

**ANNALES
BTS
BIOTECHNOLOGIE**

**Sessions
2005 / 2006 / 2007**

UPBM – ÉDILION

**Lycée « La Martinière » 69338 LYON CEDEX 9
Publications de l'UPBM**

Ces annales ont été préparées par Pascal MICHAUX, professeur au lycée Valentine Labbé à La Madeleine, et comportent des propositions de corrigés, malheureusement pas disponibles pour toutes les épreuves.

Les sujets ont été fournis et les propositions de corrigés des épreuves d'enseignement général ont été élaborées ou relues par des collègues d'enseignement général lycée Valentine Labbé. Nous tenons à les remercier chaleureusement et amicalement ici d'avoir donné un coup de main ... pour un coup de pouce aux étudiants : Dominique Binchet, Alexis Delencre et Bernard Mathelin.

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

Réacteur à levures immobilisées dans des billes d'alginate
(Cliché de Pascal MICHAUX)

BTS Biotechnologie

Définition de la nature des épreuves

1. Épreuve de français

- Épreuve écrite
- Durée maximale : 3 heures
- Coefficient : 3

Objet et contenu de l'épreuve

L'épreuve a pour but de vérifier l'aptitude du candidat à d'une part, saisir dans un texte les idées essentielles et leur organisation logique, d'autre part à s'exprimer correctement et avec simplicité.

On proposera un texte de 50 à 100 lignes dactylographiées qui offrira par lui-même un sens assez complet, qui soit clair bien composé et qui se prête à une analyse d'idées.

Le texte proposé portera sur les problèmes de la vie moderne, problèmes de culture personnelle et de relations sociales qui peuvent intéresser un futur technicien. On tiendra compte dans le choix du texte des caractéristiques particulières du domaine professionnel auquel le candidat se destine.

Le candidat devra :

- résumer le texte en un nombre limité de mots.
- répondre à quelques questions destinées à lui faire préciser et expliquer le sens de notions et de mots importants du texte en témoignant de la culture générale qu'il a reçue.
- exprimer dans un commentaire succinct et composé ses vues personnelles sur l'ensemble ou sur un aspect particulier du texte.

2. Épreuve d'anglais

- Épreuve écrite durée = 2 heures
- Oral : durée maximale 30 min.
- Coefficient : 2

L'épreuve écrite entrera pour deux tiers et l'épreuve orale pour un tiers.

Partie écrite

L'épreuve doit permettre de vérifier les capacités du candidat :

- lire une lettre à caractère technique et en rendre compte;
 - comprendre des articles de revues spécialisées
 - utiliser des notices, modes d'emploi, diagrammes et schémas en anglais concernant des matériels étrangers.
- Cette épreuve comprendra d'abord une traduction ou le compte rendu d'un texte extrait d'un document technique; lui fera suite la rédaction d'un texte se rapportant au sujet étudié précédemment.

Partie orale

L'épreuve consistera en un entretien avec le jury, destiné à vérifier la maîtrise des structures essentielles de la langue.

Épreuve facultative de langue vivante II

- Épreuve orale de durée maximale : 30 min.
- Coefficient 1.

Seuls les points au-dessus de 10 seront pris en compte pour le total obtenu par le candidat.

L'épreuve doit permettre d'apprécier les capacités du candidat :

- à lire, analyser et commenter succinctement un document se rapportant au domaine professionnel et écrit dans la langue choisie
- à s'exprimer convenablement dans les domaines de ses futures activités, dans cette langue.
- Cette épreuve, qui pourra être précédée par une préparation de 30 min au maximum, consistera en un entretien avec le jury et pourra comporter la lecture et le résumé du texte par le candidat et une conversation sur ce texte.

3. Épreuve de mathématiques et sciences physiques

- Épreuve écrite
- Durée: 4 heures (2 h+2 h)
- Coefficient : 4.

L'épreuve comporte deux parties obligatoires et indépendantes.

Mathématiques (coefficient 1,5)

Objectifs :

L'enseignement des Mathématiques a pour triple objectif de fournir un outil efficace pour les Sciences physiques et biologiques et la Technologie, de développer la formation scientifique et de contribuer à la formation personnelle et relationnelle. Par suite, cette première partie d'épreuve doit permettre :

- d'apprécier la solidité des connaissances des candidats et leur capacité à les utiliser dans des situations variées,
- de vérifier leur aptitude au raisonnement et leur capacité à analyser correctement un problème, à justifier les résultats obtenus et à apprécier leur portée,
- d'apprécier leurs qualités dans les domaines de l'expression écrite et de l'exécution soignée de tâches diverses (tracés graphiques, calculs à la main ou sur machine)

Nature de cette partie d'épreuve :

Cette partie d'épreuve écrite est prévue pour une durée de deux heures.

Les sujets comportent deux exercices de Mathématiques recouvrant une part très large du programme. Les thèmes mathématiques qu'ils mettent en oeuvre portent principalement sur les chapitres les plus utiles pour les Sciences physiques et biologiques. Le nombre de points affecté à chaque exercice est indiqué aux candidats.

L'épreuve porte sur des applications directes des connaissances de cours.

Il convient d'éviter toute difficulté théorique et toute technicité mathématique excessive.

La longueur et l'ampleur du sujet doivent permettre à un candidat moyen de traiter le sujet et de le rédiger posément dans le temps imparti.

L'utilisation des calculatrices pendant l'épreuve est définie par la circulaire n°86-228 du 28 juillet 1986 publiée au Bulletin officiel n°34 du 2 octobre 1986.

Les deux points suivants doivent être rappelés en tête des sujets :

- la clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante de l'appréciation des copies,
- l'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

Sciences physiques (coefficient 2,5)

Cette seconde partie de l'épreuve doit permettre d'apprécier le niveau de connaissances en sciences physiques du candidat et son aptitude à les utiliser dans des situations concrètes proches du domaine technique où il est appelé à intervenir.

Elle comporte plusieurs questions indépendantes ou exercices indépendants.

Les questions posées se rapportent à des applications concrètes dont la compréhension ne doit faire appel qu'à des notions fondamentales du programme.

Il doit être vérifié que le candidat :

- analyse convenablement un problème pose en utilisant judicieusement ses connaissances scientifiques,
- prend en compte l'ensemble des données et des hypothèses,
- propose une solution justifiée par un raisonnement logique, élaborée en faisant appel au contenu du programme

4. Épreuve de sciences biologiques fondamentales et génie biologique

- Épreuve écrite
- Durée maximale : 4 heures
- Coefficient : 6

Cette épreuve doit permettre d'apprécier le niveau des connaissances du candidat dans les domaines de la biochimie, de la microbiologie, de la biologie cellulaire et moléculaire et de la physiologie. Elle doit avoir un caractère pluridisciplinaire.

Elle comporte plusieurs questions indépendantes.

5. Épreuve professionnelle de synthèse : étude de projet et réalisation pratique d'opérations de génie biologique

- Épreuve écrite et pratique
 - Durée maximale : 12 heures
 - Coefficient : 12
- Cette épreuve comporte deux parties obligatoires

Étude de projet

- Partie écrite
- Durée : 4 heures
- Coefficient : 4

Cette partie a pour but de vérifier les capacités de réflexion en vue de la résolution d'un problème biotechnologique simple pouvant relever des domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique.

Elle doit permettre d'apprécier les capacités :

- d'analyse du problème,
 - de conception et de définition d'une stratégie expérimentale,
 - d'utilisation de documents, éventuellement de langue anglaise,
 - de prise en compte des aspects concernant la sécurité, la législation et la gestion,
 - d'utilisation des techniques et du matériel notamment informatique,
- et l'esprit d'initiative.

Réalisation pratique d'opérations de génie biologique

- Partie pratique
- Durée maximale : 8 heures
- Coefficient : 8

Cette partie d'épreuve a pour but de vérifier les savoir-faire dans les domaines de la biochimie, et/ou de la microbiologie, et/ou de la biologie cellulaire et moléculaire, et/ou, de la physiologie.

Elle est pluridisciplinaire.

Elle doit permettre de vérifier les capacités :

- de mise en œuvre d'un protocole opératoire dans des conditions satisfaisantes de sécurité et d'efficacité,
- d'organisation,
- de rigueur et de précision dans l'exécution,
- d'exploitation des résultats.

Elle peut se dérouler en plusieurs parties.

Elle comporte plusieurs questions liées ou indépendantes.

Elle a un caractère essentiellement pratique.

Elle donne lieu à un compte rendu et peut éventuellement, faire appel aux techniques de l'informatique.

6. Épreuve de soutenance du rapport de stage ou d'activité professionnelle

- Épreuve orale
- Durée maximale : 1 heure
- Coefficient : 4 (2 pour les compétences scientifiques, technologiques et professionnelles, 1 pour les compétences en français, 1 pour les compétences en sciences économiques)

L'épreuve a pour but de vérifier :

1. En ce qui concerne la connaissance professionnelle et humaine de l'entreprise, si le candidat est capable de :

- saisir les données constitutives d'une entreprise ou d'un laboratoire,
- comprendre le fonctionnement d'une entreprise ou d'un laboratoire sur les plans de la technique et de l'organisation,
- présenter les activités d'un stage en analysant les problèmes techniques rencontrés et les démarches adoptées

2 En ce qui concerne la communication et l'expression, si le candidat est capable de :

- dégager, ordonner et mettre en valeur les points essentiels d'un document à caractère technique,
- maîtriser les techniques de la communication orale devant un auditoire non familier,
- utiliser la langue française correctement et avec clarté.

Le candidat présentera et soutiendra oralement le rapport qu'il aura établi à l'issue de son stage de deuxième année en entreprise s'il s'agit d'un candidat scolarisé ou un rapport sur son activité professionnelle s'il s'agit d'un candidat dispensé de stage en raison d'un emploi salarié.

Il devra notamment faire apparaître le caractère spécifique de l'entreprise ou il aura effectué son stage ou exercé son activité professionnelle, rendre compte de la visée, du déroulement et de l'aboutissement du stage lui-même ou de l'activité professionnelle, exposer les réflexions en particulier d'ordre technique que le stage ou l'activité professionnelle lui aura inspirées.

La présentation n'excédera pas 20 minutes.

La seconde partie de l'épreuve pourra être consacrée à un dialogue entre le jury et le candidat.

Le rapport de stage ou d'activité professionnelle de dix à vingt pages dactylographiées (quinze à trente pages manuscrites) sans compter les documents techniques comprendra :

- une présentation schématique de l'établissement de stage et du déroulement du stage de deuxième année ou de l'activité professionnelle exercée dans le domaine de la biotechnologie,
- le compte rendu d'un travail personnel,
- une réflexion personnelle concernant l'activité professionnelle et un bilan sur ce stage ou sur cette activité professionnelle.

Ce travail devra prendre en compte les problèmes de sécurité et de législation.

Les documents indispensables à la compréhension de ce rapport pourront figurer en annexe.

Pour les candidats scolarisés, la fiche de stage sera jointe.

L'évaluation des aspects scientifiques et techniques et professionnels se fera selon la répartition suivante :

- dossier écrit : coefficient 1
 - présentation orale et entretien : coefficient 1
- La commission de jury pour cette épreuve comprend :
- un professeur de français,
 - un professeur de sciences économiques,
 - un professeur chargé d'enseignement technologique.

Les candidats autorisés ayant échoué à l'examen peuvent :

- soit présenter de nouveau le rapport soutenu lors de la session à laquelle ils ont échoué,
- soit, s'ils le jugent nécessaire, modifier celui-ci dans le sens qu'ils estiment opportun ou refaire un nouveau stage et rédiger un nouveau rapport qui tient compte des situations rencontrées au cours de ce second stage et qui peut reprendre des observations rassemblées au cours du premier stage.

Annales du BTS BIOTECHNOLOGIE

Les annales sont divisées en années : la numérotation au centre du pied de page est liée à chaque année.

Sommaire

Année 2005 :

Français	Session 2005 page 1
Anglais	Session 2005 page 4
Mathématiques	Session 2005 page 5
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2005 page 6</i>
Sciences physiques	Session 2005 page 8
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2005 page 11</i>
Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique	Session 2005 page 14
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2005 page 17</i>
Epreuve professionnelle de synthèse 1ère partie : Etude de Projet	Session 2005 page 21
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2005 page 28</i>
Epreuve professionnelle de synthèse 2ème partie : Réalisation pratique d'opérations de Génie Biologique	Session 2005 page 31

Année 2006 :

Français	Session 2006 page 1
Anglais	Session 2006 page 5
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2006 page 6</i>
Mathématiques	Session 2006 page 6
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2006 page 8</i>
Sciences physiques	Session 2006 page 9
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2006 page 12</i>
Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique	Session 2006 page 13
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2006 page 15</i>
Epreuve professionnelle de synthèse 1ère partie : Etude de Projet	Session 2006 page 19
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2006 page 24</i>
Epreuve professionnelle de synthèse 2ème partie : Réalisation pratique d'opérations de Génie Biologique	Session 2006 page 27

Année 2007 :

Français	Session 2007 page 1
Anglais	Session 2007 page 4
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2007 page 4</i>
Mathématiques	Session 2007 page 5
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2007 page 7</i>
Sciences physiques	Session 2007 page 10
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2007 page 14</i>
Sciences Biologiques Fondamentales et Génie Biologique	Session 2007 page 17
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2007 page 19</i>
Epreuve professionnelle de synthèse 1ère partie : Etude de Projet	Session 2007 page 22
<i>Éléments de corrigé</i>	<i>Session 2007 page 26</i>
Epreuve professionnelle de synthèse 2ème partie : Réalisation pratique d'opérations de Génie Biologique	Session 2007 page 30

**ÉPREUVES
DE LA SESSION 2005**

L'USAGE DES CALCULATRICES ÉLECTRONIQUES EST INTERDIT.**SYNTHÈSE DE DOCUMENTS**

Vous rédigerez une synthèse objective, concise et ordonnée, des documents suivants, relatifs aux prétentions des « parasciences ». Puis vous présenterez une brève conclusion personnelle.

DOCUMENT 1**Vraies et fausses sciences.**

Astrologie, alchimie, magie, parapsychologie... On les appelle « sciences occultes », mais sont-elles véritablement des sciences ainsi qu'elles le prétendent maintenant ?

Le dictionnaire Larousse définit les sciences comme un ensemble de 5 connaissances humaines exactes et raisonnées, acquises par la découverte de lois objectives des phénomènes, et leur explication.

Parlant des sciences occultes, il indique « qu'elles semblent échapper à l'explication rationnelle » et « qu'elles reposent sur des preuves non expérimentales ».

Il apparaît donc en toute logique qu'on peut déjà tirer la conclusion, et dire que les sciences occultes ne sont pas des sciences. Mais puisqu'elles affirment aujourd'hui le contraire, poussons plus loin notre recherche.

L'histoire est classique de cette « voyante », ouvrant la porte de sa salle d'attente pleine de clients et interrogeant : « A qui le tour ? ». Bien sûr, la voyante devrait le savoir sans le demander. Mais, très sérieusement, les ouvrages sur les sciences occultes affirment l'impossibilité pour les devins, astrologues... de deviner quoi que ce soit les concernant. On se demande bien pourquoi, et les ouvrages en question ne s'expliquent guère là-dessus.

De même, on se demande bien pourquoi toutes les séances de spiritisme se déroulent obligatoirement dans une quasi-obscurité ? Et pourquoi enfin, Rhine, aussi bien qu'Uri Geller, ont affirmé que face à un strict contrôle baptisé hostile, les facultés parapsychologiques disparaissent ?

Peut-être peut-on répondre à leur place.

Si les voyantes ne peuvent rien deviner de ce qui les concerne, c'est qu'on s'attendrait autrement à les voir toutes riches et puissantes. Si les spirites agissent dans l'obscurité, c'est peut-être que celle-ci permet plus facilement la tricherie que la pleine lumière... Même raison pour « l'hostilité » du contrôle gênant l'expression des facultés « psi », car n'importe quel étudiant est capable d'effectuer des expériences normales de physique et de chimie en milieu « hostile », face à une surveillance draconienne...

Exigences scientifiques.

Et nous voici plongés dans la première des trois exigences fondamentales de la constatation scientifique d'un fait, l'objectivité : tout résultat scientifique peut être provoqué et observé par tous, en tous lieux et en tous moments. Ce qui n'est pas le cas des sciences occultes.

La deuxième de ces exigences est le contrôle : établissement des preuves, vérification préalable des composants d'un phénomène, répétition de ce phénomène, si possible en variant les méthodes.

Établissement des preuves : on remarquera dans le domaine des sciences occultes que les preuves sont le plus souvent des on-dit, des témoignages douteux, incertains, mal interprétés, idéalisés par la rumeur publique. Ainsi se forge une légende autour d'un rebouteux ou d'un fait jugé supranaturel (...)

La troisième exigence fondamentale pour accepter un phénomène est sa cohérence. Un fait scientifique n'est jamais isolé, indépendant. Il s'intègre dans un ensemble. Si l'on acceptait de croire ne serait-ce qu'à l'existence d'un esprit faisant tourner les tables, on remettrait en cause les lois les plus sérieuses de la science que des générations de savants ont contribué à échafauder. A quoi bon savoir mesurer l'intensité de la pesanteur à un endroit donné en mètre/seconde si les effets de l'attraction terrestre peuvent être modifiés par des facultés « psi » ? (...)

Les sciences occultes veulent aujourd'hui prouver leur réalité scientifique à l'aide de bien petits moyens : jeux de cartes, lancement de dés, montres arrêtées, torsion de barres métalliques ... S'il existait réellement des possesseurs de forces cachées, inconnues, pourquoi ne trouveraient-ils pas de moyens plus spectaculaires pour s'affirmer ?

Non, ni parapsychologie ni magie traditionnelle ne sont à la hauteur. Et on leur fait souvent trop d'honneur en essayant de vérifier leurs dires. Ce qui permet aux magiciens d'affirmer : « Voyez comme nos travaux sont sérieux, la science s'occupe de nous ». Sans préciser les conclusions de la science.

Bertrand SOLET, *Superstitions et fausses sciences*, Éditions Messidor/La Farandole, 1985.

DOCUMENT 2

Les parasciences.

Les parasciences » sont bâties autour d'affirmations non contrôlées et de croyances prenant des allures de vérité par l'effet de leur répétition. Ainsi l'astrologie : certes, tous les éléments de l'Univers sont en interaction, mais le prétendu lien entre le déroulement de ma carrière ou de mes amours et la position de Vénus décrit par les horoscopes résulte de divagations sans le moindre support vérifiable. Les parasciences sont à la science ce que les parasites sont à leur victime.

Pourtant, c'est un fait, des femmes et des hommes y trouvent un réconfort. Pourquoi lutter contre la prolifération de ces magies, renouvelées grâce à un vocabulaire d'aujourd'hui, si elles peuvent être utiles à certains ?

En fait, le message souterrain véhiculé par elles est destructeur. C'est le message de la soumission à la fatalité. Le cas extrême est celui de la numérologie, qui, malgré son évidente absurdité, se répand jusque dans les services d'embauche des entreprises. Quelques nombres obtenus en manipulant la date de naissance, le nom et le prénom suffiraient pour définir les traits de caractère, les aptitudes intellectuelles et le comportement social ! Ces caractéristiques seraient donc une donnée définitive, et chacun devrait s'incliner devant les oukases (1) de son destin. Ajouter foi à de pareilles stupidités, c'est contribuer à l'avènement d'une société faite de moutons dociles, insatisfaits, mais incapables d'un sursaut. Il n'est pas abusif, paraphrasant Rabelais, de voir dans les parasciences la ruine de la conscience.

Quand accepterons-nous d'être lucides et de comprendre que la spécificité de l'homme est de pouvoir prendre en charge son destin ? Demain n'est pas écrit dans les planètes ni dans les nombres. Demain sera ce que nous décidons aujourd'hui.

Albert JACQUARD, L'Express, 20 octobre 1989.

(1) Oukase : ordre auquel on ne peut se soustraire

DOCUMENT 3

Astrologie.

Il paraît qu'en France, le budget annuel de la « sorcellerie » est d'environ trois cents milliards de francs. Cela vaut la peine de jeter un coup d'oeil sur la semaine astrologique d'un hebdomadaire comme Elle, par exemple. Contrairement à ce que l'on pourrait en attendre, on n'y trouve nul monde onirique, mais plutôt une description étroitement réaliste d'un milieu social précis, celui des lectrices du journal. Autrement dit, l'astrologie n'est nullement – du moins ici – ouverture au rêve, elle est pur miroir, pure institution de la réalité.

Les rubriques principales du destin (Chance, Au-dehors, Chez vous, Votre coeur) produisent scrupuleusement le rythme total de la vie laborieuse. L'unité en est la semaine, dans laquelle la « chance » désigne un jour ou deux. La « chance », c'est ici la part réservée de l'intériorité, de l'humeur ; elle est le signe vécu de la durée, la seule catégorie par laquelle le temps subjectif s'exprime et se libère. Pour le reste, les astres ne connaissent rien d'autre qu'un emploi du temps : Au-dehors, c'est l'horaire professionnel, les six jours de la semaine, les sept heures par jour de bureau ou de magasin. Chez vous, c'est le repas du soir, le bout de soirée avant de se coucher. Votre coeur, c'est le rendez-vous à la sortie du travail ou l'aventure du dimanche. Mais entre ces « domaines », aucune communication : rien qui, d'un horaire à l'autre puisse suggérer l'idée d'une aliénation totale ; les prisons sont contiguës, elles se relaient mais ne se contaminent pas . Les astres ne postulent jamais un renversement de l'ordre, ils influencent à la petite semaine, respectueux du statut social et des horaires patronaux.

ci, le « travail » est celui d'employées, de dactylos ou de vendeuses ; le microgroupe qui entoure la lectrice est à peu près fatalement celui du bureau ou du magasin. Les variations imposées, ou plutôt proposées par les astres (...) sont faibles, elles ne tendent jamais à bouleverser une vie : le poids du destin s'exerce uniquement sur le goût au travail, l'énerverment ou l'aisance, l'assiduité ou le relâchement, les petits déplacements, les vagues promotions, les rapports d'aigreur ou de complicité avec les collègues et surtout la fatigue, les astres prescrivant avec beaucoup d'insistance et de sagesse de dormir plus, toujours plus.

Le foyer, lui, est dominé par les problèmes d'humeur, d'hostilité ou de confiance du milieu ; il s'agit bien souvent d'un foyer de femmes, où les rapports les plus importants sont ceux de la mère et de la fille. La maison petite-bourgeoise est ici fidèlement présente, avec les visites de la « famille », distincte d'ailleurs des parents par

alliance », que les étoiles ne paraissent pas tenir en très haute estime. Cet entourage semble à peu près exclusivement familial, il y a peu d'allusions aux amis, le monde petit-bourgeois est essentiellement constitué de parents et de collègues, il ne comporte pas de véritables crises relationnelles, seulement de petits affrontements d'humeur et de vanité. L'amour, c'est celui du Courrier du cœur ; c'est un « domaine » bien à part, celui des « affaires » sentimentales. Mais tout comme la 40 transaction commerciale, l'amour connaît ici des « débuts prometteurs », des mécomptes » et de « mauvais choix ». Le malheur y est de faible amplitude : telle semaine, un cortège d'admirateurs moins nombreux, une indiscretion, une jalousie sans fondement. Le ciel sentimental ne s'ouvre vraiment grand que devant la solution tant souhaitée », le mariage : encore faut-il qu'il soit « assorti ».

Un seul trait idéalise tout ce petit monde astral, fort concret d'un autre côté, c'est qu'il n'y est jamais question d'argent. L'humanité astrologique roule sur son salaire mensuel : il est ce qu'il est, on n'en parle jamais, puisqu'il permet la « vie ». Vie que les astres décrivent beaucoup plus qu'ils ne la prédisent ; l'avenir est rarement risqué, et la prédiction toujours neutralisée par le balancement des possibles : s'il y a des échecs, ils seront peu importants, s'il y a des visages rembrunis, votre belle humeur les déridera, des relations ennuyeuses, elles seront utiles, etc... ; et si votre état général doit s'améliorer, ce sera à la suite d'un traitement que vous aurez suivi, ou peut-être aussi grâce à l'absence de tout traitement (sic).

Roland BARTHES, Mythologies, Éditions du Seuil, 1957.

DOCUMENT 4

L'horoscope (sketch).

Je ne sais pas si vous lisez l'horoscope ... moi, je le consulte tous les matins.

Il y a huit jours... je vois dans mon horoscope : « Discussion et brouille dans votre ménage. »...

Je vais voir ma femme. Je lui dis : « Qu'est-ce que je t'ai fait ? », « Rien ! », « Alors... pourquoi discutes-tu ? ».

Depuis, on est brouillé !

Ce matin, je lis dans mon horoscope : « Risques d'accidents ».

Alors, toute la journée, au volant de ma voiture, j'étais comme ça... à surveiller à droite... à gauche... rien !

Rien !... Je me dis : « Je me suis peut-être trompé ».

Le temps de vérifier dans le journal qui était sur la banquette de ma voiture... Paf ! ... ça y était !

Le conducteur est descendu... Il m'a dit : « Vous auriez pu m'éviter ! », « Pas du tout, c'était prévu ! »,

« Comment ça ? », « L'accident est déjà dans le journal ! »,

« Notre accident est déjà dans le journal ? », « Le vôtre, je ne sais pas ! Mais le mien y est ! »,

« Le vôtre, c'est le mien ! », « Oh !... Eh !... une seconde !... Vous êtes né sous quel signe, vous ? »,

« Balance ! », « Balance ? » Je regarde Balance ! Je dis : « Ah ben non ! Vous n'avez pas d'accident !... Vous êtes dans votre tort mon vieux ! »,

Il y a un agent qui est arrivé... il m'a dit : « Vous n'avez pas vu mon signe ? »,

« Prenez le journal ! Regardez ! Je ne vais pas regarder le signe de tout le monde ! ».

Raymond DEVOS, Matière à rire, Éditions Plon, 1993

DOCUMENT 5

<p>Investissez dans l'amour Gardez l'être aimé</p> <p>Lilite Spécialiste des révélations astrales Flash détaillé A votre écoute de 8h à 21h 7/7 16,77 € / 110 F minimum Prenez CB sécurisé</p> <p>04 02 2833 336</p>	<p>Claire En prénom, une date de naissance... Et je vous ferai la plus belle voyance de votre vie.</p> <p>30 € / séance 17€ mini, paiement CB sécurisé</p> <p>01 44 35 71 10</p>	<p>Anna médium/numérologue spécialiste des blocages affectifs</p> <p>01 48 74 13 85 7/7, de 9h à minuit 17€ mini, paiement CB sécurisé</p>	<p>Charles médium Noté parmi les meilleurs dans le guide de la voyance Vous serez étonnés par son aide spirituelle et ses compétences inclassables</p> <p>16 € / séance 10 € / consultation complète 50 € (cvs et esse - CB sécurisé) Réponse par téléphone - 2/7 de 8h à 22h - AC 333 956 334</p> <p>01 39 13 30 68</p>
<p>MédiumStar Les Meilleurs Médiums Tarologues Numérologues vous répondent 7/7/7</p> <p>08 92 68 11 30 Vos messages sont livrés sur votre console de télévision 3615 MEDIUMSTAR</p>	<p>LAURE Garde l'amour Aide puissante</p> <p>de 9h à 11h - 7/7 21€ mini, paiement CB sécurisé</p> <p>01 48 74 17 06</p>	<p>Michèle Grâce à mes flashes précis et datés je réponds à toutes vos questions</p> <p>30 € la séance 01 44 35 70 48</p>	<p>Sarah Médium Lève le voile de votre avenir Sentimental et Professionnel</p> <p>7/7 de 8h à 2h du matin 08 92 68 00 74 Consulte en privé au 01 45 43 98 12 19 € la question</p>
<p>L'être aimé s'éloigne ? Flash détaillés, aide immédiate</p> <p>Magnétiseuse</p> <p>7/7 de 8h à 11h - Paiement CB sécurisé 04 92 18 30 08</p>	<p>308 MATHIEUS Nos MÉDIUMS VOYANTS en DIRECT 08 92 68 68 68 100% paiement CB sécurisé</p>	<p>Céline MEDIUM FLASH PRÉCIS ET DÉTAILLÉS SUR VOTRE FUTUR AMOUREUX Consulte de 8h à 11h 12€ / séance CB sécurisé 21,34 € / 140 F minimum</p> <p>04 92 28 22 77</p>	<p>Christiana Médium / Numérologue / Psychologue Spécialiste du domaine sentimental - Flashs précis de 8h à 11h du matin 7/7</p> <p>04 42 40 88 39</p>

Publicité extraite de *Télé Câble Satellite Hebdo*, Du 28/09 au 04/10/02
Session 2005 page 3

L'usage de la calculatrice est interdit. L'usage d'un dictionnaire bilingue est autorisé.

Spy in the bin may lead war on household waste.

Householders could have their rubbish weighed or measured and be charged on how much they produce, under plans by the Environment Agency.

The government body wants to encourage more recycling - and penalise those who fail to do so.

The move follows European legislation that demands Britain cut the huge volumes of waste it produces and reuse more **rather than bury it in landfill**.

Under one idea, household dustbins would be fitted with electronic tags that could be read by a machine attached to a dustcart¹. The machine would identify the bin, weigh it and add a charge to the owner's bill.

The idea is one of several being examined by advisers in Tony Blair's strategy unit who are to publish a research paper warning that Britain - which has one of the worst recycling records in Europe - must revolutionise the way it treats waste.

At the heart of the proposals is the notion that householders are paying far too little for disposal and that if people are made to pay more then they will consider recycling instead. Current charges average less than £1 a week per household.

This week Sir John Harman, chairman of the Environment Agency, will tell its annual conference that Britain should adopt a target of "zero waste production". This would mean recycling all waste, either as raw materials or to be burnt for energy.

Critics say such a target is over-optimistic for a country that produces 29m tons of household waste, 78m tons of commercial waste and 293m tons of construction waste annually. Most of this goes to landfill, with volumes doubling every twenty years.

But Steve Lee, the agency's head of waste policy, said the UK had enjoyed "bargain basement" waste management prices. "We have got to get used to paying the proper cost. That will focus attention and lead to environmentally friendly consumerism," he said.

Michael Meacher, the environment minister, is pressing for the return of a deposit system on bottles. A similar system could also be applied to metal cans; Britain uses 5 billion aluminium and 13 billion steel cans each year.

Plastic supermarket bags are also a major target. They face a charge to encourage consumers to shop using their own. The bags take hundreds of years to decay - but Britain uses 500m a 30 week.

Adapted from Jonathan Leake, The Sunday Times, October 20, 2002

dustcart¹ : *camion des éboueurs*

PREMIÈRE PARTIE : COMPRÉHENSION (10 points)

- 1) Vous ferez un compte rendu du texte en langue française en faisant ressortir les idées principales (160 mots +/- 10%)
- 2) Vous traduirez en français les trois premiers paragraphes, de «Householders could have their rubbish weighed» (ligne 1) jusqu'à «rather than bury it in landfill» (ligne 5, en caractères gras)

DEUXIÈME PARTIE : EXPRESSION EN LANGUE ANGLAISE (10 points)

Answer the following questions in English.

- 1) Do you agree with the idea that the more waste householders produce the more they should pay ? (70 words +/- 10%)
- 2) Do you consider yourself to be an «environment friendly» citizen ? (130 words +/- 10%)

SOUS ÉPREUVE : MATHÉMATIQUES

Durée : 2 heures

Coefficient : 1,5

La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

EXERCICE 1 (12 points)

Les trois parties de cet exercice sont indépendantes.

Un laboratoire pharmaceutique fabrique, en très grande quantité, un certain type de comprimés dont la masse est exprimée en milligrammes.

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

A. Loi normale

Un comprimé de ce type est considéré comme acceptable pour la masse lorsque celle-ci appartient à l'intervalle $[580 ; 620]$.

On note X la variable aléatoire qui, à chaque comprimé prélevé au hasard dans la production, associe sa masse. On suppose que X suit la loi normale de moyenne 600 et d'écart type 9.

1° Calculer la probabilité qu'un comprimé prélevé au hasard dans la production soit acceptable pour la masse.

2° Déterminer le nombre réel positif a tel que : $P(600 - a \leq X \leq 600 + a) = 0,90$.

B. Loi binomiale et approximation d'une loi binomiale

On admet que 3 % des comprimés d'un lot important ne sont pas acceptables pour la masse.

On prélève au hasard N comprimés de ce lot pour vérification de la masse. Le lot est suffisamment important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de N comprimés.

On considère la variable aléatoire Y qui, à tout prélèvement de N comprimés, associe le nombre de comprimés non acceptables pour la masse.

1° Justifier que la variable aléatoire Y suit une loi binomiale dont on déterminera les paramètres.

2° Dans cette question, on prend $N = 10$.

a) Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement de 10 comprimés, un comprimé exactement, ne soit pas acceptable pour la masse.

b) Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement de 10 comprimés, un comprimé au moins, ne soit pas acceptable pour la masse.

3° Dans cette question, on prend $N = 50$.

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

b) On désigne par Z_1 une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre λ , où λ a la valeur obtenue au a). En utilisant cette loi de Poisson, calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement de 50 comprimés, au plus 2 comprimés ne soient pas acceptables pour la masse.

4° Dans cette question, on prend $N = 1000$.

On décide d'approcher la loi de la variable aléatoire Y par la loi normale de moyenne 30 et d'écart type 5,39.

On note Z_2 une variable aléatoire suivant la loi normale de moyenne 30 et d'écart type 5,39.

a) Justifier les paramètres de cette loi normale.

b) Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement de 1000 comprimés, au plus 25 comprimés ne soient pas acceptables pour la masse, c'est à dire calculer $P(Z_2 \leq 25,5)$.

C. Intervalle de confiance

Dans cette partie, on s'intéresse à la masse d'un stock important de comprimés.

On prélève au hasard et avec remise un échantillon de 100 comprimés dans le stock.

Soit \bar{M} la variable aléatoire qui, à tout échantillon de 100 comprimés prélevés au hasard et avec remise dans le stock, associe la moyenne des masses des comprimés de cet échantillon.

On suppose que \bar{M} suit la loi normale de moyenne inconnue μ et d'écart type $\sigma/\sqrt{100}$ avec $\sigma = 9$.

Pour l'échantillon prélevé, la moyenne obtenue est $\bar{x} = 602$.

Déterminer un intervalle de confiance centré sur \bar{x} de la moyenne inconnue μ des masses des comprimés du stock considéré, avec le coefficient de confiance 95 %.

EXERCICE 2 (8 points)

On décide de mesurer en fonction du temps la quantité de *principe actif* d'un médicament présent dans le sang d'un groupe de patients en traitement dans un hôpital.

A l'instant t , exprimé en minutes, on note $q(t)$ la quantité exprimée en milligrammes de ce principe actif, contenue dans le sang d'un patient.

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

A. Résolution d'une équation différentielle

On admet que la fonction q est solution de l'équation différentielle (E) :

$$4y' + y = -0,002t + 2,992$$

où y est une fonction de la variable réelle t définie et dérivable sur $[0 ; 1440]$ et y' sa fonction dérivée.

1° Déterminer les solutions de l'équation différentielle (E_0) : $4y' + y = 0$.

2° Déterminer deux nombres réels a et b tels que la fonction g définie sur $[0 ; 1440]$ par $g(t) = at + b$ soit une solution particulière de l'équation différentielle (E).

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

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

B. Etude d'une fonction et calcul intégral

On admet dans cette partie que, pour tout t de $[0 ; 1440]$, $q(t) = 3 - 0,002t + \frac{3}{4}e^{-\frac{t}{4}}$.

On rappelle que le temps t est exprimé en minutes.

1° a) Calculer $q'(t)$ pour tout t de $[0 ; 1440]$.

b) Résoudre dans $[0 ; 1440]$ l'inéquation $q'(t) \geq 0$.

c) En déduire le sens de variation de q sur $[0 ; 1440]$.

La fonction q admet un maximum pour $t = t_0$. Donner la valeur approchée arrondie à 10^{-2} de t_0 et $q(t_0)$.

2° Calculer la quantité de principe actif restant dans le sang d'un patient 24 heures après l'injection du médicament. On arrondira le résultat à 10^{-2} près.

3° Démontrer que la valeur moyenne V_m de la fonction q sur $[0 ; 1440]$ est : $V_m = (2234,4 + 12e^{-360})/1440$

PROPOSITION DE CORRIGÉ

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

Exercice 1 :

A. Loi normale

X variable aléatoire qui, à chaque comprimé prélevé au hasard dans la production, associe sa masse (en mg). X suit la loi normale $\mathcal{N}(600, 9)$

$$\begin{aligned} 1. \quad P(580 \leq X \leq 620) &= P\left(-\frac{20}{9} \leq T \leq \frac{20}{9}\right) \quad \text{avec } T = \frac{X - 600}{9} \\ &= 2 \Pi\left(\frac{20}{9}\right) - 1 = 0,9736 \approx 0,97 \quad \boxed{P(580 \leq X \leq 620) \approx 0,97} \end{aligned}$$

$$2. \quad P(600 - a \leq X \leq 600 + a) = 0,90$$

$$\text{Soit, } P\left(-\frac{a}{9} \leq T \leq \frac{a}{9}\right) = 0,90 \text{ D'où } 2 \Pi\left(\frac{a}{9}\right) - 1 = 0,90 \quad \text{ou bien } \Pi\left(\frac{a}{9}\right) = 0,95$$

$$\text{Par lecture inverse de la table, on obtient } \frac{a}{9} = 1,645 \text{ soit } a \approx 14,81 \quad \boxed{a \approx 14,81}$$

B. Loi binomiale et approximation

Y variable aléatoire qui, à tout prélèvement de N comprimés, associe le nombre de comprimés non acceptables pour la masse.

1. Un prélèvement a deux issues possibles : soit le comprimé est non acceptable avec une probabilité de 0,03 soit il l'est. On répète le prélèvement N fois, de façon indépendante (tirage assimilé à un tirage avec remise).

Y suit donc une loi binomiale de paramètres N et 0,03

$$2. \quad N = 10$$

$$a. \quad P(Y = 1) = C_{10}^1 0,03 0,97^9 \approx 0,23$$

La probabilité pour qu'un comprimé, exactement, ne soit pas acceptable est 0,23

$$b. \quad P(Y \geq 1) = 1 - P(X < 1) = 1 - P(X = 0) \approx 0,26$$

La probabilité pour qu'un comprimé, au moins, ne soit pas acceptable est 0,26

3. N = 50

a. La loi suivie par Y peut être approchée par une loi de Poisson de paramètre $\lambda = 50 \times 0,03$ soit $\lambda = 1,5$

Z_1 suit la loi de Poisson de paramètre 1,5

b. $P(X \leq 2) = P(X = 0) + P(X = 1) + P(X = 2) \approx 0,81$

La probabilité que, au plus 2 comprimés ne soient pas acceptables est 0,81

4. N = 1000

La loi de Y est approchée par la loi normale $\mathcal{N}(30 ; 5,39)$

a. Pour déterminer les paramètres de cette loi, il suffit de calculer l'espérance et l'écart-type de la loi

$\mathcal{B}(1000, 0,03)$ soit $m = 1000 \times 0,03 = 30$ et $\sigma = \sqrt{1000 \times 0,03 \times 0,97} \approx 5,39$

b. $P(Z_2 \leq 25,5) = P(T_2 \leq \frac{-4,5}{5,39})$ avec $T_2 = \frac{Z_2 - 30}{5,39}$

$$= 1 - \Pi\left(\frac{4,5}{5,39}\right) \approx 0,20$$

La probabilité qu'au plus 25 comprimés ne soient pas acceptables est 0,20

C. Intervalle de confiance

Masse d'un stock important de comprimés. \bar{M} suit la loi normale de masse inconnue μ et d'écart-type 0,9.

On connaît $\bar{x} = 602$

L'intervalle de confiance de μ , avec le coefficient de confiance 0,95 est donné par :

$[\bar{x} - t \times 0,9 ; \bar{x} + t \times 0,9]$ avec $\bar{x} = 602$ et $t = 1,96$ (donné par $2 \Pi(t) - 1 = 0,95$)

D'où, un intervalle de confiance de μ , avec 95% de confiance est [600,23 ; 603,77]

La moyenne inconnue (en mg) des masses du stock de comprimés a 95% de chances de se situer dans l'intervalle [600,23 ; 603,77]

Exercice 2 :

Q(t) est la quantité, exprimée en milligrammes d'un principe actif, contenue dans le sang d'un patient, à l'instant t.

A. Résolution d'une équation différentielle

q est solution de $4y' + y = -0,002t + 2,992$ (E)

1. Résolution de l'équation différentielle $4y' + 4y = 0$

$$y' + \frac{1}{4}y = 0 \quad y = C e^{-\frac{t}{4}}$$

2. solution particulière de l'équation complète

$g(t) = at + b$ $g'(t) = a$ d'où : $4a + at + b = -0,002t + 2,992$

Par identification : $a = -0,002$ et $b = 3$ d'où $g(t) = -0,002t + 3$

3. La solution générale de l'équation (E) est donc : $y = C e^{-\frac{t}{4}} - 0,002t + 3$

4. On a $q(0) = 0$, d'où $C = -3$ Alors, $q(t) = 3 - 0,002t - 3 e^{-\frac{t}{4}}$

B. Etude d'une fonction et calcul intégral

On étudie la fonction q(t) sur [0 ; 1440]

$$1. \quad q'(t) = -0,002 + \frac{3}{4} e^{-\frac{t}{4}} \quad q'(t) \geq 0 \Leftrightarrow -0,002 + \frac{3}{4} e^{-\frac{t}{4}} \geq 0 \Leftrightarrow e^{-\frac{t}{4}} \geq 0,008 \Leftrightarrow -\frac{t}{4} \geq \ln \frac{0,008}{3} \Leftrightarrow t \leq -4 \ln \frac{0,008}{3}$$

$$\text{On pose } t_0 = \ln \frac{0,008}{3}$$

Donc $q'(t) \geq 0$ sur $[0 ; t_0]$ et $q'(t) \leq 0$ sur $[t_0 ; 1440]$

La fonction q est donc croissante sur $[0 ; t_0]$ et décroissante sur $[t_0 ; 1440]$. Elle admet donc un maximum en t_0 .

On a $t_0 \approx 23,71$ et $q(t_0) \approx 2,94$.

2. On cherche à déterminer $q(24 \times 60) = q(1440) \approx 0,12$

La quantité de principe actif restant dans le sang 24h après l'injection du médicament est 0,12 mg

3. La valeur moyenne de la fonction q sur [0 ; 1440] est donnée par :

$$V_m = \frac{1}{1440} \int_0^{1440} q(t) dt \text{ soit } V_m = \frac{1}{1440} \left[3t - 0,002 \frac{t^2}{2} + 12 e^{-\frac{t}{4}} \right]_0^{1440} \text{ Ce qui donne : } V_m = \frac{1}{1440} (2234,4 + 12 e^{-360})$$

SOUS-ÉPREUVE : SCIENCES PHYSIQUES

Durée : 2 heures

Coefficient : 2,5

SCIENCES PHYSIQUES

Rappel : La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

Seul l'usage d'une calculatrice électronique, autonome, non imprimante, à entrée unique par clavier, est autorisée pour cette épreuve.

1) CHIMIE GENERALE : Détermination de pKa (17 points)

Données : A 25 °C : $pK_e = 14$; $pK_D(Ag(NH_3)_2^+) = 7,2$.

Détermination de la valeur du pKa du couple NH_4^+/NH_3 par plusieurs méthodes.

1. On mesure le pH d'une solution de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) de concentration molaire volumique $C_{NH_4Cl} = 0,25 \text{ mol.L}^{-1}$. Sa valeur est de 4,9 à 25°C.

1.1. Écrire l'équation de la réaction de dissociation de NH_4Cl dans l'eau puis l'équation du couple acide-base NH_4^+/NH_3 .

1.2. Déterminer la valeur du pKa du couple NH_4^+/NH_3 en négligeant la dissociation de l'eau.

1.3. Vérifier que la dissociation de l'eau est bien négligeable. Que peut-on dire de la dissociation de NH_4^+ dans le cas présent ?

2. On prépare une solution (S) en mélangeant 100 mL de solution de chlorure d'ammonium de concentration $C_a = 0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ et 100 mL de solution d'ammoniac de concentration $C_b = 0,25 \text{ mol.L}^{-1}$. Le pH de la solution (S) obtenue est égal à 9,2.

2.1. Comment nomme-t-on une telle solution (S) ? Quelles sont ses propriétés ?

2.2. Déterminer la valeur du pKa du couple NH_4^+/NH_3 (on négligera la dissociation de NH_4^+ et la protonation de NH_3).

3. On dispose d'une solution du complexe $Ag(NH_3)_2^+$ de concentration molaire volumique égale à $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.1. Nommer ce complexe.

3.2. Donner sa géométrie.

3.3. Écrire l'équation de réaction de formation de ce complexe.

3.4. Exprimer sa constante de formation.

4. On ajoute à la solution précédente (question 3), une solution d'acide nitrique concentrée jusqu'à ce que 99% du complexe ait disparu. Le pH de la solution obtenue est égal à 6,00. On négligera la variation de volume liée à l'addition de l'acide nitrique. Par ailleurs, la dissociation du complexe dans la solution avant ajout d'acide nitrique est négligeable et la dissociation de NH_4^+ est également négligeable.

4.1. Écrire l'équation de cette réaction.

4.2. Donner l'expression de la constante d'équilibre de cette réaction et la calculer.

4.3. En déduire la valeur du pKa du couple NH_4^+/NH_3 .

2) CHIMIE ORGANIQUE (19 points)

On réalise l'hydrolyse d'un ester A ; on obtient deux produits B et C.

1. L'oxydation par le permanganate de potassium en milieu acide du produit B donne une cétone D. L'ozonolyse du 2-méthylbut-1-ène donne du méthanal et le produit D.

1.1. Déterminer la formule semi développée et le nom du produit D.

1.2. Retrouver la formule semi développée et le nom du produit B. Justifier.

1.3. Écrire l'équation d'oxydoréduction de B par l'ion permanganate.

2. On réalise le dosage du produit C par une solution de soude avec suivi pHmétrique. La courbe obtenue est reproduite sur le document 1 à rendre avec la copie.

Déterminer la formule semi développée et le nom du produit C en justifiant la réponse sur le document 1.

3 On fait réagir du dichlore (chloration) en présence de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) sur le produit C.

3.1. Déterminer le nom et la formule semi développée du produit organique obtenu. Justifier.

3.2. Quel est le rôle du chlorure d'aluminium ?

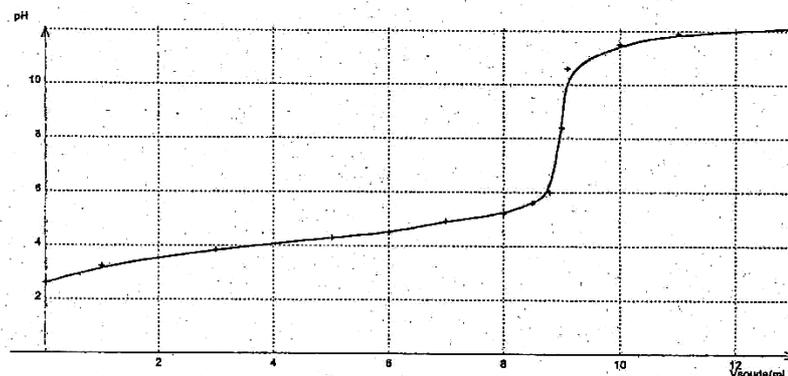
3.3. Donner le mécanisme réactionnel du dichlore sur le chlorure d'aluminium. Quel type d'intermédiaire réactionnel obtient-on ?

3.4. A quel type de réaction appartient cette réaction de chloration ?

4. Connaissant la nature des produits de l'hydrolyse de l'ester, donner la formule semi développée et le nom de l'ester A.

Document à rendre avec la copie

Document 1



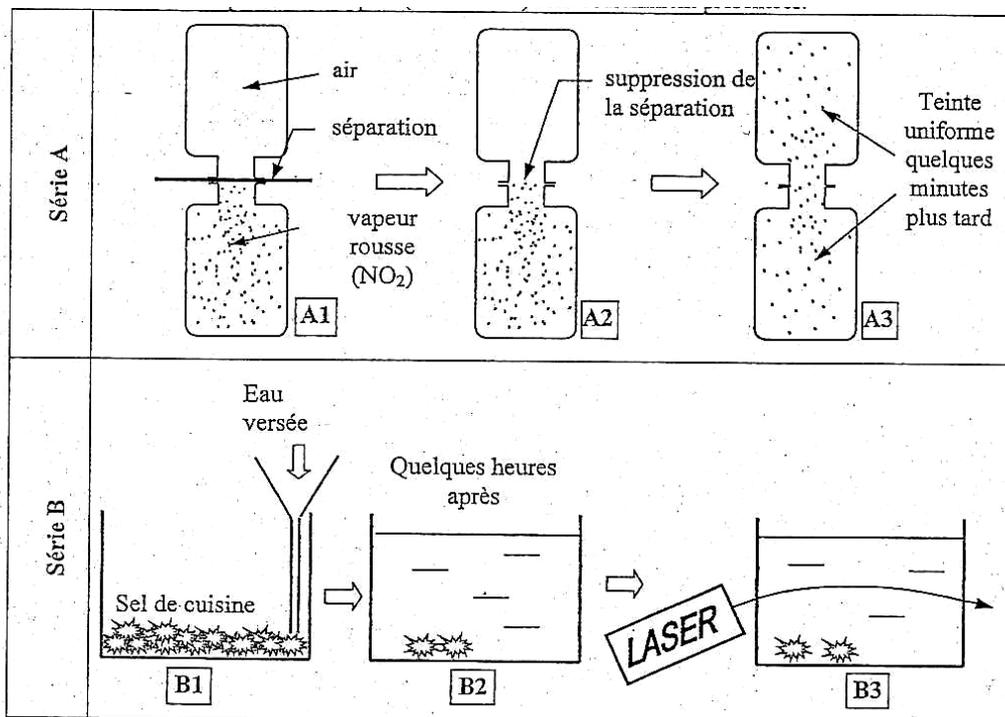
Données : A 25 °C : $pK_a (Cl_3CHCOOH \text{ (acide trichloroacétique)} / Cl_3CHCOO^-) = 0,7$
 $pK_a (COOH-CH_2-COOH \text{ (acide malonique)} / COOH-CH_2-COO^-) = 2,8$
 $pK_a (C_6H_5-COOH \text{ (acide benzoïque)} / C_6H_5-COO^-) = 4,2$

Déterminer la formule semi développée et le nom du produit C parmi les trois acides indiqués en justifiant la réponse.

3) PHYSIQUE : Diffusion par une membrane perméable (14 points)

1. Présentation qualitative du phénomène de diffusion.

Les deux séries d'expériences ci-après (série A et B) sont couramment présentées.



1.1. En s'appuyant sur ces expériences, décrire et expliquer le phénomène de diffusion.

1.2. De ces schémas, quel est celui qui met en évidence un gradient de concentration ? Justifier.

2. Étude quantitative.

Deux compartiments A et B de volume V_A et V_B égal à 1 L chacun, sont séparés par une membrane poreuse perméable de surface $S = 100 \text{ cm}^2$ et d'épaisseur $e = 100 \text{ }\mu\text{m}$.

Le compartiment A contient initialement une solution d'urée de concentration de $60 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

On renouvelle constamment l'eau pure du compartiment B et l'évolution de la concentration en masse d'urée C_A dans le compartiment A est donnée par le tableau reproduit sur le document 2 à rendre avec la copie.

2.1. Compléter le tableau et tracer la représentation graphique de $\ln C_A = f(t)$, évolution du logarithme népérien de la concentration en masse en fonction du temps, sur le document 2.

2.2. Déduire de la représentation graphique l'équation de la courbe obtenue et montrer que la fonction est de la forme $C_A = C_{A0} \cdot e^{-kt}$.

2.3. Déterminer C_{A0} et k en précisant les unités S.I.

3. La loi de Fick exprimant le débit massique de soluté diffusé en fonction du gradient de concentration permet de montrer que dans le cadre de cet exemple :

$$k = \frac{D \cdot S}{V_A \cdot e}$$

Avec D : la constante de diffusion
 S : la surface de la membrane
 V_A : le volume du compartiment
 e : l'épaisseur de la membrane

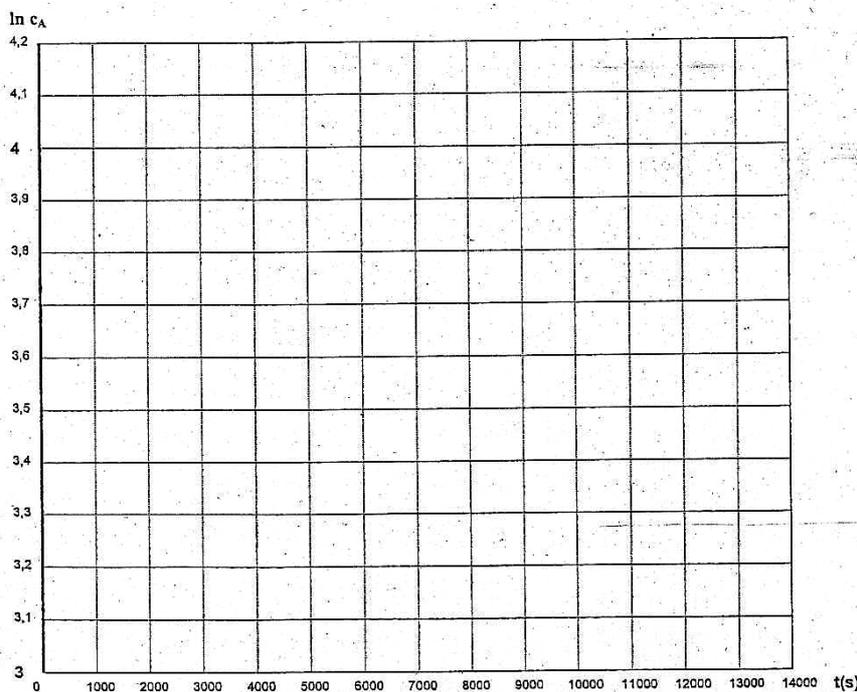
3.1. Calculer la constante de diffusion de l'urée ainsi que son unité S.I.

3.2. En supposant la valeur de k proche de $8 \cdot 10^{-5}$ unité SI, calculer la durée nécessaire pour que la concentration en urée diminue de moitié.

Document à rendre avec la copie

Document 2

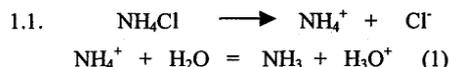
t durée en s	0	2000	4000	6000	8000	10 000	12 000
C_A en $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$	60	50	43	36	31	27	23
$\ln C_A$							



PROPOSITION DE CORRIGÉ

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

EXERCICE N°1 : CHIMIE GÉNÉRALE :



1.2.

Tableau d'avancement

V=1L	NH_4^+	+	H_2O	=	NH_3	+	H_3O^+
E.I	$C_{\text{NH}_4\text{Cl}}$		excès		0		0
E.E	$C_{\text{NH}_4\text{Cl}} - x$		excès		x		x

D'après le tableau d'avancement, à l'équilibre $[\text{NH}_3]=[\text{H}_3\text{O}^+]=10^{-\text{pH}}$ et $[\text{NH}_4^+]=C_{\text{NH}_4\text{Cl}} - [\text{NH}_3]=C_{\text{NH}_4\text{Cl}} - 10^{-\text{pH}}$

Appliquons la loi d'action de masse à (1) : (a) $K_a = \frac{[\text{NH}_3][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{NH}_4^+]}$

A.N : $K_a = 6,34 \cdot 10^{-10}$, $\text{p}K_a = -\log K_a = 9,20$

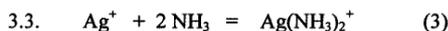
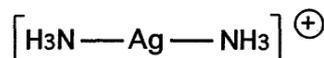
1.3. Négliger la dissociation de l'eau impose que $K_a \geq 10^4 \cdot K_e = 10^{-10}$; la RP est donc (1).
 L'hypothèse sur la valeur de K_a est bien vérifiée : $K_a = 6,34 \cdot 10^{-10} \geq 10^4 \cdot K_e = 10^{-10}$

2.1. Un tel mélange s'appelle une solution tampon ; elle permet de limiter les variations de pH lors de l'addition d'ions H_3O^+ ou d'ions OH^- en quantités limitées dans le milieu. Le pH d'une solution tampon ne varie que très faiblement par dilution.

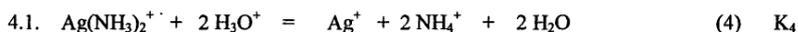
2.2. A partir du pH, du pKe, on montre que $[\text{H}_3\text{O}^+] \ll [\text{HO}^-] \ll C_a$ ou C_b , NH_4^+ est peu dissocié et $[\text{NH}_4^+] \approx [\text{NH}_3]$, donc $\text{pH} = \text{p}K_a = 9,2$.

3.1. Ce complexe se nomme ion complexe diammine argent (I).

3.2. La géométrie est linéaire (type AX_2)



3.4. $K_F = \frac{[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+]}{[\text{Ag}^+][\text{NH}_3]^2}$



4.2.

Tableau d'avancement

V=1L	$\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$	+	$2 \text{H}_3\text{O}^+$	=	Ag^+	+	2NH_4^+	+	$2 \text{H}_2\text{O}$
E.I	$2 \cdot 10^{-2}$		n		0		0		excès
E.E	$2 \cdot 10^{-4}$		10^{-6}		$1,98 \cdot 10^{-2}$		$3,96 \cdot 10^{-2}$		excès

La loi d'action de masse appliquée à (4) : $K_4 = \frac{[\text{Ag}^+][\text{NH}_4^+]^2}{[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+][\text{H}_3\text{O}^+]^2}$

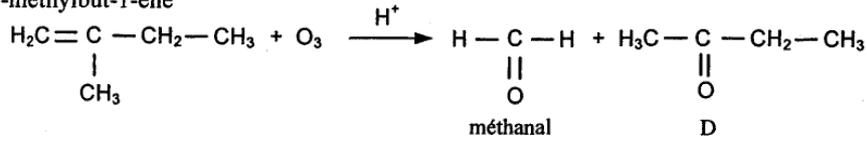
A.N : $K_4 = 1,55 \cdot 10^{11}$

4.3. On montre facilement que : $K_4 = \frac{K_D}{K_a^2}$ d'où $K_a = \sqrt{\frac{K_D}{K_4}}$ A.N : $K_a = 6,34 \cdot 10^{-10}$ et $\text{p}K_a = 9,2$

EXERCICE N°2 : CHIMIE ORGANIQUE

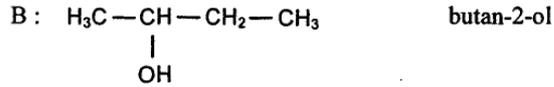
1.1.

2-méthylbut-1-ène

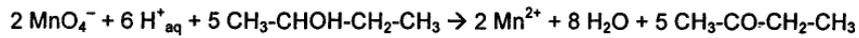
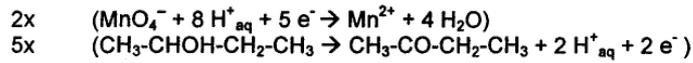


D : butan-2-one

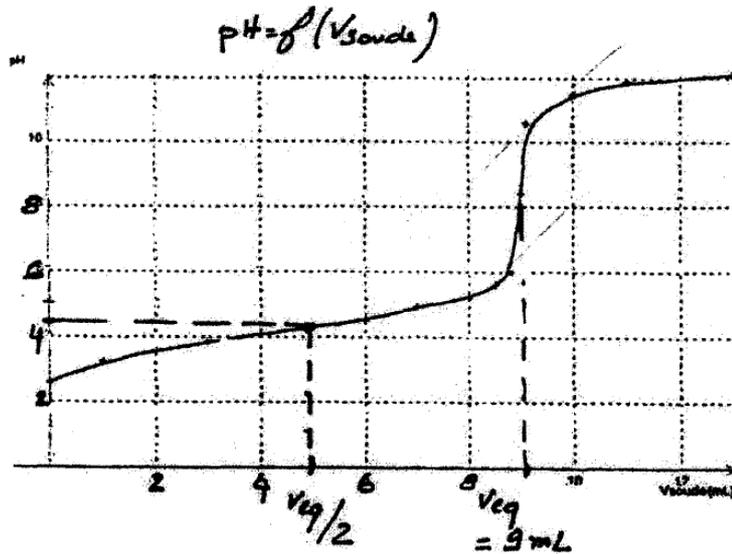
1.2 Si l'oxydation de B qui est un alcool donne une cétone alors B est un alcool II



1.3



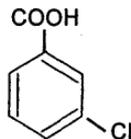
2.



On a pour un acide faible $pH = pK_A$ à la demi-équivalence : $pK_{A(C)} \approx 4,2$

Le composé C est donc un acide et c'est l'acide benzoïque $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$

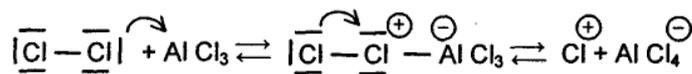
3.1 Le groupe COOH est méta orientateur donc la chloration de C donne



ac.métachlorobenzoïque.

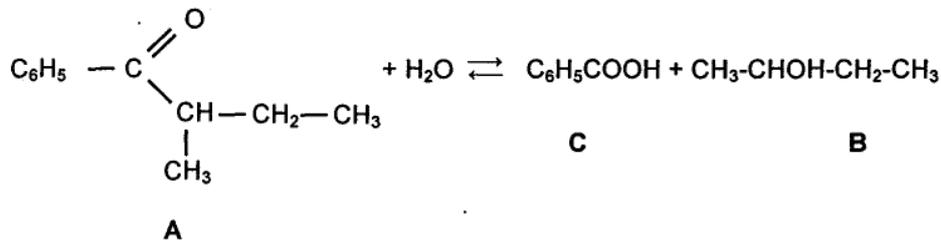
3.2 $AlCl_3$ pour le rôle d'un catalyseur (et participe à la formation de l'électrophile)

3.3



3.4 La réaction de chloration de C est une substitution électrophile aromatique

4.



Benzoate de 1-méthylpropyle

EXERCICE N°3: PHYSIQUE :

1. Présentation du problème de diffusion.

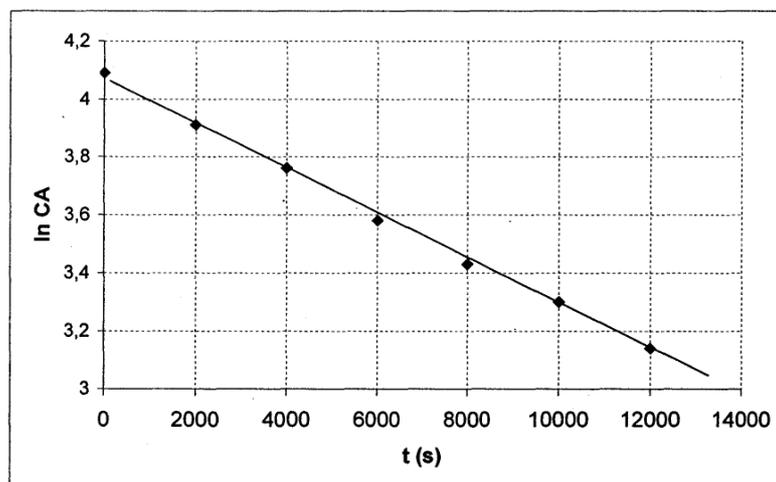
1.1. Série de schémas A : dès que la séparation entre les deux ballons est retirée, l'agitation thermique des molécules (distribution aléatoire des vitesses) provoque l'occupation de tout le volume offert, ce que montre la teinte uniforme finale. Il en est de même pour l'air.

Série de schémas B : en B₁, l'eau est versée très lentement afin d'éviter le mélange mécanique de l'eau avec la solution salée ou le sel. En B₂, la majorité du sel s'est dissous.

1.2. En B₃, la courbure du rayon lumineux montre un gradient d'indice de réfraction et donc un gradient de concentration en sel. Le sel a diffusé vers le haut de la solution.

2.1 Tableau :

t durée en s	0	2000	4000	6000	8000	10 000	12 000
c_A en kg.m^{-3}	60	50	43	36	31	27	23
$\ln c_A$	4,09	3,91	3,76	3,58	3,43	3,30	3,14



La représentation graphique de $\ln c_A = f(t)$ est celle d'une fonction affine du type : $y = ax + b$, avec les points choisis $A_1 (0 ; 4,075)$ et $A_2 (13 800 ; 0)$ appartenant à la droite de régression, on obtient :

$$a = (4,075 - 3) / (0 - 13 800) = -7,79 \cdot 10^{-5}$$

b = 4,08 ordonnée à l'origine.

(accepter toutes les réponses cohérentes par rapport au tracé)

L'équation de la droite est : $y = -7,8 \cdot 10^{-5} \cdot x + 4,08$,

soit $\ln c_A = -7,8 \cdot 10^{-5} \cdot t + 4,08$ et $C_A = e^{4,08} \cdot e^{-7,8 \cdot 10^{-5} t}$

2.3.

$\ln c_A = -kt + \ln c_{A0}$

Par identification, on obtient : $k = +7,8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

$\ln c_{A0} = 4,08$ donc $c_{A0} = e^{4,08} = \underline{59,2 \text{ kg.m}^{-3}} \approx 60 \text{ kg.m}^{-3}$ indiqués dans les données

3.1. On a $D = (k \times V \times l) / S$ avec k en s^{-1} ; V_A en m^3 , l en m , S en m^2 .

$D = (7,8 \cdot 10^{-5} \times 10^{-3} \times 100 \cdot 10^{-6}) / 100 \cdot 10^{-4} = \underline{7,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}}$.

3.2. $c_{A0} / 2 = c_{A0} \cdot e^{-kt}$

$-kt = \ln 0,5$

$t = -\ln 0,5 / k \rightarrow t = -\ln 0,5 / 810^{-5}$ on obtient $t = \underline{8,66 \cdot 10^3 \text{ s} = 2\text{h}24\text{min}}$

($t = 8,88 \cdot 10^3 \text{ s}$ avec la valeur du 2.3)

ÉPREUVE : SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GÉNIE BIOLOGIQUE

Durée : 4 heures

Coefficient : 6

Calculatrices non autorisées.

Quelques apports des biotechnologies dans la lutte contre les infections virales et bactériennes.

De nombreux traitements « classiques » contre les infections sont efficaces, mais certains peuvent présenter des inconvénients : troubles liés à l'intolérance au médicament, efficacité limitée des vaccins contre les agents pathogènes intracellulaires, apparition de souches résistantes par mutation de l'agent pathogène ...

Les biotechnologies permettent l'élaboration de nouvelles méthodes de lutte anti-virale et anti-microbienne : nouvelles molécules thérapeutiques, vaccins modernes ...

1. Un nouveau traitement contre la grippe (32 points)

1.1. Le virus de la grippe.

Le virus de la grippe est un virus à ARN de polarité négative et fragmenté en 8 molécules entourées chacune d'une capsidie à symétrie hélicoïdale. L'ensemble forme une particule sphérique, entourée d'une enveloppe comportant des molécules d'hémagglutinine et de neuraminidase.

Ce virus présente une haute variabilité génétique : de nouvelles souches, mutantes, apparaissent chaque année, rendant généralement caduc le vaccin élaboré l'année précédente.

1.1.1. Donner la définition des virus.

1.1.2. Faire le schéma légendé du virus de la grippe.

1.1.3. Rappeler les critères de la classification des virus.

1.1.4. Décrire succinctement les différentes étapes du cycle de multiplication d'un virus à ARN de polarité négative.

1.2. Les enzymes, cibles des médicaments antiviraux.

L'industrie pharmaceutique teste actuellement plusieurs molécules obtenues par synthèse chimique. Le zanamivir, par exemple, se fixe sur le site actif de la neuraminidase et inhibe l'activité de cette enzyme en modifiant la valeur de K_M .

On peut décrire le processus enzymatique par 2 étapes successives :



- 1.2.1. Briggs et Haldane ont proposé l'hypothèse de l'état stationnaire. Préciser cette hypothèse.
1.2.2. Dans cette hypothèse, montrer que :

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad \text{avec } K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

- 1.2.3. Donner l'équation de Michaelis et Menten, en rappelant la définition des paramètres cinétiques.
1.2.4. Montrer graphiquement que cette équation permet de déterminer la valeur de K_M . Préciser son unité.
1.2.5. À quel type d'inhibiteur appartient le zanamivir ? Expliquer.

2. Les antibiotiques dans la lutte antibactérienne (26 points)

2.1. Production des antibiotiques.

La sélection de nouvelles souches sécrétrices de bêta-lactamines et la production de celles-ci par hémi synthèse ont permis d'améliorer considérablement leur stabilité biochimique et leurs propriétés pharmacologiques, tout en diminuant leurs effets secondaires.

- 2.1.1. Citer deux genres microbiens producteurs d'antibiotiques. Préciser à quels groupes d'êtres vivants ils appartiennent.
2.1.2. Écrire la structure de base d'une bêta-lactamine. Qu'appelle-t-on hémi synthèse ?
2.1.3. À quel type de métabolites appartiennent généralement les antibiotiques ? Justifier.
2.1.4. Représenter sur un même graphe l'allure générale des courbes de croissance de la souche et de production de l'antibiotique.
2.1.5. Sachant qu'une souche productrice est aérobic stricte, faire le schéma légendé d'un bioréacteur industriel « STR » (Stirred Tank Reactor) en indiquant les dispositifs d'agitation et d'aération.

2.2. Sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques.

Les mécanismes d'acquisition de résistance sont différents selon les souches et selon les antibiotiques. On peut citer :

- le rejet de l'antibiotique par un mécanisme nommé « efflux ».
- une modification, après mutation, de la cible de l'antibiotique empêchant ainsi sa fixation,
- l'imperméabilité des enveloppes bactériennes.

- 2.2.1. Quel est le quatrième mécanisme possible ? Illustrer la réponse dans le cas d'une bêta-lactamine.
2.2.2. Indiquer les caractéristiques du transport correspondant à l'efflux d'un antibiotique.
2.2.3. Préciser le mode d'action d'une bêta-lactamine.

3. Évolution des vaccins : vaccins génétiques (33 points)

3.1. Les différents types de vaccins

La vaccination est un élément fondamental de la lutte contre les agents infectieux.

Les vaccins classiques sont utilisés parfois depuis plus d'un siècle mais on s'efforce actuellement de préparer de nouveaux vaccins.

- 3.1.1. Définir les différentes catégories de vaccins classiques et donner, pour chacune d'elles, un exemple.
3.1.2. Citer quatre améliorations recherchées dans la mise au point des vaccins modernes.
3.1.3. Décrire trois exemples de stratégies utilisées pour l'élaboration de ces nouveaux vaccins.

3.2. Les vaccins génétiques

Parmi les méthodes nouvelles de vaccination, on envisage d'utiliser des « vaccins génétiques ». En effet, on a constaté que des cellules transfectées par un plasmide dans lequel on a incorporé le gène d'un antigène, pouvaient exprimer cet antigène à leur surface et provoquer une réponse immunitaire spécifique vis-à-vis de cet antigène.

La mise en évidence de la production d'antigènes par ces cellules peut être réalisée par *immunofluorescence*.

- 3.2.1. Présenter, à l'aide de schémas annotés, les étapes de cette détection par immunofluorescence indirecte. Mettre en parallèle une cellule exprimant l'antigène et une cellule ne l'exprimant pas. Justifier chacune des étapes.
3.2.2. Préciser quels sont les avantages de cette technique par rapport à l'immunofluorescence directe.

L'expérimentation des vaccins génétiques, chez l'animal, a montré qu'il était important que les plasmides contenant

le gène de l'antigène, pénètrent dans des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) : cet antigène est présenté aux lymphocytes T auxiliaires afin de permettre leur activation spécifique.

- 3.2.3. Présenter, à l'aide d'un schéma annoté, les molécules membranaires mises en jeu dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T auxiliaires par les CPA.
Préciser leurs rôles.

4. Recherche fondamentale sur le génome de l'agent du SRAS (Syndrome respiratoire aigu sévère) (29 points)

Des études sont menées pour rechercher les séquences nucléotidiques codant des motifs peptidiques impliqués dans la production d'anticorps.

Ces études comportent :

- la création d'une banque d'expression à l'aide d'une méthode très puissante : le « phage display » (utilisation de vecteur phagique d'exposition ou de présentation d'un motif peptidique en surface),
- le criblage de la banque,
- le séquençage des éléments criblés.

On utilise le phage lytique T₇ de *E.coli* (voir document en annexe).

4.1. Réalisation de la banque d'expression.

Elle est effectuée selon les étapes suivantes :

- extraction des ARN totaux d'un isolat de cellules humaines infectées par l'agent responsable du SRAS,
- purification des ARN messagers,
- synthèse de molécules d'ADNc méthylées en utilisant un mélange d'amorces hexanucléotidiques,
- ligature d'un adaptateur contenant un site de restriction à chaque extrémité des molécules d'ADNc,
- recombinaison in vitro de l'ADNc avec le génome du phage T₇,
- infection d' *E.coli* par le phage recombiné pour amplification.

4.1.1. Expliquer à l'aide de schémas la synthèse d'ADNc. Justifier l'utilisation d'un mélange d'hexanucléotides amorces de séquences variables.

4.1.2. Pour utiliser le phage recombiné comme vecteur d'expression, quels sont les sites de restriction contenus dans les adaptateurs de l'ADNc ? Justifier la réponse.

4.1.3. La protéine de fusion exprimée est une protéine chimère.
Indiquer les deux parties qui la constituent et préciser leur orientation.
Comment doit-on réaliser la construction afin d'orienter convenablement le fragment d'ADNc et d'exprimer la protéine chimère ?

4.2. Purification des virions exprimant les antigènes du SRAS.

Elle s'effectue grâce à la rétention des virions libérés dans le milieu de culture, par des anticorps polyclonaux fixés sur une phase stationnaire. Ces anticorps polyclonaux sont extraits de sérum d'individus déjà infectés par le virus du SRAS.

Citer le nom de cette méthode de séparation.

Expliquer, à l'aide d'un schéma, son principe dans le cas de la méthode du « phage display ».

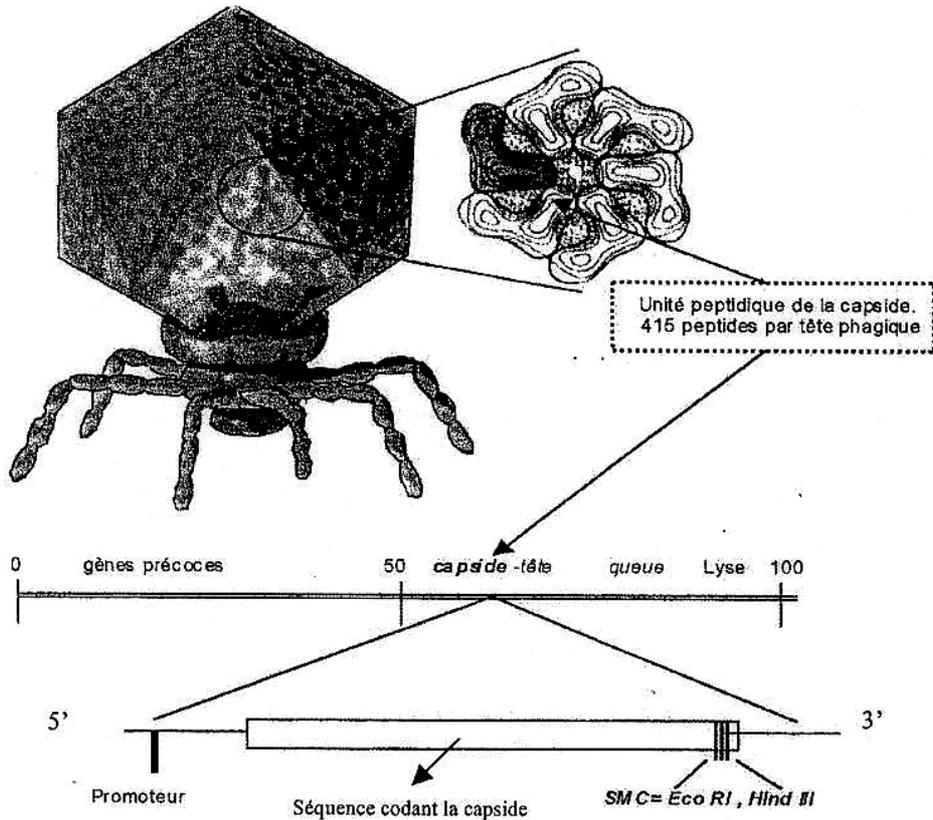
4.3. Séquençage.

Un criblage permet d'obtenir une collection de virions recombinés et d'envisager le séquençage des ADNc clonés. Le séquençage, réalisé en thermocycleur, utilise des didésoxynucléotides triphosphates fluorescents, la Taq polymérase et une amorce unique.

4.3.1. Indiquer le rôle des constituants du mélange réactionnel cité ci-dessus.

4.3.2. Comment sont analysés les produits de la réaction pour permettre le séquençage ?

DOCUMENT : structure et génome du phage T₇ utilisé dans la méthode du « phage display »

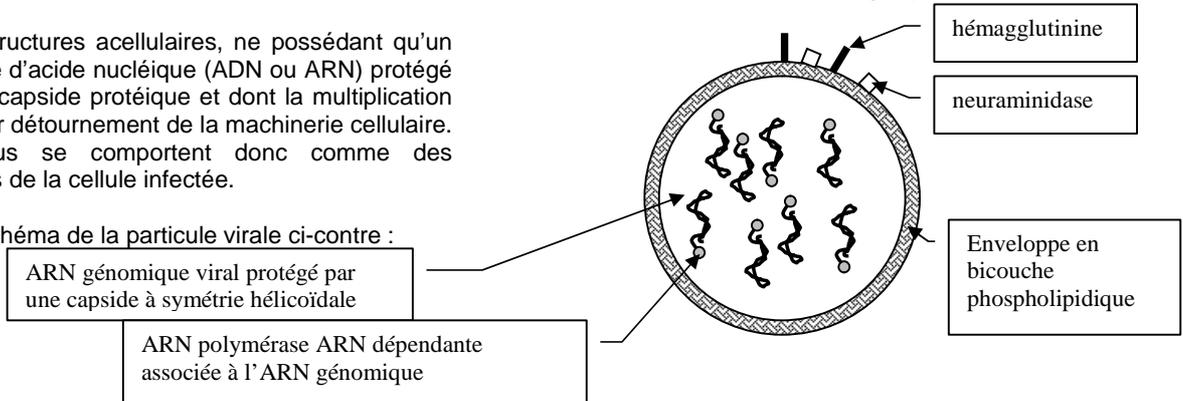


PROPOSITION DE CORRIGÉ

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

1.1.1. Structures acellulaires, ne possédant qu'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN) protégé par une capsid protéique et dont la multiplication a lieu par détournement de la machinerie cellulaire. Les virus se comportent donc comme des parasites de la cellule infectée.

1.1.2. Schéma de la particule virale ci-contre :



1.1.3. Nature de l'acide nucléique et sa structure mono ou bicaténaire ; symétrie de la nucléocapsid, présence ou non d'une enveloppe.

1.1.4. Adhésion, pénétration, décapsidation. Transcription, expression des gènes codant les protéines précoces, réplication de l'ARN génomique, expression des gènes codant les protéines tardives. Morphogenèse (assemblage viral) et libération des virions néoformés.

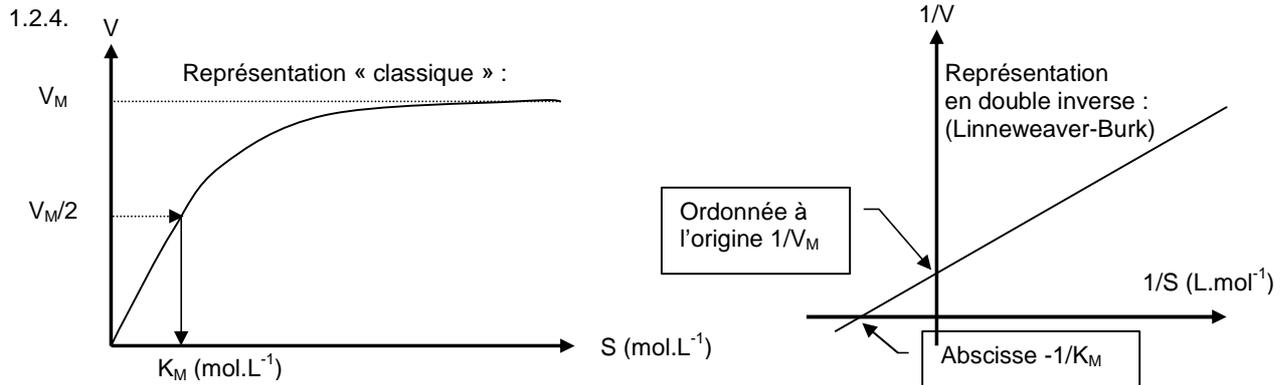
1.2.1. En début de réaction (conditions de vitesse initiale), la concentration du complexe E-S est constante.

1.2.2. La vitesse de formation du complexe E-S peut être écrite : $[E-S] = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$
 et sa vitesse de destruction est $[E-S] = (k_{-1} + k_{cat}) \cdot [ES]$

Il y a donc égalité d'après la question 12., $k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_{-1} + k_{cat}) \cdot [ES]$ donc $[ES] = [E] \cdot [S] / K_M$ avec $K_M = (k_{-1} + k_{cat}) / k_1$
 1.2.3. $V_i = V_M \cdot [S] / (K_M + [S])$

V_M (ou k_{cat}) : c'est la vitesse initiale pendant la phase stationnaire, si le substrat est en concentration saturante.

K_M : c'est la constante de dissociation, inverse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. C'est la concentration en substrat pour laquelle $V = V_M / 2$.

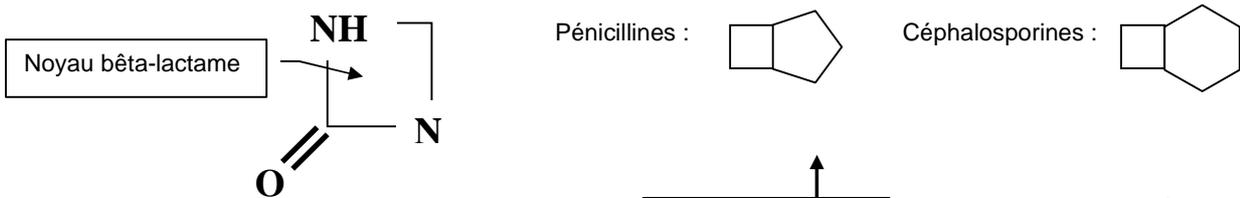


1.2.5. Augmentation du K_M donc diminution de l'affinité. Le zanamivir est un analogue structural du substrat, c'est donc un inhibiteur compétitif.

2.1.1. Moisissures (appartenant aux Micromycètes avec les levures, règne des Mycètes), par exemple *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Acremonium* *Aspergillus* ...

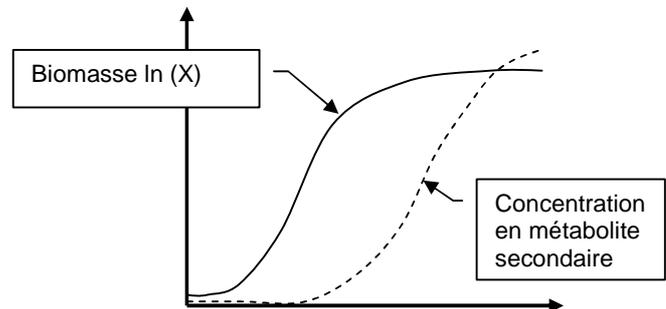
Bactéries (appartenant aux Eubactéries, règne des Procaryotes), par exemple *Streptomyces*, *Nocardia* ...

2.1.2.

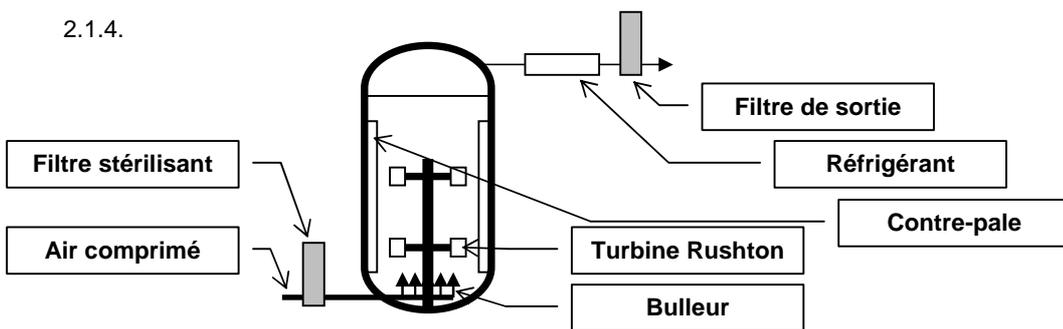


Hémi synthèse : fabrication naturelle d'un squelette moléculaire ensuite modifié par voie chimique ou biochimique.

2.1.3. Métabolites secondaires, produits en fin de phase exponentielle et pendant la phase stationnaire. Cf graphe ci-contre :



2.1.4.



2.2.1. Inactivation enzymatique par enzyme de résistance à l'antibiotique. Exemple de la bêta-lactamine : ouverture du cycle bêta-lactame par une bêta-lactamase (voir flèche sur la figure de la réponse à la question 2.1.2.).

2.2.2. Transport actif (nécessitant de l'énergie) puisque à l'encontre du gradient de concentration en antibiotique (concentration dans le milieu supérieure à celle du cytoplasme). Intervention d'un transporteur spécifique.

2.2.3. Les bêta-lactamines sont des analogues structuraux d'un oligopeptide substrat d'une transpeptidase lors de la fabrication du peptidoglycane, dont la synthèse est alors interrompue.

3.1.1. Anatoxines : toxines inactivées par traitement chimique ou physique, n'ont plus de pouvoir toxique mais sont encore immunogènes, ex : vaccin antitétanique.

Microorganismes tués ou inactivés : ne sont plus pathogènes mais encore immunogènes, ex : vaccin contre la poliomyélite.

Microorganismes vivants atténués : pouvoir pathogène naturel faible ou atténué (par exemple, par de nombreux repiquages) ex : BCG.

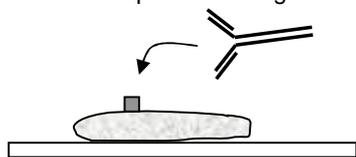
3.1.2. Vaccins moins dangereux (absence ou restauration impossible du pouvoir pathogène) ; pas de réactions secondaires (grande pureté donc pas de sensibilisation) ; plus stables et plus efficaces ; moins coûteux ; voies d'administration plus variées.

3.1.3. Utilisation d'antigènes purifiés au lieu de l'agent pathogène complet ; modification de l'agent infectieux (élimination des gènes responsables de la pathogénicité) ; utilisation d'anticorps anti-idiotypes ; transformation d'une souche bactérienne non pathogène ; vaccins à ADN nu portant le gène d'une protéine immunogène

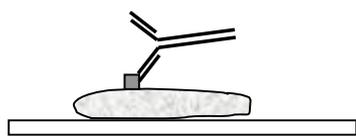
3.2.1. ① : Dépôt des cellules portant l'antigène sur une lame. ② : Incubation permettant la fixation de l'anticorps primaire spécifique de l'antigène porté par la cellule ③ : lavage pour éliminer les anticorps primaires non fixés ④ : addition de l'anticorps secondaire fluorescent spécifique de l'espèce chez qui l'on a produit l'anticorps primaire, puis incubation ⑤ : lavage ⑥ : observation de la lame au microscope à fluorescence

Cas d'une cellule exprimant l'antigène :

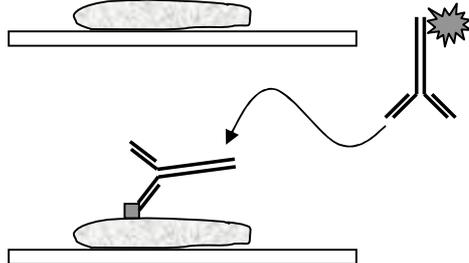
① et ②



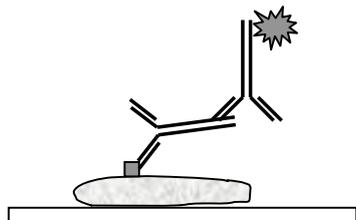
③



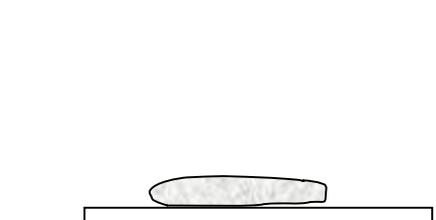
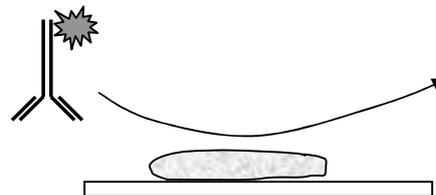
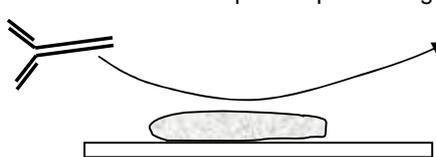
④



⑤ et ⑥



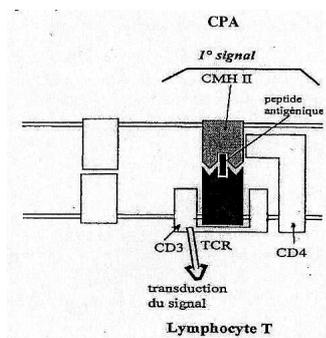
Cas d'une cellule ne portant pas d'antigène :



3.2.2. Diminution du seuil de détection par amplification du signal. Economie financière car un même anticorps secondaire peut servir à plusieurs recherches utilisant des anticorps primaires différents à condition qu'ils aient été produits chez la même espèce.

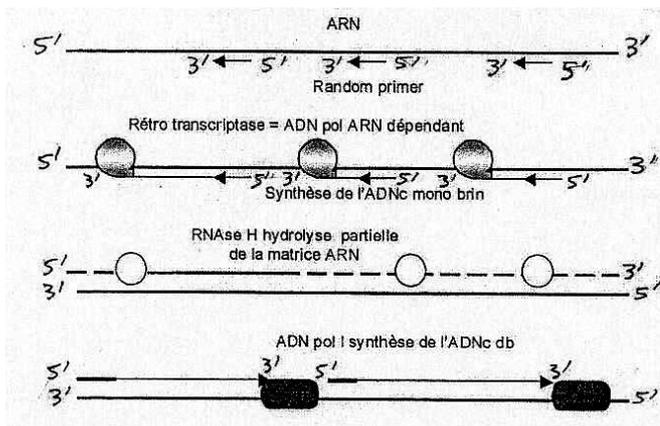
3.2.3. Rôles :

- le récepteur du lymphocyte T (TCR) interagit avec l'antigène et la molécule du CMH II
- la protéine CD4 réagit avec la molécule du CMH II, : le complexe ainsi formé est plus stable et permet des signaux d'activation
- la protéine CD3, associée au TCR permet la transduction du signal dans le cytoplasme du lymphocyte



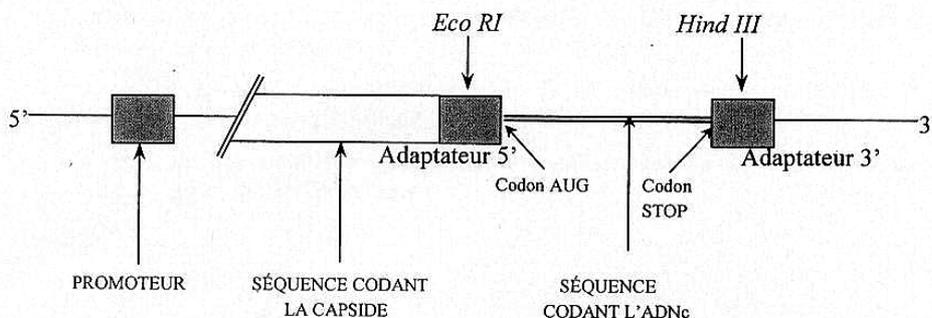
4.1.1. On utilise un mélange d'amorces hexanucléotidiques : toutes les amorces correspondant aux différentes combinaisons permettent des hybridations avec toutes les molécules d'ARN_m. La banque ainsi constituée contient donc les molécules d'ADNc correspondant à toutes les molécules d'ARN_m présentes.

- ① : hybridation des amorces avec le brin matrice et élongation
- ② : rétrotranscription par la RT (reverse transcriptase)
- ③ : disparition de l'ARN_m matrice
- ④ : amorçage (utilisation d'une ancre, hydrolyse ménagée par la RNase H ...)
- ⑤ : synthèse de l'ADN double brin par l'ADN polymérase

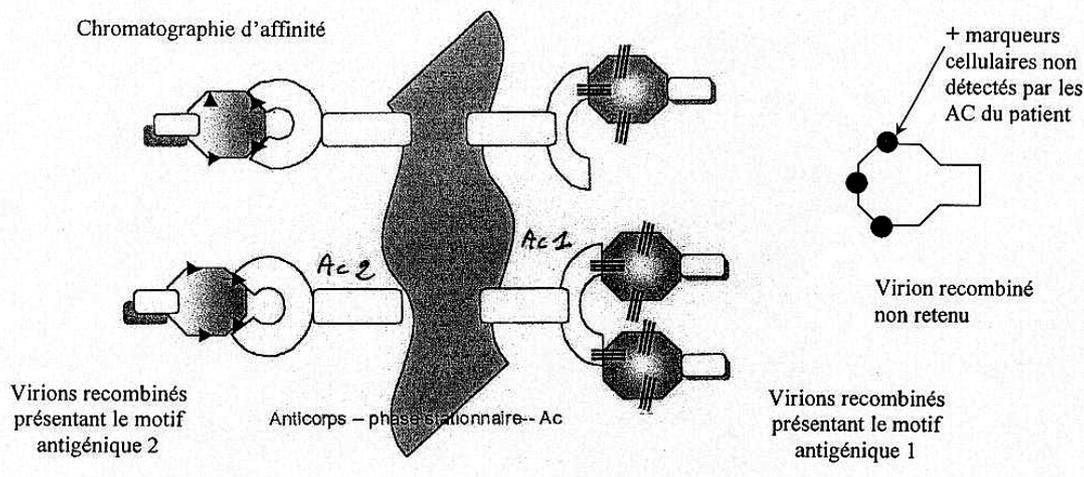


4.1.2. Les adaptateurs ont des sites EcoRI ou Hind III car ils sont présents dans le site multiple de clonage.

4.1.3. Le peptide codé par l'ADNc est du côté C-terminal, la protéine de capsid du côté N-terminal.



4.2. C'est de la chromatographie d'affinité puisque les virions exprimant les antigènes recherchés sont retenus par la colonne grâce aux anticorps (issus des patients infectés) qui reconnaissent ces antigènes. Les autres virions sont exclus de la colonne, cette méthode est spécifique.



4.3.1. Les 4 ddNTP sont marqués par 4 fluorophores différents. Ils arrêtent la progression de la Taq polymérase qui assure l'amplification. Une amorce unique permet le séquençage d'un seul brin.

4.3.2. On obtient des fragments de longueur variable donc séparables par électrophorèse en gel de polyacrylamide à haute résolution, ils sont fluorescents dont détectables par un faisceau laser pendant leur migration. Il existe une relation entre la taille du fragment amplifié et la position de la base sur la séquence.

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

1^{ère} partie : ÉTUDE DE PROJET

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

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

Matériel nécessaire : une feuille de papier millimétré.

Production de l'antibiotique spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*

Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses du sol appartenant au groupe des Actinomycètes. Ces micro-organismes sont à Gram positif, immobiles et aéro-anaérobies facultatifs. Ils ont un très grand intérêt industriel, puisqu'ils produisent environ 60 % des antibiotiques utilisés en thérapeutique ainsi qu'un certain nombre de métabolites comme des vitamines, des enzymes et des inhibiteurs d'enzymes.

L'espèce *Streptomyces ambofaciens* a été sélectionnée pour sa production de spiramycine, antibiotique macrolide, utilisé dans le traitement des infections O.R.L..

La formule développée de la spiramycine est représentée dans le **document 1**. La molécule de spiramycine est constituée d'un cycle lactonique sur lequel sont greffés des résidus glucidiques.

1. Conditions de culture et de production de l'antibiotique (11 points)

La spiramycine est produite industriellement depuis plus de vingt ans. Le milieu de production est un milieu liquide complexe, utilisant quelques sous-produits de l'industrie agroalimentaire. Sa composition est détaillée dans le **document 2**. Dans ce milieu, *Streptomyces ambofaciens* forme soit un mycélium dense si les filaments restent libres, soit des pelotes dans le cas contraire.

1.1. Constituants du milieu de production

Analyser la composition de ce milieu en donnant le ou les intérêts des différents constituants.

1.2. Agitation en fermenteur

La production industrielle de spiramycine est réalisée en « batch » dans des fermenteurs de plusieurs dizaines de m³. Une agitation forte du milieu de fermentation de *Streptomyces ambofaciens* est essentielle pour obtenir une concentration en dioxygène dissous suffisante pour la croissance et la production de l'antibiotique.

Le schéma du **document 3** présente deux types de mobiles d'agitation. Ces deux types se différencient, en plus de leur forme, par le régime d'écoulement du milieu de culture qu'ils imposent lors de leur rotation.

- 1.2.1. D'après le **document 3**, présenter dans un tableau les avantages et les inconvénients des deux types de mobiles d'agitation : A et B
- 1.2.2. Annoter le schéma du **document 3bis** (page 7/13) et le rendre avec la copie.
- 1.2.3. Quel type de mobile d'agitation doit-on choisir pour agiter un milieu de fermentation de *Streptomyces* ? Pourquoi ?

2. Métabolisme lipidique en relation avec la production de spiramycine (22 points)

La spiramycine comme la plupart des macrolides est synthétisée en deux étapes. La première étape comprend la synthèse du cycle lactonique ou partie aglycone. La deuxième étape fixe les résidus glucidiques sur ce cycle lactonique.

La synthèse du cycle lactonique passe par l'intervention d'un complexe enzymatique appelé polykétide synthase (polycétone synthase). Ce complexe enzymatique utilise des acides gras comme précurseurs de la partie aglycone de la spiramycine. Le processus d'élongation du cycle lactonique à partir d'un résidu activé d'acide gras possède de nombreuses similitudes avec celui de la synthèse des acides gras à longues chaînes. Les équipes de recherche ont essayé de mettre en relation la consommation de nutriments lipidiques contenus dans le milieu de production et la synthèse de spiramycine.

A partir d'une fermentation type en bioréacteur de 2 L, on a suivi l'évolution de quelques paramètres : la biomasse (**X**) en g.L⁻¹, l'amidon (**S_A**), les lipides totaux (**S_L**) et la spiramycine (**P**), en fonction du temps **t**.

Le **document 4** rapporte l'évolution de ces concentrations ainsi que les vitesses spécifiques correspondantes : Q_{SA} , Q_{SL} , Q_P .

- 2.1. Tracer la courbe $\ln(X) = f(t)$. Déterminer la durée de la phase exponentielle, déterminer le temps de génération **G** et la vitesse spécifique de croissance pendant la phase exponentielle $Q_{x,expo}$.
- 2.2. Tracer $P = f(t)$ sur le même graphique. En déduire le type de métabolite produit par la bactérie. Justifier la réponse.

Le **document 5** représente l'évolution en fonction du temps de la concentration des substrats glucidique et lipidique d'une part, et de la concentration des activités amylasique et lipolytique d'autre part.

- 2.3. Analyser les courbes de consommation des substrats étudiés en utilisant en parallèle les données du **document 2** et la courbe de croissance tracée précédemment.
Comparer les courbes montrant la consommation des substrats et l'évolution des concentrations d'activité enzymatique au cours des 72 premières heures de culture. Conclure.
- 2.4. Proposer une explication au troisième pic d'activité lipolytique.
- 2.5. Discuter la relation potentielle entre le substrat lipidique et la production de spiramycine

3. Dosage de la spiramycine par HPLC et par méthode immuno-enzymatique (20 points)

La spiramycine peut être dosée par différentes méthodes : spectrophotométrique, microbiologique, immuno-enzymatique et par HPLC.

3.1. Dosage par HPLC

Le **document 6** rapporte le protocole de dosage et un chromatogramme obtenu lors de la séparation des trois formes de spiramycine d'un échantillon de surnageant de culture. La colonne utilisée est une colonne en phase inverse.

À l'aide des **documents 1 et 6**, justifier l'ordre de séparation des trois formes de spiramycine sur ce type de colonne.

3.2. Dosage immuno-enzymatique

Le **document 7** présente le protocole de dosage de la spiramycine par méthode immuno-enzymatique.

- 3.2.1. Discuter du caractère immunogène de la spiramycine.
- 3.2.2. Les différentes étapes de ce dosage sont présentées dans le **document 7** ; les schématiser et préciser leurs rôles en complétant ce **document (à rendre avec la copie)**.
- 3.2.3. Quel type de technique ELISA est employée dans ce dosage ?
- 3.2.4. Le **document 8** présente les résultats d'un dosage de la spiramycine par la technique ELISA
- 3.2.5. Commenter la courbe obtenue, puis déterminer la concentration en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de spiramycine produite par la souche de *Streptomyces*, sachant que l'absorbance de l'échantillon est de 0,352. Après avoir comparé ce résultat avec la concentration de spiramycine obtenue au temps $t=190$ h (**document 4**), en déduire la dilution initiale effectuée sur l'échantillon.

4. Construction d'un vecteur de clonage spécifique de *Streptomyces ambofaciens* (27 points)

L'amélioration de la production d'antibiotiques passe obligatoirement aujourd'hui par la manipulation génétique des souches. Un des outils génétiques est l'utilisation de vecteurs d'insertion des fragments d'ADN dans la cellule bactérienne. Certaines équipes recherchent des vecteurs phagiques spécifiques des *Streptomyces*. Pour cela, il est nécessaire de mettre en évidence l'existence de ces ADN phagiques soit sous forme intégrée dans le chromosome bactérien, soit sous forme plasmidique, extra chromosomique, comme le plasmide pSAM.

4.1. Analyse de l'ADN des souches de *Streptomyces*

Le génome de quatre souches de *Streptomyces ambofaciens* provenant d'origines géographiques différentes est analysé par PFGE (électrophorèse en gel pulsé). On cherche à démontrer la présence du plasmide phagique pSAM (80 Kpb) sous forme extra chromosomique. On estime la taille de l'ADN génomique des *Streptomyces* entre 6000 et 8000 Kpb.

Les caractéristiques des quatre souches testées sont consignées dans le tableau du **document 9**. Les souches A et B servent respectivement de témoin positif et de témoin négatif.

On effectue une extraction douce de l'ADN des différentes souches (limite les cassures) puis les extraits sont analysés.

Le gel est révélé au bromure d'éthidium (BET). La photographie du gel correspond à la **figure 1 du document 10**.

- 4.1.1. Analyser la photographie du gel présenté en **figure 1 du document 10** et indiquer la nature des bandes obtenues.
- 4.1.2. Les résultats pour les pistes A et B sont-ils compatibles avec les données du **document 9** ?
- 4.1.3. À l'aide des **documents 10 et 11**, justifier l'utilisation de l'ADN du phage lambda comme marqueur de taille pour des fragments de taille inférieure à 1 000 kb.

4.2. Mise en évidence du plasmide pSAM : forme intégrée ou forme extra-chromosomique

On réalise sur le plasmide pSAM un marquage à chaud par déplacement de coupure (Nick Translation).

À partir du gel on réalise un transfert sur membrane de nitrocellulose et une hybridation avec la sonde préparée à partir de pSAM. Le résultat est présenté dans le **document 10, figure 2**.

- 4.2.1. Quel est le nom de la technique utilisée ?
- 4.2.2. Peut-on valider les résultats de l'expérience à la lecture des pistes témoins A et B ? Justifier.
- 4.2.3. Conclure quant à la présence du plasmide pSAM dans les souches tests C et D.

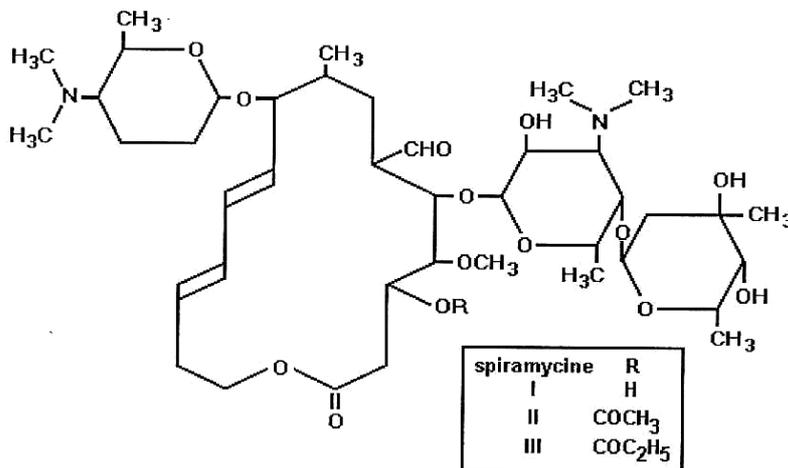
4.3. Construction d'un vecteur de transformation

La souche test A possède le plasmide pSAM sous forme libre et intégrée. Le plasmide pSAM s'intègre dans le chromosome par un mécanisme d'intégration site spécifique. La recombinaison a lieu entre deux séquences identiques de 58 bp présentes sur le plasmide (attP) et sur le chromosome (attB). Le vecteur pKC67, fabriqué à partir de pSAM, est détaillé dans le **document 12**.

- 4.3.1. Expliquer la construction du plasmide pKC67.
- 4.3.2. Quel est l'intérêt de l'utilisation de deux enzymes de restriction différentes lors d'un clonage ?
- 4.3.3. Expliquer le rôle du gène Am^R et du MCS.
- 4.3.4. Il a été démontré que ces vecteurs, une fois intégrés, sont d'une très grande stabilité même en l'absence de pression de sélection. Expliquer l'avantage de ce système dans les bio-productions industrielles.

DOCUMENT 1

Formule développée de la spiramycine, avec ses trois formes possibles



DOCUMENT 2

Composition du milieu de production pour *Streptomyces ambofaciens*

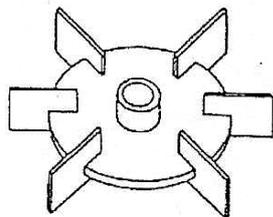
Corn steep*	20,0 g.L ⁻¹
Amidon soluble	50,0 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2,8 g.L ⁻¹
Fe SO ₄	0,5 g.L ⁻¹
NaCl	10,0 g.L ⁻¹
pH ajusté à 7,7	
Huile de maïs	20,0 g.L ⁻¹

*Résidu de la transformation industrielle du maïs

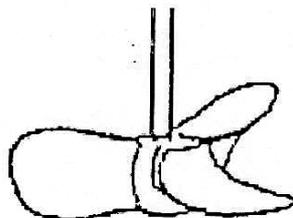
DOCUMENT 3

"Most of mixers used in stirred reactors have either a radial-flow, axial-flow or a combined flow pattern. Radial-flow impellers (like Rushton impeller) generate high shear potentially detrimental to some microbial cultures and animal cell cultures. This type of impellers can provide efficient but localized high gas-liquid mass transfer. Axial flow impellers in contrast generate less shear and can provide efficient gas-liquid-solid distribution (good bulk mixing) but relatively poor gas-liquid mass transfer."

Schéma des deux mobiles d'agitation A et B



A



B

DOCUMENT 4

Evolution des concentrations des différents paramètres de la fermentation étudiés ainsi que les vitesses spécifiques correspondantes Q_{SA} , Q_{SL} , Q_P

Temps (heure)	X (g.L ⁻¹)	S _A (g.L ⁻¹)	S _L (g.L ⁻¹)	P (mg.L ⁻¹)	Q _{SA} (h ⁻¹)	Q _{SL} (h ⁻¹)	Q _P (h ⁻¹)
0	3,05	47,64	20	0	0	0,124	0
6	3,2	47,1	15,8	0	0	0,085	0
12	4,35	45,92	15	0	0,086	0,038	0
17	6,15	41,4	14,9	0	0,118	0,012	0
24	8,8	16,2	14,6	0	0,113	0,005	0,007
36	15,15	4,9	12,3	9,9	0,067	0,013	0,261
52	18	3,12	3,35	94,5	0,016	0,013	0,346
66	18,2	2,6	1,8	156	0	0,009	0,236
72	18,2	2,35	1,2	182	0	0,005	0,120
88	18,2	2,18	0,7	227	0,003	0,002	0,083
100	18,2	1,9	0,4	255	0,001	0,000	0,150
114	16,9	1,8	0	280	0,001	0,000	0,189
138	14	1,65	0	297	0,001	0,000	0,176
144	13,3	1,5	0	298	0,001	0,000	0,142
162	11,5	1,23	0	306	0	0,000	0,065
190	10	3,66	0	300	0	0,000	0

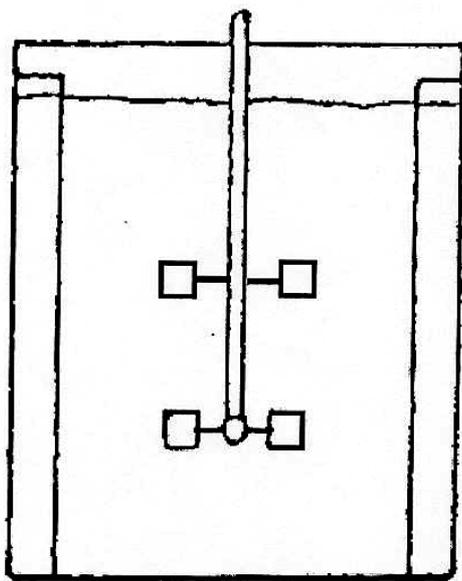
**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE
ÉPREUVE : ÉTUDE DE PROJET**

Durée : 4 h
Coefficient : 4

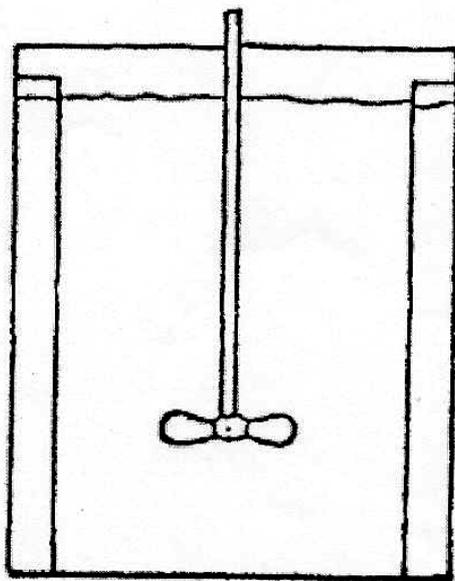
Session 2005

DOCUMENT 3bis À ANNOTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

Indiquer sur le schéma les deux régimes d'écoulement du milieu de culture. Les schémas A' et B' correspondent respectivement aux mobiles d'agitation A et B, du schéma 1 du document 3.

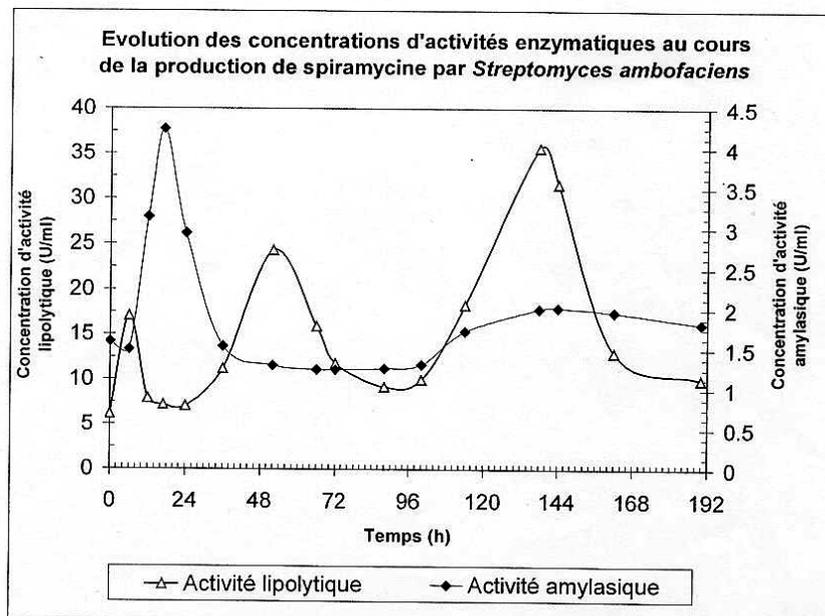
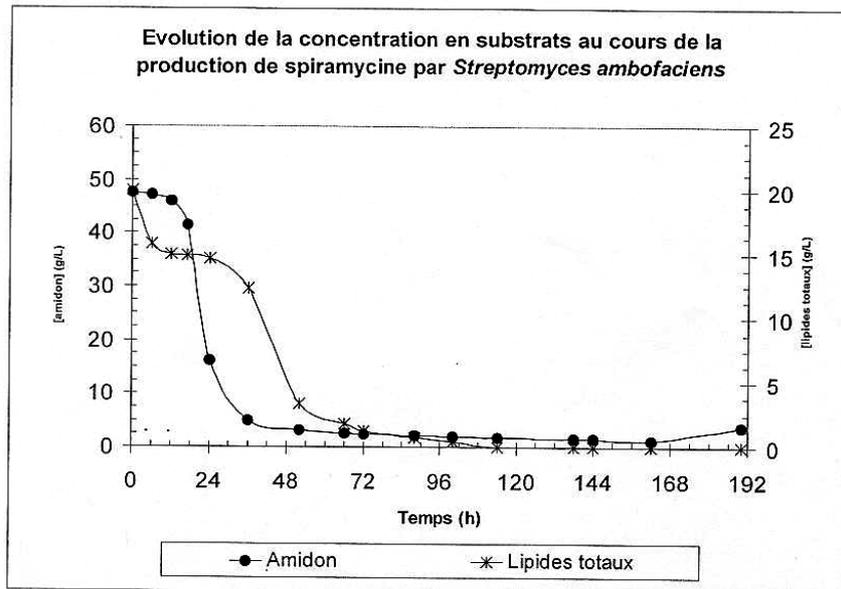


A'



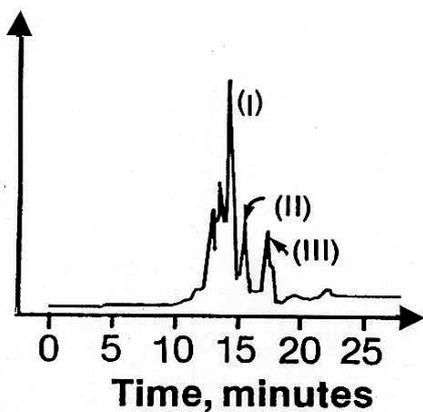
B'

DOCUMENT 5



DOCUMENT 6

Chromatogramme de la séparation des trois formes de spiramycine par HPLC



Methanol or alkaline ethyl extracts of the culture broths were used to assay antibiotic activity and for analysis of products by high pressure liquid chromatography (HPLC). For spiramycin platenolide, analytical HPLC was performed with a Waters C18- μ Bondapak reverse column (3.9 by 300 mm) using various solvent systems and operated at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. A gradient system of 30 to 70% acetonitrile-sodium perchlorate (0.01 M ; pH 4.0 ; 23 min) was used for separation of spiramycin and its analogs. The effluent was monitored at 232 nm.

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE
ÉPREUVE : ÉTUDE DE PROJET**

Durée : 4 h
Coefficient : 4

Session 2005

DOCUMENT 7 À RENDRE AVEC LA COPIE

Légende à utiliser pour les schémas



AC



Ag



Support

Protocole expérimental	Rôles des différentes étapes	Schémas des différentes étapes
<ul style="list-style-type: none"> Placer 200 µL de AC dans les cupules de la microplaque Incuber 3 heures à 37°C Vider et laver avec du tampon PBS 		
<ul style="list-style-type: none"> Distribuer 250 µL de SAB à 2 % dans chaque cupule Placer 24 h à 4°C 		
<ul style="list-style-type: none"> Vider et rincer 3 fois avec du tampon PBS-Tween Laver avec du tampon PBS Ajouter 100 µL de A Incuber 1 heure puis laver 3 fois au PBS-Tween, puis rincer au PBS Ajouter 100 µL de AC* Agiter et incuber 1 heure à 37°C 		
<ul style="list-style-type: none"> Laver et rincer 3 fois au PBS-Tween, puis rincer au PBS Ajouter 150 µL de S Incuber 15 min à 37°C Addition de 50 µL de NaOH à 1 mol.L⁻¹ 		

A = spiramycine = Ag

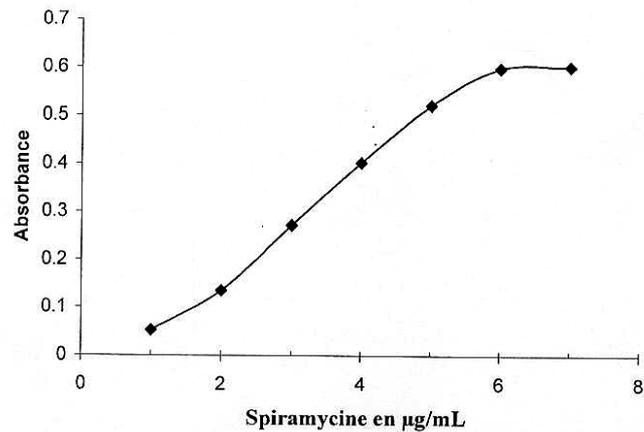
SAB = serum albumine bovine

S = substrat de la phosphatase alcaline

AC = anticorps anti-spiramycine

AC* = anticorps anti-spiramycine marqué à la phosphatase alcaline

Dosage immunoenzymatique de la spiramycine

DOCUMENT 9 Caractéristiques des quatre souches de *Streptomyces ambofaciens* testées génétiquement

Strains of <i>Streptomyces ambofaciens</i>			
Stock designation	Strain	pSAM extra chromosomal form	pSAM integrated form
A	<i>S. ambofaciens</i> ATCC15154	+	+
B	<i>S. ambofaciens</i> DSM40697	—	—
C	<i>S. ambofaciens</i> ETH9427	No published data	
D	<i>S. ambofaciens</i> ETH11317	No published data	

ATCC, American Type Culture Collection ; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen ; +/- Detection of plasmid DNA.

DOCUMENT 10

Analyse ADN par PFGE

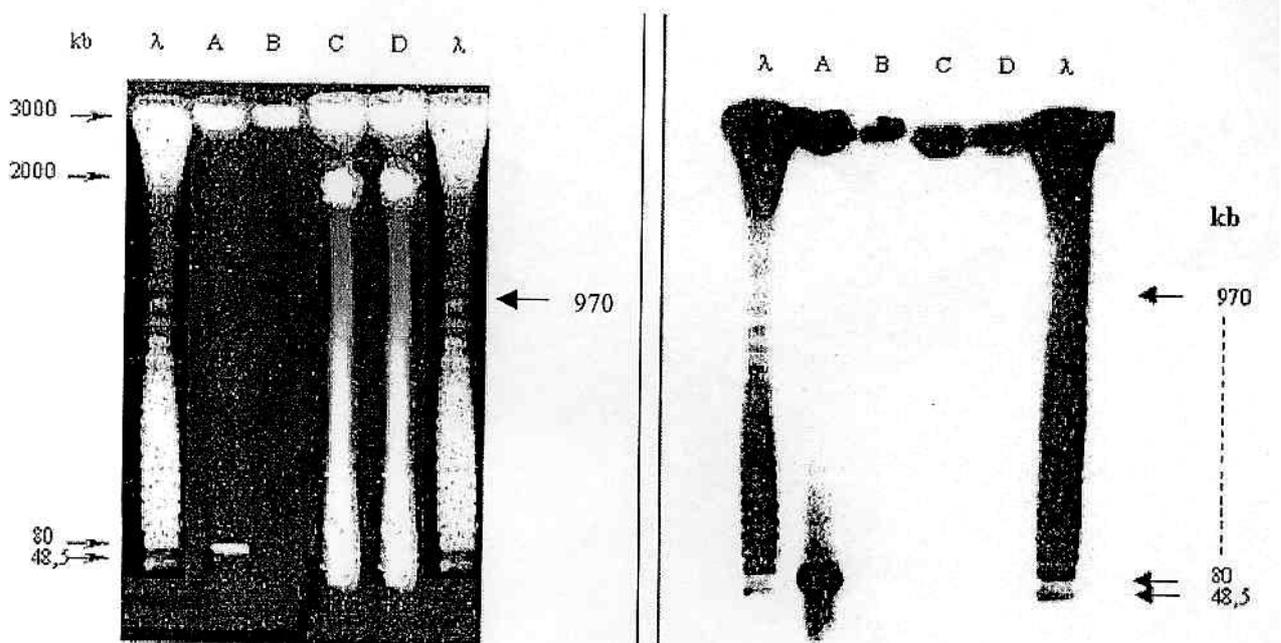


Figure 1

Figure 2

Figure 1

PFGE analysis of undigest DNA of *Streptomyces ambofaciens* strains after growth at 37°C for 8 h.
 Lanes : λ , concatemers of λ DNA used as size standard, A, strain A ; B, strain B ; C, strain C ; D, strain D ;
 Running conditions were 180V for 24 h with ramped pulse time from 60 s to 120 s.

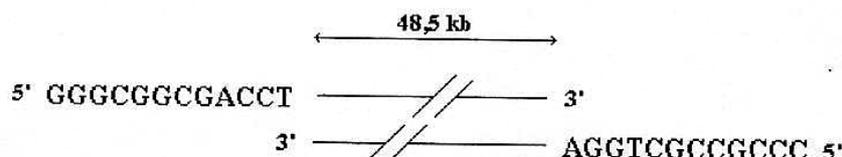
Figure 2

Hybridation of ^{32}P -labelled pSAM DNA with PFGE pattern of undigest DNA of *S. ambofaciens* strains.
 Lanes λ , hybridation of ^{32}P -labelled λ DNA with concatemers of λ DNA ; A, strain A ; B, strain B ; C, strain C ; D, strain D ;

DOCUMENT 11

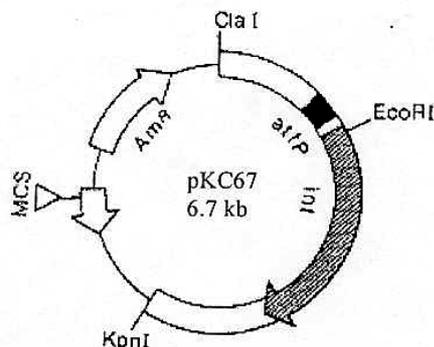
Séquence des extrémités de l'ADN du phage lambda

Concatemers of bacteriophage lambda provided a convenient marker up to 1000 kb.



DOCUMENT 12

Plasmid pKC67 was constructed by cloning a *Cla* I – *Kpn* I fragment from pSAM into *Cla* I + *Kpn* I – cut pKC34 (a pUC-based vector).
 Thin line indicate DNA derived from pKC34. Open boxes indicate pSAM DNA.
 Blackened box indicates plasmid/phage attachment site. Hatched box represents the integrate location, and the arrowheads indicate the direction of transcription.



PROPOSITION DE CORRIGÉ

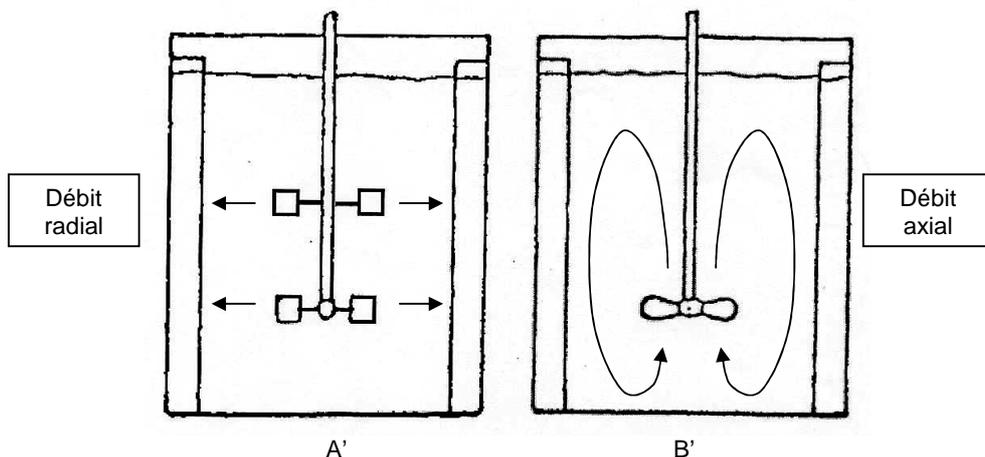
Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

- 1.1. Corn steep : source de N organique (acides aminés), de C et nutriment énergétique (glucides)
 Amidon soluble : nutriment énergétique
 (NH₄)₂SO₄ : source de N minéral
 KH₂PO₄ : participe au tamponnement du milieu (pouvoir limité) et source de P
 Fe SO₄ : source de Fe (coenzyme), oligoélément
 NaCl : permet d'obtenir un milieu isotonique, source de Na⁺ également
 Huile de maïs : apporte les substrats lipidiques (triglycérides nutriments énergétiques et source de C)

1.2.1.

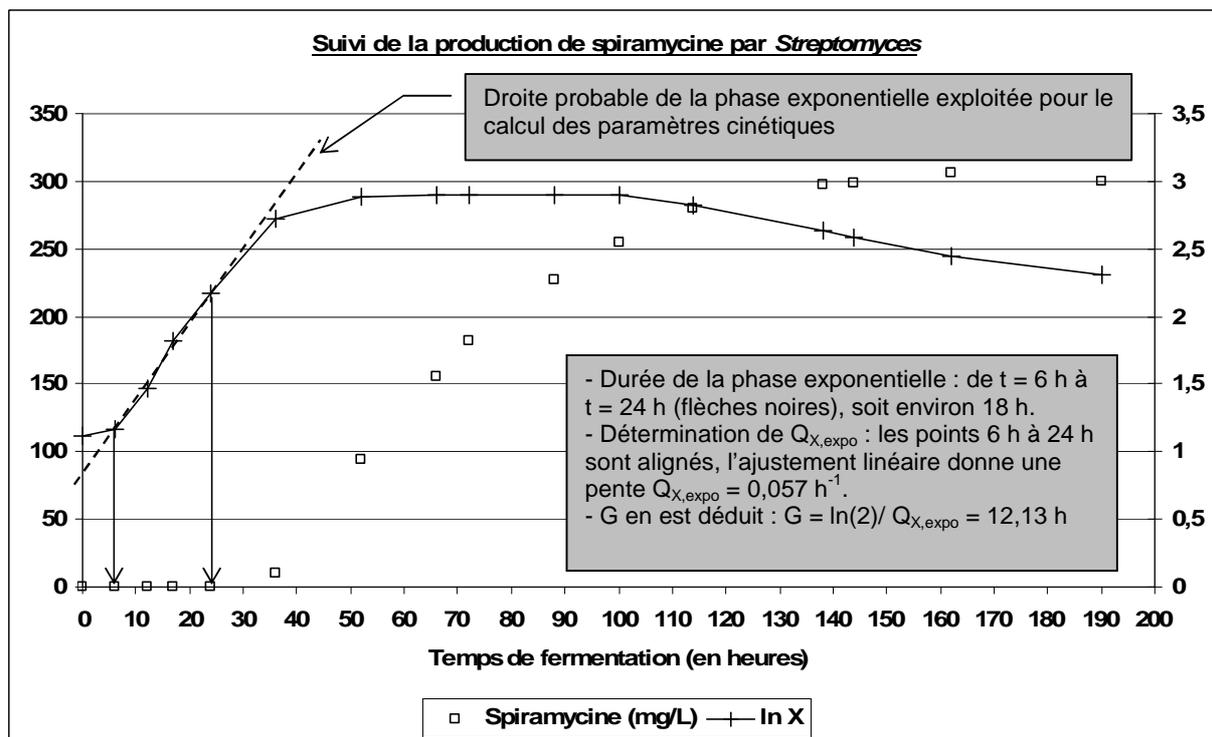
Mobile	Avantages	Inconvénients
A	Utilisation à vitesse élevée et grande efficacité (bon K_La pour l'oxygénation, faible temps de mélange, bonne homogénéisation de la culture et donc des paramètres physico-chimiques (T, pH, concentrations en substrats).	Cisaillement important, donc inadapté aux cellules fragiles (cellules animales, certaines microalgues filamenteuses, certains protozoaires). La répartition du dioxygène n'est pas toujours optimale.
B	Cisaillement faible (formes arrondies, utilisation à faible vitesse d'agitation), bien adapté aux cultures de cellules animales. Meilleure répartition du dioxygène.	Faible K_La mais suffisant pour les cellules animales

1.2.2.



1.2.3. Culture dense de *Streptomyces* (bactérie filamenteuse) donc forte demande en dioxygène dissoute satisfaite par le mobile A car K_La élevé.

2.1.



2.2. La production de la spiramycine a lieu en fin de phase exponentielle et pendant la phase stationnaire, donc c'est un métabolite secondaire.

2.3. Pendant la phase d'accélération (de t = 0 à t = 6 h) : d'après les variations de leurs concentrations et les valeurs des vitesses spécifiques, il y a consommation importante des lipides (1^{er} pic d'activité lipolytique sur le document 5) et faible de l'amidon (activité amylasique à son niveau basal).

Phases exponentielle et de ralentissement (de t = 6 h à t = 48 h) : forte utilisation de l'amidon et faible des lipides, puisque la concentration en amidon diminue très fortement (pic d'activité amylasique sur le document 5) et celle des lipides ne varie que très peu.

Phase stationnaire : utilisation des lipides résiduels (chute de leur concentration et 2^{ème} pic d'activité lipolytique sur le document 5) pour la synthèse de la spiramycine, l'amidon est quasiment épuisé et l'activité amylasique ramenée à son niveau basal.

2.4. Le 3^{ème} pic d'activité lipolytique (après t = 96 h) sur le document 5 peut correspondre aux enzymes libérées dans le milieu par les cellules entrées en phase de lyse (visible au-delà de t = 100 h sur la courbe de croissance).

2.5. Pendant les phases de croissance, les lipides de l'huile sont hydrolysés par les lipases pour fournir les AG en grande quantité nécessaires à la synthèse de la spiramycine pendant la phase stationnaire.

3.1. La colonne est une phase inverse hydrophobe (C18) la séparation des molécules a lieu selon leur caractère hydrophobe : les molécules les plus hydrophobes sont retenues dans la colonne et éluées en dernier. Les 3 formes peuvent être classées par hydrophobicité croissante : H (forme I) < COCH3 (forme II) < CoC2H5 (forme III). La forme I est effectivement éluée en premier comme le montre le document 6.

3.2.1. La spiramycine est un haptène, petite molécule non immunogène.

3.2.2.

Protocole expérimental	Rôles des différentes étapes	Schémas des différentes étapes
<ul style="list-style-type: none"> Placer 200 µL de AC dans les cupules de la microplaque Incuber 3 heures à 37°C 	Fixation de l'AC anti-spiramycine sur le support	
<ul style="list-style-type: none"> Vider et laver avec du tampon PBS 	Elimination des AC en excès non fixés.	
<ul style="list-style-type: none"> Distribuer 250 µL de SAB à 2 % dans chaque cupule Placer 24 h à 4°C 	Saturation des sites non spécifiques du support par la SAB (Δ)	
<ul style="list-style-type: none"> Vider et rincer 3 fois avec du tampon PBS-Tween Laver avec du tampon PBS 	Elimination de la SAB en excès non fixée	
<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 100 µL de A Incuber 1 heure puis laver 3 fois au PBS-Tween, puis rincer au PBS 	Réaction Ag-AC, fixation de l'anticorps primaire Elimination de l'Ag en excès non fixé	
<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 100 µL de AC* Agiter et incuber 1 heure à 37°C 	Réaction AC-AC*, fixation de l'anticorps secondaire permettant la révélation	
<ul style="list-style-type: none"> Laver et rincer 3 fois au PBS-Tween, puis rincer au PBS 	Elimination des AC* non fixés.	
<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 150 µL de S Incuber 15 min à 37°C 	Addition du substrat de l'enzyme (●) et révélation de l'activité enzymatique fixée par apparition du produit P.	
<ul style="list-style-type: none"> Addition de 50 µL de NaOH à 1 mol.L⁻¹ 	Arrêt de la réaction par inactivation de l'enzyme.	

3.2.3. C'est une technique ELISA « sandwich » puisque :

- La microplaque est sensibilisée avec l'anticorps de capture
- La présence de l'antigène est révélée après sa fixation sur cet anticorps de capture par un anticorps marqué

3.2.4. La zone de linéarité permettant le dosage est située entre 2 et 5 µg/mL.

Le report de l'absorbance de 0,352 correspond à une concentration en spiramycine (en abscisse) de 3,6 µg/mL.

A t = 190 h, la concentration atteinte est de 300 µg/mL, la dilution est donc voisine de 100 x.

4.1.1. **Figure 1. Piste A :** observation d'une bande > 3000 kpb correspondant à l'ADN chromosomique (énoncé : entre 6000 et 8000 kpb) et d'une bande d'environ 80 kpb qui est constituée du plasmide libre pSAM (énoncé : taille de 80 kpb). Cette piste correspond à l'ADN de la souche A, ce résultat est cohérent, c'est le témoin positif.

Piste B : 1 seule bande, > 3000 kpb correspondant à l'ADN chromosomique. Pas de bande 80 kpb, c'est logique puisqu'il s'agit de la souche B qui ne contient pas le plasmide pSAM (c'est le témoin négatif).

Pistes C à D : observation d'une bande > 3000 kpb (ADN chromosomique. Celle d'environ 2000 kpb et le « smear » de 50 à 970 kpb peuvent être constitués d'ADN chromosomique partiellement dégradé, de mégaplasmides, de concatémères de plasmides ... Les « smears » masquent la zone des 80 kpb, il est donc impossible de conclure quant à la présence du plasmide pSAM dans les souches C et D.

4.1.2. Les extrémités cohésives sont complémentaires et autorisent la formation de concatémères de tailles multiples de 48,5 kpb. On distingue bien les bandes jusqu'à 1000 kpb environ.

4.2.1. Il s'agit d'une technique de « Southern-Blot ».

4.2.2. **Figure 2. Piste A :** c'est le témoin positif, la souche A contient le plasmide pSAM intégré dans le chromosome (hybridation sur la bande > 3000 kpb) et libre dans le cytoplasme (hybridation sur la bande 80 kpb).

Piste B : cette souche constitue le témoin négatif, ne possédant pSAM ni sous forme intégrée ni sous forme extra chromosomique, ne devrait donner aucune image d'hybridation. C'est le cas pour la région correspondant à la bande 80 kbp (absente figure 1) mais l'image de la région correspondant à la bande > 3000 kpb n'est pas cohérente et l'expérience ne peut donc être validée.

Remarque complémentaire : l'ADN chromosomique contient la région « att B » identique au site « att P » du vecteur pSAM, ce qui explique l'hybridation systématique du chromosome avec la sonde choisie (d'où le résultat aberrant de la piste B), il faudrait donc changer de sonde.

4.2.3. Pas d'hybridation avec la région 80kpb, donc les souches C et D ne possèdent pas le pSAM extra chromosomique. Pour la même raison signalée précédemment, il est impossible de conclure quant à la présence de pSAM sous forme intégrée.

4.3.1. Double digestion de pKC34 (vecteur) et pSAM (insert) par les mêmes enzymes de restriction Kpn I et Cla I : digestion simultanée s'il existe un tampon commun, ou successivement. Purification des fragments obtenus, déphosphorylation si les sites des enzymes sont compatibles, puis ligation pour obtenir le vecteur recombinant.

4.3.2. Les enzymes ayant des sites incompatibles permettent d'orienter l'insertion du fragment d'intérêt.

4.3.3. Am^R est le gène codant la résistance à l'ampicilline permettant la sélection des clones transformés.

MCS : « multiple cloning site » = site multiple de clonage (SMC), comprenant une succession de sites uniques de restriction permettant l'insertion du fragment d'intérêt en un seul exemplaire.

4.3.4. Lors des bioproductions industrielles, cette technologie d'intégration des vecteurs est préférée, car le procédé est plus simple à gérer et économiquement plus rentable, puisqu'il n'y a pas d'antibiotique à ajouter (les antibiotiques coûtent cher !).

Remarque complémentaire : d'autre part, la présence d'un antibiotique de sélection dans le milieu de production de spiramycine ou d'une autre biomolécule poserait de gros problèmes pour la commercialisation du produit fini.

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

2^{ème} partie : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE

Durée : 8 heures

Coefficient : 8

PREMIER JOUR

Durée: 5h30

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

Une feuille de papier millimétré semi-logarithmique est fournie aux candidats.

Session 2005 page 31

CLONAGE D'UN VECTEUR CODANT POUR UNE β -GALACTOSIDASE MODIFIÉE

La souche bactérienne *Escherichia coli* JM 109 doit servir de cellule hôte pour cloner le vecteur navette p β Gal portant comme marqueur de sélection la résistance à l'ampicilline et possédant un gène muté codant une β -Galactosidase modifiée dont l'activité sera étudiée.

Avant de transformer les bactéries *Escherichia coli* JM 109 avec le vecteur p β Gal, on cherche :

- à déterminer la CMI de l'ampicilline pour JM 109, de manière à adapter la concentration d'ampicilline à introduire dans les boîtes de milieu de sélection (première partie) ;
- à préciser l'action de cet antibiotique sur cette souche bactérienne à l'aide d'une étude cinétique (première partie) ;
- à valider un protocole de miniprep d'ADN plasmidique afin de produire efficacement le vecteur (deuxième partie).

Avant d'introduire le vecteur navette dans des cellules eucaryotes déficientes en lactase pour tester l'expression du gène β Gal, on procède :

- à un repiquage de la lignée concernée (troisième partie).

PREMIÈRE PARTIE : (50 points)

1.1. Détermination de la CMI de l'ampicilline vis-à-vis d'*Escherichia coli* JM 109 (18 points)

1.1.1. Matériel

- Solution d'ampicilline à 1 mg/mL notée « Amp »
- 2 flacons de milieu Mueller Hinton liquide (15 mL/flacon) notés « MH-CMI »
- Un tube d'eau distillée stérile noté « eau distillée stérile »
- 15 tubes à hémolyse stériles
- Culture de 18 h d'*Escherichia coli* JM 109 (en milieu Mueller Hinton liquide) notée « *E coli* JM 109 »
- Pipettes automatiques P 1 000 ou P 100 (ou pipettes Paille)

1.1.2. Mode opératoire

- Préparer l'inoculum : diluer au 1/10 une culture de 18 h d '*Escherichia coli* JM 109 en eau distillée et en tube à hémolyse puis introduire 150 μ L de cette dilution dans 15 mL de bouillon « MH-CMI ».
- Diluer l'antibiotique suivant le tableau donné ci-dessous.
 \approx **Présenter à un examinateur la réalisation d'une dilution.**
- Introduire l'inoculum dans les tubes sous un volume de 1 mL.

Tubes	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Solution d'ampicilline à 1 mg/mL (mL)		1	1									
Mueller Hinton stérile (mL)	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volume redistribué (mL)				1	1	1	1	1	1	1	1	1
Inoculum en Mueller Hinton (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Concentration finale de l'ampicilline (μ g/mL)												
Lecture après 24 h d'incubation												

- Mettre à l'étuve pendant 24 heures.

1.1.3. Compte-rendu

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Indiquer le protocole de réalisation de la dilution au 1/10 de la préculture. - Calculer la concentration en ampicilline des tubes 1 à 11. |
|---|

1.2. Effet de l'ampicilline sur la croissance d '*Escherichia coli* JM 109 (32 points)

1.2.1. Matériel

- Souche JM 109 de 18 h en MH liquide (50 mL de préculture) en bain agité à 37° C notée "*E coli* JM 109"
- 1 erlen contenant 50 mL de MH + ampicilline ([ampicilline] = 100 μ g/mL) noté "MH-ampicilline 100 μ g/mL"
- 1 flacon contenant 50 mL de MH-stérile noté "MH-croissance"
- 1 tube contenant 5 mL de MH stérile noté "MH-blanc"
- Cuves pour spectrophotomètre + spectrophotomètre
- Bain thermostaté agité à 37° C

- Pipettes automatiques P 1 000 et P 100 avec cônes stériles
- Bac de javel
- Parafilms prédécoupés

1.2.2. Mode opératoire

- ensemencer l'erlenmeyer à l'aide de la préculture de manière à obtenir une absorbance de 0,2 à 600 nm au temps $t = 0$ minute.
 ✍ **Effectuer le prélèvement et la mesure d'absorbance à $t = 0$ minute en présence d'un examinateur.**
- Suivre l'évolution de la croissance en réalisant des mesures d'absorbance, toutes les 15 minutes pendant 1h30, puis toutes les 30 minutes pendant 2h.

1.2.3. Compte rendu

- Justifier le volume de la préculture introduit dans l'erlenmeyer.
- Tracer la courbe de croissance sur papier millimétré.
- Déterminer les paramètres de croissance en phase exponentielle :
 - Vitesse spécifique de croissance Q_x .
 - Temps de génération G.
- Décrire et analyser la courbe obtenue.
- En déduire l'effet de l'ampicilline sur cette souche.

DEUXIÈME PARTIE : (40 points)

Validation d'un protocole de mini préparation de plasmide

Dans cette partie, le but est de déterminer l'ordre préférentiel de certaines étapes dans une mini préparation. On dispose de 5 mL d'une culture de bactéries transformées par le vecteur p3Gal. À partir de cette culture, une mini préparation sera réalisée selon un protocole modifié. Les résultats obtenus seront comparés à ceux du protocole habituel. Ces derniers figurent en annexe 1.

2.1. Matériel

- Microtubes stériles de 1,5 mL
- Pipettes P 20, P 100, P 1 000 et cônes
- Bac avec glace pilée
- Bain thermostaté à 37° C
- Vortex
- Minifuge
- Centrifugeuse réfrigérée à 4° C
- Congélateur à - 20° C
- Hotte chimique avec cônes filtres de P 1 000
- Cuves UV en quartz

2.2. Réactifs

- 5 mL de culture bactérienne transformée par p3Gal
- 350 μ L de solution A (Tris/HCl 25 mM, Glucose 50 mM, EDTA 10 mM, lysozyme 4 mg/mL, pH 8,0)
- 650 μ L de solution B (NaOH 0,2 M, SDS 1 %)
- 500 μ L de solution C (Acétate de potassium 5M, pH 5,0)
- 1 mL de solution D (ribonucléase pancréatique à 50 μ g/mL eau)
- Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1; v/v) saturé en TE pH 8,0 (flacon sous hotte chimique)
- Chloroforme/alcool isoamylique (24:1; v/v) (flacon sous hotte chimique)
- Ethanol absolu (congélateur)
- Ethanol à 70 % (congélateur)

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Protocole de minipréparation modifié

- Mettre dans un microtube 1,5 mL de la culture transformée.
- Centrifuger 3 minutes à 5 000 rpm à température ambiante.
- Éliminer le surnageant en laissant le culot aussi sec que possible.
 ✍ **Montrer le culot à un examinateur.**
- Agiter au vortex 10 secondes.
- Ajouter 100 μ L de solution A et mélanger par aspirations refoulements.
- Incuber 5 minutes dans la glace.

- Ajouter 200 μL de solution B et mélanger par retournement.
- Incuber 5 minutes dans la glace.
- Ajouter 150 μL de solution C et agiter au vortex 10 secondes.
- Incuber 5 minutes dans la glace.
- Centrifuger 5 minutes à 10 000 rpm à température ambiante.
- Récupérer la totalité du surnageant dans un nouveau microtube; soit V μL le volume de ce surnageant.
- * Ajouter 1 volume V de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1; v/v) sous hotte chimique en mettant des gants et en utilisant des cônes pourvus de filtre.
- Agiter au vortex jusqu'à l'obtention d'une émulsion.
- * Centrifuger le tube 2 minutes à 10 000 rpm.
- ✍ **Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube devant un examinateur.**
- L'ancien tube sera soigneusement fermé et jeté dans un container sous la hotte chimique.
- * Ajouter 1 volume V de chloroforme/alcool isoamylique (24:1; v/v) sous hotte chimique en mettant des gants et en utilisant des cônes pourvus de filtre.
- Agiter au vortex jusqu'à l'obtention d'une émulsion.
- * Centrifuger le tube 2 minutes à 10 000 rpm. Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube. L'ancien tube sera soigneusement fermé et jeté dans un container sous la hotte chimique.
- Ajouter 2 volumes V d'éthanol absolu glacé, mélanger par inversions et placer le tube 10 minutes à -20°C . Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm à 4°C (ergot du microtube à l'extérieur du rotor).
- ✍ **Montrer le culot à un examinateur.**
- Enlever le surnageant et tapoter le tube sur un papier filtre pour éliminer l'excès de liquide.
- Ajouter 500 μL d'éthanol à 70 %. Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm à 4°C en prenant soin d'inverser la position du tube par rapport à la centrifugation précédente (ergot du microtube à l'intérieur du rotor).
- ✍ **Montrer le culot à un examinateur.**
- Éliminer le surnageant et à l'aide d'une mèche de papier filtre, essuyer les gouttes résiduelles sur les bords du microtube. Recouvrir le tube d'un morceau de parafilm étiré et percé de quelques trous avec une aiguille. Sécher 5 minutes.
- Ajouter 300 μL de solution D, tapoter le fond du microtube et incuber 15 minutes dans un bain thermostaté à 37°C .

2.3.2. Analyse spectrophotométrique

- Effectuer une dilution en mettant 100 μL d'ADN plasmidique dans 900 μL d'eau.
- Lire l'absorbance à 260 nm et à 280 nm.
- Effectuer un spectre UV de 230 à 320 nm.

2.4. Résultats et compte-rendu

- Indiquer la valeur du volume V.
- Déterminer la quantité Q d'ADN plasmidique total extrait en justifiant le calcul.
- Calculer le rapport $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ et conclure sur le degré de pureté d'ADN plasmidique extrait.
- Légender le spectre obtenu et le joindre à la copie.
- Analyser ce spectre et discuter à nouveau de la pureté de l'ADN plasmidique obtenu.
- Dans le protocole habituel les quatre étapes repérées par * sont effectuées en fin de manipulation, après l'ajout de la solution D. Les résultats d'absorbance et le spectre figurent en annexe 1. Analyser et comparer ces résultats fournis à ceux que vous avez obtenus.
- Préciser le rôle des quatre étapes repérées par *.
- Conclure sur l'ordre préférentiel des étapes de minipréparation d'ADN plasmidique.

TROISIÈME PARTIE : (20 points)

Repiquage de la lignée eucaryote déficiente en lactase

3.1. Réactifs et matériel

En salle de culture :

- 1 flacon de la culture cellulaire (25 cm^2)
- tampon PBS sans calcium, stérile noté « **PBS** » 3 mL
- solution de trypsine stérile notée « **Trypsine** » 2 mL
- milieu MEM stérile additionné de glutamine et de 10 % de SVF 10 mL
- flacon de culture stérile (25 cm^2)

En salle de T.P. :

- hématimètre
- solution de bleu trypan à 0,4 % 0,1 mL
- 2 tubes à hémolyse
- pipettes automatiques et cônes correspondants

3.2. Manipulation

3.2.1. Repiquage des cellules

☞ Cette manipulation est réalisée sous hotte à flux laminaire en salle de culture cellulaire en présence d'un examinateur. Un ordre de passage sera établi.

- Éliminer le milieu de culture.
- Laver le tapis cellulaire avec 2 mL de « PBS ».
- Introduire 1,5 mL de solution de trypsine et laisser agir à température ambiante en surveillant attentivement l'action de la trypsine.
- Introduire 5 mL de milieu MEM et homogénéiser soigneusement (suspension S).
- Prélever 2 mL de la suspension S dans un tube à hémolyse en vue d'une numération.
- Transférer ensuite 1,5 mL de la suspension S dans un nouveau flacon stérile. Compléter à 5 mL avec le milieu MEM.
- Placer le flacon à l'étuve à 37° C en atmosphère air + 5 % CO₂.

3.2.2. Numération des cellules viables de la suspension cellulaire

- Transférer 0,2 mL de la suspension dans un nouveau tube.
- Ajouter 0,05 mL de bleu trypan.
- À l'aide de l'hématimètre, compter les cellules viables.

☞ Montrer un champ de l'hématimètre à un examinateur après avoir consigné les résultats bruts dans le compte-rendu.

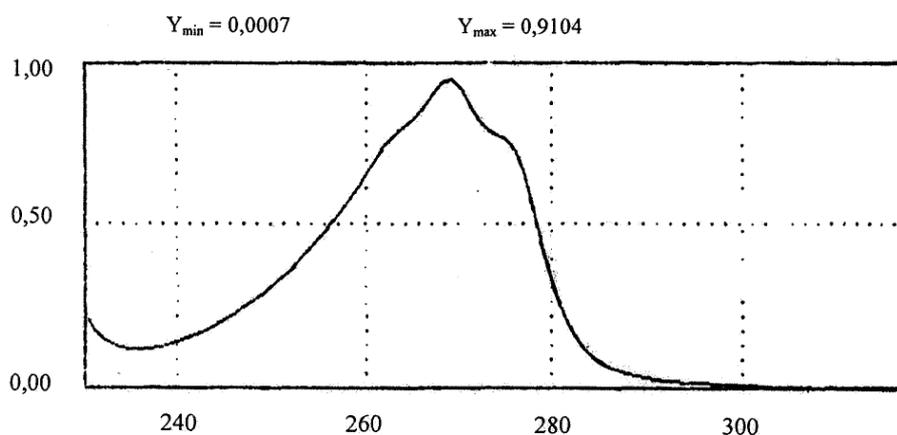
3.3. Compte-rendu

- Calculer la concentration en cellules viables de la suspension cellulaire S.
- Déterminer le pourcentage de viabilité.
- Déterminer la concentration en cellules viables du nouveau flacon de culture mis à l'étuve.
- En vue d'une cryoconservation, préciser comment procéder à partir de 20 mL de suspension S pour obtenir en ampoule une suspension de concentration de l'ordre de 10⁷ cellules/mL.

ANNEXE 1

Longueur d'onde	Absorbance
260 nm	0,6286
280 nm	0,3186

Balayage spectral



DEUXIÈME JOUR

Durée: 2h30

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

Une feuille de papier millimétré semi-logarithmique est fournie aux candidats.

PREMIÈRE PARTIE

Détermination de la CMI de l'ampicilline (18 points)

1. Détermination de la CMI de l'ampicilline vis-à-vis d '*Escherichia coli* JM 109

1.1. Lecture des résultats

Procéder à la lecture de la gamme de dilution en justifiant la légende de lecture des tubes.

Compléter le tableau consigné en annexe 2.

1.2. Compte-rendu :

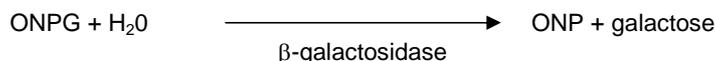
- a) Déterminer la CMI de l'ampicilline pour cette souche bactérienne.
- b) En vue de l'utilisation de l'ampicilline en biologie moléculaire :
- Le choix de cet antibiotique est-il judicieux pour sélectionner les souches d'*Escherichia coli* transformées à l'aide du plasmide p β gal ?
 - Quelle doit être la concentration de l'antibiotique à introduire dans le milieu de sélection pour assurer l'efficacité de sélection des souches résistantes ?

DEUXIÈME PARTIE

Détermination de l'activité P-Galactosidase clonée (32 points)

On souhaite étudier quelques propriétés de cette β -galactosidase mutée. Après extraction et purification à partir d'une culture des bactéries JM 109, on obtient un extrait enzymatique E, sur lequel on se propose de travailler. On cherche à étudier quelques propriétés de cette enzyme, notamment sa résistance à la chaleur.

Pour étudier cette enzyme, le substrat utilisé est l'ONPG (ortho-nitrophényl β -D-galactoside) qui donne par hydrolyse enzymatique l'ONP (orthonitrophénol) de couleur jaune et qui présente un maximum d'absorption à 420 nm.



2.1. Réactifs et matériel

- 2 mL d'extrait enzymatique E
- 35 mL ONPG 1 mM en tampon Tris-HCl pH 7,6
- 15 mL de réactif d'arrêt Na_2CO_3 2M / EDTA 8 mM
- 6 microtubes
- 10 tubes
- Macrocuves
- Pipettes P 5 000, P 1 000 et P 200 + cônes
- Parafilm
- 1 chronomètre
- Bac à glace

2.2. Mesure de l'activité de la P-galactosidase à 30°C et pH 7,6

À réaliser en présence d'un examinateur.

2.2.1. Mode opératoire (prévoir deux essais)

- Préincuber les réactifs à 30°C quelques minutes puis déterminer l'activité enzymatique à 30°C et à pH 7,6 selon le protocole suivant :
 - ONPG 2,9 mL
 - Extrait E 0,1 mL
- Arrêt de la réaction après 5 min par ajout de 1 mL de Na_2CO_3 /EDTA
- Lire l'absorbance à 420 nm contre un témoin adapté.

2.2.2. Compte-rendu

Donnée : Le coefficient d'absorption molaire de l'ONP dans ces conditions est de $4\,500\text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

- Indiquer la composition du tube témoin.
- Calculer la concentration d'activité catalytique de l'extrait E de β -galactosidase en U/mL d'extrait E.
- Le dosage des protéines sur cet extrait donne une concentration massique de $0,259\text{ mg.mL}^{-1}$. Calculer l'activité spécifique de l'extrait E en U/mg de protéines et en nkat/mg.

2.3. Dénaturation thermique à 56° C.

2.3.1. Dénaturation de l'enzyme à 56° C.

- Introduire 0,25 mL d'extrait E dans 6 microtubes.
- Placer ces tubes dans le bain thermostaté à 56°C et les sortir à exactement 2, 4, 6, 8, 10 et 12 minutes.
- Les placer immédiatement dans la glace pour arrêter la dénaturation thermique.
- Les laisser dans la glace 10 minutes environ.

2.3.2. Mesure de l'activité résiduelle à température ambiante.

- Préincuber les réactifs à la température du laboratoire pendant quelques minutes.
- Mesurer l'activité résiduelle des 6 tubes précédents à température ambiante selon le protocole suivant :
 - ONPG 2,9 mL
 - Extrait E dénaturé pendant t minutes à 56°C 0,1 mL
 - Arrêt de la réaction après 5 min par ajout de 1 mL de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{EDTA}$
- Lire pour chaque tube l'absorbance à 420 nm contre un témoin adapté.

2.3.3 Compte-rendu :

- Présenter l'organisation de la réalisation des essais sous forme de tableau.
- Tracer la courbe $\text{Ln } A_{420\text{nm}} = f$ (temps d'exposition à 56°C) par traitement informatique.
- Déterminer la constante cinétique de dénaturation kD.
- Déterminer le temps de demi-vie à 56°C de la β -galactosidase mutée.
- La β -galactosidase utilisée habituellement possède un temps de demi-vie à 56°C de 1,5 minute. Comparer avec le résultat obtenu.
- Conclure sur l'intérêt de cette mutation.

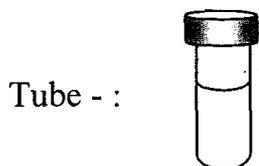
ANNEXE 2

À compléter et à rendre avec la copie

Rappel :

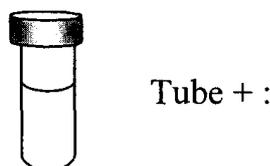
La solution d'ampicilline a été utilisée au départ à 1 mg/mL.

Tubes	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentration finale ($\mu\text{g/mL}$)												
Lecture après 24 h d'incubation												



Légende (à compléter) :

.....



Légende (à compléter) :

.....

**ÉPREUVES
DE LA SESSION 2006**

L'USAGE DES CALCULATRICES ÉLECTRONIQUES EST INTERDIT.**SYNTHÈSE DE DOCUMENTS**

Vous ferez une synthèse objective, concise et ordonnée des documents ci-joints consacrés aux robots. Dans une conclusion personnelle, vous donnerez votre opinion sur la question.

DOCUMENT 1**Au Japon, le chien Aibo est le premier représentant des robots de compagnie****Faut-il imiter ou non les comportements humains ?**

S'il est le seul à avoir été commercialisé à ce jour, le chien robot de Sony ouvre une ère nouvelle, celle du « robot personnel » : une machine accessible à tous et destinée à évoluer dans la maison. C'est dans cette optique qu'un chercheur de NEC (1), Yoshihiro Fujita, a mis au point R100, un prototype que la firme envisagerait de commercialiser dans un ou deux ans.

Sorte de grosse cafetière montée sur roulettes et coiffée d'une tête de hibou, R100 reconnaît les humains – il peut identifier avec précision dix personnes -, obéit aux commandes vocales, parle et se déplace seul. Outre sa fonction divertissante (R100 a une voix de personnage de dessin animé et exécute quelques tours hilarants), ce robot peut allumer la télé, vous filmer et envoyer les images vidéo à l'adresse électronique qu'on lui indique. Il peut aussi, sur ordre et via Internet, mettre en marche le magnétoscope depuis l'extérieur de la maison ou arrêter l'air conditionné.

Cette voie de recherche n'est pas celle de Takanori Shibata, chercheur au MITI (2) dont les animaux-robots, plus vrais que nature, privilégient le contact physique. Ainsi Paro, un phoque à fourrure blanche développé pour la société Sankyo, réagit différemment selon qu'on le caresse ou qu'on lui donne une tape. Il lève la tête, ondule le corps et cligne des yeux de façon très réaliste. « Un robot personnel évalue en termes subjectifs, qu'ils soient liés à l'apparence, au toucher, aux émotions ou à la capacité de divertissement, explique Takanori Shibata. Et il doit aussi générer son activité de façon autonome ».

D'autres chercheurs nippons travaillent à la mise au point de robots anthropomorphes. « Les robots domestiques doivent pouvoir être utilisés sans programmeur professionnel. Et la meilleure manière de communiquer facilement avec les humains est de reproduire le mode de communication qui leur est familier et naturel », insiste Atsuo Takanishi (université de Waseda).

Son équipe a mis au point des robots « sensibles » qui affichent des émotions humaines de la manière la plus réaliste possible. C'est aussi pour qu'il puisse évoluer dans le même environnement que l'homme, que Honda travaille sur P3, un robot humanoïde qui marche et pourrait peut-être, dans un avenir non précisé, avoir une utilisation domestique.

Ces travaux de développement se heurtent tous à un gros obstacle : le coût. On chuchote qu'Aibo vaudrait deux fois plus cher que le prix auquel il est vendu. Mais il constitue « le premier pas dans le développement d'une gamme de robots de divertissement. Nous raisonnons donc sur le long terme en ce qui concerne la faisabilité économique des robots », précise Merran Wigley de Sony à Tokyo.

Autre souci pour les constructeurs, leur degré de responsabilité pour des produits qui auront à gérer des fonctions d'alarme, de sécurité et de communication. Peut-être faudra-t-il définir comme le suggère M. Takanishi, « une législation pour imposer l'implantation d'une boîte noire dans le ventre des robots pour savoir, en cas d'accident, ce qui s'est réellement passé ».

Brice PEDROLETTI, *Le Monde*, 11 mars 2000.

(1) Société d'électronique et d'informatique.

(2) Ministère du commerce extérieur et de l'industrie.

DOCUMENT 2**Pourquoi les Japonais acceptent mieux les robots humanoïdes**

Alors qu'ils ne provoquent pas de rejet au Japon, les androïdes sont souvent considérés par les Européens comme concurrents des êtres humains. Une différence d'approche très culturelle qui plonge ses racines dans la religion et les relations qu'elle établit entre l'être humain et la nature.

[...] Contrairement aux adeptes du shintoïsme (1), l'Occident croit à la création de l'homme grâce à une INTERVENTION DIVINE. Ainsi, créer un robot À L'IMAGE DE L'HOMME s'apparente à un blasphème. Mais, même au Japon, le robot-chien Aibo ne doit pas trop ressembler à l'animal vivant pour ne pas troubler le public.

AIBO, le robot-chien de Sony, aurait-il pu être conçu en Occident ? Ou Asimo, l'androïde de Honda, suivi par HOAP-2, de Fujitsu, et Qrio de Sony ? Ces automates, de plus en plus habiles sur deux pieds, raniment une sourde angoisse en Europe alors qu'ils n'engendrent qu'admiration et affection chez les Japonais. Pourquoi cette différence face aux robots anthropomorphes ?

Cette question, rarement débattue, a fait l'objet d'un colloque intitulé « Robots : entre technologie et culture », qui s'est tenu le 13 décembre à la Maison de la culture du Japon à Paris, lors de la manifestation « Hommes et robots, entre l'utopie et la réalité » (du 28 octobre 2003 au 13 janvier 2004). Autre fait rare : une réponse claire a été apportée par les intervenants. Pour eux, la réaction des Japonais et des Européens face aux robots révèle des différences culturelles profondes de conception de la notion d'humanité.

Frédéric Kaplan, chercheur au Computer Science Laboratory (CSL) de Sony à Paris, tente de cerner cette divergence en notant qu'en Europe la différence entre l'homme et la machine doit être redéfinie en permanence, alors qu'elle ne fait pas le moindre doute au Japon. Le logiciel d'IBM fonctionnant sur le supercalculateur Deep Blue qui a battu le champion du monde d'échecs Gary Kasparov, en 1997, illustre ce propos.

Les occidentaux ont interprété cet événement comme une victoire de la machine sur l'homme. Si un ordinateur peut battre un homme aux échecs, alors il faut trouver d'autres domaines dans lesquels l'homme reste supérieur au robot.

LES ROBOTS PEUVENT VEXER

Frédéric Kaplan cite le philosophe allemand Peter Sloterdijk, qui remarque que « les robots peuvent vexer l'être humain ». La victoire de Deep Blue a probablement provoqué un malaise plus profond, même s'il n'a exploité que des techniques brutales de calcul ultrarapide pour battre Gary Kasparov. Néanmoins, l'un des fiefs de l'intelligence humaine était violé. Et il fallait « redéfinir le delta », comme l'exprime Frédéric Kaplan, entre l'homme et la machine. Ce constat s'applique aux années 1980, lorsque l'arrivée de robots dans les usines et des ordinateurs dans le tertiaire a été considérée comme destructrice d'emplois. Ces rejets relèvent sans doute de la crainte profonde d'une substitution possible, à terme, de l'homme par le robot. Les Japonais ignorent ce sentiment. Pour eux, les robots sont des machines et les hommes sont des hommes, ce qui simplifie considérablement leurs relations avec les automates de tout poil.

Pour trouver une explication à cette troublante différence, Frédéric Kaplan remonte aux sources religieuses. « Dans le shinto(1), on ne trouve pas d'histoire de création technique de l'être humain », remarque-t-il. Et il note une légende édifiante. Lorsque la déesse Soleil se dispute avec son frère, elle se retire dans une grotte et prive le monde de lumière. Les hommes décident d'organiser une fête pour attirer le soleil hors de sa retraite. Mais il s'agit d'une fausse fête. Les hommes font semblant de s'amuser pour sauver le monde. Au Japon « le naturel et l'artifice ne s'opposent pas », en déduit le chercheur. [...]

AFFICHER LA NATURE ARTIFICIELLE

Pour l'Occidental, qu'il soit de culture juive, chrétienne ou musulmane, la création de la vie relève de Dieu. Plus le robot se rapproche de l'homme, plus le malaise grandit. Plus la machine singe les mouvements du corps humain, ses émotions et son intelligence, plus elle devient sacrilège. Paolo Dario, professeur à l'école supérieure Sainte-Anne à Pise, en Italie, ne dit pas autre chose lorsqu'il note que « la création d'un robot est un acte contre Dieu ». Il explique pourquoi les machines, depuis le Golem (2) de la Bible, sont considérées comme dangereuses pour l'homme » « N'ayant pas été créées par Dieu, elles n'ont pas le sens du bien et du mal ».

Il est donc logique que le premier animal mécanique doté de facultés d'apprentissage, de communication et d'un embryon de langage, l'Aibo de Sony, soit né au Japon.

Michel ALBERGANTI, *Le Monde*, 24 décembre 2003.

(1) shinto : religion traditionnelle du Japon.

(2) Golem : être artificiel à forme humaine.

DOCUMENT 3

ROBOT DE CONSOLATION

Tristes tropismes. Aux États-Unis, Bob Dylan, le grand Bob Dylan, prête ses vieilles rides et une de ses chansons – Love Sick, 1997 – à une campagne de pub pour des sous-vêtements féminins. En Allemagne, des terroristes piscicoles lâchent un piranha dans un aquarium où les enfants des écoles sont censés caresser poissons sages et fleurs des mers. Quand on est déçu par les hommes et par les bêtes, il ne reste plus guère qu'une seule solution : se tourner vers les robots. C'est ainsi que votre serviteur s'est rendu, à la fin du mois dernier, au trente-cinquième Symposium international de la robotique, sis au Parc des expositions de Villepinte,

Session 2006 page 2

banlieue nord de Paris. Ce n'était pas sur un coup de tête, car notre intérêt pour les robots n'a rien d'une passade. Il se trouve qu'on avait adopté un robot autrefois, dans le cadre d'une enquête effectuée pour Voir, mensuel consacré aux nouvelles technologies lancé à l'époque par Télérama. D'accord, ça ne date pas d'hier, mais pour nous, c'est tout comme, car on ne passe pas quinze jours avec un robot sans que cette liaison laisse de traces indélébiles. Notre robot s'appelait Hero. Si l'on se souvient bien, il était né en Californie. Hero était l'un des premiers robots domestiques de l'histoire des robots, c'est-à-dire qu'il était censé aider son maître – nous en l'occurrence –, dans diverses tâches ménagères et néanmoins indispensables, telles que les aurait remplies un majordome doublé d'un(e) employé(e) de maison, à savoir par exemple lui servir un verre de vodka, avec un zeste de citron, accueillir ses visiteurs et les guider jusqu'au canapé, débarrasser la table ou encore pousser discrètement la poussière du tapis sous la chaîne hi-fi.

Autant l'avouer tout de suite : Hero, malgré des jours et des nuits d'entraînement intensif, devait s'avérer parfaitement incapable d'exécuter la moindre de ces besognes. Il appelait « papa » notre propriétaire et « chérie » notre voisin. Il déposait les verres juste à côté de la table basse, dans le vide. Quant à la poussière, il se contentait de s'y emmêler les roulettes. Bref, bien que d'apparence il ressemblât en tout point à un gros aspirateur, Hero était con comme un balai. Mais nous ne l'en aimions que davantage, comme on chérit un enfant un peu difficile ou un chien de peu de flair. Quand ses parents naturels le récupérèrent, malgré nos protestations indignées – il faut dire à leur décharge que ce machin, bien qu'inutile, coûtait bonbon –, ce fut un déchirement.

Lorsqu'il nous avait été confié, Hero sortait à peine des langes. C'était il y a vingt ans. Vingt ans, c'est plus qu'il n'en faut dans l'espèce humaine pour qu'un nourrisson désarmé, inapte à la moindre initiative, se transforme en adulte expérimenté, capable d'immenses dégâts. Connaissant mal les stades de développement chez le robot, on ne saurait imaginer ce que Hero est devenu aujourd'hui. Mais, à en juger par ses congénères du Symposium 2004, il nous étonnerait. Nous avons vu en effet, à Villepinte de ces robots capables de peindre une automobile en deux temps trois mouvements, comme dans la pub. Nous avons vu des robots capables de désamorcer des colis piégés, comme dans les aéroports du XXI^e siècle benladenisé. Nous avons vu des robots capables de débroussailler une forêt, comme à la campagne. Nous avons même vu des robots, élaborés au Commissariat à l'énergie atomique, qui vont faire le ménage au cœur d'un réacteur nucléaire, ou recoudre des tissus dans un poumon avarié. Ces robots sont dits « à retour d'effort », car quand l'homme manie la poignée qui les guide à distance, il a besoin, lui aussi, de se fatiguer un peu. Persuadés comme nous l'étions que les robots sont destinés avant tout à nous épargner toute peine, les robots à retour d'effort nous semblent une sorte d'aberration. De qui se moque-t-on, chez les robots ?

Blague à part, les bras à retour d'effort ouvrent d'immenses perspectives, allez savoir pourquoi, dans la science robotique. Et il y a plus paradoxal encore, chez nos amis les robots, comme cette machine développée par la société californienne Adept, qui déplace des pièces à la vitesse de l'éclair. Que fait-elle ? Elle joue au solitaire. Un robot qui joue au solitaire ! Voilà comment on se plaît à imaginer Hero aujourd'hui, comme un vieil adolescent un peu neurasthénique qui soigne son mal de vivre en se livrant à quelque activité misanthrope, mais anodine. On n'ose croire qu'il aurait viré voyou, et dessinerait des tags sur des voitures toutes neuves en imitant la signature de Picasso, comme certains de ses copains.

Christian SORG, *Télérama* n°2831, du 14 avril 2004.

DOCUMENT 4

Edison, génial inventeur, reçoit son ami Lord Ewald et lui fait découvrir sa stupéfiante création.

PRÉLIMINAIRES D'UN PRODIGE

Et, guidant le jeune homme à travers le labyrinthe, il l'amena vers la table d'ébène, où le rayon de lune avait brillé avant la visite de Lord Ewald.

« Voulez-vous me dire quelle impression produit sur vous ce spectacle-ci ? », demanda-t-il en montrant le pâle et sanglant bras féminin posé sur le coussin de soie violâtre.

Lord Ewald contempla, non sans un nouvel étonnement, l'inattendue relique humaine, qu'éclairaient, en ce moment, les lampes merveilleuses.

« Qu'est-ce donc ? dit-il.

- Regardez bien ».

Le jeune homme souleva d'abord la main.

« Que signifie cela ? continua-t-il Comment ! cette main... mais elle est tiède, encore !

- Ne trouvez-vous donc rien de plus *extraordinaire* dans ce bras ? » Après un instant d'examen, Lord Ewald jeta une exclamation, tout à coup.

« Oh ! murmura-t-il, ceci, je l'avoue, est une aussi surprenante merveille que *l'autre*, et faite pour troubler les plus assurés ! Sans la blessure, je ne me fusse pas aperçu du chef-d'oeuvre ! ».

L'Anglais semblait comme fasciné ; il avait pris le bras et comparait avec sa propre main la main féminine.

« La lourdeur ! le modelé ! la carnation (1) même !... continuait-il avec une vague stupeur. - N'est-ce pas, en vérité, de la chair que je touche en ce moment ? La mienne en a tressailli, sur ma parole !

- Oh ! c'est mieux ! - dit simplement Edison. La chair se fane et vieillit : ceci est un composé de substances exquises, élaborées par la chimie, de manière à confondre la suffisance de la "Nature". - (Et, entre nous, la Nature est une grande dame à laquelle je voudrais bien être présenté, car tout le monde en parle et personne ne l'a jamais vue !) - Cette copie, disons-nous, de la Nature, - pour me servir de ce mot empirique (2), - enterrera l'original sans cesser de paraître vivante et jeune. Cela périra par un coup de tonnerre avant de vieillir. C'est de la *chair artificielle*, et je puis vous expliquer comment on la produit ; du reste, lisez Berthelot.

- Hein ? vous dites ?

- Je dis : c'est de la chair artificielle, - et je crois être le seul qui puisse en fabriquer d'aussi perfectionnée ! répéta l'électricien ».

Lord Ewald, hors d'état d'exprimer le trouble où ces mots avaient jeté ses réflexions, examina de nouveau le bras irréal.

« Mais, demanda-t-il enfin, cette nacre fluide, ce lourd éclat charnel, cette vie intense !... Comment avez-vous réalisé le prodige de cette inquiétante illusion ?

- Oh ! ce côté de la question n'est rien ! répondit Edison en souriant. Tout simplement avec l'aide du Soleil.

- Du Soleil ! ... murmura Lord Ewald

- Oui. Le Soleil nous a laissé surprendre, en partie, le secret de ses vibrations !... dit Edison. [...]

Ceci est le bras d'une Andréide de ma façon, mue pour la première fois par ce surprenant agent vital que nous appelons l'Électricité, qui lui donne, comme vous voyez, tout le fondu, tout le moelleux, toute l'illusion de la Vie !

- Une Andréide ?

- Une Imitation-Humaine, si vous voulez. L'écueil désormais à éviter, c'est que le fac-similé ne surpasse, physiquement, le modèle. »

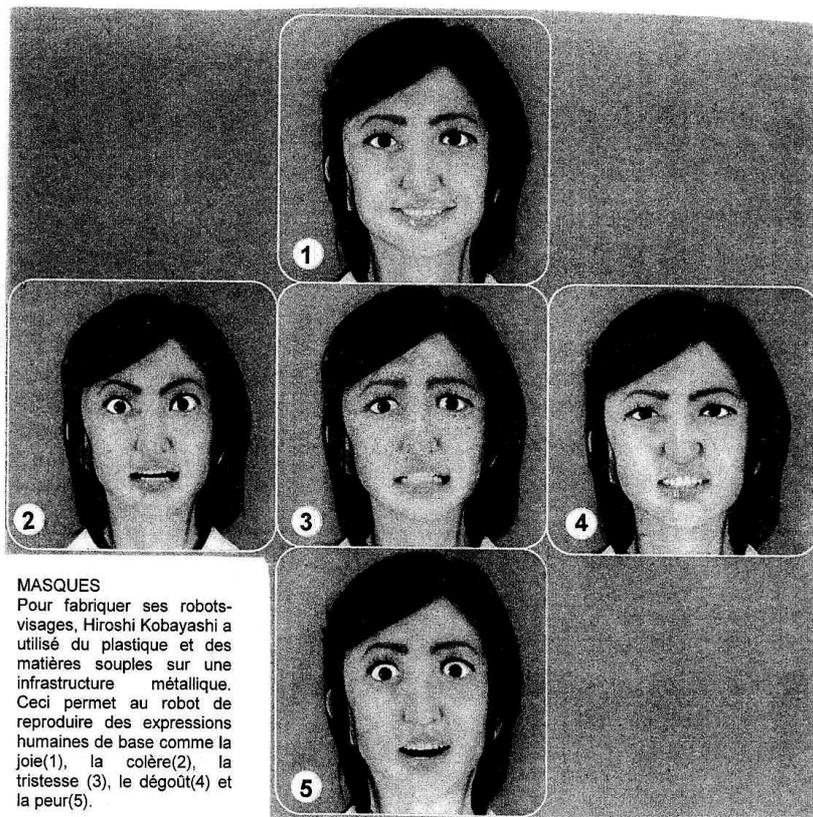
Villiers de l'Isle-Adam, *L'Ève future*, 1886, Livre II, Chapitre 4, Folio n°2498, Éditions Gallimard, 1993.

(1) carnation : teinte, couleur de la peau.

(2) Empirique qui se fonde sur l'expérience et non sur un savoir théorique.

DOCUMENT 5

Hiroshi Kobayashi, de l'université de Tokyo, a concentré ses recherches sur les robots-visages - des robots équipés d'équivalents mécaniques des muscles faciaux, recouverts d'une peau en latex et capables de créer des expressions humaines.



Ruth AYLETT, *Robots, des machines intelligentes et vivantes*, Solar, 2004
Session 2006 page 4

L'usage de la calculatrice est interdit. L'usage d'un dictionnaire bilingue est autorisé.

Children teach their parents a Tesson in hygiene

It is 11am, and the students of Marachipatti elementary school are queuing up in their courtyard. Girls and boys in two neat lines stand outside the school's white-pointed latrine block. They disappear inside. There is some vigorous hand washing. One by one they emerge into the sunlight before filing back to the classroom.

This is, of course, the toilet break. On the face of it there is nothing remarkable here – until you remember that this is rural India where there are few facilities of any kind, let alone toilets. The lack of proper sanitation is one of many obstacles Indian children face in their struggle for an education. Other factors include too few books, teachers who fail to turn up, and the requirement for children to work – like their parents – in the fields.

Until recently Marachipatti primary didn't have a latrine – nearly 85% of Indian schools are in the same dismal situation. Instead, the pupils would dash across the road and squat down in the thorn bushes. It could be a scary experience : "Sometimes snakes would come and disturb us. I would run away as quickly as possible", one 10-year-old girl, Vasanthi, explained.

The lack of sanitation brought other problems too. Pupils frequently suffered from diarrhoea. They also got hookworm. "In the past as many as 10 - 15 children would be absent because of illness," the school's assistant headteacher Mr Krishnan recalls.

This lamentable situation ended three years ago when the British charity WaterAid came up with an ingenious solution : it built a sanitation block for the school's 104 pupils – at the cost of \$410. More importantly, it asked the five-to-10-year-old pupils to manage the block themselves.

The students organised themselves into different committees responsible for keeping the toilets clean, fetching water from the hand-pump outside and ensuring all pupils washed their hands with soap. Other students on the "tidy committee" looked after the school's modest grounds.

And it worked. "I tell the students to cut their nails, make sure their clothes are clean and to brush their teeth and comb their hair," Vasanthi, a member of the personal hygiene committee, explains.

The initiative brought striking results : pupils became healthier and suffered from fewer illnesses.

But, crucially, the pupils of Marachipatti primary took the message of hygiene awareness back into their homes. WaterAid's local health workers discovered it was far quicker, and more effective, to teach adults good hygiene practices via their children than to target them directly. "I told my mother and now she washes her hands with soap before cooking vegetables," Vasanthi pointed out.

It will take a long time before every Indian school enjoys the facilities that the children of Marachipatti now use during their twice-a-day breaks. In many other rural areas of India the government education system has virtually collapsed. School buildings are falling apart, teachers are absent or do not exist, and the dropout rates, especially among girls, are depressingly high. And yet the success of the WaterAid scheme points the way forward to a better future in which there is not just education for some of the world's poorest children, but sanitation too.

Adapted from The Guardian Weekly, Luke Harding

PREMIÈRE PARTIE : COMPRÉHENSION (10 points)

1. Faire un compte rendu de l'article en français en mettant en évidence les idées essentielles. (environ 120 mots ± 10%)
2. Traduire en français le texte de la ligne 36 (« It will take ... ») à la ligne 42 (« ... but sanitation too. »)

DEUXIÈME PARTIE : EXPRESSION EN LANGUE ANGLAISE (10 points)

1. According to the article, teaching hygiene to the young is more effective than to adults. Why? Use your own words to answer the question. (60-80 words)
2. What should our priorities be for helping the world's poorest children? Give your opinion. (130 words ± 10%).

ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

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

PREMIÈRE PARTIE : COMPRÉHENSION (10 points)

1. L'association caritative britannique WaterAid a récemment construit un bloc sanitaire dans une école primaire située dans une région rurale de l'Inde afin d'initier les jeunes élèves aux règles essentielles d'hygiène. Les enfants sont ensuite chargés de veiller à la bonne utilisation du bloc par tous et à la propreté dans l'enceinte de l'école. Grâce à ce projet, les enfants sont en meilleure santé. De plus, ils arrivent à faire comprendre à leurs parents combien l'hygiène est importante dans la vie quotidienne. Il reste encore beaucoup à faire dans ces régions où l'accès à la scolarité reste difficile, mais ce projet montre combien l'hygiène doit faire partie de l'éducation des plus pauvres. (111 mots).

2. Il faudra beaucoup de temps pour que chaque école en Inde possède les équipements qu'utilisent les élèves de Marachipatti lors de leurs deux récréations quotidiennes. Ailleurs, dans de nombreuses zones rurales de l'Inde, le système public d'éducation s'est pratiquement effondré. Les bâtiments tombent en ruine, les professeurs sont absents ou inexistantes et le nombre d'élèves qui abandonnent leurs études, surtout parmi les filles, est désespérément élevé. Pourtant le succès du projet WaterAid montre comment progresser vers un avenir meilleur dans lequel les enfants les plus démunis n'auraient pas seulement accès à la scolarité, mais aussi aux installations sanitaires.

DEUXIÈME PARTIE : EXPRESSION EN LANGUE ANGLAISE (10 points)

1. At school, children learn hygiene practices that they will use for the rest of their lives. Back home, they will convince their parents and the villagers to adopt these practices and require sanitation of them. Later, when they have children of their own, they will teach them hygiene awareness and remember that better sanitation means fewer illnesses. (55 words)

2. The candidate may consider the following aspects related to this question :

- educating children and training them for jobs are top priorities, the goal being to encourage them to develop the resources of their own countries ;
- teaching children health care & sanitation is just as essential: they must be taught basic hygiene practices to suffer fewer illnesses ;
- enforcing vaccination is one way to fight endemic diseases ;
- giving poor nations access to cheap generic drugs.

The candidate may also mention the specific problem of child labour in developing countries and related issues (appalling working conditions, small salaries, schooling, etc.).

SOUS ÉPREUVE : MATHÉMATIQUES

Durée : 2 heures

Coefficient : 1,5

La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

EXERCICE 1 (12 points)

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

Une usine produit de l'eau minérale en bouteilles. Lorsque le taux de calcium dans une bouteille dépasse 6,5 mg par litre, on dit que l'eau de cette bouteille est calcaire.

Dans cet exercice, les résultats approchés sont, sauf indication contraire, à arrondir à 10^{-3} .

A. Loi binomiale et loi de Poisson

Dans un stock important de bouteilles, 7,5 % des bouteilles contiennent de l'eau calcaire.

On prélève au hasard 40 bouteilles dans le stock pour vérification du taux de calcium. Le stock est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 40 bouteilles.

On considère la variable aléatoire X qui, à tout prélèvement de 40 bouteilles, associe le nombre de bouteilles de ce prélèvement qui contiennent de l'eau calcaire.

- 1° Justifier que la variable aléatoire X suit une loi binomiale dont on déterminera les paramètres.
 - 2° On considère que la loi suivie par X peut être approchée par une loi de Poisson. Déterminer le paramètre λ de cette loi de Poisson.
 - 3° On désigne par X_1 une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre λ , où λ est la valeur obtenue au 2°.
- Calculer $P(X_1 \leq 4)$.
Traduire le résultat obtenu à l'aide d'une phrase.

B. Loi normale

L'eau minérale provient de deux sources, notées « source 1 » et « source 2 ». On rappelle que lorsque le taux de calcium dépasse 6,5 mg par litre dans une bouteille, l'eau de cette bouteille est dite calcaire. On note Y la variable aléatoire qui, à chaque bouteille prélevée au hasard dans la production de la source 1, associe le taux de calcium de l'eau qu'elle contient. On suppose que la variable aléatoire Y suit la loi normale de moyenne 5 et d'écart type 1,5.

- 1° Calculer $P(Y \leq 6,5)$.
- 2° En déduire la probabilité que l'eau d'une bouteille prélevée au hasard dans la production de la source 1 soit calcaire.

C. Probabilités conditionnelles

On suppose que la probabilité qu'une bouteille prélevée au hasard dans la production d'une journée de la source 1 contienne de l'eau calcaire est $p_1 = 0,16$ et que la probabilité qu'une bouteille prélevée au hasard dans la production de cette journée de la source 2 contienne de l'eau calcaire est $p_2 = 0,10$.

La source 1 fournit 70 % de la production totale des bouteilles d'eau et la source 2 le reste de cette production. On prélève au hasard une bouteille d'eau parmi la production totale de la journée. Toutes les bouteilles d'eau ont la même probabilité d'être tirées.

On définit les événements suivants :

- A : « la bouteille d'eau provient de la source 1 » ;
 B : « la bouteille d'eau provient de la source 2 » ;
 C : « l'eau contenue dans la bouteille est calcaire ».

- 1° Déduire des informations figurant dans l'énoncé :
 $P(A)$, $P(B)$, $P(C/A)$, $P(C/B)$.
 (On rappelle que $P(C/A) = P_A(C)$ est la probabilité de l'événement C sachant que l'événement A est réalisé.)
- 2° Calculer $P(C \cap A)$ et $P(C \cap B)$.
- 3° Déduire de ce qui précède $P(C)$.
- 4° Calculer la probabilité que l'eau contenue dans une bouteille provienne de la source 1 sachant qu'elle est calcaire.

D. Intervalle de confiance

Dans cette question on s'intéresse au taux de calcium de l'eau d'une grande quantité de bouteilles devant être livrées à une chaîne d'hypermarchés.

On prélève au hasard et avec remise un échantillon de 100 bouteilles dans cette livraison.

Soit Z la variable aléatoire qui, à tout échantillon de 100 bouteilles prélevées au hasard et avec remise dans la livraison, associe la moyenne des taux de calcium de l'eau contenue dans chacune des bouteilles de cet échantillon.

On suppose que Z suit la loi normale de moyenne inconnue μ et d'écart type $\sigma/10$ avec $\sigma=0,99$.

Pour l'échantillon prélevé, la moyenne obtenue, arrondie à 10^{-2} , est $\bar{X} = 5,37$.

- 1° A partir des informations portant sur cet échantillon, donner une estimation ponctuelle de la moyenne μ des taux de calcium de l'eau contenue dans chacune des bouteilles de la livraison.
- 2° Déterminer un intervalle de confiance centré sur \bar{X} de la moyenne μ des taux de calcium de l'eau contenue dans chacune des bouteilles de la livraison, avec le coefficient de confiance 95 %. Arrondir les bornes à 10^{-2} .

EXERCICE 2 (8 points)

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

A. Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) : $y' + 0,01y = 24$,

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

- 1° Déterminer les solutions sur $[0, +\infty[$ de l'équation différentielle (E_0): $y' + 0,01y = 0$.

2° Déterminer la constante réelle a pour que la fonction g définie sur $[0, +\infty[$ par : $g(t) = a$ soit une solution particulière de l'équation différentielle (E).

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

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

B. Etude d'une fonction et calcul intégral

Soit v la fonction définie sur $[0, +\infty[$ par $v(t) = 2400(1 - e^{-0,01t})$

1° Déterminer $\lim_{t \rightarrow +\infty} v(t)$.

2° On désigne par v' la fonction dérivée de la fonction v .

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

3° Déduire de ce qui précède le sens de variation de la fonction v sur $[0, +\infty[$.

4° Résoudre sur $[0, +\infty[$ l'équation $v(t) = 1200$.

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

C. Application des résultats de la partie B

Un réservoir contient 60 m^3 d'eau destinée à abreuver du bétail.

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

A l'instant $t = 0$, se déverse dans le réservoir une eau polluée par une substance M .

Un système de trop plein permet de conserver à tout instant à partir de l'instant $t = 0$ un volume de 60 m^3 dans le réservoir.

On admet, qu'à l'instant t (exprimé en heures), le volume, **exprimé en litres**, de substance polluante M présente dans le réservoir est $v(t)$, où v est la fonction définie dans la partie B.

1° La santé du bétail est menacée lorsque le volume de substance M dans le réservoir atteint 2 % du volume total du réservoir. Déduire d'un résultat obtenu à la partie B la valeur de t à partir de laquelle la santé du bétail est menacée par la présence dans le réservoir de substance M .

2° Le volume de substance M dans le réservoir peut-il dépasser 4 % du volume du réservoir ? Justifier la réponse à l'aide d'un résultat de la partie B.

PROPOSITION DE CORRIGÉ

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

EXERCICE 1

Partie A

1°) - Chaque prélèvement est constitué par 40 épreuves élémentaires indépendantes puisque le prélèvement est assimilé à un tirage avec remise.

- Chaque épreuve élémentaire peut déboucher sur deux résultats et deux seulement : la bouteille contient de l'eau calcaire, événement de probabilité $p = 0,075$ et la bouteille ne contient pas de l'eau calcaire, événement de probabilité $q = 1 - p = 0,925$.

La variable aléatoire X associée à ces tirages le nombre total de bouteilles d'eau contenant de l'eau calcaire.

Donc X suit la loi binomiale de paramètre 40 et 0,075.

2°) $\lambda = E(X) = 40 \times 0,075 = 3$

3°) $P(X_1 \leq 4) = P(X_1 = 0) + \dots + P(X_1 = 4) \approx 0,815$ (A l'aide de la table de la loi de Poisson ou de la formule).

La probabilité de l'événement : « dans un prélèvement de 40 bouteilles il y a au plus quatre bouteilles qui contiennent de l'eau calcaire » est proche de 0,815.

Partie B

Dans cette partie, on fait les calculs à l'aide du changement de variable $T = \frac{Y - 5}{1,5}$; T suivant la loi normale centrée réduite.

1°) $P(Y \leq 6,5) \approx 0,841$.

2°) $P(Y > 6,5) \approx 0,159$.

Partie C

1°) $P(A) = 0,7$; $P(B) = 0,3$; $P(C/A) = 0,16$; $P(C/B) = 0,10$

2° $P(C \cap A) = P(A) \cdot P(C/A) = 0,112$ et $P(C \cap B) = P(B) \cdot P(C/A) = 0,03$

3° $P(C) = P(C \cap A) + P(C \cap B)$, $P(C) = 0,142$.

4° $P(A/C) = P(C \cap A)/P(C) \approx 0,789$.

Partie D

On choisit pour estimation ponctuelle de la moyenne inconnue $\hat{\mu} = \bar{x} = 5,37$. $I \approx [5,18 ; 5,56]$.

EXERCICE 2

Partie A

1° La solution générale de (E0) est définie sur $[0 ; +\infty[$, par $y(t) = ke^{-0,01t}$

2° $g(t) = 2400$.

3° Les solutions de (E) sont définies sur $[0 ; +\infty[$ par $y(t) = ke^{-0,01t} + 2400$.

4° $v(t) = 2400e^{-0,01t} + 2400$.

Partie B

1° De $\lim_{t \rightarrow +\infty} (-0,01 t) = -\infty$ et $\lim_{x \rightarrow -\infty} ex = 0$,

on déduit que $\lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-0,01 t} = 0$, $\lim_{t \rightarrow +\infty} v(t) = 2400$,

2° $v'(t) = 24 e^{-0,01t}$

3°

t	0	$+\infty$
$v'(t)$		+
$v(t)$	0	2400

4° $t = \frac{-1}{0,01} \cdot \ln 0,5$ ou $t = 100 \ln 2 \approx 69,3$

Partie C

1° La santé du bétail est menacée lorsque le volume de substance M dans le réservoir est supérieur à $(2/100) \times 60000 \text{ L} = 1200 \text{ L}$, donc lorsque $v(t) \geq 1200$; d'après B.4°, la santé du bétail est menacée au bout de 69,3 heures après le début de la pollution.

2°

4 % du volume du réservoir représente 2400 litres.

v est strictement croissante sur $[0, +\infty[$ et $\lim_{t \rightarrow +\infty} v(t) = 2400$.

$t \rightarrow +\infty$

Donc $v(t)$ ne peut pas dépasser 2400.

Le volume de substance M ne peut pas dépasser 4 % du volume du réservoir.

SOUS ÉPREUVE : SCIENCES PHYSIQUES
 Durée : 2 heures Coefficient : 2,5

Rappel : La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

Seul l'usage d'une calculatrice électronique, autonome, non imprimante, à entrée unique par clavier, est autorisée pour cette épreuve.

1) CHIMIE ORGANIQUE (16 points)

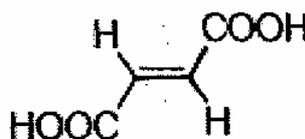
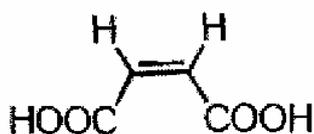
De nombreuses questions sont indépendantes

On s'intéresse aux acides (Z)-but-2-ène-1,4-dioïque (nom courant: acide maléique) et (E)-but-2-ène-1,4-dioïque

(nom courant: acide fumarique).

1. Structures

1.1. L'acide fumarique est-il représenté par la formule 1 ou par la formule 2 ?



1.2. Les molécules 1 et 2 sont-elles diastéréoisomères ou énantiomères? Justifier brièvement.

2. Propriétés

2.1. Sur une représentation claire, indiquer les liaisons hydrogène intermoléculaires ou intramoléculaires susceptibles de se former :

- 2.1.a. dans l'acide fumarique.
- 2.1.b. dans l'acide maléique.

2.2. Ces deux acides ont des températures de fusion très différentes : 130°C (acide maléique) et 287°C (acide fumarique).

Justifier que la température de fusion de l'acide fumarique est plus élevée que celle de l'acide maléique.

3. On étudie l'addition d'eau sur l'acide fumarique.

3.1. Mécanisme et propriétés optiques

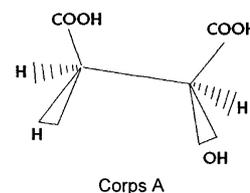
3.1.a. Écrire le mécanisme de cette réaction effectuée en présence d'ions H⁺, mécanisme identique à celui de l'hydratation d'un alcène.

3.1.b. Représenter en perspective les deux produits formés, sans les nommer.

3.1.c. Le mélange obtenu est-il optiquement actif ? Pourquoi ?

3.2. La même réaction effectuée en présence d'une enzyme, la fumarate hydratase, conduit cette fois à un seul corps A :

Déterminer, en la justifiant, sa configuration R ou S.



3.3. La fonction alcool de la molécule A peut être transformée en groupement carbonyle.

3.3.a. Représenter la molécule finale. Quelle est la nature de la transformation ?

3.3.b. Dans le cas d'un alcool secondaire, comment peut-on réaliser cette transformation ? Quelle est la fonction obtenue ?

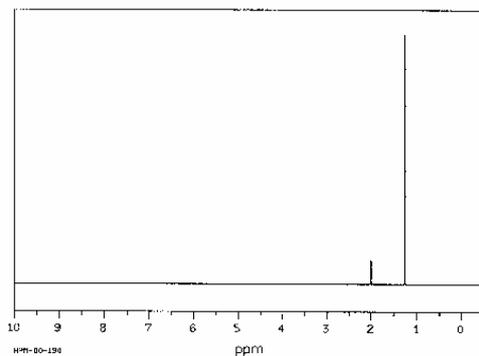
2) PHYSIQUE (18 points)

Les deux questions sont indépendantes

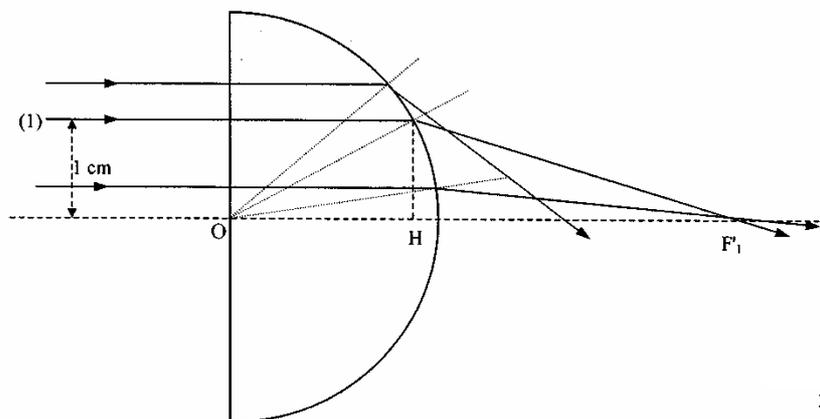
1. Cette question concerne la RMN du proton. Elle fait appel à la seule notion de couplage spin/spin, c'est pourquoi l'énoncé ne comporte pas de table de déplacement chimique.

1.1. Représenter les quatre isomères possibles pour un alcool de formule brute C₄H₁₀O.

1.2. Quelle est celle qui correspond au spectre RMN ci-dessous ? La réponse sera clairement justifiée.



2. L'objectif d'un microscope comprend - entre autres - une lentille "demi-boule": c'est une demi-sphère de rayon R = 2 cm dont la coupe principale est représentée ci-dessous :



3/5

Elle est constituée de crown, verre d'indice $n_1 = 1,5$ environ, et se trouve dans l'air d'indice $n_2 = 1$.

2.1. On considère un faisceau monochromatique de rayons lumineux incidents se propageant parallèlement à l'axe optique (cf figure ci-dessus).

- 2.1.a. Pourquoi ne peut-on pas assimiler cette lentille "demi-boule" à une lentille mince convergente ?
- 2.1.b. Quel inconvénient majeur cela représente-t-il pour la formation de l'image d'une source située à l'infini ?
- 2.1.c. Par quel terme général désigne-t-on ce genre de défaut en optique ?
- 2.1.d. Quel dispositif peut-on placer en avant de la lentille pour limiter ce phénomène ?

2.2. On considère le rayon lumineux incident (1) se propageant à 1 cm de l'axe optique. Prouver que $OF'_1 = 4,7$ cm.

2.3. Le rayon lumineux incident est en fait constitué de deux radiations, une rouge et une violette. Pour la radiation rouge, l'indice de réfraction du crown a une valeur n_{IR} différente de celle, n_{IV} , qu'il présente pour une radiation violette.

- 2.3.a. Comment se nomme ce phénomène ?
- 2.3.b. Sachant que $n_{IR} = 1,5096$ et $n_{IV} = 1,5264$, déterminer le rayon qui coupera l'axe optique au plus près du point O. Comment désigne-t-on habituellement ce défaut ?

3) CHIMIE GENERALE (16 points)

Les trois questions sont indépendantes

1. Le plomb (symbole Pb) est un métal de numéro atomique 82.

1.1. Donner la composition complète d'un atome de plomb de l'isotope 208.

1.2. La structure électronique du plomb est : $[Pb] = [Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$, [Xe] représentant la structure électronique du xénon.

Écrire la structure électronique de l'ion plomb (II).

1.3. Une étudiante affirme que le plomb se trouve dans la même colonne de la classification périodique que le carbone, de numéro atomique 6.

Confirmer ou infirmer son propos en justifiant.

2. A 25 °C, on constate qu'il est impossible de dissoudre plus de 2,20 g de chlorure de plomb (II) dans 500 mL d'eau.

2.1. Écrire l'équilibre chimique correspondant.

2.2. Calculer la solubilité du chlorure de plomb (II) en mol.L^{-1} .

On donne les masses molaires en g.mol^{-1} : Pb : 207 Cl : 35,5

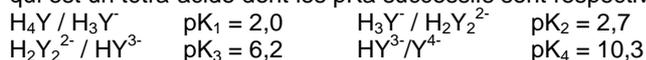
2.3. Calculer le produit de solubilité du chlorure de plomb II.

2.4. A 25 °C, le produit de solubilité de PbSO_4 (s) vaut : $K_s = 1,6 \cdot 10^{-8}$.

Du chlorure de plomb (II) ou de PbSO_4 (s), quel est le plus soluble dans l'eau à 25 °C ?

La réponse sera justifiée en comparant les solubilités.

3. Afin de doser les ions Pb^{2+} contenus dans une solution S de nitrate de plomb (II), on utilise de l'EDTA, noté H_4Y , qui est un tétra-acide dont les pKa successifs sont respectivement :



3.1. Le dosage s'effectue en milieu tamponné à $pH = 4,9$. Quelle est la forme majoritaire de l'EDTA à ce pH ? Justifier simplement à l'aide d'un diagramme de prédominance faisant apparaître uniquement pK_2 et pK_3 .

3.2. Dans un bécher, on verse 25 mL de la solution de nitrate de plomb (II) à doser, 5 mL de tampon et quelques gouttes d'orangé de xylénol (indicateur coloré de fin de réaction) qui rendent la solution violette. Il faut verser 26,7 mL de la solution d'EDTA de concentration $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ pour que la couleur de la solution contenue dans le bécher vire au jaune.

3.2.a. Écrire l'équation de la réaction de dosage sachant que des ions H^+ sont libérés et que l'espèce PbY^{2-} est formée.

3.2.b. Calculer la concentration molaire en ions Pb^{2+} dans la solution S.

3.2.c. Ce dosage est-il un dosage par précipitation ou complexométrique ou acidobasique ?

ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

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

CHIMIE ORGANIQUE

1.1. Formule 2.

1.2. Diastéréoisomères.

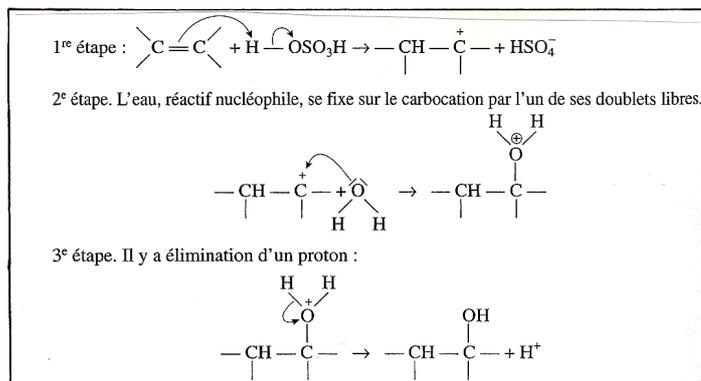
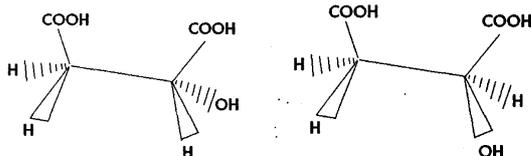
2.1.a. Liaisons intermoléculaires.

2.1.b. Liaisons intramoléculaires.

2.2. Ceci est dû à l'effet des liaisons intermoléculaires.

3.1.a. Voir encadré ci-contre

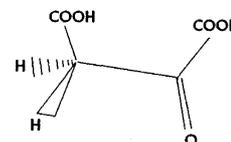
3.1.b. Voir les molécules ci-dessous :



3.1.c. Mélange inactif optiquement car racémique.

3.2. Configuration S.

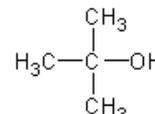
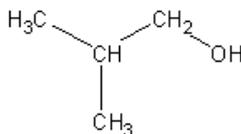
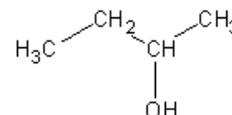
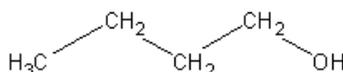
3.3.a. Molécule obtenue après oxydation :



3.3.b. Action d'un oxydant comme l'ion dichromate pour obtenir une cétone.

PHYSIQUE

1.1. Voir les molécules ci-contre :

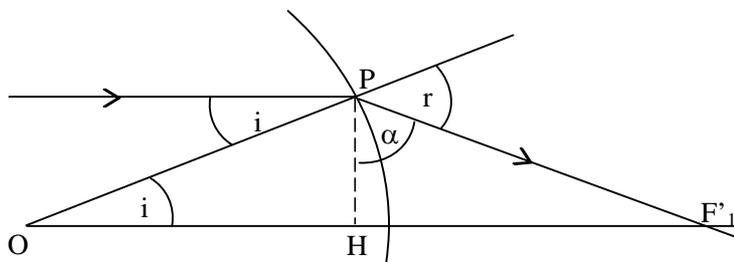


1.2. C'est le 2-méthylpropan-2-ol, pour la raison suivante : le spectre RMN montre deux pics (singulets) donc la molécule ne comporte que deux types d'hydrogènes équivalents, sans aucun couplage spin-spin donc sans hydrogène voisin. Des quatre possibilités, seul le 2-méthylpropan-2-ol est dans ce cas. On vérifie de plus que les hauteurs relatives des pics concordent (1 pour 9 : l'hydrogène de la fonction alcool est seul et les 9 hydrogènes des trois groupes méthyle sont équivalents).

2.1.a. Une lentille peut être modélisée comme une lentille mince si son épaisseur est négligeable devant le rayon de courbure de ses faces. Or ici l'épaisseur est égale au rayon d'une face ($= R$).

- 2.1.b. L'image obtenue serait floue.
 2.1.c. C'est une aberration géométrique.
 2.1.d. On peut placer un diaphragme.

2.2. Voir figure ci-contre :



On a :

$$OF'_1 = OH + HF'_1.$$

$$\sin i = \frac{PH}{OP} = 1/2 \text{ donc } i = \sin^{-1}(0,5) . \cos i = \frac{OH}{OP} \text{ d'où } OH = 2 \cos i \text{ (en cm).}$$

$$\text{Autre moyen de déterminer OH : } OH^2 + PH^2 = OP^2 \text{ d'où } OH = \sqrt{2^2 - 1^2} = \sqrt{3} \text{ cm .}$$

$$\tan \alpha = \frac{HF'_1}{PH} \text{ donc } HF'_1 \text{ en cm} = \tan \alpha ; \text{ or } \alpha = 180^\circ - r - (90^\circ - i) = 90^\circ - r + i. \text{ Il reste donc à déterminer l'angle de}$$

$$\text{réfraction } r : \text{ d'après la loi de Descartes } r = \sin^{-1}\left(\frac{n_1 \sin i}{n_2}\right) = \sin^{-1}\left(\frac{n_1}{2n_2}\right). \text{ On trouve } \alpha = 71,4^\circ \text{ environ d'où}$$

$$OF'_1 = \sqrt{3} + \tan 71,4^\circ = 4,7 \text{ cm.}$$

2.3.a. C'est la dispersion.

2.3.b. Le rayon violet (n_1 est plus grand donc r est plus grand). Ce défaut est une aberration chromatique.

CHIMIE GÉNÉRALE

- 1.1. 82 protons et électrons, 126 neutrons.
- 1.2. $[Pb^{2+}] = [Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2$
- 1.3. Oui, car $[C] = 1s^2 2s^2 2p^2$ donc même valence en np^2
- 2.1. $PbCl_2 = Pb^{2+} + 2 Cl^-$
- 2.2. $s = 1,58 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$
- 2.3. $K_S = 1,6 \cdot 10^{-5}$
- 2.4. $s(PbSO_4(s)) = 1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} < 1,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ donc $PbSO_4$ est le moins soluble
- 3.1. H_2Y^{2-}
- 3.2.a. $H_2Y^{2-} + Pb^{2+} \rightarrow PbY^{2-} + 2H^+$
- 3.2.b. Dans S, $[Pb^{2+}] = 5,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$
- 3.2.c. C'est un dosage complexométrique.

ÉPREUVE : SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GÉNIE BIOLOGIQUE

Durée : 4 heures

Coefficient : 6

Calculatrices non autorisées.

Green Fluorescent Protein

La Green Fluorescent Protein « GFP » est une protéine spontanément fluorescente isolée d'animaux (par exemple la méduse *Aequorea victoria*) dont le rôle naturel est de transférer la chimio-luminescence bleue d'une autre protéine (l'æquorine) vers le vert. Cette molécule (de même que ses dérivés) est appelée à jouer un rôle majeur en biologie dans la mesure où elle est intrinsèquement fluorescente et peut servir de marqueur polyvalent dans la cellule vivante.

1. Amélioration des propriétés biologiques de la GFP (37 points)

Afin d'étudier la structure de la GFP et d'optimiser ses propriétés biologiques par mutagenèse, on réalise son extraction à partir de la méduse *Aequorea victoria* puis sa purification.

1.1 Purification de la GFP

La purification de la GFP met en oeuvre quatre techniques chromatographiques :

- DEAE-sepharose
- Phase inverse
- DEAE-Bio-Gel
- Gel filtration

- 1.1.1. Donner le principe de la séparation par gel filtration.
- 1.1.2. Présenter le principe et les caractéristiques de la chromatographie en phase inverse. Donner un exemple de phase stationnaire utilisée.
- 1.1.3. La purification d'une protéine peut être évaluée de manière qualitative ou quantitative. Expliquer succinctement ces deux approches. Proposer une méthode adaptée à chacune.

1.2 Données structurales

La structure de la GFP a été élucidée récemment par diffraction des rayons X, ce qui a permis de définir ainsi une nouvelle classe de protéines (boîte ou bidon β : « β -can») : conformation en cylindre avec une enveloppe constituée de feuillets β protégeant des hélices α portant les fluorophores.

- 1.2.1. Décrire les différents niveaux d'organisation d'une protéine en insistant sur la nature des liaisons qui en permettent le maintien.
- 1.2.2. Représenter le schéma conventionnel d'un feuillet β et d'une hélice α dans une protéine.

Chaque molécule de GFP est un dimère dont les deux protomères de 238 résidus d'acides aminés sont identiques. La zone de contact entre les deux protomères met en évidence deux groupes de résidus :

- alanine, leucine, phénylalanine d'une part ;
- tyrosine, acide glutamique, glutamine, asparagine, sérine, arginine d'autre part.

1.2.3 Indiquer la propriété caractéristique de chacun des deux groupes de résidus intervenant dans l'association des deux protomères en dimère. Présenter les types d'interactions pouvant s'établir entre les résidus à l'intérieur de chaque groupe.

La stabilité remarquable (demi-vie de 24 heures) de la fluorescence de la GFP native s'explique par la localisation des fluorophores.

- 1.2.4 Donner la signification de l'expression « demi-vie de la fluorescence de la GFP ». À partir des données structurales de la GFP, expliquer la stabilité de la fluorescence.

1.3 Modifications de la GFP native

Dans le but de produire de nouvelles molécules fluorescentes dérivées de la GFP, on a modifié par mutagenèse dirigée la structure primaire de la GFP. De nombreuses autres molécules ont été obtenues :

- des molécules apparentées dont la CFP (*Cyan Fluorescent Protein*), la BFP (*Blue FP*), la YFP (*Yellow FP*),
- diverses GFP moins stables dont les demi-vies varient de 1 à 4 heures,
- divers marqueurs fluorescents de solubilité améliorée.

- 1.3.1. Définir «mutagenèse dirigée» et «mutagenèse aléatoire».
- 1.3.2. Dans le cas d'une mutagenèse dirigée, comment doit-on concevoir l'oligonucléotide nécessaire pour réaliser une mutation ponctuelle ? Quelle sera la conséquence de cette mutagenèse pour la protéine ?

2. Clonage du gène de la GFP (21 points)

Le gène de la GFP étant utilisé pour produire des protéines de fusion, il est nécessaire de le cloner. La méthode suivante a été mise en œuvre :

- obtention des ADNc à partir de la fraction cytosolique d'un broyat cellulaire,
 - utilisation de la bactérie *Escherichia coli* pour réaliser une banque plasmidique d'ADNc,
 - criblage de la banque à l'aide d'une sonde oligonucléotidique marquée par une technique froide.
- 2.1. Définir précisément le terme « ADNc ». Présenter à l'aide de schémas les étapes indispensables de la synthèse d'un ADNc à partir d'une fraction cytosolique.
 - 2.2. Justifier l'utilisation d'un ADNc et non pas du gène naturel pour la production de la GFP chez *E. coli*.
 - 2.3. Décrire les étapes de l'incorporation de l'ADNc au vecteur à l'aide d'adaptateurs (linkers).
 - 2.4. Donner le principe de la transformation d'une bactérie par la technique d'électroporation.
 - 2.5. Présenter les éléments essentiels d'un vecteur plasmidique de clonage chez *E. coli* et préciser leur rôle.

3. La GFP, outil de recherche de nouveaux anti-microbiens (26 points)

Un groupe pharmaceutique a financé l'étude de voies métaboliques spécifiques du processus infectieux, en espérant découvrir de nouvelles cibles d'antibiotiques.

La stratégie de cette société repose essentiellement sur la technologie dite «*Differential Fluorescence Induction*» (DFI : induction différentielle de fluorescence) : des souches pathogènes ont été transformées par des vecteurs exprimant la GFP sous le contrôle de différents promoteurs de gènes liés au processus infectieux. L'action d'un agent antimicrobien est alors repérée par la diminution de la fluorescence des souches transformées.

- 3.1. Définir le terme « promoteur ».
- 3.2. Le gène codant la GFP est utilisé dans cette technologie comme gène rapporteur.
Définir le terme « gène rapporteur ».
Préciser le rôle d'une telle construction dans le contexte de l'étude réalisée.
- 3.3. À l'aide d'un schéma, indiquer trois cibles des antibiotiques chez les bactéries et citer, pour chacune d'elle, un antibiotique actif.
- 3.4. Présenter quatre mécanismes de résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique.
- 3.5. Le dénombrement des bactéries fluorescentes peut être réalisé en cytofluorimétrie de flux.
Décrire le principe de la cytofluorimétrie de flux dans un contexte général et exposer également le principe du tri des cellules.

4. La GFP, outil de biologie cellulaire (36 points)

La GFP est utilisée pour produire des protéines de fusion afin de marquer par fluorescence divers constituants cellulaires. Par exemple, la GFP permet l'étude de la distribution dans l'espace de certains composants des chromosomes (centromères, télomères, gènes actifs et inactifs...) qui sont visualisés en microscopie confocale.

- 4.1. Définir « télomère » et « centromère » ; préciser leur(s) rôle(s) respectif(s).

L'utilisation de la GFP permet aussi l'analyse des mouvements des chromosomes au cours des divisions cellulaires (mitose et méiose) et la mise en évidence du rôle du cytosquelette dans des mouvements intracellulaires variés.

- 4.2. Réaliser des schémas annotés d'une cellule diploïde ($2n = 6$) en anaphase I et en anaphase II de méiose, ainsi qu'en anaphase de mitose.
- 4.3. Citer les trois constituants filamenteux du cytosquelette.
Décrire la structure moléculaire de chacun d'entre eux.

La GFP est un outil de marquage qui peut constituer une alternative à l'utilisation des anticorps marqués, qu'ils soient d'origine polyclonale ou monoclonale, pour le repérage des ultra structures cellulaires.

- 4.4. Les anticorps monoclonaux sont généralement des immunoglobulines G.
Présenter la structure d'une IgG sous forme d'un schéma annoté.
- 4.5. Définir le terme « anticorps monoclonaux ».
- 4.6. Présenter la démarche d'obtention d'un clone d'hybridome producteur d'anticorps monoclonaux : préciser les caractéristiques des cellules mises en jeu et la stratégie de sélection des hybridomes.

ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

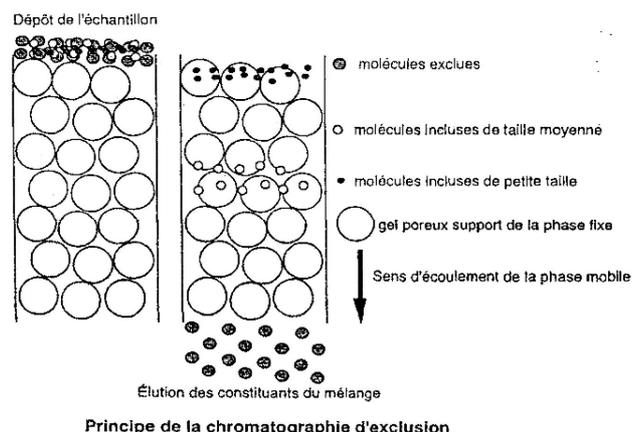
Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

1.1.1. Le principe repose sur les capacités différentes des molécules à pénétrer dans les pores des grains du gel en fonction de leur taille et de leur forme :

- les très grosses molécules dont le rayon de Stokes est supérieur au rayon des pores des billes sont exclues, ne pénètrent jamais dans les grains du gel et traversent rapidement le support chromatographique en empruntant le volume mort
- les molécules plus petites, dont la taille est inférieure au diamètre des pores des billes, sont incluses, pénètrent plus ou moins profondément dans les grains du gel en fonction de leur rayon de Stokes, et sont plus ou moins retardées dans leur traversée du lit du gel.

Les molécules sont éluées dans l'ordre des tailles, donc des masses molaires, décroissantes.

Voir le schéma (non demandé) ci-contre :



1.1.2. La phase stationnaire apolaire et la phase mobile moyennement polaire : les molécules les plus hydrophobes sont les plus retenues.

Exemple : silice greffée par de longues chaînes carbonées (C18) ou des cycles aromatiques, apolaires.

1.1.3.

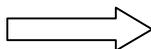
Approche qualitative	Approche quantitative
Mise en évidence de la présence de la protéine Vérification de sa pureté par la recherche de protéines contaminantes	Dosage des protéines et de la protéine d'intérêt Détermination du rendement et du taux de purification
Electrophorèse de type SDS-PAGE Méthode immunologique	Méthodes de dosage global des protéines : Biuret, Folin, Bradford... Méthode de dosage spécifique de la protéine d'intérêt

1.2.1. Structure primaire : séquence des acides aminés liés par liaison peptidique (liaison covalente)

Structure secondaire : : formation d'un squelette organisé (hélices alpha, feuillets bêta) grâce aux liaisons (ou interactions) hydrogène des chaînes latérales.

Structure tertiaire : génération d'une forme globale par repliements dans l'espace grâce à l'intervention des liaisons ou interactions de faible énergie (hydrogène, hydrophobes, Van der Waals) et aux liaisons covalentes des ponts disulfures.

Structure quaternaire : association de sous unités, identiques ou différentes, par des interactions de faible énergie ou des ponts disulfures.

1.2.2. Hélice α  ou  Feuille β 

1.2.3. Ala, Leu, Phe : chaînes latérales hydrophobe, donc interactions hydrophobes possibles.

Tyr, Glu, Gln, Asp, Ser, Arg : chaînes latérales non chargées (donc interactions hydrogène possibles) ou hydrophiles (donc interactions ioniques possibles).

1.2.4. C'est le temps au bout duquel la moitié de la fluorescence initiale a été perdue.

Les fluorophores, portés par les hélices α , sont situés à l'intérieur de l'enveloppe constituée par les feuillets β

1.3.1. Mutagenèse dirigée : processus qui modifie de manière connue une séquence nucléotidique choisie.

Mutagenèse aléatoire : processus qui modifie une ou plusieurs séquences nucléotidiques au hasard dans le génome (nature et position de la mutation inconnues).

1.3.2. Fabriquer l'oligonucléotide complémentaire de cette séquence en modifiant un nucléotide.

Le nucléotide modifié permettra de modifier un codon dans le gène et donc un acide aminé dans la protéine.

2.1. ADNc : c'est un ADN complémentaire d'un ARN messager mature d'origine eucaryote.

① : extraction des ARN totaux

② : hybridation d'une amorce polydT sur la queue polyA ou d'une amorce aléatoire hexanucléotidique

③ : action de la transcriptase inverse assurant la synthèse de l'ADNc par polymérisation des dNTP en présence de Mg^{++}

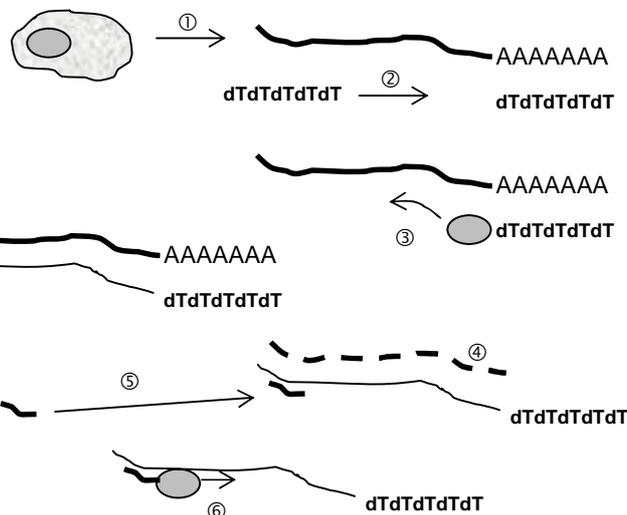
② + ③ = synthèse du 1^{er} brin

④ : hydrolyse ou élimination de l'ARN matrice initial

⑤ : hybridation d'une 2^{ème} amorce

⑥ : action de l'ADN polymérase, permettant la synthèse du 2^{ème} brin

④ + ⑤ + ⑥ = synthèse du 2^{ème} brin



2.2. *E. coli* est une bactérie ; elle est donc incapable d'épisser les introns présents habituellement dans les gènes eucaryotes, et produira une protéine incomplète. De plus la taille du gène est souvent trop grande à cause des introns et dépasserait la capacité du vecteur.

2.3. L'adaptateur est un ADN double brin à bouts francs de petite taille possédant un site de restriction. On le ligature à l'ADNc par une ligase capable de le faire : l'ADN ligase du phage T4. On hydrolyse ensuite par la même enzyme de restriction générant des extrémités cohésives, d'une part le vecteur, d'autre part l'ADNc muni de ses adaptateurs. On effectue enfin une ligature qui permet d'obtenir le vecteur recombiné.

2.4. On soumet les cellules, placées en présence du vecteur de transformation dans un milieu désionisé, à un courant bref et intense qui provoque la formation de pores transitoires qui permettent l'entrée du vecteur.

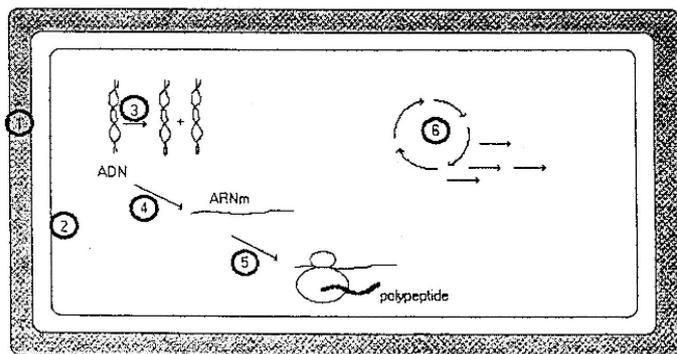
2.5.

Site de réplication chez <i>E. coli</i>	Permet la réplication du vecteur et sa transmission verticale lors de la multiplication bactérienne
Gène de résistance à un agent antimicrobien	Marqueur de transformation : permet de sélectionner les bactéries transformées par le vecteur (natif ou recombiné)
Au moins un site unique de restriction ou un site multiple de clonage (SMC) contenant des sites uniques d'enzymes différentes, situé dans le gène marqueur d'insertion	Permet d'insérer le fragment d'intérêt dans le gène marqueur d'insertion
Gène contenant un(des) site(s) unique(s) de restriction	Marqueur d'insertion du fragment d'intérêt : lorsque ce fragment est inséré, l'expression de ce gène est interrompue et le repérage des clones transformés par le vecteur recombiné est donc possible par leur phénotype différent de celui des clones transformés par le vecteur natif

3.1. C'est une séquence nucléotidique sur l'ADN, en amont de chaque gène, où se fixe l'ARN polymérase lors de l'initiation de la transcription, qui est orientée.

3.2. C'est un gène codant une protéine dont l'activité est facile à mettre en évidence. Ici, la fluorescence de la GFP est exprimée lorsque son gène est sous le contrôle d'un gène intervenant dans le pouvoir pathogène. Une diminution de cette expression montre un blocage de cette expression dû à l'action de l'agent antimicrobien testé.

3.3. Schéma demandé et exemples de cibles et d'antibiotiques :



- ① : paroi (β -lactamines)
- ② : membrane plasmique (polymyxine, colistine)
- ③ : réplication (novobiocine, mitomycine, quinolones)
- ④ : transcription (rifampicine)
- ⑤ : traduction (chloramphénicol, streptomycine)
- ⑥ : métabolisme (sulfamides)

3.4. Exemples de mécanismes de résistance aux antibiotiques :

- modification de la perméabilité à l'antibiotique
- efflux : évacuation active de l'antibiotique par une pompe membranaire
- présence d'enzymes d'inactivation des molécules d'antibiotiques
- mutation : modification, disparition de la molécule cible de l'antibiotique
- modification d'une voie métabolique cible d'un sulfamide

3.5. Principe général de la cytométrie en flux :

- les cellules de la suspension sont individualisées à l'intérieur de microgouttelettes : 0 ou 1 cellule par goutte (passage de la suspension diluée dans un vibreur ultrasonique provoquant la formation d'un flux de microgouttes) ;
- le flux de microgouttelettes est illuminé par un rayon laser ;
- analyse de la lumière dispersée et de la lumière de fluorescence émises par chaque goutte (détecteurs de lumière dispersée + détecteurs de lumière de fluorescence) ;
- Traitement informatique des données.

Fonction de tri :

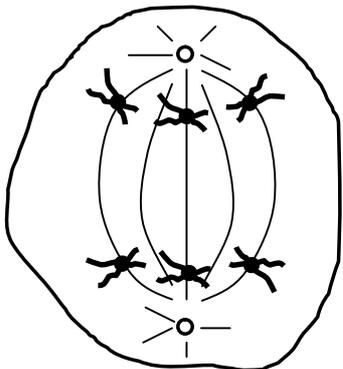
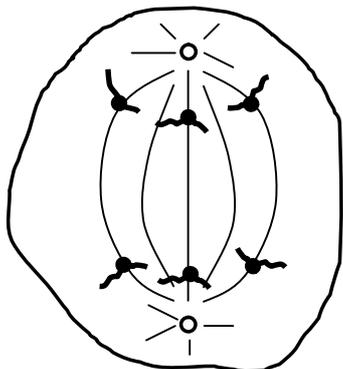
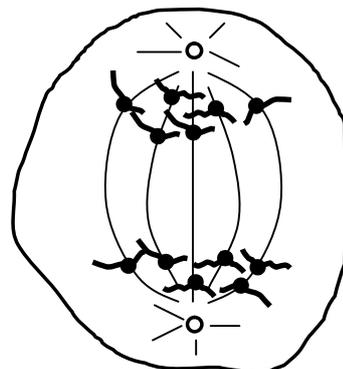
- Charge électrique (+ ou - ou 0) de la microgoutte en fonction de la nature de la cellule présente : le choix est établi à partir d'un ou plusieurs critères et le signal de charge est envoyé par le système informatique de traitement des données ;

- Tri des gouttes chargées (ou non) par passage du flux entre deux plaques électriques de charges opposées : gouttes chargées + déviées vers plaque - ; gouttes chargées — déviées vers plaque + ; gouttes non chargées non déviées = gouttes contenant un amas de cellules ou aucune cellule ;
- Collecte des cellules dans trois récipients selon les trois axes de partage du flux de gouttelettes.

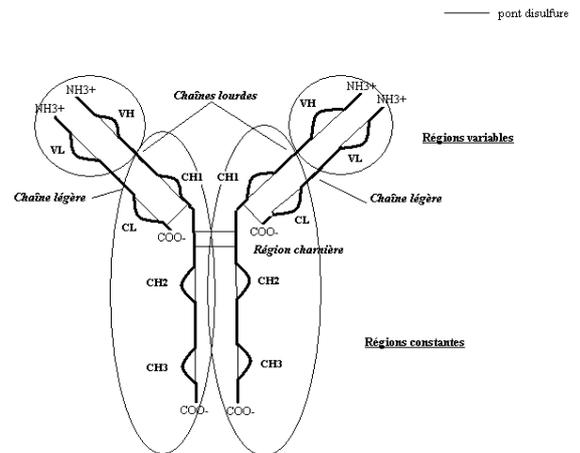
4.1 Télomère = séquence nucléotidique répétitive non codante située à l'extrémité des molécules linéaires d'ADN dans les chromosomes eucaryotes. (Ces séquences sont allongées périodiquement par la télomérase pour compenser la perte de nucléotides qui se produit à chaque cycle de réplication à l'extrémité des molécules d'ADN linéaires).

Centromère = constriction sur le chromosome mitotique qui maintient ensemble les chromatides. Le centromère est également le site de fixation du kinétochore (centre organisateur de microtubules du fuseau mitotique) qui joue un rôle important dans la séparation des chromosomes au cours de la division cellulaire.

4.2.

		
Anaphase 1 de la méiose : séparation des chromosomes homologues à 2 chromatides chacun aux 2 pôles de la cellule	Anaphase 2 de la méiose : séparation des chromatides de chaque chromosome	Anaphase de la mitose : séparation des chromatides

- 4.3. Filament d'actine ou microfilament : polymère hélicoïdal à deux brins (diamètre fin) d'une protéine globulaire, l'actine.
- Microtubule : polymère d'une protéine globulaire, la tubuline. Structure cylindrique constituée par l'association de plusieurs protofilaments ; (diamètre important).
- Filament intermédiaire : polymère de protéines fibreuses diverses (diamètre intermédiaire).



Représentation schématique de l'immunoglobuline G1

4.5. Anticorps provenant d'un seul clone de lymphocyte B activé par l'antigène.

4.6. ① Immunisation. ② Hybridation : les cellules hybrides résultant de la fusion de cellules de myélome non sécrétant d'Ac et déficient HGPRT- (ou TK -) et cellule « immortelle » avec des lymphocytes B sensibilisés qui proviennent de la rate d'un animal immunisé par l'antigène « non immortel » HGPRT + (ou TK+).

③ Sélection des hybridomes sur milieu HAT : A aminoptérine, T thymidine, H hypoxanthine. L'aminoptérine est un poison métabolique bloquant voie principale de synthèse de certaines bases azotées. Hypoxanthine et thymidine sont des précurseurs d'une voie métabolique annexe de synthèse des bases azotées.

④ Clonage par dilution limite des hybridomes sélectionnés.

⑤ Détection des clones d'hybridomes producteurs d'anticorps par test immunologique (RIA ou ELISA).

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

1^{ère} partie : ÉTUDE DE PROJET

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

L'usage d'un dictionnaire anglais français et d'une calculatrice est autorisé.
Matériel nécessaire : une feuille de papier millimétré.

Toxines de *Bacillus thuringiensis* et biopesticides

Les δ -endotoxines produites par *Bacillus thuringiensis* représentent 90% des biopesticides commercialisés. Parallèlement aux δ -endotoxines spécifiques d'espèces d'insectes, les *Bacillus thuringiensis* peuvent produire également une β -exotoxine non spécifique, toxique pour les animaux. De ce fait, il est nécessaire de mettre au point des méthodes de dosage de la β -exotoxine permettant de garantir l'absence de celle-ci dans les biopesticides utilisés. Pour éviter la pulvérisation des plantations par des cultures de *Bacillus thuringiensis*, la recherche s'oriente également vers le développement de plantes transgéniques produisant des δ -endotoxines.

1. Détection de la β -exotoxine dans les biopesticides (53 points)

1.1. Structure de la β -exotoxine ; séparation et dosage par HPLC : **document 1.**

1.1.1. À quel groupe de biomolécules s'apparente la β -exotoxine ? Justifier. **Document 1.1**

1.1.2 Étude du **document 1.2** :

1.1.2.1. Sous forme d'un schéma fonctionnel, donner les différents éléments du système chromatographique utilisé. Préciser leur rôle.

1.1.2.2. Quel est le mode de séparation utilisé ? Justifier.

1.1.2.3. Quel est le mode d'éluion utilisé ? Justifier.

1.1.2.4. Justifier le choix de la longueur d'onde de mesure.

1.1.2.5. Indiquer et justifier les traitements préliminaires des échantillons et des solvants lors de la réalisation d'une HPLC.

1.1.2.6. Déterminer le volume d'une fraction et le volume de tampon nécessaire pour réaliser l'analyse d'un échantillon de β -exotoxine.

1.1.2.7. Donner le temps de rétention de la β -exotoxine. Calculer son volume d'éluion et le facteur de dilution de l'échantillon.

1.2. Mise au point d'une technique immuno-enzymatique de dosage : **document 2.**

Après avoir préparé les antigènes (**document 2.1**), obtenu les anticorps chez le lapin (**document 2.2**) et testé ces anticorps (**document 2.3**), on veut effectuer le dosage de la β -exotoxine par une méthode ELISA (**document 2.4**).

1.2.1. Préparation des antigènes : **document 2.1**

1.2.1.1. Pourquoi doit-on coupler la toxine à une protéine ?

1.2.1.2. Donner l'équation du couplage de la β -exotoxine et d'une protéine (symbolisée R-NH₂), par la méthode au glutaraldéhyde (formules semi développées demandées).

1.2.1.3. Commenter les résultats du tableau et les mettre en relation avec les données du **document 1.1**.

1.2.1.4. Quelle méthode de couplage semble la plus adaptée pour l'obtention d'anticorps ? Justifier.

1.2.2 Dosage de la (β -exotoxine par méthode ELISA : **documents 2.3 et 2.4.**

1.2.2.1. Pourquoi n'utilise-t-on pas le même antigène pour tapisser la plaque et pour immuniser les lapins ?

1.2.2.2. Comment peut-on interpréter les résultats du **document 2.3** ?

1.2.2.3. Sur un grand schéma, traduire les étapes du protocole de dosage de la β -exotoxine, en faisant apparaître les réactifs et les temps d'action. (**document 2.4**)

1.2.2.4. Dans quel domaine de concentrations peut-on utiliser la courbe pour le dosage de la β -exotoxine dans les biopesticides ? (**document 2.4**)

1.3. Influence de la composition du milieu de culture sur la production de la β -exotoxine par *Bacillus thuringiensis* variété *kurstaki*.

1.3.1. Citer les principales caractéristiques du genre *Bacillus*.

1.3.2 On étudie la production de β -exotoxine dans trois milieux différents, en dosant la toxine par la technique ELISA précédemment mise au point. (**document 3**).

1.3.2.1. Comment mesure-t-on l'absorbance des suspensions bactériennes après 12 h de culture ? Justifier

1.3.2.2. Déterminer pour le milieu 3 les différentes phases de la croissance.

1.3.2.3. Comment détermine-t-on :

- le temps de génération,
- la vitesse spécifique de croissance maximale ?

Évaluer ces deux paramètres dans le cas de la culture sur milieu M1 et M3. Conclure.

1.3.2.4. Expliquer le phénomène observé dans le milieu M2 entre la 4^{ème} et la 14^{ème} heure de culture.

1.3.2.5. Commenter la cinétique de production de cette toxine. À quel type de métabolite appartient-elle ?

1.3.2.6. Quel est l'effet de la teneur en glucide du milieu sur la production de la β -exotoxine? En déduire le milieu le plus adapté à la production de biopesticide.

2. Les δ -endotoxines et le riz transgénique (27 points)

Les larves de *Scirpophaga incertulas* (insecte lépidoptère) sont les principaux ravageurs responsables des diminutions massives de rendement des récoltes de riz. Ces larves sont sensibles à différentes δ -endotoxines, dont CryIAc.

Un cultivar de riz transgénique exprimant la toxine CryIAc a été développé par transfection de plants de riz, avec le plasmide recombinant pBCT1.

2.1 Le plasmide pBCT1.

2.1.1. Quel est le rôle des éléments soulignés du plasmide pBCT1 présenté dans le document 4 ?

2.1.2. À quelle catégorie de vecteur appartient ce plasmide ? Justifier.

2.1.3. Que désigne le sigle BamHI ?

2.2 La transfection des cals embryogènes de riz : **document 5**.

2.2.1. Définir un cal.

2.2.2. Quelle est la méthode utilisée pour transférer ces cellules végétales ? Citer deux autres moyens de transfection d'une cellule eucaryote en général.

2.2.3. Quel est le rôle de l'hygromycine B dans le milieu de culture des cals « bombardés » ?

2.2.4. Indiquer le rôle des molécules 6-benzylaminopurine et acide α -naphthalene-acétique du milieu de culture.

2.3 Résultats, étude des plantes transgéniques : **document 6**.

2.3.1 Recherche de la présence du gène par PCR (polymerase chain reaction) document 6.1.

2.3.1.1 Sur un schéma, résumer le principe de la technique PCR, positionner les amorces, écrire les séquences bordantes du fragment de gène à amplifier, préciser le sens de l'élongation.

2.3.1.2 Pourquoi utilise-t-on des amorces de cette dimension ? Quelles doivent être les autres caractéristiques des amorces ?

2.3.2. Résultats de tests effectués sur les plants venant d'être régénérés à partir des cals : **document 6.2**.

Commenter le tableau :

2.3.2.1. Quel est le nombre total de plants transformés :

- résistants à l'hygromycine,
- ayant intégré le gène,
- exprimant le gène ?

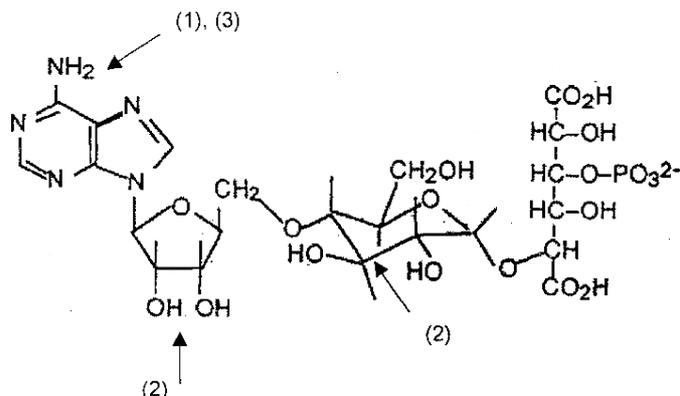
2.3.2.2. Analyser et interpréter les cas n° 4, 6 et 9.

DOCUMENT 1

Document 1.1. : Structure of β -exotoxin

Arrows show positions of conjugation by :

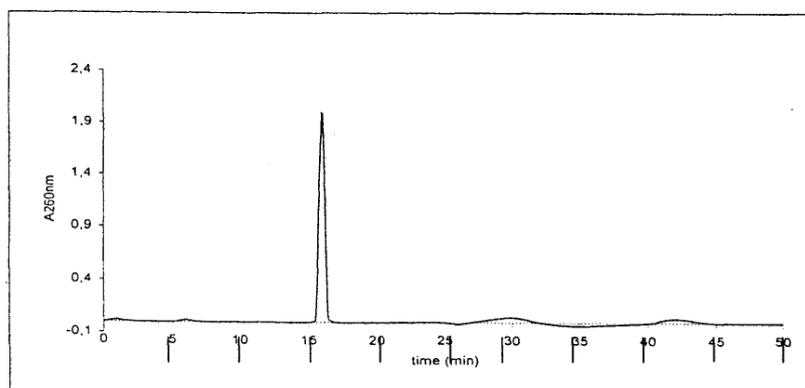
- 1 : diazotation
- 2 : periodate coupling
- 3 : glutaraldehyde coupling



Document 1.2. : HPLC β -exotoxin assay

A varian 9010 HPLC system with a 9050 UV-visible detector set at $\lambda = 260 \text{ nm}$ and a octadecylsilane bonded phase (C18) column (15 cm x 4,6 mm, 5 μm packing) from Supelco, Inc. (Bellefonte, PA) was used to fraction samples according to the method of Campbell et al. (1987).

The injection volume was 10 μL and fractions were collected every minute from 0 to 50 min. A mobile phase of 50 $\text{mmol.L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 3,0 with a flow rate of 2 mL.min^{-1} provides adequate conditions to separate the β -exotoxin components.



DOCUMENT 2

Document 2.1 : Préparation des antigènes.

La β -exotoxine est couplée à 2 protéines, soit à la sérum albumine de boeuf (SAB) soit à l'hémocyanine de mollusque, en utilisant trois techniques de couplage différentes :

- par diazotation,
- par la méthode au periodate,
- par la méthode au glutaraldéhyde.

Le couplage de la toxine avec les protéines est évalué en déterminant le rapport molaire β -exotoxine / protéine) par spectrophotométrie d'absorption à 260 et à 280 nm. Les résultats obtenus pour les 3 méthodes de couplage à l'hémocyanine sont les suivants :

	diazotation	glutaraldéhyde	periodate
β -exotoxine / hémocyanine	5,4	6,6	99

Document 2.2 : Obtention des anticorps par immunisation des lapins.

Les lapins ont été immunisés, par voie intradermique avec le conjugué (β -exotoxine -hémocyanine) obtenu par une des 3 méthodes de couplage, comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

	diazotation	glutaraldéhyde	periodate
Lapins n°	939 et 942	948 et 950	957 et 961

Après une première immunisation avec 100 μg de conjugué en présence d'adjuvant complet de Freund, on pratique trois rappels à quatre semaines d'intervalle avec le même conjugué en présence d'adjuvant incomplet de Freund. Après la dernière injection, on prélève le sang des animaux, on prépare les immun-sérums qui sont testés selon le protocole du **document 2.3**.

Document 2.3.: Dosage immuno-enzymatique indirect des Anticorps de lapin anti- β -exotoxine.

Les puits d'une microplaque de titration sont tapissés en déposant 100 μL de la β -exotoxine conjuguée à la SAB en tampon carbonate 0,5 mol.L^{-1} , pH 9,6 à la concentration de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les plaques sont recouvertes et incubées une nuit à 4°C.

Le deuxième jour, les plaques tapissées sont lavées 5 fois avec du PBS pour éliminer l'antigène non fixé. Des dilutions en série de l'antisérum, en PBS, sont ajoutées à raison de 100 μL par puits et les plaques sont incubées 2 h à température ambiante. Les plaques sont ensuite lavées 5 fois. 50 μL d'IgG de chèvre anti-IgG de lapin marquées à la phosphatase alcaline, diluées en PBS (1/2500), sont ajoutées dans chaque puits et les plaques sont incubées 2 h à température ambiante. Après 5 nouveaux lavages, l'activité phosphatasique est mesurée en

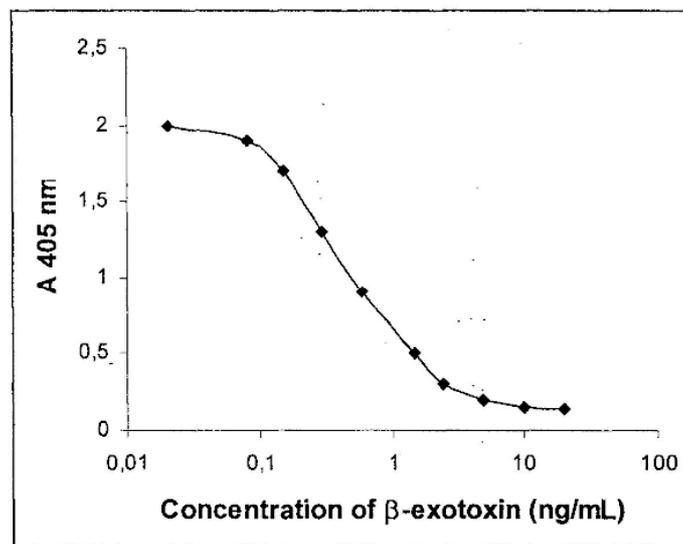
ajoutant dans chaque puits 100 µL de pNPP (1mg.mL⁻¹ en tampon diéthanolamine, pH 9,8). L'intensité de la coloration est lue à 405 nm après 30 min d'incubation à température ambiante. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Antigène adsorbé sur la plaque = β-exotoxine couplée à la SAB par	Antisérums testés provenant des lapins n°					
	939	942	948	950	957	961
Diazotation	-	-	-	-	-	++
Glutaraldéhyde	-	-	-	-	+	++
Periodate	-	-	+	++	++	+++

Intensité de la coloration : (-) = faible, (+) = modérée, (++) = élevée, (+++) = très élevée.

Document 2.4 : (3-exotoxine quantification by competitive enzyme immunoassay)

The procedure for competitive ELISA was essentially the same as that for the indirect ELISA described above. Firstly, the plates were coated by adding β-exotoxin-BSA conjugates and incubated overnight. In the same time, dilutions of β-exotoxin or sample containing exotoxin in distilled water were incubated overnight at room temperature with the rabbit anti-β-exotoxin antiserum. Then, those dilutions were added to the coated and washed plates. From there, the enzyme immunoassay was performed as in **document 2.3**. An example of calibration curve obtained with rabbit n°957 antiserum is given below :

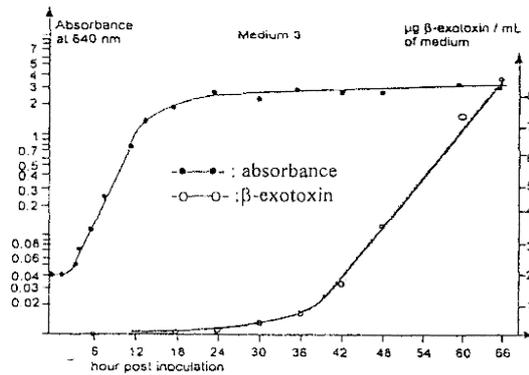
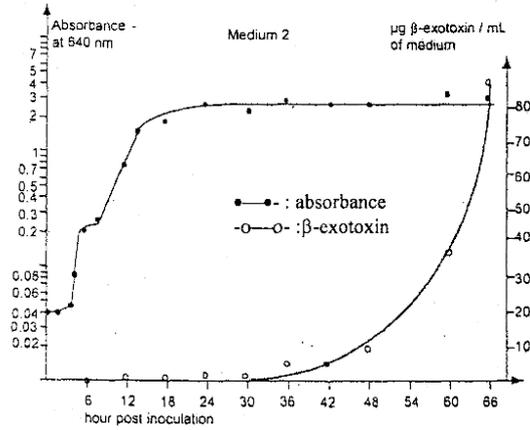
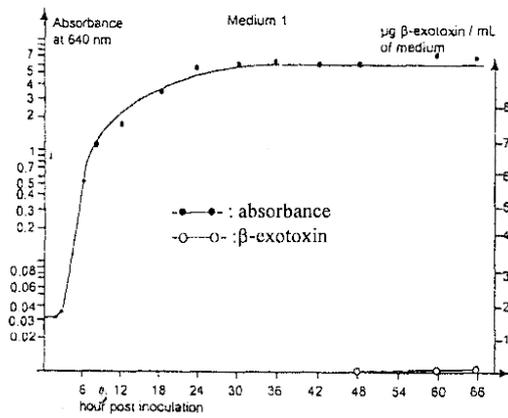


DOCUMENT 3

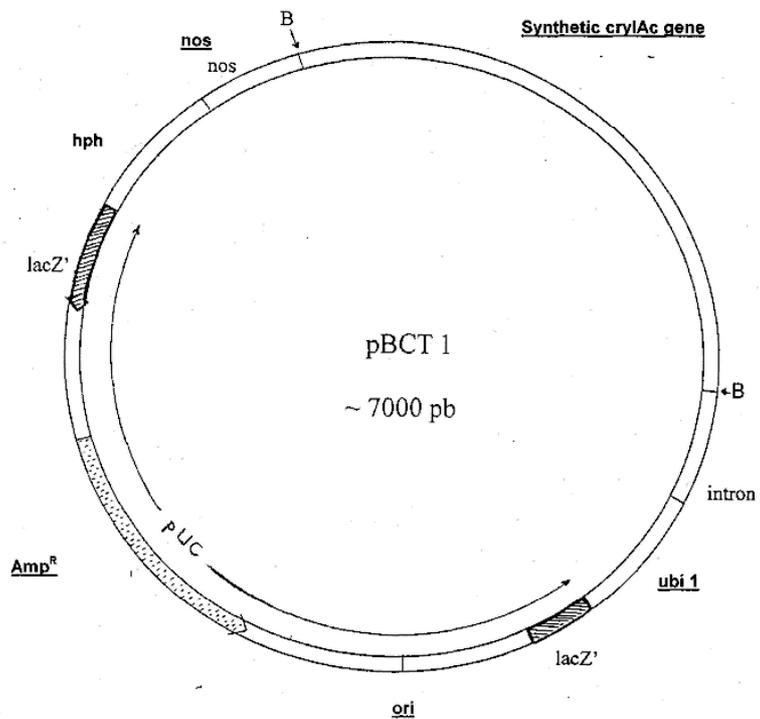
Influence de la composition du milieu de culture sur la production de la β-exotoxine par *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Btk).

Trois fioles d'Erlenmeyer de 250 mL, contenant chacune 50 mL d'un milieu différent (M1, M2, M3) préchauffées à 34°C, sontensemencées avec un inoculum de 500 µL. Les fioles sont incubées dans un bain thermostaté à 34°C, sous agitation de 200 osc/min. L'inoculum correspond à une culture d'une nuit en bouillon trypticase soja de Btk incubé dans un bain thermostaté à 34°C, sous agitation de 200 osc/min. A intervalles de temps réguliers, des aliquots sont prélevés dans chaque fiole puis congelés en attendant l'analyse par ELISA.

Composition	Pancreatic digest of casein (g/L)	Papaic digest of soybean meal (g/L)	NaCl (g/L)	Dextrose (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	pH à 25°C
M1	17.0	3.0	5.0	15.0	2.5	7.3 ± 0.2
M2	17.0	3.0	5.0	2.5	2.5	7.3 ± 0.2
M3	17.0	3.0	5.0	-	2.5	7.3 ± 0.2



DOCUMENT 4 : Plasmide pBTC 1



B = *Bam*HI

hph = gène codant l'hygromycine phosphotransferase ; l'hygromycine phosphorylée est inactive.

nos = nopaline synthetase terminator

ubi 1 = ubiquitin 1 promoter

ubiquitine = protéine conservée chez tous les eucaryotes

DOCUMENT 5

Rice transformation :

Embryogenic calli were initiated from tissues of mature seed embryo of indica rice (IR64). One-month-old calli were bombarded with plasmid DNA pBTC1 using a Bio-Rad 1000/He Biolistic gun at 1100 psi (psi = pound per square inch). After 24 h, the bombarded calli were transferred to fresh medium containing 50 µg/mL hygromycin B. After two sub-cultures, each lasting two weeks, rapidly growing calli were separated and cultured in the selection medium for another three sub-cultures. Surviving calli were transferred to the preregeneration medium and incubated under 16 h light / 8 h dark photoperiod (3 000 lux) at 24°C for ten days, followed by transfer to Murashige and Skoog (MS) medium without any growth regulators for plant regeneration.

Murashige and Skoog (MS) medium = salts and vitamins

Preregeneration medium = MS medium + 3 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) + 1 mg/L α-naphtaleneacetic acid (ANA) + 3% sucrose + 1% agar, pH 5,7.

DOCUMENT 6

Document 6.1.

PCR analysis employed the following primers :

5'-ACCAGATCATGGCCTCTCCAGTT-3'

5'-TTCAAGATTGTA CT CAGCCTCAAG-3'

for amplification of a 905-bp fragment from the *cryIAc* gene.

Document 6.2.: Summary of transformation experiments :

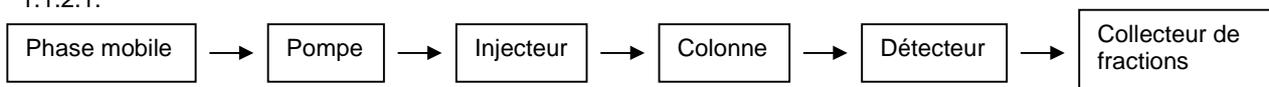
Cal number	Mass bombarded (mg)	Number of plants		
		Hyg-resistant	cryIAc	showing high cryIAc protein expression
1	462	11	8	-
2	384	7	3	-
3	457	17	12	2
4	387	14	11	-
5	456	9	6	1
6	389	-	-	-
7	417	16	12	1
8	433	8	6	-
9	446	24	18	2

ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

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

1.1.1. Nucléoside, puisqu'il y a présence d'une base azotée associée à une molécule de ribose.

1.1.2.1.



- Phase mobile : entraîne les solutés.
- Pompe : aspire la phase mobile et l'envoie (à raison de 2 mL/min) à travers la colonne.
- Injecteur : permet d'introduire l'échantillon à analyser, à pression atmosphérique, dans la colonne sous pression sans introduire d'air ni modifier la pression.
- Colonne : contient la phase stationnaire permettant la séparation des solutés de l'échantillon.
- Détecteur : spectrophotomètre UV-visible mesure l'absorbance de l'éluat.
- Collecteur de fraction : recueille les fractions en sortie de colonne (ici 1 fraction par min).

1.1.2.2. C'est une séparation par chromatographie en phase inverse (phase stationnaire apolaire en C18 et phase mobile polaire), on parle aussi de chromatographie de partage.

1.1.2.3. L'éluat est isocratique, la composition de la phase mobile est constante.

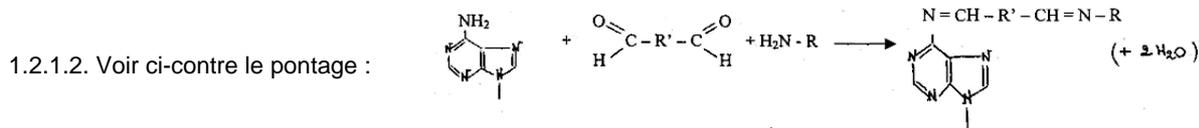
1.1.2.4. $\lambda = 260 \text{ nm}$ car c'est une molécule proche d'un nucléoside, qui possède donc le même pic d'absorption.

1.1.2.5. Une filtration de l'échantillon permet d'éviter le colmatage de la colonne, et le dégazage du solvant d'éluat est indispensable pour obtenir une bonne séparation.

1.1.2.6. 1 fraction par minute sous un débit de 2 mL/min, donc le volume d'une fraction est de 2 mL. Le volume de solvant est donc au total de volume d'une fraction x nombre de fractions, soit $2 \times 50 = 100 \text{ mL}$.

1.1.2.7. On observe sur le chromatogramme que la β -exotoxine est éluée à la fraction n°16, ce qui correspond à un volume d'éluat de $16 \times 2 = 32 \text{ mL}$. La β -exotoxine est recueillie dans 2 mL d'éluat, alors que le volume injecté était de 10 μL , soit un facteur de dilution de $2000/10 = 200$ fois.

1.2.1.1. La β -exotoxine est une petite molécule peu ou pas immunogène (haptène), elle doit donc être couplée à une molécule immunogène comme la SAB ou l'hémocyanine.



1.2.1.3. Le couplage par diazotation ou avec le glutaraldéhyde donne des résultats voisins sans doute car la fixation a lieu sur le même site - NH_2 de l'adénine (voir document 1.1.) ; dans le cas du couplage par le periodate, la réaction a lieu sur deux sites (voir document 1.1.) ce qui explique un rapport β -exotoxine/protéine plus élevé.

1.2.1.4. La méthode au periodate, car elle permet la fixation de 20 fois plus de β -exotoxine par protéine.

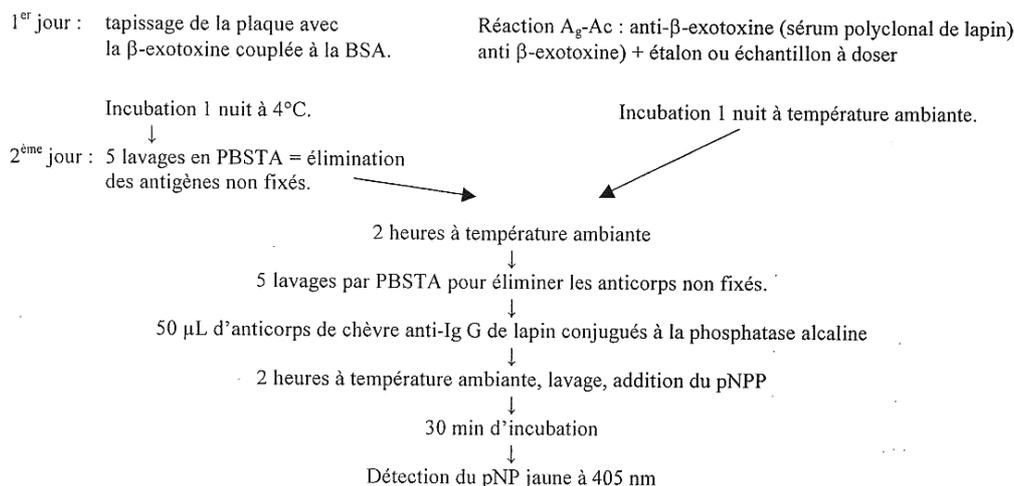
1.2.2.1. Pour éviter la fixation des anticorps dirigés contre la protéine porteuse et ainsi augmenter la spécificité de la réaction ELISA.

1.2.2.2. Le même lot de lapins donne des résultats différents selon la méthode ELISA : le 961 sert de témoin de détection positif puisqu'il y a réponse au moins + dans de nombreux cas et +++ pour l'immunisation par l'antigène couplé par la méthode au periodate. Cette méthode de détection est la meilleure, quelle que soit la méthode d'immunisation (lapins 957 et 961).

La méthode par diazotation (lapins n° 939 et 942 : préparation de l'antigène immunisant et de l'antigène de détection) ne donne pas de résultat positif, il n'y a donc pas d'immunisation (résultat négatif quelle que soit la méthode de détection).

La méthode d'immunisation par l'antigène couplé par le glutaraldéhyde (lapins 948 et 950) donne des résultats faibles mais la détection par l'antigène couplé par le periodate donne une réponse plus forte : cette méthode ELISA est sans doute plus sensible.

1.2.2.3. Faire apparaître sur le schéma :



1.2.2.4. La partie linéaire de la courbe est exploitable, elle correspond aux concentrations de 0,1 à 1 ng/mL.

1.3.1. Ce sont des bacilles Gram⁺ aérobies ou aéroanaérobies, parfois sporulés et formant souvent des chaînettes, d'origine tellurique et saprophytes de l'environnement, ils possèdent une catalase.

1.3.2.1. Après 12 h de culture, toutes les absorbances déterminées sont supérieures à 1, donc obtenues après dilution des échantillons car les valeurs mesurées sont supérieures à la limite de linéarité de la méthode.

Remarque : pour les questions 1.3.2.2. et 1.3.2.3. les courbes analysées doivent être du type $\ln(X) = f(t)$, comme c'est le cas de celles du document 3.

1.3.2.2. Les phases de latence et accélération durent environ de 0 à 4 h soit 4 heures ; la phase exponentielle de 4 h à 12 h, soit 8 heures ; celle de décélération de 12 h à 24 h, soit 12 heures ; la phase stationnaire débute à 24 h.

1.3.2.3. Pour déterminer G et $\mu_{X_{max}}$, on exploite les points situés pendant la phase exponentielle :

1. en estimant graphiquement G, temps de doublement de la concentration de biomasse X (ici l'absorbance) c'est ici le temps nécessaire pour que A_{640} soit multipliée par 2 (méthode utilisable ici puisqu'on demande **d'évaluer** les paramètres cinétiques, G sera obtenu en heures puisque le temps est exprimé en heures sur le graphe)
2. ou en calculant la vitesse spécifique de croissance maximale $\mu_{X_{max}}$ d'après 2 points si possible expérimentaux de coordonnées (t_1, A_1) et (t_2, A_2) avec $\mu_{X_{max}} = [\ln(A_2) - \ln(A_1)] / (t_2 - t_1)$ exprimé en h^{-1}
3. ou en calculant $\mu_{X_{max}}$ par ajustement linéaire à l'aide des coordonnées $(\ln A, t)$ des points situés dans la phase exponentielle

Dans tous les cas cités ci-dessus, l'autre paramètre est obtenu à l'aide de la relation $G = \ln(2) / \mu_{X_{max}}$

Remarque : pour l'exploitation des courbes données dans le document 3, il n'est pas facile de lire des points correspondant à un doublement de A_{640} (méthode 1) et on ne dispose pas d'un tableau des valeurs expérimentales (méthode 3). La méthode 2 est donc la plus facile à utiliser, en lisant les coordonnées de points (expérimentaux ou non) situés sur la droite de phase exponentielle.

Résultats évalués :

- pour le milieu M1 : on a environ $A_{640} = 0,04$ pour $t = 3$ h et $0,60$ pour $t = 6$ h, donc $\mu_{X_{max1}}$ est proche de $(\ln 0,6 - \ln 0,04) / (6-3) = 0,90 h^{-1}$ et $G_1 = 0,76 h = 46$ min.
- pour le milieu M3 : on a environ $A_{640} = 0,07$ pour $t = 4$ h et $0,90$ pour $t = 12$ h, donc $\mu_{X_{max3}}$ est proche de $(\ln 0,9 - \ln 0,07) / (12-4) = 0,32 h^{-1}$ et $G_3 = 2,17 h = 130$ min.

Le milieu 1 contient du glucose (dextrose) en plus des acides aminés (que le milieu 3 contient seuls) apportés par la peptone pancréatique de caséine et la peptone papaïnique de soja : la vitesse de croissance dans le milieu 1 est plus élevée car le glucose est plus facilement métabolisé à des fins énergétiques.

1.3.2.4. Cette courbe présente les principales phases suivantes : après latence et accélération, une première phase exponentielle de $t = 4$ à $t = 6$ heures environ, ; une phase intermédiaire montrant un arrêt de la croissance de $t = 6$ à $t = 9$ h environ ; une deuxième phase exponentielle de $t = 9$ h à $t = 14$ h environ.

La pente de la première phase exponentielle est élevée et semble proche de celle de la phase exponentielle sur le milieu 1 en présence de glucose et d'acides aminés, et la pente de la deuxième semble proche de celle obtenue dans le milieu 3 en présence des seuls acides aminés. Or le milieu 2 contient du glucose et des acides aminés, on a donc un phénomène de diauxie :

- 1^{ère} phase exponentielle avec consommation du glucose
- phase intermédiaire d'adaptation métabolique
- 2^{ème} phase exponentielle avec consommation des acides aminés

1.3.2.5. Les courbes montrent l'augmentation de la concentration en β -exotoxine après la phase de croissance exponentielle, il s'agit donc d'un métabolite secondaire.

1.3.2.6. Milieu 1 : pas de production en présence d'une concentration élevée en glucose, qui provoque sans doute une répression catabolique, ce milieu ne convient pas à la production de ce biopesticide.

Milieus 2 et 3 : productions avec des cinétiques différentes mais les productivités volumiques horaires globales sont proches car les concentrations voisines entre 60 et 66 heures. Ces milieux conviennent.

2.1.1. Ori : origine permettant la réplication dans une souche procaryote pour la production du vecteur.

Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline, permettant la sélection des clones de cette souche transformés par le vecteur natif ou recombinant.

Ubi 1 : promoteur de l'ubiquitine permettant la fixation de l'ARN polymérase eucaryote et donc l'expression du gène d'intérêt (ici cryIAC) inséré sous sa dépendance.

Nos : terminateur, signal de fin de transcription dans la cellule eucaryote.

2.1.2. C'est un vecteur navette : il possède une origine de réplication procaryote et des signaux d'expression eucaryote.

2.1.3. *Bam*H1 est une enzyme de restriction dont le sigle B désigne les sites de coupure sur le vecteur. B désigne le genre et *am* l'espèce de la bactérie productrice de cette enzyme. Ici : *Bam* = *Bacillus amyloliquefaciens*

2.2.1. Un cal est un massif de cellules indifférenciées et non organisés qui se multiplient rapidement.

2.2.2. La méthode biolistique est utilisée ici : on parle aussi du canon à gènes.

Exemples d'autres méthodes : électroporation, lipofection, *Agrobacterium* pour les végétaux.

2.2.3. L'hygromycine est toxique pour les plantes : seules les cellules transfectées par le vecteur se développeront, car elles exprimeront le gène *hph*, codant l'hygromycine phosphotransférase qui inactive l'hygromycine.

2.2.4. Ce sont des phytohormones (auxine ou acide α -naphtalène acétique, et 6-benzylaminopurine qui est une cytokine), utilisées dans le milieu pour favoriser la croissance des cals en stimulant la multiplication et la différenciation cellulaires.

2.3.1.1. Après dénaturation de l'ADN à amplifier, le brins sont séparés et peuvent subir l'étape d'hybridation avec les amorces :

élongation ← TTGACCTCTCCGGTACTAGACCA-5'
AACTGGAGAGGCCATGATCTGGT-3'

3'-AAGTTCTAACATGAGTCGGAGTTC

5'-TTCAAGATTGTACTCAGCCTCAAG → élongation

L'élongation est menée par l'ADN polymérase thermostable en présence des dNTP et d'ions Mg⁺⁺.

2.3.1.2. Ces longues amorces ont une forte probabilité de ne s'hybrider qu'avec une seule séquence de l'ADN cible, la méthode est donc spécifique. Leur taille leur confère d'autres caractéristiques : elles sont suffisamment longues pour être stables et suffisamment courtes pour avoir un point de fusion T_m bas.

Elles ne doivent pas être complémentaires d'elles-mêmes ni l'une de l'autre et présenter des T_m proches.

2.3.2.1. 106 sont résistants à l'hygromycine, 76 sont cryI_{Ac}⁺ et 6 expriment la protéine.

2.3.2.2. Cal n°6 : 0 plantule résistant à l'hygromycine, ce cal n'a pas été transfecté par le vecteur recombinant.

Cal n°4 : 14 cellules ont été transfectées par le vecteur recombinant (puisque résistantes à l'hygromycine), 11 plantules ont reçu le gène mais le gène ne s'exprime pas. Les vecteurs correspondants contiennent le gène inséré dans le mauvais sens, ou le taux d'expression est faible, ou le gène n'est pas transcrit en un ARN_m stable.

Cal n° 9 : sur les 29 cellules transfectées correctement, 18 donnent des plants contenant le gène, qui n'est fortement exprimé que dans deux cas seulement.

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

2^{ème} partie : RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE

Durée : 8 heures

Coefficient : 8

Calculatrice autorisée.

PREMIER JOUR

Durée: 5h30+ 30 de repas

LES CONSERVATEURS

Les conservateurs sont des substances chimiques destinées à retarder ou empêcher une prolifération des microorganismes. La conservation par traitement chimique est souvent pratiquée lorsque les traitements physiques, notamment thermiques, ne sont pas possibles.

On se propose d'étudier quelques effets biologiques de certains conservateurs.

1. EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PRODUCTION DE NISINE PAR FERMENTATION (36 points)

La nisine est une bactériocine, peptide antimicrobien produit par des souches de bactéries lactiques. Elle est actuellement utilisée comme conservateur alimentaire.

Un milieu à base de lactosérum a été élaboré pour la production maximale de nisine par une souche de *Lactococcus lactis*. On se propose d'étudier l'effet de la température sur la production de nisine en milieu non renouvelé.

Dans cet objectif, deux fermentations sont conduites à des températures différentes 30°C et 37°C et des échantillons de moût de fermentation (« M₃₀ » et « M₃₇ ») sont prélevés afin de doser la nisine produite. Le dosage est effectué par voie microbiologique, par diffusion en milieu solide. La souche indicatrice utilisée, sensible à la nisine, est une souche de *Micrococcus luteus* ATCC 102-40.

1.1. Matériels et réactifs

- 60 mL de gélose Mueller Hinton maintenue en surfusion
- 2 mL de solution étalon mère de nisine à 10^4 UI par mL, notée « S₁ »
- 10 mL d'eau distillée stérile, en flacon, noté « ED »
- 1 boîte de Petri renfermant 20 disques non imprégnés stériles
- solution de Tween 20, notée « Tween »
- matériel nécessaire pour réaliser les dilutions
- culture de *Micrococcus luteus*, souche sensible, sur gélose Mueller Hinton inclinée, notée « *M. luteus* »
- 1 tube de 5 mL de bouillon Mueller Hinton, noté « MH »
- 1 boîte de Petri carrée
- 4 semi-microcuvettes spectrophotométriques
- 200 µL de moûts de fermentation « M₃₀ » et « M₃₇ »

1.2. Mode opératoire

1.2.1. Préparation de la gamme étalon de nisine

S₁ est la solution étalon mère de nisine à 10^4 UI.mL⁻¹.

- Préparer une gamme de 5 solutions étalon S₂ à S₆ à partir de la solution S₁ par dilutions en série géométrique de raison 1/2 en eau distillée stérile sous un volume final de 0,5 mL.

1.2.2. Préparation de la boîte de dosage

- À partir de la culture sur gélose inclinée de *M. luteus*, préparer 5 mL d'une suspension à 0,5 d'absorbance mesurée à 620 nm, en bouillon Mueller Hinton (la limite de linéarité pour les mesures d'absorbance sera précisée par le centre d'examen).
- Incorporer 2 mL de cette suspension aux 60 mL de gélose Mueller Hinton en surfusion ainsi que du Tween 20 à raison de 1% v/v final (le Tween 20 facilite la diffusion de la nisine dans la gélose). Homogénéiser et couler dans la boîte de Pétri carrée.
- Laisser solidifier.
- Déposer 16 disques non imprégnés stériles à la surface de la gélose solide selon le gabarit fourni.

1.2.3. Réalisation du dosage

Montrer l'imprégnation de deux disques à un examinateur

En double essai :

- Imprégner les disques à l'aide de 20 µL des différentes solutions étalon S₂ à S₆ ;
- Imprégner les disques M₃₀ et M₃₇ avec 20 µL des échantillons de moûts correspondants ;
- réaliser le témoin négatif.
- Laisser diffuser à température ambiante pendant 30 minutes avant d'incuber 18 à 24 heures à 37°C.

1.3. Compte rendu

- a. Construire un tableau en indiquant :
- le mode opératoire de la réalisation de la gamme étalon ;
 - les concentrations en nisine des solutions réalisées.
- b. Préciser le protocole de réalisation de la suspension à 0,5 d'absorbance.
- c. Indiquer la composition du témoin négatif.

2. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES DE LA NISINASE (50 points)

Certains microorganismes sont particulièrement résistants aux différents conservateurs, et notamment à la nisine. Parmi d'autres facteurs, une enzyme hydrolytique (la nisinase) permet d'expliquer cette résistance à la nisine. De manière à mieux connaître cette hydrolase, on se propose de déterminer ses paramètres cinétiques, Km et Vmax.

Le substrat utilisé est un peptide synthétique modifié utilisé pour le dosage d'activité protéasique. Ce peptide est couplé à un chromophore particulier : le pNA (para-nitroanilide) qui est libéré sous l'action de la protéase. L'hydrolyse du peptide-pNA par la nisinase entraîne l'apparition d'un composé qui absorbe à 405 nm.

2.1. Matériels et réactifs

- 3 mL de solution de substrat peptide-pNA à 20 mmol.L⁻¹, noté « peptide-pNA »
- 2,5 mL de solution de nisinase, noté « nisinase » (à conserver dans la glace)
- 50 mL de solution de tampon phosphate à 100 mmol.L⁻¹ pH 7,2, noté « Tp P »
- 25 mL de solution de réactif d'arrêt noté « arrêt »
- pipettes semi-automatiques de 5 mL, 1 mL, 200 µL, 100 µL et 20 µL
- 12 tubes à hémolyse

- 10 macrocuvettes standard
- chronomètre.

2.2. Conditions de vitesse initiale

2.2.1. Mode opératoire

Il s'agit de s'assurer que sur toute la durée de la réaction à 30°C, l'enzyme fonctionne bien en conditions de vitesse initiale (V_i).

Cette manipulation, à partir du déclenchement de la réaction, est à réaliser en présence d'un examinateur

- Introduire dans un tube à hémolyse 0,1 mL de solution de substrat « peptide-pNA » à 20 mmol.L⁻¹.
- Compléter à 2 mL avec du tampon « Tp P ».
- Préincuber au moins 5 minutes à 30°C.
- Déclencher la réaction par l'addition de 100 µL de solution de nisinase.
- Suivre la variation de l'absorbance pendant 4 minutes.

2.2.2. Compte rendu

- a. Représenter graphiquement l'évolution de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps.
 b. En déduire un intervalle de temps permettant de travailler en méthode deux points.
 c. Calculer la concentration d'activité catalytique en kat.L⁻¹ de milieu réactionnel.
Données :
 - Le coefficient d'absorbance spécifique du pNA à pH 7,2 est 2200 L.mol⁻¹.cm⁻¹.
 - Le trajet optique des cuvettes pour photométrie est de 1 cm.

2.3. Détermination des paramètres cinétiques.

2.3.1. Mode opératoire

La méthode en deux points se fera sur une durée de **3 minutes** et à une température de 30°C. Le tableau suivant donne le volume de substrat « peptide-pNA » à prélever :

N° de tube	1	2	3	4	5	6	7
Volume de substrat peptide-pNA (µL)	20	50	75	100	150	200	300

- Compléter chaque tube à hémolyse à 2 mL à l'aide de tampon phosphate pH 7,2.
- Lancer la réaction par ajout de 100 µL de solution enzymatique.
- Arrêter la réaction par addition de 1 mL de réactif d'arrêt.

Composition du tube témoin :

- 2 mL de tampon phosphate pH 7,2 ;
- 1 mL de réactif d'arrêt ;
- 100 µL de solution enzymatique.

Le démarrage de la manipulation est à réaliser en présence d'un examinateur.

2.3.2. Compte rendu

- a. Calculer la concentration de substrat dans le milieu réactionnel pour chacun des tubes
 b. Présenter les résultats dans un tableau
 c. Déterminer K_m et V_{max} à l'aide d'un logiciel.
 d. Calculer la concentration d'activité catalytique de la solution d'enzyme fournie en kat.L⁻¹.
Données :
 - 1 katal = quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une mole de substrat en une seconde ;
 - coefficient d'absorbance spécifique du pNA au pH de mesure: 4500 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

3. ÉTUDE DE LA CYTOTOXICITÉ DE CONSERVATEURS UTILISÉS EN COSMÉTOLOGIE (54 points)

On se propose d'étudier les effets de trois conservateurs X, Y et Z potentiellement utilisables dans des produits cosmétiques. Leur cytotoxicité peut être évaluée par des mesures de viabilité réalisées en plaque multipuits sur des cellules animales cultivées *in vitro*.

On détermine la viabilité cellulaire par un test colorimétrique utilisant le MTT (bromure de diméthylthiazol-diphényltétrazolium). Lorsque des cellules sont mises en présence d'une solution de MTT, les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes réduisent le MTT en formazan. Le formazan insoluble dans l'eau est ensuite solubilisé dans un solvant (ici le diméthylsulfoxyde DMSO). L'intensité de la coloration violette, mesurée par spectrophotométrie, est fonction du nombre de cellules vivantes.

Les différentes phases de la manipulation sont les suivantes :

- Réalisation d'une gamme de concentration en cellules en plaque ou barrettes multipuits.
- Action des conservateurs sur les cellules.
- Quantification de la viabilité cellulaire par mesure photométrique du formazan libéré.

3.1. Matériel et réactifs

- cellule de comptage du centre (fiche technique disponible)
- microplaque pour culture cellulaire avec couvercle
- 2 tubes à hémolyse
- 2,5 mL de suspension cellulaire « **SC** »
- 0,2 mL de solution de bleu de Funk, « **Funk** »
- 3 mL de milieu de culture « **M** »
- 0,2 mL de chacune des trois solutions de conservateurs « **X** », « **Y** » et « **Z** » en milieu de culture « **M** »
- 0,5 mL de solution « **MTT** »
- 2,5 mL de « **DMSO** »

3.2. Mode opératoire

3.2.1 Préparation d'une suspension cellulaire ajustée

- Réaliser une numération des cellules vivantes et des cellules mortes de la suspension « SC » en présence de bleu de Funk (colorant d'exclusion) : 150 µL de suspension « SC » + 50 µL de bleu de Funk.
- À partir de la suspension « SC », préparer 3 mL de suspension fille à 5.10^5 cellules vivantes par mL de milieu de culture « M ».

3.2.2. Réalisation d'une gamme de cellules en microplaque

- À partir de la suspension fille préparée ci-dessus, réaliser dans les lignes A et B de la microplaque (puits A1 à A6 et B1 à B6) la gamme suivante en double essai :
cellules vivantes par puits, sous un volume final de milieu de culture M de 160 µL :
 10^4 2.10^4 4.10^4 6.10^4 7.10^4 8.10^4
- Dans les puits C1 à C6, introduire 8.10^4 cellules vivantes par puits.
- Couvrir la plaque et la placer 1h30 à 37°C, dans une étuve à 5 % de CO₂. 3.2.3.

3.2.3. Action des conservateurs

- Ajouter dans les puits:
 - A1 à A6 et B1 à B6 : 30 µL de milieu de culture « M »
 - C1 et C2 : 30 µL de conservateur « X »
 - C3 et C4 : 30 µL de conservateur « Y »
 - C5 et C6 : 30 µL de conservateur « Z »
- Couvrir la plaque et la placer 1h30 à 37°C, dans l'étuve à 5 % de CO₂.

3.2.4. Quantification des cellules vivantes

- Distribuer dans tous les puits 20 µL de solution de « MTT ».
- Incuber 1h à 37°C, dans l'étuve à 5 % de CO₂.
- Prélever et éliminer 200 µL dans chaque puits en évitant d'aspirer les cristaux de formazan.
- Distribuer dans tous les puits 100 µL de « DMSO ».
- Introduire 100 µL de « DMSO » dans le puits C8 qui servira de blanc de lecture.
- Agiter 10 minutes.
- Effectuer la lecture de l'absorbance à 570 nm.

3.3. Compte rendu

- Indiquer les résultats de la numération et calculer la concentration de la suspension cellulaire « SC » en cellules vivantes et en cellules totales par mL.
- Expliquer la préparation de la suspension à 5.10^5 cellules vivantes par mL.

- c. Rassembler dans un tableau la composition des puits de la microplaque.
- d. Légènder la feuille des mesures d'absorbance à 570 nm.
- e. Tracer la courbe d'étalonnage de la méthode (absorbance à 570 nm en fonction du nombre de cellules par puits).
- f. Reporter sur cette courbe les résultats de la ligne C et conclure.

DEUXIÈME JOUR

Durée : 2 heures 30 minutes

1. EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PRODUCTION DE NISINE PAR FERMENTATION

- 1.1. Mesurer les diamètres des zones d'inhibition et consigner ces résultats dans un tableau.
- 1.2. Tracer la courbe d'étalonnage de la méthode : diamètre = f(log [nisine]) (outil informatique obligatoire).
- 1.3. Déterminer les concentrations respectives des moûts « M30 » et « M37 » en UI/mL de nisine.
- 1.4. Calculer la concentration des moûts en g/L de nisine pure.

Donnée :

La solution étalon mère à 10^4 UI.mL⁻¹ de nisine a été préparée par pesée de poudre commerciale dosée à 10^6 UI.g⁻¹. Cette poudre contient 2,5% m/m de nisine pure, 70 à 75 % m/m de NaCl et 20 % m/m de protéines de lait.

- 1.5. Conclure.

4. ÉTUDE PARTIELLE D'UN PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN BACTÉRIEN (20 points)

Le but de l'étude proposée est de tester l'influence du SDS sur l'activité de la protéinase K.

En effet, on a constaté que l'extraction de l'ADN génomique de *Lactobacillus lactis* en vue du clonage du gène de la nisine donnait des résultats très décevants par les méthodes usuelles :

- faible quantité d'ADN génomique obtenue ;
- présence importante de protéines contaminantes.

Aussi, il a été décidé de réaliser la lyse de *Lactococcus lactis* à l'aide d'une solution de SDS (sodium dodécylsulfate) et de protéinase K (endopeptidase aspécifique).

Il s'agit de montrer que le SDS, aux concentrations utilisées ne perturbe pas l'activité de la protéinase K. Les peptides acido-solubles libérés par l'action de cette enzyme sur un substrat protéique sont dosés par le réactif de Folin, après arrêt de la réaction enzymatique par l'acide trichloracétique.

4.1. Matériel et réactifs

- 1 mL de tampon Tris HCl, CaCl₂, pH 7,5 noté « **Tp 7,5** »
- 1 mL de protéinase K à 50 µg/mL noté « **prK** »
- 6 mL de serum albumine bovine à 20 mg/mL en eau physiologique noté « **SAB** »
- 1 mL de SDS à 10% m/v noté « **SDS** »
- 10 mL d'acide trichloracétique à 0,5 mol/L noté « **ATCA** »
- 20 mL de NaOH à 0,5 mol/L noté « **NaOH** »
- 2 mL de réactif de Folin non dilué noté « **Folin** »
- 12 microtubes de 1,5 mL
- 12 semi-microcuvettes standard

4.2. Mode opératoire

Le but est de déterminer l'activité de la protéinase K en présence des concentrations finales en SDS suivantes : 0 0,5 1 1,5 2% m/v.

Réaliser un témoin sans enzyme pour chaque pourcentage de « SDS » testé.

Pour chaque test :

- Introduire dans un microtube :
 - 300 µL de « SAB »
 - x µL de « SDS » à 10 % m/v
 - (150-x) µL d'eau distillée
 - 50 µL de tampon Tp 7,5
- Préchauffer au moins 5 minutes à 42°C.
- Ajouter 50 µL de protéinase K.
- Incuber exactement 10 minutes à 42°C.

- Ajouter 0,5 mL de « ATCA ».
- Laisser au moins 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 2 minutes à vitesse maximale.
- Introduire dans une cuve de spectrophotomètre 400 μL du surnageant obtenu.
- Ajouter dans la cuve :
 - 800 μL de NaOH 0,5 mol/L
 - 80 de réactif de Folin.
- Laisser au moins 5 minutes à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance à 750 nm contre de l'eau.

Les lectures d'absorbance seront effectuées en présence d'un examinateur.

4.3. Compte rendu

- | |
|---|
| <p>a. Construire un tableau indiquant la composition des différents milieux réactionnels (volumes x de SDS à 10% m/v et (150-x) d'eau).</p> <p>b. Calculer, pour chaque concentration finale en SDS (% m/v), l'absorbance corrigée de l'essai. Reporter l'ensemble des résultats (bruts et corrigés) dans le tableau précédent.</p> <p>c. Analyser les résultats et conclure.</p> |
|---|

**ÉPREUVES
DE LA SESSION 2007**

L'USAGE DE LA CALCULATRICE ÉLECTRONIQUE ET DU DICTIONNAIRE EST INTERDIT.

PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE (/40 points)

La fête, dans ses dimensions collectives.

Vous rédigerez une synthèse objective et ordonnée des documents suivants :

DOCUMENT 1

De mémoire de Parisien, et de Français, on n'avait pas vu pareil débordement populaire depuis... la Libération en 1945 ! Déferlant dans les rues, des jeunes, beaucoup, mais aussi des moins jeunes, en couple, en famille, entre amis, peinturlurés de bleu-blanc-rouge, assis sur les portes des voitures, brandissant au vent le drapeau tricolore sur le toit des voitures roulant vers la Bastille, prise une énième fois par une foule turbulente, heureuse, encore étonnée de la victoire comme de l'effet qu'elle produit sur tant de gens réunis à la faveur de cette prouesse.

Au milieu des saluts, des sourires échangés, des cris, des youyous, des klaxons, des pétards et des fumigènes, on se bouscule, on se congratule, on se côtoie, on danse, on improvise une « ola » et on entonne en refrain le slogan fédérateur et fort symbolique de cette soirée de délire collectif : « *Zidane président !* » Des voitures sont chahutées, on se serre la main, on n'en revient pas d'être ensemble. Des drapeaux flottent sur la foule et s'élèvent au rythme des tams-tams dans les airs, il s'agit du drapeau français mais aussi du drapeau algérien en hommage à l'origine kabyle de « Zizou ».

Un baptême national

On ne peut s'empêcher de penser qu'il est en train de se passer quelque chose d'important. Il s'agit de football, mais il s'agit aussi de bien plus que cela. Cette victoire véritablement nationale, est à l'image de la France réelle, c'est-à-dire multicolore et rassemblée derrière les valeurs d'une République tolérante et humaniste. Des joueurs antillais, arménien, basque, breton, guadeloupéen, kabyle, kanak, normand, fédérés par un Jacquet originaire de la Loire, le berceau de la France. Tout un symbole de la nation à la française ! Cette équipe incarne le mythe du creuset à la française et incite les Français à s'identifier positivement à ce qu'ils sont vraiment, un pays pluriel. [...]

Une France qui s'ébranlait en dansant, un peu étonnée de cette soudaine promiscuité entre des univers normalement séparés, brandissant sans complexe un drapeau reconquis sur les forces xénophobes et racistes, restauré dans sa dimension universaliste. Ce Mondial aura donc eu entre autres mérites de permettre de se réapproprier les emblèmes de l'identité française.

Tous ensemble

Une heure et demie, place de la Bastille : sur des rythmes techno, une voiture engage dans son sillage une parade joyeuse dans la rue Saint-Antoine menant tout droit vers la place de la Concorde, mêlant jeunes des banlieues et Parisiens aisés ou branchés qui se sont ralliés au Mondial. C'est l'autre surprise de ce Mondial, la réconciliation en France du football - sport de masse par excellence, sport le plus populaire du monde et à ce titre seul capable de susciter des mouvements collectifs d'une telle ampleur - avec les élites intellectuelles, les catégories aisées et les femmes, qui, contre toute attente, se sont littéralement approprié le Mondial avec passion, séduites par des joueurs loin de n'être que des bêtes de stade, et les soutenant avec des accents parfois maternels. On pouvait lire sur une banderole au Stade de France : « *Merci Aimé, grâce à toi nos femmes aiment le foot !* »

Cette Coupe du monde et le football - révélateur des passions humaines, métaphore de la vie en société, catalyseur des énergies et du sentiment national - semblent avoir réussi, certes le temps d'un moment exceptionnel, ce que la politique échoue à faire : résorber la fameuse « fracture sociale », thème dominant de la dernière campagne présidentielle et sujet lancinant de nombreux essais politiques. Elle semble avoir réussi à (re)créer du lien social, à rapprocher des catégories que tout sépare habituellement.

De nombreux commentateurs français comme étrangers ont souligné ce pouvoir de cohésion sociale du Mondial, cet état de grâce d'un pays rassemblé derrière une équipe, au-delà des clivages culturels, sociaux et politiques traditionnels. Le New York Times, revenant sur le cliché de « *ce pays ingérable, jamais d'accord sur rien, éternellement divisé, profondément sceptique* », a souligné qu'il « *s'est retrouvé uni autour d'une équipe de football... L'équipe est devenue le symbole positif d'un pays qui retrouve la croissance après une longue période de blues* ». [...]

Le pouvoir d'une métaphore

Et si l'on peut douter que cette victoire, ces jours et ces nuits de communion rare suffisent à eux seuls à inverser le cours des choses au niveau national, on peut reconnaître qu'à sa faveur s'est exprimé, comme jamais

peut-être, « *le désir d'union, de cohésion et de force* » d'un pays, comme n'a pas manqué de le remarquer le président de la République lui-même. Un moment certes, mais unique, qui a permis de révéler paradoxalement tout ce dont cette société manque et qu'elle possède pourtant en elle comme aspirations et capacités de partage.

Sur les Champs-Élysées à Paris, sur la plage de Marseille, dans les lieux publics partout en France, un peu plus de mixité sociale, un supplément d'âme nationale et de fraternité se sont cristallisés. De quoi suffire pour remercier les Bleus.

Anne RAPIN, « La France championne du monde de football », *Label France*, magazine d'information, n°33, Ministère des Affaires Étrangères, 3e trimestre 1998.

DOCUMENT 2

Au-delà pourtant de cette identification au groupe, à la nation, au-delà de l'exploitation ouvertement politique, le spectacle sportif est aussi, plus qu'auparavant, objet festif, réjouissance collective, mélange de délasserment, d'effervescence, de marché. L'épisode crée même ses rituels : l'engagement dans la société du divertissement, avec ses références publicitaires, sa débauche d'images, son ludisme réinventé, ferment majeur des ferveurs collectives d'aujourd'hui.

La caravane du Tour installée dans l'épreuve au début des années 1930 en est le meilleur exemple : effigies de carton-pâte, placards colorés, musiques ambulantes, distributions non comptées. Le camion du chocolat Menier, par exemple, précède la course, dans cette caravane de 1930, en diffusant 500 000 chapeaux en papier frappés au nom de la marque. Ses agents abandonnent sur les routes plusieurs tonnes de chocolat en tablettes. Ils s'arrêtent au sommet des cols, offrent des tasses de chocolat chaud aux spectateurs et aux coureurs. La caravane accentue nécessairement l'aspect festif du Tour. Alors que les reportages peuvent aussi s'éloigner des accents héroïques, jouer avec le loisir, s'autoriser des références sensuelles jusque-là rarissimes : « A la Garonnette devant un lot très nombreux de jolies baigneuses plus déshabillées que l'an passé comme elles le seront plus l'année prochaine que cette année ». L'allusion à la morale fait davantage place à l'évocation du plaisir partagé.

Autre construction festive, les Six-Jours⁽¹⁾ : 15 000 spectateurs au début des années 1930. L'*Illustration* y distingue les « forcenés » et les « mondains ». Les premiers recourent à un congé pour y assister jour et nuit, « le pain, le saucisson et le vin à portée de main », vociférant, passionnés, commentant interminablement surprises et incidents. Les seconds s'y attardent le soir, en curieux, consommateurs dilettantes et élégants : « Il est de bon ton de n'y faire son entrée que tard dans la soirée, voire après le théâtre ; les soupeurs s'attablent ; le champagne coule à flots... » Lieu de rencontre et de visibilité, mélange de groupes aussi, et d'appartenances, le sport s'est bien imposé dans le paysage social.

Georges VIGARELLO, *Histoire du corps*, 2006.

(1) les Six-Jours : célèbre épreuve cycliste qui se déroulait au Vélodrome d'Hiver à Paris.

DOCUMENT 3

Le Raid Passion Hérault est une épreuve de sport-aventure associant différentes activités de pleine nature (course à pied, VTT...) Elle dure sept jours et se déroule le long du fleuve Hérault.

C'est une des facettes de l'être ensemble qui est sondée ici. Le déguisement en est un moment-clé. Les participants ont effectivement tous joué le jeu. L'appréciation est unanime : « c'est une idée géniale », « super-sympa ». Faire preuve d'imagination, d'originalité, « trouver une idée » est ressenti comme dynamisant par le groupe. Le déguisement est bien assimilé au registre de la fête, du ludique, du rire (« les grands s'amuse »). La distance au sport est prise « ça enlève le côté Adidas » avec « moins de compétition, plus de jeu et de convivialité ». Deux contraintes seulement sont évoquées : trouver de la place dans les bagages, ou encore le risque de handicap avec la pratique sportive. Si certains ont hésité ou n'avaient pas encore prévu leur déguisement la veille, d'autres se sont « investis dès le départ en la peaufinant ». Dans ce cas, le déguisement renforce encore la cohésion de l'équipe au travers de son identité et de l'image qu'elle souhaite donner et se donner. Il est aussi vécu comme un changement dans le rapport avec les autres équipes, « un autre lien », « chaque équipe va rire en regardant les autres et réciproquement » ; c'est un moyen de « finir sur une bonne impression ». Ainsi, la fête dans les épreuves est perçue dans la relation à l'équipe, le fait d'être en groupe, et ce particulièrement dans le moment fort du déguisement qui clôturait le raid en signant sa symbolique (le passage de l'embouchure). Ce moment traduit la dimension transgressive de cette « fête des corps », détournement jusqu'à la dérision des normes productives et comparatives du sport. [...]

En permanence, du début à la fin du raid, celle qui est première, c'est « la fête de l'équipe, de l'être ensemble » (ce que décrivent les paragraphes précédents). Dans la confrontation à soi-même et aux autres, l'individu choisit ses pairs pour une pratique « tribale » : réunion ponctuelle d'une équipe partageant le même objectif, le même style de vie, et sacrifiant à la même passion. Le groupe est solidaire, mais aussi solitaire, en autonomie dans un milieu inconnu, tout en se mesurant à d'autres, qui font la même chose, au même moment (un mélange de communion et de rivalité). C'est l'illustration d'un « lien social émotionnel » (MAFFESOLI, 1990), où la pratique conviviale ménage une forme de relation surprenante : le « vivre ensemble séparément ». Une relation

intimiste, à quelques-uns, pour un partage intense mais éphémère, d'où peut-être la déception de quelques-uns dans le passage au grand groupe, lorsque la célébration collective ne prend pas le relais de la relation intimiste de l'équipe (ou perd en qualité et en intensité).

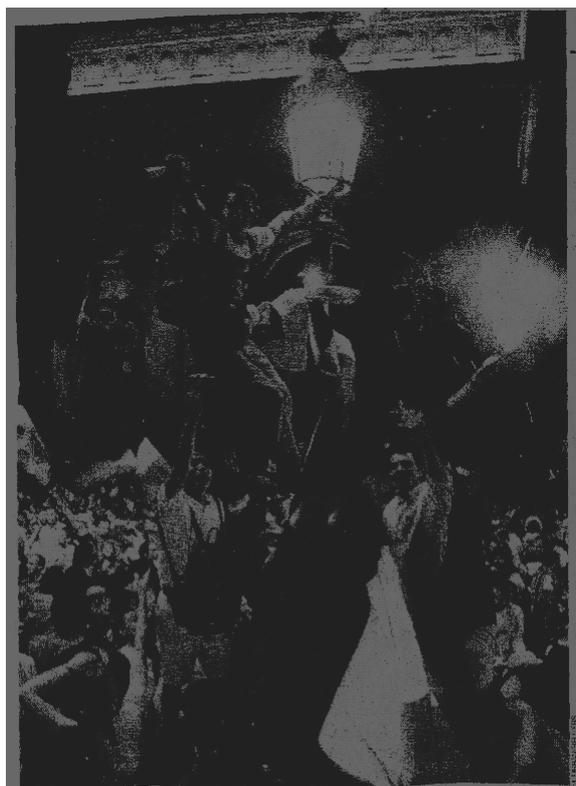
Mais la fête prend aussi des formes différentes au cours du raid. Les deux premières journées sont plutôt celles de « la fête de la nature ». Il se dégage une ambiance conviviale sur fond de verdure ou de hameau paisible que vont égayer les concurrents par leur flot coloré accompagné d'une sonorisation entre rock et reggae. C'est aussi « la fête de la rivière » quand au petit matin, dans un cadre magnifique, se mélangent dans les reflets de l'eau troublés par les premières éclaboussures, les couleurs de la nature et celles des canoës jaunes et des gilets de sauvetage violets. Images qui se marient à un panachage sonore insolite : un coup de sifflet toutes les trois minutes, le chant des oiseaux, les éclats de rires, le clapotis de l'eau et... l'hélico. A la fin de ces deux journées, les repas permettent tout juste à quelques chants de pointer : la fatigue et les conditions matérielles portent une grande part de responsabilité. Les soirées n'attirent effectivement pas les participants et seules quelques équipes poursuivront tardivement la fête à leur façon.

La troisième journée prend les allures de « la fête effervescente ». Le ton est donné avec l'épreuve déguisée : les équipes traversent le vieux Agde en chantant pour le plus grand plaisir des touristes curieux. Elles donnent à voir une troupe bigarrée, aux effluves composites, associant à l'iode marin l'odeur du maquillage et des bombes colorantes, sur fond d'animation de plage et de friture, avec bien sûr toujours... les rotations de l'hélicoptère. A n'en pas douter, nul besoin de terres étrangères pour vivre l'exotisme : juxtaposition des contraires, ambiance esthétique et polysensuelle, le « processus de melting-pot » (LIPOVETSKY, 1983) participe à la fête, exprimant « un hédonisme du quotidien irrépressible et puissant » (MAFFESOLI, 1990).

Le soir, la fête éclate, plus chaleureuse que délirante : l'intensité du lien social relève encore davantage du petit groupe. Tout le monde se connaît bien après avoir vécu ensemble une tranche de vie éphémère.

Gisèle LACROIX, « Le sport-aventure, une forme d'innovation sportive », Sport et Management, Ouvrage collectif sous la direction d'A. LORET, recueil d'articles, Éditions Dunod, 1993.

DOCUMENT 4



Photographie de M. URBAN,
L'Express, 16 juillet 1998

DEUXIÈME PARTIE : ÉCRITURE PERSONNELLE (/20 points)

Pensez-vous que le sport soit l'occasion d'une véritable fête collective ?
Vous appuiez votre réponse sur les éléments du corpus et sur vos connaissances personnelles.

L'usage de la calculatrice est interdit. L'usage d'un dictionnaire bilingue est autorisé.

People must make lifestyle changes, says Blair

Tony Blair urged the public today to take more responsibility for their own health as he warned the NHS¹ was under increasing pressure from the results of excessive drinking, eating and smoking.

The government could not make choices for people to improve their own well-being, Mr Blair said as he signalled a move away from the stereotypical image of a "nanny-state".

But Mr Blair warned the "junk food" industry that if the voluntary code on limiting the advertising of unhealthy food to children didn't work the government would legislate next year to enforce the restrictions.

Mr Blair said: "In the future, healthcare cannot be just about treating the sick but must be about helping us to live healthily. This requires more from all of us, individuals, companies and government. And for government, it has to encourage, it has to inform, but, if necessary, in a tougher way than ever before, it has to be prepared to act."

Today's public health problems are "not, strictly speaking, public health problems at all", according to the prime minister.

"They are questions of individual lifestyle - obesity, smoking, alcohol abuse, diabetes, sexually transmitted disease. These are not epidemics in the epidemiological sense. They are the result of millions of individual decisions, at millions of points in time."

Mr Blair said obesity was rising rapidly, and the social effects of alcohol abuse were "widespread and worsening." Smoking may account for half of the "health gap" between social classes, he added.

"These individual actions lead to collective costs. The economic burden of chronic disease, including lost work, the early drawing down of pension entitlements and the need for palliative care, could be vast."

Mr Blair said a more "robust" approach to health was needed because everyone would pay the price for failure.

"That doesn't mean you stop treating people in the NHS who smoke, or force people to do what they don't choose to do," he said.

"But it does mean that government should play an active role by empowering people to choose responsibly."

Mr Blair said the government was acting by insisting school meals become healthier, and pledged that if voluntary initiatives limiting advertising of junk food to children have not worked by 2007, legislation would be brought in.

But providing good information so people can make the right choices is often as important as legislation.

He said: "In 10 years' time, and if possible long before, I want the health debate in Britain not to be confined to the excellent NHS that treats people when they are sick, but to the broader national health service that is about prevention as much as cure, about personal responsibility as much as collective responsibility, about the quality of living as much as life expectancy."

Adapted from *The Guardian*, July 26, 2006

¹NHS (abbreviation of National Health Service) = équivalent britannique de notre 'Sécurité Sociale'

I. COMPRÉHENSION (10 points)

1. Faire un compte rendu de l'article en français en mettant en évidence les idées essentielles (environ 120 mots ± 10%).
2. Traduire en français le texte de la ligne 9 ('In the future ...') à la ligne 12 ('...be prepared to act.').

II. EXPRESSION EN ANGLAIS (10 points)

Answer the following questions in English.

1. Mr Blair says that excessive drinking, eating and smoking is a question of individual decision that generates a heavy cost for the rest of the population. Explain this statement (70 words ± 10%).
2. What is your opinion about the ban on smoking in all public places? (130 words 10%).

ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

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

I. COMPRÉHENSION (10 points)

1. Tony Blair demande aux Britanniques d'être davantage responsables de leur santé face aux fléaux modernes que sont l'obésité, l'alcoolisme et le tabagisme. Pour lui, améliorer le bien-être de la population relève autant de choix personnels que de décisions gouvernementales.

En effet, obésité, tabac, alcoolisme sont le résultat de choix individuels qui ont un coût de plus en plus lourd pour la collectivité. Si les services de santé se doivent de toujours traiter efficacement les malades, le débat sur la santé en Grande Bretagne doit également porter sur la prévention des maladies et la responsabilité des individus quant à leur choix de vie.

Le rôle du gouvernement consiste à informer le public pour l'aider à faire les bons choix et à vivre plus sainement, sinon le gouvernement adoptera des mesures plus coercitives. (123 mots).

2. À l'avenir, la notion de santé publique ne peut se limiter aux soins des malades ; il s'agit aussi de nous aider à vivre sainement. Ceci exige plus d'efforts de la part de tous, qu'il s'agisse des individus, des entreprises ou du gouvernement. Concernant ce dernier, il doit encourager, il doit informer, mais, s'il le faut, il doit être prêt à agir plus fermement que jamais.

II. EXPRESSION EN ANGLAIS (10 points)

1. Smoking, drinking alcohol, eating fat food are matters of individual choice and personal freedom. Yet, obesity, alcoholism and cigarette addiction are likely to lead to serious diseases such as diabetes, heart condition or cancer. These illnesses often mean lesser productivity at work or lost work, they also require expensive treatment that generates heavy healthcare costs to be supported by the nation's budget.

Now isn't our consumer society largely responsible for encouraging young people to smoke, drink and eat junk food? (80 words)

2. The candidate may consider the following aspects related to the question :

- A ban on smoking will mean considerable gains for public health :
 - employees who work long hours in pubs & restaurants will be protected from the effect of passive smoking,
 - young people will have fewer opportunities to smoke at school,
 - it can help those who want to stop,
 - cigarette smoke is dangerous as it leads to heart disease & lung cancer (according to scientists, lung cancer kills more people than the other types of cancer combined), British physicians claim that a ban on smoking in the workplace will increase the country 's productivity significantly.
- Economic & social problems :
 - a ban can increase the tension between smokers & non-smokers,
 - some professions are concerned by the consequences (tobacconists, bar-tenders are afraid they will lose customers & revenues.)

Possible conclusion: non-smokers have the right to be protected, but can you 'force people to do what they don't choose to do'?

SOUS ÉPREUVE : MATHÉMATIQUES

Durée : 2 heures

Coefficient : 1,5

La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

La calculatrice (conforme à la circulaire n° 99-186 du 16-11-99) est autorisée.

Le formulaire de mathématiques est joint au sujet.

Une feuille de papier millimétré est fournie.

EXERCICE 1 (10 points)

Dans cet exercice on s'intéresse à un flotteur réalisé en plastique allégé.

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

A. Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) : $y' - y = -e^x$,

où y est une fonction de la variable réelle x , définie et dérivable sur \mathbb{R} et y' la fonction dérivée de y .

1° Déterminer les solutions sur \mathbb{R} de l'équation différentielle (E_0) :

$$y' - y = 0$$

2° Soit h la fonction définie sur \mathbb{R} par $h(x) = -x e^x$.

Démontrer que la fonction h est une solution particulière de l'équation différentielle (E).

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

4° Déterminer la solution de l'équation différentielle (E) qui vérifie la condition initiale $f(0) = 2$.

B. Étude d'une fonction et calcul intégral

Soit f la fonction définie sur $[-2, 2]$ par $f(x) = (2 - x) e^x$.

On désigne par C la courbe représentative de f dans un repère orthonormal $(O; \vec{i}; \vec{j})$ où l'unité graphique est 2 centimètres.

- 1°
 - a) Calculer $f'(x)$ pour tout x de $[-2, 2]$.
 - b) Étudier le signe de $f'(x)$ lorsque x varie dans $[-2, 2]$.
 - c) Établir le tableau de variation de f sur $[-2, 2]$.

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

- 3°
 - a) Résoudre algébriquement dans $[-2, 2]$ l'inéquation $f(x) \geq 2 - x$.
 - b) Retrouver graphiquement le résultat du 3° a). On fera apparaître sur la figure du 2° les constructions utiles.

4° a) Démontrer que la fonction F définie sur $[-2, 2]$ par $F(x) = \left(\frac{1}{2}x^2 - \frac{5}{2}x + \frac{13}{4}\right) e^{2x}$ est une primitive sur $[-2, 2]$ de la fonction $x \rightarrow [f(x)]^2$.

b) Application :

On considère le solide S engendré par la rotation autour de l'axe des abscisses de la partie du plan limitée par la courbe C , l'axe des abscisses et la droite d'équation $x = -2$.

Le solide obtenu est utilisé pour réaliser un modèle de flotteur en plastique allégé.

On admet que le volume V , en unités de volume, du solide S est : $V = \pi \int_{-2}^2 [f(x)]^2 dx$

Établir que $V = \frac{\pi}{4} (e^4 - 41 e^{-4})$.

- c) Donner la valeur approchée de V en cm^3 arrondie à 10^{-3} .

EXERCICE 2 (10 points)

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

Dans cet exercice, on s'intéresse au contrôle de la qualité de la fabrication du modèle de flotteur décrit dans l'exercice 1.

A. Loi binomiale

On considère un stock important de flotteurs.

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

On dit qu'un flotteur est acceptable si sa masse, exprimée en grammes, appartient à l'intervalle $[24,5 ; 25,5]$.

On prélève au hasard un flotteur dans le stock.

On note E l'événement : « le flotteur prélevé dans le stock est acceptable ».

On suppose que $P(E) = 0,26$.

On prélève au hasard n flotteurs dans le stock pour vérification. Le stock est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement de n flotteurs à un tirage avec remise. On considère la variable aléatoire X qui, à tout prélèvement ainsi défini, associe le nombre de flotteurs acceptables dans le prélèvement.

1° Justifier que la variable aléatoire X suit une loi binomiale dont on donnera les paramètres.

2° Dans cette question, on suppose $n = 6$.

- a) Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement, deux flotteurs exactement soient acceptables.
- b) Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement, au plus deux flotteurs soient acceptables.

3° Dans cette question, on considère un prélèvement de n flotteurs.

- a) Donner, en fonction de n l'expression de $P(X=0)$.
- b) Soit F l'événement : « dans le prélèvement, au moins un flotteur est acceptable ». Calculer la valeur minimale n_0 de n telle que $P(F) \geq 0,95$.

B. Loi normale

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

On désigne par Y la variable aléatoire qui, à chaque flotteur prélevé au hasard dans la production d'une journée, associe sa masse exprimée en grammes.

On suppose que la variable aléatoire Y suit la loi normale de moyenne 25 et d'écart type 1,58.

1° Calculer la probabilité qu'un flotteur prélevé au hasard dans la production de la journée ait une masse inférieure ou égale à 27 grammes.

2° Calculer la probabilité qu'un flotteur prélevé au hasard dans la production de la journée ait une masse inférieure ou égale à 24,5 grammes.

C. Probabilités conditionnelles

Dans cette partie, les résultats sont à arrondir à 10^{-4} près.

Les flotteurs sont fabriqués par deux machines notées M_1 et M_2 .

60 % des flotteurs proviennent de la machine M_1 et 40 % proviennent de la machine M_2 .

On admet que 1,3 % des flotteurs provenant de la machine M_1 sont défectueux et que 1,8 % des flotteurs provenant de la machine M_2 sont défectueux.

On prélève au hasard un flotteur dans la production d'un mois.

On considère les événements suivants :

A_1 : « le flotteur provient de la machine M_1 »

A_2 : « le flotteur provient de la machine M_2 »

D : « le flotteur est défectueux ».

1° Déterminer $P(A_1)$, $P(A_2)$, $P(D/A_1)$ et $P(D/A_2)$.

On rappelle que $P(D/A_1) = P_{A_1}(D)$ est la probabilité de l'événement D sachant que l'événement A_1 est réalisé.

2° a) Calculer les valeurs exactes des probabilités $P(A_1 \cap D)$ et $P(A_2 \cap D)$.

b) En déduire la valeur exacte de la probabilité qu'un flotteur prélevé au hasard dans la production du mois soit défectueux.

3° Calculer la probabilité qu'un flotteur provienne de la machine M_1 sachant qu'il est défectueux.

ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

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

Exercice 1 (10 points)

Dans cet exercice, on s'intéresse à un flotteur réalisé en plastique allégé.

A. Solution de l'équation différentielle (E) : $y' - y = -e^x$

1. Résolution de l'équation sans second membre associée $y' - y = 0$

La solution générale de cette équation est $y = C e^x$

2. On veut vérifier que $h(x) = -x e^x$ est une solution particulière de (E).

Pour cela on calcule $h'(x) - h(x) = -e^x - x e^x - (-x e^x) = -e^x$. $h(x)$ est une solution de (E)

3. La solution générale de (E) est donc donnée par : $f(x) = C e^x - x e^x$

Vérification :

$f'(x) = C e^x - e^x - x e^x$ d'où : $f'(x) - f(x) = C e^x - e^x - x e^x - C e^x + x e^x = -e^x$

4. On cherche alors la solution particulière qui vérifie la condition $f(0) = 2$

Cela donne $C = 2$

La solution cherchée est donc :

$$f(x) = (2 - x) e^x$$

B. Etude de la fonction f sur $[-2 ; 2]$

Les variations de la fonction f sont données par le signe de sa dérivée.

Or $f'(x) = (1 - x) e^x$

Le signe de $f'(x)$ ne dépend que du signe de $1 - x$.

Cela donne le tableau de signe puis le tableau de variation suivant :

X	- 2	1	2
f'(x)	+	0	-
f		e	
	$4 e^{-2}$		0

Résolution de l'inéquation $f(x) \geq 2 - x$

$$(2 - x)e^x - (2 - x) \geq 0$$

$$(2 - x)(e^x - 1) \geq 0$$

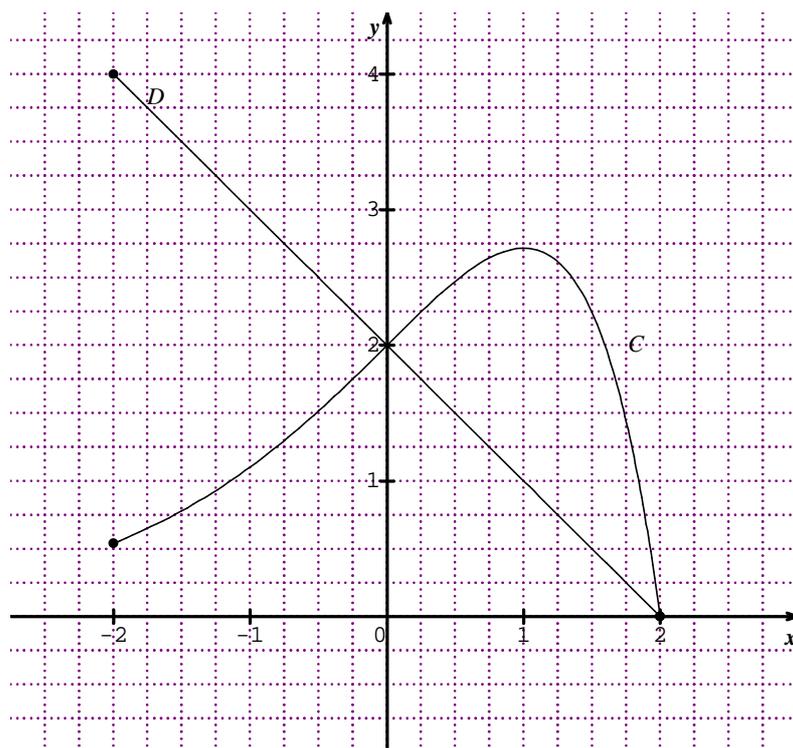
Tableau de signe :

x	- 2	0	2
2 - x	+		+
$e^x - 1$	-	0	+
$(2 - x)(e^x - 1)$	-	0	+

On a alors $S = [0 ; 2]$.

On retrouve graphiquement ce résultat en lisant l'ensemble des abscisses des points de la courbe qui se situent au dessus de la droite D d'équation $y = 2 - x$.

Graphique :



Pour démontrer que F est une primitive de $[f(x)]^2$, on calcule $F'(x)$:

$$\begin{aligned}
 F'(x) &= \left(x - \frac{5}{2}\right)e^{2x} + 2 e^{2x} \left(\frac{1}{2}x^2 - \frac{5}{2}x + \frac{13}{4}\right) \\
 &= e^{2x}(x^2 - 4x + 4) \\
 &= e^{2x}(x - 2)^2 \\
 &= e^{2x}(2 - x)^2 \\
 &= [f(x)]^2
 \end{aligned}$$

Application : calcul du volume du flotteur :

$$\begin{aligned}
 V &= \pi \int_{-2}^2 [f(x)]^2 dx \\
 &= \pi [F(x)]_{-2}^2 \\
 &= \pi \left[\left(2 - 5 + \frac{13}{4}\right) e^4 - \left(2 + 5 + \frac{13}{4}\right) e^{-4} \right] \\
 &= \frac{\pi}{4} (e^4 - 41 e^{-4}) \text{ en u.v.}
 \end{aligned}$$

or l'unité graphique est 2cm, alors 1 u.v. = 2³ cm³, d'où $V \approx 338,332 \text{ cm}^3$

Exercice 2 (10 points)

On s'intéresse maintenant au contrôle de la qualité de la fabrication du modèle de flotteur.

A. Loi binomiale

1. Chaque prélèvement de n flotteurs est constitué par n épreuves élémentaires indépendantes (tirage avec remise).

Chaque épreuve élémentaire (le tirage d'un flotteur) a deux issues possibles et deux seulement :

- le flotteur a une masse acceptable avec la probabilité $p = 0,26$
- ou
- le flotteur n'a pas une masse acceptable avec une probabilité $q = 0,74$.

La variable aléatoire X associée à ces tirages le nombre total de flotteurs dont la masse est acceptable.

Donc X suit la loi binomiale de paramètres n et 0,26.

$$\text{Et } P(X=k) = C_n^k 0,26^k 0,74^{n-k}$$

2. On suppose $n = 6$

- a. Calcul de $P(X = 2)$: $P(X = 2) \approx 0,30$
- b. Calcul de $P(X \leq 2)$: $P(X \leq 2) = P(X=0) + P(X=1) + P(X=2) \approx 0,81$

3. On prélève n flotteurs

- a. calcul de $P(X=0)$: $P(X=0) = 0,74^n$
- b. On cherche n_0 tel que $P(X \geq 1) \geq 0,95$.

$$\text{Or } P(X \geq 1) = 1 - P(X = 0)$$

$$\text{D'où } 1 - P(X = 0) \geq 0,95 \text{ soit } P(X=0) \leq 0,05$$

$$\text{ce qui donne } (0,74)^n \leq 0,05$$

$$n \ln(0,74) \leq \ln 0,05$$

$$n \geq \frac{\ln 0,05}{\ln 0,74} \quad \text{soit } \boxed{n_0 = 10}$$

B. Loi normale

Y est la variable aléatoire qui, à chaque flotteur associe sa masse exprimée en g.

Y suit une loi normale de moyenne 25 et d'écart-type 1,58

$$1. P(X \leq 27) = P\left(T \leq \frac{2}{2,58}\right) \quad \text{avec } T = \frac{X - 25}{1,58} \approx 0,90$$

$$2. P(X \leq 24,5) = P\left(T \leq \frac{-0,5}{1,58}\right) \approx 0,37$$

C. Probabilités conditionnelles

1. D'après l'énoncé :

$$P(A_1) = 0,60 \quad P(A_2) = 0,40 \quad P(D/A_1) = 0,013 \quad P(D/A_2) = 0,018$$

$$2. P(A_1 \cap D) = P(D/A_1) \times P(A_1) = 0,0078$$

$$\text{de même } P(A_2 \cap D) = P(D/A_2) \times P(A_2) = 0,0072$$

$$\text{D'où } P(D) = P(A_1 \cap D) + P(A_2 \cap D) = 0,015$$

$$3. \text{ On peut calculer alors, } P(A_1/D) = \frac{P(A_1 \cap D)}{P(D)} = 0,52$$

L'emploi de toutes les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphiques est autorisée à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (circulaire n°99-018 du 1-02-1999).

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 6 pages numérotées de 1 à 6.

Il est rappelé aux candidats que la qualité de la rédaction, la clarté et la précision des raisonnements entreront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

Le candidat devra impérativement se conformer à l'ordre et à la numérotation des questions posées.

I. SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET CHIMIE ORGANIQUE (22 points)

On donne le tableau de quelques fréquences caractéristiques en spectroscopie infrarouge en **annexe 1**.

1. Un composé organique (A), de formule brute (C₅H₁₂O), présente dans l'infrarouge une large bande d'absorption aux environs de 3 300 cm⁻¹, ainsi qu'une autre beaucoup plus fine à 3 600 cm⁻¹.

- a) De quel groupement fonctionnel ces deux bandes révèlent-elles la présence ?
- b) À quelle catégorie de composés organiques la substance (A) appartient-elle ?

2. Un composé (B) de formule C₅H₁₀O se caractérise par la présence dans l'infrarouge moyen d'une bande d'absorption à 1730 cm⁻¹. Il donne un précipité jaune avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH).

- a) Quel est le groupement fonctionnel présent dans le composé (B) ?
- b) Calculer la longueur d'onde λ à laquelle se situe la bande d'absorption dans l'infrarouge.
- c) A quelles catégories de composés organiques la substance (B) peut-elle appartenir ?

3. (B) est en fait obtenu à partir de (A) par oxydation par une solution acidifiée de dichromate de potassium (K₂Cr₂O₇). (B) donne un test négatif au réactif de Fehling. Le composé (B) est analysé en RMN. Le spectre ¹H du composé (B) ainsi qu'une table de déplacements chimiques sont donnés en **annexe 2**.

- a) En déduire la catégorie de composés organiques à laquelle appartient (B).
- b) Quelle est la classe du composé organique (A) ?
- c) Proposer une structure du composé (B) cohérente avec le spectre RMN et les questions précédentes. Préciser le nom de (B).
- d) En déduire la formule et le nom de (A).
- e) Le composé (A) possède-t-il un carbone asymétrique ? Dans l'affirmative, représenter le stéréo-isomère de configuration absolue S.
- f) Écrire et équilibrer la réaction d'oxydoréduction permettant d'obtenir (B) à partir de (A). On donne le couple redox : Cr₂O₇²⁻ / Cr³⁺.

II. ÉQUILIBRES ACIDO-BASIQUES (13 points)

Les questions (1. et 2.) sont indépendantes.

Soit une solution aqueuse (S_A) contenant de l'acide méthanoïque à la concentration c = 2,30 mmol.L⁻¹.

1. Cette solution présente à 25,0°C un pH égal à 3,25.

- a) Écrire l'équation de la réaction de dissociation de l'acide dans l'eau puis donner l'expression de la constante d'équilibre associée.
- b) Exprimer les concentrations molaires des espèces (HCO₂H) et (HCO₂⁻) en fonction de (c) et du pH.
- c) En déduire la valeur de la constante d'équilibre (K_A), puis celle de la grandeur (pK_A), cette dernière étant donnée avec deux décimales.

2. On mélange la solution précédente à une solution (S_B) de base forte (K⁺OH⁻) de concentration molaire c' = 8,00 mmol.L⁻¹ ; les volumes employés sont respectivement : V_A = 100,0 cm³ ; V_B = 50,0 cm³.

- a) Écrire l'équation de la réaction prépondérante intervenant au cours du mélange des deux solutions.
- b) Quel est le réactif en excès ? Justifier votre réponse.

c) Déterminer les concentrations molaires de toutes les espèces majoritaires et le pH du milieu à l'état final.

Le produit ionique de l'eau est égal à $1,00 \cdot 10^{-14}$ à la température envisagée (25,0°C).

III. VISCOSITÉ DES LIQUIDES. (8 points)

Les questions (1. et 2.) sont indépendantes.

Un viscosimètre d'Ostwald comporte un tube capillaire vertical (T) surmonté d'une ampoule (A) munie de deux index (I_1 , I_2), et dont l'extrémité inférieure plonge dans le liquide étudié.

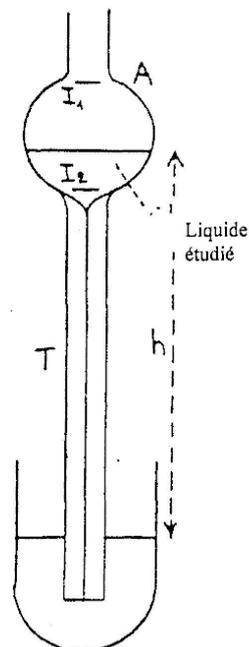
L'ampoule étant préalablement remplie par aspiration, on laisse le liquide s'écouler par gravité et on mesure la durée de l'écoulement (t) correspondant au passage de la surface libre de l'index I_1 à l'index I_2 .

Cette durée (t) est proportionnelle à la viscosité (η) du liquide et inversement proportionnelle à sa masse volumique (ρ), ce que l'on exprime par la relation :

$$t = \eta / (K \cdot \rho)$$

K représente la constante d'étalonnage de l'appareil.

La viscosité admet pour unité SI, le poiseuille (noté Pl qui correspond à $1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.



1. L'expérience a été réalisée avec deux liquides à 20,0°C :

- le propan-1-ol de viscosité connue $\eta_0 = 2,256 \text{ mPl}$, et de masse volumique $\rho_0 = 0,8021 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$

- l'acide méthanoïque qui présente une masse volumique $\rho = 1,2178 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$

Elle a conduit aux résultats suivants :

- pour le propan-1-ol, $t_0 = 314,8 \text{ s}$;

- pour l'acide méthanoïque $t = 165,8 \text{ s}$.

a) Expliquer sommairement, de façon qualitative, pourquoi :

- ✓ le temps d'écoulement est fonction croissante de la viscosité du liquide.
- ✓ ce même temps est fonction décroissante de sa masse volumique.

b) Établir l'expression de la viscosité (η) de l'acide méthanoïque en fonction des autres données (η_0 , ρ_0 , t_0 , ρ , t).

c) La calculer avec une précision convenable.

2. Constante d'étalonnage du viscosimètre

a) Exprimer la constante d'étalonnage (K) de l'appareil en fonction des données relatives au liquide de référence (le propan-1-ol).

b) La calculer en utilisant les unités de base de la mécanique ; mentionner l'unité finale accompagnant le résultat.

IV. THERMODYNAMIQUE (7 points)

Les questions sont indépendantes.

L'oxydation de l'acide méthanoïque par le dibrome en solution aqueuse est caractérisée à 25,0°C (soit 298,15 K) par :



- une variation d'entropie standard $\Delta_r S^0 = -11,3 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$;

- une constante d'équilibre $K = 1,051 \cdot 10^{42}$.

1.

a) Exprimer puis calculer les variations d'enthalpie libre standard ($\Delta_r G^0$) et d'enthalpie standard ($\Delta_r H^0$) relatives à la réaction considérée à la même température (on donne $R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$).

b) L'oxydation de l'acide méthanoïque est-elle spontanée dans les conditions standard ? Cette réaction est-elle endo ou exothermique ? Justifier votre réponse.

2. Exprimer ($\Delta_r S^0$) en fonction des entropies molaires standard des diverses espèces intervenant dans l'équation de la réaction et en déduire celle de l'acide méthanoïque.

Données :

$$S^0_{\text{CO}_2} = 117,6 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$S^0_{\text{Br}_2} = 130,5 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$S^0_{\text{Br}^-} = 82,4 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$S^0_{\text{H}^+} = 0$$

Annexe 1

SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

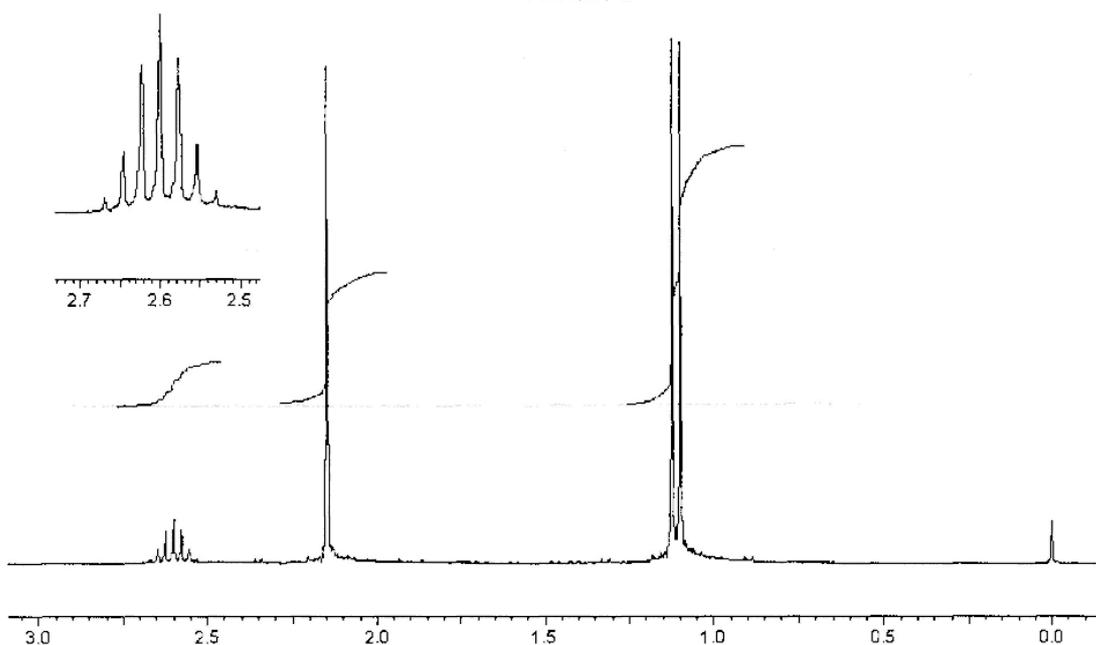
Liaison + Environnement	Nature	Nbre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité ⁽¹⁾
C _{sp3} -H	Valence	2810 - 3000	F
C _{sp3} -H (CH ₃ -)	Déformation	1365 - 1385	F
C _{sp2} -H	Valence	3000 - 3100	m
C _{sp2} -H	Déformation	790 - 960	F
C _{sp2} -H (aromatique)	Valence	3030 - 3080	m
C _{sp2} -H (aromatique monosubstitué)	Déformation (hors du plan)	690 - 770	F
		730 - 770	F
C _{sp2} -H (aromatique ortho.-disubstitué)	Déformation (hors du plan)	735 - 770	F
C _{sp2} -H (aromatique méta.-disubstitué)	Déformation (hors du plan)	680 - 725	m
		750 - 810	F
C _{sp2} -H (aromatique para.-disubstitué)	Déformation (hors du plan)	800 - 860	F
C _{sp2} -H (aromatique 1,2,3 substitué)	Déformation (hors du plan)	685 - 720	m
		770 - 800	F
C _{sp2} -H (aromatique 1,2,4 substitué)	Déformation (hors du plan)	800 - 860	F
		860 - 900	m
C _{sp2} -H (aromatique 1,2,5 substitué)	Déformation (hors du plan)	675 - 730	F
		810 - 865	F
C _{sp2} -H (aldéhyde)	Valence	1750 - 2900	m
C _{sp} -H	Valence	3300 - 3310	m
O-H (libres)	Valence	3580 - 3670	F
O-H (alcool et liaison H)	Valence	3200 - 3400	F
O-H (acide carboxylique)	Valence	2500 - 3200	F
N-H (amines + imines)	Valence	3100 - 3500	m
N-H (amides)	Valence	3100 - 3500	F
C-C	Valence	1000 - 1250	F
C=C	Valence	1625 - 1680	m
C≡C	Valence	2100 - 2250	f
C=C (aromatique) si le cycle est conjugué, ces deux bandes sont déplacées de - 20 et - 40 cm ⁻¹ et l'intensité de ces bandes devient forte.	Valence	Vers 1600	m
		Vers 1500	m
C-O	Valence	1050 - 1450	F
C=O (aldéhydes et cétones)	Valence	1650 - 1730	F
C=O (acides)	Valence	1680 - 1710	F
C=O (esters)	Valence	1700 - 1740	F
C=O (anhydrides)	Valence	1700 - 1840	F
		(2 bandes)	
C=O (amides)	Valence	1650 - 1700	F
C-N	Valence	1000 - 1400	F
C=N	Valence	1600 - 1680	F
C≡N	Valence	2120 - 2260	m, F
C-F	Valence	1000 - 1400	F
C-Cl	Valence	700 - 800	F
C-Br	Valence	600 - 750	F
C-I	Valence	500 - 600	F
N=O	Valence	1510 - 1580	F
		1325 - 1365	F

⁽¹⁾ F = forte

m = moyenne

f = faible

Annexe 2



Spectre RMN ¹H du composé (B) avec agrandissement aux alentours de 2,6 ppm.

Groupe fonctionnel	Déplacement chimique
$\text{CH}_3-\text{C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	0 - 1
$\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{C} \\ \diagdown \end{array}$	1 - 2
$\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \\ \text{O} \end{array}$	3 - 4
$-\text{C} \equiv \text{CH}$	2 - 3
$\text{CH}_3-\text{C} \begin{array}{l} \\ \text{O} \end{array}$	2 - 3
$\text{CH}_3-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	2 - 3
$\text{R}-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	2 - 3
$\text{R}-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \\ \text{O} \end{array}$	2 - 3
$\text{CH}_3-\text{O}-$	3 - 4
$\text{R}-\text{CH}_2-\text{O}-$	3 - 4
$\text{R}-\text{OH}$	1 - 5
$\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C}=\text{CH}_2 \\ \diagdown \end{array}$	4 - 6
$-\text{CH}=\text{CH}-$	5 - 7
	7 - 8
	7 - 9
$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \\ \text{O} \\ \\ \text{H} \end{array}$	9 - 10
$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	10 - 12

Table de déplacements chimiques de noyaux ¹H dans le TMS.

ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

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

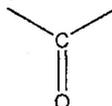
I. - SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET CHIMIE ORGANIQUE (22 points)

1.

- a) Ces deux bandes révèlent la présence d'un groupement – OH.
- b) (A) est un alcool.

2.

- a) La bande à 1730 cm⁻¹ et le test positif à la 2,4-DNPH indique la présence d'une fonction carbonyle :



$$b) \lambda = \frac{1}{1730} = 5,78 \cdot 10^{-4} \text{ cm} = 5,78 \cdot 10^{-6} \text{ m.}$$

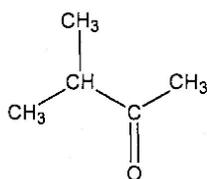
- c) (B) peut être un aldéhyde ou une cétone.

3.

- a) (B) n'a pas de propriétés réductrices donc (B) est une cétone.
- b) (A) est un alcool secondaire.
- c)

δ (ppm)	Intégration		Multiplicité	Nb de H voisins	Conclusion
	En cm environ	En H			
1,2	3,6	6	Doublet	1	2 CH ₃ voisins d'un CH donc <chem>CH3-CH-CH3</chem>
2,3	1,8	3	Singulet	0	CH ₃ – sans voisin
2,6	0,6	1	Septuplet	6	Un CH voisin de 2 CH ₃ donc <chem>CH3-CH-CH3</chem>
	Total 6	10			

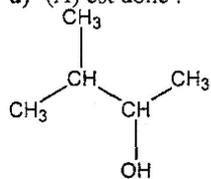
Donc la molécule (B) a pour formule :



c'est la 3-méthylbutan-2-one.

d) (A) est donc :

1 pt



c'est le 3-méthylbutan-2-ol.

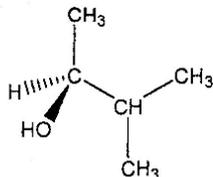
1 pt

e) (A) possède un carbone asymétrique (avec 4 groupements différents)

1 pt

Les groupements portés par cet atome sont classés par numéros atomiques décroissants, ainsi $-\text{OH} > (\text{CH}_3)_2\text{CH} - > \text{CH}_3 - > \text{H} -$

1 pt

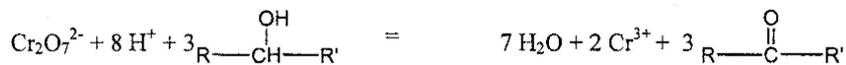


f)

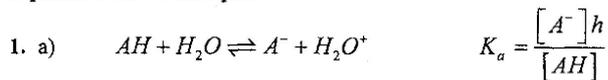
3 pts



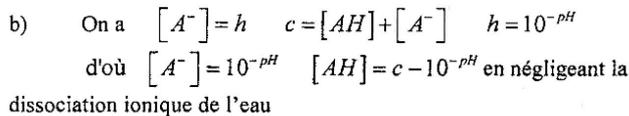
Soit



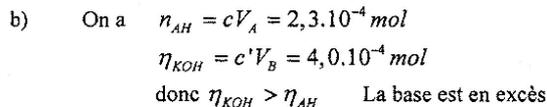
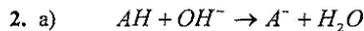
II. Équilibres acido-basiques



avec $AH : HCOOH$ $A^- : HCOO^-$



c) $K_a = \frac{10^{-2pH}}{(c - 10^{-pH})} = 1,82 \cdot 10^{-4}$; $pK_a = -\lg K_a = 3,74$.



c) L'acide a totalement réagi (tableau avancement ou autre justification)

$$[A^-] = \frac{n_{AH}}{(V_A + V_B)} = 1,53 \text{ mmol/L}; [K^+] = \frac{n_{KOH}}{(V_A + V_B)} = 2,67 \text{ mmol/L};$$

$$[OH^-] = \frac{(n_{KOH} - n_{AH})}{(V_A + V_B)} = 1,13 \text{ mmol/L} \quad 11,0 < pH < 11,1$$

III. Viscosité des liquides

1. a) Explications

b) On a $\begin{cases} t = \eta / K_\rho \Rightarrow \eta = \eta_0 \left(\frac{t}{t_0} \right) \left(\frac{\rho}{\rho_0} \right) \\ t_0 = \eta_0 / K_{\rho_0} \end{cases}$

c) $\eta = 1,804 \text{ mPa}$

2. a) $K = \frac{\eta_0}{\rho_0 t_0}$

b) $K = 8,935 \cdot 10^{-9} \text{ SI}$ $U_{(K)} = \frac{1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}}{1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}} = 1 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$.

IV. Thermodynamique

1. a) $\Delta_r G^0 = -RT \ln K = -240 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$;

$$\Delta_r H^0 = \Delta_r G^0 + T \Delta_r S^0 = -243 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

c) Réaction possible dans les conditions stand : car $\Delta_r G^0 < 0$ ou K positif et grand

Réaction exothermique puisque $\Delta_r H^0 < 0$

2. $\Delta_r S^0 = S_{CO_2}^0 + 2S_{H^+}^0 + 2S_{Br^-}^0 - S_{HCO_2H}^0 - S_{Br_2}^0 \Rightarrow$

$$S_{HCO_2H}^0 = S_{CO_2}^0 + 2S_{H^+}^0 + 2S_{Br^-}^0 - S_{Br_2}^0 - \Delta_r S^0 = 163 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Calculatrices non autorisées.

β-GALACTOSIDASE ET BIOTECHNOLOGIES

Introduction

La β-galactosidase est utilisée dans de nombreux domaines touchant aux biotechnologies, de la recherche à l'industrie.

Quelques aspects de cette enzyme et de l'utilisation qui peut en être faite sont abordés ici. Ainsi seront étudiés successivement :

- la structure et fonction de la β-galactosidase;
- l'utilisation de la β-galactosidase au laboratoire comme outil technologique ;
- l'utilisation de l'activité β-galactosidase à l'échelle industrielle pour l'hydrolyse du petit-lait ;
- le syndrome de Goldberg, qui résulte chez l'homme d'un défaut d'une protéine protectrice de la β-galactosidase.

1. Structure et fonction de la β-galactosidase (20 points)

La β-galactosidase d '*E.coli* (E.C.3.2.1.23) est une exoenzyme tétramérique dont la masse molaire est de 540 000 g.mol⁻¹.

1.1 Définir les différents niveaux d'organisation structurale de cette molécule en citant à chaque fois les types de liaisons impliquées.

1.2 Après avoir cité les différentes classes d'enzymes, indiquer celle à laquelle appartient la β-galactosidase et justifier la réponse.

L'oNPG (orhonitrophényl-(3-D-galactoside) est un substrat synthétique qui permet d'étudier les paramètres cinétiques de cette enzyme.

1.3 Écrire l'équation de la réaction (formules semi-développées exigées).

1.4 Justifier l'intérêt pratique de ce substrat pour suivre l'évolution de la réaction.

1.5 Définir l'activité enzymatique.

2. Utilisation de la β-galactosidase en biochimie analytique (12 points)

Le dosage du lactose dans le petit-lait et dans les aliments utilise une première réaction enzymatique mettant en oeuvre la β-galactosidase. Une deuxième réaction intervient : elle est catalysée par la galactose déshydrogénase (qui transforme le galactose en acide galactonique). Lorsque la réaction enzymatique est terminée, l'absorbance du milieu réactionnel enzymatique est mesurée à 340 nm.

2.1 Expliquer le principe de cette méthode de dosage.

2.2 Schématiser la structure de ce coenzyme et justifier son nom.

2.3 Justifier la longueur d'onde de lecture en précisant les caractéristiques spectrales du coenzyme impliqué.

2.4 Donner la réaction d'oxydo-réduction en faisant apparaître la partie réactive du coenzyme.

3. Utilisation de la β-galactosidase à l'échelle industrielle : l'hydrolyse du lactose du petit-lait (30 points)

Le « petit-lait » est un sous produit de l'industrie fromagère obtenu lors de la première étape du traitement du lait. C'est un liquide riche en sucre et en sels minéraux.

3.1 Présenter l'importance des sels minéraux dans la réaction enzymatique.

Justifier le fait que les ions minéraux à concentration élevée soient gênants pour une hydrolyse enzymatique efficace.

3.2 Nommer et exposer le principe d'une méthode de déminéralisation du petit-lait susceptible d'être mise en oeuvre à grande échelle préalablement à l'hydrolyse du lactose.

L'hydrolyse du lactose est catalysée en bioréacteur avec l'enzyme immobilisée.

L'enzyme est obtenue à partir d'une culture d'*Aspergillus niger*. Les moisissures exigent pour leur culture des conditions nutritives et physico-chimiques particulières.

3.3 Réaliser un schéma annoté d'une fructification d'*Aspergillus* observé au microscope optique.

3.4 Citer les principales conditions physicochimiques et nutritionnelles permettant la culture des moisissures.

La culture de moisissures en bioréacteur discontinu et agité exige des précautions différentes de celles des cultures bactériennes.

- 3.5 Définir la notion de bioréacteur discontinu et agité. Justifier la nécessité de l'agitation dans ce cas précis.
- 3.6 Indiquer les contraintes de la culture de moisissures en bioréacteur. Proposer un dispositif adapté à la culture de moisissures.

L'enzyme est extraite et purifiée, puis immobilisée par réticulation.

- 3.7 Exposer les étapes d'une méthode d'extraction d'enzyme intracellulaire susceptible d'être mise en oeuvre à l'échelle industrielle.
- 3.8 Donner le principe de l'immobilisation par réticulation et justifier l'augmentation de la stabilité thermique de l'enzyme réticulée.
- 3.9 Présenter, sous forme de tableau, la classification des principales méthodes d'immobilisation d'enzymes.

4. Utilisation de la β -galactosidase comme outil en biologie moléculaire (38 points)

La β -galactosidase est souvent utilisée comme marqueur de repérage des clones d'*Escherichia coli*. Cette utilisation a nécessité la connaissance du fonctionnement de l'opéron lactose transformé par un plasmide recombinant : le vecteur pUC 18.

- 4.1 Définir la notion d'opéron et préciser l'intérêt de ce mode d'organisation pour la cellule.
- 4.2 À l'aide de schémas légendés, expliquer le fonctionnement de cet opéron :
 - o en présence de lactose uniquement ;
 - o en présence de glucose et de lactose.

Le plasmide pUC18 est utilisé comme vecteur de clonage. Il contient une partie de l'opéron lactose.

- 4.3 Réaliser une carte simplifiée du vecteur pUC 18 montrant les différentes boîtes fonctionnelles.
- 4.4 Justifier la position du site multiple de clonage dans le plasmide.
- 4.5 Donner les caractéristiques phénotypiques majeures obligatoires de la bactérie hôte pour que ce clonage soit opérationnel.

Le plasmide recombinant est obtenu par l'insertion d'un fragment de 1 kilobase. Il est ensuite introduit dans une souche d'*E. coli* Lac (-).

Les bactéries transformées sont cultivées sur un milieu gélosé en présence d'ampicilline, d'IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) et d' X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside).

Après incubation dans les conditions adéquates, on observe quelques colonies bleues et de très nombreuses colonies blanches.

- 4.6 Préciser le rôle de l'ampicilline.
- 4.7 En s'appuyant sur la structure de l'IPTG et de X-gal, préciser le rôle de chacune de ces molécules dans le test réalisé.
- 4.8 Expliquer les mécanismes conduisant à la différence de couleur des colonies.

D'autres types de vecteurs sont utilisés couramment en biologie moléculaire.

- 4.9 Donner les caractéristiques d'un vecteur d'expression navette utilisable chez les moisissures.

5. La β -galactosidase dans la cellule eucaryote (20 points)

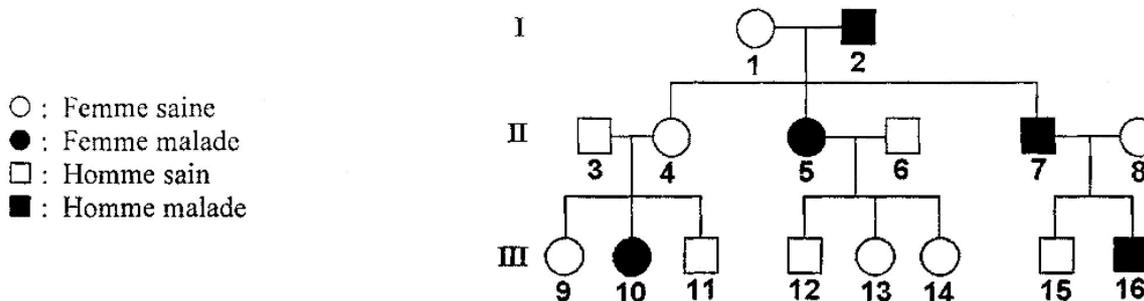
Il existe une maladie génétique rare appelée syndrome de Goldberg. Elle se caractérise par une accumulation anormale de β -galactosides dans les lysosomes. Cette galactosialidose résulte d'un déficit en une protéine lysosomale protectrice : la PPCA, Protéine Protectrice contre la Cathepsine A (la cathepsine étant elle même une protéase lysosomale). La PPCA protège la β -galactosidase et la neuraminidase (autres hydrolases acides lysosomales) contre la cathepsine A.

- 5.1 Présenter les principales différences structurales entre une cellule eucaryote et une cellule procaryote.
- 5.2 Rappeler le rôle du lysosome dans la cellule eucaryote.
- 5.3 Expliquer, à l'aide d'un schéma, comment sont créées les conditions physico-chimiques indispensables à l'activité des hydrolases contenues dans cet organe.
- 5.4 Sachant que ces hydrolases lysosomales sont susceptibles d'être libérées du lysosome, préciser quel peut être l'intérêt pour la cellule de telles conditions physico-chimiques.

Des fibroblastes cultivés à partir de la peau de patients atteints du syndrome de Goldberg peuvent se multiplier et montrent la même déficience lysosomale que chez le patient. Cependant, lorsque des fibroblastes synthétisant normalement la PPCA sont cultivés avec ceux d'un malade atteint par cette maladie, les lysosomes de ces derniers ne sont plus encombrés de substances accumulées de façon anormale.

5.5 Analyser et interpréter ces observations expérimentales.

L'arbre généalogique de la famille atteinte par cette pathologie est détaillé ci-dessous.



ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

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

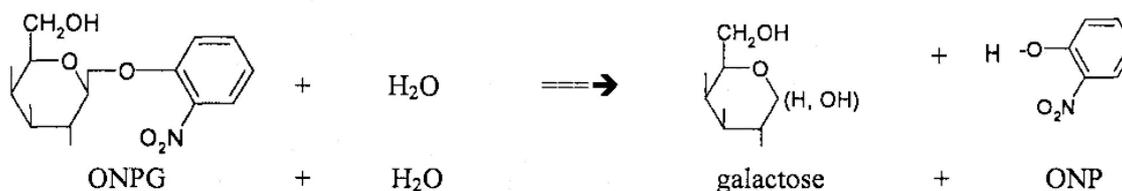
1.1.

Structure	Définition	Liaisons impliquées
I	Enchaînement des acides aminés dans la séquence peptidique	Liaison peptidique (covalente) ou liaison amide
II	Premier degré de repliement en hélice α , feuillet ou coude β	Liaisons hydrogène entre groupements C=O et N-H impliqués dans la liaison peptidique
III	Deuxième degré de repliement : domaines constitués par l'association des structures secondaires	Liaisons diverses, en relation avec la structure et les propriétés des radicaux des acides aminés (ponts S-S, liaisons H, liaisons ioniques, liaisons hydrophobes ...)
IV	Troisième degré de repliement : association des monomères par des liaisons identiques aux précédentes	Idem III

1.2. Classes : oxydoréductases, transférases, hydrolases, ligases, isomérases, lyases.

β -galactosidase : hydrolase, car elle appartient à la classe 3 (E.C.3.) et provoque la coupure de la liaison osidique par la fixation d'une molécule d'eau.

1.3.



1.4. L'ONPG est un substrat incolore dont l'hydrolyse libère l'ONP coloré en jaune qui permet le suivi colorimétrique de la réaction.

1.5. C'est la quantité d'enzyme qui hydrolyse une quantité de substrat par unité de temps dans des conditions physico-chimiques données.

2.1. Lors d'une méthode en point final, la réaction est totale, donc l'hydrolyse du lactose (réaction principale) est totale avec libération de galactose. Lors de la réaction indicatrice, il y a transformation du galactose libéré avec formation de NADH+H⁺ en proportion stoechiométrique. Les enzymes et co-substrats ne sont pas limitants.

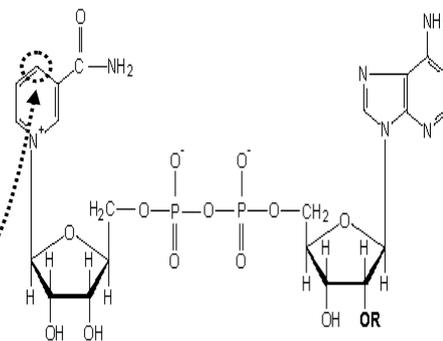
2.2. Image ci-contre issue du site :

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ge19/05nad.gif>

« Nicotinamide adénine dinucléotide » : donc il y a deux nucléotides, l'un avec le nicotinamide et l'autre avec l'adénine.

2.3. Le pic d'absorbance spécifique du NADH+H⁺ à 340 nm, alors que le NAD⁺ n'absorbe pas à cette longueur d'onde.

2.4. AH₂ + NAD⁺ → A + NADH+H⁺ : partie réactive



3.1. Les sels minéraux interviennent comme cofacteurs (activateurs ou inhibiteurs) et peuvent provoquer, à forte concentration, l'insolubilisation de la protéine.

3.2. Chromatographie par échange d'ions provoquant l'échange des cations et des anions sur des résines soit en lits séparés (dans deux colonnes) soit en lits mélangés dans une seule colonne.

3.3. Le schéma d'*Aspergillus* doit montrer : un **conidiophore** portant une **tête aspergillaire** (terminée par une **vésicule**) avec une rangée de **phialides** ou deux rangées (**métules** et **phialides**) portant les (**conidio**)spores.

3.4. Milieu acide, riche en glucides et fortement oxygéné.

3.5. Bioréacteur discontinu : culture en batch, sans apport de milieu (fed-batch) ni apport de milieu et prélèvement de culture simultanés (culture continue). Agitation nécessaire pour éviter la sédimentation de la biomasse et pour assurer la répartition des nutriments.

3.6. Agitation efficace car le milieu est visqueux (biomasse filamenteuse ou sous forme de pelotes) et pour permettre l'oxygénation, par bulleur perforé. Turbines Rushton sauf si moisissure sensible au cisaillement (utilisation d'une combinaison turbine Rushton et hélice marine pour faciliter le pompage par débit axial).

3.7. Lyse cellulaire nécessaire ; par moyen mécanique ou physico-chimique, puis séparation par centrifugation ou filtration.

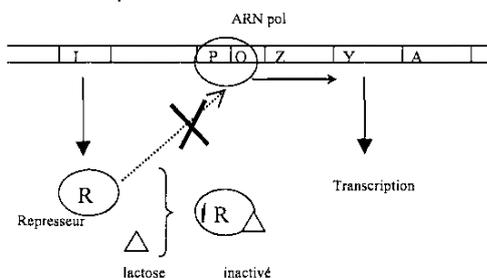
3.8. Réticulation par un agent bi-fonctionnel (par exemple le glutaraldéhyde) formant des pontages par liaisons covalentes intercalées entre les enzymes. La conséquence est une meilleure résistance thermique de la molécule car elle est moins sensible au dépliement à cause de la rigidification de sa structure.

3.9.

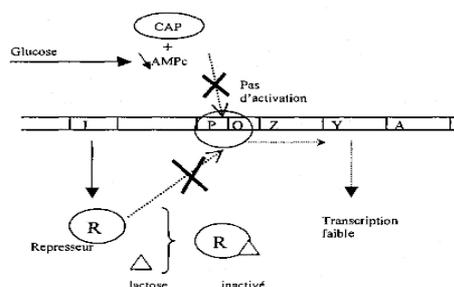
Méthodes physiques			Méthodes chimiques		
Inclusion ou confinement	Encapsulation	Inclusion dans un liposome	Support solide préexistant		Sans support solide préexistant
Polyacrylamide, alginate, carraghénate, fibres creuses			Liaisons non covalentes	Liaisons covalentes	
			Adsorption, liaisons ioniques, chélation		Réticulation, coréticulation

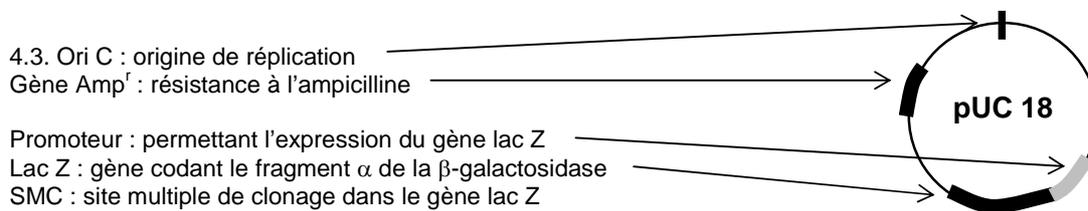
4.1. Ensemble de gènes sous le contrôle d'un promoteur régulier permettant la synthèse d'un ensemble d'enzymes impliqués dans la même voie métabolique.

4.2. En présence de lactose :



en absence de lactose :





4.4. Vecteur natif : production de la β-galactosidase
Vecteur recombinant : interruption de la phase de lecture par l'insert et donc pas de synthèse de l'enzyme.

4.5. La souche doit être Lac⁻ et Amp^s (également recA⁻ pour éviter des recombinaisons entre le vecteur et le chromosome).

4.6. Ampicilline : antibiotique permettant la sélection des clones transformés par le vecteur pUC 18, natif ou recombiné. Les bactéries non transformées sont détruites.

4.7. L'IPTG, β-galactoside non hydrolysable, est un inducteur « gratuit » pour le promoteur du gène lac Z. X-gal, β-galactoside incolore, est hydrolysable et libère un chromophore, c'est donc un substrat chromogène. Remarque : le produit de l'hydrolyse du X-gal reste dans le cytoplasme bactérien.

4.8. Colonies bleues : cellules hébergeant pUC 18 sans insert, l'expression du gène lac Z est induite par l'IPTG et le X-gal est hydrolysé.
Colonies blanches : cellules hébergeant pUC 18 avec un insert, donc l'expression du gène lac Z induite par l'IPTG conduit à une β-galactosidase non fonctionnelle et le X-gal n'est pas hydrolysé.

4.9. Amp^r et origine de répllication permettant le clonage chez *E.coli*.
Vecteur navette : il faut une origine de répllication chez la moisissure et un promoteur de type eycaryote.

5.1.

Cellule eucaryote	Cellule procaryote
Noyau vrai délimité par une enveloppe (à double membrane) et contenant la chromatine (plusieurs chromosomes)	Chromosome bactérien unique directement au contact du cytoplasme, pas de noyau.
Réseau membranaire intracellulaire (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, vésicules ...) Autres organites (mitochondries, chloroplastes des Végétaux ...)	En général pas de système membranaire intracytoplasmique (exceptions très rares)
Paroi : <ul style="list-style-type: none"> • Pecto-cellulosique chez les Végétaux • Constituée de chitine chez les Mycètes 	Paroi caractéristique (peptidoglycane) Exceptions : bactéries sans paroi (mycoplasmes ...)

5.2. Dégradation des molécules et structures : macromolécules, débris, organites, bactéries ...

5.3. Les hydrolases sont acides et nécessitent un pH nettement < 7, donc la concentration élevée en ions H⁺ est entretenue par une pompe à H⁺ ATP-dépendante.

5.4. Les hydrolases sont inactives dans le cytoplasme car le pH (voisin de la neutralité) n'est pas optimal et c'est donc une protection contre l'autodigestion.

5.5. Il y a un échange de protéines PPCA par des mécanismes d'endocytose / exocytose.

5.6. La maladie touche indifféremment des hommes et des femmes, elle n'est donc pas liée au sexe. La personne III-10 est malade alors que ses parents sont sains, ce qui prouve que ses parents sont hétérozygotes et porteurs de l'allèle muté. Cet allèle ne s'exprime qu'à l'état homozygote, la maladie est donc récessive.

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

1^{ère} partie : ÉTUDE DE PROJET

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

L'usage d'un dictionnaire anglais français et d'une calculatrice est autorisé.
Matériel nécessaire : une feuille de papier millimétré.

Caractérisation du pouvoir phytopathogène du champignon *Colletotrichum lindemuthianum*

Colletotrichum lindemuthianum est un champignon filamenteux ascomycète, responsable de l'antracnose chez le haricot commun *Phaseolus vulgaris*. Ce champignon infecte les parties aériennes de la plante hôte par l'intermédiaire de ses conidies. La maladie est caractérisée par des lésions brunes au niveau des nervures principales et secondaires des feuilles et qui vont s'étendre après quelques jours pour entraîner une macération totale des tissus végétaux. Des études ont été menées pour identifier et caractériser le pouvoir phytopathogène de ce champignon, en utilisant la souche sauvage pathogène UPS9 et une souche mutante non pathogène H290.

1. Préparation du matériel fongique (32 points)

Les études concernant le pouvoir pathogène de *C. lindemuthianum* passent par une mise en culture de ce champignon. Afin de standardiser l'infection de plants de haricots, on cherche à optimiser la pureté des préparations de conidies.

1.1. Culture de *Colletotrichum lindemuthianum*

Les souches de *C. lindemuthianum* sont cultivées sur milieu GPYECH modifié, à 19°C, pendant 10 jours afin d'obtenir des suspensions de conidies (**document n° 1**).

- 1.1.1. Indiquer les rôles des constituants du milieu de culture et en déduire les types trophiques de cette moisissure.
- 1.1.2. D'après les conditions physico-chimiques de culture, indiquer les caractères culturels de cette souche.
- 1.1.3. À quel moment de la préparation les antibiotiques sont-ils ajoutés au milieu de culture, pourquoi ?
- 1.1.4. Justifier l'utilisation de deux antibiotiques.
- 1.1.5. À partir d'un flacon de pénicilline G en poudre (caractéristiques présentées dans le **document n° 2**), indiquer, en exposant les calculs, les étapes de la préparation et de l'addition de cet antibiotique à un litre de milieu stérile.
- 1.1.6. Indiquer la signification des lettres "R" et "S".

1.2. Préparation des conidies

Deux modes opératoires de préparation des conidies sont envisagés :

- préparation par centrifugation isopycnique
- préparation par centrifugation isopycnique suivie d'une purification immunomagnétique.

1.2.1. Préparation des conidies par centrifugation isopycnique

- 1.2.1.1 Définir, succinctement, une centrifugation isopycnique (IPC).
- 1.2.1.2 Présenter les étapes de préparation des conidies décrites dans le **document n° 3**, sous la forme d'un schéma d'organisation.

1.2.2 Purification immunomagnétique (IMS) des conidies (**document n° 4**)

Cette purification nécessite l'utilisation d'anticorps MAb UB 31 dont la préparation est décrite dans le **document n° 4a**.

- 1.2.2.1. Schématiser l'étape finale de cette technique d'immunofluorescence indirecte. Préciser le rôle de cette technique dans le cadre de la préparation des MAb UB31.
- 1.2.2.2 Justifier le rôle des différentes étapes du protocole de purification immunomagnétique (**document n° 4b**).
- 1.2.2.3. Présenter, à l'aide d'un schéma légendé, l'étape 3 et préciser l'origine et la spécificité des deux types d'anticorps.

1.2.3 Comparaison des deux modes de préparation des conidies

À partir de l'analyse et de la comparaison des résultats obtenus pour les deux méthodes de préparation des conidies (**document n° 5**), en déduire le mode opératoire le mieux adapté.

2. Étude du gène *clk1* impliqué dans le pouvoir phytopathogène (25 points)

Pour identifier les gènes impliqués dans le pouvoir phytopathogène de *C. lindemuthianum*, un mutant non pathogène de ce champignon H290 a été créé par mutagenèse insertionnelle. Celle-ci a été réalisée en intégrant, de façon aléatoire, dans le génome de *C. lindemuthianum*, un ADN plasmidique (pAN7-1). La carte du plasmide est présentée dans le **document n° 6**.

2.1. Détermination du nombre d'insertion(s) du plasmide pAN7-1 dans le génome fongique

Afin de déterminer cette donnée, une analyse de l'ADN du mutant H290 a été réalisée par hybridation de type Southern, en utilisant :

- + l'enzyme de restriction : *Hind* III, dont le site est présent en grand nombre dans la plupart des génomes ;
- + la sonde : plasmide pAN7-1, linéarisé et marqué au phosphore 32.

Le **document n° 7** présente les caractéristiques et les résultats des « Southern blots » réalisés dans le cadre de cette expérience.

- 2.1.1 Indiquer le rôle de la sonde dans cette technique.
- 2.1.2 Interpréter les résultats du Southern blot n° 1 et montrer son intérêt.
- 2.1.3 Montrer à l'aide d'un schéma que les résultats du Southern blot n° 2 permettent de conclure que le plasmide a été inséré en un seul exemplaire.

Donnée : le site *Hind* III est conservé à l'intérieur du plasmide après insertion.

2.2. Étude de l'expression du gène *clk1* lors de l'infection du haricot par la souche sauvage

Le gène *clk1* (*Colletotrichum lindemuthianum* protein kinase I) code pour une protéine présentant une forte homologie de séquences avec des sérine-thréonine kinases. L'analyse de l'expression de ce gène *clk1* durant l'infection a été effectuée par RT-PCR.

Le **document n° 8b** renseigne sur les conditions de cette analyse :

- 2.2.1 Indiquer s'il est possible de réaliser ces trois RT-PCR en multiplex et d'en exploiter les résultats en tenant compte des critères suivants :
 - séquence des amorces
 - températures d'hybridation
 - taille de l'amplicon.
- 2.2.2 Expliquer l'intérêt d'utiliser des amorces dont l'extrémité 3'OH est riche en GC.
- 2.2.3 En quoi les résultats présentés dans le **document 9 (expériences A et B)** permettent-ils de confirmer les informations du **document 8a** ?
- 2.2.4 Quel est l'intérêt du choix du gène *gpd* pour la validation de la technique ?
- 2.2.5 Commenter les résultats obtenus pour l'expérience C.

3. Étude du métabolisme azoté et carboné au cours de l'interaction pathogène de *Colletotrichum lindemuthianum* et *Phaseolus vulgaris* (23 points)

Lors du processus infectieux, *C.lindemuthianum* induit des modifications du métabolisme carboné et azoté de la plante que l'on peut suivre à l'aide de marqueurs biochimiques.

3.1. Étude de la glutamine synthétase, marqueur du métabolisme azoté

La glutamine synthétase (GS) est une enzyme impliquée dans la synthèse de la glutamine à partir du glutamate et de l'ammonium libre. Les résultats du dosage de l'activité glutamine synthétase sont présentés dans le **document n° 10**.

- 3.1.1. Tracer sur un même graphe, l'évolution de l'activité de la GS en fonction du temps pour les haricots infectés par UPS9 et H290.
- 3.1.2. Calculer dans chaque cas les pourcentages d'activité résiduelle au bout de 12 jours.
- 3.1.3. Analyser l'ensemble de ces résultats et conclure quant à l'effet de l'infection sur l'activité GS.
- 3.1.4. Quelles sont les conséquences métaboliques de la modification de l'activité GS de la plante infectée? En déduire un intérêt possible pour le champignon.

3.2. Étude de la concentration en amidon et saccharose, deux marqueurs du métabolisme glucidique

Les échantillons de plantes infectées sont préparés selon le mode opératoire présenté dans le **document n° 11**.

3.2.1 Préciser les conditions de la réalisation de l'expérience témoin et son intérêt.

Les échantillons en vue du dosage des glucides sont préparés selon le mode opératoire présenté dans le **document n° 12.a**.

3.2.2 Quel est le rôle de l'acide perchlorique dans un tel dosage ?

3.2.3 Justifier le choix de la longueur d'onde à 340 nm et montrer que la mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde permet de doser le saccharose.

3.2.4 Justifier les différentes étapes du mode opératoire et leur chronologie.

Les résultats de ces dosages sont présentés dans le **document n° 13**.

3.2.5 Commenter les résultats obtenus.

3.2.6 Quel serait l'intérêt pour la souche UPS9 de perturber le métabolisme glucidique de la plante ?

DOCUMENT n°1

Composition du milieu gpyech

Composition pour 1 L de milieu

20 g : glucose
5 g : bactopeptone
1 g : extrait de levure
1 g : hydrolysate de caséine

- Ajuster le pH à 5,5, autoclaver 20 min à 120°C
- Ajouter - spectinomycine (1 g /L)
- extemporanément : - pénicilline G (5 000 unités/mL)

DOCUMENT n°2

Pénicilline G

SIGMA	ref : P8721	Penicillin G potassium salt USP powder
Identifiers	Synonyms : Benzylpenicillin potassium salt Molecular Formula : C ₁₆ H ₁₇ KN ₂ O ₄ S Molecular Weight : 372.48 CAS Number : 113-98-4 Beilstein Registry Number : 3832841 EG/EC Number : 2040380 MDL number : MFCD00036193	
Description	Biochem/physiol Actions	Mode of Action : Inhibits bacterial cell wall synthesis Antimicrobial spectrum : Gram-positive bacteria
Properties	Solubility Water	100 mg/mL Solutions should be filter sterilized and stored at 2-8°C for 1 week or at -20°C for extended periods. Solutions are stable at 37°C for 3 days.
	Potency	1500 units per mg
References	Merck Beilstein	Merck, 13 , 7165 Beil. 27 ,IV,5861
Safety Information	Hazard Codes	Xn
	R 42/43 S 36/37 RTECS	XH9700000

DOCUMENT n°3
Préparation d'une suspension de conidies par IPC

Primary leaves were excised from seedlings of *Phaseolus vulgaris* L. cv. La Victoire, brush inoculated with conidial suspension of *C. lindemuthianum*, and incubated for 72 h at 17°C.

After homogenization of the infected leaves using a blender, fungal infection structures were isolated from the homogenates using an isopycnic centrifugation (IPC) procedure.

This IPC preparation contained, on average, 10^7 conidia in total, with a purity of approximately 40 %.

Other components of the preparation were germ tubes, intracellular hyphae, plant cell wall fragments, starch grains, and chloroplasts.

Remarque « La Victoire » est la dénomination commerciale de la variété de haricot.

DOCUMENT n°4
Préparation d'une suspension de conidies par IMS

Document 4a
Preparation of MAb UB 31

MAb UB31 was obtained after immunization of BALB/c mice with *C. lindemuthianum* infection structures. The antibody was selected for further study after screening tissue culture supernatants on preparations of *C. lindemuthianum* infection structures by indirect immunofluorescence.

MAb UB31 is an immunoglobulin G1 (IgG1) with kappa light chains, that labels conidia strongly.

Document 4b

Protocole de purification immunomagnétique des conidies

Étape 1	Dans un tube, mettre les broyats de feuilles infectées en suspension dans 5 mL de surnageant contenant MAb UB31. Incuber sous agitation (60 rpm) pendant 18 heures à 4 °C.
Étape 2	Centrifuger la suspension, éliminer le surnageant et remettre en suspension dans 5 mL de PBS (tampon phosphate). Renouveler cette étape 4 fois.
Étape 3	Centrifuger et reprendre le culot dans 5 mL de PBS additionné de billes magnétiques sensibilisées par des anticorps de rats anti-IgG1 de souris. Incuber sous agitation (60 rpm) pendant 1 heure à 4 °C.
Étape 4	Placer le tube dans l'appareil MPC (Magnetic Particle Concentrator) pendant 5 minutes. Éliminer le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur.
Étape 5	Retirer le tube de l'appareil MPC, reprendre la fraction "bille" par 1 mL de PBS et agiter vigoureusement pendant 2 minutes.
Étape 6	Replacer le tube dans l'appareil MPC pendant 5 minutes et récupérer le surnageant riche en conidies.

DOCUMENT n°5

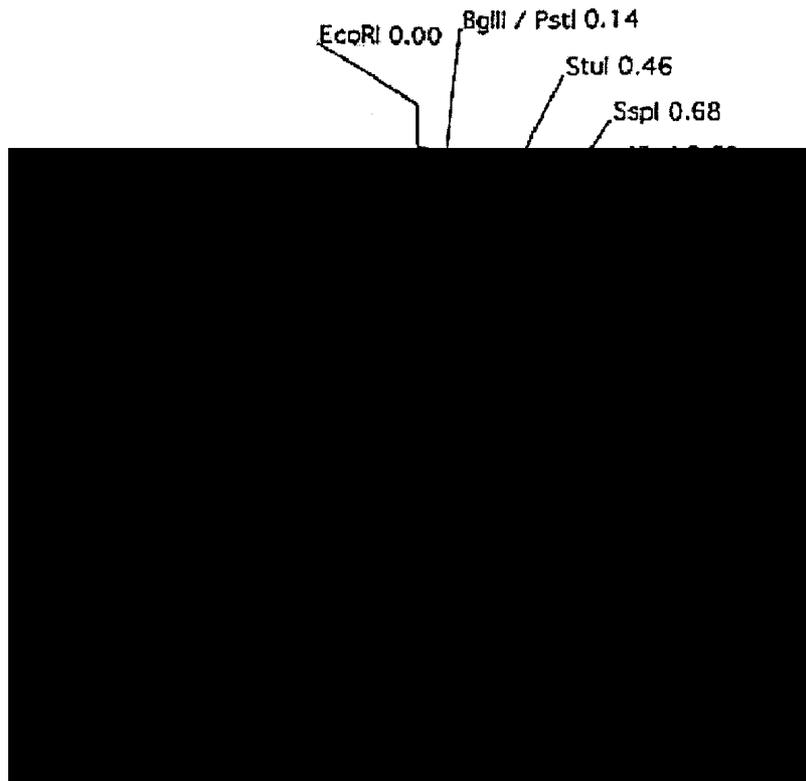
**Numbers of *C. lindemuthianum* conidia, intracellular hyphae
and chloroplasts obtained from homogenates
of infected bean leaves by IPC or IPC followed by IMS using MAb UB31^a**

Cell or organelle	IPC preparation		IMS preparation	
	Mean purity (%)	Mean yield ($\times 10^4$ per g of leaf tissue)	Mean purity (%)	Mean yield ($\times 10^4$ per g of leaf tissue)
Conidia	42,8 ± 6,4	118 ± 15	95,9 ± 1,8	31,7 ± 2,4
Intracellular hyphae	6,6 ± 1,3	19 ± 3	1,6 ± 0,3	0,54 ± 0,09
Chloroplasts	51 ± 7	170 ± 60	2,9 ± 0,3	1,0 ± 0,1

^a Results are the means ± standard errors from five replicate experiments. The range in conidial cell numbers was $1,03 \cdot 10^7$ to $2,06 \cdot 10^7$ for the IPC preparation and $3,15 \cdot 10^6$ to $5,4 \cdot 10^6$ for the IMS preparation.

DOCUMENT n°6

Carte du plasmide pAN7-1



DOCUMENT n°7

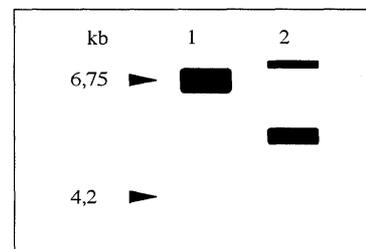
Caractéristiques et résultats des différents southern réalisés

southern	ADN testé	sonde*	enzyme utilisée
N°1	pAN7-1	pAN7-1	<i>Hind</i> III
N°2	ADN du mutant H290	pAN7-1	<i>Hind</i> III

*marquée au phosphore 32

Analysis of pAN7-1 integration pattern in H290 genomic DNA. *Hind* III digests of plasmid (lane 1) was included as controls.

Total genomic DNA of the mutant strain H290 was digested with *Hind* III (lane 2). The whole pAN7-1 was used as probe. Sizes are indicated in kilobases.



DOCUMENT n°8

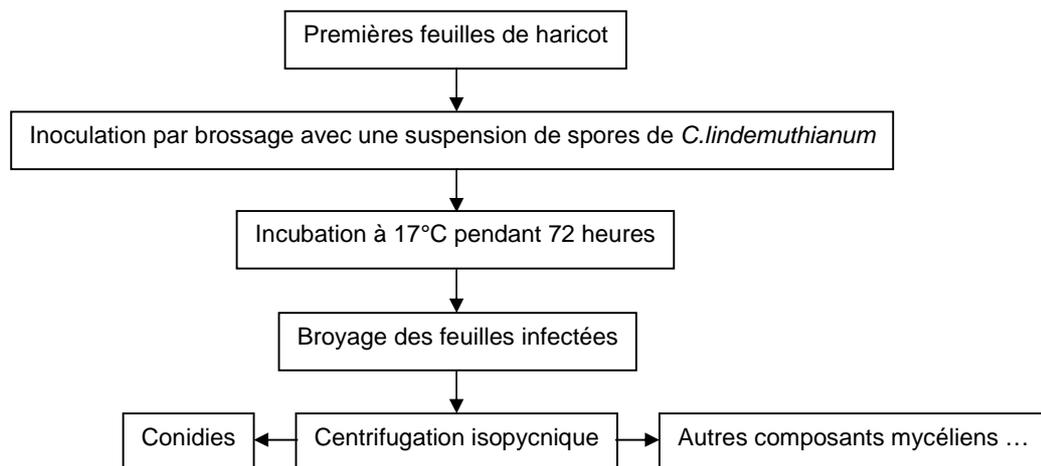
8a – *clk1* expression analysis

A more sensitive reverse transcriptase (RT-PCR) approach was developed to detect *clk1* transcripts. In order to evaluate the occurrence of fungal transcript in *P.vulgaris*-infected leaves, two fungal-specific genes were used. The first one corresponded to the *C.lindemuthianum* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase structural gene *gpd*, a constitutively and strongly expressed gene. Fungal-specific oligonucleotides were designed to avoid cross-amplification with plant materials. The second gene was the *C.lindemuthianum* structural nitrate reductase gene *nia*, selected because of its inducibility under nitrogen starvation. *clk1*-specific oligonucleotides were synthesized for the detection of the kinase transcripts.

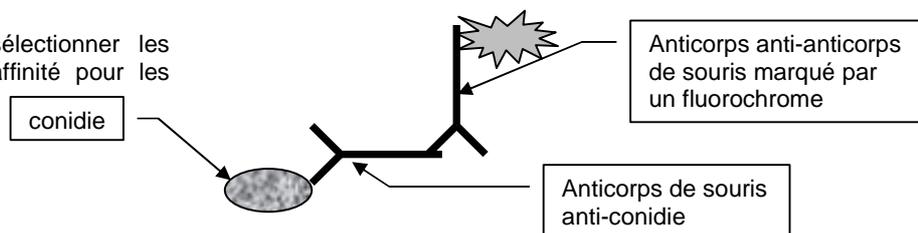
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ

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

- 1.1.1. Glucose : source de carbone organique (les moisissures sont hétérotrophes) et nutriment énergétique (les moisissures sont chémoorganotrophes). La bactopeptone et l'hydrolysate de caséine fournissent les acides aminés (donc ce sont des sources d'azote organique). L'extrait de levure contient de nombreuses vitamines et la souche de moisissure est certainement auxotrophe pour plusieurs facteurs de croissance et acides aminés. Les autres éléments chimiques (P,S) sont fournis par ces constituants du milieu.
- 1.1.2. La souche est mésophile (son optimum de température de croissance est entre 20 et 40°C) elle cultive bien à 19°C. le pH de 5,5 montre son caractère acidophile.
- 1.1.3. Les antibiotiques étant des molécules thermolabiles, on doit les ajouter après autoclavage.
- 1.1.4. Afin d'élargir le spectre d'action antibactérienne, c'est-à-dire les bactéries inhibées ou détruites.
- 1.1.5. Préparation d'une solution mère à 100 mg.mL⁻¹ par pesée de 10 g d'antibiotique en poudre et solubilisation dans du tampon en conditions de propreté.
Ajustage à 100 mL dans une fiole jaugée. La solution obtenue est à 150 000 U.mL⁻¹.
Stérilisation par filtration stérilisante sur dispositif stérile à usage unique.
Addition, en conditions aseptiques, de 33 mL de la solution stérile dans un litre de milieu.
- 1.1.6. R = phrase décrivant un risque et S = phrase décrivant les mesures de sécurité correspondantes à prendre pour éviter le risque signalé par la phrase R.
- 1.2.1.1. Centrifugation permettant de séparer les molécules selon leur densité.
- 1.2.1.2.



1.2.2.1. Elle permet de sélectionner les anticorps ayant le plus d'affinité pour les conidies



- 1.2.2.2. Étape 1 : fixation des anticorps anti-conidies sur les conidies.
- Étape 2 : élimination des anticorps non fixés
- Étape 3 : formation du complexe bille-anticorps de rat-anticorps de souris-conidies
- Étape 4 : rétention des billes complexées aux conidies et élimination du matériel cellulaire
- Étape 5 : dissociation des conidies et des billes
- Étape 6 : élimination des billes pour obtenir une suspension pure de conidies

1.2.2.3. L'anticorps primaire est un anticorps IgG1 de souris anti-conidie (c'est Mab UB 31).
L'anticorps secondaire est un anticorps de rat anti-igG1 de souris.

1.2.3. Le protocole par IMS permet d'obtenir une préparation de meilleur pureté, mais en moindre concentration, il est le meilleur choix puisqu'on cherche à obtenir une pureté maximale.

2.1.1. La sonde permet de repérer la séquence recherchée car elle en est spécifique et permet la visualisation de celle-ci grâce à son marquage au ³²P.

2.1.2. On voit 1 seule bande intense de taille 6,75 kb après hybridation, il y a donc eu une seule coupure : ces résultats sont cohérents, car il y a un seul site de restriction Hind III sur le plasmide, dont la taille est de 6,75 kb. Les réactifs et le mode opératoire sont donc validés, le « Southern » n°2 est donc exploitable.

2.1.3. Il y a des sites Hind III (flèches) dans l'ADN fongique (trait fin) et un seul site sur le plasmide (trait épais).



On observe donc 2 bandes qui hybrident avec la sonde, celle-ci révèle les 2 fragments de restriction obtenus après digestion par Hind III, il y a donc une seule insertion du plasmide dans l'ADN fongique.

2.2.1. Il ne faut pas qu'une hybridation entre les amorces soit possible, il faut que leurs températures d'hybridation soient proches, que les tailles des amplicons soient suffisamment différentes pour qu'on puisse les séparer. Il y a respectivement 9 et 7 °C d'écart entre les amorces clk1 et gpd ou nia, elles sont donc incompatibles. Les amplicons attendus sont respectivement de 345 et 340 pb pour les amorces nia et clk1, ils ne sont pas séparables.

2.2.2. Il y a 3 liaisons hydrogène entre G et C, la stabilité de l'hybridation est donc meilleure. L'extrémité 3'OH riche en GC permet donc un meilleur démarrage de l'élongation.

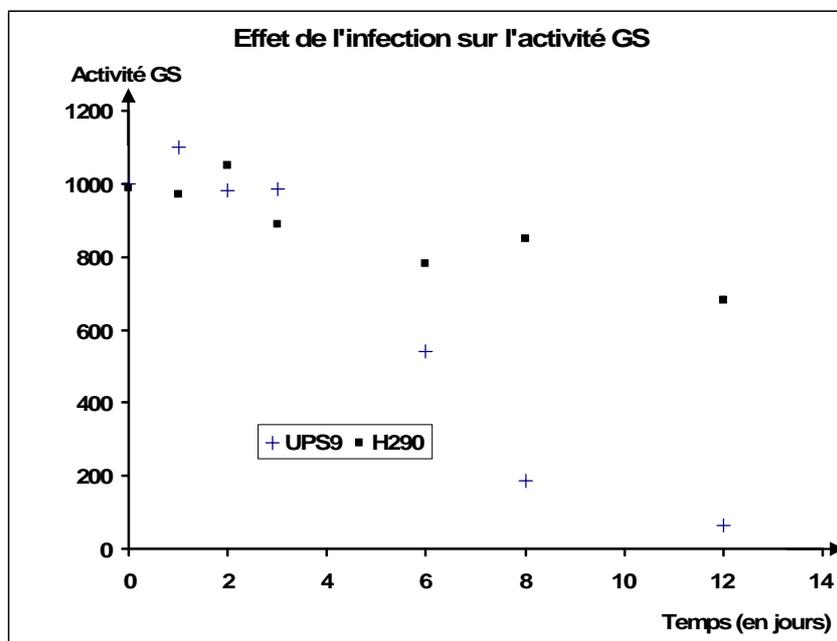
2.2.3. Pour A : les résultats pour gpd sont stables dans le temps, c'est donc sans doute un gène d'expression constitutive.

Pour B : l'expression du gène nia n'est pas détectable avant 20 h, c'est un gène inductible.

2.2.4. gpd est un gène dont le taux d'expression est élevé et constitutif : c'est donc un témoin positif intéressant.

2.2.5. L'expression du gène clk1 est tardive (entre 92 h et 100 h). Exemple de commentaire envisageable : l'expression de clk1 ne semble pas indispensable au début de l'infection du végétal par la moisissure.

3.1.1.



3.1.2. Pour la souche sauvage :
Pour la souche mutante :

% activité résiduelle = 65/1000 = 6,5 %
% activité résiduelle = 680/990 = 68,7 %

3.1.3. Infection de la plante par la souche sauvage : l'activité GS reste pratiquement stable pendant les 3 premiers jours, puis décroît fortement pour devenir très faible au 12^{ème} jour.

Infection de la plante par la souche mutante : l'activité GS décroît légèrement au cours du temps pour atteindre une valeur qui correspond à environ à 70 % de l'activité initiale. L'effet de l'infection est limité dans ce cas.

L'infection de la plante par le champignon provoque une forte diminution de l'activité GS, ce qui indique une forte perturbation du métabolisme azoté de la plante.

3.1.4. L'activité GS de la plante lui permet d'assimiler les ions NH_4^+ : le champignon peut avoir intérêt à stopper cette activité GS pour que les ions soient disponibles pour sa croissance, puisque les ions NH_4^+ sont une forme minérale de l'azote très facilement utilisable par les microorganismes.

3.2.1. L'expérience témoin est réalisée dans les mêmes conditions que l'essai, les feuilles ont été prélevées aux mêmes temps que les essais, il s'agit donc d'un témoin réalisé en absence d'infection.

3.2.2. L'acide perchlorique est un agent déféquant qui provoque la précipitation des protéines.

3.2.3. Le $\text{NADPH}+\text{H}^+$ présente un maximum d'absorption à $\lambda = 340 \text{ nm}$. D'après la stoechiométrie des réactions du dosage, une mole de saccharose hydrolysée mène à la formation d'une mole de $\text{NADPH}+\text{H}^+$.

3.2.4. Il était possible de répondre à partir du document 12 a ou du 12 b.

D'après le document 12 a :

- Broyage à -80°C : solidification et conservation du matériel biologique. Le broyage permet la libération des molécules, dont les glucides.
- Acide perchlorique : précipitation des protéines.
- Centrifugation : élimination des protéines précipitées.
- Surnageant : il permet le dosage des glucides solubles
- Culot : on effectue la solubilisation des grains d'amidon (formation de l'empois) puis la libération de celui-ci, il est ensuite hydrolysé par l'amylase et l'amylo-glucosidase, on dose ensuite les glucides libérés après élimination des restes des débris cellulaires par centrifugation.

D'après le document 12 b :

- Fructosidase : elle hydrolyse le saccharose, son pH optimal est différent de celui des 2 autres enzymes
- Incubation : la réaction d'hydrolyse doit être totale
- Addition des co-substrats des 2 réactions suivantes
- Homogénéisation pendant 10 minutes : elle permet aux réactions endogènes à l'échantillon menant à la production de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ et de $\text{NADH}+\text{H}^+$ de se développer
- A1 est mesuré avant l'addition des 2 enzymes (hexokinase et G6PDH) et permet ainsi de ne pas prendre en compte le $\text{NADPH}+\text{H}^+$ et le $\text{NADH}+\text{H}^+$ présent dans l'échantillon ou apparu par d'autres voies
- Addition des enzymes : elle déclenche la réaction, qui sera assurément totale au bout de 10 min
- $A2 - A1$ permet de ne prendre en compte dans le dosage que le $\text{NADPH}+\text{H}^+$ résultant effectivement que de l'hydrolyse du saccharose

3.2.5. La concentration en amidon diminue de manière identique au cours du temps, quelle que soit la souche testée (sauvage ou pathogène).

La concentration en saccharose augmente seulement lors de l'infection par la souche pathogène, alors que le niveau basal de la production de saccharose n'est pas modifié par l'infection par la souche sauvage non pathogène. Le saccharose formé lors de l'infection par la souche pathogène ne provient donc pas de l'hydrolyse de l'amidon : la souche pathogène perturbe le métabolisme glucidique du végétal infecté.

3.2.6. La souche pathogène provoque une formation accrue de saccharose dans le but d'utiliser celui-ci comme nutriment carboné et énergétique.

1.3. Compte rendu

- 1.3.1. Présenter les calculs effectués en 1.2.
- 1.3.2. Tracer la courbe de croissance sur papier millimétré à partir des valeurs expérimentales.
- 1.3.3. Commenter la courbe obtenue.
- 1.3.4. Déterminer graphiquement G et calculer Qx. (ou μ_x)

DEUXIÈME PARTIE : 35 points (premier et deuxième jour).

Vérification d'une construction plasmidique

Un fragment d'ADN de 1100 pb codant pour la protéine d'intérêt est intégré dans la cassette de clonage du plasmide P (3250 pb). La construction plasmidique est amplifiée par transformation de bactéries compétentes. Les bactéries ayant intégré le plasmide sont mises en culture sur milieu sélectif.

Une des colonies est repiquée en milieu liquide. Une mini préparation de plasmide est réalisée par la technique rapide de lyse bouillante. La solution plasmidique obtenue est analysée par digestion enzymatique pour vérifier la présence de l'insert.

2.1. Réactifs :

- | | |
|--|------------------|
| - solution plasmidique « S » : | 30 μL |
| - endonucléase de restriction Hinc II à 10 U. μL^{-1} « E » : | 3 μL |
| - tampon d'hydrolyse concentré 10 fois, « TH » : | 5 μL |
| - eau distillée, « ED » : | 50 μL |
| - solution de tampon de charge « TC » : | 12 μL |
- concentration fournie par le centre

2.2. Manipulation :

2.2.1. Digestion.

- Dans un microtube, préparer 20 L d'hydrolysate en introduisant successivement :
 - V_1 μL d'eau distillée
 - V_2 L de tampon x 10
 - 10 μL de solution plasmidique
 - 10 U d'enzyme
- Incuber à 37°C pendant 1 heure

2.2.2. Contrôle négatif.

Déposer parallèlement à la digestion la même quantité de solution plasmidique non digérée préparée comme suit dans un microtube :

- V_3 μL d'eau distillée
- 10 μL de solution plasmidique

2.2.3. Électrophorèse.

- Ajouter un volume adéquat de tampon de charge « TC » au produit de digestion et à la solution plasmidique non digérée. Conserver les mélanges dans la glace jusqu'au moment du dépôt.
- Charger le gel avec un volume V de chaque mélange (indiqué en début d'épreuve).
- Les dépôts du marqueur de taille, la migration et la révélation du gel seront réalisés par un examinateur.

2.3. Compte rendu

Indiquer les volumes mis en oeuvre et expliquer les calculs réalisés pour la réalisation des différentes étapes de la manipulation.

TROISIÈME PARTIE : 45 points

Dosage des protéines exprimées par les cellules transformées

Le fragment d'ADN du clone positif est ensuite introduit dans un vecteur d'expression. Les cellules transformées sont cultivées sur un milieu permettant d'optimiser l'expression du gène d'intérêt (production optimale estimée à 10 g.L⁻¹). Après culture, le surnageant protéique est dosé par la méthode de Bradford.

3.1. Réactifs et matériels

- solution étalon de BSA à 0,5 g.L⁻¹, « **BSA à 0,5 g.L⁻¹** » 5 mL
- solution protéique à doser, « **P** » 5 mL
- « **Réactif de Bradford** » en distributeur réglé sur 3 mL
- 2 fioles jaugées
- tubes à hémolyse et cuves de spectrophotomètre

3.2. Manipulation

3.2.1. Préparation de la gamme et des essais :

- À partir de la solution étalon fournie, préparer 5 solutions étalon filles contenant au maximum 50 µg de protéines pour 0,1 mL.
- Réaliser deux dilutions différentes de la solution **P** à doser.

Une dilution de la solution P sera réalisée en présence d'un examinateur

3.2.2. Réaction colorimétrique :

- 0,1 mL de solution protéique
- 3 mL de réactif de Bradford
- Agiter, attendre 10 min.
- Lire l'absorbance à 595 nm contre le témoin réactif. (La coloration est stable pendant 1 heure).

3.3. Compte rendu

3.3.1. Expliquer les dilutions effectuées sur la solution P à doser.

3.3.2. Présenter la préparation de la gamme et les résultats sous forme d'un tableau.

3.3.3. Tracer la courbe d'étalonnage à l'aide de l'outil informatique, calculer la concentration en protéines de la solution à doser (cv = 5 %)

QUATRIÈME PARTIE : 40 points

Préliminaire à l'étude des effets de cette protéine d'intérêt sur la cellule animale.

En vue de tester les effets de cette protéine sur des cellules animales, on se propose d'entretenir des cultures cellulaires (cellules animales adhérentes cultivant en monocouche dans du milieu DMEM additionné de 10 % v/v de sérum de veau foetal), en réalisant les étapes suivantes :

- vérification des flacons de cultures cellulaires à repiquer,
- repiquage des cellules,
- numération de la suspension cellulaire.

4.1. Réactifs et matériel :

En salle de culture :

- 2 flacons de la culture cellulaire « **Xa** » et « **Xb** » 25 mL
- tampon PBS sans calcium, stérile « **PBS** » 6 mL
- solution de trypsine stérile « **Trypsine** », 2,5 mL
- milieu DMEM stérile additionné de glutamine, de 10 % v/v de SVF et d'antibiotiques « **DMEM⁺** », 10 mL
- flacon de culture stérile (25 mL)
- matériel spécifique aux cultures cellulaires

En salle de T.P. :

- hématimètre et lamelles planes,
- solution de bleu de Funk à 0,4 % « **BF** » 1 mL
- 2 tubes à hémolyse, 2 tubes Eppendorf

4.2. Manipulation :

Les parties 4.2.1 et 4.2.2 sont réalisées sous hotte à flux laminaire en salle de culture cellulaire en présence d'un examinateur.

Tous les examens microscopiques réalisés doivent être présentés à un examinateur.

4.2.1. Vérification des cultures cellulaires à repiquer.

- Réaliser un examen macroscopique des cultures cellulaires à disposition.
- Réaliser un examen microscopique des cultures cellulaires au microscope inversé.
- Choisir un flacon de culture cellulaire (« Xa » ou « Xb ») afin d'effectuer le repiquage.

4.2.2. Repiquage des cellules.

À partir du flacon de culture choisi :

- Éliminer le milieu de culture.
- Laver le tapis cellulaire avec 5 mL de « PBS ».
- Introduire 2 mL de solution de trypsine et laisser agir à température ambiante en surveillant attentivement l'action de la trypsine.
- Introduire 5 mL de milieu DMEM⁺ et homogénéiser soigneusement : on obtient la suspension cellulaire C.
- Transférer 1,5 mL de suspension C dans un nouveau flacon stérile. Compléter à 5 mL avec le milieu DMEM⁺.
- Placer le flacon à l'étuve à 37°C en atmosphère air + 5 % CO₂.

4.2.3. Numération des cellules viables de la suspension cellulaire C.

- Prélever 0,2 mL de la suspension C.
- Ajouter 0,05 mL de bleu de Funk.
- À l'aide de l'hématimètre, compter immédiatement les cellules viables.

Montrer un champ de l'hématimètre à un examinateur.

4.3. Compte rendu

- 4.3.1. Indiquer les résultats des examens macroscopique et microscopique des cultures cellulaires.
- 4.3.2. Indiquer le critère de choix du flacon de culture cellulaire utilisé pour prélever les cellules à repiquer.
- 4.3.3. Présenter le résultat de la numération : nombre de cellules viables par mL de suspension cellulaire et pourcentage de viabilité.
- 4.3.4. Calculer le nombre de cellules viables introduites dans le nouveau flacon de culture.

DEUXIÈME JOUR

Durée : 1 heure 15 minutes

PREMIÈRE PARTIE : 40 points (premier et deuxième jour).

Vérification des paramètres de croissance de la souche productrice E.coli

- 1.1. Présenter les résultats obtenus pour le contrôle de pureté et les commenter.
- 1.2. Interpréter les résultats des numérations obtenues à t₁ et t₂.
- 1.3. À l'aide des résultats des numérations, déterminer Q_x et comparer au résultat

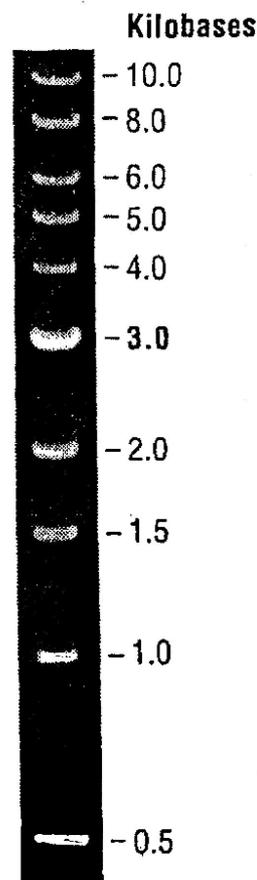
DEUXIÈME PARTIE : 35 points (premier et deuxième jour).

Vérification d'une construction plasmidique.

- 2.1. Joindre au compte rendu l'électrophorégramme fourni.
- 2.2. Repérer les différentes bandes correspondant au marqueur à l'aide du document joint.
- 2.3. Interpréter le résultat obtenu pour la construction non digérée.
- 2.4. Évaluer la taille du ou des fragments séparés par la digestion enzymatique.
- 2.5. Conclure.
- 2.6. Calculer la quantité d'ADN présente dans chaque bande de la digestion en sachant que la concentration initiale de la solution plasmidique était de 100 ng.μL⁻¹ et que 10 μL ont été soumis à la digestion.

DOCUMENT

0,5 μg du ladder 1 kb visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % en présence de BET



Achévé d'imprimer le 1^{er} trimestre 2008

**ANNALES
BTS BIOTECHNOLOGIE**

Sessions 2005/2006/2007

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

**Consulter le site internet :
<http://www.upbm.net>**

ISBN : 978-2-910069-50-6



Prix de vente : 8 €