

*Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité*

Nom : Numéro de place :  
Prénom : Numéro de salle :

**AGRÉGATION DES SCIENCES DE LA VIES, SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS**

**TRAVAUX PRATIQUES DE SPÉCIALITÉ A**

*Concours externe 2004*

**Durée totale 6 heures**

**Consignes générales**

L'épreuve est constituée de 2 parties indépendantes :

- **une partie expérimentale** qui comporte deux activités désignées par "exercice 1" il s'agit d'un dosage immunométrique et "exercice 2" il s'agit d'une titration
- **un problème** que nous désignerons par "exercice 3"

**Attention :** l'exercice 1 demande, pour la lecture du sujet et la manipulation, 1 heure environ, une incubation de 2 heures, puis une seconde incubation de 45 minutes. La lecture des plaques sera faite par le personnel technique et il vous restera à exploiter les résultats. Il vous est vivement conseillé de mettre en œuvre cet exercice 1 le plus rapidement possible et de réaliser les exercices 2 et 3 pendant les incubations.

**Exercice 1 . Dosage immunométrique à 2 sites de la  $\beta$ -lactoglobuline bovine**

Compétences attendues : cette manipulation ne demande pas de connaissances théoriques particulières, vous aurez à effectuer des dilutions et à distribuer les échantillons, les mesures seront répétées 2 ou 4 fois. Il sera tenu compte de la répétitivité des doubles, de l'exactitude des dilutions et, bien entendu, de la justesse des résultats attendus.

Barème prévisionnel : 20/40

Déroulement des opérations :

Lecture du sujet : 20 minutes

Préparation des dilutions et distribution : 40 minutes

Première incubation : 2 heures

Rinçage et distribution du réactif d'Ellman : 15 minutes

Seconde incubation : 45 minutes

Lecture des plaques (réalisée par le personnel technique) : 15 minutes

Interprétation des résultats 45 minutes

**Exercice 2 . Détermination de l'acidité du lait**

Compétences attendues : la manipulation est simple il sera tenu compte de l'exactitude du résultat obtenu et de la pertinence de la réponse à la question posée.

Barème prévisionnel: 5/40

Déroulement des opérations : à réaliser pendant la seconde incubation de l'exercice 1

Mise en œuvre : 10 minutes

Réalisation de la mesure : 15 minutes

Calculs et réponse à la question : 15 minutes

**Exercice 3 . Etude biochimique des invertases**

Compétences attendues : des réponses brèves précises et exactes sont souhaitées

Barème prévisionnel: 15/40

Déroulement : à réaliser pendant la première incubation de l'exercice 1

**AVANT DE RENDRE VOTRE COPIE, VEUILLEZ VÉRIFIER QUE VOUS AVEZ BIEN INDIQUÉ VOS NOM, PRÉNOM ET NUMÉRO DE PLACE ET DE SALLE, EN TÊTE DE CHAQUE PARTIE**

*Répondre dans les cadres prévus. Ne pas séparer les feuilles de l'énoncé.*

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité**

Nom :

Numéro de place :

Prénom :

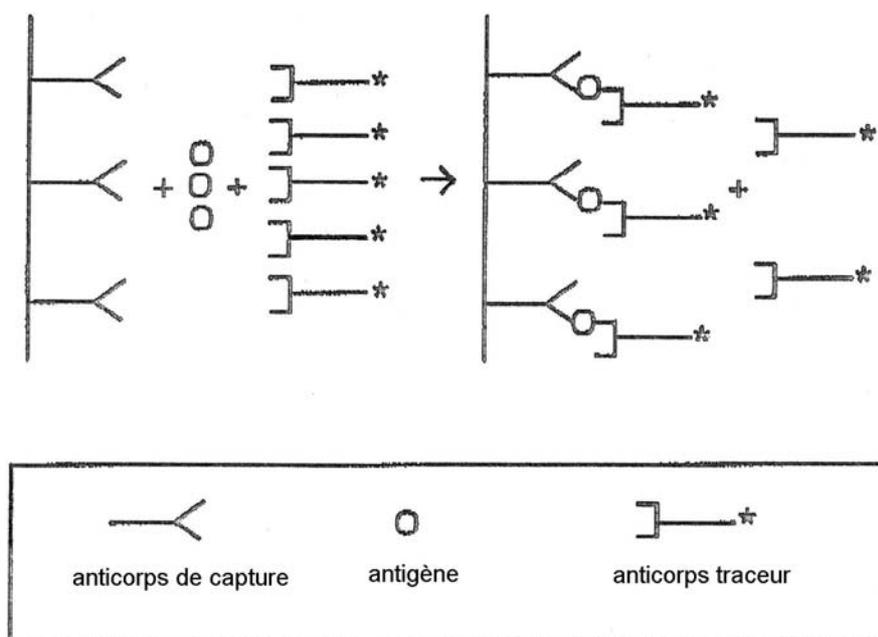
Numéro de salle :

### Exercice 1 . Dosage immunométrique à deux sites de la $\beta$ -lactoglobuline bovine\*

#### 1- Principe du dosage

Il s'agit d'un dosage immunométrique, fondé sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux dirigés contre deux épitopes différents de la  $\beta$ -lactoglobuline bovine (Blg). Un de ces anticorps, appelé anticorps de capture, est immobilisé sur un support solide (puits d'une plaque de microtitration en polystyrène). En réagissant, l'anticorps de capture va immobiliser l'antigène (c'est à dire le produit à doser) sur le fond du puits.

La présence de l'antigène sur la plaque solide sera mise en évidence à l'aide d'un deuxième anticorps monoclonal, appelé anticorps traceur parcequ'il est couplé chimiquement à une enzyme : l'acétylcholinestérase (AChE). Quand l'anticorps traceur aura réagi avec la Blg, l'enzyme sera, elle aussi, indirectement fixée sur le support en quantité proportionnelle à la quantité d'antigène introduite dans le dosage. Ce type de dosage est aussi appelé "dosage sandwich" car l'antigène est littéralement pris en sandwich entre les deux anticorps monoclonaux.



En mesurant l'activité de l'enzyme immobilisée, on peut accéder indirectement à la concentration de l'antigène dans la solution testée. Pour obtenir une mesure quantitative, on se réfère à la courbe d'étalonnage établie à l'aide de concentrations connues d'antigène. Sur cette courbe, que vous aurez à tracer, les concentrations d'antigène sont portées en abscisse et l'intensité du signal sur la phase solide en ordonnée. Cette courbe, dans sa partie initiale et utilisable est une droite ; en théorie, elle devrait passer par l'origine mais une faible quantité d'anticorps traceur s'adsorbe sur le polystyrène si bien qu'un signal apparaît pour la concentration 0. Ce signal sera mesuré dans des puits témoins où il n'y a pas d'antigène et retranché des valeurs mesurées.

\* kit de dosage développé par le Service de Pharmacologie et d'Immunologie de Saclay, Direction des Sciences du Vivant du CEA, en collaboration avec l'APBG

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité**

Nom : \_\_\_\_\_ Numéro de place : \_\_\_\_\_  
 Prénom : \_\_\_\_\_ Numéro de salle : \_\_\_\_\_

---

**2- Matériel à disposition**

- une plaque de 96 puits ; l'anticorps de capture a déjà été fixé dans les puits que vous aurez à utiliser. Repérez les lettres (sur la largeur) et les nombres (sur la longueur) qui vous permettent d'identifier chaque puits. Ne pas découvrir cette plaque avant la distribution des échantillons
- une pipette automatique réglable de 200 µL (cônes jaunes)
- une pipette automatique réglable de 1000 µL (cônes bleus).
- un tube à bouchon rouge contenant une solution étalon de Bgl à 100 ng/mL.
- un tube à bouchon incolore contenant l'anticorps traceur prêt à l'emploi. Il sera distribué ultérieurement.
- Une fiole contenant du tampon EIA utilisé comme diluant
- une multipipette qui vous permettra de distribuer le réactif d'Ellman. Ce dernier vous sera fourni ultérieurement.
- une pissette contenant du tampon de lavage qui vous servira pour les rinçages.
- un tube à bouchon bleu contenant du lait dilué 1000 fois, dans lequel vous doserez la Blg.

**3- Mode opératoire**

Préparation de la gamme d'étalonnage : à expliciter page 6

A partir de la solution étalon de Blg à 100 ng/mL réalisez les dilutions appropriées de telle sorte que vous disposiez, dans 8 tubes distincts, de 300 µL au moins d'une solution à 10 ng/mL, 8 ng/mL, 6 ng/mL, 5 ng/mL, 4 ng/mL, 2 ng/mL, 1 ng/mL et 0 ng/mL (les dilutions se feront dans le tampon EIA).

Dilution de l'échantillon à doser : à expliciter page 6

Compte tenu de la sensibilité du dosage, l'échantillon sera fortement dilué. La concentration de 4 dilutions différentes sera mesurée en quadruple exemplaire. A partir de l'échantillon à doser déjà dilué 1 000 fois, réalisez les dilutions appropriées de telle sorte que vous disposiez, dans 4 tubes distincts de 500 µL d'une solution de dilution finale de 10 000 fois, 20 000 fois, 40 000 fois et 80 000 fois (les dilutions se feront dans le tampon EIA).

Distribution dans les puits de la plaque :

Retirer l'adhésif qui couvre les puits en veillant à ne pas en oublier un lambeau. D'un geste brusque au dessus de l'évier, vider le liquide contenu dans les puits et égoutter la plaque en la tapant sur des feuilles de papier filtre

- Puits de la colonne 1 (de 1a à 1h) = **témoins négatifs** 100 µL de tampon EIA
- puits des colonnes 2 et 3 = **gamme étalon**

puits 2a et 2b 100 µL de solution à **0 ng/mL**  
 puits 2c et 2d 100 µL de solution à **1 ng/mL**  
 puits 2e et 2f 100 µL de solution à **2 ng/mL**  
 puits 2g et 2h 100 µL de solution à **4 ng/mL**  
 puits 3a et 3b 100 µL de solution à **5 ng/mL**  
 puits 3c et 3d 100 µL de solution à **6 ng/mL**  
 puits 3e et 3f 100 µL de solution à **8 ng/mL**  
 puits 3g et 3h 100 µL de solution à **10 ng/mL**

- puits des colonnes 4 et 5 = **diverses dilutions de l'échantillon à doser**

puits 4a à 4d 100 µL de solution diluée **80 000 fois**  
 puits 4e à 4h 100 µL de solution diluée **40 000 fois**  
 puits 5a à 5d 100 µL de solution diluée **20 000 fois**  
 puits 5e à 5h 100 µL de solution diluée **10 000 fois**

- distribuez, dans les puits de 1a à 5h 100 µL de l'anticorps traceur (tube à bouchon incolore)

Première incubation :

Notez l'heure de la fin de la distribution de l'anticorps traceur, **agitez légèrement la plaque, laissez incuber 1 heure 30** sur la paillasse à la température de la pièce.

Arrêt de la réaction :

Après 1 heure 30 d'incubation, videz la plaque et la lavez abondamment avec le tampon de lavage en utilisant la pissette.

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité**

Nom : Numéro de place :  
Prénom : Numéro de salle :

---

**Révélation de l'anticorps traceur fixé à l'antigène :**

Distribuez dans chaque puits, à l'aide d'une pipette automatique ou d'une multipipette, 200  $\mu\text{L}$  de réactif d'Ellman permettant de mesurer l'activité enzymatique de l'ACHé. La réaction enzymatique conduit à l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'enzyme immobilisée. **Laissez incuber 15 à 30 minutes à la température ambiante.**

L'acétylcholinestérase joue un rôle important dans le système nerveux central et périphérique en hydrolysant l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques. L'acétylcholinestérase utilisée dans ce dosage a été purifiée à partir d'organes électriques de Gymnote. Ce poisson, qui vit dans les bassins de l'Orénoque et de l'Amazonie, possède de très gros organes électriques qui lui permettent d'envoyer des décharges électriques atteignant 700 volts sous plusieurs ampères. L'enzyme de Gymnote, très active, peut catalyser l'hydrolyse de 16 000 molécules de substrat par seconde.

Pour mesurer l'activité de cette acétylcholinestérase, on utilise le dosage décrit par Ellman et coll. en 1961. Cette méthode est fondée sur l'utilisation d'un pseudo-substrat : l'acetylthiocholine. L'hydrolyse de l'acetylthiocholine conduit à la formation de thiocholine, porteuse d'une fonction thiol. Celle-ci réagit immédiatement avec le 5-5'-dithiobis-nitrobenzoate (DTNB) qui, sous forme réduite, absorbe fortement dans le visible ( $\epsilon_M = 13\ 600$  à 412nm).

La méthode d'Ellman permet de détecter des concentrations d'enzyme de l'ordre de  $10^{-14}$  M ce qui explique que l'acétylcholinestérase, couplée ici à des anticorps, conduise à l'obtention de dosages immunométriques très sensibles.

En fin d'incubation signalez aux examinateurs que la réaction est terminée. Ils feront la lecture de la plaque à l'aide d'un appareil très rapide dont l'absorbance est réglée à 414 nm. Il vous sera rendu votre plaque ainsi qu'une feuille de papier sur laquelle les résultats seront imprimés. Cette feuille devra **impérativement être jointe à votre copie** (fixée par un ruban adhésif dans le cadre ci-dessous).

**4- Expression des résultats**

Dans cet emplacement, collez la feuille sur laquelle sont imprimés les résultats de la lecture de la plaque

*Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité*

Nom :

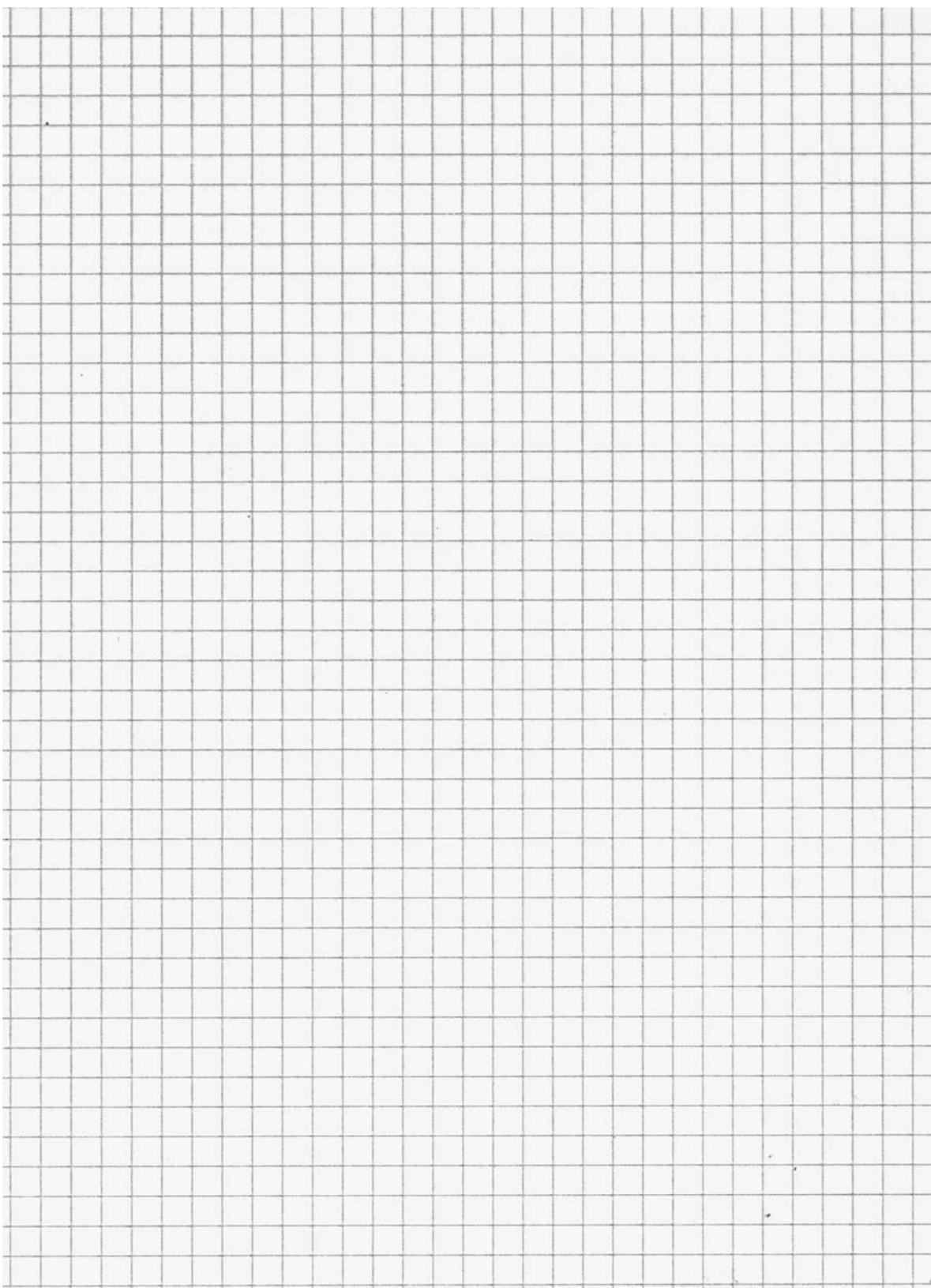
Numéro de place :

Prénom :

Numéro de salle :

---

**1- Tracez la courbe étalon**



*Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité*

Nom : Numéro de place :

Prénom : Numéro de salle :

---

**2- Détermination de la quantité de  $\beta$ -lactoglobuline dans l'échantillon de lait**

**2-1 Exposez, sous forme de tableaux, le protocole que vous avez suivi pour réaliser :**

- la gamme d'étalonnage
- les dilutions de l'échantillon à doser

**2 -2 En utilisant la courbe étalon, déterminez la concentration de  $\beta$ -lactoglobuline contenue dans un litre de lait. Donnez le détail des calculs.**

*Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité*

Nom :

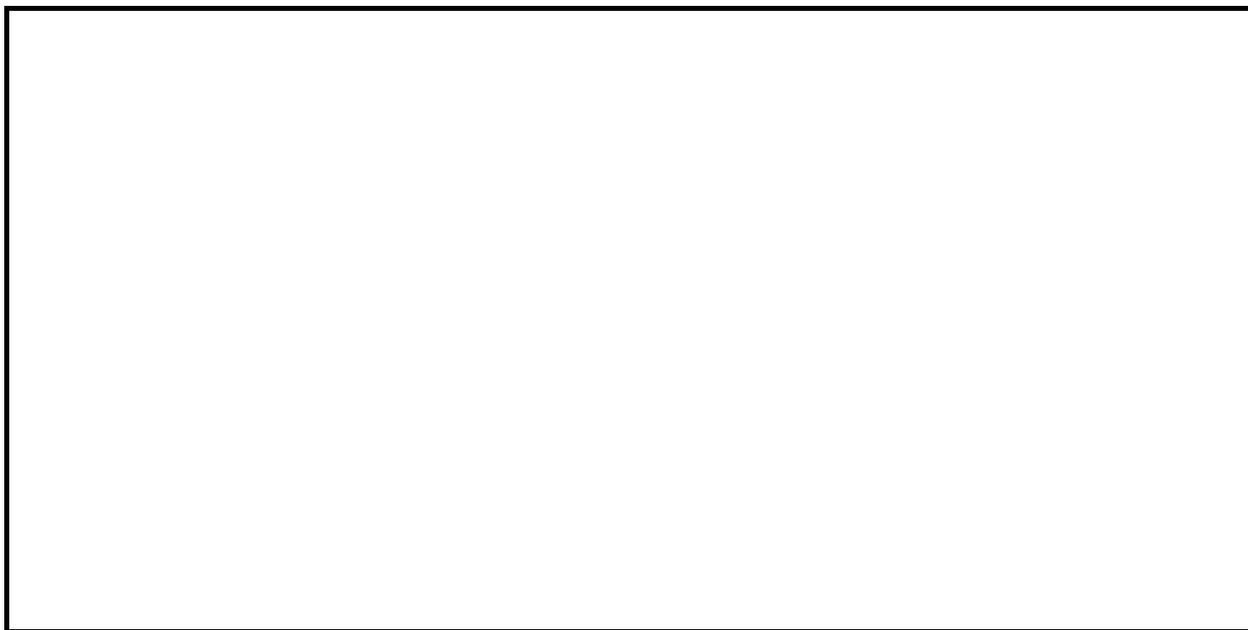
Numéro de place :

Prénom :

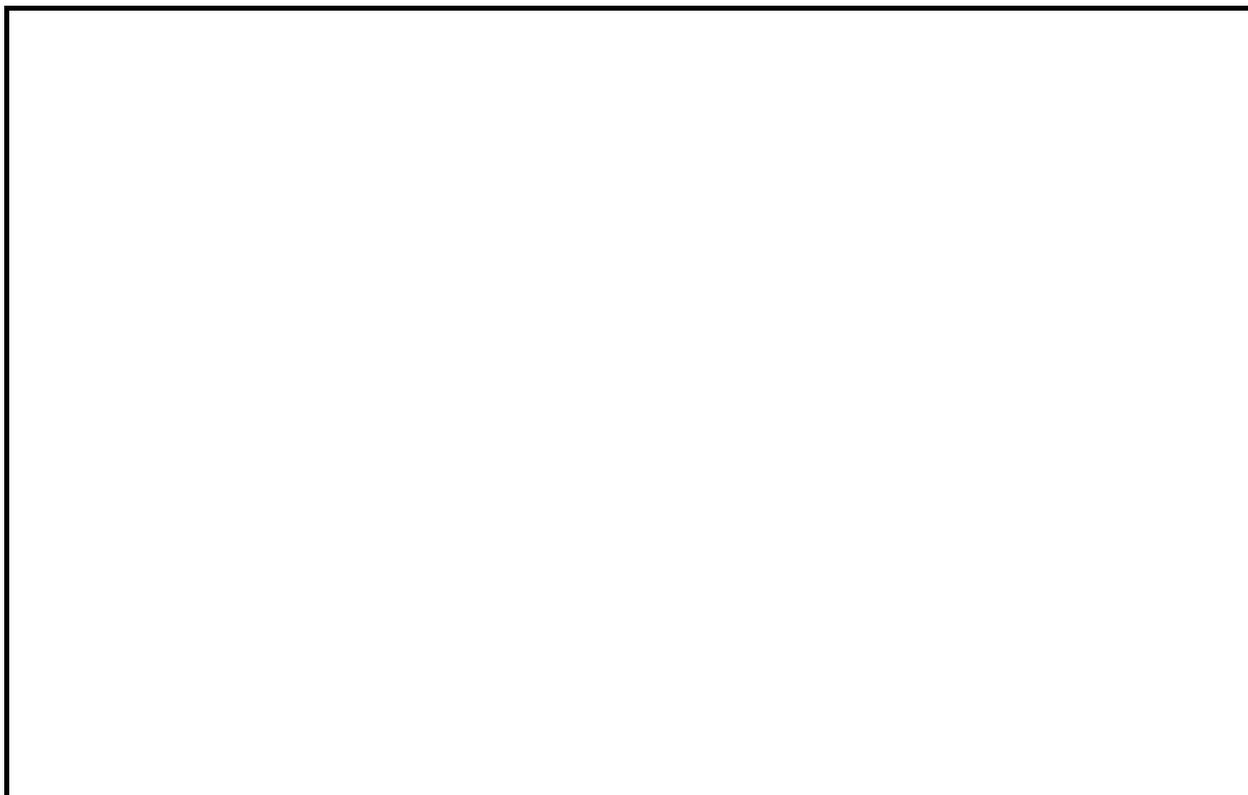
Numéro de salle :

---

**2-3 Calculez la concentration de  $\beta$ -lactoglobuline par litre de lait sans utiliser la courbe étalon. Donnez le détail des calculs.**



**2-4 Quelles garanties d'exactitude apportent l'usage de la courbe étalon et la mesure de plusieurs dilutions du même échantillon ?**



<b>Récapitulatif de la distribution des échantillons dans les puits de la plaque de titration</b>
---

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	témoin	gamme 0 ng/ml	Gamme 5 ng/ml	dilué 80 000 fois	dilué 20 000 fois							
<b>B</b>	témoin	gamme 0 ng/ml	Gamme 5 ng/ml	dilué 80 000 fois	dilué 20 000 fois							
<b>C</b>	témoin	Gamme 1 ng/ml	Gamme 6 ng/ml	dilué 80 000 fois	dilué 20 000 fois							
<b>D</b>	témoin	Gamme 1 ng/ml	Gamme 6 ng/ml	dilué 80 000 fois	dilué 20 000 fois							
<b>E</b>	témoin	Gamme 2 ng/ml	Gamme 8 ng/ml	dilué 40 000 fois	dilué 10 000 fois							
<b>F</b>	témoin	Gamme 2 ng/ml	Gamme 8 ng/ml	dilué 40 000 fois	dilué 10 000 fois							
<b>G</b>	témoin	Gamme 4 ng/ml	Gamme 10 ng/ml	dilué 40 000 fois	dilué 10 000 fois							
<b>H</b>	témoin	Gamme 4 ng/ml	Gamme 10 ng/ml	dilué 40 000 fois	dilué 10 000 fois							

*Réaliser la gamme à partir d'une solution mère à 100 ng/ml (tube à bouchon rouge) en utilisant du tampon EIA.*

Réaliser la dilution de l'échantillon à doser, à partir d'une solution mère de lait du commerce déjà diluée 1000 fois (tube à bouchon bleu) pour obtenir les solutions demandées exprimées en dilutions finales. Utiliser le tampon EIA.

La première incubation avec l'anticorps traceur (tube à bouchon incolore) dure 1 heure 30 minutes.

La seconde incubation avec le réactif d'Ellman dure au moins 15 minutes. **Attention** il faut conserver le réactif dans les plaques pour faire cette lecture. La lecture sera faite par les examinateurs car l'utilisation des appareils est délicate. La feuille d'enregistrement qui vous sera remise devra **impérativement** être scotchée sur le cadre réservé à cet effet.

*Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité*

Nom : Numéro de place :  
Prénom : Numéro de salle :

---

## Exercice 2 . Détermination de l'acidité du lait

L'acide lactique, de formule  $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$ , de masse molaire  $90 \text{ g.mol}^{-1}$  provient de la fermentation du lactose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ). Cette fermentation qui se développe dans le temps, produit de plus en plus d'acide. La mesure de l'acidité du lait donne une idée de la "fraîcheur" du produit : plus il y a d'acide, plus le lait est vieux ou mal conservé. En d'autres cas, cette acidification peut-être contrôlée pour fabriquer des produits alimentaires dérivés du lait comme les yaourts par exemple.

### 1- Matériel et produits

Vous disposez d'un ensemble comprenant :

- 50 mL de lait de vache
- 50 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium dont la concentration est de  $1/9 \text{ mole.L}^{-1}$
- un indicateur de virage : la phénolphthaléine dont la teinte est rose pour un pH supérieur ou égal à 8
- une pipette graduée de 5 mL
- un récipient de 50 mL

### 2- Manipulation

En utilisant le matériel proposé, déterminez l'acidité du lait à partir d'un volume précis de 10 mL

### 3- Expression des résultats

3-1 Faites un schéma du dispositif expérimental que vous avez mis en œuvre.

*Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité*

Nom :

Numéro de place :

Prénom :

Numéro de salle :

---

3-2 La soude de concentration  $1/9 \text{ mol.L}^{-1}$  est appelée «soude Dornic ».  $1 \text{ cm}^3$  de cette solution neutralise 10 mg d'acide lactique. L'acidité du lait est exprimée en degrés Dornic : 1 degré Dornic correspond à 100 mg d'acide lactique dans 1 litre de lait.

Déterminez l'acidité du lait de l'échantillon proposé, exprimée en degrés Dornic. Donnez le détail de la valeur mesurée et des calculs effectués.

3-3 Expliquez pourquoi il est commode d'utiliser la soude Dornic, de prendre un volume de lait de 10 mL et d'exprimer les résultats en degrés Dornic ? (rappel : la masse molaire de l'acide lactique est de  $90 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

### Exercice 3. Etude biochimique des invertases (15 / 40 points)

Michaelis et Menten, dès 1913, décident de mener leurs célèbres investigations sur les enzymes à partir de travaux portant sur les invertases. Ces enzymes existent sous plusieurs formes (acide, neutre, alcaline) avec plusieurs localisations cellulaires (cytoplasme, vacuole, paroi). L'invertase catalyse la réaction d'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose. Trois isoformes d'invertase ont été isolées chez la pomme de terre : une invertase soluble cytoplasmique (INV 1), une invertase liée par liaison ionique à la paroi (INV 2) et une invertase liée par liaison covalente à la paroi (INV 3).

#### 1) La purification des invertases : le cas des invertases cytoplasmique (INV 1) et pariétale ionique (INV 2).

Les différentes étapes sont résumées dans le tableau ci-dessous. Chaque fraction protéique a été testée en présence de saccharose pour déterminer son activité catalytique en unité enzymatique ( $\mu$ moles de saccharose hydrolysées par seconde :  $\mu$ katal). La teneur en protéine (en mg) de chaque fraction a également été dosée à l'aide de la méthode de Bradford.

**1-1) Pour chaque fraction, déterminez l'activité spécifique (en  $\mu$ katal / mg de protéine), le taux de purification et le rendement et cela pour les deux types d'invertase. Détaillez un exemple de calcul uniquement pour chaque paramètre et remplissez le tableau 1.**

**1-2) Que pouvez-vous en déduire pour chaque étape de ce protocole de purification ?**

Étapes de purification	Type d'invertases	Unités enzymatique ( $\mu$ katal)	Quantité de protéine (mg)	Activité spécifique	taux de purification	Rendement (%)
Broyage et solubilisation	INV 1	1000	1250		1,00	100,00
	INV 2	318	353		1,00	100,00
Centrifugation à 27 000 g	INV 1	600	1034			
	INV 2	210	344			
Saturation avec du sulfate d'ammonium	INV 1	570	792			
	INV 2	180	265			
Centrifugation à 27 000 g	INV 1	530	730			
	INV 2	172	215			
Chromatographie gel filtration sur sephadex G-100	INV 1	320	5,82			
	INV 2	90	3,10			
Chromatographie d'adsorption	INV 1	208	1,30			
	INV 2	62	0,50			

Tableau 1

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

**Réponse question 1-1**

**Réponse question 1-2**

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

## 2) Caractéristiques enzymatiques des invertases.

**2-1) A l'aide des données ci-dessous, déterminez les constantes michaeliennes cinétiques ( $K_m$ ,  $V_m$ ,  $K_i$ ) et le pH optimum pour les trois types d'invertase. La technique de calcul, sa justification et la précision des résultats sera prise en compte dans la notation. Quelle est la signification de chaque paramètre cinétique ?**

**2-2) Qu'en déduisez vous de l'effet du glucose, du fructose et du pH sur les différentes invertases ?**

Quatre feuilles de papier millimétré sont jointes.

Concentration en saccharose (mM)		12	24	36	48	60	72	84	96
Vitesse en $\mu$ katal ( $V_i$ )									
INV1		<b>3,00</b>	<b>4,61</b>	<b>5,63</b>	<b>6,31</b>	<b>6,82</b>	<b>7,21</b>	<b>7,50</b>	<b>7,74</b>
INV2		<b>3,72</b>	<b>5,40</b>	<b>6,37</b>	<b>6,99</b>	<b>7,43</b>	<b>7,75</b>	<b>7,99</b>	<b>8,19</b>
INV3		<b>0,74</b>	<b>1,37</b>	<b>1,92</b>	<b>2,38</b>	<b>2,80</b>	<b>3,17</b>	<b>3,48</b>	<b>3,77</b>
Concentration en saccharose (mM) en présence de glucose 80 mM		12	24	36	48	60	72	84	96
$V_i$ INV1		<b>0,037</b>	<b>0,056</b>	<b>0,069</b>	<b>0,077</b>	<b>0,083</b>	<b>0,088</b>	<b>0,092</b>	<b>0,095</b>
INV2		<b>0,044</b>	<b>0,064</b>	<b>0,076</b>	<b>0,084</b>	<b>0,089</b>	<b>0,093</b>	<b>0,096</b>	<b>0,098</b>
INV3		<b>0,016</b>	<b>0,030</b>	<b>0,042</b>	<b>0,052</b>	<b>0,061</b>	<b>0,069</b>	<b>0,076</b>	<b>0,083</b>
Concentration en saccharose (mM) en présence de fructose 120 mM		12	24	36	48	60	72	84	96
$V_i$ INV1		<b>0,006</b>	<b>0,012</b>	<b>0,019</b>	<b>0,025</b>	<b>0,032</b>	<b>0,038</b>	<b>0,044</b>	<b>0,051</b>
INV2		<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,029</b>	<b>0,039</b>	<b>0,049</b>	<b>0,059</b>	<b>0,068</b>	<b>0,078</b>
INV3		<b>0,003</b>	<b>0,007</b>	<b>0,011</b>	<b>0,015</b>	<b>0,019</b>	<b>0,023</b>	<b>0,027</b>	<b>0,031</b>
pH du milieu réactionnel, en présence de 60 mM de saccharose		2	3	4	5	6	7	8	9
$V_i$ INV1		<b>1,6</b>	<b>3,0</b>	<b>8,5</b>	<b>10,0</b>	<b>3,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>
INV2		<b>2,0</b>	<b>3,3</b>	<b>8,0</b>	<b>9,9</b>	<b>3,4</b>	<b>3,0</b>	<b>2,7</b>	<b>2,2</b>
INV3		<b>1,9</b>	<b>3,0</b>	<b>7,8</b>	<b>9,0</b>	<b>3,4</b>	<b>2,9</b>	<b>2,6</b>	<b>2,1</b>

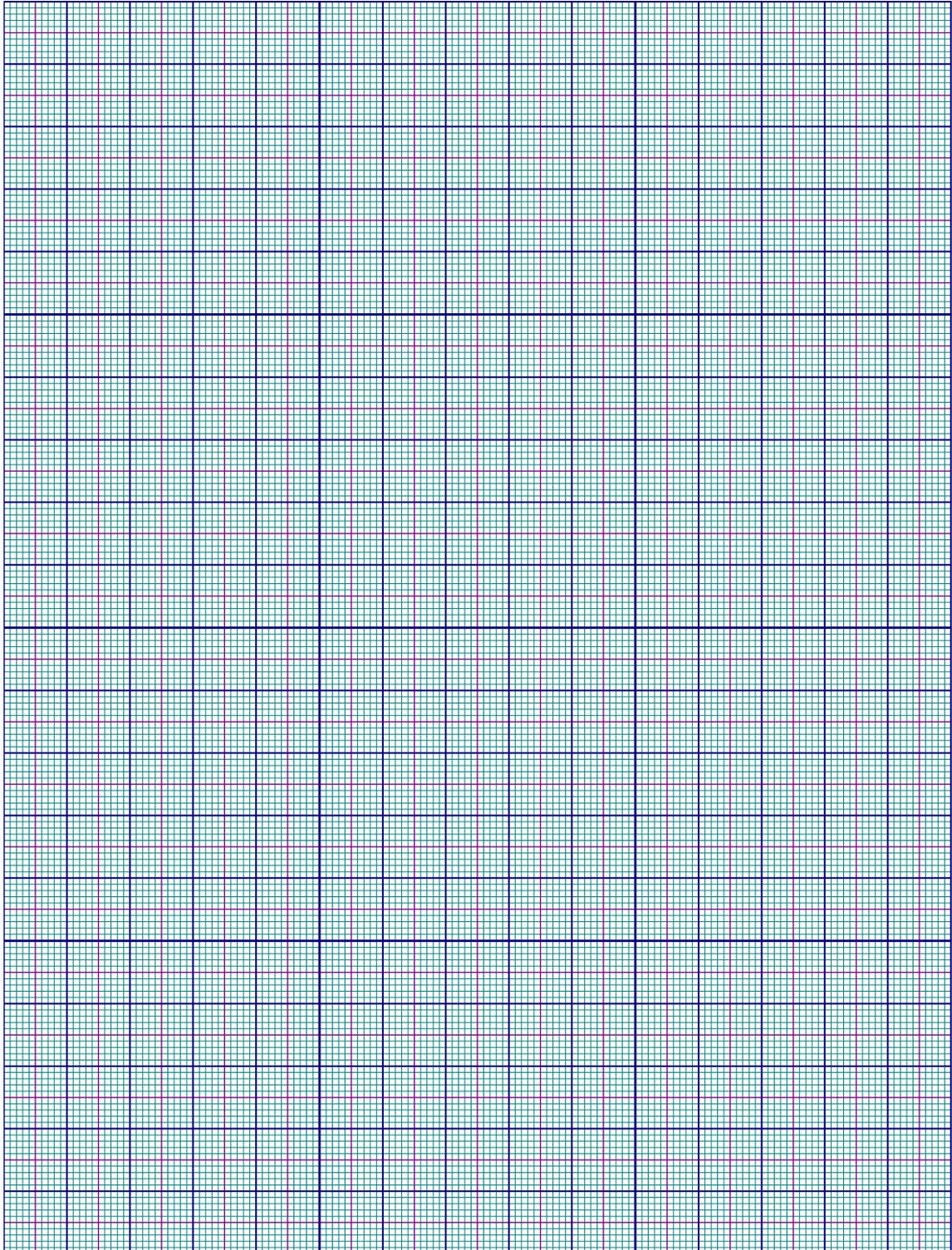
**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :



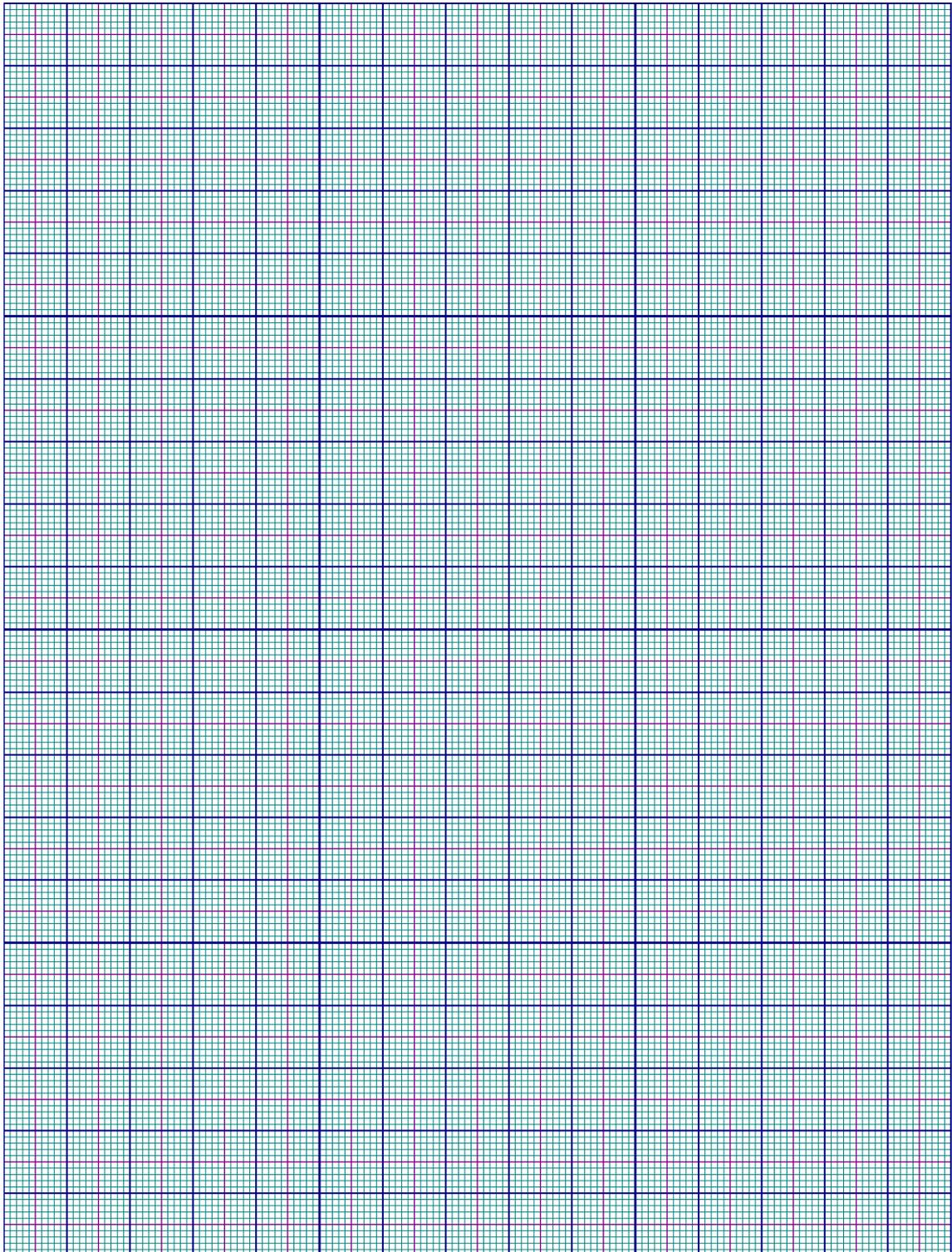
**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :



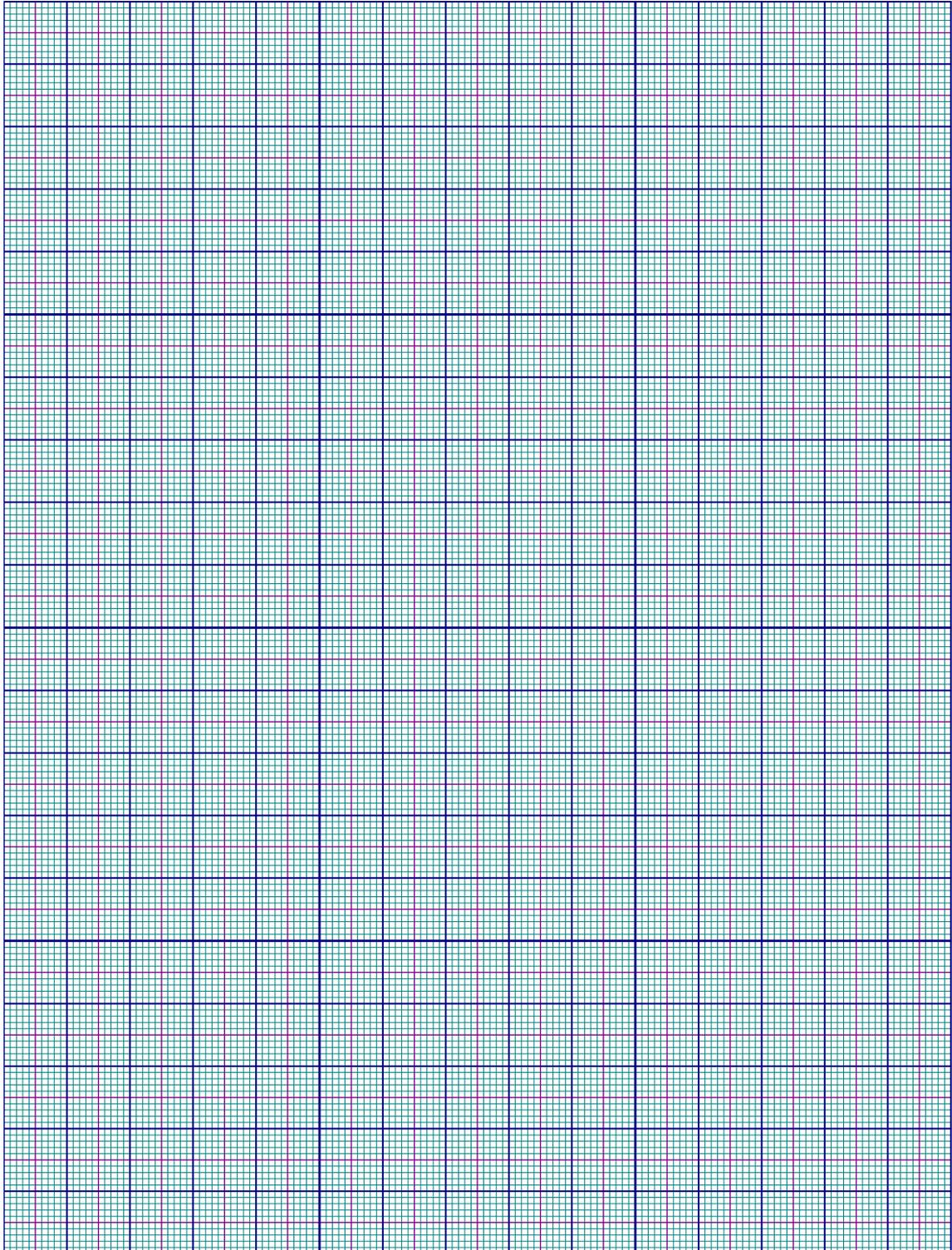
**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :



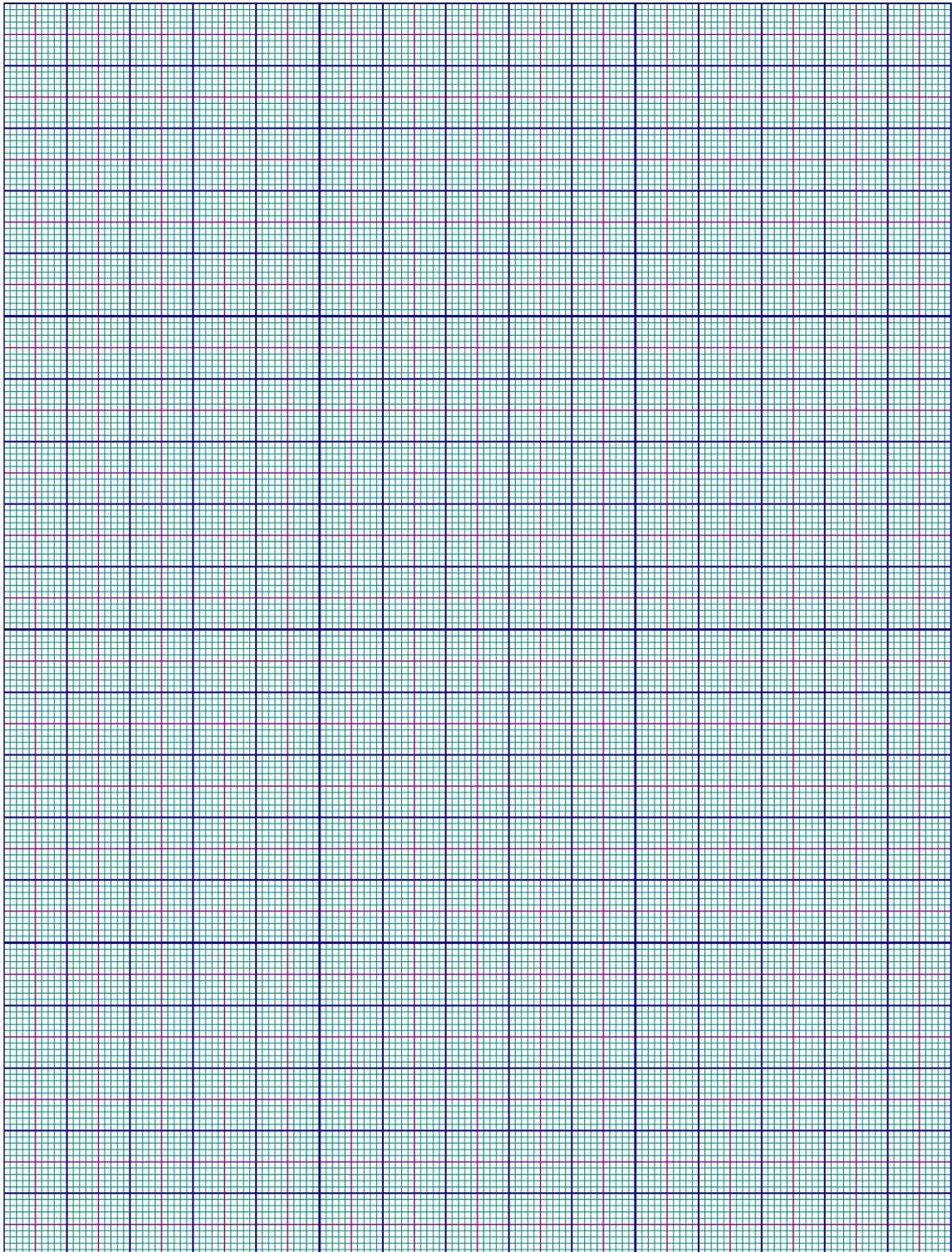
**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :



**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

**Réponse question 2-1**

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

**Réponse question 2-2**

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

### 3) Caractéristiques immunologiques des invertases

Des analyses immunologiques sont réalisées. Tout d'abord on provoque à l'aide d'anticorps dirigés contre l'invertase cytoplasmique soluble de pomme de terre (INV 1) l'immunoprécipitation d'invertases dans un extrait protéique de pomme de terre, suivie d'une centrifugation. Le surnageant est récupéré et l'activité résiduelle invertase est déterminée (Figure 1).

#### 3-1) Interprétez les courbes. Qu'en déduisez vous ?

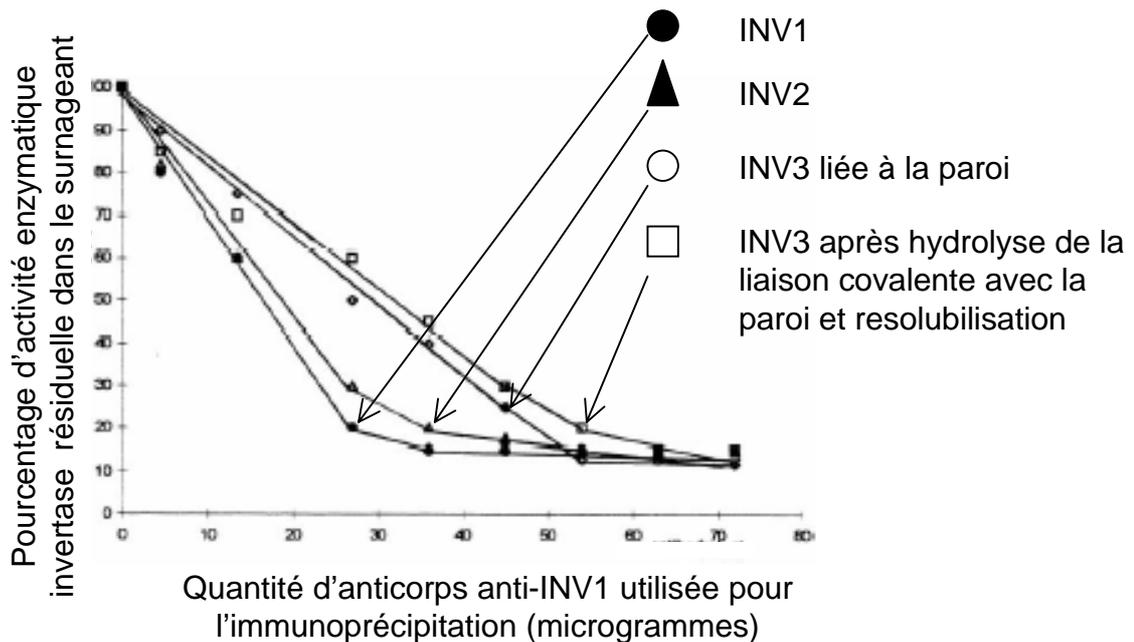


Figure 1

Des expériences complémentaires de type western blot sont effectuées sur des fractions purifiées de chaque invertase (INV 1, 2 et 3). Des extraits protéiques contenant chacun un des trois types d'invertases sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes. Un transfert sur membrane de nitrocellulose et une hybridation de type western blot à l'aide d'anticorps anti-INV 1 sont réalisés (Figure 2)

#### 3-2) Analysez ces résultats.

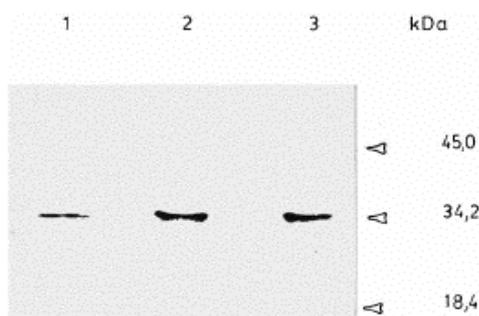


Figure 2

Analyse en western blot avec des anticorps anti-INV1, après séparation des protéines en électrophorèse dénaturante.

1 : extrait protéique contenant INV 1.

2 : extrait protéique contenant INV 2.

3 : extrait protéique contenant INV 3.

Des marqueurs de poids moléculaires sont indiqués sur la droite en kilo Dalton.

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

**Réponse question 3-1**

**Réponse question 3-2**

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

#### **4) Rôles physiologiques des invertases.**

Les expériences suivantes portent sur une variété cultivée de carotte. Des carottes transgéniques inhibées pour l'invertase cytoplasmique soluble (homologue de INV 1 de la pomme de terre) ou pour l'invertase pariétale (homologue de INV 2 de la pomme de terre) sont produites. Le phénotype de ces plantes transgéniques et de plantes témoins est présenté ci-dessous (Figure 3).

**4-1) Proposez, sous forme d'un schéma annoté, un protocole détaillé de l'obtention de telles carottes transgéniques. Vous expliquerez également comment les chercheurs peuvent confirmer qu'il s'agit de carottes transgéniques inhibées pour l'une ou l'autre invertase (INV 1 ou INV 2).**

**4-2) Analysez les résultats présentés sur la figure 3. Proposez sous forme d'un schéma commenté une conclusion sur le rôle des invertases en intégrant les résultats précédents et vos connaissances sur la physiologie des plantes bisannuelles.**



Figure 3

(a) : comparaison entre une carotte transgénique inhibée pour l'invertase pariétale de type INV 2 (à gauche) et une plante témoin (à droite).

(b) : comparaison entre une carotte transgénique inhibée pour l'invertase cytoplasmique de type INV 1 (à gauche) et une plante témoin (à droite).

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

**Réponse question 4-1**

**Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité.**

Nom :

Numéro de la place :

Prénom :

Numéro de la salle :

**Réponse question 4-2**