
Annales du Brevet de Technicien Supérieur

BIOTECHNOLOGIES

2022-2023

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 :
Isabelle ÉTIENNE, François GUILLOU, Jean-Luis LÉCRIVAIN, Patrick LEMÉNICIER,
Daniela MASTROFINI, Romain MITRE, Paule RENVOISÉ.

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).

978-2-491571-00-9



Éditions UPBM-ÉDILION
Avenue Andreï Sakharov
69339 Lyon Cedex 9

[http:// www.upbm.org](http://www.upbm.org)

Illustration de couverture : cellule Caco-2 en mitose, en microscopie de super-résolution
STED (haut) versus microscopie confocale (bas).
Les microtubules sont colorés en bleu, l'actine en orange et les jonctions serrées en rose.

Crédit des photos de couverture : © Plateforme d'Imagerie Cellulaire SFR Necker Inserm
US 24 / Manon RAIMBAULT - Béatrice DUREL

Conception de la couverture : Antoine GAUDIN

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	5
Session 2022 : Sujets	8
2022 - U11 : Mathématiques	9
2022 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	15
2022 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique	23
2022 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	31
2022 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	40
2022 - U42 : Biologie cellulaire.....	47
Session 2022 : Éléments de corrigé	55
2022 - U11 : Mathématiques	56
2022 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	59
2022 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique	63
2022 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	66
2022 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	70
2022 - U42 : Biologie cellulaire.....	73
Session 2023 : Sujets	76
2023 - U11 : Mathématiques	77
2023 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	81
2023 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique	91
2023 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	99
2023 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	108
2023 - U42 : Biologie cellulaire.....	114
Session 2023 : Éléments de corrigé	124
2023 - U11 : Mathématiques	125
2023 - U12 : Sciences physiques et chimiques.....	128
2023 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique	132
2023 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines.....	135
2023 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire	138
2023 - U42 : Biologie cellulaire.....	142
Travaux Pratiques de Biotechnologies	146
U51 : TP de biologie moléculaire et génie génétique	147
U52 : TP de biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	149
U53 : TP de microbiologie et génie fermentaire	151
U54 : TP de biologie et technologies cellulaires.....	153
Rapport de stage et soutenance	155
U6 : Rapport de stage et soutenance.....	156

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 / 2h
	Biochimie des protéines	1	CCF / ponctuelle	2 x 3h / 2h
	Microbiologie et génie fermentaire	1	CCF / ponctuelle	2 x 3h / 2h
	Biologie cellulaire	1	CCF / ponctuelle	2 x 3h / 2h
<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

ÉPREUVES ORALES DE CONTRÔLE

Après délibération du jury et depuis la session 2022, les candidats qui ont obtenu une moyenne générale inférieure à 10 sur 20 et supérieure ou égale à 8 sur 20, ainsi qu'une moyenne aux épreuves professionnelles supérieure ou égale à 10 sur 20 sont autorisés à se présenter aux épreuves de contrôle.

Les candidats passent une interrogation orale sur chacune des épreuves non professionnelles : mathématiques et sciences physiques et chimiques. Chaque interrogation dure 20 minutes et est précédée d'une préparation de 20 minutes.

Chaque épreuve de contrôle est notée par l'examineur concerné sur 20 points et est affectée du coefficient de l'épreuve correspondante.

À l'issue des épreuves de contrôle et après délibération du jury, les candidats sont déclarés admis dès lors qu'ils ont obtenu une moyenne générale supérieure ou égale à 10 sur 20.

Session 2022 : Sujets

2022 - U11 : Mathématiques*Durée : 2 h – coefficient 1*

Matériel autorisé : *calculatrice avec mode examen actif*
calculatrice sans mémoire, « type collège »

L'**annexe** est à rendre avec la copie.

EXERCICE 1 (10 points)

On s'intéresse dans cet exercice à l'évolution, dans un pays de 60 millions d'habitants, du nombre de personnes équipées d'un certain implant médical. On exploitera deux modèles distincts.

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

Partie A

Le tableau ci-dessous indique le nombre de personnes de ce pays équipées de l'implant médical depuis 2013.

Année	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Rang de l'année k_i	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de personnes N_i (en milliers) équipées de	56,25	58,1	60,5	63	65,8	68,7	72	75,5	79,3

On décide de modéliser cette évolution par une fonction exponentielle et pour cela on effectue le changement de variable $y = \ln(N - 30)$.

- Compléter le tableau donné en **annexe à rendre avec la copie**. On arrondira les valeurs au millième.
- À l'aide de la calculatrice, déterminer une équation de la droite d'ajustement du nuage de points $M_i(k_i, y_i)$ par la méthode des moindres carrés. On écrira cette équation sous la forme $y = ak + b$ où a et b sont des coefficients que l'on arrondira au centième.
 - En utilisant cette équation de droite, déduire que le nombre de personnes (en milliers) équipées de l'implant médical dans ce pays, en fonction du rang k , peut être modélisé par la fonction N d'expression :
$$N(k) = 30 + 26,05e^{0,08k}$$
- On formule l'hypothèse que le modèle proposé reste valide plusieurs années encore.
 - Quel devrait être le nombre de personnes, au millier près, équipées de l'implant médical dans ce pays en 2026 ?
 - Si on suppose que le nombre d'habitants du pays reste stable sur le long terme, le modèle étudié reste-t-il valide sur le long terme ? Justifier la réponse.

Partie B

1. Dans cette question, on considère la fonction g définie et dérivable sur l'intervalle $[0, +\infty[$ qui vérifie $g(0) = 8$ et qui est solution de l'équation différentielle (E) sur l'intervalle $[0, +\infty[$:

$$(E) : y' + 0,05y = 0,05$$

- Résoudre sur l'intervalle $[0, +\infty[$ l'équation différentielle $(E_0) : y' + 0,05y = 0$.
- Déterminer une solution constante de l'équation différentielle (E) .
- Résoudre sur l'intervalle $[0, +\infty[$ l'équation différentielle (E) .
- On rappelle que $g(0) = 8$.
En déduire une expression de la fonction g sur l'intervalle $[0, +\infty[$.

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

$$f(t) = \frac{450}{1 + 7e^{-0,05t}}$$

On admet que cette fonction permet de modéliser l'évolution du nombre de personnes équipées de l'implant médical dans ce pays.

Plus précisément, $f(t)$ représente le nombre de personnes, exprimé en milliers, équipées de l'implant médical dans ce pays en fonction du temps t mesuré en années depuis 2013.

Par exemple, $f(1)$ représente le nombre de personnes de ce pays équipées de l'implant médical en 2014.

- Déterminer, selon ce modèle, combien de personnes, au millier près, seront équipées de l'implant médical en 2026.
- Déterminer la limite de la fonction f en $+\infty$. Interpréter le résultat dans le contexte de l'exercice.
- À l'aide d'un logiciel de calcul formel, on a obtenu l'expression suivante :

$$f'(t) = \frac{315e^{-0,05t}}{2(1 + 7e^{-0,05t})^2}$$

En déduire le sens de variation de la fonction f sur l'intervalle $[0, +\infty[$ et l'interpréter dans le contexte de l'exercice.

- Déterminer à partir de quelle année le nombre de personnes de ce pays équipées de cet implant médical dépassera 120 000, c'est-à-dire 120 milliers. On expliquera la méthode employée.

EXERCICE 2 (10 points)

Les trois parties de cet exercice sont indépendantes.

Dans une usine, une machine à embouteiller est alimentée par un réservoir d'eau et par une file d'entrée qui permet l'approvisionnement en bouteilles vides.

Partie A - Défaut d'approvisionnement

On considère qu'il y a un défaut d'approvisionnement lorsqu'au moins un des deux cas suivants est réalisé :

- la file d'entrée des bouteilles est vide ;
- le réservoir est vide.

On choisit au hasard un jour d'activité de l'entreprise dans l'année. On note :

- A l'événement : « la file d'entrée des bouteilles est vide au moins une fois dans la journée » ;
- B l'événement : « le réservoir est vide au moins une fois dans la journée ».

On admet que les événements A et B sont indépendants.

Une étude statistique permet de dire que les probabilités des événements A et B sont respectivement données par $P(A) = 0,03$ et $P(B) = 0,02$.

Chaque phrase du tableau de gauche est associée à une unique information correspondante dans le tableau de droite. Pour chacune des quatre réponses, écrire sur la copie le numéro de la phrase avec la lettre qui correspond à l'information associée. Aucune justification n'est demandée.

1	La probabilité de l'événement : « La file d'entrée ne se vide pas dans la journée. »
2	L'événement : « La file d'entrée est vide au moins une fois dans la journée mais pas le réservoir. »
3	La probabilité de l'événement : « La file d'entrée et le réservoir ont été tous les deux vides au moins une fois au cours de la journée. »
4	La probabilité de l'événement : « La machine a connu un défaut d'approvisionnement dans la journée. »

A	$\bar{A} \cap B$
B	0,05
C	$A \cap \bar{B}$
D	0,0494
E	0,97
F	0,0006

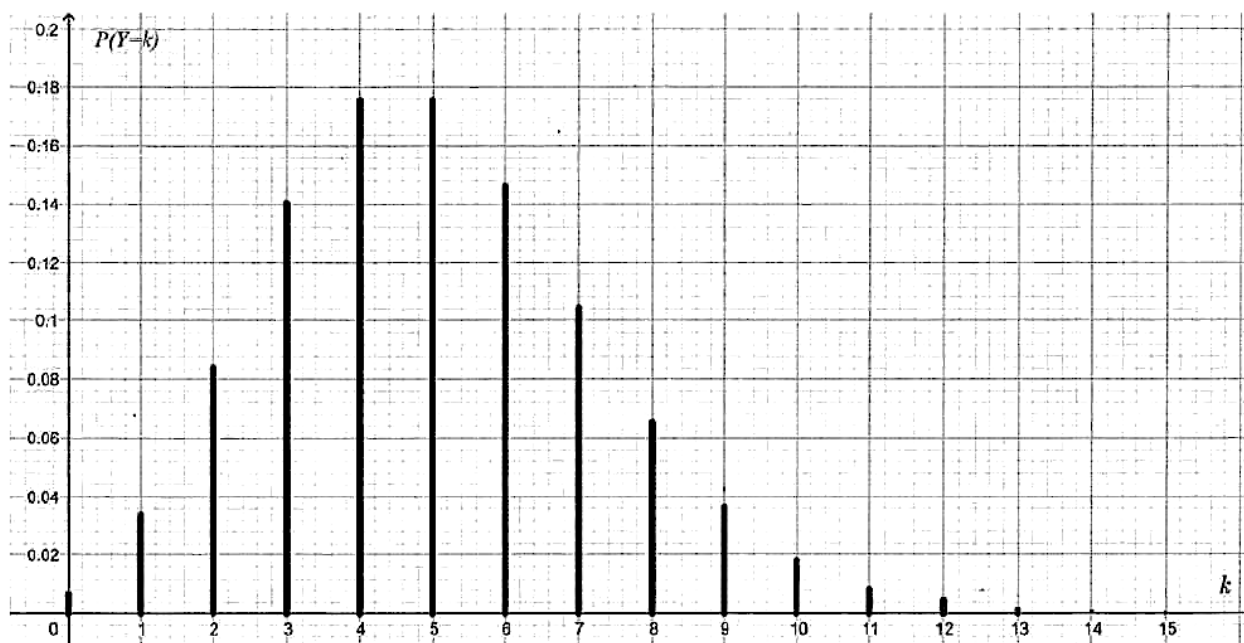
Partie B - Pannes de la machine à embouteiller sur une durée de 200 jours

1. Lorsque la machine tombe en panne, elle est immobilisée pour le reste de la journée et réparée pour le lendemain. La probabilité qu'elle tombe en panne un jour quelconque est égale à 0,025.

On note X la variable aléatoire qui, à toute période de 200 jours consécutifs choisie au hasard, associe le nombre de jours où la machine est tombée en panne. On considère que les jours où les pannes surviennent sont indépendants les uns des autres.

Donner, sans justifier, la loi de probabilité suivie par la variable aléatoire X . Préciser ses paramètres.

2. On admet que la loi de la variable aléatoire X peut être approchée par une loi de Poisson de paramètre λ . Soit Y une variable aléatoire qui suit cette loi de Poisson.
- Justifier que $\lambda = 5$.
 - Donner la valeur arrondie à 10^{-3} de la probabilité $P(Y \leq 10)$.
 - On a représenté ci-dessous les valeurs de $P(Y = k)$ en fonction des premières valeurs de k :



Cette représentation graphique suggère que la probabilité $P(Y = 15)$ est égale à 0.

On admet que pour tout entier $k \geq 1$, on a :

$$P(Y = k) = \frac{5^k e^{-5}}{1 \times 2 \times \dots \times k}$$

La conjecture « $P(Y = 15)$ est égale à 0 » est-elle vraie ou fausse ? Justifier.

Partie C - Qualité de l'embouteillage

Un laboratoire analyse la qualité de l'embouteillage en sortie de machine.

La machine est correctement réglée quand une bouteille remplie contient un volume d'eau dont l'arrondi au centilitre est 75 cL.

On souhaite tester l'hypothèse « La machine est correctement réglée » à l'aide d'un test bilatéral au seuil de confiance de 95 %.

On note :

- m la quantité moyenne d'eau en centilitres dans une bouteille remplie par la machine ;
- s l'écart type correspondant.

On réalise une mesure du volume d'eau arrondi au centilitre pour un échantillon de 100 bouteilles remplies par la machine. Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-dessous :

Quantité d'eau contenue (cL)	73	74	75	76	77
Nombre de bouteilles	17	20	43	13	7

1. Déterminer, à l'aide de la calculatrice, la moyenne $\bar{x}$ et l'écart type σ de cet échantillon. On donnera la valeur arrondie de l'écart type à 10^{-2} .
2. On souhaite réaliser le test bilatéral suivant au seuil de confiance de 95 % :

$$H_0 : « m = 75 » \text{ et } H_1 : « m \neq 75 ».$$

On note $\bar{Z}$ la variable aléatoire qui à tout échantillon de 100 bouteilles remplies par la machine associe la moyenne du volume d'eau contenue dans les bouteilles, mesuré en centilitres. On suppose que la variable aléatoire $\bar{Z}$ suit la loi normale d'espérance m et d'écart type s .

Dans la suite, on remplace l'écart type s des volumes d'eau contenue après remplissage par la machine par son estimateur 0,11.

Sous l'hypothèse H_0 , $\bar{Z}$ suit donc la loi normale d'espérance 75 et d'écart type 0,11.

- a. Déterminer un nombre réel h vérifiant $P(75 - h \leq \bar{Z} \leq 75 + h) \approx 0,95$ à 10^{-2} près.
- b. Énoncer la règle de décision du test.
- c. D'après les résultats de l'échantillon donné, peut-on accepter l'hypothèse $H_0 : « m = 75 »$?

ANNEXE à rendre avec la copie**Exercice 1, Partie A, question 1**

Tableau à compléter :

Rang de l'année k_i	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de personnes N_i (en milliers) équipées de l'implant	56,25	58,1	60,5	63	65,8	68,7	72	75,5	79,3
$y_i = \ln(N_i - 30)$									

2022 - U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée : 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : *calculatrice avec mode examen actif
calculatrice sans mémoire, « type collègue »*

Les annexes 1 à 4 sont à rendre avec la copie.

Les données numériques sont indiquées dans chaque exercice.

Chaque partie du sujet peut être traitée indépendamment et dans n'importe quel ordre.

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.

Éléments de contexte non essentiels à la réalisation du sujet

À partir de quelques litres de lait, il est possible de créer toutes sortes de variétés de fromages aux goûts et aux saveurs bien différents.

Le circuit de fabrication d'un fromage comporte quelques étapes importantes :

*Le **caillage** est l'une des étapes essentielles de la fabrication des fromages. Le but est de laisser le lait coaguler grâce à l'action de présure (enzyme issue de l'estomac du veau) et de ferments lactiques. La quantité de ferments lactiques pourra ainsi changer selon le type de fromage souhaité à l'arrivée.*

*Après le caillage du lait, on obtient le caillé qui est placé dans différents moules, selon la forme du fromage souhaité, lors de l'étape du **moulage**.*

*L'étape suivante est l'**égouttage** du caillé qui a pour finalité de séparer celui-ci du petit lait. Les fromages frais et fromages blancs peuvent être consommés à l'issue de cette étape.*

*Pour les autres fromages, les fromages frais obtenus sont démoulés puis salés. Le **salage** a trois actions directes sur le fromage : une action antiseptique, une action de conservation et il donne également du goût au fromage.*

*L'étape finale de la fabrication du fromage est l'**affinage**. Sa durée varie de quelques jours à plusieurs mois selon les variétés de fromages. Dans ce que l'on appelle des caves d'affinage, le fromage mûrit, c'est-à-dire fermente, sous le contrôle de fromagers experts, qui régulent la température et l'humidité des caves. Phase complexe de la fabrication du fromage, elle demande savoir-faire et patience.*

D'après : www.produits-laitiers.com/le-circuit-de-fabrication-du-fromage

I. VÉRIFICATION DE LA CONFORMITÉ DU LAIT AUX NORMES DE CONSOMMATION (15 points)

De nombreuses questions peuvent être traitées indépendamment l'une de l'autre.

Une fois le lait traité, il est réfrigéré, afin de le protéger et de le conserver au mieux. Analysé pour vérifier qu'il est conforme aux normes de consommation, le lait est ensuite collecté par des camions citernes isothermes qui le conduisent jusqu'à la laiterie, où il sera traité, avant de subir sa transformation en fromage...

Pour qu'un lait soit conforme, il faut, entre autres, déterminer les teneurs en ions chlorure et en acide lactique.

Une inflammation des mamelles des vaches rend le lait impropre à la consommation. Cette inflammation se traduit par une augmentation de la concentration en ions sodium $\text{Na}^+(\text{aq})$ et en ions chlorure $\text{Cl}^-(\text{aq})$. Un dosage conductimétrique permet de déterminer la concentration de ces derniers.

L'état de fraîcheur d'un lait dépend de sa teneur en acide lactique, provenant de l'action des bactéries qui transforment le lactose, un sucre naturellement présent dans le lait, en acide lactique. Un dosage acidobasique permet de déterminer la concentration de ce dernier.

D'après : www.produits-laitiers.com/le-circuit-de-fabrication-du-fromage

Document 1 : Norme en vigueur pour la teneur en ions chlorure

La norme en vigueur impose que la concentration massique en ions chlorure soit comprise entre $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour que le lait traité soit consommable.

Document 2 : Le degré Dornic

Dans l'industrie laitière, l'acidité d'un lait n'est pas exprimée par son pH mais par son degré Dornic ($^{\circ}\text{D}$).

Un degré Dornic (1°D) correspond à une concentration massique de $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'acide lactique.

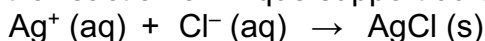
Le lait est considéré comme frais si son acidité est inférieure à 18°D .

Document 3 : Protocole du dosage conductimétrique réalisé

- Le lait traité étudié est dilué 5 fois : soit S_1 la solution aqueuse de lait diluée et C_1 sa concentration molaire en ions chlorure $\text{Cl}^-(\text{aq})$.
- On verse un volume $V_1 = 10,0 \text{ mL}$ de S_1 dans un bécher et on y ajoute environ 250 mL d'eau distillée.
- On mélange puis on plonge dans le bécher une cellule conductimétrique.
- Initialement et après chaque ajout, millilitre par millilitre, d'une solution aqueuse S_2 de nitrate d'argent ($\text{Ag}^+(\text{aq}) + \text{NO}_3^-(\text{aq})$), de concentration molaire $C_2 = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, contenue dans une burette, le conductimètre affiche directement la valeur de la conductivité σ de la solution aqueuse contenue dans le bécher.
- Les différentes valeurs expérimentales obtenues ont permis de tracer la courbe de dosage conductimétrique $\sigma = f(V_2)$, avec V_2 le volume de S_2 versé à chaque ajout, donnée **annexe 1**.

Données :

Équation modélisant la réaction chimique support du dosage réalisé :



Produit de solubilité du composé solide ionique chlorure d'argent : $K_s(\text{AgCl}) = 2,0 \times 10^{-10}$

Masse molaire atomique de l'atome de chlore : $M(\text{Cl}) = 35,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Formule de l'acide lactique : $\text{CH}_3\text{--CH}(\text{OH})\text{--COOH}$ que l'on notera HA

Masse molaire moléculaire de l'acide lactique : $M = 90,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans un premier temps, on souhaite déterminer la concentration en ions chlorure $\text{Cl}^-(\text{aq})$ du lait.

1. Exprimer le produit de solubilité $K_s(\text{AgCl})$ du chlorure d'argent en fonction des concentrations molaires en ions argent $\text{Ag}^+(\text{aq})$ et chlorure $\text{Cl}^-(\text{aq})$ à l'équilibre.
2. Exprimer la constante d'équilibre K , de la transformation chimique modélisant la formation du précipité de chlorure d'argent, en fonction de son produit de solubilité $K_s(\text{AgCl})$.
3. Montrer que la valeur de la constante d'équilibre K vaut $5,0 \times 10^9$.
4. En déduire que la réaction chimique étudiée peut servir de support à un dosage.
5. Déterminer graphiquement sur l'**annexe 1** le volume V_E de solution aqueuse de nitrate d'argent versé à l'équivalence.
6. Définir à l'équivalence la relation entre la quantité de matière en ions argent introduits $n(\text{Ag}^+)_E$ et la quantité de matière en ions chlorure initialement présents $n(\text{Cl}^-)_i$ dans la solution aqueuse S_1 .
7. Déterminer la valeur de la concentration molaire C_1 en ions chlorure initialement présents dans la solution aqueuse S_1 .
8. En déduire que la concentration molaire C en ions chlorure initialement présents dans le lait trait étudié a pour valeur $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.
9. Déterminer la valeur de la concentration massique C_m en ions chlorure initialement présents dans le lait trait étudié.
10. Conclure à partir de la valeur de la concentration massique C_m , si la teneur en ions chlorure du lait trait étudié respecte la norme en vigueur.

Dans un second temps, on souhaite déterminer la concentration en acide lactique HA du lait.

L'acide lactique du lait est maintenant titré par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ($\text{Na}^+(\text{aq}) + \text{HO}^-(\text{aq})$) en présence de quelques gouttes d'un indicateur coloré parmi ceux présentés ci-dessous :

Indicateur coloré acidobasique HInd/Ind ⁻	Zone de virage
Bleu de bromothymol	6,0 – 7,6
Rouge de phénol	6,8 – 8,4
Hélianthine	2,4 – 4,4

11. Établir l'équation de la transformation chimique modélisant la réaction de dosage entre l'acide lactique HA et les ions hydroxydes $\text{HO}^-(\text{aq})$.
12. Proposer, en justifiant, un indicateur coloré adapté au dosage colorimétrique de l'acide lactique, acide faible en solution aqueuse, sachant que le pH à l'équivalence vaut 8,1.
13. Expliquer la raison pour laquelle on n'introduit que quelques gouttes d'indicateur coloré lors d'un dosage.

La valeur expérimentale obtenue pour le volume équivalent V_B a permis de déterminer une concentration molaire en acide lactique présent dans le lait étudié : $C_A = 1,8 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

14. Montrer que le lait dosé est frais en détaillant la démarche.

II. LES FERMENTATIONS DANS L'ÉLABORATION DES FROMAGES (14 points)

Les questions 1 à 12 peuvent être traitées indépendamment les unes des autres.

Les fermentations résultent de l'action de micro-organismes sur certains composés organiques.

Les phénomènes de fermentation sont mis à profit pour conserver certains aliments et en transformer d'autres en améliorant leurs qualités nutritionnelles ou organoleptiques.

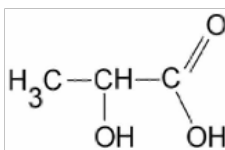
De très nombreux aliments fermentés existent actuellement parmi lesquels les fromages.

On distingue plusieurs types de fermentation pouvant intervenir dans l'élaboration des fromages.

Données :

Numéros atomiques : $Z(\text{H}) = 1$ $Z(\text{C}) = 6$ $Z(\text{O}) = 8$

Formule de l'acide lactique :



A. La fermentation lactique

La fermentation lactique intervient dès le caillage du lait, première étape de la fabrication des fromages.

Cette fermentation consiste en l'obtention d'acide lactique au sein du caillé, par l'action de bactéries lactiques (telles que *Lactococcus lactis*) sur le glucose présent dans le lait après hydrolyse du lactose.

1. Représenter par un schéma de Lewis la molécule d'acide lactique en faisant apparaître tous les doublets liants et non-liants.
2. Identifier, en s'appuyant sur la théorie VSEPR, le type AX_nE_m et le nom de la géométrie autour de l'atome de carbone du groupe fonctionnel -COOH et ceux autour de l'atome de carbone relié au groupe fonctionnel -OH .
3. Nommer les deux fonctions chimiques présentes dans la molécule d'acide lactique.
4. Définir un carbone asymétrique, puis identifier par un astérisque le(s) carbone(s) asymétrique(s) de la molécule d'acide lactique, après avoir recopié sa formule.
5. Représenter par une projection de Cram, l'énantiomère de configuration absolue S de l'acide lactique, en numérotant les différents atomes ou groupes d'atomes en fonction de leur priorité.
6. Représenter, en projection de Fischer, l'énantiomère (L)-acide lactique qui correspond à l'énantiomère de configuration absolue S, seul énantiomère obtenu par fermentation lactique.

B. La fermentation butyrique

L'acide lactique formé par fermentation lactique subit une fermentation butyrique sous l'action de bactéries butyriques (telles que *Clostridium butyricum*). Il se forme de l'acide butanoïque, du dioxyde de carbone gazeux et du dihydrogène gazeux.

L'acide butanoïque est responsable de la forte odeur et du goût piquant de certains fromages à pâtes pressées (tels que le saint-nectaire).

7. Représenter la formule semi-développée de la molécule d'acide butanoïque.
8. Attribuer en justifiant, à l'aide du document **annexe 2**, les deux bandes, apparaissant respectivement à environ 1700 cm^{-1} pour l'une et aux alentours de 3100 cm^{-1} .

C. De la découverte de l'acide lactique à la synthèse de l'acide lactique par voie chimique

L'acide lactique est l'élément principal de tous les produits laitiers acidifiés auxquels il donne leurs caractéristiques fondamentales. Il fut mis en évidence pour la première fois dans le lait par le chimiste suédois Carl Wilhelm Scheele en 1870.

De nos jours, 90 % des synthèses d'acide lactique sont réalisées à partir de fermentations microbiennes, les 10 % restants sont produits synthétiquement par voie chimique.

Une méthode de préparation de l'acide lactique par voie chimique est basée sur l'hydratation de l'acide prop-2-énoïque dont le mécanisme réactionnel s'écrit en trois étapes.

Ces différentes étapes sont représentées en **annexe 3**.

9. Pour chaque étape, compléter le mécanisme à l'aide d'une flèche courbe.
10. Justifier le fait que les ions H^+ jouent un rôle de catalyseur dans cette réaction.
11. Caractériser la réaction chimique d'hydratation de l'acide prop-2-énoïque en utilisant l'un des termes suivants : addition, élimination, substitution.
12. Préciser la nature de la réaction chimique d'hydratation de l'acide prop-2-énoïque en utilisant l'un des termes suivants : électrophile, nucléophile, radicalaire.

III. OBSERVATION DES SPORES DU PENICILLIUM ROQUEFORTI PENDANT LA PHASE DE MATURATION DU ROQUEFORT (11 points)

Les trois parties A, B, C peuvent être traitées indépendamment les unes des autres.

Dès l'obtention du caillé, l'ensemencement en *Penicillium roqueforti* s'effectue avec des souches propres à chaque fabricant de roquefort.

En se développant pendant la période d'affinage, ce champignon microscopique donne aux veines du roquefort sa couleur bleu-vert mais aussi son goût et son onctuosité.

L'affinage se prolonge par une phase de maturation contrôlée. C'est là qu'entre en jeu le savoir-faire du maître de cave qui contrôle le développement du *Penicillium roqueforti* dans le roquefort.

D'après : www.quiveutdufromage.com/ac-comment-est-fabrique-le-roquefort

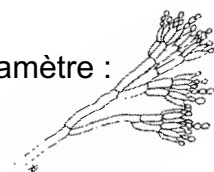
Données :

Taille de la spore de *Penicillium roqueforti* à observer, assimilée à son diamètre :

$AB = 5,0 \mu m$

Distance minimale de vision distincte pour un œil normal : $d_m = 25 \text{ cm}$

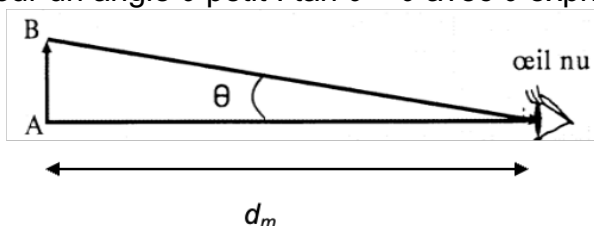
Pouvoir de résolution de l'œil : $\theta_m = 3,0 \times 10^{-4} \text{ rad}$



A. Observation à l'œil nu et pouvoir de résolution de l'œil

1. Déterminer l'angle θ sous lequel on pourrait voir à l'œil nu la spore AB de *Penicillium roqueforti* située à la distance minimale de vision distincte d_m de l'œil.

On rappelle que pour un angle θ petit : $\tan \theta \approx \theta$ avec θ exprimé en radian.



2. Conclure quant à la possibilité de pouvoir observer, ou non, la spore de *Penicillium roqueforti* à l'œil nu.

B. Utilisation d'un microscope

Document : Pouvoir de résolution d'un microscope

Le pouvoir de résolution d'un microscope est limité par le phénomène de diffraction et la taille $AB_{\min}$ du plus petit objet observable est donnée par la relation :

$$AB_{\min} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin u}$$

λ : longueur d'onde de la lumière utilisée (en mètre ou sous-multiple)
 n : indice de réfraction du milieu d'observation (sans unité)
 u : angle entre l'axe optique et le rayon le plus écarté de l'axe optique entrant dans l'objectif (sin u sans unité)

- Calculer la taille $AB_{\min}$ pour un objet placé dans l'air d'indice de réfraction $n = 1,0$ sachant que, pour le microscope utilisé, $\lambda = 600 \text{ nm}$ et $u = 40^\circ$.
- Déduire de la valeur $AB_{\min}$ si l'observation d'objets, de la taille de la spore AB de *Penicillium roqueforti*, est possible à travers le microscope utilisé.

C. Observation de la spore de *Penicillium roqueforti* au microscope

Document : Caractéristiques du microscope utilisé

Le microscope utilisé est constitué :

- d'un objectif L_1 considéré comme une lentille mince convergente de centre optique O_1 , de foyer objet F_1 , de foyer image F'_1 et de distance focale $f'_1 = + 5,0 \text{ mm}$,
- d'un oculaire L_2 considéré comme une lentille mince convergente de centre optique O_2 , de foyer objet F_2 , de foyer image F'_2 et de distance focale $f'_2 = + 2,0 \text{ cm}$.

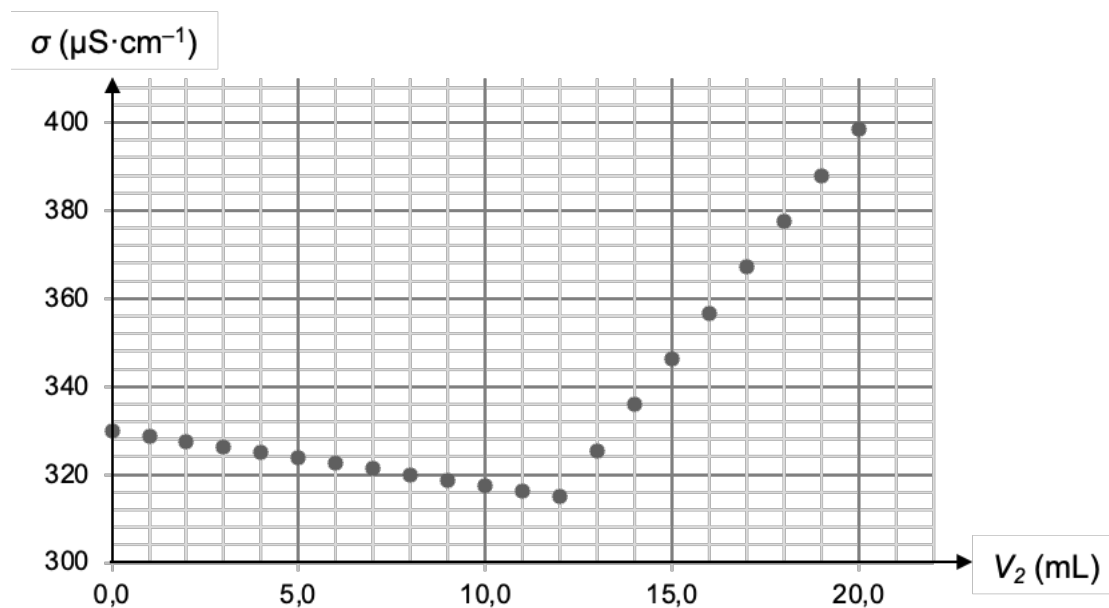
L'intervalle optique du microscope a pour valeur : $\Delta = \overline{F'_1 F_2} = 18 \text{ cm}$.

Le grossissement commercial du microscope est donné par la relation : $G_c = \frac{\Delta}{4 \cdot f'_1 \cdot f'_2}$

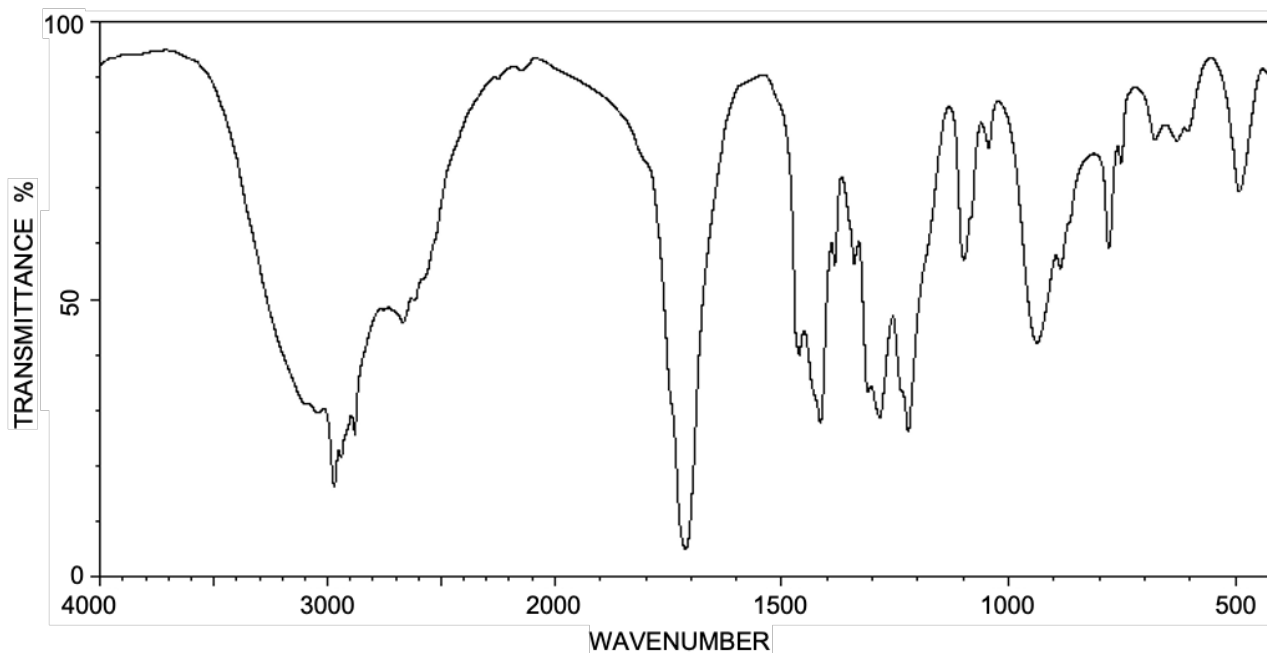
- Indiquer où doit se former l'image intermédiaire A_1B_1 , de la spore AB, donnée par l'objectif L_1 , pour qu'un observateur puisse utiliser le microscope sans accommodation (c'est-à-dire pour que l'œil puisse observer l'image définitive $A'B'$, donnée par le microscope, à l'infini).
- Compléter le schéma, **sans soucis d'échelle**, fourni en **annexe 4** en faisant apparaître :
 - la marche des rayons lumineux permettant l'obtention de l'image intermédiaire A_1B_1 ;
 - les foyers objet F_2 et image F'_2 ;
 - l'image définitive $A'B'$;
 - l'angle θ' sous lequel on observe la spore *Penicillium roqueforti* à travers le microscope.
- Calculer la valeur du grossissement commercial G_c du microscope.
- Exprimer la relation entre le grossissement commercial du microscope G_c , l'angle θ' sous lequel on voit la spore de *Penicillium roqueforti* à travers le microscope et l'angle θ sous lequel on pourrait voir à l'œil nu la spore de *Penicillium roqueforti* située à la distance minimale de vision distincte d_m de l'œil.
- En déduire que l'angle θ' a pour valeur $9,0 \times 10^{-3} \text{ rad}$ sachant que $\theta = 2,0 \times 10^{-5} \text{ rad}$.
- Déduire, en comparant θ' au pouvoir de résolution de l'œil θ_m , si la spore AB de *Penicillium roqueforti* est observable, par l'œil de l'observateur, à travers le microscope utilisé.

ANNEXE 1

Évolution de la conductivité σ en fonction du volume V_2 de solution de nitrate d'argent versé lors du dosage conductimétrique des ions chlorure dans la solution aqueuse de lait dilué

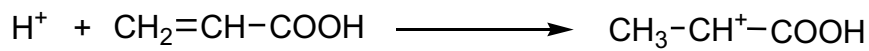
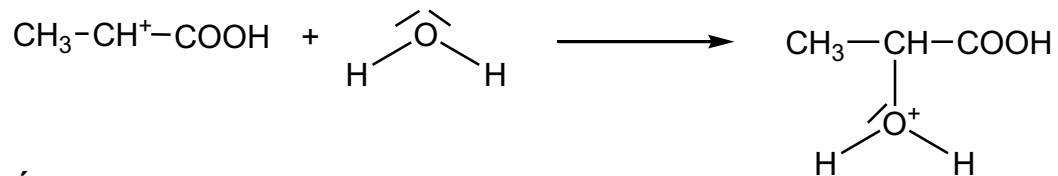
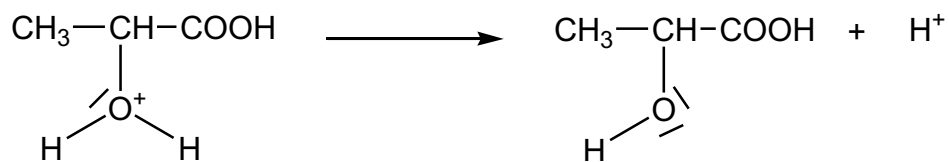
**ANNEXE 2**

Spectre infra-rouge de l'acide butanoïque



Document : Table simplifiée de vibrations de quelques liaisons en spectrophotométrie infra-rouge

Liaison	O-H	N-H	C=O	C=C
Nombre d'onde (cm^{-1})	2900 à 3650	3100 à 3500	1650 à 1750	1620 à 1690

ANNEXE 3**Mécanisme de l'hydratation de l'acide prop-2-énoïque****Étape n°1****Étape n°2****Étape n°3****ANNEXE 4****Schéma de principe du microscope sans soucis d'échelle**

2022 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Durée : 2 h – coefficient 1

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

Capacités évaluées :

Maitrise des connaissances scientifiques et techniques	4 points
Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	6 points
Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	6 points
Pertinence et cohérence des solutions proposées	2 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2 points

Stratégie de production de la protéine NS5 du virus de la Dengue par le système Gateway®

Le virus de la Dengue (DENV) peut provoquer une fièvre bénigne, qui ne présente pas de réel danger, mais également des fièvres hémorragiques qui peuvent être fatales. On lui attribue 100 millions de cas de fièvre de bénigne et 500 000 cas de fièvres hémorragiques chaque année. Le virus de la Dengue sévit dans les régions subtropicales, il est transmis par les moustiques.

Il appartient à la famille des *Flaviviridae* dont le génome contient en particulier un gène codant la protéine NS5. Cette protéine est une cible potentielle pour un traitement efficace anti-viral.

Un travail préalable de clonage et d'expression du cadre ouvert de lecture de la protéine NS5 est réalisé par le système Gateway®.

1. Obtention de la séquence codant la protéine NS5

Le génome du virus de la Dengue décrit dans le **document 1** se présente sous forme d'un ARN positif simple brin d'environ 11 kb. Le cadre ouvert de lecture (ORF, Open Reading Frame) de la protéine NS5 est obtenu par RT-PCR, à partir de l'ARN viral, selon le protocole fourni dans le **document 2**.

- 1.1. Identifier les trois grandes étapes du protocole de préparation de l'ADNc double brin NS5.
- 1.2. Citer les trois types d'amorces généralement utilisées pour la transcription inverse (RT). Parmi ces trois types d'amorces, identifier celle qui est utilisée pour réaliser la transcription inverse de la séquence NS5. La positionner orientée sur une représentation légendée du génome viral.

Dans le cadre d'une PCR optimisée, on privilégie autant que possible l'utilisation d'amorces ayant une T_m comprise entre 55 °C et 60°C. Les séquences des amorces pour cette PCR sont déterminées par le logiciel Primer3. Les propriétés de chaque couple d'amorces sont vérifiées par ce système d'analyse en ligne.

Le **document 3** présente certaines caractéristiques du gène NS5 ainsi que les propriétés du couple d'amorces pré-sélectionné.

- 1.3. À partir de l'extrait de la fiche GenBank, identifier les informations nécessaires au calcul de la taille du cadre ouvert de lecture NS5. Préciser la fonction de la protéine NS5 dans le cycle viral.
- 1.4. Indiquer trois critères de choix des amorces pour une PCR.

- 1.5. Proposer une définition de « T_m » puis expliquer la conséquence possible de l'utilisation d'un couple d'amorce de T_m inférieure à 45 °C.
- 1.6 Expliquer les résultats de l'analyse informatique du couple d'amorces pré-sélectionné, qui apparaissent en gras dans le tableau.

2. Construction du vecteur d'entrée du système Gateway®

Le système de clonage Gateway® a été adapté à partir des mécanismes d'intégration et d'excision du phage λ dans *Escherichia coli*. Présenté dans les **documents 4 et 5**, le principe du clonage par le système Gateway® comporte trois étapes :

- a. La production de l'insert à cloner par PCR d'assemblage. Elle vise à ajouter à l'ORF codant la protéine NS5 les éléments suivants :
 - les 2 sites de recombinaison spécifique, attB1 et attB2,
 - la séquence nucléotidique codant le site de clivage par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus),
 - une étiquette nommée Tag-S.
- b. La construction du vecteur d'entrée
Les amplicons de PCR, encadrés par les sites attB, sont clonés dans le vecteur donneur pDONR221 (Invitrogen) possédant les sites attP1 et attP2. Le vecteur obtenu est appelé « *Entry vector* » et porte le gène de résistance à la kanamycine (Kan^R), les sites de recombinaison spécifique attL1 et attL2 et l'ORF NS5.
- c. Le transfert de l'ORF NS5 vers le vecteur de destination (« *Destination vector* »), réalisé *in vitro*, conduisant à la création du vecteur d'expression (« *Expression vector* »)

La stratégie de PCR d'assemblage réalisée dans cette étude est décrite dans le **document 5**.

- 2.1. Schématiser avec leurs différents éléments, les amplicons obtenus à l'issue de la première PCR et ceux obtenus à l'issue de la deuxième PCR.

La solution d'ADN ainsi obtenue est utilisée pour transformer par choc thermique des bactéries *E.coli* chimiocompétentes.

- 2.2. Exposer les principales étapes du principe d'obtention de bactéries chimiocompétentes. Présenter le principe de la technique de transformation utilisée.

La réaction d'intégration / excision schématisée dans la deuxième étape du **document 4** n'est pas efficace à 100 %. De ce fait, les quatre vecteurs peuvent coexister dans la solution d'ADN utilisée pour transformer les bactéries.

- 2.3. Préciser les caractéristiques phénotypiques obligatoires de la souche bactérienne hôte permettant de sélectionner les clones transformés.
- 2.4. Montrer que l'addition d'ampicilline dans le milieu de culture permet de sélectionner uniquement les clones ayant incorporé le vecteur noté « *Expression vector* ».

3. Production de la protéine NS5

L'ORF NS5, a été clonée dans le vecteur de destination, pDEST17 (Invitrogen©) permettant la synthèse de la protéine NS5 sous le contrôle du promoteur T7. La carte de ce vecteur est présentée dans le **document 6**.

Le vecteur recombiné, «*Expression vector*», pDEST17-NS5 est introduit par électroporation dans une souche d'*E. coli* produisant l'ARN polymérase T7.

- 3.1. Schématiser la carte du vecteur recombiné pDEST17-NS5 avec l'insert obtenu par la PCR2.
- 3.2. Indiquer les séquences de ce vecteur nécessaires d'une part à la transcription et d'autre part à la traduction de la protéine NS5 recombinante. Préciser le rôle de chacune d'entre elles.
- 3.3. Représenter et orienter la protéine NS5 recombinante en faisant apparaître les différents éléments la constituant.

La protéine NS5, dont le poids moléculaire est proche de 100 kDa, est produite puis purifiée par chromatographie *Immobilized Metallic Affinity Chromatography* (IMAC). Le **document 7** montre le suivi de la purification de la protéine NS5 par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

- 3.4. Préciser quel élément de la protéine recombinante est mis en jeu dans cette purification par chromatographie.
- 3.5. Analyser le gel obtenu, expliquer les résultats sur chacune des pistes et conclure quant à la qualité de la purification.

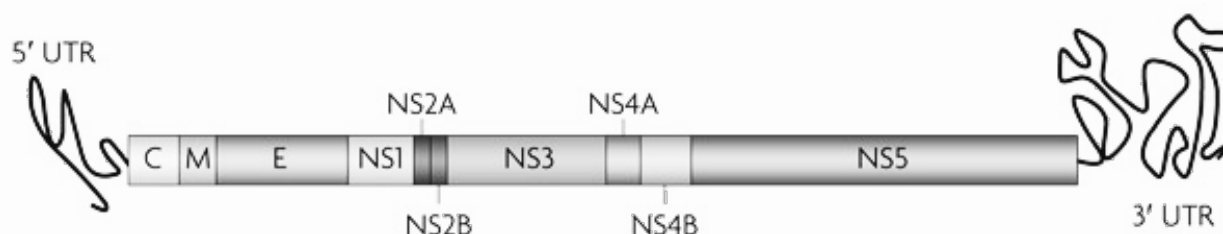
La protéine recombinante NS5 contient le site de clivage par la protéase TEV.

- 3.6. Préciser l'intérêt d'avoir introduit ce site lors de la construction de l'insert.

Document 1 : Organisation générale du génome du virus de la Dengue

Le génome du virus, sous la forme d'un ARN positif simple brin d'environ 11 kb, code :

- 3 protéines structurales : la protéine E (pour Enveloppe), la protéine M (pour Membrane) et la protéine C (pour Capside)
- 5 protéines non-structurales : NS1, NS2, NS3, NS4 et NS5.



« UTR » : UnTRAnslated

Guzman, M. G. et al., Dengue: A continuing global threat. 2010. Nature Reviews Microbiology; 8, S7–S16

Document 2 : Protocole de préparation de l'ADNc NS5 à partir de surnageant de cellules Vero infectées par le virus de la dengue et lysées

The sample, culture supernatant, was then incubated at 80°C for 10 min and 550 µL of guanidium lysis buffer was added. The RNA was separated from other components using 700 µL of acid phenol: chloroform and spinning at 13,000 rpm for 15 min. The aqueous phase was transferred to a fresh tube and one volume of isopropanol was added and the sample was incubated at – 20 °C for 3 hours. The sample was then centrifuged at 13,000 rpm at – 4 °C for 30 min. The supernatant was removed and the pellet was dried out after washing with 75 % ethanol. The RNA was resuspended in 20 µL of RNA storage solution and stored at – 80 °C until used.

Reverse transcription (RT) reactions were performed in 30 µL, containing 6 µL of RT buffer, 2 µL of 0.1 M dithiothreitol, 2.5 µL of 2.5 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP; final concentration, 200 mM), 1 µL of RNase inhibitor, 10 µL of RNA template, 2.5 µL of **NS5 reverse primer** (10 mM; final concentration, 0.75 mM) and 5 µL of ultrapure DEPC-pretreated water. Each sample was boiled for 5 min and cooled on wet ice. One microliter of Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase was added. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 1 h and at 95 °C for 10 min.

The PCRs were performed in 40 µL containing 4 µL of Taq buffer X10, 4 µL of 50 mM MgCl₂ (final concentration, 5 mM), 4 µL of 2 mM dNTP (final concentration, 200 µM), 2 µL of 200 pM **NS5 reverse primer** (final concentration, 10 pM), and 2 µL of 200 pM NS5 sense primer (final concentration, 10 pM), 2 µL of Taq DNA polymerase, and 22 µL of ultrapure DEPC-pretreated H₂O. Then, 5 µL of RT products was added. The PCR thermal cycling incubations used were performed as follows: amplification with primers with 35 cycles of incubation at 94, 45, and 72 °C for 1 min each.

D'après : Julu Bhatnagar et al., Molecular Detection and Typing of Dengue Viruses from archived Tissues of Fatal Cases by RT-PCR and Sequencing: Diagnostic and Epidemiologic Implications. 2012. Am. J. Trop. Med. Hyg., 86(2), 2012, pp. 335–340.

Document 3 : Design d'amorces à partir de la séquence NS5**Extrait de la fiche GenBank du gène NS5**

```

/gene="flavivirus polyprotein gene"
/locus_tag="DENV_gp1"
/product="RNA-dependent RNA polymerase NS5"
        nonstructural protein NS5"
/ORF_location= "7474..10173"
/protein_id="NP_739590.2"
/db_xref="GI:159024820"
/db_xref="VBRC:35929

```

D'après :
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001474.2?report=genbank&from=97&to=10272
 [consulté le 08/12/21]

Propriétés du couple d'amorces pré-sélectionné**PCR Primer Stats results**

Global settings:

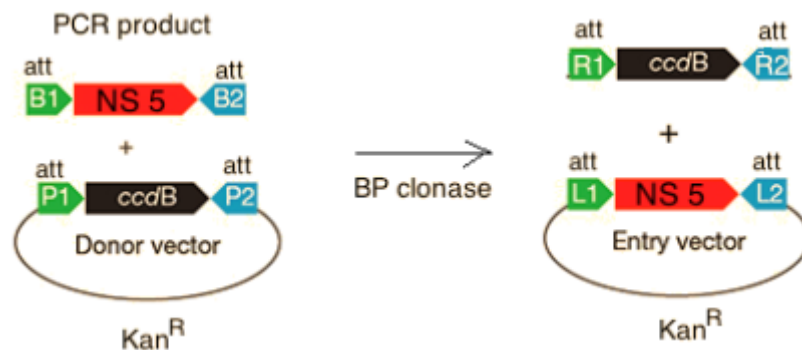
- The primers do not have a 5'-phosphate group.
- Combined concentration of K⁺ and Na⁺ in the reaction = 50 millimolar.
- Mg²⁺ concentration in the reaction = 1.5 millimolar.
- Primer concentration in the reaction = 200 nanomolar.

NS5 sense primer	NS5 reverse primer
<u>General properties:</u> Primer name: Left Primer sequence: TCTATTATGAAGAACACAAC Sequence length: 20 Base counts: G=2; A=9; T=5; C=4; GC content (%): 30.00 Molecular weight (Daltons): 6093.07 Basic Tm (degrees C): 44 Salt adjusted Tm (degrees C): 38 Nearest neighbor Tm (degrees C): 53.21 <u>PCR suitability tests (Pass / Warning):</u> Single base runs: Pass Dinucleotide base runs: Pass Length: Pass Percent GC: Warning Tm (Nearest neighbor): Warning GC clamp: Pass Self-annealing: Pass Hairpin formation: Pass	<u>General properties:</u> Primer name: Right Primer sequence: CTACCACAGAACTCCT Sequence length: 16 Base counts: G=1; A=5; T=3; C=7; GC content (%): 50.00 Molecular weight (Daltons): 4770.16 Basic Tm (degrees C): 43 Salt adjusted Tm (degrees C): 38 Nearest neighbor Tm (degrees C): 53.78 <u>PCR suitability tests (Pass / Warning):</u> Single base runs: Pass Dinucleotide base runs: Pass Length: Pass Percent GC: Pass Tm (Nearest neighbor): Warning GC clamp: Pass Self-annealing: Pass Hairpin formation: Pass

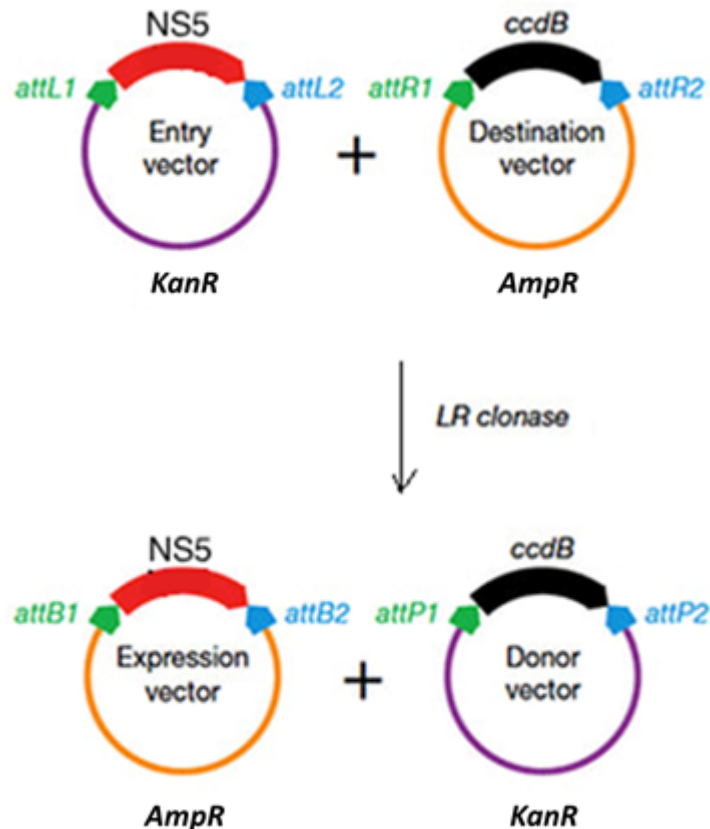
Source personnelle de l'auteur

Document 4 : Système Gateway®

Première étape : Insertion du produit de PCR dans le vecteur donneur pour constituer le vecteur d'entrée.



Deuxième étape : Transfert du gène d'intérêt dans le vecteur destination pour constituer le vecteur d'expression.



ccdB : Gène codant une toxine qui est létale pour la cellule qui la produit.

AmpR : Gène conférant une résistance à l'ampicilline.

KanR : Gène conférant une résistance à la kanamycine.

attB1, *attB2*, *attL1*, *attL2*, *attP1*, *attP2*, *attR1*, *attR2*: sites spécifiques de recombinaison

D'après : <http://smolkelab.weebly.com/gateway-cloning.html> [consulté le 08/12/21]

D'après : Simon J Unterholzner, et al., Toxin–antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mob Genet Elements*, 2013; 3(5)

Document 5 : Stratégie et séquences des amorces utilisées en PCR d'assemblage pour la construction de l'insert NS5

La première PCR (PCR1) fait intervenir :

- une amorce sens spécifique du gène NS5 portant la séquence codant le site de clivage TEV et la partie 3' du site attB1 (attB1partiel),
- une amorce anti-sens complémentaire de la fin du gène NS5 portant la séquence de l'étiquette Tag-S.

La seconde PCR (PCR2) utilise :

- une amorce sens portant la partie 5' du site attB1 et la séquence codant le site de clivage TEV,
- une amorce anti-sens portant le site de reconnaissance attB2 et la séquence Tag-S.

La séquence des amorces utilisées est reportée dans le tableau ci-dessous.

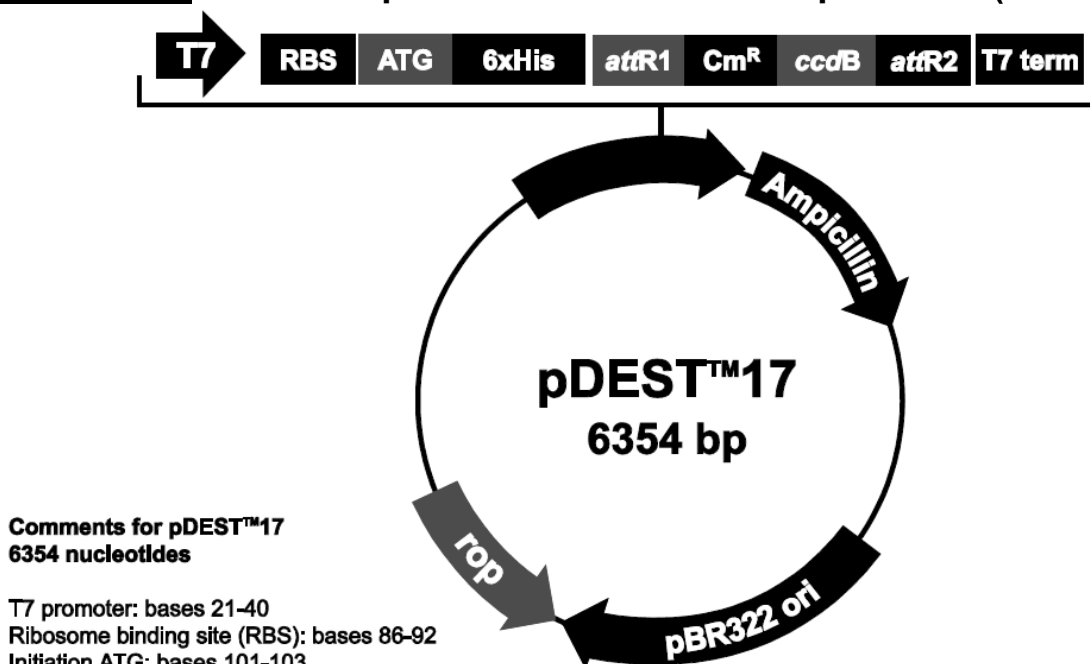
PCR	Séquences
PCR1	amorce sens (S) PCR1 : attB1partiel-<u>TEV</u>- NS5 5'- GGCTTC <u>GAGAATCTTTATTTTCAGGGC</u> -(NS5 specific sequence)-3'
	amorce anti-sens (AS) PCR1 : TagS- NS5 5'- <u>CTTAACTGTCCATGTGCTGGCGTTCGAA</u> -(NS5 specific sequence)-3'
PCR2	amorce sens (S) PCR2 : attB1-<u>TEV</u> 5'- GGGGGGGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>GAGAATCTTTATTTCAGGGC</u> -3'
	amorce anti-sens (AS) PCR2 : attB2-<u>TagS</u> 5'- GGGGGGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC <u>CTTAACTGTCCATGTGCTGGCGTTCGAA</u> -3'

Légende :

Amorces sens (S) et anti-sens (AS) utilisées pour les PCR d'assemblage.

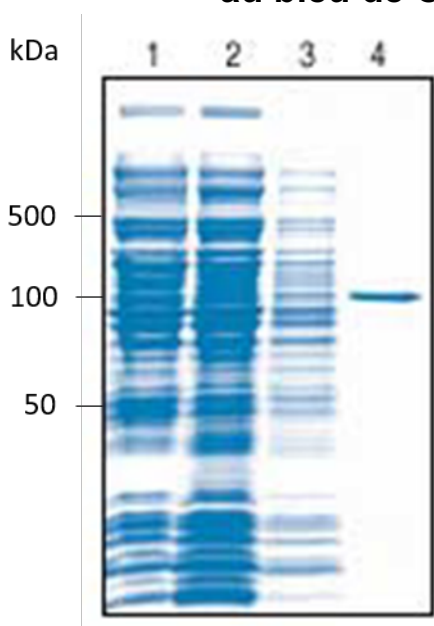
Les oligonucléotides qui apparaissent en gras correspondent au site de recombinaison attB1, ou attB2 (complet ou partiel) et ceux soulignés correspondent au site de clivage par la TEV ou au Tag-S.

D'après : Sandrine Braud et al., J. Proteome Res., 2005, 4 (6), pp 2137–2147
Dual Expression System Suitable for High-Throughput Fluorescence-Based Screening and Production of Soluble Proteins.

Document 6 : Carte du plasmide de destination pDEST17 (Invitrogen®)**Comments for pDEST™17
6354 nucleotides**

T7 promoter: bases 21-40
 Ribosome binding site (RBS): bases 86-92
 Initiation ATG: bases 101-103
 6xHis tag: bases 113-130
 attR1: bases 140-264
 Chloramphenicol resistance gene (Cm^R): bases 373-1032
 ccdB gene: bases 1374-1679
 attR2: bases 1720-1844
 T7 transcription termination region: bases 1855-1983
 bla promoter: bases 2471-2569
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2570-3430
 pBR322 origin: bases 3575-4248
 ROP ORF: bases 4619-4810 (C)
 C=complementary strand

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2Fvectors%2FpDEST17_map.pdf

Document 7 : Suivi de la purification de NS5 sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie

Un extrait bactérien brut, après induction de l'expression de la protéine recombinante, a été chargé sur une colonne contenant des ions nickel divalents (Ni²⁺) immobilisés sur des billes de cellulose.

Après une étape de lavage, la protéine retenue est éluée par un gradient d'imidazole.

À chaque étape de la purification un échantillon a été conservé pour l'analyse sur gel :

1. Lysat brut de bactéries transformées par le plasmide pDEST17-NS5
2. Fraction non retenue
3. Lavage
4. Éluat

D'après : <http://www.123bio.net/cours/chromato/ex17.html> [consulté le 08/12/21]

2022 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée : 2 h – coefficient 1

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

Capacités évaluées :

Maîtrise des connaissances scientifiques et techniques	4 points
Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	4 points
Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	6 points
Pertinence et cohérence des solutions proposées	4 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2 points

Étude des interactions entre la protéine Spike du virus SARS-CoV2 et le récepteur cellulaire ACE2

Le SARS-CoV-2 est le septième coronavirus pathogène pour l'être humain. Il est responsable de la maladie "COronaVirus Disease 2019" (Covid-19), induisant un syndrome respiratoire aigu sévère. La recherche se mobilise pour améliorer les connaissances sur ce virus et pour développer de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques permettant de lutter contre la maladie.

Avertissement

Le document ressource en **annexe 1**, page 5 « Caractéristiques chimiques des 20 acides aminés constitutifs des protéines » est utile pour traiter plusieurs questions du sujet.

1. Étude des partenaires moléculaires favorisant l'entrée du virus dans la cellule hôte

Une protéine de l'enveloppe du SARS-CoV-2, la protéine Spike, a la capacité de s'associer au récepteur ACE2, protéine présente en abondance à la surface des cellules du tractus respiratoire humain. Le **document 1** présente la structure et le rôle des molécules mises en jeu pour l'entrée du virus dans la cellule hôte.

1.1. Expliquer les trois notions en gras-souligné dans le texte du **document 1**.

La forte infectiosité du SARS-Cov-2 est notamment due à sa capacité à utiliser deux protéases cellulaires, la furine et la TMPRSS2 (TransMembrane PRotease Serine 2). L'activité de ces deux protéases déclenche la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule hôte. Le **document 2** présente les deux étapes de la protéolyse de la protéine Spike, catalysée par ces enzymes.

1.2. Écrire l'équation de la réaction catalysée par la furine :

- en restreignant la représentation de son substrat à deux résidus d'acides aminés de part et d'autre du site de coupure,
- en utilisant la formule semi-développée, non chargée.

Pour limiter la progression du virus dans l'organisme infecté, des équipes de recherche se sont penchées sur des moyens d'inhiber l'enzyme cellulaire furine dans les premiers stades de l'infection. La vitesse initiale de la réaction catalysée par cette enzyme est mesurée à l'aide du kit présenté dans le **document 3**.

- 1.3. Argumenter le choix de la longueur d'onde de travail (370 nm) utilisée pour mesurer l'activité de la furine.
- 1.4. Déterminer la vitesse initiale de la réaction catalysée par la furine contenue dans un lysat cellulaire, à partir des résultats expérimentaux obtenus. La valeur de la vitesse initiale doit être exprimée en $\text{nanomol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{MR}}$.

Le diminazène apparaît comme molécule candidate pour bloquer l'activité de la furine cellulaire dans les premières phases de l'infection. Le **document 4** présente les résultats obtenus lors de la détermination des constantes cinétiques K_M et v_{max} de la furine, pour le substrat Arg-Arg-Ala-Arg-MCA, avec ou sans diminazène.

- 1.5. Analyser ces résultats, pour déduire le caractère compétitif ou non compétitif du diminazène vis-à-vis de la furine. Expliquer le mode d'action de ce type d'inhibiteur sur une enzyme.

2. Étude de l'association Spike-ACE2

Les protéines Spike et ACE2 interagissent au niveau du domaine RBD de Spike et de l'hélice N-terminale (hNT) de ACE2.

Production des protéines Spike et ACE2 et vérification de leur association *in vitro*

Une séquence peptidique de 150 kDa, nommée « Spike* », recouvrant largement le domaine RBD de la protéine Spike, est produite par transfection de cellules en culture. De même, une séquence peptidique de 80 kDa, nommée « ACE2* », recouvrant largement l'hélice N-terminale du récepteur ACE2, est produite par transfection.

Pour vérifier l'interaction entre Spike* et ACE2*, ces deux protéines sont mélangées en concentrations équivalentes puis incubées 8 heures à 6°C. Le mélange résultant de l'incubation est traité par chromatographie d'exclusion afin de séparer le complexe « ACE2*-Spike* » des molécules libres ACE2* et Spike*.

Les résultats sont présentés dans le **document 5**. Chacune des fractions correspondant aux pics obtenus sur le chromatogramme « $A_{280 \text{ nm}} = f(V_{\text{élution}})$ » est analysée par SDS-PAGE.

- 2.1. Argumenter l'affirmation suivante à partir du principe des deux techniques mises en œuvre : « Les interactions faibles impliquées dans l'association entre protéines sont maintenues en chromatographie d'exclusion (gel filtration) alors qu'elles sont rompues en SDS-PAGE ».
- 2.2. Analyser le résultat du SDS-PAGE pour déduire le contenu en protéines des fractions correspondant à chacun des pics I, II et III. Conclure sur la capacité de Spike* et ACE2* à s'associer entre elles.
- 2.3. Expliquer le choix de la valeur de 280 nm comme longueur d'onde de suivi de l'élution des protéines.
- 2.4. Montrer que l'ordre d'élution des molécules est cohérent avec le principe de la chromatographie d'exclusion.

Étude des interactions faibles impliquées dans l'association Spike-ACE2

Le virus SARS-CoV-2 s'est révélé beaucoup plus virulent que le virus SARS-CoV dont il dérive. Une étude comparative entre ces deux virus a été menée au niveau des interactions faibles établies dans la reconnaissance entre Spike et ACE2.

Le **document 6** expose un exemple d'interaction faible établie entre ACE2 et Spike, dans le cas du virus SARS-CoV-2, et absente dans le cas du virus SARS-CoV. Elle met en jeu un résidu d'acide aminé Acide aspartique (D) et un résidu d'acide aminé lysine (K).

- 2.5. Représenter l'état d'ionisation de la chaîne latérale des acides aminés D et K, au pH physiologique du milieu intérieur (7,4). Argumenter la réponse.
- 2.6. En déduire le type d'interaction faible mise en jeu entre le résidu D30 de ACE2 et le résidu K417 de Spike, dans le cas du virus SARS-CoV-2. Argumenter la réponse.
- 2.7. Expliquer pourquoi ce type d'interaction n'est pas possible entre ACE2 et Spike dans le cas du virus SARS-CoV.

3. Recherche d'un anticorps neutralisant l'association Spike-ACE2

La mise au point d'un médicament empêchant l'interaction entre Spike et ACE2 est une piste très étudiée pour traiter les patients atteints de la maladie.

Le kit « SARS-CoV-2 S1/ACE2 binding » permet de tester l'efficacité de différents anticorps candidats, dirigés contre le domaine S1 de Spike. Ce test, présenté dans le **document 7**, repose sur le principe du *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET).

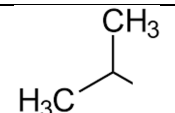
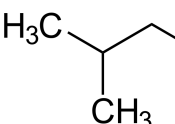
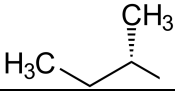
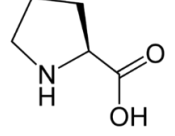
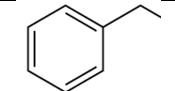
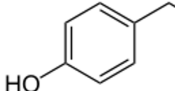
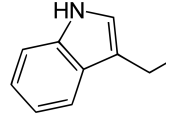
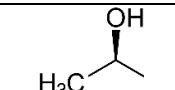
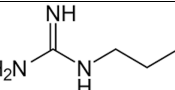
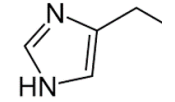
- 3.1. Schématiser le positionnement entre ACE2-Eu et S1-d2 :
 - en absence d'anticorps, en faisant apparaître le transfert d'énergie entre ces deux molécules.
 - en présence d'anticorps neutralisants.
- 3.2. Démontrer, à partir des schémas précédents :
 - que $IF_{665\text{ nm}}$ est élevée en absence d'anticorps neutralisant
 - que $IF_{620\text{ nm}}$ est élevée en présence d'anticorps neutralisant.

En déduire que le rapport « $IF_{665\text{ nm}} / IF_{620\text{ nm}}$ » permet de suivre la quantité de complexe ACE2-Eu_S1-d2 formé.

Le **document 7** présente également la procédure opératoire et les résultats expérimentaux obtenus pour tester l'efficacité de deux anticorps, Ac1 et Ac2, dirigés contre S1.

- 3.3. Expliquer l'intérêt d'effectuer des dilutions de l'anticorps neutralisant lors de l'étape 1 de la procédure opératoire. Préciser la concentration en anticorps pour le point expérimental marqué d'une croix sur le graphique.
- 3.4. À partir des résultats expérimentaux fournis, démontrer que l'anticorps Ac2 est le plus efficace pour neutraliser l'association S1-ACE2.

Annexe 1 Caractéristiques chimiques des 20 acides aminés constitutifs des protéines

Catégorie	Acide aminé	Chaîne latérale	Codes 3 lettres / 1 lettre	pKa ₁ α COOH	pKa ₂ α NH ₂	pKa chaîne latérale
Aliphatiques	Glycine	H -	Gly / G	2,4	9,8	-
	Alanine	CH ₃ -	Ala / A	2,4	9,9	-
	Valine		Val / V	2,3	9,7	-
	Leucine		Leu / L	2,3	9,7	-
	Isoleucine		Ile / I	2,3	9,8	-
Amine secondaire	Proline	 Formule complète	Pro / P	2,0	10,6	-
Aromatiques	Phénylalanine		Phe / F	2,2	9,3	-
	Tyrosine		Tyr / Y	2,3	9,2	10,5
	Tryptophane		Trp / W	2,5	9,4	-
Hydroxylés	Sérine	HO-CH ₂ -	Ser / S	2,2	9,2	-
	Thréonine		Thr / T	2,1	9,1	-
Soufrés	Cystéine	HS-CH ₂ -	Cys / C	1,9	10,7	8,4
	Méthionine	CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -	Met / M	2,1	9,3	-
Basiques	Lysine	NH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	Lys / K	2,2	9,1	10,5
	Arginine		Arg / R	1,8	9,0	12,5
	Histidine		His / H	1,8	9,3	6,0
Acides carboxyliques	Acide aspartique	COOH-CH ₂ -	Asp / D	2,0	9,9	3,9
	Acide glutamique	COOH-CH ₂ -CH ₂ -	Glu / E	2,1	9,5	4,1
Amides	Asparagine	NH ₂ -CO-CH ₂ -	Asn / N	2,1	8,7	-
	Glutamine	NH ₂ -CO-CH ₂ -CH ₂ -	Gln / Q	2,2	9,1	-

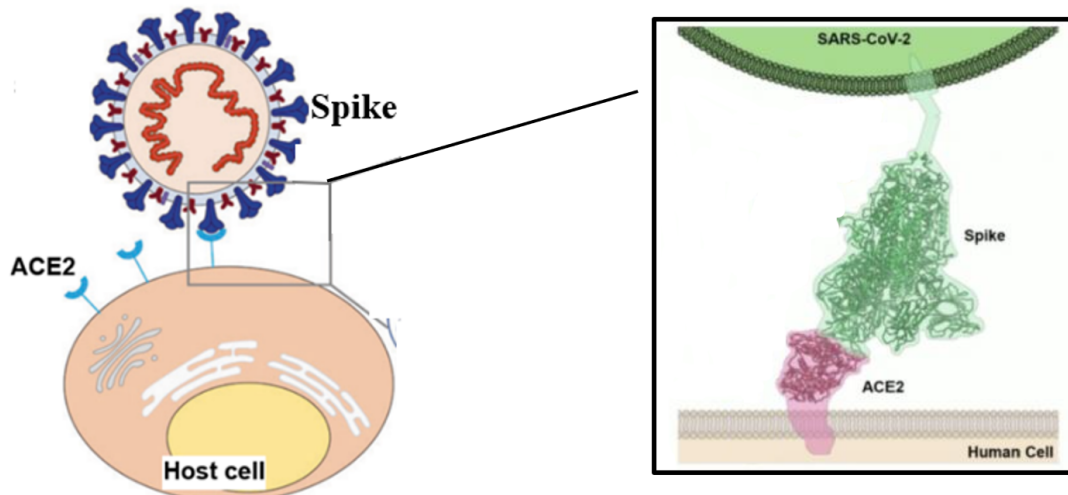
pKa_R signifie pKa de la chaîne latérale

Document 1 : Associations moléculaires reliant la cellule humaine et le SARS-CoV-2

Des protéines ancrées dans la membrane plasmique des cellules cibles humaines interagissent avec la protéine Spike intégrée dans l'enveloppe du virus SARS-CoV-2.

La **glycoprotéine** virale Spike est **homotrimérique**. Chacune de ses sous-unités est composée de deux **domaines** nommés S1 et S2.

La protéine transmembranaire ACE2 (homodimérique) intervient dans la reconnaissance spécifique avec la protéine Spike.



COVID-19 : Le second récepteur qui explique son infectiosité, 2021, 15 octobre, santé log.

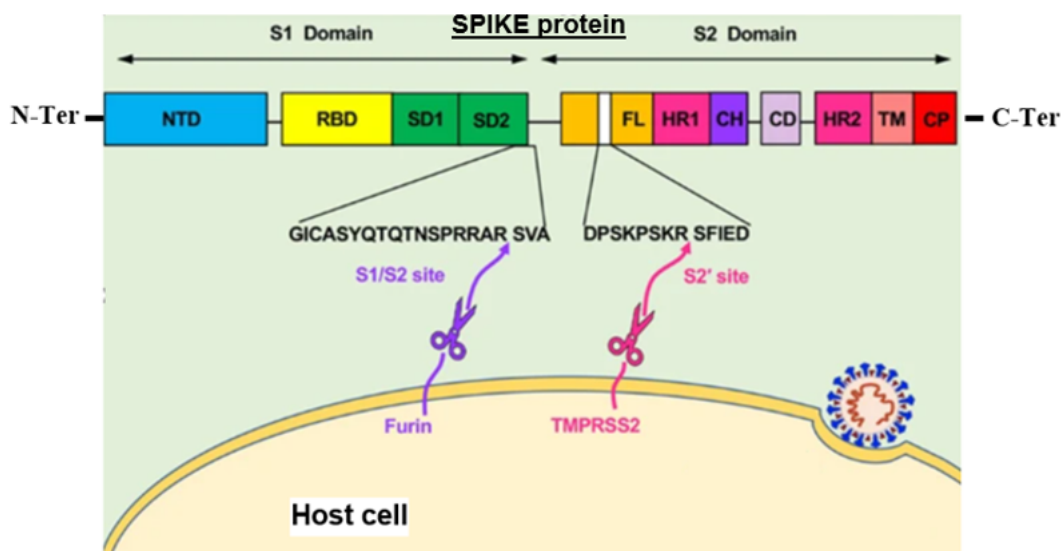
<https://www.santelog.com/actualites/covid-19-le-second-recepteur-qui-explique-son-infectiosite> [Consulté en 2021].

Document 2 : Sequential proteolysis mediated by Furin and TMPRSS2, allowing SARS-CoV-2 virus to enter cells

To enter the cell, the SARS-CoV-2 virus hijacks the function of two cell membrane proteases :

Step 1 - The proteolysis of the Spike protein catalyzed by Furin at the S1-S2 site, causes the separation of the S1 and S2 domains.

Step 2 - The proteolysis of the S2 domain at the S2' site, catalyzed by TMPRSS2, results in the fusion between the viral envelope and the plasma membrane. Then the virus enters the cell.



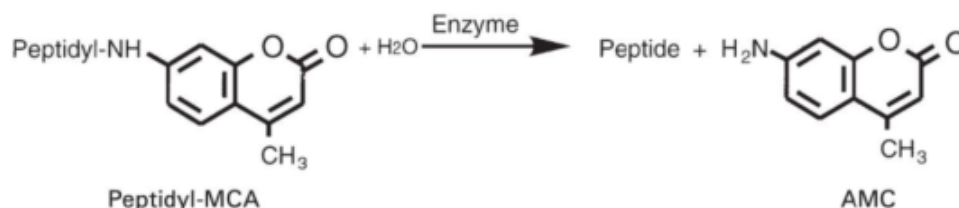
Zhang, Q et al., Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. Nature 2021, 11 juin, <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00653> [Consulté en 2021].

Document 3 : Assay Methods using Peptidyl-MCA substrate for Furin activity measurement (From PeptaNova)

Principle

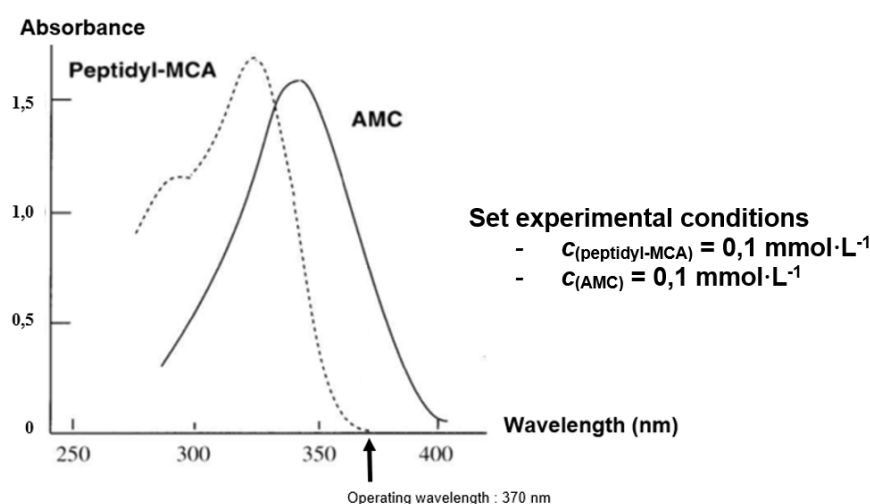
For Furin activity determination, the chromogenic substrate is the peptidyl-MCA :

Arg-Arg-Ala-Arg-MCA



The initial rate of increase in the AMC concentration can be monitored photometrically at 370 nm. At this wavelength, **AMC molar absorptivity** (ϵ) is $7\,700 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

UV-Absorption spectra for peptidyl-MCA and AMC

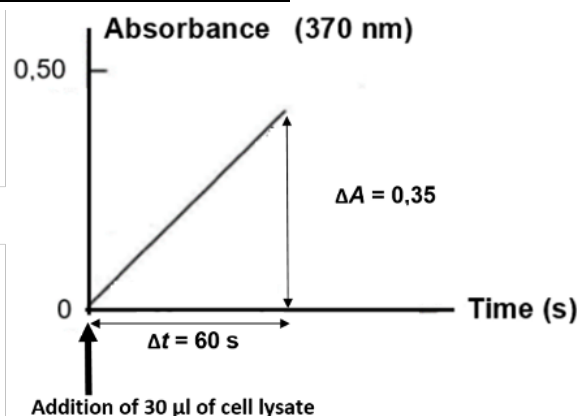


Procedure for initial rate method

1. Set a spectrophotometer at $\lambda = 370 \text{ nm}$ at 25°C .
2. Pipette $2940 \mu\text{L}$ of buffer and $30 \mu\text{L}$ of substrate stock solution (10 mM in DMSO) into the cuvette.
3. Incubate in the spectrophotometer for 3-4 min (for temperature equilibration).
4. Set absorbance to zero.
5. Add $30 \mu\text{L}$ of enzyme solution (cell lysate) and homogenize.
6. Record the increase of the absorbance intensity during 1 min.

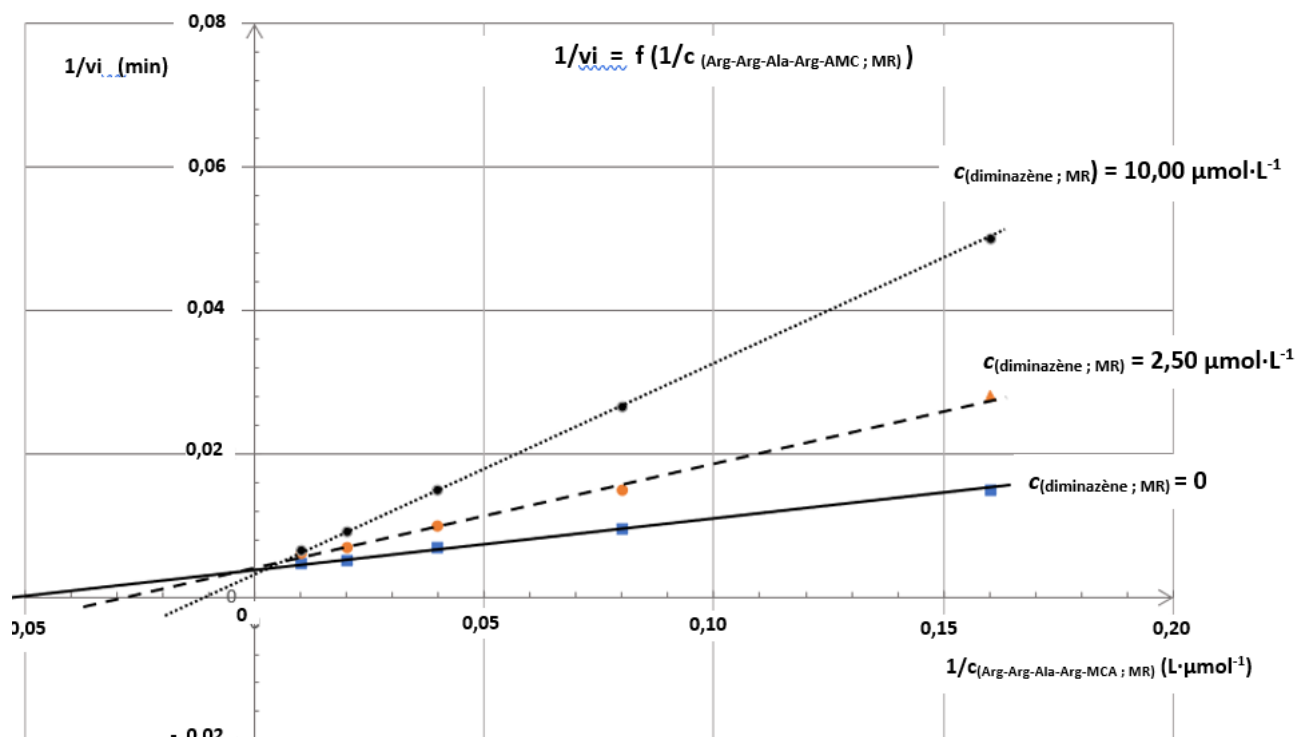
Experimental results obtained for Furin initial rate reaction

Sample : human lung cell lysate



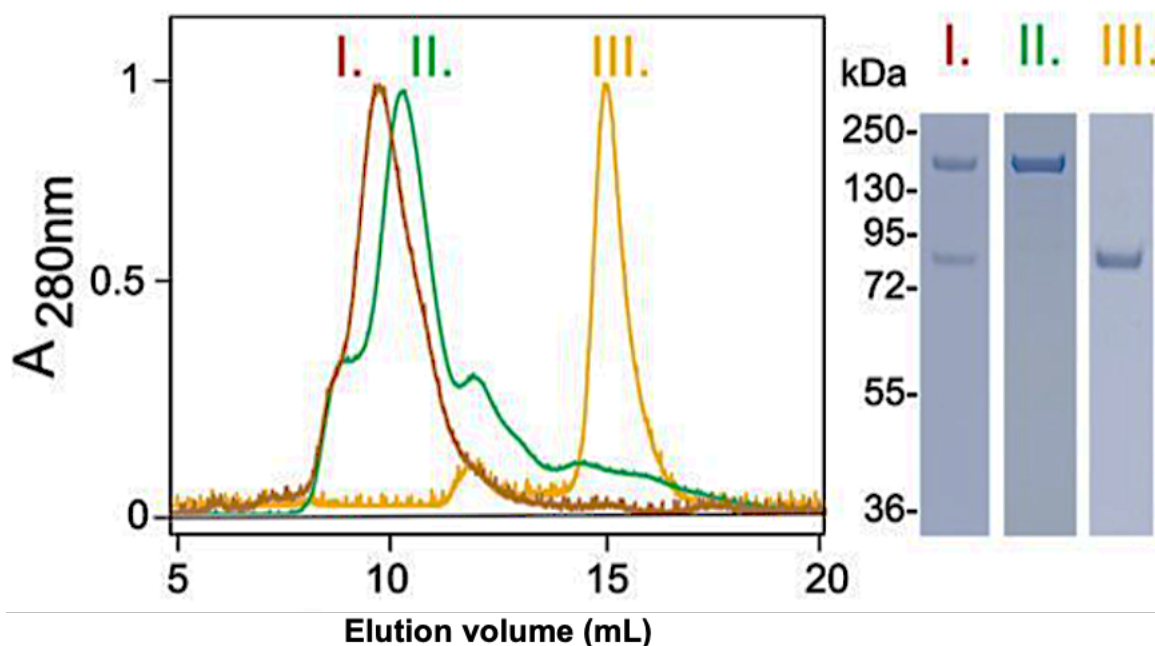
Assay Methods Using Peptidyl-AMC (MCA) Substrates. Pepta nova biologically active peptides. (2015). <https://www.peptanova.de/wp-content/uploads/2015/11/amc1.pdf>, [Consulté en 2021].

Document 4 : Détermination des constantes cinétiques de la furine, en présence ou en absence de diminazène



Wu, C., Zheng, et al., Furin: A Potential Therapeutic Target for COVID-19. iScience, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101642>, [Consulté en 2021].

Document 5 : Analyse du mélange Spike*-ACE2* par chromatographie d'exclusion suivie d'une électrophorèse SDS-PAGE

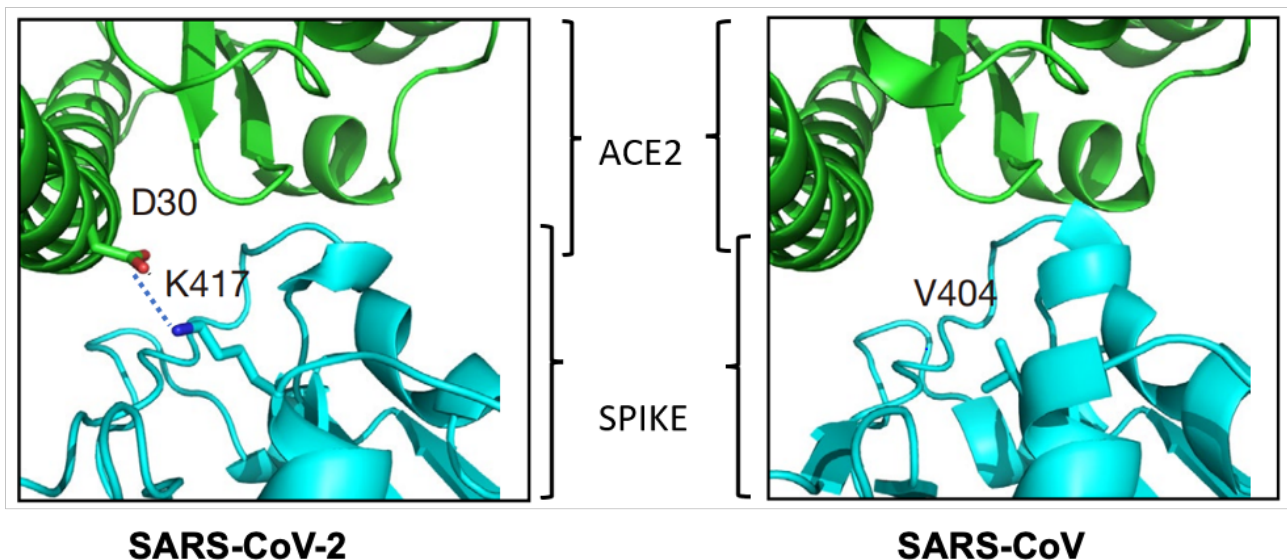


Christine Toelzer, Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein. Science. (2020, 6 novembre). <https://science.sciencemag.org/content/370/6517/725>, [Consulté le 20 juillet 2021].

Document 6 : Étude d'une interaction faible mise en jeu dans l'association Spike-ACE2, pour les 2 virus SARS-CoV2 et SARS-CoV

Les figures ci-dessous représentent l'une des interactions faibles mises en jeu à l'interface entre Spike et ACE2 :

- dans le cas du SARS-CoV-2, le résidu D30 de l'ACE2 s'associe avec le résidu K417 de la protéine Spike,
- dans le cas du SARS-CoV, étant donné l'existence d'un décalage entre les séquences de Spike des 2 virus, le résidu D30 de ACE2 se retrouve en face du résidu V404 de la protéine Spike.



Lan, J., et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **581**, 215–220 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>

Document 7 : Extrait de la fiche technique du kit « SARS-CoV-2 S1/ACE2 binding »

Principe

La protéine ACE2 et la protéine Spike restreinte à son domaine S1, sont marquées respectivement avec les fluorophores donneur (Eu) et accepteur (d2), pour obtenir ACE2-Eu et S1-d2.

Lorsque ACE2-Eu et S1-d2 interagissent, les fluorophores Eu et d2 sont positionnés à une distance inférieure à 10 nm. Dans cette configuration de proximité, l'excitation du donneur Eu à 337 nm, entraîne une émission de fluorescence à 620 nm, dont une partie de l'énergie est transférée à l'accepteur d2, qui à son tour, émet de la fluorescence à la longueur d'onde de 665 nm. Ce transfert d'énergie ne se produit pas si ACE2-Eu et S1-d2 sont dissociées. Ce test permet de rechercher un anticorps empêchant l'association entre les deux molécules. L'efficacité du blocage de l'interaction entre ACE2-Eu et S1-d2 est évaluée par le suivi du rapport " $IF_{665\text{ nm}} / IF_{620\text{ nm}}$ " en fonction de la concentration en anticorps neutralisant.

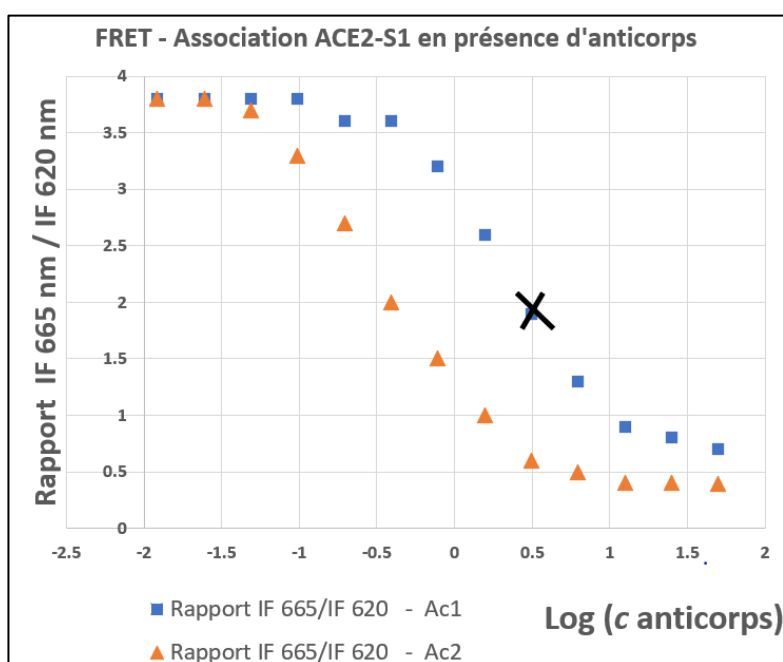
Remarque : IF signifie "intensité de fluorescence"

Procédure opératoire

1. Dans une ligne de la plaque multipuits, effectuer une cascade de dilutions au 1/2, de la solution "Anticorps neutralisant" à tester, à l'aide de la solution tampon, et sous un volume total de 40 μL .
2. Dans une nouvelle ligne de puits, transférer 4 μL de chacune des dilutions "Anticorps neutralisant" précédemment préparées.
3. Ajouter dans chaque puits 8 μL de S1-d2 et 8 μL de ACE2-Eu.
4. Incuber 12 h à 6 °C.
5. Relever le rapport $IF_{665\text{ nm}} / IF_{620\text{ nm}}$ au lecteur de microplaque pour une excitation à 337 nm.

Résultats

Exemples de résultats expérimentaux obtenus pour le test de deux anticorps (Ac1 et Ac2) dirigés contre le domaine S1 de Spike.



$\lambda_{\text{excitation}} = 337\text{ nm}$; c (anticorps) est exprimée en $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

S1/ACE2 binding assay kits. cisbio.com. 2021, janvier 2.
https://fr.cisbio.eu/media/asset/c/i/cisbio_dd_pi_64bds1peg-64bds1peh.pdf [Consulté le 20 juillet 2021].

2022 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée : 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français
calculatrice avec mode examen actif

Capacités évaluées :

Maîtrise des connaissances scientifiques et techniques	4 points
Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	3 points
Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	7 points
Pertinence et cohérence des solutions proposées	4 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2 points

Les probiotiques

Les probiotiques sont des microorganismes revivifiables qui peuvent, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercer des effets bénéfiques sur la santé. Ces microorganismes des genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ou *Saccharomyces*, enrichissent le microbiote intestinal impliqué dans le fonctionnement des entérocytes au cours de l'assimilation des nutriments. Les probiotiques stimulent le système immunitaire, préviennent les diarrhées et contribuent à leur traitement.

1. Les effets bénéfiques des probiotiques

La consommation régulière de probiotiques en tant qu'agent anti-viral constituerait une alternative financière intéressante à la vaccination contre les Rotavirus. Les Rotavirus sont la principale cause de gastro-entérites chez les enfants. Ce sont des virus nus de structure icosaédrique à ARN bicaténaire, appartenant à la famille des *Reoviridae*.

1.1. Indiquer les éléments structuraux d'un virus auxquels font référence les termes soulignés ci-dessus.

Le **document 1** présente le cycle viral du Rotavirus.

1.2. Nommer la protéine virale qui reconnaît les cellules cibles. Citer les deux étapes de synthèse des ARN viraux. Préciser le nom de l'enzyme qui réalise ces étapes de synthèse et son origine virale ou cellulaire.

Des souris nouveau-nées ont été infectées par un Rotavirus puis traitées par voie orale avec des extraits de trois souches de *Lactobacillus ruminis* SPM0211, SPM1205 et SPM1206. Des souris contrôles ont été infectées par le Rotavirus mais traitées avec du tampon PBS. Les souris ont ensuite été sacrifiées, les ARN extraits de leurs tissus intestinaux puis rétrotranscrits en ADNc. Enfin, certains ADNc correspondant à des gènes du rotavirus sont amplifiés par PCR quantitative en temps réel.

Le **document 2** présente les effets du traitement par les probiotiques sur l'expression génétique du Rotavirus.

1.3. Rappeler la caractéristique principale que doivent présenter les cellules intestinales pour être infectées par un Rotavirus.

1.4. Analyser l'histogramme et conclure sur l'effet antiviral de l'espèce *Lactobacillus ruminis*.

2. Production d'acide lactique par *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri est une espèce largement utilisée en tant qu'agent probiotique. Des études montrent qu'une partie de son effet est due à l'acidification de son environnement, qui empêche le développement de microorganismes pathogènes. La production d'acide lactique est donc un paramètre fondamental dans l'effet du probiotique.

Lactobacillus reuteri utilise deux voies d'oxydation du glucose qui acidifient le milieu. Elle produit de l'acide lactique, de l'éthanol et du dioxyde de carbone lorsque le glucose est oxydé par la voie des pentoses phosphates (Voie A, **document 3**) et uniquement de l'acide lactique lorsque le glucose est oxydé par la voie d'Embden-Meyerhof (Voie B, **document 3**).

2.1. Indiquer, en le justifiant, le type fermentaire des bactéries utilisant la voie A et celui des bactéries utilisant la voie B.

2.2. Comparer les bilans en ATP de ces deux voies métaboliques.

Trois souches de *Lactobacillus reuteri*, DSM 20016, DSM 17938 et ATCC 53608, ont été sélectionnées pour réaliser un suivi de croissance. Ces trois souches appartiennent à la même espèce.

2.3. Rappeler deux des trois critères moléculaires qui permettent de déterminer l'appartenance de deux souches à la même espèce.

Les cultures ont été réalisées en milieu MRS (**document 4**) supplémenté en glucose.

2.4. Analyser la composition du milieu de culture, pour en déduire les types trophiques des souches cultivant sur ce milieu. Argumenter la réponse à l'aide des **documents 3 et 4**.

Le **document 5** présente l'évolution du pH lors de la croissance des trois souches de *Lactobacillus reuteri*.

2.5. Proposer une explication aux différences d'évolution de pH observées entre les trois souches, en relation avec les voies métaboliques utilisées.

Afin de doser le glucose et l'acide lactique dans le milieu de culture, les échantillons sont traités selon le protocole présenté dans le **document 6**.

2.6. Expliquer l'intérêt de chacune des étapes soulignées dans ce protocole.

Le **document 7** présente les courbes de consommation du glucose et de production d'acide lactique pour les trois souches.

2.7. Calculer le rendement total de conversion du glucose en acide lactique pour la souche DSM 20016. Calculer la productivité volumique horaire à 10 h de culture (PVH_{10 h}) et la productivité volumique horaire totale (PVHT), en acide lactique, pour la souche DSM 20016. Préciser l'intérêt du calcul de la PVH_{10 h} pour cette souche.

Le **document 8** est un tableau récapitulatif des rendements de conversion et des productivités pour les souches DSM 17938, ATCC 53608 et DSM 20016.

2.8. Analyser les résultats obtenus pour les trois souches et sélectionner la souche la plus rentable pour la production d'acide lactique.

3. Production industrielle de probiotiques

Bifidobacterium est utilisé comme micro-organisme modèle pour la production de bactéries lactiques, à l'origine des probiotiques.

La maîtrise du procédé de fermentation des souches de *Bifidobacterium* doit permettre de produire une grande quantité de biomasse avec une viabilité élevée.

Cette production industrielle est traditionnellement réalisée en culture batch ou fed-batch. Une culture en batch, réalisée en milieu MRS, avec la souche *Bifidobacterium longum*, sans régulation de pH, a permis d'obtenir une productivité de $27,5 \cdot 10^{10} \text{ UFC} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Dans des conditions identiques, mais avec un pH contrôlé, la productivité en biomasse calculée est de $144 \cdot 10^{10} \text{ UFC} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

(D'après Guillaume Lemetals. Sélection et Intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012)

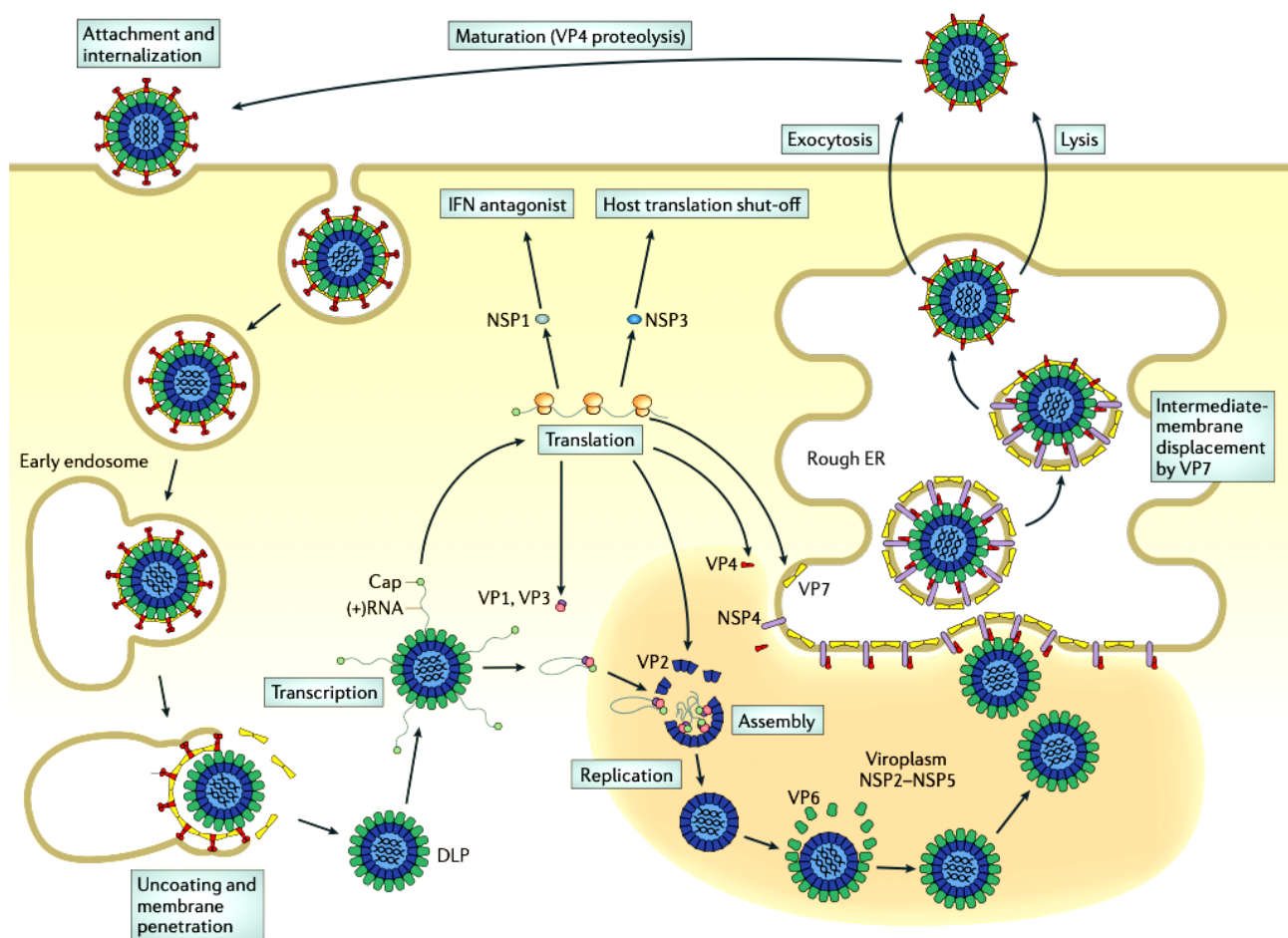
3.1. Proposer un schéma légendé de la boucle de régulation du pH dans le cadre de cette fermentation.

3.2. Comparer et expliquer les résultats ci-dessus obtenus avec et sans régulation de pH.

Les probiotiques sont conditionnés sous forme lyophilisée. Cette forme permet de conserver une bonne viabilité. Différentes conditions de lyophilisation sont testées et présentées dans le **document 9**.

3.3. Dégager le rôle joué par le tréhalose ou le saccharose dans la survie des cellules.

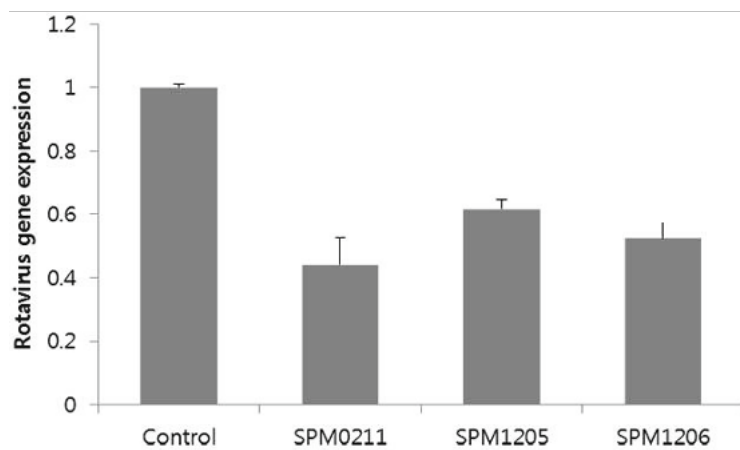
Document 1 : Le cycle viral du Rotavirus



VP : Viral Protein ; NSP : Non Structural Protein ; DLP : Double layered particle ;
IFN : Interferon

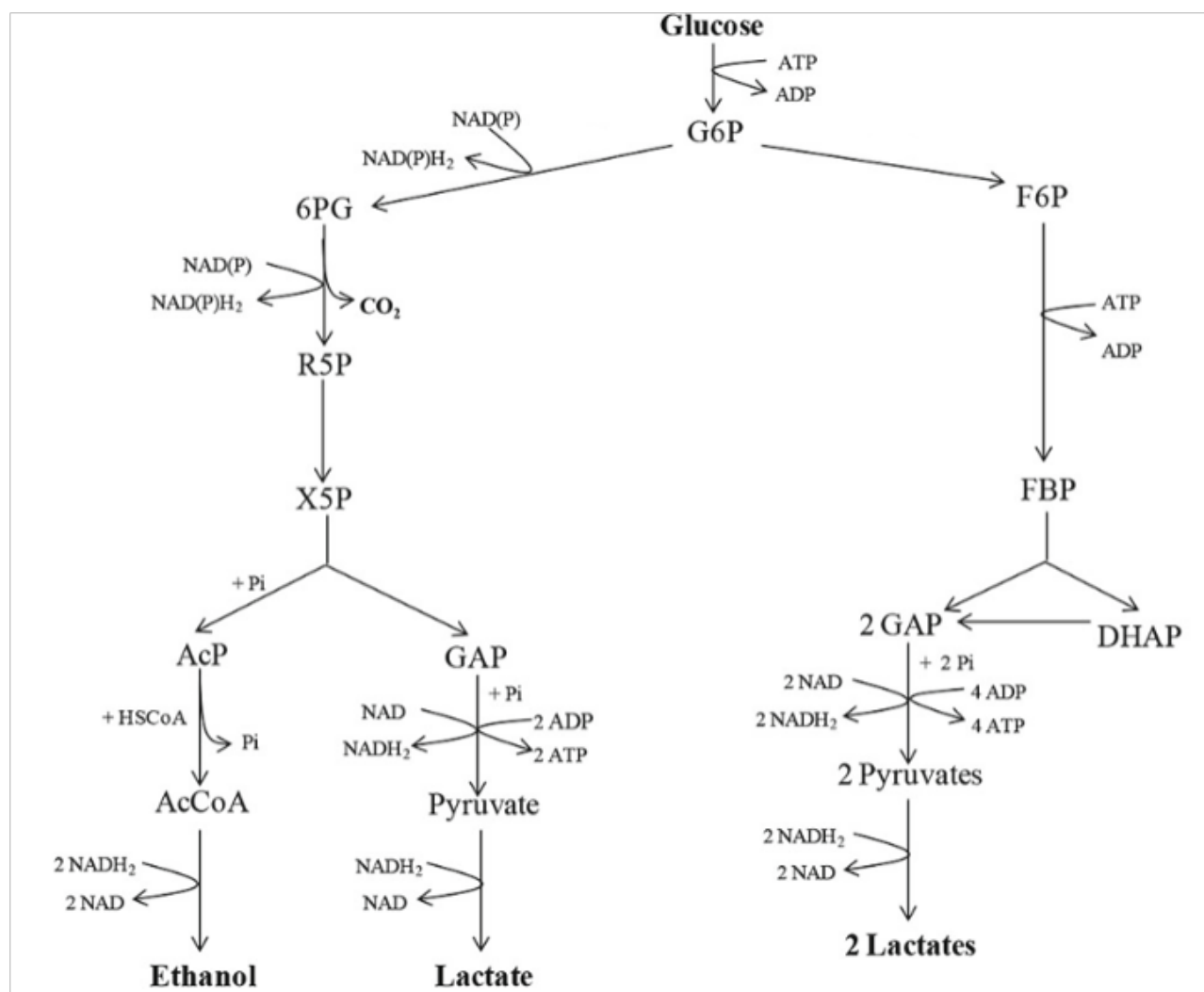
Nature Reviews Microbiology 10, 165-177 (March 2012)

Document 2 : Effets de l'ingestion de souches de *Lactobacillus* sur l'expression génétique de Rotavirus chez la souris



Kang, Journal of Microbiology (2015), Volume 53, Number 11, pp. 796-798

Document 3 : Voies d'oxydation du glucose utilisées par *Lactobacillus reuteri*



Voie A

Voie B

G6P : glucose-6-phosphate ; 6PG : 6-phosphogluconate ; R5P : ribulose-5-phosphate ;
 X5P : xylulose-5-phosphate ; AcP : acétyl-phosphate ; AcCoA : acétyl-coenzymeA ;
 GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ;
 FBP : fructose-1,6-biphosphate ; DHAP : dihydroxyacétone phosphate.

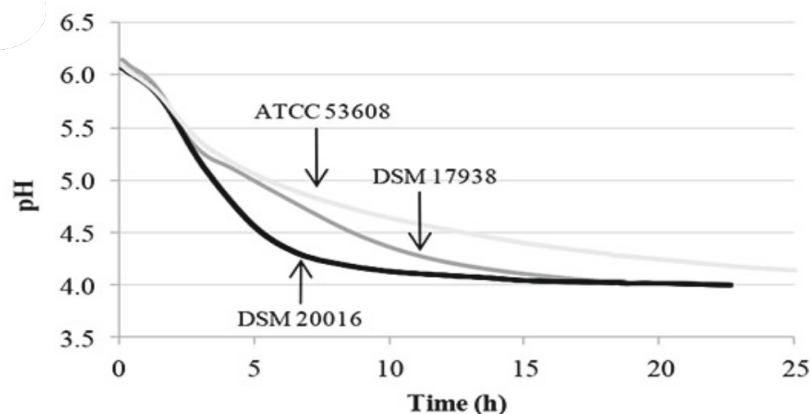
Burgé. Journal of Microbiology (2015), Volume 53, Number 10, pp. 702-710

Document 4 : Composition du milieu Man Rogosa Sharpe (MRS)

Peptones	10 g	MgSO ₄	0,2 g
K ₂ HPO ₄	2 g	Acétate de sodium trihydraté	5 g
Extrait de levure	10 g	MnSO ₄	0,05 g
Citrate d'ammonium	2 g	Tween 80	1 g
Glucose	40 g	eau	qsp 1 L

Burgé. Journal of Microbiology (2015), Volume 53, Number 10, pp. 702-710

Document 5 : Étude de l'acidification du milieu de culture par trois souches de *Lactobacillus reuteri*



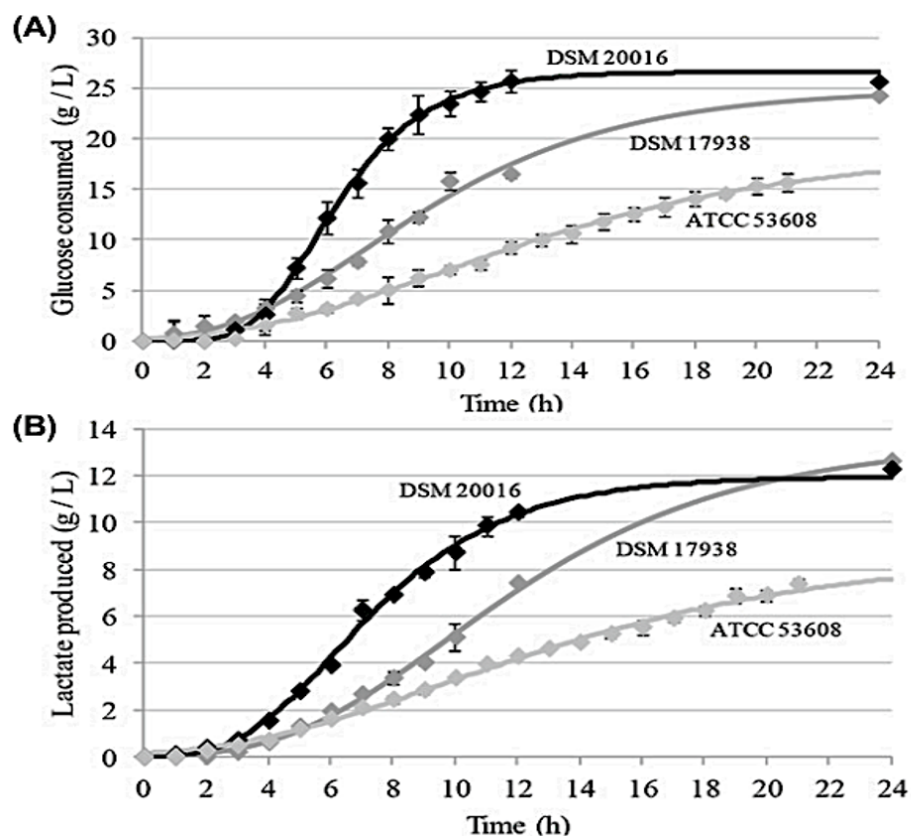
Burgé. Journal of Microbiology (2015), Volume 53, Number 10, pp. 702-710

Document 6 : Treatment of culture samples

“Each sample (900 μ L collected each hour during growth monitoring) was mixed (50% v/v) with trichloroacetic acid 21% (v/v) [...] and then centrifugated at 13000 g for 2 min at 4°C before filtration through a 0.22 μ m pore-size filter (Millipore). The supernatant was stored at 4°C.”

Burgé. Journal of Microbiology (2015), Volume 53, Number 10, pp. 702-710

Document 7 : Étude de la productivité en acide lactique des souches de *Lactobacillus reuteri*



Burgé. Journal of Microbiology (2015), Volume 53, Number 10, pp. 702-710

Document 8 : Rendements de conversion et productivités des souches de *Lactobacillus reuteri*

Souche	DSM 17938	ATCC 53608	DSM 20016
Rendement total de conversion en g d'acide lactique par g de glucose	0,54	0,47	À déterminer
PVH à 10 h en g·L ⁻¹ ·h ⁻¹	0,50	0,35	À déterminer
PVHT en g·L ⁻¹ ·h ⁻¹	0,52	0,31	À déterminer

D'après Guillaume Lemetais.

Sélection et intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche.
Sciences agricoles, Université de Bourgogne, 2012.

Document 9 : Étude de la viabilité des cellules en fonction des conditions de lyophilisation

Souches	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Témoin avant lyophilisation	94 %	97 %
Lyophilisation	38 %	36 %
Lyophilisation en présence de tréhalose	87 %	87 %
Lyophilisation en présence de saccharose	80 %	83 %

D'après Guillaume Lemetais.

Sélection et intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche.
Sciences agricoles, Université de Bourgogne, 2012.

2022 - U42 : Biologie cellulaire

Durée : 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français

Capacités évaluées :

Maîtrise des connaissances scientifiques et techniques	4 points
Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	4 points
Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	5 points
Pertinence et cohérence des solutions proposées	5 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2 points

L'inhibition de contact : étude, régulation et conséquences de sa dérégulation

Au sein d'un tissu, les cellules établissent des contacts entre elles et avec la matrice extra-cellulaire. Ces interactions permettent de réguler plusieurs processus cellulaires comme par exemple le processus de prolifération.

L'inhibition de contact ou *Cell Inhibition Proliferation* (CIP) en est un exemple type. En effet, lors de la cancérisation, de nombreuses cellules perdent cette propriété.

Bien que les caractéristiques de la CIP soient établies depuis les années 1965, les voies de régulation ne sont précisément connues que depuis une quinzaine d'années. On se propose d'étudier la protéine YAP (*Yes-associated protein*) qui pourrait être impliquée dans la perte de l'inhibition de contact, affectant ainsi la prolifération cellulaire dans certains cancers.

1. Implication de YAP sur la prolifération cellulaire

Afin d'étudier le rôle de YAP au cours de la prolifération cellulaire, des tests sont réalisés sur la lignée de cellules épithéliales mammaires humaines immortalisées MCF10A.

Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM : F-12 complet (**document 1**).

- 1.1. Dans un tableau, présenter les différentes catégories de composants du milieu de culture de base utilisé et préciser leur(s) rôle(s) respectif(s).

L'influence de la protéine YAP sur l'inhibition de contact est étudiée par la méthode des ARN interférents (si-RNA) noté « siY », utilisés pour inhiber l'expression de la protéine YAP. Un contrôle est réalisé en parallèle à l'aide d'un si-RNA (noté « siCo »), qui possède la particularité de ne cibler aucun ARN messager dans la cellule. Le mode opératoire, ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans le **document 2**.

- 1.2. Argumenter le choix d'utiliser la lignée MCF10A, en précisant l'origine de cette lignée et le type cellulaire concerné.
- 1.3. Après avoir rappelé le rôle du BrdU, expliquer pourquoi la réalisation d'un *pulse* de BrdU permet de ne marquer spécifiquement que les cellules en phase S.

La quantification de la prolifération cellulaire s'effectue par immunofluorescence accompagnée d'un contre marquage au DAPI.

- 1.4. Préciser le rôle du Triton utilisé dans le mode opératoire.
- 1.5. Représenter, par un schéma légendé, l'édifice moléculaire obtenu dans le cas d'un résultat positif de l'immunomarquage.

- 1.6. À l'aide des résultats de fluorescence, indiquer le rôle du contre marquage des cellules au DAPI. En déduire l'équation aux grandeurs permettant le calcul du pourcentage de cellules en phase S.

Le pourcentage de cellules en phase S est proportionnel au pourcentage de cellules en prolifération.

- 1.7. Analyser et interpréter les résultats des tests de prolifération, en présence d'ARN interférents en fonction de la densité cellulaire. Conclure quant au rôle de la protéine YAP.

2. Étude de la localisation intracellulaire de la protéine YAP

Différentes équipes se sont intéressées à la localisation intracellulaire de la protéine YAP ainsi qu'au processus régulant cette localisation, afin de préciser son mode d'action et son implication au cours de la CIP.

L'étude de la localisation de la protéine YAP est réalisée par immunofluorescence.

Le mode opératoire ainsi que les résultats obtenus sont indiqués dans le **document 3**.

- 2.1. À partir de l'analyse des résultats de l'immunofluorescence et de son exploitation quantitative, établir le lien entre la densité cellulaire et la localisation de la protéine YAP.

Des études suggèrent que l'état de phosphorylation de la protéine YAP serait à l'origine de sa localisation intracellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, le niveau de phosphorylation de YAP est analysé par Western blot sur des lysats de cellules initialement ensemencées à différentes densités (**document 4**).

- 2.2. Analyser et interpréter les résultats du Western Blot et en déduire le lien entre la localisation de la protéine YAP et son état de phosphorylation.

La protéine YAP intervient dans une voie de signalisation nommée « Hippo-YAP » activée lors de contacts cellule-cellule.

Dans le but de comprendre comment cette voie de signalisation régule l'activité de la protéine YAP, les auteurs réalisent un test d'expression de la luciférase, appelé « test luciférase », dont le principe est présenté dans le **document 5A**. Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 5B**.

- 2.3. Montrer, à l'aide du principe du test d'expression de la luciférase, que les conditions expérimentales n°1 et 2, présentés dans le **document 5B**, constituent des contrôles.
- 2.4. Interpréter le résultat de la condition expérimentale n°3 et conclure sur la relation existant entre l'activité de la protéine YAP et son état de phosphorylation.
- 2.5. Schématiser la voie de signalisation « Hippo/YAP » dans le cas d'une inhibition de contact.

Certains cancers s'expliquent par une perte d'inhibition de contact. Il a été montré qu'une mutation de la protéine YAP dans les cellules tumorales engendrait une localisation privilégiée dans le noyau. Le gène codant la protéine YAP est un proto-oncogène.

- 2.6. Exposer de façon détaillée trois autres caractéristiques d'une cellule tumorale.

- 2.7. Expliquer le terme « proto-oncogène ».

- 2.8. À partir de l'ensemble des résultats expérimentaux de l'étude, préciser la localisation, l'état de phosphorylation et l'activité de la protéine YAP dans le cas d'une inhibition de contact. Proposer une hypothèse permettant d'expliquer l'implication de YAP dans la perte d'inhibition de contact et donc dans l'apparition d'un cancer.

Document 1. Composition du milieu de culture DMEM : F-12
Formulation for DMEM:F-12 Medium
ATCC® 30-2006
Inorganic Salts (g/liter)

CaCl ₂ (anhydrous)	0.11665
CuSO ₄ (anhydrous)	0.0000008
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.00005
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.000417
MgSO ₄ (anhydrous)	0.08495
KCl	0.3118
NaHCO ₃	1.20000
NaCl	7.00000
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	0.07100
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.06250
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.000432

Amino Acids (g/liter)

L-Alanine	0.00445
L-Arginine·HCl	0.14750
L-Asparagine·H ₂ O	0.00750
L-Aspartic Acid	0.00665
L-Cysteine·HCl·H ₂ O	0.01756
L-Cystine·2HCl	0.03129
L-Glutamic Acid	0.00735
L-Glutamine	0.36510
Glycine	0.01875
L-Histidine·HCl·H ₂ O	0.03148
L-Isoleucine	0.05437
L-Leucine	0.05895
L-Lysine·HCl	0.09135
L-Methionine	0.01724
L-Phenylalanine	0.03548
L-Proline	0.01725
L-Serine	0.02625
L-Threonine	0.05355
L-Tryptophan	0.00902
L-Tyrosine·2Na·2H ₂ O	0.05582
L-Valine	0.05285

Vitamins (g/liter)

D-Biotin	0.00000365
Choline Chloride	0.00898
Folic Acid	0.00265
myo-Inositol	0.01261
Niacinamide	0.00202
D-Pantothenic Acid	0.00224
(hemicalcium)	
Pyridoxine·HCl	0.00203
Riboflavin	0.00022
Thiamine·HCl	0.00217
Vitamin B-12	0.00068

Other (g/liter)

D-Glucose	3.15100
HEPES	3.57480
Hypoxanthine	0.00239 *
Linoleic Acid	0.000044
Phenol Red, Sodium Salt	0.00810 *
Putrescine·2HCl	0.00008 *
Pyruvic Acid·Na	0.05500
DL-Thioctic Acid	0.000105
Thymidine	0.000365

*** : les composés
encadrés ne sont pas à
traiter dans la question
1.1.**

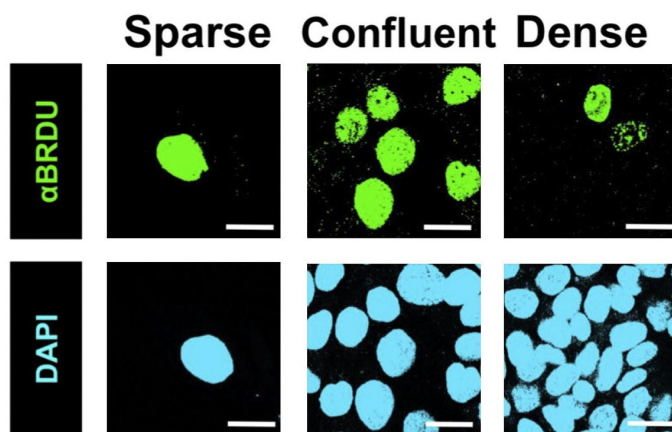
DMEM: F-12 Medium, référence 30-2006 [en ligne], ATCC [consulté le 07/12/2021]. Disponible sur : https://www.atcc.org/products/30-2006?geo_country=fr#documentation

Document 2. Tests de prolifération cellulaire

2A. Protocol

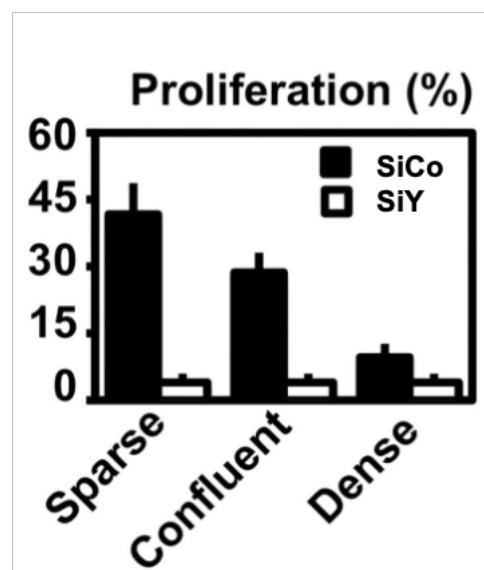
- Human immortalized mammary epithelial MCF10A cells were cultured in DMEM : F-12 with 5 % Horse Serum, glutamine and antibiotics.
- siRNA transfections (control : siCo. or YAP depletion : siY) were done in antibiotics-free medium according to the manufacturer instruction.
- Cells were plated on plastic at 3 000 cells·cm⁻² to obtain low density cultures (**SPARSE**), at 15 000 cells·cm⁻² for confluent monolayers (**CONFLUENT**), and 75 000 cells·cm⁻² to obtain hyperconfluent monolayers (**DENSE**).
- After 2 days, cells were incubated for 1 hour with a **pulse of BrdU** to label cells undergoing DNA duplication. Cells were fixed and processed for anti-BrdU immunofluorescence (α BRDU). The BrdU is a thymidine analog.
- For Immunofluorescence mouse anti-BrdU was incubated overnight in PBS + 0.1% Triton and 2% Goat Serum. Secondary antibody was Goat anti-mouse Alexa488 (fluorochrome). DAPI was used as a nuclear counterstain.

2B. Résultats de l'immunofluorescence



Fluorescence results for siCo. transfected cells (scale bar = 20 μ m)

2C. Quantification de la prolifération cellulaire



Quantitation of proliferation measured as the percentage of BrdU-positive cells.

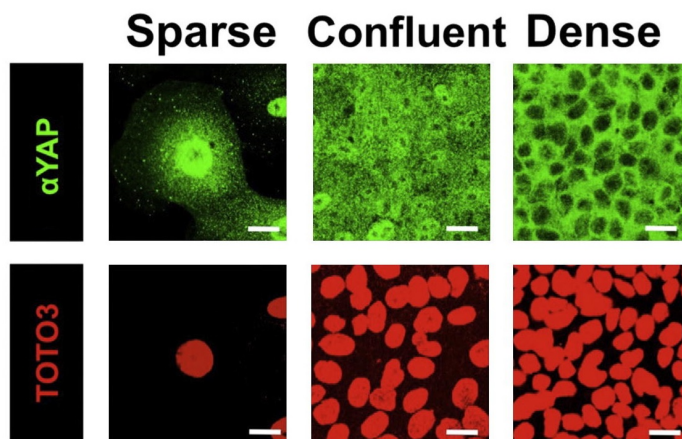
Adapté de Aragona M. et al., A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. Cell. 2013 Aug 29 ;154(5):1047-1059.

Document 3. Étude de la localisation de la protéine YAP

3A. Protocole

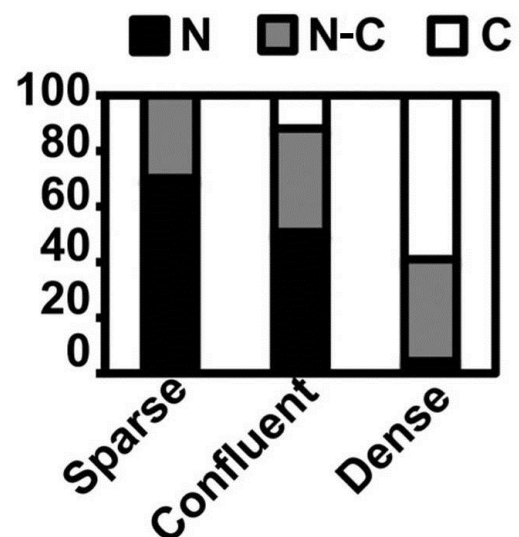
- Des cellules MCF10A non transfectées sont mises en culture de la même manière que celle indiquée dans le **document 2**.
- La protéine YAP est repérée à l'aide d'un anticorps murin anti-YAP (α YAP) et d'un anticorps secondaire de chèvre anti-anticorps de souris couplé à de l'Alexa 488. Un contre marquage de tous les noyaux cellulaires est également réalisé avec le marqueur fluorescent **TOTO3**.
- La localisation intracellulaire de la protéine YAP est ensuite observée à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence.

3B. Résultats de l'immunofluorescence



Résultats des observations au microscope à épifluorescence
Longueur des barres = 20 μ m

3C. Évaluation de la localisation cellulaire de YAP

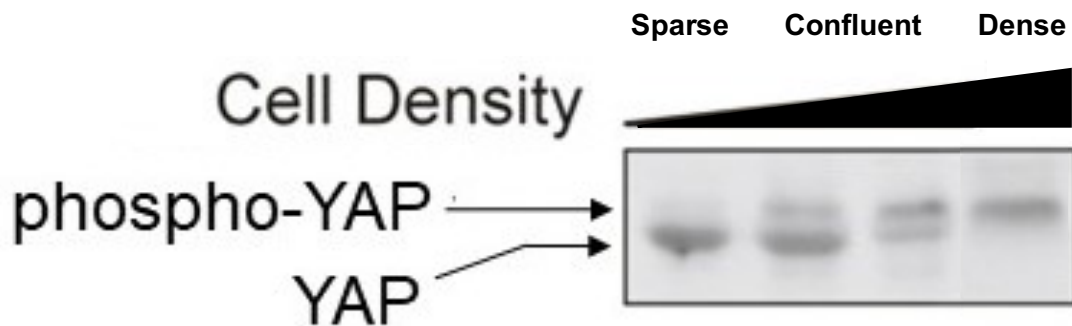


Proportions de cellules présentant une localisation nucléaire (N) ou cytosolique (C) ou les deux (N-C) de la protéine YAP en fonction de la densité cellulaire

Adapté de Aragona M. et al., A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. Cell. 2013 Aug 29;154(5):1047-1059.

Document 4. Étude du niveau de phosphorylation de la protéine YAP en fonction de la densité cellulaire par Western blot

- Des cellules MCF10A ont étéensemencées et incubées à 37°C pendant 48h pour obtenir quatre densités cellulaires différentes
- Les cellules sont ensuite lysées et le niveau d'expression de la protéine YAP est analysé par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-YAP et révélé *via* un anticorps conjugué à l'HRP (*Horse Radish Peroxydase*).
- Des densités cellulaires croissantes sont testées (densités comprises entre **Sparse** et **Confluent**)

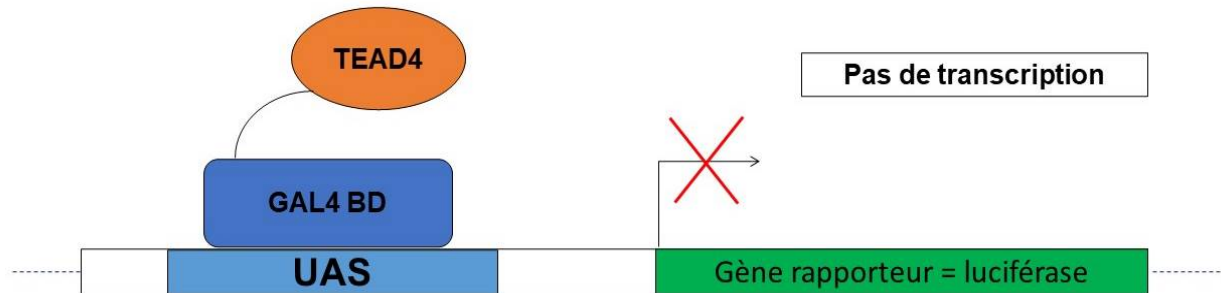


Adapté de Zhao B. et al., Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007 Nov 1;21(21):2747-61.

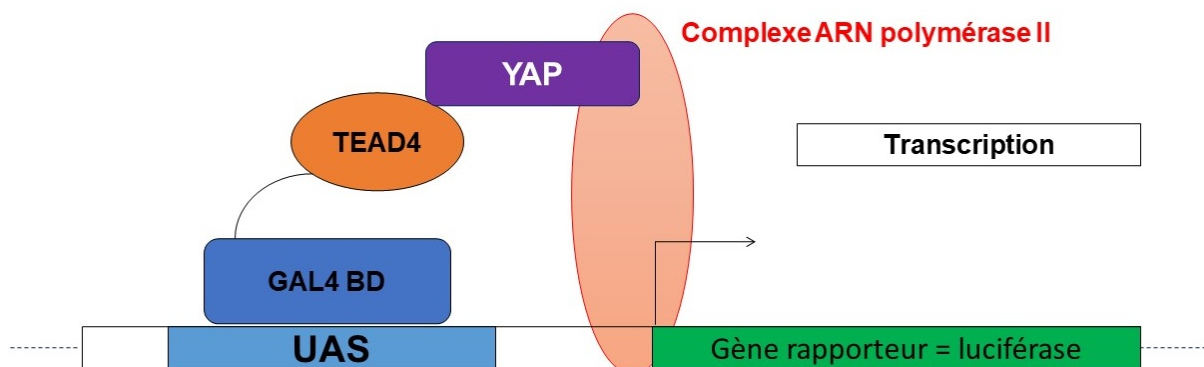
Document 5. Étude de l'activité de la protéine YAP au cours du test luciférase

5A. Principe du test luciférase

- Dans le cas d'une localisation non nucléaire du facteur coactivateur YAP :



- Dans le cas d'une localisation nucléaire du facteur coactivateur YAP :



Légende :

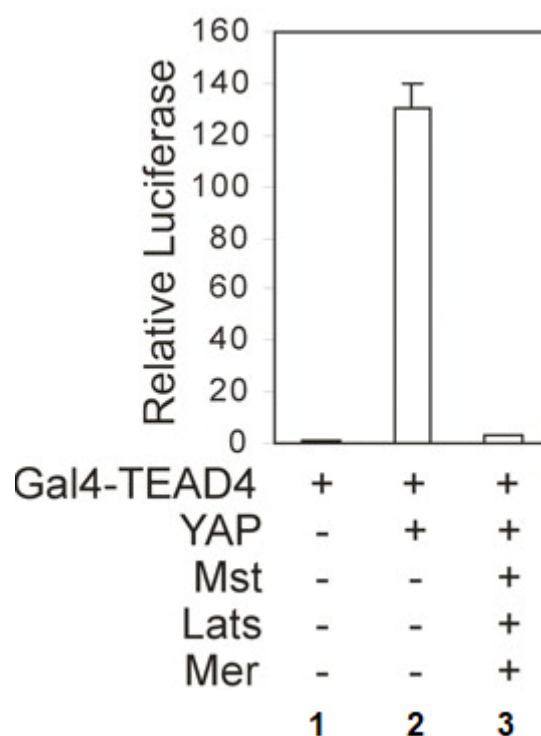
- UAS (Upstream Activator Sequence) : séquence contrôlant l'expression du gène rapporteur codant la luciférase.
- GAL4 BD : domaine de liaison à l'ADN du facteur Gal4 capable de se lier à la séquence UAS.
- TEAD4 : un facteur de transcription de la famille TEAD cible du coactivateur YAP et fusionné au domaine GAL4 BD.

5B. Mode opératoire et résultats du test luciférase

Des cellules MCF10A, exprimant les constructions géniques nécessaires au test luciférase, ont été mises en culture sur des plaques 12 puits. Elles sont ensuite transfectées avec un plasmide permettant la surexpression de la protéine YAP et/ou d'un ou plusieurs plasmides permettant la surexpression des trois protéines de la voie de signalisation Hippo présentées ci-dessous :

- Mst : kinase ciblant la protéine Lats
- Lats : kinase ciblant la protéine YAP
- Merlin (Mer) : kinase ciblant la protéine Mst

L'activité luciférase est ensuite mesurée et normalisée de manière à ce que les résultats soient comparables d'un puits à l'autre.



Conditions expérimentales et résultats des tests luciférase

Adapté de Zhao B. et al., Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007 Nov 1;21(21):2747-61.

Session 2022 : 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.

2022 - U11 : Mathématiques

EXERCICE 1

Partie A

1. Compléter le tableau donné en **annexe à rendre avec la copie**. On arrondira les valeurs au millième.

Rang de l'année k_i	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de personnes N_i (en milliers) équipées de	56,25	58,1	60,5	63	65,8	68,7	72	75,5	79,3
$y_i = \ln(N_i - 30)$	3,268	3,336	3,418	3,497	3,578	3,656	3,738	3,818	3,898

2. a. La droite d'ajustement du nuage par la méthode des moindres carrés a pour équation $y = 0,08k + 3,26$

b. On sait que $y = \ln(N - 30)$ et que $y \approx 0,08k + 3,26$.

$$\begin{aligned}
 \text{Ainsi, } \ln(N - 30) &= 0,08k + 3,26 & \Rightarrow N - 30 &= e^{0,08k+3,26} \\
 & & \Rightarrow N &= 30 + e^{0,08k+3,26} \\
 & & \Rightarrow N &= 30 + e^{0,08k} \times e^{3,26} \\
 & & \Rightarrow N &= 30 + e^{0,08k} \times 26,05
 \end{aligned}$$

On peut en conclure que $N(k) = 30 + 26,05e^{0,08k}$.

3. a. En 2026, $k = 13$. Par conséquent $N(13) = 30 + e^{0,08 \cdot 13} \times 26,05 \approx 103,7 \approx 104$

En 2026, il devrait y avoir environ 104 000 personnes équipées de l'implant médical dans ce pays.

b. Cherchons la limite de $N(k)$ lorsque k tend vers $+\infty$

$$\lim_{k \rightarrow +\infty} 0,08k = +\infty \text{ et par composée, } \lim_{k \rightarrow +\infty} e^{0,08k} = +\infty$$

On peut donc en conclure que $\lim_{k \rightarrow +\infty} 30 + 26,05 e^{0,08k} = +\infty$.

Donc au bout d'un certain nombre d'années, le nombre $N(k)$ de personnes équipées de l'implant médical sera supérieur à la population du pays qui reste stable à 60 millions ; ce n'est pas possible donc **ce modèle n'est pas valide**.

Partie B

1. a. $(E_0)y' + 0,05y = 0 \Rightarrow y' = -0,05y$

Les solutions de l'équation homogène (E_0) sont les fonctions, qui à tout réel t de $[0, +\infty[$ associent $Ce^{-0,05t}$ où C est une constante réelle.

b. Si h est une solution constante de l'équation (E) alors h vérifie :

$$h'(t) + 0,05h(t) = 0,05 \quad \text{et} \quad h'(t) = 0.$$

$$\text{Ainsi, } 0,05h(t) = 0,05 \Rightarrow h(t) = 1$$

c. On en déduit que les solutions de l'équation (E) sont les fonctions, qui à tout réel t de $[0, +\infty[$ associent $Ce^{-0,05t} + 1$, où C est une constante réelle.

d. $g(t) = Ce^{-0,05t} + 1.$

$$\text{Or, } g(0) = 8 \Rightarrow Ce^{-0,05 \times 0} + 1 = 8 \Rightarrow C + 1 = 8 \Rightarrow C = 7.$$

La fonction g a pour expression $g(t) = 7e^{-0,05t} + 1.$

2. $f(13) = \frac{450}{1+7e^{-0,05 \times 13}} = \frac{450}{1+7e^{-0,65}} \approx 96,68 \approx 97.$

En 2026, environ 97 000 personnes de ce pays seront équipées de l'implant médical.

3. $\lim_{t \rightarrow +\infty} -0,05t = -\infty$

$$\text{Par composée, } \lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-0,05t} = 0 \Rightarrow \lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{450}{1+7e^{-0,05t}} = 450.$$

Sur le long terme, le nombre de personnes équipées d'un implant médical se stabiliserait autour de 450 000.

4. Pour tout t de $[0, +\infty[$, $e^{-0,05t} > 0$

$$\text{Donc } 315e^{-0,05t} > 0 \quad \text{et} \quad 2(1+7e^{-0,05t})^2 > 0$$

On a donc $f'(t) > 0$. **Par conséquent, f est strictement croissante sur $[0, +\infty[$.**

Cela signifie que le nombre de personnes équipées de l'implant croît avec le temps.

5. On peut résoudre l'inéquation $\frac{450}{1+7e^{-0,05t}} > 120$

$$\Rightarrow \frac{450}{120} > 1 + 7e^{-0,05t} \quad \text{car} \quad 1 + 7e^{-0,05t} > 0.$$

Ainsi on obtient :

$$\frac{11}{4} > 7e^{-0,05t} \Rightarrow \frac{11}{28} > e^{-0,05t} \Rightarrow \ln\left(\frac{11}{28}\right) > -0,05t \Rightarrow \frac{\ln\left(\frac{11}{28}\right)}{-0,05} < t \quad \text{car } -0,05 < 0.$$

$$\frac{\ln\left(\frac{11}{28}\right)}{-0,05} \approx 18,68 \quad \text{on prendra } t \geq 19.$$

À partir de 2032, le nombre de personnes de ce pays équipées de cet implant médical dépassera 120 000.

EXERCICE 2

Partie A - Défaut d'approvisionnement

1	La probabilité de l'événement : « La file d'entrée ne se vide pas dans la journée. » Réponse E : $P(A) = 0,03 \Rightarrow P(\bar{A}) = 1 - 0,03 = \mathbf{0,97}$
2	L'événement : « La file d'entrée est vide au moins une fois dans la journée mais pas le réservoir. » Réponse C : $A \cap \bar{B}$
3	La probabilité de l'événement : « La file d'entrée et le réservoir ont été tous les deux vides au moins une fois au cours de la journée. » Réponse F : Comme A et B sont indépendants, $P(A \cap B) = P(A) \times P(B)$ $P(A \cap B) = 0,03 \times 0,02$ $P(A \cap B) = \mathbf{0,0006}$
4	La probabilité de l'événement : « La machine a connu un défaut d'approvisionnement dans la journée. » Réponse D : $P(A \cup B) = P(A) + P(B) - P(A \cap B)$ $= 0,03 + 0,02 - 0,0006$ $= \mathbf{0,0494}$

Partie B - Pannes de la machine à embouteiller sur une durée de 200 jours

1. La variable aléatoire X suit la **loi binomiale de paramètres $n = 200$ et $p = 0,025$**

2. a. $\lambda = n \times p = 200 \times 0,025 = 5$.

b. $P(Y \leq 10) \approx 0,986$

c. $P(Y = 15) = \frac{5^{15} \times e^{-5}}{1 \times 2 \times \dots \times 15} \frac{5^{15} \times e^{-5}}{15!} = 1,57 \times 10^{-4} \neq 0$

La conjecture « $P(Y = 15)$ est égale à 0 » est fausse.

Partie C - Qualité de l'embouteillage

1. $\bar{x} \approx \mathbf{74,73}$ et $\sigma \approx \mathbf{1,10}$

2. a. On sait que pour une variable aléatoire X suivant la loi normale de paramètres m et σ , on a : $P(m - 2\sigma \leq X \leq m + 2\sigma) \approx 0,95$

On pourra donc prendre $h = 2\sigma = 2 \times 0,11 = \mathbf{0,22}$.

b. La règle de décision du test est

- si la moyenne de l'échantillon appartient à l'intervalle $I_{95} = [75 - h; 75 + h]$, alors on accepte l'hypothèse H_0 ;
- sinon on rejette l'hypothèse H_0 .

c. $I_{95} = [75 - h; 75 + h] = [75 - 0,22; 75 + 0,22] = [\mathbf{74,78}; \mathbf{75,22}]$.

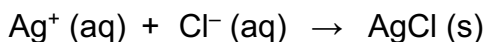
D'après les résultats de l'échantillon donné, on a $\bar{x} \approx 74,73$ et $74,73 \notin I_{95}$

Donc on ne peut pas accepter l'hypothèse H_0 : « $m = 75$ ».

2022 - U12 : Sciences physiques et chimiques

I. VÉRIFICATION DE LA CONFORMITÉ DU LAIT AUX NORMES DE CONSOMMATION

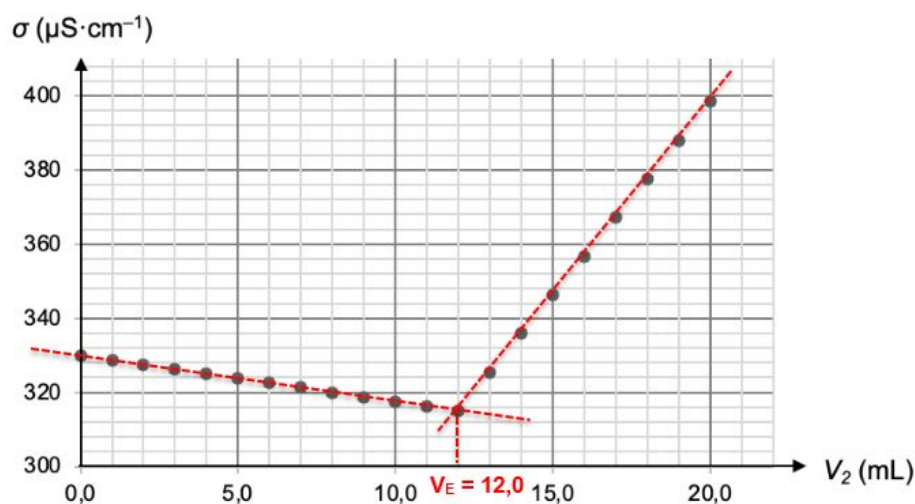
1. Produit de solubilité du chlorure d'argent : $K_s(\text{AgCl}) = [\text{Ag}^+_{(\text{aq})}] \times [\text{Cl}^-_{(\text{aq})}]$
2. La transformation chimique modélisant la formation du précipité de chlorure d'argent est la suivante :



L'expression de la constante d'équilibre K associée à la réaction est :

$$K = \frac{1}{[\text{Ag}^+_{(\text{aq})}] \cdot [\text{Cl}^-_{(\text{aq})}]} = \frac{1}{K_s(\text{AgCl})}$$

3. $K = \frac{1}{K_s(\text{AgCl})} = \frac{1}{2,0 \cdot 10^{-10}} = 5,0 \times 10^9$
4. Dans le cas présent, $K \gg 10^4$, la réaction chimique est totale et peut donc servir de support à un dosage.
5. Par détermination graphique sur l'annexe 1, le volume de $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ versé à l'équivalence V_E est égal à 12,00 mL :



6. À l'équivalence, les ions argent introduits $(\text{Ag}^+)_E$ et les ions chlorure initialement présents $(\text{Cl}^-)_i$ sont dans les proportions stoechiométriques : $n(\text{Cl}^-)_i = n(\text{Ag}^+)_E$
7. À l'équivalence $n(\text{Cl}^-)_i = n(\text{Ag}^+)_E$ soit :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_E$$

$$C_1 = \frac{C_2 \times V_E}{V_1}$$

$$C_1 = \frac{5,0 \times 10^{-3} \times 12,0}{10,0} = 6,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

8. Sachant que le lait trait dosé a été dilué 5 fois, la concentration C en ions chlorure initialement présents dans le lait trait étudié a pour valeur :

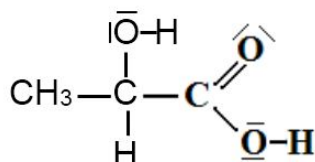
$$C = 5 \times C_1 = 5 \times 6,0 \times 10^{-3} = 3,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}.$$

9. La concentration massique C_m en ions chlorure initialement présents dans le lait trait étudié est : $C_m = C \times M(Cl)$
 $C_m = 3,0 \times 10^{-2} \times 35,5$ soit $C_m = 1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
10. La valeur de C_m étant comprise entre $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, la teneur en ions chlorure du lait trait respecte la norme en vigueur.
11. La transformation chimique modélisant la réaction de dosage entre l'acide lactique HA et les ions hydroxydes $\text{HO}^-_{(\text{aq})}$ a pour équation :
 $\text{HA}(\text{aq}) + \text{HO}^- (\text{aq}) \rightarrow \text{A}^- (\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} (\text{l})$
12. Il faut choisir un indicateur coloré dont la zone de virage encadre le pH à l'équivalence. Le pH à l'équivalence étant de 8,1, le rouge de phénol est approprié pour ce dosage.
13. On n'introduit que quelques gouttes d'indicateur coloré lors d'un dosage car un indicateur coloré est lui-même un acide faible qui pourrait perturber le dosage si ajouté en trop grande quantité.
14. Afin de montrer que le lait dosé est frais, on calcule d'abord sa concentration massique en acide lactique ($C_{m,A}$) à partir de la concentration molaire C_A :
 $C_{m,A} = C_A \times M(\text{HA}) = 1,8 \times 10^{-2} \times 90,0 = 1,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 Sachant qu'une concentration massique en acide lactique de $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ correspond à 1°D , une concentration de $1,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ correspondra à 16°D .
 Un lait est considéré comme frais si son degré Dornic est inférieur à 18°D ; dans ce cas, $16^\circ\text{D} < 18^\circ\text{D}$ donc on en conclut que le lait dosé est frais.

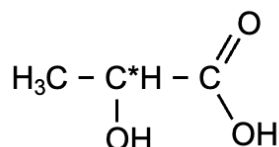
II. LES FERMENTATIONS DANS L'ÉLABORATION DES FROMAGES

A. La fermentation lactique

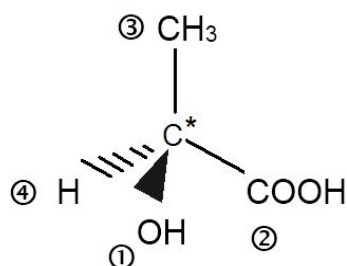
1. Schéma de Lewis de l'acide lactique :



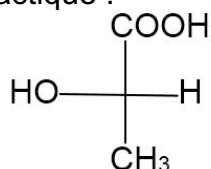
2. D'après la théorie VSEPR, l'atome de carbone du groupe fonctionnel $-\text{COOH}$ est de type AX_3 correspondant à une géométrie trigonale plane. L'atome de carbone relié au groupe hydroxyle $-\text{OH}$ est de type AX_4 et de géométrie tétraédrique.
3. La molécule d'acide lactique contient une fonction alcool ($-\text{OH}$) et une fonction acide carboxylique ($-\text{COOH}$).
4. Un carbone asymétrique est un atome de carbone relié à 4 atomes ou groupes d'atomes différents. La molécule d'acide lactique possède un atome de carbone asymétrique comme indiqué ci-dessous :



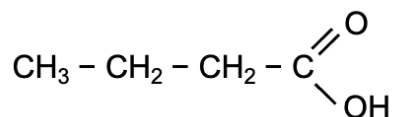
5. Projection de Cram de l'acide (S)-lactique



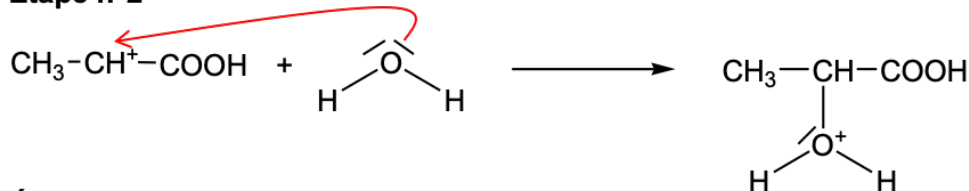
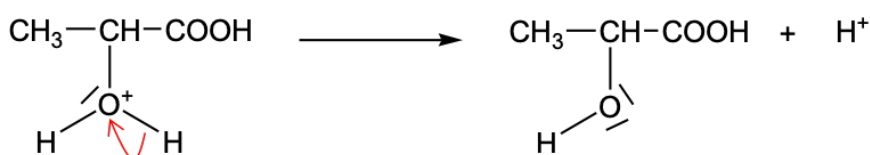
6. Projection de Fischer de l'énantiomère de configuration absolue S du (L)-acide lactique :

**B. La fermentation butyrique**

7. Formule de l'acide butanoïque

8. D'après le document en **annexe 2**, les deux bandes apparaissant à environ 1700 cm^{-1} et 3100 cm^{-1} , correspondent respectivement à la vibration de la liaison C=O et à la vibration de la liaison O-H.**C. De la découverte de l'acide lactique à la synthèse de l'acide lactique par voie chimique**

9. Mécanisme de l'hydratation de l'acide prop-2-énoïque

Étape n°1**Étape n°2****Étape n°3**10. Les ions H^+ sont consommés dans l'étape 1 du mécanisme réactionnel et régénérés dans l'étape 3 : ce sont des catalyseurs de la réaction.11. L'hydratation de l'acide prop-2-énoïque est une réaction d'**addition**.12. L'hydratation de l'acide prop-2-énoïque est une réaction d'addition **électrophile**.

III. OBSERVATION DES SPORES DU *PENICILLIUM ROQUEFORTI* PENDANT LA PHASE DE MATURATION DU ROQUEFORT

A. Observation à l'œil nu et pouvoir de résolution de l'œil

1. Détermination de l'angle θ :

$$\theta = \tan \theta = \frac{AB}{d_m}$$

$$\theta = \frac{5,0 \times 10^{-6}}{25 \times 10^{-2}} = 2,0 \times 10^{-5} \text{ rad}$$

2. Le pouvoir de résolution de l'œil est de $3,0 \times 10^{-4} \text{ rad}$. L'angle θ est inférieur à θ_m donc la spore de *Penicillium roqueforti* ne peut pas être observée à l'œil nu.

B. Utilisation d'un microscope

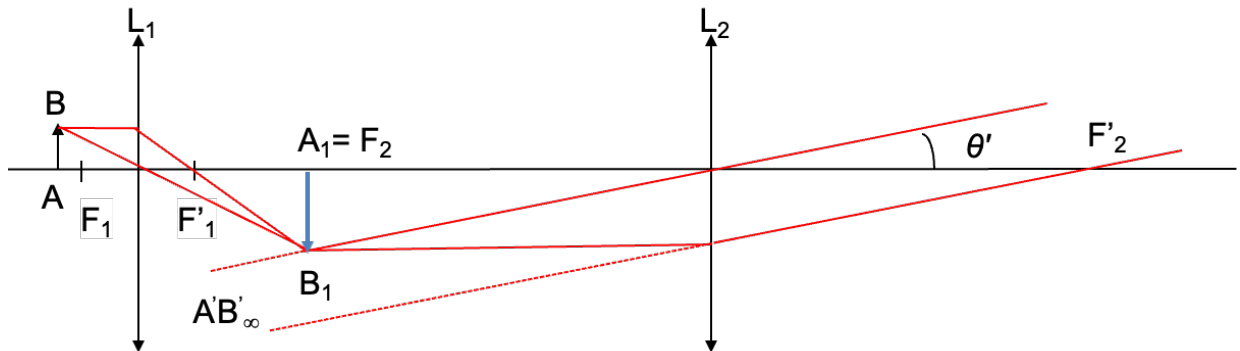
3. $AB_{\min} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin u}$

$$AB_{\min} = \frac{0,61 \times 600 \times 10^{-9}}{1,0 \times \sin 40^\circ} = 5,7 \times 10^{-7} \text{ m} = 0,57 \text{ } \mu\text{m}$$

4. $AB_{\min} < AB$ donc le microscope permet d'observer la spore de *Penicillium roqueforti*.

C. Observation de la spore de *Penicillium roqueforti* au microscope

5. Pour qu'un observateur puisse utiliser le microscope sans accommodation (image définitive rejetée à l'infini), l'image intermédiaire A_1B_1 doit se former au foyer objet F_2 de l'oculaire.
6. Schéma du principe de fonctionnement du microscope sans souci d'échelle :



7. Le grossissement commercial du microscope s'écrit :

$$G_c = \frac{\Delta}{4 \cdot f'_1 \cdot f'_2}$$

$$G_c = \frac{18 \times 10^{-2}}{4 \times 5,0 \times 10^{-3} \times 2,0 \times 10^{-2}} = 450$$

8. $G_c = \frac{\theta'}{\theta}$

9. $\theta' = G_c \times \theta$

$$\theta' = 450 \times 2,0 \times 10^{-5} = 9,0 \times 10^{-3} \text{ rad}$$

10. $\theta' > \theta_m$ donc la spore de *Penicillium roqueforti* est observable par l'œil de l'observateur à travers le microscope utilisé.

2022 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Stratégie de production de la protéine NS5 du virus de la Dengue par le système Gateway®

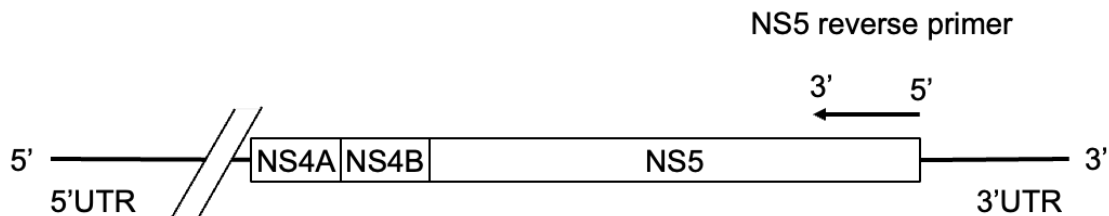
1. Obtention de la séquence codant la protéine NS5

1.1. Les étapes de préparation des ADNc double brin NS5 sont les suivantes :

- extraction / purification de l'ARN génomique viral
- synthèse du premier brin d'ADNc par rétrotranscription
- synthèse du deuxième brin d'ADNc et amplification par PCR

1.2. Lors d'une rétrotranscription, il est possible d'utiliser des amorces aléatoires (random hexamers), des amorces oligo(dT) ou une amorce spécifique de la séquence à rétrotranscrire.

Pour la rétrotranscription de l'ARN viral, une amorce spécifique de la séquence NS5 a été utilisée (NS5 reverse primer).



1.3. La rubrique « ORF location » indique la position de l'ORF NS5 : 7474 . . 10173

La rubrique « product » indique que l'ORF code l'ARN polymérase ARN dépendante NS5. Cette enzyme intervient donc dans la réplication du génome du virus de la dengue.

1.4. Les critères de choix des amorces sont par exemple :

- la complémentarité avec les séquences bordant la séquence cible à amplifier
- la longueur (suffisante pour permettre une hybridation spécifique sur l'ADN matrice)
- la proximité des températures de fusion de chaque amorce (pour permettre une hybridation suffisante des amorces à la même température d'hybridation)
- l'absence d'hybridation intra-caténaire (absence de formation de structure de type tige-boucle ou épingle à cheveu)
- la non-complémentarité de chaque amorce avec elle-même et avec l'autre amorce du couple (absence d'hybridation inter-caténaire)

1.5. La température de fusion « Tm » est la température pour laquelle la moitié des ADN double brin sont dénaturés.

Si la Tm des amorces est trop basse, les hybridations peuvent se faire à température ambiante et donc provoquer des amplifications non spécifiques avant le démarrage de l'amplification (sauf si le milieu réactionnel est maintenu à +4°C ou qu'une ADN polymérase « hot start » est utilisée).

Lors de l'élongation, à 72°C, il y a un risque de décrochage des amorces avant que l'ADN polymérase n'ait démarré, ce qui conduirait à une diminution de l'efficacité d'amplification.

1.6 L'analyse informatique indique :

Test	Explication
Length	La longueur chaque amorce est suffisante pour permettre une hybridation spécifique sur l'ADN matrice
% GC	Le pourcentage en GC de l'amorce sens est de 30 %, un peu trop faible pour permettre une hybridation suffisamment stable de l'amorce sur la séquence complémentaire Le pourcentage en GC de l'amorce antisens est de 50 %, correct
T _m	Les températures de fusion des amorces sont de 44°C et 43°C, elles sont proches mais faibles, l'amplification risque de perdre en efficacité
Self annealing	Deux amorces sens ne peuvent s'hybrider l'une avec l'autre (tête-bêche), et de même pour les amorces antisens. La conséquence de la formation de ce type de structure serait une diminution de la concentration effective en amorces dans le milieu réactionnel
Hairpin formation	Aucune des deux amorces ne peut s'hybrider sur elle-même en formant des structures de type tige-boucle ou épingle à cheveux. La conséquence de la formation de ce type de structure serait une diminution de la concentration effective en amorces dans le milieu réactionnel

2. Construction du vecteur d'entrée du système Gateway®

2.1. Les amplicons obtenus après chaque amplification sont les suivants :

Après PCR1	<i>attB1p</i>	TEV	NS5	TagS
------------	---------------	-----	-----	------

Après PCR2	attB1	TEV	NS5	TagS	attB2
------------	--------------	-----	-----	------	--------------

2.2. Une grande quantité de bactéries en phase de croissance exponentielle (culture jeune et concentrée) est mise en présence d'une solution contenant des cations divalents (*CaCl₂ ou autre*).

L'ADN à transformer est ajouté à froid (4°C) à la suspension de bactéries compétentes, puis le mélange est brièvement placé à 42°C. Ce choc thermique favorise la formation de nanopores réversibles dans les enveloppes bactériennes et permet l'entrée de l'ADN dans les cellules.

Les cellules sont ensuite placées à 37°C dans un milieu nutritif riche et non sélectif, de façon à régénérer leurs enveloppes.

2.3. La souche hôte doit être sensible à l'ampicilline et à la kanamycine (résistances à ces antibiotiques codées par les vecteurs utilisés dans ce clonage Gateway®).

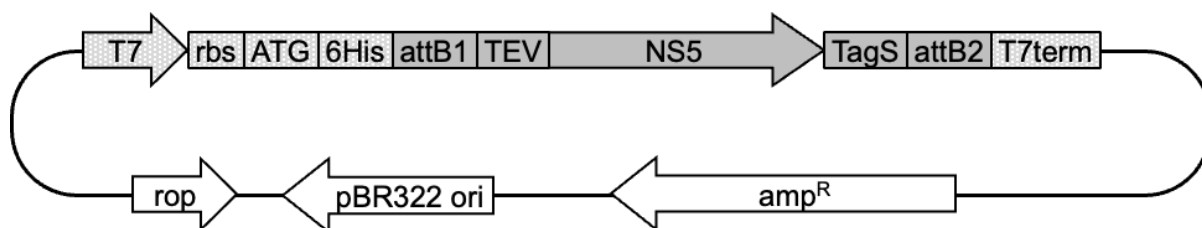
2.4. Les vecteurs « Entry » et « Donor » apportent la résistance à la kanamycine mais pas à l'ampicilline, donc les bactéries transformées par ces vecteurs ne cultiveront pas sur un milieu avec ampicilline.

Le vecteur « Destination » apporte la résistance à l'ampicilline, mais il porte aussi le gène *ccdB* qui est létal pour la bactérie. Les bactéries transformées par ce vecteur ne cultiveront donc pas (quel que soit le milieu).

Le vecteur « Expression » porte le gène de résistance à l'ampicilline mais pas le gène *ccdB*. Les bactéries transformées par ce vecteur seront les seules à cultiver sur le milieu sélectif + ampicilline.

3. Production de la protéine NS5

3.1. Le schéma du vecteur recombiné pDEST17-NS5 est le suivant :



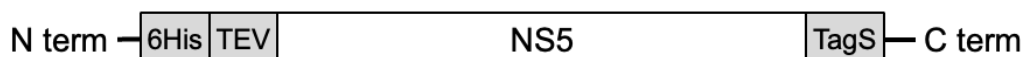
3.2. Les séquences nécessaires à la transcription sont :

- le promoteur T7 : séquence d'initiation de la transcription par recrutement de l'ARN polymérase T7
- le terminateur T7 (T7 term) : signal d'arrêt de la transcription

Les séquences nécessaires à la traduction sont :

- la séquence rbs (ribosome binding site) : séquence permettant la fixation du ribosome
- ATG : codon d'initiation de la traduction, codant pour la N-formyl-Met

3.3. La protéine NS5 recombinante peut être schématisée de la façon suivante :



3.4. L'étiquette 6His (et plus précisément les noyaux imidazole des histidines) permet la purification de la protéine recombinante sur colonne IMAC.

3.5. Le lysat brut a été déposé dans le puits 1. Il présente logiquement un grand nombre de bandes, correspondant à l'ensemble des protéines cellulaires.

Les fractions « non retenue » et « lavage », déposées dans les puits 2 et 3, présentent également un grand nombre de bandes (équivalent à l'extrait brut). Il s'agit des protéines non retenues par la colonne IMAC. Ces protéines sont majoritaires dans la cellule, le résultat est donc cohérent. *L'intensité des bandes dans la fraction de lavage est plus faible, parce que la fraction est probablement plus diluée que les autres (on utilise en général un grand volume de lavage) et parce que les protéines sont en quantité plus faible.*

La fraction « éluat » déposée dans le puits 4 montre une seule bande, donc une seule protéine, dont la taille est d'environ 100 kDa, cohérente avec la taille de la protéine NS5.

La purification est donc très efficace (apparemment une seule protéine présente dans l'éluat).

3.6. Le site TEV est situé entre l'étiquette 6His et la séquence de la protéine NS5, et permet donc d'éliminer l'étiquette 6His une fois la purification effectuée.

2022 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Étude des interactions entre la protéine Spike du virus SARS-CoV2 et le récepteur cellulaire ACE2

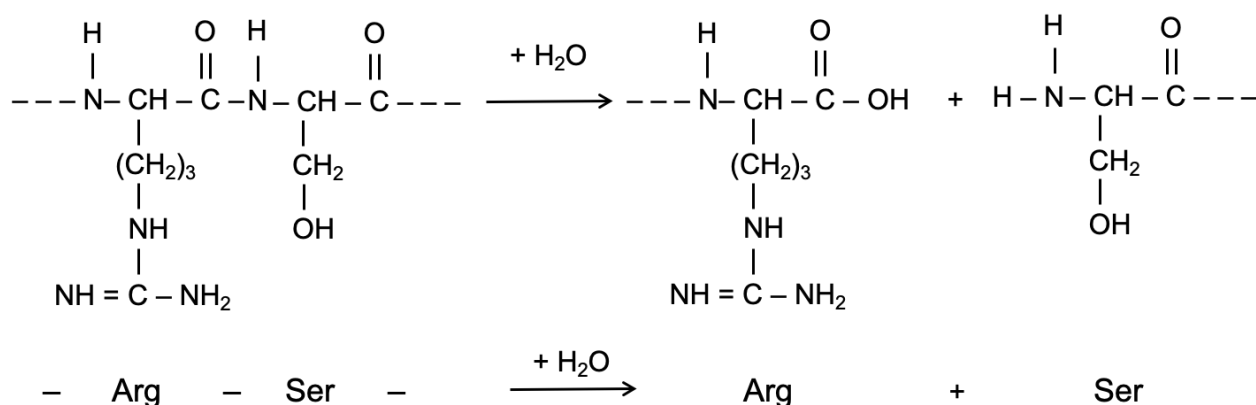
1. Étude des partenaires moléculaires favorisant l'entrée du virus dans la cellule hôte

1.1. Une **glycoprotéine** est une protéine dont la chaîne latérale de certains acides aminés est modifiée par ajout d'un résidu glucidique (= osidique).

Une protéine **homotrimérique** est constituée de trois (-tri-) sous-unités (-mériques) identiques entre elles (homo-).

Un **domaine** protéique est une portion de chaîne peptidique repliée de façon indépendante du reste de la protéine par des structures secondaires et tertiaires, et qui confère à cette région une fonction particulière.

1.2. L'équation de la réaction catalysée par la furine s'écrit :



1.3. La vitesse de réaction est suivie par l'apparition du produit, l'AMC, qui présente un maximum d'absorption à la longueur d'onde de 340 nm. Néanmoins, à 340 nm, le substrat de la réaction (peptidyl-AMC) absorbe également de façon importante. À 370 nm, l'absorbance de l'AMC reste suffisamment élevée pour être détectée et le peptidyl-AMC n'absorbe pas.

1.4. La vitesse initiale s'écrit :

$$v_i = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon_{\text{AMC}} \times \ell} \quad [\text{nmol}_{\text{AMC}} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}_{\text{MR}}^{-1}] = \left[\frac{\emptyset}{s} \times \frac{1}{\text{mL} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times \text{cm}} \right]$$

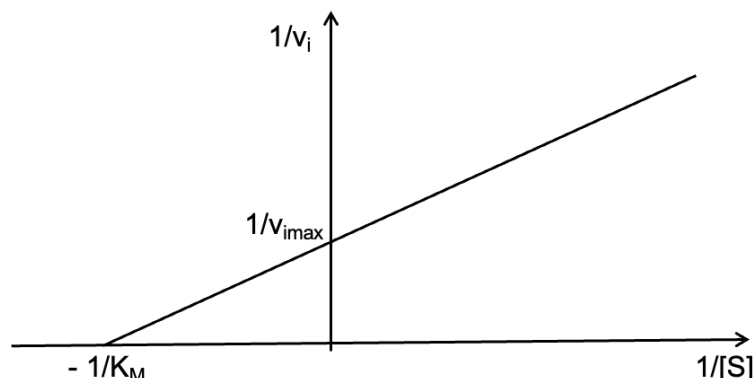
On convertit le coefficient d'extinction molaire de l'AMC en $\text{mL} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$\varepsilon_{\text{AMC}} = 7700 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = 7700 \times 10^3 \times 10^{-9} \text{ mL} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$v_i = \frac{0,35}{60} \times \frac{1}{7700 \times 10^{-6} \times 1}$$

$$v_i = 0,76 \text{ nmol}_{\text{AMC}} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}_{\text{MR}}^{-1}$$

- 1.5. La courbe du document 4 correspond à la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten par la méthode en doubles inverses et permet de déterminer v_{imax} et K_M par lecture graphique.



D'après le document 4, la vitesse initiale maximale ne varie pas quelle que soit la concentration en diminazène ($1/v_{\text{imax}}$ ne varie pas).

La constante de Michaelis K_M augmente lorsque la concentration en diminazène augmente (la valeur absolue de $1/K_M$ diminue, donc K_M augmente).

Le diminazène est donc un inhibiteur compétitif.

Le diminazène se loge dans le site actif de la furine à la place du substrat, et partage donc probablement une analogie structurale avec le substrat.

2. Étude de l'association Spike-ACE2

- 2.1. Dans une chromatographie d'exclusion stérique, l'extrait protéique est préparé puis analysé dans des solvants non dénaturants : tampon d'extraction puis tampon d'élution. Les interactions faibles entre protéines sont donc maintenues. En SDS-PAGE, les protéines sont dénaturées par ajout de SDS (détergent) et chauffage. Les interactions faibles sont déstabilisées par le SDS, conduisant à la séparation des protéines et/ou des sous-unités associées par des liaisons faibles.
- 2.2. L'électrophorégramme en SDS-PAGE de la fraction correspondant au pic I de la chromatographie d'exclusion stérique montre la présence de deux bandes, donc de deux chaînes peptidiques. Les masses moléculaires de ces protéines sont d'environ 150 kDa (bande située entre les bandes 130 et 250 kDa du marqueur de taille) et 80 kDa (bande située entre les bandes 72 et 95 kDa du marqueur de taille). Ces masses moléculaires correspondent à celles des protéines Spike* (150 kDa) et ACE2* (80 kDa). Le premier pic de la chromatographie d'exclusion contient donc les deux protéines Spike* et ACE2* associées par des liaisons faibles. L'analyse en SDS-PAGE des protéines contenues dans le pic II montre la présence d'une seule protéine d'environ 150 kDa, ce qui correspond à la taille de Spike*. L'analyse en SDS-PAGE des protéines contenues dans le pic III montre la présence d'une seule protéine d'environ 80 kDa, ce qui correspond à la taille de ACE2*. Les protéines Spike* et ACE2* sont donc capables d'interagir l'une avec l'autre (présence du pic I) mais pas totalement (présence des pic II et III).
- 2.3. Les acides aminés aromatiques absorbent à 280 nm, ce qui permet de suivre l'élution des protéines.

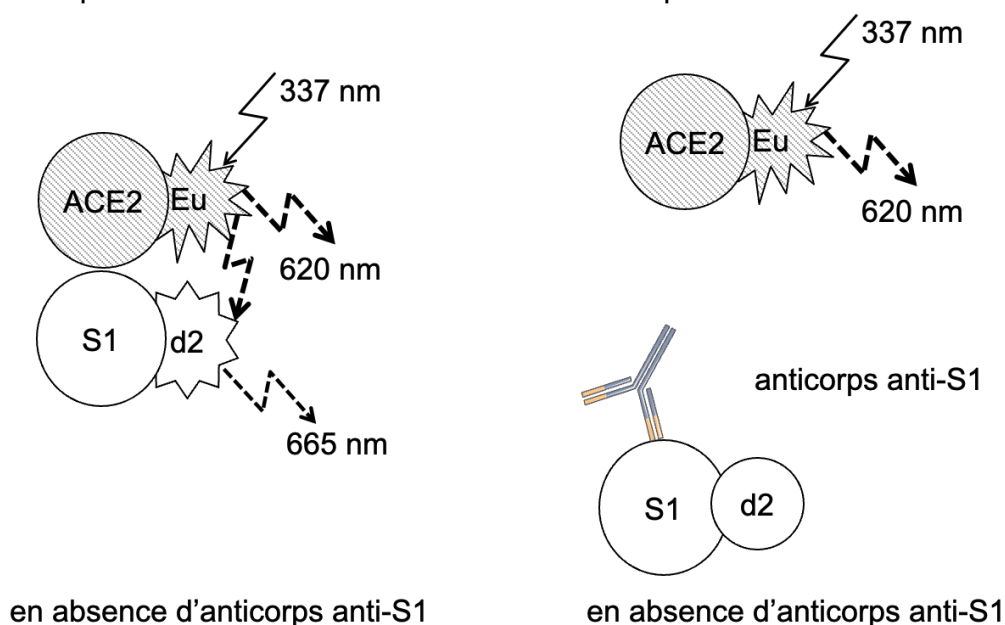
- 2.4. Lors d'une chromatographie d'exclusion stérique, les molécules sont éluées par ordre de masses moléculaires décroissantes (les plus volumineuses en premier).
Le pic I contient le complexe protéique Spike* / ACE2*, dont la masse moléculaire est de 230 kDa (150 kDa + 80 kDa). Ce complexe est élué en premier.
Les protéines Spike* (150 kDa) et ACE2* (80 kDa) sont éluées, respectivement, en deuxième et troisième, par ordre de masses moléculaires décroissantes, ce qui est cohérent avec le principe de la chromatographie d'exclusion.
- 2.5. L'ionisation de la chaîne latérale des acides aminés D (acide aspartique) et K (Lysine) à pH 7,4 est le suivant :

	4,1	7,4	10,5	pH
Asp	$-(CH_2)-COOH$	$-(CH_2)-COO^-$		
Lys		$-(CH_2)_4-NH_3^+$	$-(CH_2)_4-NH_2$	

- 2.6. Les chaînes latérales de l'acide aspartique et de la lysine portent des charges opposées et peuvent donc interagir par des liaisons ioniques (ou électrostatiques).
- 2.7. Dans le cas du virus SARS-CoV, la charge négative de l'acide aspartique (D30) est située face à une valine (V404), dont la chaîne latérale est aliphatique. Il ne peut donc y avoir interaction entre Spike et ACE2 dans le cas du virus SARS-CoV.

3. Recherche d'un anticorps neutralisant l'association Spike-ACE2

- 3.1. En absence d'anticorps neutralisant, les sous-unités ACE2 et S1 interagissent, ce qui conduit au rapprochement des fluorophores Eu et d2 et permet le transfert d'énergie de fluorescence. Après excitation à 337 nm, on observe une fluorescence émise à 620 nm (Eu) et 665 nm (d2).
En présence d'anticorps anti-S1, le rapprochement entre Eu et d2 n'est pas effectif et il n'y a pas de transfert d'énergie de fluorescence. Après excitation à 337 nm, on observe uniquement la fluorescence émise à 620 nm par Eu.



- 3.2. En absence d'anticorps neutralisant, le fluorophore d2 est excité par l'émission produite par Eu, et émet à son tour une fluorescence à 665 nm. En conséquence, $IF_{665\text{ nm}}$ est élevée en absence d'anticorps neutralisant. Cependant $IF_{620\text{ nm}}$ n'est pas nulle puisque seule une partie de la fluorescence émise par Eu est transmise à d2. En présence d'anticorps neutralisant, le fluorophore Eu émet une fluorescence à 620 nm qui ne peut pas être transmise à d2. En conséquence, $IF_{620\text{ nm}}$ est élevée en présence d'anticorps neutralisant.
- Plus l'interaction entre ACE2-Eu et S1-d2 sera importante, plus l'émission de d2 à 665 nm sera élevée par rapport à l'émission de Eu à 620 nm. Le rapport « $IF_{665\text{ nm}} / IF_{620\text{ nm}}$ » permet donc de mesurer la quantité de complexe ACE2-Eu_S1-d2 formé.
- 3.3. Tester différentes dilutions de l'anticorps anti-S1 permet de quantifier l'effet de la concentration en anticorps sur la neutralisation de l'interaction entre ACE2-Eu et S1-d2.
- Par report graphique, on lit pour le point expérimental : $\log(C_{\text{anticorps}}) = 0,5$
D'où une concentration en anticorps $C_{\text{anticorps}} = 10^{0,5} \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1} = 3,2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$.
- 3.4. Pour une même concentration en anticorps (par exemple pour $\log(C_{\text{anticorps}}) = 0,5$) , on observe que le rapport $IF_{665\text{ nm}} / IF_{620\text{ nm}}$ est plus élevé pour l'anticorps Ac1 que pour l'anticorps Ac2. Ceci traduit une meilleure neutralisation de l'interaction entre ACE2 et S1 par l'anticorps Ac2 que par l'anticorps Ac1.
- Il est possible de déterminer C_{50} , la concentration en anticorps pour laquelle le rapport $IF_{665\text{ nm}} / IF_{620\text{ nm}}$ est diminué de moitié.
- Pour Ac1, la diminution de moitié du rapport $IF_{665\text{ nm}} / IF_{620\text{ nm}}$ est atteinte pour $C_{\text{anticorps}} = 3,2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (point expérimental marqué).
- Pour Ac2, la diminution de moitié du rapport $IF_{665\text{ nm}} / IF_{620\text{ nm}}$ est atteinte pour $C_{\text{anticorps}} = 10^{-0,5} = 0,32 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Il faut donc 10 fois plus d'anticorps Ac1 que d'anticorps Ac2 pour obtenir la même neutralisation de l'interaction entre ACE2 et S1 : Ac2 est dix fois plus efficace que Ac1.

2022 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Les probiotiques

1. Les effets bénéfiques des probiotiques

- 1.1. Le terme « nu » fait référence à l'enveloppe virale (et à son absence dans le cas présent), « icosaédrique » fait référence à la structure de la capsid (20 faces triangulaires), et « ARN bicaténaire » fait référence à la nature et à l'organisation du génome viral.
- 1.2. Les cellules cibles sont reconnues par les spicules, constitués par la protéine VP4 d'après le document 1.
Les deux étapes de synthèse des ARN viraux sont la réplication (pour la copie de l'information génétique) et la transcription (pour la production d'ARNm viraux).
L'enzyme qui réalise ces étapes est une ARN polymérase ARN dépendante d'origine virale, puisque cette activité enzymatique n'existe pas dans les cellules eucaryotes.
- 1.3. Pour être infectées par un Rotavirus les cellules doivent être sensibles, c'est-à-dire présenter à leur surface des récepteurs reconnus spécifiquement par le virion.
- 1.4. Les souris contrôles ne reçoivent pas de traitement après infection par le Rotavirus et présentent un niveau d'expression des gènes du Rotavirus égal à 1, ce niveau étant un indicateur de la sévérité de l'infection.
Les souris ayant reçu un traitement à base de souches de *Lactobacillus ruminis* présentent toutes un niveau d'expression viral significativement plus faible que les souris contrôles. L'expression des gènes du Rotavirus est diminuée de moitié (niveau d'expression compris entre 0,4 à 0,6 selon la souche de *Lactobacillus ruminis* utilisée).
L'espèce *Lactobacillus ruminis* exerce donc un effet antiviral sur le Rotavirus.

2. Production d'acide lactique par *Lactobacillus reuteri*

- 2.1. Les bactéries utilisant la voie A sont dites hétérofermentaires car elles produisent de l'acide lactique plus d'autres molécules (ici de l'éthanol et du CO₂), alors que les bactéries utilisant la voie B sont dites homofermentaires car elles ne produisent que de l'acide lactique.
- 2.2. La voie A produit globalement 1 ATP (2 ATP produits pour 1 ATP consommé) alors que la voie B produit globalement 2 ATP (4 ATP produits pour 2 ATP consommés). La voie B est donc plus énergétique que la voie A.
- 2.3. Pour affirmer que deux souches appartiennent à la même espèce, il faut que :
 - le pourcentage d'hybridation ADN/ADN de leur génome soit supérieur à 70 %,
 - la température de fusion (T_m) de l'hétéroduplex formé par l'hybridation des deux génomes aient un écart maximum de 5°C avec la T_m de l'homoduplex
 - les séquences de leurs ARN ribosomiques 16S soient identiques à plus de 97 %
 - leur pourcentage en GC soient identiques (condition nécessaire mais pas suffisante)
- 2.4. Dans le milieu MRS, les principales sources de carbone (glucose, peptones, extrait de levure) sont organiques, tout comme la principale source d'électron (glucose utilisé dans les voies fermentaires). Les voies métaboliques utilisées produisent de l'énergie chimique par oxydo-réduction. Les souches cultivant sur ce milieu sont donc chimiotrophes (source d'énergie chimique), organotrophes (source d'électrons organique) et hétérotrophes (source de carbone organique).

Le milieu MRS est par ailleurs un milieu empirique (composition précise inconnue), riche (plusieurs sources de facteurs de croissance), et sélectif des lactobacilles (acétate de sodium).

- 2.5. D'après le document 5, la souche DSM 20016 acidifie le milieu plus rapidement que les souches ATCC 53608 et DSM 17938, ce qui signifie que la première produit davantage d'acide lactique que les deux autres.

La différence d'acidification observée entre les trois souches peut s'expliquer :

- soit par la nature de la voie fermentaire utilisée : la souche DSM 20016 utilisant la voie homolactique (dont le bilan est de 2 molécules d'acide lactique par molécule de glucose oxydée), les deux autres souches utilisant la voie hétérolactique (dont le bilan est d'une seule molécule d'acide lactique par molécule de glucose oxydée)
- soit par l'utilisation de la même voie métabolique pour les trois souches, mais avec des efficacités métaboliques différentes pour chacune.

Une manière de trancher entre ces deux hypothèses serait de mettre en évidence un coproduit de fermentation de la voie hétérolactique, par exemple le CO₂ en utilisant une cloche de Durham, permettant de capturer les gaz dans un milieu liquide en tube.

- 2.6. Le traitement de l'échantillon à l'acide trichloroacétique (TCA) permet de faire précipiter les protéines et de tuer les bactéries.

La centrifugation permet de séparer les particules solides (précipité de protéines et débris cellulaires) du surnageant où se trouvent les métabolites en solution.

La filtration permet d'éliminer les particules de diamètre supérieur à 0,22 µm, dont les éventuelles bactéries encore intactes.

- 2.7. Le rendement total de conversion $R_{P/S}$ pour la souche DSM 20016 s'écrit :

$$R_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{12 - 0}{26 - 0} = 0,46 \text{ g d'acide lactique par gramme de glucose}$$

La productivité volumique horaire à 10 h (PVH_{10h}) et totale (PVHT) s'écrivent :

$$PVH = \frac{\Delta P}{\text{temps de production}}$$

$$\Rightarrow PVHT = \frac{12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{24 \text{ h}} = 0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$\Rightarrow PVH_{10h} = \frac{9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{10 \text{ h}} = 0,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Le calcul de la PVH_{10h} correspond à la productivité volumique horaire maximale pour cette fermentation. Elle indique la durée optimale de conduite du procédé.

- 2.8. Tableau complet des paramètres de production :

Souche	DSM 17938	ATCC 53608	DSM 20016
$R_{P/S}$ en g de lactate par g de glucose	0,54	0,47	0,46
PVH à 10 h en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0,50	0,35	0,90
PVHT en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0,52	0,31	0,50

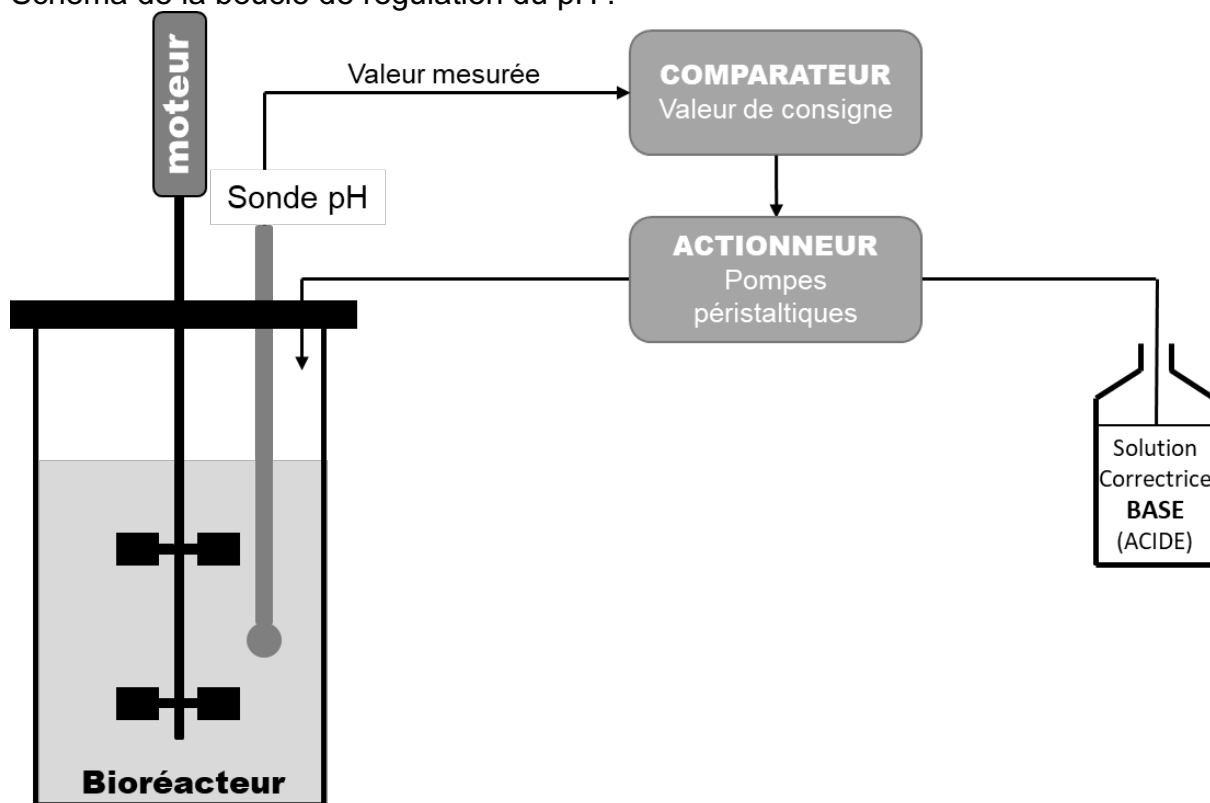
La souche DSM 17938 présente le meilleur rendement global de conversion (elle utilise mieux son substrat).

Cependant, la souche DSM 20016 présente une PVHT similaire et une PVHM bien supérieure (elle produit beaucoup plus vite).

Il est donc plus rentable d'utiliser la souche DSM 20016 sur des cycles de procédés de 10 h, plutôt que la souche DSM 17938 sur des cycles de procédés de 24 h.

3. Production industrielle de probiotiques

3.1. Schéma de la boucle de régulation du pH :



- 3.2. Sans régulation du pH, la PVH en biomasse est environ 5 fois plus faible que lorsque le pH est régulé. La régulation permet de maintenir le pH à une valeur fixe et stable. On peut donc déduire que l'acidification résultant du métabolisme microbien devient un facteur limitant la croissance des souches.
- 3.3. Le document 9 montre l'effet de la lyophilisation sur la viabilité des souches, avec ou sans additifs. Sans additifs, la viabilité cellulaire baisse d'environ 60 %, alors qu'en présence de tréhalose et de saccharose, elle ne baisse que de 10 à 15 %. La lyophilisation est un procédé qui consiste à éliminer l'eau d'une préparation par congélation de la préparation puis sublimation de la glace à basse pression. Le tréhalose et le saccharose ont un rôle cryoprotecteur en limitant la formation des cristaux de glace à l'intérieur des cellules, favorisant ainsi leur survie lors de la congélation.

2022 - U42 : Biologie cellulaire

L'inhibition de contact : étude, régulation et conséquences de sa dérégulation

1. Implication de YAP sur la prolifération cellulaire

1.1. Analyse des composants du milieu DMEM : F-12

Sels minéraux	macroéléments (de l'ordre du g·L ⁻¹)	Maintien de la pression osmotique (Na ⁺ , Cl ⁻) Maintien du potentiel de membrane (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻) Interactions favorisant l'adhérence (Ca ⁺) Second messenger chimique (Ca ⁺) Cofacteurs enzymatique (Mg ²⁺)
	microéléments (de l'ordre du mg·L ⁻¹)	Cofacteurs enzymatiques (Fe ²⁺ , Zn ²⁺)
Glucide		Source de carbone et d'énergie (glucose)
Acides aminés		Source d'azote ou synthèse protéique
Vitamines		Coenzymes ou précurseurs de coenzymes
Système de tampon pH		Maintien du pH (Hepes)
Indicateur coloré de pH		Estimation de la valeur du pH (Rouge de phénol) détection d'une contamination microbienne

1.2. La lignée MCF10A est une lignée continue d'origine humaine et de type cellulaire épithélial mammaire.

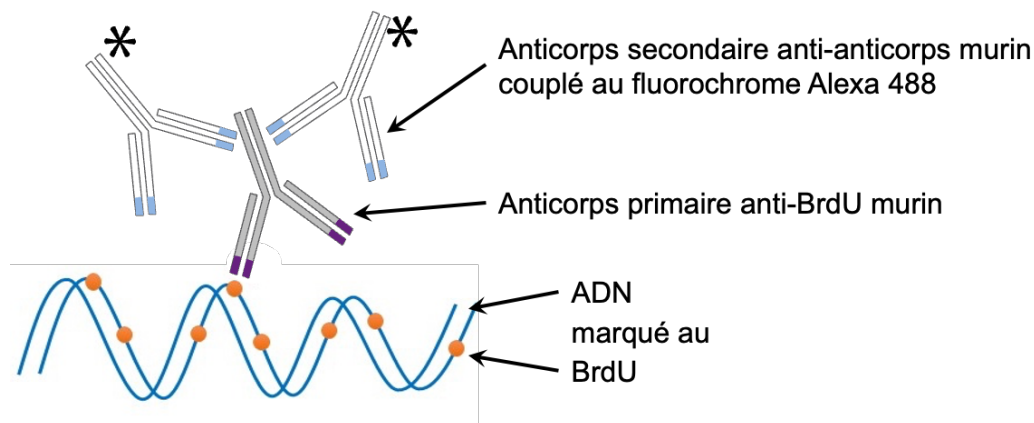
Il s'agit d'une lignée de cellules adhérentes, sur lesquelles il est donc possible d'étudier l'inhibition de contact, et immortalisée, ce qui permet d'étudier la prolifération cellulaire.

1.3. Le BrdU est un analogue structural de la thymidine, il est donc incorporé dans l'ADN à la place de la thymidine au cours de la réplication de l'ADN.

Le *pulse* correspond à une exposition brève (1 heure) des cellules au BrdU avant fixation. Dans ces conditions, seules les cellules qui sont en cours de réplication de l'ADN, donc en phase S du cycle cellulaire, incorporent le BrdU. Les cellules en phase G1, G2 ou M, dont la réplication de l'ADN n'est pas en cours, ne sont pas marquées.

1.4. Le triton perméabilise les membranes biologiques pour permettre aux anticorps d'atteindre leur cible antigénique.

1.5. Schéma de l'édifice moléculaire en cas de marquage positif :



- 1.6. Le DAPI est un agent intercalant de l'ADN qui diffuse à travers la membrane plasmique et qui marque donc l'ADN de toutes les cellules.

$$\% \text{ cellules en phase S} = \frac{\text{nombre de cellules marquées par l'anticorps } \alpha\text{BrdU}}{\text{nombre total de cellules marquées par le DAPI}} \times 100$$

- 1.7. Dans le cas des cellules transfectées avec l'ARN interférent contrôle « siCo », le document 2B montre que plus la culture cellulaire est dense, moins il y a de cellules en réplication (forte diminution du marquage par l'anticorps anti-BrdU).
Le document 2C permet de quantifier cette diminution de la prolifération cellulaire : ainsi les pourcentages de prolifération sont de 40 %, 30 % et 10 % avec des cellules peu denses, confluentes et très denses, respectivement.
Dans le cas des cellules transfectées avec l'ARN interférent « siY » inhibant la traduction de YAP « siY », le pourcentage de prolifération cellulaire est très faible (5 %) et constant quelle que soit la densité cellulaire.
La protéine YAP active donc la prolifération cellulaire.

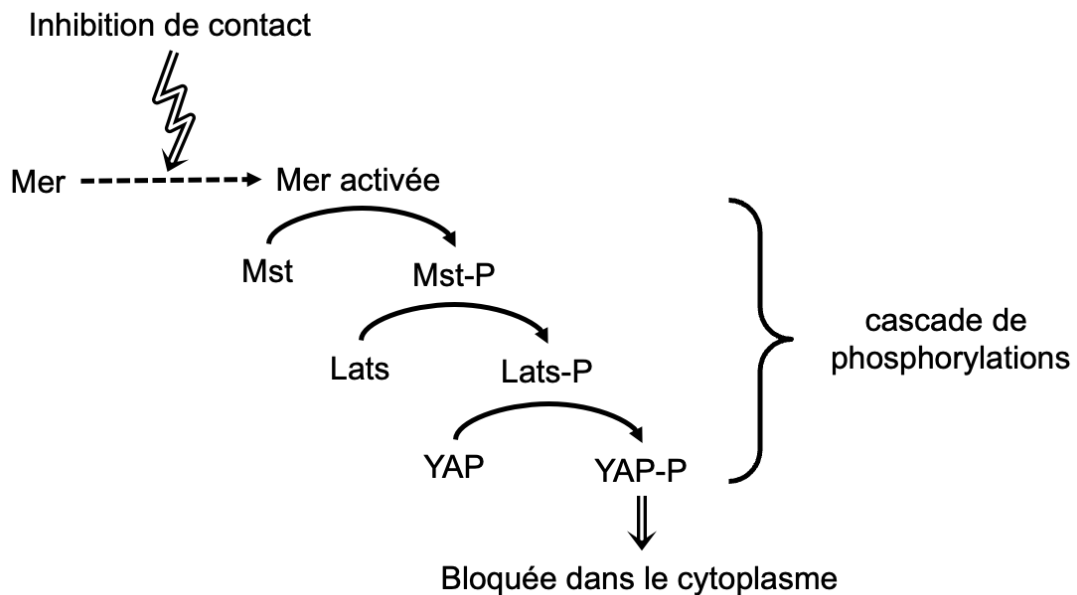
2. Étude de la localisation intracellulaire de la protéine YAP

- 2.1. L'analyse des résultats d'immunofluorescence du document 3B montrent une fluorescence associée à l'anticorps anti-YAP essentiellement présente dans le noyau pour la culture peu dense alors que dans la culture très dense, la fluorescence n'est présente que dans le cytosol.
La quantification de la fluorescence (document 3C) montre que la protéine YAP est majoritairement localisée dans le noyau pour une culture peu dense (70 %) et que cette proportion diminue lorsque la densité cellulaire augmente (respectivement 50 % puis 5 % de protéine YAP dans le noyau pour les cultures confluentes et très denses). Inversement, la proportion de protéine YAP cytosolique augmente avec la densité cellulaire : 0 %, 5 % et 60 % de protéine YAP dans le cytosol dans le cas des cultures peu dense, confluentes et très dense, respectivement.
Ainsi, plus la densité cellulaire augmente, plus la protéine YAP est présente dans le cytosol.
- 2.2. Le Western blot montre que l'intensité de la bande associée à la protéine YAP non phosphorylée diminue lorsque la densité cellulaire augmente, jusqu'à devenir inexistante dans le cas d'une culture très dense. Inversement, l'intensité des bandes associées à la protéine YAP phosphorylée augmente avec la densité cellulaire, et est nulle dans le cas d'une culture peu dense.
Or il a été montré que la localisation cytosolique de la protéine YAP augmentait avec la densité cellulaire (question 2.1.). La protéine YAP non phosphorylée est donc située dans le noyau alors que la protéine phospho-Yap est localisée dans le cytosol.
La phosphorylation de la protéine YAP est donc associée et probablement responsable de sa localisation cytosolique.
- 2.3. Dans la condition expérimentale n°1, les cellules MCF10A expriment seulement la protéine Gal4-TEAD4 (absence de transfection). Il s'agit donc d'un contrôle permettant de vérifier que Gal4-TEAD4 ne suffit pas à initier la transcription du gène codant la luciférase (par une éventuelle interaction de TDEA4 avec une autre protéine cellulaire). Le résultat observé est cohérent avec le résultat attendu : activité luciférase proche de zéro.
Dans la condition expérimentale n°2, les cellules MCF10A expriment la protéine Gal4-TEAD4 et le cofacteur activateur YAP (transfection par un plasmide permettant la surexpression de cette protéine). Il s'agit d'un contrôle permettant de valider la transcription effective du gène codant la luciférase après interaction entre TDEA4 et YAP. Le résultat observé est cohérent avec le résultat attendu : forte activité luciférase (maximale), de l'ordre de 130 uA.

2.4. Dans la condition expérimentale n°3, les cellules MCF10A expriment la protéine Gal4-TEAD4, le cofacteur activateur YAP et l'ensemble des protéines Mst, Lats et Mer. L'expression relative de la luciférase est alors très faible, de l'ordre de 5 uA, soit environ 24 fois moins que le contrôle positif. L'interaction entre TEAD4 et le cofacteur activateur YAP n'est donc plus effective lorsque les trois protéines de la voie de signalisation Hippo sont présentes.

Ainsi, lorsque YAP n'est pas phosphorylée, elle est active (condition expérimentale n°2), et lorsque YAP est phosphorylée (par les protéines de la voie de signalisation Hippo), elle est inactive (condition expérimentale n°3).

2.5. Schéma de la voie de signalisation « Hippo-YAP » dans le cas d'une inhibition de contact :



2.6. D'autres caractéristiques d'une cellule tumorale sont par exemple :

- une prolifération anarchique et indépendante des stimuli externes (facteurs de croissance)
- une perte d'adhérence car perte d'expression des protéines impliquées dans l'adhérence des cellules
- une résistance à l'apoptose car modification des systèmes de contrôle de la mort cellulaire
- une angiogenèse favorisée par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques
- une dérégulation énergétique par la consommation excessive de glucose

2.7. Un proto-oncogène est un gène dont l'expression active le cycle cellulaire et qui est susceptible de devenir, à la suite d'une ou plusieurs mutations « gain de fonction », un oncogène.

2.8. Lorsque la densité cellulaire augmente (inhibition de contact), la voie de signalisation « Hippo-YAP » est activée. La protéine YAP est alors phosphorylée, inactive et localisée dans le cytosol.

La perte de l'inhibition de contact peut être due à une mutation de YAP empêchant sa phosphorylation. Dans ce cas, même après activation de la voie de signalisation « Hippo-YAP », la protéine YAP resterait déphosphorylée, active et localisée dans le noyau. Elle permettrait alors l'expression de gènes impliqués dans l'activation du cycle cellulaire d'où une prolifération cellulaire excessive responsable de l'apparition d'un cancer.

Session 2023 : Sujets

2023 - U11 : Mathématiques

Durée : 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : calculatrice avec mode examen actif
calculatrice sans mémoire, « type collègue »

EXERCICE 1 (10 points)

Les deux parties peuvent être traitées indépendamment.

Afin de vérifier la bonne isolation thermique d'un spa, on porte la température de l'eau du spa à 38 °C puis on coupe l'alimentation électrique du spa qui sert à chauffer l'eau. On s'intéresse à l'évolution de cette température en fonction du temps écoulé à partir de cette coupure.

La température de l'eau du spa est modélisée par une fonction f qui, à tout temps t (en heures) écoulé depuis la coupure de l'alimentation électrique, associe la température $f(t)$, en degré Celsius (°C), de l'eau du spa au temps t . On admet que $f(0) = 38$.

Lors de cette vérification, la température ambiante extérieure au spa reste constante et égale à 25 °C. On remarque que la température de l'eau du spa est de 37 °C au bout de 1,5 h.

Partie A

On admet que la fonction f est la solution sur l'intervalle $[0; +\infty[$ de l'équation différentielle (E) d'inconnue y de la variable réelle t : $y' + 0,05y = 1,25$ et qui vérifie la condition $f(0) = 38$.

1. Déterminer les solutions de l'équation différentielle $y' + 0,05y = 0$ sur l'intervalle $[0; +\infty[$.
2. Déterminer sur l'intervalle $[0; +\infty[$ une fonction constante solution particulière de l'équation différentielle (E).
3. En déduire les solutions de l'équation différentielle (E) : $y' + 0,05y = 1,25$.
4. Montrer que, pour tout réel t de l'intervalle $[0; +\infty[$, $f(t) = 13e^{-0,05t} + 25$.

Partie B

On admet que, pour tout réel t de l'intervalle $[0; +\infty[$, $f(t) = 13e^{-0,05t} + 25$

1. Calculer la valeur arrondie à 10^{-1} de $f(24)$. Interpréter cette valeur dans le contexte de l'exercice.
2. a) Pour tout réel t de l'intervalle $[0; +\infty[$, déterminer une expression de $f'(t)$.
b) En déduire le sens de variation de la fonction f sur l'intervalle $[0; +\infty[$. Ce sens de variation paraît-il cohérent avec le contexte de l'exercice ? Argumenter.
3. a) Déterminer la limite de la fonction f en $+\infty$.
b) Interpréter la valeur de cette limite dans le contexte de l'exercice.
4. Une alarme sonore est émise quand la température de l'eau du spa devient strictement inférieure à une température programmée par l'utilisateur.
a) L'utilisateur programme la température de l'eau du spa à 36 °C. Déterminer, par le calcul, combien de temps après coupure de l'alimentation électrique cette alarme sonore retentira. On donnera la valeur exacte de cette durée puis la valeur arrondie à la minute.

- b) Quelle est la valeur numérique affichée par l'algorithme ci-dessous ?

```

H ← 0
T ← 38
Tant que H ≥ 34
    H ← H + 1
    T ← 13e-0,05H + 25
Fin du tant que
Afficher H

```

- c) Expliquer ce que cet algorithme permet de déterminer dans le contexte de l'exercice.

EXERCICE 2 (10 points)

Les trois parties de cet exercice sont indépendantes.

Une minoterie (établissement qui fabrique des farines de céréales) reçoit chaque jour des camions de blé. Ce blé est destiné à être transformé en farine. La farine fabriquée est ensuite vendue à des boulangers industriels ou à des artisans boulangers.

Partie A

Dans la minoterie, on procède à deux contrôles qualité à l'arrivée d'une livraison de blé : l'un sur l'extensibilité d'une pâte obtenue à partir de la farine fabriquée avec un échantillon du blé livré, l'autre sur le taux d'humidité du blé livré.

- Un technicien broie une quantité de blé représentatif d'une livraison. Il obtient une farine, avec laquelle il fabrique cinq échantillons de qualité identique de pâte. Il mesure l'indice d'extensibilité, en mm, de chacun de ces échantillons. Voici les résultats obtenus

	Indice d'extensibilité en mm
Échantillon n°1	104
Échantillon n°2	81
Échantillon n°3	83
Échantillon n°4	57
Échantillon n°5	55

- Donner la moyenne $\bar{x}$ de cette série et son écart-type arrondi au centième.
- Dans cette question, on considère que l'écart-type de la série est $\sigma = 18$ mm.

Le processus qualité impose de procéder à un test sur cinq nouveaux échantillons de pâte si l'une des cinq valeurs de la série précédente est en dehors de l'intervalle $[\bar{x} - 2\sigma, \bar{x} + 2\sigma]$.

Vérifier que le technicien n'a pas besoin de procéder à un test sur cinq nouveaux échantillons de pâte.

2. Deux camions, en provenance d'une même exploitation agricole, sont arrivés. Le technicien utilise un humidimètre qui indique le taux d'humidité, mesuré en pourcentage, du blé livré dans chaque camion :

- le premier contient 29 540 kg de blé présentant un taux d'humidité global de 12,4 % ;
- le second contient 14 540 kg de blé présentant un taux d'humidité global de 14,1 %.

Le cahier des charges exige un taux d'humidité inférieur à 13 % dans un même silo. Lors du déchargement des deux camions dans un même silo, les blés seront mélangés.

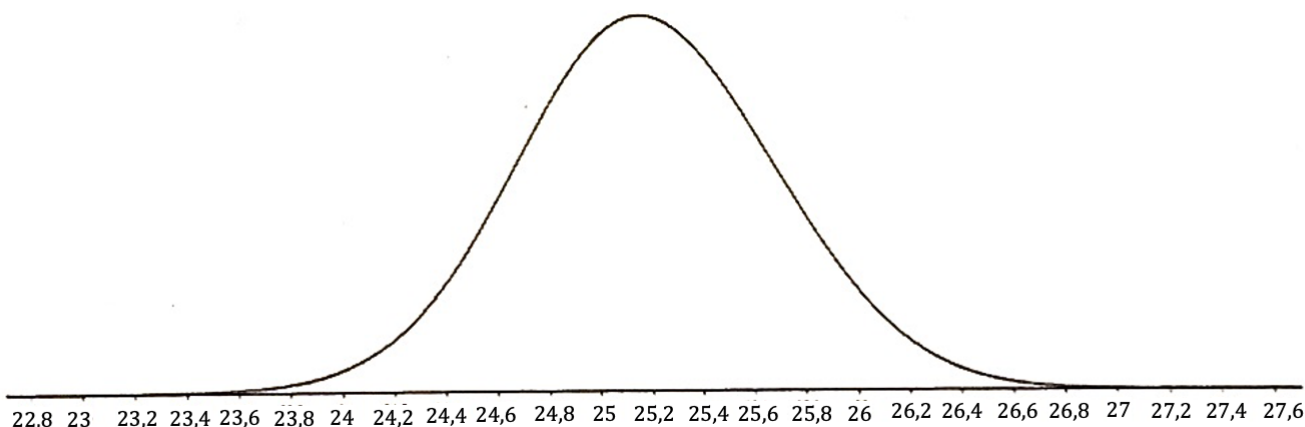
Montrer que le technicien peut autoriser le déchargement des deux camions dans un même silo vide.

Partie B

La farine fabriquée par la minoterie est conditionnée dans des sacs destinés à être vendues aux boulangers. On note X la variable aléatoire qui, à chaque sac de farine, associe son poids en kg. On admet que la variable aléatoire X suit la loi normale de moyenne 25,2 kg et d'écart-type 0,1.

On prélève un sac au hasard dans la production.

1. Un sac ne peut pas être vendu s'il a une masse inférieure à 25 kg. Quelle est la probabilité, à 10^{-3} près, pour que ce sac ait une masse inférieure à 25 kg ?
2. a) Donner un réel h tel que : $P(25,2 - h \leq X \leq 25,2 + h) \approx 0,95$ à 10^{-2} près.
b) On a tracé ci-dessous la représentation graphique d'une fonction de densité. Expliquer pourquoi cette représentation ne peut pas être celle de la fonction de densité de la variable aléatoire X .



Partie C

Un commercial de la minoterie présente à ses clients une nouvelle farine appelée *La Romaine*. On dispose des données suivantes :

- 70 % des clients de la minoterie sont des artisans boulangers, les autres sont des boulangers industriels,
- parmi les artisans boulangers, 38 % acceptent de tester la farine *La Romaine* ;
- parmi les boulangers industriels, 25 % acceptent de tester la farine *La Romaine*.

On choisit un client de la minoterie au hasard.

On note A l'évènement « le client est un artisan boulanger » et T l'évènement « le client accepte de tester la farine *La Romaine* ».

1. Représenter la situation décrite par un arbre pondéré.
2. a) Calculer la probabilité de l'évènement « le client est un artisan boulanger et il accepte de tester la farine *La Romaine* ».
b) Montrer que la probabilité de l'évènement « le client accepte de tester la farine *La Romaine* est égale à 0,341 ».
3. Un client ayant testé la farine *La Romaine* reprend contact avec le commercial de la minoterie. Quelle est la probabilité, arrondie à 10^{-3} , que ce soit un artisan boulanger ?
4. On choisit au hasard 200 clients de la minoterie. Les clients de la minoterie sont suffisamment nombreux pour assimiler ce choix à un tirage avec remise. On note Y la variable aléatoire qui, à un échantillon de 200 clients, associe le nombre de clients qui ont testé la farine *La Romaine*.
On admet que la variable aléatoire Y suit la loi binomiale de paramètres n et p , avec $n = 200$ et $p = 0,341$.
a) Quelle est la probabilité, arrondie à 10^{-3} , qu'au plus 60 des 200 clients choisis aient testé la farine *La Romaine* ?
b) Calculer l'espérance de la variable aléatoire Y et interpréter dans le contexte de l'exercice.

2023 - U12 : Sciences physiques et chimiques

Durée : 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : calculatrice avec mode examen actif
calculatrice sans mémoire, « type collègue »

Les annexes 2 et 5 sont à rendre avec la copie.

Les données numériques sont indiquées dans chaque exercice.

De nombreuses questions peuvent être traitées indépendamment les unes des autres.

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.

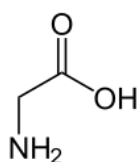
De l'analyse chimique, à la détection par les phénomènes de radioactivité et de fluorescence, les sciences physiques et chimiques fournissent des éléments de compréhension utiles à l'étude des acides α -aminés.

I. CARACTÉRISTIQUES DE QUELQUES ACIDES α -AMINÉS (17 points)

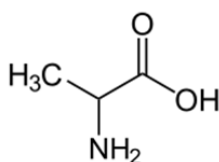
Les acides α -aminés sont les éléments de construction des protéines. Ils jouent un rôle essentiel dans la structure, le métabolisme et la physiologie des cellules des êtres vivants.

De par leur propriété amphotère, les acides α -aminés se comportent à la fois comme des acides et comme des bases.

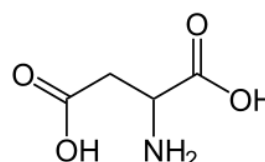
A. Structure chimique de quelques molécules d'acides α -aminés



Glycine



Alanine



Acide aspartique

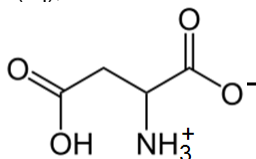
Données :

Élément chimique	H	C	N	O
Numéro atomique Z	1	6	7	8

- Nommer les fonctions chimiques présentes dans les molécules d'acides α -aminés.
- Justifier que les acides α -aminés sont amphotères.
- Toutes les solutions d'acides α -aminés naturels ont la propriété de faire tourner le plan de polarisation d'une lumière, à l'exception des solutions de glycine. Justifier cette différence en vous appuyant sur l'identification des carbones asymétriques.
- Donner la représentation de Fischer de la molécule de L-alanine.
- Donner la représentation de Cram de l'énantiomère de configuration absolue R de la molécule d'acide aspartique en expliquant la démarche.

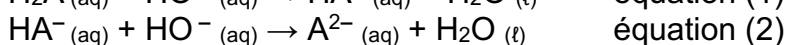
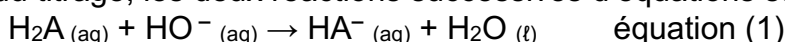
B. Titrage pH-métrique de l'acide aspartique

On considère une solution aqueuse dans laquelle l'acide aspartique est sous la forme d'un zwitterion, noté symboliquement $\text{H}_2\text{A}_{(\text{aq})}$, de formule :



On cherche à déterminer la masse d'acide aspartique présente dans un volume $V_A = 50,0 \text{ mL}$ de la solution aqueuse étudiée. Pour cela, on réalise un titrage pH-métrique en ajoutant un volume V_B de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ($\text{Na}^+_{(\text{aq})} + \text{HO}^-_{(\text{aq})}$) de concentration molaire $C_B = 0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

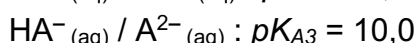
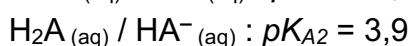
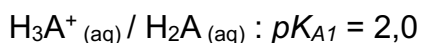
Au cours du titrage, les deux réactions successives d'équations suivantes se produisent :



Données :

Produit ionique de l'eau à 25°C : $K_E = [\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}] \cdot [\text{HO}^-_{(\text{aq})}] = 1,0 \times 10^{-14}$

Couples acide / base de l'acide aspartique :



Masse molaire de l'acide aspartique : $M(\text{H}_2\text{A}) = 133,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Indicateurs colorés acido-basiques :

	pH de la zone de virage	Couleurs
Jaune de méthyle	2,9 – 4,0	Rouge - Jaune
Bleu de bromothymol	6,0 – 7,6	Jaune - Bleu
Phénolphthaléine	8,0 – 10,0	Incolore - Rose

- Justifier que la forme $\text{H}_2\text{A}_{(\text{aq})}$ de l'acide aspartique, est l'espèce majoritaire en solution aqueuse avant le titrage à l'aide des **documents 1 et 2 de l'annexe 1**.
- Exprimer la constante d'équilibre K_1 de la réaction de titrage (équation (1)) en fonction de K_{A2} et K_E . Calculer sa valeur et en déduire si cette réaction peut être considérée comme totale.
- Après avoir écrit la relation à l'équivalence, déterminer la masse d'acide aspartique initialement présente en solution aqueuse à l'aide du **document 2 de l'annexe 1 et de l'équation (1)**. Détailler la démarche.
- La solution aqueuse d'acide aspartique dosée est limpide. Montrer que cette observation est en accord avec la valeur de la solubilité de l'acide aspartique qui est d'environ $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Proposer l'indicateur coloré acido-basique adapté à ce titrage.

II. MÉTHODES PHYSIQUES DE MARQUAGE DES ACIDES α -AMINÉS (14 points)

Le marquage des acides α -aminés d'une protéine est une étape essentielle à la compréhension des processus biochimiques à l'œuvre dans les êtres vivants.

A. Marquage des protéines par des noyaux radioactifs

L'iode 125 est un noyau radioactif employé pour le marquage des protéines possédant un résidu histidine ou tyrosine.

L'activité initiale d'un échantillon de protéines marquées vaut $A_0 = 20$ MBq.

La décroissance radioactive de l'échantillon suit la loi suivante, $A(t) = A_0 \cdot e^{-0,0115 \cdot t}$ dans laquelle le temps t est exprimé en jour.

Données :

- constante de Planck : $h = 6,63 \times 10^{-34}$ J·s
- célérité de la lumière dans le vide : $c = 3,00 \times 10^8$ m·s⁻¹
- électron-volt : $1 \text{ eV} = 1,60 \times 10^{-19}$ J

Marqueur radioactif	$^{125}_{53}\text{I}$	^3_1H
Temps de demi-vie $t_{1/2}$ (ou période)		12,3 ans
Énergie libérée E	35,5 keV	18,6 keV

1. Donner la composition du noyau d'iode 125, $^{125}_{53}\text{I}$.
2. Définir le temps de demi-vie $t_{1/2}$ (ou période) d'un échantillon de noyaux radioactifs. Déterminer graphiquement le temps de demi-vie $t_{1/2}$ de l'iode 125, $^{125}_{53}\text{I}$, à l'aide de l'**annexe 2 à rendre avec la copie**. Expliquer la démarche.
3. Calculer la valeur de la longueur d'onde λ du rayonnement émis par l'iode 125, $^{125}_{53}\text{I}$.
4. Justifier que le rayonnement électromagnétique émis par l'iode 125, $^{125}_{53}\text{I}$, est un rayonnement gamma, à l'aide de l'**annexe 2 à rendre avec la copie**.
5. L'activité $A(t)$ de l'échantillon est considérée comme négligeable lorsque le rapport $\frac{A}{A_0}$ est inférieur à 1%. Calculer la durée t (en jours) pour laquelle l'activité A de l'échantillon pourrait être considérée comme négligeable. Commenter cette valeur.

Pour marquer les autres acides α -aminés, le technicien peut utiliser un noyau de tritium ^3_1H .

Le noyau fils formé lors de la désintégration du tritium est l'hélium ^3_2He .

6. Écrire l'équation de la désintégration du noyau de tritium ^3_1H . Nommer la particule émise. Indiquer le type de radioactivité.

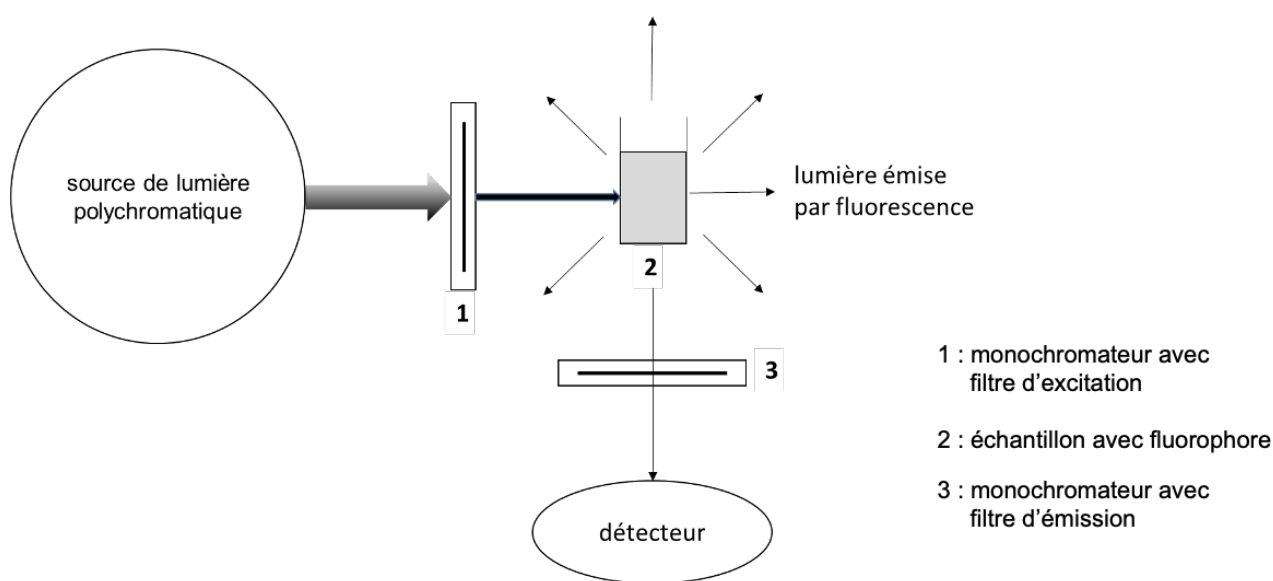
B. Marquage des protéines par un fluorophore

Le marquage des protéines par un fluorophore est une voie alternative au marquage par un noyau radioactif, dont le principal avantage est l'absence d'exposition du technicien aux rayonnements ionisants.

Un fluorophore possède la propriété d'absorber un rayonnement correspondant à la longueur d'onde d'excitation, puis d'émettre, par phénomène de fluorescence, un rayonnement de longueur d'onde plus élevée, appelée longueur d'onde d'émission.

Une protéine marquée par un fluorophore émet une lumière colorée détectable par un spectrofluorimètre.

Schéma simplifié d'un spectrofluorimètre :



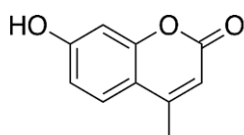
7. Déterminer le fluorophore utilisé comme marqueur dans l'échantillon à l'aide des **documents de l'annexe 3** en justifiant la réponse.
8. Choisir la lampe spectrale à utiliser dans le spectrofluorimètre à l'aide du **document 7 de l'annexe 4**, en justifiant la réponse.
9. Choisir le filtre d'émission à utiliser dans le spectrofluorimètre pour visualiser correctement le spectre d'émission de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine à l'aide du **document 8 de l'annexe 4** en justifiant la réponse.

III. SYNTHÈSE ORGANIQUE D'UN FLUOROPHORE (9 points)

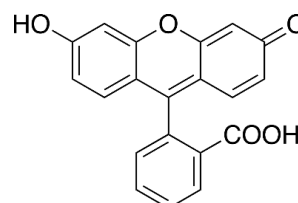
Parmi tous les acides α -aminés, seuls le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine ont la propriété d'émettre de la lumière par fluorescence. Pour détecter les autres acides α -aminés constituant les protéines, il est nécessaire de les lier à un fluorophore.

La couleur de la lumière émise par fluorescence dépend de la structure chimique du fluorophore. Plus un fluorophore possède de doubles liaisons conjuguées, plus il absorbe et émet de la lumière dans les longueurs d'ondes élevées.

Les fluorophores suivants sont couramment utilisés pour réaliser le marquage des acides α -aminés.



7-hydroxy-4-méthylcoumarine



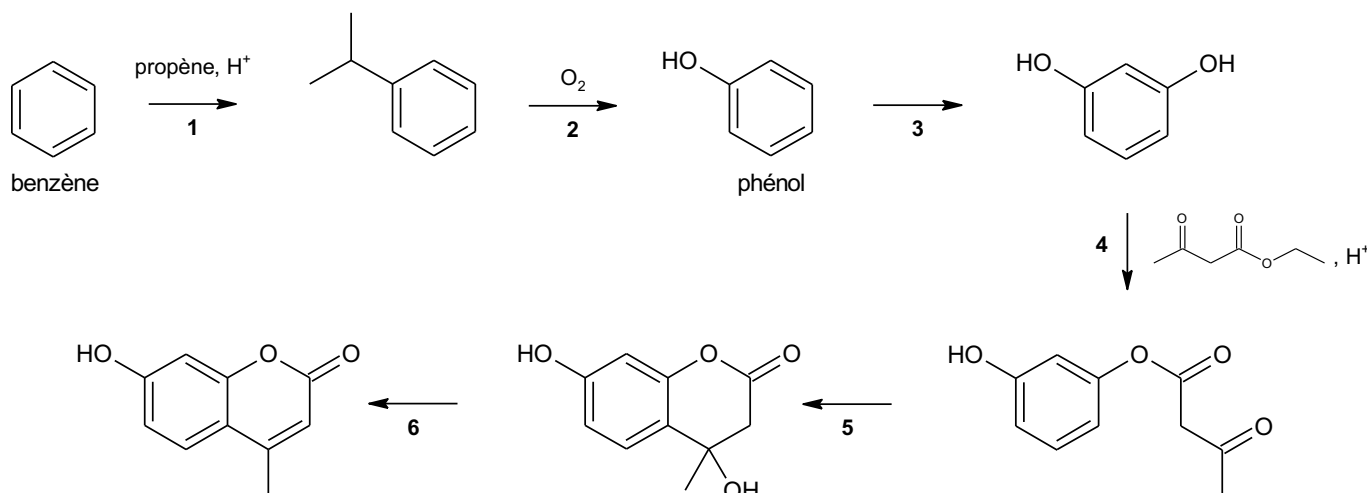
Fluorescéine

Donnée :

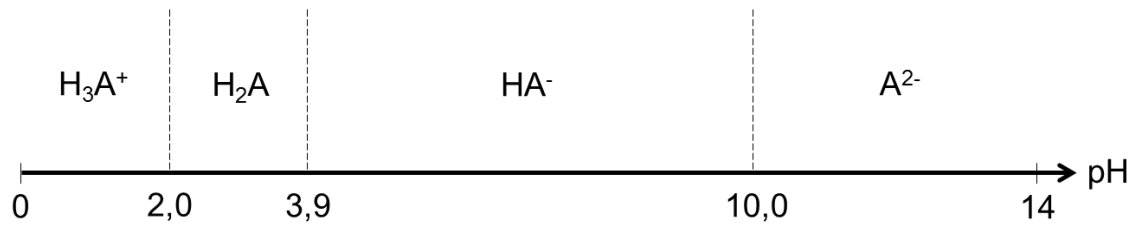
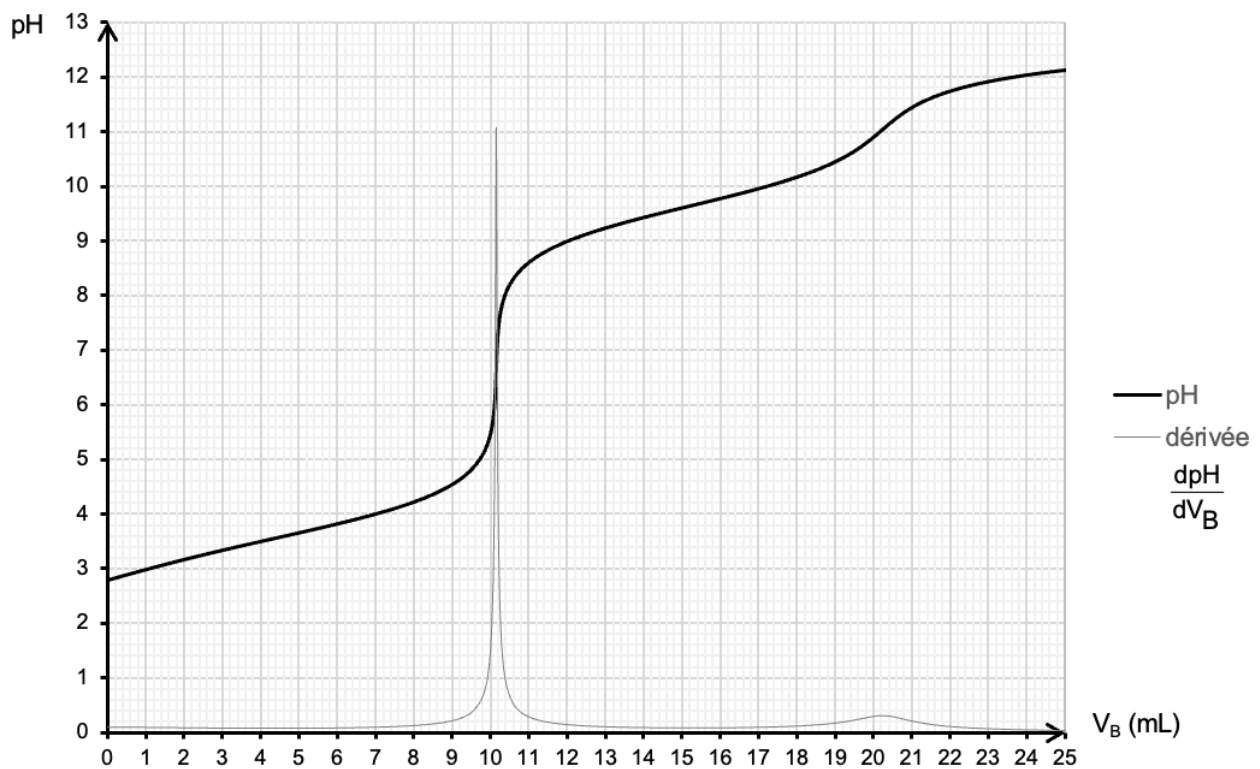
Le domaine visible est constitué par une infinité de radiations monochromatiques, dont les longueurs d'onde vont de 380 nm (violet) à 780 nm (rouge).

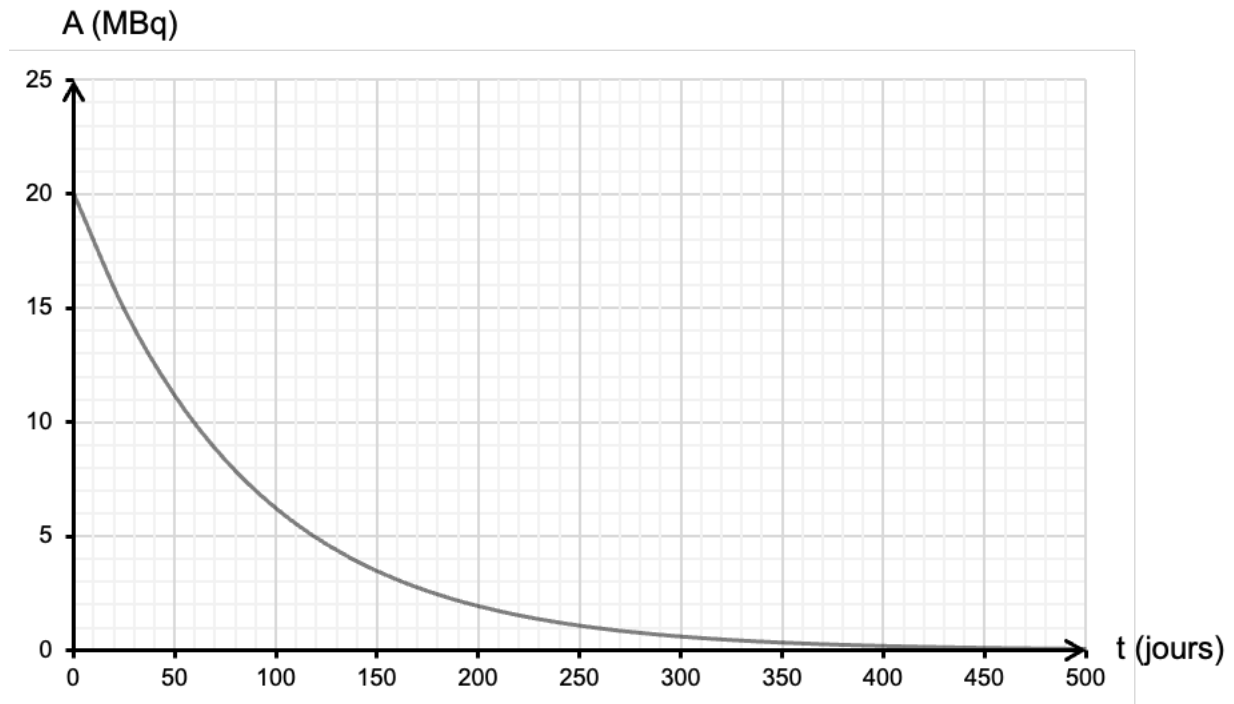
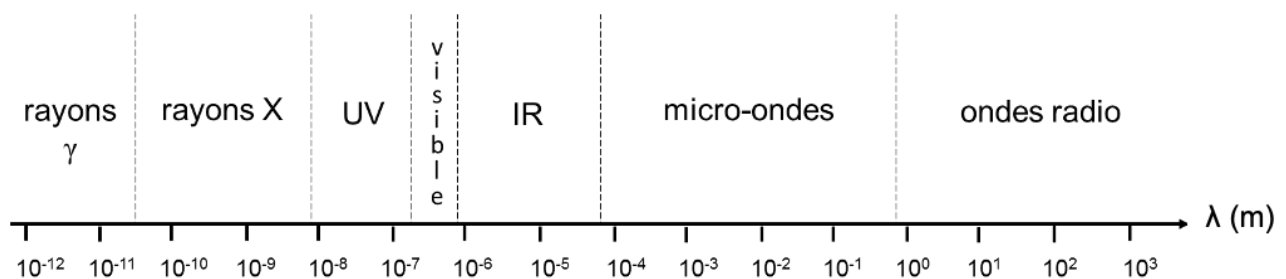
1. L'un de ces fluorophores émet, après excitation, une lumière verte, alors que l'autre émet une lumière bleue. Attribuer les couleurs d'émission correspondant à chaque fluorophore en analysant les doubles liaisons conjuguées.

La synthèse de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine peut être réalisée à partir du benzène, selon le schéma réactionnel suivant :



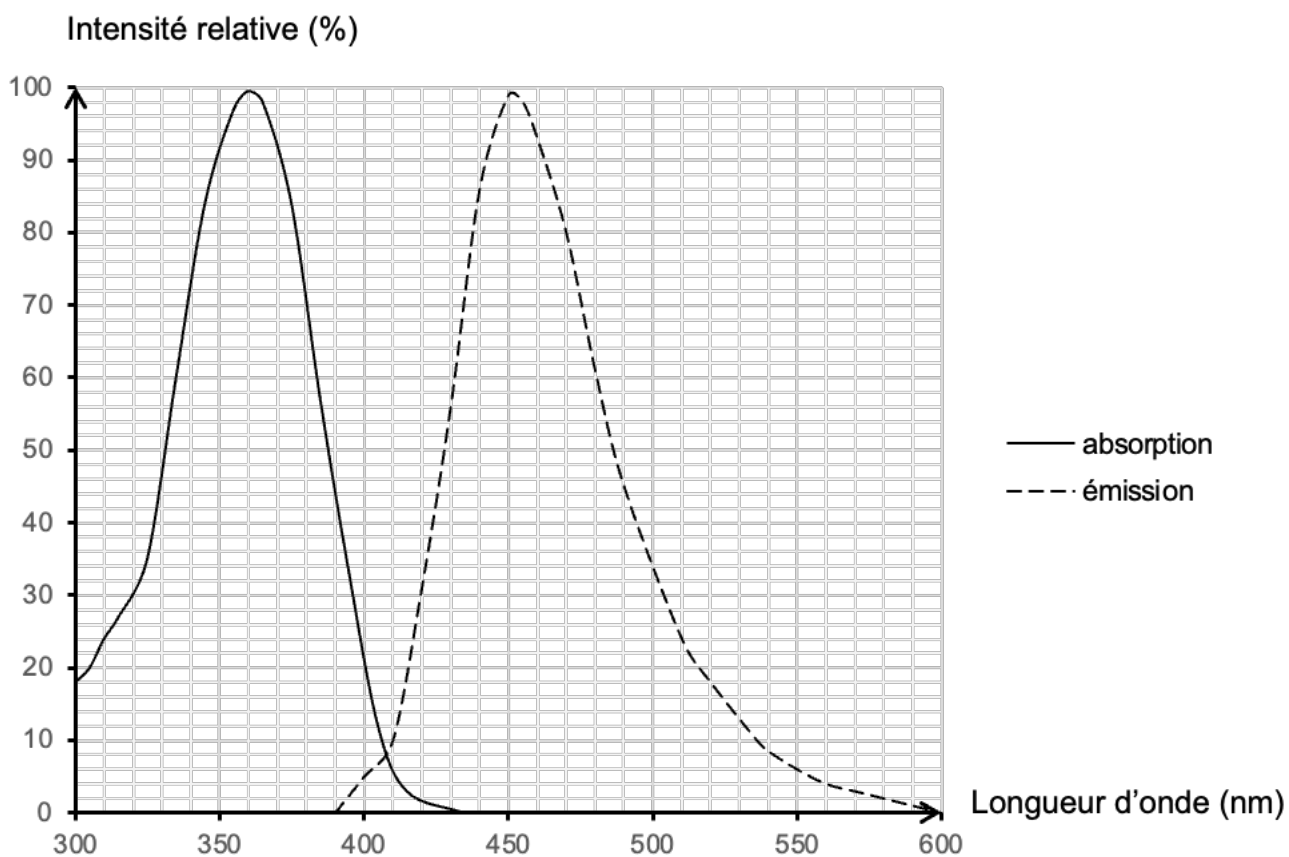
2. À l'aide du modèle des flèches courbes, compléter le mécanisme réactionnel de l'étape 1 de la synthèse, sur l'**annexe 5 à rendre avec la copie**.
3. Indiquer la nature de l'intermédiaire réactionnel formé parmi les catégories suivantes : carbocation, carbanion, radical.
4. Donner le rôle de l'ion H^+ . Justifier à partir du mécanisme de la réaction.
5. Indiquer le type de réaction correspondant à l'étape 1 (addition, élimination, substitution).
6. Nommer et écrire la formule semi-développée du sous-produit formé lors de l'étape 4.
7. Nommer la réaction correspondant à l'étape 6.

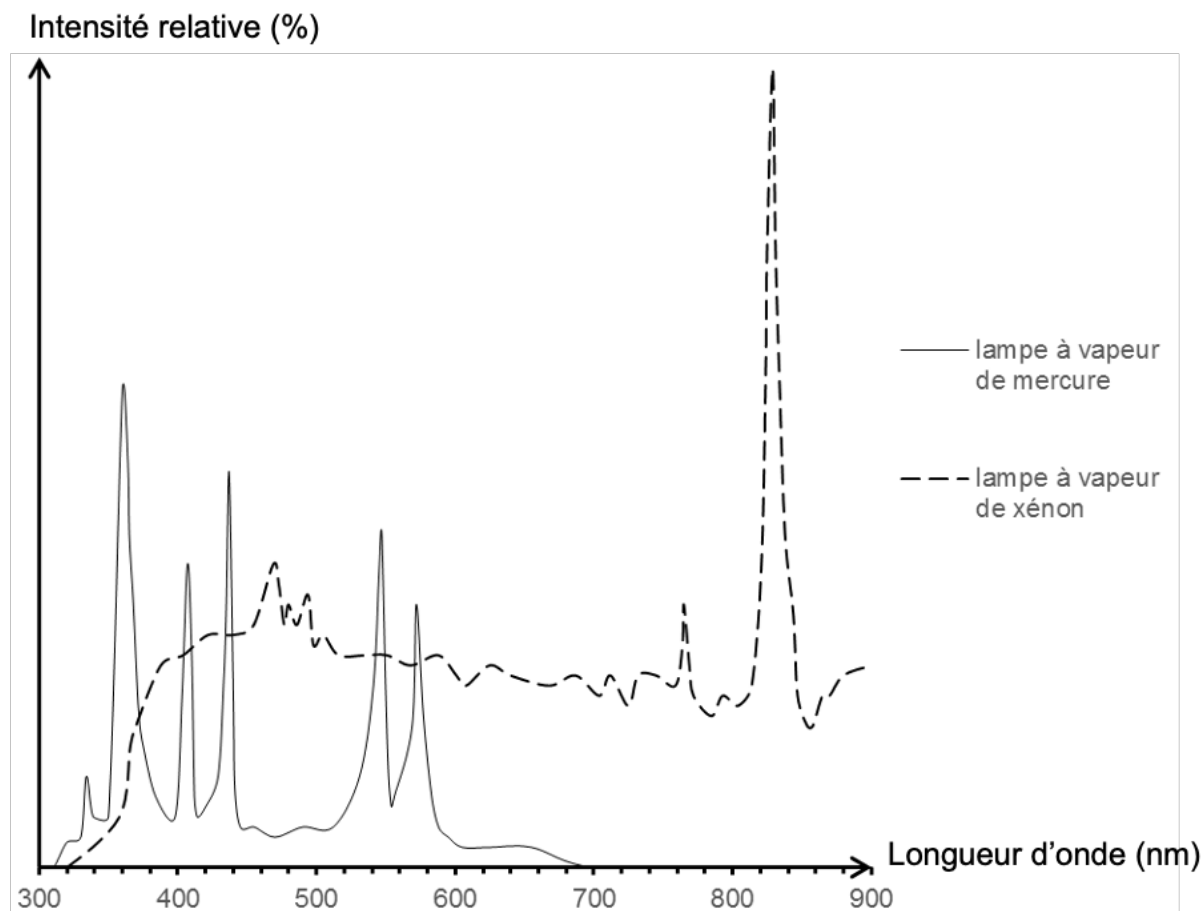
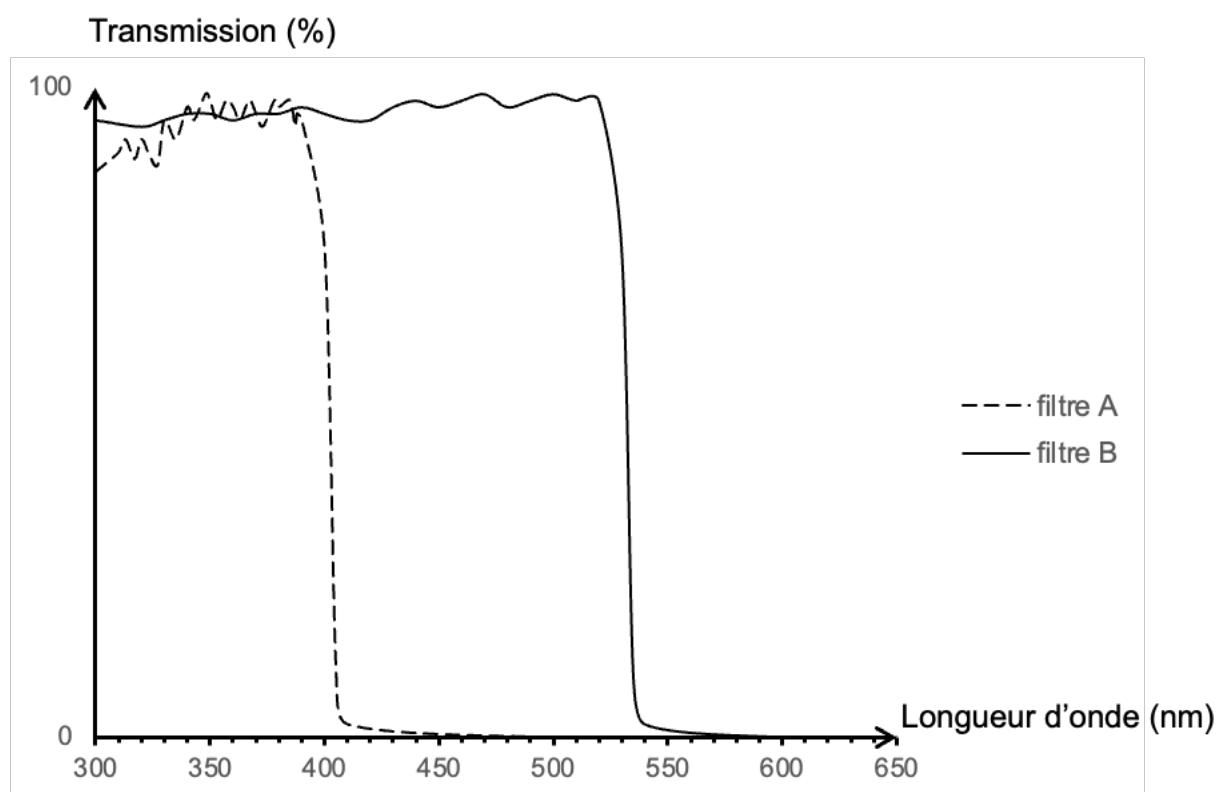
ANNEXE 1**Document 1** : diagramme de prédominance de l'acide aspartique**Document 2** : courbe de titrage pH-métrique de l'acide aspartique

ANNEXE 2**À RENDRE AVEC LA COPIE****Document 3** : courbe de décroissance radioactive d'un échantillon de noyaux d'iode 125**Document 4** : spectre des ondes électromagnétiques

ANNEXE 3**Document 5** : caractéristiques de quelques fluorophores

	Longueur d'onde d'excitation λ_{max} (en nm)	Longueur d'onde d'émission λ_{max} (en nm)
Fluorescéine	490	520
7-hydroxy-4-méthylcoumarine	360	449
AlexaFluor 350	346	442

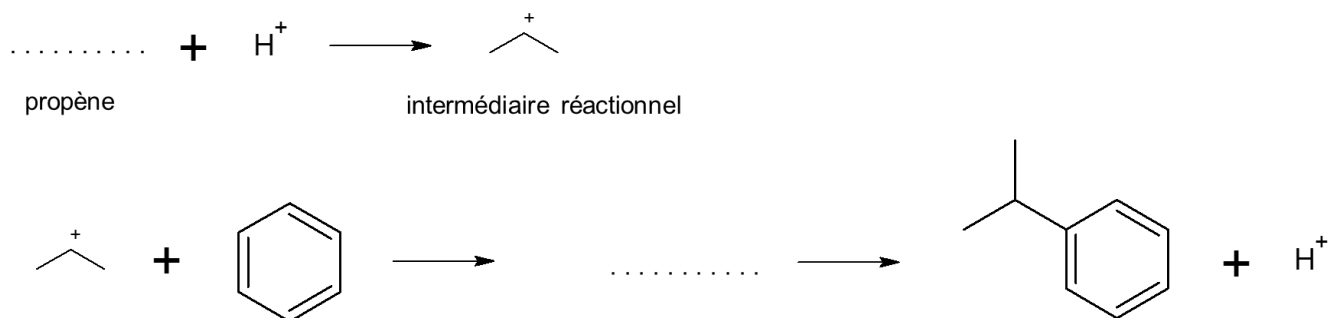
Document 6 : spectres d'absorption et d'émission du fluorophore utilisé

ANNEXE 4**Document 7 : spectres d'émission de lampes pour spectrofluorimètre****Document 8 : filtres d'émission pour spectrofluorimètre**

ANNEXE 5

À RENDRE AVEC LA COPIE

Mécanisme réactionnel de l'étape 1 de la synthèse :



2023 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Durée : 2 h – coefficient 1

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

Capacités évaluées :

Maitrise des connaissances scientifiques et techniques	4 points
Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	4 points
Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	7 points
Pertinence et cohérence des solutions proposées	3 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2 points

Étude des méthylations du génome, marqueurs épigénétiques liés aux cancers

En 2018 en France, le cancer colorectal était responsable de 17000 décès, avec 43300 nouveaux cas. Le gène *MLH1* est mis en cause dans le syndrome héréditaire de Lynch, qui représente 5 % des cancers colorectaux.

Ce gène code une protéine qui participe à la réparation des erreurs commises par l'ADN polymérase lors de la réplication. Une diminution de l'expression de cette protéine engendre une hausse des mutations, favorisant ainsi la cancérogenèse.

L'étude menée propose de rechercher le lien entre l'expression du gène *MLH1* et les méthylations du promoteur de ce gène, au niveau des îlots CpG, séquences riches en GC. En effet certains patients atteints de cancers colorectaux ne montrent pas de mutation du gène *MLH1*, alors que son expression est modifiée.

La connaissance du profil des méthylations des gènes impliqués dans les cancers pourrait alors permettre de proposer un traitement spécifique à chaque patient.

1 Étude du gène *MLH1*

Un schéma de structure d'un gène eucaryote est présenté dans le **document 1**. Ce schéma fait apparaître les séquences permettant l'expression d'un gène et la régulation de son expression.

- 1.1. Donner la signification des termes « *promoter* », « *enhancer* » et du sigle « UTR ». Préciser leur rôle. (C1)

Le **document 2** décrit les conséquences des modifications épigénétiques par méthylation des cytosines au niveau des îlots CpG.

- 1.2. Expliquer les conséquences possibles de l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* sur l'expression de ce gène. (C3, C4)

La séquence partielle du gène *MLH1* présentée dans le **document 3**, correspond à une partie de la séquence codante de ce gène et aux 198 nucléotides situés en amont de celle-ci, incluant le promoteur de ce gène.

- 1.3. Présenter les étapes permettant d'obtenir ce format de séquence partielle par bioinformatique via le portail NCBI. Préciser en quoi le format FASTA diffère de la présentation du **document 3**. (C1)

L'étude de la méthylation du promoteur du gène *MLH1* nécessite en premier lieu une extraction de l'ADN génomique à partir de tissus humains sains et à partir de tissus humains tumoraux.

Dans les deux cas, l'ADN extrait est fragmenté par l'action d'enzymes de restriction.

Le site de restriction et de coupure de l'endonuclease *Pst*I choisie pour cette étape est le suivant : CTGCA/G.

- 1.4. Schématiser et orienter les deux fragments d'ADN obtenus après l'action de *Pst*I sur un ADN double brin contenant un site de restriction pour *Pst*I. Caractériser le type d'extrémités obtenues. (C1, C2)
- 1.5. Calculer alors la taille du fragment d'ADN obtenu après coupure par *Pst*I du gène *MLH1* de la séquence d'ADN contenant le promoteur. (C3)

2 Méthode d'analyse des méthylations du gène *MLH1*

L'analyse de la méthylation des échantillons d'ADN est conduite en deux temps :

- un traitement de l'ADN au bisulfite de sodium pour différencier les ADN méthylés des ADN non méthylés ;
- une amplification des produits du traitement précédent par PCR en temps réel en technologique Taqman, qualifiée dans ce cas précis de PCR spécifique d'ADN méthylé (MSP).

Les fragments d'ADN obtenus par l'action de *Pst*I sur la séquence du gène *MLH1* subissent le traitement chimique au bisulfite de sodium décrit dans le **document 4**.

- 2.1. Expliquer la conséquence du traitement au bisulfite de sodium sur une cytosine non méthylée d'une part et sur une cytosine méthylée d'autre part. (C3)

La séquence d'ADN double brin matrice, cible de l'amorce sens utilisée lors de la MSP, est présentée ci-dessous :

5' -AGAGTCGCGAAATTCGAACG-3'
3' -TCTCAGCGCTTTAAGCTTGC-5'

- 2.2. Écrire la séquence double brin orientée obtenue après traitement au bisulfite de sodium de cette séquence cible non méthylée. (C3)

- 2.3. En déduire la séquence de l'amorce sens à utiliser pour amplifier cette dernière. (C4)

La séquence de l'amorce anti-sens est obtenue de la même manière à l'aide de séquence cible de cette amorce.

L'amplification spécifique des ADN méthylés est réalisée sur des échantillons d'ADN, soit traités, soit non traités au bisulfite de sodium en utilisant deux couples d'amorces spécifiques, sens et antisens.

La comparaison des résultats suite à ces deux amplifications permet de conclure quant à la méthylation du promoteur du gène *MLH1*.

Le **document 5** présente le principe de cette amplification incluant la qPCR en technologie Taqman.

- 2.4. Dégager le principe de la PCR en technologie Taqman® sous la forme d'un schéma annoté et légendé. (C2)
- 2.5. Identifier et expliciter les trois étapes A, B et C soulignées dans le protocole d'amplification. (C2)
- 2.6. Identifier l'étape du cycle d'amplification à laquelle doit être effectuée la lecture de fluorescence. Expliquer. (C3)

- 2.7. Préciser l'avantage principal de la quantification d'ADN en technologie Taqman® par rapport à la technologie Sybr®Green. (C2)

3 Méthylation du gène *MLH1* et cancer colorectal

Des expériences sont menées chez des patients atteints de cancer colorectal, afin d'étudier le lien entre la méthylation des îlots CpG du promoteur du gène *MLH1* et l'expression de ce gène.

Le niveau d'expression du gène *MLH1* est évalué par transcription inverse suivie d'une PCR quantitative (RT-qPCR). Pour cela, une gamme d'étalonnage est réalisée à partir de solutions d'ADN en quantités connues. La courbe d'étalonnage obtenue à partir de ces amplifications est présentée dans le **document 6**.

Les courbes d'amplification d'échantillons de tissus sains et tumoraux sont également présentées sur ce même document.

- 3.1. Déterminer graphiquement la quantité d'ADNc contenue dans l'échantillon 19N.
Expliquer la démarche suivie. (C3)

Pour chaque patient, l'état de méthylation des îlots CpG est également analysé sur des échantillons de tissus non tumoraux (N) et des échantillons de tissus tumoraux (T) d'un même patient.

Le **document 7** présente les résultats de l'expression du gène *MLH1* et de l'état de méthylation des îlots CpG de son promoteur, pour des échantillons de tissus prélevés sur les tissus tumoraux de 25 patients (2T, ..., 28T) et les tissus non tumoraux (2N, ..., 28N), des mêmes patients.

Le gène *ACTB* est utilisé comme gène de référence dans l'étude de l'expression du gène *MLH1*.

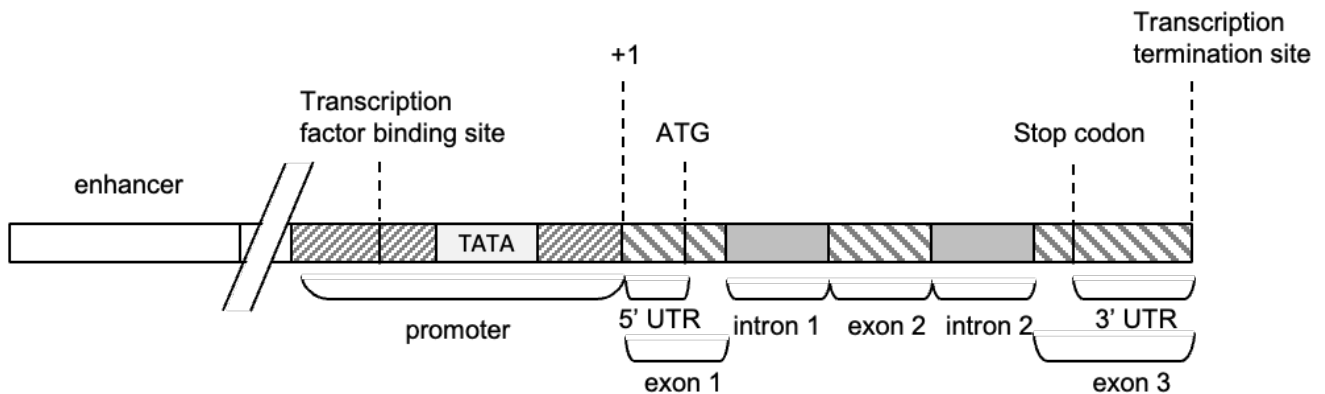
- 3.2. Proposer une définition d'un gène de référence puis préciser l'intérêt de son utilisation en PCR quantitative. (C1)
- 3.3. Pour les échantillons issus du patient 17 (échantillons 17N et 17T), analyser l'expression du gène *MLH1* puis l'état de méthylation des îlots CpG de son promoteur. Proposer une hypothèse expliquant la différence d'expression du gène *MLH1*. (C3, C4)
- 3.4. Réaliser, de la même façon, l'analyse des résultats obtenus à partir des échantillons issus du patient 19. (C3, C4)
Proposer une hypothèse sur l'origine de la cancérogenèse chez ce patient 19.

Dans la perspective de traitements anticancéreux, des substances inhibitrices des méthylases DNA 5méthylC MéthylTransférases (DNMTs) peuvent être utilisées.

La Commission européenne a délivré une autorisation de mise sur le marché pour la 5-Azacytidine (Vidaza®) en décembre 2008. Le Vidaza® est l'une des substances inhibitrices des DNMTs.

- 3.5. Expliquer l'intérêt d'utiliser la 5-Azacytidine dans le traitement de certains cancers. Préciser si ce traitement est adapté pour les patients 17 et 19. Argumenter. (C3, C4)

Document 1 : Schéma de structure d'un gène eucaryote



Huang, Wen-Lin, et al., Rule-Based Knowledge Acquisition Method for Promoter Prediction in Human and Drosophila Species, 2014, The Scientific World Journal.

Document 2 : Modifications épigénétiques par méthylation des cytosines

Les modifications épigénétiques consistent en des modifications chimiques, en particulier la méthylation des bases azotées C (5mC)* dans des îlots riches en dinucléotides CpG. Une hyperméthylation des séquences modifie les interactions faibles avec les histones, conduisant à un degré supérieur de compaction de la chromatine nommée alors hétérochromatine.

Des enzymes de méthylation, nommées méthylases comme les DNA 5méthylC MéthylTransférases (DNMTs) et des enzymes de déméthylation, les déméthylases, rendent le processus réversible.

*(5mC : Cytosine portant un résidu -CH₃ sur le carbone C₅).

Source personnelle de l'auteur

Document 3 : Séquence partielle du gène *MLH1*

NG_007109.2:5001-62497 Homo sapiens mutL homolog 1 (MLH1),
RefSeqGene (LRG_216) on chromosome 3

```

1  gaagagactg cagaacccac agagtcgcga aattcgaacg gcattcaagc tgtccaatca
61 atagctgccg ctgaagggtg gggctggatg gggtaacctc cagctgaagg aagaacgtga
121 gcacgaggca ctgaggtgat tgcgcgaaga cacgtcgatt gagcatctag acgtttcctt
181 ggctcttctg ggcgcaaaat gtcgttcgtg gctgcagtta ttcggcggct ggacgagaca
241 gtggtgaacc gcatcgcggc gggggaagtt atccagcggc cagctaagtc tatcaaagag
301 atgattgaga actggtacgg agggagtcga gccgggctca cttagggtc acgacttaac
361 gggccgcgtc actcaatggc gcggacacgc ctctttgccc gggcagaggc atgtacagcg

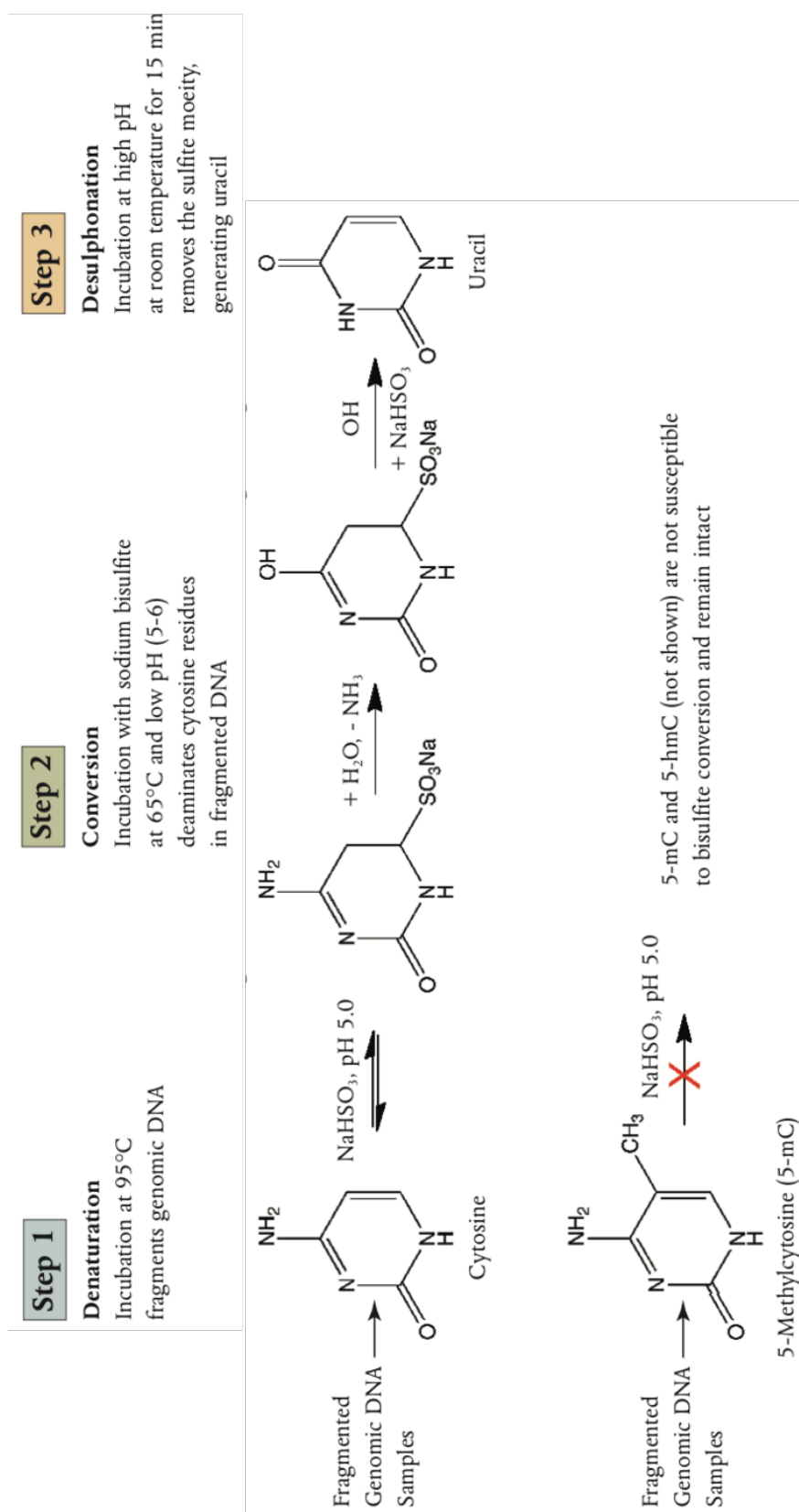
```

Légende :

- Souligné 1 trait : sites de restriction de *Pst*I
- Souligné 2 traits : codon d'initiation
- Souligné en pointillés : position des amorces sens et antisens utilisées lors de la MSP

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_007109.2?report=genbank&from=5001&to=62497
[consulté le 08/12/21]

Document 4 : Action du bisulfite de sodium (NaHSO_3) sur la cytosine et sur la 5-méthylcytosine



https://www.neb.com/~media/nebus/page%20images/newsized%20brochure%20images/epigenetics/bisulfite_conversion.jpg [consulté le 08/12/21]

Document 5 : Mise en évidence des ADN méthylés par amplification spécifique

- MSP aim

Bisulfite conversion can be followed by PCR amplification to reveal the methylation status of every cytosine. Uracils are amplified in PCR reaction as thymines, whereas 5-mC residues get amplified as cytosines. Applications such as Methylation-Specific PCR (MSP) involve analyzing untreated and bisulfite treated DNA using **two different sets of PCR primer pairs**, one pair that targets the unaltered, methylated sequence and the other that targets the converted unmethylated sequence.

<https://international.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion> [consulté le 08/12/21]

- Principe d'une PCR en temps réel reposant sur l'utilisation de sondes d'hydrolyse Taqman®

Les ADN génomiques méthylés ou non sont amplifiés séparément avec deux couples d'amorces, l'un ciblant la séquence méthylée, l'autre la séquence non méthylée. La sonde oligonucléotidique type Taqman® comprend un fluorochrome appelé « reporter » en 5', le 6FAM et un agent bloquant l'émission de fluorescence appelé « quencher » en 3', le TAMRA.

L'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase hydrolyse la sonde et libère le fluorochrome qui émet alors de la fluorescence. La fluorescence est mesurée par le détecteur d'un appareil de type ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer). Après dépassement d'un seuil de détection de fluorescence, l'amplification par PCR conduit à un signal fluorescent proportionnel à la quantité de produit de PCR générée. La quantité de matrice initiale peut être déduite du nombre de cycles auquel le signal fluorescent franchit un seuil dans la phase exponentielle de la réaction PCR. Les essais sont normalisés en utilisant des échantillons de référence.

- Protocole d'amplification

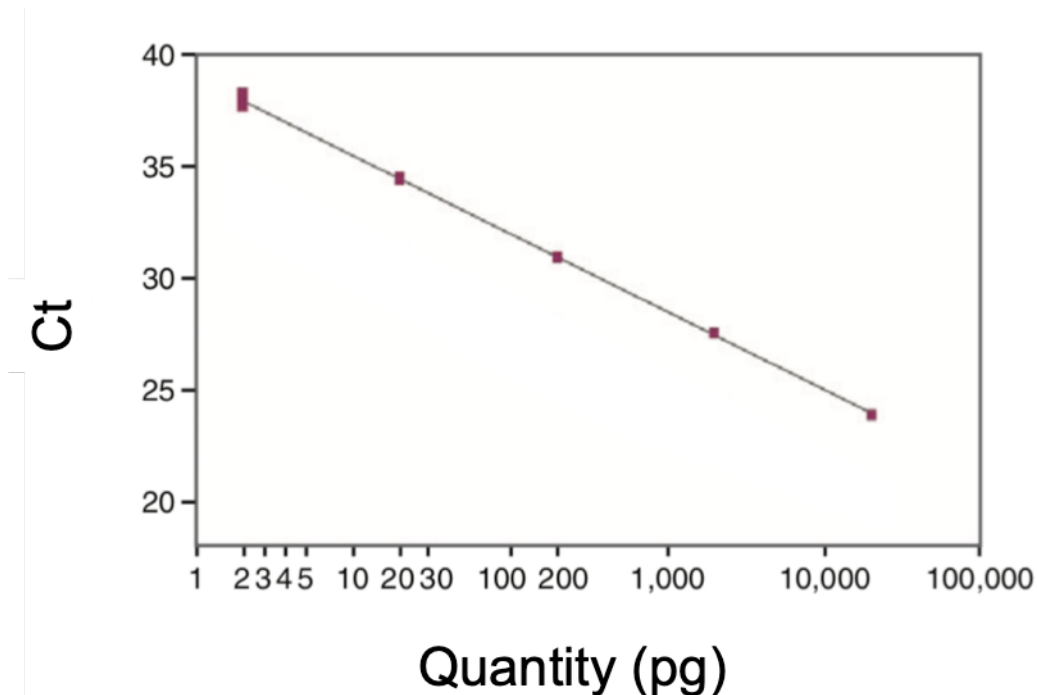
Les amplifications PCR de l'ADN traité au bisulfite et de l'ADN non traité au bisulfite, sont réalisées en microplaque à 96 puits avec un mélange réactionnel final de 25 µL, constitué de 600 nM d'un des deux couples d'amorces, de 200 nM de sonde, 200 µM de dATP, dCTP, dGTP et dTTP, 3,5 mM de MgCl₂, tampon TaqMan®, Taq polymérase et de l'un des deux échantillons d'ADN matrice.

Le programme d'amplification est le suivant : 95 °C pendant 10 min, suivi de 40 cycles incluant 95 °C pendant 30 s (étape A), 63 °C pendant 15 s (étape B) et 72 °C pendant 1 min (étape C).

Cindy A. Eads et al., MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation, *Nucleic Acids Res.* 2000 Apr 15; 28(8): e32, PMC102836.

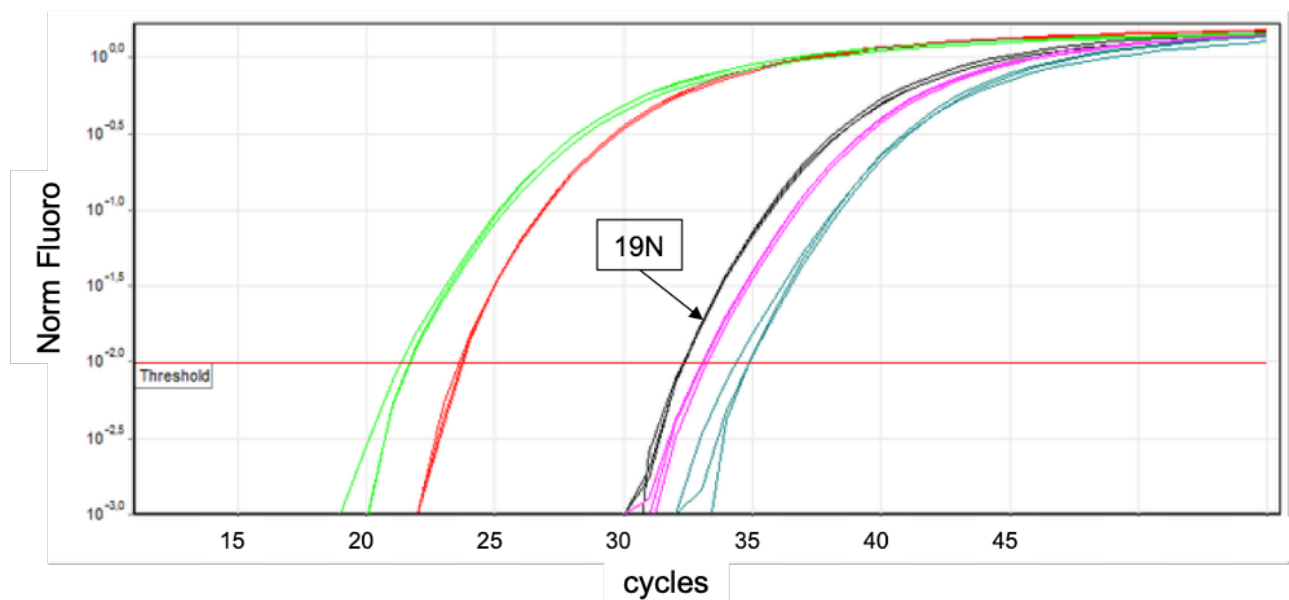
Document 6 : Quantification des transcrits du gène *MLH1* par qPCR

Courbe d'étalonnage : $C_t = f(\text{quantité d'ADNc})$



<https://international.neb.com/products/m3004-luna-universal-probe-qpcr-master-mix#Product%20Information> [consulté le 08/12/21]

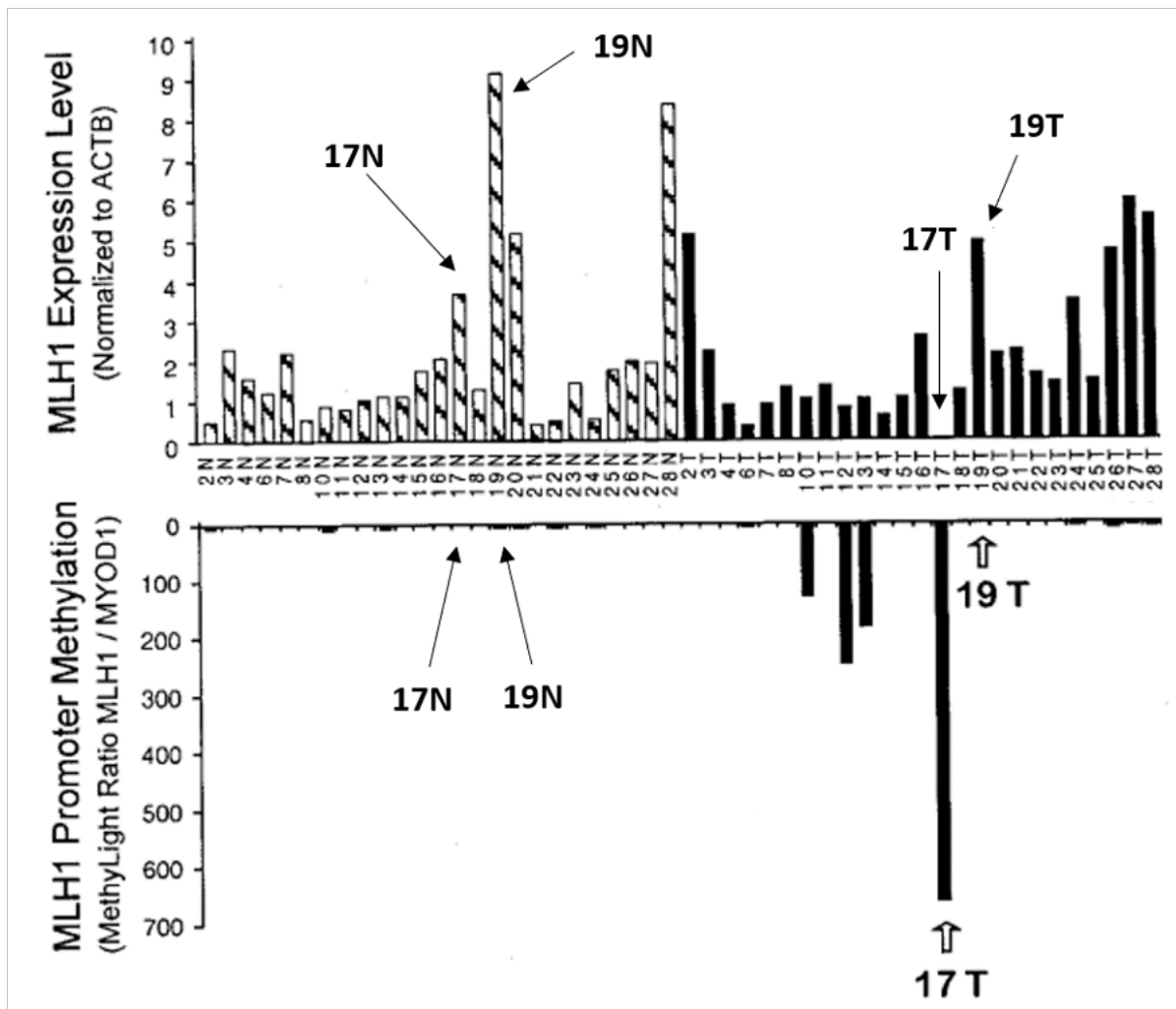
Exemples de courbes d'amplification pour différents échantillons



Norm. Fluoro. : Fluorescence normalisée.

https://en.wikipedia.org/wiki/Real-time_polymerase_chain_reaction#/media/File:Qpcr-cycling.png [consulté le 08/12/21]

Document 7 : Comparison of *MLH1* expression, and *MLH1* promoter methylation of 25 matched-paired human colorectal samples



Upper : *MLH1* expression levels measured by quantitative, real time RT-PCR (TaqMan®) in matched normal (hatched bars) and tumor (solid black bars) colorectal samples. The expression levels are displayed as a ratio between *MLH1* and *ACTB* measurements.

Lower : Methylation status of the *MLH1* promotor as determined by MSP.

Cindy A. Eads et al., *MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation*, *Nucleic Acids Res.* 2000 Apr 15; 28(8): e32, PMC102836

2023 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Durée : 2 h – coefficient 1

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

Capacités évaluées :

Maitrise des connaissances scientifiques et techniques	3 points
Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	4 points
Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	6 points
Pertinence et cohérence des solutions proposées	5 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2 points

La carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A), une enzyme cible pour le traitement de la « maladie du foie gras »

La « maladie du foie gras » ou stéatose hépatique résulte de l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes. Une enzyme candidate, la CPT1A ou carnitine palmitoyl transférase 1A, est une cible potentielle pour lutter contre la maladie.

L'enzyme CPT1A est localisée dans la membrane externe des mitochondries. Elle est impliquée dans la première réaction de la β -oxydation, qui est la voie métabolique de dégradation des acides gras. Elle est notamment régulée par le malonyl-CoA, un intermédiaire de la voie de synthèse des acides gras.

Information préliminaire :

Le document ressource en **annexe page 5** « Les 20 principaux acides aminés constitutifs des protéines » est utile pour traiter plusieurs questions du sujet.

1. Régulation de la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A) par le malonyl-CoA.

La carnitine palmitoyl transférase humaine se présente sous trois isoformes : hépatique (CPT1A), musculaire (CPT1B) et cérébrale (CPT1C).

1.1. Expliquer le terme d'isoforme. (C1)

Le **document 1** présente les premières étapes de la β -oxydation des acides gras à longue chaîne, impliquant notamment la CPT1A.

1.2. Identifier le groupement transféré par la CPT1A. (C2)

Une étude cinétique a été réalisée en présence de différentes concentrations en carnitine afin d'identifier le type d'inhibition exercé par le malonyl-CoA sur la CPT1A. Les résultats sont présentés dans le **document 2**.

1.3. Poser les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques pour déterminer le K_M et le V_{imax} apparents pour les trois concentrations en malonyl-CoA testées. (C3, C4)

1.4. Analyser les résultats pour déduire le type d'inhibition exercé par le malonyl-CoA sur l'enzyme CPT1A. (C1, C3)

Le **document 3** présente un mécanisme simplifié de contrôle de la lipogenèse et de la β -oxydation des acides gras dans le foie. L'enzyme CPT1A est impliquée dans la β -oxydation et est régulée par le malonyl-CoA.

- 1.4. Expliquer en quoi la suppression de l'effet inhibiteur du malonyl-CoA sur la CPT1A, pourrait représenter une stratégie thérapeutique efficace dans la prévention des stéatoses hépatiques. (C4)

2. Production d'une enzyme CPT1A mutée

L'objectif est de vérifier que l'enzyme mutée insensible au malonyl-CoA est fonctionnelle. Dans ce but, il est nécessaire de produire en grande quantité l'enzyme mutée et l'enzyme sauvage pour les comparer. Des hépatocytes exprimant l'enzyme sauvage CPT1A ou exprimant l'enzyme mutée, CPT1Amt sont préparés.

Trois lots d'hépatocytes de rats sont transfectés par des adénovirus (Ad) recombinants codant soit pour une enzyme CPT1A sauvage (CPT1-wt), soit pour une enzyme CPT1A mutée (CPT1mt) soit par un adénovirus (Ad) recombinant codant pour cette enzyme (Ad- β -gal).

Après culture des hépatocytes transfectés, puis extraction de leur contenu cellulaire, un Western blot est mis en œuvre. Les résultats obtenus sont présentés sur le **document 4**.

Un autre lot d'hépatocytes non transfectés est également analysé.

Deux contrôles sont réalisés pour l'analyse par Western blot :

- des mesures de l'expression de la β -galactosidase,
- des mesures de l'expression de CPT2, protéine constitutive des mitochondries.

- 2.1. Expliquer le rôle de chacun des contrôles. (C4)
- 2.2. Analyser les résultats obtenus par Western blot pour chacun des quatre lots d'hépatocytes pour un nombre de particules infectieuses de 2,5 ip/cell.
Conclure sur l'efficacité d'expression de CPT1-wt et de CPT1-mt. (C3)

L'activité « carnitine palmitoyl transférase » (CPT) est déterminée pour chacun des extraits cellulaires des quatre lots d'hépatocytes. En parallèle, un Western blot est mis en œuvre dans le but d'estimer les quantités d'enzyme contenues dans les extraits cellulaires.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 5**.

- 2.3. Expliquer la présence d'une activité CPT non nulle pour les hépatocytes non transfectés et pour les hépatocytes transfectés par Ad- β -gal. (C4)
- 2.4. À partir des résultats du Western blot d'une part et des activités enzymatiques spécifiques de CPT d'autre part, montrer que ces activités sont équivalentes pour les enzymes mutée et sauvage. Conclure. (C3)

3. Mode d'action du malonyl-CoA sur la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A)

L'obtention d'une grande quantité de CPT1A sauvage et muté permet d'étudier le mécanisme d'inhibition par le malonyl-CoA au site de régulation. Ce mécanisme implique deux domaines de CPT1A, l'un positionné à l'extrémité N terminale, l'autre positionné à l'extrémité C terminale.

3.1. Expliquer la notion de domaine protéique. (C1)

Afin de montrer la participation des domaines N-ter et C-ter dans la fixation du malonyl-CoA, plusieurs enzymes mutantes ont été produites. Dans l'enzyme sauvage, il a été montré que les résidus Glu²⁶ et Lys⁵⁶¹, appartenant respectivement au domaine N-ter et au domaine C-ter, interviennent dans la fixation du malonyl-CoA à l'enzyme. Leur position spatiale dans l'enzyme en présence de malonyl-CoA, est présentée dans le **document 6**.

3.2. Représenter l'état d'ionisation de la chaîne latérale des acides aminés Glu et Lys, à pH 7. Argumenter la réponse. En déduire le type d'interaction possible entre ces deux résidus. (C2)

Pour étudier l'interaction entre CPT1A et le malonyl-CoA, des enzymes mutées pour l'un ou les deux résidus Glu²⁶ et Lys⁵⁶¹, ont été produites par mutagenèse dirigée :

- Dans l'enzyme « E26K » : le résidu E en position 26 est remplacé par un résidu K,
- Dans l'enzyme « K561E » : le résidu K en position 561 est remplacé par un résidu E,
- Dans l'enzyme « E26K/K561E » : les deux résidus sont mutés.

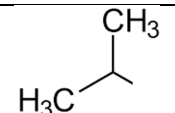
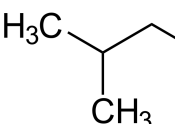
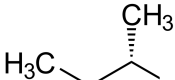
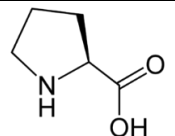
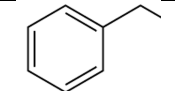
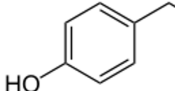
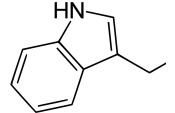
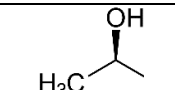
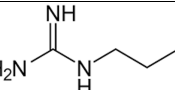
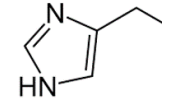
L'activité des quatre enzymes CPT sauvage ou mutantes est mesurée en présence de différentes concentrations en malonyl-CoA. Les résultats sont rapportés dans le **document 7**.

3.3. Analyser les résultats obtenus pour les enzymes « E26K » et « K561E » pour proposer une hypothèse expliquant la baisse d'activité observée dans les deux cas. (C3, C4)

3.4. Analyser le résultat obtenu pour le double mutant « E26K/K561E ». (C3)

3.5. Argumenter le fait que l'interaction entre les deux domaines terminaux est essentielle pour l'inhibition de la CPT1A par le malonyl-CoA. (C4)

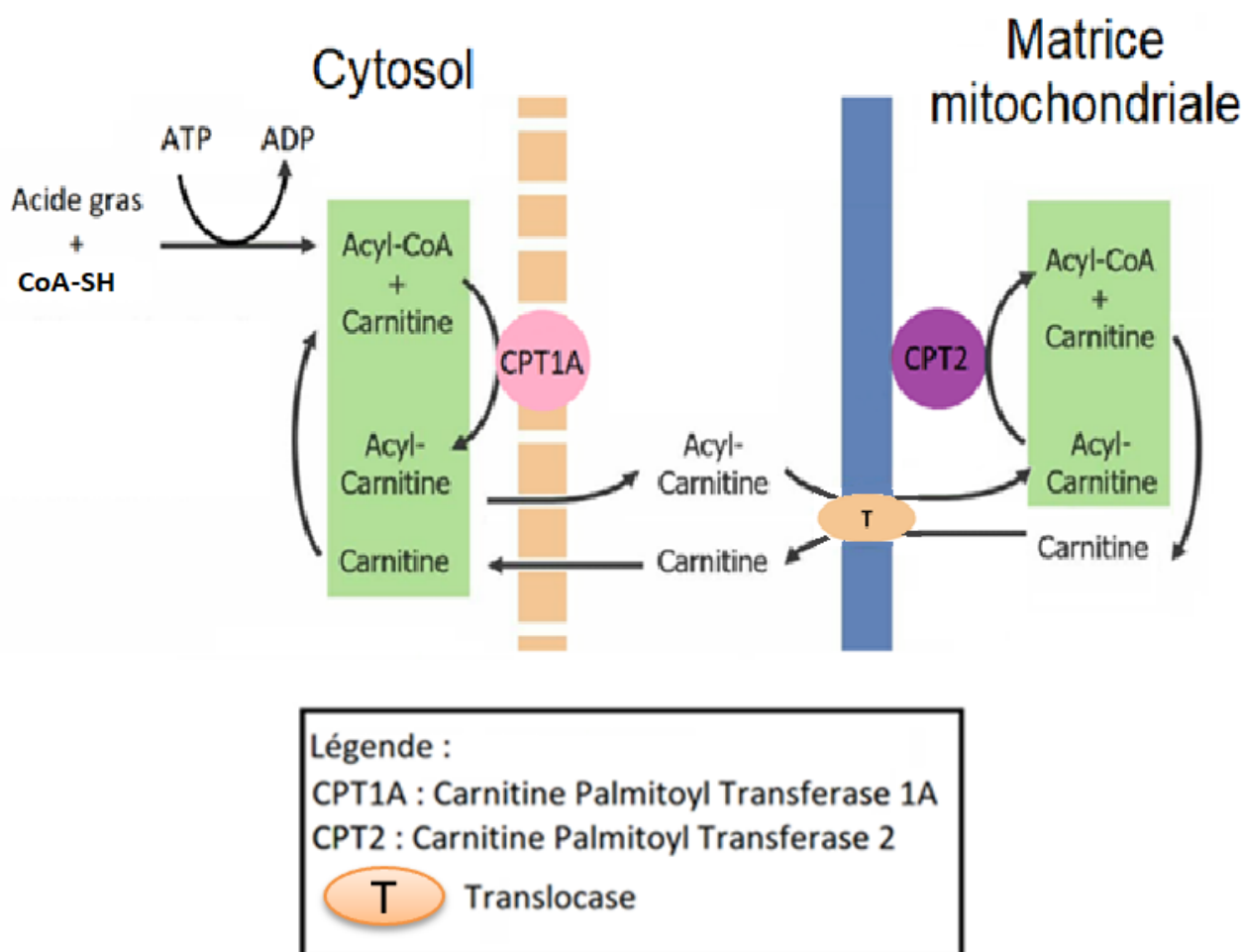
Annexe 1 Caractéristiques chimiques des 20 acides aminés constitutifs des protéines

Catégorie	Acide aminé	Chaîne latérale	Codes 3 lettres / 1 lettre	pKa ₁ α COOH	pKa ₂ α NH ₂	pKa chaîne latérale
Aliphatiques	Glycine	H -	Gly / G	2,4	9,8	-
	Alanine	CH ₃ -	Ala / A	2,4	9,9	-
	Valine		Val / V	2,3	9,7	-
	Leucine		Leu / L	2,3	9,7	-
	Isoleucine		Ile / I	2,3	9,8	-
Amine secondaire	Proline	 Formule complète	Pro / P	2,0	10,6	-
Aromatiques	Phénylalanine		Phe / F	2,2	9,3	-
	Tyrosine		Tyr / Y	2,3	9,2	10,5
	Tryptophane		Trp / W	2,5	9,4	-
Hydroxylés	Sérine	HO-CH ₂ -	Ser / S	2,2	9,2	-
	Thréonine		Thr / T	2,1	9,1	-
Soufrés	Cystéine	HS-CH ₂ -	Cys / C	1,9	10,7	8,4
	Méthionine	CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -	Met / M	2,1	9,3	-
Basiques	Lysine	NH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	Lys / K	2,2	9,1	10,5
	Arginine		Arg / R	1,8	9,0	12,5
	Histidine		His / H	1,8	9,3	6,0
Acides carboxyliques	Acide aspartique	COOH-CH ₂ -	Asp / D	2,0	9,9	3,9
	Acide glutamique	COOH-CH ₂ -CH ₂ -	Glu / E	2,1	9,5	4,1
Amides	Asparagine	NH ₂ -CO-CH ₂ -	Asn / N	2,1	8,7	-
	Glutamine	NH ₂ -CO-CH ₂ -CH ₂ -	Gln / Q	2,2	9,1	-

Document 1 : Transfert de l'acyl-CoA du cytosol à la matrice mitochondriale

Le système carnitine palmitoyl transférase est une étape essentielle de la bêta-oxydation des acides gras à longue chaîne. Avant leur dégradation, les acides gras sont tout d'abord activés en acyl-CoA sur la membrane mitochondriale externe. Avant d'être oxydés dans la matrice mitochondriale, les acides gras à longue chaîne doivent être transportés par la navette "carnitine palmitoyl transférase".

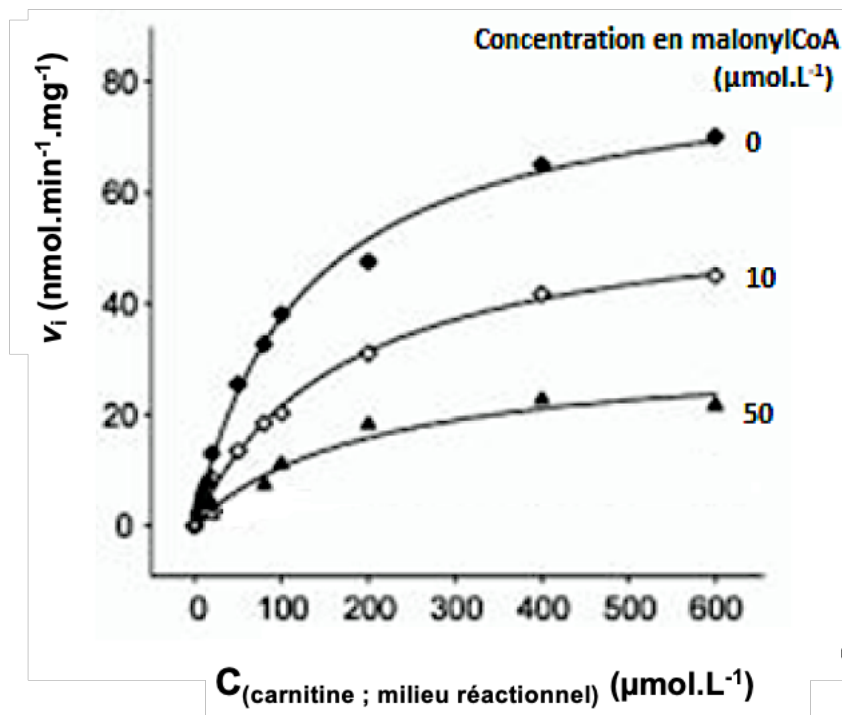
La carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A) est le premier composant de cette navette. Une translocase fait ensuite passer l'acyl-carnitine à travers la membrane mitochondriale interne.



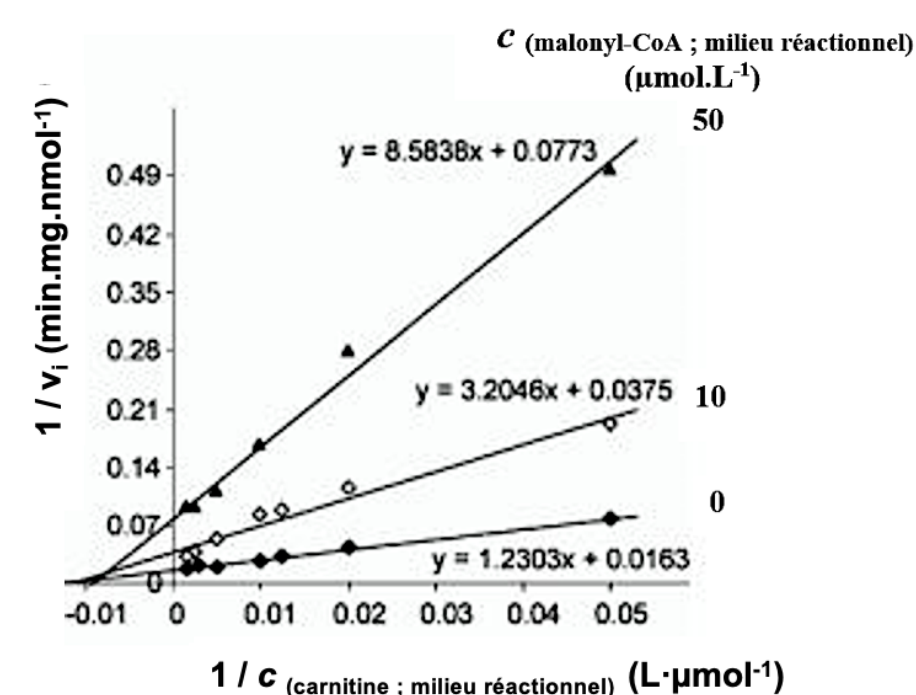
Document 2 : Étude de l'influence du malonyl-CoA sur la vitesse de la réaction catalysée par la CPT1A

L'analyse cinétique de la CPT1A avec la carnitine comme substrat est réalisée en présence de différentes concentrations de malonyl-CoA.

Représentation de Michaelis-Menten

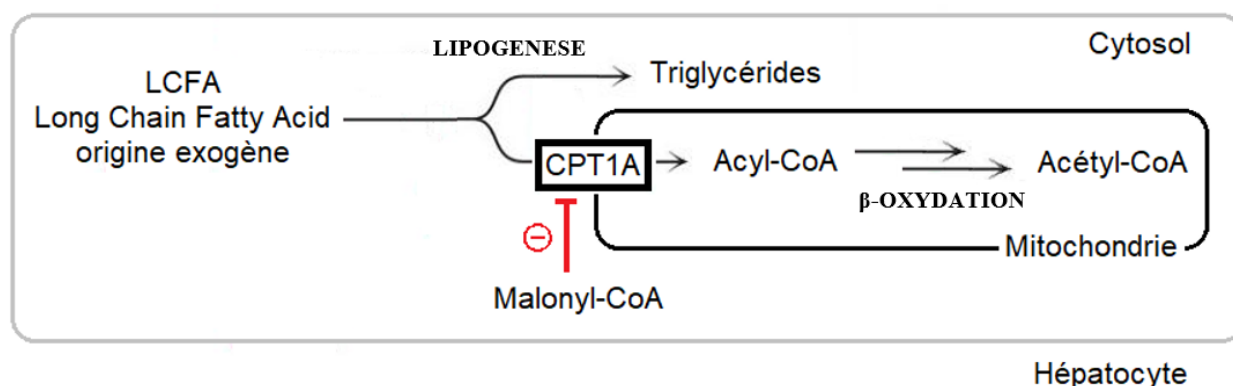


Représentation du tracé secondaire de Lineweaver-Burk



Definition by Functional and Structural Analysis of Two Malonyl-CoA Sites in Carnitine Palmitoyltransferase 1A. Assia Bentebibel , Chandrashekar Gurunathan , Montserrat Morillas , Dolores de Arriaga , Dolors Serra , Guillermina Asins , Fausto G. Hegardt , and Paulino Gomez-Puertas

Document 3 : Métabolisme simplifié des acides gras à longue chaîne (LCFA) dans le foie

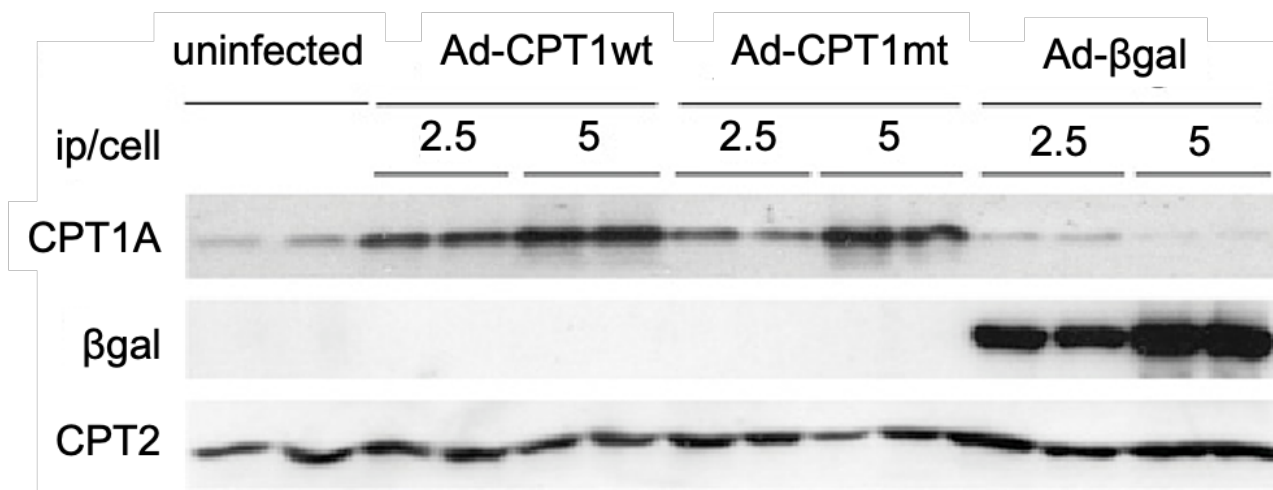


Document 4 : Results of overexpressed CPT1-wt and CPT1-mt proteins in cultured rat hepatocytes

Primary rat hepatocytes were infected with either uninfected, 2.5 or 5 infectious particles per cell (ip/cell) of the indicated adenovirus and cultured for 40 h in 5 mmol·L⁻¹ glucose.

Immunoblot analysis of cellular extracts (30 µg of protein) using specific antibodies for β-galactosidase (βgal), CPT1A and CPT2.

Western blots are representative of four independent experiments performed in duplicates.



Modulation of hepatic malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids Marie Akkaoui, Isabelle Cohen, Catherine Esnous, Véronique Lenoir, Martin Sournac, Jean Girard, Carina Prip-Buus

Document 5 : Caractérisation du mutant CPT1-mt

A. Résultats du Western blot obtenu sur les extraits cellulaires des quatre lots d'hépatocytes transfectés par le vecteur à 2,5 ip/cell. L'anticorps utilisé est marqué par un fluorochrome et reconnaît indifféremment l'enzyme mutée et sauvage.

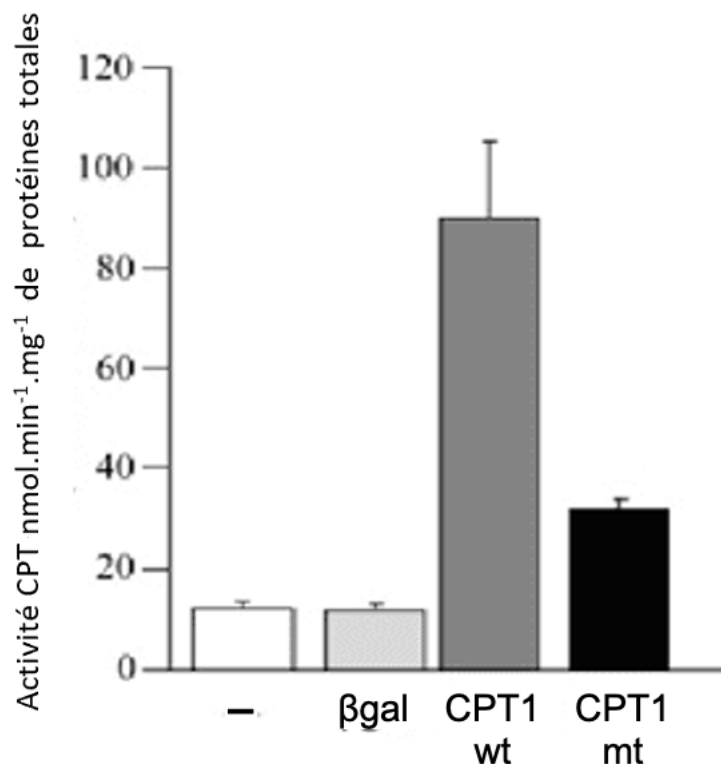
B. Résultats de mesure de l'activité CPT1 pour les extraits cellulaires des quatre lots d'hépatocytes (histogramme en-dessous du Western Blot).

A.

Intensités relatives des bandes correspondant à la protéine CPT1A

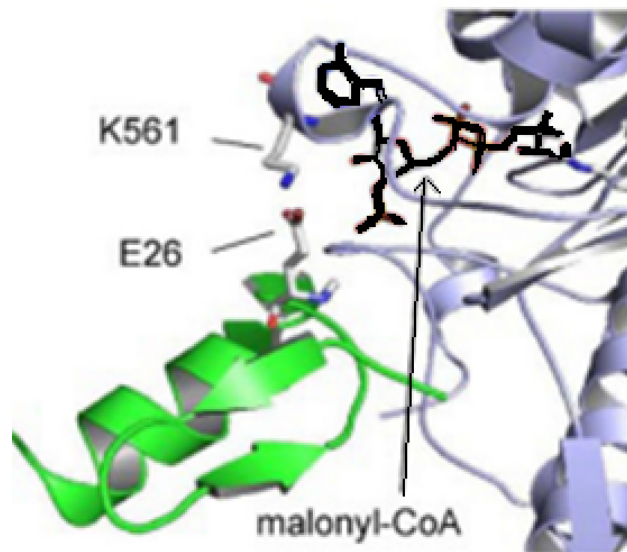


B.

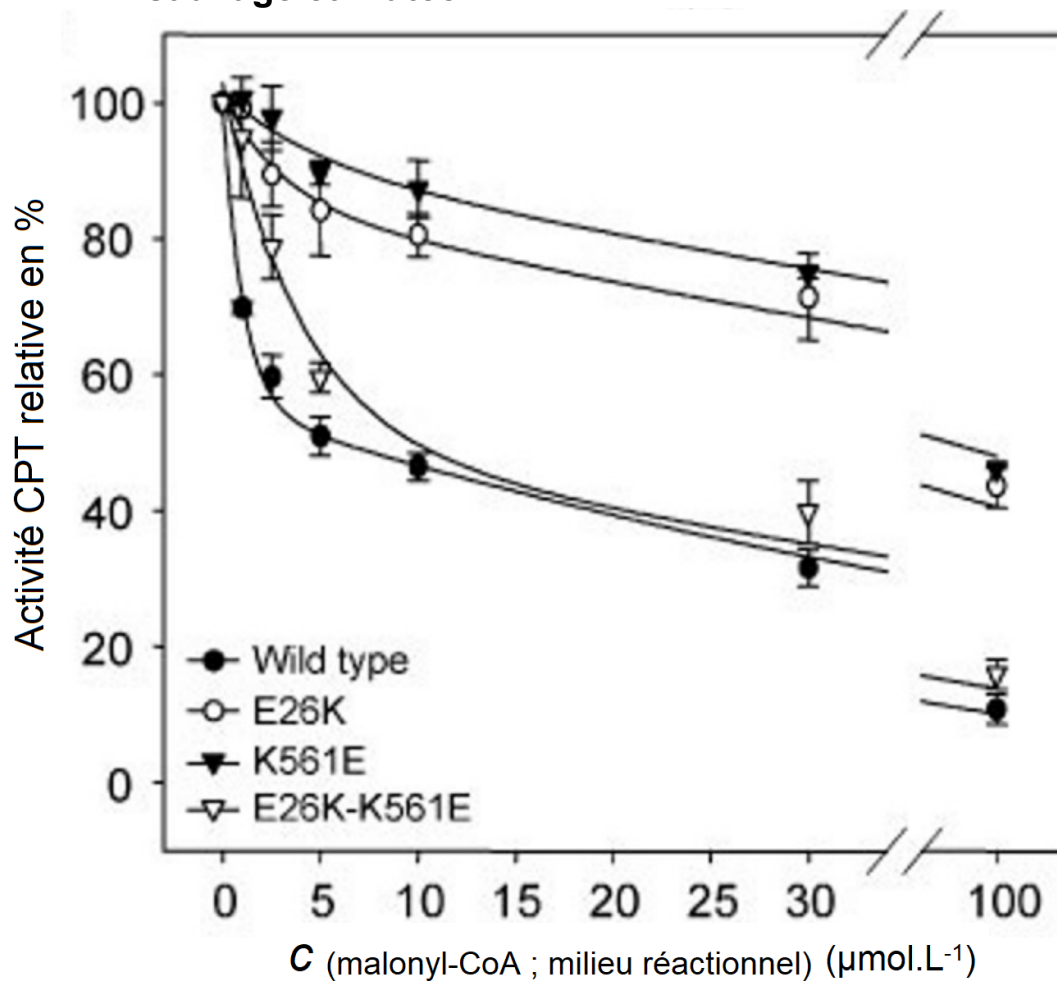


Modulation of hepatic malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids Marie Akkaoui, Isabelle Cohen, Catherine Esnous, Véronique Lenoir, Martin Sournac, Jean Girard, Carina Prip-Buus

Document 6 : Position spatiale des domaines N-ter et C-ter de CPT1A, en présence du malonyl-CoA



Document 7 : Effet du malonyl-CoA sur l'activité des enzymes CPT1A sauvage et mutée.



Definition by Functional and Structural Analysis of Two Malonyl-CoA Sites in Carnitine Palmitoyltransferase 1A* Received for publication, January 30, 2007, and in revised form, April 17, 2007, Published, JBC Papers in Press, April 23, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700885200

2023 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Durée : 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français
calculatrice avec mode examen actif

Capacités évaluées :

Maîtrise des connaissances scientifiques et techniques	3 points
Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	5 points
Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	8 points
Pertinence et cohérence des solutions proposées	2 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2 points

Recyclage des métaux de circuits imprimés usagés par biolixiviation

De nombreux déchets sont générés en fin de vie des équipements électriques et électroniques, en particulier des métaux d'intérêt entrant dans la composition des circuits imprimés.

Le recyclage des métaux par biolixiviation permettrait d'économiser des matières premières, de moins dépendre de pays tiers, de développer un circuit durable court et de créer de l'emploi. La biolixiviation est un processus permettant d'extraire des métaux lourds, par exemple l'or, le cuivre, le cobalt, le nickel, l'aluminium, à partir de minerais faiblement concentrés, par une communauté de bactéries, qualifiée de consortium bactérien.

L'optimisation du processus de biolixiviation nécessite une connaissance suffisante du métabolisme énergétique du consortium bactérien. Une étude du processus de biolixiviation constitue une étape préalable à la mise en œuvre du recyclage des circuits imprimés en bioréacteur.

1. Métabolisme énergétique des bactéries réalisant la biolixiviation

Un consortium de bactéries extrémophiles aérobies a été sélectionné pour sa capacité à réaliser une biolixiviation efficace. Les espèces majoritaires de ce consortium sont *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *Sulfobacillus benefaciens*.

Acidithiobacillus (At) ferrooxidans est diazototrophe facultative. L'arbre phylogénétique du genre *Sulfobacillus* est présenté sur le **document 1**. La classification est fondée sur l'analyse de la séquence des gènes de l'ARN 16S.

1.1. Expliquer pourquoi l'analyse de la séquence des gènes de l'ARN 16S permet d'établir la classification des espèces de *Sulfobacillus*. (C1)

Les bactéries du consortium sont chimiolithotrophes, autotrophes, prototrophes, mésophiles et acidophiles. Elles cultivent dans des conditions et un milieu de culture particulier, présentés dans le **document 2**.

1.2. Établir les relations entre les caractéristiques des bactéries présentées ci-dessus et les conditions ainsi que le milieu de culture utilisés. (C3)

1.3. Montrer que la diazotrophie de l'espèce *At. ferrooxidans* ne peut pas être mise en évidence par une culture en milieu 0Cm. (C3)

Le **document 3** présente la chaîne respiratoire d'*At. ferrooxidans*.

1.4. Justifier l'appartenance de *At. ferrooxidans* aux bactéries Gram négatives. (C1)

- 1.5. Reproduire les deux membranes et reporter sur la copie les lettres de A à C. Identifier les compartiments correspondants. Sur ce schéma, représenter l'ATP synthase et son mécanisme de production d'ATP. (C2)
- 1.6. Préciser le donneur et l'accepteur final d'électron. En déduire le type de respiration correspondant à cette voie. (C1)

2. Biolixiviation adaptée à l'extraction des métaux des circuits imprimés usagés

L'étude porte sur l'intérêt d'utiliser le consortium de bactéries pour dissoudre les métaux lourds des circuits imprimés (PCB : printed circuit board) usagés en vue de leur recyclage. Le principe de la biolixiviation est schématisé dans le **document 4**.

- 2.1. Expliciter le rôle des bactéries dans le processus de biolixiviation. (C3)

Le milieu de base 0Cm est additionné de broyat de circuits imprimés usagés (PCB) pour tester la biolixiviation. Or, les métaux lourds cationiques à forte concentration sont toxiques pour les bactéries.

Une étude préliminaire est menée pour évaluer la toxicité des métaux lourds des PCBs sur les bactéries du consortium. Le **document 5** présente le protocole mis en œuvre et les résultats obtenus.

- 2.2. À partir du graphe A, comparer les résultats obtenus pour les trois concentrations de lixiviat. Estimer la durée du temps de latence, comparer visuellement les vitesses spécifiques de croissance en phase exponentielle. (C2)
- 2.3. Analyser les résultats du graphe B et les interpréter au regard du processus de biolixiviation. (C3)
- 2.4. À partir de l'analyse des deux graphes, argumenter l'absence d'effet toxique sur le consortium bactérien par les métaux lourds solubilisés. (C3)
- 2.5. Conclure quant à l'effet de la concentration en PCBs sur la biolixiviation. (C4)

3. Biolixiviation en bioréacteurs en procédé continu à deux étages

Pour optimiser la méthode de traitement des PCBs, un système à deux réacteurs en série en mode continu est testé avec un temps de séjour 3,2 h pour le premier bioréacteur. Le **document 6** présente ce montage.

- 3.1. Justifier l'appellation de procédé continu. (C1)
- 3.2. Identifier les rôles du bullage avec de l'air enrichi en CO₂ du premier bioréacteur. (C2)
- 3.3. Préciser la fonction du premier bioréacteur. (C2)
- 3.4. Montrer que le débit d'entrée/sortie du premier bioréacteur est de 46,9 mL·h⁻¹. (C3)

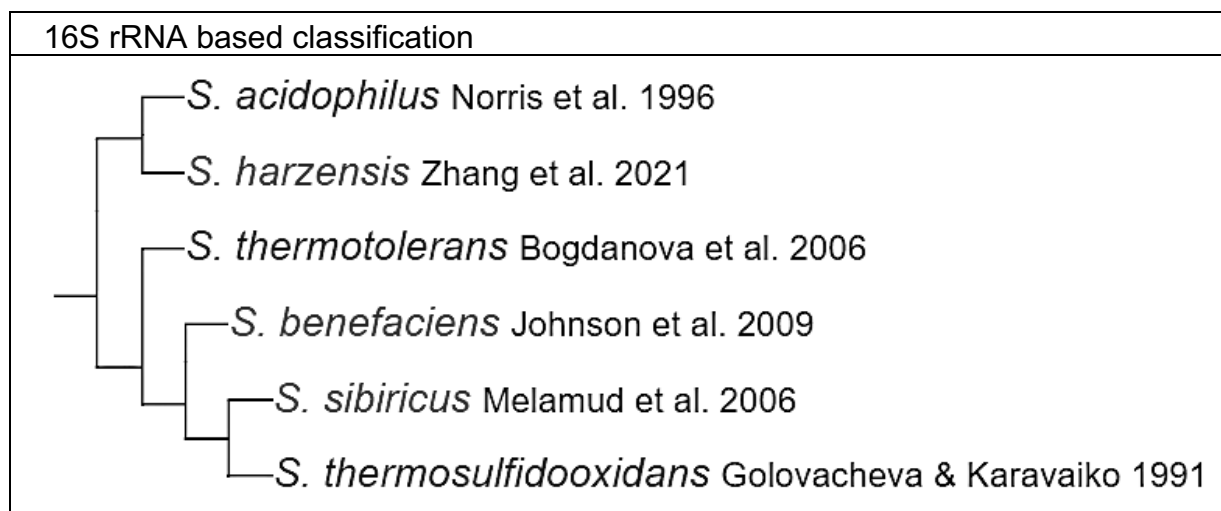
L'agitation du deuxième bioréacteur est optimisée par l'équipement d'un système d'agitation à deux mobiles superposés : un mobile Rushton en position inférieure et un mobile d'agitation à pales inclinées à 45° en position supérieure.

- 3.5. Schématiser le système d'agitation du deuxième bioréacteur avec les flux liquidiens associés. Préciser le rôle de chacun des deux mobiles. (C2, C4)
- 3.6. Déterminer la vitesse spécifique exponentielle de croissance moyenne ($Q_{X_{\text{expo}}}$) du consortium de bactéries dans le deuxième bioréacteur, sachant que ce chimostat est à l'équilibre dynamique. En déduire le temps de génération du consortium. (C3)

La capacité à dissoudre les différents métaux des PCBs a été testée en calculant les rendements de dissolution dans le bioréacteur à double étage. Les résultats sont représentés sur le **document 7**

- 3.7. Analyser les résultats et conclure quant à la possibilité de recycler les métaux testés des circuits imprimés (PCBs). (C3)

Document 1 : Extrait d'un arbre phylogénétique du genre *Sulfobacillus*.



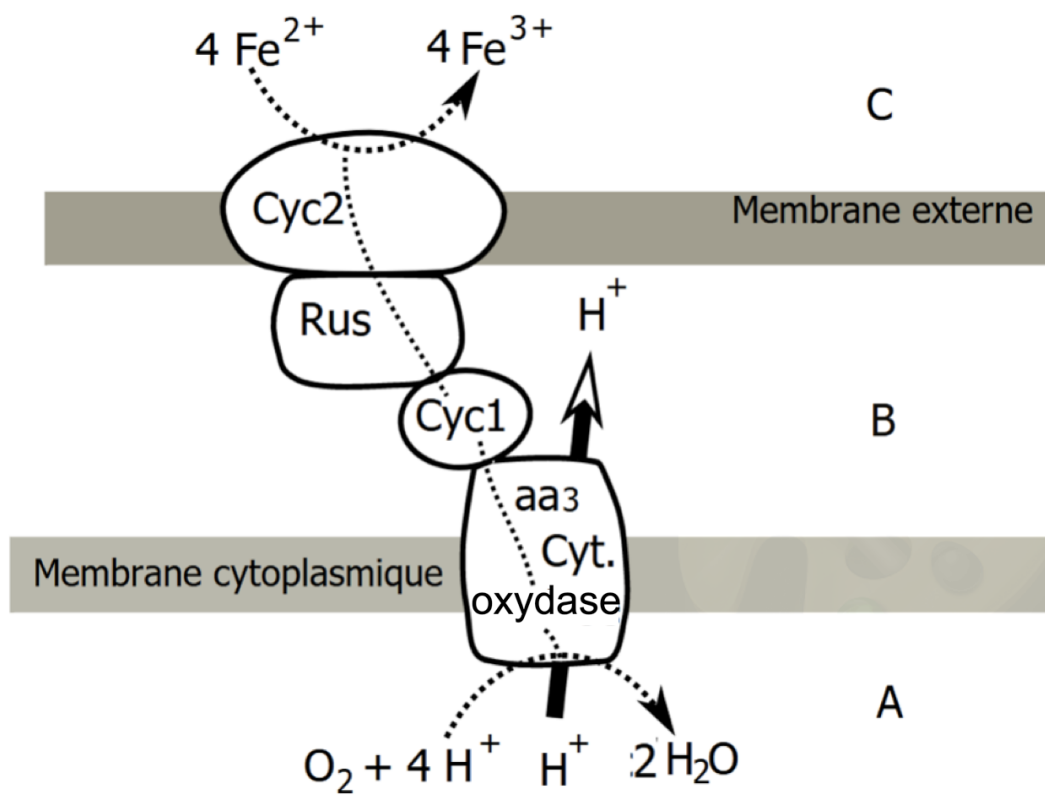
D'après Videsh Ramsahai — Travail personnel. In Wikipedia [en ligne],
mis à jour le 22 septembre 2022 [consulté le 16 novembre 2022]

Document 2 : Conditions de culture sur milieu 0Cm

The nutrient medium was denoted 0Cm and made up of 0.4 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.81 g·L⁻¹ H₃PO₄ 85 %, 0.48 g·L⁻¹ KOH and 0.52 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O. Ferrous sulphate was added when needed as FeSO₄·7H₂O. Concentrated sulphuric acid was used to adjust the pH to 1.3.

The gas supply system was designed to accommodate air enriched with 1 % CO₂ and the temperature was maintained at 36°C.

Document 3 : Chaîne respiratoire et oxydation du Fe(II) chez *Acidithiobacillus*

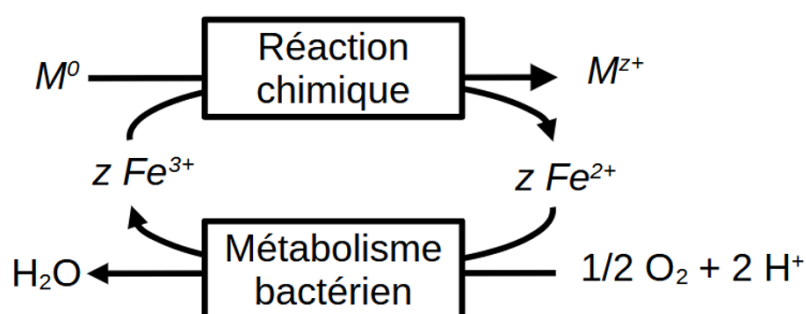


Cyc2, Rus, Cyc1 et aa3 cyt. oxydase = protéines transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire représentée.

Adapté de Zhang S et al, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its potential application. *Extremophiles*. 2018 Jul ; 22(4) :563-579.

Document 4 : Processus de biolixiviation.

En milieu acide, le Fe (III) en excès, oxyde un métal solide M^0 pour le solubiliser en ion métallique M^{z+} . Le Fe (II) produit sert de donneur d'électrons pour le métabolisme énergétique microbien.



Document 5 : Étude de la toxicité des métaux lourds sur le consortium bactérien

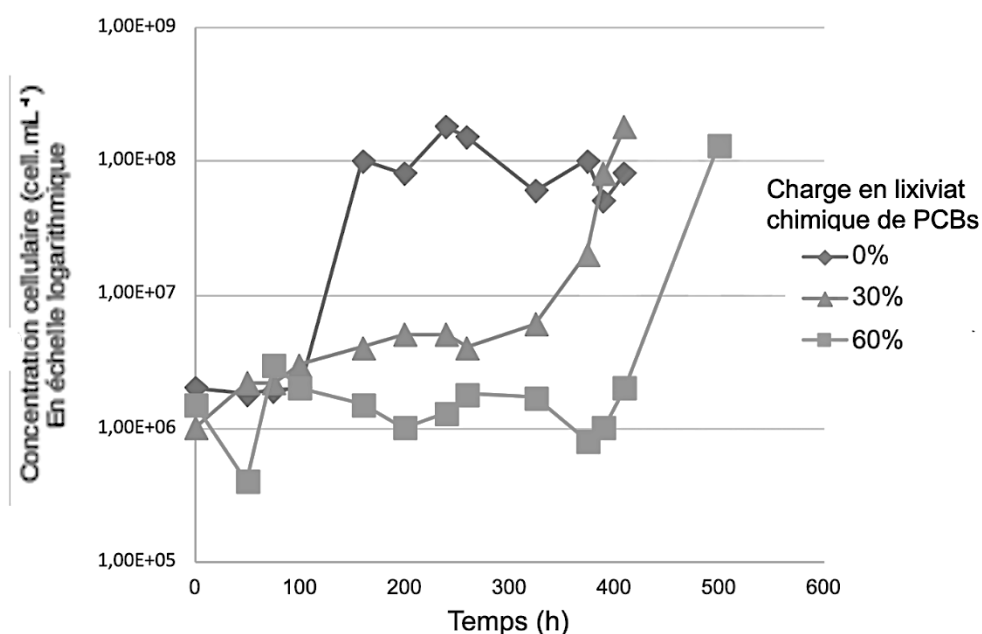
Des broyats de PCBS ont été traités selon un procédé chimique qui entraîne la libération des métaux lourds sous forme de cations solubles. La solution obtenue est appelée lixiviat chimique.

Pour étudier l'effet toxique du lixiviat chimique sur la croissance des bactéries et la capacité du consortium à oxyder le Fe (II), une croissance du consortium bactérien est mise en œuvre dans trois conditions de concentration du lixiviat chimique de PCBs.

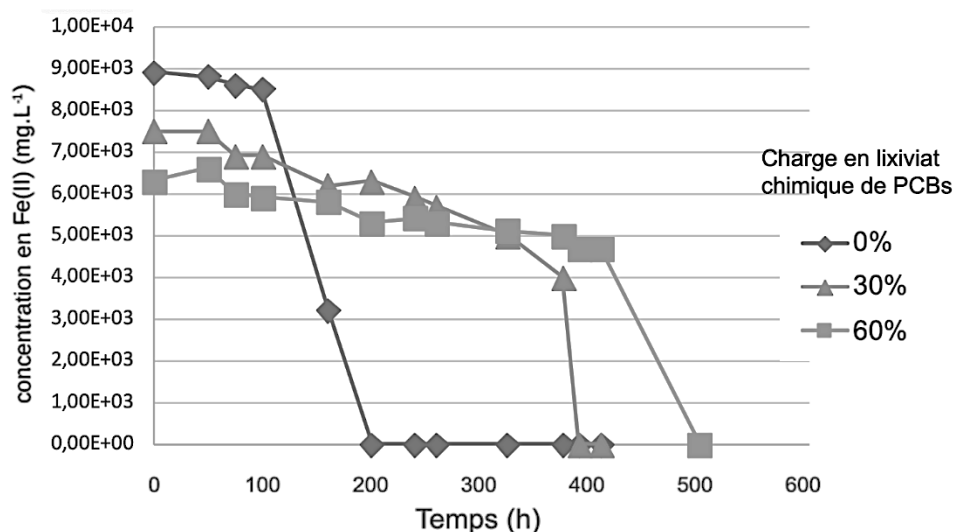
Différentes concentrations de lixiviat chimique (0 % v/v, 30 % v/v et 60 % v/v) ont été testées. Chaque flacon a été inoculé avec 10 mL (10 % v/v) de préculture de consortium de bactéries contenant $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de Fe(II) et $10^7 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Les flacons ont été maintenus dans un incubateur à 40°C et agités à 107 rpm.

Graphe A



Graphe B



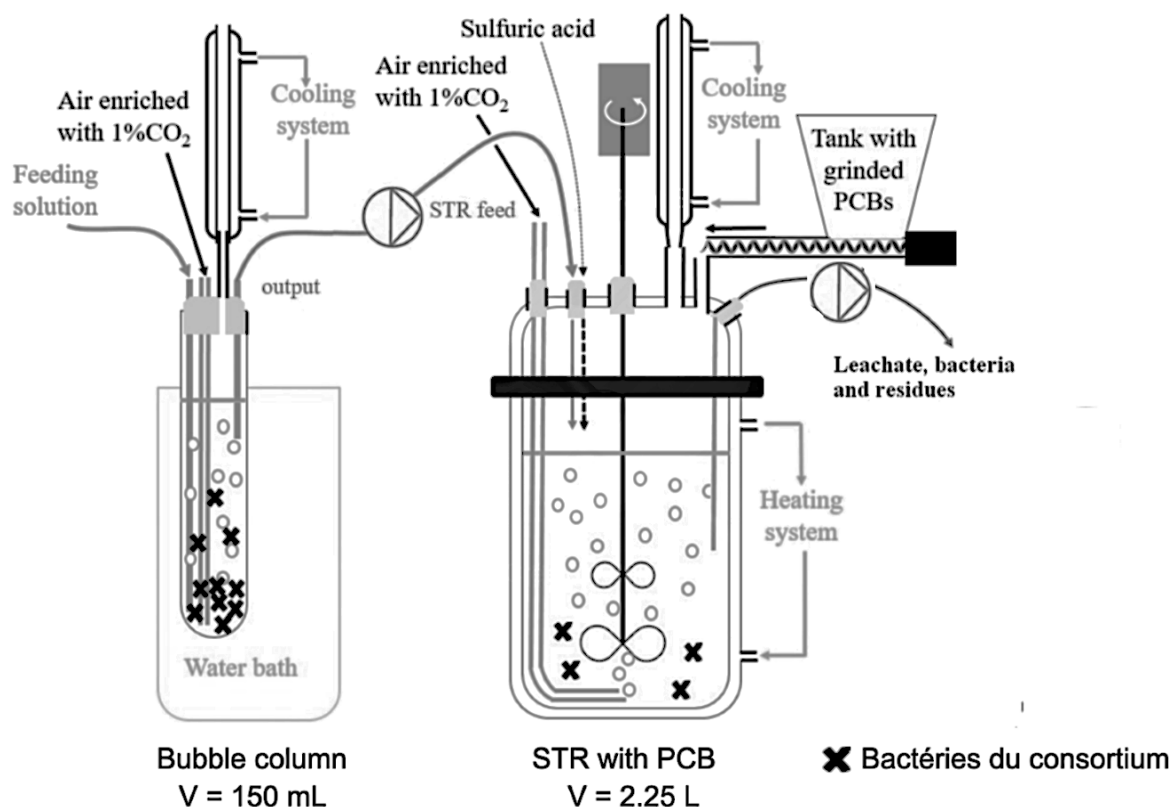
Document 6 : Schéma du système en continu à double étage.

The bubble column contains 0Cm medium containing 1 g.L⁻¹ ferrous sulphate.

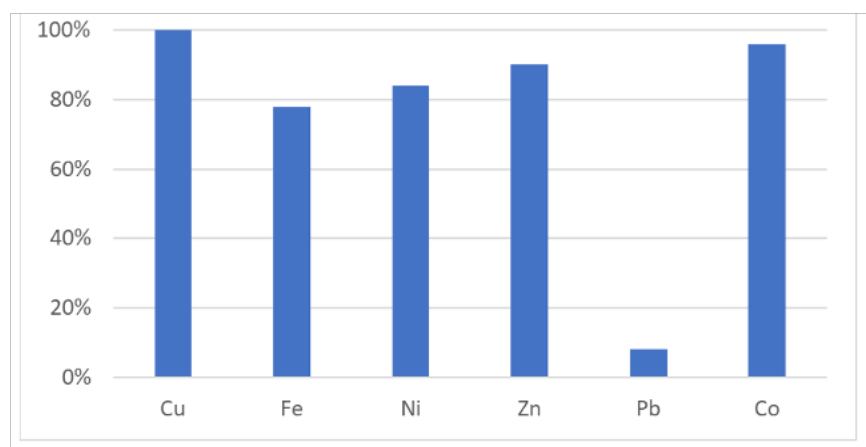
The leached bioreactor (STR with PCBs) is equipped with an agitator which is a dual impeller system (axial/radial) consisting of a standard Rushton turbine in combination with a 45° axial flow impeller.

All experiments were performed without sterilisation to be as representative of industrial conditions as possible. The system enters a dynamic stationary equilibrium.

Donnée : leachate = lixiviat.



Document 7 : Rendement de dissolution (%) du bioréacteur à double étage



Le rendement est exprimé en gramme de métal M²⁺ pour 100 grammes de métal M⁰ contenu dans les PCB

Hubau A. et al., Separation and Purification Technology, Elsevier, 2020, 238, pp.116481
Recovery of metals in a double stage continuous bioreactor for acidic bioleaching of printed circuit boards (PCBs).

2023 - U42 : Biologie cellulaire

Durée : 2 h – coefficient 1

Matériel autorisé : dictionnaire anglais/français

Capacités évaluées :

Maîtrise des connaissances scientifiques et techniques	4 points
Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	4 points
Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	7 points
Pertinence et cohérence des solutions proposées	3 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2 points

Transition épithélio-mésenchymateuse et immunothérapie anti-cancéreuse

La Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) fait partie des étapes tardives du processus de cancérisation. Ce phénomène cellulaire est corrélé avec la formation de métastases.

Durant la TEM, les cellules épithéliales se transforment en cellules mésenchymateuses qui acquièrent de nouvelles propriétés conduisant à la formation de métastases. La dissémination des métastases est favorisée par leur échappement au système immunitaire et leur résistance aux traitements de chimiothérapie. Ces deux phénomènes constituent les principaux écueils dans la lutte contre le cancer. Depuis peu, l'immunothérapie offre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

1. Étude phénotypique des cellules épithéliales et mésenchymateuses

Le **document 1** présente un schéma du processus de TEM ainsi que les résultats d'une analyse par cytométrie de flux, obtenus pour une population de cellules d'origine épithéliale, entrée en phase de TEM.

- 1.1. Analyser les résultats obtenus pour argumenter que la TEM s'accompagne d'une perte d'expression en E-cadhérine et d'une augmentation de l'expression de la vimentine.
Montrer que la population de cellules étudiée est en début de TEM. (C3)
- 1.2. Schématiser un épithélium. Indiquer la localisation de la E-cadhérine sur ce schéma.
(C1)
- 1.3. Proposer, à partir du schéma du processus de TEM, une analyse comparative, aux niveaux cellulaire et tissulaire, des cellules épithéliales et des cellules mésenchymateuses.
En déduire une propriété majeure des cellules mésenchymateuses, argumenter. (C2)

Les cadhérines participent à des voies de transduction de signaux intracellulaires dont l'une est présentée dans le **document 2**.

- 1.4. Analyser cette voie de transduction pour montrer les conséquences de la perte de l'E-cadhérine. (C2)

Les cellules mésenchymateuses sont capables de migrer en formant des lamellipodes. Ces derniers contiennent un réseau dynamique d'actine, dont la polymérisation est contrôlée par plusieurs protéines comme le complexe Arp 2/3 (Actin Related Protein).

Le **document 3** présente le principe d'une technique de mesure de la polymérisation de l'actine *in vitro*, ainsi que les résultats d'une étude analysant l'influence de Arp 2/3 sur la vitesse de polymérisation de l'actine.

- 1.5. Expliquer le principe de la technique utilisée pour mesurer la polymérisation de l'actine.
(C3)

- 1.6. Comparer la vitesse de polymérisation de l'actine G ainsi que les concentrations critiques, en présence et en absence d'Arp 2/3. Conclure sur l'influence du complexe Arp 2/3 sur la migration cellulaire. (C3)

2. Mise au point d'un modèle d'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Afin d'explorer *in vitro* les caractéristiques cellulaires et moléculaires des cellules en TEM, les cellules de la lignée A549, issue d'un « cancer du poumon non à petites cellules » (CPNPC), ont été choisies comme modèle d'étude.

Pour induire la TEM, les cellules A549 sont cultivées en présence de TNF- α et de TGF- β .

Le **document 4** présente les résultats de trois expériences :

- Observation de cellules au microscope à contraste de phase,
 - Test de migration de cellules,
 - Mise en évidence de marqueurs membranaires par Western-blot.
- 2.1. Présenter deux intérêts de l'utilisation du microscope inversé à contraste de phase en technologie cellulaire. (C1)
- 2.2. Proposer un schéma annoté de l'édifice moléculaire correspondant à une détection positive de la E-cadhérine par Western blot. (C2)
- 2.3. Analyser les résultats obtenus pour chacune des trois expériences. (C3)
- 2.4. Argumenter la pertinence du choix des cellules A549 comme modèle d'étude. (C4)

3. Transition épithélio-mésenchymateuse et immunothérapie

Le système immunitaire est capable de reconnaître et d'éliminer les cellules cancéreuses.

- 3.1. Schématiser les interactions moléculaires impliquées dans la reconnaissance d'une cellule cancéreuse par un lymphocyte T cytotoxique. Expliquer les phénomènes à l'origine de la destruction de la cellule cancéreuse. (C1)

Les cellules qui subissent la TEM échappent parfois au système immunitaire. L'une des stratégies d'échappement couramment utilisée par les cellules tumorales, est l'expression de PD-L1 (Programmed cell Death protein - Ligand) qui inactive les lymphocytes T cytotoxiques.

L'étude de l'expression de PD-L1 dans le modèle d'induction de la TEM des cellules A549 est présentée dans le **document 5**.

- 3.2. Expliquer le rôle du témoin réalisé dans cette étude. (C2)
- 3.3. Analyser les résultats obtenus. (C3)

La protéine PD-L1 est devenue une cible privilégiée des thérapies anti-cancéreuses basées sur l'utilisation des anticorps monoclonaux.

Des anticorps monoclonaux MEDI4736 dirigés contre PD-L1 ont été produits par la technique des hybridomes présentée dans le **document 6**.

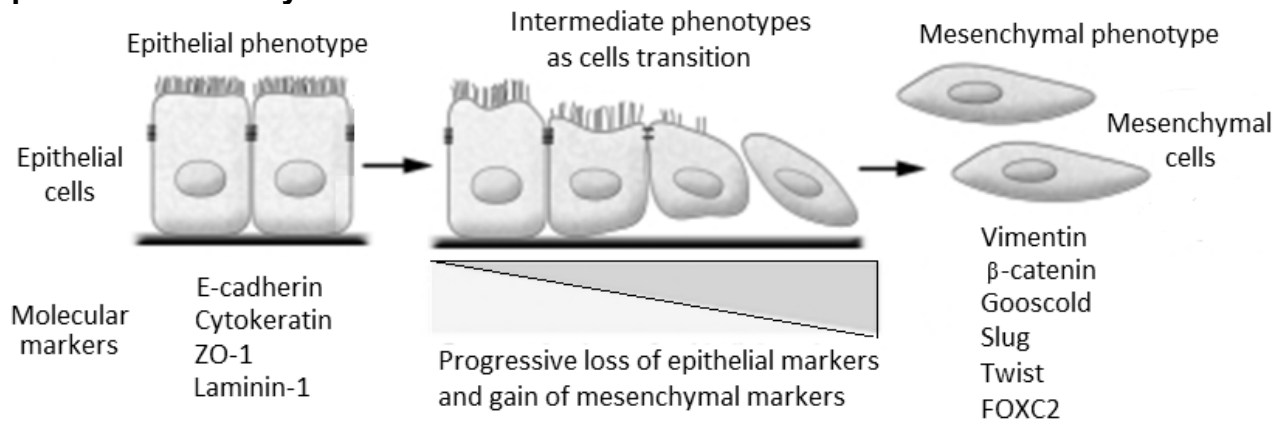
- 3.4. Argumenter le choix du milieu HAT pour la sélection des hybridomes. (C3)

Pour tester l'efficacité des anticorps MEDI4736, des cellules cancéreuses associées ou non à des lymphocytes T cytotoxiques sont implantés dans des souris immunodéficientes. Des anticorps MEDI4736 sont ensuite injectées à ces souris. L'évolution du volume des tumeurs est suivi au cours du temps. Le **document 7** présente les résultats de cette étude.

- 3.5. Analyser et interpréter les résultats obtenus. (C3)
- 3.6. Dédire de l'ensemble des études menées, les phénomènes mis en jeu, depuis l'action des anticorps MEDI4736 jusqu'à la régression des tumeurs. (C4)

Document 1 : La transition épithélio-mésenchymateuse.

Epithelial-mesenchymal transition

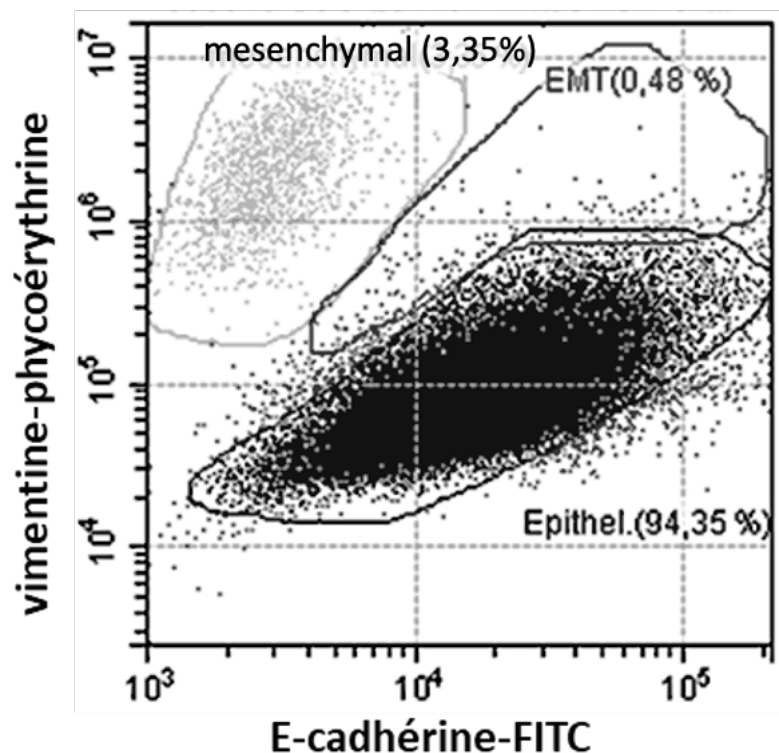


D'après Kalluri R et al., *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*. 2009 Jun ;119(6):1420-8.

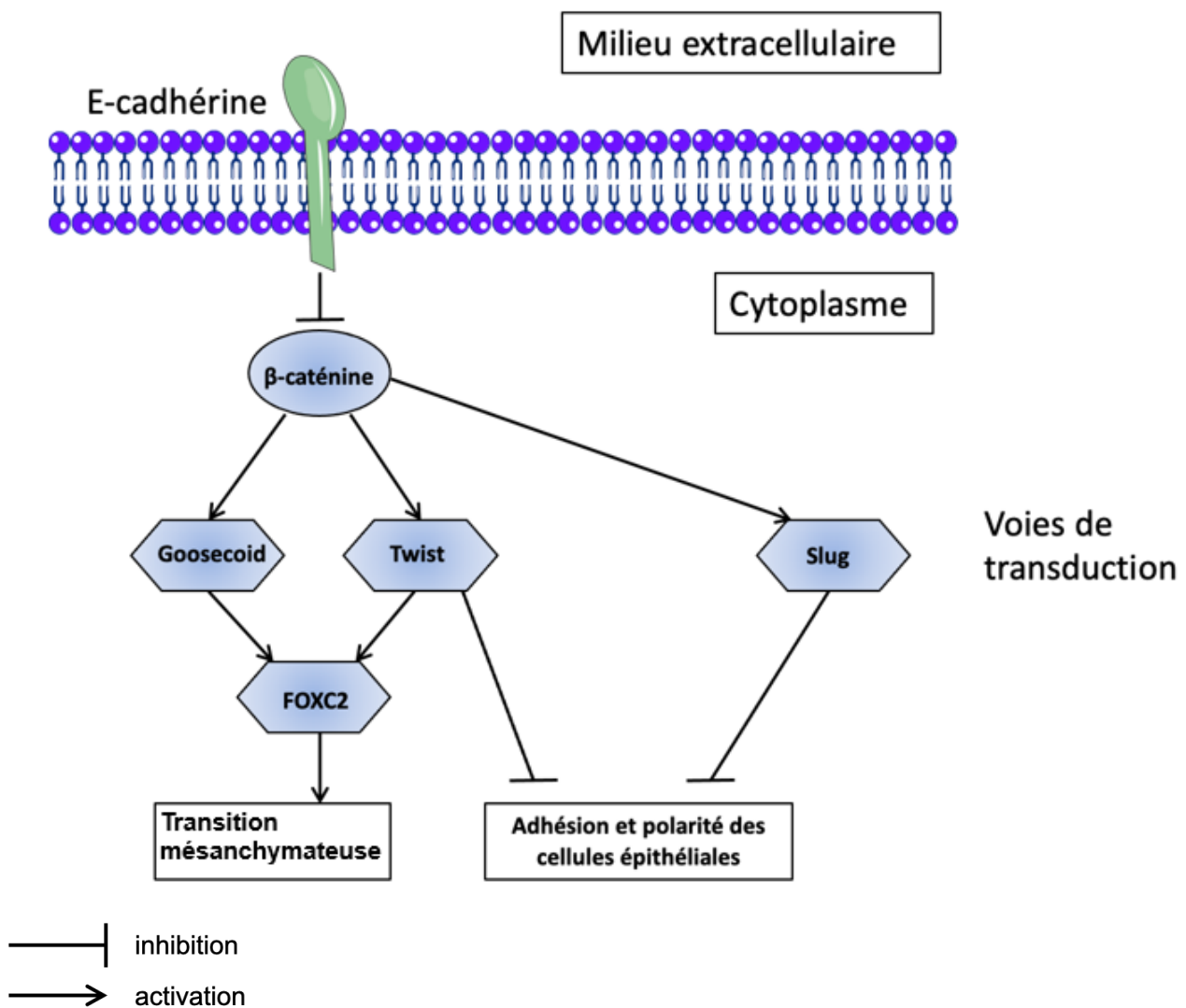
Analyse en cytométrie en flux de cellules en phase de TEM, marquées par des anticorps.

Anticorps utilisés pour le marquage :

- anticorps anti-E-cadhérine couplé au FITC
- anticorps anti-Vimentine couplés à la phycoérythrine



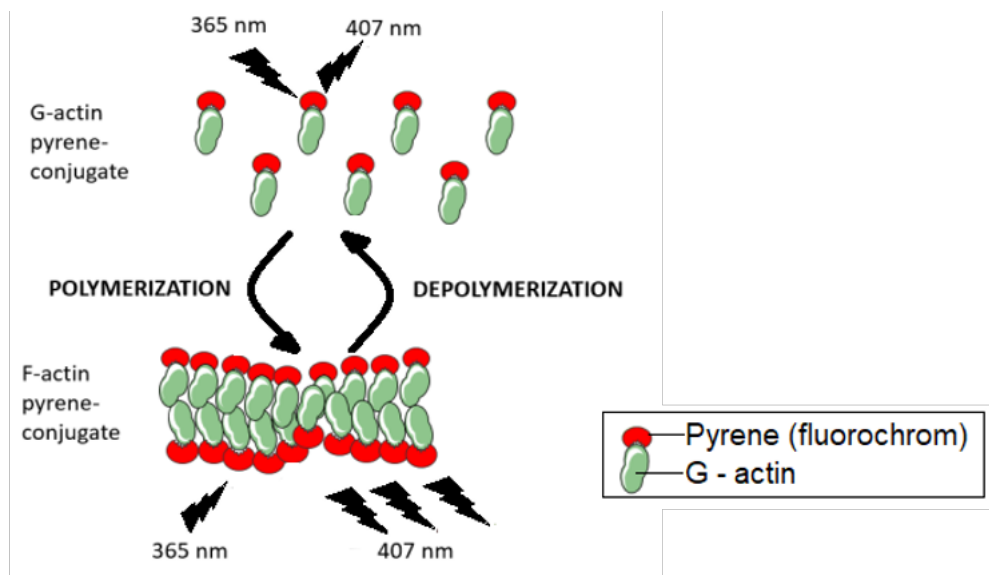
D'après Steinbichler et al., *Pleiotropic Effects of Epithelial Mesenchymal Crosstalk on Head and Neck Cancer : EMT and beyond*. *Cancer Microenviron*. 2019 Dec;12(2-3):67-76.

Document 2 : une des voies de transduction impliquant la E-cadhérine

D'après Yang J et al., Dev Cell. 2008 Jun;14(6):818-29.
Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.

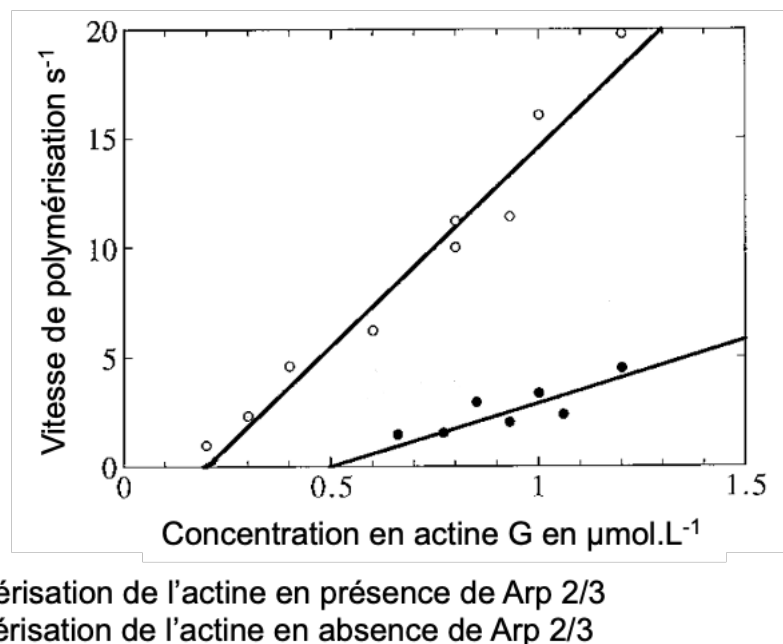
Document 3 : Étude de la polymérisation de l'actine dans les lamellipodes.

Principe de la mesure de la polymérisation de l'actine *in vitro*



Les monomères d'actine G sont liés à un pyrène. Le pyrène est positionné à proximité de résidus de tryptophane et de tyrosine présents dans l'actine G, avec pour conséquence d'éteindre en partie la fluorescence du pyrène. Lorsque les monomères d'actine G s'assemblent, elle subit une légère réorganisation structurale qui tend à éloigner le pyrène des résidus tryptophane et tyrosine.

Influence de Arp 2/3 sur la vitesse de polymérisation de l'actine G

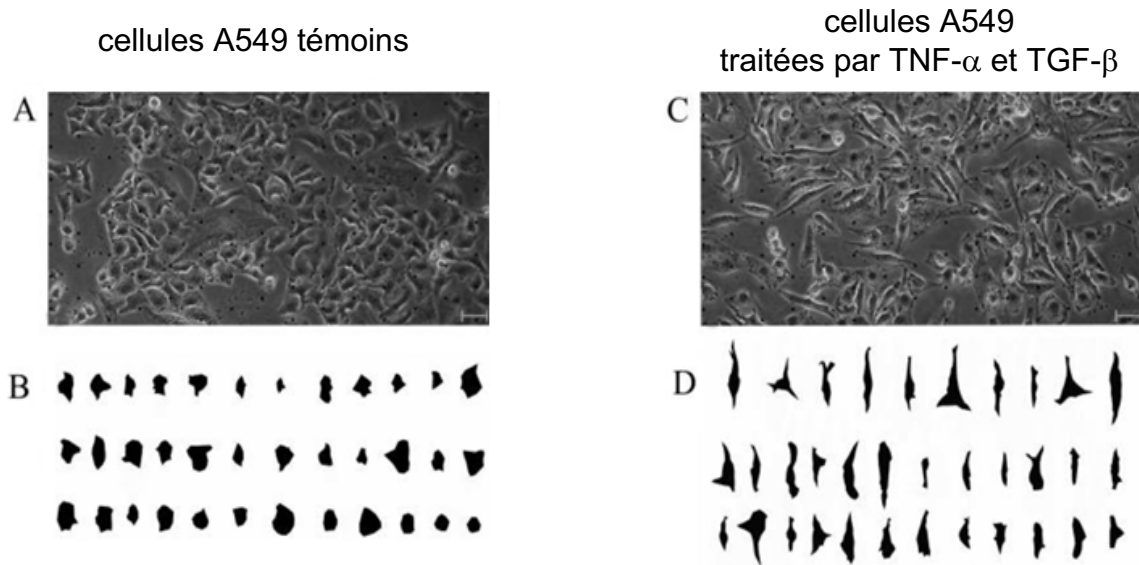


La concentration critique est la concentration en actine G à partir de laquelle la polymérisation démarre.

D'après Ressad F et al., Control of actin filament length and turnover by actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) in the presence of capping proteins and ARP2/3 complex. J Biol Chem. 1999 Jul 23;274(30):20970-6.

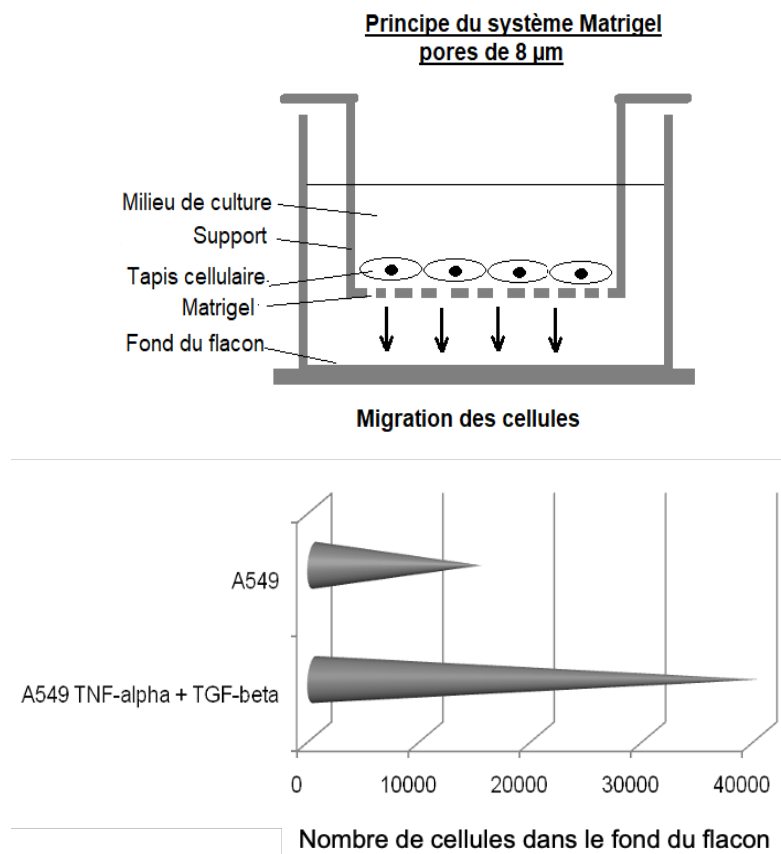
Document 4 : Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse par TNF- α et TGF- β .

Observation des cellules au microscope à contraste de phase



A et C : Images obtenues en microscopie à contraste de phase (Olympus CKX41-A32PH)
 B et D : Analyse de la forme des cellules par le logiciel Image Pro Plus

Test de migration des cellules A549 traitées au TNF- α et TGF- β par le système Matrigel pores de 8 μ m



Document 4 : Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse par TNF- α et TGF- β . (suite)

Mise en évidence de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux par Western blot sur des cellules A549 cultivées avec ou sans TNF- α et TGF- β

Protocol :

Cellular proteins were separated by electrophoresis (SDS-PAGE) in a polyacrylamide gel in presence of sodium dodecylsulfate (SDS) according to their molecular weight, then transferred to a nitrocellulose membrane for staining by specific antibodies. For E-cadherin detection, an anti-E-cadherin antibody produced in goat is used. The secondary antibody is a peroxidase-conjugated anti-Goat Ig antibody. For Vimentin detection, an anti-vimentin antibody produced in rabbit is used. The secondary antibody is a peroxidase-conjugated anti-Rabbit Ig antibody. For GAPDH detection, an peroxidase-conjugated anti-GAPDH antibody is used. Detection of GAPDH is used for normalization because it is an "housekeeping protein". The substrate used is DAB (3,3'Diaminobenzidine). In the presence of peroxidase, DAB produces a brown precipitate.

Results :



D'après Asgarova A. (2015). La TEM régule l'expression de PD-L1 dans le cancer du poumon, non à petites cellules : un rôle pour IKK. [Thèse de doctorat – Spécialité Médecine humaine et pathologie – Université de Franche-Comté]. NNT : 2015BESA3007

Document 5 : Étude de l'expression de PD-L1 dans les cellules A549 exposées au TNF- α et au TGF- β

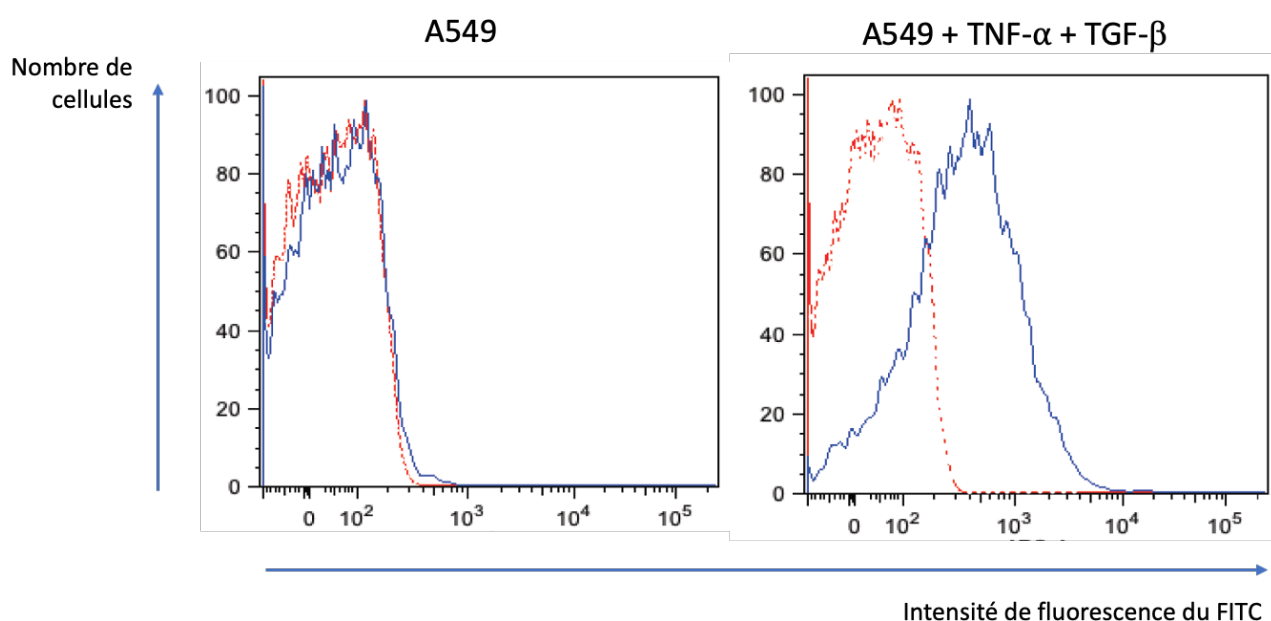
Protocol :

For membrane staining, cells were incubated with corresponding antibody for 30 min at 4°C, then washed with PBS (phosphate buffered saline) and centrifugated for 10 minutes at 300 g. Ten thousand cells from each sample were evaluated for fluorescence detection using cytometer.

Antibody used for Flow Cytometer are FITC-conjugated IgG anti-PD-L1 antibody for PD-L1 detection and a non-specific FITC-conjugated IgG for non-specific detection.

Each sample of cells is stained either by the anti-PD-L1 antibody or by the non-specific antibody. Then the two results are overlaid.

Results :



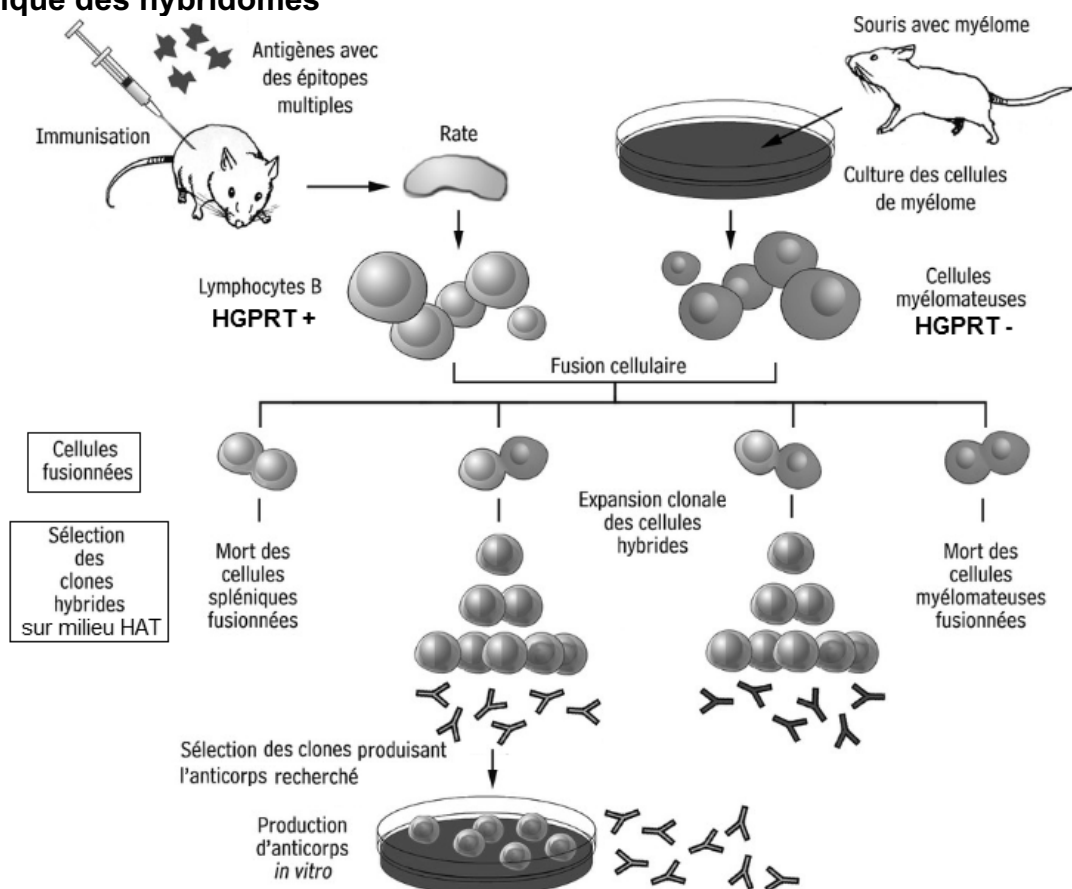
Courbe en pointillé : marquage avec l'anticorps non spécifique

Courbe en trait plein : marquage avec l'anticorps anti-PD-L1

D'après Asgarova A. (2015). La TEM régule l'expression de PD-L1 dans le cancer du poumon, non à petites cellules : un rôle pour IKK. [Thèse de doctorat – Spécialité Médecine humaine et pathologie – Université de Franche-Comté]. NNT : 2015BESA3007

Document 6 : Production d'anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes

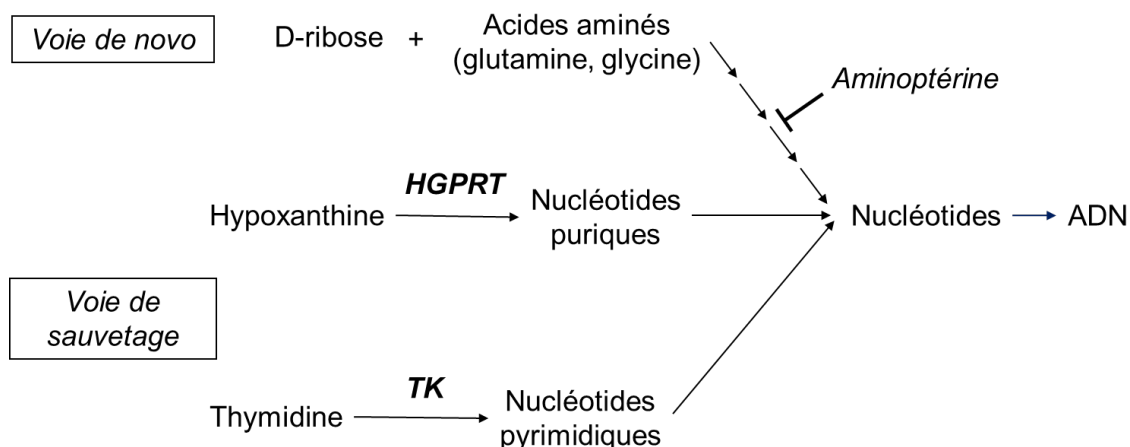
Technique des hybridomes



HGPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

Milieu HAT : Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine

Voies de synthèse des nucléotides



HGPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

TK : Thymidine kinase

HAT : Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine

—| : inhibition

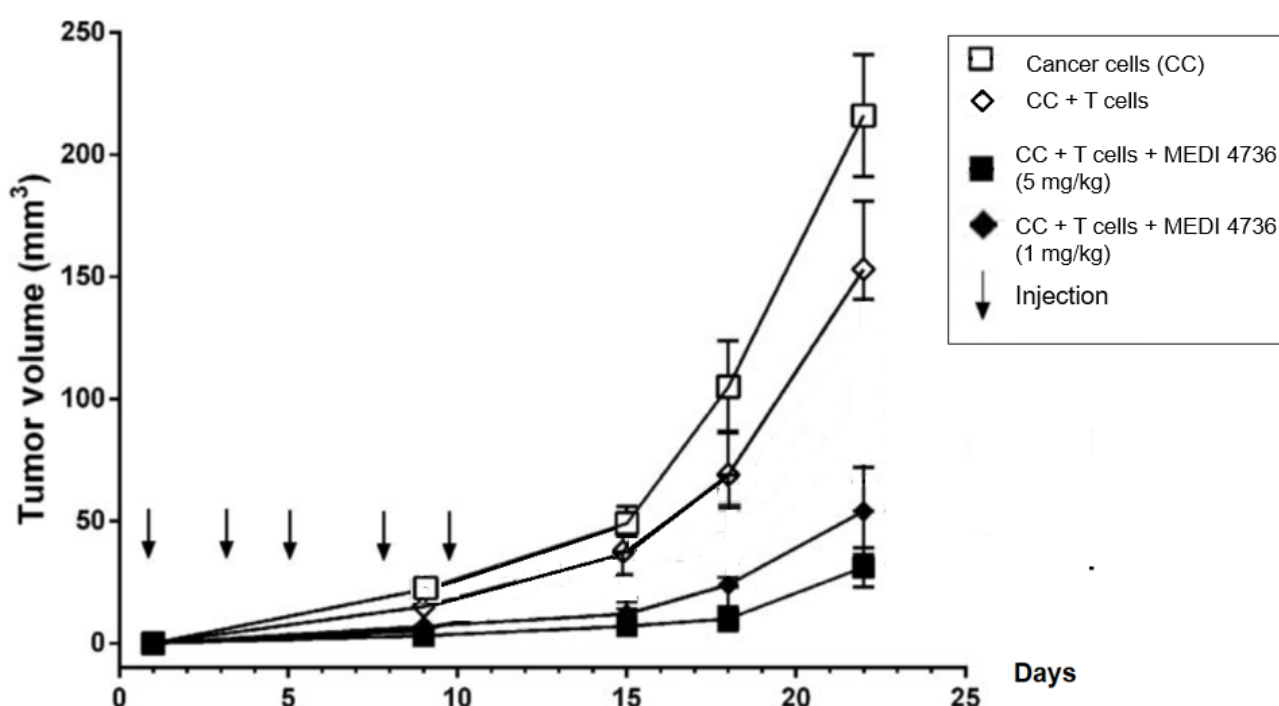
D'après Roselyne L'ITALIEN, Benoît LEBLANC. Immunohématologie. Chenelière Education, 2008 (Chapitre 2, p53). 568 pages. ISBN 978-2-89470-239-0.

Document 7 : Étude de l'évolution de tumeurs humaines traitées au MEDI4736

Method :

Tumor reactive T cells were mixed with cancer cells at a 1:6 ratio. Cell mixtures were implanted by subcutaneous injection of 2.5×10^6 cells into the left flank of NOD/SCID mice. Antibodies (MEDI4736) were administered by intraperitoneal injection 1 hour after implantation and on days 3, 5, 8, and 10 at the doses indicated. Tumor growth was measured in two dimensions, and tumor volume (mm^3) was calculated using the formula $(\text{width}^2 \times \text{length})/2$.

Results :



D'après Stewart R et al., Identification and Characterization of MEDI4736, an Antagonistic Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody. Cancer Immunol Res. 2015 Sep;3(9):1052-62.

Session 2023 : 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.

2023 - U11 : Mathématiques

EXERCICE 1

Partie A

1. $y' + 0,05y = 0 \Rightarrow y' = -0,05y$

Les solutions de l'équation homogène sont les fonctions, qui à tout réel t de $[0, +\infty[$ associent $Ce^{-0,05t}$ où C est une constante réelle.

2. Notons g la fonction constante solution de l'équation (E).

g vérifie $g'(t) + 0,05g(t) = 1,25$. Comme g est constante alors $g'(t)=0$.

Ainsi $0,05g(t) = 1,25$ soit $g(t) = \frac{1,25}{0,05} = 25$.

3. On en déduit que les solutions de l'équation (E) sont les fonctions, qui à tout réel t de $[0, +\infty[$ associent $Ce^{-0,05t} + 25$ où C est une constante réelle.

4. On sait que $f(0) = 38$.

$$f(t) = Ce^{-0,05t} + 25 \Rightarrow f(0) = Ce^0 + 25 \Rightarrow C + 25 = 38 \quad \text{soit } C = 13.$$

On en déduit que $f(t) = 13e^{-0,05t} + 25$.

Partie B

1. $f(24) = 13e^{-0,05 \times 24} + 25 \approx 28,9$.

La température de l'eau du spa est à environ 28,9°C au bout de 24 heures.

2. a) $f'(t) = 13 \times (-0,05e^{-0,05t}) + 0 = -0,65e^{-0,05t}$

b) $f'(t) < 0$ car $-0,65 < 0$ et $e^{-0,05t} > 0$ pour tout réel t .

Ainsi **f est strictement décroissante sur $[0, +\infty[$** , ce qui est cohérent avec le contexte de l'exercice. En effet, la température ne peut être maintenue à 38 °C car on coupe l'alimentation électrique et la température extérieure est de 25 °C. La température ne peut que baisser.

3. a) $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 25$

car : $\lim_{t \rightarrow +\infty} -0,05t = -\infty$, donc par composée $\lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-0,05t} = 0$.

b) La température de l'eau du spa tendra à se stabiliser autour de 25 °C au bout d'un grand laps de temps.

4 a) $13e^{-0,05t} + 25 < 36 \Rightarrow e^{-0,05t} < \frac{11}{13}$

$$\Rightarrow -0,05t < \ln\left(\frac{11}{13}\right) \Rightarrow t > \frac{\ln\left(\frac{11}{13}\right)}{-0,05} \quad \text{car } -0,05 < 0.$$

L'alarme se déclenchera $\frac{\ln\left(\frac{11}{13}\right)}{-0,05} \approx 3,34$ soit 3 h 20 min après la coupure de l'alimentation électrique.

b) L'algorithme affiche la valeur $H = 8$

H	0	1	2	3	4	5	6	7	8
T	38	37,4	36,8	36,3	35,6	35,1	34,6	34,2	33,7
Validation $T \geq 34$	Vrai	Vrai	Vrai	Vrai	Vrai	Vrai	Vrai	Vrai	Faux

c) Cet algorithme permet de déterminer le premier instant en heures à partir duquel la température du spa sera strictement inférieure à 34°C

EXERCICE 2

Partie A

1. a) $\bar{x} = 76$ et $\sigma \approx 18,22$.

b) $[\bar{x} - 2\sigma, \bar{x} + 2\sigma] \approx [76 - 2 \times 18; 76 + 2 \times 18] \approx [40; 112]$

Le technicien n'a pas besoin de procéder à un test sur cinq nouveaux échantillons de pâte car les valeurs 55, 57, 83, 81 et 104 appartiennent à l'intervalle $[40; 112]$.

2. Le mélange de blé contient $0,124 \times 29\,540 + 0,141 \times 14\,540 = 5\,713,1$ kg d'humidité.

Le taux d'humidité du mélange est donc de $\frac{5\,713,1}{29\,540 + 0,141 \times 14\,540}$

soit $0,1296 \approx 12,96\% < 13\%$.

Le technicien peut autoriser le déchargement des deux camions dans un même silo vide.

Partie B

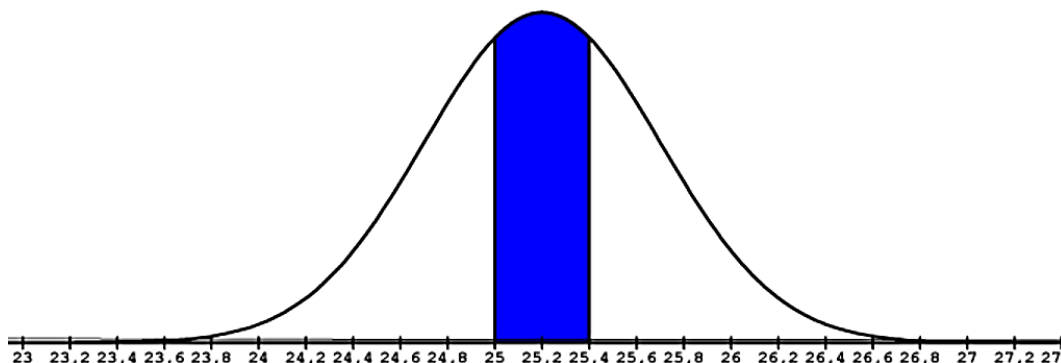
1. $P(X < 25) \approx 0,023$.

2. a) On sait que pour une variable aléatoire X suivant la loi normale de paramètres m et σ , on a : $P(m - 2\sigma \leq X \leq m + 2\sigma) \approx 0,95$

On pourra donc prendre $h = 2\sigma = 2 \times 0,1 = 0,2$

b) On sait que $P(25,2 - 2\sigma \leq X \leq 25,2 + 2\sigma) = P(25 \leq X \leq 25,4) \approx 0,95$

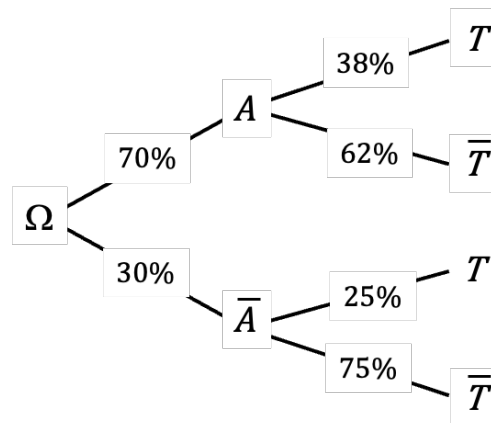
Or le graphique permet d'estimer que $P(25 \leq X \leq 25,4) < 0,5$.



Cette représentation ne peut pas être celle de la fonction densité de la variable aléatoire X .

Partie C

1. L'arbre pondéré décrivant la situation décrite est le suivant :



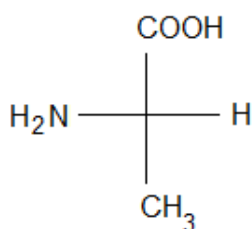
2. a) $P(A \cap T) = P(A) \times P_A(T) = 0,7 \times 0,38 = \mathbf{0,266}$.
- b) A et $\bar{A}$ formant une partition de l'univers Ω , on peut appliquer la formule des probabilités totales :
- $$P(T) = P(A \cap T) + P(\bar{A} \cap T) = 0,7 \times 0,38 + 0,3 \times 0,25 = \mathbf{0,341}.$$
3. $P_T(A) = \frac{P(A \cap T)}{P(T)} = \frac{0,266}{0,341} = \mathbf{0,780}$
4. a) $P(Y \leq 60) \approx \mathbf{0,125}$
- b) $E(Y) = 200 \times 0,341 = \mathbf{68,2}$

Si on répète un grand nombre de fois l'expérience, on peut espérer qu'en moyenne 68,2 clients ont testé la farine *La Romaine*.

2023 - U12 : Sciences physiques et chimiques

I. CARACTÉRISTIQUES DE QUELQUES ACIDES α -AMINÉS

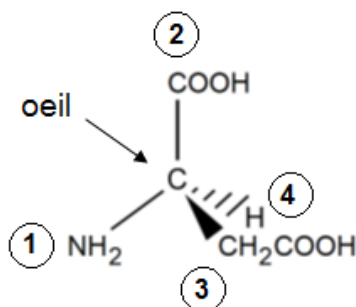
1. Les acides aminés portent les fonctions acide carboxylique ($-\text{COOH}$) et amine ($-\text{NH}_2$).
2. On peut qualifier les acides α -aminés d'amphotères car ils possèdent à la fois des propriétés acides (présence de la fonction acide carboxylique) et des propriétés basiques (présence de la fonction amine).
3. L'alanine et l'acide aspartique possèdent un atome de carbone asymétrique et présentent en conséquent une activité optique (capacité de faire tourner le plan de polarisation d'une lumière). La glycine n'ayant pas de carbone asymétrique n'a pas cette propriété.
4. Représentation de Fischer de la L-alanine :



5. D'après les règles CIP, le classement se fait par numéro atomique Z décroissant des atomes directement reliés au carbone asymétrique (C^*) étudié.
Quand deux substituants sont liés au C^* par des atomes identiques (par exemple, un carbone pour $-\text{CH}_2\text{COOH}$ et $-\text{COOH}$), on considère les atomes du second ordre c'est-à-dire les atomes directement reliés aux atomes sur lesquels porte l'indétermination, les atomes de $\underline{\text{C}}$ dans ce cas. Le $\underline{\text{C}}$ du groupement $-\text{COOH}$ étant relié un atome de O ($Z = 8$) est donc prioritaire par rapport au groupement $-\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{OOH}$ où le $\underline{\text{C}}$ est relié à un atome de C ($Z = 6$) et à deux atomes de H ($Z = 1$).

L'ordre de priorité est donc : $\text{NH}_2 > \text{COOH} > \text{CH}_2\text{COOH} > \text{H}$.

Représentation de Cram de l'acide R-aspartique :



En plaçant le substituant (4) vers l'arrière, pour passer de (1) à (2) à (3) on tourne dans le sens des aiguilles d'une montre ce qui correspond bien à l'énantiomère R de l'acide aspartique.

B. Titrage pH-métrique de l'acide aspartique

6. D'après le document 2 de l'annexe 1, le pH avant le titrage est de 2,8.
Selon le document 1 de l'annexe 1, l'espèce majoritaire en solution aqueuse pour un pH compris entre 2,0 et 3,9 est bien la forme acide l'acide aspartique, $H_2A_{(aq)}$.
7. Pour l'équation (1) :

$$K_1 = \frac{[HA^-]_{\text{éq}}}{[H_2A]_{\text{éq}} \cdot [HO^-]_{\text{éq}}}$$

On fait apparaître K_E en multipliant numérateur et dénominateur par la concentration en ions oxonium. On obtient :

$$K_1 = \frac{[HA^-]_{\text{éq}}}{[H_2A]_{\text{éq}} \cdot [HO^-]_{\text{éq}}} \cdot \frac{[H_3O^+]_{\text{éq}}}{[H_3O^+]_{\text{éq}}}$$

$$K_1 = \frac{K_{A2}}{K_E}$$

$$K_1 = \frac{10^{-pK_{A2}}}{K_E} = \frac{10^{-3,9}}{1,0 \times 10^{-14}} = 1,3 \times 10^{10}$$

Étant donné que $K_1 \gg 10^4$, cette réaction peut être considérée comme totale.

8. D'après l'équation (1), à l'équivalence : $n(H_2A)_{\text{initial}} = n(HO^-)_{\text{éq}}$

$$n(H_2A)_{\text{initial}} = C_B \cdot V_{\text{éq}}$$

$$n(H_2A)_{\text{initial}} = 0,100 \times 10,2 \times 10^{-3} = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

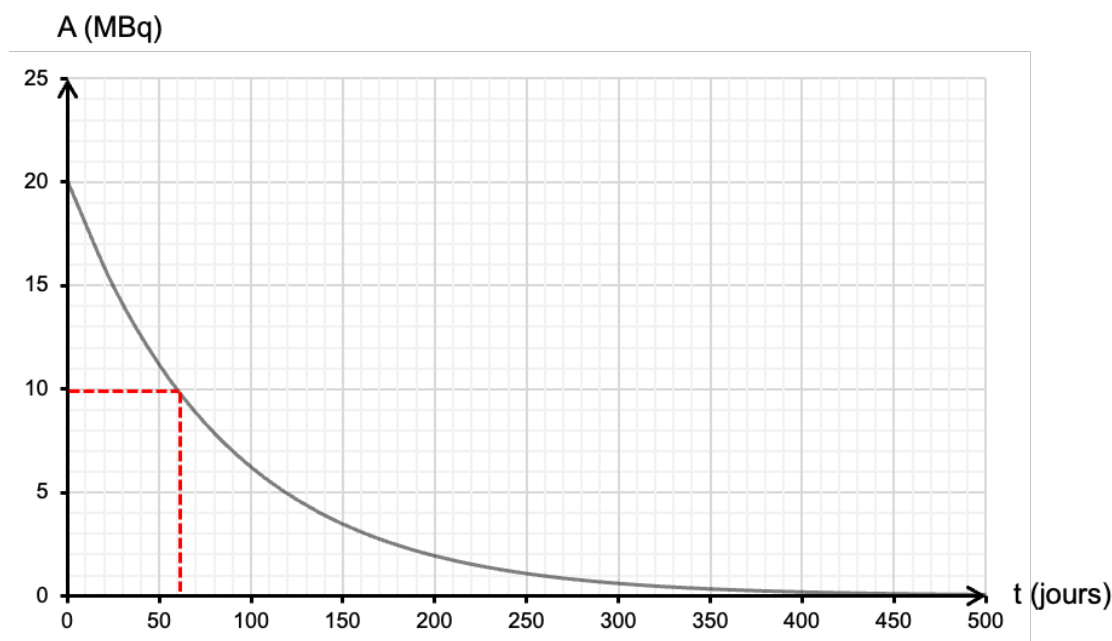
$$m(H_2A) = n(H_2A)_{\text{initial}} \cdot M(H_2A)$$

$$m(H_2A) = 1,02 \times 10^{-3} \times 133,1 = 0,136 \text{ g soit } 136 \text{ mg}$$

9. La masse d'acide aspartique contenue dans 50 mL de solution aqueuse est de 0,136 g.
Pour 1 L de solution aqueuse on a une masse d'acide aspartique 20 fois plus importante soit $0,136 \times 20 = 2,72 \text{ g}$ d'acide aspartique.
Puisque $2,72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} < 4,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (valeur de la solubilité), l'acide aspartique est entièrement dissout et la solution est limpide.
10. D'après la courbe de titrage présentée dans le document 1 de l'annexe 1, le pH à l'équivalence est d'environ 6,8. Le bleu de bromothymol a une zone de virage qui encadre cette valeur pH à l'équivalence, il est donc adapté pour suivre ce titrage.

II. MÉTHODES PHYSIQUES DE MARQUAGE DES ACIDES α -AMINÉS**A. Marquage des protéines par des noyaux radioactifs**

1. Un noyau d'iode 125 est composé de 125 nucléons dont 53 protons et 72 neutrons.
2. Le temps de demi-vie $t_{1/2}$ (ou période) est la durée au bout de laquelle la moitié des noyaux radioactifs initialement présents dans un échantillon s'est désintégrée.
D'après le document 3 de l'annexe 2, $\frac{A}{A_2} = 10 \text{ MBq}$ et le temps de demi-vie de l'iode 125 est de 60 jours.



3. D'après la relation de Planck :

$$\lambda = \frac{h \cdot c}{E} = \frac{6,63 \times 10^{-34} \times 3,00 \times 10^8}{35,5 \times 10^3 \times 1,60 \times 10^{-19}} = 3,50 \times 10^{-11} \text{ m}$$

4. D'après le document 4 de l'annexe 2, le rayonnement électromagnétique de longueur d'onde $\lambda = 3,50 \times 10^{-11} \text{ m}$ appartient au domaine des rayonnements gamma.
5. D'après la loi de décroissance radioactive :

$$A = A_0 \cdot e^{-0,0115 \cdot t} \quad \text{soit} \quad \frac{A}{A_0} = e^{-0,0115 \cdot t}$$

Lorsque le rapport $\frac{A}{A_0} = e^{-0,0115 \cdot t} = 0,01$, l'activité de l'échantillon peut être considérée comme négligeable.

On obtient :

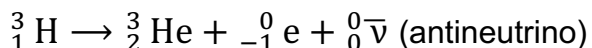
$$e^{-0,0115 \cdot t} = 0,01$$

$$-0,0115 \cdot t = \ln 0,01$$

$$t = \frac{\ln 0,01}{-0,0115} = 400 \text{ jours}$$

L'activité de l'échantillon est négligeable après 400 jours, soit après plus d'un an.

6. La réaction de désintégration du tritium s'écrit :



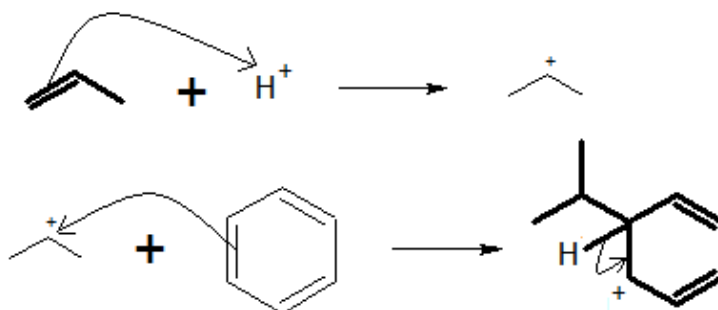
Il s'agit d'une désintégration β^- , la particule émise est un électron, ${}^0_{-1}\text{e}$.

B. Marquage des protéines par un fluorophore

7. D'après le document 6 de l'annexe 3, la longueur d'onde maximale $\lambda_{\max}$ du rayonnement émis par le fluorophore est de 450 nm.
À l'aide du document 5, on en déduit que le fluorophore utilisé est le 7-hydroxy-4-méthylcoumarine, sa longueur d'onde maximale d'émission étant égale à 449 nm.
8. D'après le document 6 de l'annexe 3, la longueur d'onde maximale d'absorption de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine est de 360 nm.
On en déduit, à l'aide du document 7 de l'annexe 4, que la lampe à choisir est la lampe à vapeur de mercure, son pic d'émission étant à 360 nm.
9. La 7-hydroxy-4-méthylcoumarine émet par fluorescence à 449 nm (cf. annexe 3).
On lit sur le document 8 de l'annexe 3 que le filtre B a une transmission proche de 100 % à 449 nm.
Donc le filtre d'émission pour visualiser correctement le spectre d'émission de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine est le filtre B.

III. SYNTHÈSE ORGANIQUE D'UN FLUOROPHORE

1. La fluorescéine émet à 520 nm alors que la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine émet à 449 nm (d'après le document 3 de l'annexe 5). La fluorescéine émet donc une lumière verte et la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine une lumière bleue.
La fluorescéine possède plus de doubles liaisons conjuguées que la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine, elle émet donc à une longueur d'onde plus élevée.
2. Le mécanisme réactionnel de l'étape 1 de la synthèse s'écrit :



3. L'intermédiaire réactionnel est un carbocation.
4. L'ion H^+ est un catalyseur, il accélère la réaction. En effet, il est consommé dans la première étape et régénéré dans la dernière.
5. La réaction correspondant à l'étape 1 est une réaction de substitution.
6. Le sous-produit formé lors de l'étape 4 est de l'éthanol, dont la formule semi-développée est :
 CH_3-CH_2-OH .
7. La réaction correspondant à l'étape 6 est une réaction d'élimination. La molécule éliminée est l'eau, il s'agit donc d'une déshydratation.

2023 - U2 : Biologie moléculaire et génie génétique

Étude des méthylations du génome, marqueurs épigénétiques liés aux cancers

1 Étude du gène *MLH1*

Un schéma de structure d'un gène eucaryote est présenté dans le **document 1**. Ce schéma fait apparaître les séquences permettant l'expression d'un gène et la régulation de son expression.

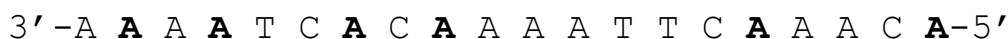
- 1.1. Un promoteur est une séquence reconnue par l'ARN polymérase et permet l'initiation de la transcription.
Un enhancer est une séquence d'activation de la transcription, située à distance du promoteur.
Le sigle UTR signifie « Untranslated Transcribed Region », il s'agit de séquences transcrites en ARN messenger mais non traduites. Elles permettent de contrôler la traduction des ARN messagers, ainsi que leur localisation et leur dégradation.
- 1.2. Le document 2 indique qu'une hyperméthylation des îlots CpG conduit à une compaction de la chromatine, la rendant moins accessible à l'ARN polymérase. En conséquence, l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* conduit à une diminution de son expression.
- 1.3. Le portail NCBI donne accès à la base de données « Nucleotide », dans laquelle il est possible d'effectuer une recherche de la séquence par son numéro d'accèsion (NG_007109) ou par mots clés (*MLH1*, *Homo sapiens*). Une extraction des informations de la séquence au format « GenBank » donne le résultat présenté dans le document 3.
La séquence présentée n'est pas précédée de la ligne d'identification de la séquence débutant par le signe « > », caractéristique du format FASTA. De plus, la séquence nucléotidique contient des chiffres et des espaces, ce qui n'est pas le cas dans le format FASTA.
- 1.4. Les extrémités générées après hydrolyse d'un site *Pst*I sont les suivantes :

5'	-----CTGCA	et	G---	3'
3'	-----G		ACGTC---	5'

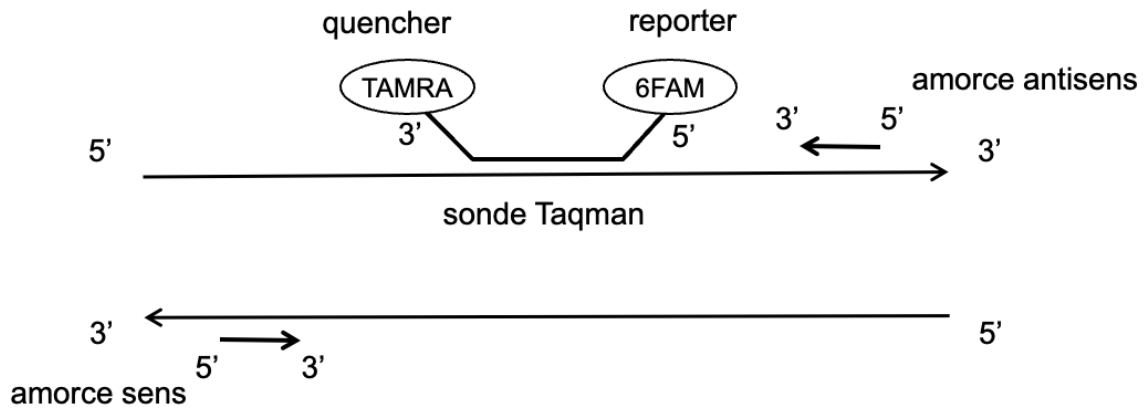
Il s'agit d'extrémités cohésives débordantes en 3'.
- 1.5. L'enzyme *Pst*I coupe la séquence après les nucléotides 12 et 216. La taille du fragment obtenu est donc de 204 nucléotides (216 – 12).

2 Méthode d'analyse des méthylations du gène *MLH1*

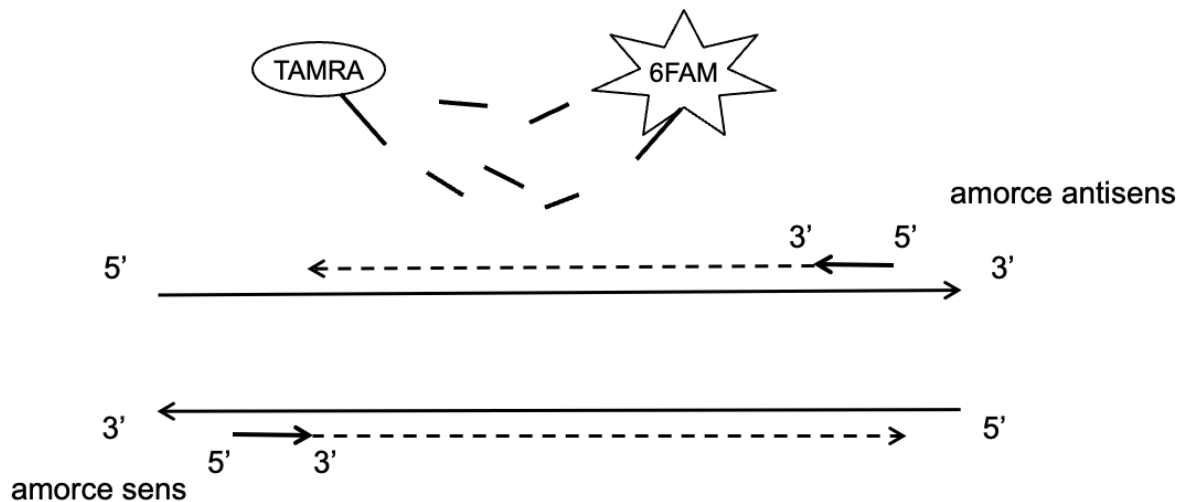
- 2.1. Les cytosines non méthylées sont converties en uracile après traitement au bisulfite de sodium. Les cytosines méthylées ne sont pas modifiées.
- 2.2. Après traitement au bisulfite de sodium, la séquence cible des amorces s'écrit :
- 5' -A G A G T U G U G A A A T T U G A A U G-3'
- 3' -T U T U A G U G U T T T A A G U T T G U-5'
- 2.3. La séquence de l'amorce sens est la suivante :



- 2.4. Lors de l'étape d'hybridation, les amorces sens, antisens et la sonde Taqman s'hybrident sur l'ADN matrice. Les fluorophores TAMRA et 6FAM sont proches car fixés sur les extrémités de la sonde. Lors de l'excitation de 6FAM, l'émission de fluorescence est captée par TAMRA, et n'est donc pas observable (extinction de fluorescence).



Lors de l'élongation, la Taq polymérase hydrolyse la sonde grâce à son activité 5'-3' exonucléasique. Les fluorophores TAMRA et 6FAM sont alors séparés. L'excitation de 6FAM conduit à l'apparition d'une fluorescence détectable.



La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de sonde hydrolysée, et donc à la quantité d'amplicon présent au moment de la détection.

- 2.5. L'étape A (30 secondes à 95°C) correspond à la dénaturation des ADN double brin. L'étape B (15 secondes à 68°C) permet l'hybridation des amorces et de la sonde Taqman. L'étape C (1 minute à 72°C) correspond à l'élongation du brin d'ADN par la Taq polymérase (et l'hydrolyse de la sonde).
- 2.6. La fluorescence de 6FAM n'est détectable qu'après hydrolyse de la sonde Taqman, et doit donc être mesurée à la fin de l'étape d'élongation.

- 2.7. L'avantage majeur de la technologie Taqman® par rapport à la technologie Sybr®Green est la spécificité de la détection des amplicons.
En effet en technologie Taqman®, la spécificité d'hybridation de la sonde assure que la fluorescence émise ne correspond qu'à l'amplification de la séquence cible, même en présence d'amplifications non spécifiques.
En technologie Sybr®Green, la fluorescence émise est proportionnelle à tous les amplicons, y compris ceux qui sont éventuellement générés par des amplifications non spécifiques. En cas d'amplification non spécifique, la quantification n'est pas possible.

3 Méthylation du gène *MLH1* et cancer colorectal

- 3.1. La courbe d'amplification de l'échantillon 19N montre que le seuil de fluorescence est franchi après environ 32 cycles. Le cycle seuil C_t de l'échantillon 19N est donc de 32. En reportant cette valeur de C_t sur la courbe d'étalonnage $C_t = f(\text{Quantity})$, on lit une valeur d'environ 100 pg d'ADN cible présent initialement dans l'échantillon 19N.
- 3.2. Un gène de référence est un gène dont l'expression est constante quelles que soient les conditions de l'expérience. Son utilisation permet de normaliser les résultats pour pouvoir les comparer, en s'affranchissant des biais liés notamment à la qualité et la quantité des ARN extraits dans chaque échantillon.
- 3.3. L'expression du gène *MLH1* chez le patient 17 est très fortement diminuée dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux (expression normalisée d'environ 4 dans les échantillons 17N, et quasi nulle dans les échantillons 17T).
L'analyse de la méthylation du promoteur montre qu'elle est quasi-nulle dans les tissus normaux et très forte dans les tissus tumoraux (expression normalisée égale à environ 680).
L'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* peut expliquer la répression de l'expression du gène *MLH1*, par la compaction de l'ADN qu'elle induit.
- 3.4. L'expression du gène *MLH1* chez le patient 19 est presque diminuée de moitié dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux (expression normalisée d'environ 9 dans les échantillons 19N, et d'environ 5 dans les échantillons 19T).
L'analyse de la méthylation du promoteur montre qu'elle est identique et quasi-nulle aussi bien dans les tissus normaux que dans les tissus tumoraux.
Dans le cas du patient 19, il n'y a pas de corrélation entre la méthylation du promoteur et la diminution de l'expression de *MLH1*.
La cancérogénèse chez le patient 19 peut s'expliquer par une autre modification au niveau du gène *MLH1* (mutation sur le promoteur, les enhancers, autre modification épigénétique portant par exemple sur les histones). Elle peut aussi être due à des mutations sur d'autres gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire ou de la réparation de l'ADN.
- 3.5. La 5-Azacytidine est un inhibiteur des DNMTs, enzymes responsables de la méthylation des cytosines de l'ADN. Son utilisation permet donc de diminuer la méthylation de l'ADN.
Dans le cas du patient 17, ce traitement paraît adapté, puisqu'il pourrait permettre de réduire la méthylation du promoteur du gène *MLH1*, et donc de restaurer l'expression de ce gène dont le produit participe au processus de réparation de l'ADN.
Dans le cas du patient 19, puisqu'il n'y a pas de corrélation entre la méthylation du promoteur et la diminution de l'expression de *MLH1*, ce traitement ne paraît pas adapté.

2023 – U3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

La carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A), une enzyme cible pour le traitement de la « maladie du foie gras »

1. Régulation de la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A) par le malonyl-CoA.

1.1. Les isoformes sont les différentes formes de protéines issues d'un épissage alternatif de l'ARNm. Elles possèdent donc des structures différentes mais partagent des fonctions similaires voire identiques.

Dans le cas des enzymes, le terme est souvent confondu avec celui d'isoenzymes, enzymes ayant des propriétés physicochimiques différentes (structures différentes), catalysant la même réaction chimique et codées par des gènes différents (bien que proches).

1.2. La CPT1A catalyse le transfert d'un groupement acyl (de l'acyl-CoA vers la carnitine).

1.3. L'équation issue de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten par la méthode de Lineweaver et Burke est la suivante :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{v_{imax}} \times \frac{1}{C_{(carnitine; milieu réactionnel)}} + \frac{1}{v_{imax}}$$

$$\left[\frac{1}{\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}} \right] = \left[\frac{\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}}{\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}} \times \frac{1}{\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}} + \frac{1}{\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}} \right]$$

Il s'agit d'une équation de type $y = ax + b$

$$\text{avec } a = \text{pente} = \frac{K_M}{v_{imax}} \quad \text{et} \quad b = \text{ordonnée à l'origine} = \frac{1}{v_{imax}}$$

D'où les équations aux grandeurs et aux unités

$$v_{imax} = \frac{1}{b} \quad [\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}] = \left[\frac{1}{\text{nmol}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}} \right]$$

$$K_M = a \times v_{imax} \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}] = \left[\frac{\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}}{\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}} \times \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \right]$$

Les applications numériques donnent les résultats suivants :

$C_{\text{Malonyl-coA}} (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	v_{imax} ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	$K_M (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
0	61,3	75,5
10	26,7	85,5
50	12,9	111

La constante de Michaelis peut aussi être calculée après lecture graphique de l'intersection de la droite obtenue par la méthode de Lineweaver et Burke avec l'axe des abscisses (valeur de x pour y = 0).

$$K_M = - \frac{1}{\text{valeur de } x \text{ pour } y=0} \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}] = \left[\frac{1}{\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}} \cdot \right]$$

La valeur de l'intersection avec l'axe des abscisses est d'environ $-0,01 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$, soit $K_M = 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

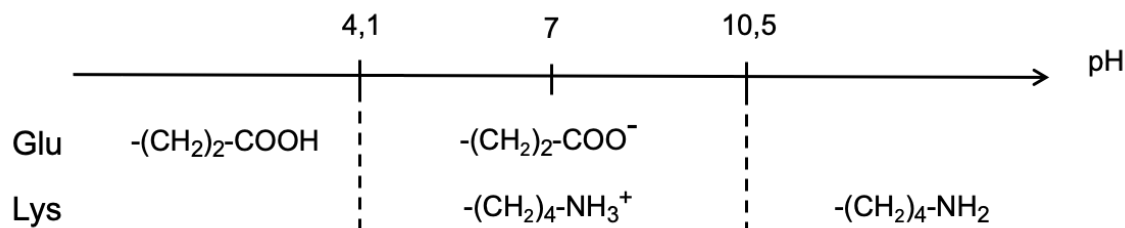
- 1.4. D'après les calculs et l'observation de la courbe de Michaelis-Menten linéarisée, la vitesse initiale maximale diminue lorsque la concentration en Malonyl-CoA augmente, alors que la constante de Michaelis ne varie pas (ou peu).
L'inhibition par le Malonyl-coA est donc de type non compétitif.
- 1.4. La stéatose hépatique est due au stockage des acides gras à longue chaîne d'origine exogène sous la forme de triglycérides par la voie de la lipogénèse.
La CPT1A permet l'oxydation complète des acides gras à longue chaîne d'origine exogène, son fonctionnement permet donc de limiter l'apport d'acides gras à la voie de la lipogénèse.
La suppression de l'inhibition de la CPT1A par le malonyl-CoA permettrait donc de limiter le stockage des triglycérides dans le foie et donc de prévenir la stéatose hépatique.

2. Production d'une enzyme CPT1A mutée

- 2.1. La transfection des hépatocytes par Ad- β -gal permet de vérifier l'efficacité de la transfection : les hépatocytes n'exprimant pas la β -galactosidase de façon endogène, la présence de β -galactosidase montre l'efficacité du protocole de transfection.
L'expression de la protéine CPT2 étant constitutive, on peut supposer qu'elle est présente en quantité identique dans toutes les cellules. L'intensité des bandes obtenues pour CPT2 lors de l'analyse en Western blot permettra de normaliser l'expression des autres protéines, dont CPT1A, et donc de comparer leur niveau d'expression.
- 2.2. Les hépatocytes transfectés par Ad- β -gal présentent des bandes révélées par les anticorps anti- β -gal de très forte intensité, traduisant une forte expression de la β -galactosidase. Le protocole de transfection est donc validé.
L'intensité des bandes obtenues pour la protéine CPT2 est identique quelle que soit la condition, traduisant une quantité de protéines identiques pour chacun des dépôts. Il est donc possible de comparer directement les intensités des bandes CPT1A pour estimer son niveau d'expression dans chaque condition.
Pour le lot d'hépatocytes non transfectés, on observe une très faible expression de CPT1A (identique à celui du lot transfecté par Ad- β -gal). CPT1A est exprimée naturellement pas les hépatocytes.
Pour les lots d'hépatocytes transfectés par Ad-CPT1-wt et Ad-CPT1-mt, on observe des bandes très intenses pour CPT1A (intensité de CPT1A-mt légèrement inférieure à celle de CPT1A-wt).
Les protéines CPT1A-wt et CPT1A-mt sont bien exprimées en grande quantité après transfection par le vecteur adénoviral.
- 2.3. Les hépatocytes produisent CPT1 de façon endogène (au niveau mitochondrial), ce qui explique la présence d'une faible activité CPT1 pour les hépatocytes non transfectés ou transfectés avec un vecteur ne codant pas CPT1A.
- 2.4. D'après le document 5.B, l'activité de l'enzyme CPT1A sauvage est d'environ $90 \text{ mmol} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, alors que l'activité de l'enzyme CPT1A mutée est d'environ $30 \text{ mmol} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. L'activité de CPT1A-wt est donc environ trois fois plus importante que celle de CPT1A-mt.
Le document 5.A montre une intensité relative de la bande CPT1A-wt deux à trois fois plus forte que CPT1A-mt, traduisant une quantité de CPT1A deux à trois fois plus forte dans les extraits des lots CPT1A-wt que dans les extraits des lots CPT1A-mt.
L'activité de CPT1A rapportée à la quantité d'enzyme réellement présente dans les extraits cellulaires est donc équivalente.
En conclusion, l'enzyme mutée CPT1A insensible au malonyl-CoA est bien fonctionnelle.

3. Mode d'action du malonyl-CoA sur la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A)

- 3.1. Un domaine protéique est une zone de repliement autonome et indépendante d'une partie d'une protéine, lui conférant souvent une fonction particulière.
- 3.2. La représentation de l'ionisation des chaînes latérales de l'acide glutamique et de la lysine est la suivante :



À pH 7, la chaîne latérale de l'acide glutamique est chargée négativement, celle de la lysine est chargée positivement.

Ces résidus peuvent donc interagir par des liaisons ioniques (ou électrostatiques).

- 3.3. La courbe du document 7 met en évidence l'effet de la concentration en malonyl-CoA sur l'inhibition de la CPT1A. L'enzyme sauvage montre une forte baisse d'activité en présence de malonyl-CoA, qui atteint 50 % de son activité pour une concentration en malonyl-CoA de l'ordre de 5 à 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Les résultats obtenus pour les enzymes « E26K » et « K561E » montrent un effet inhibiteur plus modéré du malonyl-CoA sur CPT1A. En effet les enzymes mutées atteignent 50 % d'inhibition pour une concentration en malonyl-CoA d'environ 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, soit 10 fois plus que pour l'enzyme sauvage.

La mutation de l'acide glutamique en lysine provoque la perte de l'interaction ionique entre les domaines N-ter et C-ter de CPT1A, et engendre probablement même un effet de répulsion entre les résidus (deux charges positives ou deux charges négatives). D'après le document 6, le malonyl-CoA se loge dans un site effecteur situé à la jonction des domaines N-ter et C-ter de CPT1A. La perte de l'interaction ionique entre les domaines change la conformation spatiale de ce site effecteur, conduisant à la diminution de l'efficacité de fixation du malonyl-CoA sur CPT1A, et donc à une diminution de son effet inhibiteur.

- 3.4. La courbe d'inhibition du double mutant « E26K/K561E » est très proche de celle de l'enzyme CPT1A sauvage, avec une perte d'activité de 50 % pour une concentration de malonyl-CoA d'environ 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

La double mutation restaure l'interaction ionique entre les domaines N-ter et C-ter de CPT1A, puisqu'il y a inversion des acides aminés entre les positions 26 et 561.

- 3.5. Dans les enzymes mutées « E26K » et « K561E », les acides aminés 26 et 561 ne peuvent interagir puisqu'ils portent une charge identique (positive ou négative). La perte de l'interaction entre les domaines N-ter et C-ter provoque la perte de l'effet inhibiteur du malonyl-CoA.

Le double mutant correspond à l'inversion de Glu et Lys sur les positions 26 et 561. L'interaction ionique permettant l'association des domaines N-ter et C-ter est restaurée, de même que l'effet inhibiteur du malonyl-CoA sur CPT1A.

L'interaction entre les deux domaines N-ter et C-ter est donc essentielle pour l'inhibition de CPT1A.

2023 - U41 : Microbiologie et génie fermentaire

Recyclage des métaux de circuits imprimés usagés par biolixiviation

1. Métabolisme énergétique des bactéries réalisant la biolixiviation

1.1. Les gènes codant les ARN 16S présentent à la fois des séquences hautement conservées au cours de l'évolution, ainsi que des séquences hypervariables. Les séquences conservées des ARNr 16S participent à la définition de l'espèce bactérienne (groupe de souches présentant plus de 97 % d'homologies au niveau des ARNr 16S). L'évolution des séquences variables permettent de tracer l'arbre phylogénétique des espèces considérées.

1.2. Relation entre caractéristiques des bactéries du consortium et conditions de culture :

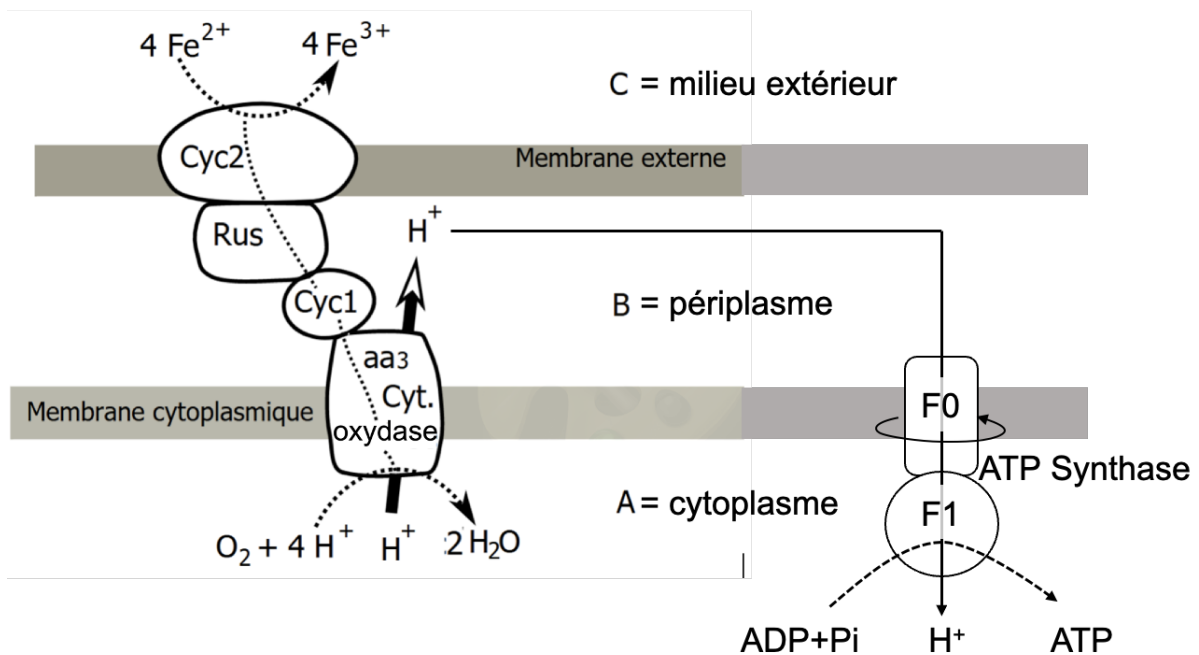
Caractéristique	Signification	Conditions de culture et/ou de milieu
Chimiotrophe	Source d'énergie chimique	Présence de Fe(II) en grande quantité (ajouté quand nécessaire)
Lithotrophe	Source d'électrons minérale	
Autotrophe	Source de carbone minérale	Absence de source de carbone Culture en atmosphère enrichie en CO ₂ (1 %)
Prototrophe	Capable de synthétiser tous ses composants organiques	Absence de composés organique, notamment d'acide aminés, de vitamines et facteurs de croissance
Mésophile	Culture entre 15 et 45 °C	Température d'incubation = 36 °C
Acidophile	Culture à pH acide	pH du milieu = 1,3

1.3. *At. ferrooxidans* est diazototrophe facultative, donc capable d'utiliser comme source d'azote l'azote atmosphérique (N₂) ou d'autres molécules azotées (par exemple les ions ammonium NH₄⁺).

Le milieu 0Cm contient une source d'azote minérale facilement assimilable : (NH₄)₂SO₄. En conséquence, il n'est pas possible de mettre en évidence la diazototrophie de cette bactérie.

Un suivi de la consommation des ions ammoniums permettrait de montrer s'ils sont assimilés ou pas.

1.4. D'après le document 3, la paroi de cette bactérie est constituée de deux couches de membranes : plasmique et externe. Elle appartient donc aux bactéries Gram négatives.

1.5. Schéma de la paroi d'*At ferrooxidans* :

- 1.6. D'après le document 3, le donneur d'électron est l'ion fer ferreux Fe^{2+} et l'accepteur final d'électron est le dioxygène. Il s'agit donc d'une respiration aérobie.

2. Biolixiviation adaptée à l'extraction des métaux des circuits imprimés usagés

- 2.1. Dans le processus de biolixiviation, les bactéries assurent le recyclage du fer ferreux (Fe^{2+}) en fer ferrique (Fe^{3+}). Ce dernier est nécessaire à l'oxydation des métaux lourds M^0 en ions métalliques M^{Z+} et donc à leur solubilisation.
- 2.2. Le graphe A du document 5 montre l'effet de différentes charges en métaux lourds sur la croissance de la biomasse. La condition 0 % joue le rôle de témoin de croissance. On constate que l'ajout de lixiviat de métaux lourds allonge la durée de la phase de latence de la culture : elle passe de 100 heures pour le témoin à 350 heures et 400 heures pour les cultures additionnées de lixiviat. En revanche, les pentes des phases de croissance exponentielle sont globalement identiques. La vitesse de croissance n'est donc pas influencée par la présence de lixiviats dans le milieu.
- 2.3. D'après le graphe B du document 5, on constate que l'utilisation du fer ferreux par les bactéries est synchrone avec l'apparition de la phase exponentielle de croissance. Lorsque la croissance démarre (après une phase d'adaptation plus ou moins longue), l'efficacité de l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique semble être identique, et le fer ferreux finit par être oxydé en totalité.
- 2.4. La présence de métaux lourds (jusqu'à 60% v/v de lixiviat) augmente la durée de la phase de latence de la culture (phase d'adaptation et de production des équipements enzymatiques), mais n'a pas d'influence sur la croissance de la biomasse. D'autre part, une fois la croissance démarrée, l'oxydation du fer ferreux est aussi efficace dans toutes les conditions testées. La présence de lixiviats de métaux lourds n'est donc pas toxique pour la culture.
- 2.5. D'après les documents précédents, une concentration de lixiviat de PCB allant jusqu'à 60% v/v peut être utilisée dans le procédé de biolixiviation. La toxicité n'a pas été pour des concentrations plus élevées.

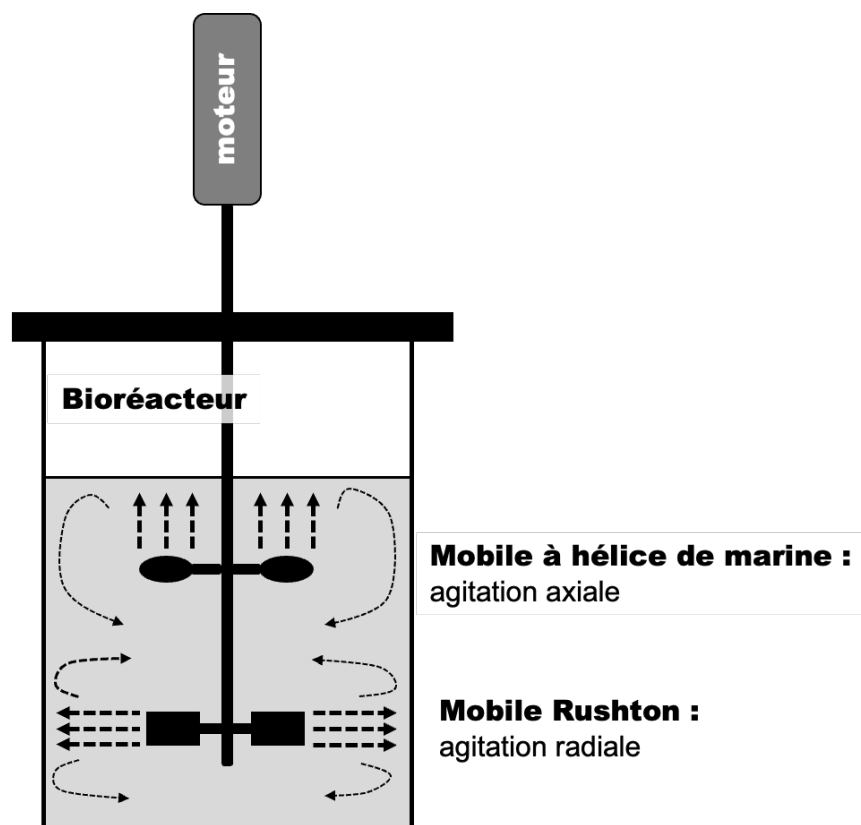
3. Biolixiviation en bioréacteurs en procédé continu à deux étages

- 3.1. D'après le document 6, on constate que le premier bioréacteur est alimenté en continu, que ses effluents alimentent en continu le 2^e bioréacteur et que ce dernier fait l'objet d'un soutirage continu également.
- 3.2. Le bullage avec de l'air enrichi en CO₂ joue trois rôles :
- homogénéisation du milieu de culture de la colonne à bulle,
 - apport de carbone minéral nécessaire à la croissance des souches autotrophes utilisées dans le procédé et
 - apport de dioxygène nécessaire à la respiration aérobie.
- 3.3. Compte-tenu de la durée de la croissance des espèces composant le consortium de biolixiviation, le premier étage du chimostat présenté dans le document 6 a pour rôle de favoriser la croissance de la biomasse et de produire une grande quantité de cellules. Ainsi, le bioréacteur 2 peut bénéficier d'une biomasse suffisante à sa fonction de biolixiviation.
- 3.4. Calcul du débit d'alimentation :

$$F_{in} = F_{out} = \frac{V_{\text{bioréacteur}}}{\text{temps de séjour}} \quad \text{mL} \cdot \text{h}^{-1} = \frac{\text{mL}}{\text{h}}$$

$$F_{in} = F_{out} = \frac{150 \text{ mL}}{3,2 \text{ h}} = 46,9 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$$

- 3.5. Schéma du système d'agitation du 2^e bioréacteur



Le mobile Rushton produit une agitation radiale, produisant une forte émulsion, et une très bonne homogénéisation du milieu de culture (oxygénation du milieu et mise en suspension des PCBs).

Le mobile à hélice de marine produit une agitation axiale plus douce et permet d'homogénéiser le milieu sur l'ensemble de sa hauteur.

3.6. Calcul de la vitesse spécifique de croissance $Q_{X_{\text{expo}}}$:

Le chimostat est à l'équilibre dynamique donc $Q_{X_{\text{expo}}} = D$ (vitesse ou taux de dilution du milieu)

$$Q_{X_{\text{expo}}} = D = \frac{F}{V_{\text{bioréacteur}}} = \frac{46,9 \text{ mL/h}}{2250 \text{ mL}} = 0,021 \text{ h}^{-1}$$

Calcul du temps de génération G :

$$G = \frac{\ln 2}{Q_{X_{\text{expo}}}} = \frac{\ln 2}{0,021} = 33 \text{ h}$$

3.7. D'après le document 7, on constate que la plupart des métaux ont un rendement de dissolution d'au moins 80 %, à l'exception du plomb (< 10 %).

Le processus de biolixiviation est donc globalement efficace, voire très efficace pour certains métaux comme le cuivre ou le cobalt entièrement solubilisés ou presque.

Il faudrait mettre en place un procédé de traitement spécifique du plomb pour compléter ce procédé de biolixiviation adapté à l'extraction des PBCs.

2023 - U42 : Biologie cellulaire

Transition épithélio-mésenchymateuse et immunothérapie anti-cancéreuse

1. Étude phénotypique des cellules épithéliales et mésenchymateuses

1.1. L'analyse en cytométrie en flux révèle trois populations de cellules.

Les cellules épithéliales montrent une forte fluorescence du FITC couplé à l'anticorps anti-E-cadhérine (entre 10^4 et 10^5 unités arbitraires, uA), et une plus faible fluorescence de la phycoérythrine couplée à l'anticorps anti-vimentine (inférieure à 10^6 uA). Ces cellules expriment donc très majoritairement la E-cadhérine à leur surface.

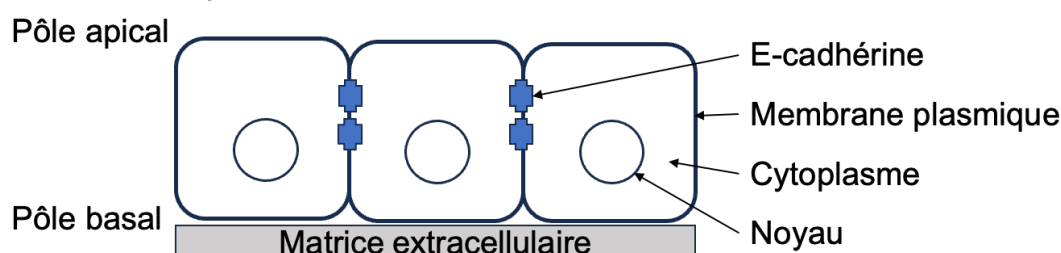
Les cellules mésenchymateuses montrent une forte fluorescence de la phycoérythrine couplée à l'anticorps anti-vimentine (supérieure à 10^6 uA) et une faible fluorescence du FITC couplé à l'anticorps anti-E-cadhérine (inférieure à 10^4 uA). Ces cellules expriment donc majoritairement la vimentine à leur surface, et plus faiblement la E-cadhérine.

La troisième population cellulaire expose en surface à la fois la E-cadhérine et la vimentine, comme le montrent les fortes intensités de fluorescence du FITC (supérieure à 10^6 uA) et de la phycoérythrine (comprise entre 10^4 et 10^5 uA).

Cette analyse révèle donc que la population de cellules épithéliales entrée en phase de TEM et exprimant la E-cadhérine mais pas la vimentine est transformée en cellules TEM puis en cellules mésenchymateuses qui n'expriment plus la E-cadhérine mais la vimentine : il y a donc bien une perte d'expression de la E-cadhérine et une augmentation de l'expression de la vimentine lors de la TEM.

Le fort pourcentage des cellules épithéliales (94,35 %) et le faible pourcentage des cellules mésenchymateuses (3,35 %) indiquent que la population des cellules étudiées par cytométrie en flux est en début de TEM.

1.2. Schéma d'un épithélium :



1.3. D'après le schéma du processus de TEM :

Caractéristiques		Cellule épithéliale	Cellule mésenchymateuse
au niveau cellulaire	morphologie	rectangulaire	allongée
	polarité	oui	non
au niveau tissulaire	adhérence	cellules jointives	cellules non jointives
	cohésion	présence de jonctions cellule-cellule	absence de jonctions cellule-cellule

Les cellules mésenchymateuses ne possèdent pas de propriétés de cohésion et d'adhérence, ce qui leur permet de se détacher du tissu épithélial et de migrer pour

former des métastases. Par rapport aux cellules épithéliales dont elles dérivent, elles perdent également leur différenciation (modifications de la morphologie et perte de la polarité).

1.4. La perte de la E-cadhérine lève l'inhibition de la β -caténine.

Lorsqu'elle est active, la β -caténine inhibe l'adhésion et la polarisation des cellules épithéliales *via* les facteurs cytoplasmiques Twist et Slug. En parallèle, la β -caténine active la transition mésenchymateuse *via* les facteurs Goosecoid, Twist et FOXC2.

Ainsi en absence de E-cadhérine, les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques cellulaires et tissulaires pour se transformer en cellules mésenchymateuses.

1.5. Les monomères d'actine G sont couplés au pyrène, fluorochrome qui émet une fluorescence à 407 nm lorsqu'il est excité à 365 nm. L'intensité de fluorescence du pyrène est plus faible lorsque l'actine G est sous forme monomérique que lorsque l'actine G est polymérisée.

L'augmentation de l'intensité de fluorescence à 407 nm permet donc de suivre la polymérisation de l'actine.

1.6. D'après le graphique, la polymérisation est plus importante en présence d'Arp2/3 qu'en absence d'Arp 2/3. Ainsi, pour une même concentration en actine G, la vitesse de la polymérisation de l'actine est toujours plus élevée en présence d'Arp 2/3. De même, la pente de la courbe « vitesse de polymérisation = f(concentration en actine G) » est plus élevée en présence de Arp 2/3 qu'en son absence.

La concentration critique en actine G est de $0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en présence d'Arp 2/3, et de $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en absence d'Arp 2/3. La polymérisation de l'actine démarre donc pour des concentrations en actine G 2,5 fois plus faibles lorsque Arp 2/3 est présente.

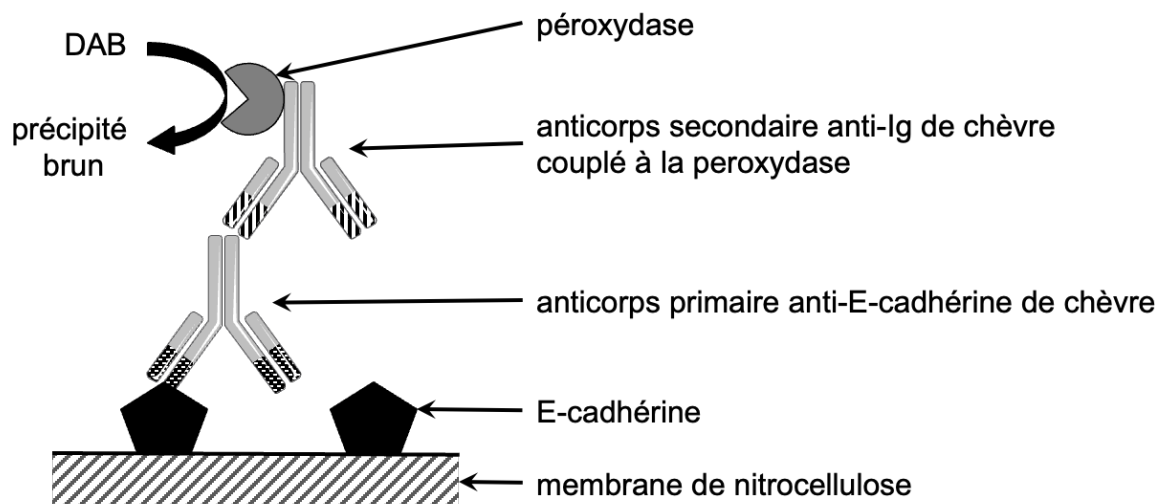
Ainsi, en présence d'Arp 2/3, la polymérisation de l'actine est favorisée, conduisant à la formation de lamellipodes responsables de la migration des cellules mésenchymateuses.

2. Mise au point d'un modèle d'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

2.1. Tout d'abord, l'utilisation d'un microscope inversé permet d'observer des cellules adhérentes sans les sortir de leur flasque de culture, grâce au positionnement des objectifs sous la platine.

Le contraste de phase permet de mieux distinguer les éléments de cellules non colorées, ce qui est le cas des cellules en culture cellulaire.

2.2. Schéma de la détection de la E-cadhérine :



- 2.3. Dans la culture témoin, l'observation des cellules au microscope à contraste de phase montre des cellules petites et assez compactes, alors qu'en présence de TNF- α et TGF- β , elles sont plus grosses et allongées.

⇒ la présence de TNF- α et TGF- β provoque donc une modification morphologique des cellules A549.

Le système Matrigel permet de mesurer la migration cellulaire en dénombrant les cellules ayant migré à travers le Matrigel vers le fond du flacon. Les résultats montrent que 3 fois plus de cellules A549 ont migré dans le fond du flacon en présence de TNF- α et TGF- β , (38 000 cellules) par rapport aux cellules témoin (13 000 cellules).

⇒ les cellules A549 ont donc une capacité migratoire augmentée en présence de TNF- α et TGF- β .

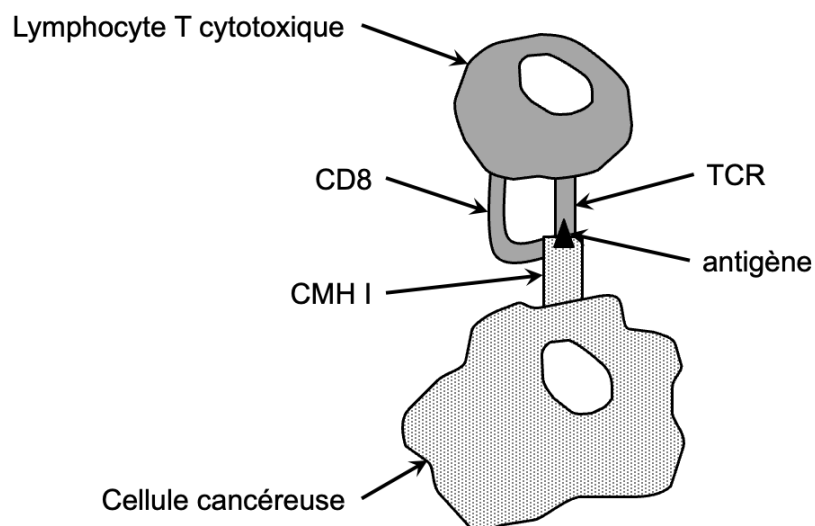
En Western blot, la révélation spécifique de la protéine GAPDH, exprimée de façon constitutive, présente des bandes d'intensité forte et identique. Il est donc possible d'analyser les résultats obtenus pour les marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. Les cellules A549 cultivées en absence de TNF- α et TGF- β montrent une bande correspondant à la E-cadhérine mais pas de bande correspondant à la vimentine : ces cellules n'expriment donc que la E-cadhérine (E-cadhérine + et vimentine -). En présence de TNF- α et TGF- β , le profil inverse est observé : absence de E-cadhérine et présence de vimentine (E-cadhérine - et vimentine +).

⇒ la présence de TNF- α et TGF- β induit donc l'expression de marqueurs mésenchymateux (vimentine) et inhibe l'expression de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) sur les cellules A549.

- 2.4. Les cellules A549 ont les caractéristiques des cellules épithéliales, et leur exposition à TNF- α et TGF- β induit leur transformation en cellules mésenchymateuses. Les cellules A549 sont donc un bon modèle d'étude de la TEM.

3. Transition épithélio-mésenchymateuse et immunothérapie

- 3.1. Schéma des interactions moléculaires entre lymphocyte T cytotoxique et cellule cancéreuse :



Le complexe CMH I - peptide antigénique exposé par la cellule cancéreuse est reconnu par un lymphocyte T cytotoxique *via* le TCR et le CD8. Cette reconnaissance induit la dégranulation du lymphocyte T avec libération de perforine. Cette protéine, responsable de la formation de nanopores dans la membrane plasmique, permet l'entrée de granzymes dans le cytoplasme de la cellule cancéreuse. Les granzymes induisent alors l'entrée en apoptose de la cellule cancéreuse.

- 3.2. Le témoin est constitué des cellules A549 (traitées ou non traitées par TNF- α et TGF- β) incubées avec un anticorps non spécifique conjugué à FITC. Son rôle est de quantifier la fluorescence non spécifique ou bruit de fond pour chaque lot de cellules.
- 3.3. Pour les cellules A549 non traitées, l'intensité de fluorescence du FITC avec l'anticorps anti-PD-L1 est la même que celle du témoin (pic vers 10^2 uA). Ces cellules ne portent donc pas le marqueur PD-L1.
Les cellules A549 traitées par TNF- α et TGF- β présentent une intensité de fluorescence du FITC avec l'anticorps anti-PD-L1 plus élevée (pic vers 10^3 uA) que celle du témoin (pic vers 10^2 uA). Ces cellules portent donc le marqueur PD-L1.
- 3.4. Le milieu HAT contient
- de l'aminoptérine qui inhibe la voie *de novo* de synthèse des nucléotides
 - de l'hypoxanthine et de la thymidine qui permettent d'alimenter la voie de sauvetage pour la synthèse des nucléotides.
- Pour cultiver en milieu HAT, les cellules doivent donc
- être immortelles pour survivre aux repiquages
 - exprimer les deux enzymes de la voie de sauvetage, HGPRT et TK, puisque la voie *de novo* est inhibée par l'aminoptérine.
- Les lymphocytes B non fusionnés sont HGPRT + mais ne sont pas immortels et ne peuvent donc survivre en milieu HAT.
Les cellules myélomateuses sont immortelles mais HGPRT –, elles ne peuvent donc pas utiliser la voie de sauvetage pour synthétiser les nucléotides.
Les hybridomes issus de la fusion entre un lymphocyte B (HGPRT +) et une cellule myélomateuse (immortelle) sont donc les seules cellules à cultiver sur milieu HAT.
- 3.5. Dans le cas de l'implantation des seules cellules cancéreuses, la croissance de la tumeur est lente pendant 15 jours puis plus rapide, pour atteindre un volume de 200 mm^3 après 22 jours.
Lorsque les cellules cancéreuses sont accompagnées de lymphocytes T, la croissance de la tumeur est plus lente, cette dernière atteignant un volume de 150 mm^3 après 22 jours, soit 25 % de moins que celle dans le témoin sans lymphocytes.
Les tumeurs générées lorsque les cellules cancéreuses sont implantées en présence de lymphocytes T et avec injections de MEDI4736 sont également plus petites.
Ainsi, lorsque le MEDI4736 est dosé à $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, le volume de la tumeur est de 50 mm^3 après 22 jours, soit 3 fois plus faible que sans injection de MEDI4736. Lorsque le MEDI4736 est dosé à $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, le volume de la tumeur est de 30 mm^3 après 22 jours, soit 5 fois plus faible que sans injection de MEDI4736.
Les anticorps monoclonaux MEDI4736 permettent donc de limiter le développement de la masse tumorale en présence de lymphocytes T.
- 3.6. Les anticorps monoclonaux MEDI4736 se fixent sur les marqueurs PD-L1 des cellules cancéreuses. Le masquage de PD-L1 lève l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant les cellules cancéreuses. Ces dernières entrent alors en apoptose, ce qui réduit le volume des tumeurs.

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	Conservier 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 ensemercer le milieu de fermentation
	C1.7.4	Conduire la fermentation
	C1.7.5	Traiter des données cinétiques
	C1.7.6	Effectuer le traitement primaire du moût en fin de fermentation : séparation de la biomasse
	C1.7.7	Conservier et stocker le matériel collecté
	C1.7.8	Assurer l'élimination des cultures et des consommables
	C1.7.9	Décontaminer et nettoyer l'unité de fermentation et les périphériques
C2.1- Organiser son activité de travail	C2.1.1	Recenser et planifier les travaux à réaliser
	C2.1.2	Inventorier les besoins en matériels et en réactifs
	C2.1.3	Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.4	Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.5	Organiser son espace de travail
	C2.1.6	Remettre en ordre son espace de travail
	C2.1.7	Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires

C 2.4- Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	C2.4.1	Identifier les dangers
	C2.4.2	Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation
	C2.4.3	Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés
	C2.4.4	Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés
	C2.4.5	Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement
	C2.4.6	Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident
	C2.4.7	Pour toute personne entrante : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs
	C2.4.8	Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	C3.1.1	Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique
	C3.1.2	Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	C4.3.1	Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué

U54 : TP de biologie et technologies cellulaires

Coefficient 1 – CCF

Compétences évaluables

Compétences terminales Globales	Compétences terminales élémentaires	
C1.1- Préparer les réactifs et les solutions travail	C1.1.1.	Préparer et conditionner solutions de travail et réactifs
	C1.1.2.	Préparer des milieux de culture
	C1.1.3.	Etalonner les solutions titrantes
C1.2- Préparer ou prétraiter les échantillons biologiques	C1.2.1.	Préparer les échantillons biologiques
	C1.2.2.	Prétraiter les échantillons biologiques
	C1.2.3.	Conditionner le matériel biologique
C1.5- Mettre en œuvre des techniques utilisant des anticorps	C1.5.1	Choisir un protocole adapté.
	C1.5.2	Prévoir des témoins et des échantillons de référence
	C1.5.3	Appliquer sur les échantillons et les témoins le protocole choisi
C1-9- Mettre en œuvre des techniques de génie cellulaire	C1.9.1	Préparer les milieux de culture
	C1.9.2	Préparer une culture primaire de cellules eucaryotes supérieures
	C1.9.3	Entretenir une culture de cellules eucaryotes supérieures
	C1.9.4	Utiliser des cellules eucaryotes supérieures comme support d'expérimentation ou de production
	C1.9.5	Conserver et stocker des lignées cellulaires et les clones
	C1.9.6	Assurer l'élimination des cultures et du matériel contaminés
C2.1- Organiser son activité de travail	C2.1.1	Recenser et planifier les travaux à réaliser
	C2.1.2	Inventorier les besoins en matériels et en réactifs
	C2.1.3	Vérifier la disponibilité des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.4	Garantir l'approvisionnement et le renouvellement des matériels, des réactifs et des consommables
	C2.1.5	Organiser son espace de travail
	C2.1.6	Remettre en ordre son espace de travail
	C2.1.7	Mettre en route les matériels et les équipements et faire les réglages nécessaires

C 2.4 Gérer la santé et la sécurité au travail. Organiser le travail dans le temps et dans l'espace	C2.4.1	Identifier les dangers
	C2.4.2	Évaluer les risques et les facteurs potentiels d'accidents d'une manipulation
	C2.4.3	Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés
	C2.4.4	Vérifier l'adéquation du choix des équipements de protection aux risques identifiés
	C2.4.5	Déclencher les opérations adaptées en cas de dysfonctionnement pouvant créer une situation de risque pour les personnes, les matériels, les produits ou l'environnement
	C2.4.6	Intervenir de façon adaptée en cas d'accident ou d'incident
	C2.4.7	Pour toute personne entrante : vérifier son autorisation d'entrée, informer des risques spécifiques liés aux activités des laboratoires et locaux associés veiller à la mise à disposition des équipements de protection individuels et collectifs
	C2.4.8	Veiller à la mise en œuvre des procédures de sécurité préalables aux activités sous-traitées
C3-1- Analyser et exploiter des données ou des résultats	C3.1.1	Mettre en forme et traiter les données et les résultats bruts collectés lors d'une phase de travail technique
	C3.1.2	Analyser et exploiter des données techniques et/ou scientifiques dans le cadre d'une problématique définie
C4-3- Rendre compte et transmettre l'information	C4.3.1	Faire un rapport écrit ou oral sur le travail effectué

Rapport de stage et soutenance

U6 : Rapport de stage et soutenance

Extraits du référentiel :

1. Objectifs et modalités des stages

Les stages en entreprise doivent permettre :

- d'apprendre à travailler en situation réelle,
- de s'insérer dans une équipe de professionnels et de percevoir l'importance des facteurs humains et des relations sociales au sein de l'entreprise,
- d'acquérir ou d'approfondir ou d'appliquer des méthodologies ou des techniques inscrites au référentiel de certification,
- de conduire une réflexion critique sur les résultats obtenus.

La durée totale des stages sera de 15 semaines soit 5 à 6 semaines en 1ère année et 9 à 10 semaines en 2ème année.

2. Choix du terrain de stage

Le terrain de stage doit être obligatoirement en adéquation avec les objectifs de la formation professionnelle du BTS Biotechnologies. Il est également impératif que les activités principales du stagiaire comportent la mise en œuvre de techniques en relation avec les travaux de l'équipe d'accueil. S'agissant d'entreprises de production, des regroupements ponctuels organisés en partenariat avec les entreprises de Biotechnologie seront l'occasion d'une première approche de la démarche – qualité (référentiels et normes).

Bien que pouvant être conseillé par l'équipe pédagogique, le candidat doit rester responsable du choix de son terrain de stage.

3. Rédaction des rapports de stage :

Hors figures, bibliographie, index, lexiques et annexes diverses, le corps de chacun des rapports (1ère ou 2ème année) ne devra pas dépasser 20 pages dactylographiées, en format A4, police de type Times 11 ou 12, marges de 2 cm et texte justifié, interligne simple. Le volume des annexes ne devra pas excéder 10 pages. Les illustrations seront disposées en regard des textes.

Le rapport comportera, en quatrième de couverture, un résumé en anglais de 20 lignes. Tout en bénéficiant de conseils de la part des enseignants ou du maître de stage, la rédaction du rapport doit rester un travail personnel et original du candidat.

4. Contenu de l'épreuve :

L'épreuve de soutenance doit permettre d'évaluer les qualités d'expression, de communication et de réflexion des candidats ainsi que la maîtrise des connaissances scientifiques et techniques correspondant au sujet traité. L'exposé oral ne doit pas excéder 20 minutes. Il comportera la présentation en anglais du résumé du rapport de stage.

Cet exposé sera suivi d'un questionnement qui doit permettre d'apprécier les capacités du candidat à répondre de façon argumentée à des questions techniques sur le sujet choisi. L'étudiant sera en outre interrogé sur ses prestations écrites et orales en anglais. La durée totale du questionnement n'excédera pas 30 minutes.

5. Évaluation :

L'évaluation portera sur les points suivants :

- Les contenus scientifiques et techniques (évalués dans le rapport et lors de la soutenance) :
 - adéquation du thème du stage aux objectifs de formation,
 - cohérence du plan,
 - place du travail réalisé dans le projet ou la thématique du laboratoire,
 - présentation claire et correcte des techniques,
 - pertinence et qualité de la réflexion sur l'analyse critique des résultats et leur exploitation ,
 - prolongements possibles et mise en perspective.
- Le travail rédactionnel (évalué dans le rapport) :
présentation matérielle du rapport de stage, qualité des illustrations, expression française (orthographe, syntaxe...), pertinence et qualité des documents présentés lors de la soutenance ;
- La communication (évaluée lors de la soutenance) :
présentation pertinente du rapport, expression orale, respect du temps imparti, aptitude au dialogue.
- L'expression en langue anglaise.

Le jury sera obligatoirement composé d'un professeur de biochimie-génie biologique, d'un professionnel (qui n'est pas le tuteur du candidat) d'un professeur de Français et d'un professeur d'anglais.

Le maître de stage peut assister à la soutenance en qualité d'observateur. En aucun cas, il ne participera à l'évaluation de l'épreuve.