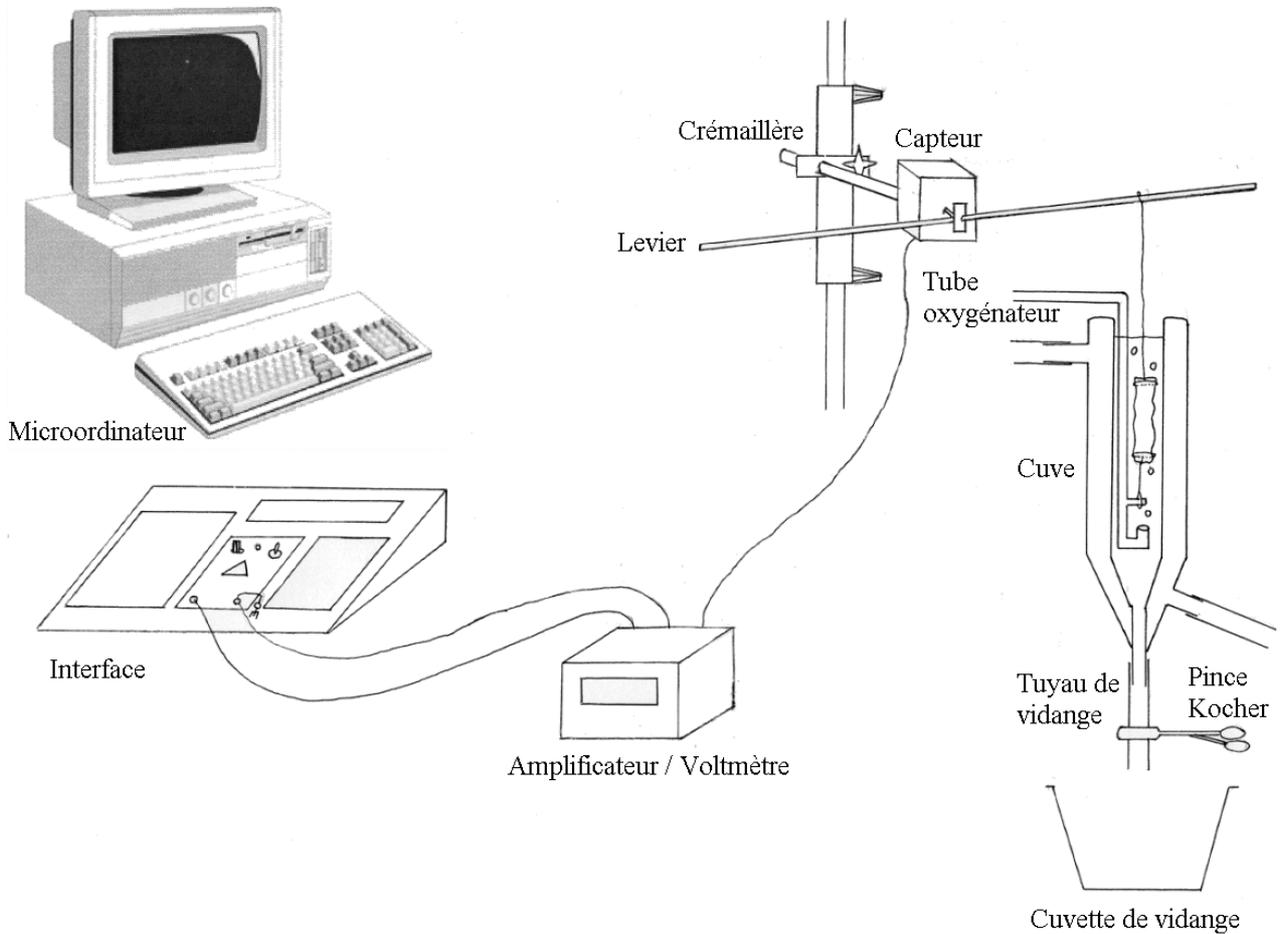


Quelques aspects de la contraction musculaire (20 points)**Dispositif expérimental et principe**

La préparation musculaire est placée dans une cuve contenant du liquide physiologique, oxygéné grâce à un tube oxygénéateur alimenté en air comprimé. Elle est fixée par un fil de ligature muni d'une boucle au tube oxygénéateur d'une part, et par un second fil à un levier mobile d'autre part. Le levier est associé à un capteur de mouvement.

Lorsque la musculature se contracte, elle exerce une traction sur le levier. Le capteur convertit l'amplitude du déplacement du levier en une tension électrique. Amplifiée par l'amplificateur / voltmètre, elle est ensuite transmise à l'interface d'acquisition reliée au micro-ordinateur.

Avec un tel dispositif, il est possible d'étudier l'effet de diverses substances sur la contraction musculaire, en les ajoutant au liquide physiologique contenu dans la cuve.

Matériel et solutions :

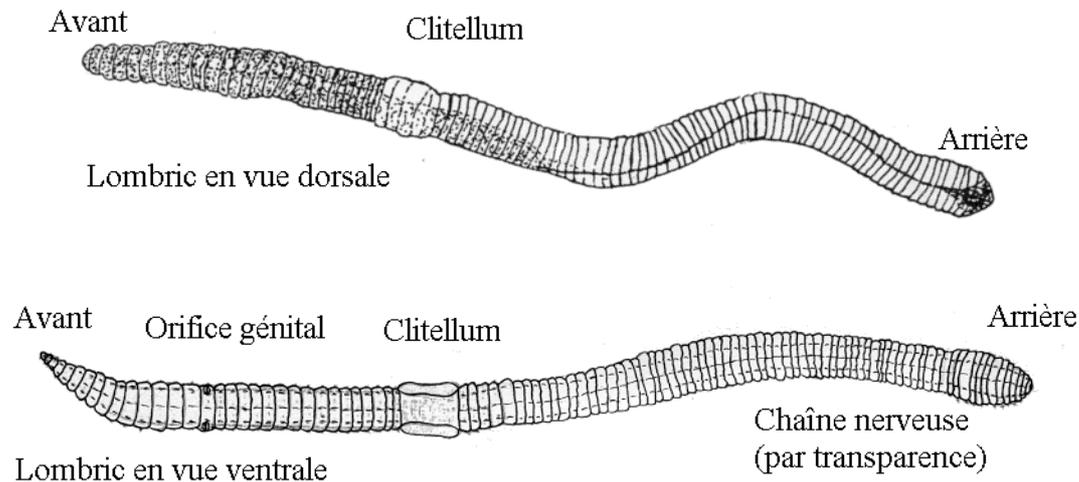
- Lombric (Ver de terre)
- dispositif expérimental
- gants
- cuvette à dissection
- épingles à dissection
- fil de ligature
- petit cristalliseur
- pastette de 3 ml
- éprouvette graduée de 100 ml
- micro-pipettes automatiques 1-200 μ l et 200-1000 μ l
- cônes pour micro-pipettes automatiques (jaunes pour 1-200 μ l, bleus pour 200-1000 μ l)
- un tube de 5 ml vide (tube à bouchon jaune)
- 1 l de liquide physiologique
- 5 ml de solution de glutamate (Glu) à la concentration de 100 mmol.l⁻¹ (tube à bouchon rose)
- 1 ml de solution de curare à la concentration de 10 mmol.l⁻¹ (tube à bouchon rouge)
- 5 ml de solution d'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) à la concentration de 54 mmol.l⁻¹ (tube à bouchon violet)

Préparation et mise en place du matériel biologique :

Les expériences sont réalisées sur la musculature de la paroi corporelle du Lombric (Ver de terre). La préparation est réalisée à partir d'un animal non anesthésié. S'il est nécessaire de rincer la préparation, utilisez du liquide physiologique.

- Orientez l'animal.

L'extrémité antérieure est effilée et conique alors que l'extrémité postérieure est large et aplatie. La face dorsale est rose-violacé et plus sombre que la face ventrale qui apparaît rose clair. Cette dernière porte en outre les orifices génitaux. Un renflement glandulaire, le clitellum, est présent dans la moitié antérieure du corps chez les individus ayant atteint la maturité sexuelle.



- Sectionnez la région antérieure de l'animal en arrière du clitellum ainsi que la région postérieure, à l'aide de ciseaux forts.
- Placez le tronçon d'animal face dorsale contre le fond de la cuvette à dissection et immobilisez le à l'aide de deux épingles positionnées à l'avant.
- En maintenant la partie postérieure avec les doigts, incisez le tégument latéralement à l'aide de ciseaux fins en progressant de l'arrière vers l'avant. La paroi corporelle doit être approximativement coupée en deux parties égales, l'une dorsale et l'autre ventrale.
- A l'aide de pinces, éliminez la paroi corporelle ventrale. Cette opération entraîne la suppression du vaisseau ventral et de la chaîne nerveuse ventrale.
- De la même manière, éliminez l'ensemble des organes internes (tube digestif, vaisseau dorsal, parois des cavités coelomiques). Il ne reste alors que la paroi corporelle dorsale, d'une largeur comprise entre 0,5 et 1 cm.
- Coupez un fragment de paroi corporelle dorsale de 2 à 3 cm de long.
- Ligaturez solidement chaque extrémité de la préparation. Pour cela, préparez un fil de ligature d'une vingtaine de centimètres de long. Posez l'extrémité de la préparation sur le fil, faites un double nœud. Pratiquez de même pour l'autre extrémité.

Appelez l'examineur

- Le cas échéant, placez la préparation en attente dans un cristalliseur rempli de liquide physiologique.
- Mettez en place la préparation musculaire dans la cuve. Pour cela, faites une boucle avec l'un des fils de ligature et passez la autour du support solide du tube oxygénateur. L'extrémité de la préparation doit se trouver à 2-3cm du support. Attachez l'autre fil de ligature, plus long, au levier relié au capteur.
- A l'aide de l'éprouvette graduée, remplissez la cuve de liquide physiologique de sorte que la préparation soit totalement immergée. Notez soigneusement le volume de liquide versé.

Volume de liquide physiologique contenu dans la cuve :

- Mettez en place l'oxygénation en ouvrant doucement le robinet d'air comprimé. Réglez le débit de sorte que deux à trois groupes de bulles se dégagent chaque seconde.
- Vérifiez que le fil reliant la préparation au levier du capteur reste libre et n'adhère ni au tube oxygénateur ni à la paroi de la cuve.

Appelez l'examineur

Protocole et questions :

Le programme d'acquisition des mesures est préalablement mis en route et les réglages de base sont effectués. Quelques ajustements peuvent néanmoins être nécessaires. Les opérations principales sont les suivantes :

- pour modifier l'échelle de temps, utilisez le menu Axes, échelle de temps

définissez en secondes la durée de la mesure (généralement 90 secondes, parfois 300 secondes)

définissez en secondes la largeur de la page (mêmes valeurs que la durée de mesure)

validez

- pour modifier l'échelle de tension, utilisez le menu Axes, échelle ampli 2 : mV

définissez la valeur minimale (généralement -250 mV, parfois -500 mV ou -1000 mV)

définissez la valeur maximale (généralement +500 mV ou +1000 mV)

validez

- pour lancer une mesure, utilisez le menu Exécution, lancer la mesure

le déclenchement de l'acquisition est immédiat, la courbe s'affiche au fur et à mesure de l'acquisition

- pour enregistrer une mesure, dès la fin de l'acquisition, utilisez le menu Fichier, enregistrer sous

dans la fenêtre nom du fichier, remplacez l'étoile par votre nom suivi du numéro du tracé (nom de 8 caractères au maximum), l'extension est « .bio »

- pour imprimer une courbe, utilisez le menu Fichier, imprimer et validez

Tous les tracés imprimés sont joints à la copie. Ils doivent porter les nom et prénom du candidat et être identifiés (tracé n°...).

1. Contrôle

- A l'aide de la crémaillère, réglez la hauteur du capteur afin que la valeur affichée sur l'amplificateur / voltmètre soit environ de zéro.

- Définissez une durée de mesure et une largeur de page de 300 secondes, puis lancez une mesure (tracé 1).

- Enregistrez et imprimez le tracé obtenu.

Identifiez le tracé.

Appelez l'examineur

2. Action du glutamate

- Définissez une durée de mesure et une largeur de page de 90 secondes.

- A l'aide d'une micropipette automatique, prélevez 750 µl de glutamate.

- Lancez la mesure et déposez dans la cuve les 750 µl de glutamate en notant soigneusement le moment du dépôt (tracé 2).

- Enregistrez et imprimez le tracé obtenu.

- Jetez le cône ayant servi au prélèvement et au dépôt.

Identifiez le tracé, indiquez à l'aide d'une flèche le moment d'introduction du glutamate.

Appelez l'examineur

Quelle est la concentration finale du glutamate dans la cuve ? Détaillez le calcul.

3. Rinçage et retour au niveau de base

- Ouvrez la pince Kocher et laissez s'écouler le liquide physiologique contenu dans la cuve dans la cuvette de vidange. Pendant cette opération, soutenez la préparation musculaire en tenant le fil qui la relie au levier.

- Remettez la pince Kocher en place et remplissez la cuve de liquide physiologique (rinçage). Pendant cette opération, soutenez la préparation musculaire en tenant le fil qui la relie au levier.

- Comme précédemment, vidangez la cuve puis remettez la pince Kocher en place.

- Remplissez la cuve avec le même volume de liquide physiologique que celui noté initialement.

- Définissez une durée de mesure et une largeur de page de 300 secondes, puis lancez une mesure (tracé 3).

- Enregistrez et imprimez le tracé obtenu.

Identifiez le tracé.

Appelez l'examineur

4. Action du curare

- Calculez le volume de solution de curare à ajouter dans la cuve pour que la concentration finale de celui-ci soit égale à 60 µmol.l⁻¹.

Calcul détaillé :

- Portez des gants.

- Définissez une durée de mesure et une largeur de page de 90 secondes.

- Préparez dans le tube vide le volume de solution de curare déterminé ci-dessus et y ajoutez 750 µl de la solution de glutamate à 100 mmol.l⁻¹. Utilisez des micropipettes automatiques et changez de cône entre les deux prélèvements/dépôts.

- Lancez la mesure et déposez dans la cuve le contenu du tube à l'aide d'une micropipette automatique en notant soigneusement le moment du dépôt (tracé 4).

- Enregistrez et imprimez le tracé obtenu.

- Jetez les cônes ayant servi aux prélèvements et aux dépôts.

Identifiez le tracé, indiquez à l'aide d'une flèche le moment d'introduction du mélange curare / glutamate.

Appelez l'examineur

En fonction des résultats des manipulations 2 et 4, que pouvez-vous conclure quant au mécanisme d'action du glutamate sur les muscles pariétaux du Lombric ?

A partir de vos connaissances sur le contrôle de la contraction musculaire, quelle expérience supplémentaire pourriez-vous réaliser pour renforcer votre conclusion ?

5. Rinçage et retour au niveau de base – action de l'EDTA

- Ouvrez la pince Kocher et laissez s'écouler le liquide physiologique contenu dans la cuve dans la cuvette de vidange. Pendant cette opération, soutenez la préparation musculaire en tenant le fil qui la relie au levier.
- Remettez la pince Kocher en place et remplissez la cuve de liquide physiologique (rinçage). Pendant cette opération, soutenez la préparation musculaire en tenant le fil qui la relie au levier.
- Comme précédemment, vidangez la cuve puis remettez la pince Kocher en place.
- Remplissez la cuve avec le même volume de liquide physiologique que celui noté initialement.
- Définissez une durée de mesure et une largeur de page de 300 secondes, puis lancez une mesure (tracé 5).
- Après 120 secondes, ajoutez au liquide physiologique 3 ml de la solution d'EDTA à 54 mmol.l⁻¹. Utilisez pour cela la micropipette automatique 200-1000 µl, puis jetez le cône.
- Enregistrez et imprimez le tracé obtenu.

Identifiez le tracé, indiquez à l'aide d'une flèche le moment d'introduction de l'EDTA.

Appelez l'examineur

6. Action de l'EDTA

- Définissez une durée de mesure et une largeur de page de 90 secondes.
- A l'aide d'une micropipette automatique, prélevez 750 µl de glutamate.
- Lancez la mesure et déposez dans la cuve les 750 µl de glutamate en notant soigneusement le moment du dépôt (tracé 6).
- Enregistrez et imprimez le tracé obtenu.
- Jetez le cône ayant servi au prélèvement et au dépôt.

Identifiez le tracé, indiquez à l'aide d'une flèche le moment d'introduction du glutamate.

Appelez l'examineur

A partir de vos connaissances sur le rôle des ions Ca²⁺ dans la contraction musculaire et sachant que l'EDTA est un chélateur de ces ions, que pouvez-vous conclure quant au mécanisme d'action du glutamate sur les muscles pariétaux du Lombric ?

7. Rinçage

- Ouvrez la pince Kocher et laissez s'écouler le liquide physiologique contenu dans la cuve dans la cuvette de vidange.
- Remettez la pince Kocher en place et remplissez la cuve de liquide physiologique (rinçage).
- Comme précédemment, vidangez la cuve puis remettez la pince Kocher en place.
- Eliminez la préparation musculaire du dispositif expérimental.

Analyse d'une réponse métabolique bactérienne en présence de différentes sources de carbone (20 points)

Le but de cette manipulation est de suivre la croissance de la bactérie *Escherichia coli* dans différents milieux nutritifs et de doser l'activité de l'enzyme β -galactosidase, une enzyme intracellulaire, associée à cette croissance. La β -galactosidase catalyse la réaction suivante :



Des bactéries *E. coli* ont été ensemencées dans un milieu de culture contenant comme source énergétique principale du lactose (milieu 1) et incubées à 37°C sous agitation pendant 2 heures.

Au bout de 2 heures, 3 fois 10 mL de cette culture (appelée pré-culture) ont été transvasés dans des tubes et centrifugés.

Le surnageant de culture a été éliminé et les culots bactériens obtenus ont été repris dans 50 mL de 3 milieux de culture différents : milieu 1 (avec lactose), 2 (avec glucose) ou 3 (avec lactose et glucose) et incubés à 37°C sous agitation. Le moment de remise en culture est défini comme le temps $t = 0\text{h}$.

	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
Composition : milieu Luria Broth (extrait de levure, NaCl) complété avec :	Milieu LB avec lactose 28 mM	Milieu LB avec glucose 55 mM	Milieu LB avec lactose 28 mM + glucose 55 mM

Pour chacune des 3 conditions de culture, au bout de 2 heures ($t = 2\text{h}$) et de 4 heures ($t = 4\text{h}$), on effectue les deux opérations suivantes :

- prélèvement de 5 mL de suspension bactérienne et mesure de la densité optique pour évaluer la concentration bactérienne selon le paragraphe 1 (tubes numérotés de 1 à 6 selon le tableau joint)
- prélèvement de 200 μL de suspension bactérienne, centrifugation, élimination du surnageant et conservation du culot bactérien qui va servir à mesurer l'activité β -galactosidase selon le paragraphe 2 (tubes numérotés de 1 à 6 selon le tableau joint).

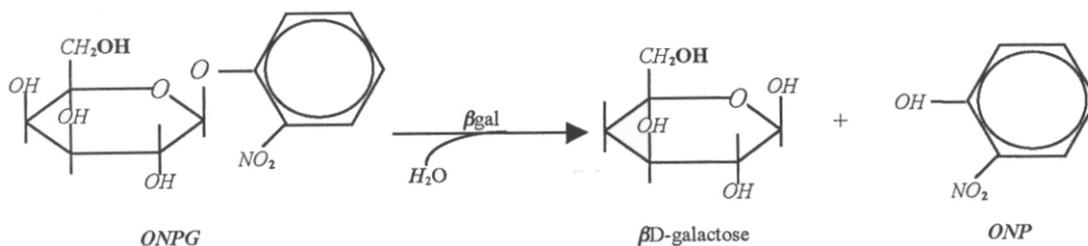
Deux prélèvements de la pré-culture à 2 heures ont également été effectués et traités dans les mêmes conditions (tubes 0).

1. Mesure de la concentration bactérienne par opacimétrie (spectrophotométrie des milieux troubles)

La densité optique à 600 nm ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$) des échantillons prélevés (7 au total) a été lue au spectrophotomètre et consignée dans le tableau joint. Sachant que 1 unité de densité optique à 600 nm ($\text{uDO}_{600\text{ nm}}$) équivaut à $5 \cdot 10^8$ bactéries/mL, déduire le nombre de bactéries/mL pour chaque tube. Compléter le tableau.

2. Dosage de l'activité β -galactosidase

Pour doser l'activité β -galactosidase, on tire partie du fait que cette enzyme présente une spécificité élargie et qu'il est capable d'hydrolyser efficacement un β -D galactoside artificiel comme l'ONPG (ortho-nitro-phényl β -D galactoside) pour donner l'ONP (ortho-nitro-phénol ou nitro-2-phénol) et du β -D-galactose selon la réaction ci-dessous. La réaction peut être arrêtée à pH basique.



2.1. Préliminaire

Préparer 4 tubes à hémolyse contenant :

	A	B	C	D
ONP 0,4 mM	-	1 mL	1 mL	-
ONPG 32mM	-	-	-	1,5 mL
Tampon Phosphate 0,1M	4 mL	3 mL	2 mL	1,5 mL
Na_2CO_3 1M	-	-	1 mL	1 mL

Homogénéiser et transvaser 2 mL dans une cuve de lecture. Mesurer l'absorbance à 400, 420 nm et 440 nm contre le tube A. Consigner les résultats dans le tableau ci-dessous :

	A	B	C	D
A à 400 nm	0			
A à 420 nm	0			
A à 440 nm	0			

Compte rendu :

- Comment peut-on expliquer la différence d'absorbance des tubes B et C ?
- Déterminer la longueur d'onde qui convient le mieux pour mesurer l'activité β -galactosidase. Justifier.
- En appliquant la loi de Beer-Lambert, calculer le coefficient d'absorption molaire de l'ONP dans les conditions du tube C à la longueur d'onde choisie.

Données :

La loi de Beer-Lambert s'exprime sous la forme :

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} l C$$

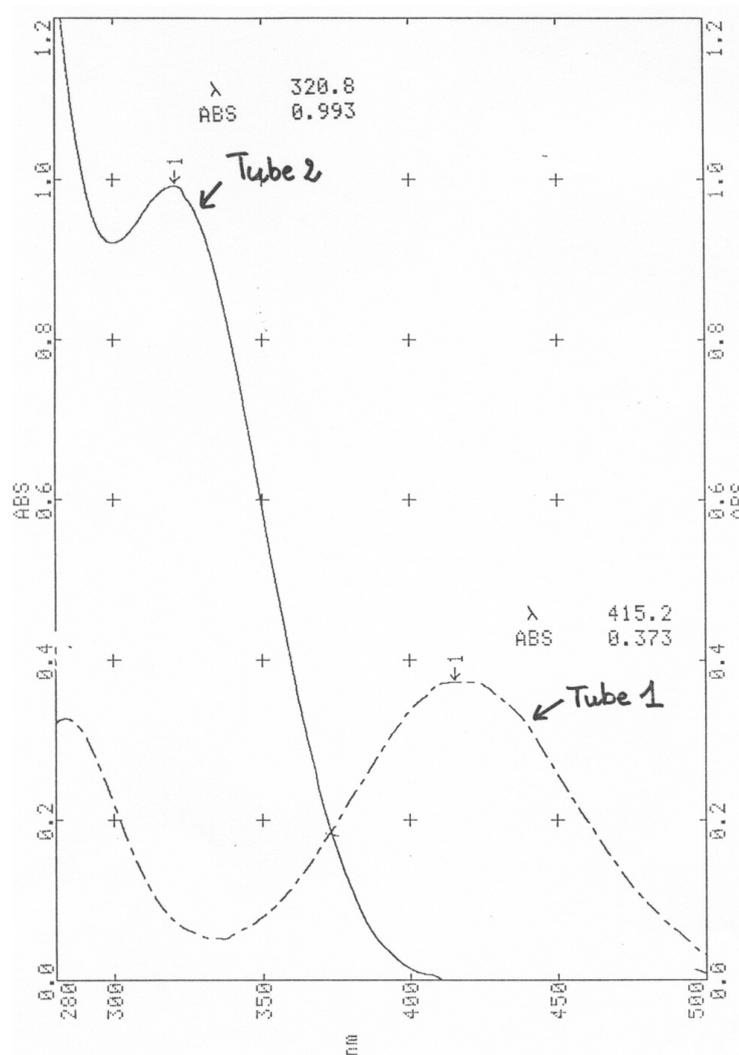
Avec

A = absorbance

ϵ = coefficient d'absorption molaire spécifique en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

l = trajet optique (ici 1 cm)

C = concentration molaire de la substance absorbante.



Spectres d'absorption de l'ONP et de l'ONPG

	Echantillon 1	Echantillon 2
ONP 0,4 mM	1 mL	-
ONPG 3,2 mM	-	1,5 mL
Tampon phosphate 0,1 M	2 mL	1,5 mL
Na ₂ CO ₃ 1 M	1 mL	1 mL

2.2. Dosage

Réaliser simultanément pour chacun des sept tubes fournis les mélanges réactionnels suivants :

- Extraction de la β -galactosidase
 - . Reprendre le culot bactérien dans 1 mL de NaCl 9%.
 - . Ajouter 0,5 mL de bromure de cétyltriméthylammonium à 0,8 g.L⁻¹ pour lyser les bactéries.
- Mesure de l'activité β -galactosidase
 - . Ajouter 1,5 mL de substrat ONPG 3,2 mM.
 - . Homogénéiser tout en déclenchant le chronomètre.
 - . Au bout de 20 minutes arrêter la réaction par addition de 1 mL de Na₂CO₃ 1M.
 - . Centrifuger 5 minutes à 4000 tr/minute pour éliminer les débris cellulaires (obtention d'un surnageant limpide).
 - . Transvaser délicatement 2 mL de surnageant dans une cuve et lire l'absorbance à la longueur d'onde choisie au spectrophotomètre contre un tube référence de votre choix.

Compte rendu :

- d. Préciser la composition du tube de référence choisi pour la lecture d'absorbance.
- e. L'activité β -galactosidase est proportionnelle à la quantité de produit ONP apparue par unité de temps. En partant de la loi de Beer-Lambert, écrire la formule littérale permettant d'exprimer cette activité en nmoles de produit apparues par minute dans le mélange réactionnel. Ensuite, écrire la formule littérale permettant d'exprimer cette activité en nmoles de produit apparues par minute par mL de prise d'essai de culture bactérienne.
- f. Enfin, écrire la formule littérale permettant d'exprimer l'activité β -galactosidase spécifique en nmoles de produit apparues par minute pour 10⁶ bactéries.

Compléter le tableau en appliquant les formules.

N° TUBE	MILIEU	TEMPS	CONCENTRATION BACTERIENNE		ACTIVITE β -GALACTOSIDASE		ACTIVITE SPECIFIQUE β -GALACTOSIDASE
			uDO à 600 nm	Bactéries/mL	A à ... nm	nmoles d'ONP apparues /min/mL de prise d'essai de culture bactérienne	nmoles d'ONP apparues /min pour 10^6 bactéries
0	Préculture à 2h (lactose)	T 0h	1,081				
1	Milieu 1 (lactose)	T 2h	1,689				
		T 4h	5,12				
2							
3	Milieu 2 (glucose)	T 2h	1,691				
		T 4h	5,18				
4							
5	Milieu 3 (lactose + glucose)	T 2h	1,582				
		T 4h	5,98				
6							

g. Commentez les résultats obtenus.

Emettez des hypothèses sur le rôle du glucose et du lactose dans la régulation du taux d'activité spécifique β -galactosidase chez E. coli.

Autour d'un rameau d'arbre: approche morphologique, anatomique et cytologique (cytochimie et ultrastructure) (20 points)

1.

Faire un dessin d'un axe principal et d'une ramification. Délimiter les unités de croissance (années 2005 et 2004). Résumer vos observations en insistant sur les modalités de la croissance.

2.

Réaliser des coupes transversales (au moins 3 pour chaque niveau) dans la tige (unités de croissance 2005 et 2004). Les placer dans l'eau distillée avant utilisation.

Etudier à l'aide du microscope une coupe de chaque niveau après les traitements suivants (à réaliser sur des coupes distinctes) :

a) eau distillée

b) phloroglucine chlorhydrique (sur la lame, déposer les coupes dans une goutte de phloroglucine en solution alcoolique, puis ajouter une goutte d'acide chlorhydrique concentré. Ce réactif est caractéristique des composés phénoliques, à l'état monomérique ou condensé)

c) Lugol

Appeler un examinateur pour l'appréciation de vos préparations.

L'ensemble de vos observations sera consigné dans deux schémas (un pour chaque niveau) soigneusement légendés.

Vous pourrez représenter quelques cellules caractéristiques sous forme de dessin(s) de détail si vous le jugez nécessaire.

Rédiger une conclusion basée sur l'ensemble de vos observations, ayant trait aux données structurales et fonctionnelles, ainsi qu'à leur évolution sur une période de 1 an.

3. Etude ultrastructurale de plusieurs étapes de l'évolution d'un type cellulaire présent dans les coupes précédemment observées.

Le matériel a été traité selon les techniques classiques de la microscopie électronique à transmission (il ne sera pas tenu compte des différences de contraste affectant certains éléments).

Légender les trois micrographies proposées. Rédiger une conclusion basée sur cette étude.

De quel type cellulaire s'agit-il ? Pouvez-vous faire le lien entre son évolution et la fonction de ces cellules ?

