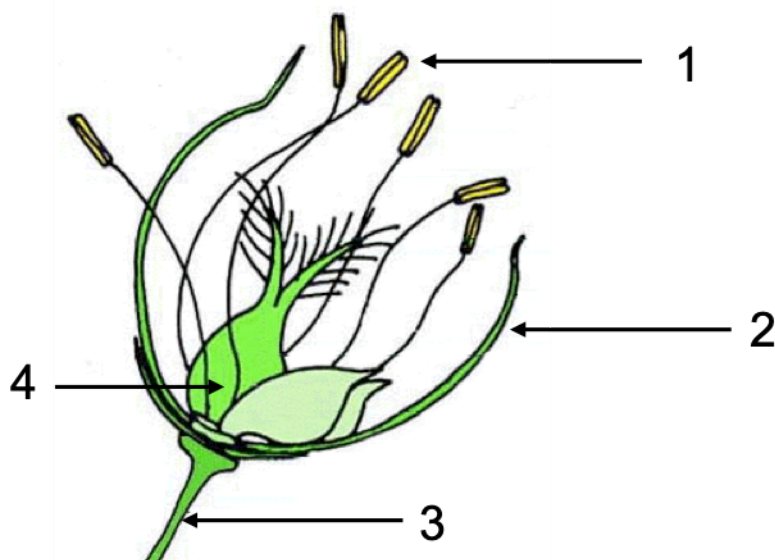
La protéine RAD51, présente chez tous les eucaryotes, joue un rôle essentiel dans la réparation des cassures d'ADN double-brin fréquentes en cas de crossing-over. Chez la plante modèle *Arabidopsis*, la perte de fonction du gène *RAD51* se caractérise par un phénotype identique à celui du mutant mâle *osfign1*.

Une éventuelle interaction entre les deux protéines RAD51 et FIGNL1 a été recherchée chez le riz par la technique du split YFP/BiFC présentée dans le **document 7A**. Le **document 7B** présente les résultats obtenus.

- 3.4. Conclure sur l'éventuelle interaction entre les protéines FIGNL1 et RAD51, à partir des résultats d'épifluorescence.
3.5. Indiquer l'élément désigné par une flèche dans le **document 5B**.
3.6. Formuler une hypothèse sur l'influence de la protéine FIGNL1 dans la fertilité du riz, en reprenant l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude.

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

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

Document 1. Schéma de l'appareil florifère de riz

Disponible sur : <http://www-plb.ucdavis.edu/labs/rost/Rice/reproduction/flower/flower.html>

Document 2. Croisements réalisés par l'équipe de Zhang

Parents	Plante ♂ homozygote mutante <i>osfln1</i>	x	Plante ♀ homozygote sauvage
F1	aucun descendant		

Croisement 1

Parents	Plante ♂ homozygote sauvage	x	Plante ♀ homozygote mutante <i>osfln1</i>
F1	plantes F1		
F2	Autofécondation n descendant dont 303 plantes homozygotes mutantes		

Croisement 2

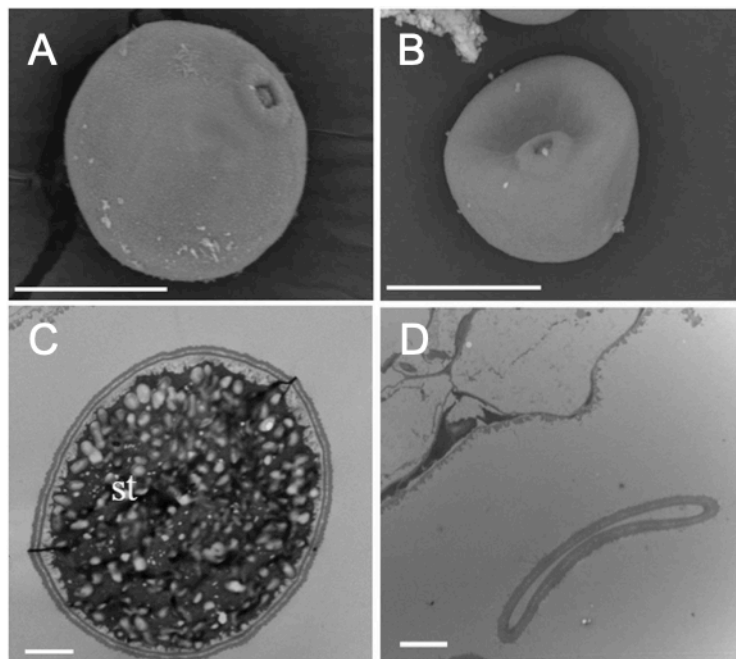
Document 3. Protocole de préparation pour la MET

Transmission Electron Microscopy (TEM)

For TEM observation, spikelets at different developmental stages were fixed with 3 % (w/v) paraformaldehyde and 0,25 % glutaraldehyde in 0,2 M sodium phosphate buffer (pH 7,2) overnight at 4°C, then rinsed twice using 0,1 M phosphate buffer (pH 7,0). The samples were dehydrated using an ethanol series from 30 to 100 %, then embedded in acrylic resin. Ultrathin sections were cut and collected on uncoated nickel grids, and stained with uranyl acetate solution. The pictures were examined with a Hitachi H-7650 transmission electron microscope at 80 kV.

Zhang et al., « The Rice AAA-ATPase OsFIGNL1 Is Essential For Male Meiosis ». *Frontier in plant science*. September 2017, vol 8, article 1639.

Document 4. Électronographie des grains de pollen effectuées au MET et MEB



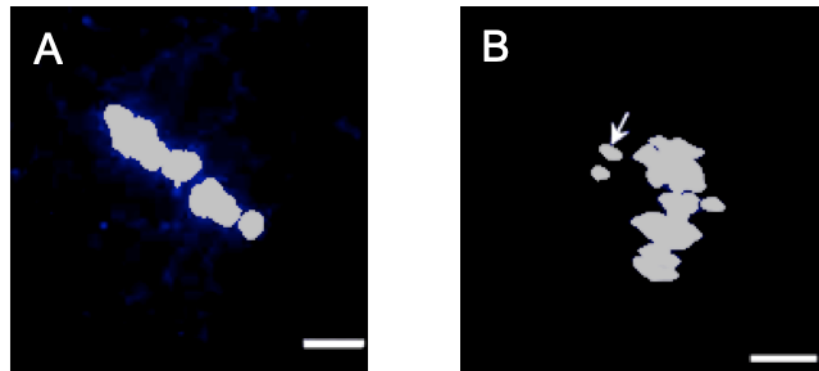
Grain de pollen mature d'une plante sauvage (A, C) et d'une plante mutante *osfignl1* (B, D).

Barres = 20 μm (A, B), 5 μm en (C, D).

st : starch granules : grains d'amidon

Zhang et al., *Frontier in plant science*. September 2017, vol 8, article 1639.
« The Rice AAA-ATPase OsFIGNL1 Is Essential For Male Meiosis ».

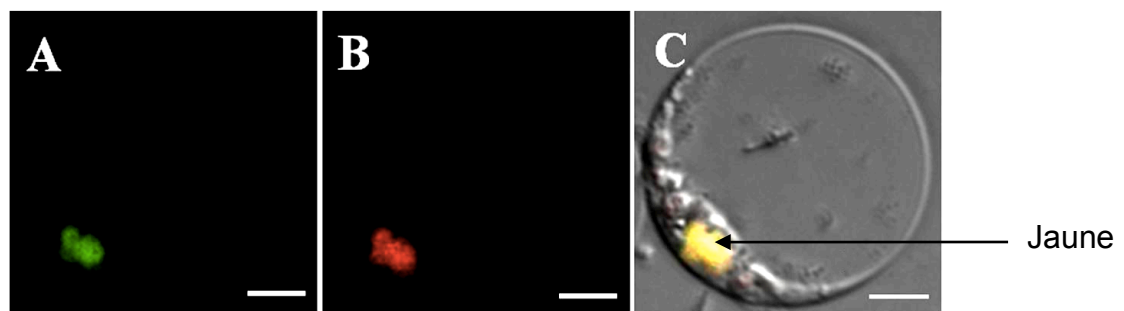
Document 5. Observation de la méiose dans une cellule de mutant mâle *osfign1* par microscopie à épifluorescence après marquage par le DAPI



Métaphase I de la méiose chez la plante sauvage (A) et chez le mutant *osfign1* (B).
Barres = 5 μ m.

Zhang et al., 2017. Frontier in plant science, vol 8, article 1639.

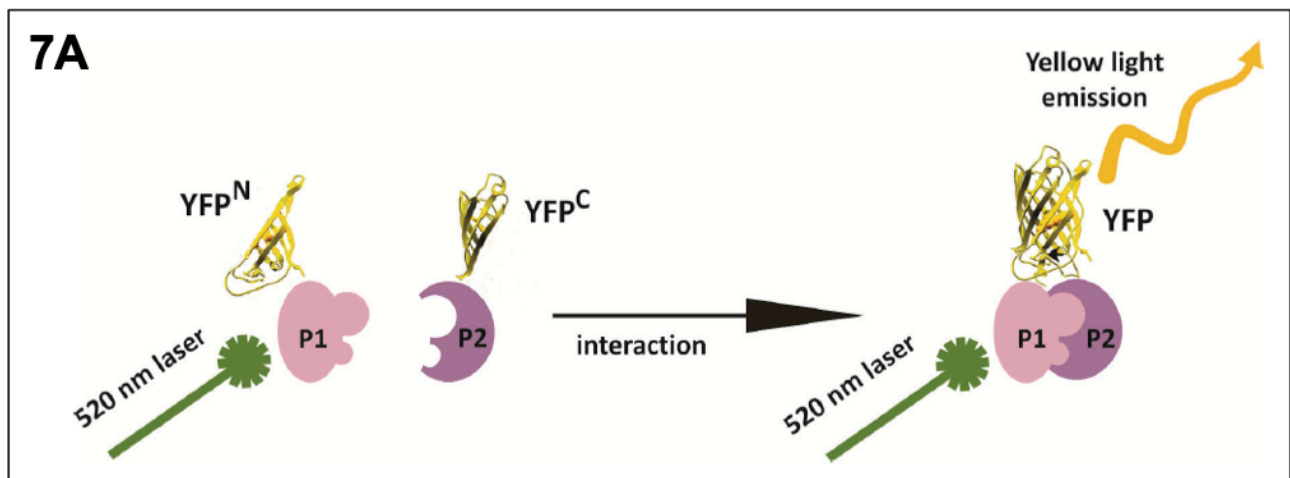
Document 6. Localisation subcellulaire de la protéine FIGNL1 dans des protoplastes de riz transformés avec la construction issue de la fusion du gène *osfign1* avec le gène de la protéine GFP par microscopie confocale



- (A) OsFIGNL1-GFP (signal vert obtenu).
- (B) OsMADS3-mCherry, utilisé comme marqueur nucléaire (signal rouge obtenu).
- (C) Superpositions des images A et B obtenues en microscopie confocale et de l'image obtenue en microscopie photonique à fond clair (signal jaune obtenu).

Zhang et al., 2017. Frontier in plant science, vol 8, article 1639.

Document 7. Étude de l'interaction des protéines FIGNL1 et RAD51 *in vivo* par la technique de la split-YFP (yellow fluorescent protein) / BiFC (complémentation de fluorescence bimoléculaire)

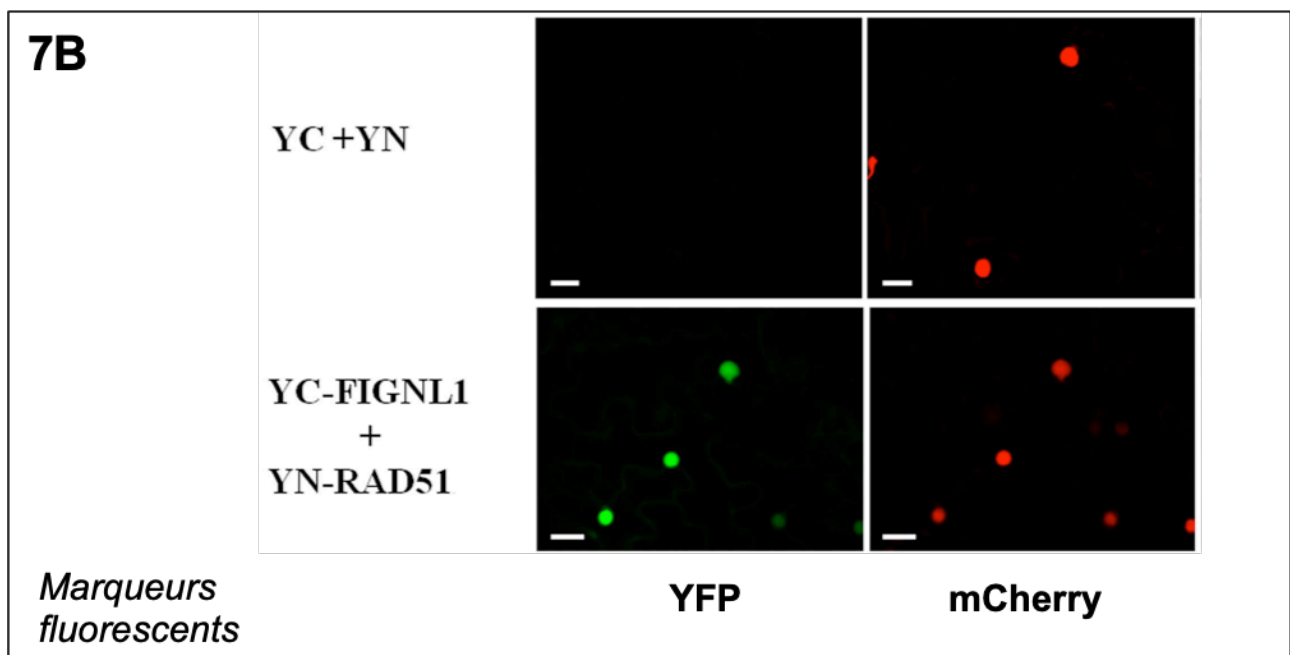


(7A) Principe de la technique du split-YFP.

La protéine YFP est séparée en deux moitiés non-fluorescentes, une partie *N*-terminale (YFP^N ou YN) et une partie *C*-terminale (YFP^C ou YC), qui sont fusionnées aux protéines d'intérêt (P1 et P2). La molécule YFP est alors reconstituée lors de l'interaction entre les protéines P1 et P2, ce qui aboutit à l'émission de fluorescence jaune quand le fluorochrome est excité à la longueur d'onde adaptée.

Horstman et al., *Int J Mol Sci.* 2014 Jun; 15(6): 9628–9643.

A Cautionary Note on the Use of Split-YFP/BiFC in Plant Protein-Protein Interaction Studies



(7B) Étude de l'interaction des protéines FIGNL1 et RAD51 de riz *in vivo* par la technique de la split-YFP / BiFC.

OsMADS3-mCherry est utilisé comme marqueur nucléaire. Barres = 20 µm.

Zhang et al., 2017. *Frontier in plant science*, vol 8, article 1639.

Session 2020 : 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.

2020 - U11 : Mathématiques

EXERCICE 1

A. Évolution de la population de poissons au fil des mois dans certains aquariums

- Réponse **d**. $10 \times 1,3^5 \approx 37,1$. Il y a donc 37 poissons au bout de 5 mois.
- Réponse **b**.
Les solutions de l'équation différentielle $y' + 0,3y = 0$ sont les fonctions définies sur $\mathbb{R}$ par $t \mapsto Ce^{-0,3t}$ où $C \in \mathbb{R}$.
Puisque $g(t) = Ce^{-0,3t}$ et $g(0) = 10$, on obtient $Ce^0 = 10$ soit $C = 10$.
Ainsi, on obtient finalement $g(t) = 10e^{-0,3t}$.

B. Étude statistique

- Tableau complété.
Attention, il y a une erreur d'énoncé. Les résultats ont été arrondis à 10^{-2}

Concentration en pesticide (en mg/l) (x_i)	0	1	4	5	6	7	8	10
Nombre d'œufs pondus dans le mois (N_i)	249	248	246	230	130	50	40	35
$y_i = -\ln\left(\frac{250}{N_i} - 1\right)$	5,52	4,82	4,12	2,44	0,08	-1,39	-1,66	-1,82

- La calculatrice fournit comme valeur $r \approx -0,95$.
Le coefficient de corrélation linéaire est proche de 1. On peut en conclure qu'un ajustement affine du nuage de la série $(x_i; y_i)$ est approprié.
- $y = -0,857x + 5,905$
- 4.a** Comme $y = -\ln\left(\frac{250}{N} - 1\right)$ et $y = -0,857x + 5,905$
alors $-\ln\left(\frac{250}{N(x)} - 1\right) = -0,857x + 5,905$
soit $\ln\left(\frac{250}{N(x)} - 1\right) = 0,857x - 5,905$
 $\Rightarrow \frac{250}{N(x)} - 1 = e^{0,857x - 5,905}$

4.b Comme $y = -\ln\left(\frac{250}{N} - 1\right)$ et $y = -0,857x + 5,905$
 $\Rightarrow \frac{250}{N(x)} - 1 = e^{0,857x - 5,905} \quad \Rightarrow \frac{250}{N(x)} = 1 + e^{0,857x - 5,905}$
 $\Rightarrow N(x) = \frac{250}{1 + e^{0,857x - 5,905}}$

C. Étude de la fonction

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

$$\lim_{x \rightarrow +\infty} 0,9x = +\infty \Rightarrow \lim_{x \rightarrow +\infty} e^{0,9x} = +\infty \Rightarrow \lim_{x \rightarrow +\infty} 1 + 0,003e^{0,9x} = +\infty$$

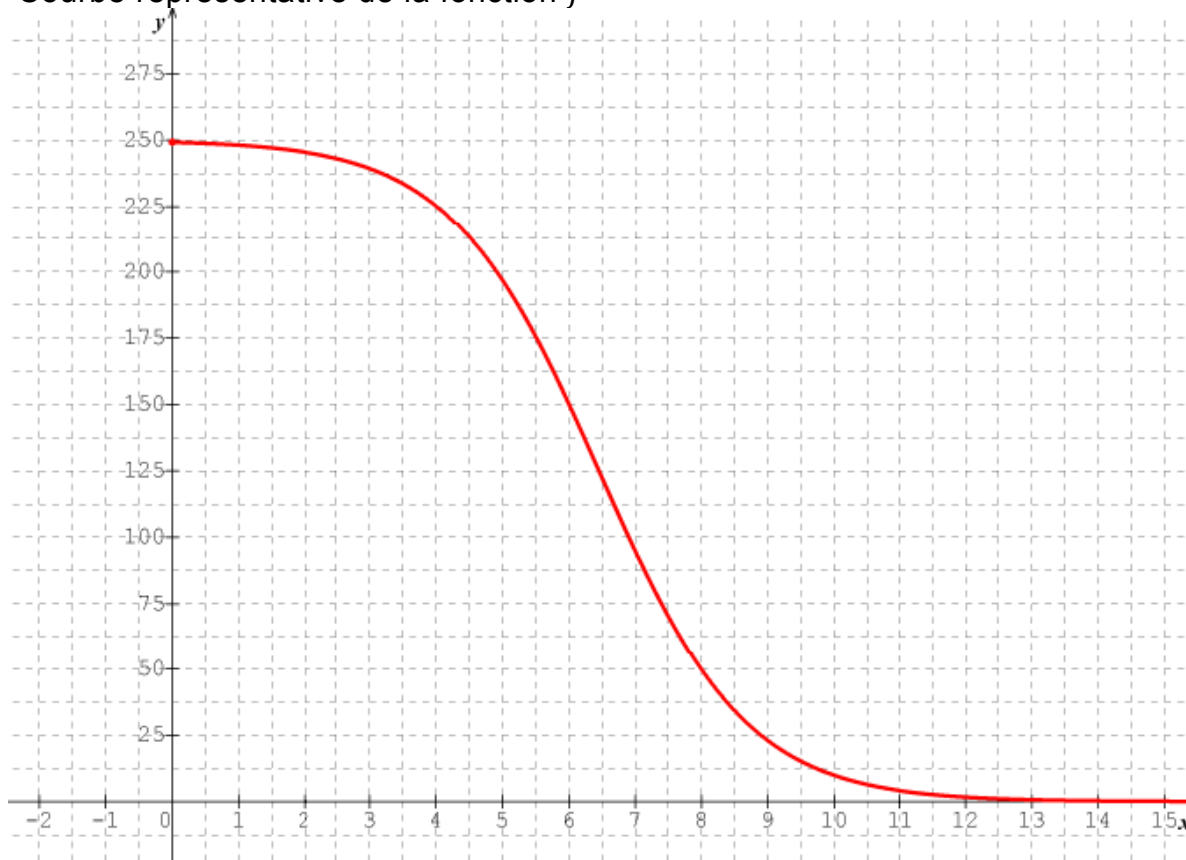
$$\lim_{x \rightarrow +\infty} \frac{250}{1 + 0,003e^{0,9x}} = 0$$

2.a Pour tout $x \in [0; +\infty[$, $f'(x) = 250 \times -\frac{0,003 \times 0,9e^{0,9x}}{(1 + 0,003e^{0,9x})^2} = \frac{-0,675e^{0,9x}}{(1 + 0,003e^{0,9x})^2}$

2.b $f'(x) < 0$ pour tout $x \in [0; +\infty[$ car $e^{0,9x} > 0$ et $(1 + 0,003e^{0,9x})^2 > 0$

Par conséquent, f est strictement décroissante sur $[0; +\infty[$.

3. Courbe représentative de la fonction f



4. Si l'eau est sans pesticide, le nombre de poissons est égal à $f(0) = \frac{250}{1,003} \approx 249,3$.

On cherche donc la concentration x qui correspond donc la moitié de $f(0)$ soit environ 124,6.

Par lecture graphique, à l'aide du mode GRAPH de la calculatrice, on obtient $x = 6,5$ mg/l.

Par le calcul, on peut également résoudre l'équation $f(x) = \frac{250}{2,006}$:

$$\frac{250}{1 + 0,003e^{0,9x}} = \frac{250}{2,006} \Rightarrow 1 + 0,003e^{0,9x} = 2,006 \Rightarrow e^{0,9x} = \frac{1,006}{0,003}$$

$$\Rightarrow x = \frac{\ln\left(\frac{1,006}{0,003}\right)}{0,9} \approx 6,5.$$

$$\begin{aligned}
 5. \quad \frac{1}{6-4} \int_4^6 f(x) dx &= \frac{1}{2} [F(6) - F(4)] \\
 &= \frac{1}{2} \left[-\frac{2500}{9} \ln(e^{-5,4} + 0,003) + \frac{2500}{9} \ln(e^{-3,6} + 0,003) \right] \approx 194
 \end{aligned}$$

Il y a donc 194 œufs pondus en moyenne par mois pour des concentrations en pesticides comprises entre 4 et 6 mg/l.

EXERCICE 2

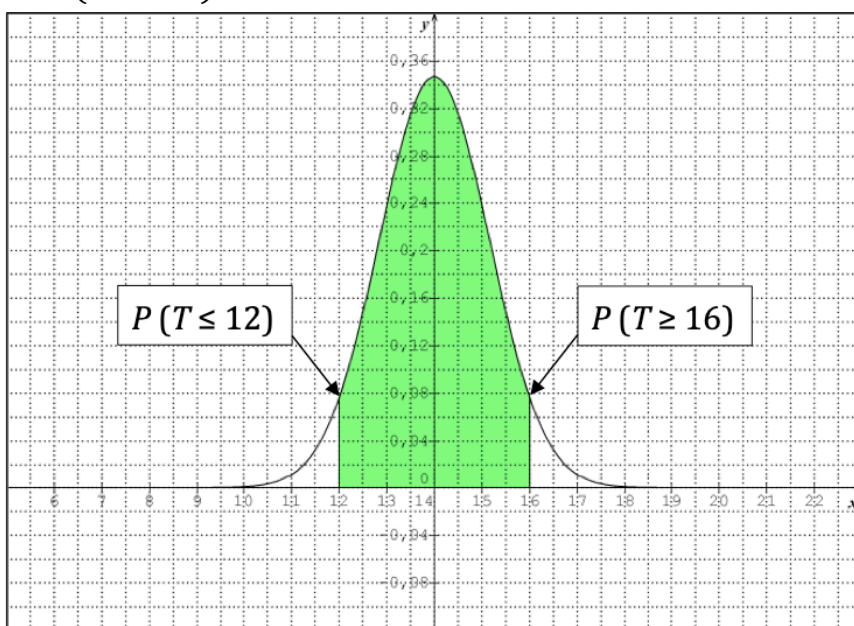
A. Étude du taux d'hémoglobine chez la femme en France

1. $P(T \leq 12) \approx 0,041$

2. $P(T \geq 16) \approx 0,041$.

En effet, par symétrie de la courbe de Gauss par rapport à μ qui vaut 14, on a :

$$P(T \leq 12) = P(T \geq 16)$$



B. Prévisions d'erreurs d'analyses

1. On répète 300 fois de manière indépendante une même épreuve qui admet deux issues :

succès : « l'analyse est erronée »	$p = 0,005$
échec : « l'analyse est exacte »	$1-p = 0,995$

X , nombre de succès, suit donc la loi binomiale de paramètres 300 et 0,005.

- 2a. La probabilité qu'aucune des 300 analyses de l'échantillon ne soit erronée est égale à $P(X = 0) \approx 0,222$

- 2b. $P(2 \leq X \leq 4) = P(X = 2) + P(X = 3) + P(X = 4) \approx 0,424$.

La probabilité qu'il y ait de 2 à 4 analyses erronées parmi les 300 analyses de l'échantillon est égale à environ 0,424.

C. Délai des résultats des analyses du taux d'hémoglobine

1. On pose $Z = \frac{\bar{Y}-60}{1,5}$. Ainsi Z suit la loi normale centrée réduite.

$$P(60 - h \leq \bar{Y} \leq 60 + h) = P\left(-\frac{h}{1,5} \leq Z \leq \frac{h}{1,5}\right) = 0,95$$

$$\Rightarrow \frac{h}{1,5} \approx 1,96 \Rightarrow h \approx 2,94$$

2. Règle de décision du test : on prélève un échantillon de 100 analyses et on calcule le délai moyen pour fournir le résultat m :
- si $m \in I \approx [57,06; 62,94]$, on accepte H_0 et on rejette H_1 ;
 - si $m \notin I \approx [57,06; 62,94]$, on rejette H_0 et on accepte H_1 .
3. $62,5 \in I \approx [57,06; 62,94]$; on accepte l'hypothèse H_0 et on rejette H_1 .
On peut conclure que le laboratoire a raison quand il affirme que le délai moyen pour fournir les résultats d'une analyse du taux d'hémoglobine est de 60 minutes.

2020 - U12 : Sciences physiques et chimiques

I. DIFFRACTION ET SÉLECTION D'UNE LONGUEUR D'ONDE

1. Du phénomène de diffraction à la structure d'une protéine

1.1. Diffraction à travers une fente

$$1.1.1. \quad d = \frac{2 \lambda \cdot D}{a} \quad \text{donc } a = \frac{2 \lambda \cdot D}{d}$$

$$a = \frac{2 \times 635 \times 10^{-9}}{2,1 \times 10^{-2}} = 6,05 \times 10^{-5} \text{ m} = 60,5 \text{ } \mu\text{m}$$

1.1.2. D'après la relation précédente, la largeur d de la tache centrale de diffraction diminue lorsque la largeur a de la fente augmente.

1.2. Les figures de diffraction dépendent de la largeur (taille) et de la forme (géométrie) de l'objet.

1.3. Application à la cristallographie des protéines

D'après le document 2, la longueur d'onde doit être du même ordre de grandeur que les dimensions et les détails de l'objet à analyser. Par conséquent, pour observer des détails de l'ordre de grandeur des distances entre les atomes soit du diamètre des atomes (10^{-10} m), on doit utiliser des rayons X ($\lambda = 5.10^{-11}$ m et 10^{-8} m).

2. Comment sélectionner une longueur d'onde ?

2.1. L'énergie d'un photon est donnée par la relation de Planck : $E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$ soit $\lambda = \frac{h \cdot c}{E}$

Pour $E_1 = 13,5 \text{ eV} = 13,5 \times 1,6 \times 10^{-19} \text{ J}$

$$\lambda_1 = \frac{6,63 \times 10^{-34} \times 3,00 \times 10^8}{13,5 \times 1,6 \times 10^{-19}} = 9,21 \times 10^{-8} \text{ m} = 92,1 \text{ nm}$$

Pour $E_2 = 14,5 \text{ eV} = 14,5 \times 1,6 \times 10^{-19} \text{ J}$

$$\lambda_2 = \frac{6,63 \times 10^{-34} \times 3,00 \times 10^8}{14,5 \times 1,6 \times 10^{-19}} = 8,57 \times 10^{-8} \text{ m} = 85,7 \text{ nm}$$

Les longueurs d'onde émises sont comprises entre 92,1 nm et 85,7 nm.

2.2. On utilise la formule des réseaux par transmission : $\sin i' - \sin i = k \cdot n \cdot \lambda$

Pour un ordre 1, $k = 1$

En incidence normale, $i = 0^\circ$ soit $\sin i = 0$

La formule simplifiée sera alors : $\sin i' = n \cdot \lambda$

Pour $n = 2400 \times 10^3 \text{ traits / m}$ et $\lambda_1 = 92,1 \text{ nm}$, $\sin i'_1 = 0,2210$ soit $i'_1 = 12,8^\circ$

Pour le même réseau (réseau 2) et $\lambda_2 = 85,7 \text{ nm}$, $\sin i'_2 = 0,2057$ soit $i'_2 = 11,9^\circ$

2.3. L'écart angulaire $\Delta i' = i'_1 - i'_2 = 12,8 - 11,9 = 0,9^\circ$

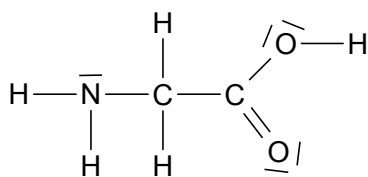
2.4. L'écart angulaire étant plus important pour le réseau 3, cela facilitera la séparation de deux longueurs d'onde.

2.5. D'après la relation $\sin i' - \sin i = n \cdot \lambda$, si l'on veut garder un écart angulaire équivalent, pour une longueur d'onde plus petite (comme celle des rayons X), il faudra utiliser un réseau dont le nombre de traits par millimètre est beaucoup plus important.

II. LA GLYCINE

1. Étude de la molécule de glycine

1.1. Représentation de Lewis de la glycine :

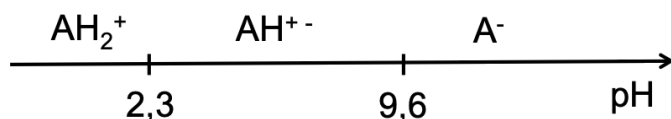


1.2. L'atome d'azote est lié à 3 substituants et il possède 1 doublet non liant, il est donc de la forme AX_3E . Sa géométrie sera celle d'un tétraèdre déformé, plus exactement il aura une géométrie pyramidale à base trigonale.

1.3. Formule semi-développée du zwitterion de la glycine : $H_3N^+ - CH_2 - COO^-$

2. La glycine en solution aqueuse

2.1. La forme acide prédomine pour $pH < pK_A$, la forme basique pour $pH > pK_A$.



2.2. Le pH d'une solution aqueuse d'un ampholyte est : $pH = \frac{1}{2} (pK_{A1} + pK_{A2})$

$$pH = \frac{1}{2} (2,3 + 9,6) = 5,95 \approx 6,0$$

3. Dosage de la forme acide de la glycine $AH_{2(aq)}^+$

3.1. À la première équivalence :

3.1.1. La réaction support du dosage est : $AH_{2(aq)}^+ + HO_{(aq)}^- \rightleftharpoons AH_{(aq)}^{+-} + H_2O(l)$

3.1.2. La constante d'équilibre de cette réaction est :

$$K = \frac{[AH_{(aq)}^{+-}]_{\text{éq}}}{[AH_{2(aq)}^+]_{\text{éq}} \cdot [HO_{(aq)}^-]_{\text{éq}}}$$

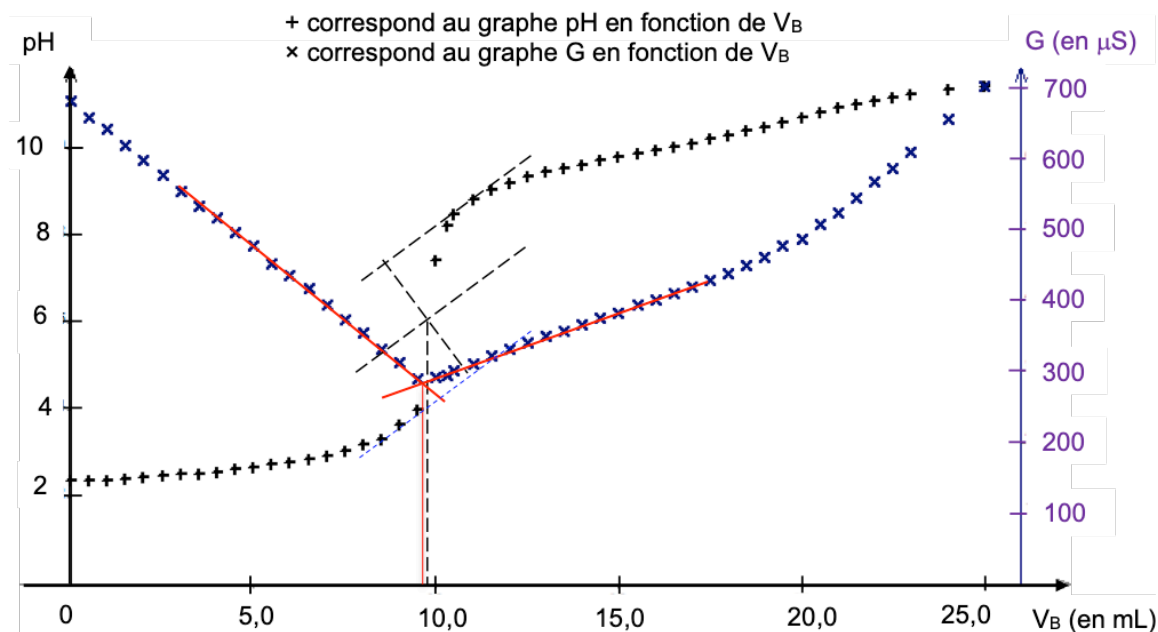
$$\text{On peut également écrire } K = \frac{[AH_{(aq)}^{+-}]_{\text{éq}} \cdot [H_3O_{(aq)}^+]}{[AH_{2(aq)}^+]_{\text{éq}} \cdot [HO_{(aq)}^-]_{\text{éq}} \cdot [H_3O_{(aq)}^+]} = \frac{K_{A1}}{K_e}$$

$$\text{D'où } K = \frac{10^{-2,3}}{10^{-14}} = 10^{11,7} = 5,0 \times 10^{11}$$

3.1.3. $K > 10^4$ donc la réaction est totale. Pour un dosage, il faut que la réaction support soit totale : on en conclut que cette réaction peut être utilisée pour un dosage.

- 3.1.4. Détermination de la concentration de la solution en $\text{AH}_2^+(\text{aq})$ par conductimétrie en utilisant le point de croisement des deux droites sur la courbe $G = f(V_B)$ (traits de construction en traits pleins sur la figure ci-dessous) : on obtient un volume équivalent (V_{BE}) d'environ $V_{BE} = 10,0 \text{ mL}$ (entre 9 mL et 11 mL).

Détermination de la concentration de la solution en $\text{AH}_2^+(\text{aq})$ par pH-métrie en utilisant la méthode des tangentes (traits de construction en pointillés sur la figure ci-dessous) : sur la courbe $\text{pH} = f(V_B)$ on obtient le même volume équivalent V_{BE} , autour de 10 mL.



À l'équivalence, le réactif titrant et le réactif titré sont dans les proportions stœchiométriques :

$$n(\text{AH}_2^+)_i = n(\text{HO}^-)_{\text{versé}} \quad \text{soit } C_A \cdot V_A = C_B \cdot V_{BE}$$

$$C_A = \frac{C_B \cdot V_{BE}}{V_A} = \frac{1,00 \times 10^{-1} \times 10,0}{10,0} = 1,00 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

- 3.1.5. À la première équivalence, l'espèce majoritaire est AH^{+-} : tout AH_2^+ a été consommé et il s'est formé AH^{+-} .

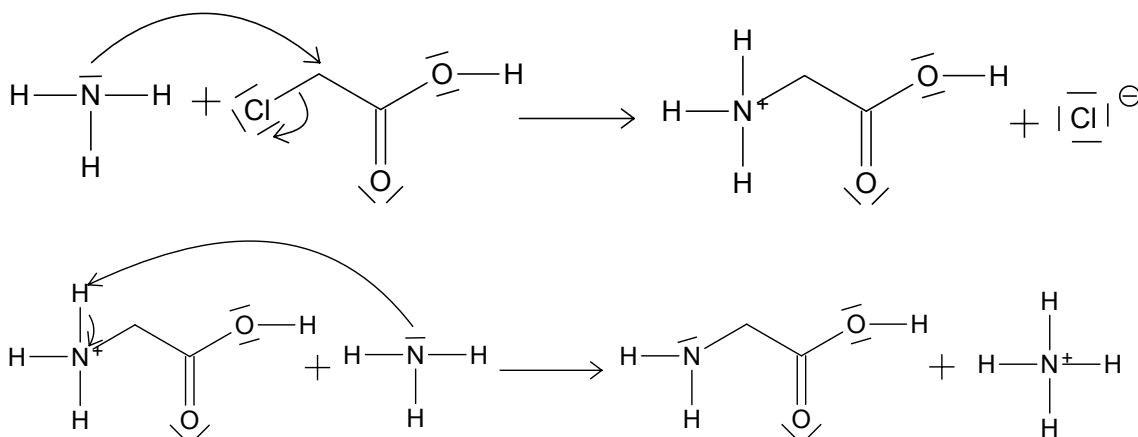
- 3.2. La courbe représentant le $\text{pH} = f(V_B)$, montre un deuxième saut de pH non exploitable.

En revanche, on peut observer une rupture de pente pour la courbe $G = f(V)$ en correspondance de la deuxième équivalence. Cette dernière peut donc être utilisée pour déterminer la deuxième équivalence.

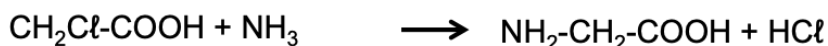
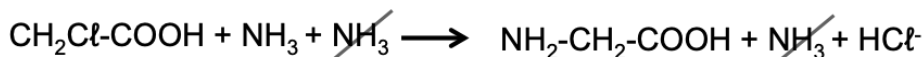
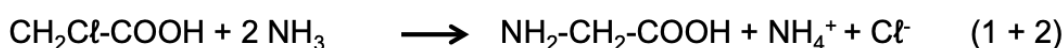
III. LA CHIMIE ORGANIQUE AUTOUR DES ACIDES α -AMINÉS

1. Synthèse de la glycine

1.1.



1.2. L'équation de la réaction s'écrit :

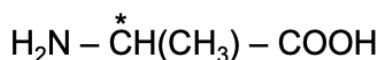


1.3. Il s'agit d'une réaction de substitution nucléophile.

2. La molécule d'alanine

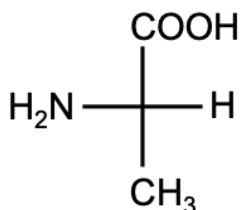
2.1.

2.1.1. L'alanine possède deux stéréoisomères car elle ne possède qu'un carbone asymétrique :

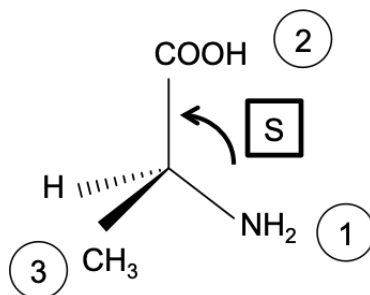


2.1.2. Ces stéréoisomères sont des énantiomères car images l'un de l'autre dans un miroir, non superposables.

2.2. Pour réaliser la représentation de Fischer de la molécule de L-alanine, on place la chaîne carbonée la plus longue verticalement, la fonction la plus oxydée en haut (ici COOH). La fonction amine NH_2 doit être à gauche pour avoir la (L)-alanine.



- 2.3. Representation de Cram de la molécule de (L)-alanine de configuration absolue S :



Les substituants sont d'abord classés selon les règles C.I.P. :

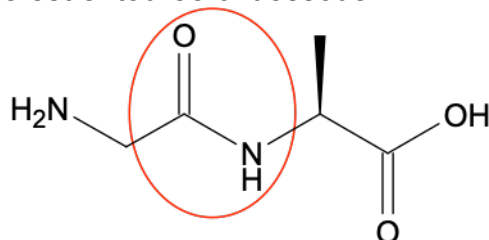
$\text{NH}_2 > \text{COOH} > \text{CH}_3 > \text{H}$

Le sens de rotation est ensuite défini de la façon suivante : on regarde le carbone asymétrique avec le constituant 4 (le plus faible) vers l'arrière, puis pour aller de 1 à 3, on tourne dans le sens trigonométrique ou anti-horaire : donc il s'agit du stéréoisomère S.

- 2.4. Le spectre RMN de la (L)-alanine présente deux groupements de signaux.
 Un doublet à 1,5 ppm : noyaux d'hydrogène du CH_3 car il y a un seul noyau d'hydrogène sur le carbone voisin d'où le doublet.
 Un quadruplet à 3,8 ppm : noyaux d'hydrogène du CH car il y a trois noyaux d'hydrogène sur le carbone voisin d'où le quadruplet. Ce signal a un déplacement chimique plus important car il est plus proche des atomes d'oxygène très électronégatifs.

3. Formation de la liaison peptidique entre la glycine et l'alanine

- 3.1. La liaison peptidique est entourée ci-dessous :



- 3.2. $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH} + \text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}$
- 3.3. Lors de la réaction entre la glycine et l'alanine trois autres dipeptides peuvent également être formés : par exemple, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$.
- 3.4.
- 3.4.1. $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH} + \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{OH} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 + \text{H}_2\text{O}$
- 3.4.2. Il s'agit d'une réaction d'estérification (réaction de substitution nucléophile)
- 3.4.3. C'est une réaction lente, limitée et athermique.
- 3.4.4. Il faudrait bloquer la fonction amine de la glycine.

2020 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Étude des mécanismes de résistance d'une bactérie entomopathogène aux peptides antimicrobiens de son hôte

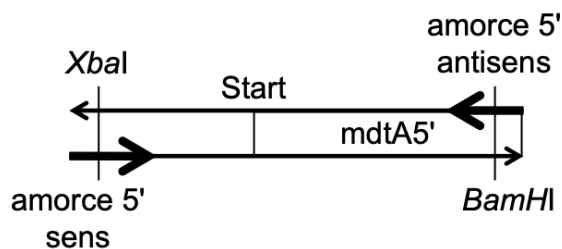
1. Caractérisation de l'opéron *mdtABC* de *P. luminescens*

- 1.1. Dans un premier temps, une recherche des loci associant plusieurs ORF est effectuée au sein du génome de *Photobacterium luminescens* (logiciel ORF Finder). Les séquences de ces ORF sont ensuite traduites *in silico* puis alignées contre des séquences protéiques dont la fonction est connue, afin d'identifier d'éventuelles homologues (logiciel BLASTx ou logiciels Transeq + BLASTp).
- 1.2. Une ORF ou « Open Reading Frame » (cadre de lecture ouvert) est une séquence ininterrompue de codons, débutant par un codon start et finissant par un codon stop, suffisamment longue pour coder une protéine (au moins 300 nucléotides), mais sans que l'existence réelle de cette protéine ait été prouvée.
- 1.3. Les valeurs de E-value (ou Expect value) sont attendues très faibles (voire nulles), ce qui permet d'affirmer que l'alignement proposé n'a pas été obtenu par hasard. L'analyse de l'alignement des séquences est donc possible.
- 1.4. L'alignement des séquences protéiques montre une homologie supérieure à 70 % entre les trois protéines étudiées et les protéines équivalentes chez *E. coli* (70 %, 78 % et 76 % d'homologie pour les protéines MdtA, MdtB et MdtC, respectivement). D'après Joshi et Xu, la probabilité que les protéines MdtA, MdtB et MdtC de *P. luminescens* participent au même processus biologique que celles d'*E. coli* (pompe à efflux MdtABC) est donc de 90 %.
- 1.5. Un opéron est un ensemble de séquences codant des protéines (cds) participant à une même fonction biologique, placées sous le contrôle d'un même promoteur inductible et donc dont l'expression est soumise aux mêmes régulations.

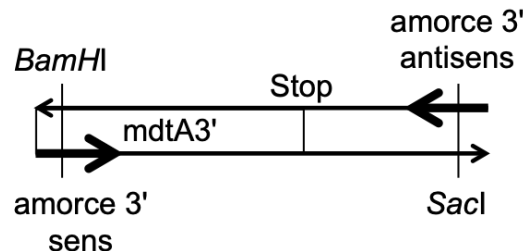
2. Production d'une souche de *P. luminescens* mutée sur *mdtA*

- 2.1. Le phénol et le chloroforme sont des solvants organiques permettant la dénaturation des protéines, ce qui permet de les séparer de l'ADN (restant en phase aqueuse). Le chloroforme permet également d'éliminer les traces de phénol qui pourraient entraver les utilisations ultérieures des ADN extraits.
Les RNases permettent d'hydrolyser les ARN extraits en même temps que l'ADN.

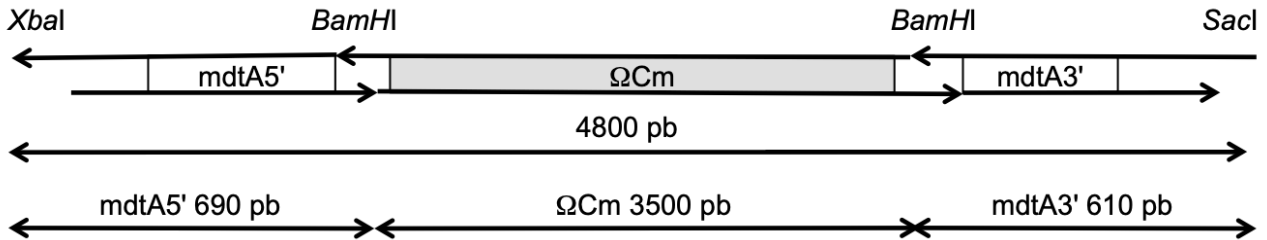
2.2. Amplicon *mdtA5'*



Amplicon *mdtA3'*



2.3. Après digestion et ligature, la cassette d'expression est la suivante :

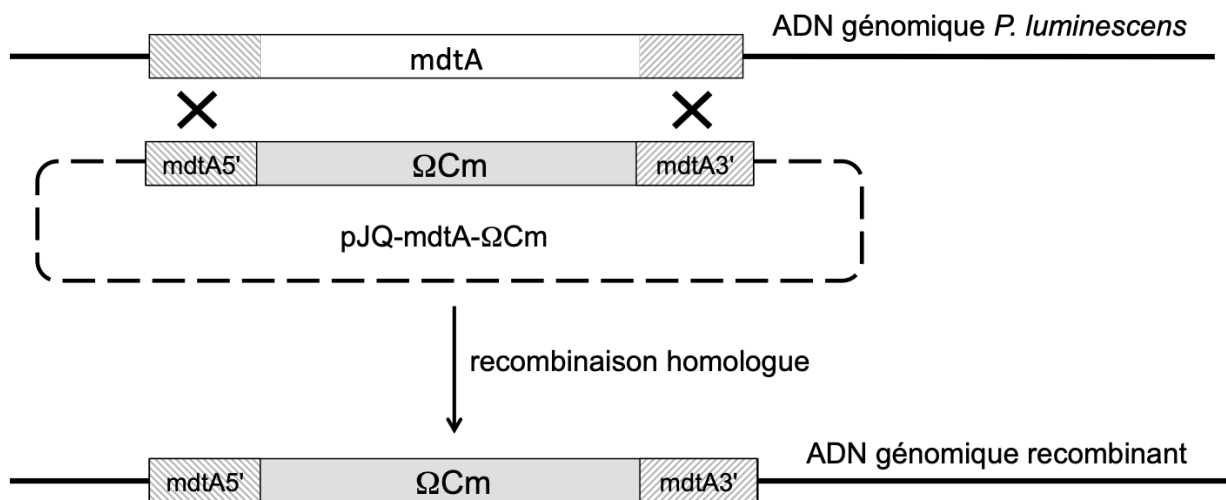


2.4. Les sites de restriction utilisés pour intégrer la cassette *mdtA5'-ΩCm-mdtA3'* dans le plasmide pJQ200SK sont ceux situés aux extrémités de cette cassette : *Xba* I et *Sac* I. Ces sites de restrictions sont également présents dans le site multiple de clonage de pJQ200SK.

2.5. Électroporation : application d'un champ électrique bref et intense à un mélange de bactéries et d'ADN à transformer ; le champ électrique crée des nanopores réversibles dans les enveloppes bactériennes et permet l'entrée du vecteur dans les cellules.

Transformation chimique : fragilisation des enveloppes bactériennes par traitement chimique (chlorure de calcium), puis mise en présence des bactéries chimio-compétentes et de l'ADN à transformer ; l'application d'un choc thermique permet de créer des nanopores réversibles dans les enveloppes bactériennes et de faire entrer le vecteur dans les cellules.

2.6. À l'issue de la recombinaison, la séquence codante du gène *mdtA* de *Photorhabdus luminescens* a été partiellement déléetée, d'où l'appellation Δ *mdtA*.



2.7. Après recombinaison, le génome de *P. luminescens* Δ *mdtA* possède la cassette de résistance ΩCm, ce qui confère aux bactéries recombinantes la résistance au chloramphénicol.

L'ajout de chloramphénicol au milieu de culture permet donc sélectionner les colonies *P. luminescens* Δ *mdtA*.

2.8. La qualité ou intégrité des ARN totaux peut être vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose ou par électrophorèse capillaire (puce Agilent).

La concentration des ARN est évaluable par spectrophotométrie UV (en cuve ou nanodrop) ou par fluorimétrie.

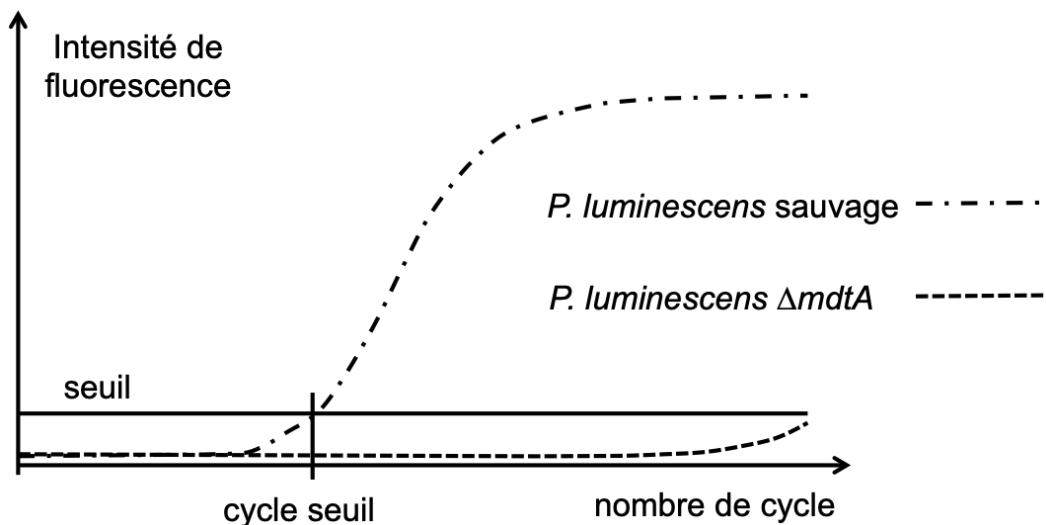
2.9. Les amorces « random hexamers » permettent d'initier la synthèse du premier brin d'ADN complémentaire par la rétrotranscriptase.

2.10. La spécificité de l'amplification peut être étudiée par la réalisation d'une courbe de fusion à l'issue de l'amplification. Cette courbe permet de visualiser la dénaturation de tous les ADN double brin présents (diminution de la fluorescence émise par le Sybr®Green lorsqu'il est dissocié des ADN double brin) et de déterminer leur température de fusion (T_m).

Dans le cas d'une amplification spécifique, les amplicons sont identiques, et une seule T_m est visualisée.

Dans ce cas la courbe directe (fluorescence) = $f(\text{température})$ présente un seul point d'inflexion, et la courbe dérivée $d(\text{fluorescence}) = f(\text{température})$ montre un seul pic pour la valeur de T_m .

2.11. Dans la souche *P. luminescens* $\Delta mdtA$, le gène *mdtA* n'est pas transcrit, il n'y a donc pas d'ADN complémentaire correspondant à l'ARNm *mdtA* après l'étape de RT, et donc pas d'amplification avec les amorces spécifiques de *mdtA*.



3. Étude de l'expression de l'opéron *mdtABC* et de son rôle dans la pathogénicité de *P. luminescens*

3.1. La GFP est une protéine naturellement fluorescente, donc facilement repérable. Lorsque la séquence codant la GFP est placée en aval d'un promoteur à étudier, l'émission d'une fluorescence permet de mettre en évidence l'activité de ce promoteur. Dans le cas des expériences *in vivo*, l'émission de fluorescence permet également de montrer la présence des bactéries dans les tissus étudiés.

L'émission d'une fluorescence permet de mettre en évidence l'activité du promoteur situé en amont de la séquence codant la GFP, et dans le cas des expériences *in vivo*, la présence des bactéries dans les tissus étudiés.

3.2. Un promoteur constitutif n'est pas régulé, les séquences codantes situées en aval sont exprimées en permanence.

La souche de *P. luminescens* porteuse de p_{lac} -gfp permet donc

- de valider l'infection des larves par la souche lors des expériences *in vivo*
- de localiser les bactéries dans la larve infectée lors des expériences *in vivo*
- de fournir une valeur de référence pour la normalisation des résultats (valeur de fluorescence maximale)

- 3.3. Les larves infectées par la souche *P. luminescens* porteuse de p_{lac} -gfp montrent une forte fluorescence à la fois dans l'hémolymphe et dans l'organe hématopoïétique. Le protocole d'infection des larves par la souche bactérienne est donc validée, et après infection, les bactéries sont présentes dans ces deux tissus. Les larves infectées par la souche *P. luminescens* porteuse de p_{mdtA} -gfp montrent une absence de fluorescence dans l'hémolymphe, mais une forte fluorescence dans l'organe hématopoïétique. Le promoteur p_{mdtA} est donc fortement actif que dans l'organe hématopoïétique des larves, et pas dans l'hémolymphe.
- 3.4. L'histogramme présente les résultats de fluorescence de la GFP exprimée sous le contrôle du promoteur p_{mdtA} -gfp, normalisés par rapport à la fluorescence de la GFP exprimée de façon constitutive par le promoteur p_{lac} -gfp. La condition « LB », sans ajout d'extraits tissulaires dans le milieu de culture de *P. luminescens* porteuse de p_{mdtA} -gfp, est utilisée comme référence. Lorsque des extraits plasmatiques sont ajoutés dans le milieu de culture, la fluorescence paraît diminuée (d'un facteur 5), mais cette diminution n'est statistiquement pas significative (absence d'astérisque). Lorsque des extraits d'organe hématopoïétique (HO) sont ajoutés dans le milieu de culture, la fluorescence est significativement augmentée, d'environ 10 fois. Ces résultats sont donc en accord avec ceux du document 3 : le promoteur p_{mdtA} est actif en présence d'extrait HO ou dans le tissu hématopoïétique, et est inactif dans l'hémolymphe.
- 3.5. L'activation du promoteur p_{mdtA} est probablement liée à la présence de protéines produites dans les tissus hématopoïétiques de la larve d'insecte (et absents de l'hémolymphe). Le promoteur p_{mdtA} pourrait être directement activé par une de ces protéines qui agirait comme un facteur de transcription après entrée dans la cellule bactérienne. Une autre possibilité serait que ces protéines se fixent sur un récepteur de surface de *Photobacterium luminescens*, provoquant une activation indirecte du promoteur p_{mdtA} via un facteur de transcription bactérien.

2020 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Conception d'une xylanase multimodulaire

1. Caractérisation de la xylanase de *Neocallimastix patriciarum*

1.1. La xylanase catalyse la rupture d'une liaison covalente avec intervention d'une molécule d'eau. Il s'agit donc d'une réaction d'hydrolyse, catalysée par une hydrolase, soit la classe 3 des enzymes.

1.2. D'après le document 2

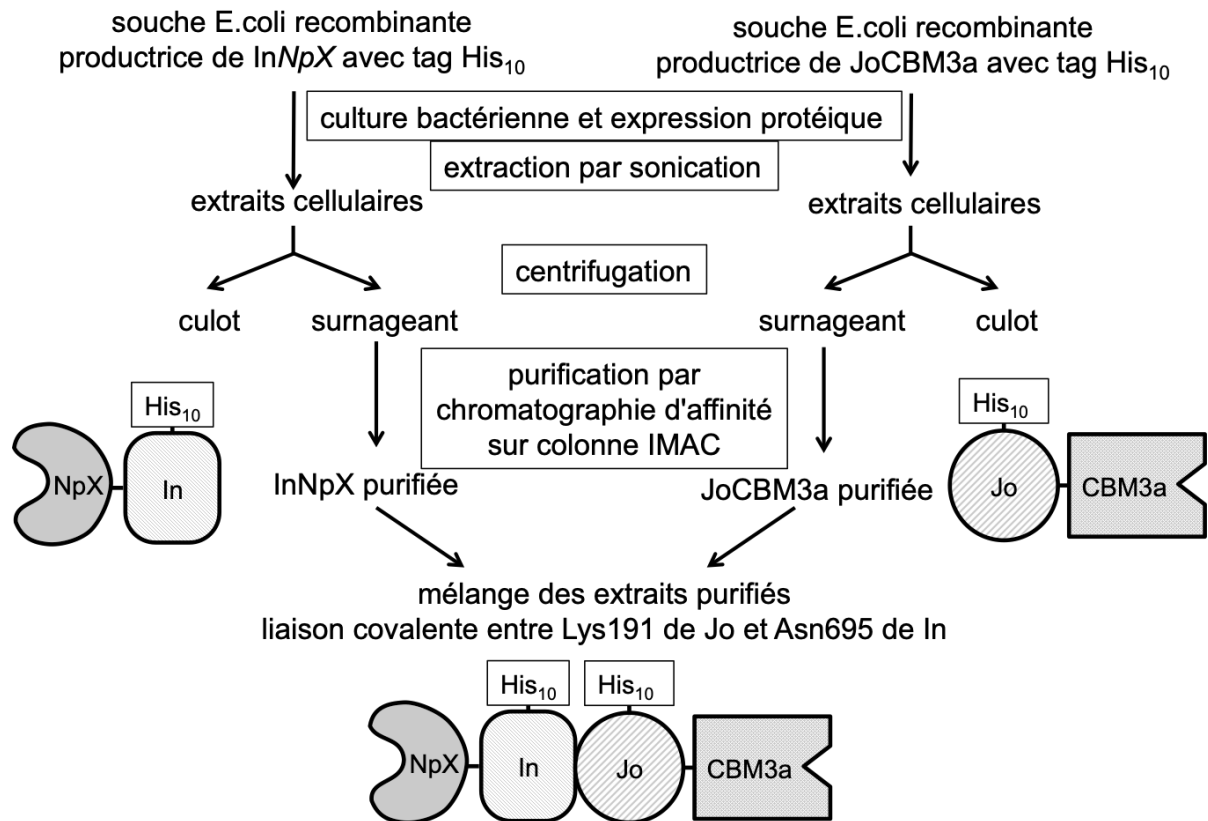
	Organisation spatiale	Liaisons stabilisatrices
Hélices α	Structure hélicoïdale du squelette peptidique Chaines latérales des acides aminés orientées vers l'extérieur, perpendiculairement à l'axe de l'hélice	liaisons hydrogène s'établissant entre les C=O et N-H des liaisons peptidiques d'une même chaîne peptidique
Feuillets β	Brins β organisés en feuillets plissés antiparallèles (et peut-être mixtes) Chaines latérales des acides aminés orientées de part et d'autre du plan du feuillet	
Coudes β	Repliement de la chaîne permettant un changement brutal de direction du squelette peptidique	

1.3. Deux acides glutamiques sont impliqués dans la catalyse, en position 113 et 202. Leur chaîne latérale porte un groupement acide carboxylique $-\text{COOH}$ (ionisable en $-\text{COO}^-$) qui peut participer à des catalyses de type « acide-base ».

2. Construction d'une xylanase multimodulaire via le système Jo-In

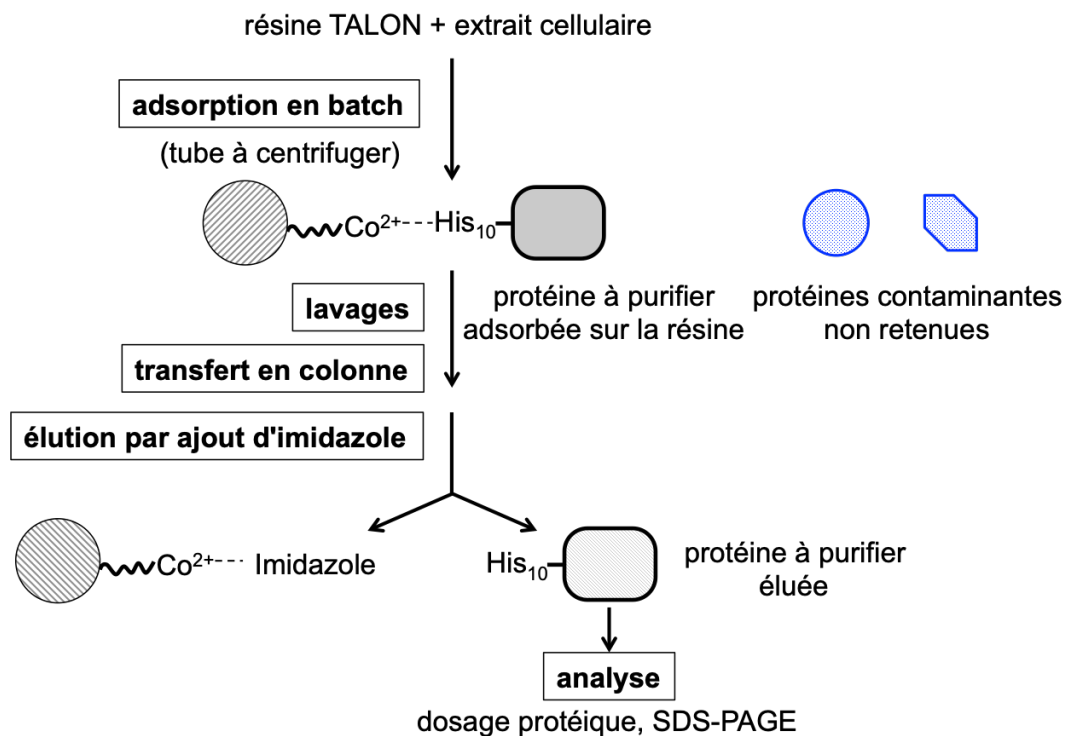
2.1. Un domaine protéique est une région bien délimitée d'une protéine, se repliant de manière indépendante du reste de la protéine, et conférant à cette protéine une fonction biologique particulière.

2.2.



2.3. Les ions cobalt Co^{2+} de la résine TALON[®] sont capables de s'associer avec les noyaux imidazole des chaînes latérales des histidines par des liaisons de coordinance. Les protéines portant un tag histidine sont particulièrement retenues sur ce type de colonne. L'élution est assurée par l'ajout d'imidazole à forte concentration (500 mM), qui va entrer en compétition avec les histidines et se fixer à leur place sur la colonne, libérant ainsi les protéines initialement adsorbées sur la colonne IMAC, dont les protéines InNpX et JoCBM3a.

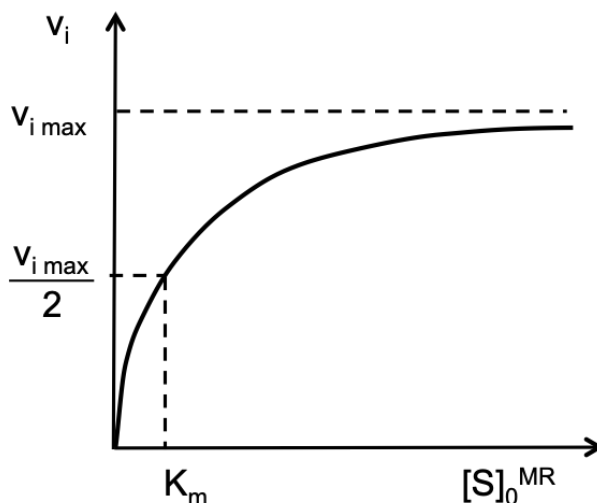
2.4.



- 2.5. Le SDS est un détergent anionique permettant de dénaturer les protéines et de leur conférer une charge négative uniforme, en masquant leur charge intrinsèque. Dans ces conditions, la vitesse de migration des protéines dans un gel de polyacrylamide sous l'action d'un champ électrique ne dépend que de leur masse moléculaire (et de leur conformation).
- 2.6. L'observation de nombreuses bandes dans les puits C et SN signe la présence de nombreuses protéines, ce qui est cohérent avec une lyse totale des bactéries par sonication. Les protéines extraites sont majoritairement solubles.
Une bande plus intense à environ 29 kDa, taille attendue pour la protéine JoCBM3a, est présente aussi bien dans le culot que dans le surnageant.
La production de JoCBM3a par les bactéries recombinantes semble donc efficace.
Le dépôt de l'extrait purifié par chromatographie d'affinité montre une bande majoritaire d'environ 29 kDa, correspondant probablement à JoBCM3a, mais aussi quelques bandes supplémentaires moins intenses de taille supérieure.
La purification de JoCBM3a n'est donc pas totalement efficace. En effet il peut exister des protéines possédant un enchainement de plusieurs histidines produites naturellement chez *E.coli*, et qui peuvent donc être adsorbées sur la résine TALON®.

3. Évaluation de l'efficacité catalytique de la xylanase multimodulaire

- 3.1. L'activité spécifique de la xylanase NpX sauvage est environ 2,5 fois plus élevée que celle de la xylanase multimodulaire InNpX-JoCBM3a. Cet écart est significatif compte-tenu de l'incertitude des mesures (Z_{sp} de NpX sauvage comprise entre 3 et $7 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, Z_{sp} de InNpX-JoCBM3a comprise entre 1,6 et $2,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$).
- 3.2. La constante de Michaelis K_M est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale.



Par report graphique, les K_M de la xylanase sauvage NpX et de la xylanase InNpX sont d'environ $0,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivement. L'ordre de grandeur est donc le même que celui proposé par la publication ($0,75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et $2,76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivement).

- 3.3. Le K_M de la xylanase NpX pour les xylanes de hêtre est environ 3,5 fois inférieur au K_M de la xylanase InNpX pour ce même substrat, et cet écart est significatif compte-tenu des incertitudes de détermination (*pour les xylanes de hêtres, le K_M de NpX est compris entre $0,6$ et $0,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, le K_M de InNpX est compris entre $2,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et $3,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$*).
La valeur de K_M étant une évaluation de l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, la xylanase NpX a environ 3,5 fois plus d'affinité pour les xylanes de hêtres que la xylanase InNpX.

- 3.4. La constante catalytique k_{cat} , la vitesse initiale maximale $v_{i\ max}$ et la concentration en enzyme totale $[E]_{totale}$ sont liés par la relation :

$$v_{i\ max} = k_{cat} \times [E]_{totale}$$

À concentrations égales en enzyme, les différences de valeurs de k_{cat} sont donc liées à des variations de $v_{i\ max}$.

Il semblerait donc que la configuration du site actif de NpX dans la protéine de fusion InNpX permette une catalyse plus rapide que dans la protéine native NpX.

- 3.5. Le rapport k_{cat}/K_M donne une évaluation de l'efficacité catalytique d'une enzyme pour son substrat (k_{cat} traduisant la vitesse de catalyse à saturation en substrat, le rapport $1/K_M$ mesurant l'affinité de l'enzyme pour son substrat).

L'efficacité catalytique de la xylanase NpX est environ 1,5 fois plus faible que celle de la protéine de fusion InNpX.

Cet écart est significatif (k_{cat}/K_M pour NpX compris entre $2,7 \cdot 10^4$ et $3,8 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, (k_{cat}/K_M pour InNpX comprise entre $4,7 \cdot 10^4$ et $5,4 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

Par rapport à l'enzyme sauvage NpX, la xylanase InNpX présente une affinité plus faible pour les xylanes de hêtre, compensée par une très forte augmentation de sa vitesse de catalyse.

- 3.6. La perte d'activité de la xylanase multimodulaire InNpX-JoCBM3a peut être due

- aux conséquences de la liaison entre InNpX et JoCBM3a :
 - encombrement stérique empêchant l'accès du substrat dans le site actif de InNpX (suggéré par l'activité de InNpX-JoCBM3a observée avec le substrat de petite taille pNP-X₃)
 - mauvais positionnement relatif de InNpX et JoCBM3a, bloquant l'accès du substrat au site actif de InNpX
 - déformation du site actif de InNpX
- à une mauvaise reconnaissance de la biomasse lignocellulosique par le domaine CBM3a (qui ne reconnaît que certains polysaccharides).

2020 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Étude d'exopolysaccharides (EPS) issus de bactéries marines

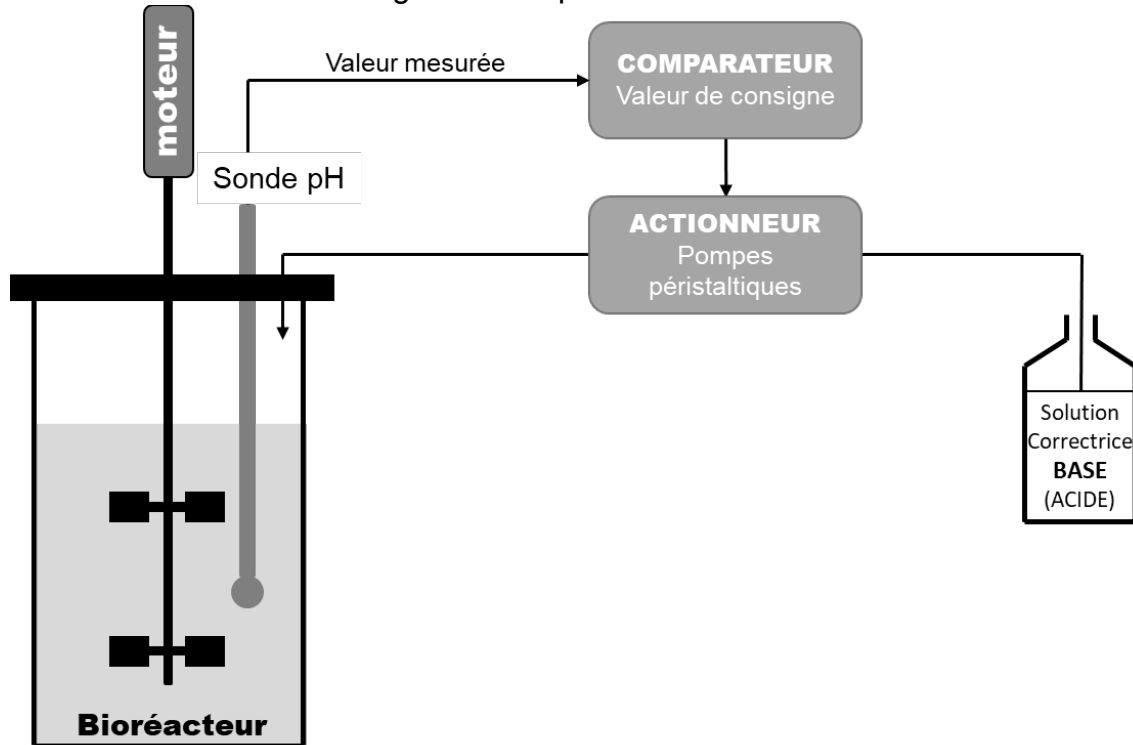
1 Sélection et propriétés d'une souche marine d'intérêt

- 1.1. D'après le document 1, le terme « extrêmophile » désigne les organismes occupant des biotopes dont les conditions physico-chimiques sont très éloignées des conditions physiologiques : température de croissance basse ou élevée, forte pression, forte salinité, pH acide... Deux applications des EPS (et non pas des enzymes produites) évoquées dans le tableau du document 1 peuvent être la régénération tissulaire, les activités antivirales et antibiofilm, les effets anticoagulants, ou encore la cryoprotection.
- 1.2. Les peptones sont une source de carbone, d'azote, d'énergie, et de facteurs de croissances type acides aminés. Les extraits de levure sont la source principale de facteurs de croissance divers. En conséquence le milieu Zobell E est un milieu empirique et riche (ou complet).
- 1.3. La source de carbone et d'électrons présente dans le milieu étant organique, et cette bactérie se développant dans les fonds marins en absence de lumière, on peut déduire qu'elle est chimio-organo-hétérotrophe.
- 1.4. Le temps de génération correspond au temps nécessaire au doublement de la population microbienne. Les paramètres optimaux de croissance correspondent donc aux conditions qui permettent de minimiser la valeur du temps de génération. D'après le document 3 on peut déterminer les valeurs suivantes : température de 27°C, pH de 7 et salinité de 30 g/L
- 1.5. Le caractère extrêmophile de cette souche est déterminé par la forte concentration en sels dont elle a besoin pour une croissance optimale.
- 1.6. La structure bactérienne à laquelle appartiennent les EPS est la capsule bactérienne qui est majoritairement, et le plus souvent, constituée de polysaccharides. La présence d'une capsule apporte différents avantages aux bactéries qui la produisent : protection contre l'environnement, adhésion facilitée, résistance à la phagocytose, dessiccation...

2 Culture en batch – optimisation de production de l'EPS HYD 1545

- 2.1. Légendes du bioréacteur :
 - 1- Cuve : réception du milieu, siège de la fermentation.
 - 2- Sparger : assure l'entrée d'air dans la cuve et permet l'oxygénation du milieu.
 - 3- voies d'entrée : apports de réactifs (solutions correctrices de pH, antimousse) ou de milieu neuf dans la cuve.
 - 4- Mobile d'agitation (type Rushton) : agitation et homogénéisation du milieu.
- 2.2. Le choix de la concentration en glucose repose sur deux contraintes : le glucose doit d'une part être en quantité suffisante pour permettre l'optimisation de la production de la molécule d'intérêt (ici les EPS) et dans une moindre mesure de la biomasse (qui n'est pas l'objet prioritaire dans ce contexte), et d'autre part ne pas être trop abondant pour éviter le gaspillage du substrat. D'après le document 5, l'intervalle de concentration en glucose utilisable est compris entre 20 g/L (atteinte du plateau de production des EPS, et biomasse suffisante) et 30 g/L (apparition de glucose résiduel dans le milieu).

2.3. Schéma de la boucle de régulation du pH :



2.4. D'après le document 6, la phase exponentielle de croissance a lieu entre le temps initial et le point 10 h du suivi de croissance. La production d'EPS ne débute qu'à partir du point 20 h du suivi de croissance, ils sont donc produits pendant la phase stationnaire. Ce sont donc des métabolites secondaires.

2.5. Calcul de $R_{EPS/S}$:

$$R_{EPS/S} = \frac{\Delta EPS}{\Delta glc} = \frac{EPS_{final} - EPS_0}{glc_0 - glc_{final}} = \frac{10 - 0}{30 - 0} = 0,33 \text{ g}_{EPS} \cdot \text{g}_{glucose}^{-1}$$

2.6. Calcul de la productivité volumique horaire totale (Pvht) d'*A. macleodii* :

$$Pvht = \frac{\Delta EPS}{t_{procédé}} = \frac{10 - 0}{120} = 0,083 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Cette valeur de Pvht est supérieure à la valeur minimale attendue de $0,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, la souche est donc intéressante dans le cadre d'une production d'EPS.

3 Application biotechnologique de l'EPS HYD 1545 à la lutte contre les biofilms

3.1. Le document 7 présente les différentes étapes de la formation d'un biofilm. Elle débute par l'adhésion réversible des cellules pionnières au support par la mise en place de liaisons de faible énergie (forces de Van der Waals, interactions hydrophobes), puis irréversible suite à l'intervention de structures d'adhésion (pili, exopolymères). Le développement se poursuit par la production d'une matrice protectrice d'exopolymères facilitant l'adhésion d'autres organismes. L'étape suivante est la maturation du biofilm avec sa croissance liée à la multiplication des microorganismes qui le composent. Enfin, la libération (relargage) d'une partie de ses microorganismes permet l'essaimage et le développement d'un nouveau biofilm. Les modalités d'action anti-biofilm attendues de l'EPS HYD 1545 sont probablement en relation avec l'occupation de la surface et l'inhibition de l'adhésion des microorganismes indésirables par la formation d'un film protecteur.

- 3.2. D'après le document 8, on observe qu'au bout de 7 jours, l'échantillon de référence non conditionné par des EPS a été recouvert à 70 % par un biofilm. L'échantillon conditionné par l'EPS HYD 1545 est lui seulement recouvert à environ 12 % par un biofilm. Le prétraitement d'une surface par cet EPS a donc un effet très bénéfique (diminution d'environ 80 %) contre la formation des biofilms marins.
- 3.3. La CMI est la concentration minimale en substance antibiotique capable d'inhiber la croissance visible d'une souche microbienne. Un témoin approprié serait un témoin de croissance, contenant la souche et le milieu sans EPS, de façon à vérifier la viabilité de la souche. Un témoin de stérilité du milieu pourrait également être réalisé, (milieu non ensemencé par la souche).
- 3.4. D'après le document 9, aucun des EPS testés n'est capable d'inhiber la croissance des souches testées à une concentration inférieure ou égale à $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. On en déduit que même à forte concentration, ces molécules n'ont pas d'effet inhibiteur sur la croissance des microorganismes et sont donc respectueux de l'environnement.
4. **Conclusion** : La bactérie *Alteromonas macleodii* est facile à cultiver (chimio-organo-hétérotrophe) et produit des EPS en quantité intéressante en bioréacteur. D'autre part, cet EPS est efficace contre la formation de biofilm par inhibition de l'adhésion bactérienne (film protecteur) et il ne possède aucune activité antimicrobienne. Il ne présente donc pas de danger pour environnement marin. L'utilisation de cette souche dans le cadre de la production d'EPS est donc particulièrement intéressante et conseillée.

2020 - U42 : Biologie cellulaire

Étude de l'influence de la protéine FIGNL1 sur la fertilité du riz

1. Étude génétique et phénotypique du mutant *osfignl1*

- 1.1. 1 : anthère ; 2 : pétale ; 3 : tige ou pédoncule ; 4 : ovaire

Les gamétophytes mâles sont formés dans les anthères alors que les gamétophytes femelles sont formés dans l'ovaire.

- 1.2. Pour le croisement 1, aucun descendant n'est observé : la plante mâle homozygote mutante *osfignl1* est donc stérile, soit elle n'a pas formé de gamète, soit elle a formé des gamètes non fonctionnels.

Pour le croisement 2, des plantes F1 sont obtenues à l'issue de ce croisement : la plante femelle homozygote mutante *osfignl1* n'est donc pas stérile, elle a formé des gamètes fonctionnels.

Ainsi on peut émettre l'hypothèse que seuls les mutants homozygote *osfignl1* mâles sont impactés par la mutation en devenant stériles.

- 1.3. Chaque plante F1 est hétérozygote *osfignl1/FIGNL1* et produit donc deux types de gamètes : *osfignl1* et *FIGNL1* (la mutation est récessive donc le gène *osfignl1* est écrit en minuscule et le gène *FIGNL1* en majuscule). L'échiquier de croisement est le suivant :

		Gamètes mâles	
		<i>FIGNL1</i>	<i>osfignl1</i>
Gamètes femelles	<i>osfignl1</i>	<i>osfignl1/FIGNL1</i>	<i>osfignl1/osfignl1</i>
	<i>FIGNL1</i>	<i>FIGNL1/FIGNL1</i>	<i>osfignl1/FIGNL1</i>

Parmi les n descendants du croisement 2 en F2, 303 plantes sont homozygotes mutantes *osfignl1/osfignl1*, et d'après l'échiquier de croisement, elles représentent 25 % (= un quart) du nombre total de descendants. Donc le nombre total de descendants vaut $n = 303 \times 25 / 100 = 303 \times 4 = 1212$.

D'après l'échiquier de croisement, 50 % (= la moitié) des descendants sont hétérozygotes, soit $1212 \times 50 / 100 = 1212 / 2 = 606$ descendants hétérozygotes.

Les descendants homozygotes sauvages *FIGNL1/FIGNL1* représentent 25 % du nombre total de descendants, soit $1212 \times 25 / 100 = 303$ (identique au nombre de descendants homozygotes mutants).

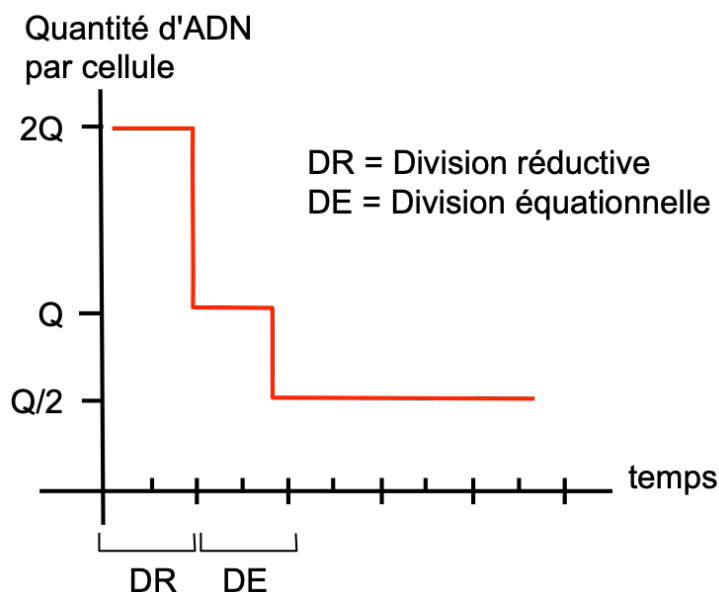
- 1.4. Les étapes de préparation des échantillons sont les suivantes :

1. fixation chimique des structures cellulaires par le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, afin de créer des liens entre les constituants cellulaires pour résister aux électrons du MET qui traverseront la préparation
2. rinçage pour éliminer les produits chimiques utilisés dans l'étape 1
3. déshydratation de l'échantillon dans des bains d'éthanol successifs à pourcentage d'éthanol croissant, afin d'éliminer l'eau des tissus
4. inclusion de l'échantillon dans une résine d'acrylique qui remplace l'eau pour solidifier l'échantillon afin de réaliser des coupes tissulaires
5. réalisation de coupes ultra fines de l'échantillon afin de permettre aux électrons de traverser la préparation
6. dépôt des coupes sur une grille de nickel
7. imprégnation métallique des coupes dans une solution d'acétate d'uranyl pour obtenir au sein de l'échantillon des zones imperméables aux électrons donc apparaissant sombres en MET.

- 1.5. Les images A et B montrent la structure externe (surface) d'un grain de pollen avec une image en 3D : donc microscopie électronique à balayage (MEB).
Les images C et D montrent des observations de l'ultrastructure interne d'un grain de pollen avec une image en 2D : donc microscopie électronique à transmission (MET).
- 1.6. Les images A et B montrent un grain de pollen d'une plante sauvage, il est volumineux et très riche en grains d'amidon.
Les images C et D montrent un grain de pollen d'une plante mutante, il est petit, aplati et vide, aucun grain d'amidon n'est observé.

2. Étude de la gamétogenèse mâle du mutant *osfign1*

- 2.1. Quantité d'ADN par cellule au cours de la méiose :



- 2.2. La métaphase est caractérisée par la présence de tous les chromosomes de la cellule sur la plaque équatoriale. Le document 5A permet de vérifier que c'est le cas pour une cellule en métaphase I d'une plante mâle sauvage. En revanche, pour une cellule en métaphase I d'une plante mâle mutante *osfign1* on observe des chromosomes dispersés dans la cellule, non alignés sur la plaque équatoriale.
On peut formuler l'hypothèse que la mutation *osfign1* chez le mâle perturbe la méiose ce qui empêche la formation des gamètes mâles : le grain de pollen formé est donc vide (question 1.6) et la plante est stérile (question 1.2).

3. Localisation subcellulaire de FIGNL1 et interaction avec la protéine RAD51

- 3.1. Les protoplastes sont des cellules végétales sans paroi pecto-cellulosique.
- 3.2. Les enzymes utilisées pour la digestion des constituants de la paroi végétale sont des pectinases et des cellulases. L'hydrolyse de ces constituants doit être effectuée en milieu iso-osmotique (parfois hyper-osmotique) pour ne pas provoquer la lyse des protoplastes obtenus.
- 3.3. La protéine FIGNL1-GFP est observée par un spot vert en bas à gauche de l'image A, l'image B indique la localisation du noyau de la cellule également en bas à gauche (spot rouge de la protéine osMADS3-mCherry), l'image C révèle un spot jaune correspondant à la superposition du vert et du rouge donc les protéines FIGNL1 et osMADS3 sont localisées au même endroit dans la cellule : la protéine FIGNL1 est donc une protéine nucléaire.

- 3.4. L'absence de fluorescence au niveau du marquage YFP sur le premier panel « YC + YN » permet de vérifier qu'il n'y a pas d'interaction entre les moitiés YC et YN et que chacune n'est pas fluorescente intrinsèquement. Le marquage mCherry permet de visualiser les cellules en localisant leur noyau (3 noyaux donc 3 cellules sur le champ microscopique du panel supérieur du document 7B). Lorsque les moitiés YC et YN sont fusionnées avec FIGNL1 et RAD51, la protéine YFP émet une fluorescence. Donc YFP est reconstituée, ce qui montre que les protéines FIGNL1 et RAD51 interagissent dans les cellules concernées. De plus, la fluorescence de YFP est strictement superposée au marquage des noyaux par osMADS3-mCherry (fluorescence jaune = superposition des fluorescences verte et rouge), ce qui signifie que l'interaction a lieu au niveau du noyau des cellules.
- 3.5. La protéine RAD51 joue un rôle essentiel dans la réparation des cassures d'ADN double-brin et une perte de fonction du gène *RAD51* se caractérise par le même phénotype que la mutation *osfign1* chez la plante mâle : donc la flèche dans le document 5B correspond à une cassure d'ADN double brin non réparée, cet ADN, n'étant plus solidaire du chromosome, ne peut plus s'aligner sur la plaque équatoriale au cours de la métaphase.
- 3.6. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que :
- les plantes mâles portant la mutation *osfign1* sont stériles, avec formation de grains de pollen vides sans gamètes
 - la méiose chez les mutants *osfign1* est perturbée : lors de la métaphase I, l'alignement de l'ADN chromosomique sur la plaque équatoriale est incorrect, et des cassures d'ADN double brin sont observées
 - la protéine FIGNL1 interagit avec la protéine RAD51, elle-même impliquée dans la réparation des cassures d'ADN double brin.
- La protéine FIGNL1 intervient donc probablement dans la réparation des cassures d'ADN double brin qui ont lieu pendant la prophase I de la méiose. En absence de protéine FIGNL1 fonctionnelle (mutation *osfign1*), la réparation des cassures d'ADN double brin après un crossing-over n'est plus réalisée, ce qui bloque la méiose. Aucun gamète n'est donc formé et la plante mâle mutée est stérile.

Session 2021 : Sujets

2021 - 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 Partie A question 1,
Annexe 2 exercice 1 Partie A question 3

Exercice 1 (10 points)

Une usine agroalimentaire produit de la viande de bœuf hachée. On souhaite évaluer la durée de conservation de la viande de bœuf une fois hachée et conservée dans une chambre froide réglée à 0°C.

Les parties A et B peuvent être traitées de manière indépendante.

PARTIE A :

Voici le relevé du nombre de germes putréfiants par centimètre carré (cm²) tous les cinq jours à la surface d'un échantillon de viande de bœuf hachée conservée dans la chambre froide :

Nombre de jours de conservation t_i	0	5	10	15	20
Nombre N_i de germes putréfiants par cm ²	1000	4000	199000	5 960 000	48 600 000

- On effectue un changement de variable logarithmique : $Z_i = \ln(N_i)$. Compléter le tableau donné en **annexe 1 à rendre avec la copie**. On arrondira les valeurs au dixième.
- À l'aide de la calculatrice, déterminer une équation de la droite d'ajustement du nuage de points $M_i(t_i; z_i)$ par la méthode des moindres carrés sous la forme $z = at + b$.
Les réels a et b seront arrondis au centième.
- Sur le graphique donné en annexe 2 à rendre avec la copie :
 - Placer les points $M_i(t_i; z_i)$.
 - Tracer la droite D d'équation $z = 0,6t + 6,4$.
- On considère que la droite D est une droite d'ajustement du nuage de points $M_i(t_i; z_i)$ et que ce modèle reste valable jusqu'au 30^e jour de conservation dans la chambre froide. Donner une estimation du nombre de germes putréfiants par cm² sur l'échantillon de viande hachée si celui-ci était stocké et conservé pendant 25 jours dans la chambre froide. Arrondir au million.

PARTIE B :

Soit f la fonction définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par

$$f(t) = 600e^{0,6t}$$

On admet que la fonction f modélise le nombre de germes par cm² sur la surface de la viande hachée conservée en chambre froide. Plus précisément, $f(t)$ est le nombre de germes par cm² sur la viande hachée après t jours de conservation dans la chambre froide à 0°C.

- Déterminer la limite de la fonction f en $+\infty$ et interpréter ce résultat dans le contexte de l'exercice.

2. On note f' la fonction dérivée de la fonction f .
Calculer $f'(t)$ pour tout réel t appartenant à l'intervalle $[0; +\infty[$.
3. Déterminer le sens de variation de la fonction f sur l'intervalle $[0; +\infty[$ et interpréter ce résultat dans le contexte de l'exercice.
4. On définit le réel m par $m = \frac{1}{10-5} \int_5^{10} f(t)dt$
 - a. Sans la calculer, interpréter la valeur du réel m dans le contexte de l'exercice.
 - b. Déterminer une primitive de la fonction f sur l'intervalle $[0; +\infty[$.
 - c. En déduire que $m = 200e^6 - 200e^3$.
5. On admet que la viande hachée peut être commercialisée si, lorsqu'elle quitte l'usine, la concentration de germes putréfiants à sa surface est strictement inférieure à 3 000 germes par cm^2 .
 - a. Résoudre l'inéquation $f(t) < 3\,000$ sur l'intervalle $[0; +\infty[$.
 - b. En déduire si l'usine peut conserver la viande de bœuf hachée produite en chambre froide plus de deux jours avant de la commercialiser.
6. La viande hachée pourra ensuite être vendue à des particuliers tant que le nombre de germes par cm^2 ne dépasse pas 27 000.
On appelle durée limite de consommation le nombre maximal de jours pendant lequel cette viande hachée peut être vendue à des particuliers.
 - a. En précisant la démarche employée, donner la valeur numérique affichée par l'algorithme ci-dessous :

```

J ← 0
N ← 600
Tant Que N ≤ 27 000
  J ← J + 1
  N ← 600 * e0,6*J
Fin Tant Que
Afficher J

```

- b. Interpréter cette valeur dans le contexte de l'exercice.

Exercice 2 (10 points)

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

Pour améliorer l'hygiène de baignade dans un spa, il est possible de traiter l'eau aux ultra-violets (UV). La lampe UV (Figure 1), placée dans une chambre de désinfection, diffuse des rayons ultra-violets en continu. En passant devant cette lampe, dans le système de filtration, l'eau est désinfectée et débarrassée des micro-organismes.

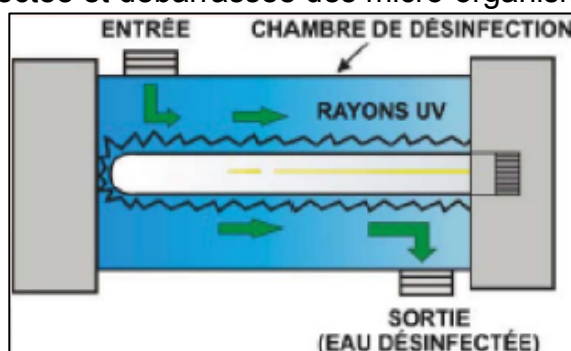


Figure 1. Schéma d'une chambre de désinfection équipée d'une lampe UV

PARTIE A :

Les résultats seront donnés à 10^{-3} près.

Une étude effectuée sur l'ensemble des spas installés par un fabricant indique que :

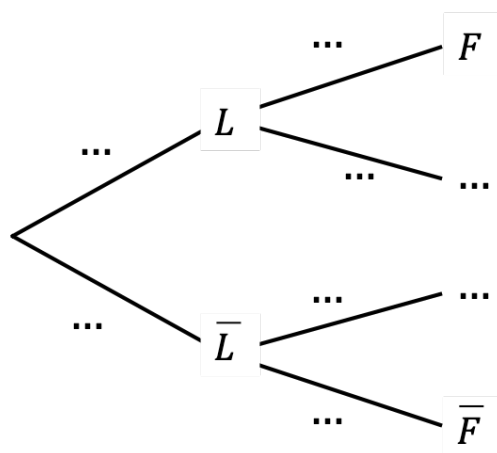
- 40 % des spas sont équipés de lampe UV et, parmi eux, 2 % présentent un problème de filtration ;
- Parmi les spas non-équipés de lampe UV, 15 % présentent un problème de filtration.

On choisit un spa au hasard parmi ceux installés par le fabricant.

On note :

- L l'événement « le spa est équipé d'une lampe UV » ;
- F l'événement « le spa présente un problème de filtration » ;
- $\bar{L}$ et $\bar{F}$ les événements contraires respectifs des événements L et F .

1. Recopier sur la copie l'arbre pondéré ci-dessous et compléter les pointillés.



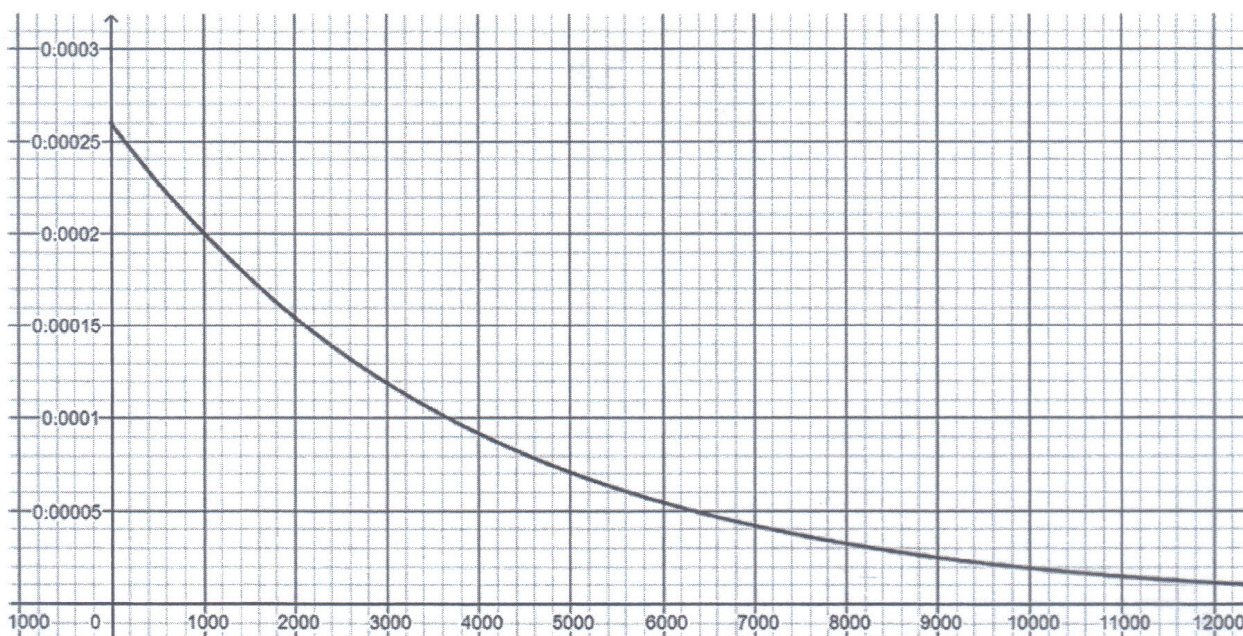
2. Montrer que la probabilité de l'évènement F est égale à 0,098.
3. Le spa choisi au hasard présente un problème de filtration. Calculer la probabilité que ce spa ne possède pas de lampe UV.
4. Lors d'une opération de maintenance sur un parc de 78 spas installés par le fabricant, un technicien comptabilise 12 spas présentant un problème de filtration.
 - a. Donner une estimation ponctuelle f de la proportion inconnue p des spas installés par ce fabricant qui présentent un problème de filtration.
 - b. Déterminer par un intervalle de confiance au seuil de 95 % cette proportion p .

PARTIE B :

On s'intéresse désormais à la durée de vie des lampes UV. Celle-ci, exprimée en heures, est une variable aléatoire X qui suit une loi exponentielle de paramètre λ où λ est un réel strictement positif. On rappelle que la fonction de densité f d'une telle variable aléatoire est donnée pour tout réel $t \geq 0$ par :

$$f(t) = \lambda e^{-\lambda t}$$

La courbe ci-dessous est une représentation graphique de la fonction de densité f .



1. À l'aide du graphique, justifier que $\lambda = 0,00026$.
2. On considère la proposition suivante : « en moyenne, une lampe UV tombe en panne au bout de 1 000 heures ». Cette proposition est-elle vraie ? Justifier.
3. Montrer que la probabilité qu'une lampe n'ait pas eu de panne au cours des 500 premières heures est égale à $e^{-0,13}$.

PARTIE C :

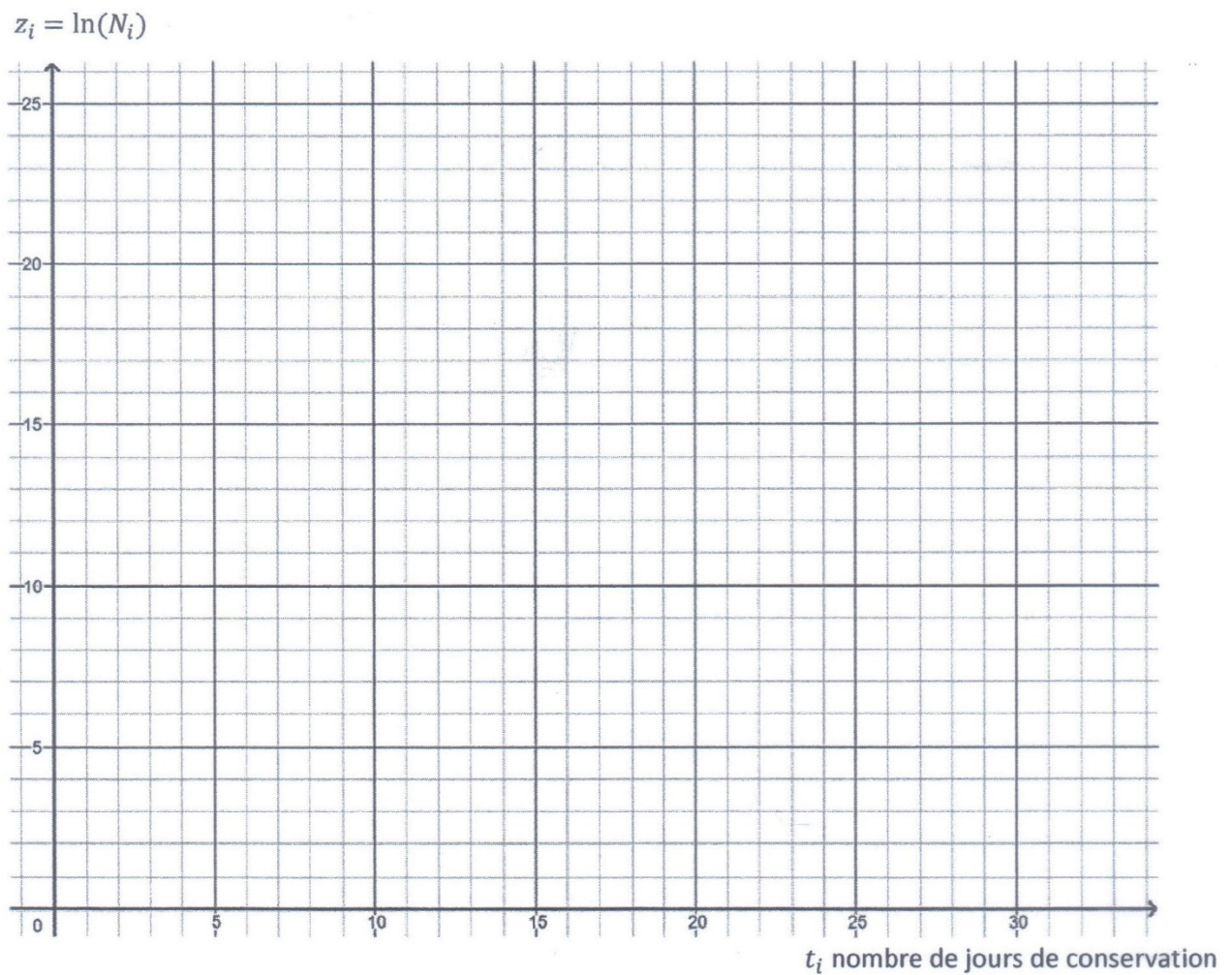
Lors de l'utilisation des lampes UV, on constate que la probabilité que la durée d'utilisation d'une lampe UV prise au hasard dépasse 1000 heures est $p = 0,77$.

On prélève au hasard un lot de 50 lampes dans la production, jugée suffisamment importante pour assimiler ce choix à un tirage avec remise. On appelle Y la variable aléatoire qui, à un échantillon de 50 lampes UV de la production, associe le nombre de lampes UV dont la durée d'utilisation dépasse 1 000 heures.

1. Justifier que la variable aléatoire Y suit une loi binomiale dont on déterminera les paramètres.
2. Déterminer l'arrondi à 10^{-3} de la probabilité $P(Y \geq 42)$ et interpréter ce résultat dans le contexte de l'exercice.
3. Calculer l'espérance de la variable aléatoire Y et interpréter ce résultat dans le contexte de l'exercice.

ANNEXE 1 : Exercice 1 - Partie A - Question 1

Nombre de jours de conservation t_i	0	5	10	15	20
Nombre N_i de germes putréfiants par cm^2	1 000	4 000	199 000	5 960 000	48 600 000
$z_i = \ln(N_i)$					

ANNEXE 2 : Exercice 1 - Partie A - Question 3

2021 - U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : L'usage de la calculatrice avec mode examen actif ou de la calculatrice sans mémoire, « type collègue » est autorisé

Documents 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. ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE D'UNE MOLÉCULE LACRYMALE

Les halogénures d'alkyle (chloroforme, dichlorométhane, tétrachlorure de carbone...) sont très utilisés en chimie comme réactifs ou solvants, mais ils possèdent également des propriétés biochimiques importantes : anesthésiants, pesticides, insecticides...

L'hydrolyse d'halogénure d'alkyle au niveau de l'œil induit un effet lacrymogène.

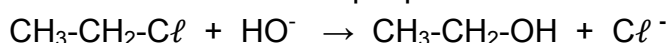
Remarque : Pour des raisons de simplification, on étudiera dans cet exercice un halogénure d'alkyle simple : le chloroéthane.

A. Hydrolyse en milieu basique

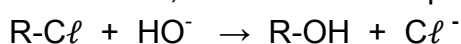
On fait réagir du chloroéthane $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-Cl}$ avec les ions hydroxyde HO^- provenant d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ($\text{Na}^+(\text{aq}) + \text{HO}^-(\text{aq})$). Cette hydrolyse en milieu basique conduit à la formation d'éthanol $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ et d'ions chlorure Cl^- .

Durant toute l'expérience, la température est maintenue constante et égale à 40 °C.

La transformation chimique peut être modélisée par la réaction d'équation :



Par la suite, on écrira cette équation de façon simplifiée :



Les réactifs sont mis en contact à l'instant $t = 0$.

À cet instant, les concentrations des deux réactifs sont égales :

$$[\text{R-Cl}]_0 = [\text{HO}^-]_0 = 17,5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}.$$

Le tableau ci-dessous donne les valeurs des concentrations en chloroéthane **restant** à différents instants :

Durée de réaction (minutes)	0	10	20	40	60	120	200
$[\text{R-Cl}]$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$17,5 \times 10^{-2}$	$9,5 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$0,98 \times 10^{-2}$

La réaction étudiée est une substitution nucléophile (SN) dont on veut connaître l'ordre cinétique global. Pour cela, on trace à partir des données expérimentales trois représentations graphiques représentées dans l'annexe 1 à rendre avec la copie.

L'analyse des représentations graphiques conduit à privilégier l'hypothèse d'une réaction de type SN2 (substitution nucléophile d'ordre 2) mais pas de type SN1 (substitution nucléophile d'ordre 1).

1. Expliquer pourquoi.

On rappelle l'évolution d'un réactif A qui suit une réaction dépendant de l'ordre de la réaction :

- Pour une réaction d'ordre 0, $[A] = [A]_0 - k \cdot t$
 - Pour une réaction d'ordre 1, $[A] = [A]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$
 - Pour une réaction d'ordre 2, $\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + k \cdot t$
2. En exploitant la représentation graphique appropriée, vérifier que la constante de vitesse k de la réaction à 40°C vaut 0,48 L·mol⁻¹·min⁻¹.
 3. Par un tracé complémentaire effectué sur la représentation graphique n°1 de **l'annexe 1 à rendre avec la copie**, expliquer sans calculs comment on aurait pu déterminer la vitesse de la réaction à l'instant initial $t = 0$.
 4. À quel instant la vitesse de la réaction est-elle maximale ? Justifier.
 5. En supposant que la réaction est d'ordre 1 par rapport au chloroéthane et d'ordre 1 par rapport aux ions hydroxyde, exprimer sa vitesse en fonction de k et des concentrations $[RCl]$ et $[OH^-]$.
 6. Citer trois facteurs cinétiques susceptibles de modifier la vitesse de la réaction.
 7. Définir le temps de demi-réaction, puis estimer graphiquement sa valeur en utilisant la courbe n°1, en explicitant la méthode utilisée.

B. Influence du milieu réactionnel

L'hydrolyse du chloroéthane peut également se faire en milieu neutre. Dans ces conditions, le temps de demi-réaction de cette hydrolyse vaut 38 jours.

8. Expliquer l'intérêt de réaliser l'hydrolyse en milieu basique plutôt qu'en milieu neutre.

La loi d'Arrhenius exprime la dépendance de la constante de vitesse k en fonction de la température :

$$k = A \times e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}}$$

Avec A : facteur pré exponentiel ;
 E_a : énergie d'activation (J·mol⁻¹) ;
 T : température absolue (K) ;
 R : constante des gaz parfaits (8,31 J·K⁻¹·mol⁻¹).

9. Montrer que l'on peut écrire la loi d'Arrhenius sous la forme :

$$\ln(k) = \frac{-E_a}{R \cdot T} + \ln(A)$$

La constante de vitesse k a été déterminée à différentes températures. On a obtenu les résultats suivants :

température T (en K)	303	313	323	333
k (en L · mol ⁻¹ · min ⁻¹)	0,167	0,480	1,185	2,99

Le **document 1 de l'annexe 2** représente les variations de $\ln(k)$ en fonction de $1/T$.
 Le coefficient directeur de la droite vaut - 9,6·10³ K.

10. À partir de cette valeur, déterminer l'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse du chloroéthane en milieu basique. Que représente cette grandeur ?

Le tableau ci-dessous donne la valeur de l'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse du chloroéthane en milieu neutre :

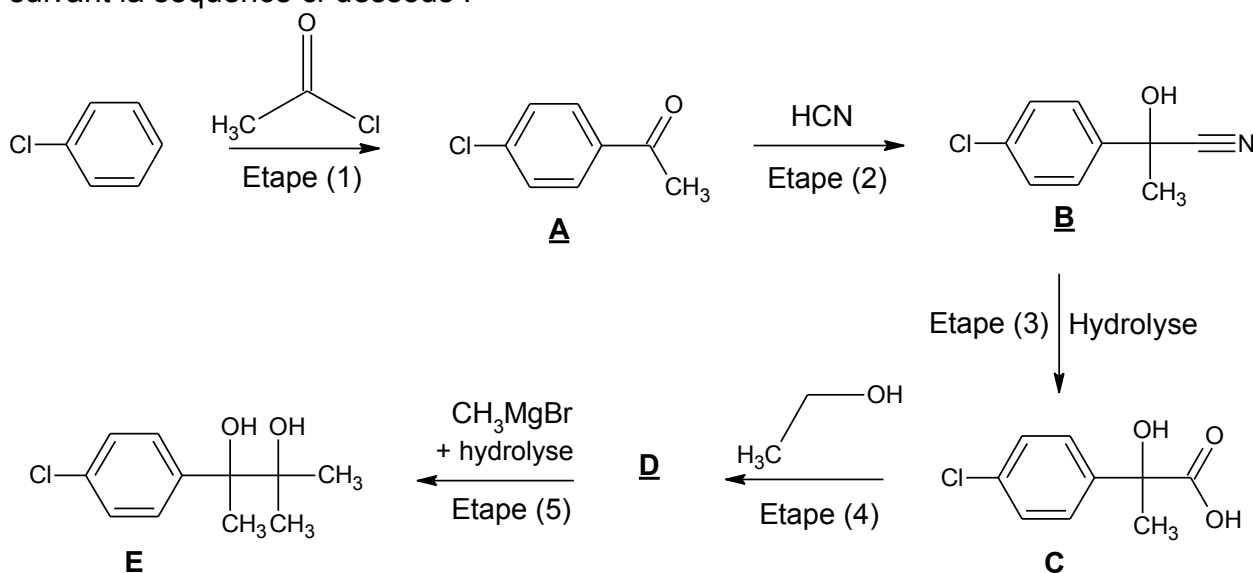
	E_a (kJ·mol ⁻¹)
Énergie d'activation (milieu neutre)	111

Source : <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14127/5/2/3>

11. Justifier simplement la cohérence de cette valeur avec celle obtenue en milieu basique.

II. SYNTHÈSE DU PHÉNAGLYCODOL

Le phénaglycodol (molécule notée **E** dans la synthèse ci-dessous) est le nom usuel d'un médicament décrit comme un tranquillisant ou un sédatif qui possède des propriétés anxiolytiques et anticonvulsivante. Sa synthèse à partir du chlorobenzène peut se faire suivant la séquence ci-dessous :



Données :

Éléments	H	C	O	Cl
Numéro atomique	1	6	8	17

A. Étape (1) de la synthèse du phénaglycodol

1. Écrire la formule brute de l'autre produit formé lors de l'étape (1).
2. Préciser le type (élimination, substitution, addition), la nature (radicalaire, nucléophile, électrophile) de la réaction modélisant la transformation de l'étape (1).
3. Proposer un catalyseur pouvant être utilisé dans cette étape. Donner l'équation de l'étape permettant de former l'espèce électrophile grâce au catalyseur.
4. En utilisant le formalisme de la flèche courbe, écrire l'étape du mécanisme réactionnel rendant compte de la réaction entre l'espèce électrophile intermédiaire et le chlorobenzène.
5. Un autre composé, isomère de **A**, peut également être formé. Donner sa formule semi-développée. Préciser la position d'une 2^e substitution par rapport à l'atome de chlore.

B. Étapes (3) et (4) de la synthèse du phénaglycodol

6. Recopier la formule du composé **C** sur votre copie. Entourer les groupes caractéristiques de ce composé et nommer les familles fonctionnelles correspondantes

À l'étape (4), le composé **C** réagit avec l'éthanol pour donner le composé **D**.

7. Donner la formule semi-développée du composé **D**. Indiquer l'autre produit qui est également formé.
8. Nommer cette réaction. Citer deux des caractéristiques de la transformation associée.

C. Étude de la molécule de phénaglycodol

9. Recopier la formule du composé **E** sur votre copie. Indiquer le ou les atome(s) de carbone asymétrique(s). Justifier la démarche.
10. Donner la représentation, en perspective de Cram, du stéréoisomère de configuration S du phénaglycodol. Détailler la démarche.
11. Citer une technique expérimentale permettant de distinguer les stéréoisomères du phénaglycodol.

III. ÉTUDE D'UN ISOTOPE DU XÉNON

Le xénon 133 est un isotope du xénon. Sa demi-vie (ou période) $t_{1/2}$ vaut 5,25 jours. Le noyau de xénon 133 est instable et radioactif de type bêta moins (β^-); il se désintègre pour donner du césium 133 qui est un isotope stable du césium (symbole Cs). Il est utilisé par inhalation en imagerie médicale pour observer les fonctions pulmonaires et radiographier les poumons. Il est aussi souvent utilisé pour visualiser la circulation sanguine, en particulier dans le cerveau.

D'après Wikipédia

Données :

Célérité de la lumière dans le vide : $c = 2,9979 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$

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

Le gray : $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1}$

L'électron-volt : $1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$.

La dose absorbée est le rapport de l'énergie absorbée par unité de masse de la matière exposée.

Dose horaire moyenne reçue en France due à la radioactivité naturelle : 1670 nGy.

A. Étude énergétique de la désintégration

1. La représentation symbolique du noyau de xénon 133 est $^{133}_{54}\text{Xe}$. Donner la composition du noyau de xénon 133.

Le xénon 133 est un émetteur β^- .

2. Indiquer la nature de la particule émise. Donner son symbole.
3. Écrire l'équation de la réaction de désintégration d'un noyau de xénon 133.
Citer les 2 lois de conservation utilisées.

L'énergie totale libérée lors de cette réaction de désintégration d'un noyau de xénon vaut $E = 427 \text{ keV}$.

Le **document 2 de l'annexe 2** montre les différentes voies de désintégration du xénon 133. On y observe le niveau fondamental de l'atome de césium, ainsi que ses deux premiers niveaux excités.

Expérimentalement, on observe l'émission de photons d'énergie $E_1 = 80$ keV, $E_2 = 81$ keV et $E_3 = 161$ keV permettant de revenir à l'état fondamental.

4. Sur le **document 2 de l'annexe 2**, faire apparaître les transitions nucléaires correspondant aux trois énergies E_1 , E_2 et E_3 .
5. Déterminer la longueur d'onde λ_1 du photon émis d'énergie E_1 .
6. Déterminer l'énergie maximale E_{max} de la particule émise par la désintégration du noyau de xénon, quand le noyau de césium est produit dans l'état excité d'énergie $E_3 = 161$ keV.

B. Décroissance radioactive

7. Citer la définition de la demi-vie d'un échantillon radioactif.
8. Donner l'expression de la loi de décroissance radioactive et en déduire que la valeur de la constante de désintégration radioactive λ vaut $1,53 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$.

À un instant $t = 0$, un échantillon contenant du xénon 133 a une activité $A_0 = 3,7 \times 10^8$ Bq.

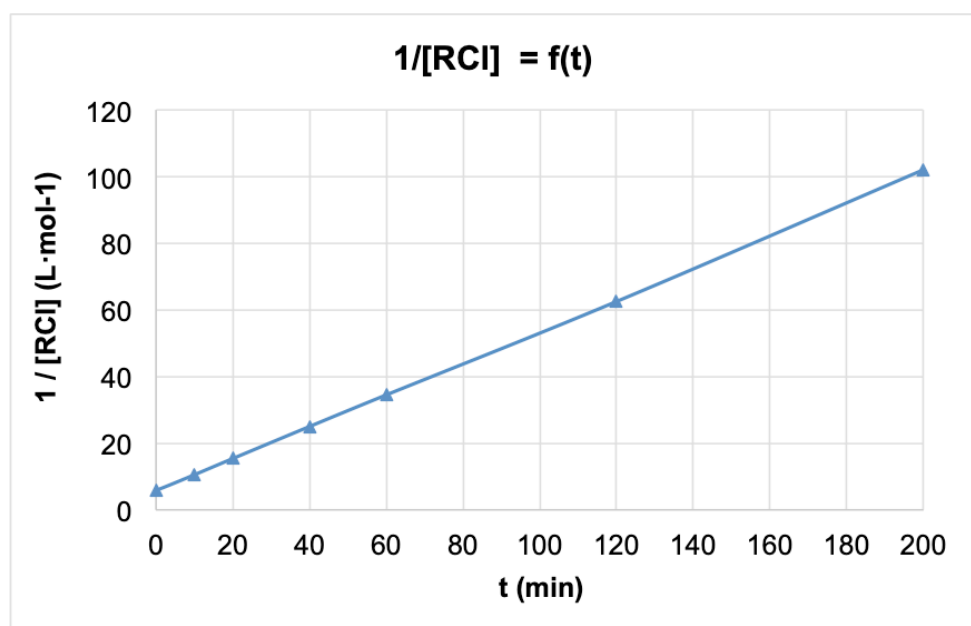
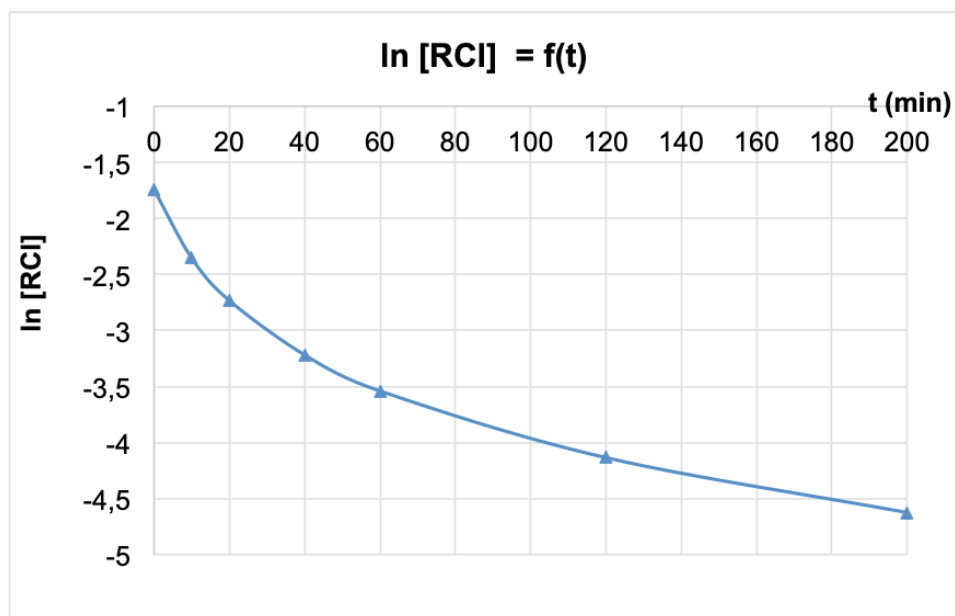
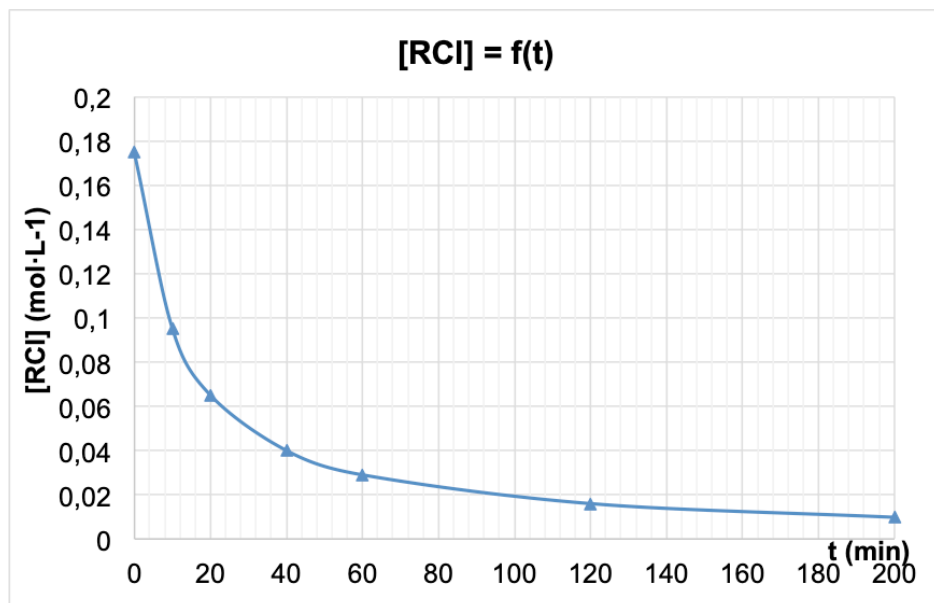
9. Déterminer que la valeur du nombre N_0 de noyaux de xénon 133 contenus dans l'échantillon à cet instant vaut $2,4 \times 10^{14}$ noyaux.
10. En déduire que le nombre N de noyaux restants à l'instant $t = 8,0$ heures vaut $2,3 \times 10^{14}$ noyaux.

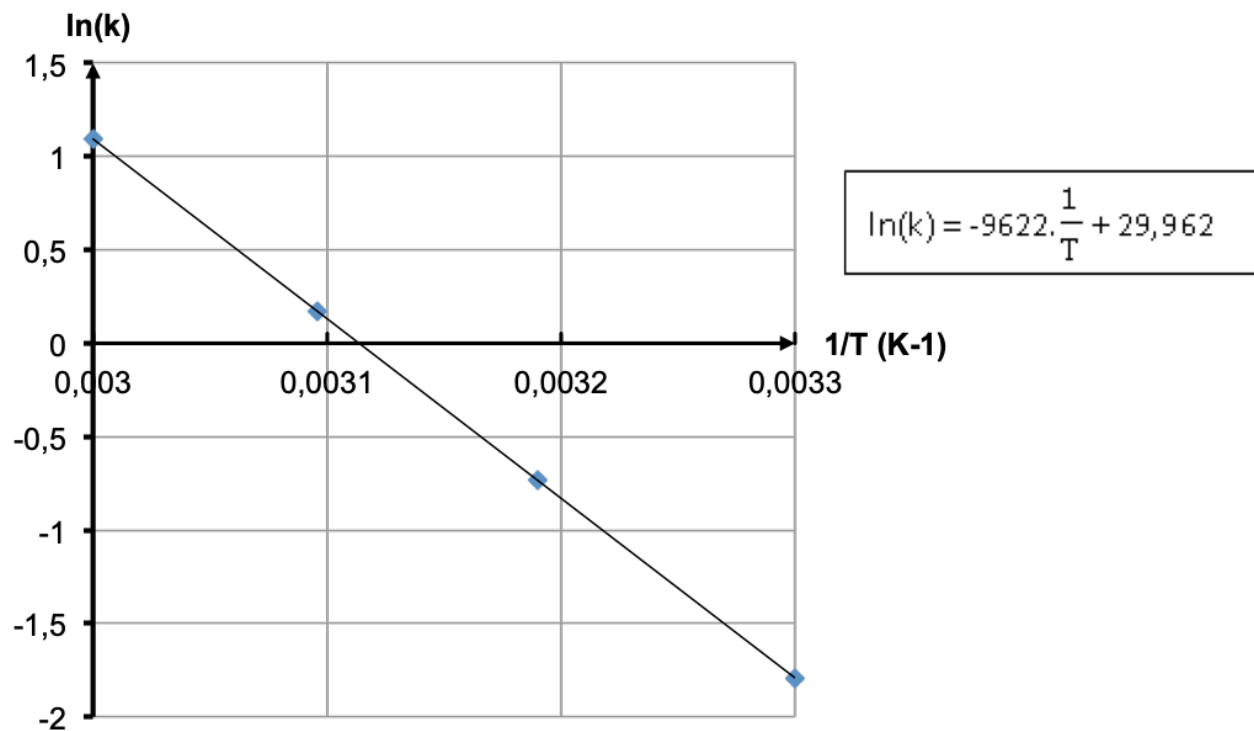
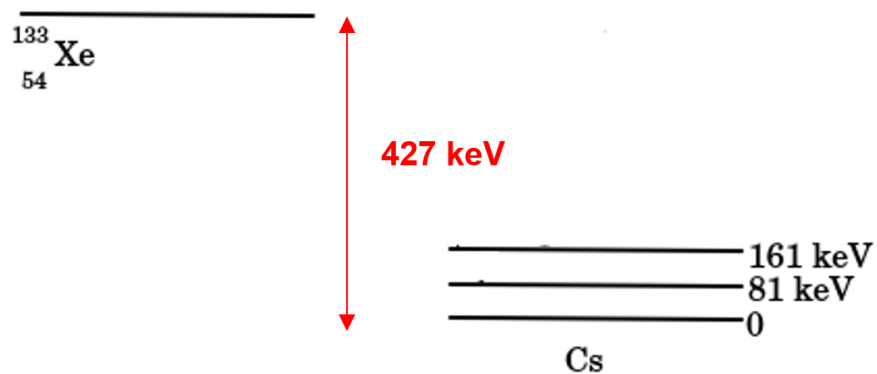
C. Radioprotection

Le xénon 133 utilisé en médecine pour l'étude de la respiration est sous forme gazeuse, mélangé avec de l'air filtré.

Un employé de l'entreprise de fabrication des mélanges gazeux reste accidentellement durant une journée de travail de 8,0 heures à proximité d'un échantillon de xénon d'activité $1,0 \times 10^{12}$ Bq. Pendant cette durée, la personne absorbe 5,0 % des photons d'énergie $E_2 = 81$ keV émis par cette source (on néglige les photons d'énergie E_1 et E_3).

11. Citer la définition du Becquerel.
12. À partir de la valeur de l'activité, en déduire que le nombre de noyaux de xénon 133 qui se sont désintégrés pendant ces 8,0 heures vaut $2,9 \times 10^{16}$ noyaux (on négligera la diminution de l'activité de la source pendant cette durée).
13. Déterminer que la valeur de l'énergie absorbée par le corps de l'employé pendant ces 8,0 heures est d'environ 19 J, sachant qu'une désintégration donne lieu à l'émission d'un photon.
14. Sachant que l'employé a une masse de 60 kg, déterminer que la dose absorbée en gray est de 0,32 Gy.
15. Comparer cette valeur et la dose horaire moyenne reçue en France due à la radioactivité naturelle. Conclure.

ANNEXE 1 (à rendre avec la copie)

ANNEXE 2 (à rendre avec la copie)**DOCUMENT 1****DOCUMENT 2**

2021 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Durée 2 h – coefficient 1

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

Mise au point de vecteurs lentiviraux pour une surexpression de la GFP dans les neurones du système nerveux central

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (HIV-1) est un virus enveloppé à ARN et fait partie des lentivirus. Il est capable d'intégrer son génome dans l'ADN de la cellule cible, de manière stable.

Les vecteurs lentiviraux dérivés du génome de HIV-1 sont des outils de premier choix pour réaliser une transgénèse à long terme et notamment celle des neurones, qui sont très difficiles à transformer par ailleurs. L'information génétique du transgène est sous forme ARN, empaqueté dans les vecteurs lentiviraux, qui infecteront les cellules cibles, à traiter par thérapie génique.

Pour permettre une expression spécifique et stable du transgène dans les neurones, une étape de mise au point est nécessaire. L'étude présentée utilise le gène de la GFP pour tester différentes séquences régulatrices dans la perspective d'un traitement de la maladie de Parkinson par des vecteurs lentiviraux (H. Hioki *et al.*, Gene Therapy (2007), 14, 872-882).

1. HIV-1, un virus à l'origine d'un vecteur de thérapie génique (3,5 points)

Le HIV-1 infecte les lymphocytes T4 (LT4), s'y multiplie puis provoque leur mort progressive. La disparition de ces cellules entraîne un effondrement complet du système immunitaire adaptatif.

Les caractéristiques majeures du virion et du provirus HIV-1 ainsi que son cycle de reproduction sont présentés dans le **document 1**.

- 1.1. Préciser l'activité des enzymes virales, Reverse Transcriptase (RT) et Intégrase, codées par le gène *pol*.
- 1.2. Identifier chacune des étapes du cycle de reproduction dans lesquelles sont impliquées les protéines codées par le gène *pol*.
- 1.3. Parmi les différentes étapes du cycle viral, préciser celles nécessaires pour obtenir une transfection stable avec un vecteur lentiviral, dérivé de ce type de virus.

2. Méthode de production d'un vecteur lentiviral de 2^{ème} génération (4 points)

Pour être utilisées sur des cellules cibles, les vecteurs lentiviraux de deuxième génération doivent être produits par des cellules en culture de type 293T (fibroblastes humain immortalisés), appelées cellules d'empaquetage.

Le **document 2** présente les grandes étapes de la production et de l'utilisation d'un vecteur lentiviral

Le **document 3** présente les trois plasmides utilisés pour la co-transfection des cellules d'empaquetage :

- Un plasmide d'enveloppe (**document 3.1**) qui porte le gène codant la protéine de fusion VSV-G. Cette protéine virale transmembranaire a la propriété de faire

fusionner l'enveloppe des vecteurs lentiviraux avec la membrane plasmique lors de l'infection des cellules cibles de mammifères.

- Un plasmide d'emballage (**document 3.2**) qui porte les gènes *gag* et *pol*.
- Un plasmide de transfert (**document 3.3**) qui porte le transgène (dans ce cas, codant la GFP) au sein d'une cassette de transfert délimitées par les séquences LTR. Ces séquences LTR permettent la production du transcrit d'ARN génomique.

Les trois vecteurs présentés possèdent les éléments génétiques « *Amp^R* » et « *ori* ».

- 2.1. Rappeler à quoi correspondent ces deux éléments et leur utilité en génie génétique.
- 2.2. Identifier les produits d'expression des plasmides pEnv et pEmpac. Expliquer leur rôle dans les virions produits ou dans les cellules cibles lors de l'intégration du transgène.
- 2.3. Expliquer le rôle du plasmide pLenti_GFP, en précisant les éléments génétiques présents dans ce plasmide qui permettront l'intégration du transgène dans le génome des cellules cibles de mammifères.
- 2.4. Schématiser l'ARN du vecteur lentiviral produit par les cellules d'emballage co-transfectées, en faisant apparaître les différents éléments génétiques contenus.

Le vecteur lentiviral obtenu est incapable d'induire un cycle viral complet dans les cellules.

- 2.5. Argumenter cette affirmation.
- 2.6. Expliquer en quoi cette caractéristique est nécessaire pour l'utilisation des lentivirus en tant que vecteurs à visée thérapeutique.

3. Production de vecteurs lentiviraux (6,5 points)

La transfection des cellules d'emballage 293T est réalisée par la méthode au phosphate de calcium (**document 4.1**).

- 3.1. Présenter le principe général de la transfection des cellules adhérentes en culture par cette méthode.

Le point 3 du protocole (**document 4.1**) résume la préparation de la solution de transfection contenant les trois plasmides.

- 3.2. Donner la composition précise de la solution de transfection avant dépôt sur cellules en tenant compte des données expérimentales (**document 4.2**).

Après production du vecteur, il est important de titrer la solution virale obtenue. On utilise la technique de RT-qPCR en technologie SYBR[®]Green. La séquence amplifiée est une région de la séquence codante de la GFP, fournie dans le **document 5.1**.

- 3.3. Déterminer les séquences orientées d'amorces, de 15 nucléotides, sens et antisens, nécessaires pour obtenir des amplicons correspondant à la séquence cible en caractères gras sur le **document 5.1**.
- 3.4. Rappeler les différentes étapes d'un cycle de PCR en précisant leurs températures, et indiquer à quel moment du cycle est réalisée la mesure de fluorescence émise par le SYBR[®]Green dans le cadre d'une PCR en temps réel.

Les résultats de la RT-qPCR pour 3 lots de production (A, B et C) d'un même lentivirus sont présentés dans le **document 5.2**. On souhaite sélectionner le lot le plus concentré en lentivirus.

- 3.5. Recopier l'allure des courbes d'amplification et montrer comment les exploiter dans le cadre d'une quantification.
En déduire le lot présentant le titre en vecteur lentiviral le plus important.

4. Recherche de promoteurs efficaces et spécifiques pour l'utilisation de vecteurs lentiviraux dans le cerveau (4 points)

La recherche clinique sur les maladies neuro-dégénératives développe des vecteurs permettant de transfecter des neurones du cerveau afin de restaurer une déficience en protéine fonctionnelle. Pour sélectionner le promoteur le plus efficace et spécifique des neurones, plusieurs cassettes d'expression utilisant la GFP comme gène rapporteur sont testées.

Dans cette perspective, trois vecteurs de transfert ont été produits à partir du modèle du vecteur pLenti_GFP (**document 3.3**) :

- Le vecteur **pLenti_GFP_Enh/CMV** porte la séquence codante de la GFP sous contrôle du promoteur fort du CytoMegaloVirus (CMV) couplé à l'enhancer du CMV.
- Le vecteur **pLenti_GFP_SYN** porte la séquence codante de la GFP sous contrôle du promoteur de la syntaxine humaine (SYN), sans enhancer du CMV.
- Le vecteur **pLenti_GFP_Enh/SYN** porte la séquence codante de la GFP sous contrôle du promoteur syntaxine humaine (SYN), couplé à l'enhancer du CMV.

Des suspensions de mêmes titres de vecteurs ont été produites et injectées directement dans le cerveau de rats adultes.

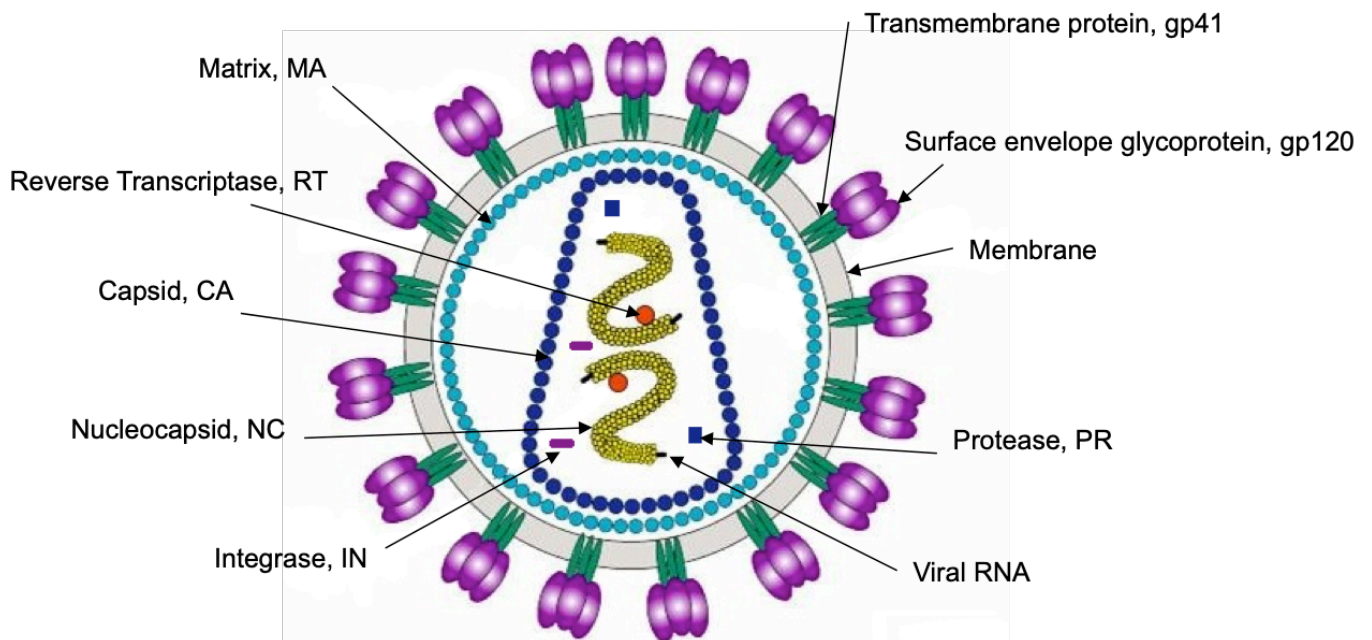
- 4.1. Analyser les résultats du **document 6.1** et conclure sur le vecteur conduisant à une expression importante et spécifique de la GFP dans les neurones.
- 4.2. Analyser les résultats du **document 6.2**. Indiquer s'ils confirment ou non, les résultats du **document 6.1**.
- 4.3. Indiquer en quoi l'expérience exposée dans le **document 6.2** permet-elle de confirmer la stabilité de l'intégration du vecteur dans le génome des cellules ?

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

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

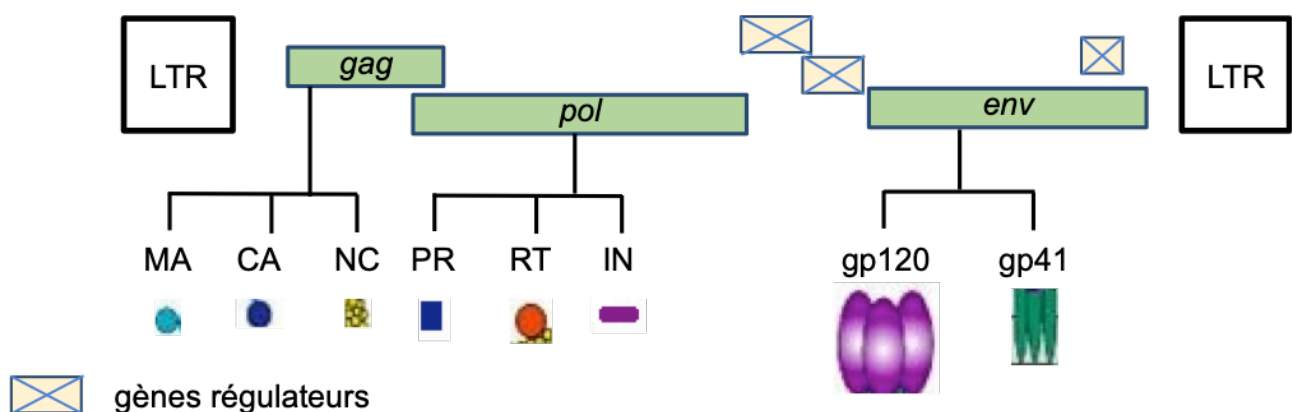
Document 1 : Caractéristiques majeures et cycle de reproduction du virus HIV-1

1.1. Ultrastructure du virion HIV-1



<https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:HI-Virion.svg> (consulté en nov 2020)

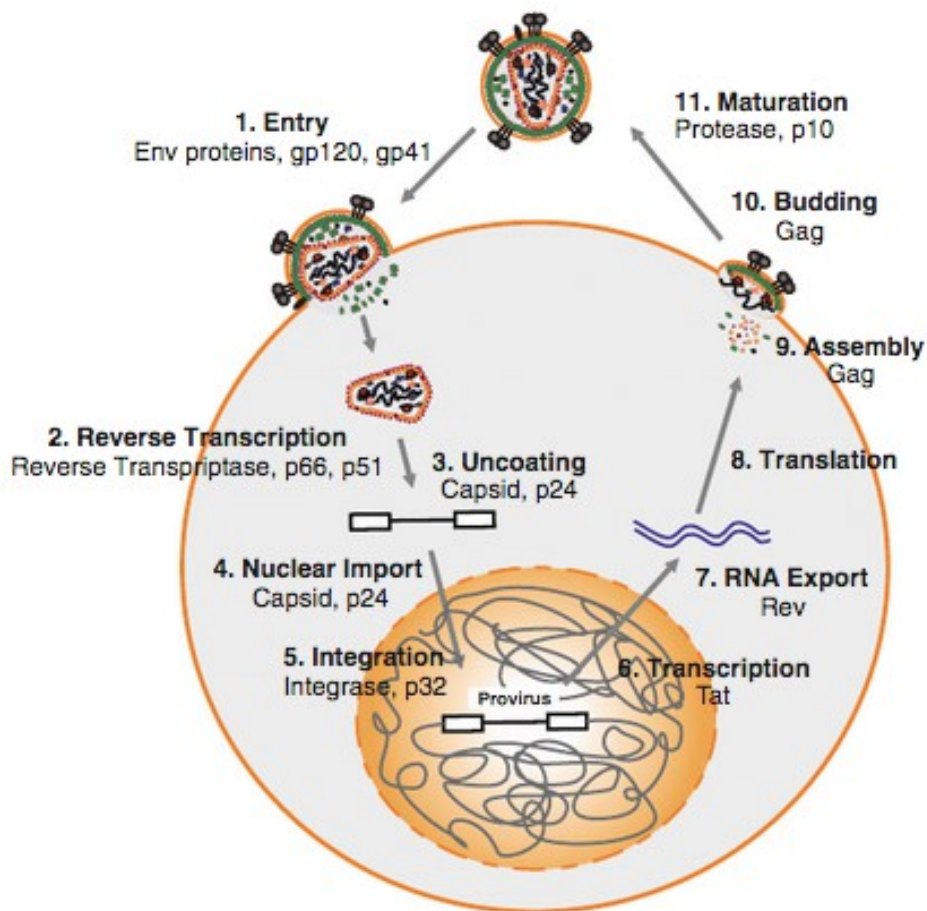
1.2. Éléments génétiques principaux contenus dans l'ARN du HIV-1



Encyclopedia of AIDS (2013)

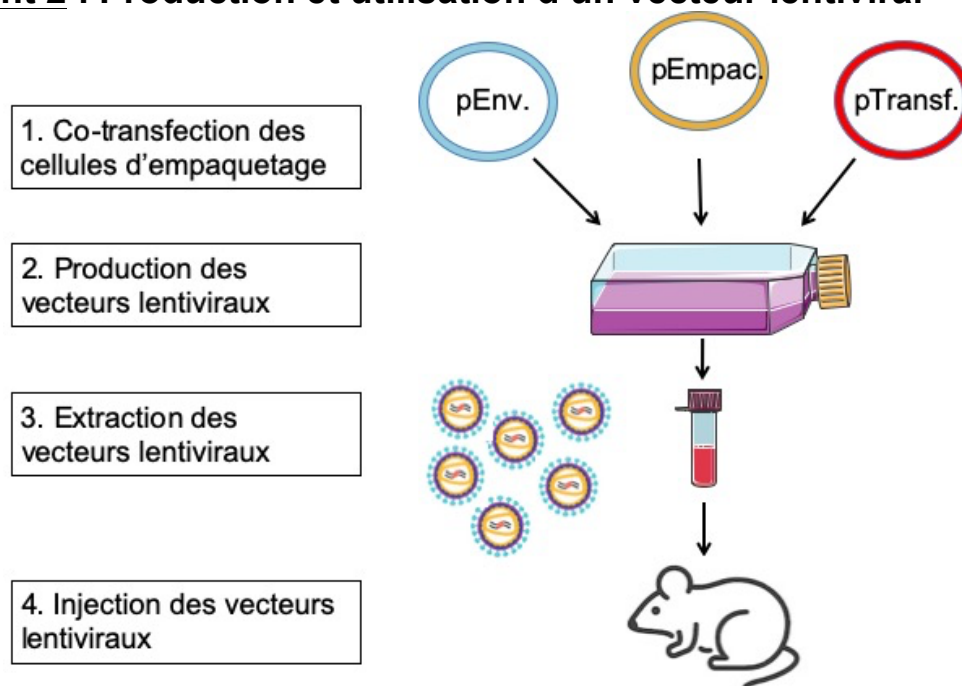
1.3. Cycle de reproduction du HIV-1

Les protéines impliquées dans chaque étape du cycle sont indiquées ci-dessous.



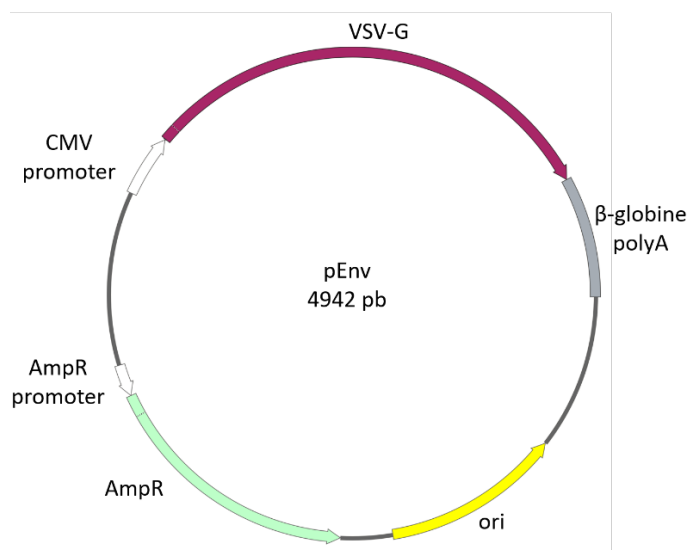
Encyclopedia of AIDS (2013)

Document 2 : Production et utilisation d'un vecteur lentiviral

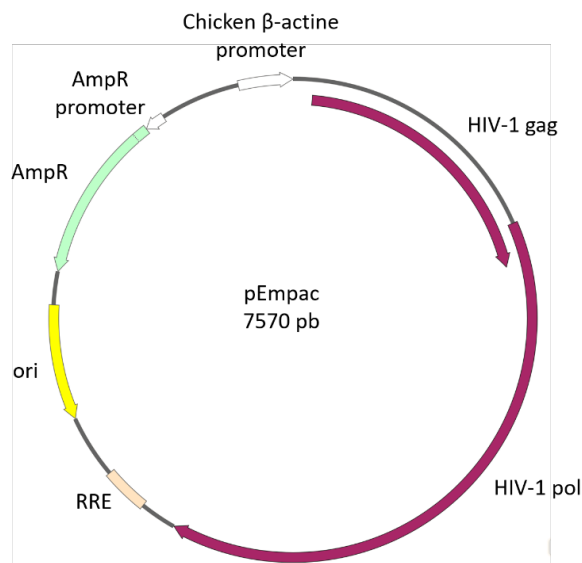


Document 3 : Cartes des trois plasmides utilisés pour la production des vecteurs lentiviraux

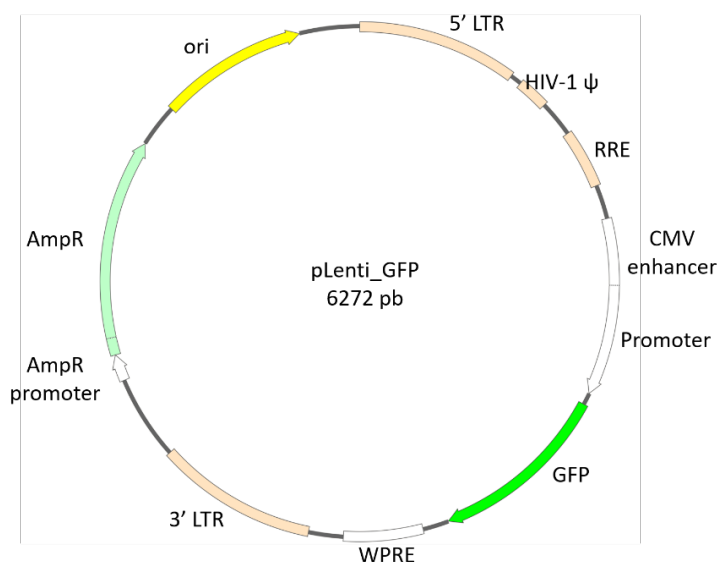
3.1. Plasmide d'enveloppe



3.2. Plasmide d'empaquetage



3.3. Plasmide de transfert



Éléments	Description
VSV-G	Protéine virale permettant la fusion enveloppe/membrane cellulaire.
β-globin poly (A)	Signal de polyadénylation de la bêta-globine humaine
CMV promoter	Promoteur fort du virus animal CMV.
CMV enhancer	Séquence enhancer du virus animal CMV
Chicken β actin promoter	Promoteur constitutif du gène de la bêta-actine du poulet.
HIV-1 gag	Séquence codante du gène <i>gag</i> de HIV-1.
HIV-1 pol	Séquence codante du gène <i>pol</i> de HIV-1.
HIV-1 ψ (psi)	Signal d'empaquetage de l'ARN de HIV-1
RRE	Signal d'adressage de l'ARN de HIV-1 vers le cytosol
WPRE	Signal de stabilisation de l'ARN viral
LTR	Long Terminal Repeat

Document 4 : Technique de transfection des cellules d'emballage**4.1. Extrait du protocole de production des vecteurs lentiviraux (Invitrogen)****Lentivirus preparation by Calcium-Phosphate Transfection**

1. Coat 10 cm cell culture dish with 10 mL 0.1 % gelatin, place at 4 °C for 1 h.
2. Aspirate off the gelatin, plate 2.5×10^6 of 293T cells per 10 cm dish in 10 mL culture medium and incubate at 37°C with 5 % CO₂.
3. 24h later, prepare calcium-phosphate precipitate (for one 10 cm dish): mix 20 µg lentivirus plasmid, 15 µg packaging plasmid and 6 µg envelope plasmid in a 1.5 mL sterile Eppendorf tube. Add 125 µL 1 M CaCl₂ and bring the volume to 0.5 mL with sterile water. Add 0.5 mL 2x BES buffered saline (10.7 g · L⁻¹ BES, 16.0 g · L⁻¹ NaCl, 0.27 g · L⁻¹ Na₂HPO₄) and shake briefly. Keep at RT for 20 min. Add dropwise of the precipitate solution to the cells and mix gently with medium. Incubate at 37 °C with 5 % CO₂.

4.2. Concentrations en ADN des solutions plasmidiques disponibles

Lentivirus plasmid:	10 µg · µL ⁻¹
Packaging plasmid solution:	5 µg · µL ⁻¹
Envelope plasmid:	12 µg · µL ⁻¹

Document 5 : Titrage de la solution virale par RT-qPCR

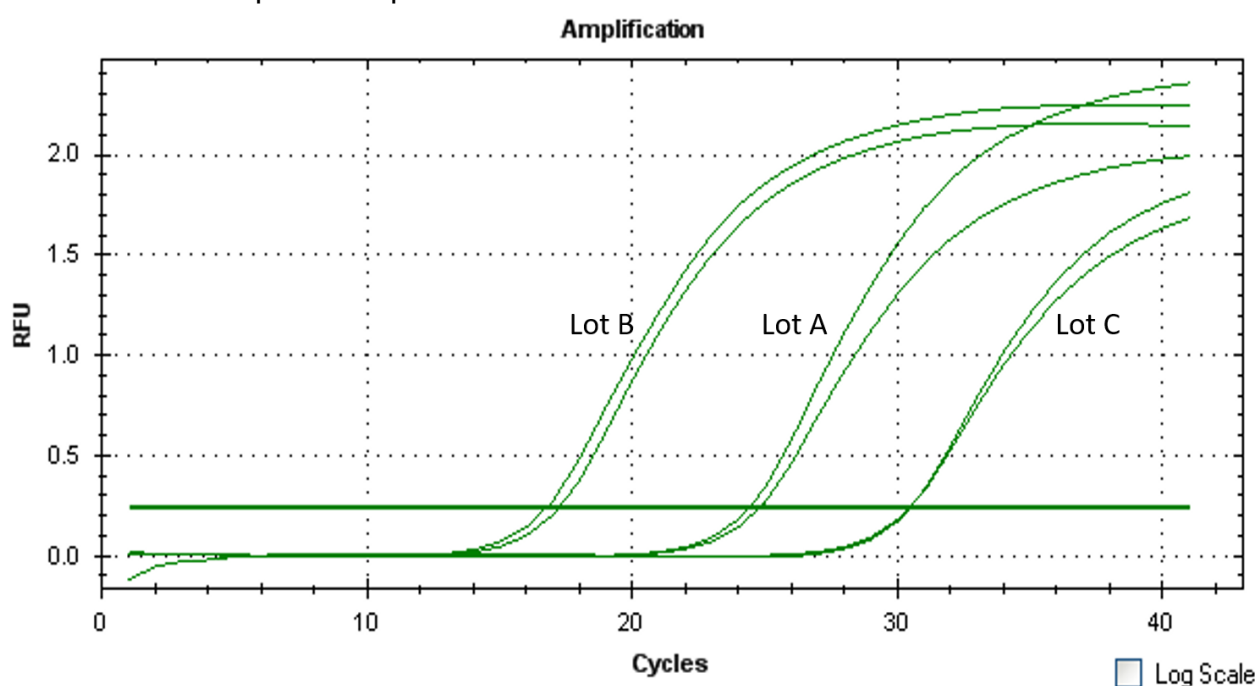
5.1. Localisation de la région cible dans la séquence codant la GFP

ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTATTTCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTCCACAC
 AACCAAAAAGGAACTGGAAAAATGTTTCCTTCTAATTACCATTATTGCCCCGTCAGCTCAGATTTAAATTGG
 CATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGT
 TGGATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACAT
 TCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAA**GCATTGAACAAACGAAACAAGGAACCTGG**
CTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAG
GTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTACAGTTCATCAACGGAAAA
TGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTA
TGTGATTCTAACCTCATTTCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAG
GAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAAGTACTTTGCTTATGAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACTGC
 AAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCC
 AGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATT
 CAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCA
 ATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTCTTTCACCATAATCAAT
 GGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTC
 GGAATGATCAGTGGAACCTACCACAGAAAGGGAAGTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATT
 GGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGTATGTTG
 GACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTCTGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAA
 CTTCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAAGGT
 TGGTTCAGTAGTTGAAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTG
 GTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATA
 GAGATGAACCGACTTGGAAGTGA

Séquence en gras : région à amplifier par PCR

5.2. Courbes d'amplification obtenues à l'issue de la RT-qPCR

Trois lots de production (A, B et C) ont été titrés en duplicats. Le même volume de prise d'essai a été testé pour chaque lot.



Document 6 : Étude de différents promoteurs pour le développement d'un vecteur lentiviral ciblant les neurones du système nerveux central

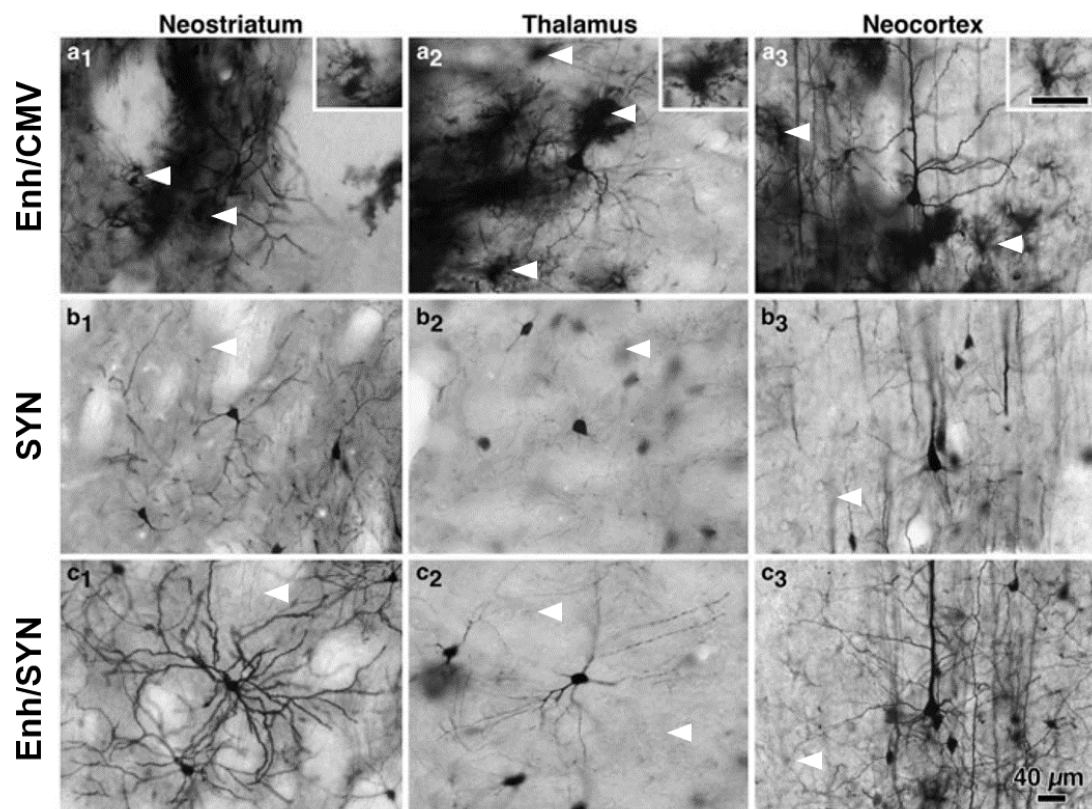
6.1. Détection de la GFP (visualisée en noir sur ces images) dans des coupes fines de trois régions du cerveau de rat (néostriatum, thalamus et néocortex) après injection de la solution de vecteur lentiviral :

Enh/CMV : Enhancer CMV - Promoteur CMV - GFP

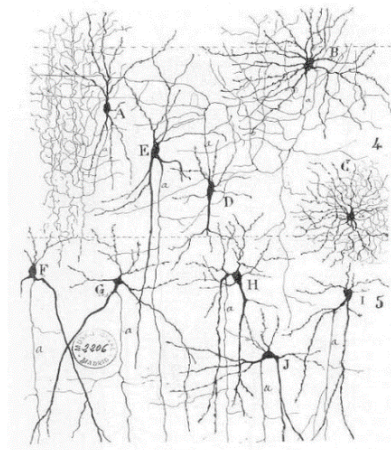
SYN : Promoteur syntaxine - GFP

Enh/SYN : Enhancer CMV - Promoteur syntaxine - GFP

Les flèches blanches indiquent la présence de cellules gliales, cellules différentes des neurones.



L'allure de différents neurones du cerveau est rappelée ci-dessous.

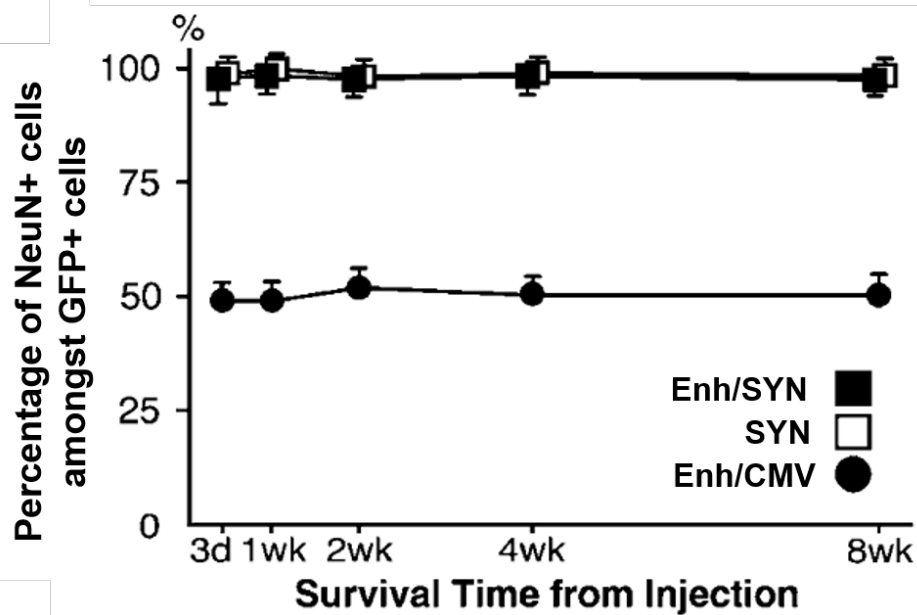


Dessins originaux de Ramon y Cajal, 1911.

6.2. Recherche de la proportion de neurones parmi la population de cellules du striatum positives pour la GFP

Les neurones sont mis en évidence par la présence de NeurineN (protéine spécifiquement exprimée par les neurones) dans 200 cellules du striatum positives pour la GFP après transfection par un des trois vecteurs (Enh/CMV, SYN ou Enh/SYN).

Le pourcentage de cellules NeuN+ a été déterminé à différents temps (3 jours à 8 semaines) après l'injection.



2021 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée 2 h – coefficient 1

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

Les protéines Tau et la maladie d'Alzheimer

Les protéines Tau, très solubles et non repliées, sont naturellement présentes en abondance dans les axones. Leur rôle physiologique est de stabiliser les microtubules axonaux en s'y associant.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative présentant deux caractéristiques pathologiques principales : la présence de plaques amyloïdes extracellulaires et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs : NeuroFibrillary Tangles). Ceux-ci sont dus à l'autoassemblage des protéines Tau, favorisé par une hyperphosphorylation de Tau.

1 Structure des protéines Tau et formation des complexes NFTs (7 points)

Le **document 1** présente schématiquement le mode de formation des complexes NFTs et les enzymes intervenant dans les modifications de la structure des protéines Tau.

1.1. Expliquer les étapes conduisant à la formation des NFTs.

Il existe 6 isoformes majeures des protéines Tau. Elles sont toutes composées de deux domaines dont un permettant la fixation aux microtubules. Celui-ci contient un nombre variable de répétitions de séquences R, toutes identiques. Le **document 2** présente la structure des différentes isoformes des protéines Tau.

1.2. Argumenter la nomenclature utilisée pour les isoformes des protéines Tau en s'appuyant sur leur composition structurale. Dégager la notion de domaine protéique.

Les différents sites de phosphorylation présents sur ces protéines sont répertoriés dans le **document 3**.

1.3. Identifier les trois résidus aminoacyles pouvant être phosphorylés. Représenter la structure développée de l'un d'entre eux sous formes phosphorylée et non phosphorylée.

Le **document 4** présente une étude des différentes isoformes phosphorylées des protéines Tau chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

1.4. Présenter les étapes principales de la technique Western Blot.

1.5. Schématiser ou expliquer l'interaction des anticorps AT100 et AD2 avec une protéine Tau dans les deux situations présentées. Analyser précisément le document pour montrer la modification de la protéine Tau chez un patient atteint de la maladie.

2. Production d'une protéine Tau recombinante (5 points)

Pour l'étude des fonctions moléculaires, biochimiques et cellulaires des protéines Tau, il est nécessaire de disposer d'une grande quantité de cette molécule. Pour ce faire, une production en bioréacteur est réalisée à partir d'une souche d'*E coli* transformée exprimant une protéine Tau couplée à une étiquette « 6 His ». Les cellules sont lysées par sonication et le lysat est traité selon la procédure présentée dans le **document 5**.

- 2.1. Expliquer comment la sonication permet de lyser les cellules.
- 2.2. Préciser le rôle de chaque étape de la chromatographie Ni-NTA.
- 2.3. En déduire le principe de l'élution.

Après la purification sur colonne Ni-NTA de la protéine Tau, une seconde procédure décrite dans le **document 6**, est mise en œuvre.

- 2.4. Dégager le principe et l'intérêt de chacune des deux étapes de cette procédure.

3 Stratégies thérapeutiques (6 points)

Plusieurs pistes thérapeutiques sont envisagées pour traiter les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Modifications de la structure tridimensionnelle des protéines Tau

Une courte séquence de 6 aminoacides VQIVYK (séquence appelée PHF6) est impliquée dans l'autoassemblage organisé des protéines Tau.

Le bleu de méthylène, actuellement en essai clinique de phase 3 contre la maladie d'Alzheimer, est une molécule qui oxyde spécifiquement certaines cystéines des protéines Tau, notamment les C291 et C322. Cette oxydation conduit à la désagrégation des NFTs. Le **document 7** présente une partie de la séquence de la protéine Tau incluant ces cystéines.

- 3.1. Proposer une hypothèse expliquant la désagrégation des NFTs.
- 3.2. Schématiser ou expliquer le changement de conformation de Tau suite à l'oxydation des deux cystéines pour former une cystine intrachaine en précisant la localisation de la séquence PHF6.

Inhibition de la protéolyse des protéines Tau

Les caspases sont des protéases à cystéine clivant les protéines après un résidu aspartyl. Ces enzymes reconnaissent spécifiquement les motifs peptidiques « Xaa₁-Xaa₂-Asp » avec Xaa₁ hydrophile et Xaa₂ hydrophobe.

Les caspases sont impliquées dans des modifications post-traductionnelles des protéines Tau, favorisant leur agrégation. Il a été montré que le bleu de méthylène peut également inhiber l'action de ces enzymes. L'effet du bleu de méthylène sur la caspase a été déterminé par mesure des paramètres cinétiques de l'enzyme (**document 8**).

- 3.3. Montrer que le composé Ac-VEID-Afc est un substrat de la caspase.
- 3.4. Déterminer la vitesse initiale maximale dans chacune des conditions, en précisant la méthode utilisée.
- 3.5. Comparer les K_M de la caspase dans les trois conditions testées.
- 3.6. En déduire le mode d'action du bleu de méthylène.

Sélection de peptides ayant une action sur l'agrégation des protéines Tau

Certains peptides pourraient être utiles pour développer de nouvelles voies thérapeutiques. Ces peptides se fixent sur la séquence PHF6 des protéines Tau.

3.7. Montrer, à partir du **document 1**, comment ces peptides limitent la formation des NFTs.

L'efficacité de trois peptides a été testée en utilisant un marqueur fluorescent dont la fluorescence est intensifiée en présence d'agrégats de Tau (**document 9**).

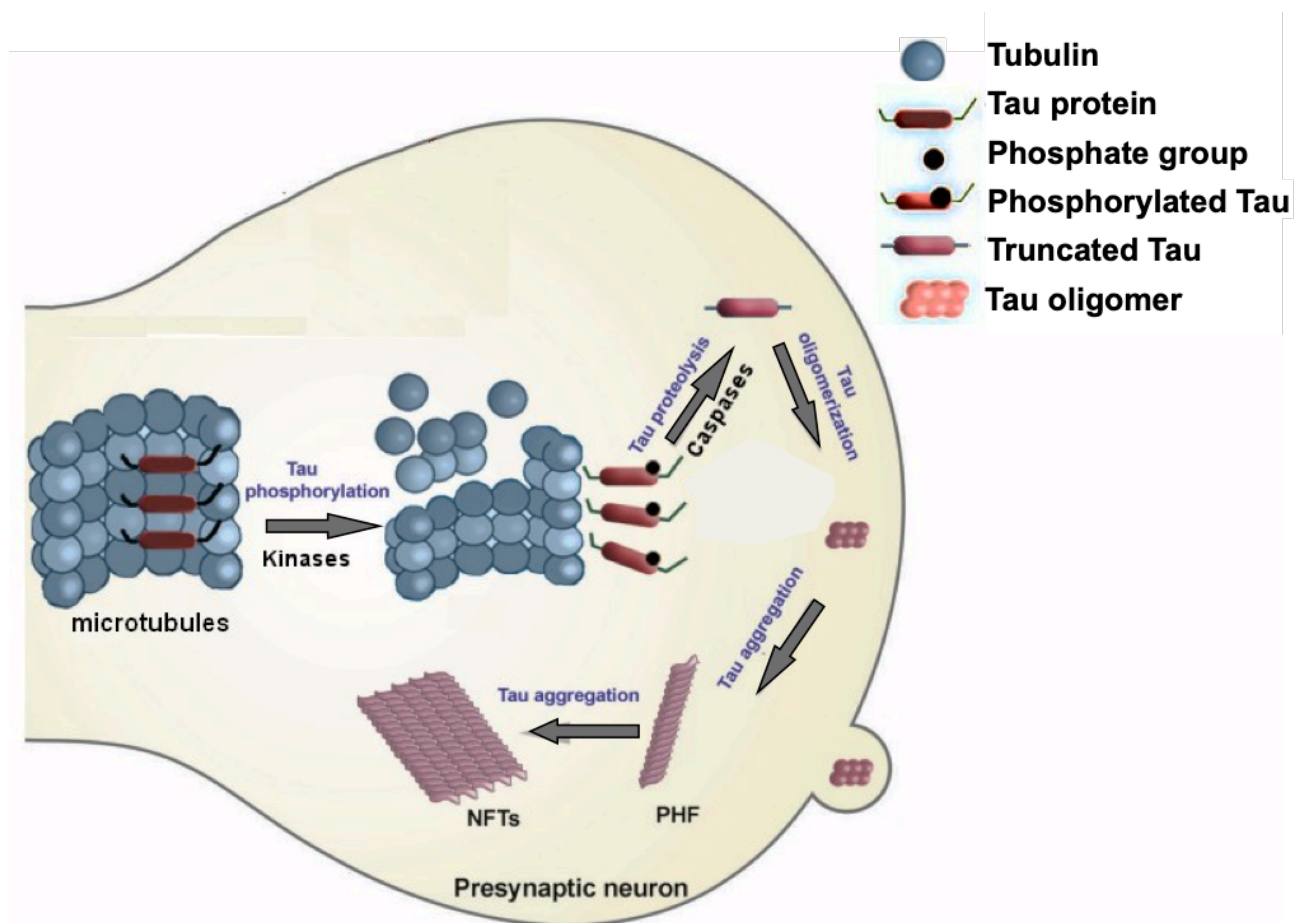
3.8. Analyser le document pour identifier le peptide ayant l'efficacité maximale. Proposer une explication de la différence observée sur l'effet de TD28 et TL28.

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

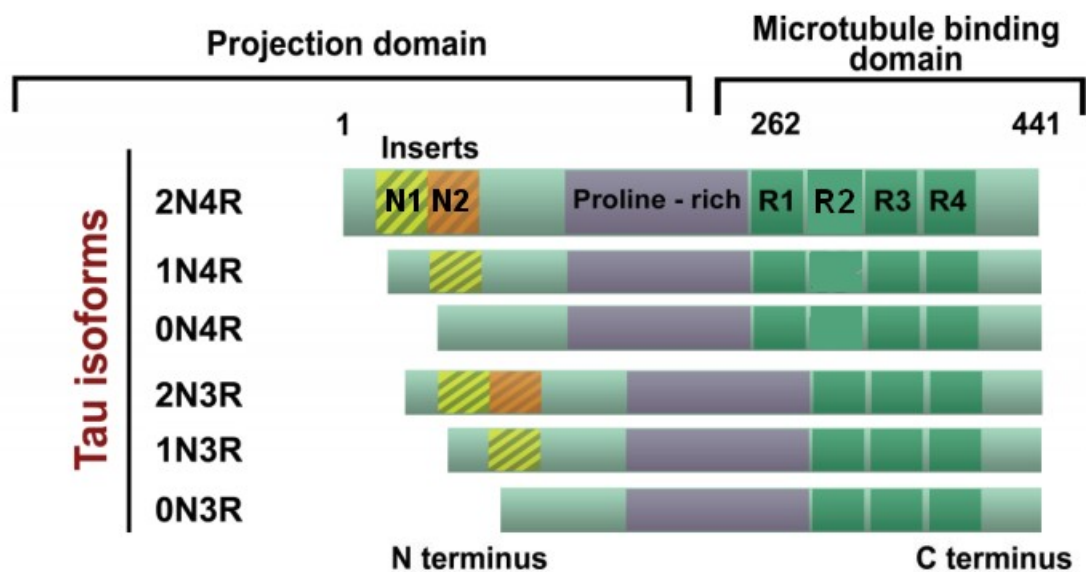
Document 1 : Représentation schématique du mode de fonctionnement des protéines Tau



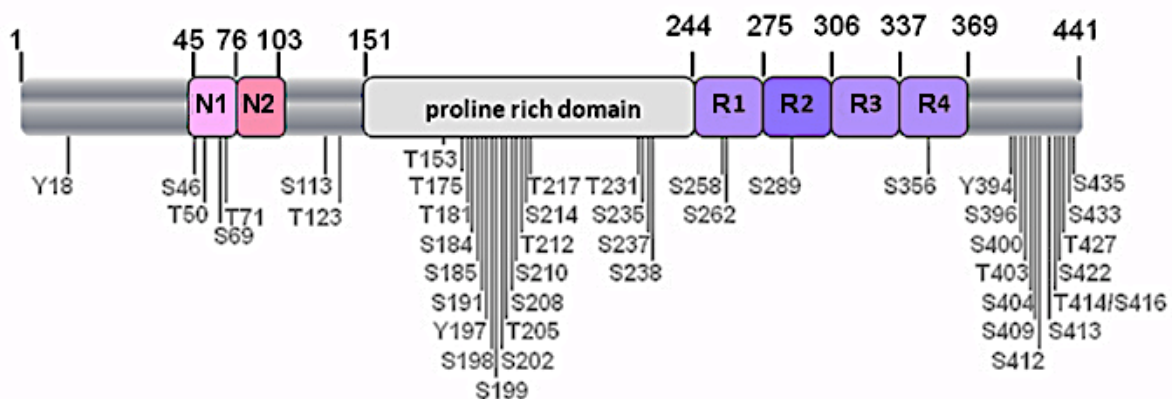
PHF : paired helical filament

NFTs : NeuroFibrillary Tangles

Document 2 : Structure des isoformes des protéines Tau



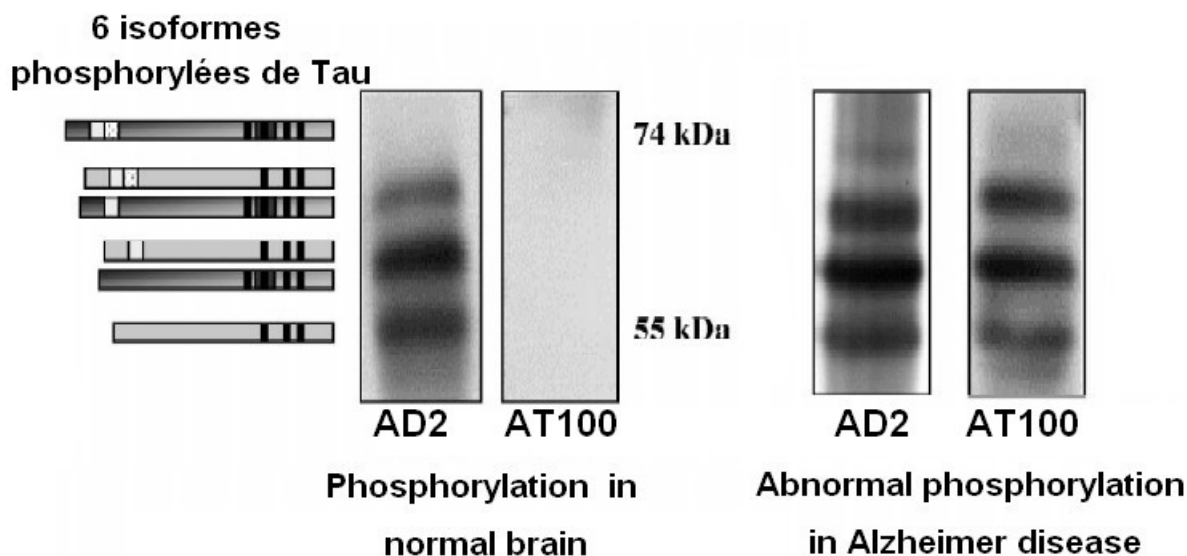
Document 3 : Sites Potentiels de phosphorylation des protéines Tau



Ala	A	Gly	G	Pro	P
Arg	R	His	H	Ser	S
Asn	N	Ile	I	Thr	T
Asp	D	Leu	L	Trp	W
Glu	E	Lys	K	Tyr	Y
Cys	C	Met	M	Val	V
Gln	Q	Phe	F		

Code international des acides aminés

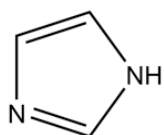
Document 4 : Étude par Western Blot de la phosphorylation des isoformes de Tau dans la maladie d'Alzheimer



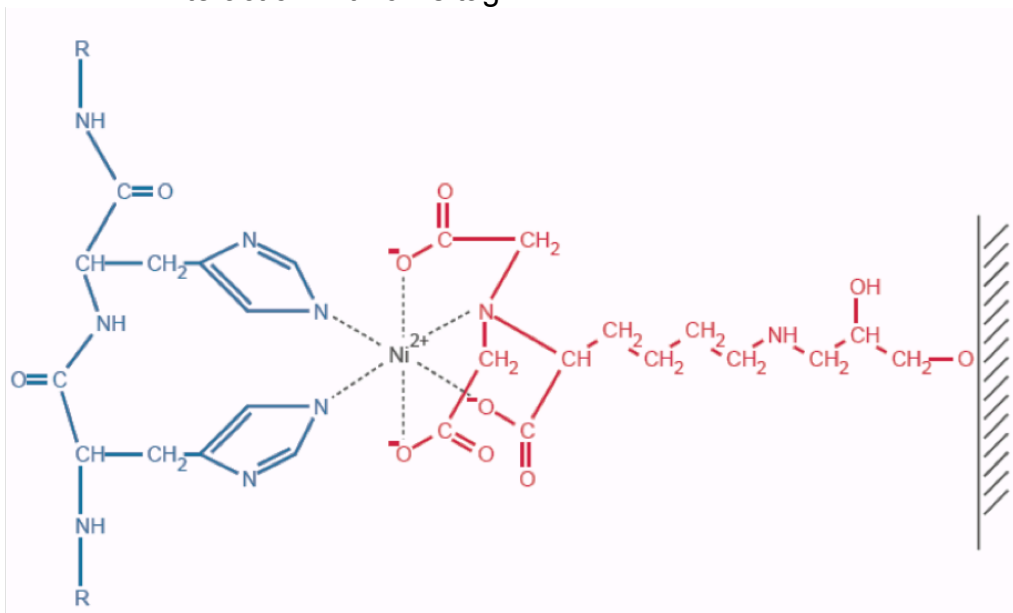
Les phosphorylations sont révélées avec les anticorps radiomarqués AT100 (spécifiques de l'épitope comprenant T212 et S214 phosphorylées) et AD2 (spécifiques de l'épitope comprenant S396 et S404 phosphorylées).

Document 5 : Protein purification by Ni-NTA chromatography

Imidazol



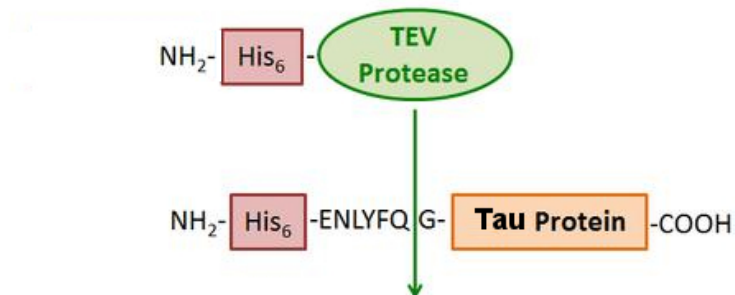
Ni-NTA interaction with 6His tag



A Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic acid) column was used. Chelating sepharose resin was charged with 10 mM $\text{NiCl}_2/\text{CH}_3\text{COONa}$ pH 4.0 and equilibrated with buffer A (50 mM Na_2PO_4 , pH 7.0, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole) before addition of the lysat. The column was re-washed with buffer A, followed by buffer B (50 mM Na_2PO_4 pH 7.0, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole) and the protein eluted with buffer C (50 mM Na_2PO_4 pH 7.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole).

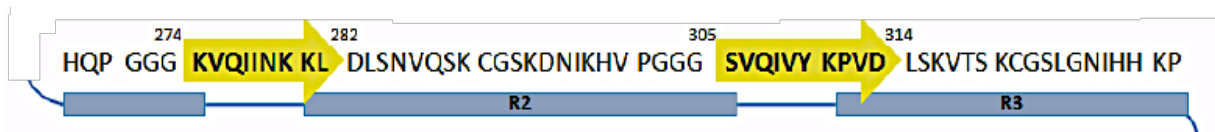
Document 6 : Élimination de l'étiquette « 6His » de la protéine Tau

- La protéine "Tau-6His" élue précédemment est ensuite dialysée pendant 10 heures contre une solution tampon ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris HCl pH 7,5, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl), en présence de $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de protéase "TEV-6His*". Cette protéase permet de cliver l'étiquette histidine de "Tau-6His".



- Après dialyse, le contenu du boudin de dialyse est déposé sur colonne à Ni-NTA.
- * Protéase extraite du tabac (*Tobacco Etch Virus*) et modifiée par une étiquette de 6 Histidines.

Document 7 : Séquence d'une partie de la protéine Tau



Document 8 : Étude cinétique de l'activité de la caspase en présence de bleu de méthylène

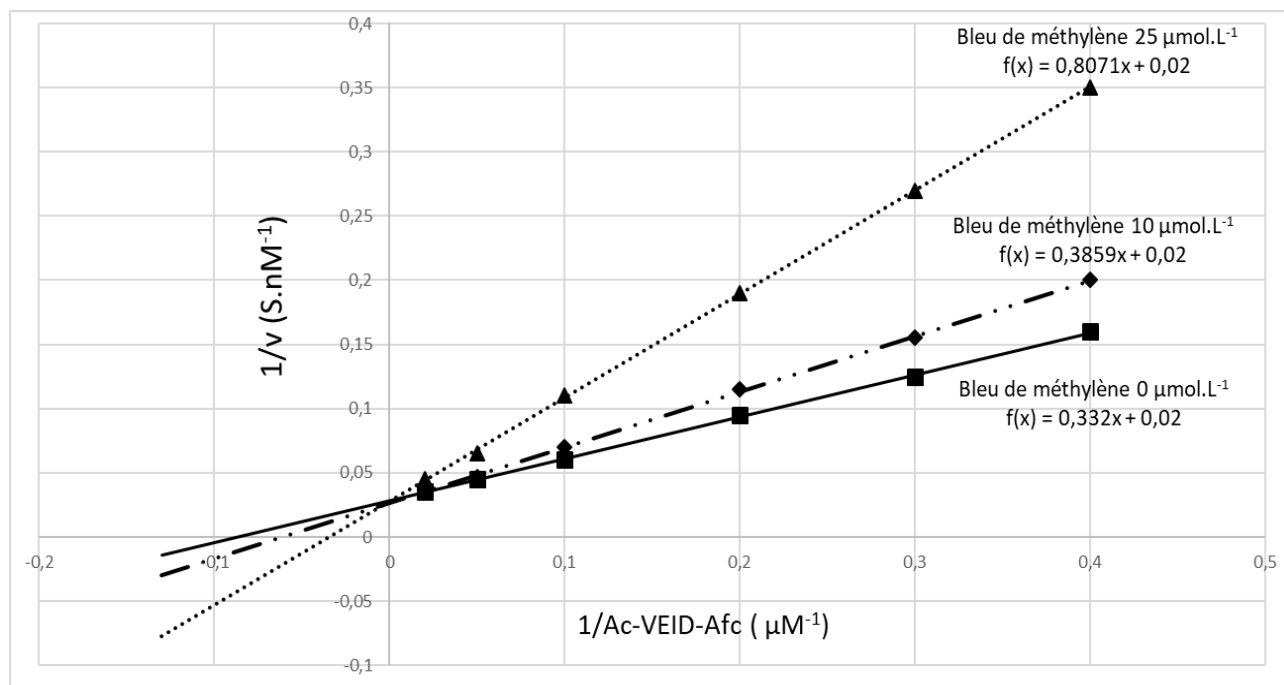
Méthode de dosage d'activité de la caspase

L'activité de la caspase a été mesurée *in vitro* par dosage fluorogénique avec le substrat Acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-7-Amino-4-trifluoromethyl-couramin (Ac-VEID-Afc) dans du tampon pH 7,2.

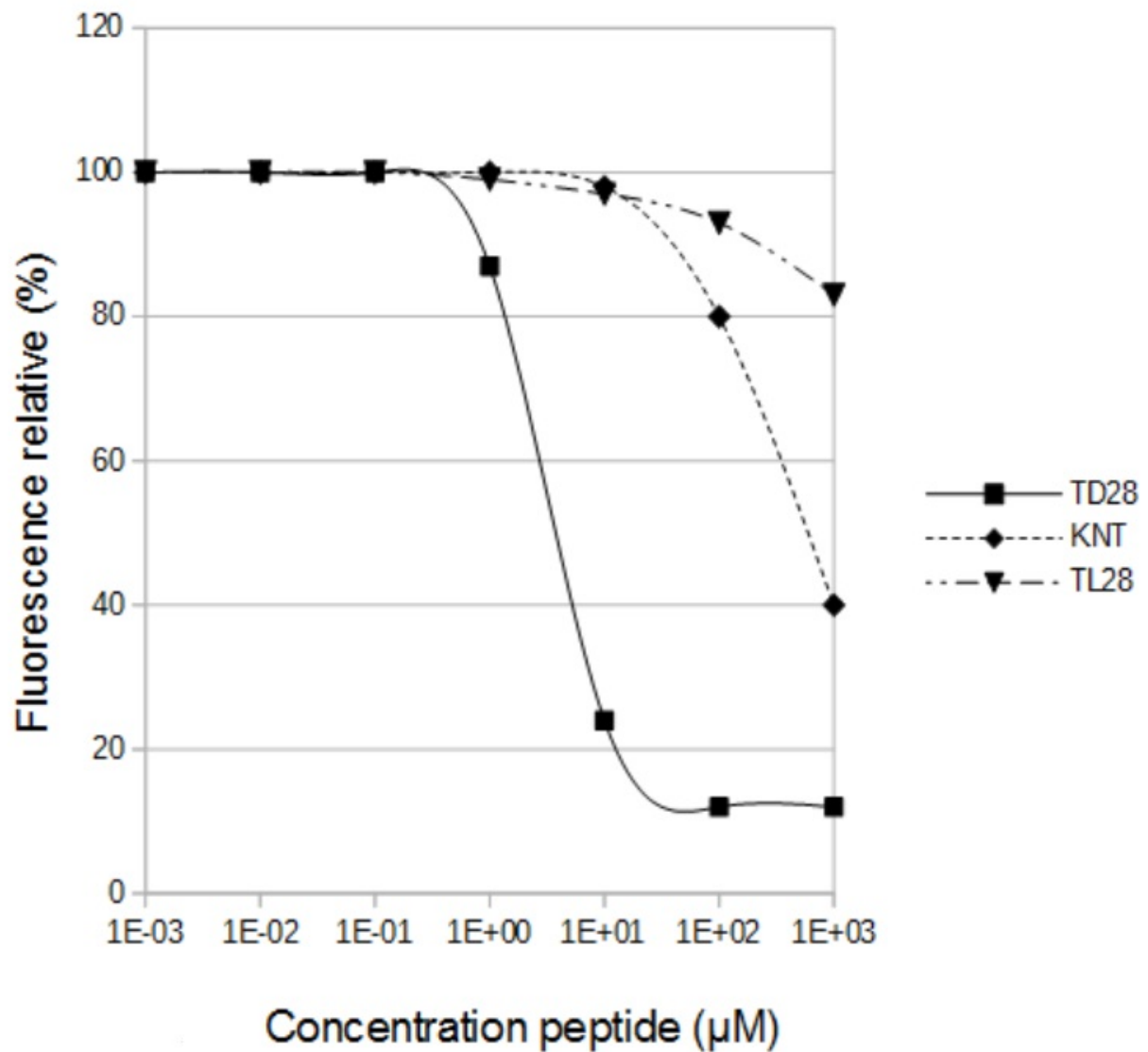
Le mélange réactionnel est constitué de $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de Caspase et de concentrations variables en substrat, pour trois concentrations en bleu de méthylène. L'activité est mesurée dans une plaque noire de 96 puits, incubée à 37°C et lue toutes les 2 minutes pendant 100 minutes.

L'Afc libre est fluorescente : λ_{max} Excitation = 400 nm, λ_{max} Émission = 505 nm.

Résultats



Document 9 : Action des peptides TD28, KNT et TL28 sur la protéine Tau



TD28 : TTSLQMRLYYPP (D-aminoacyls)

TL28 : TTSLQMRLYYPP (L-aminoacyls)

KNT : KNT PQHRKLRLS (D-aminoacyls)

2021 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français, calculatrice avec mode examen actif ou calculatrice sans mémoire, « type collègue ».

Les sidérophores : il fallait le « fer »

Les sidérophores sont des métabolites synthétisés et excrétés dans le milieu extracellulaire par certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*. Ces molécules possèdent une fonction chélatrice ainsi qu'une affinité très importante vis-à-vis du fer ferrique. Elles permettent l'internalisation de ces ions, indispensables au métabolisme bactérien, mais faiblement biodisponibles.

L'étude des interactions entre les bactéries de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, leur environnement et les sidérophores, a permis de mettre au point des outils biotechnologiques destinés à la dépollution des sols contaminés par des métaux lourds ou encore pour contourner la résistance aux antibiotiques de certaines bactéries.

1. Les sidérophores, des métabolites indispensables à l'internalisation du fer chez *Pseudomonas aeruginosa* (9,5 points)

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif, pourvu d'une oxydase et aérobic strict. L'étude de sa paroi permet de comprendre les interactions existantes entre le microorganisme et son environnement.

La structure de la paroi des bactéries à Gram négatif est présentée dans le **document 1**.

- 1.1. Reporter sur la copie les numéros de 1 à 8 et identifier les structures correspondantes.
- 1.2. Citer le nom du milieu de culture permettant la mise en évidence du type respiratoire. Schématiser le résultat attendu pour *P. aeruginosa* après une période d'incubation suffisante.

Les sidérophores forment des complexes avec le fer présent dans l'environnement.

Les sidérophores sont des métabolites secondaires, dont la structure complexe comporte des groupements acyls dérivés d'intermédiaires du cycle de Krebs, tels que le succinate, le malate ou l' α -cétoglutarate.

Les complexes « sidérophore- Fe^{3+} » sont ensuite internalisés dans la cellule par des mécanismes de transport actif. Dans le milieu intracellulaire, les complexes se dissocient et le fer peut alors être utilisé notamment pour le fonctionnement des enzymes de la chaîne respiratoire. Le sidérophore, dissocié du fer, est recyclé vers le milieu extracellulaire par une pompe à efflux qui nécessite de l'énergie.

La chaîne respiratoire de *P. aeruginosa* est présentée dans le **document 2**.

- 1.3. Expliquer la production d'ATP à partir du gradient de protons, formé au niveau de la chaîne respiratoire.
- 1.4. Dédire l'importance de ce gradient dans le cycle d'utilisation des sidérophores par la cellule.

La production de sidérophores par *P. aeruginosa* a été étudiée dans trois milieux de culture. Leur composition et la vitesse spécifique de croissance de la souche en phase exponentielle de croissance, sur ces milieux, sont présentées dans le **document 3**.

- 1.5. Identifier les composés source de carbone et d'énergie au sein de ces trois milieux.

- 1.6. En déduire les types trophiques de *P. aeruginosa*.
- 1.7. Comparer les vitesses spécifiques de croissance de la souche en phase exponentielle (Q_{xexp}) et les mettre en relation avec la composition de chacun des milieux.

Le document 4 présente les conditions de fermentation (**document 4a**) et les résultats de la croissance et de la production de sidérophores par *P. aeruginosa* dans le milieu « C » (**document 4b**).

Dans un tel milieu, la corrélation qui relie l'atténuation à 600 nm (D_{600}) à la concentration en biomasse (X) de *P. aeruginosa* est : si D_{600} est égale à 1, $X = 0,65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. A la fin du procédé de fermentation, la concentration massique en acide glutamique résiduel est évaluée à $0,41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et le rendement global de production en sidérophores est de 210 μmoles de sidérophores par g d'acide glutamique.

- 1.8. Reproduire le tableau ci-dessous sur la copie. Le compléter, après avoir établi les équations aux grandeurs puis aux valeurs numériques pour les paramètres manquants.

Milieu	$Y_{x/s}$ g de biomasse $\cdot$ g ¹ de substrat	$Y_{p/s}$ μmoles de sidérophores $\cdot$ g ¹ de substrat	PVHG μmoles de sidérophores $\cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Milieu A	0,057	3,37	2,37
Milieu B	0,74	10,3	7,5
Milieu C			

- 1.9. Comparer les résultats pour l'ensemble des milieux utilisés. Conclure, en argumentant la réponse, sur le milieu le plus adapté pour la production de sidérophores par *P. aeruginosa*.

2. Les sidérophores comme outils pour la remédiation des sols (3 points)

Les sidérophores bactériens de *P. aeruginosa* sont capables de complexer de nombreuses variétés de métaux lourds (cuivre, cadmium, plomb,...) permettant d'envisager une dépollution des sols par des plantes hyperaccumulatrices de métaux. Les plantes sont cultivées en présence des micro-organismes d'intérêt (**document 5**).

Dans la rhizosphère, les racines libèrent des acides organiques, des ions, du dioxygène, de l'eau et des molécules chimio-attractives. Les microorganismes, en plus de la sécrétion de sidérophores, libèrent des éléments inorganiques, réalisent la fixation d'azote et facilitent la suppression d'organismes phytopathogènes.

- 2.1. Nommer et expliquer ce mode de relation plante/microorganismes.
- 2.2. À l'aide du **document 5**, expliquer le rôle des sidérophores bactériens dans la dépollution des sols.

Des études menées chez des plantes accumulatrices de métaux ont démontré que la présence de sidérophores bactériens dans les sols favorise leur développement. Le **document 6** présente des résultats expérimentaux obtenus chez le trèfle rouge.

- 2.3. Analyser le **document 6**, et montrer l'intérêt de la présence de sidérophores bactériens pour le développement de la plante.

3. Des sidérophores pour contourner la résistance des bactéries aux antibiotiques (5,5 points)

La plupart des infections nosocomiales sont causées par des bactéries pathogènes opportunistes (BPO) comme les bactéries productrices de métallo- β -lactamase (MBL). Parmi ces bactéries figure *Pseudomonas aeruginosa*.

L'apparition de résistances aux antibiotiques des BPO a rendu le traitement difficile pour combattre les infections. Il est donc devenu impératif d'explorer de nouvelles options thérapeutiques.

Une stratégie possible serait d'imposer un environnement pauvre en fer grâce à des exosidérophores tels que la déféroxamine-B (DFO-B) produite par *Streptomyces pilosus*.

- 3.1. Proposer une définition des deux expressions soulignées.

Le document 7 présente le protocole de détermination de la CMI de la DFO-B utilisée seule et en combinaison avec de l'ampicilline.

- 3.2. Préciser l'intérêt des 3 témoins réalisés, ainsi que le résultat attendu pour chacun d'eux.

- 3.3. À partir de l'analyse du tableau du **document 8**, déterminer la CMI de la DFO-B vis-à-vis de la souche étudiée en présence et en absence d'ampicilline. Justifier la réponse.

Le document 9 montre l'effet des exosidérophores associés à l'ampicilline sur la croissance de *P. aeruginosa*.

- 3.4. À l'aide du graphe C, montrer que la souche de *P. aeruginosa* est insensible à la présence d'ampicilline à $0,01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

- 3.5. Commenter l'effet de l'exosidérophore sur la croissance (en présence et en absence d'ampicilline).

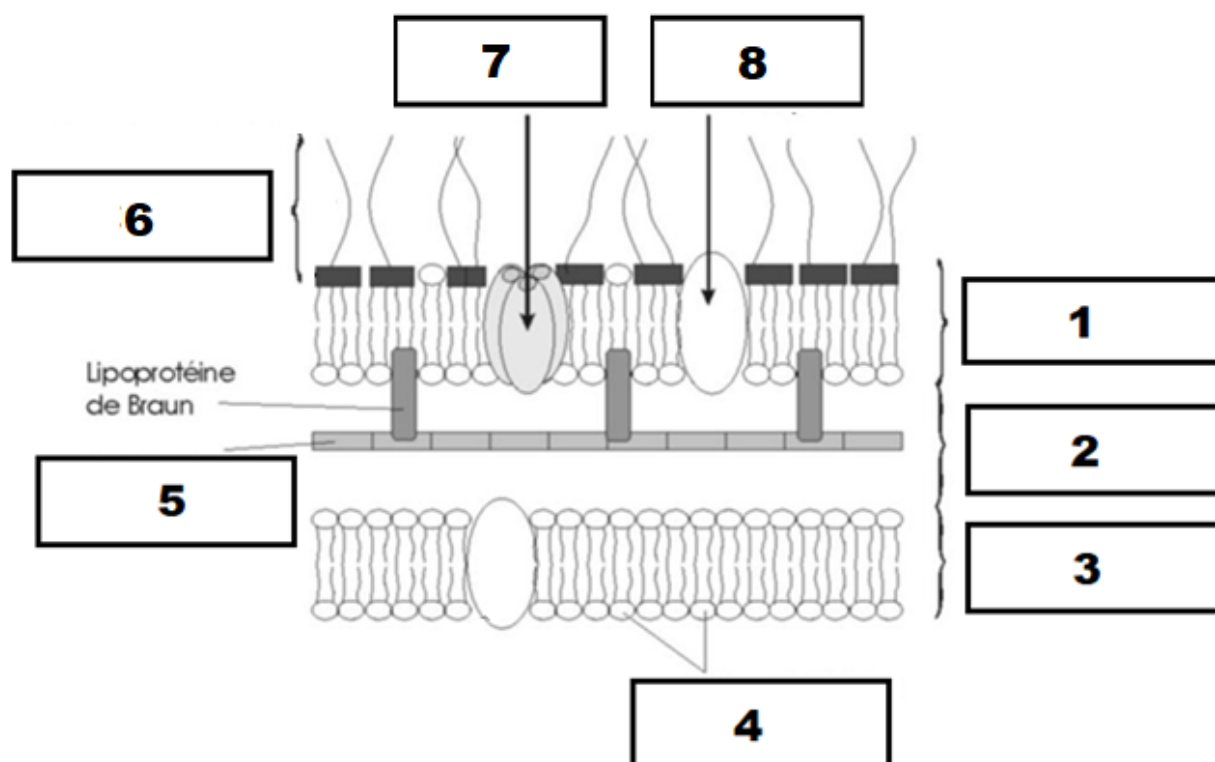
- 3.6. Déduire de l'analyse des deux derniers documents, l'intérêt d'utiliser simultanément l'exosidérophore DFO-B et l'ampicilline. Conclure.

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

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

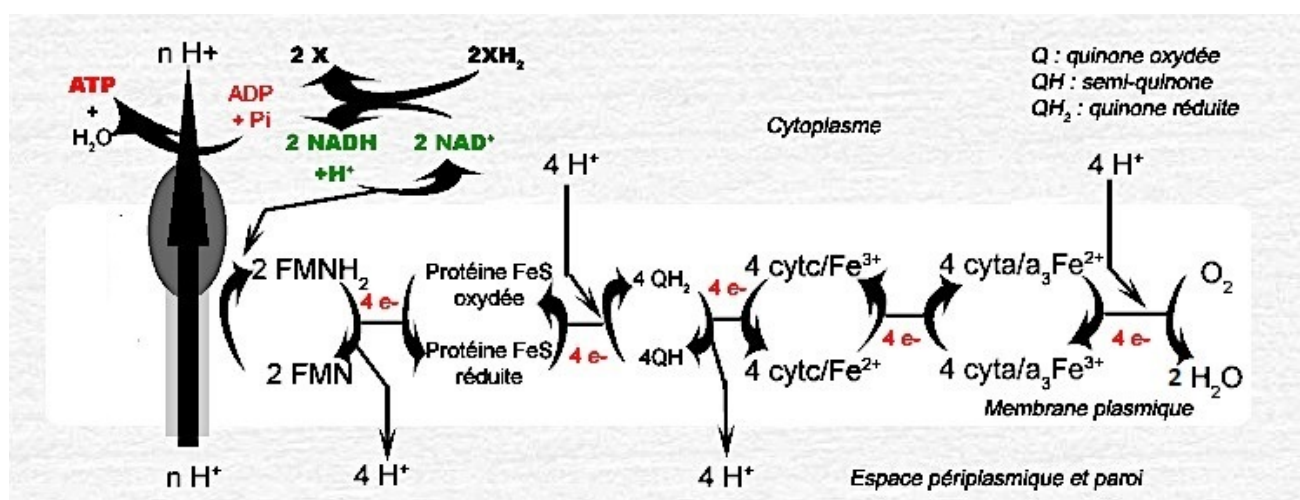
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1 : La paroi des bactéries à Gram négatif



Ressources pédagogiques. La paroi des Gram négatifs.
Disponible sur : <http://disciplines.ac-montpellier.fr/> (consulté le 30 juin 2020).

Document 2 : La chaîne respiratoire aérobie chez *P. aeruginosa*



Disponible sur http://www.ucam.ac.ma/fssm/biologie/cours_td/microbiosv3/metabolismenutrition.htm
(consulté le 02 octobre 2020)

Document 3 : Composition des milieux de culture utilisés pour la production de sidérophores par *P. aeruginosa*

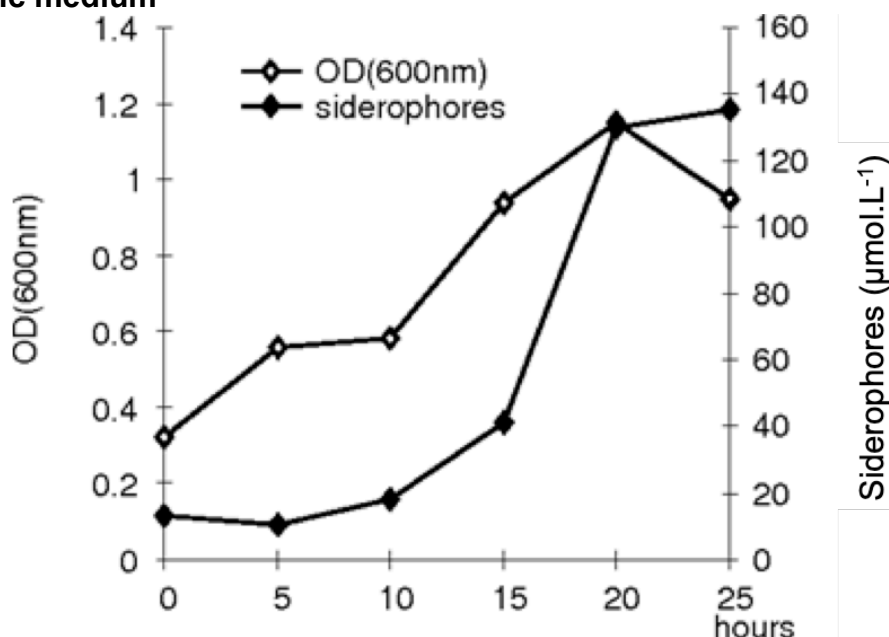
Composés en g · L ⁻¹	Milieux		
	A	B	C
K ₂ HPO ₄	6	0,56	
KH ₂ PO ₄	3		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2		
Succinate	4		
Glucose		10	
Urée		0,85	
Acide glutamique		1	1
(NH ₄) ₂ NO ₃			0,02
Na ₂ SO ₄			0,02
Vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle			
Q _{xexpo} en h ⁻¹	0,07	0,1394	0,064

Document 4 : Essais de production de sidérophores par *P. aeruginosa* en milieu C

4a. Fermentation conditions

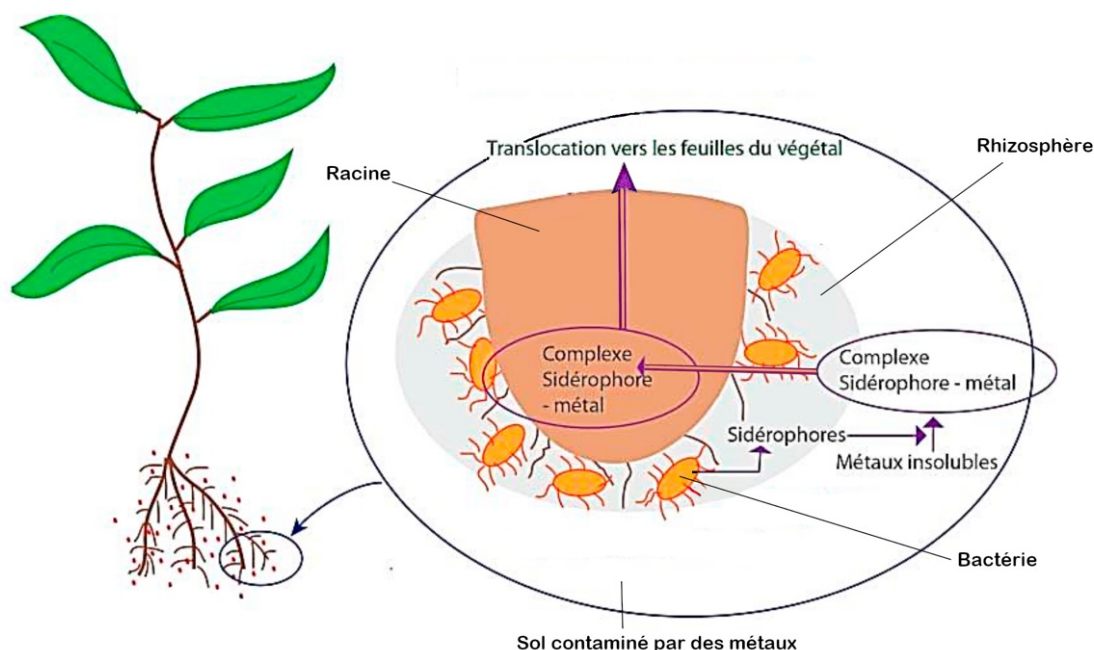
To initiate growth of *Pseudomonas aeruginosa* a lyophilized culture was placed onto sterile Kings Medium agar10 and incubated for 24 hours at 30°C. The culture was transferred to seed broth (200 mL of Kings Medium) contained in a 500 mL Erlenmeyer flask and incubated at 30°C on a rotary shaker (175 rpm) for 6-8 hours. A 500 mL Erlenmeyer flask containing 200 mL of the same seed medium was incubated as specified above. The seed culture was transferred to a 5 liter fermenter containing each one 3.5 liter of the three liquid media (pH 7) described in document 3.

4b. Growth and production of siderophores by *Pseudomonas aeruginosa* PSS in glutamic medium



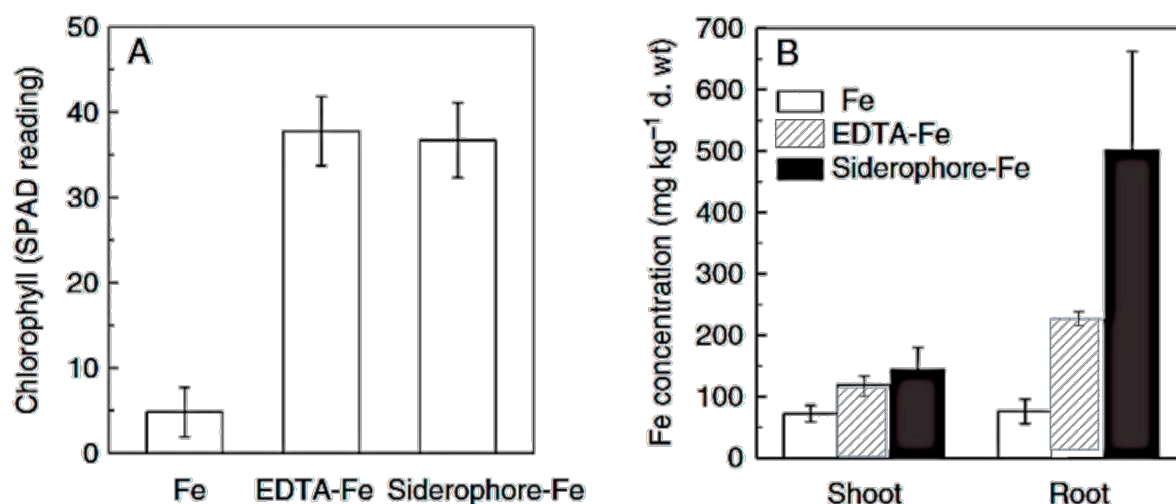
Documents 3 et 4 d'après María Elena Díaz de Villegas et al. Microbiología, 2002, Vol. 44, N°3-4, p.112-117.
Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. Revista Latinoamericana

Document 5 : Phytoextraction de métaux de sol contaminé



Adapté de : <http://realise.unistra.fr/uploads/media/fiche-irebs.pdf> (consulté le 3 juillet 2020).

Document 6 : Influence de la présence de sidérophores bactériens sur la synthèse de chlorophylle et la concentration en fer chez le trèfle rouge



Notes : (A) Chlorophyll synthesis and (B) Fe concentration in red clover plants after 4 weeks culture in Fe, + EDTA-Fe (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), or + siderophore-Fe complexes (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)

EDTA is an iron chelator, used as a control

Abbreviation : EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid

D'après Chong Wei Jin et al., *Annals of Botany*, Volume 105, Issue 5, May 2010, p.835–841.
Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere

Document 7 : Détermination de la CMI de DFO-B seul et en combinaison avec l'ampicilline

Pour chaque souche testée (= isolat), la CMI est déterminée en triple essais dans des plaques de microtitration à 96 puits en utilisant le bouillon Mueller-Hinton (MHB). Le volume total dans chaque puits est de 200 μL et les plaques sont incubées à 37°C pendant 24 h.

Pour déterminer la CMI, des concentrations de DFO-B sont utilisées individuellement et en combinaison avec de l'ampicilline (antibiotique de la famille des bêta-lactamines). Les concentrations en DFO-B testées sont de 0,5-1-2,5-5-7,5 et 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. La concentration en ampicilline est maintenue constante à 0,01 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Trois témoins sont réalisés en parallèle : le témoin n°1 avec 200 μL de MHB sans isolat, le témoin n°2 composé de 200 μL de MHB ensemencé par un isolat et le témoin n°3 composé de 200 μL de MHB + ampicilline ensemencé par un isolat. Après incubation de 24 h à 37°C, la turbidité de chaque puits est mesurée à 620 nm grâce à un lecteur de microplaques.

Document 8 : MIC of DFO-B for MRSA and MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa*

MIC was determined by adding DFO-B at different concentrations with or without ampicillin at 0.01 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Isolates	Isolates inhibition at DFO-B ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)						Isolates inhibition at DFO-B ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) + ampicillin 0.01 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$					
	0.5	1	2.5	5	7.5	10	0.5	1	2.5	5	7.5	10
MRSA	0	0	0	0	I	I	0	0	0	I	I	I
MBL-producing <i>P.aeruginosa</i>	0	0	0	I	I	I	0	0	I	I	I	I

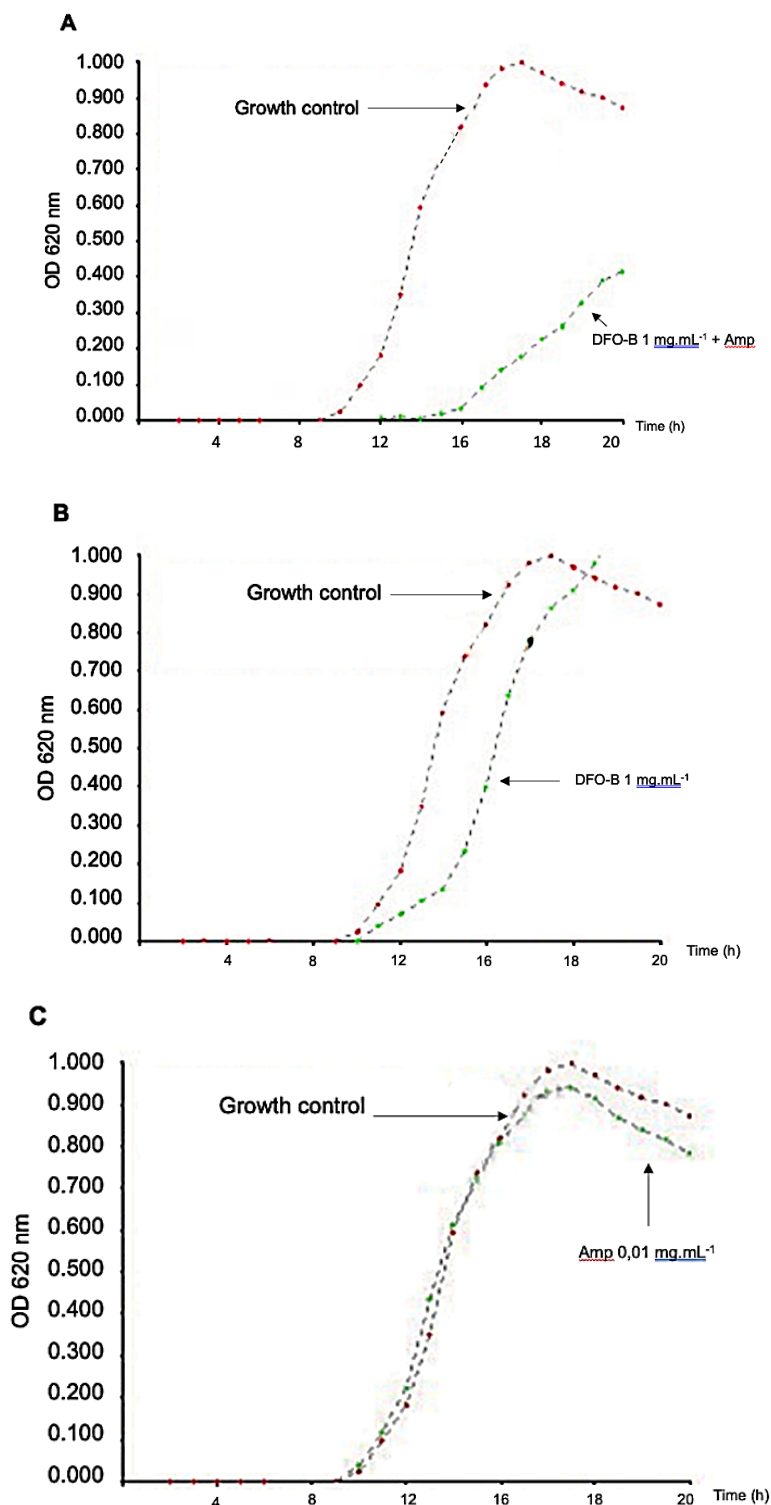
Symbols : 0 : no inhibited strain
 I : more than one inhibited strain

Notes : The lowest concentration of the DFO-B that did not allow growth of the isolate was the MIC of the siderophore. Medium control showed no growth, whereas growth control, ampicillin control, showed growth. (Data not shown.)

Abbreviations : DFO-B: deferoxamine-B ; MBL : metallo- β -lactamase ; MIC : minimum inhibitory concentration ; MRSA : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Documents 7 et 8 d'après Karuna Gokarn, Ramprasad B Pal. Infect Drug Resist, 2018, Vol.11, p.61-75
 Activity of siderophores against drug-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Document 9 : Susceptibility of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates to siderophores and antibiotics



Abbreviations: Amp : ampicillin ; DFO-B : deferoxamine-B ; OD : optical density

Remarque : « OD 620 nm » en Anglais correspond à la valeur de l'atténuation à 620 nm.

*D'après Karuna Gokarn, Ramprasad B Pal. Infect Drug Resist, 2018, Vol.11, p.61-75
Activity of siderophores against drug-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria.*

2021 - U42 : Biologie cellulaire

Durée 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français, calculatrice avec mode examen actif ou calculatrice sans mémoire, « type collège ».

L'immunothérapie : une thérapie ciblée contre le cancer

A l'échelle mondiale, le cancer atteint plus de 18 millions de personnes. Il a provoqué 9,6 millions de décès en 2018. Cette maladie reste une des principales causes de décès prématurés, notamment dans les pays développés où son taux d'apparition ne cesse d'augmenter.

Jusqu'à récemment, les médecins avaient accès à trois voies majeures pour lutter contre les cancers : la chirurgie avec ablation des tumeurs, la radiothérapie avec l'irradiation des tumeurs et la chimiothérapie avec des traitements médicamenteux dirigés contre les cellules en développement.

Les travaux sur l'immunothérapie de James Allison et de Tasuku Honjo apportent une quatrième approche de lutte contre le cancer : ils ont découvert qu'il était possible d'améliorer la réponse du système immunitaire contre les cellules cancéreuses en neutralisant des molécules inhibitrices qui empêchent de reconnaître les cellules cancéreuses comme une menace.

Cette nouvelle promesse de lutte contre le cancer apparaît comme une révolution et donne de nouveaux espoirs de traitements. Elle a été couronnée en 2018 par le prix Nobel de médecine.

1. Cycle cellulaire et cancérogenèse (8,5 points)

La prolifération incontrôlée des cellules tumorales représente une des caractéristiques fondamentales de la cancérogenèse. La majorité des cellules d'un organisme normal ne se divise pas : elles sont dites quiescentes (phase G0 pour Gap 0). Le passage des cellules dans une phase de prolifération nécessite le déclenchement du cycle cellulaire et le franchissement du point de restriction ou point de non-retour.

1.1. Schématiser un cycle cellulaire. Indiquer sur le schéma, la phase G0 et la position du point de restriction.

Le point de restriction, qui engage irréversiblement la cellule dans le cycle cellulaire, est dépendant de la présence prolongée de facteurs de croissance dans l'environnement de la cellule.

L'action d'un facteur de croissance sur la cellule est représentée dans le **document 1**.

1.2. Identifier sur la copie les annotations de 1 à 3.

Des informations biochimiques concernant le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) sont consignées dans le **document 2**. Les facteurs de croissance de ce type sont considérés comme des « messagers cellulaires à récepteurs membranaires ».

1.3. Argumenter cette appellation.

1.4. Indiquer l'autre possibilité de localisation des récepteurs cellulaires aux messagers.

Pour entrer en prolifération anarchique, une cellule cancéreuse doit également présenter des déficiences au niveau des points de surveillance du cycle cellulaire. La protéine p53 par exemple, est mutée dans environ 50 % des cancers.

Le **document 3** représente le mode de fonctionnement de la protéine p53 dans une cellule normale et dans une cellule ayant subi des mutations sur le gène *p53*.

- 1.5. Expliquer le mode de fonctionnement de la protéine p53. Montrer qu'elle joue un rôle prépondérant lors de la mise en place du point de surveillance du cycle cellulaire.

Afin d'étudier les conséquences des mutations sur le gène *p53*, des chercheurs ont réalisé des manipulations génétiques en vue d'obtenir des souris de génotypes diversifiés au niveau du gène *p53*. Le **document 4** présente les conditions et les résultats de ces expériences.

- 1.6. Analyser les résultats obtenus pour les souris de génotypes *p53^{+/+}* et *p53^{+/-}*. Préciser la signification de la valeur « 54 » sur l'axe des abscisses.
- 1.7. Analyser les résultats obtenus pour des souris homozygotes *p53^{-/-}*. En déduire si le gène *p53* appartient à la famille des anti-oncogènes ou à la famille des proto-oncogènes.

2. Cancer et système immunitaire (9,5 points)

Les mécanismes immunitaires mis en jeu dans la réponse anti-tumorale sont nombreux et complexes. Parmi ceux-ci, la fixation des lymphocytes T cytotoxiques sur les cellules cancéreuses est une étape fondamentale.

- 2.1 Représenter la coopération membranaire entre une cellule cancéreuse et un lymphocyte T cytotoxique lors de leur association.

Le **document 5** est une photographie de la coopération lymphocyte T cytotoxique - cellule cancéreuse.

- 2.2. Préciser le type de microscope utilisé pour obtenir ce cliché. Argumenter.
- 2.3. À partir de l'observation de la photographie, proposer une interprétation à la dissymétrie du lymphocyte T.

Même si le système immunitaire est programmé pour détruire les cellules anormales, son action sur les cellules cancéreuses est souvent trop faible, ou trop lente, pour endiguer la progression de la maladie. En réalité les chercheurs ont montré que face à une cellule cancéreuse, les lymphocytes sont naturellement inhibés dans leur action par des freins moléculaires immunologiques.

Le **document 6** présente la protéine PD-1, une des molécules inhibitrices permettant l'échappement des cellules cancéreuses à l'action du système immunitaire.

- 2.4. En absence de cancer, proposer un intérêt à l'existence des freins moléculaires immunologiques tels que PD-1.
- 2.5. Expliquer le choix de la protéine PD-1 comme cible intéressante dans le traitement du cancer.

L'immunothérapie consiste à bloquer l'action de PD-1 grâce à des anticorps monoclonaux.

- 2.6. Préciser les deux cibles possibles des anticorps monoclonaux dans ce contexte. Argumenter la nécessité d'utiliser des anticorps monoclonaux.

Pour déterminer avec précision la cible des anticorps monoclonaux, un mélange de cellules tumorales et de lymphocytes T cytotoxiques est analysé par cytométrie en flux. Les étapes du protocole et les résultats obtenus sont proposés dans le **document 7**.

- 2.7. Rappeler le lien existant entre chaque paramètre de dispersion SSC et FSC, déterminé en cytométrie et un des éléments de la structure d'une cellule.
- 2.8. Déduire de l'analyse des résultats, la cible des anticorps monoclonaux destinés à bloquer l'action de PD-1.

L'atezolizumab (Tecentriq®) fait partie des nouveaux traitements d'immunothérapie proposés aux patients. Des études cliniques comparatives avec un traitement médicamenteux de chimiothérapie classique ont été entreprises sur des patients volontaires. Les résultats sont présentés dans le **document 8**.

2.9. Expliquer le caractère particulièrement cytotoxique du docétaxel sur des cellules à forte activité mitotique.

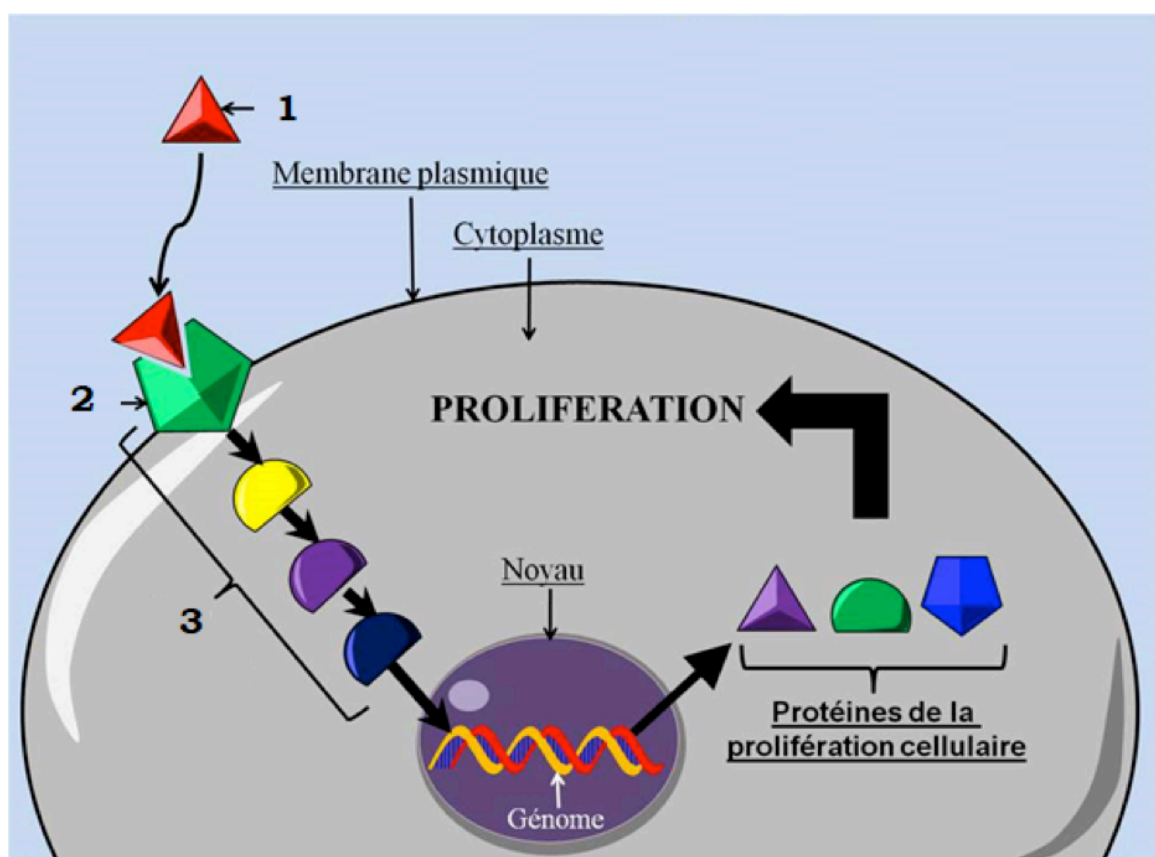
2.10. Comparer, à partir de l'analyse des résultats, l'efficacité de l'immunothérapie avec l'atezolizumab par rapport à la chimiothérapie avec le docétaxel.

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 : Action d'un facteur de croissance sur une cellule cible



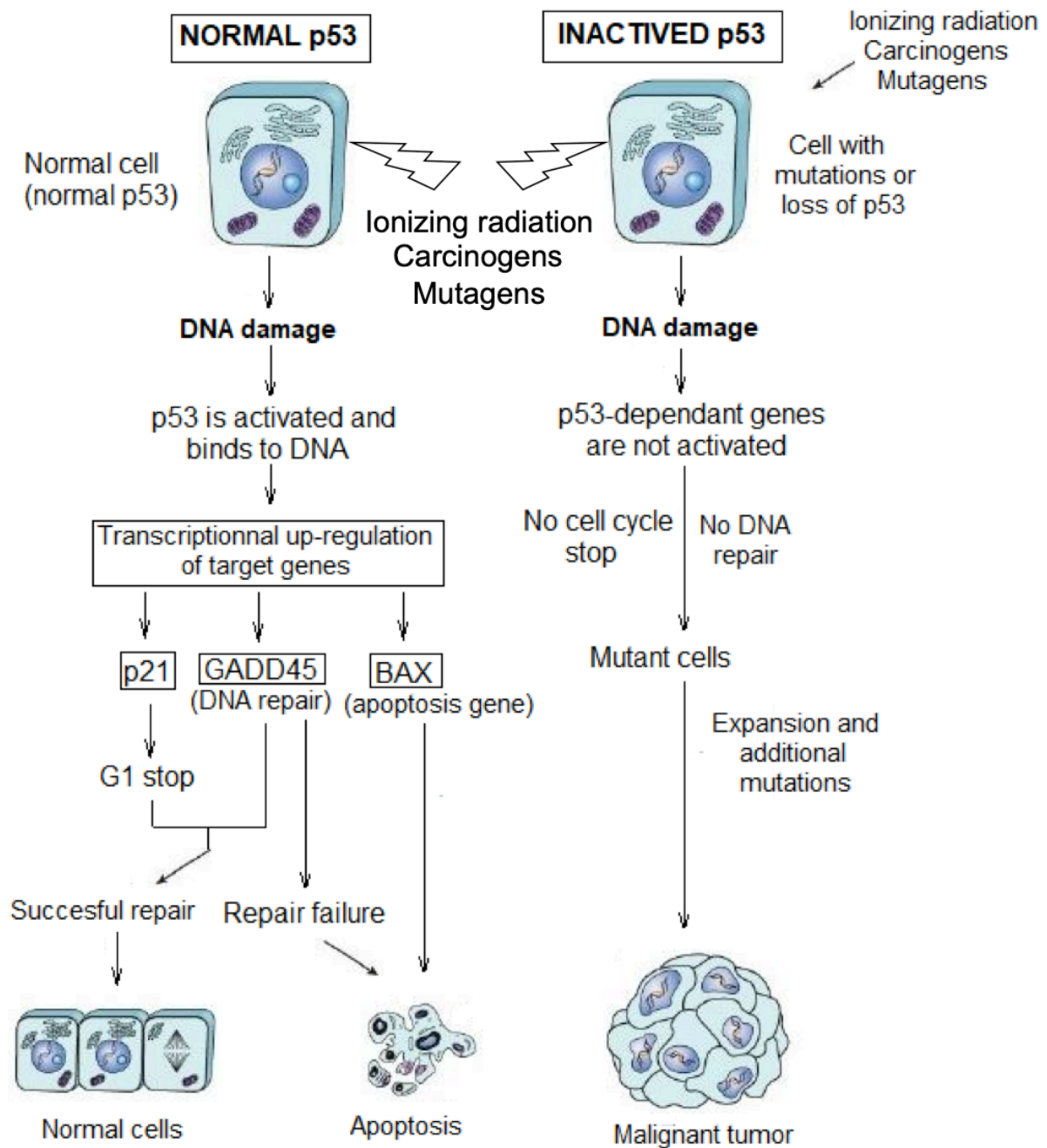
Document 2 : Informations sur la molécule d'EGF

Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Cys-Pro-Leu-Ser-His-Asp-Gly-Tyr-Cys-Leu-
 16 His-Asp-Gly-Val-Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Lys-Tyr-Ala-
 31 Cys-Asn-Cys-Val-Val-Gly-Tyr-Ile-Gly-Glu-Arg-Cys-Gln-Tyr-Arg-
 46 Asp-Leu-Lys-Trp-Trp-Glu-Leu-Arg

Poids moléculaire : 6,2 kDa

Source : <https://www.uniprot.org/uniprot/Q6QBS2#sequences> (retravaillée par la suite avec le logiciel SMS2)

Document 3 : Mode de fonctionnement de la protéine p53 dans des conditions normales et après mutation



Document 4 : Description et résultats d'expériences de manipulations génétiques sur le gène codant la protéine p53

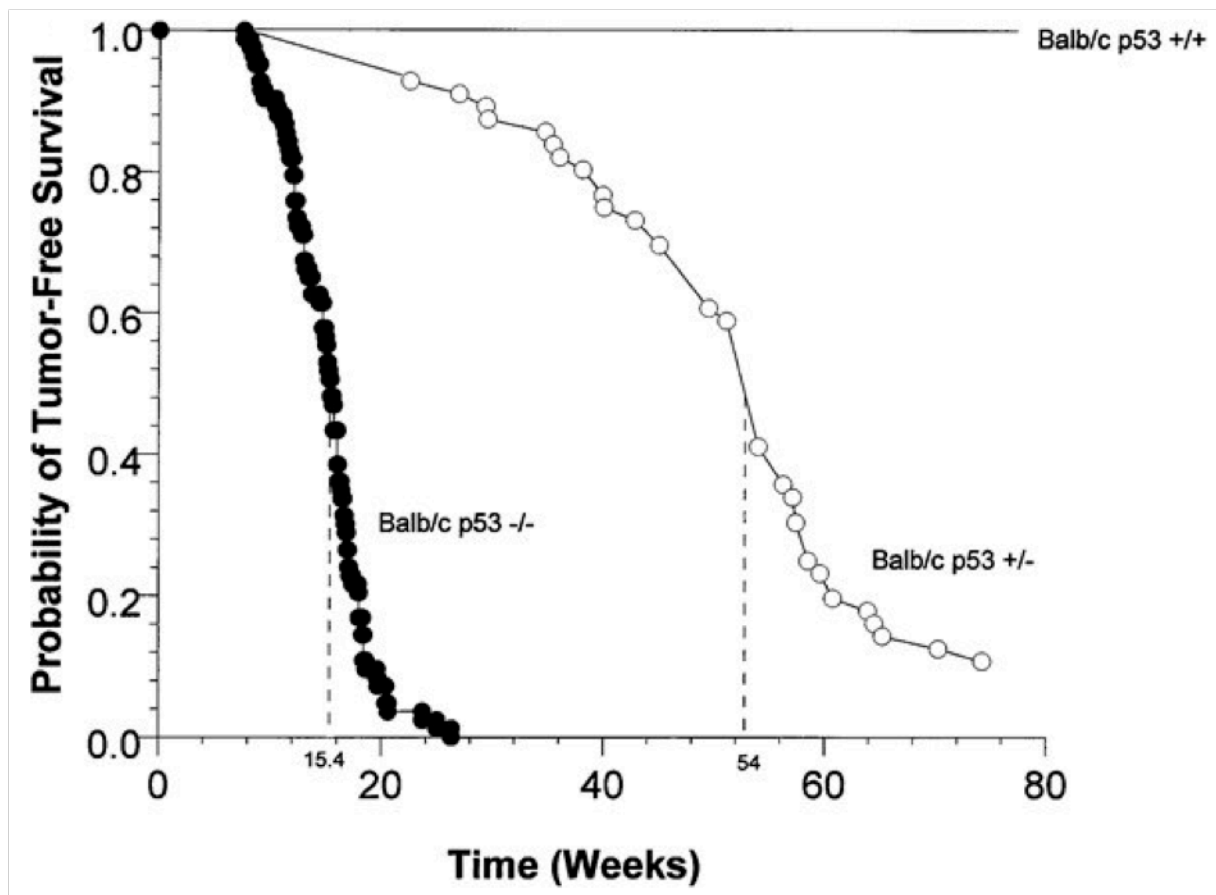
Manipulations génétiques effectuées sur le gène codant la protéine p53 :

p53 +/+ : souris homozygote, avec le génotype normal

p53 +/- : souris hétérozygote, avec un allèle muté

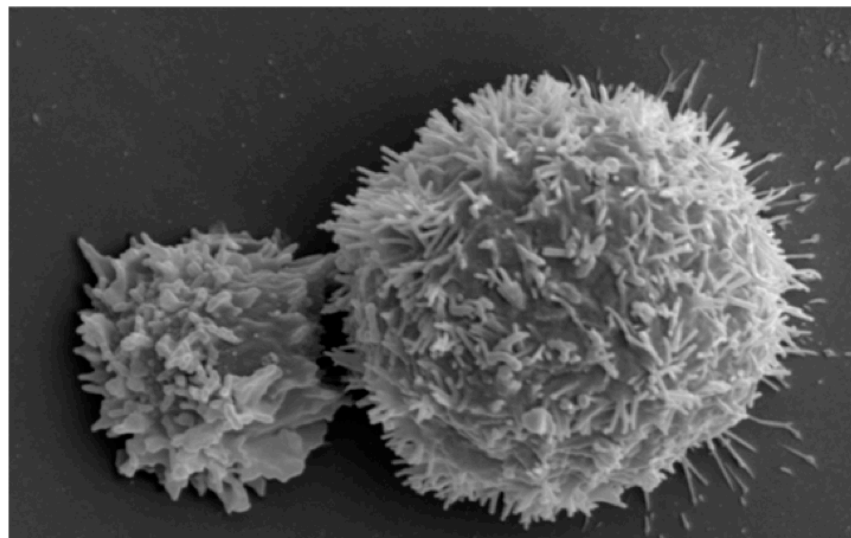
p53 -/- : souris homozygote, double mutée

Les chercheurs ont suivi le devenir des souriceaux ayant ces génotypes et notamment le développement de tumeurs. Tous les animaux ont été élevés dans les mêmes conditions. Les graphiques ci-dessous illustrent les résultats obtenus sur une lignée de souris de type Balb/c.



KUPERWASSER Charlotte et al., *The American Journal of Pathology*, Dec 2000, Volume 157, p. 2151-2159
Development of Spontaneous Mammary Tumors in BALB/c p53 Heterozygous Mice

Document 5 : Photographie prise en microscopie de la coopération lymphocyte T cytotoxique – cellule cancéreuse



**Lymphocyte T
cytotoxique**

Cellule cancéreuse

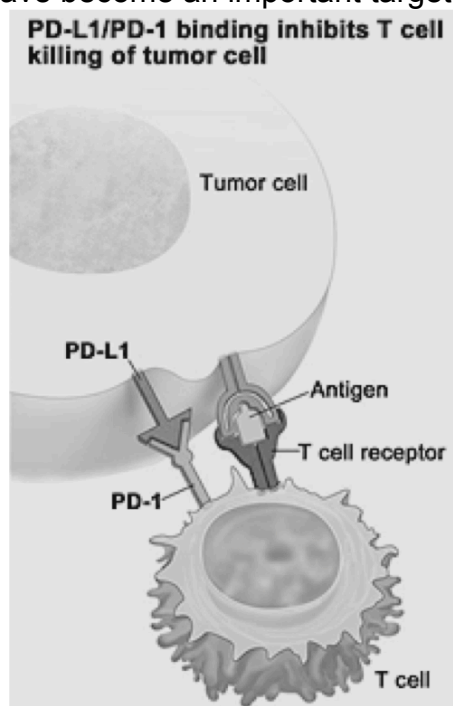
Grossissement : x 2500

TRAMBAS Christina. *Cancer, la révolution de l'immunothérapie*, CNRS le journal, 2019

Document 6 : PD-1 Protein and Tumor cells

Programmed cell death protein 1, or PD-1, is a protein which helps to regulate the immune system. PD-1 can bind to either PD-L1 (PD-1 ligands) and as a result, inhibits T cell activation and other pro-inflammatory processes. This inhibition is accomplished through increasing apoptosis of T-cells. PD-L1 are often over expressed in various types of cancer. Overexpression of PD-L1 helps cancer cells evade the immune system.

As a result, PD-1 inhibitors have become an important target in immuno oncology.



NCI Staff, FDA Approves. *New Immunotherapy Drug for Bladder Cancer*, National Cancer Institute, 2016:
<https://www.cancer.gov> (consulté le 27 août 2019)

Document 7 : Description et résultats de la cytométrie en flux

Étapes du protocole :

Lymphocytes T cytotoxiques + Cellules cancéreuses



Obtention d'un mélange de cellules

+

Anticorps monoclonaux
conjugués à la fluorescéine
(Anticorps de l'étude)



Fixation des anticorps

Mélange de cellules
potentiellement marquées

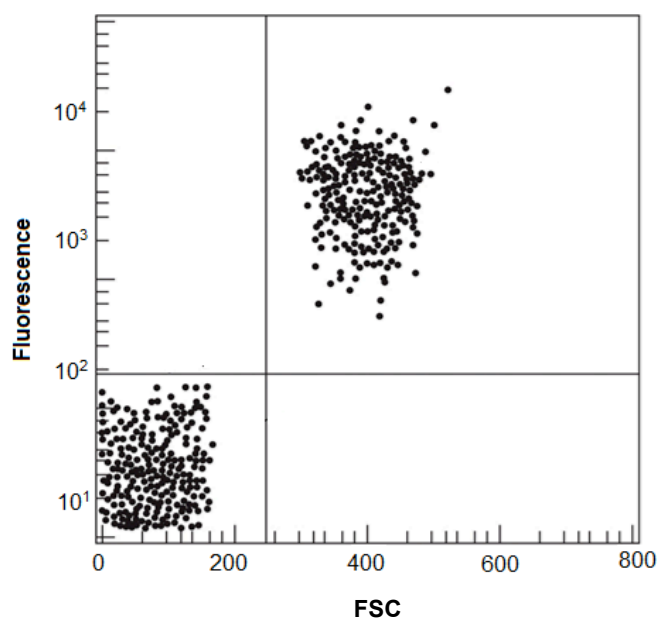
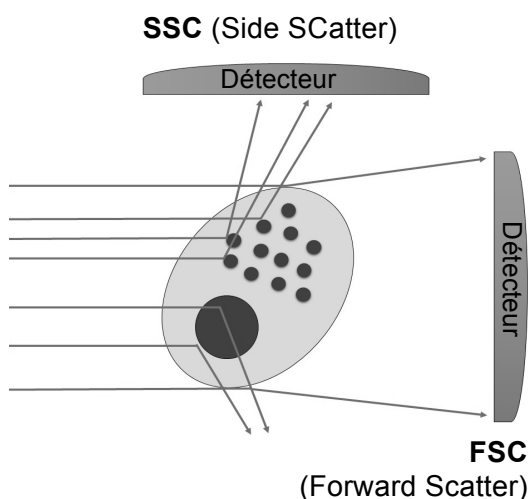


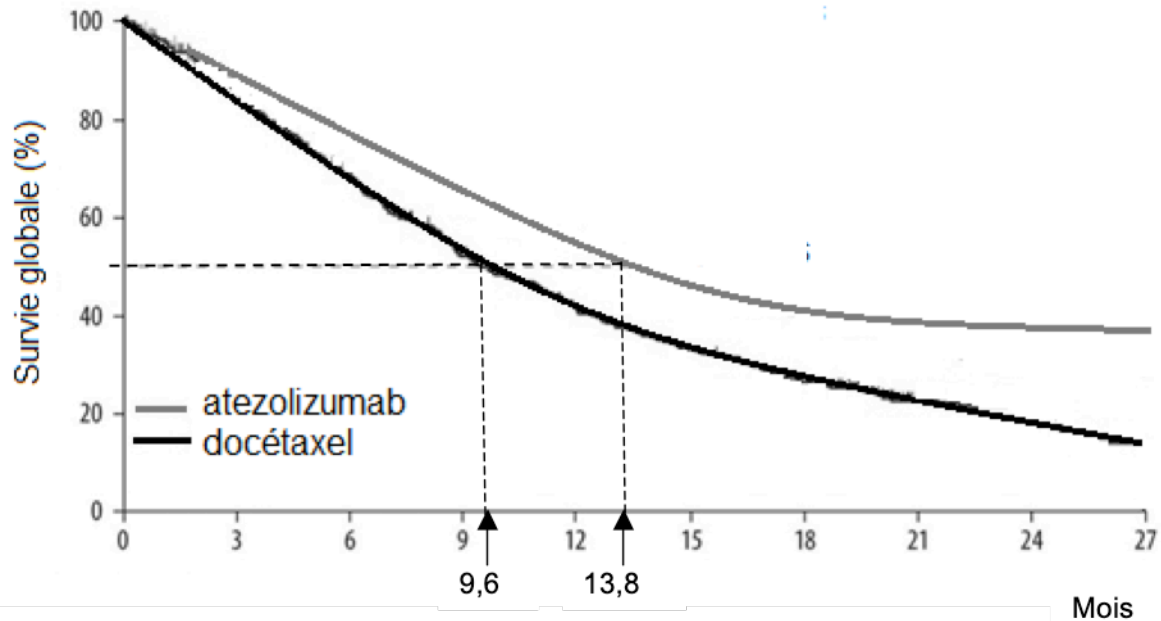
*Passage du mélange cellulaire
au cytomètre en flux*

Résultat = cytogramme

Mesure de certains paramètres à l'aide d'un cytomètre en flux

Résultats :



Document 8 : Comparaison de l'efficacité de l'atezolizumab et du docétaxel comme traitement anti-tumoral chez des patients

Remarque : Le docétaxel est un agent antinéoplasique utilisé en chimiothérapie, qui agit en désorganisant le réseau intracellulaire des microtubules.

*RITTMEYER Achim et Al, The lancet, 2017, Volume 389, p. 255-265
Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer*

Session 2021 : 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.

2021 - U11 : Mathématiques

Exercice 1

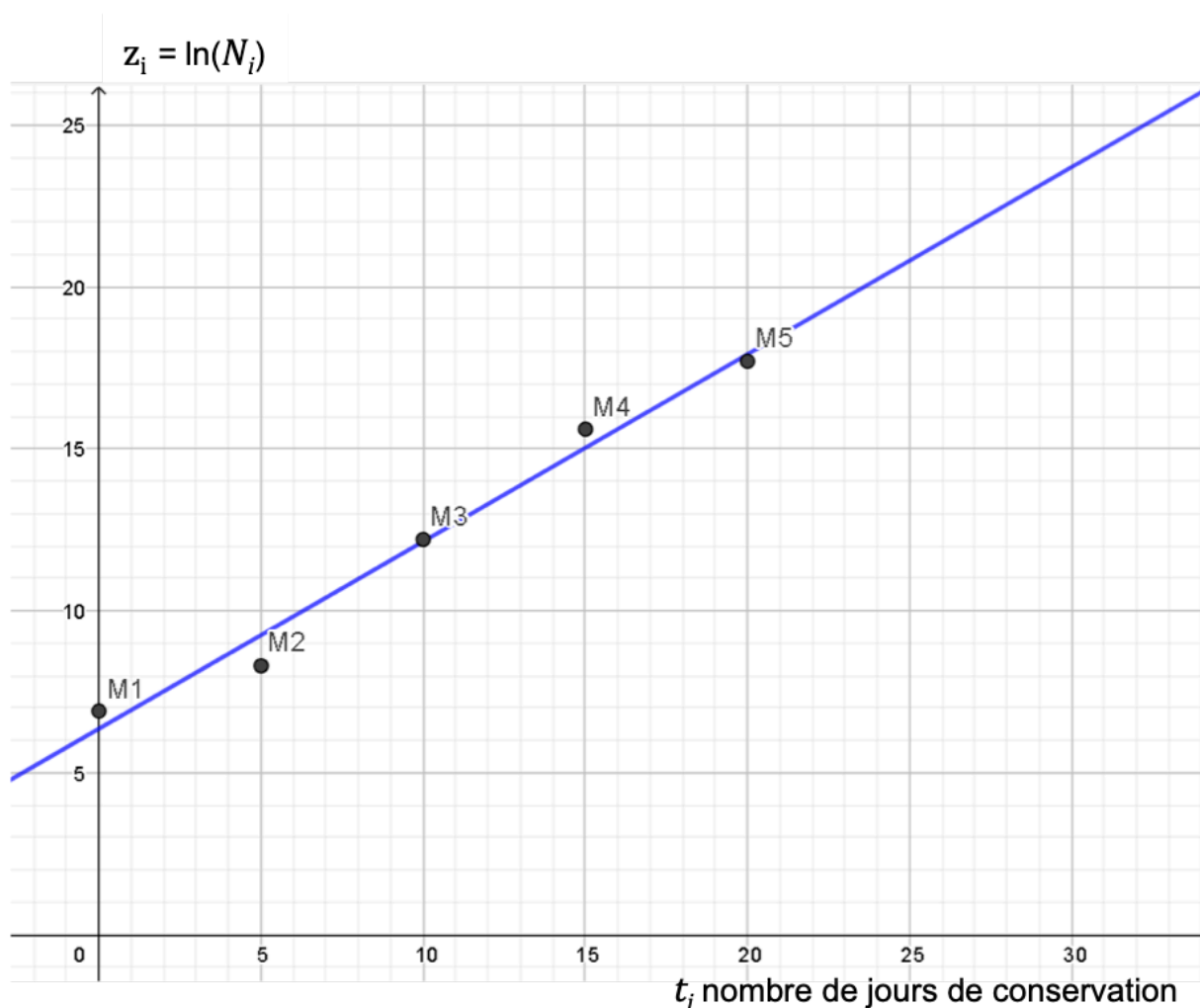
PARTIE A :

1. Tableau de l'annexe 1 complété :

Nombre de jours de conservation t_i	0	5	10	15	20
Nombre N_i de germes putréfiants par cm^2	1 000	4 000	199 000	5 960 000	48 600 000
$z_i = \ln(N_i)$	6,9	8,3	12,2	15,6	17,7

2. $z = 0,58t + 6,36$

3. Graphique de l'annexe 2 complété :



4. $z = 0,6 \times 25 + 6,4 = 21,4$.

Comme $z = \ln(N)$ alors $\ln(N) = 21,4 \Rightarrow N = e^{21,4} \approx 1\,967\,442 \times 10^9$

Soient environ **1 967 millions** de germes putréfiants par cm^2 observés au bout de 25 jours

PARTIE B :

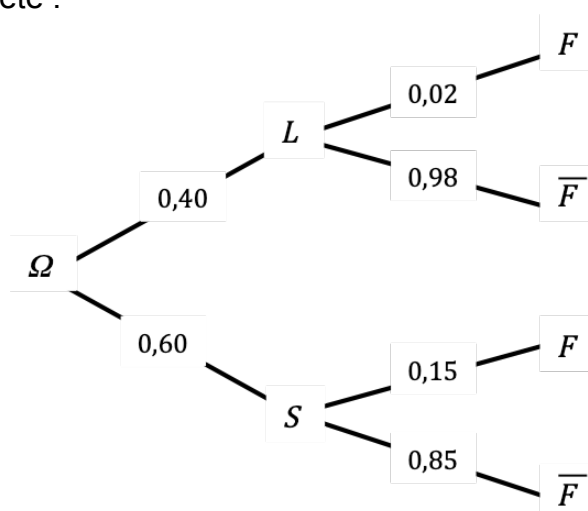
1. $\lim_{t \rightarrow +\infty} 0,6t = +\infty \Rightarrow \lim_{t \rightarrow +\infty} e^{0,6t} = +\infty \Rightarrow \lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = +\infty$
Ainsi, plus la viande hachée est stockée et conservée sur une très longue période, plus le nombre de germes putréfiants devient infiniment grand.
2. $f'(t) = 600 \times 0,6 e^{0,6t} = 360 e^{0,6t}$
3. $360 > 0$ et, pour tout réel t de $[0; +\infty[$, $e^{0,6t} > 0 \Rightarrow f'(t) > 0$
Ainsi f est **strictement croissante** sur $[0; +\infty[$.
Lorsque le temps de stockage et de conservation augmente, le nombre de germes putréfiants augmente.
- 4a. m est le **nombre moyen** de germes putréfiants par cm^2 , par jour, entre le 5^{ème} et le 10^{ème} jour.
- 4b. $F(t) = 600 \times \frac{e^{0,6t}}{0,6} = 1000 e^{0,6t}$
- 4c. $m = \frac{1}{10-5} \int_5^{10} f(t) dt = \frac{1}{5} \times [F(10) - F(5)] = \frac{1}{5} \times [1000 e^6 - 1000 e^3]$
 $= 200 e^6 - 200 e^3$
- 5a. $f(t) < 300 \Rightarrow 600 \times e^{0,6t} < 3000 \Rightarrow e^{0,6t} < 5 \Rightarrow 0,6t < \ln 5 \Rightarrow t < \frac{\ln 5}{0,6}$.
- 5b. Puisque $\frac{\ln 5}{0,6} \approx 2,7$, l'usine peut conserver la viande de bœuf hachée produite en chambre froide jusqu'à environ 2 jours et demi avant de la commercialiser.
- 6a. À l'aide d'un tableau, la valeur numérique affichée par l'algorithme est **7** :

J	0	1	2	3	4	5	6	7
N	600	1093	1992	3630	6614	12 051	21 959	40 011
Test $N \leq 27\,000$	VRAI	VRAI	VRAI	VRAI	VRAI	VRAI	VRAI	FAUX

- 6b. La durée limite de consommation de la viande hachée est de 6 jours.

Exercice 2**PARTIE A :**

1. Arbre pondéré complété :



2. D'après la formule des probabilités totales,

$$P(F) = P(F \cap L) + P(F \cap \bar{L}) = P(L) \times P_L(F) + P(\bar{L}) \times P_{\bar{L}}(F) \\ = 0,40 \times 0,02 + 0,60 \times 0,15 = \mathbf{0,098}$$

3.

$$P_F(\bar{L}) = \frac{P(F \cap \bar{L})}{P(F)} = \frac{0,60 \times 0,15}{0,098} \approx \mathbf{0,918}$$

- 4a. $f = \frac{12}{78} \approx \mathbf{0,154}$ est une estimation ponctuelle de la proportion inconnue p des spas installés par ce fabricant qui présentent un problème de filtration ;

4b.

$$\left[f - 1,96 \sqrt{\frac{f(1-f)}{n}} ; f + 1,96 \sqrt{\frac{f(1-f)}{n}} \right] \approx \\ \left[0,154 - 1,96 \sqrt{\frac{0,154 \times 0,846}{78}} ; 0,154 + 1,96 \sqrt{\frac{0,154 \times 0,846}{78}} \right] \approx [\mathbf{0,074; 0,243}]$$

est un intervalle de confiance au seuil de 95 % de la proportion p .

PARTIE B :

1. $f(0) = \lambda$, or d'après le graphique $f(0) = 0,00026$ donc $\lambda = \mathbf{0,00026}$.

2. Cette proposition est **fausse**, en effet :

$$E(X) = \frac{1}{\lambda} = \frac{1}{0,00026} \approx 3\,846 \neq 1\,000$$

3. $P(X) \geq 500 = 1 - P(X < 500) = 1 - \int_0^{500} 0,00026 e^{-0,00026t} dt = 1 - [F(500) - F(0)]$
 $F(t) = -e^{-0,00026t}$
 $P(X) \geq 500 = 1 - (-e^{-0,13} + 1) = \mathbf{e^{-0,13}}$

PARTIE C :

1. Choisir une lampe au hasard est une épreuve de Bernoulli :

Succès : « La lampe a une durée de vie qui dépasse 1 000 heures » $p = 0,77$.

Echec : « La lampe a une durée de vie qui ne dépasse pas 1 000 heures »

$$1-p = 0,23.$$

On obtient le schéma de Bernoulli en répétant 50 fois cette même épreuve de manière indépendante.

Y , nombre de succès, suit donc la loi binomiale de paramètres 50 et 0,77.

2. $P(Y \geq 42) = 1 - P(Y \leq 41) \approx 1 - 0,844 \approx \mathbf{0,156}$

On a environ 15,6 % de chances de choisir au moins 42 lampes dont la durée de vie dépasse 1 000 heures.

3. $E(Y) = 50 \times 0,77 = \mathbf{38,5}$

Si on répète un grand nombre de fois l'expérience, le nombre moyen de lampes dont la durée de vie dépasse 1 000 heures est de **38,5**.

2021 - U12 : Sciences physiques et chimiques

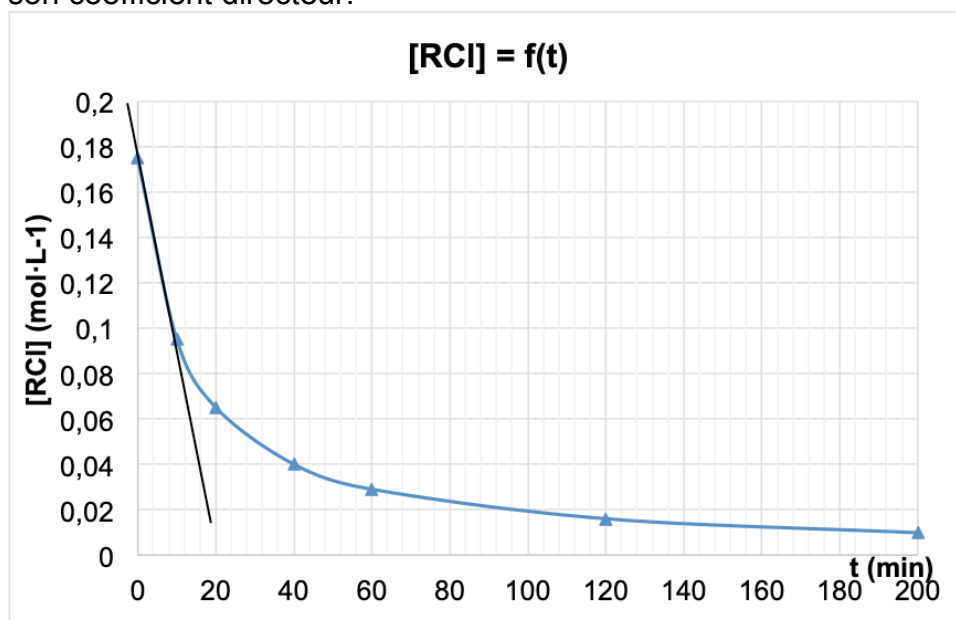
I. ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE D'UNE MOLÉCULE LACRYMALE

A. Hydrolyse en milieu basique

1. Le graphique 3 de l'annexe 1 montre que l'inverse de la concentration en réactif $1/[RC\ell]$ est une fonction affine croissante du temps t . L'équation mathématique correspondant est celle d'une réaction d'ordre 2.
2. La constante de vitesse k correspond au coefficient directeur de la droite représentée dans le graphique 3. En utilisant 2 points au choix de cette droite, par exemple (0 ; 5) et (200 ; 100), on peut calculer sa valeur :

$$k = \frac{100-5}{200-0} = 0,48 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

3. La vitesse initiale représente le coefficient directeur de la droite tangente à la courbe pour $t = 0$. À partir du Graphique 1, on peut tracer cette tangente et ensuite calculer son coefficient directeur.



4. La vitesse est maximale pour $t = 0$ car la pente de la droite est la plus élevée à cet instant ou bien car la vitesse dépend de la concentration en réactifs, cette dernière diminue au cours du temps ainsi que la vitesse.
5. $v = k \times [RC\ell] \times [OH^-]$
6. La température, la présence d'un catalyseur, la concentration en réactifs et pour cette réaction également le pH sont des facteurs cinétiques.
7. Le temps de demi-réaction correspond à la durée au bout de laquelle la moitié de l'avancement final est atteinte.
À partir du graphique 1, on identifie un avancement maximal d'environ $0,18 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Le temps de demi-réaction se produit donc pour une concentration en réactif $[RCI] = 0,09 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Par lecture graphique on trouve $t_{1/2} = 10 \text{ min}$.

B. Influence du milieu réactionnel

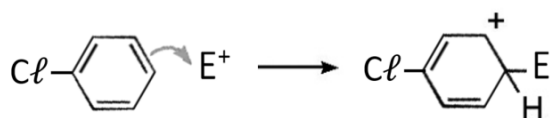
8. En comparant les temps de demi-réaction en milieu acide ($t_{1/2} = 10 \text{ min}$) et en milieu neutre ($t_{1/2} = 38 \text{ jours}$), on en déduit que la réaction sera bien plus rapide en milieu acide.

9. $k = A \times e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}}$
 $\ln(k) = \ln(A \times e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}})$
 $\ln(k) = \ln(A) + \ln(e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}})$
 $\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R \cdot T}$
10. L'expression mathématique précédente (question 9) nous indique que le coefficient directeur de la droite représentant $\ln(k)$ en fonction de $1/T$ (document 1, Annexe 2) est égal à $-E_a/R$.
 D'après la régression linéaire :
 $-E_a/R = -9,62 \cdot 10^3 \text{ K}$ donc $E_a = -9,62 \cdot 10^3 \times 8,31 = 7,99 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$
 L'énergie d'activation correspond à la barrière énergétique qu'il faut franchir pour amorcer la réaction.
11. L'énergie d'activation E_a étant inférieure en milieu basique, la vitesse de réaction sera plus élevée.

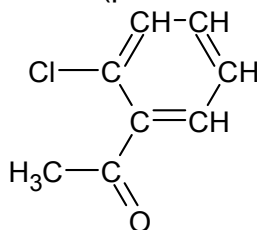
II. SYNTHÈSE DU PHÉNAGLYCODOL

A. Étape (1) de la synthèse du phénaglycodol

- Le deuxième produit formé est HCl .
- Il s'agit d'une réaction de substitution électrophile.
- Le catalyseur utilisé est AlCl_3 . Il permet la formation de l'électrophile selon la réaction : $\text{CH}_3\text{-COCl} + \text{AlCl}_3 \rightarrow \text{CH}_3\text{-CO}^+ + \text{AlCl}_4^-$
- L'électrophile E^+ formé à l'étape précédente est $\text{CH}_3\text{-CO}^+$. Il réagit avec le chlorobenzène selon le mécanisme ci-dessous :

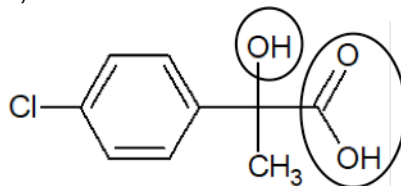


5. La formation d'un isomère de A est due à la position différente occupée par le 2^{ème} substituant par rapport au chlore (position ortho) :

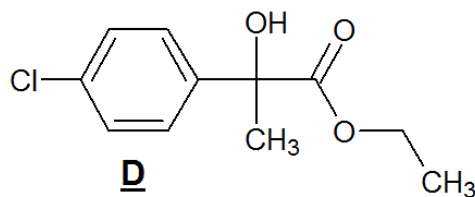


B. Étapes (3) et (4) de la synthèse du phénaglycodol

6. Les groupes caractéristiques sont le groupe hydroxyle OH, de la famille des alcools, et le groupe carboxyle COOH , de la famille des acides carboxyliques.



7. La formule semi-développée du composé D est la suivante :

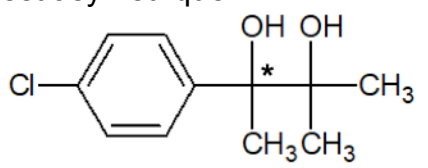


Il se forme également de l'eau.

8. Il s'agit d'une réaction d'estérification. Lorsque les réactifs utilisés sont l'acide carboxylique et l'alcool, cette réaction est lente et limitée.

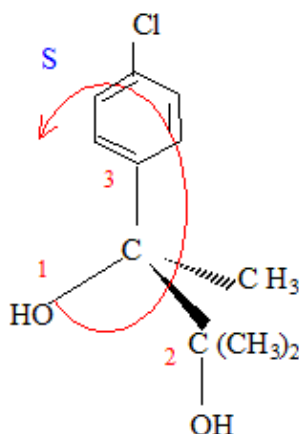
C. Étude de la molécule de phénaglycodol

9. Par définition, un carbone asymétrique est lié à 4 substituants différents : seul le C₃ est asymétrique :



10. La première étape est le classement des substituants selon les règles C.I.P. :
 $\text{OH} > \text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH} > \text{C}_6\text{H}_4\text{Cl} > \text{CH}_3$

La deuxième étape consiste à définir le sens de rotation pour aller de 1 à 3, le substituant 4 étant vers l'arrière : le sens de rotation doit être anti-horaire pour le stéréoisomère S.



11. La polarimétrie permet de distinguer les stéréoisomères du phénaglycodol, deux énantiomères ayant une activité optique opposée.

III. ÉTUDE D'UN ISOTOPE DU XÉNON

A. Étude énergétique de la désintégration

1. Le noyau de xénon 133 est constitué de 54 protons et de 79 neutrons.
2. La particule émise lors d'une désintégration β^- est l'électron de symbole ${}_{-1}^0\text{e}^-$.
3. ${}_{54}^{133}\text{Xe} \rightarrow {}_{55}^{133}\text{Cs} + {}_{-1}^0\text{e}^- + \bar{\nu}$ (anti-neutrino)

Pour établir la composition du noyau fils on applique les lois de Soddy : conservation du nombre de masse et conservation du nombre de charges.

4. Les transitions nucléaires correspondant aux énergies E_1 , E_2 et E_3 sont :



5. $E_1 = 80 \text{ keV}$ soit $1,3 \times 10^{-14} \text{ J}$ (conversion en joules).

En appliquant la relation de Planck : $\lambda_1 = \frac{h \cdot c}{E_1} = 1,5 \times 10^{-11} \text{ m}$.

6. L'énergie maximale E_{max} correspond à l'écart énergétique entre le noyau père de xénon et le noyau fils de césium à l'état excité E_3 donc $E_{\text{max}} = 427 - 161 = 266 \text{ keV}$.

B. Décroissance radioactive

7. La demi-vie d'un échantillon radioactif correspond à la durée au bout de laquelle l'échantillon a perdu la moitié de ses noyaux radioactifs.

8. Loi de décroissance radioactive : $A = A_0 \times e^{-\lambda \times t}$

À la demi-vie $A = A_0/2$ donc :

$$\frac{A_0}{2} = A_0 \times e^{-\lambda \times t_{1/2}} \text{ soit } \frac{1}{2} = e^{-\lambda \times t_{1/2}}$$

$$\ln\left(\frac{1}{2}\right) = -\lambda \times t_{1/2} \text{ soit } -\ln 2 = -\lambda \times t_{1/2}$$

L'expression de la constante radioactive est $\lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} = 1,53 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$.

À un instant $t = 0$, un échantillon contenant du xénon 133 a une activité $A_0 = 3,7 \times 10^8 \text{ Bq}$.

9. Pour $t = 0$, $N_0 = A_0 / \lambda = 2,4 \times 10^{14}$ noyaux.

10. La loi de décroissance radioactive exprimée en fonction du nombre des noyaux radioactifs est : $N = N_0 \times e^{-\lambda \times t}$. Pour $t = 8,0 \text{ h}$ soit $2,9 \times 10^4 \text{ s}$, $N = 2,3 \times 10^{14}$ noyaux.

C. Radioprotection

11. Le Becquerel correspond à 1 désintégration par seconde.

12. Au cours de 8,0 heures il y a eu $1,0 \times 10^{12} \times 3600 \times 8,0 = 2,9 \times 10^{16}$ désintégrations.

13. Énergie des photons émis = nombre de désintégrations $\times E_2$ (en eV)

$$\text{soit } 2,9 \times 10^{16} \times 81 \times 10^3 = 2,3 \cdot 10^{21} \text{ eV} = 3,8 \times 10^2 \text{ J}$$

L'employé absorbe 5,0 % de cette énergie soit $0,05 \times 3,8 \times 10^2 = 19 \text{ J}$

14. La dose absorbée étant le rapport de l'énergie absorbée par unité de masse de la matière exposée soit $19 / 60 = 0,32 \text{ Gy}$

15. La dose horaire absorbée par l'employé est égale à $0,32/8 = 0,04 \text{ Gy}$.

La dose horaire moyenne reçue en France due à la radioactivité naturelle est égale à $1670 \cdot 10^{-9} \text{ Gy}$. Le rapport entre les deux doses nous permet de les comparer : on obtient $0,04/(1670 \cdot 10^{-9}) = 10^4$

On en conclut que la dose horaire absorbée par l'employé est bien trop élevée (10 000 fois supérieure à celle naturelle).

2021 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Mise au point de vecteurs lentiviraux pour une surexpression de la GFP dans les neurones du système nerveux central

1. HIV-1, un virus à l'origine d'un vecteur de thérapie génique

- 1.1. La reverse transcriptase a une activité ADN polymérasique 5'→3' ARN dépendante (utilisation d'une matrice ARN).
L'intégrase possède une activité de coupure et religature d'un ADN double permettant l'intégration d'un ADN double brin dans un génome.
- 1.2. Trois protéines sont codées par le gène *pol* : RT (reverse transcriptase), IN (intégrase) et PR (protéase).
La reverse transcriptase intervient dans l'étape 2 : rétrotranscription du génome viral ARN en ADNc.
L'intégrase intervient dans l'étape 5 : intégration de l'ADNc dans le génome de la cellule cible.
La protéase intervient dans l'étape 11 : maturation des virions.
- 1.3. Une transfection stable correspond à l'intégration d'un fragment d'ADN étranger dans le génome d'une cellule cible. Les étapes 1 à 5 sont donc nécessaires, de la reconnaissance de la cellule cible (étape 1) à l'intégration dans le génome de la cellule hôte de l'ADNc issu de la rétrotranscription de l'ARN porté par le vecteur lentiviral.

2. Méthode de production d'un vecteur lentiviral de 2ème génération

- 2.1. *AmpR* correspond au gène codant la résistance à l'ampicilline, et permet de sélectionner les bactéries transformées.
Ori est une origine de répllication bactérienne permettant la répllication autonome du vecteur dans une cellule bactérienne. Elle est souvent de type relâchée et permet donc d'obtenir un haut nombre de copies du vecteur dans la bactérie transformée.
- 2.2. Le plasmide pEnv code la protéine d'enveloppe VSV-G, qui permet la reconnaissance et l'adhésion à la cellule cible par des récepteurs membranaires. Sa présence est nécessaire pour assurer l'infectivité des vecteurs lentiviraux.
Le plasmide pEmpac porte les gènes *pol* et *gag*.
Le gène *pol* code pour la reverse transcriptase (RT), l'intégrase (IN) et la protéase (PR). RT et IN permettent d'assurer la rétrotranscription de l'ARN étranger en ADNc, puis l'intégration de cet ADNc dans la cellule cible. PR permet la maturation du virion défectif dans les cellules productrices.
Le gène *gag* code pour des protéines de matrice (MA), de capsid (CA) et de nucléocapsid (NC), qui interviennent dans la structure du virion défectif, en s'associant à l'ARN rétroviral (NC) et aux protéines associées à cet ARN (CA), ainsi qu'à la face interne de l'enveloppe virale (MA).
- 2.3. Le plasmide pLenti_GFP apporte la séquence à intégrer dans le génome de la cellule cible (ici la cassette CMV enhancer – Promoteur – GFP), encadré par des séquences LTR (5' LTR et 3' LTR) qui sont nécessaires à son intégration dans le génome de la cellule hôte.

2.4.



Les séquences ψ (psi), RRE et WPRE permettent d'assurer l'encapsidation de l'ARN portant le transgène, d'adresser l'ARN du vecteur vers le cytoplasme pour y être encapsidé, et de stabiliser l'ARN viral avant son encapsidation, respectivement. Elles sont nécessaires à la production du vecteur lentiviral dans les cellules H293T, mais n'interviennent plus une fois l'ADNc du transgène intégré dans le génome de la cellule cible.

- 2.5. Le vecteur lentiviral après encapsidation ne porte pas les gènes nécessaires à sa réplication et son encapsidation (gènes *gag pol* et *env*). Une fois intégré dans le génome de la cellule hôte, il est donc incapable de se répliquer : c'est un virion défectif.
- 2.6. Pour être utilisé en thérapie, le vecteur doit être inoffensif, donc en particulier ne pas être capable de se propager dans l'organisme hôte.

3. Production de vecteurs lentiviraux

- 3.1. L'ADN à transfecter et le phosphate de calcium forment un précipité. Les cellules hôtes internalisent ce précipité par endocytose.
- 3.2. La composition de la solution de transfection est la suivante :

Réactif	Volume	Explication
Lentivirus plasmid à $10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	2 μL	pour 20 μg final
Packaging plasmid à $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	3 μL	pour 15 μg final
Envelope plasmid à $12 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	0,5 μL	pour 6 μg final
CaCl_2 à 1 M	125 μL	
H_2O stérile	370 μL	qsp 0,5 mL
Tampon BES 2X	0,5 mL	

- 3.3. La séquence fournie est orientée de 5' vers 3', par convention. La séquence des bornes de l'amplicon est la suivante (séquence des amorces en gras) :

5' – **GCATTGAACAAACGA** – CTTATGAAACTGGAG – 3'
 3' – CGTAACTTGTTTGCT – **GAATACTTTGACCTC** – 5'

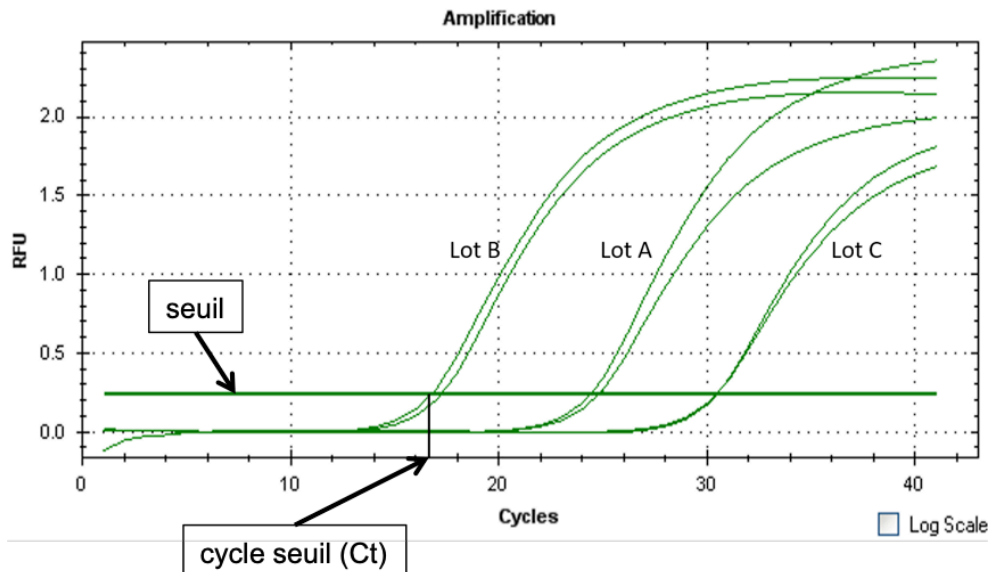
Amorce sens : 5' – GCATTGAACAAACGA – 3'
 Amorce antisens : 5' – CTCCAGTTTCATAAG – 3'

- 3.4. Dans une PCR classique, trois étapes sont réalisées à chaque cycle :

- dénaturation des ADN double brin, à 95°C
- hybridation des amorces, à la température d'hybridation (50°C à 60°C)
- élongation de l'ADN à partir de l'amorce, à 72°C

Le SYBR[®]Green se loge dans le petit sillon de l'ADN double brin, la lecture de fluorescence est donc réalisée à la fin de l'étape d'élongation.

- 3.5. La quantification est basée sur la détermination du cycle seuil C_t , qui correspond au nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur seuil de fluorescence.



Le cycle seuil est atteint d'autant plus tôt que le nombre de copies d'ADN initialement présent dans le milieu réactionnel est élevé.

Le lot B présente le cycle seuil le plus bas, et est donc le lot le plus concentré en virions.

4. Recherche de promoteurs efficaces et spécifiques pour l'utilisation de vecteurs lentiviraux dans le cerveau

- 4.1. La transfection des cellules par le vecteur portant la construction $Enh_{CMV}-P_{CMV}-GFP$ montre une très forte fluorescence à la fois dans les cellules gliales et dans les neurones, et ce quel que soit le tissu cérébral. Le protocole de transfection est donc efficace (pour tous les types cellulaires), et la GFP est fortement exprimée (cohérent car sous le contrôle d'un promoteur fort et constitutif), et de façon non spécifique.

Les cellules transfectées par le vecteur portant la construction $P_{syn}-GFP$ montrent une fluorescence moins importante, et localisée uniquement au niveau des neurones (corps cellulaires). Le promoteur P_{SYN} n'est donc actif que dans les neurones.

Les cellules transfectées par le vecteur portant la construction $Enh_{CMV}-P_{SYN}-GFP$ présentent une fluorescence localisée uniquement au niveau des neurones, beaucoup plus intense qu'en absence de la séquence enhancer CMV (corps cellulaires, axones, dendrites).

En conclusion, le vecteur portant la construction $Enh_{CMV}-P_{SYN}-GFP$ permet une expression importante et spécifique de la GFP dans les neurones.

- 4.2. Avec le vecteur portant la construction $Enh_{CMV}-P_{CMV}-GFP$ (contrôle), 50 % des cellules transfectées sont des neurones, les autres cellules transfectées étant probablement des cellules gliales.

Avec le vecteur portant la construction $Enh_{CMV}-P_{SYN}-GFP$ ou $P_{syn}-GFP$, la totalité des cellules transfectées sont des neurones.

Ces observations sont cohérentes avec celles du document 6.1.

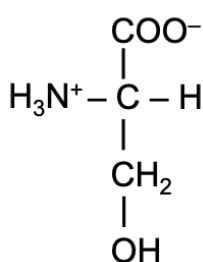
- 4.3. Le document 6.2 montre que l'expression de la GFP est stable pendant au moins 8 semaines, ce qui prouve que la cassette est intégrée de façon stable dans le génome des cellules.

2021 - U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

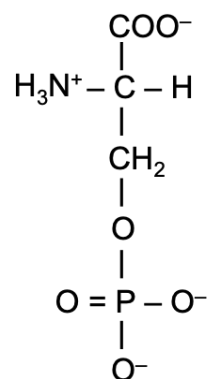
Les protéines Tau et la maladie d'Alzheimer

1 Structure des protéines Tau et formation des complexes NFTs

- 1.1. Les protéines Tau sont associées à la tubuline et stabilisent la structure des microtubules. Leur phosphorylation provoque la libération des protéines Tau phosphorylées. Ces dernières sont alors hydrolysées par les caspases. Les protéines Tau tronquées s'agrègent pour former des filaments (PHF) puis des enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs).
- 1.2. Les isoformes des protéines Tau sont nommées d'après le nombre de répétitions des séquences N (dans le domaine de projection en N terminal) et R (dans le domaine de fixation au microtubules) qu'elles contiennent.
Par exemple, l'isoforme 2N4R comporte 2 répétitions de la séquence N (2N) et 4 répétitions de la séquence R (4R).
Un domaine protéique est une région d'une protéine se repliant de façon autonome et indépendante du reste de la protéine, et qui lui confère une fonction particulière.
- 1.3. Les acides aminés dont les chaînes latérales peuvent être phosphorylés sont la sérine, la thréonine et la tyrosine, qui partagent un groupement hydroxyle –OH.



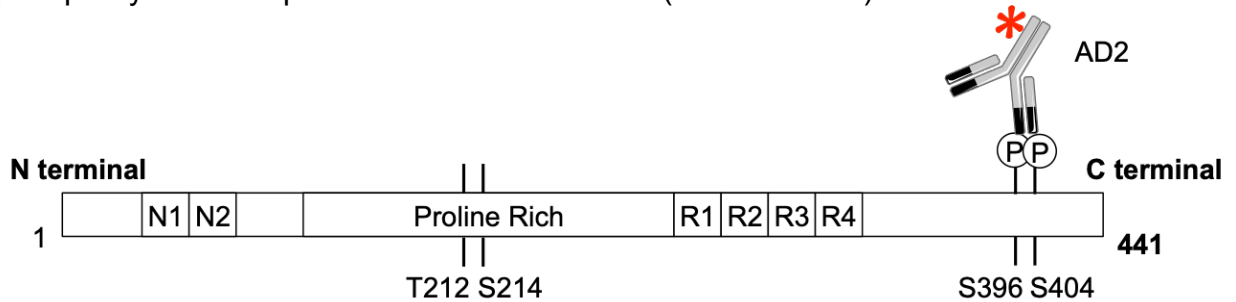
sérine



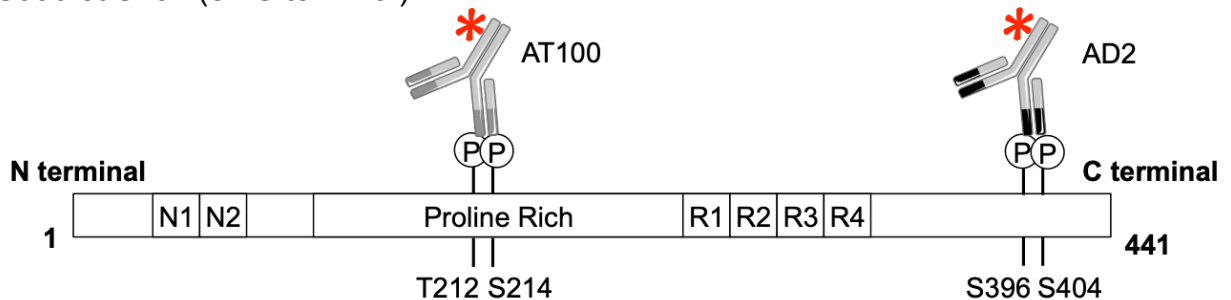
sérine phosphorylée

- 1.4. Étape 1 : extraction (et éventuellement dosage) des protéines.
- Étape 2 : séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) après dénaturation des échantillons par chauffage en présence de SDS (et éventuellement d'un agent réducteur).
- Étape 3 : transfert des protéines sur membrane (par capillarité ou électrotransfert).
- Étape 4 : saturation de la membrane, immunocomplexation avec des anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt, lavage de l'excès d'anticorps.
- Étape 5 : révélation de la présence de l'anticorps. Dans le cas présent, l'anticorps est radiomarqué.

- 1.5. Dans le cerveau sain : immunocomplexation de l'anticorps AD2 seulement, donc phosphorylation uniquement sur S396 et S404 (en C terminal).



Dans le cerveau malade : immunocomplexation des deux anticorps AT100 et AD2, donc phosphorylation à la fois sur T212 et S214 (séquence riche en proline) et sur S396 et S404 (en C terminal).



L'immunocomplexation avec l'anticorps AD2 montre la phosphorylation de trois isoformes de Tau (présence de 3 bandes), aussi bien dans le cas du cerveau sain que dans le cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer. La phosphorylation en positions S396 et S404 est donc normale.

En revanche, l'anticorps AT100 montre une absence de phosphorylation des isoformes de Tau dans le cas du cerveau sain (absence d'immunocomplexation avec AT100 et donc absence de bande), mais révèle la phosphorylation de la protéine Tau dans le cas du cerveau atteint d'Alzheimer (présence de 3 bandes). Les phosphorylations en positions T212 et S214 semblent donc être associées à la maladie d'Alzheimer.

2. Production d'une protéine Tau recombinante

- 2.1. La sonication consiste à appliquer à l'échantillon une onde sonore à très haute fréquence (ultrasons), ce qui provoque un phénomène de cavitation avec formation de microbulles éphémères et une agitation intense des molécules qui détruisent les membranes cellulaires.
- 2.2. La résine Ni-NTA chargée en nickel est équilibrée dans le tampon de fixation. Lors de l'étape de fixation, le lysat est ajouté et les protéines portant une séquence de plusieurs histidines (protéine Tau étiquetée « 6His ») sont adsorbées sur la colonne de nickel (création de liaisons de coordination entre les histidines et les atomes de nickel). Les lavages (en présence d'imidazole à faible concentration : 25 mM) permettent d'éliminer les protéines et autres composés non fixés sur la colonne. L'élution (à forte concentration en imidazole : 500 mM) permet de décrocher les protéines préalablement retenues.
- 2.3. Le tampon C d'élution contient de l'imidazole à forte concentration (500 mM), qui va entrer en compétition avec les noyaux imidazole des histidines pour la fixation sur les ions Ni^{2+} de la colonne.

2.4. La première étape consiste en une hydrolyse de l'étiquette « 6His » des protéines Tau-6His par la protéase TEV (portant elle-même une étiquette « 6His » : TEV-6His) à l'intérieur d'un boudin de dialyse. Au cours du temps d'incubation, l'étiquette « 6His » issue de l'hydrolyse et l'imidazole en excès utilisé pour l'élution de Tau-6His diffusent à l'extérieur du boudin de dialyse. Les protéines Tau et TEV-6His restent dans le boudin de dialyse.

La deuxième étape consiste en une deuxième chromatographie sur colonne de nickel Ni-NTA. Les protéines Tau ayant perdu l'étiquette « 6His » ne sont pas retenues, contrairement à la protéase TEV-6His.

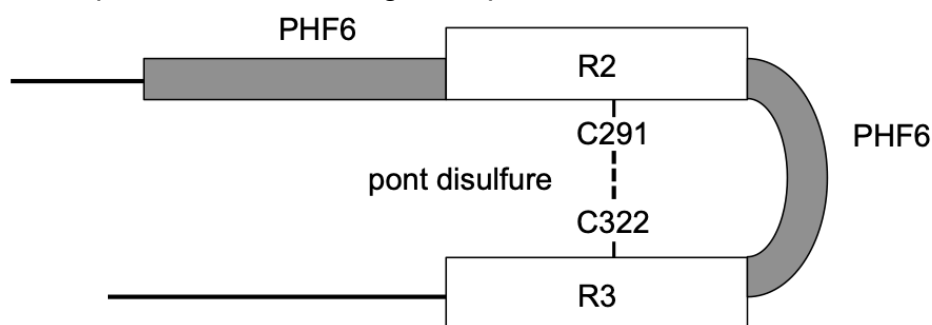
Ces étapes permettent de récupérer la protéine Tau sans étiquette.

3 Stratégies thérapeutiques

Modifications de la structure tridimensionnelle des protéines Tau

3.1. Les cystéines 291 et 322 doivent être sous forme réduites (groupement thiol –SH libre) pour qu'il y ait formation des NFTs. La formation de ponts disulfures (oxydation des groupements thiols –SH par le bleu de méthylène) entre les cystéines 291 et 322 doit provoquer un changement de conformation de la protéine Tau qui empêche la formation des amas par modification de l'accessibilité des sites PHF6.

3.2. Les cystéines 291 et 322 sont situées de part et d'autre de la séquence PHF6, respectivement dans les séquences répétées R2 et R3. La formation d'un pont disulfure entre ces cystéines provoque un repliement de la séquence PHF6, qui n'est plus disponible pour l'autoassemblage des protéines Tau en NFTs.



Inhibition de la protéolyse des protéines Tau

3.3. Le composé Ac-VEID-Afc est un substrat de la caspase car il comporte une séquence d'acides aminés reconnus par le site actif de la caspase : Glutamate (acide aminé hydrophile = Xaa₁) – Isoleucine (acide aminé hydrophobe = Xaa₂) – Aspartate (dernier acide aminé avant hydrolyse de la liaison peptidique).

3.4. La vitesse initiale maximale peut être déterminée à partir de la représentation en double inverse de l'équation de Michaelis et Menten (représentation de Lineweaver et Burke), soit par lecture graphique, soit à partir de l'équation de la droite. En effet l'ordonnée à l'origine est égale à $1/v_{\text{imax}}$ dans cette représentation.

Les équations montrent que l'ordonnée à l'origine est égale à $0,02 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{s}$ dans les trois conditions $\Rightarrow v_{\text{imax}} = 1 / 0,02 = 50 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$.

Par lecture graphique, dans les trois conditions, l'ordonnée à l'origine vaut environ $0,025 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{s}$ $\Rightarrow v_{\text{imax}} = 1 / 0,025 = 40 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$.

- 3.5. Par lecture graphique (intersection des droites avec l'axe des abscisses), on obtient les valeurs de $-1/K_M$, puis par déduction les valeurs approchées de K_M :

Condition	$-1/K_M (\mu M^{-1})$	$K_M (\mu M)$
Bleu de méthylène $0 \mu mol \cdot L^{-1}$	$-0,08$	$\approx 12,5$
Bleu de méthylène $10 \mu mol \cdot L^{-1}$	$-0,06$	≈ 15
Bleu de méthylène $25 \mu mol \cdot L^{-1}$	$-0,05$	≈ 20

Les K_M de la caspase pour le substrat (Ac-VEID-Afc) augmentent lorsque la concentration en bleu de méthylène augmente, ce qui traduit une diminution de l'affinité de la caspase pour le substrat.

- 3.6. En présence de bleu de méthylène, la caspase présente une $v_{\max}$ inchangée et un K_M augmenté, ce qui montre que le bleu de méthylène agit comme un inhibiteur compétitif de la caspase.

Sélection de peptides ayant une action sur l'agrégation des protéines Tau

- 3.7. L'énoncé indique que la séquence PHF6 est impliquée dans l'autoassemblage organisé des protéines Tau. Des peptides se fixant sur cette séquence PHF6 pourraient la masquer et donc inhiber l'autoassemblage des protéines Tau.

- 3.8. La fluorescence indique la présence d'agrégats de protéines Tau, et est égale à 100 % en absence de peptide thérapeutique.

En présence de peptides thérapeutiques à concentrations croissantes, la fluorescence diminue, traduisant une diminution équivalente des agrégats de protéines Tau. L'effet le plus fort est observé avec le peptide TD28 (environ 50 % de fluorescence à $1 \mu M$, et 15 % à partir de $10 \mu M$)., qui est donc le peptide le plus actif pour dissocier les agrégats.

Les peptides TD28 et TL28 ne diffèrent que par la série des acides aminés qui les composent (ils partagent la même séquence en acides aminés) : énantiomères de la série D pour TD28, et de la série L pour TL28. Le peptide composé d'acides aminés appartenant à la série D est plus efficace que celui composé d'acides aminés de la série L (qui est la série naturellement présente dans les protéines cellulaires).

2021 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

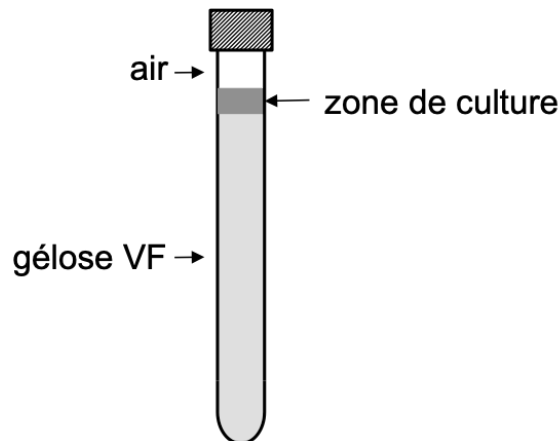
Les sidérophores : il fallait le « fer »

1. Les sidérophores, des métabolites indispensables à l'internalisation du fer chez *Pseudomonas aeruginosa*

1.1. Légendes du document 1 :

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1- membrane externe | 5- peptidoglycane (fin) |
| 2- périplasme | 6- lipopolysaccharide (LPS) |
| 3- membrane plasmique (interne) | 7- porine |
| 4- phospholipides | 8- protéine membranaire (intrinsèque) |

- 1.2. La mise en évidence du type respiratoire se fait en milieu viande-foie (VF) en tube Félix ou Veillon pour la mise en place du gradient de dioxygène. *P. aeruginosa* est aérobic strict en absence de nitrates, il se développera donc à la surface du tube, en présence de au contact du dioxygène.



- 1.3. Le gradient de protons, formé dans l'espace périplasmique par les transports actifs et le cycle des quinones, constitue la force protonmotrice qui met en mouvement l'ATP synthétase lors de leur retour dans le cytoplasme. L'énergie générée est utilisée par le complexe enzymatique pour la phosphorylation de l'ADP en ATP.
- 1.4. Ce gradient est important car il permet à la cellule de générer de l'ATP qui est indispensable au transport actif dont est tributaire le cycle des sidérophores.
- 1.5. Dans les trois milieux A, B et C, les composés source de carbone et d'énergie sont respectivement : le succinate, le glucose et le glutamate.
- 1.6. Ces trois molécules étant des molécules organiques, et *P. aeruginosa* se développant en absence de lumière, on peut donc déduire que la souche est chimio-organohétérotrophe.
- 1.7. La vitesse spécifique de croissance de la souche en phase exponentielle (Q_{xepo}) la plus élevée est obtenue en milieu B. La source de carbone et d'énergie, le glucose, est facilement utilisable et présente en grande quantité. Dans les deux autres milieux, les Q_{xepo} sont du même ordre de grandeur et deux fois plus faibles que dans le milieu B. Dans ces milieux la source de carbone, succinate ou glutamate, est plus limitée et est potentiellement aussi utilisée dans le cycle des sidérophores ou d'autres voies de biosynthèse ce qui la rend moins disponible pour les oxydations phosphorylantes.

1.8. Tableau comparatif

Milieu	$Y_{X/S}$ $g_{biomasse} \cdot g_{substrat}^{-1}$	$Y_{P/S}$ $\mu mol_{sidérophore} \cdot g_{substrat}^{-1}$	PVHG $\mu mol_{sidérophore} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$
Milieu A	0,057	3,37	2,37
Milieu B	0,74	10,3	7,5
Milieu C	0,66	210	4,8

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_{final} - X_0}{S_0 - S_{final}} = \frac{(0,95 - 0,35) \times 0,65}{1 - 0,41} = 0,66 g_{biomasse} \cdot g_{substrat}^{-1}$$

$$PVHT = \frac{\Delta P}{\text{temps procédé}} = \frac{P_{final} - P_0}{t} = \frac{(135 - 15)}{25} = 4,8 \mu mol \cdot L^{-1} \cdot g^{-1}$$

$Y_{P/S}$: non calculé car donné par l'énoncé.

- 1.9. Le milieu B présente le meilleur rendement de production de biomasse et la meilleure productivité volumique horaire totale, il semble donc, d'après ces données, le plus approprié à la production en bioréacteur de sidérophores. Le milieu C présente la meilleure productivité de sidérophores par gramme de substrat et une PVHT non négligeable. On pourrait argumenter qu'une augmentation de la concentration en glutamate dans la composition du milieu donnerait à terme de meilleurs résultats que le milieu glucosé.

2. Les sidérophores comme outils pour la remédiation des sols

- 2.1. Ce mode de relation plante/microorganismes est appelé symbiose. Chaque partenaire tire profit de la présence de l'autre. Les bactéries bénéficient d'un apport en nutriment et en O_2 de la part des racines de la plante. La plante reçoit en retour des sidérophores chargés qui lui permettent une meilleure assimilation des éléments métalliques du sol dont elle a besoin.
- 2.2. D'après le document 5, les sidérophores bactériens capturent les ions métalliques du sol (dont les métaux lourds éventuels) et sont assimilés par la plante au niveau de ses racines. Les sidérophores chargés sont ensuite transportés jusqu'aux feuilles du végétal. Les éléments polluants sont donc déplacés depuis le sol vers les feuilles des plantes. Le prélèvement des plantes après croissance permet donc d'éliminer une pollution aux métaux lourds d'un sol contaminé.
- 2.3. D'après le document 6, le Fer complexé (par les sidérophores ou par l'EDTA) améliore la teneur en chlorophylle du trèfle rouge. Son assimilation, par les racines en particulier, est meilleure lorsqu'il est complexé par les sidérophores bactériens. On peut donc en déduire que la présence de sidérophores favorise le métabolisme énergétique de la plante en augmentant son efficacité photosynthétique et ses transports membranaires d'électrons. (Remarque : la chlorophylle lie un ion Mg^{2+} dans son hème, et non pas un ion Fe^{2+} comme l'hémoglobine).

3. Des sidérophores pour contourner la résistance des bactéries aux antibiotiques

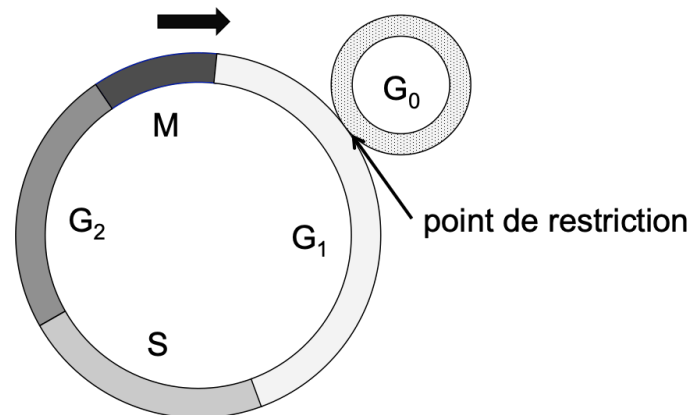
- 3.1. Bactéries pathogènes opportunistes : microorganismes qui ne provoquent habituellement pas d'infection mais qui peuvent devenir pathogènes lorsque le système immunitaire et la résistance de l'individu sont affaiblis, où lorsqu'ils sont délocalisés à un emplacement inhabituel ou normalement stérile.
Métallo- β -lactamase : famille d'enzyme permettant l'hydrolyse des β -lactamines (et possédant un cofacteur enzymatique métallique)
- 3.2. Témoin n°1 : témoin de stérilité du milieu MHB. Résultat attendu : absence de culture.
Témoin n°2 : témoin de croissance en milieu MHB de chacune des souches. Résultat attendu : culture
Témoin n°3 : témoin de résistance de la souche à l'ampicilline à la concentration utilisée. Résultat attendu : culture.
- 3.3. D'après le document 8, on lit la CMI comme la plus petite concentration qui inhibe toute croissance visible de la souche. Dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, la CMI de l'exosidérophore seul est de $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, et celle de l'association sidérophore-ampicilline de $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. (remarque : un exosidérophore est un sidérophore produit par une autre espèce bactérienne et qui n'est pas reconnu par la souche d'intérêt car elle ne possède pas les récepteurs appropriés).
- 3.4. D'après le graphe C du document 9, les deux courbes de croissance de la souche en présence et en absence d'ampicilline sont confondues. La souche est donc bien résistante à l'antibiotique à la concentration utilisée.
- 3.5. D'après le graphe B du même document, les exosidérophores seuls ont un effet inhibiteur limité sur la croissance de la souche : allongement de la phase stationnaire, mais vitesse de croissance identique. La capture des ions métalliques semble uniquement retarder la croissance de *Pseudomonas*.
Sur le Graphe A du même document, la présence conjointe des exosidérophores et de l'ampicilline induit une forte inhibition de la croissance de la souche : allongement de la phase stationnaire de 10h à 16h et forte diminution de la vitesse de croissance.
- 3.6. L'utilisation conjointe des sidérophores et de l'ampicilline montre un effet synergique : l'effet de leur association est supérieur à la somme de leurs effets individuels. L'ampicilline induit une perturbation de la synthèse du peptidoglycane, et les exosidérophores capturent les ions métalliques nécessaires au métabolisme énergétique de la souche. On peut avancer l'hypothèse que la perturbation de la synthèse de la paroi par l'ampicilline favorise la capture des ions métalliques cellulaires par les sidérophores, ce qui, à terme perturbe le métabolisme énergétique de *Pseudomonas* et impacte fortement sa croissance.
En conclusion, la présence d'exosidérophores permet de réduire la résistance de *Pseudomonas* à l'ampicilline.

2021 - U42 : Biologie cellulaire

L'immunothérapie : une thérapie ciblée contre le cancer

1. Cycle cellulaire et cancérogenèse

1.1. Schéma du cycle cellulaire :



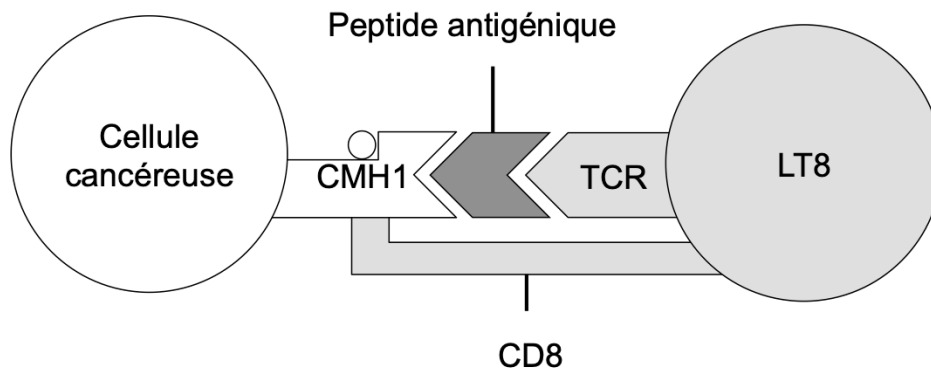
- 1.2. Les légendes du schéma sont les suivantes : 1 : facteur de croissance, 2 : récepteur du facteur de croissance, 3 : voie de transduction du signal (de l'information).
- 1.3. D'après le document 2, l'EGF est un peptide composé de 53 acides aminés majoritairement hydrophiles (Cys, Ser, Asp, Glu, Asn, Gln, Lys, Arg). Il ne peut donc pas traverser la membrane plasmique et doit se fixer sur un récepteur membranaire présent à la surface de la cellule, ce qui explique l'appellation « messenger à récepteur membranaire ».
- 1.4. Les messagers chimiques capables de traverser la membrane plasmique se fixent sur des récepteurs intracellulaires, localisés soit dans le cytoplasme, soit dans le noyau.
- 1.5. Dans une cellule normale, lorsque l'ADN est endommagé, la protéine p53 est activée et induit l'expression des gènes codant les protéines p21, GADD45 et BAX. L'action combinée de p21 et GADD45 conduit à la réparation de l'ADN : p21 bloque le cycle cellulaire en phase G₁, ce qui permet l'intervention de GADD45 pour la réparation de l'ADN. Si les lésions de l'ADN ne sont pas réparées, la protéine BAX induit l'apoptose de la cellule. Dans une cellule où p53 n'est pas fonctionnelle, les lésions de l'ADN ne sont pas réparées ou sont réparées de façon fautive, ce qui conduit à l'apparition de cellules mutées. Ces dernières, en se multipliant, peuvent aboutir à la formation d'une tumeur. Ainsi p53, en contrôlant la production de la protéine p21 intervenant dans la mise en place du point de surveillance du cycle cellulaire, constitue un élément clé de la régulation de ce cycle.
- 1.6. Le document 4 suit l'évolution de la probabilité de ne pas développer de tumeur au cours du temps pour trois lignées de souris. Les souris de génotype *p53*^{+/+} ne développent pas de tumeur après 80 semaines. Les souris de génotype *p53*^{+/-} développent une tumeur à partir de 10 semaines et la probabilité de ne pas développer de tumeur diminue pour atteindre la valeur de 0,1 à 80 semaines. La valeur de 54 représente le nombre de semaines au bout desquelles 50 % des souris de génotype *p53*^{+/-} ont développé une tumeur.

- 1.7. Pour les souris de génotype $p53^{-/-}$, aucune souris ne développe de tumeur jusqu'à 10 semaines, puis la probabilité de ne pas développer de tumeur diminue rapidement, 50 % des souris développent une tumeur au bout de 15,4 semaines et 100 % des souris développent une tumeur après 26 semaines.

L'absence du gène $p53$ conduit au développement de tumeurs chez les souris, donc sa présence empêche le développement de tumeur : le gène $p53$ est un anti-oncogène.

2. Cancer et système immunitaire

- 2.1. Représentation de la coopération membranaire entre une cellule cancéreuse et un lymphocyte T cytotoxique :



- 2.2. Le microscope utilisé est un microscope électronique à balayage. En effet, le grossissement est élevé ($\times 2500$), l'image obtenue est en trois dimensions et seule la surface des cellules est observée.
- 2.3. Le lymphocyte T présente une surface relativement granuleuse, sauf au contact de la cellule cancéreuse, où sa surface est plus lisse et où deux ponts membranaires avec la cellule cancéreuse sont visibles. La forte association des deux types cellulaires crée une synapse immunologique, cet espace restreint garantissant l'accès des molécules toxiques libérées par le lymphocyte T vers les cellules cibles.
- 2.4. En absence de cancer, les freins moléculaires immunologiques permettent de stopper la réaction immunitaire lorsque l'antigène est éliminé et d'éviter un emballement de cette réponse.
- 2.5. La protéine PD1 est exprimée en surface des lymphocytes T (LT). Son ligand PD-L1 est présent sur les cellules auxquelles les LT s'associent, parmi lesquelles les cellules cancéreuses qui sur-expriment souvent PD-L1. La reconnaissance des cellules cancéreuses par les LT permet l'association entre PD1 et PD-L1, ce qui provoque l'apoptose des LT et empêche donc la destruction des cellules cancéreuses par ces derniers. Cibler PD1 pour inhiber son interaction avec PD-L1 pourrait permettre d'éviter la mort des LT, restaurant ainsi la réponse immunitaire des LT contre les cellules cancéreuses.
- 2.6. Afin d'empêcher la liaison entre PD-1 et PD-L1, il faut neutraliser soit PD-1, soit PD-L1 par un anticorps monoclonal. L'utilisation d'un anticorps monoclonal est indispensable afin de garantir la spécificité de reconnaissance et donc de fixation sur la molécule cible et d'éviter des réactions croisées.

- 2.7. Le FSC correspond à la diffusion aux petits angles (ou diffusion axiale) et permet de caractériser la taille de la cellule.
Le SSC correspond à la diffusion aux grands angles (ou diffusion latérale) et permet de caractériser la granulosité de la cellule.
- 2.8. Deux spots apparaissent sur le graphe présentant la fluorescence des cellules en fonction de leur taille :
- un spot avec un angle FSC faible et une intensité de fluorescence faible, inférieure à 10^2 : ces cellules sont petites, ce sont donc les lymphocytes T, elles ne sont pas reconnues par le conjugué donc ne sont pas la cible des anticorps monoclonaux
 - un spot avec un angle FSC important et une intensité de fluorescence élevée entre 10^3 et 10^4 : ces cellules sont grosses, ce sont les cellules cancéreuses, elles sont reconnues par le conjugué donc sont la cible des anticorps monoclonaux.
- Les anticorps monoclonaux sont donc dirigés contre la protéine PD-L1 présente sur les cellules cancéreuses.
- 2.9. Le docétaxel désorganise le réseau des microtubules ce qui bloque la mitose : le docétaxel est donc particulièrement toxique pour les cellules en division.
- 2.10. Le document 8 représente l'évolution du pourcentage de patients survivants au cours du temps, pour des patients qui suivent deux traitements anti-tumoraux différents.
Le traitement par l'atezolizumab permet une meilleure survie au cours du temps avec 50 % de patients survivants après 13,8 mois et une stabilisation du pourcentage de survivants à 40 % à partir de 21 mois et jusqu'à 27 mois.
Le traitement par le docétaxel montre un taux de survie de 50 % des patients après seulement 9,6 semaines et une diminution régulière de ce pourcentage pour atteindre 10 % de survivants après 27 mois.
L'atezolizumab augmente la durée de vie des patients traités, il est donc plus efficace pour lutter contre le cancer que le docétaxel.

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 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
C1.3- 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
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 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
C1.3- 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.	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
C1.4- 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 ensemer 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 questionnaire 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 questionnaire 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.