

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE EN RECHERCHE

ET EN PRODUCTION

E4 – PHYSIQUE-CHIMIE

SESSION 2026

DURÉE DE L'ÉPREUVE : 2 heures

COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

L'usage de la calculatrice avec mode examen actif est autorisé.

L'usage de la calculatrice sans mémoire, « type collègue » est autorisé.

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.

Le sujet se compose de 12 pages, numérotées de 1/12 à 12/12.

L'ANNEXE PAGE 12/12 EST À RENDRE AVEC LA COPIE

La correction de l'épreuve tiendra le plus grand compte de la clarté dans la conduite de la résolution et dans la rédaction de l'énoncé des lois, de la compatibilité de la précision des résultats numériques avec celle des données de l'énoncé, du soin apporté aux représentations graphiques éventuelles et de la qualité de la langue française dans son emploi scientifique.

BTS BIOTECHNOLOGIE EN RECHERCHE ET EN PRODUCTION		Session 2026
E4 – Physique-chimie	26BOE4PC	Page : 1/12

La PCR pour *Polymerase Chain Reaction*, ou réaction de polymérisation en chaîne est une technique de biologie moléculaire très utilisée depuis les années 1990.

À partir d'échantillon peu abondant (exemple : goutte de sang), cette technique permet de copier rapidement des séquences précises d'ADN en de très nombreux exemplaires que l'on appelle les amplicons.

Les applications de la réaction en chaîne par polymérase sont nombreuses : recherche fondamentale, diagnostic médical, médecine légale, agroalimentaire...

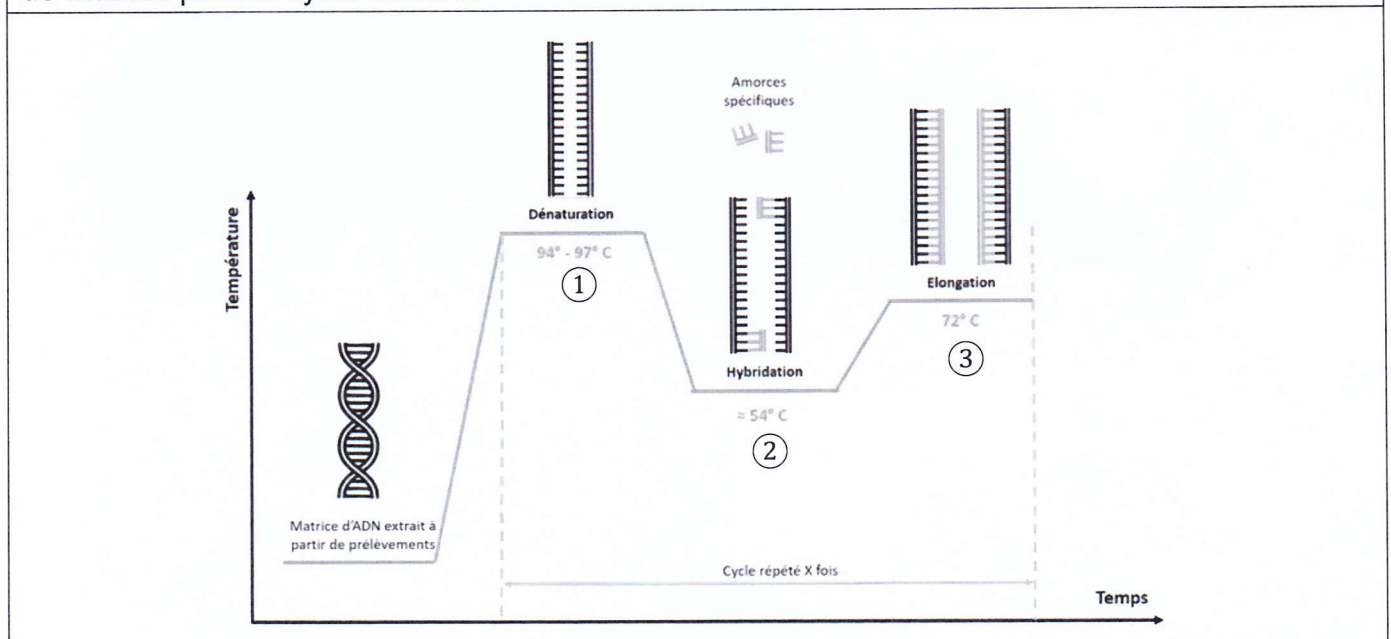
Si le principe général rappelé ci-dessous, reste sensiblement le même, les différents contextes d'utilisation de la PCR, et la grande variété des échantillons, nécessitent une constante adaptation et l'optimisation de conditions opératoires spécifiques, particulièrement en recherche.

① Dénaturation : séparation des deux brins.

② Appariement ou hybridation : les deux amorces se fixent à leur séquence complémentaire.

③ Élongation : la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire à l'ADN mono brin qui lui sert de matrice.

Le 1^{er} cycle est terminé. Les deux fragments d'ADN ainsi synthétisés peuvent servir à leur tour de matrice pour le cycle suivant.



Principe général de la PCR

Ce sujet propose d'étudier les principaux paramètres physiques et chimiques à prendre en compte pour l'optimisation d'un kit de PCR quantitative (qPCR) destiné à un laboratoire de recherche.

Les trois parties du sujet sont indépendantes.

- A. STRUCTURE, STABILITE ET PURETE DU FRAGMENT CIBLE D'ADN
- B. ÉTUDE DU MILIEU REACTIONNEL
- C. MARQUAGE ET DETECTION DES AMPLICONS

BTS BIOTECHNOLOGIE EN RECHERCHE ET EN PRODUCTION		Session 2026
E4 – Physique-chimie	26BOE4PC	Page : 2/12

Données utiles :

- Numéros atomiques : $Z(\text{H}) = 1$; $Z(\text{C}) = 6$; $Z(\text{N}) = 7$; $Z(\text{O}) = 8$
- Électronégativités χ dans l'échelle de Pauling

Atome	H	C	N	O
χ (sans unité)	2,20	2,55	3,04	3,44

$\Delta\chi < 0,4 \Rightarrow$ liaison non polarisée

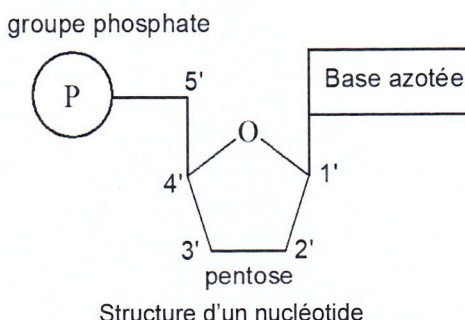
$0,4 < \Delta\chi < 1,7 \Rightarrow$ liaison polarisée

$\Delta\chi > 1,8 \Rightarrow$ liaison à caractère ionique

- Masses molaires (en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) : $\text{Mg} = 24,3$; $\text{Cl} = 35,5$; $\text{H}_2\text{O} = 18,0$
- $\text{p}K_a$ du TRIS à 25 °C est égal à 8,1
- Critère de Stokes : $\Delta\lambda > 20$ nm pour caractériser un fluorophore comme étant utilisable
- Pour un couple acide/base : Relation d'Henderson : $\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{base}]}{[\text{acide}]}$
- Constante de formation du complexe $[\text{MgY}]^{2-}$: $K_f = 10^{8,7}$

A. STRUCTURE, STABILITEET PURETE DU FRAGMENT CIBLE D'ADN

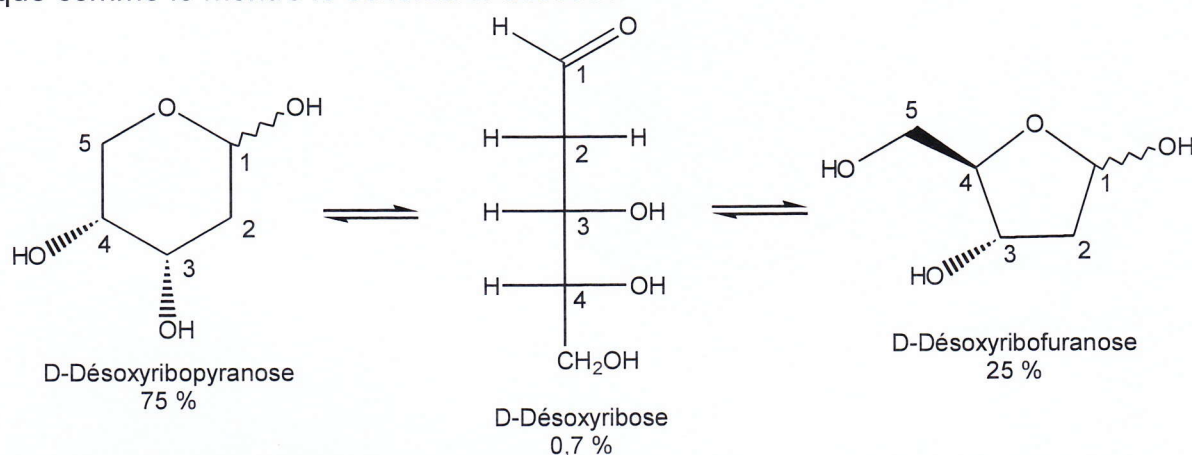
Les acides nucléiques sont des biopolymères dont les unités monomères sont des nucléotides, reliés entre eux par des liaisons phosphodiester. Chaque nucléotide est composé d'un pentose : ribose pour l'ARN et désoxyribose pour l'ADN ; d'une base azotée et d'un à trois groupements phosphates.



I. Le désoxyribose

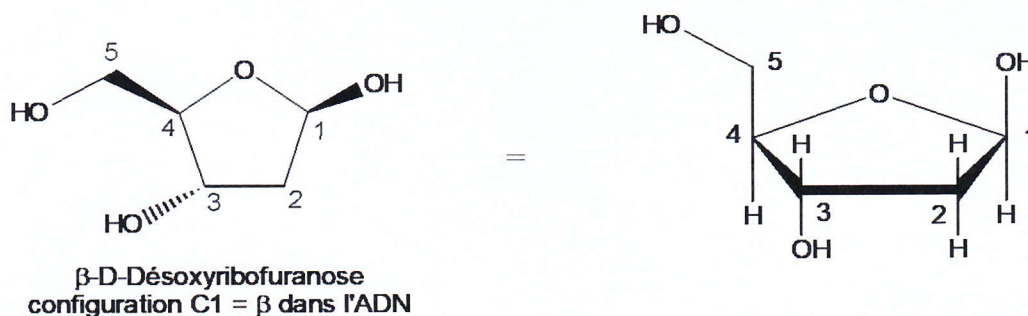
La particularité du désoxyribose réside dans la perte d'un groupement OH sur le carbone numéro 2 qui donne à la molécule d'ADN une stabilité chimique supérieure par rapport à l'ARN.

En solution et dans les milieux biologiques le désoxyribose adopte majoritairement une forme cyclique comme le montre le schéma ci-dessous.



1. À l'aide de la représentation de Fischer donnée en **annexe 1a page 12 à rendre avec la copie**, identifier les fonctions présentes sur la forme ouverte du D-2-désoxyribose.
2. Justifier le fait que le désoxyribose représenté ci-dessus et sur l'**annexe 1a page 12**, appartient bien à la série D.

Dans l'ADN, le désoxyribose est sous la forme β -D-2-désoxyribofuranose, la configuration du carbone n°1 est donc connue et la liaison C1–OH est en avant du plan dans la représentation de Cram.



3. Déterminer la configuration absolue (stéréodescripteur R ou S) du carbone n°1. On détaillera la démarche et les règles utilisées, à l'aide de l'annexe 1b page 12 à rendre avec la copie.

Lors du passage de la forme ouverte à la forme cyclique furanose (hémiacétalisation), la réaction peut être schématisée de la façon suivante : la flèche courbe mettant en évidence l'étape principale du mécanisme.

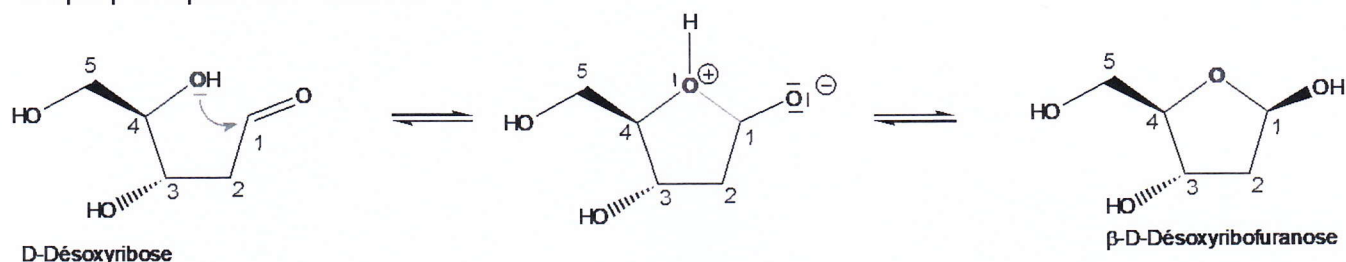


Schéma simplifié de la formation intramoléculaire d'un hémiacétal

4. En choisissant le terme approprié (substitution, addition, oxydation, élimination) préciser la nature de cette étape.

La différence entre le ribose et le désoxyribose est fondamentale d'un point de vue biologique. En effet la présence d'un groupement hydroxyle en position 2, favorise la réactivité chimique du ribose, donc de l'ARN, ce qui est important dans les processus transitoires comme la transcription et la traduction. Le désoxyribose lui est moins réactif.

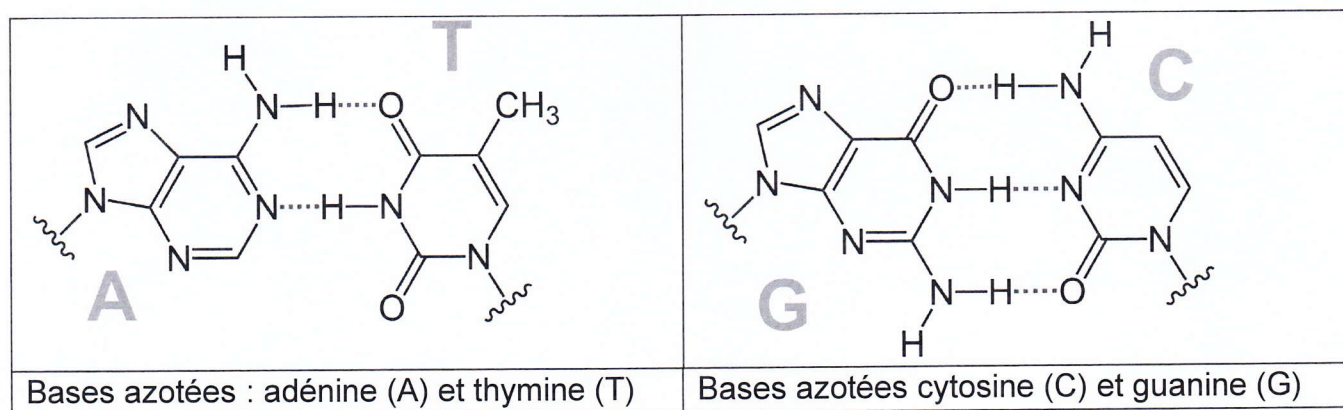
Ainsi, le choix évolutif du désoxyribose comme pilier de la structure de l'ADN, contraste avec le rôle du ribose dans l'ARN, l'un étant adapté à la stabilité et l'autre, à la réactivité.

D'après : www.futura-sciences.com

5. Proposer une définition du terme réactivité chimique.
6. Justifier brièvement l'intérêt biologique de la présence du désoxyribose plutôt que du ribose dans la structure de l'ADN.

II. Les bases azotées

La stabilité de l'ADN tient également à sa structure en double hélice : les deux brins antiparallèles étant associés par complémentarité des bases azotées.



7. Préciser le nom des liaisons représentées en pointillés sur la figure ci-dessus.

8. À l'aide des données, indiquer les charges partielles δ^+ et δ^- sur les atomes de part et d'autre de chaque liaison en pointillés. Justifier par un calcul simple que les liaisons sont polarisées. Compléter l'annexe 2 page 12 à rendre avec la copie.

Lorsque l'ADN est soumis à une élévation de température les deux brins peuvent être séparés (dénaturation). On peut ainsi déterminer la température de fusion T_m (température pour laquelle la moitié de l'ADN est dénaturé) pour chaque échantillon.

Plusieurs facteurs influencent la température de fusion T_m , comme la longueur du fragment, mais également le pourcentage de bases CG (coefficient de Chargaff).

9. Justifier que la valeur de T_m pour l'ADN augmente quand le coefficient de Chargaff (pourcentage de bases azotées CG) augmente.

L'étape ① du cycle de PCR, utilise cette dénaturation thermique pour séparer totalement les deux brins du fragment d'ADN cible de l'échantillon. Cette étape est réalisée à l'aide d'un thermocycleur réglé à 95 °C pendant 10 à 15 minutes.

10. Sachant que l'ADN humain a une température de fusion d'environ 86 °C, justifier la valeur de la température utilisée pour l'étape ① de la PCR.

III. Pureté de l'échantillon

Les étapes d'extraction et de purification de l'ADN peuvent laisser des contaminants. Il est donc nécessaire d'évaluer la concentration et la pureté des acides nucléiques cibles avant de procéder à l'étape ① de la PCR. Pour cela on utilise un spectrophotomètre UV-visible tel que le Nanodrop®.

11. À l'aide de la figure 1, indiquer la longueur d'onde à laquelle le dosage de l'ADN doit être effectué. Justifier.

Les contaminants peuvent provenir notamment des solvants d'extraction comme la guanidine ou le phénol.

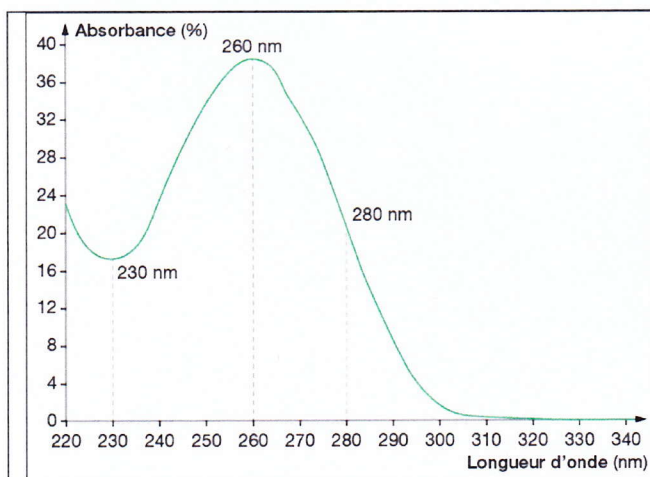


Figure 1 : Spectre de l'ADN

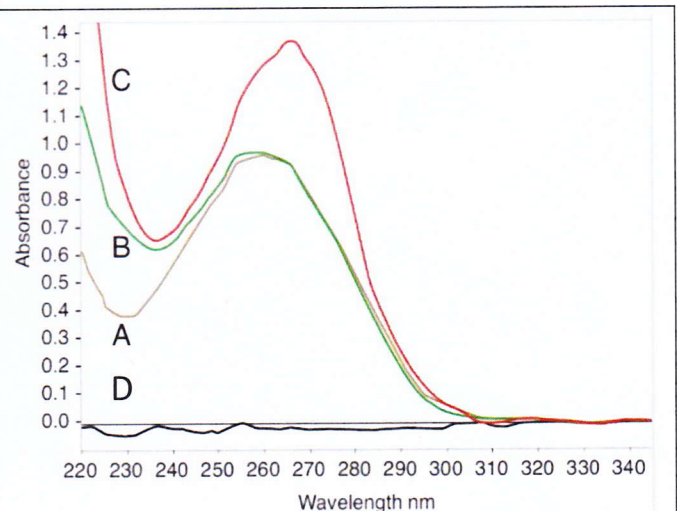


Figure 2 : Spectres d'ADN pur (A) et en présence de deux contaminants : (B) Guanidine, (C) Phénol, (D) bruit de fond.



La tension superficielle de la goutte échantillon crée une colonne liquide entre les 2 surfaces. La distance entre les deux surfaces est précisément contrôlée (1 mm ou 0,5 mm ...) et détermine le parcours optique.

(Adapté de doc. technique ThermoScientific)

Figure 3 : Principe du spectrophotomètre Nanodrop®

Pour détecter la présence de contaminants, le Nanodrop® mesure les rapports A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} .

- 12.** À l'aide des spectres de la figure 2, indiquer quel rapport permet de vérifier la présence de phénol. Justifier.

Le principe du Nanodrop® est similaire à un spectrophotomètre UV-visible classique (figure 3) où la cuve est remplacée par un dispositif permettant l'analyse de microéchantillons.

Une goutte de l'échantillon est déposée sur un socle, puis on abaisse le bras supérieur sur la goutte ce qui permet de former une colonne liquide.

Le faisceau lumineux passe directement à travers le liquide, sans cuve.

Le trajet optique ℓ est contrôlé automatiquement par l'appareil.

- 13.** Donner le nom et l'expression de la loi reliant l'absorbance A et la concentration en ADN. On précisera les unités de chaque terme.

- 14.** Préciser à quoi correspond le trajet optique dans le cas du Nanodrop®.

La source polychromatique utilisée dans le Nanodrop® est une lampe à arc au xénon émettant un rayonnement dans une large gamme UV-visible allant de 200 à 800 nm.

- 15.** Citer deux dispositifs dispersifs, couramment utilisés dans des monochromateurs, permettant de sélectionner la longueur d'onde de travail à partir de cette source polychromatique.

Un réseau par transmission comportant $1\,500 \times 10^3$ traits $\cdot \text{m}^{-1}$ est éclairé à l'aide d'une lampe au xénon, en incidence normale.

On donne la formule du réseau qui permet de calculer la longueur d'onde sélectionnée :

$$\sin(i') - \sin(i) = k \cdot n \cdot \lambda$$

avec i = angle d'incidence (en degré)
 i' = angle d'émergence (en degré)
 k = ordre du spectre (sans unité)
 n = nombre de traits par mètre

Lors d'un blanc automatique permettant de vérifier le bon fonctionnement du Nanodrop® et la propreté du socle, l'angle d'émergence i' est égal à $23,0^\circ$ pour l'ordre 1.

BTS BIOTECHNOLOGIE EN RECHERCHE ET EN PRODUCTION		Session 2026
E4 – Physique-chimie	26BOE4PC	Page : 7/12

16. Calculer la valeur de la longueur d'onde sélectionnée par l'appareil dans ce cas.
Conclure sur le bon fonctionnement du Nanodrop®.

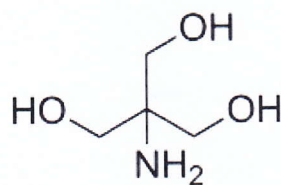
B. ETUDE DU MILIEU REACTIONNEL

I. Le tampon

La PCR doit être réalisée dans un tampon favorable à l'activité de l'ADN polymérase. Le pH du tampon est généralement compris entre 8,0 et 9,5. Le tris(hydroxyméthyl)aminométhane ou *TRIS* est l'un des plus utilisés en biologie moléculaire.

17. Citer les propriétés d'une solution tampon.

Seule la fonction amine du *TRIS* est ionisable en solution aqueuse. Il sera par la suite noté *TRIS-NH₂* sous sa forme basique.



Formule du *TRIS*

Pour préparer différentes solutions tampon nécessaire à l'optimisation du kit, on dispose de *Tris-NH₂* solide et d'une solution d'acide chlorhydrique (H_3O^+ ; Cl^-).

18. Écrire l'équation de réaction acido-basique entre le *Tris-NH₂* et l'acide chlorhydrique.
19. Dans 1 L d'eau, on dissout, sans variation de volume, 1,0 mol de *Tris-NH₂* et 0,5 mol d'acide chlorhydrique. Établir la composition du mélange final, en déduire la valeur du pH à l'aide des données fournies, et conclure sur la possibilité d'utiliser cette solution comme tampon.

II. Le magnésium

Les ions Mg^{2+} servent de cofacteur pour l'activité des ADN-polymérases, ils sont apportés dans le milieu réactionnel sous forme de chlorure de magnésium MgCl_2 . La concentration en ions Mg^{2+} joue un rôle fondamental dans les conditions opératoires. Une concentration trop faible ou trop forte peut jouer sur le rendement ou la spécificité de la réaction.

L'usage est de partir de solutions mères commerciales de concentrations en ions Mg^{2+} de l'ordre de $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pour obtenir une concentration de 0,5 à $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ en ions Mg^{2+} dans le milieu réactionnel final.

20. Calculer la valeur du facteur de dilution permettant d'obtenir une solution finale à $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ à partir d'une solution commerciale à $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

On souhaite obtenir 10 mL de cette solution fille.

21. Proposer la verrerie nécessaire pour réaliser cette dilution. Préciser les volumes.

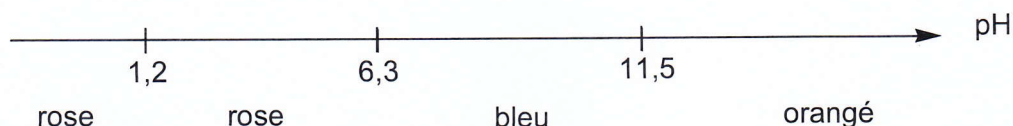
BTS BIOTECHNOLOGIE EN RECHERCHE ET EN PRODUCTION		Session 2026
E4 – Physique-chimie	26BOE4PC	Page : 8/12

Le technicien doit pouvoir vérifier précisément la concentration en ions Mg^{2+} dans les milieux réactionnels qu'il optimise.

Pour cela, il utilise un dosage par complexation. Le réactif titrant utilisé est l'EDTA noté Y^{4-} . L'indicateur coloré de fin de réaction est le Noir Eriochrome T noté NET (voir document 1).

Document 1 : Couleur du NET

Le NET forme un complexe stable de couleur rouge violacée avec le cation magnésium. Dans ses formes libres, le NET change de couleur en fonction du pH :



Document 2 : Principe du dosage

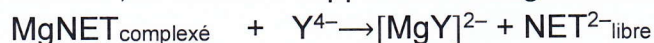
Espèce à doser : Mg^{2+} solution titrante : Y^{4-} (EDTA)

La réaction support du dosage : $\text{Mg}^{2+} + \text{Y}^{4-} \rightarrow [\text{MgY}]^{2-}$
Incolore

Constante de formation du complexe $[\text{MgY}]^{2-}$: $K_f = 10^{8,7}$

Les espèces mises en jeu dans cette réaction étant toutes incolores, on utilise un indicateur de fin de réaction, le NET.

En présence de NET, la réaction support du dosage devient à $\text{pH} = 10$:



On rappelle qu'une réaction est retenue comme réaction support d'un dosage seulement si elle est totale et rapide.

22. Justifier à l'aide des données fournies que la réaction de complexation de Mg^{2+} par EDTA est bien totale.

23. Indiquer la couleur de la solution dosée, avant l'équivalence et après l'équivalence.

Le technicien dose le magnésium dans l'un des milieux réactionnels commerciaux ayant donné le meilleur résultat pour la PCR étudiée. Il utilise une microburette de 2,00 mL et une solution titrante d'EDTA de concentration $C = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Le dosage s'effectue sur une prise d'essai de 2,0 mL de milieu réactionnel, auquel on ajoute 4 mL de tampon $\text{pH} = 10$ et une goutte de NET. Le virage de l'indicateur NET est obtenu pour un volume équivalent V_{eq} , égal à 0,70 mL.

24. Donner la relation à l'équivalence entre la quantité de matière d'ions Mg^{2+} et la quantité de matière d'ions Y^{4-} .

25. En déduire la valeur de la concentration en ions Mg^{2+} du milieu réactionnel commercial.

Pour réaliser les PCR suivantes, le technicien prépare 2,0 L d'une solution stock de concentration en ion magnésium égale à $3,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

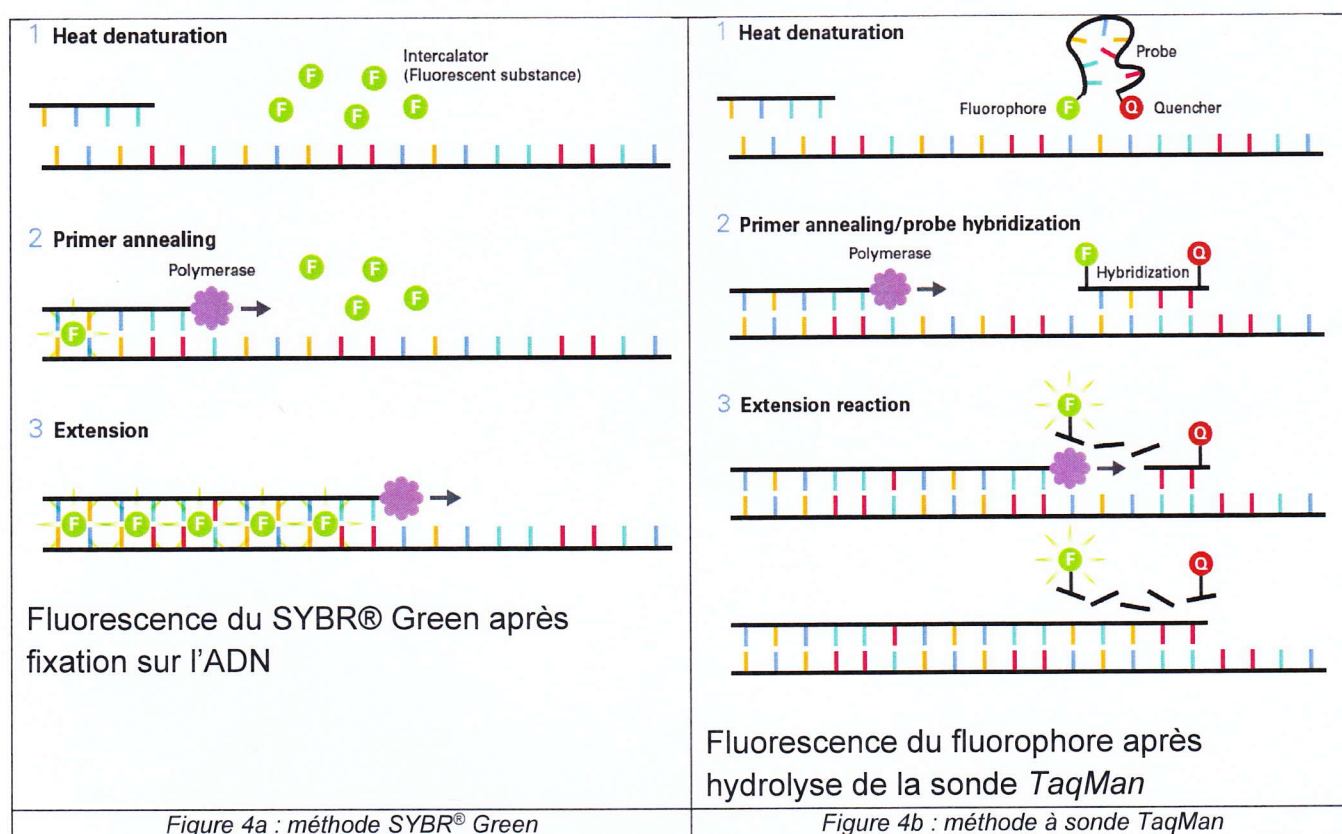
BTS BIOTECHNOLOGIE EN RECHERCHE ET EN PRODUCTION		Session 2026
E4 – Physique-chimie	26BOE4PC	Page : 9/12

26. Calculer la valeur de la masse de chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) à peser pour préparer cette solution.

III. MARQUAGE ET DETECTION DES AMPLICONS

La technique de qPCR étudiée ici permet de mesurer en temps réel le nombre d'amplicons produits. Il est donc nécessaire de créer un signal dont l'intensité est mesurable et proportionnelle à la quantité d'ADN produite. On utilise la fluorescence : plus le nombre de copies d'acides nucléiques cibles est élevé, plus une augmentation de la fluorescence sera observée. Deux méthodes sont principalement utilisées :

- L'utilisation du colorant fluorophore *SYBR® Green*
- L'utilisation d'une sonde fluorogénique *TaqMan*

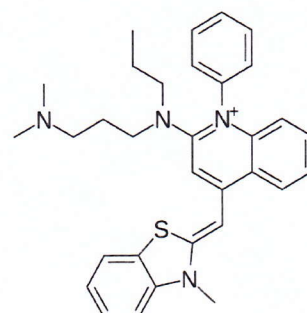


Le SYBR® Green

Le marquage de l'ADN est réalisé par la fixation du fluorophore *SYBR® Green*. Seul, à l'état libre, il est peu fluorescent, mais dès qu'il est fixé à l'ADN lors de la phase d'élongation ③, il devient un très bon fluorophore. Le complexe ADN-*SYBR® Green* absorbe la lumière bleue ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$) et émet de la lumière verte ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$).

27. Définir brièvement le phénomène de fluorescence.

28. Vérifier que le *SYBR® Green* est utilisable selon le critère de Stokes.



La sonde *TaqMan*

On utilise le principe du quenching. La sonde *TaqMan* (*probe* en anglais) possède un fluorophore F et un quencher Q, comme le montre la figure 4b.

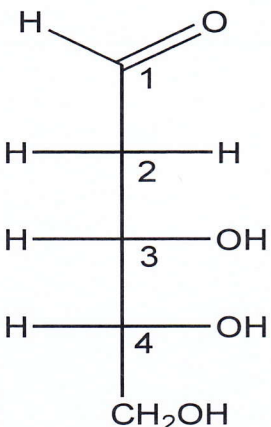
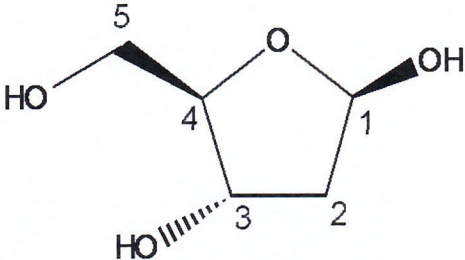
29. En vous aidant de la figure 4b, rappeler le principe du *quenching*.

30. En vous aidant des figures 4a et 4b, indiquer la méthode dans laquelle l'intensité de fluorescence I_f est la plus forte pour une même quantité d'ADN amplifiée. Justifier.

L'intensité de fluorescence I_f est mesurée à l'aide d'un capteur placé à 90° par rapport au faisceau incident, contrairement à la spectrophotométrie UV-visible où le capteur se trouve en face du faisceau incident.

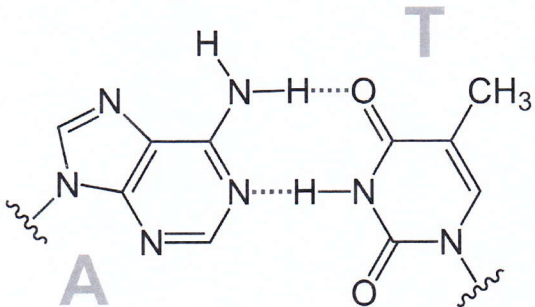
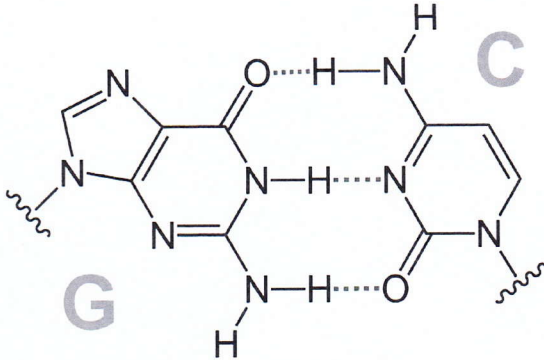
31. Justifier cette différence. On pourra s'aider d'un schéma.

ANNEXE 1 : Le désoxyribose (à rendre avec la copie)

Annexe 1a : fonctions	Annexe 1b : configuration absolue C1
	
D-désoxyribose	β -D-désoxyribofuranose

ANNEXE 2 : Les bases azotées (à rendre avec la copie)

Charges partielles δ^+ et δ^- à compléter.

	
Appariement : Adénine/Thymine	Appariement : Guanine / Cytosine