



Concours de recrutement du second degré

Rapport de jury

Concours : AGREGATION EXTERNE

Section : BIOCHIMIE GENIE BIOLOGIQUE

Session 2019

Rapport de jury présenté par : Caroline BONNEFOY

Présidente du jury

SOMMAIRE

	Page
RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES	3
ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ	
Composition de Biochimie	
Sujet	5
Rapport de Jury	5
Composition de Microbiologie	
Sujet	8
Rapport de Jury	8
Composition de Biologie Cellulaire et Physiologie	
Sujet	11
Rapport de Jury	11
ÉPREUVES D'ADMISSION	
Travaux Pratiques de Biochimie – Physiologie	
Sujet	13
Rapport de Jury	31
Travaux Pratiques de Microbiologie	
Sujet	37
Rapport de Jury	50
Travaux Pratiques de Chimie	
Sujet	56
Rapport de Jury	76
Épreuve Orale de Leçon	
Sujets	79
Rapport de Jury	79
Épreuve Orale d'Étude Critique de Dossier scientifique et/ou technique	
Sujets	84
Rapport de Jury	86
CONCLUSION GÉNÉRALE	89

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits	295
Candidats présents aux trois épreuves d'admissibilité (non éliminés)	79
Nombre de postes	10
Candidats admissibles	23
Candidats présents aux épreuves d'admission	20
Candidats proposés pour l'admission	10
Barre d'admissibilité (sur 20)	06,67
Barre d'admission (sur 20)	09,89

ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

Moyenne générale des candidats présents (sur 20)	05,67
Moyenne générale des candidats admissibles (sur 20)	09,92

COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Moyenne des candidats présents (sur 20)	05,09
Moyenne des candidats admissibles (sur 20)	10,81
Note maximale (sur 20)	17,90

COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents (sur 20)	05,24
Moyenne des candidats admissibles (sur 20)	09,10
Note maximale (sur 20)	18,00

COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents (sur 20)	06,29
Moyenne des candidats admissibles (sur 20)	09,84
Note maximale (sur 20)	17,00

ÉPREUVES D'ADMISSION

Moyenne générale des candidats présents (sur 20) 10,05

Moyenne générale des candidats admis (sur 20) 12,12

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents (sur 20) 11,71

Moyennes des candidats admis (sur 20) 13,10

Note maximale (sur 20) 16,00

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents (sur 20) 10,69

Moyennes des candidats admis (sur 20) 11,79

Note maximale (sur 20) 16,00

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

Moyenne des candidats présents (sur 20) 09,61

Moyennes des candidats admis (sur 20) 10,31

Note maximale (sur 20) 16,20

LEÇON

Moyenne des candidats présents (sur 20) 09,90

Moyennes des candidats admis (sur 20) 13,50

Note maximale (sur 20) 19,00

ÉTUDE CRITIQUE DE DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Moyenne des candidats présents (sur 20) 08,78

Moyennes des candidats admis (sur 20) 11,50

Note maximale (sur 20) 19,00

ENSEMBLE DU CONCOURS

Moyenne générale des candidats présents admissibles (sur 20) 10,13

Moyenne générale des candidats admis (sur 20) 12,20

ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Les réactions d'oxydoréduction chez les eucaryotes.

Un exposé synthétique faisant ressortir les principaux concepts de l'oxydo-réduction cellulaire est attendu. Il mettra en évidence la diversité, les mécanismes moléculaires et l'intégration dans la physiologie cellulaire de ces réactions. Vous illustrerez votre exposé à l'aide d'exemples judicieusement choisis dans le monde animal et le monde végétal.

RAPPORT DU JURY DE BIOCHIMIE

Pour le sujet proposé cette année, il s'agissait de produire une synthèse faisant ressortir les principaux concepts de l'oxydoréduction cellulaire en illustrant la démonstration à l'aide d'exemples judicieusement choisis dans le monde animal et végétal. Ce sujet appelait de bonnes connaissances en chimie de l'oxydoreduction mais aussi une vision intégrée et conceptuelle de l'importance de ces réactions dans la physiologie cellulaire.

REMARQUES DE FORME & INTRODUCTION

Tout d'abord, les correcteurs rappellent que l'introduction de la composition ne doit pas se contenter de juxtaposer la définition des termes du sujet (oxydoreduction, eucaryote, animaux, végétaux) mais doit proposer une réelle mise en problématique du sujet permettant de dégager un plan structuré et logique pour répondre à la question posée. On attendait ici des candidats qu'ils soulignent le rôle majeur et universel des réactions d'oxydo-réduction dans le métabolisme énergétique cellulaire. En effet les composées organiques qui constituent les êtres vivants sont essentiellement le résultat d'un processus de réduction de l'atome de carbone. Ainsi, tous les métabolismes cellulaires sont basés sur des processus de transfert d'électrons qui varient en fonction du type trophique de l'organisme. Les végétaux, organismes photo-lithoautotrophes, sont

capables d'utiliser l'énergie lumineuse pour capturer les électrons de la molécule d'eau et obtenir l'énergie et le pouvoir réducteur nécessaire à la synthèse des composés organiques réduit à partir du CO₂ atmosphérique. Les animaux sont quant à eux des organismes chimio-organohétérotrophes qui utilisent la matière organique comme source de matière, d'énergie, mais aussi d'électrons. Les réactions d'oxydo-réduction participent donc d'un enjeu énergétique majeur dans la physiologie cellulaire qui se devait d'être démontrée.

Par ailleurs, on attendait des candidats qu'ils mettent en exergue la très grande diversité des processus de transfert d'électrons lesquels ne se limitent pas aux processus du métabolisme énergétique, mais peuvent aussi participer au remodelage des diverses biomolécules *via* l'oxydation ou la réduction des fonctions chimiques des composés carbonés. Enfin, ces réactions jouent un rôle important dans l'intégration des cellules dans leur environnement et peuvent participer à la genèse d'un stress oxydant. En effet les réactions redox peuvent conduire à la genèse d'espèces réactives et les cellules intègrent des processus permettant à la fois se protéger contre les potentiels dommages induits pas ces composés, mais aussi pour les utiliser dans des processus de signalisation cellulaire.

Le plan de la composition devait permettre non seulement de bien faire ressortir les notions de chimie liées à l'oxydo-réduction mais aussi les spécificités de ces réactions dans la physiologie cellulaire. Il pouvait par exemple s'articuler en 3 parties : (1) Bases de la biochimie des réactions redox, (2) Importance des réactions redox dans le métabolisme énergétique, (3) Diversité des réactions redox et intégration du stress oxydant à la physiologie cellulaire.

NOTIONS ATTENDUES DANS LA COMPOSITION

Bases de la biochimie des réactions d'oxydo-réduction

Dans une première partie, on attendait donc une présentation des réactions redox : des bases de la chimie aux mécanismes précis mis en jeu dans les systèmes cellulaires. Il s'agissait de présenter de manière rigoureuse les principes de la chimie de l'oxydo-réduction : définition d'une réaction redox, notion de potentiel redox, thermodynamique associée (équation de Nernst), couplage redox et sens des réactions spontanées... Ces principes pouvaient alors être appliqués au cas des biomolécules en présentant les divers degrés d'oxydation possible de l'atome de carbone dans les composés organiques cellulaires et en soulignant les enjeux énergétiques liés aux processus de réductions nécessaires pour la synthèse de ces composé. Cette partie devait permettre aussi une présentation des mécanismes biochimique de l'oxydo-réduction avec une présentation des couples de donneurs et accepteurs d'électrons, organiques (coenzymes nicotiniques, quinones, vitamine C...) ou minéraux (cofacteurs métalliques) utilisés pour les couplages redox cellulaires.

De plus, le jury attendait un exposé de la diversité des enzymes oxydo-réductases ainsi que la présentation détaillée de quelques mécanismes catalytiques d'oxydo-réduction.

Enfin, il aurait apprécié des candidats qu'ils soulignent le fait que les réactions redox cellulaires ne sont pas toujours enzymatiques, que des transferts d'électrons peuvent avoir lieu de manière spontanées entre biomolécules et composés de l'environnement (dérivés de l'oxygène, métaux, xénobiotiques) ou sous l'action de la lumière.

Si la plupart des candidats ont commencé leur copie par une présentation de la chimie de réaction redox, les correcteurs ont souvent regretté le manque de précision dans la présentation des principes thermodynamiques associés. Par ailleurs, les principes de chimie n'ont que rarement été utilisés pour étayer une réelle démonstration des enjeux énergétiques cellulaires liés à l'oxydoréduction. De même, si de nombreux candidats ont souligné l'importance des couples de donneurs/accepteurs d'électrons, les mécanismes de l'oxydo-réduction cellulaires ont souvent été traités de manière superficielle.

Importance des réactions redox dans le métabolisme énergétique

Une deuxième partie devait être consacrée à la place de l'oxydo-réduction dans le métabolisme énergétique cellulaire en distinguant notamment le cas des organismes animaux et végétaux.

Cette partie devait permettre aux candidats d'éclairer le rôle majeur des processus d'oxydo-réduction à la fois dans le catabolisme et l'anabolisme.

Si les notions à mobiliser ici étaient celles des bases de la biochimie métaboliques (photosynthèse, glycolyse, respiration, voie des pentoses phosphates...), la difficulté résidait dans une mise en perspective conceptuelle du rôle joué par les transferts d'électrons. Il s'agissait de montrer comment des donneurs d'électrons cellulaires sont produits par le biais de conversions énergétiques à partir d'une source d'énergie externe, soit de l'énergie lumineuse pour les végétaux, soit de l'énergie redox stockée dans les molécules organiques pour les animaux. Il s'agissait ensuite de démontrer la diversité des processus d'utilisation de l'énergie redox : synthèse d'ATP, phosphorylation oxydative, et biosynthèses diverses (cycle de Calvin, biosynthèse des acides gras, néoglucogénèse...).

La plupart des candidats ont démontré des connaissances de base de la biochimie métabolique et ont su replacer les réactions redox dans les processus de glycolyse et respiration. Les correcteurs ont par contre regretté le traitement, soit inexistant soit superficiel de la photosynthèse dans de nombreuses copies. D'autre part, malgré les connaissances en biochimie métabolique démontrées par les candidats, seules quelques copies ont su utiliser ces connaissances dans une démonstration étayée avec une réelle vision intégrée du rôle central des réactions redox dans l'énergétique cellulaire.

Diversité des réactions redox et intégration du stress oxydant à la physiologie cellulaire

Une dernière partie du devoir devait permettre aux candidats de démontrer l'étendue de leurs connaissances sur l'oxydo-réduction cellulaire en sortant du champ des bases du métabolisme. Il s'agissait non seulement d'aborder la diversité des réactions d'oxydo-réduction et de leur importance dans les remodelages des biomolécules et leur diversification mais aussi d'aborder la thématique très actuelle du stress oxydant.

Ainsi, tout d'abord, les correcteurs attendaient que les candidats fassent des choix judicieux pour éclairer la diversité des fonctions des réactions redox en présentant des exemples précis (biosynthèse des hormones et autres molécules de signalisation, maintien du degré d'oxydation du fer de l'hémoglobine, formation des ponts disulfure et repliement des protéines, inactivation et dégradation des biomolécules et xénobiotiques par les cytochrome P₄₅₀ hépatiques...) soutenus par des schémas détaillés des mécanismes moléculaires mis en jeu.

Enfin, il était attendu un développement sur la notion de stress oxydant médié par les espèces réactives de l'oxygène (ROS et ROSN) en présentant les mécanismes de production de ces composés, les dommages cellulaires qu'ils produisent et les lignes de défenses antioxydantes développées par les cellules. Par ailleurs, ces espèces sont aussi synthétisées par des enzymes (NADPH oxydase et NO synthase) de manière contrôlée par les cellules, dans le cadre de la défense microbienne ou des processus de signalisation.

Cette partie de la composition a été inégalement traitée par les candidats. En effet, si le stress oxydant a été évoqué dans la plupart des copies, seules quelques-unes ont démontré des connaissances pointues des réactions redox dans leur diversité.

REMARQUES GÉNÉRALES

À la lecture de l'ensemble des copies, le jury a noté le niveau très faible en biochimie de nombreux candidats avec notamment de très nombreuses copies blanches ou limitées à une ou deux pages.

Pour d'autres candidats les connaissances présentées sont restées superficielles se limitant à des bases plus proches d'un niveau de licence que celui attendu pour l'agrégation de biochimie. Ainsi, seules quelques candidats ont démontré un réel esprit de synthèse et une culture en biochimie suffisante pour traiter pleinement le sujet. Comme les années précédentes, nous regrettons un grand déséquilibre dans la construction des devoirs avec une introduction et une conclusion très largement négligées, sans problématique et logique scientifique affichées et perspectives développées.

COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

La résistance et l'échappement.

À l'aide d'exemples judicieusement choisis dans les domaines de l'immunité et la thérapeutique antimicrobiennes, et de la physiologie des micro-organismes, vous illustrerez les mécanismes de résistance ou d'échappement développés par les bactéries et les virus.

RAPPORT DU JURY DE MICROBIOLOGIE

Cette année encore, le sujet proposé traitait d'un aspect particulier précis de la co-évolution hôte/pathogène, et demandait donc de bonnes connaissances générales en Microbiologie, en Immunologie et en Physiologie, ainsi qu'un bon esprit de synthèse. Il permettait à chaque candidat de puiser très largement dans ses connaissances pour construire un devoir cohérent et complet, et pour illustrer judicieusement cette problématique d'actualité.

NOTIONS ATTENDUES DANS LA COMPOSITION

La notion de coévolution hôte/pathogène, au centre de la problématique, trouvait toute sa place soit en introduction et pouvait servir de fil conducteur dans le devoir. L'introduction devait permettre aux candidats de délimiter le champ du sujet qui était relativement étendu, et de présenter la démarche et le plan adoptés pour la rédaction. Les définitions (virus, bactéries, les immunités,...) étaient les bienvenues, et plus particulièrement celle concernant la résistance, qui pouvait prendre plusieurs formes : échappement, défense active....

Plusieurs plans étaient possibles même si beaucoup de copies ont choisi l'un de ceux que suggérait l'énoncé du sujet.

La partie consacrée à la résistance des microorganismes aux mécanismes de défense de l'hôte devait inclure les défenses non spécifiques (les différentes barrières et protections), ainsi que la résistance aux réponses immunitaires de l'hôte, réponse innée et réponse adaptative. Il n'était pas nécessaire de développer de manière exhaustive l'ensemble des mécanismes de défense de l'hôte au risque d'être hors sujet. Néanmoins, une présentation synthétique s'imposait afin de décliner ensuite l'ensemble des mécanismes développés par les microorganismes pour y résister ou y échapper.

La résistance pouvait se décliner de plusieurs façons :

- résistance passive qu'illustrent par exemple la capsule bactérienne, la latence virale (Herpesviridae) et la multiplication intracellulaires des bactéries (*Listeria*, *Chlamydiae*, Rickettsiales) ;
- résistance active, pour laquelle les exemples sont nombreux : inhibiteurs de composants du complément, variabilité des antigènes de surface (VIH-1, virus *Influenza*, *Neisseria*), inversion de phase de la flagelline (*Salmonella*...), excrétion de leucotoxines, d'enzymes ou protéines (protéase anti-IgA, protéine A de *S. aureus*), lutte intracellulaire contre les mécanismes de phagocytose/bactéricidie (Mycobactéries,...) ou échappement à ces mécanismes (*Listeria*, *Shigella*,...), contrôle de l'expression des molécules du CMH (Poxvirus, Herpesvirus, VIH-1...), sécrétion de cytokines immuno-modulatrices par des cellules infectées par certains virus (Virus de la Rougeole...), camouflage pour certains virus avec expression en surface de molécules de l'hôte (Virus de l'Hépatite B, VIH-1, ...). Cette liste n'est pas exhaustive, même si certains exemples ou situations sont à la limite du sujet.

La partie consacrée au développement de résistance à la thérapeutique antimicrobienne devait traiter à la fois de la résistance aux antibiotiques développées par les bactéries, et de la résistance aux antiviraux développée par certains virus. Il fallait restreindre cette partie en définissant les résistances naturelles et acquises, les supports de résistance (chromosomique, éléments mobiles), les résistances multiples et la fréquence de ces différents types de résistance. Quelques grands mécanismes partagés par de nombreux genres bactériens pouvaient être présentés (par exemple : bêta-lactamases, pompes à efflux...), mais l'ensemble de ces mécanismes pouvant constituer un sujet en soi, ils ne devaient être développés de manière exhaustive sous peine de manquer de temps. Le choix judicieux de quelques exemples de la résistance aux antibiotiques des bactéries devait donc être fait pour étayer le propos. Les mécanismes de résistance des virus aux antiviraux pouvaient quant à eux être présentés plus en détail, le panel d'antiviraux disponibles n'étant pas très large. Les vaccins, qui permettent de limiter le développement de résistances par les microorganismes, pouvaient également être évoqués dans cette partie si le plan logique le permettait, mais ils ne devaient pas être traités en détail. Ils trouvaient plutôt leur place comme ouverture, en conclusion.

Une partie sur les mécanismes génétiques de développement et de transmission des résistances pouvait ensuite être envisagée.

Dans le domaine de la physiologie, une place devait être réservée aux biofilms (structure, formation et propriétés) qui constituent un mécanisme de résistance très partagé contre de nombreux antimicrobiens (antibiotiques mais également acteurs immunologiques...) et qui confèrent une résistance à la température et aux contraintes physico-chimiques. Ceci permet à nombre de microorganismes de « survivre » dans les milieux extérieurs et de se disséminer efficacement. Des exemples très divers permettaient également d'étayer cette partie, parmi lesquels les bactéries sporulantes (*Bacillus*, *Clostridium*...), les pseudospores de *Chlamydia* ou *Rickettsia*, la paroi bactérienne des mycobactéries, les virus nus et virus enveloppés... À noter que les mécanismes de résistance des bactéries aux infections par les bactériophages (systèmes de restriction modification/ Système CRISPR-Cas) pouvaient trouver également leur place dans le devoir.

Enfin, le sujet ne demandait pas de développer particulièrement les applications de la connaissance de ces mécanismes de résistance. Ceux-ci pouvaient néanmoins être évoqués comme ouverture en conclusion.

COMMENTAIRES SUR L'ÉPREUVE

Ce sujet nécessitait une culture générale étendue en Microbiologie et un bon esprit de synthèse, ce que ne possédait pas la plus grande partie des candidats. De ce fait, très peu de copies ont

obtenu la moyenne. L'un des défauts majeurs de nombreuses copies était caractérisé par le déséquilibre du plan. Certains candidats ont traité le sujet uniquement sous l'angle de l'immunologie, sans que n'apparaisse à aucun moment des exemples fondés sur les données de microbiologie. Il reste néanmoins qu'il s'agissait d'un sujet de microbiologie. Cette restriction du sujet, par manque de connaissance plus que par manque de temps, s'est aussi appliquée à la résistance aux substances antimicrobiennes. Dans une majorité de copies, la partie réservée aux antibiotiques, aux antiviraux et aux mécanismes permettant aux microorganismes d'y résister était très limitée ou inexistante. Souvent, il n'a été que brièvement évoqué en conclusion de l'exposé. À l'inverse, les vaccins ont été souvent développés en détail, alors qu'il n'était pas systématiquement logique de les inclure dans le devoir, sauf justification.

Le jury regrette que la plupart des devoirs n'ait traité que des microorganismes pathogènes (présentés comme les plus nombreux dans de nombreuses copies ...) et trop rarement des microorganismes de la flore commensale. Il est important de rappeler que le système immunitaire de l'hôte est extrêmement efficace la plupart du temps pour éviter toute infection et que la mise en place de la tolérance immunitaire au niveau des muqueuses permet un effet barrière, tout en évitant l'épuisement du système immunitaire de l'hôte. À noter que de très nombreuses copies présentent la mise en place de la réponse immune adaptative comme facultative, enclenchée uniquement lorsque la réponse immune innée n'est pas assez efficace pour éliminer l'agresseur. Ce point est d'autant plus important à rectifier qu'il est à la base des stratégies vaccinales efficaces contre nombre de pathogènes.

Par ailleurs, les bases du développement des résistances ou de la variation antigénique des microorganismes ont trop rarement été traitées ou de façon partielle. Nombre d'exemples pouvaient être cités tels que la rapidité de réplication associés à une faible fidélité de réplication (ex extrême des virus à ARN), la recombinaison intra-individu (*Yersinia* et pseudogènes) ou inter individus au sein des populations microbiennes (transfert dans les biofilms...) ou lors de co-infections (virus Influenza, VIH-1...). Néanmoins, le fait que les microorganismes, dont le matériel génétique est nettement moins stable que celui des hôtes avec lesquels ils co-évoluent, soient de véritables moteurs d'évolution pour leurs hôtes a été bien vu par quelques candidats.

De manière générale, il était demandé d'étayer le propos à l'aide d'exemples dans les domaines de la virologie et de la bactériologie. De nombreuses copies ont montré des carences dans les deux domaines ou dans l'un d'entre eux. Certaines copies se sont contentées d'exposer des généralités, restant dans le vague et le flou ou de faire des hors sujet (structure et pouvoir pathogène des bactéries et des virus...).

Comme chaque année, les correcteurs souhaitent appeler l'attention des candidats futurs sur un nombre croissant de copie sans plan ou avec un plan en filigrane, non formulé. Le plan est une façon d'ordonner sa pensée. Pour de futurs enseignants, métier auquel destine le concours d'agrégation, et quelque soit le mode de transmission du savoir, la structuration des idées et des connaissances nous semble être la première des qualités requise. Dans leur ensemble, les candidats font l'effort d'une présentation et d'une rédaction correctes, à l'exception de trop nombreuses copies, pour lesquelles l'orthographe voire la syntaxe laissent vraiment à désirer. Les fautes d'orthographe et les erreurs (*Streptococcus aureus*, *Mycoplasma tuberculosis*,...) ont été sanctionnées comme il se doit. Le jury regrette également le nombre de copies avec très peu d'illustrations, voire sans aucune. Les illustrations et les schémas explicatifs sont toujours appréciés du jury, et constituent un outil didactique très important.

COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Les mouvements liquidiens entre les compartiments.

À partir d'exemples, vous présenterez les rôles physiologiques des mouvements de liquides qui s'établissent entre différents compartiments de l'organisme mais aussi entre l'organisme et le milieu extérieur. Les mécanismes à l'origine de ces flux seront explicités, ainsi que les pathologies associées.

RAPPORT DU JURY DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Ce sujet sur les mouvements liquidiens nécessitait de bien analyser les termes pour le délimiter et justifier ses choix de développement. En effet, les mouvements liquidiens sont impliqués dans de très nombreux processus biologiques.

Le libellé du sujet posait clairement le cadre de l'étude, c'est-à-dire les rôles des mouvements de liquides entre différents compartiments de l'organisme. Par conséquent, la convection du sang au sein du système cardiovasculaire et les mouvements de fluide dépendant du péristaltisme du tube digestif étaient exclus. Malgré cette précision, de nombreux candidats ont traité de la pression artérielle, de sa régulation, du fonctionnement du cœur ou encore de la structure des différents vaisseaux sanguins.

Le jury rappelle que quelle que soit leur qualité, les concepts et notions hors-sujet ne sont pas valorisées dans la notation de la copie, il est donc primordial de bien cerner le sujet avant de rédiger. Trop peu de devoirs prennent bien le temps de définir les termes du sujet et ainsi justifier leur choix de développement dans l'introduction ainsi que l'articulation entre les différentes parties. Trop d'introductions se limitent à des généralités autour de la physiologie présentant l'homéostasie et Claude Bernard après avoir paraphrasé les termes du sujet.

Une manière élégante de traiter le sujet pouvait être de commencer par présenter les mécanismes à l'origine des mouvements liquidiens entre compartiments. Les mécanismes osmotiques, conséquence de flux ioniques passifs (gradients) ou actifs devaient être présentés. Le rôle central des aquaporines constitutives ou inductibles devait être explicité ; il est surprenant que certains

candidats considèrent encore que l'eau puisse passer librement les membranes sans l'aide de transporteurs.

Ces bases permettaient ensuite de comprendre les mécanismes des différents mouvements liquidiens qui pouvaient être rassemblés autour de deux grands axes, d'ailleurs suggérés par le libellé du sujet :

- les mouvements s'établissant entre les compartiments internes de l'organisme.
Il était incontournable dans ce sujet de présenter les mécanismes de l'ultrafiltration et de réabsorption au niveau des lits capillaires comme ceux de la filtration glomérulaire. Dans de nombreuses copies, ces mécanismes ont été simplement décrits alors qu'il est attendu, dans une épreuve d'agrégation, une démonstration argumentée des mouvements d'eau : notions de pression hydrostatique, pression oncotique, pression résultante, ...
La formation et la réabsorption du liquide céphalorachidien pouvaient aussi être abordées dans cette partie.
- les mouvements s'établissant avec l'environnement.
Les mécanismes classiques de réabsorption et de sécrétion s'établissant un niveau du tubule du néphron et conduisant à la production de l'urine définitive étaient attendus par le jury.
De même, les candidats devaient présenter les mécanismes de la sudation et leur contrôle. Il était possible également d'évoquer les flux hydriques impliqués dans les processus digestifs, dans la lactation ou encore en lien avec la reproduction.

Le sujet étant très large, il n'était pas attendu des candidats une présentation exhaustive de l'ensemble de ces mouvements liquidiens. Quelques exemples judicieusement choisis parmi ces mécanismes, appuyés par les mécanismes de régulations et les pathologies associées (diabète, cholera, mucoviscidose...) permettaient de bien traiter le sujet.

Il est également important de rappeler que le cœur de cette épreuve est la physiologie animale ; il est donc nécessaire de limiter les exemples provenant du monde végétal et des microorganismes qui ne doivent venir qu'en appui ou réflexion autour d'exemples tirés du monde animal.

La conclusion du devoir n'est pas non plus à négliger, au-delà d'une synthèse des concepts clefs développés dans le sujet, il est important d'offrir une perspective pertinente en ouverture.

Sur la forme, les schémas sont indispensables et doivent être mis au service de la démarche explicative et argumentative ; illustrer sa copie par des schémas hors sujet n'est pas valorisé dans la notation et conduit souvent à un effet de dilution des notions.

Plusieurs très bonnes copies, bien construites, argumentées et illustrées ont été appréciées par le jury. À l'inverse, de nombreuses copies témoignent de connaissances parcellaires en biologie cellulaire et physiologie ou d'une faible compréhension des mécanismes impliqués dans les processus assurant le fonctionnement de l'organisme.

ÉPREUVES D'ADMISSION

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

PROPANIL ET CYCLODEXTRINES :

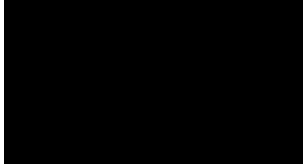
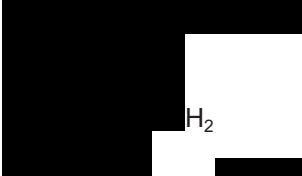
Toxicité et détoxification ?

INTRODUCTION

L'agriculture moderne intensive a recours à l'utilisation de pesticides en grande quantité. Environ trois milliards de kilogrammes de pesticides sont ainsi épandus dans le monde, dont 500 millions de kilogrammes aux États-Unis. Parmi les pesticides massivement employés dans ce pays, le propanil (3,4-dichloropropioanilide, **document 1**) est l'un des herbicides les plus largement utilisés, particulièrement comme adjuvant dans la culture du riz.

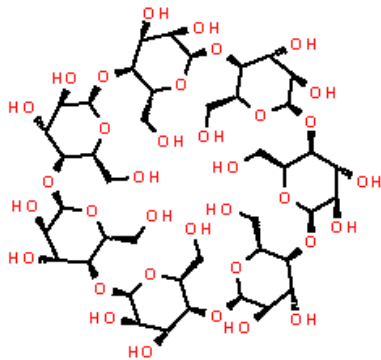
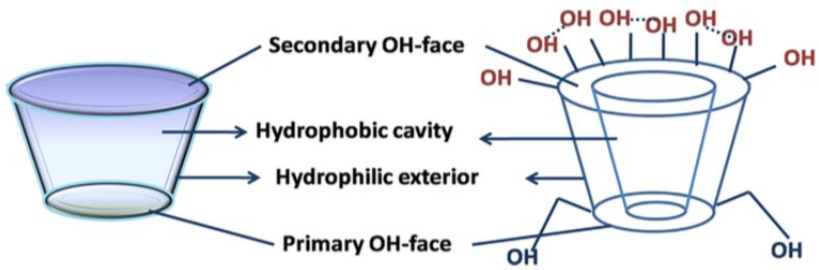
Son principal mode d'action herbicide est l'inhibition de la photosynthèse par action sur la chaîne de transporteurs des électrons, entraînant alors la nécrose des feuilles. Le riz est peu sensible au propanil, contrairement à la plupart des mauvaises herbes, ses cellules contenant un taux élevé d'arylacylamidase (AAA), qui métabolise rapidement le propanil en 3,4-dichloroaniline (**document 1**), non toxique pour le végétal.

L'utilisation du propanil dans le système agricole conduit à la pollution des eaux de surface et des eaux souterraines. L'exposition au propanil est associée à une toxicité aiguë chez un large éventail d'espèces aquatiques ; chez l'homme, la méthémoglobinémie est la manifestation principale due sa toxicité.

Document 1 : Structure du propanil et de la 3,4-dichloroaniline	
<p>A – Propanil 3,4-dichloropropioanilide</p> 	<p>B – 3,4-dichloroaniline</p> 

Une stratégie envisagée pour la dépollution des eaux consiste à utiliser les cyclodextrines pour neutraliser le propanil.

Depuis une trentaine d'années, les cyclodextrines ont été utilisées dans de nombreuses applications industrielles notamment dans les secteurs pharmaceutiques et agro-alimentaires. Ce sont des oligosaccharides produits par la dégradation de l'amidon, dont la structure présente une cavité hydrophobe capable d'encapsuler des molécules très variées, et une surface externe hydrophile (**document 2**). Les cyclodextrines sont non toxiques, biodégradables, facilement produites à l'échelle industrielle et peuvent être modifiées aisément pour permettre d'adapter leurs capacités à lier certaines molécules cibles.

Document 2 : Structure de la β -cyclodextrine	
<p>A – β-cyclodextrine</p>  <p>(source : ChemSpider)</p>	<p>B – Forme générale des cyclodextrines</p>  <p>(source : Chemical engineering Journal 355 (2019) 920-941)</p>

Parmi les méthodes possibles pour étudier les effets sur la santé associés à l'utilisation des pesticides, la culture de cellules ou de tissus s'est beaucoup développée. Ces techniques permettent d'identifier ou d'examiner les effets (métabolisme, transport, communication...) de substances potentiellement toxiques.

Nous proposons d'étudier la toxicité du propanil sur des cellules *in vitro* et d'observer si la β -cyclodextrine modifie cette toxicité.

Le modèle d'étude choisi est la culture de cellules Caco-2, cellules provenant d'adénocarcinome de côlon humain. Ces cellules expriment une différenciation entérocytaire spontanée, en fonction du temps de culture. Ce modèle a été choisi parce qu'il est prédictif de l'absorption intestinale chez l'homme.

Dans un premier temps les cellules seront incubées en présence ou en absence de propanil et/ou de β -cyclodextrine (**partie 1**). Puis les effets éventuels de ces traitements seront étudiés selon trois méthodes (**parties 2 à 4**).

AVERTISSEMENT

Certains des produits utilisés présentent des risques chimiques ou biologiques. L'**ANNEXE 1** du dossier technique présente les données de sécurité correspondantes. Veiller à manipuler ces produits en adoptant les mesures de précaution adaptées.

CONSIGNES GÉNÉRALES

Tous les résultats bruts seront joints à la copie.

Pour tout travail en plaque ou microplaque un plan de plaque doit être présenté dans le compte-rendu.

Les fichiers informatiques réalisés pour traiter les données seront enregistrés dans le dossier candidat.

Par ailleurs, pour chaque série de calculs, il faudra systématiquement présenter les équations aux grandeurs et aux unités ainsi qu'un exemple d'équation aux valeurs numériques.

PARTIE 1 :

TRAITEMENT DES CELLULES CACO-2

Des cellules Caco-2 ont été mises en culture en milieu DMEM complet, dans huit puits d'une plaque 12 puits, pendant 15 jours. Elles ont rapidement adhéré au support puis se sont différenciées en mimant l'épithélium intestinale.

Quatre traitements différents sont à réaliser en double essai (**fiche technique 1**). Pour cela, le milieu de culture est à remplacer par 1 mL de milieu de culture DMEM sans rouge de phénol complété par :

- traitement 1 : un volume adéquat de DMSO,
- traitement 2 : un volume adéquat de DMSO + 5 mmol·L⁻¹ de β-cyclodextrine,
- traitement 3 : 1 mmol·L⁻¹ de propanil,
- traitement 4 : 1 mmol·L⁻¹ de propanil + 5 mmol·L⁻¹ de β-cyclodextrine.

L'**ANNEXE 2** présente la composition du milieu DMEM complet ainsi que des caractéristiques physico-chimiques concernant le propanil et la β-cyclodextrine.

- Q1. À partir de l'ANNEXE 2, indiquer le rôle des différents composants du milieu de culture complet.**
- Q2. Justifier l'intérêt de chacun des quatre traitements. Proposer d'éventuel(s) contrôle(s) supplémentaire(s).**
- Q3. Présenter le mode opératoire permettant de préparer les quatre milieux d'incubation (répondre à la question Q3 sur la feuille indépendante fournie).**

Après avoir rendu la réponse à la question Q3 à l'examineur, traiter les cellules dans les quatre conditions proposées ci-dessus, en double essai et selon la **fiche technique 1**.

Après 1 h d'incubation, observer les cellules au microscope inversé à contraste de phase.

- Q4. Après avoir rappelé l'intérêt de ce type de microscope en culture cellulaire, indiquer si des différences notables d'aspect des cellules en fonction des traitements sont observées.**

Afin d'étudier les effets éventuels du propanil et de la β-cyclodextrine, trois méthodes différentes sont mises en œuvre :

1. Mesure du relargage de la Lactate Déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture (**partie 2**).
2. Mesure de l'activité spécifique de la Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) dans l'homogénat cellulaire correspondant (**partie 3**).
3. Test MTT, reflet de l'activité métabolique des cellules (**partie 4**).

En se référant à la **fiche technique 2**, prélever les surnageants et préparer les homogénats cellulaires sur la première série de puits, en vue de réaliser les dosages de LDH et DPP IV.

Le test de MTT est à réaliser sur la deuxième série de puits.

PARTIE 2 : MESURE DE L'ACTIVITÉ LDH

La LDH est une oxydoréductase cytoplasmique catalysant l'interconversion du lactate et du pyruvate. Les cellules endommagées libèrent dans le milieu de culture la lactate déshydrogénase. La mesure de l'activité LDH d'un surnageant permet donc d'évaluer la cytolysse et est fréquemment utilisée dans les études de cytotoxicité cellulaire.

À l'aide de la **fiche technique 3**, réaliser la mesure de l'activité de la LDH dans les surnageants de culture.

Effectuer le premier passage au spectrophotomètre devant un examinateur.

- Q5. Établir l'équation chimique de la réaction mise en œuvre lors de ce dosage de l'activité LDH (les formules développées des co-enzymes ne sont pas exigées).**
- Q6. Indiquer le nom de la méthode de mesure utilisée et justifier le sens de variation de l'absorbance.**
- Q7. Présenter les résultats obtenus pour les surnageants de culture de cellules Caco-2 dans les quatre conditions testées.**
- Q8. Analyser et conclure.**

PARTIE 3 : MESURE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE LA DPP IV

Les cellules de la muqueuse intestinale expriment naturellement une enzyme membranaire, la DPP IV (dipeptidyl peptidase type IV). Cette enzyme est responsable de la digestion terminale des peptides. Elle est présente au niveau de la membrane de la bordure en brosse des entérocytes, ainsi que dans la membrane des cellules Caco-2 différenciées.

Le Gly-Pro para-nitroanilide est un substrat synthétique utilisé pour la mesure d'activité de certaines enzymes protéolytiques, comme la DPP IV : la para-nitroaniline formée lors de son hydrolyse est un chromophore.

3.1) Mesure de l'activité de la DPPIV

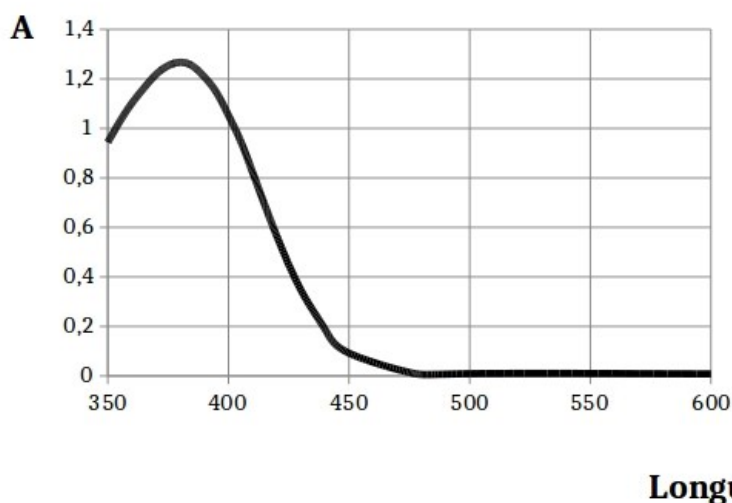
La **fiche technique 4** présente le mode opératoire du dosage de la DPP IV.

Le spectre d'absorption de la para-nitroaniline est présenté dans le **document 3**.

Document 3 : Spectre de la para-nitroaniline

Réalisé avec une solution de para-nitroaniline à $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en tampon Tris-HCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0, à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pour un trajet optique de 1 cm.

Spectre d'absorption de la p-nitroaniline à $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$



Valeurs mesurées :

Longueur d'onde (nm)	360	365	370	375	380	385	390	395	400	405
A lue	1,102	1,163	1,218	1,253	1,267	1,253	1,208	1,146	1,053	0,950

Longueur d'onde (nm)	410	415	420	430	440	450	475	500
A lue	0,823	0,692	0,566	0,348	0,189	0,092	0,014	0,009

- Q9. Déterminer le coefficient d'extinction molaire, à la longueur d'onde de travail, de la para-nitroaniline.**
- Q10. Déterminer le trajet optique dans les conditions de la fiche technique 4.**

Réaliser la mesure d'activité de la DPP IV sur les homogénats de cellules Caco-2, dans les quatre conditions testées.

Effectuer le premier passage au lecteur de microplaque devant un examinateur.

- Q11. Tracer les cinétiques des quatre extraits sur un même graphe.**
- Q12. Calculer la vitesse initiale de formation de la para-nitroaniline en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$.**
- Q13. Calculer la concentration d'activité catalytique des homogénats cellulaires, en $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$.**

3.2) Dosage des protéines par la méthode au BCA

Effectuer le dosage des protéines dans les homogénats cellulaires selon la **fiche technique 5**.

Q14. Schématiser la préparation du réactif de coloration.

Q15. Présenter le tableau de préparation de la gamme et des essais.

Q16. Calculer la concentration en protéines des échantillons.

3.3) Bilan

Q17. Déterminer l'activité spécifique de la DPPIV dans les homogénats, en $U \cdot mg^{-1}$.

Q18. Interpréter les résultats obtenus en précisant l'intérêt de comparer les activités spécifiques.

PARTIE 3 : MESURE DE L'ACTIVITÉ MITOCHONDRIALE

Le test au MTT est une méthode colorimétrique utilisée classiquement pour évaluer la viabilité cellulaire. Le principe repose sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium (MTT) qui est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale. Le formazan est ensuite solubilisé dans une solution d'isopropanol pour permettre son dosage spectrophotométrique. La quantité de formazan produit est donc proportionnelle à l'activité métabolique mitochondriale des cellules. Selon les cas, ce test est utilisé pour dénombrer les cellules vivantes, pour étudier la croissance cellulaire ou pour des études de cytotoxicité.

Le MTT est une substance classée CMR. Des extraits de la fiche de sécurité du MTT du fournisseur sont présentés dans le **document 4**. Par ailleurs le **document 5** présente les tableaux permettant de caractériser la dangerosité d'un mélange contenant des agents mutagènes sur les cellules germinales, comme c'est le cas du MTT. L'utilisation de ces tableaux permet donc d'évaluer la dangerosité d'un mélange et de déterminer l'étiquetage à y apposer.

Q19. Indiquer la signification du sigle CMR.

Q20. Justifier l'absence de pictogramme et de la mention H341 concernant le réactif « MTT » dans l'ANNEXE 1.

Document 4 : Extrait de la fiche de sécurité du MTT

1.1 Identificateurs de produit

Nom du produit : Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

Code Produit Marque : M2128

No.-CAS : 298-93-1

2.2 Éléments d'étiquetage

Étiquetage en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008

Pictogramme 

Mention d'avertissement : Attention

Mention de danger

H315 Provoque une irritation cutanée.

H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

H335 Peut irriter les voies respiratoires.

H341 Susceptible d'induire des anomalies génétiques (agent mutagène, catégorie 2)

Propriétés physico-chimiques

Forme : solide

Aspect : jaune

Masse molaire : 414,32 g.mol⁻¹

Source : FDS Sigma-Aldrich

Document 5 : Tableaux extraits du règlement européen n°1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges.

5. Agents mutagènes sur des cellules germinales (produits dits CMR)

Tableau 3.5.2



Limites de concentration génériques des composants d'un mélange, classés comme agents mutagènes des cellules germinales, qui déterminent la classification du mélange

Composant classé comme	Limites de concentration génériques qui déterminent la classification du mélange		
	Mutagène de la catégorie 1A	Mutagène de la catégorie 1B	Agent mutagène de la catégorie 2
Agent mutagène de la catégorie 1A	≥ 0,1 %	—	—
Agent mutagène de la catégorie 1B	—	≥ 0,1 %	—
Agent mutagène de la catégorie 2	—	—	≥ 1,0 %

Note : Pour cette classe, la dangerosité d'un produit est délimitée par sa concentration (*w* en pourcentage de masse donc souvent équivalent à g/100 mL).

Tableau 3.5.3

Éléments d'étiquetage pour les agents mutagènes sur les cellules germinales

Classification	Catégorie 1A ou catégorie 1B	catégorie 2
Pictogrammes SGH		
Mention d'avertissement	Danger	Attention
Mention de danger	H340: Peut induire des anomalies génétiques (indiquer la voie d'exposition s'il est formellement prouvé qu'aucune autre voie d'exposition ne conduit au même danger)	H341: Susceptible d'induire des anomalies génétiques (indiquer la voie d'exposition s'il est formellement prouvé qu'aucune autre voie d'exposition ne conduit au même danger)
Conseil de prudence Prévention	P201 P202 P281	P201 P202 P281
Conseil de prudence Intervention	P308 = P313	P308 = P313
Conseil de prudence Stockage	P405	P405
Conseil de prudence Élimination	P501	P501

Source : Journal officiel de l'Union européenne

Réaliser le test MTT, selon la **fiche technique 6**.

Q21. Présenter les résultats du test MTT sur les cellules Caco-2 dans les quatre conditions testées.

Ce test de cytotoxicité peut s'interpréter dans l'hypothèse où la quantité de cellules dans chaque puits est équivalente.

Q22. Comparer les résultats obtenus dans les différentes conditions de culture. Commenter et conclure.

SYNTHÈSE FINALE

Q23. Présenter les résultats obtenus sous forme d'un schéma de synthèse reprenant les différentes cibles physiologiques étudiées via les trois tests effectués.

Une étude complémentaire aurait pu être menée pour caractériser l'interaction entre le propanil et la β -cyclodextrine.

Q24. À partir des structures du propanil et de la β -cyclodextrine, proposer le comportement prévisible de ces deux molécules lorsqu'elles sont mises en solution.

Q25. Proposer une méthode d'étude de cette interaction en précisant les conditions opératoires des différents tests effectués.

L'étude de l'effet cytotoxique fait partie des concepts et savoir-faire à enseigner aux étudiants de plusieurs BTS et IUT. Le **document 6** présente un extrait du référentiel du BTS BioAnalyses et Contrôles.

Document 6 : extrait du référentiel BTS BioAnalyses et Contrôles

Activités technologiques en biologie cellulaire et moléculaire

Module 1 : Techniques de culture des cellules eucaryotes

4. Mise en évidence et quantification d'un effet cytotoxique sur des cellules en culture
- 4.1. Effet cytotoxique d'une molécule ou d'une substance par une méthode spectrophotométrique
- 4.2. Effet cytopathogène d'une souche virale ou vaccinale

Q26. Dans le cadre d'une application pédagogique en BTS BioAnalyses et Contrôles, présenter les avantages et inconvénients des trois techniques d'étude de la toxicité réalisées.

Références :

- R. J. Flaherty *et al.* 2013. Cyclodextrins as complexation and extraction agents for pesticides from contaminated soil. *Chemosphere* 91, pp. 912–920
- N. Morin-Crini *et al.* 2018. Water-insoluble-cyclodextrin–epichlorohydrin polymers for removal of pollutants from aqueous solutions by sorption processes using batch studies: a review of inclusion mechanisms. *Progress in Polymer Science* 78, pp. 1-23
- T. Sikder *et al.* 2019. Remediation of water pollution with native cyclodextrins and modified cyclodextrins: a comparative overview and perspectives. *Chemical Engineering Journal* 355, pp. 920-941

DOSSIER TECHNIQUE

Le dossier technique est distribué à côté du sujet.

ANNEXE 1

DONNÉES DE SÉCURITÉ SUR LES RÉACTIFS

Sulfate de cuivre (II) pentahydraté à 4 %



Attention

H315 Provoque une irritation cutanée.

H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

H410 Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Une fois dilué au 1/20 cette substance ne présente plus de danger.

Aiguille de seringue

A éliminer dans un collecteur à aiguille, sans recapuchonner.

Cellules Caco-2

Lignée de classe 1, selon l'ATCC (*US Public Health Service Guidelines*).

Néanmoins, la manipulation des cellules humaines vivantes se fera sous hotte à flux laminaire, avec port de gants.

Isopropanol acide



Danger

H225 Liquides et vapeurs très inflammables.

H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

H336 Peut provoquer somnolence ou vertiges.

ANNEXE 2**COMPOSITION ET CARACTÉRISTIQUES DU MILIEU DE CULTURE ET DES RÉACTIFS UTILISÉS POUR LE TRAITEMENT DES CELLULES****Composition du milieu DMEM complet**

Composant	Concentration	Composant	Concentration
CaCl ₂ (anhydre)	200 mg/L	L-Thréonine	95,0 mg/L
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,100 mg/L	L-Tryptophane	16,0 mg/L
MgSO ₄ (anhydre)	97,7 mg/L	L-Tyrosine·2Na·2H ₂ O	103,79 mg/L
KCl	400 mg/L	L-Valine	94,0 mg/L
NaHCO ₃	1,5 g/L	Choline Chloride	4,00 mg/L
NaCl	6,4 g/L	Acide folique	7,20 mg/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125 mg/L	Myo-inositol	7,20 mg/L
L-Arginine·HCl	84 mg/L	Nicotinamide	4,00 mg/L
L-Cystéine·2HCl	62,6 mg/L	Acide D-pantothénique	4,00 mg/L
L-Glutamine	584 mg/L	Pyridoxine.HCl	4,00 mg/L
Glycine	30,0 mg/L	Riboflavine	0,40 mg/L
L-Histidine·HCl·H ₂ O	42,0 mg/L	Thiamine.HCl	4,00 mg/L
L-Isoleucine	105 mg/L	D-Glucose	4,5 g/L
L-Leucine	105 mg/L	Rouge de phénol*	15,0 mg/L
L-Lysine·HCl	146 mg/L	Pyruvate de sodium	110 mg/L
L-Méthionine	30,0 mg/L	SVF	12 %
L-Phénylalanine	66,0 mg/L	Pénicilline à 10000 UI/mL	1 %
L-Sérine	42,0 mg/L	Streptomycine à 10000 µg/mL	1 %

* Pour certaines étapes le milieu utilisé peut être du DMEM sans rouge de phénol.

Caractéristiques du propanil

Formule : C₉H₉Cl₂NO

Masse molaire : 218,08 g·mol⁻¹

Solution stock : solubilisé en DMSO à 400 mmol·L⁻¹

Conserver à température ambiante

Caractéristiques de la β-cyclodextrine

Formule : C₄₂H₇₀O₃₅

Masse molaire : 1135 g·mol⁻¹

En poudre

Solubilité dans l'eau à 16,5 mmol·L⁻¹

Conserver à température ambiante

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
PBS	NaCl 137 mmol·L ⁻¹ ; KCl 2,7 mmol·L ⁻¹ ; Na ₂ HPO ₄ 10 mmol·L ⁻¹ ; KH ₂ PO ₄ 1,8 mmol·L ⁻¹ ; pH 7,4	30 mL
DMEM + DMSO	Milieu de culture complet sans rouge de phénol + DMSO	2,5 mL*
DMEM + DMSO + CD	Milieu de culture complet sans rouge de phénol + DMSO + β-cyclodextrine 5 mmol·L ⁻¹	2,5 mL*
DMEM + Pro	Milieu de culture complet sans rouge de phénol + propanil 1 mmol·L ⁻¹	2,5 mL*
DMEM + Pro + CD	Milieu de culture complet sans rouge de phénol + propanil 1 mmol·L ⁻¹ + β-cyclodextrine 5 mmol·L ⁻¹	2,5 mL*

- Plaque 12 puitsensemencée avec les cellules Caco-2 le 29/05/2019 et incubées à 37 °C sous CO₂, fournie après réponse à **Q3**
- Pipettes graduées stériles de 5 mL

Sous hotte à flux laminaire :

- P1000, P200 et cônes stériles
- Pipeteur
- Pipettes Pasteur stériles
- Poubelle DASRI pour déchets liquides et solides

* Conservés à 37 °C et fournis en même temps que la plaqueensemencée.

MODE OPÉRATOIRE

1. Éliminer le surnageant de culture.
2. Rincer les cellules avec 1 mL de PBS.
3. Ajouter 1 mL de milieu d'incubation sur les cellules.
4. Incuber 1 h à 37 °C sous 5 % de CO₂.

Remettre la plaque prête à incuber à l'examinateur.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
PBS	NaCl 137 mmol·L ⁻¹ ; KCl 2,7 mmol·L ⁻¹ ; Na ₂ HPO ₄ 10 mmol·L ⁻¹ ; KH ₂ PO ₄ 1,8 mmol·L ⁻¹ ; pH 7,4	30 mL

- Plaque 12 puitsensemencée avec les cellules Caco-2 et incubée 1h avec ou sans propanil et β-cyclodextrine
- Pipettes graduées stériles de 5 mL
- 4 seringues 1 mL
- 4 aiguilles 25G orange (0,5 x 16 mm)
- microtubes
- glace

Sous hotte à flux laminaire :

- P1000, P200 et cônes stériles
- Pipeteur
- Pipettes Pasteur stériles
- Poubelle DASRI pour déchets liquides et solides
- Collecteur d'aiguilles

MODE OPÉRATOIRE

1. Récupérer les surnageants en microtubes.
2. Conserver les surnageants cellulaires dans la glace.
3. Rincer les cellules avec 1 mL de PBS
4. Ajouter 500 µL de PBS sur les cellules
5. Aspirer refouler au moins 10 fois (et jusqu'à décollement des cellules) avec la seringue pour décoller, éclater et homogénéiser les cellules.
6. Transférer l'homogénat cellulaire obtenu en microtube.
Éliminer immédiatement l'aiguille dans la poubelle prévue à cet effet.
7. Conserver les homogénats cellulaires dans la glace.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Tp phosphate pH 7,3	Tampon phosphate de sodium à $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,3	7 mL
NADH	NADH à $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 mL
Pyruvate	Pyruvate de sodium à $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 mL
Echantillon	Surnageants de culture cellulaire	

- Semi-microcuvettes adaptées, parafilm
- Spectrophotomètre avec notice au poste cinétique

MODE OPÉRATOIRE

1. Introduire dans une microcuvette :
 - 700 μL de tampon phosphate pH 7,3
 - 100 μL de pyruvate
 - 100 μL de NADH.
2. Initier la réaction en ajoutant 100 μL de surnageant de culture.
3. Homogénéiser.
4. Réaliser le suivi cinétique à 340 nm à 37 °C durant 2 minutes après avoir réglé le zéro sur l'air.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
GP-pNA	Solution de Gly-Pro-p-nitroanilide à $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en mélange éthanol /tampon tris-HCL $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8 (50/50)	25 μL
Tampon Tris-HCl pH 8,0	Tampon tris-HCL $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8	2 mL
Échantillons	Homogénats cellulaires	

- Microplaque de 96 puits à fond plat
- Lecteur de microplaque relié à une imprimante
- Chronomètre

MODE OPÉRATOIRE

1. Introduire dans un puits de microplaque :
 - 4 μL de substrat GP-pNA
 - 200 μL de tampon Tris-Hcl pH 8,0
2. Initier la réaction en ajoutant 10 μL d'échantillon à tester.
3. Réaliser le suivi cinétique à 405 nm à température ambiante pendant au moins 30 minutes.

DONNÉES

Lecteur de microplaque

- déjà réglé sur 405 nm,
- l'absorbance est lue pour tous les puits de la plaque,
- le zéro de l'appareil est fait sur l'air au niveau de la cupule H12,
- trajet optique = à *déterminer*.

Microplaque 96 puits : rayon interne d'un puits = 3,2 mm

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
SAB	Solution étalon de sérualbumine à $1,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en PBS	500 μL
Réactif A	Acide Bicinchoninic	2,5 mL
Réactif B	Sulfate de cuivre (II) pentahydraté à 4 %	200 μL
PBS	NaCl $137 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; KCl $2,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Na ₂ HPO ₄ $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; KH ₂ PO ₄ $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 7,4	30 mL
Échantillons	Homogénats cellulaires	

- Microplaque de 96 puits à fond plat
- Lecteur de microplaque relié à une imprimante

MODE OPÉRATOIRE**Préparation extemporanée du réactif :**

1. Diluer au 1/20 le réactif B en réactif A.
2. Homogénéiser vigoureusement.

Étalonnage :

3. Introduire entre 0 et 20 μg de sérum albumine pour un volume final de 20 μL .
4. Ajouter 200 μL du mélange de réactifs.
5. Couvrir et incuber 30 min à température ambiante.
6. Lire les absorbances à 570 nm.

Dosage des protéines dans les extraits obtenus :

7. Réaliser le dosage des protéines sur 10 μL de lysat cellulaire.

DONNÉES

Linéarité de la méthode : entre 200 et 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de protéines

Lecteur de microplaque

- déjà réglé sur 570 nm,
- l'absorbance est lue pour tous les puits de la plaque,
- le zéro de l'appareil est fait sur l'air au niveau de la cupule H12,
- trajet optique = 0,683 cm

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
PBS	NaCl 137 mmol·L ⁻¹ ; KCl 2,7 mmol·L ⁻¹ ; Na ₂ HPO ₄ 10 mmol·L ⁻¹ ; KH ₂ PO ₄ 1,8 mmol·L ⁻¹ ; pH 7,4	30 mL
MTT	MTT à 0,5 mg·mL ⁻¹ en DMEM sans rouge de phénol	3 mL
Solution de solubilisation	Isopropanol acide (80 % isopropanol ; 10 % HCl 1 M ; 10% DMSO)	6 mL
Échantillon	Culture de cellules Caco-2	2 ^e série de puits

- Semi-microcuvettes visibles, notées « Semi V »
- Pipettes graduées stériles de 5 mL
- Spectrophotomètre

Sous hotte à flux laminaire :

- P1000, P200 et cônes stériles
- Pipeteur
- Pipettes Pasteur stériles
- Poubelle DASRI pour déchets liquides et solides

MODE OPÉRATOIRE

1. Éliminer le milieu de culture.
2. Rincer les cellules avec 1 mL de PBS.
3. Déposer 500 µL de milieu additionné de MTT.
4. Incuber 1 h à 37 °C en incubateur à CO₂. (**Remettre la plaque à l'examineur**)
5. Éliminer le surnageant.
6. Ajouter 1 mL de solution de solubilisation dans tous les puits.
7. Homogénéiser jusqu'à dissolution complète des cristaux de formazan.
8. Mesurer l'absorbance à 570 nm et à 630nm contre la solution de solubilisation.

DONNÉES

Les résultats sont exprimés sous forme de différence entre l'absorbance à 570 nm et celle à 630 nm :

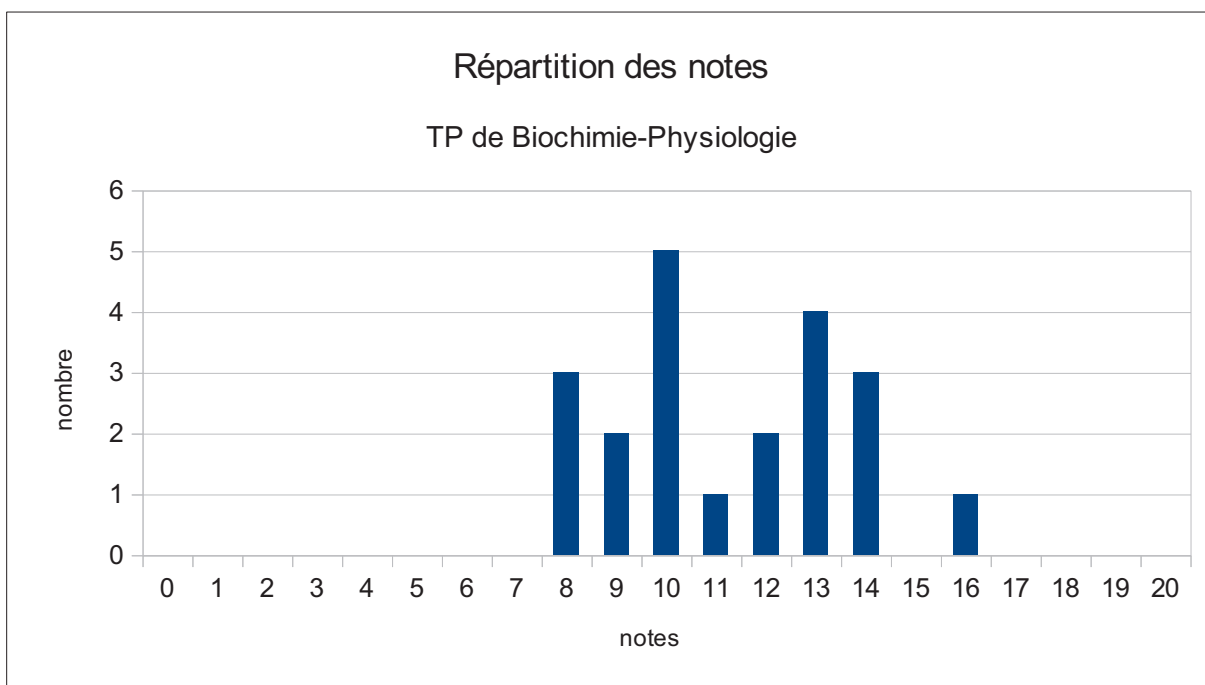
$$A_{MTT} = A_{570nm} - A_{630nm}$$

RAPPORT DU JURY DE TP DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Propanil et cyclodextrines

Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **11,71 / 20**
- Meilleure note : **16,00 / 20**
- Note la plus basse : **08,10 / 20**
- 16 notes sur 21 (**76 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20
- Moyenne des candidats admis : **13,10 / 20**



Histogramme de répartition

COMMENTAIRES GÉNÉRAUX SUR L'ÉPREUVE

Le sujet portait sur l'étude de la cytotoxicité d'un herbicide couramment utilisé dans la culture du riz, notamment aux États-Unis, le propanil. Cet herbicide toxique pour les organismes aquatiques et pour l'homme contamine les eaux de ruissellement et finalement l'eau de consommation. Le sujet visait à évaluer l'efficacité de l'addition de β -cyclodextrine pour neutraliser la cytotoxicité du propanil. Le modèle d'étude choisit consistait en la culture de cellules Caco-2 différenciées mimant l'endothélium du système digestif humain. Ce modèle est considéré comme présomptif de l'absorption intestinale et trois techniques d'étude étaient proposées pour évaluer la toxicité du propanil ainsi que l'effet de la cyclodextrine.

L'organisation temporelle est une qualité essentielle à transmettre à nos élèves et il fallait que les candidats en fassent preuve pour pouvoir traiter le sujet en intégralité. Il était judicieux par exemple d'initier la rédaction par les questions 2 et 3 nécessaires à la bonne compréhension et au

démarrage des manipulations. En effet le système cellulaire d'étude de la cytotoxicité du propanil et de la cyclodextrine nécessitait une incubation préalable d'une heure. Cette heure devait être mise à profit pour s'approprier les fiches techniques et préparer le matériel nécessaire aux manipulations à venir. La préparation d'un plan de manipulation, d'un organigramme ou de tout autre système de planification de l'ensemble des manipulations était nécessaire pour éviter des erreurs majeures. En effet, plusieurs candidats, ayant jeté les surnageants, se sont retrouvés dans l'impossibilité de réaliser le dosage de l'activité LDH, d'autres ont lysé toutes les cellules à leur disposition et n'ont pas pu ensuite réaliser le test MTT.

Il fallait par ailleurs prendre connaissance du matériel à disposition pour effectuer les bons choix techniques par la suite (ex : semi-microcuvettes UV pour réaliser le suivi à 340 nm de l'activité LDH, MTT à faire en semi-microcuvettes visibles de 1 mL car il n'y avait pas de lecteur de microplaque programmé à 630 nm, gestion d'une même microplaque pour deux manipulations, 4 seringues + 4 aiguilles à utiliser pour obtenir les homogénats cellulaires, ...).

Ainsi, le jury a évalué, entre autres, la réaction des candidats face à un matériel, une technique, un aléa, ... L'adaptabilité des candidats a été observée. Même s'ils ne terminent pas toutes les manipulations, ils peuvent (doivent) faire des choix pour réaliser un maximum de manipulations (quitte à réduire certaines durées ou le nombre des tests), tout en exploitant complètement et avec rigueur les résultats obtenus. Le jury a par ailleurs apprécié que certains candidats, qui n'ont pas pu faire une manipulation par manque de temps ou suite à une erreur, aient malgré tout tenté une réflexion sur un résultat attendu. Ces candidats ont été valorisés.

Comme toujours, la présentation des résultats de mesure et des calculs nécessitait de ne jamais omettre les unités. Trop de candidats ne présentent pas les équations aux unités permettant de valider et exploiter les équations aux grandeurs proposées. Ceci dénote un manque de rigueur auquel il convient de remédier pour bien préparer le concours, cette qualité étant indispensable pour le métier d'enseignant en biotechnologies.

Le jury invite aussi les candidats à ne pas négliger les formes de communications que sont les tableaux et schémas qui peuvent faire gagner du temps par rapport à une longue explication rédigée et sont aussi l'occasion pour les candidats de faire preuve d'un esprit de synthèse.

Remarque concernant la gestion des risques au laboratoire et les mesures de prévention mises en œuvre :

Comme pour tout travail en laboratoire le port d'une blouse fermée est nécessaire. Attention à ne pas oublier que, pour que celle-ci remplisse son rôle de protection, il faut porter des vêtements adaptés (pas de manches ou capuche qui dépassent par exemple). Trop de candidats portaient bagues, bracelets et montres qui ne sont pas nécessaires et sont contraires aux bonnes pratiques de laboratoire.

Les gants n'étaient requis que pour la manipulation des cellules vivantes. Comme l'indiquait la question 20, le réactif MTT dilué à 0,05 % ne nécessitait pas de précaution particulière. Le port de gants doit toujours être réfléchi car il peut être source de contamination quand ils sont utilisés à mauvais escient. Nous avons pu observer parfois leur non élimination en poubelle DASRI, leur réutilisation après stockage au poste de travail, la manipulation des outils de mesure communs avec les gants (spectrophotomètres, pipettes, ...).

PARTIE 1 : TRAITEMENT DES CELLULES CACO-2

Les cellules Caco-2 en culture n'étaient fournies aux candidats qu'après avoir réalisé les calculs des volumes (propanil et donc DMSO), et masse (β -cyclodextrine) à ajouter au milieu DMEM. Le jury déplore que ces calculs correspondant simplement à la conservation de matière et constituant la base des calculs préparatoires à toute activité technologique ne soient pas maîtrisés par un grand nombre de candidats. Par ailleurs, les résultats de ces calculs devaient être judicieusement

arrondis au regard du matériel utilisé et de son incertitude associée. Notons que le prélèvement effectif d'un volume de 2493,75 μL n'est pas possible avec le matériel fourni ! Le jury a apprécié les commentaires des candidats montrant une prise de recul sur la masse à peser et la proposition de moyens judicieux pour en tenir compte (réalisation d'une solution mère plus concentrée de β -cyclodextrine en DMEM à diluer ensuite).

Les quatre conditions de traitement pouvaient être complétées par un témoin composé de cellules Caco-2 non traitées mais cultivées simplement en milieu DMEM sans indicateur de pH afin de vérifier l'innocuité du DMSO, solvant du propanil.

Pour un certain nombre de candidat, le jury a observé une manipulation souvent peu soignée des cellules, conduisant à des décollements partiels qui ont compromis la qualité des résultats et la possibilité de comparer ensuite les différents puits. Il était important ici de ne pas toucher les cellules lors des rinçages et récupérations de surnageants, et de délivrer les solutions avec délicatesse, contre la paroi des puits.

La maîtrise de la gestuelle spécifique sous hotte à flux laminaire n'était pas nécessaire et le jury a apprécié l'attitude réfléchie et les réactions de bon sens de nombreux candidats. En revanche certains ont mal organisé l'espace de travail restreint et n'ont pas utilisé le matériel adéquat, qu'il convenait d'apporter en une fois sous la hotte.

PARTIE 2 : MESURE DE L'ACTIVITÉ LDH

Cette partie proposait la mise en œuvre d'une technique indirecte d'étude de la cytotoxicité par dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase relarguée dans le surnageant de culture. Une activité accrue de la LDH dans le milieu de culture témoigne de la désorganisation de la membrane cellulaire induite par les traitements effectués.

Les examinateurs ont regretté de constater que des éléments de base dans la réalisation d'une cinétique enzymatique ont parfois été oubliés par les candidats : une majorité de candidats n'a pas pensé à pré-incuber les cuves dans le spectrophotomètre (ou l'étuve à disposition dans le laboratoire) pour équilibrer les températures, ou n'a pas su gérer correctement l'homogénéisation des échantillons avant le démarrage de la lecture. De ce fait, la qualité des cinétiques, suivies ici sur un laps de temps court, s'en est ressentie grandement. Par ailleurs, le mode d'emploi de l'appareil laissait la possibilité aux candidats qui auraient fait cette erreur de retravailler les résultats obtenus en choisissant d'éliminer certains points de la cinétique pour obtenir non pas une pente moyenne mais déterminée sur la partie la plus linéaire. Peu de candidats ont profité de cette possibilité et ont de fait eu du mal à interpréter leurs résultats. Il convient avant de démarrer une manipulation de prendre le temps nécessaire pour se familiariser avec les appareillages et notices à disposition.

Les résultats obtenus par les candidats étaient très variables, en lien avec des cellules maltraitées (dans les deux sens du terme). Leur interprétation restait cependant possible et nécessaire. Il ne fallait, par exemple, pas occulter une augmentation d'un facteur deux de la pente de la cinétique obtenue en présence de propanil au motif que la valeur numérique semblait faible.

Les résultats attendus correspondaient à une valeur d'activité faible (de l'ordre de $0,010 \text{ min}^{-1}$) pour les deux témoins (traitement DMSO avec ou sans β -cyclodextrine), d'une activité augmentée dans les surnageants de culture en présence de propanil (de l'ordre de $0,020 \text{ min}^{-1}$) et d'un retour à une valeur de base lorsque les cellules sont incubées en présence à la fois de propanil et β -cyclodextrine. Cette faiblesse des valeurs mesurées pouvait en revanche être commentée et des solutions techniques éventuellement proposées : comme par exemple de doubler la prise d'essai du volume de surnageant.

PARTIE 3 : MESURE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE LA DPP IV

À partir des lysats cellulaires deux tests devaient être réalisés : la mesure de l'activité de la DPP IV par méthode cinétique en continu, associée au dosage des protéines, afin d'exprimer une activité spécifique de l'enzyme. La DPP IV est une enzyme membranaire spécifiquement exprimée au niveau de la bordure en brosse des entérocytes matures.

Lorsque la manipulation a pu être mise en œuvre, elle a été réalisée correctement et dans de bonnes conditions. Certains candidats manquant de temps ont choisi judicieusement d'écourter le suivi de la cinétique, tout en réalisant au moins quatre mesures. Ceci leur a permis de tracer correctement les courbes de cinétique. Les pentes donnant une vitesse en min^{-1} .

Le calcul du coefficient d'extinction molaire du produit de la réaction était demandé en introduction de cette partie. Il nous paraît inadmissible qu'un candidat à l'agrégation ne maîtrise pas la loi de Beer-Lambert (fausse énonciation ou confusion entre longueur d'onde et absorbance) !

Le dosage des protéines par la méthode BCA a été réalisé avec des performances variables en fonction des candidats. La conception de la gamme, laissée libre aux candidats, a été bien faite. En revanche on regrette la disparité dans la linéarité des courbes d'étalonnage. Concernant les résultats du dosage des protéines, les candidats qui ont eu des résultats variables d'un puits à l'autre, ont rarement porté un regard critique sur ces valeurs qui étaient en général associées à un décollement important des cellules (décollement observable à l'œil nu).

Concernant le traitement de ces résultats (courbes et calculs), la majorité des candidats a bien tenu compte des remarques du rapport du jury de 2018 dont nous conseillons la lecture. On notera cependant la présence de quelques graphes sans titre, sans définition des axes, et/ou avec chevauchement d'une droite de régression linéaire et d'une courbe reliant les points, rendant le graphique illisible. Le jury regrette que certains candidats n'aient pas du tout utilisé les ordinateurs fournis, outil pourtant essentiel pour l'analyse des résultats en biochimie.

Les calculs d'activité ont correctement été menés, mais le calcul de l'activité spécifique a rarement été réalisé. Soulignons que certains candidats, qui n'avaient pas réalisé ces manipulations, ont fait le choix judicieux de présenter tout de même les méthodes de calcul (équations aux grandeurs et équations aux unités).

Ces deux tests étaient réalisés en microplaques et le lecteur donnait les valeurs mesurées sur les 96 puits. Il était donc très important de donner un plan de plaque clair pour que le jury puisse identifier les résultats. On peut regretter une communication déficiente à ce sujet.

PARTIE 4 : MESURE DE L'ACTIVITÉ MITOCHONDRIALE

Cette partie, bien que présentée en fin de sujet devait être réalisée dès la récupération des lysats et surnageants pour respecter le temps de traitement des cellules, et pour pouvoir laisser un temps d'incubation avec le MTT suffisant (le sujet indiquant à nouveau une heure d'incubation). La technique ne présentait pas de difficulté et a été menée correctement et en autonomie.

Notons que lorsque les tapis cellulaires étaient partiellement décollés, cela était particulièrement visible à la fin de l'incubation avec le MTT, une remarque des candidats sur leur copie, montrant qu'ils avaient observé ce problème et indiquant que les résultats à venir étaient donc probablement peu fiables, aurait été bienvenue. Même si la gestion du temps est difficile, il est important d'observer ses échantillons à chaque étape et de noter les aléas rencontrés : ce sens de l'observation et cette rigueur scientifique sont attendus.

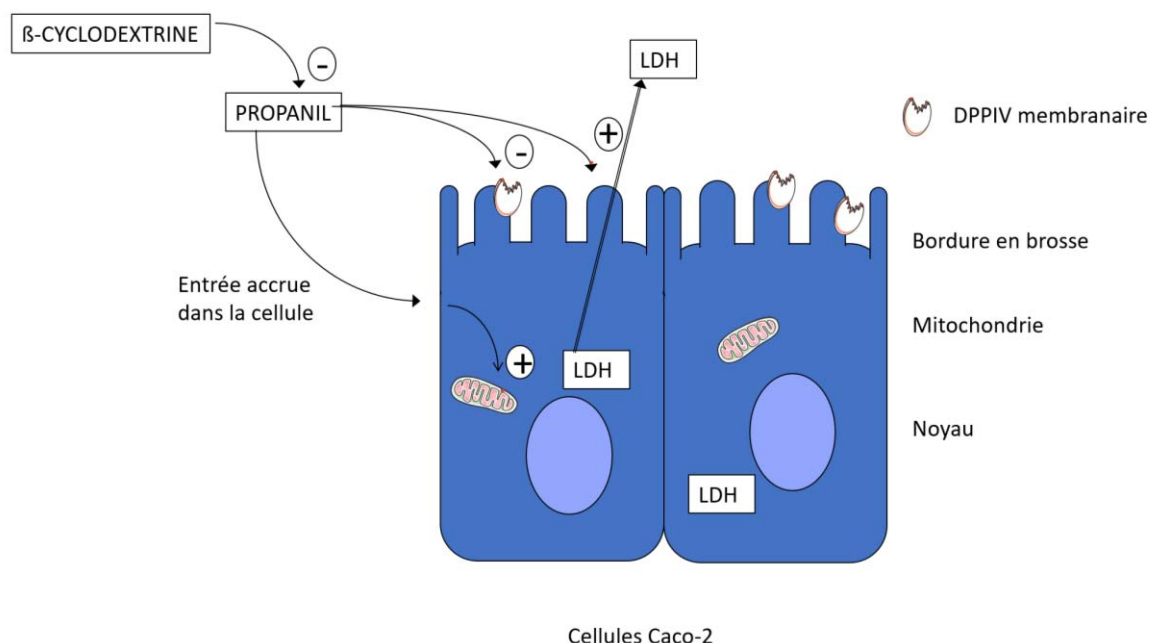
Les résultats, lorsque la manipulation avait été faite sur des tapis cellulaires corrects et homogènes, montraient une activité mitochondriale supérieure dans les cellules traitées avec le propanil par rapport aux cellules témoins ou aux cellules traitées à la fois par le propanil et la β -cyclodextrine. Malgré ces résultats surprenants, le jury en attendait une interprétation honnête. Cette augmentation témoigne d'une stimulation de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale et peut être mise en perspective avec l'action herbicide du propanil via l'inhibition de la photosynthèse par action sur la chaîne de transporteurs des électrons.

Une autre hypothèse pouvait être proposée par les candidats portant sur la perméabilité membranaire augmentée par le propanil (altération observée avec résultats du test LDH effectué

en partie 2). Cette perméabilité accrue augmenterait la vitesse de pénétration du substrat MTT dans les cellules et donc la quantité transformée en cristaux de formazan pendant un temps donné.

SYNTHÈSE FINALE

Peu de candidats ont traité la question de synthèse finale qui demandait la réalisation d'un schéma, alors que celui-ci permettait de montrer efficacement que le candidat avait compris le contexte dans lequel il se situait et la localisation subcellulaire des activités mesurées.

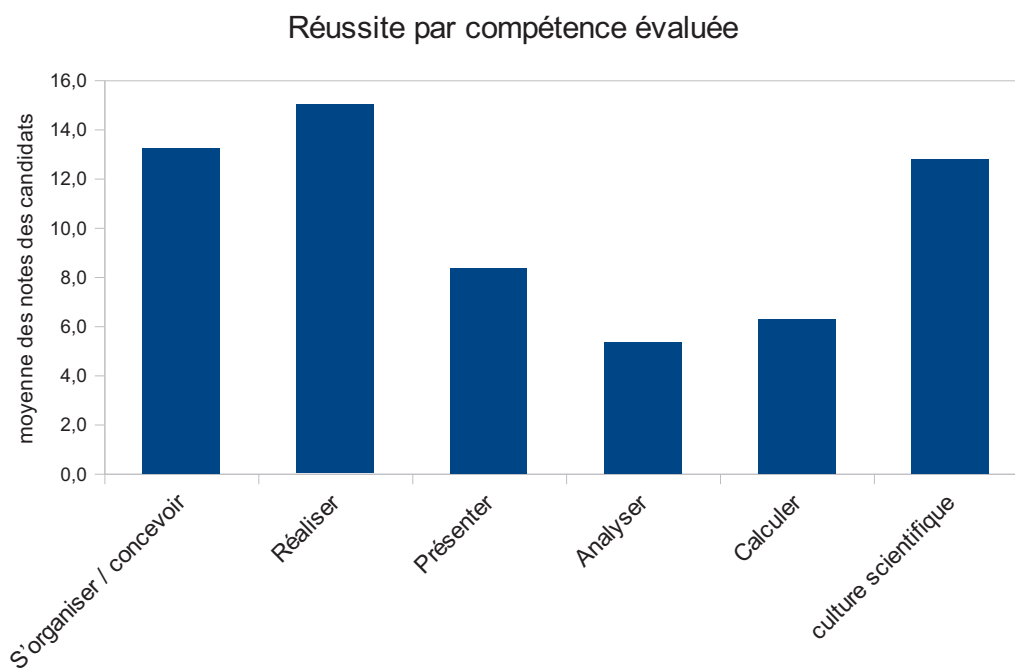


L'étude de l'effet cytotoxique faisant partie des concepts et savoir-faire à enseigner aux étudiants de plusieurs STS et IUT, une question terminale de synthèse pédagogique permettait aux candidats de se projeter dans l'adaptation des techniques abordées dans le sujet. Il est regrettable que si peu de candidats aient répondu à cette question. Les avantages et inconvénients des trois techniques d'étude de la toxicité réalisées étaient à comparer. Toutes répondaient au programme en mettant en évidence et en quantifiant un effet cytotoxique sur des cellules en culture par une méthode spectrophotométrique, aucune ne présentait de risques biologique ou chimique. En revanche la manipulation d'aiguille pour la réalisation de l'extrait cellulaire préalable au dosage d'activité de la DPPIV comportait un risque physique de coupure qui pouvait être souligné. Les durées, les difficultés techniques, les exigences matérielles mais aussi les applications pédagogiques interdisciplinaires (remobilisation de techniques et exploitation d'enzymologie, lien avec le métabolisme, ...) pouvaient également faire l'objet de commentaires et comparaisons par les candidats.

BILAN SUR LES COMPÉTENCES ÉVALUÉES

Comme le montre l'histogramme présenté ci-dessous, si les candidats maîtrisent globalement correctement les compétences d'organisation et de gestion technique des manipulations (ce qui révèle une réelle préparation à cette épreuve), c'est toujours la partie compte-rendu qui est la moins bien réalisée. Très peu de calculs étaient demandés dans le sujet de cette année et malgré

cela, la compétence « Calculer » n'est pas bien maîtrisée. Les moins bons résultats, concernant la compétence « Analyser », peuvent s'expliquer par un manque de temps. Il est cependant regrettable que la compétence « Présenter » obtienne un score si faible. Les candidats doivent donc travailler particulièrement ces trois axes : présenter correctement les tableaux et schéma de manipulation, les résultats et les graphes associés, réaliser les calculs en vérifiant systématiquement les unités, et enfin analyser les résultats et répondre aux questions de



synthèse.

En conclusion, l'épreuve a globalement été réussie avec une bonne maîtrise générale des gestes techniques, plusieurs candidats bien organisés ayant su mener à bien leurs manipulations tout en gérant la rédaction de leur compte-rendu. Le jury les félicite.

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

STRATÉGIES COMPÉTITIVES DES *ENTEROBACTERIACEAE* AU SEIN DES ÉCOSYSTÈMES :

- un mécanisme offensif : l'appareil de sécrétion type VI
- un mécanisme défensif : la survie dans un environnement hostile

INTRODUCTION

Dans leur environnement naturel, les microorganismes vivent souvent en communautés au sein desquelles ils sont capables de coopération pour améliorer leur survie et de compétition pour la colonisation d'une nouvelle niche. C'est le cas des bactéries entéropathogènes qui lorsqu'elles colonisent l'intestin sont soumises à une compétition pour le gain de nutriments face à une flore commensale déjà installée. Certaines bactéries sont dotées d'appareils de sécrétion très efficaces pour détruire les bactéries voisines ou lutter contre la destruction par des phagocytes professionnels tels que les macrophages. D'autres bactéries utilisent des phagocytes de l'environnement tels que les amibes pour résister à des conditions hostiles à leur multiplication.

Le sujet propose :

- En **partie A**, d'étudier la compétition entre deux souches d'*Escherichia coli*.
- En **partie B**, d'illustrer un mécanisme de survie dans un environnement hostile grâce à l'interaction entre un microorganisme unicellulaire (amibe) et une bactérie entéropathogène (*Yersinia pseudotuberculosis*).
- En **partie C**, de réaliser une vérification phénotypique d'une des souches utilisées en **partie A**.

TRAVAIL DU PREMIER JOUR

DONNÉES

La linéarité du spectrophotomètre à 600 nm dans les conditions expérimentales est vérifiée pour une suspension bactérienne dans l'intervalle $DO_{600} = 0,020 - 0,800$.

- $DO_{600} = 0,100 \Leftrightarrow 1,0 \cdot 10^8 E. coli \cdot mL^{-1}$
- $DO_{600} = 0,100 \Leftrightarrow 0,5 \cdot 10^8 Y. pseudotuberculosis \cdot mL^{-1}$

Les temps de génération en conditions optimales de croissance sont :

- 30 minutes pour *E. coli*
- 90 minutes pour *Y. pseudotuberculosis*

MATÉRIEL UTILISABLE POUR TOUTES LES MANIPULATIONS

Bec Hoffmann

Microscope optique

Spectrophotomètre

Agitateur mécanique de laboratoire

Portoir pour tubes à essai

Portoir pour tubes à hémolyse

Portoir pour microtubes

Tubes à hémolyse stériles de 10 mL à bouchon cellulose

Microtubes de 1,5 mL et 2 mL stériles

1 microplaque stérile à fonds ronds (volume maximal d'une cupule = 250 μ L) pour les dilutions en série

Pipettes graduées stériles de 1 mL, 2 mL, 5 mL et 10 mL

Pipettes automatiques P1000, P200, P20 et cônes adaptés

Pipettes Pasteur stériles

Systèmes d'aspiration à roulette et propipette

Lunettes de sécurité

Fond noir

Bacs à glace

PARTIE A

Étude de la compétition entre deux souches d'*Escherichia coli*

La capacité de prédation des *E. coli* est étudiée pour deux souches : **T6** (souche possédant l'appareil de sécrétion type VI) et **ΔT6** (la même souche ne possédant pas l'appareil de sécrétion type VI fonctionnel). Lors de cette étude, la souche **RLE** sert de proie et est mise en présence des deux souches prédatrices.

Cultures

<i>E. coli</i> RLE KanaR	1 culture de 4 heures à 37 °C en bouillon SIM de la souche d' <i>E. coli</i> RLE (7 mL en tube à essai)
<i>E. coli</i> T6 KanaS	1 culture de 4 heures à 37 °C en bouillon SIM de la souche d' <i>E. coli</i> T6 (7 mL en tube à essai)
<i>E. coli</i> ΔT6 KanaS	1 culture de 4 heures à 37 °C en bouillon SIM de la souche d' <i>E. coli</i> ΔT6 (7 mL en tube à essai)

Milieux de culture

Bouillon LB	1 flacon de 100 mL (utilisé également en partie B)
Bouillon SIM	1 flacon de 10 mL de bouillon SIM stérile
Gélose SIM agar	1 plaque 24 puits contenant 8 puits remplis de gélose SIM agar
Gélose LA-Kana	6 Géloses LA + Kanamycine à 50 µg·mL ⁻¹

Matériel spécifique individuel

Semi-microcuvettes et portoir
Parafilm prédécoupé
1 plaque à fond noir (sur demande)

Matériel spécifique commun

Microcentrifugeuse (Utilisation : 5 min à 6000 tours·min⁻¹)
Incubateur à 37 °C

MANIPULATIONS

Toutes les mesures au spectrophotomètre seront réalisées en présence d'un examinateur.

A1- Préparation des suspensions bactériennes

Les pré-cultures en milieu SIM des souches sont fournies en phase exponentielle de croissance.

- Vérifier que la concentration bactérienne est proche de 5-8.10⁸ bactéries·mL⁻¹.
- Préparer, en milieu SIM, des suspensions de chaque souche bactérienne de concentration proche de 1.10¹⁰ bactéries·mL⁻¹ (une microcentrifugeuse est à disposition si nécessaire).

A2- Mise en contact prédateurs-proies

- Préparer 75 µL de mélanges prédateurs-proies avec un ratio de 4:1 :
 - T6:RLE
 - ΔT6:RLE
- Préparer les témoins « souches pures » RLE et T6 dans des conditions identiques à celles des mélanges
- Déposer en spots de 15 µL, sur milieu **SIM** Agar en plaque 24 puits :
 - Les mélanges prédateurs-proies
 - Les témoins « souches pures » RLE et T6
- Laisser sécher les spots en zone stérile.
- Incuber à 37°C pendant 3h30 au minimum.

Donner la plaque aux examinateurs pour l'incubation à 37 °C.

A3- Remise en suspension des spots

- Déposer 1 mL de bouillon LB dans chaque puits.
- Homogénéiser précautionneusement la totalité de chaque spot par aspirations-refoulements lents.

Montrer une homogénéisation d'un spot à un examinateur.

On admettra que les DO_{600} obtenues sont de l'ordre de 0,5 à 1.

A4- Étude par fluorescence

- Déposer 200 µL des suspensions obtenues en **partie A3** dans une microplaque à fond noir dans l'ordre suivant : T6, RLE, RLE:T6 (2 essais), RLE:ΔT6 (2 essais).
- La mesure de la fluorescence sera effectuée par les examinateurs au microfluorimètre.

A5- Dénombrements des proies

- Diluer en série en microplaque les suspensions obtenues en **partie A3** « témoin RLE », T6:RLE et ΔT6:RLE.
- Dénombrer chacune de ces suspensions par technique de numération en gouttes sur géloses **LA-Kana** (voir fiche technique, **annexe 1**).

Montrer une série de dilutions à un examinateur.

- Incuber 36-48h à température ambiante.

RAPPORT D'ACTIVITÉS

1. Présenter de façon concise et organisée les modes opératoires (matériel, témoins...) retenus pour chaque partie.
2. Veiller à justifier et expliciter correctement les calculs utilisés, ainsi que les dilutions choisies pour les dénombrements.

PARTIE B

Étude de la survie de *Yersinia pseudotuberculosis* en condition hostile

Yersinia pseudotuberculosis est capable de survivre dans un environnement hostile à sa multiplication grâce à son association avec des amibes retrouvées dans l'environnement. Pour évaluer cette interaction une souche de *Yersinia pseudotuberculosis* sera co-cultivée avec *Dictyostelium discoideum* (une amibe retrouvée dans le sol) puis exposée à l'action d'un antibiotique bactéricide.

Cultures

Amibes Genta R 1 pré-culture d'amibes *Dictyostelium*, dans un flacon de 25 cm² en milieu HL5

Yersinia Genta S *Yersinia pseudotuberculosis* cultivée en nappe sur gélose LA

Milieus de culture

Bouillon LB 1 flacon de 100 mL (utilisé également en **partie A**)

Milieu HL5 1 flacon de 100 mL

Gélose LA 34 boîtes

Réactifs

Triton 0,2 % 1 flacon de 10 mL de triton 0,2 % stérile

Triton 2% 1 microtube de 1 mL de triton 2 %

Gentamycine 1 microtube de 1 mL de gentamycine à 2 mg·mL⁻¹

Bleu de Funk 1 microtube de 1 mL

Matériel spécifique individuel

3 cytomètres de Malassez à usage unique

1 compteur manuel

Billes de verre stériles et pot de récupération des billes (pot à remplir de désinfectant)

1 plaque 24 puits stérile

Tubes coniques de 15 mL

Matériel spécifique commun

Centrifugeuse de plaques (Utilisation : 5 min à 1000 tours·min⁻¹)

Microscope inversé

MANIPULATIONS

Toutes les mesures au spectrophotomètre seront réalisées en présence d'un examinateur.

Toutes les observations microscopiques seront présentées à un examinateur.

B1- Préparation de la suspension d'amibes

- Observer les amibes au microscope inversé.
- Retirer délicatement le milieu de culture surnageant. Attention, les amibes adhèrent faiblement au fond de la boîte.
- Ajouter 5 mL de milieu neuf HL5 et remettre en suspension les amibes par aspirations-refoulements (tapoter le flacon pour améliorer le décollement du tapis).
- Effectuer la numération des amibes en cytomètre de Malassez en présence de bleu de Funk (voir fiche technique, **annexe 2**).
- Préparer une suspension à environ $5 \cdot 10^5$ amibes vivantes $\cdot \text{mL}^{-1}$ en tube conique de 15 mL.

B2- Étude des témoins

Il est prévu la réalisation de 2 témoins dans les puits B1 et B2 (**partie B3**).

Proposer 3 autres témoins nécessaires pour interpréter et valider la manipulation en précisant le mode opératoire.

- Choisir le témoin le plus pertinent parmi les 3 proposés.
- Mettre en œuvre ce témoin dans le puits A1.

B3- Préparation de la microplaque

- Déposer 1 mL de la suspension d'amibes préparée en **partie B1** dans les puits : B1, B2, C1, C2, C4, C5, d'une plaque 24 puits (voir plan de dépôt en **annexe 3**).
- Incuber la plaque pendant 1h à température ambiante.

B4- Ajout de la suspension de *Yersinia*

- À partir de la culture de *Yersinia* en nappe sur gélose LA, préparer en milieu HL5 une suspension à $5 \cdot 10^7$ bactéries $\cdot \text{mL}^{-1}$.
- Dénombrer l'inoculum de *Yersinia* en double essai : réaliser les dilutions en série en bouillon LB en microplaque à fond rond puis déposer 100 μL en surface de géloses LA et homogénéiser avec des billes. Incuber 36-48h à température ambiante.
- Aspirer délicatement le milieu HL5 surnageant des puits B2, C1, C2, C4 et C5.
- Ajouter 1 mL de la suspension de *Yersinia* ajustée dans les puits C1, C2, C4 et C5.
- Ajouter 1 mL de HL5 dans le puit B2.
- Centrifuger la microplaque **5 minutes à 1000 tours $\cdot \text{minute}^{-1}$** (appeler l'examineur).
- Observer la culture d'amibes ainsi traitée au microscope inversé.
- Incuber 45 minutes à température ambiante.

B5- Traitement à la gentamycine

- Laver 1 fois délicatement les amibes adhérentes en B2, C1, C2, C4 et C5 avec du milieu HL5.
- Préparer une solution de gentamycine à $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en milieu HL5. Ajouter 1 mL de cette solution dans les cupules C4 et C5 de la plaque 24 puits.
- Ajouter 1 mL de milieu HL5 dans les puits B2, C1 et C2.
- Incuber 1h à température ambiante.
- Laver 3 fois délicatement à l'aide de 1 mL de milieu HL5 les puits B2, C1, C2, C4 et C5. Laisser 1 mL de HL5 dans chaque puits.

Réaliser un lavage en présence d'un examinateur.

B6- Dénombrement des amibes

- Remettre en suspension les amibes dans les puits B1 et B2.
- Dénombrer ces suspensions en cytomètre de Malassez, en présence de bleu de Funk.

B7- Dénombrement des *Yersinia*

- Aspirer délicatement le surnageant des puits C1, C2, C4 et C5.
- Ajouter 500 μL d'une solution de triton 0,2 % stérile pour lyser les amibes dans les cupules C1, C2, C4 et C5. Laisser agir 10 minutes à température ambiante.
- Dénombrer les dilutions 10^0 à 10^{-6} pour les puits C1 et C2 et les dilutions 10^0 à 10^{-3} pour les puits C4 et C5. Réaliser les dilutions en série en microplaque à fond rond en bouillon LB puis déposer 100 μL en surface de géloses LA et homogénéiser avec des billes.
- Incuber 36-48 h à température ambiante.

RAPPORT D'ACTIVITÉS

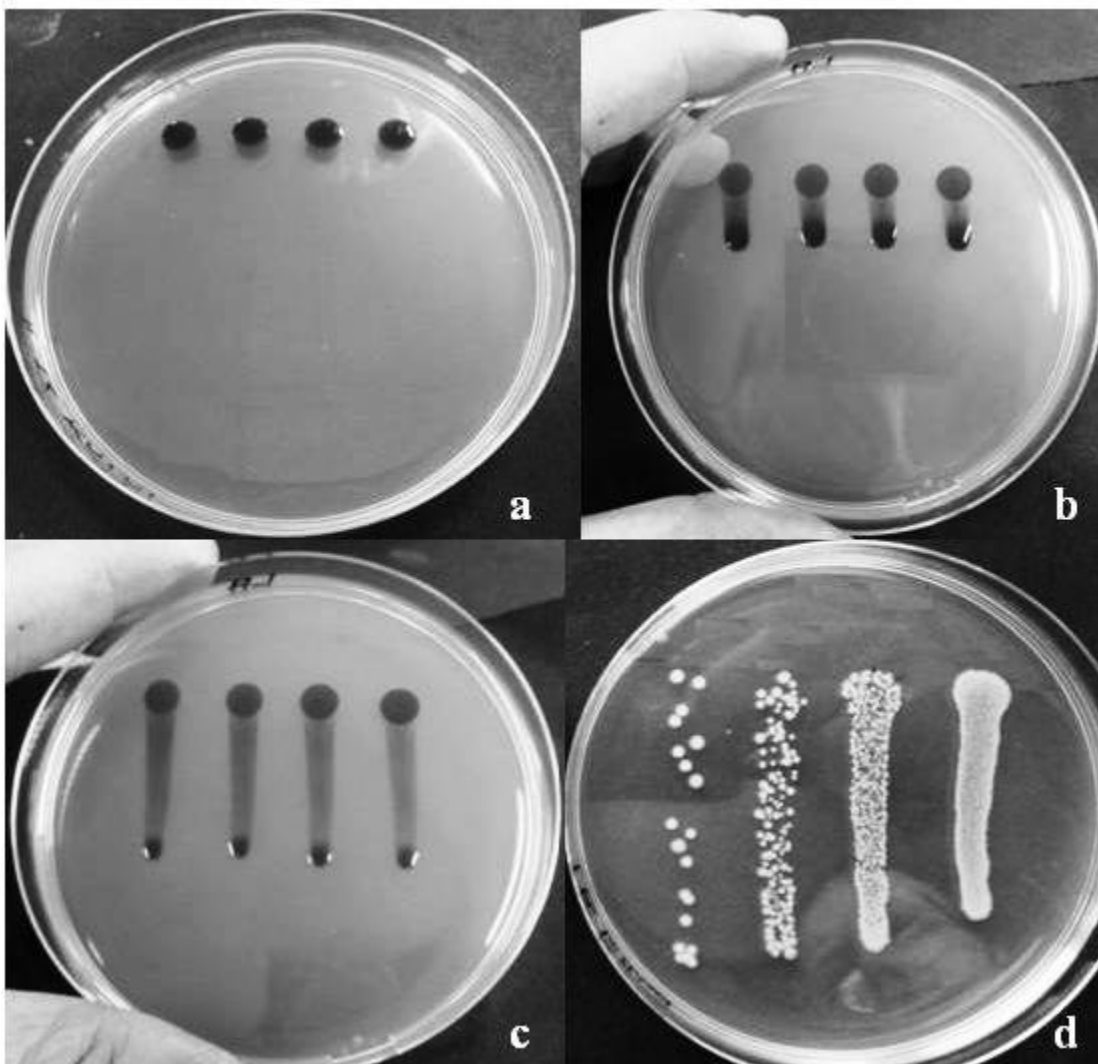
3. Rendre compte des observations réalisées au microscope inversé.
4. Présenter de façon concise et organisée les modes opératoires retenus pour les étapes de dénombrement. Veiller à justifier et expliciter correctement les calculs utilisés.
5. Calculer le facteur MOI « *Multiplicity Of Infection* » correspondant au nombre de bactéries introduites dans la culture rapporté au nombre d'amibes présentes.
6. Pour la **partie B2**, décrire le rôle et le mode opératoire des 3 témoins. Justifier le choix du témoin réalisé.
7. Préciser les rôles des témoins en puits B1 et B2. Analyser les résultats obtenus en présentant les calculs réalisés.
8. Justifier le choix des dilutions imposées en **partie B7** pour le dénombrement des *Yersinia* en C1, C2, C4 et C5.
9. Proposer un schéma expliquant l'objectif de chaque étape de la **partie B**.

ANNEXE 1

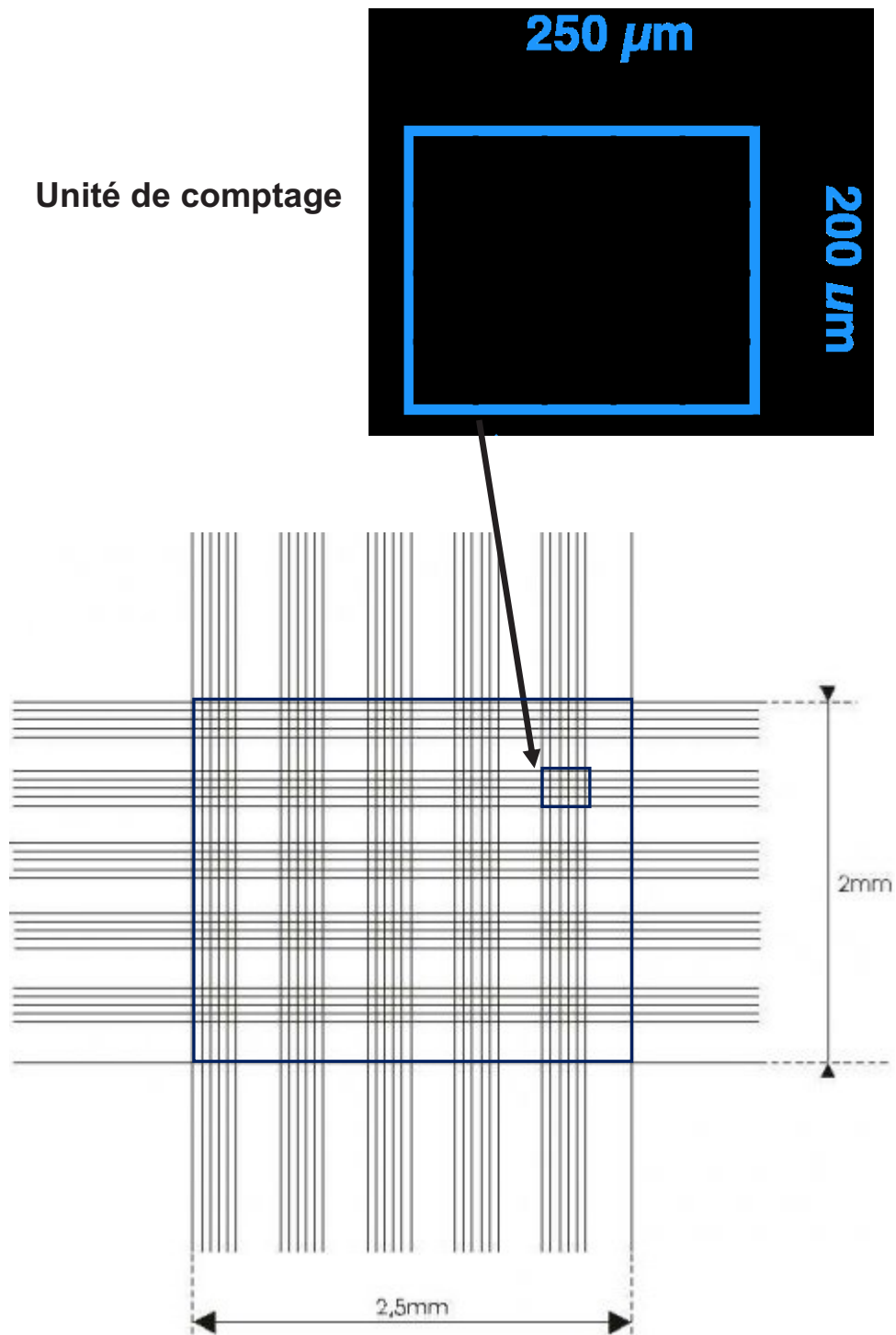
Méthode de numération par la technique en gouttes

- Diluer la suspension à dénombrer
- Déposer une goutte de 10 μ L des dilutions à dénombrer. Le dépôt doit s'effectuer conformément à la **photo a** ci-dessous (4 dépôts au maximum par boîte de Pétri ronde de 90 mm)
- Incliner la boîte et laisser s'écouler les gouttes sur 3-4 cm, de façon rectiligne (**photos b et c**)
- Laisser sécher la boîte bien à plat en zone stérile

Un résultat type est présenté sur la **photo d**.



ANNEXE 2
Quadrillage du cytomètre de Malassez



Profondeur de la chambre de comptage : 0,2 mm

ANNEXE 3
Plan de dépôts en plaque 24 puits

	1	2	3	4	5	6
A	Témoin à prévoir					
B	B1	B2				
C	C1	C2		C4	C5	
D						

TRAVAIL DU SECOND JOUR

Le sujet du premier jour est restitué au poste de travail.

Le compte-rendu du premier jour peut être consulté.

PARTIE A

Étude de la compétition entre deux souches d'*Escherichia coli*

La capacité de prédation des *E. coli* est étudiée pour 2 souches : **T6** (souche possédant l'appareil de sécrétion type VI) et **ΔT6** (la même souche ne possédant pas l'appareil de sécrétion type VI fonctionnel). Lors de cette étude, la souche **RLE** sert de proie et est mise en présence des 2 souches prédatrices. Seule la proie **RLE** possède le gène codant la Green Fluorescent Protein (GFP).

A6- Étude par fluorescence

- Analyser les résultats obtenus après mesure au fluorimètre (excitation à 485 nm / émission à 530 nm).

A7- Dénombrements des mélanges « prédateurs-proies »

- Dénombrer les colonies obtenues pour :
 - « témoin RLE »
 - T6:RLE
 - ΔT6:RLE

RAPPORT D'ACTIVITÉS

11. Présenter et analyser l'ensemble des résultats. Expliciter les calculs réalisés.

PARTIE B

Étude de la survie de *Yersinia pseudotuberculosis* en condition hostile

Yersinia pseudotuberculosis est capable de survivre dans un environnement hostile à sa multiplication grâce à son association avec des amibes retrouvées dans l'environnement. Pour évaluer cette interaction une souche de *Yersinia pseudotuberculosis* sera co-cultivée avec *Dictyostelium discoideum* (une amibe retrouvée dans le sol) puis exposée à l'action d'un antibiotique bactéricide.

B8- Lecture des résultats pour le témoin (cupule A1)

B9- Dénombrements de *Yersinia*

- Dénombrer les colonies obtenues pour l'inoculum.
- Dénombrer les colonies obtenues à partir des puits C1, C2, C4 et C5.

RAPPORT D'ACTIVITÉS

12. Présenter et analyser les résultats des dénombrements.
13. Calculer le facteur MOI réel et le comparer avec le facteur MOI théorique.
14. Proposer des hypothèses expliquant les résultats obtenus en C1, C2, C4 et C5.

PARTIE C

Vérification des caractéristiques d'identification de la souche d'*E. coli* Δ T6

La souche *E. coli* Δ T6 a été modifiée pour qu'elle n'exprime plus d'appareil de sécrétion type VI fonctionnel. On souhaite vérifier que ces mutations n'ont pas entraîné de modification de la typicité de la souche.

+ réactif API

C3- Vérification des caractères phénotypiques

- Effectuer la lecture des résultats.
- Vérifier l'identification de la souche à l'aide du **document API20E** « Système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux ».

RAPPORT D'ACTIVITÉS

15. Présenter et analyser les résultats obtenus.

Bibliographie

- A. Zoued *et al.* 2014. Architecture and assembly of the Type IV secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843, pp. 1164-1673
- B. Chassaing *et al.* 2018. Antibacterial weapons: targeted destruction in the Microbiota. *Trends in Microbiology* 26 (4), pp. 329-338
- S. Pukatzi *et al.* 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *PNAS* 103 (5), pp. 1528-1533

Remerciements à Éric CASCALES (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, CNRS, Université d'Aix-Marseille, UMR 7255) pour avoir fourni les souches d'*E. coli* utilisées dans ce sujet.

RAPPORT DU JURY DE TP DE MICROBIOLOGIE

Stratégies compétitives des *Enterobacteriaceae* au sein des écosystèmes

Au sein d'un écosystème, les microorganismes utilisent des mécanismes de défense et d'attaque variés pour assurer leur prolifération et leur survie. Le sujet propose plusieurs parties :

- L'étude de la compétition entre deux souches d'*Escherichia coli* dont l'une possède un appareil de sécrétion de type VI.
- L'illustration d'un mécanisme de survie dans un environnement hostile grâce à l'interaction entre un microorganisme unicellulaire (amibe) et une bactérie entéropathogène (*Yersinia pseudotuberculosis*).
- Une vérification phénotypique d'une des souches utilisées.

Statistiques des résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,69 / 20**
- Meilleure note : **16,00 / 20**
- Note la plus basse : **01,70 / 20**
- 13 notes sur 21 (**62 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20
- Moyenne des candidats admis : **11,79 / 20**

Répartition

- 2 notes $\leq 6 / 20$
- 6 notes > 6 et $\leq 10 / 20$
- 5 notes > 10 et $\leq 12 / 20$
- 4 notes > 12 et ≤ 14
- 4 notes $> 14 / 20$

Il convient de rappeler que l'évaluation de cette épreuve porte sur l'aspect technique, l'aspect rédactionnel du rapport d'activités et la qualité des raisonnements. Étant donné la diversité et le nombre d'éléments évalués, il est important de ne pas se démobiliser face aux difficultés rencontrées.

COMMENTAIRES TECHNIQUES GÉNÉRAUX

- La mise en place des modes opératoires a posé problème à de nombreux candidats qui ont ainsi perdu beaucoup de temps en début d'épreuve.
- Il est important de bien repérer les temps d'incubation des différentes parties pour élaborer une organisation efficace.
- Les candidats avaient à disposition deux paillasses équipées de beaucoup de matériels. Il était impératif d'organiser correctement son espace de travail.
- Il convenait de choisir judicieusement les grossissements utilisés pour présenter les observations microscopiques aux examinateurs et les préciser sur le rapport d'activités.
- Comme les années précédentes, l'épreuve faisait appel à des techniques classiques de microbiologie, pourtant certains candidats ne maîtrisent toujours pas les gestes de base suivants :
 - la manipulation en zone d'asepsie ;
 - la lecture au spectrophotomètre ;
 - l'utilisation du microscope ;
 - les dénombrements en milieu gélosé ;
 - les dilutions en microplaques.
- Les éventuels incidents au cours de la manipulation ne sont pas pénalisants s'ils sont gérés de façon adéquate, en respectant les règles de sécurité.

Les techniques de biologie moléculaire sont en général plutôt bien maîtrisées. Il est cependant dommage que peu de candidats ait réalisé les études de fluorescence

COMMENTAIRES RÉDACTIONNELS GÉNÉRAUX

- La présentation générale des copies doit être soignée et mettre en valeur les points clefs.
- La rédaction du rapport d'activités doit être réalisée au fur et à mesure des manipulations. Il est essentiel de ne pas perdre de temps à rédiger intégralement des réponses sur le brouillon qui n'est pas pris en compte dans l'évaluation.
- Cette année, il a été accordé une certaine liberté dans l'organisation du rapport d'activités. Cependant, une présentation rigoureuse était attendue, devant comprendre :
 - un plan détaillé bien mis en valeur ;
 - des modes opératoires détaillés et justifiés ;
 - les résultats bruts complets ;
 - les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques ;
 - des interprétations pas à pas aboutissant à une conclusion explicite.

PARTIE A

Étude de la compétition entre deux souches d'*Escherichia coli*

L'objectif de cette partie était de mesurer l'apport de l'appareil de sécrétion type VI lors d'une compétition entre différentes souches d'*E. coli*.

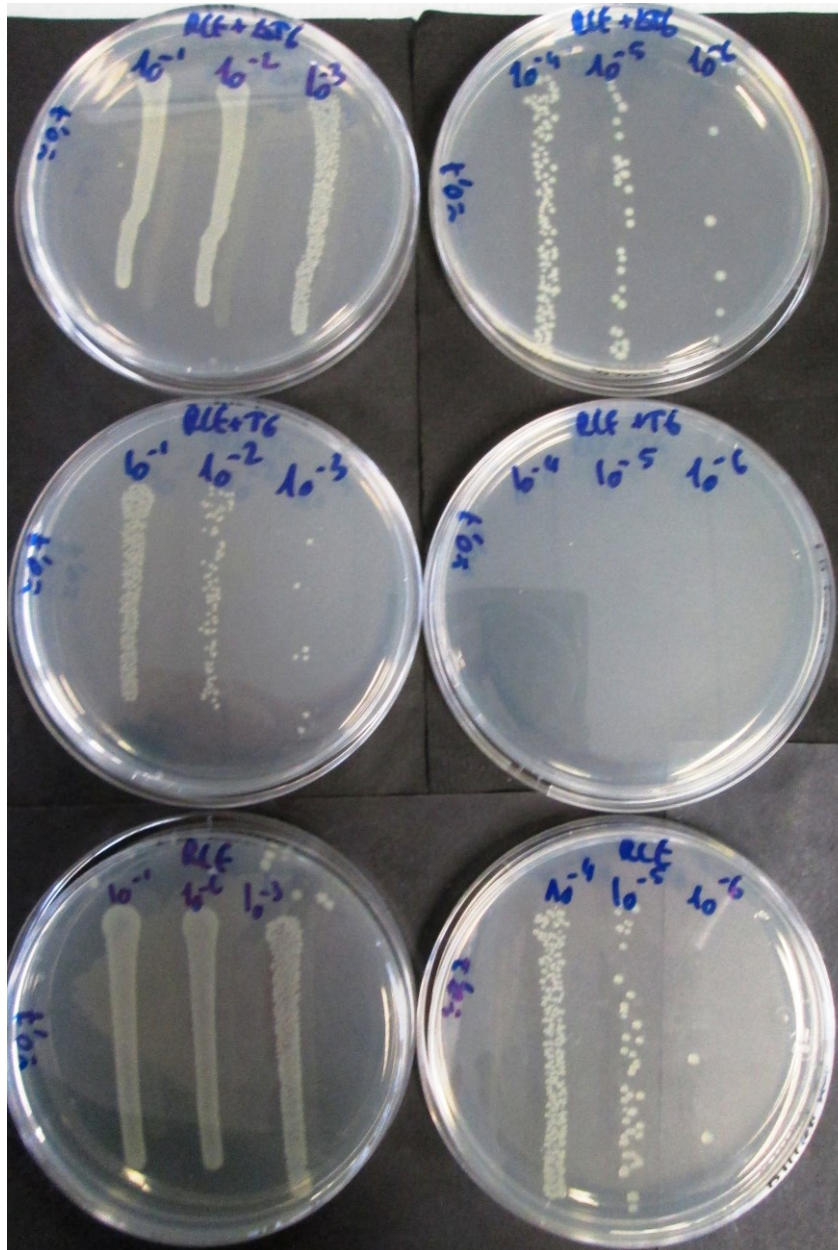
ASPECTS TECHNIQUES

- La manipulation étant longue, elle devait être mise en œuvre dès le début de l'épreuve.
- De nombreux candidats ont éprouvé de grandes difficultés pour la préparation d'une suspension ajustée fortement concentrée : il convenait de prévoir une étape de centrifugation.
- Les volumes nécessaires aux manipulations doivent être correctement anticipés pour ne pas perdre de temps avec une nouvelle préparation.
- Certains candidats n'ont pas préparé correctement les témoins malgré les indications fournies dans le sujet.
- Les dilutions décimales en microplaque ont donné lieu à de graves erreurs (homogénéisation insuffisante, facteur de dilution non respecté, changement de cônes au mauvais moment).
- Toute mesure au spectrophotomètre doit être effectuée contre une référence (un blanc) correctement choisie.
- Les candidats n'ont pas été perturbés par la nouvelle technique de dénombrement par gouttes proposée.

RÉSULTATS ATTENDUS ET RAPPORT D'ACTIVITÉS

La souche RLE présente une faible survie en présence de la souche prédatrice T6, liée à l'expression de l'appareil de sécrétion de type VI fonctionnel. En présence de la souche $\Delta T6$, on observe une prédation moindre mais mesurable, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de prédation. Ces effets étaient mesurables à la fois en fluorimétrie et lors des dénombrements de la souche RLE survivante.

- Il est important de signaler que seule la souche RLE était capable de croître en présence de kanamycine.
- Les résultats bruts doivent être regroupés et organisés de manière à faciliter les comparaisons et les interprétations.
- Les effets observés doivent être quantifiés.
- En fluorimétrie, il fallait soustraire le signal de la souche T6 pour tenir compte de l'autofluorescence de la bactérie.
- Les volumes de milieu SIM et de suspensions bactériennes devaient être précisés pour la réalisation des témoins et des MIX.
- Certaines informations de préparations effectuées en J1 doivent être rappelées en J2 pour permettre de comprendre les calculs réalisés en J2.



*Dénombrements des RLE survivantes sur gélose LA-Kana
(Technique en gouttes / exemple de résultats)*

*En haut : après incubation en présence de la souche $\Delta T6$
 Au milieu : après incubation en présence de la souche T6
 En bas : après incubation de la souche RLE seule*

PARTIE B

Étude de la survie de *Yersinia pseudotuberculosis* en condition hostile

Cette étude concerne la capacité de *Y. pseudotuberculosis* à résister à l'action d'un antibiotique grâce à sa faculté de survie après la phagocytose par des amibes.

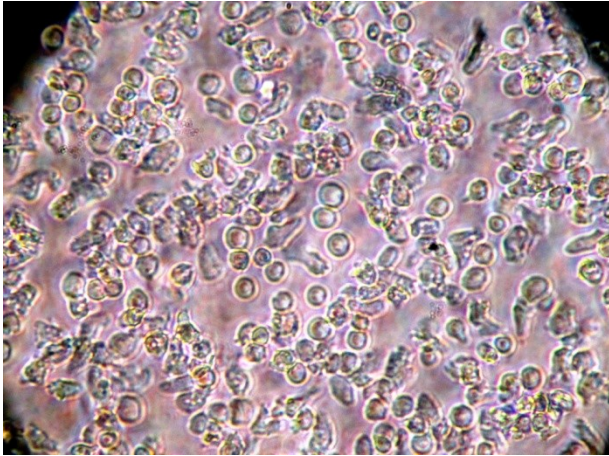
ASPECTS TECHNIQUES

- L'ensemble des suspensions cellulaires doit être conservé suffisamment éloigné du bec électrique pour éviter une mortalité liée à la température excessive.
- La numération en cytomètre n'est pas maîtrisée par de trop nombreux candidats.
- Il faut tenir compte de la dilution induite par l'ajout de bleu de Funk lors des numérations.
- Le sujet insistait sur le fait d'effectuer des lavages délicats, pourtant plusieurs candidats ont décollé les amibes par des gestes trop brusques.
- Les candidats ne maîtrisent pas tous la technique d'étalement avec les billes.
- Le choix des dilutions à étaler est rarement justifié et souvent incorrect.

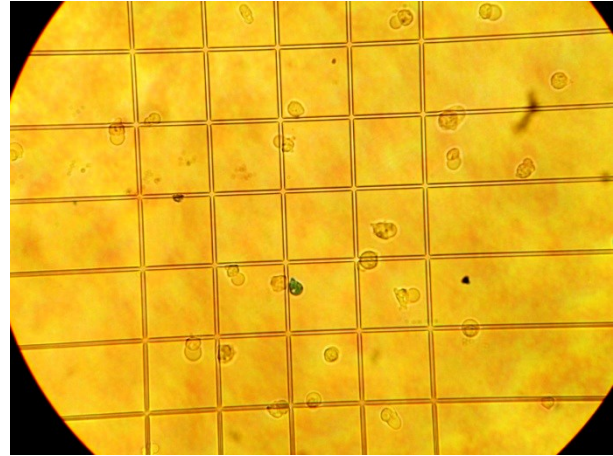
RÉSULTATS ATTENDUS ET RAPPORT D'ACTIVITÉS

Les bactéries sont protégées de l'effet de la gentamycine par la phagocytose des amibes. Ces résultats étaient observables en comparant les puits C1, C2 (sans traitement) et C4, C5 (avec traitement). Pour l'interprétation de ces résultats, de nombreux témoins étaient nécessaires. Certains étaient imposés (B1 et B2 pour vérifier l'impact des conditions opératoires sur le tapis d'amibes) et d'autres proposés par les candidats. Le jury attendait entre autre un témoin permettant de tester la sensibilité des *Yersinia* à la gentamycine ou au triton.

- La conception des témoins par les candidats a été décevante.
- Les commentaires d'observation microscopique sont trop peu détaillés (adhérence, état, densité).
- Il était nécessaire de détailler le rôle et l'intérêt du bleu de Funk et de présenter le pourcentage de viabilité.
- Les résultats obtenus ont été trop peu discutés, pourtant cette partie était propice à des développements et des remarques sur la technique utilisée. La majorité des candidats ne présente pas leur démarche d'analyse et se contente de conclure sans démonstration et sans faire référence aux résultats obtenus.
- Il manque souvent une démarche scientifique rigoureuse.



a



b



c

Observations microscopiques des amibes *Dictyostelium discoideum*.

- tapis de culture initiale, en flacon (a),
- dénombrement en cytomètre de Malassez, en bleu de Funk (b),
- tapis d'amibes, en présence de *Yersinia* (MOI x100) (c).

PARTIE C

Vérification des caractéristiques d'identification de la souche d'*E. coli* ΔT6

On vérifie ici la typicité de la souche *E. coli* ΔT6.

ASPECTS TECHNIQUES

- Il est dommage que peu de candidats ait réalisé l'ensemble de ces manipulations d'autant plus qu'elles étaient basiques, simples et d'exécution rapide. Il est anormal que les techniques d'observations macroscopique et microscopique (état frais, coloration de Gram) ne soient pas maîtrisées.
- Le jury est surpris de constater que certains candidats découvraient la galerie API20E.

RÉSULTATS ATTENDUS ET RAPPORT D'ACTIVITÉS

- La récolte de l'ensemble des caractères devait être réalisée dans une démarche de confirmation de typicité (*E. coli*) et non d'identification.
- Une remarque était attendue sur l'intérêt de comparer ces résultats à ceux de la souche T6 et non pas à un profil de référence.

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

Molécules naturelles et analogues de synthèse

Le sujet qui vous est ici proposé portera sur la vanilline et la levure de boulanger qui ont en commun d'être toutes deux largement utilisées non seulement en agroalimentaire, mais aussi en chimie de synthèse.

Pour faire face à une demande importante pouvant être limitée par les ressources biologiques, il convient de pouvoir synthétiser des composés et formuler des mélanges dont les propriétés seraient équivalentes, voire optimisées.

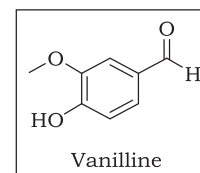
Le sujet portera dans un premier temps sur l'identification et le dosage des molécules responsables du goût vanille d'un sucre aromatisé. Il s'attachera ensuite à l'étude de la chimie associée à la levure de boulanger. Il vous sera enfin proposé le dosage d'une des substances présentes dans un sachet de levure chimique.

Le sujet fait alterner des questions théoriques et des parties expérimentales qui sont identifiables par **un encadré**.

L'annexe 8 (feuille de résultats) est à compléter au fur et à mesure de la réalisation des manipulations et est à joindre à la copie en fin d'épreuve.

I. Vanilline et éthylvanilline

Le vanillier est une orchidée dont les fruits, communément appelés « gousses » sont traités thermiquement, séchés et affinés pour obtenir les bâtons de vanille utilisés en cuisine. Ce travail, long de plusieurs mois, explique le prix, mais surtout la relative rareté de cette épice : la demande en vanilline (utilisée essentiellement comme additif dans l'alimentation ou les parfums) est plus de 10 fois supérieure à la production agricole.



On comprend alors que dès 1894, Rhône-Poulenc entreprit la production de vanilline, principale molécule aromatique de la gousse de vanille, à une échelle industrielle.¹

La synthèse chimique à partir du gaïacol (Figure 1) est encore largement utilisée, mais de nombreuses voies plus « naturelles » à partir de matières premières biosourcées sont de plus en plus exploitées telles la production de vanilline par oxydation de la lignine, la transformation du son de riz ou de maïs par des bactéries² ou des champignons.³

Quelle que soit la méthode exploitée, la vanilline non issue d'une gousse de vanille est désignée comme étant un **arôme identique au naturel**.

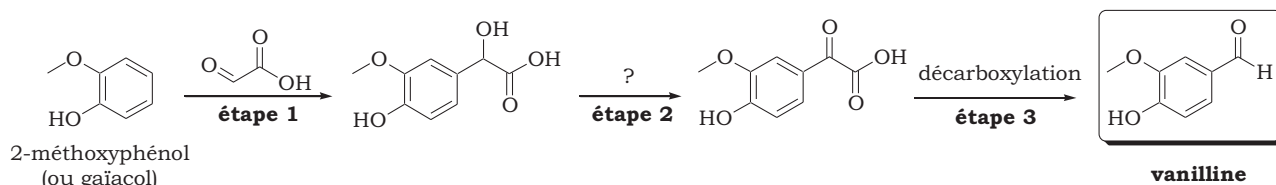


Figure 1 : Synthèse industrielle de la vanilline à partir du gaïacol

Enfin, le goût vanille peut être obtenu par un **arôme artificiel** : un composé dont la structure chimique n'est pas celle de la vanilline. C'est le cas de l'éthylvanilline dont l'odeur de vanille est 2 à 4 fois plus intense que celle de la vanilline.

Vous avez à votre disposition le contenu d'un sucre aromatisé goût vanille. L'objectif des manipulations sera de déterminer s'il s'agit de vanilline ou d'éthylvanilline, puis d'en connaître la masse contenue dans un sachet.

Document 1 : composition de sucre aromatisé à la vanille

Le sucre vanillé doit contenir du saccharose et 4 % en masse de gousses de vanille en poudre, sachant qu'un gramme de gousse contient entre 5 et 25 mg de vanilline.

Le sucre vanillé est composé de saccharose et d'éthylvanilline (de l'ordre de 0,3 % en masse).

Document 2 : propriétés physico-chimiques de la vanilline et de l'éthylvanilline

	Vanilline	Éthylvanilline
Formule brute	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃
Température de fusion	80-81°C	76-78°C
pK _A	7,4	7,9
Solubilité	Soluble dans l'eau (10 g·L ⁻¹ à 25 °C) Grande solubilité dans les solvants organiques courants	Soluble dans l'eau (10 g·L ⁻¹ à 50 °C) Grande solubilité dans les solvants organiques courants

¹ VAN NOSTRAND'S scientific encyclopedia ; Wiley

² <http://ennolys.fr/nos-solutions/ennallin/>

³ Techniques de l'ingénieur ; A. LOMASCOLO et col ; Réf : J6012

1. Extraction et identification de l'arôme vanille contenu dans un sachet de sucre

Expérience 1 :

Réaliser le protocole suivant :

Introduire dans une ampoule à décanter 20 mL d'eau. Ajouter 3 g de sucre aromatisé goût vanille et extraire l'agent aromatique avec 15 mL d'acétate d'éthyle. Recueillir la phase organique dans un erlenmeyer, la sécher sur sulfate de magnésium anhydre et l'analyser par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant un éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (1/1) et une révélation sous UV à 254 nm.

1. Indiquer la composition des différentes phases.
2. En quoi l'extraction ici réalisée est-elle nécessaire ?
3. Faire un dessin de la CCM obtenue et conclure quant à la nature de la substance aromatique contenue dans le sachet de sucre. Coller la plaque CCM sur la feuille de résultats (annexe 8).
4. Les rapports frontaux obtenus avec ces conditions d'élution sont trop élevés et proches pour envisager la séparation d'un mélange de vanilline et d'éthylvanilline par chromatographie sur colonne de silice. Comment pourrait-on alors modifier l'éluant pour arriver à une bonne séparation ?

2. Dosage de l'arôme vanille contenu dans le sucre étudié

La vanilline ou l'éthylvanilline contenue dans l'échantillon de sucre peut être dosée par spectrophotométrie d'absorption moléculaire.

Des mesures d'absorbance ont été réalisées pour des solutions de vanilline d'une part et d'éthylvanilline d'autre part, dans des solutions d'hydroxyde de sodium de concentrations $C = 0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et pour une même longueur d'onde $\lambda = 348 \text{ nm}$.

Les résultats expérimentaux sont présentés ci-dessous.

Vanilline	C (mg·L ⁻¹)	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	6,00
	A	0,182	0,347	0,503	0,669	0,836	0,962

Ethylvanilline	C (mg·L ⁻¹)	1,16	2,32	3,48	4,64	5,80	6,96
	A	0,182	0,347	0,521	0,698	0,867	1,030

5. Donner la formule semi-développée de l'espèce absorbant dans les solutions de la gamme étalon réalisée à partir de la vanilline. Justifier.
6. Proposer un protocole pour préparer l'échantillon à analyser. Appeler un membre du jury pour valider le protocole élaboré.

Expérience 2 :

Mettre en œuvre le protocole proposé de préparation de l'échantillon et mesurer son absorbance.

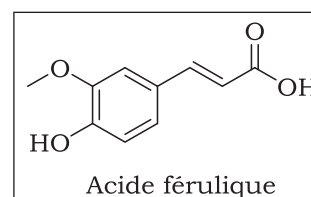
7. Exprimer et calculer le pourcentage massique d'arôme vanille contenu dans le sucre aromatisé analysé.

3. Différentes voies d'obtention de la vanilline

La figure 1 présente la synthèse de la vanilline en trois étapes à partir du gaiacol.

- Proposer un mécanisme pour l'étape 1, sachant que la réaction se déroule en milieu acide.
- Quel est le nom d'une réaction telle celle menée à l'étape 2 ? Proposer un réactif permettant de réaliser cette étape.
- Interpréter les spectres IR (appareil FTIR Thermo Scientific Nicolet iS 10 ATR-diamant) et RMN (appareil Magritek Spinsolve 43 MHz, dans CDCl_3) de la vanilline fournis en annexe 2.
- Préciser, en le justifiant, quel type de spectroscopie pourrait être utilisé pour distinguer la vanilline de l'éthylvanilline. Quelles seraient les modifications observées ?

D'autres voies de synthèse de la vanilline à partir de produits naturels ont été développées ces dernières années, par exemple à partir de l'acide férulique contenu dans le son de riz ou de maïs.



- Proposer une voie de synthèse permettant de synthétiser la vanilline à partir de l'acide férulique et des substances chimiques de votre choix.

4. Produit naturel ou identique au naturel ?

La vanille naturelle est composée de plus de 200 molécules différentes présentes en faibles quantités par rapport à la vanilline, mais jouant un rôle subtil dans le goût et l'odeur de l'aromate. Dès lors, on ne peut pas vendre sous la même appellation de la *vanille naturelle* et de la vanilline obtenue par exemple par oxydation de lignine. Pour cette dernière, on utilise le terme d'*identique au naturel*.

Il est possible de distinguer vanilline naturelle et synthétique biosourcée par une analyse de l'abondance isotopique en carbone ^{13}C . En effet, le carbone ^{13}C n'est pas assimilé de la même façon par des plantes différentes : il s'agit du fractionnement isotopique naturel. Il a ainsi été montré que la vanilline extraite de gousses de vanille présente un léger excès de ^{13}C par rapport à de la vanilline synthétisée à partir de lignine extraite de bois.

La vanilline synthétique est tout d'abord traitée par de l'acide iodhydrique (Figure 2). L'iodométhane formé est récupéré et son taux de carbone ^{13}C est mesuré puis comparé à celui obtenu en réalisant la même expérience sur de la vanilline issue de gousses de vanille.⁴

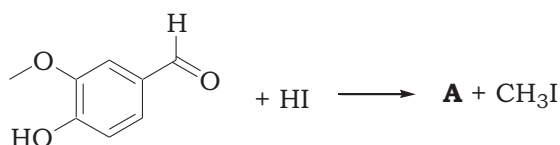


Figure 2 : Traitement de la vanilline par l'acide iodhydrique

⁴ D. A. Krueger and H. W. Krueger ; *J. Agric. Food. Chem.*, **1983**, 31, 1265-1268

13. Que désigne le nombre 13 dans l'écriture ^{13}C ?
14. Le ^{13}C est-il un isotope stable ? Est-il l'isotope le plus abondant dans la nature ?
15. Le ^{11}C est un isotope instable qui se désintègre essentiellement par émission d'un positron (radioactivité β^+). Écrire l'équation correspondant à cette désintégration.
16. Sur quelle propriété physique ou chimique les isotopes sont-ils discriminés par des plantes ?
17. Représenter la structure de **A**.
18. Proposer un mécanisme expliquant la formation de **A**.

II. La levure de boulanger

La levure de boulanger est composée de plusieurs souches de *Saccharomyces cerevisiae*, un champignon unicellulaire. Utilisée dans la fabrication du pain, elle permet la dégradation des sucres présents (saccharose, glucose et maltose notamment) non seulement en dioxyde de carbone (ce qui assure le gonflement de la pâte) mais aussi en de nombreux composés aromatiques (dont des aldéhydes) responsables du goût du pain.⁵

Au laboratoire de chimie, la levure de boulanger est également utilisée dans des réactions de réduction énantiosélective de cétones. Ces dernières ont fait l'objet de plusieurs centaines de publications.⁶

1. Utilisation de la levure en boulangerie

L'une des réactions responsables du gonflement de la pâte à pain est la fermentation éthanolique.

19. Écrire l'équation associée à la fermentation éthanolique modélisée par la transformation du glucose solide en éthanol liquide et en dioxyde de carbone gazeux.
20. Proposer un nom pour qualifier une telle réaction.
21. Exprimer et calculer $\Delta_{\text{fermentation}}G^\circ$, enthalpie libre standard de cette réaction à 298K en utilisant les grandeurs thermodynamiques données ci-dessous et associées aux réactions de combustion complète du glucose solide ou de l'éthanol liquide dans le dioxygène gazeux, conduisant à la formation d'eau liquide et de dioxyde de carbone gazeux.

	$\Delta_{\text{comb}}H^\circ$ en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{\text{comb}}S^\circ$ en $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
glucose (s)	- 2 803	259
éthanol (l)	- 1368	- 139

⁵ H.-D. Belitz, W. Grosh, P. Schierberle, *Food Chemistry* 4th ed., Springer

⁶ E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, A. Manzocchi, *Chem. Rev*, **1992**, 92, 10071-1140

Cette réaction est couplée à la formation nette de 2 ATP ce qui permet de récupérer une partie de l'énergie dégagée par la fermentation alcoolique.

22. Sachant que l'enthalpie libre standard de la réaction $\text{ATP} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$ est $\Delta_{\text{ATP}}G^\circ = -30,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, estimer le rendement énergétique de la fermentation éthanolique.
23. Pourquoi ne ressent-on pas le goût de l'éthanol dans le pain ?

2. Un analogue de la levure de boulanger : la levure chimique

Introduite dans la pâte, la levure chimique à votre disposition permet lors de la cuisson de libérer du dioxyde de carbone.

Un sachet de levure chimique contient de l'hydrogénocarbonate de sodium NaHCO_3 , du dihydrogénopyrophosphate de sodium $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ et de la farine de blé.

24. Indiquer le type de réaction mis en jeu et donner l'équation de la réaction de formation du dioxyde de carbone dans le mélange humide de la levure chimique et de la pâte à cuire. Calculer la constante de réaction associée. Commenter.

Le but de l'expérience proposée est de titrer l'un des composants de la levure : le dihydrogénopyrophosphate de sodium $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

Des réactions de précipitation et de complexation des ions zinc(II) sont utilisées.

25. Donner la configuration électronique du zinc dans son état fondamental.
26. Relier la configuration électronique à la place de l'élément zinc dans la classification périodique.
27. Après avoir rappelé la définition, identifier les électrons de valence d'un atome de zinc. Justifier la formation de l'ion Zn^{2+} et donner sa configuration électronique dans son état fondamental.

Le protocole est alors le suivant :

Expérience 3 :

Etape a :

Dans un erlenmeyer de 250 mL propre et sec, peser exactement une masse m_1 d'environ 0,75 g de levure chimique. Ajouter $E_1 = 50 \text{ mL}$ de solution d'acétate de zinc à $C_1 = 0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en zinc.

Mettre sous agitation magnétique pendant 15 minutes, durée pendant laquelle il se forme quantitativement du pyrophosphate de zinc $\text{Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$ solide.

Filtrer dans un erlenmeyer propre et sec de 100 mL à l'aide d'un entonnoir propre et sec et d'un papier filtre plissé.

Etape b :

Prélever $E_2 = 10$ mL du filtrat.

Vérifier que le pH du filtrat est d'environ 5 ; sinon, l'ajuster avec quelques gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique à $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Ajouter une pointe de spatule d'orangé de xylénol, indicateur de fin de réaction.

Etape c :

Titrer le volume prélevé par une solution d'EDTA de concentration $C_2 = 0,0400 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Le changement de couleur observé sera du violet au jaune.

Réaliser deux essais concordants à $0,10$ mL près à partir du même filtrat.

28. Préciser la verrerie à utiliser pour prélever les volumes E_1 et E_2 .

29. Indiquer la nature des solides filtrés à l'étape *a*.

Lors de l'expérience 3 :

- L'indicateur de fin de réaction, l'orangé de xylénol est un hexa-acide noté H_6I . On introduit une pointe de spatule de son sel disodique (noté Na_2H_4I) dans la solution à $pH = 5$ (on négligera l'effet de cet ajout sur le pH de la solution). L'orangé de xylénol réagit alors avec les ions Zn^{2+} pour former le complexe violet $[ZnH_3I]^-$.
- L'EDTA, noté Y^{4-} pour sa forme la plus basique, forme un complexe avec les ions Zn^{2+} introduits en excès : $[ZnY]^{2-}$.
- Un échange de ligand a lieu à l'équivalence.

30. Indiquer les formes majoritaires en solution aqueuse de l'acide pyrophosphorique, de l'EDTA et de l'orangé de xylénol à $pH = 5$.

31. En utilisant ces formes majoritaires et en ne faisant pas apparaître dans les équations les ions acétate, écrire les équations de réaction associées aux étapes *a*, *b* et *c* de ce titrage (deux équations attendues pour l'étape *c*).

32. Expliquer alors le changement de couleur observé et le choix du pH pour la détection visuelle de l'équivalence.

33. En considérant les réactions intervenant lors du titrage comme quantitatives, exprimer la masse m_2 de dihydrogénopyrophosphate de sodium $Na_2H_2P_2O_7$ contenue dans la masse m_1 de levure chimique en fonction des grandeurs intervenant dans le titrage.

34. Calculer le pourcentage massique de dihydrogénopyrophosphate de sodium dans la levure.

35. Justifier que la précipitation de $Zn(OH)_2(s)$ n'a pas lieu ici.

3. Utilisation de la levure de boulanger en chimie organique

La levure de boulanger est couramment utilisée pour transformer des composés carbonylés comme présenté dans le tableau suivant⁷ :

R	Yield (%)	E.e. (%)	$[\alpha]_D (c, \text{CHCl}_3)$	Absolute configuration
(4a) Et	49	30	-4.3° (1.6)	R
(4b) Bu	45	33	+4.2° (1.3)	S
(4c) Bu ^t	29	25	+3.9° (1.4)	S
(4d) Octyl	62 ^c	90	+10.6° (2.1)	S
	50	85	+8.6° (1.8)	S
(4e) Decyl	14	94	+9.3° (1.0)	S

36. Sur le composé (4), indiquer la géométrie ainsi que l'ordre de grandeur des angles de liaison autour de l'atome d'oxygène de la fonction alcool, de l'atome de carbone de la fonction ester et de l'atome de carbone portant le chlore.
37. Préciser de quel type de réaction il s'agit ici. Quel réactif permettrait cette réaction ?
38. Préciser la signification de chacune des colonnes du tableau.
39. Les réactions présentées sont-elles stéréosélectives ? stéréospécifiques ? Justifier les réponses.
40. Dessiner la structure du stéréoisomère du composé (4a) majoritairement obtenu en justifiant la démarche.

Dans la partie expérimentale de la publication, la description de la synthèse du composé (4d) débute ainsi : *To a suspension of bakers' yeast (Fleischmann's, 25 g) and sucrose (10 g) in deionized water (333 ml) in a shaker was added compound (3d). The suspension was shaken at room temperature and at 250 rpm and the reaction was followed by TLC.*

41. Qu'est-ce que le *sucrose* et quel est son intérêt dans cette réaction ?

Dans des conditions opératoires similaires, le composé **B** conduit à l'alcool **C** qui se cyclise spontanément pour conduire à la lactone **D**.⁸

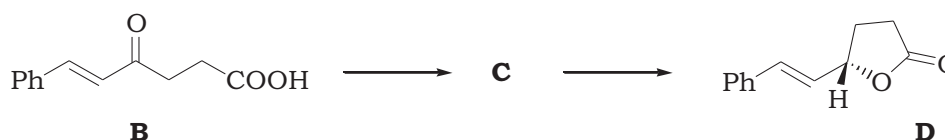


Figure 3 : Formation d'une lactone

42. Donner la structure de **C**. Préciser la stéréochimie.
43. Proposer un mécanisme pour la réaction **C** → **D** réalisée en milieu acide.

⁷ A. S. Gopalan and H. K. Jacobs, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 1897-1900

⁸ M. Aquino, S. Cardani, G. Pronza, C. Fuganti., R. P. Fernandez, A. Tagliani, *Tetrahedron*, Vol 47, No 37, p 7887-7896, **1991**

ANNEXES

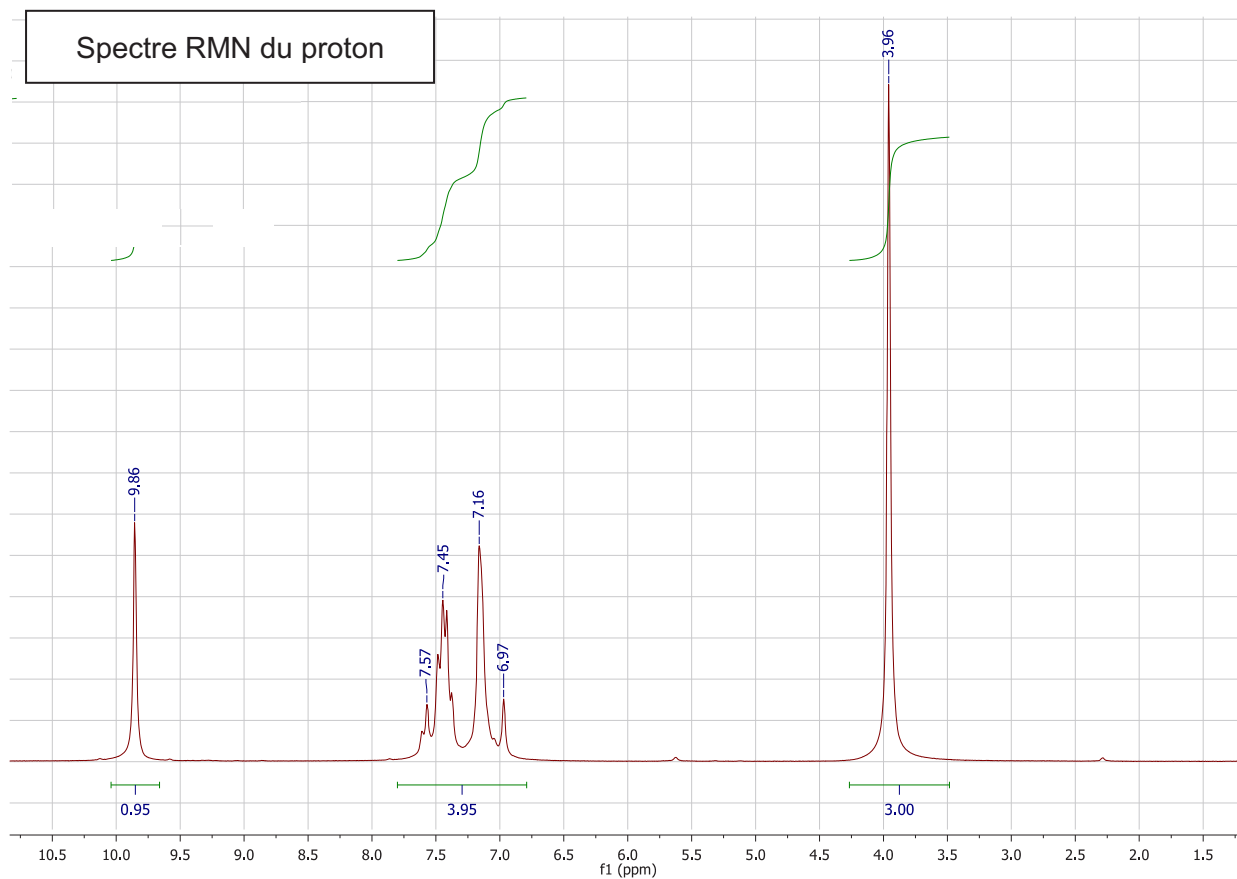
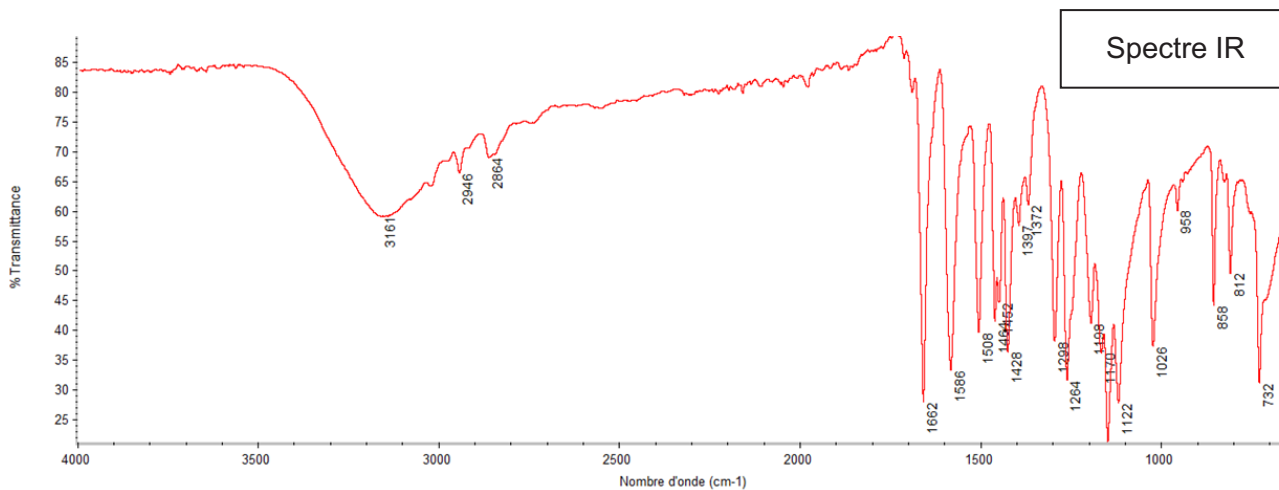
ANNEXE 1 : Données physico-chimiques

Masse molaire de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$: $222 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

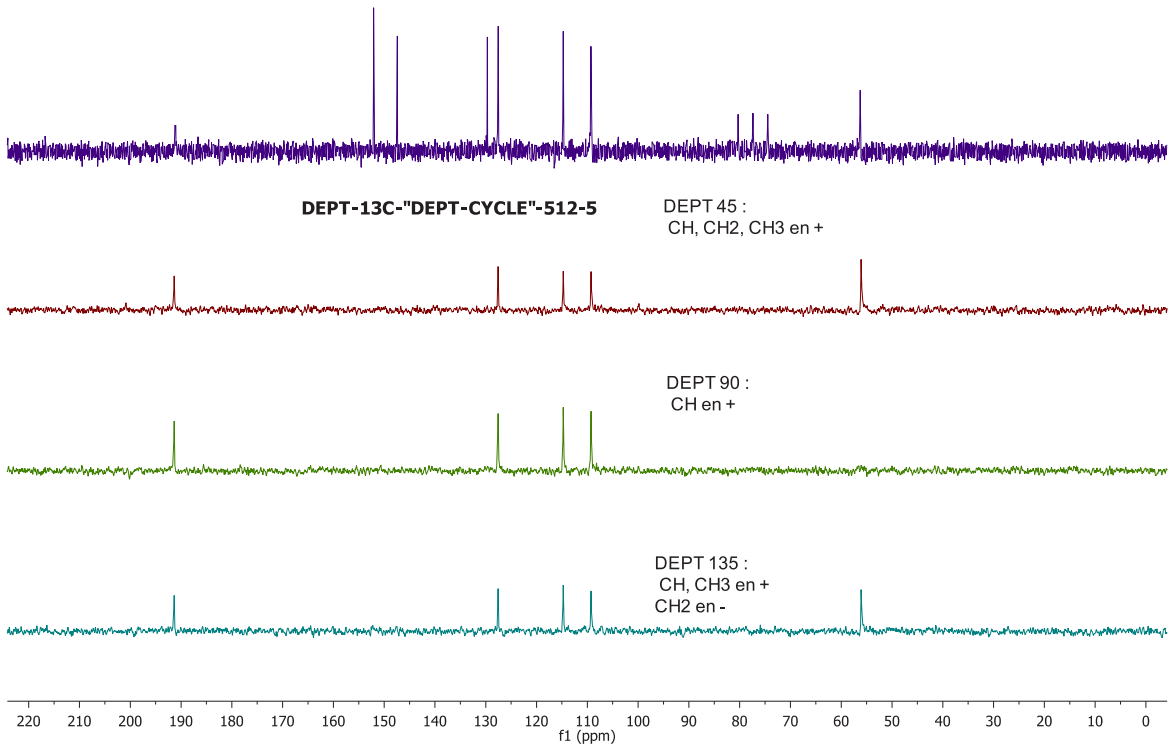
Substance chimique	Constantes thermodynamiques associées
EDTA de forme la plus basique notée Y^{4-}	$\text{pK}_{\text{A}1} = 1,0$; $\text{pK}_{\text{A}2} = 1,5$; $\text{pK}_{\text{A}3} = 2,1$; $\text{pK}_{\text{A}4} = 2,7$; $\text{pK}_{\text{A}5} = 6,2$; $\text{pK}_{\text{A}6} = 10,3$
Orangé de xylénol de forme la plus acide notée H_6I	$\text{pK}_{\text{A}1} < 0$; $\text{pK}_{\text{A}2} = 2,6$; $\text{pK}_{\text{A}3} = 3,2$; $\text{pK}_{\text{A}4} = 6,4$; $\text{pK}_{\text{A}5} = 10,5$; $\text{pK}_{\text{A}6} = 12,6$
Acide pyrophosphorique $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$	$\text{pK}_{\text{A}1} = 0,7$; $\text{pK}_{\text{A}2} = 2,2$; $\text{pK}_{\text{A}3} = 6,8$; $\text{pK}_{\text{A}4} = 9,6$
Dioxyde de carbone	$\text{pK}_{\text{A}1} = 6,4$; $\text{pK}_{\text{A}2} = 10,4$
$[\text{ZnH}_3\text{I}]^-$	$\log(\beta) = 6,1$
$[\text{ZnY}]^{2-}$	$\log(\beta) = 16,5$
$\text{Zn}(\text{OH})_2(\text{s})$	$\text{pK}_\text{s} = 15,7$

L'orangé de xylénol prend une teinte jaune en solution aqueuse pour un pH inférieur à 6 et une teinte rouge-violet au-delà.

ANNEXE 2 : Spectres IR, RMN ^1H , ^{13}C avec DEPT et 2D (corrélation proton/carbone) de la vanilline

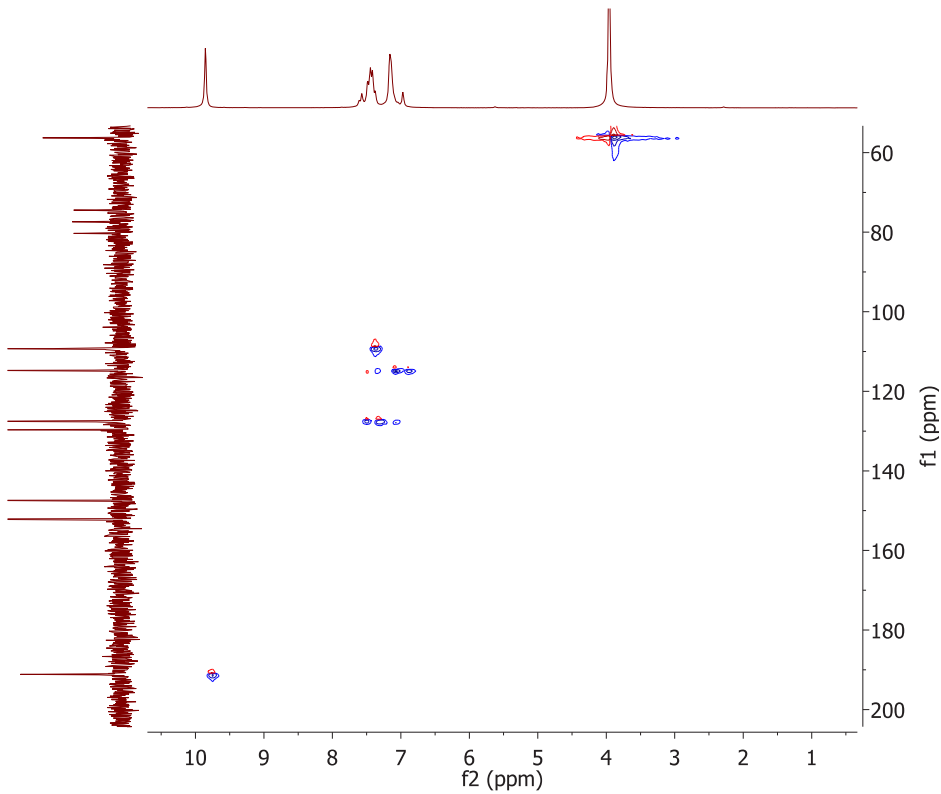


Spectre RMN du carbone 13
avec découplage du proton et séquences DEPT









NOTE : le triplet entre 70 et 80 ppm correspond au signal du carbone du solvant deutéré CDCl_3

Spectre RMN-2D de corrélation $^1\text{H}-^{13}\text{C}$



ANNEXE 3 : Données de sécurité

Produits	Pictogramme	Phrases H et P
Acétate d'éthyle		H225, H319, H336 P210, P305 + P351 + P338, P370 + P378, P403 + P235
Cyclohexane		H225, H304, H315, H336, H410 P210, P261, P273, P301 + P310, P331, P501
Sulfate de magnésium anhydre	-	-
Vanilline		H319 P305 + P351 + P338
Ethylvanilline		H302, H305, H315, H319 P261, P305 + P351 + P338
Soude à 0,100 mol·L ⁻¹	-	-
Solution d'acide chlorhydrique à 1 mol·L ⁻¹		H290, H314, H335 P280, P303 + P361 + P353, P304 + P340, P305 + P351 + P338, P310
Solution d'acétate de zinc à 0,1000 mol·L ⁻¹ exactement		H302, H318, H411 P280, P305 + P351 + P338, P301 + P330 + P331, P310
Solution d'EDTA à 0,0400 mol·L ⁻¹ exactement	-	-
Orangé de xylénol	-	-

ANNEXE 4 : Phrases H et P

Mentions de danger

H200 : Explosif instable.
H201 : Explosif ; danger d'explosion en masse.
H202 : Explosif ; danger sérieux de projection.
H203 : Explosif ; danger d'incendie, d'effet de souffle ou de projection.
H204 : Danger d'incendie ou de projection.
H205 : Danger d'explosion en masse en cas d'incendie.
H220 : Gaz extrêmement inflammable.
H221 : Gaz inflammable.
H222 : Aérosol extrêmement inflammable.
H223 : Aérosol inflammable.
H224 : Liquide et vapeurs extrêmement inflammables.
H225 : Liquide et vapeurs très inflammables.
H226 : Liquide et vapeurs inflammables.
H228 : Matière solide inflammable.
H240 : Peut exploser sous l'effet de la chaleur.
H241 : Peut s'enflammer ou exploser sous l'effet de la chaleur.
H242 : Peut s'enflammer sous l'effet de la chaleur.
H250 : S'enflamme spontanément au contact de l'air.
H251 : Matière auto-échauffante ; peut s'enflammer.
H252 : Matière auto-échauffante en grandes quantités ; peut s'enflammer.
H260 : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables qui peuvent s'enflammer spontanément.
H261 : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables.
H270 : Peut provoquer ou aggraver un incendie ; comburant.
H271 : Peut provoquer un incendie ou une explosion ; comburant puissant.
H272 : Peut aggraver un incendie ; comburant.
H280 : Contient un gaz sous pression ; peut exploser sous l'effet de la chaleur.
H281 : Contient un gaz réfrigéré ; peut causer des brûlures ou blessures cryogéniques.
H290 : Peut être corrosif pour les métaux.
H300 : Mortel en cas d'ingestion.
H301 : Toxique en cas d'ingestion.
H302 : Nocif en cas d'ingestion.
H304 : Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires.
H310 : Mortel par contact cutané.
H311 : Toxique par contact cutané.
H312 : Nocif par contact cutané.
H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
H315 : Provoque une irritation cutanée.
H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.
H318 : Provoque des lésions oculaires graves.
H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.
H330 : Mortel par inhalation.
H331 : Toxique par inhalation.
H332 : Nocif par inhalation.
H334 : Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
H335 : Peut irriter les voies respiratoires.
H336 : Peut provoquer somnolence ou vertiges.
H340 : Peut induire des anomalies génétiques
H341 : Susceptible d'induire des anomalies génétiques
H350 : Peut provoquer le cancer
H350i : Peut provoquer le cancer par inhalation.
H351 : Susceptible de provoquer le cancer
H360 : Peut nuire à la fertilité ou au fœtus
H360F : Peut nuire à la fertilité.
H360D : Peut nuire au fœtus.
H360FD : Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H360Fd : Peut nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.
H360Df : Peut nuire au fœtus. Susceptible de nuire à la fertilité.
H361 : Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus
H361f : Susceptible de nuire à la fertilité
H361d : Susceptible de nuire au fœtus
H361fd : Susceptible de nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.
H362 : Peut-être nocif pour les bébés nourris au lait maternel.
H370 : Risque avéré d'effets graves pour les organes
H371 : Risque présumé d'effets graves pour les organes

H372 : Risque avéré d'effets graves pour les à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
H373 : Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
H300+H310 : Mortel par ingestion ou par contact cutané.
H300+H330 : Mortel par ingestion ou par inhalation.
H310+H330 : Mortel par contact cutané ou par inhalation.
H300+H310+H330 : Mortel par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.
H301+H311 : Toxique par ingestion ou par contact cutané.
H301+H331 : Toxique par ingestion ou par inhalation.
H311+H331 : Toxique par contact cutané ou par inhalation.
H301+H311+H331 : Toxique par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.
H302+H312 : Nocif en cas d'ingestion ou de contact cutané.
H302+H332 : Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation.
H312+H332 : Nocif en cas de contact cutané ou d'inhalation.
H302+H312+H332 : Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation.
H400 : Très toxique pour les organismes aquatiques.
H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
H413 : Peut être nocif à long terme pour les organismes aquatiques.
H420 : Nuit à la santé publique et à l'environnement en détruisant l'ozone dans la haute atmosphère.

Conseils de prudence

P101 : En cas de consultation d'un médecin, garder à disposition le récipient ou l'étiquette
P102 : Tenir hors de portée des enfants.
P103 : Lire l'étiquette avant utilisation.
P201 : Se procurer les instructions avant l'utilisation.
P202 : Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P210 : Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes – Ne pas fumer.
P211 : Ne pas vaporiser sur une flamme nue ou sur toute autre source d'ignition.
P220 : Tenir/stocker à l'écart des vêtements/.../matières combustibles.
P221 : Prendre toutes précautions pour éviter de mélanger avec des matières combustibles/...
P222 : Ne pas laisser au contact de l'air.
P223 : Éviter tout contact avec l'eau, à cause du risque de réaction violente et d'inflammation spontanée.
P230 : Maintenir humidifié avec...
P231 : Manipuler sous gaz inerte.
P232 : Protéger de l'humidité.
P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.
P234 : Conserver uniquement dans le récipient d'origine.
P235 : Tenir au frais.
P240 : Mise à la terre/liaison équipotentielle du récipient et du matériel de réception.
P241 : Utiliser du matériel électrique/de ventilation/d'éclairage/.../ antidéflagrant.
P242 : Ne pas utiliser d'outils produisant des étincelles.
P243 : Prendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques.
P244 : S'assurer de l'absence de graisse ou d'huile sur les soupapes de réduction.
P250 : Éviter les abrasions/les chocs/.../les frottements.
P251 : Récipient sous pression : ne pas perforer, ni brûler, même après usage.
P260 : Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aéros
P262 : Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements.
P263 : Éviter tout contact avec la substance au cours de la grossesse/pendant l'allaitement.
P264 : Se laver ... soigneusement après manipulation.
P270 : Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant le produit.
P271 : Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.
P272 : Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.
P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P281 : Utiliser l'équipement de protection individuel requis.
P282 : Porter des gants isolants contre le froid/un équipement de protection des yeux/du visage.
P283 : Porter des vêtements résistants au feu/aux flammes/ignifuges.
P284 : Porter un équipement de protection respiratoire.
P285 : Lorsque la ventilation du local est insuffisante, porter un équipement de protection respiratoire.
P231+P232 : Manipuler sous gaz inerte. Protéger de l'humidité.
P235+P410 : Tenir au frais. Protéger du rayonnement solaire.

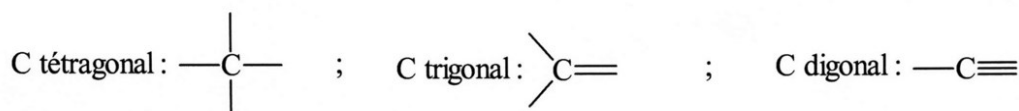
P310 : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P311 : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P312 : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
P313 : Consulter un médecin.
P314 : Consulter un médecin en cas de malaise.
P315 : Consulter immédiatement un médecin.
P320 : Un traitement spécifique est urgent (voir ... sur cette étiquette).
P321 : Traitement spécifique (voir ... sur cette étiquette).
P322 : Mesures spécifiques (voir ... sur cette étiquette).
P330 : Rincer la bouche.
P331 : NE PAS faire vomir.
P332 : En cas d'irritation cutanée :
P333 : En cas d'irritation/éruption cutanée :
P334 : Rincer à l'eau fraîche/poser une compresse humide.
P335 : Enlever avec précaution les particules déposées sur la peau.
P336 : Dégeler les parties gelées avec de l'eau tiède. Ne pas frotter les zones touchées.
P337 : Si l'irritation oculaire persiste :
P338 : Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P340 : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.
P341 : S'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.
P342 : En cas de symptômes respiratoires :
P350 : Laver avec précaution et abondamment à l'eau et au savon.
P351 : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes.
P352 : Laver abondamment à l'eau et au savon.
P353 : Rincer la peau à l'eau/se doucher.
P360 : Rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau les vêtements contaminés et la peau avant de les enlever.
P361 : Enlever immédiatement les vêtements contaminés.
P362 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.
P363 : Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.
P370 : En cas d'incendie :
P371 : En cas d'incendie important et s'il s'agit de grandes quantités :
P372 : Risque d'explosion en cas d'incendie.
P373 : NE PAS combattre l'incendie lorsque le feu atteint les explosifs.
P374 : Combattre l'incendie à distance en prenant les précautions normales.
P375 : Combattre l'incendie à distance à cause du risque d'explosion.
P376 : Obturer la fuite si cela peut se faire sans danger.
P377 : Fuite de gaz inflammé : Ne pas éteindre si la fuite ne peut pas être arrêtée sans danger.
P378 : Utiliser ... pour l'extinction.
P380 : Évacuer la zone.
P381 : Éliminer toutes les sources d'ignition si cela est faisable sans danger.
P390 : Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants.
P391 : Recueillir le produit répandu.
P301+P310 : EN CAS D'INGESTION : appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P301+P312 : EN CAS D'INGESTION : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
P301+P330+P331 : EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir.
P302+P334 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : rincer à l'eau fraîche/poser une compresse humide.
P302+P350 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver avec précaution et abondamment à l'eau et au savon.
P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon.
P303+P361+P353 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher.
P304+P340 : EN CAS D'INHALATION : transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.
P304+P341 : EN CAS D'INHALATION : s'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.
P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P306+P360 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES VÊTEMENTS : rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau les vêtements contaminés et la peau avant de les enlever.
P307+P311 : EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P308+P313 : EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.
P309+P311 : EN CAS d'exposition ou de malaise : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P332+P313 : En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin.
P333+P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.
P335+P334 : Enlever avec précaution les particules déposées sur la peau. Rincer à l'eau fraîche/poser une compresse humide.
P337+P313 : Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.
P342+P311 : En cas de symptômes respiratoires : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P370+P376 : En cas d'incendie : obturer la fuite si cela peut se faire sans danger.
P370+P378 : En cas d'incendie : utiliser de l'eau vaporisée pour l'extinction.
P370+P380 : En cas d'incendie : évacuer la zone.
P370+P380+P375 : En cas d'incendie : évacuer la zone. Combattre l'incendie à distance à cause du risque d'explosion.

P371+P380+P375 : En cas d'incendie important et s'il s'agit de grandes quantités : évacuer la zone. Combattre l'incendie à distance à cause du risque d'explosion.
P4xx : conseils de prudence de stockage
P402 : Stocker dans un endroit sec.
P403 : Stocker dans un endroit bien ventilé.
P404 : Stocker dans un récipient fermé.
P405 : Garder sous clef.
P406 : Stocker dans un récipient résistant à la corrosion/récipient en ... avec doublure intérieure résistant à la corrosion.
P407 : Maintenir un intervalle d'air entre les piles/palettes.
P410 : Protéger du rayonnement solaire.
P411 : Stocker à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F.
P412 : Ne pas exposer à une température supérieure à 50 °C / 122 °F.
P413 : Stocker les quantités en vrac de plus de ... kg / ... lb à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F.
P420 : Stocker à l'écart des autres matières.
P402+P404 : Stocker dans un endroit sec. Stocker dans un récipient fermé.
P403+P233 : Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche.
P403+P235 : Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais.
P410+P403 : Protéger du rayonnement solaire. Stocker dans un endroit bien ventilé.
P410+P412 : Protéger du rayonnement solaire. Ne pas exposer à une température supérieure à 50 °C / 122 °F.
P411+P235 : Stocker à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F. Tenir au frais.
P501 : Éliminer le contenu/récipient dans ...
P502 : Se reporter au fabricant/fournisseur pour des informations concernant la récupération/le recyclage.

ANNEXE 5 : Données en spectroscopie infrarouge

Liaison	Nature	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité
O-H alcool libre	Valence	3590-3650	F ; fine
O-H alcool lié	Valence	3200-3600	F ; large
N-H amine primaire : 2 bandes secondaire: 1 bande	Valence	3300-3500	m
N-H amide	Valence	3100-3500	F
C _{di} -H	Valence	≈ 3300	m ou f
C _{tri} -H	Valence	3030-3100	m
C _{tri} -H aromatique	Valence	3000-3100	m
C _{tet} -H	Valence	2850-2970	F
C _{tri} -H aldéhyde	Valence	2700-2900	m
O-H acide carboxylique	Valence	2500-3200	F à m ; large
C≡C	Valence	2100-2260	f
C≡N nitriles	Valence	2200-2260	F ou m
C=O anhydride	Valence	1800-1850 1740-1790	F ; 2 bandes
C=O chlorure d'acide	Valence	1790-1815	F
C=O ester	Valence	1735-1750	F
C=O aldéhyde et cétone	Valence	1700-1740	F
		abaissement de 20 à 30 cm ⁻¹ si conjugaison	
C=O acide carboxylique	Valence	1700-1725	F
C=O amide	Valence	1650-1700	F
C=C	Valence	1620-1690	m
C=C aromatique	Valence	1450-1600	Variable ; 3 ou 4 bandes
N=O (de -NO ₂) conjugué	Valence	1500-1550 1290-1360	F ; 2 bandes
N=N	Valence	1400-1500	f ; parfois invisible
C=N	Valence	1640-1690	F ou m
N-H amine ou amide	Déformation	1560-1640	F ou m
C _{tet} -H	Déformation	1430-1470	F
C _{tet} -H (CH ₃)	Déformation	1370-1390	F ; 2 bandes
O-H	Déformation	1260-1410	F
C _{tet} -O-C _{tet} (étheroxydes)	Valence	1070-1150	F
C _{tet} -OH (alcools)	Valence	1010-1200	
C _{tet} -O-C _{tri} (esters)	Valence	1050-1300	F ; 1 ou 2 bandes
C _{tri} -O-C _{tri} (anhydrides)			
C-N	Valence	1020-1220	m
C-C	Valence	1000-1250	F
C _{tri} -H de -HC=CH- (E)	Déformation	960-970	F
(Z)	Déformation	670-730	m
C _{tri} -H aromatique monosubstitué	Déformation	730-770 et 680-720	F ; 2 bandes
C _{tri} -H aromatique o-disubstitué	Déformation	735-770	F
m-disubstitué	Déformation	750-800 et 680-720	F et m ; 2 bandes
p-disubstitué	Déformation	800-860	F
C _{tet} -Cl	Valence	600-800	F
C _{tet} -Br	Valence	500-750	F
C _{tet} -I	Valence	≈ 500	F

F : fort ; m : moyen ;
f : faible



ANNEXE 6 : Données en RMN du proton et du carbone

Domaines de déplacements chimiques de divers protons

Type de proton	δ en ppm	Type de proton	δ en ppm
$>C(\text{cycle})=CH_2$	4,6	-CO-OH	8,5-13
$>C=CH_2$	5,3	$>C=C-OH$	11-17
-C=CH-	5,1	Ph-H	7,2
-C=CH- (cyclique)	5,3	R-OH	0,5-5,5
R-C \equiv C-H	3,1	N-OH	7,0-10,0
Ar-H (externe au cycle)	7,0-9,0	Ar-OH	4,0-7,5
$>C=CH-CO-$	5,9	Ar-OH (avec liaison H intramoléculaire)	5,5-12,5
-CH=C-CO-	6,8	R-NH-	
R-CHO	9,9	Ar-NH	0,5-3,0
Ar-CHO	9,9	R-CO-NH-	3,0-5,0
H-CO-O-	8	CHCl ₃	5,0-8,5
H-CO-N<	8	H ₂ O	7,2

Ar désigne un groupe aryle : substituant aromatique.

Domaines de déplacements chimiques de divers ¹³C

Type de carbone	δ en ppm	Type de carbone	δ en ppm
RCH ₃	5-35	CHCl ₃	77
R ₂ CH ₂	15-50	RCH ₂ NH ₂	20-70
R ₃ CH	30-60	RCH ₂ OH et RCH ₂ OR'	50-90
R ₄ C	25-40	RNO ₂	60-80
R ₂ C=CR ₂	100-150	RC \equiv N	110-130
RC \equiv CR'	50-95	RCONH ₂	150-170
aromatique	110-175	RCOCl et RCO-O-COR	150-170
RCH ₂ I	10-40	RCO ₂ R'	150-180
RCH ₂ Br	20-40	RCO ₂ H	160-190
RCH ₂ Cl	25-90	RCHO et RCOR'	190-220

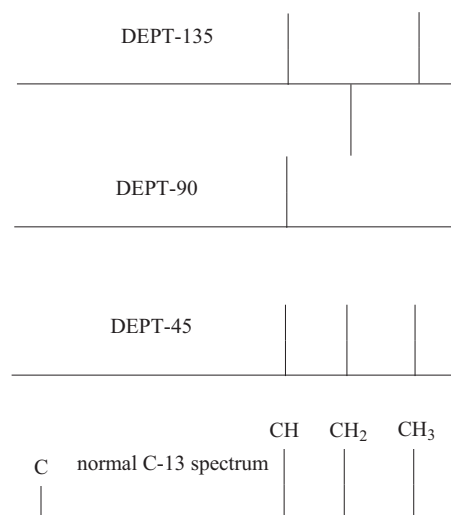
Séquences DEPT en RMN-¹³C

En RMN du carbone 13, les séquences DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer) permettent d'identifier le nombre d'atomes d'hydrogène liés à chaque atome de carbone donnant le signal. Ainsi les signaux des CH, CH₂, CH₃ et des carbones quaternaires (liés à aucun H) sont différenciés.

Un spectre DEPT 135 fait apparaître les signaux des CH et CH₃ d'un côté du plan défini par la ligne de base, et les signaux des CH₂ de l'autre côté du plan.

Un spectre DEPT 90 ne fait apparaître des signaux que pour des carbones liés à un seul atome d'hydrogène : CH.

Quelle que soit la séquence DEPT (45, 90 ou 135), aucun signal n'apparaît pour un carbone quaternaire.



6. Classification périodique

numéro atomique → masse atomique en $g \cdot mol^{-1}$ (1) → symbole (2) → nom

légende

notes : (1) basé sur le ^{12}C
 (2) état physique du corps pur simple à 25 °C et 1,013 bar :
 noir = solide ; rouge = gaz ; vert = liquide ; violet = préparé par synthèse

I	1 1,0 H Hydrogène	2 4,0 He Hélium
II	3 6,9 Li Lithium	4 9,0 Be Béryllium
III	11 23,0 Na Sodium	12 24,3 Mg Magnésium
IV	19 39,1 K Potassium	20 40,1 Ca Calcium
V	37 85,5 Rb Rubidium	38 87,6 Sr Strontium
VI	55 132,9 Cs Césium	56 137,3 Ba Baryum
VII	87 223 Fr Francium	88 226 Ra Radium
	89 227 Ac Actinium	
	90 232,0 Th Thorium	91 231,0 Pa Protactinium
	92 238,0 U Uranium	93 237,0 Np Neptunium
	94 242 Pu Plutonium	95 243 Am Americium
	96 247 Cm Curium	97 247 Bk Berkélium
	98 251 Cf Californium	99 254 Es Einsteinium
	100 253 Fm Fermium	101 256 Md Mendélévium
	102 254 No Nobelium	103 257 Lr Lawrencium
	104 261 Rf Rutherfordium	105 262 Db Dubnium
	106 263 Sg Seaborgium	107 261 Bh Bohrium
	108 265 Hs Hassium	109 264 Mt Meitnerium
	110 268 Ds Darmstadtium	111 268 Rg Roentgenium
	112 277 Cn Copernicium	113 278 Nh Nihonium
	114 285 Fl Flerovium	115 284 Mc Moscovium
	116 289 Lv Livermorium	117 289 Ts Tennessine
	118 294 Og Oganesson	119 293 Uu Ununennium
	120 293 Uub Unbibium	121 293 Uut Untrium
	122 293 Uuq Unquadrium	123 293 Uuq Unquadrium
	124 293 Uuq Unquadrium	125 293 Uuq Unquadrium
	126 293 Uuq Unquadrium	127 293 Uuq Unquadrium
	128 293 Uuq Unquadrium	129 293 Uuq Unquadrium
	130 293 Uuq Unquadrium	131 293 Uuq Unquadrium
	132 293 Uuq Unquadrium	133 293 Uuq Unquadrium
	134 293 Uuq Unquadrium	135 293 Uuq Unquadrium
	136 293 Uuq Unquadrium	137 293 Uuq Unquadrium
	138 293 Uuq Unquadrium	139 293 Uuq Unquadrium
	140 293 Uuq Unquadrium	141 293 Uuq Unquadrium
	142 293 Uuq Unquadrium	143 293 Uuq Unquadrium
	144 293 Uuq Unquadrium	145 293 Uuq Unquadrium
	146 293 Uuq Unquadrium	147 293 Uuq Unquadrium
	148 293 Uuq Unquadrium	149 293 Uuq Unquadrium
	150 293 Uuq Unquadrium	151 293 Uuq Unquadrium
	152 293 Uuq Unquadrium	153 293 Uuq Unquadrium
	154 293 Uuq Unquadrium	155 293 Uuq Unquadrium
	156 293 Uuq Unquadrium	157 293 Uuq Unquadrium
	158 293 Uuq Unquadrium	159 293 Uuq Unquadrium
	160 293 Uuq Unquadrium	161 293 Uuq Unquadrium
	162 293 Uuq Unquadrium	163 293 Uuq Unquadrium
	164 293 Uuq Unquadrium	165 293 Uuq Unquadrium
	166 293 Uuq Unquadrium	167 293 Uuq Unquadrium
	168 293 Uuq Unquadrium	169 293 Uuq Unquadrium
	170 293 Uuq Unquadrium	171 293 Uuq Unquadrium
	172 293 Uuq Unquadrium	173 293 Uuq Unquadrium
	174 293 Uuq Unquadrium	175 293 Uuq Unquadrium
	176 293 Uuq Unquadrium	177 293 Uuq Unquadrium
	178 293 Uuq Unquadrium	179 293 Uuq Unquadrium
	180 293 Uuq Unquadrium	181 293 Uuq Unquadrium
	182 293 Uuq Unquadrium	183 293 Uuq Unquadrium
	184 293 Uuq Unquadrium	185 293 Uuq Unquadrium
	186 293 Uuq Unquadrium	187 293 Uuq Unquadrium
	188 293 Uuq Unquadrium	189 293 Uuq Unquadrium
	190 293 Uuq Unquadrium	191 293 Uuq Unquadrium
	192 293 Uuq Unquadrium	193 293 Uuq Unquadrium
	194 293 Uuq Unquadrium	195 293 Uuq Unquadrium
	196 293 Uuq Unquadrium	197 293 Uuq Unquadrium
	198 293 Uuq Unquadrium	199 293 Uuq Unquadrium
	200 293 Uuq Unquadrium	201 293 Uuq Unquadrium
	202 293 Uuq Unquadrium	203 293 Uuq Unquadrium
	204 293 Uuq Unquadrium	205 293 Uuq Unquadrium
	206 293 Uuq Unquadrium	207 293 Uuq Unquadrium
	208 293 Uuq Unquadrium	209 293 Uuq Unquadrium
	210 293 Uuq Unquadrium	211 293 Uuq Unquadrium
	212 293 Uuq Unquadrium	213 293 Uuq Unquadrium
	214 293 Uuq Unquadrium	215 293 Uuq Unquadrium
	216 293 Uuq Unquadrium	217 293 Uuq Unquadrium
	218 293 Uuq Unquadrium	219 293 Uuq Unquadrium
	220 293 Uuq Unquadrium	221 293 Uuq Unquadrium
	222 293 Uuq Unquadrium	223 293 Uuq Unquadrium
	224 293 Uuq Unquadrium	225 293 Uuq Unquadrium
	226 293 Uuq Unquadrium	227 293 Uuq Unquadrium
	228 293 Uuq Unquadrium	229 293 Uuq Unquadrium
	230 293 Uuq Unquadrium	231 293 Uuq Unquadrium
	232 293 Uuq Unquadrium	233 293 Uuq Unquadrium
	234 293 Uuq Unquadrium	235 293 Uuq Unquadrium
	236 293 Uuq Unquadrium	237 293 Uuq Unquadrium
	238 293 Uuq Unquadrium	239 293 Uuq Unquadrium
	240 293 Uuq Unquadrium	241 293 Uuq Unquadrium
	242 293 Uuq Unquadrium	243 293 Uuq Unquadrium
	244 293 Uuq Unquadrium	245 293 Uuq Unquadrium
	246 293 Uuq Unquadrium	247 293 Uuq Unquadrium
	248 293 Uuq Unquadrium	249 293 Uuq Unquadrium
	250 293 Uuq Unquadrium	251 293 Uuq Unquadrium
	252 293 Uuq Unquadrium	253 293 Uuq Unquadrium
	254 293 Uuq Unquadrium	255 293 Uuq Unquadrium
	256 293 Uuq Unquadrium	257 293 Uuq Unquadrium
	258 293 Uuq Unquadrium	259 293 Uuq Unquadrium
	260 293 Uuq Unquadrium	261 293 Uuq Unquadrium
	262 293 Uuq Unquadrium	263 293 Uuq Unquadrium
	264 293 Uuq Unquadrium	265 293 Uuq Unquadrium
	266 293 Uuq Unquadrium	267 293 Uuq Unquadrium
	268 293 Uuq Unquadrium	269 293 Uuq Unquadrium
	270 293 Uuq Unquadrium	271 293 Uuq Unquadrium
	272 293 Uuq Unquadrium	273 293 Uuq Unquadrium
	274 293 Uuq Unquadrium	275 293 Uuq Unquadrium
	276 293 Uuq Unquadrium	277 293 Uuq Unquadrium
	278 293 Uuq Unquadrium	279 293 Uuq Unquadrium
	280 293 Uuq Unquadrium	281 293 Uuq Unquadrium
	282 293 Uuq Unquadrium	283 293 Uuq Unquadrium
	284 293 Uuq Unquadrium	285 293 Uuq Unquadrium
	286 293 Uuq Unquadrium	287 293 Uuq Unquadrium
	288 293 Uuq Unquadrium	289 293 Uuq Unquadrium
	290 293 Uuq Unquadrium	291 293 Uuq Unquadrium
	292 293 Uuq Unquadrium	293 293 Uuq Unquadrium

ANNEXE 8 : Feuille de résultats

Numéro de poste :

I. Vanilline et éthylvanilline

1. Extraction et identification de l'arôme vanille contenu dans un sachet de sucre

Coller la CCM réalisée

Substance identifiée responsable du goût vanille :

2. Dosage de l'arôme vanille contenu dans le sucre étudié

Masse de sucre aromatisé goût vanille utilisée :

Volume de solution préparée :

Absorbance mesurée :

Concentration en arôme vanille dans la solution préparée :

Pourcentage massique d'arôme vanille contenu dans le sucre aromatisé analysé :

II. La levure de boulanger

2. Un analogue de la levure de boulanger : la levure chimique

Masse m_1 de levure utilisée pour la préparation de la solution : $m_1 =$

Premier essai : $V_{eq1} =$

Second essai : $V_{eq2} =$

Masse m_2 de dihydrogénopyrophosphate de sodium $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ contenue dans la masse m_1 de levure chimique :

Expression littérale	Application numérique
$m_2 =$	

Pourcentage massique de dihydrogénopyrophosphate de sodium dans la levure :

Expression littérale	Application numérique

RAPPORT DU JURY DE TP DE CHIMIE

Molécules naturelles et analogues de synthèse

Statistiques des résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **09,61 / 20**
- Meilleure note : **16,20 / 20**
- Note la plus basse : **04,10 / 20**
- 8 notes sur 21 (**38 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20
- Moyenne des candidats admis : **10,31 / 20**

L'épreuve de travaux pratiques de chimie de cette année s'intéressait aux molécules naturelles et analogues de synthèse.

La partie expérimentale, répartie dans les parties I et II portait sur la réalisation de :

- l'extraction puis l'identification par chromatographie sur couche mince (CCM) de la molécule responsable de l'arôme vanille (vanilline ou éthylvanilline) dans un sucre aromatisé (partie I) ;
- la détermination du pourcentage massique de l'arôme identifié par spectroscopie d'absorption moléculaire (partie I) ;
- la détermination du pourcentage massique de dihydrogénopyrophosphate de sodium dans une levure chimique (partie II).

L'étude expérimentale réalisée était complétée par l'analyse de différentes voies de synthèse de la vanilline, la différenciation entre produit naturel et identique au naturel (partie I) puis par l'utilisation de la levure en boulangerie ainsi qu'en chimie organique (partie II).

Le jury rappelle que la note finale accorde une importance similaire à la partie expérimentale (questions 1 à 4, 6 à 7 et 28 à 34 ; feuille de résultats ; qualité des manipulations) et à la partie théorique, soit l'intégralité du reste du sujet.

Bien que le temps accordé à la manipulation par les candidats ait été conséquent, le jury a constaté des difficultés quant à l'organisation dans la mise en œuvre de trois manipulations pourtant relativement courtes et indépendantes, mais aussi dans la compréhension des manipulations réalisées. Il est conseillé aux candidats de noter leurs résultats expérimentaux sur la feuille de résultats prévue à cet effet (ou éventuellement sur la copie). Trop de copies comportent des données expérimentales incomplètes.

Le soin apporté aux copies est inégal et souvent insuffisant pour de futurs enseignants.

Enfin, le jury est sensible à une attitude respectueuse des consignes de sécurité et de l'environnement :

- le port des lunettes est obligatoire dès qu'un candidat commence à manipuler et jusqu'à la sortie de la salle ;
- les coupelles de pesée contenant des poudres doivent être placées dans une boîte de Petri fermée lors des déplacements dans le laboratoire ;
- l'utilisation des gants doit être raisonnée. Leur emploi n'est nécessaire que lors de la manipulation de produits présentant des dangers. Ils sont à retirer lors de la rédaction du compte-rendu et de l'emploi de la calculatrice ou de l'ordinateur ;
- des quantités minimales de substances chimiques et consommables doivent être utilisées (préparation de l'éluant pour la CCM, papier pH).

I. Vanilline et éthylvanilline

Partie expérimentale

Les choix expérimentaux doivent être réfléchis. Ainsi, un volume de phase aqueuse ou de phase organique n'a pas à être prélevé à la pipette jaugée, une éprouvette graduée suffit. De même, on ne choisira pas une balance dont l'affichage est à 0,0001 g pour l'extraction puis identification de l'arôme vanille contenu dans le sucre (analyse non quantitative) alors que la détermination du pourcentage massique en arôme dans le sucre (analyse quantitative) nécessite une grande précision.. Enfin, s'il n'est pas nécessaire de chercher à peser exactement la masse calculée, il est en revanche indispensable d'effectuer les calculs avec la masse réellement pesée et connue avec précision (l'utilisation de la balance dont l'affichage est à 0,0001 g est alors nécessaire).

Trop de candidats ne savent pas concevoir et exploiter un dosage par étalonnage (les points expérimentaux permettant de tracer la courbe d'étalonnage étant pourtant fournis dans l'énoncé).

Gestes techniques en chimie organique :

Lors de la réalisation des manipulations, le jury rappelle que :

- Un candidat doit savoir identifier la position des phases aqueuse et organique et prélever les échantillons à bon escient ;
- Le bouchon de l'ampoule à décanter doit être retiré dès lors qu'elle est posée sur son support (risque de surpression et impossibilité d'écoulement).

D'autre part :

- Le séchage d'une phase organique n'est pas compris ni maîtrisé ;
- La réalisation des CCM est globalement satisfaisante. En revanche la connaissance des phénomènes physiques associés est insuffisante. En particulier, l'usage d'eau (en tant que solvant ou éluant) est extrêmement rare avec des produits organiques.

Partie théorique

Les mécanismes réactionnels ont été globalement peu traités : le mouvement des électrons formalisé par des flèches est attendu (plutôt qu'une phrase descriptive) et toutes les étapes doivent être détaillées.

Le jury rappelle qu'une bande d'absorption en IR n'est pas caractéristique d'une fonction, mais d'une liaison entre deux atomes.

II. La levure de boulanger

Partie expérimentale

Le sujet proposait un protocole complètement guidé qui a plutôt bien été mis en œuvre.

L'exploitation du dosage en retour est en revanche problématique pour beaucoup. En particulier, l'absence d'écriture des équations de réaction mises en jeu ne permet pas d'aboutir.

La détermination de l'équivalence par changement de couleur est souvent mal réalisée : les deux essais doivent correspondre à la même couleur à l'équivalence. Il est recommandé, une fois l'équivalence repérée, d'ajouter une goutte supplémentaire de réactif titrant afin de s'assurer que la couleur n'évolue plus.

Partie théorique

L'équation de réaction était attendue pour la fermentation éthanolique et non les étapes du processus biochimique.

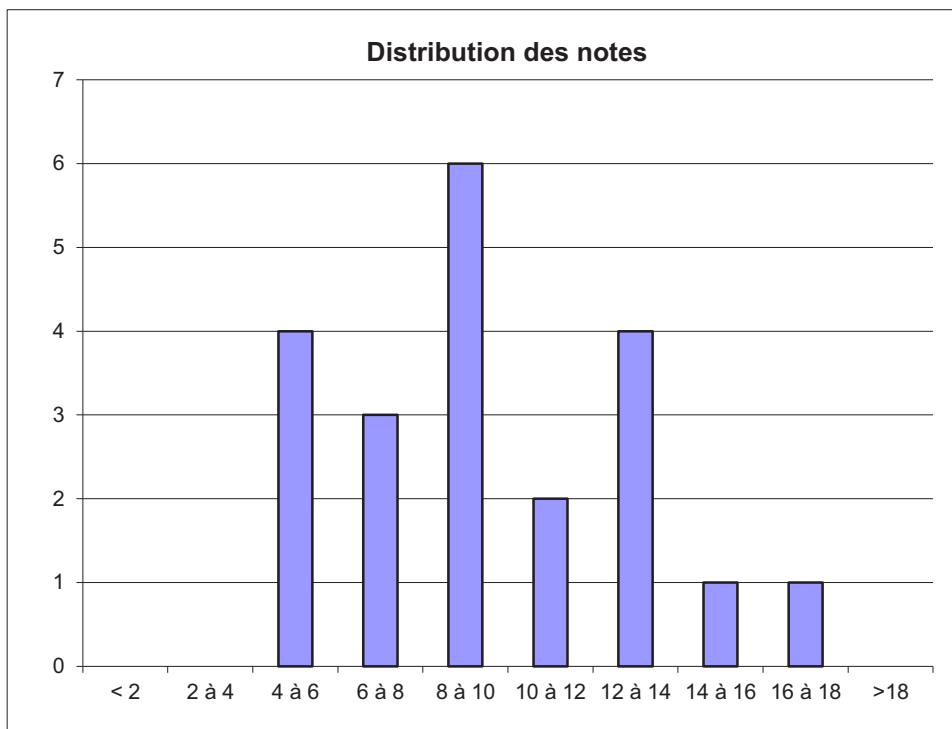
L'énoncé proposait des grandeurs de combustion : l'écriture des équations de réaction associées est un préalable à leur utilisation. Ceci aurait évité des erreurs de signe, conduisant à une fermentation éthanolique endergonique.

Il est rappelé qu'un rendement ne peut être ni négatif ni supérieur à 100 %. En cas de valeur aberrante, une analyse critique est attendue et valorisée.

L'écriture d'une configuration électronique est quant à elle globalement maîtrisée

Répartition des taux de réponses et des pourcentages de bonnes réponses du sujet

Moyenne **09,6 / 20**
Ecart type **3,5**



I. Vanilline et éthylvanilline																		
N° question	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
% réponses	95	95	100	71	71	67	62	57	76	52	48	14	90	86	76	33	67	38
% bonnes réponses	75	58	62	7	60	80	61	14	53	36	90	33	95	72	38	71	79	41

II. La levure de boulanger																	
N° question	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
% réponses	76	62	71	43	57	38	90	81	81	81	52	62	48	48	48	48	43
% bonnes réponses	67	85	39	33	92	25	84	57	63	88	55	64	49	63	20	40	13

II. La levure de boulanger								
N° question	36	37	38	39	40	41	42	43
% réponses	43	48	33	29	19	33	24	19
% bonnes réponses	61	40	40	29	75	57	80	29

ÉPREUVE ORALE DE LEÇON

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

SUJETS

BIOCHIMIE	MICROBIOLOGIE	BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE
Le cytosquelette et les mouvements intracellulaires.	Les vaccins.	La plasticité : de la cellule au système nerveux.
La plasticité de la structure tridimensionnelle des protéines.	La variabilité génomique des virus.	Les modulations de la neurotransmission.
Les interactions enzyme-substrat.	Les procaryotes vivant en conditions extrêmes.	Les bicarbonates : rôle dans la physiologie de l'organisme.
Les conversions énergétiques cellulaires.	Microbes et cancer.	La membrane plasmique.
Protéines kinases et voies de signalisation intracellulaires.	Les infections virales : du diagnostic à la thérapeutique.	Les bases physiologiques de la maîtrise de la reproduction humaine.
	Les bactéries intracellulaires obligatoires.	L'adaptation à l'altitude.
	Les flores microbiennes chez l'homme.	Les adaptations métaboliques et physiologiques à l'exercice musculaire.
	Les virus neurotropes.	

RAPPORT DU JURY DE LEÇONS

Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **09,90 / 20**
- Meilleure note : **19,00 / 20**
- Note la plus basse : **04,00 / 20**
- 9 notes sur 20 (**45 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20
- Moyenne des candidats admis **13,50 / 20**

Commentaires généraux

Il convient de rappeler que le candidat doit effectuer une présentation didactique et pédagogique au niveau le plus élevé des connaissances actuelles dans l'une des trois disciplines explicitement nommée sur le sujet (Biochimie, Microbiologie ou Biologie Cellulaire et Physiologie).

L'objectif pour les candidats est de présenter très clairement une leçon structurée et illustrée, qui met en avant les connaissances actuelles dans un domaine donné. Le candidat doit donc faire l'effort d'un vrai travail de conceptualisation, de synthèse et d'organisation pédagogique. La problématique du sujet doit être cernée, les idées hiérarchisées et un choix de concepts et notions à présenter est indispensable dans le temps limité de la leçon. Toutes les leçons doivent être traitées à toutes les échelles possibles, de la molécule à l'organisme dans son environnement, qui doit lui aussi être pris en compte si le sujet proposé le permet. Elles ne peuvent être réduites à un cours tel qu'il serait présenté à des élèves. Il est fondamental de ne pas restreindre l'exposé à une succession d'items non articulés entre eux. L'exposé doit montrer une intégration des relations structure-fonction jusqu'à l'échelle de la molécule et ne pas rester aux niveaux supérieurs d'organisation, même dans le cadre de leçon de physiologie (et biologie cellulaire) ou de microbiologie.

L'épreuve de leçon est donc avant tout une épreuve de synthèse qui nécessite de la part du candidat de connaissances solides mais aussi une prise de distance qui lui permet de dégager les concepts clés à développer. Les sujets couvrant un large champ de connaissances n'appellent pas une présentation exhaustive de toutes les notions mais nécessitent une composition fondée sur la sélection des exemples les plus pertinents par rapport à la démarche choisie par le candidat. À chaque fois que cela est possible, la présentation des concepts, notions ou modèles, devrait pouvoir s'appuyer sur une démarche de démonstration fondée sur des observations biologiques notamment d'origine expérimentale.

Cette épreuve nécessite donc un travail de fond durant toute la préparation au concours. En particulier, une bonne connaissance des ouvrages mis à disposition est un atout majeur permettant d'effectuer une sélection pertinente pour être efficace au cours de la préparation. Il est en effet illusoire de réaliser une synthèse d'un nombre trop important d'ouvrages en quatre heures de préparation.

Remarques sur la présentation

Le candidat dispose de 45 minutes sans interruption pour présenter sa leçon, temps suivi de 15 minutes d'entretien.

Le jury rappelle que l'introduction doit permettre de cerner le sujet et de préciser les notions permettant de dégager la problématique centrale. Les termes du sujet doivent donc être analysés et non seulement définis, afin de dégager une problématique réellement construite.

L'exposé doit être structuré en parties ; l'annonce du plan projette les auditeurs sur le déroulement ultérieur tout en apportant une légitimité aux choix effectués. Il n'est pas nécessaire d'utiliser tout l'espace du tableau disponible pour le plan, mais il est important pour la compréhension de la leçon que le déroulé du plan apparaisse tout au long de l'exposé. Pour cela, le diaporama et le tableau doivent être utilisés de façon complémentaire et judicieuse. Le tableau est avant tout un support dynamique pour étayer la démonstration (schémas explicatifs, équations, schémas ou tableaux de synthèse...). Dans ce contexte où le tableau peut être effacé, le jury appréciera que le plan soit affiché ou projeté à la fin de l'exposé, et à disposition pour l'entretien.

En ce qui concerne les supports (images et photos), le jury rappelle aux candidats que la possibilité de prendre des photos (qui doivent être de qualité suffisante pour être lisibles) ne doit pas faire oublier qu'il est primordial d'effectuer des choix pertinents. Toute illustration présentée doit être vraiment exploitée pour étayer la démonstration.

Par ailleurs, le jury apprécie tout particulièrement la construction de documents didactiques personnels (schémas, tableaux, organigrammes, cartes heuristiques...), qui témoignent de l'appropriation et de la maîtrise du sujet.

La conclusion ne peut être réduite à un simple résumé des notions évoquées au cours de la leçon. Elle doit tirer davantage d'une démarche d'ouverture sur des projets de recherche, des enjeux éthiques, économiques, sociétaux, de santé publique et/ou des applications biotechnologiques ou biomédicales.

Le jury a apprécié les grandes qualités de communication de certains candidats : respect du temps imparti, structuration de l'exposé, dynamisme et posture enseignante, qualité des supports, du plan, des conclusions partielles, des transitions, l'ensemble apportant de la légitimité au propos. Le jury a apprécié les candidats capables de se détacher de leurs notes pendant leur présentation, comme celles et ceux qui s'attachaient à regarder le jury auquel ils ou elles s'adressaient. De même il est attendu de futurs enseignants d'être en mesure d'expliquer clairement les phénomènes biologiques ou les techniques présentés, le choix du vocabulaire scientifique ou technologique est alors essentiel à l'explication et permettent d'en montrer la maîtrise.

Rappelons aussi que doivent figurer sur les diapositives les illustrations supportant le propos, éventuellement accompagnées d'un texte de longueur raisonnable permettant au candidat de présenter des notions et concepts qu'il souhaite développer dans sa leçon. Des diapositives support d'un texte lu dans son intégralité n'ont aucune valeur pédagogique et empêchent le candidat d'avoir une posture communicante avec l'auditoire. Le jury regrette également que certains diaporamas soient presque exclusivement constitués de clichés photographiques souvent illisibles (flous, de trop petite dimension, pas assez contrastés) sans plan, ni annotations permettant de structurer leur analyse. Il est par ailleurs dommage que certains candidats se contentent de lire leurs notes plutôt que de commenter de manière argumentée les figures présentées. Le tableau pourrait être davantage utilisé en cours d'exposé (illustrations, schémas de synthèse, construction de tableau, courbes, croquis, ...).

Dans le respect du droit d'auteur, il est attendu que la source de chaque illustration soit mentionnée. Cependant, au regard des contraintes de temps de préparation, il est toléré que la liste des ouvrages utilisés soit indiquée au terme de la présentation.

Remarques sur l'entretien

Le jury, au cours d'un entretien de 15 minutes, demande au candidat :

- d'éclaircir, d'approfondir et de compléter certains points de la leçon ;
- d'élargir le sujet dans des domaines connexes ou non abordés.

Pour cet entretien, le jury attend un niveau d'expression orale en rapport avec la posture de futur(e) professeur(e) agrégé(e) de Biochimie – Génie Biologique, tant au niveau du vocabulaire scientifique que de la pratique de la langue française.

Le plus souvent, les candidats ont fait preuve de qualité d'écoute, de réactivité et de probité intellectuelle. Une bonne maîtrise des fondamentaux technologiques et scientifiques, une approche réfléchie sont des atouts pour compenser, du moins partiellement, une prestation orale jugée perfectible.

Lors de l'entretien, il est attendu que le candidat fasse preuve de bon sens, de recul par rapport au sujet traité. Pour cela, il doit posséder des connaissances qui ne se limitent pas au cadre parfois trop restreint de son étude.

Le jury a apprécié que certains candidats fournissent des réponses très argumentées, étayées par des schémas ou dessins.

Le jury rappelle que l'entretien n'est pas qu'une succession de réponses ponctuelles aux questions posées, mais le plus souvent l'occasion de réfléchir à voix haute en prolongeant l'échange, par une communication véritable entre biologistes. Il est attendu des candidats qu'ils soient capables

de se remettre en question lorsque cela leur est suggéré par le jury et de réagir constructivement en proposant une interprétation ou une argumentation différente de celle proposée au départ.

Rapport sur les leçons de Biochimie

Les sujets posés en biochimie cette année proposaient aux candidats de faire une synthèse autour d'une problématique énoncée dans le titre de la leçon. Un effort était donc nécessaire pour les candidats pour cibler de manière claire la problématique associée à la leçon afin de sélectionner les exemples les plus pertinents pour éclairer les divers concepts associés. Les candidats qui ont réussi leur leçon sont donc ceux qui ont pris le temps d'analyser les termes du sujet pour dégager un questionnement qui a servi de base à la construction de leur leçon. En particulier, le jury a apprécié l'utilisation du dictionnaire pour questionner les limites du terme « plasticité » avant de l'appliquer aux champs de la biochimie des protéines. De même, la présentation des concepts et enjeux associés à la signalisation cellulaire a permis d'apporter un cadre de réflexion pour la construction de la leçon sur les protéines kinases. Au contraire, les candidats qui n'ont pas pris le temps de questionner les termes de l'énoncé (interactions, conversion, mouvement) sont passés à côté des concepts clés associés avec leur sujet.

Par ailleurs, le jury a souvent regretté, lors des leçons mais aussi des entretiens, le manque de maîtrise dans des concepts fondamentaux de la biochimie (affinité, cinétique Michaelienne, allostérie). Enfin très peu de candidats ont démontré des connaissances vraiment approfondies et pointues dans le domaine de la biochimie.

Le jury rappelle que la spécialité de l'agrégation à laquelle se présentent les candidats est « Biochimie – Génie Biologique ». En conséquence le niveau de biochimie attendu par le jury est un niveau de Master pour l'ensemble des épreuves orales, ce qui inclut les réponses aux questions posées à l'issue des leçons de microbiologie et de biologie cellulaire et physiologie. Sans cette connaissance fondamentale des principaux fondamentaux de biochimie, il devient particulièrement difficile pour le candidat de mettre en perspective ses connaissances dans un cadre plus global se situant à l'échelle de l'organisme et pour plusieurs situations physiopathologiques.

Rapport sur les leçons de Microbiologie

Cette année encore, les sujets proposés étaient classiques et relativement ciblés, donc sans difficulté majeure pour un candidat bien préparé à cette épreuve. Certains candidats n'ont pas analysé les termes exacts du sujet proposé. Ceci a affecté leur compréhension de la problématique et limité leur exposé à seulement un des aspects qui devaient être développés. De trop nombreux candidats manquaient également d'une vision intégrée, en particulier sur les interactions du monde microbien avec leur environnement et leurs hôtes. Il est important de rappeler que la Microbiologie, en Bactériologie comme en Virologie, ne se limite pas à une classification et à quelques cycles viraux que trop de candidats utilisent de manière inappropriée ou injustifiée.

La plupart de sujets proposés cette année nécessitaient des connaissances fondamentales dans d'autres domaines, Biologie cellulaire et Physiologie ou Biochimie, ce qui donnait tout son sens à la problématique de la leçon. Ces notions n'ont, très souvent, pas été introduites de manière satisfaisante (globales et synthétiques, ou ponctuelles pour illustration précise) et n'ont même parfois pas été évoquées (par exemple, bases de cancérogénèse dans une leçon sur « Microbes et cancers »).

Pour certains candidats, le niveau de connaissance en immunologie et en biologie cellulaire est encore trop faible pour permettre une discussion à la hauteur de cet exercice.

Rapport sur les leçons de Biologie Cellulaire et Physiologie

Les sujets de biologie cellulaire et physiologie concernent un large champ notionnel, de la molécule à l'organisme dans son environnement.

Leur libellé, souvent très général (comme par exemple « La membrane plasmique » ou « L'adaptation à l'altitude ») impose aux candidats de proposer un plan construit sur des concepts plutôt que de rechercher une exhaustivité dans les notions. Malheureusement, c'est souvent cette deuxième attitude qui est constatée et qui conduit à des listes plus ou moins organisées de notions égrenées dans un exposé fastidieux.

Les sujets de biologie cellulaire et physiologie doivent donc être abordés à toutes les échelles possibles et étayés par des mécanismes physico-chimiques replacés dans leur contexte physiologique. Les complémentarités et coopérations entre systèmes et/ou organes sont à considérer ainsi que les interactions de l'organisme avec l'environnement défini dans son sens le plus large, incluant le microbiote.

Enfin, il est rappelé que la structure et le fonctionnement du système nerveux font partie du programme de l'agrégation. À ce titre ces notions doivent être travaillées par les candidats, y compris dans leurs développements les plus récents : interaction neurones – cellules gliales, plasticité fonctionnelle,...

Le jury souhaite tout de même féliciter certains candidats qui ont réussi à proposer des exposés synthétiques, construits à partir d'une problématique pertinente et des documents sur lesquels ils ont su appuyer leurs démonstrations.

ÉPREUVE ORALE D'ÉTUDE CRITIQUE DE DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

SUJETS

Redessiner des toxines.	Naimuddin M, Kobayashi S, Tsutsui C, Machida M, Nemoto N, Sakai T, Kubo T Directed evolution of a three-finger neurotoxin by using cDNA display yields antagonists as well as agonists of interleukin-6 receptor signaling <i>Molecular Brain</i> , 2011, vol. 4 (2), p. 1-16 (+ ADDITIONAL FILES sur la clé)
Agrégation des protéines.	M. Perchiacca JM, Bhattacharya M, Tessier PM Mutational analysis of domain antibodies reveals aggregation hotspots within and near the complementarity determining region <i>Proteins</i> , 2011, vol. 79, p. 2637-2647
Des synapses mitochondriales	Romanov RA, Lasher RS, High B, Savidge LE, Lawson A, Rogachevskaja OA, Zhao H, Rogachevsky VV, Bystrova MF, Churbanov GD, Adameyko I, Harkany T, Yang R, Kidd GJ, Marambaud P, Kinnamon JC, Kolesnikov SS, Finger TE Chemical synapses without synaptic vesicles: Purinergic neurotransmission through a CALHM1 channel-mitochondrial signaling complex <i>Science Signaling</i> , 2018, vol. 11, p. 1-11
Vitamine C & épigénétique.	Ma Z, Tanis JE, Taruno A, Foskett JK Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels <i>Plügers Archiv / European Journal of Physiology</i> , 2016, vol. 468(3), p. 395-403 (<i>non numérotées ici</i>)
Vitamine C & épigénétique.	Xue J-H, Chen G-D, Hao F, Chen H, Fang Z, Chen F-F, Pang B, Yang Q-L, Wei X, Fan Q-Q, Xin C, Zhao J, Deng X, Wang B-A, Zhang X-J, Chu Y, Tang H, Yin H, Ma W, Chen L, Ding J, Weinhold E, M. Kohli R, Liu W, Zhu Z-J, Huang K, Tang H, Xu G-L A vitamin-C-derived DNA modification catalysed by an algal TET homologue <i>Nature</i> , 2019, vol. 569, p. 581-585 (<i>non numérotés ici</i>) + METHODS (+ EXTENDED DATA sur la clé)
Virus et inflammation du tractus digestif.	Yang JY, Kim MS, Kim E, Cheon JH, Lee YS, Kim Y, Lee SH, Seo SU, Shin SH, Choi SS, Kim B, Chang SY, Ko HJ, Bae JW, Kweon MN Enteric Viruses Ameliorate Gut Inflammation via Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7-Mediated Interferon-β Production <i>Immunity</i> , 2016, vol 44 (4), p. 889-900 (+ SUPPLEMENTAL INFORMATION sur la clé)
Virus et inflammation du tractus digestif.	Karst SM Viral Safeguard: The Enteric Virome Protects Against Gut Inflammation <i>Immunity</i> , 2016, vol 44 (4), p. 715-718
Froid et thermogenèse : importance différentielle de l'ATGL entre cœur et tissu adipeux brun.	Schreiber R, Diwoky C, Schoiswohl G, Feiler U, Wongsiriraj N, Abdellatif M, Kolb D, Hoeks J, Kershaw EE, Sedej S, Schrauwen P, Haemmerle G, Zechner R Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue <i>Cell Metabolism</i> , 2017, vol. 26, p. 753-763
Froid et thermogenèse : importance différentielle de l'ATGL entre cœur et tissu adipeux brun.	Hankir MK, Klingenspor M Brown adipocyte glucose metabolism: a heated subject <i>EMBO Reports</i> , 2018, vol. e46404, p. 1-13

<p>La guerre des symbiontes ?</p>	<p>Speare L, Cecere AG, Guckes KR, Smith S, Wollenberg MS, Mandel MJ, Miyashiro T, Septer AN Bacterial symbionts use a type VI secretion system to eliminate competitors in their natural host <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2018, vol. 115 (36), p. E8528-E8537 (+ SUPPORTING INFORMATION sur la clé)</p>
<p>Des vibrisses fonctionnelles sans cortex à tonneaux.</p>	<p>Hong YK, Lacefield CO, Ridgers CC, Bruno RM Sensation, movement and learning in the absence of barrel cortex <i>Nature</i>, 2018, vol. 561, p. 542-546 (non numérotées ici) + METHODS</p> <p>Jiang J, Cui H, Rahmouni K Optogenetics and pharmacogenetics: principles and applications <i>American Journal of Physiology / Regulatory, Integrative and Comparative Physiology</i>, 2017, vol. 313, p. R633-R645</p>
<p>Transport intracellulaire des toxines.</p>	<p>Herrera C, Klokke TI, Cole R, Sandvig K, Mantis NJ A Bispecific Antibody Promotes Aggregation of Ricin Toxin on Cell Surfaces and Alters Dynamics of Toxin Internalization and Trafficking <i>PLoS ONE</i>, 2016, vol. 11 (6), p. 1-18. (+ SUPPORTING INFORMATION sur la clé : films non fournis)</p>
<p>Aptamères & antibiotiques.</p>	<p>Youn H, Lee K, Her J, Jeon J, Mok J, So JI, Shin S, Ban C Aptasensor for multiplex detection of antibiotics based on FRET strategy combined with aptamer / graphene oxide complex <i>Scientific Reports (Nature)</i>, 2019, vol. 9, art. 7659, p. 1-9 (+ SUPPLEMENTARY INFORMATION sur la clé)</p>
<p>Méthylation et cardiopathie.</p>	<p>Pyun JH, Kim HJ, Jeon MH, Ahn BY, Vuong TA, Lee DI, Choi S, Koo SH, Cho H, Kang JS Cardiac specific PRMT1 ablation causes heart failure through CaMKII dysregulation <i>Nature Communications</i>, 2018, vol. 9:5107, p. 1-15</p> <p>Andersen ME, Brown JH, Bers DM CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure <i>Journal of Molecular and Cellular Cardiology</i>, 2011, vol. 51, p. 468-473</p>
<p>Auto-immunité & anti-TNF.</p>	<p>Bitoun S, Nocturne G, Ly B, Krzysiek R, Roques P, Pruvost A, Paoletti A, Pascaud J, Dönnès P, Florence K, Gleizes A, Agns Hincelin-Mery A, Allez M, Hachein-Bey-Abina S, Mackay F, Pallardy M, Le Grand R, Mariette X Methotrexate and BAFF interaction prevents immunization against TNF inhibitors <i>Annals of the Rheumatic Diseases</i>, 2018, vol. 77 (10), p. 1463-1470 (numérotés 1 à 8 ici)</p>
<p>La vie après le biofilm.</p>	<p>Bartolini M, Cogliati S, Vileta D, Bauman C, Rateni L, Leñini C, Argañaraz F, Francisco M, Villalba JM, Steil L, Völker U, Grau R Regulation of Biofilm Aging and Dispersal in <i>Bacillus subtilis</i> by the Alternative Sigma Factor SigB <i>Journal of Bacteriology</i>, 2018, vol 201 (2), p.1-14 (+ SUPPLEMENTARY INFORMATION sur la clé)</p> <p>Cherny KE, Sauer K <i>Pseudomonas aeruginosa</i> requires the DNA-specific endonuclease EndA to degrade eDNA to disperse from the biofilm <i>Journal of Bacteriology</i>, 2019, p. 1-35 (non numérotées ici) [Epub ahead of print]</p>
<p>Immunité & infection HIV.</p>	<p>Alaoui L, Gustavo Palomino G, Zurawski S, Zurawski G, Coindre S, Dereuddre-Bosquet N, Lecuroux C, Goujard C, Vaslin B, Bourgeois C, Roques P, Le Grand R, Lambotte O, Favier B Early SIV and HIV infection promotes the LILRB2/MHC-I inhibitory axis in cDCs <i>Cellular and Molecular Life Science</i>, 2018, vol. 75, p. 1871-1887. (+ SUPPLEMENTARY MATERIAL sur la clé)</p>
<p>Microbiote et tissu adipeux.</p>	<p>Suárez-Zamorano N, Fabbiano S, Chevalier C, Stojanović O, Colin DJ, Stevanović A, Veyrat-Durebex C, Tarallo V, Rigo D, Germain S, Ilievska M, Montet X, Seimbille Y, Hapfelmeier S, Trajkovski M Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity <i>Nature Medicine</i>, 2015, vol. 21, p. 1497-1501 (numérotées 1 à 5 ici) + ONLINE METHODS</p> <p>Burcelin R, Pomié C Gut microbiota cool-down burning fat! The immune hypothesis <i>Trends in Endocrinology and Metabolism</i>, 2016, vol. 27(2), p. 67-68 (numérotées 1 à 2 ici)</p>
<p>Homing des lymphocytes T.</p>	<p>Guenin-Macé L, Carrette F, Asperti-Boursin F, Le Bon A, Caleechurn L, Di Bartolo V, Fontanet A, Bismuth G, Demangel C Mycolactone impairs T cell homing by suppressing microRNA control of L-selectin expression <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2011, vol. 108 (31), p. 2833-2838 (+ SUPPORTING INFORMATION + FILM sur la clé)</p>

Enzymes & résistance aux antibiotiques.	Naas T, Dortet L, Iorga BI Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases <i>Current Drug Targets</i> , 2016, vol. 17, p. 1006-1028
Nouvel aspect du quorum sensing chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.	Kostylev M, Kim DY, Smalley NE, Salukhe I, Greenberg EP, Dandekar AA Evolution of the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> quorum-sensing hierarchy <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i> , 2019, vol. 116 (14), p. 7027-7032 (+ SUPPLEMENTAL MATERIAL sur la clé) Chen R, Déziel E, Groleau MC, Schaefer AL, Greenberg EP Social cheating in a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> quorum-sensing variant <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i> , 2019, vol. 116 (14), p. 7021-7026 (+ SUPPLEMENTAL APPENDIX sur la clé)
Repliement de l'insuline et diabète.	Riahi Y, Israeli T, Yeroslaviz R, Chimenez S, Avrahami D, Stolovich-Rain M, Alter I, Sebag M, Polin N, Bernal-Mizrachi E, Dor Y, Cerasi E, Leibowitz G Inhibition of mTORC1 by ER stress impairs neonatal β-cell expansion and predisposes to diabetes in the Akita mouse <i>eLife</i> , 2018, vol. 7: e38472, p. 1-25 Modi H, Jonhson JD Folding mutations suppress early beta-cell proliferation <i>eLife</i> , 2018, vol. 7: e43475, p. 1-4
Les conditions de germination de <i>Clostridium difficile</i>.	Shrestha R, Cochran AM, Sorg JA The requirement for co-germinants during <i>Clostridium difficile</i> spore germination is influenced by mutations in <i>yabG</i> and <i>cspA</i> <i>PLoS Pathogenes</i> , 2019, vol. 15 (4), p. 1-27 (+ SUPPORTING INFORMATION sur la clé)

RAPPORT DU JURY D'ECD

Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **08,78 / 20**
- Meilleure note : **19,00 / 20**
- Note la plus basse : **04,00 / 20**
- 6 notes sur 20 (**30 %**) sont supérieures ou égales à **10 / 20**
- Moyenne des candidats admis **11,50 / 20**

Rapport sur l'épreuve d'ECD

Chaque dossier comporte un article de recherche associé généralement à une revue ou un commentaire. La présentation doit être centrée sur l'article de recherche. Elle doit présenter la ou les questions scientifiques posées ainsi que la démarche scientifique pour y répondre. Il est donc préférable d'éviter de donner la conclusion de l'article de recherche en introduction. Cela permettra de présenter la logique liant les différentes expériences pour arriver à cette conclusion. La structure de la présentation ne nécessite pas forcément un plan différent de celui de l'article. Elle peut être basée sur celui de l'article qui est constitué d'une introduction, de résultats analysés et d'une conclusion associée à des perspectives. Sans être une leçon, cet exercice doit permettre de manière pédagogique à l'ensemble du jury de comprendre la présentation.

Dans l'introduction, il est important de resituer l'étude dans un contexte plus large, scientifique voire sociétal si le sujet s'y prête ce que la majorité des candidats a réalisé. Cependant, la question scientifique à laquelle l'article de recherche répond doit être clairement posée ainsi que les connaissances scientifiques préalables à l'étude. Ces connaissances sont fournies dans la revue ou un équivalent sous forme de commentaire associé à l'article de recherche. Dans le cas

d'un article de recherche seul, ces connaissances sont aussi présentées de manière plus succincte dans l'introduction. Enfin, l'accès à internet constitue une autre source d'information tant que ces sources sont mentionnées.

La présentation doit s'appuyer sur la description, l'analyse des expériences de recherche et ne pas présenter uniquement une série de conclusions. Elle ne doit pas être un exposé linéaire et exhaustif des différentes expériences mais un choix justifié pour expliciter la démarche scientifique. Les efforts des candidats pour illustrer leurs propos par des documents issus des articles ou de sites internet et retravaillés sont appréciés par le jury. La copie *in extenso* de figures complexes d'article voire de tableaux, sans remise en forme aboutit dans certains cas à des projections illisibles (parfois par le candidat lui-même).

Le lien entre les différentes expériences ainsi que les conclusions intermédiaires sont appréciés. En cas de technique originale ou d'approche expérimentale complexe, une description du principe de l'expérience peut s'avérer utile.

En conclusion, un schéma récapitulatif est toujours apprécié ainsi que des perspectives réalistes.

L'aspect critique du dossier peut se retrouver sous deux aspects. Il peut parfois être pertinent de souligner une partie moins convaincante d'expériences. Cependant l'esprit critique du candidat sera surtout jugé sur ses capacités à choisir les résultats les plus pertinents à présenter.

L'utilisation du tableau en plus de la vidéo projection peut être un atout pédagogique, sauf quand il s'agit de répéter les plans déjà projetés.

Enfin, les questions représentent la moitié du temps de l'épreuve. Cet aspect de l'épreuve n'est pas à négliger. Elles sont l'occasion pour le jury de sonder le candidat sur la pleine compréhension de l'article de recherche, sur l'étendue et la solidité de ses connaissances et sa capacité à répondre à des questions hors du domaine du dossier. La capacité d'écoute, la précision du vocabulaire utilisé ainsi que la concision des réponses sont toutes des qualités très appréciées par le jury.

Afin de se préparer au mieux à cette épreuve d'ECD, le jury invite les futurs candidats à lire régulièrement de la littérature scientifique, notamment certains journaux généralistes comme « *PNAS* » ou « *Frontiers in...* ». Ils sont en libre accès et permettront aux candidats non seulement de s'améliorer pour cette épreuve mais aussi de réactualiser leurs connaissances scientifiques et techniques.

Rapport sur les questions relatives à la Chimie

L'épreuve d'ECD fait l'objet de questions de chimie. Ces dernières portent, dans un premier temps, sur les notions abordées par le candidat lors de sa présentation, et dans un deuxième temps sur des points de chimie soulevés dans les publications étudiées.

Il est indispensable que toute technique analytique évoquée lors de l'épreuve (méthodes spectroscopiques ou chromatographiques par exemple) soit maîtrisée.

Le (la) candidat(e) devra connaître les unités couramment utilisées dans le domaine de la biochimie comme le Da.

Certaines structures électroniques des atomes semblent connues mais pas nécessairement le lien couches électroniques n'est pas suffisamment maîtrisée, de même que l'électronégativité des atomes.

Les notions liées à la bioluminescence et la fluorescence sont connues mais expliquées avec peu de précision dans le vocabulaire. Il faudrait que le (la) candidat(e) puisse donner la relation entre l'énergie E et λ , la charge et la masse d'un photon, définir le spectre d'excitation et d'émission, préciser les particularités des groupements chimiques des fluorophores...

Les molécules de bases ne sont pas toujours connues des candidat(e)s (bases puriques, pyrimidiques, glucides simples ou diholosides, acides gras, triglycérides...). Les représentations sont parfois approximatives. Le (la) candidat(e) devrait aussi connaître les règles de numérotation de ces molécules.

Les notions de pK_a , en particulier pour les acides aminés (courbe de titration), et celle de solution tampon, ne sont pas complètement assimilées.

Les différents types d'isomérisation ne sont pas connus. La chiralité est l'isomérisation la plus fréquemment citée mais elle n'est pas la seule. Il faudrait que le (la) candidat(e) puisse expliquer certaines règles comme les configurations L et D ou R et S. Les configurations L et D ne doivent pas être confondues avec le pouvoir rotatoire levogyre et dextrogyre.

Les expressions des constantes (constante d'acidité, produit de solubilité...) manquent de rigueur dans leur écriture. Le lien entre les constantes et le $\Delta_r G^\circ$ n'est toutefois pas connu.

Conclusion

Plus du tiers des candidats ont été à la hauteur de l'épreuve. Pour les autres, les lacunes dans le domaine du dossier ou dans les domaines méthodologiques connexes, étaient manifestes. Ces lacunes, décelables au cours de l'exposé sont souvent confirmées durant l'entretien qui suit. Celui-ci permet au jury de parfaire l'évaluation des candidats.

L'ECD reste une épreuve difficile dans laquelle la pédagogie tient une place non négligeable mais qui ne doit pas prendre le pas sur la compréhension et l'analyse critique du dossier scientifique et technique.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le jury s'est réparti en deux commissions, une par épreuve, travaillant en parallèle. Cette organisation permet d'une part une meilleure objectivité de l'évaluation des candidats lors de l'étude critique de dossier, et d'autre part de réduire les inégalités entre les candidats, puisque les épreuves pour chaque candidat se déroulent sur deux jours consécutifs.

Les candidats présents aux épreuves d'admissibilité et d'admission venaient, comme chaque année, d'horizons assez différents, y compris les docteurs, l'agrégation externe pour les docteurs n'étant pas ouverte cette année.

Les résultats aux épreuves d'admissibilité et d'admission révèlent encore une fois qu'un concours de cette dimension doit se préparer en consolidant ses connaissances de bases et en actualisant ses savoirs dans chaque champ mentionné dans le programme. Ce n'est qu'à ce prix que les candidats oeuvrent construire leur expertise disciplinaire.

L'évolution continue des techniques et des connaissances dans les champs disciplinaires couverts par le programme demandera une remise en question permanente de la part des futurs agrégés. Évaluer la capacité des candidats à assurer une mise à niveau de leurs connaissances est un des objectifs assignés à ce concours. Chaque épreuve nécessite d'autre part, comme cela a été précisé dans les rapports spécifiques, d'aborder le sujet par un temps de réflexion pour cerner le sujet et la problématique, de faire preuve de bon sens, d'avoir présent à l'esprit la volonté de transmettre un message qui aidera, certes, à la structuration d'une composition (écrite ou orale), mais aussi à distinguer l'essentiel de l'accessoire. Il convient de ne pas oublier que l'agrégation est un concours d'enseignement qui évalue également l'aptitude des candidats à organiser, structurer, présenter un propos et de le faire avec une approche pédagogique et didactique efficaces.

Les travaux pratiques constituent une des originalités de ce concours. Ils ont, cette année encore, rempli leur rôle, emblématique de notre agrégation. Et dans l'esprit des initiateurs de cette agrégation, ils préfiguraient une part non négligeable des enseignements auxquels serait confronté le futur agrégé de biochimie génie biologique. D'ailleurs, leurs coefficients n'est pas moindre que celui des autres épreuves d'admission et une bonne préparation à ces épreuves est un gage de réussite. Certains en ont fait les frais, et cette année encore ces épreuves pratiques ont permis d'apprécier l'adaptabilité des candidats placés devant des sujets innovants pour lesquels ils doivent faire preuve d'un grand sens de l'organisation, de discernement pour faire les choix pertinents, et, ce n'est pas le moindre, de maîtrise des techniques.

Pour l'épreuve d'étude critique de dossier, l'accès à Internet représente incontestablement une aide lors de l'épreuve, aussi bien en matière de traduction que pour découvrir le sujet. Cependant, cette perspective faussement rassurante ne doit pas abuser les futurs candidats car elle ne peut en aucun cas pallier l'absence de maîtrise des concepts majeurs. Elle nécessite également de développer une pratique de la lecture et l'analyse d'articles scientifiques nombreux et variés.

Le jury félicite les candidats lauréats de cette session 2019. Il encourage les autres candidats à persévérer dans leur projet, d'autant que tous ont fait preuve de remarquables qualités dans certaines épreuves.

Le jury tient à remercier Madame Nora MACHURÉ, Proviseure du lycée Pierre-Gilles de Gennes, ENCPB et son équipe : proviseurs-adjoints, professeurs agrégés de biochimie génie biologique, concepteurs de sujet et préparateurs des épreuves pratiques, personnels des laboratoires de chimie, de biochimie, de microbiologie, de biologie cellulaire et moléculaire, et personnel administratif, pour l'accueil et le travail efficace pour l'organisation et tout au long du déroulement de ce concours. Comme les années précédentes, la session 2019 de l'agrégation de biochimie génie biologique a eu lieu dans d'excellentes conditions.