



Secrétariat Général
Direction générale des
ressources humaines
Sous-direction du recrutement

MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE

Concours du second degré – Rapport de jury

Session 2018

AGRÉGATION EXTERNE

SECTION :

BIOCHIMIE GÉNIE BIOLOGIQUE

Rapport de jury présenté par Henri-Jean BOULOUIS
Président de Jury

*Les rapports des jurys des concours sont établis
sous la responsabilité des présidents de 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	41
Rapport de Jury	60
Travaux Pratiques de Chimie	
Sujet	67
Rapport de Jury	83
Épreuve Orale de Leçon	
Sujets	86
Rapport de Jury	86
Épreuve Orale d'Étude Critique de Dossier scientifique et/ou technique	
Sujets	90
Rapport de Jury	92
CONCLUSION GÉNÉRALE	94

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits	271
Candidats présents aux trois épreuves d'admissibilité	61
Nombre de postes	6
Candidats admissibles	14
Candidats présents aux épreuves d'admission	13
Candidats proposés pour l'admission	7
Barre d'admissibilité	07,87
Barre d'admission	09,76

ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

Moyenne générale des candidats présents	04,92
Moyenne générale des candidats admissibles	10,42

COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Moyenne des candidats présents	06,72
Moyenne des candidats admissibles	12,31
Note maximale	15,80

COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents	04,19
Moyenne des candidats admissibles	09,11
Note maximale	15,00

COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents	04,30
Moyenne des candidats admissibles	09,84
Note maximale	18,50

ÉPREUVES D'ADMISSION

Moyenne générale des candidats présents	10,15
---	-------

Moyenne générale des candidats admis	12,32
--------------------------------------	-------

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents	10,62
--------------------------------	-------

Moyennes des candidats admis	12,21
------------------------------	-------

Note maximale	15,30
---------------	-------

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents	08,96
--------------------------------	-------

Moyennes des candidats admis	10,49
------------------------------	-------

Note maximale	16,00
---------------	-------

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

Moyenne des candidats présents	09,62
--------------------------------	-------

Moyennes des candidats admis	12,44
------------------------------	-------

Note maximale	17,10
---------------	-------

LEÇON

Moyenne des candidats présents	10,38
--------------------------------	-------

Moyennes des candidats admis	12,29
------------------------------	-------

Note maximale	20,00
---------------	-------

ÉTUDE CRITIQUE DE DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Moyenne des candidats présents	10,77
--------------------------------	-------

Moyennes des candidats admis	13,57
------------------------------	-------

Note maximale	19,00
---------------	-------

ENSEMBLE DU CONCOURS

Moyenne générale des candidats présents admissibles	10,22
---	-------

Moyenne générale des candidats admis	12,21
--------------------------------------	-------

ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Oses et osides chez les Eucaryotes : structures, fonctions, biologie.

RAPPORT DU JURY DE BIOCHIMIE

Le sujet proposé cette année couvrait un large champ disciplinaire, celui de la biochimie des glucides qu'il fallait traiter à partir de l'échelle moléculaire jusqu'à une vision plus intégrative et fonctionnelle au niveau de la biologie de l'organisme eucaryotes (y compris les végétaux).

Le devoir se devait d'être structuré et concis, offrir une vision claire et précise du domaine, le tout bien évidemment présenté de façon pédagogique.

REMARQUES DE FORME & INTRODUCTION

En ce qui concerne la forme, il n'est pas inutile de rappeler qu'un devoir d'agrégation débute toujours par une introduction qui définit les termes du sujet, pose la problématique et propose un plan détaillé et logique permettant de répondre à la/les question(s) posée(s). Dans cette introduction était attendue une définition des oses et osides et leur positionnement dans la biologie cellulaire et des organismes. Le jury attendait notamment une mise en problématique soulignant le rôle central des glucides dans le métabolisme cellulaires à la fois anabolique et catabolique. Les correcteurs ont été surpris qu'une partie infime de candidats aient mis en avant le fait que la synthèse des glucides constitue la voie d'entrée des molécules organiques dans la biosphère via le processus de photosynthèse. Il fallait aussi souligner que le rôle des glucides ne se limite pas au métabolisme et qu'il participe à des fonctions biologiques aussi diversifiées que le stockage et l'expression de l'information génétique, le repliement et la maturation des protéines, les processus de reconnaissance moléculaires et cellulaires, la signalisation cellulaire, la structuration des tissus, ou le fonctionnement du système immunitaire. Le plan du sujet devait donc permettre de mettre en avant la diversité structurale et fonctionnelle des glucides et pouvait s'articuler autour de 3 parties : 1) Présentation structurale des glucides, 2) Rôle métaboliques des glucides, 3) fonctions biologiques des glucides.

NOTIONS ATTENDUES DANS LA COMPOSITION

Diversité structurale des glucides

Dans la première partie, le jury attendait donc une présentation de la diversité structurale des glucides. Cette présentation devait se baser sur un schéma montrant la classification des glucides simples (oses) ou plus complexes (osides) y compris les hétérosides. La présentation des glucides devait s'appuyer sur des définitions et des schémas, les formules chimiques précises des molécules devant être discutées.

La présentation des oses, monomères des glucides, devait inclure une discussion sur leur fonction, leur stéréochimie et leur structure cyclique. On attendait aussi une présentation des modifications diverses qu'ils peuvent subir (dérivés phosphorylés, aminés, oxydés...).

Il s'agissait ensuite de présenter la liaison osidique et la diversité des polysides en s'appuyant sur des exemples précis. Enfin, un bilan sur la diversité des oses à la fois en les replaçant dans le contexte cellulaire (localisation des molécules osidiques dans les différents compartiments cellulaires et extracellulaires, notamment matrice extracellulaire) devait permettre de faire une transition vers les aspects fonctionnels de la biochimie des glucides.

Si les oses ont généralement été bien présentés, les correcteurs déplorent le faible nombre de candidat ayant présentés leurs dérivés. De même la partie osides s'est souvent limitée en une présentation de l'amidon et du glycogène et la présentation hétérosides, en particulier les glycoprotéines mais aussi nucléotides, est la plupart du temps restée superficielle ou non traitée.

Rôle central des glucides dans le métabolisme

Une deuxième partie devait permettre d'éclairer le rôle central des glucides dans le métabolisme cellulaire des organismes phototrophes ou hétérotrophes. Il s'agissait de donner une vision globale de l'importance qualitative et quantitative du métabolisme glucidique en replaçant les divers glucides dans les réseaux métaboliques cellulaires et dans l'énergétique des organismes.

Il s'agissait de présenter tout d'abord les voies d'entrée des glucides dans les organismes eucaryotes : photosynthèse pour les végétaux et alimentation, digestion et absorption intestinale pour les mammifères. Une présentation des divers récepteurs GLUT assurant l'entrée du glucose au niveau cellulaire était aussi attendue.

Le jury attendait ensuite des développements sur le catabolisme énergétique (glycolyse et respiration) et sur les voies anaboliques impliquant les glucides (biosynthèse des composés de réserves, glycogène et lipides, rôle comme précurseurs de diverses molécules, voies des pentoses-phosphate...).

Enfin, une présentation des modalités de contrôle du métabolisme énergétique glucidique était attendue avec l'exemple de la régulation de la glycémie chez les mammifères.

Il est dommage que de nombreux candidats aient limité leur démonstration à la glycolyse et à la respiration. Seules quelques copies ont pensé à présenter la photosynthèse ! De même, le niveau de précision de la description des voies présentées était souvent insuffisant. De plus, il est dommage qu'un travail de synthèse ait rarement été réalisé. En particulier, seuls quelques candidats ont pensé à présenter le rôle ubiquitaire des nucléotides (ATP, NAD, NADPH) dans l'énergétique cellulaire. De même une vision globale des connections entre les diverses voies métaboliques cataboliques et anaboliques n'a que trop rarement été présentée.

Autres rôles des glucides

Une dernière partie du devoir devait permettre au candidat d'exprimer ses capacités de synthèse et de composition en présentant la diversité des rôles des glucides en dehors du champ du métabolisme (information génétique, repliement et maturation des protéines, reconnaissances moléculaires et cellulaires, signalisation cellulaire, matrices extracellulaires et structuration des tissus, fonctionnement du système immunitaire...).

Les correcteurs attendaient que les candidats effectuent des choix judicieux pour éclairer la diversité de ces fonctions en présentant des exemples précis soutenus par des schémas détaillés des mécanismes moléculaires mis en jeu. Cette partie du sujet qui nécessitait de mobiliser une large connaissance générale en biochimie et physiologie a été la moins bien traitée par les candidats.

Seules quelques copies ont présenté une synthèse de la diversité des rôles des glucides à l'échelle de l'organisme.

REMARQUES GÉNÉRALES

À la lecture de l'ensemble des copies, les correcteurs ont noté le niveau insuffisant en biochimie d'une partie importante des candidats pour lesquels les connaissances présentées sont restées superficielles.

Comme les années précédentes, nous ne pouvons que déplorer un grand déséquilibre dans la construction des devoirs avec une introduction et une conclusion très largement négligées, sans problématique et logique scientifique affichées ni perspectives développées.

Une ouverture évidente concernait par exemple ici les pathologies de déséquilibre du métabolisme glucidique en lien avec les problèmes de nutrition, et autres dysfonctionnements physiopathologiques.

COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Les relations entre microorganismes et système Immunitaire des mammifères : vous décrirez la nature de ces interrelations à l'échelle moléculaire, cellulaire et de l'organisme de l'hôte à l'aide d'exemples pris à la fois en bactériologie et en virologie.

RAPPORT DU JURY DE MICROBIOLOGIE

L'introduction de ce devoir pouvait être l'occasion de définitions, ce qui permettait de circonscrire le sujet et d'éviter de consacrer une partie entière à la définition des microorganismes et à leur cycle de développement. En particulier, les différentes relations microorganismes/organismes supérieurs devaient être d'emblée définies. Le système immunitaire pouvait être pris dans son acception la plus large. Toutefois, s'agissant d'un sujet de Microbiologie, la part dédiée à l'Immunologie devait être limitée au strict nécessaire pour pouvoir traiter plus largement et précisément les aspects microbiologiques de la question.

L'énoncé du sujet pouvait servir de plan, mais tous les plans logiques ont été acceptés. Cependant, la séparation entre les aspects moléculaires et cellulaires pouvait ne pas être aussi tranchée que le laissait supposer l'énoncé du sujet, en particulier concernant les virus. Des choix judicieux devaient donc être faits pour organiser le devoir et lui donner à la fois cohérence et fluidité.

Les interrelations à l'échelle moléculaire devaient traiter des structures impliquées dans les mécanismes de reconnaissance entre microorganismes et système immunitaire :

- concernant l'immunité innée, les motifs moléculaires conservés (PAMP pour *Pathogen Associated Molecular Patterns*/motifs moléculaires associés aux pathogènes : LPS, peptidoglycanes, acides nucléiques...) et leurs récepteurs (PRR pour *Pattern Recognition Receptors*/récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires : TLR, CNR, NLR) devaient être présentés et illustrés par des exemples concernant aussi bien les bactéries que les virus. Les conséquences de l'interaction PAMP/PRR (activation des cellules, sécrétion de cytokines,...) pouvaient être ensuite évoquées. L'activation du complément par la voie alterne et par la voie des lectines, ainsi que ses conséquences pour le microorganisme (opsonisation), faisaient également partie du sujet.

- Concernant l'immunité acquise, une présentation générale des interactions entre les motifs antigéniques, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et les récepteurs à l'antigène (Ig/BCR et TCR) était requise. Un certain nombre de conséquences de ces interactions devaient ensuite être évoquées, en particulier celles qui concernent plus directement les microorganismes telle que la nature et la polarisation des réponses immunitaires spécifiques en fonction de la nature de l'agent infectieux (intracellulaire ou extracellulaire).

Dans cette partie, de très nombreux exemples pouvaient illustrer la diversité des mécanismes développés par les microorganismes pour limiter leur reconnaissance par les senseurs et récepteurs cellulaires, leur permettant ainsi d'interférer avec la mise en place des réponses immunes innées et adaptatives : installation d'une tolérance (avec comme exemple l'induction de la synthèse d'IL10 par certaines bactéries responsable d'infections chroniques telle *Brucella*), réponse immunitaire favorisant l'infection (virus de la dengue et facilitation par les anticorps...), variation antigénique (épitopes B et T) et échappement aux anticorps neutralisants et à la réponse cytotoxique.... Enfin le fait que certains pathogènes agissent directement sur le système immunitaire devait être évoqué, de bons exemples étant les virus qui produisent des molécules immunosuppressives (tel EBV et son peptide de LMP-2, FeLV et sa protéine P15) des analogues de cytokines ou des leurres de divers récepteurs de cytokines (exemple des Poxvirus), ou bien encore le staphylocoque qui excrète une IgA protéase. L'exemple du virus VIH-1 et de sa protéine Vif, qui inhibe l'action du facteur de restriction cellulaire APOBEC3 induisant des mutations dans le génome viral, pouvait également être présenté. Enfin la protéine A du staphylocoque, qui fixe les immunoglobulines G par leur fragment Fc pour échapper à la phagocytose, pouvait être citée.

La reconnaissance de molécules à la surface de cellules immunitaires, préalable à leur entrée dans ces cellules, pouvait être une transition judicieuse avec la partie consacrée aux relations microorganismes/système immunitaire à l'échelle cellulaire. L'exemple le plus fréquemment cité est celui de l'utilisation du CD4 et des récepteurs de chimiokines CXCR4 ou CCR5 par le virus VIH-1 (par le biais de sa glycoprotéine gp120) pour infecter les lymphocytes T auxiliaires ou les macrophages.

Cette deuxième partie pouvait débiter par des exemples de microorganismes ayant pour cellules cibles des cellules de l'immunité : Retroviridae, Herpesviridae (EBV, VZV), Rickettsiales,...

Ensuite deux axes devaient être présentés :

- les relations microorganismes/système immunitaire aboutissant à l'élimination de l'agent infectieux, en évoquant notamment la phagocytose des microorganismes extracellulaires, la cytotoxicité (lymphocytes T CD8 cytotoxiques et cellules NK pour les microorganismes intracellulaires), sans omettre le rôle des interférons dans la protection des cellules contre l'infection virale), la mise en place d'une réponse humorale thymo-dépendante et ses conséquences.
- les relations microorganismes/système immunitaire aboutissant à l'échappement de l'agent infectieux au système immunitaire: variation antigénique, avec le système immunitaire comme moteur de la variabilité antigénique des microorganismes (des exemples pouvaient être pris parmi le VIH-1, le Virus de la grippe, les Coronavirus ou encore *Salmonella* ou *Neisseria*); utilisation des cellules du système immunitaire pour disséminer dans l'organisme (mécanisme d'échappement dans les vacuoles de phagocytose pour les bactéries telles que les Mycobactéries, *Brucella* ou *Coxiella* ou certains virus, utilisation des cellules M de la barrière intestinale par *Shigella*, utilisation des cellules dendritiques et des lymphocytes T comme véhicules par le VIH-1 pour atteindre les organes lymphoïdes...), destruction des cellules effectrices de l'immunité (VIH-1 et apoptose des lymphocytes T CD4+, Leucocidines : exemple de la toxine de Pantone-Valentine de *S. aureus*....) ; production de superantigènes viraux ou bactériens (Entérotoxines de *S. aureus*...) interférant avec la réponse immunitaire ; diminution de l'expression des molécules du CMH par certains virus (Poxvirus et Herpesvirus...) par exemple.

Enfin à l'échelle de l'organisme, les communautés de micro-organismes forment le microbiote, en interaction constante avec l'organisme et en particulier avec le système immunitaire. Ces flores, qu'il s'agisse du microbiote cutané, intestinal ou vaginal (flore de Döderlein), participent en premier lieu à la protection de l'organisme et sont parfois considérés comme partie intégrante du système immunitaire (effet de barrière du microbiote résident). Par ailleurs, ces microbiotes, et en particulier le microbiote intestinal, participent à la maturation du système immunitaire muqueux et systémique en le stimulant par le biais d'antigènes bactériens et viraux. Le microbiote intestinal induit également une tolérance à certains antigènes qui contribue au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, par des mécanismes impliquant notamment les cellules dendritiques, les cellules phagocytaires et les lymphocytes T régulateurs. Les microorganismes participent bien sûr à la constitution du répertoire antigénique de l'individu. Enfin lorsque l'on s'intéresse plus généralement à une infection, le lieu de l'infection conditionne le type de réponse immunitaire mise en place et l'hyperthermie qu'elle génère interfère avec la croissance des microbes et en particulier des virus.

Compte tenu de l'ampleur du sujet, l'énoncé ne demandait pas d'exemple d'applications biotechnologiques ou médicales issues des interactions microorganisme/système immunitaire. Le jury a néanmoins apprécié lorsque certaines applications étaient évoquées à bon escient, le plus souvent en ouverture.

Les bonnes copies ont été rares. Le principal défaut a consisté à traiter le sujet sous l'angle de l'immunité anti-microbienne : les lacunes évidentes en matière de connaissance de base en virologie et bactériologie ont abouti à du remplissage avec des notions d'immunologie souvent très générales et sans rapport avec le sujet. Les exemples de microbiologie pour illustrer le propos ont été souvent inexistantes.

Dans une majorité de copies, la partie réservée aux relations à l'échelle de l'organisme était très restreinte ou inexistante : la notion de microbiote et ses interactions avec l'organisme, pourtant d'actualité, n'a que trop rarement été abordé. Souvent, il n'a été que brièvement évoqué en conclusion de l'exposé.

On peut rappeler ici quelques conseils pour la rédaction de ce genre d'épreuve : les futurs candidats doivent prendre le temps de réfléchir à la problématique du sujet, à l'intérêt de certaines notions par rapport à cette problématique et aux connaissances qu'ils doivent et souhaitent développer. Une réflexion sur l'organisation du devoir est également primordiale à ce stade, afin de pouvoir traiter le sujet dans sa totalité mais de manière concise. La précision et la pertinence des exemples sont bien sûr un gage de réussite, de même que les schémas dénotant des qualités pédagogiques. Enfin, dans leur ensemble, les candidats font l'effort d'une présentation et d'une rédaction correctes, à l'exception de copies, trop nombreuses, pour lesquelles l'orthographe laisse vraiment à désirer.

COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

La plasticité, une forme d'adaptation à long terme de l'organisme.

Des modifications durables assurent à l'organisme un fonctionnement adapté aux différents paramètres environnementaux auxquels il est exposé.

À partir d'exemples, vous montrerez comment des processus dynamiques d'adaptation sur le long terme se mettent en place à différentes échelles (moléculaire, cellulaire, tissulaire, systémique, comportementale) et révèlent une plasticité de l'organisme. Vous discuterez également de la transmission possible de ces adaptations au travers des générations.

RAPPORT DU JURY DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Ce sujet sur la plasticité nécessitait de bien définir le cadre de ce qui allait être développé dans le devoir et de justifier ses choix. En effet, la notion de plasticité associée ici aux adaptations à long terme balaye un ensemble de concepts très larges.

Nous attendions ici une réflexion sur la plasticité de l'organisme lui permettant de s'adapter sur le long terme à son environnement. De ce fait, les notions de régulations étaient hors sujet. La différence entre adaptation et régulation ne semble pas connue de l'ensemble des candidats alors qu'elle représente un concept clef en physiologie. Malgré l'indication très claire d'une temporalité longue dans l'énoncé du sujet, certains candidats ont tout de même traité des régulations à court terme, comme celle de la glycémie ou de la pression artérielle.

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.

L'intitulé incitait les candidats à considérer plusieurs dimensions, notamment celle du comportement. Ces indications permettaient d'aiguiller les candidats sur un champ de réflexion large, incluant aussi bien les adaptations aux caractéristiques physico-chimiques de l'environnement que les adaptations comportementales mettant en jeu la plasticité cérébrale. L'adaptation au niveau cellulaire permettait d'inclure le rôle du système immunitaire adaptatif dans le sujet. Enfin, il était demandé de traiter de la transmission de ces adaptations au travers des générations.

Certains devoirs cernent bien le sujet dans leur introduction mais d'autres continuent à développer des généralités autour de la physiologie présentant l'homéostasie et Claude Bernard sans définir les termes du sujet.

Le sujet étant très large, il n'était pas attendu des candidats une connaissance exhaustive de l'ensemble des exemples de plasticité. Au contraire, chaque concept clé pouvait être abordé à partir d'un ou deux exemples pertinents bien exploités.

L'adaptation aux caractéristiques physico-chimiques de l'environnement a été le concept le mieux traité. L'exemple de la vie en altitude et de la disponibilité en oxygène, l'adaptation de la pigmentation de la peau selon l'ensoleillement ou encore du métabolisme de base selon le climat ont souvent été abordés. Les fluctuations moléculaires de niveau de 2,3-DPG n'ont été traitées qu'exceptionnellement alors que cet exemple permettait bien d'illustrer les adaptations à l'échelle moléculaire.

Un autre concept attendu était l'adaptation de l'Homme à ses activités. L'exemple de l'adaptation à l'activité physique a été souvent abordé. En effet, l'adaptation des paramètres cardiovasculaires et des fibres musculaires associées à l'entraînement sportif était tout à fait pertinent. Certains sont tombés dans le hors sujet en présentant l'adaptation des paramètres cardiovasculaire pendant l'effort physique, omettant l'aspect long terme défini dans le sujet.

L'activité cérébrale est également primordiale dans la capacité de l'Homme à s'adapter à son environnement. Bien que l'apprentissage à l'échelle moléculaire (LTP) soit régulièrement présenté dans les devoirs, les bases cérébrales cellulaires et comportementales de l'apprentissage sont cependant très peu connues. De nombreux exemples auraient pu être abordés comme l'existence de comportements innés et acquis (mise en place des comportements alimentaires par effet post ingestif, mémoire associative). Ce dernier volet permettait également d'illustrer de nombreux dérèglements comme les addictions mais aussi des aspects expérimentaux classiques comme ceux de Pavlov ou encore de la piscine de Morris.

Aborder des aspects pathologiques et expérimentaux est toujours valorisé dans les devoirs.

Il était également pertinent de présenter le concept d'adaptabilité à la pathogénicité de l'environnement à travers le fonctionnement du système immunitaire adaptatif.

Attention cependant à ne pas rester très général mais bien relier les aspects abordés à la problématique du sujet. Ainsi, la sélection clonale par l'antigène ainsi que la mise en place des cellules mémoires devaient être au cœur de cette partie alors que certains devoirs se perdent dans des détails (définition d'un haptène par exemple).

Enfin, il était demandé d'inscrire ces adaptations au travers des générations.

Dans ce cadre, les aspects épigénétiques devaient être abordés mais le comportement y avait également toute sa place. Peu de candidats ont de véritables connaissances sur ces aspects. Il y a eu de nombreux hors sujets, notamment sur la sélection darwinienne de mutations favorables mais aussi sur la protection apportée aux nouveaux-nés au travers des IgA contenus dans le lait maternel. Dans les deux cas, il ne s'agit pas de transmission d'une adaptation acquise en réponse à l'environnement, le premier car elle n'est acquise que par le hasard et le deuxième car cette protection par les IgA est temporaire.

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.

Sur la forme, les schémas 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.

ÉPREUVES D'ADMISSION

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

DU MALT AU DIABÈTE :

**système d'étude *in vitro* de
médicaments anti-diabétiques**

INTRODUCTION



Structure de la DPP IV

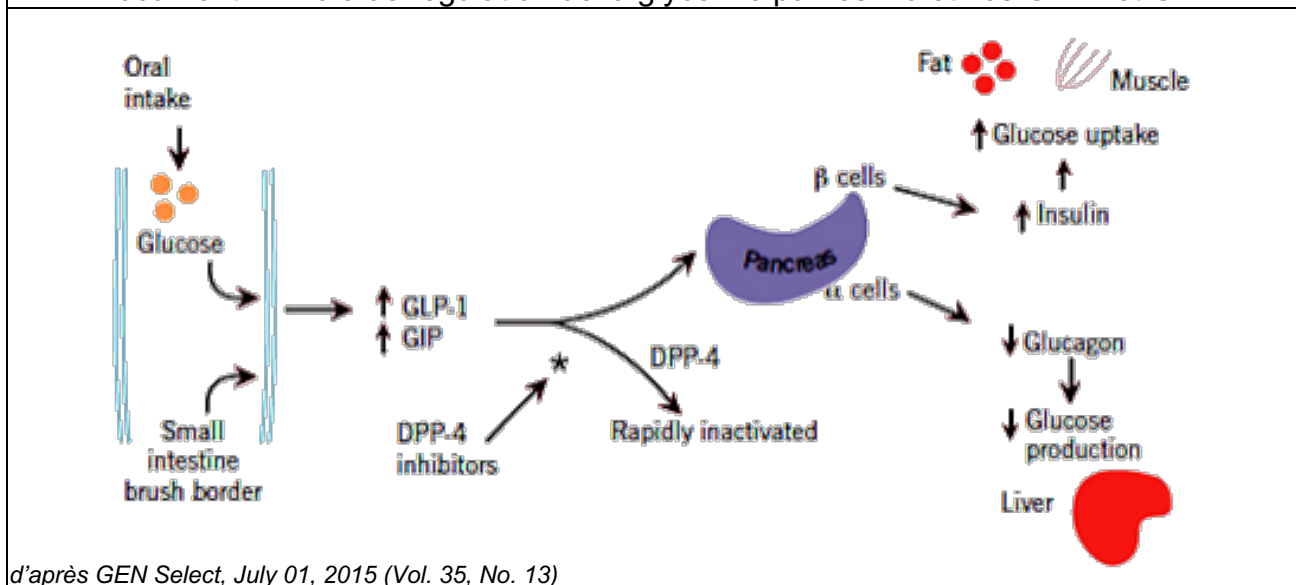
Le diabète est une pathologie caractérisée par une élévation prolongée de la glycémie, ayant des conséquences délétères pour l'organisme et constituant un facteur de risque pour de multiples pathologies telles que les maladies cardio-vasculaires, les néphropathies, les cancers...

Sa prévalence, principalement pour le diabète de type 2, est en constante augmentation dans le monde (avec une hausse de plus de 5% par an entre 2000 et 2011) et l'OMS prévoit que le diabète sera en 2030 la 7^{ème} cause de décès dans le monde. Cette pathologie représente donc un enjeu de santé publique.

Les traitements classiques de cette hyperglycémie chronique consistent en l'administration d'insuline, de metformine et de sulfonurées. De nouveaux traitements ont récemment été développés, comme par exemple l'utilisation d'inhibiteurs des protéases dégradant des peptides naturels produits par l'organisme et qui ont des effets hypoglycémiant, tels que le GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1).

Une de ces protéases, la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV ou CD26, EC 3.4.14.5) représente une cible intéressante puisqu'elle inactive le GLP-1 par hydrolyse de ses deux acides aminés N-terminaux. La sitagliptine, en inhibant la DPP IV, permet le maintien de l'activité hypoglycémiant de GLP-1 ; elle est actuellement utilisée dans le traitement du diabète de type 2. Le **document 1** présente la voie de régulation ciblée par ces inhibiteurs.

Document 1 : Voie de régulation de la glycémie par les incrétines GLP1 et GIP



L'objectif des manipulations est de développer une stratégie de recherche de nouveaux inhibiteurs de la DPP IV, à faible coût. Pour cela :

- la DPP IV sera purifiée à partir de malt (orge germé), produit facilement disponible et de faible coût. L'évaluation de sa purification sera réalisée en utilisant des techniques classiques de biochimie ;
- les constantes cinétiques de cette enzyme (K_M et $v_{i,max}$) seront caractérisées, ainsi que l'action inhibitrice de la sitagliptine. Par comparaison aux résultats obtenus avec une DPP IV extraite de foie de mammifère, on pourra conclure sur l'intérêt de l'utilisation de cette DPP IV d'orge, purifiée à bas coût, dans l'étude de nouveaux inhibiteurs potentiellement plus actifs que la sitagliptine.

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.

Les fichiers informatiques obtenus seront enregistrés dans le dossier candidat.

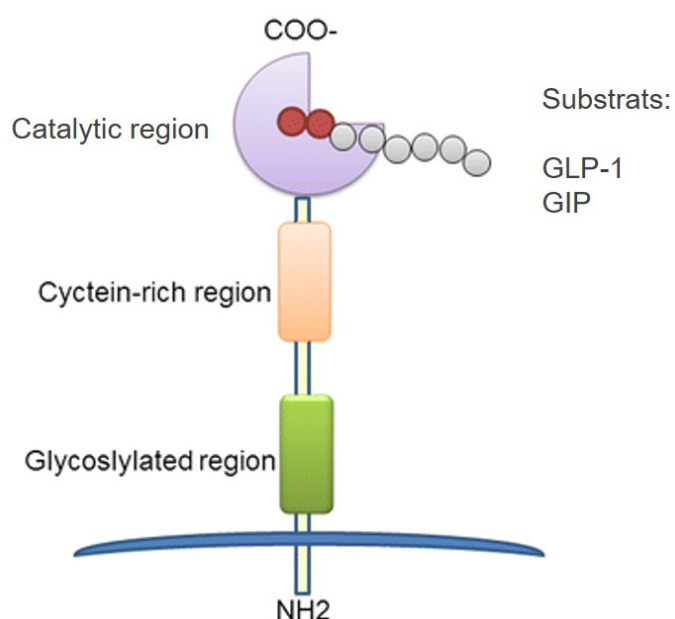
Par ailleurs, pour chaque série de calculs, il faudra systématiquement présenter les équations aux unités ainsi qu'un exemple d'équation aux valeurs numériques.

PARTIE 1 : PURIFICATION DE LA DPP IV D'ORGE

La DPP IV est une peptidase associée à la membrane, largement exprimée chez les mammifères dans les tissus tels que le foie, les poumons, les intestins et les reins. Elle est également connue sous le nom de CD26 et est distribuée sur les Lymphocytes T, B et NK. Dans le grain d'orge germé, cette endopeptidase libère les acides aminés contenus dans les protéines de réserve qui sont utilisés lors de la germination.

La masse moléculaire de cette glycoprotéine monomérique est de 105 kDa chez l'orge comme chez les mammifères et son pI de 3,55. Le **document 2** présente la structure schématique de DPP IV.

Document 2 : Structure de la protéine membranaire DPP IV



Source : *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2016 9:1

La **fiche technique 1** présente les protocoles d'extraction et de purification par chromatographie de la DPP IV de l'orge vert moulu.

I- Extraction

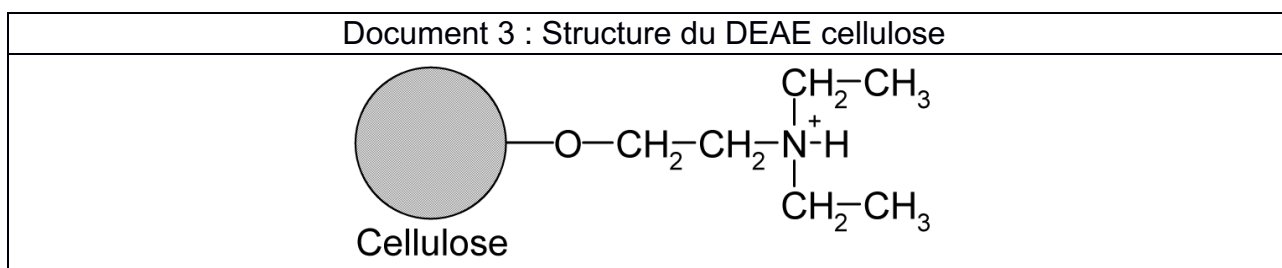
L'extraction a déjà été réalisée selon le protocole de la **fiche technique 1** et l'extrait brut **EB** est fourni au candidat.

Q1. Préciser le rôle des différents composés du tampon d'extraction.

Q2. Justifier l'intérêt de conserver l'extrait brut et les différentes fractions dans la glace.

II- Purification sur colonne de DEAE cellulose

Le **document 3** présente la structure chimique du diéthylaminoéthyle cellulose.



Q3. Donner le type de chromatographie réalisée sur ce support et expliquer le principe d'élution. Préciser le type de molécules attendues dans l'effluent (Flow through) collecté lors du dépôt de la résine sur la colonne.

Réaliser la purification de la DPP IV par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, à partir de l'extrait brut fourni et à l'aide de la **fiche technique 1**.

III- Suivi de la purification

La qualité de la purification est suivie par différentes méthodes :

- le dosage des protéines,
- la mesure d'activité enzymatique,
- la visualisation du profil protéique par électrophorèse.

Il est rappelé aux candidats l'importance de réaliser un tableau général de suivi avec l'ensemble des paramètres mesurés.

3.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Réaliser un dosage des protéines pour l'ensemble des fractions obtenues, à l'aide de la **fiche technique 2**.

Q4. Présenter la mise en œuvre et l'exploitation des résultats du dosage des protéines sous des formes adaptées.

3.2. Mesure de l'activité enzymatique de DPP IV

Les acides aminés N-terminaux des hormones GLP-1 et GIP, substrats naturels de la DPP IV de mammifère, jouent un rôle essentiel dans l'interaction avec leur récepteur. Leurs séquences sont illustrées dans le **document 4**

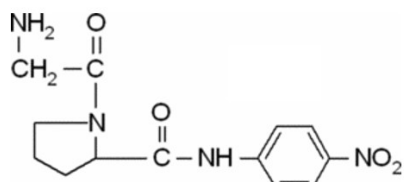
Document 4 : Séquences des substrats de DPP IV

Séquences des substrats naturels de la DPP IV

GLP-1 HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG
 GIP YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

Séquence du substrat synthétique de la DPP IV

Gly-Pro p-Nitroanilide

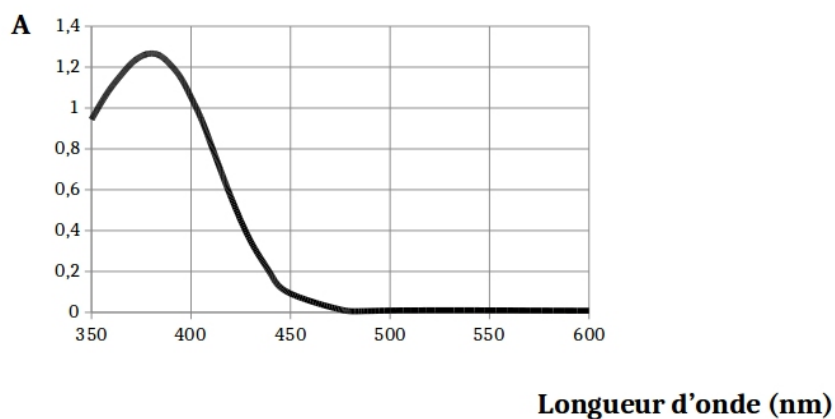


Q5. Dédurre de ces séquences la spécificité de l'enzyme et son intérêt pharmacologique.

Le Gly-Pro para-nitroanilide (**document 4**) est un substrat synthétique utilisé pour la mesure d'activité de certaines enzymes protéolytiques. La para-nitroaniline formée lors de son hydrolyse est un chromophore, dont le spectre d'absorption est présenté dans le **document 5**.

Document 5 : Spectre de la para-nitroaniline

Spectre d'absorption de la p-nitroaniline à 0,1 mmol.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

Q6. Déterminer le coefficient d'extinction molaire, à la longueur d'onde de travail, de la para-nitroaniline.

À l'aide de la **fiche technique 3**, réaliser la mesure d'activité de la DPP IV :

- sur l'ensemble des fractions (EB à D29) ;
- et sur une dilution au 1/10 de l'extrait brut EB.

Q7. Présenter le plan de plaque et un tableau récapitulatif des valeurs mesurées.

Q8. Proposer une technique de pipetage permettant de limiter la formation de bulles dans les cupules de la microplaque.

Faire valider cette proposition à l'examineur avant de réaliser la manipulation ou demander la fiche technique correspondante.

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

Q9. Indiquer le rôle du témoin.

Q10. Tracer la cinétique pour la fraction la plus riche en activité enzymatique.

Q11. Calculer la vitesse initiale dans les différentes fractions, en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$.

Q12. Calculer la concentration d'activité catalytique dans chaque fraction, en $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$.

Q13. Comparer les résultats obtenus pour l'extrait brut non dilué et l'extrait brut dilué au 1/10. Proposer une explication.

Q14. Calculer l'activité spécifique de chaque fraction en $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$.

Q15. Construire un graphe de synthèse de suivi de la purification et le commenter.

3.3. Profil protéique après électrophorèse sur gel SDS-PAGE

À l'aide des instructions de la **fiche technique 4**, réaliser une électrophorèse SDS PAGE sur neuf échantillons judicieusement choisis. Les volumes de prise d'essai seront les mêmes pour tous les échantillons.

Prévenir un examinateur au démarrage de la préparation des échantillons.

Q16. Justifier le choix des fractions déposées sur le gel.

Q17. Expliquer le principe de dénaturation des protéines dans les conditions de cette électrophorèse.

Q18. Présenter et exploiter les résultats de l'électrophorèse.

Q19. Indiquer une technique qui permettrait de repérer spécifiquement la DPP IV et en présenter les principales étapes.

3.4. Bilan de la purification

Q20. Conclure sur le choix de la (ou des) fraction(s) à conserver et à analyser.

Q21. Calculer le facteur d'enrichissement ou taux de purification de la fraction choisie.

Q22. Proposer une(des) technique(s) complémentaire(s) afin d'améliorer cet enrichissement.

PARTIE 2 :

CARACTÉRISATION DE LA DPP IV ET DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA SITAGLIPTINE

De par son activité protéolytique, la DPP IV est une cible majeure pour le traitement du diabète. Les inhibiteurs de DPP IV sont des agents oraux qui agissent en prolongeant l'action du GLP-1 endogène. Trois inhibiteurs de la DPP IV ont une autorisation de mise sur le marché : la sitagliptine, la vildagliptine et la saxagliptine. Parmi ceux-ci, la sitagliptine est prescrite en France sous le nom de Januvia® depuis 2007.

Des modifications et optimisations potentielles de ces inhibiteurs sont en cours de développement. La validation du choix de la DPP IV d'orge comme protéine modèle pour le criblage de nouvelles molécules inhibitrices exige de connaître ses caractéristiques enzymatiques ainsi que sa sensibilité aux inhibiteurs déjà référencés.

Une extraction de DPP IV de foie de mammifère a été réalisée (extrait nommé **DPP IV FM**). Il s'agit dans cette partie de comparer les constantes cinétiques de la DPP IV de mammifère et d'orge, ainsi que leur comportement vis à vis de la sitagliptine utilisée dans le traitement du diabète.

I- Détermination des constantes cinétique K_M et v_{max} de la DPP IV

Tester l'activité enzymatique de l'extrait de foie de mammifère et de la fraction de DPP IV d'orge retenue, pour différentes concentrations en substrat dans le milieu réactionnel, à l'aide des indications de la **fiche technique 6**.

- Q23.** Préparer un tableau de préparation de la gamme de substrat.
- Q24.** Présenter le plan de plaque et un tableau récapitulatif des valeurs mesurées.
- Q25.** Exploiter ces résultats à l'aide d'une représentation graphique appropriée.
- Q26.** Calculer K_M et v_{max} pour les deux enzymes et commenter ces résultats.

II- Effet inhibiteur de la sitagliptine sur la DPP IV

L'objectif est de déterminer le type d'inhibition exercée par la sitagliptine sur la DPP IV et de vérifier si la DPP IV purifiée à partir d'orge est utilisable pour des tests pharmacologiques.

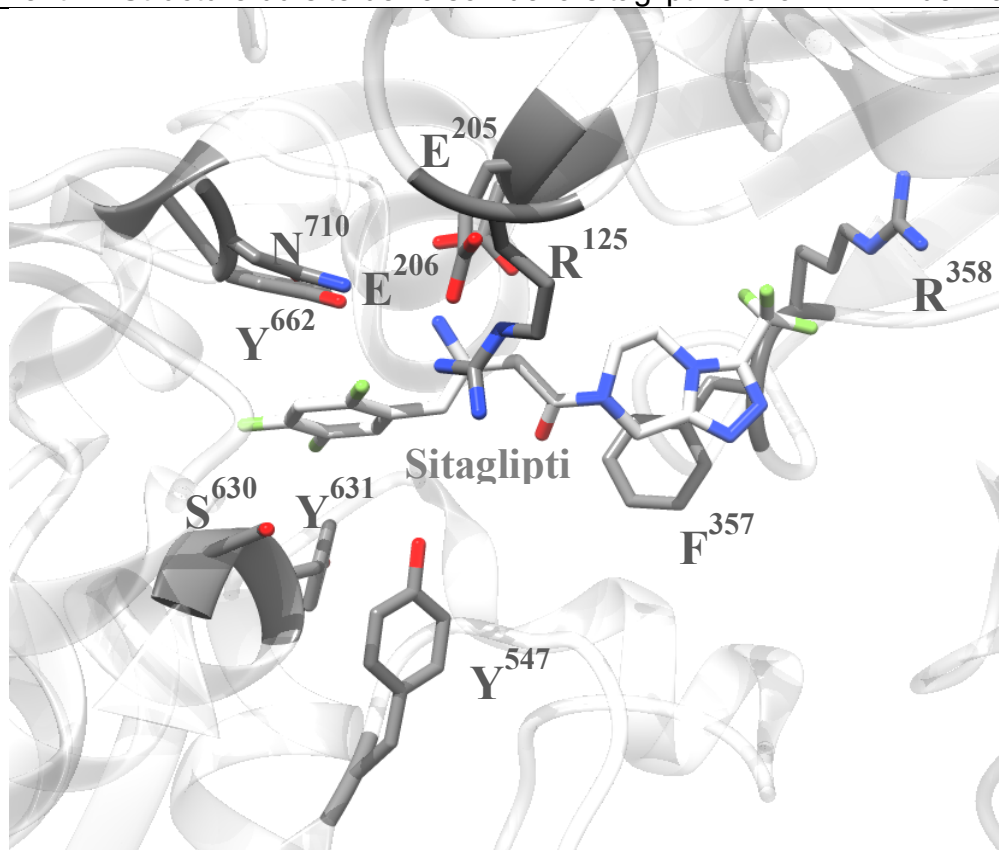
Après avoir préparé la solution de sitagliptine comme indiqué sur la **fiche technique 5**, tester l'activité enzymatique de l'extrait de foie de mammifère et de la fraction de DPP IV d'orge retenue, pour différentes concentrations en substrat dans le milieu réactionnel, en présence et en absence de sitagliptine (**fiche technique 6**).

- Q27.** Schématiser la réalisation de la solution d'inhibiteur en précisant le matériel utilisé. Calculer la concentration molaire en sitagliptine dans la solution fille.
- Q28.** À partir des valeurs de K_M et v_{max} obtenues en présence d'inhibiteur, déterminer le type d'inhibition de la sitagliptine sur la DPP IV.
- Q29.** Comparer l'effet inhibiteur de la sitagliptine sur la DPP IV d'orge et sur la DPP IV de mammifère.

Le **document 6** présente l'alignement des séquences protéiques entre les DPP IV de mammifère et d'orge, et le **document 7** schématise le site d'interaction entre la DPP IV et la sitagliptine.

Document 6 : Comparaison de séquences peptidiques de DPPIV de mammifère et d'orge (*Hordeum*)

DPPIV_Mammals	1	MKTPWKVLLGLLGAALVTIITVPVLLNKGTTDDATADSRKTYTLTDYLK	50
DPPIV_Hordeum	1	M-----LNRPITSKDVASLPQPGFNLAESIRFSPDDKFITYLRSPN	41
DPPIV_Mammals	51	NTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFGH	100
DPPIV_Hordeum	42	QTLSRQLYAYNIQNEKEYVYAEPE-----GEGKTE-ENLSMEEKLR	82
DPPIV_Mammals	101	SINDYSISPDGQFILLEYNVYKQWRHSYTA---SYDIYDLNKRQLITEER	147
DPPIV_Hordeum	83	RERQRQLITG---ITRYQWSKNKSHSLMLIPIGCDLYIHNGKELRLLVN	128
DPPIV_Mammals	148	IPNNTQWVT--WSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSY--RITWTGK-ED	192
DPPIV_Hordeum	129	GSDQPPIIDPKLSPDGSFVAYVQDCELYYVSTSDATAQPRQITFDARGRP	178
DPPIV_Mammals	193	IIYNGITDWVYEFEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYS	242
DPPIV_Hordeum	179	NKTNGLAEFIAQEEM-ERSDGFWWSDNADFIQVDESNDVPAFRITHSG	227
DPPIV_Mammals	243	DESLQYPKTVRPYPKAGAVNPTVKFFVNT-DSLSSVTNATSIQITAPA	291
DPPIV_Hordeum	228	SDDPDQIEEHR--YFAGKANVQVNVGVVLDLRDKSKQEPDIYWIDLSS--	273
DPPIV_Mammals	292	SMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLV	341
DPPIV_Hordeum	274	---FHDYIARVNFPPDNTLALQIENREQ--TKLQLFQYD---FLNKKP	314
DPPIV_Mammals	342	ARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIIISNEE-GYRHICYFQID	390
DPPIV_Hordeum	315	SRLLEETSGSWINL---HDFHTLKKTPQFIWASERSGFMHLELYDLT	361
DPPIV_Mammals	391	K-KDCTFITKGTWEVIGIEALTSD--YLYYISNEYKMPGGRNLYKIQLS	437
DPPIV_Hordeum	362	TGKLKSLTNGEWVQRLVDIDEDNSVIYFLAN--RETPIEVHLYSVNYN	409
DPPIV_Mammals	438	DYTK-VTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSV	486
DPPIV_Hordeum	410	DDAPTVDRIQEVGCHVIHCFNRTFEYCITQWNSIDQCPTIRMLDVKKKQ	459
DPPIV_Mammals	487	NDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMLPPHFDK	536
DPPIV_Hordeum	460	VIKYFDHLHQGQ--QQTIEQFRFVKPQLLKITNRNNDTLYCAVYKPDGQ	507
DPPIV_Mammals	537	SKK---YPLLLDVYAGPCSQKA--DTVFRNLNWTYLASTENIIVASFDR	581
DPPIV_Hordeum	508	DRHQRPYPTLVSVYGGPHLQRVINSWALRVDMRCQRLVEAGYVVLRLDNR	557
DPPIV_Mammals	582	GSYGQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRKIAIWGSY	631
DPPIV_Hordeum	558	GSPNRGVAFESAIRYDMGHLELEDQVDGVRYLVQQGITDKTRVGIYGSY	607
DPPIV_Mammals	632	GGYVTSMVLGSGSGVFKGIAVAPVSRWEYVDSVYTERYMGLPTPEDNLD	681
DPPIV_Hordeum	608	GGYMSAMALVRANDVFKLGIAGAPVTHWDGYDHYTERYMG--TPEGNPR	655
DPPIV_Mammals	682	HYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKALVDVGVDFO	731
DPPIV_Hordeum	656	GYEVSVMHYINNLTG-HLMIMHGLIDENVHFRHSARLINALIRANKPYE	704
DPPIV_Mammals	732	AMWYTDDEHGIASSTAQHIIYTHMSHFQKQCFSLP	766
DPPIV_Hordeum	705	LVLFPDERHMPKLLDDRIYLEDRIFEYIRKYL---	736



D'après Tang J. et al. An inhibitor against dipeptidyl peptidase IV improves glucose tolerance in vivo. *J Biol Chem.* 2013 288:1307-16.

Q30. Émettre des hypothèses expliquant les résultats obtenus.

SYNTHÈSE FINALE

Q31. Rappeler les objectifs de la manipulation, les principaux résultats obtenus et conclure.

Une autre stratégie aurait pu être la production d'une protéine recombinante pour obtenir un modèle moléculaire utilisable pour tester des inhibiteurs d'intérêt pharmacologique.

Q32. Discuter le choix d'un système procaryote ou eucaryote pour effectuer cette production.

Références :

- Sen Shi, Daisuke Koya and Keizo Kanasaki, Dipeptidyl peptidase-4 and kidney fibrosis in diabetes, *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2016, 9:1
- Anne Davy, Karl Kristian Thomsen, Maria A. Juliano, Lira C. Alves, Ib Svendsen, and David J. Simpson, Purification and Characterization of Barley Dipeptidyl Peptidase IV, *Plant Physiology*, February 2000, Vol. 122, pp. 425–431
- Diana Röhrborn, Nina Wronkowitz and Juergen Eckel, DPP4 in diabetes, *Frontiers in Immunology*, July 2015, Volume 6, Article 386

Remerciements à Hervé Lamoureux de la malterie Yec'Hed Malt qui a fourni le malt d'orge vert, obtenu avant touraillage.

DOSSIER TECHNIQUE

Le dossier technique est distribué à côté du sujet.

ANNEXE 1

DONNÉES DE SÉCURITÉ SUR LES RÉACTIFS

Réactif de Bradford



Attention

H315 Provoque une irritation cutanée.

H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

Januvia® 100 mg (Sitagliptine)

Comprimés pelliculés utilisables par voie orale.

Médicament soumis à prescription médicale.

Posologie recommandée : 1 comprimé de 100 mg par jour par voie orale.



Ce médicament n'a qu'un effet négligeable sur l'aptitude à conduire, cependant des cas d'étourdissement ou de somnolence ont été rapportés.



Ne pas utiliser chez la femme enceinte, sauf en l'absence d'alternative thérapeutique.

Source : Laboratoire MSD

Tampon échantillon SB 2 X



Danger

H302 Nocif en cas d'ingestion.

H331 Toxique par inhalation.

H318 Provoque de graves lésions des yeux.



H411 Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme.

Gel de polyacrylamide pré-coulé

Pas de mention de danger ou d'avertissement

Conseil de prudence : porter des gants de protection et des lunettes de sécurité.

Source : FDS Fournisseur

Marqueur de taille (MT)

Pas de mention de danger ou d'avertissement

Conseil de prudence : porter des gants de protection et des lunettes de sécurité.

Source : FDS Fournisseur

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Extrait Brut (EB)	Extrait d'Orge obtenu selon le protocole ci-dessous	30 mL en tube conique
DEAE-Cellulose	Suspension de résine (DEAE-cellulose) à 50 g·L ⁻¹ en tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4	12 mL en flacon
Tampon de lavage	Tris-HCl 20 mM pH 7,4	25 mL en flacon
Tampon élution 1	Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM	25 mL en flacon
Tampon élution 2	Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM	20 mL en flacon

- Support pour colonne + seringue de 10 mL avec laine de verre + tuyau + pince de Mohr
- Verrerie
- Tubes collecteurs 50 mL
- Microtubes de 1,5 mL
- Bac à glace

MODE OPÉRATOIRE

Dans la mesure du possible, toutes les étapes de l'extraction et de la purification seront réalisées dans la glace.

Préparation d'un extrait brut d'orge (réalisée avant l'épreuve) :

- Dans un bécher de 400 mL :
 - Peser 12,5 g d'orge moulu et conservé à -20 °C ;
 - Ajouter 100 mL de tampon d'extraction : 20 mM tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100.
- Laisser sous agitation (700 rpm) dans la glace pendant 1 heure.
- Transvaser en tubes de 50 mL et centrifuger à 4000 rpm pendant 20 min à 4 °C.
- Récupérer le surnageant dans un bécher de 250 mL.
- Mesurer le volume de l'extrait brut obtenu, noté EB.
- Conserver l'extrait à 4 °C.

Purification de la DPP IV sur colonne de DEAE-cellulose :

- Dans un bécher de 250 mL, mélanger 10 mL de résine (DEAE-cellulose) et 25 mL d'extrait brut EB.
- Mettre en contact pendant 10 minutes dans la glace en agitant de régulièrement.
- Couler le gel dans une seringue de 10 mL et récupérer l'effluent (flow-through) dans un tube conique de 50 mL
- Laver la résine avec 20 mL de tampon de lavage et collecter l'effluent de lavage avec le flow-through. On obtient une fraction notée FTL.
- Éluer les protéines avec 24 mL de tampon d'élution 1. Collecter l'éluat obtenu dans un tube conique de 50 mL noté D1.
- Réaliser une élution successive de 10 fractions de 1 mL avec le tampon d'élution 2. Collecter les fractions obtenues en microtubes de 1,5 mL, notés D20 à D29.
- Fermer la colonne.

DONNÉES

Pour une extraction de 12,5 g d'orge moulu, on obtient 80 mL d'extrait brut EB.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
SAB	Solution étalon de sérumalbumine à $0,20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en eau physiologique	1 mL en microtube
Réactif de Bradford	Bleu de Coomassie G250 à $0,08 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, acide phosphorique 8,4 %, éthanol 5 %	Flacon avec distributeur 1 mL à disposition dans le laboratoire
Eau physiologique	Solution de NaCl à $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	10 mL en flacon
Échantillons	Extrait brut (EB) et fractions obtenues au cours de la purification	Voir FT1

- Semi-microcuvettes
- Spectrophotomètre

MODE OPÉRATOIRE***Etalonnage :***

1. Introduire entre 0 et 20 μg de sérum albumine pour un volume final de 100 μL dans des cuves spectrophotométriques.
2. Ajouter 1 mL de réactif de Bradford.
3. Homogénéiser.
4. Lire les absorbances à 595 nm après 5 minutes d'incubation. Ne pas dépasser 30 minutes.

Dosage des protéines dans les extraits obtenus :

- Réaliser le dosage des protéines des fractions obtenues en travaillant sur des échantillons dilués au $1/5^{\circ}$ et en adaptant cette dilution si nécessaire.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
GP-pNA	Solution de Gly-Pro-p-nitroanilide à $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ en tampon Tris $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,5	1400 μL en microtube
Tampon Enzymo	Tris $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,5	40 mL en flacon
Echantillons	Extrait brut (EB) et fractions obtenues au cours de la purification	Voir FT1

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

MODE OPÉRATOIRE

1. Tester chacune des fractions selon le mode opératoire de mesure d'activité suivant :

	TÉMOIN	ÉCHANTILLON
GP-pNA	50 μL	50 μL
Tampon Tris 50 mM pH 7,5	50 μL	-
Fraction testée	-	50 μL

2. Attendre 5 minutes à température ambiante.
3. Laisser la réaction se dérouler à température ambiante et suivre la cinétique pendant au moins 30 minutes par mesures d'absorbance à 405 nm.

DONNÉES

Le lecteur de microplaque est déjà réglé sur 405 nm.

Pour chaque point de cinétique :

- 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.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Echantillons	Extrait brut (EB) et fractions obtenues au cours de la purification	Voir FT1
Gel de polyacrylamide	Gel de polyacrylamide à 10% pré-coulé : Mini-protean TGX Gel 10 puits (Bio-Rad)	1 par candidat, mis en place par l'examineur sur demande
Tampon échantillon (SB 2X)	Tris 0,063 mol·L ⁻¹ ; glycérol 25 % ; SDS 2 % ; BBP (bleu de bromophénol) 0,01 % ; 2-mercaptoéthanol 5 %	180 µL en microtube
Tampon de migration (RB 1X)	Tris-HCl 25 mM ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1 %	Dans la cuve
Marqueur de taille (MT)	« <i>Unstained Precision Plus Protein Standard</i> » (Bio-Rad) : mélange de protéines recombinantes en tampon échantillon prêt à l'emploi	1 microtube commun à disposition sur la paillasse électrophorèse
Rapid-Blue	Solution aqueuse de bleu de Coomassie G250 80 mg·L ⁻¹ ; β-cyclodextrine 10 g·L ⁻¹ ; NaOH 33 mM ; acide phosphorique 8 % (V/V) ; éthanol 4,8 % (V/V)	1 flacon commun sur la paillasse électrophorèse

- Bloc chauffant thermostaté à 95 °C (1 pour 2 candidats)
- Cuve d'électrophorèse verticale Bio-Rad (1 pour 2 candidats)
- Générateur
- Boîte en plastique pour la révélation
- Flacon de récupération du Rapid-Blue

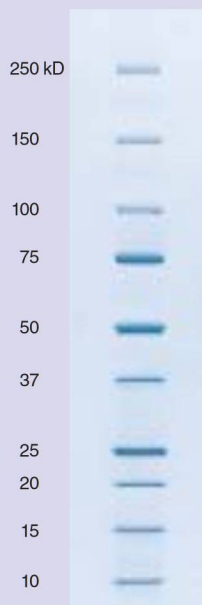
MODE OPÉRATOIRE

Prévenir un examinateur au démarrage de la préparation des échantillons.

1. Préparer 9 échantillons judicieusement choisis contenant :
 - 15 μ L de fraction protéique obtenue au cours de la purification ;
 - 15 μ L de tampon échantillon SB 2X (à bien homogénéiser avant utilisation).
2. Dénaturer les échantillons en les incubant 5 minutes à 95 °C.
3. Déposer sur un gel de polyacrylamide précoulé installé :
 - 10 μ L de marqueur de taille (MT);
 - 20 μ L de chacun des 9 échantillons dénaturés préparés.
4. Lorsque 2 gels sont prêts, brancher les électrodes et lancer la migration à 140 V pendant 45 minutes environ (le bleu de bromophénol doit atteindre le bas du gel).
5. En fin de migration, éteindre le générateur, sortir le gel et le démouler à l'aide d'une spatule pour casser le support plastique.
6. Déposer le gel dans une boîte en plastique et le rincer quelques minutes avec de l'eau déminéralisée.
7. Éliminer l'eau déminéralisée à l'évier puis recouvrir le gel avec 15 à 20 mL de colorant Rapid-Blue. Incuber 15 minutes.
8. Récupérer le Rapid-blue dans le flacon de récupération.
9. Rincer le gel à l'eau déminéralisée. Réaliser plusieurs lavages successifs pendant environ 15 minutes. Éliminer à l'évier.
10. Appeler l'examineur pour prendre le gel en photo.

DONNÉES

Representative lot of unstained Precision Plus Protein standards on a 4–20% Tris-HCl Criterion™ Gel



Precision Plus Protein standards are the latest generation of recombinant proteins designed to provide a ladder of convenient, consistent sizes. These standards continue the tradition of accuracy and ease of use begun by Precision Protein™ standards, while also providing instant orientation, even greater accuracy, particularly in the 10–25 kD range, and two-color convenience (catalog #161-0374 only). All Precision Plus Protein standards contain three reference bands (the 25 kD, 50 kD, and 75 kD bands are three times as intense as the other bands). These standards are available in unstained, prestained all blue, and prestained dual color formulations.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Januvia®	100 mg de sitagliptine, excipients	Comprimé pelliculé
Tampon Enzymo	Tris 50 mmol.L ⁻¹ ; pH 7,5	40 mL en flacon

- Mortier et pilon
- Verrerie

MODE OPÉRATOIRE

1. À l'aide du mortier et du pilon écraser finement le comprimé.
2. Préparer une solution mère par dissolution de la poudre obtenue dans 250 mL d'eau déminéralisée. Du fait de la présence des excipients, la solution obtenue est opalescente.
3. Préparer une solution fille de sitagliptine par dilution au 1/50^{ème} dans du tampon Tris 50 mM pH 7,5.

DONNÉES

$$M_{\text{sitagliptine}} = 407,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

FICHE TECHNIQUE 6**DÉTERMINATION DES CONSTANTES
CINÉTIQUES DE DPP IV ET
CARACTÉRISATION DE SON INHIBITEUR****RÉACTIFS ET MATÉRIEL**

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
DPP IV FM	Fraction enzymatique contenant de la DDPIV de foie de mammifère	400 µL en microtube
Fraction enzymatique contenant de la DPP4 d'orge	Fraction enzymatique contenant la meilleure activité catalytique	
Tampon Enzymo	Tris 50 mmol.L ⁻¹ pH 7,5	40 mL en flacon
GP-pNA	Solution de Gly-Pro-p-nitroanilide à 5 mmol.L ⁻¹ en tampon Tris 50 mmol.L ⁻¹ pH 7,5	1400 µL en microtube
Sitagliptine	Solution de sitagliptine préparée	Voir FT 5

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

MODE OPÉRATOIRE

1. Préparer une gamme de GP-pNA de concentrations : 2,5 ; 2 ; 1,5 ; 1 mmol.L⁻¹ en tampon Tris 50 mM pH 7,5 sous un volume final de 300 µL, pour réaliser ensuite :
 - une gamme de cinétiques avec l'extrait de foie de mammifère en absence de sitagliptine ;
 - une gamme de cinétiques avec l'extrait de foie de mammifère en présence de sitagliptine ;
 - une gamme de cinétiques avec l'extrait d'orge choisi en absence de sitagliptine ;
 - une gamme de cinétiques avec l'extrait d'orge choisi en présence de sitagliptine.
2. Mise en œuvre des gammes de cinétiques :

	Gamme en absence de sitagliptine	Gamme en présence de sitagliptine
Sitagliptine	0	10 µL
GP-pNA	50 µL	50 µL
Tampon Tris 50 mM pH 7,5	En quantité suffisante pour un volume de milieu réactionnel de 100 µL	
Fraction enzymatique	40 µL	40 µL

3. Attendre 5 minutes à température ambiante.
4. Laisser la réaction se dérouler à température ambiante et suivre la cinétique pendant au moins 30 minutes par mesures d'absorbance à 405 nm.

Cette technique de pipetage est utilisée pour les liquides visqueux ou volatils ou dans le but d'éviter la formation de bulles lors des pipetages de petits volumes.

Procéder en suivant les étapes ci-dessous :

1. Préparation

Tenir la pipette verticalement.
Appuyer sur le bouton-poussoir jusqu'à la deuxième butée.

2. Aspiration

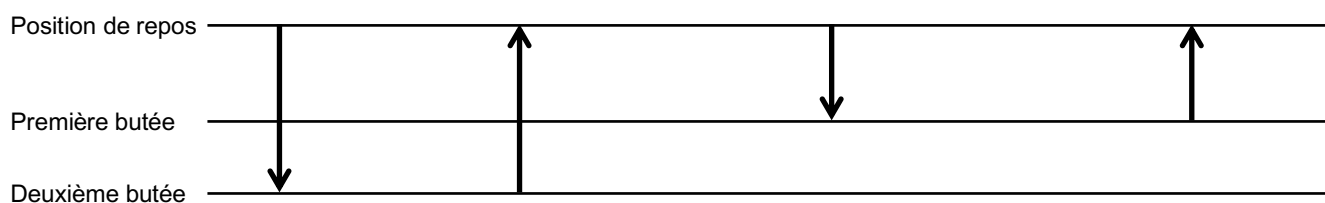
Immerger l'extrémité du cône et laisser remonter le piston jusqu'à sa position de repos.

3. Distribution

Tenir la pointe avec un angle de 10 à 45° contre la paroi du tube récepteur.
Appuyer doucement sur le bouton-poussoir jusqu'à la première butée.

4. Ré aspiration

Si la pointe est réutilisée pour le même échantillon, maintenir le piston à la position intermédiaire et recommencer à partir de l'étape 2.



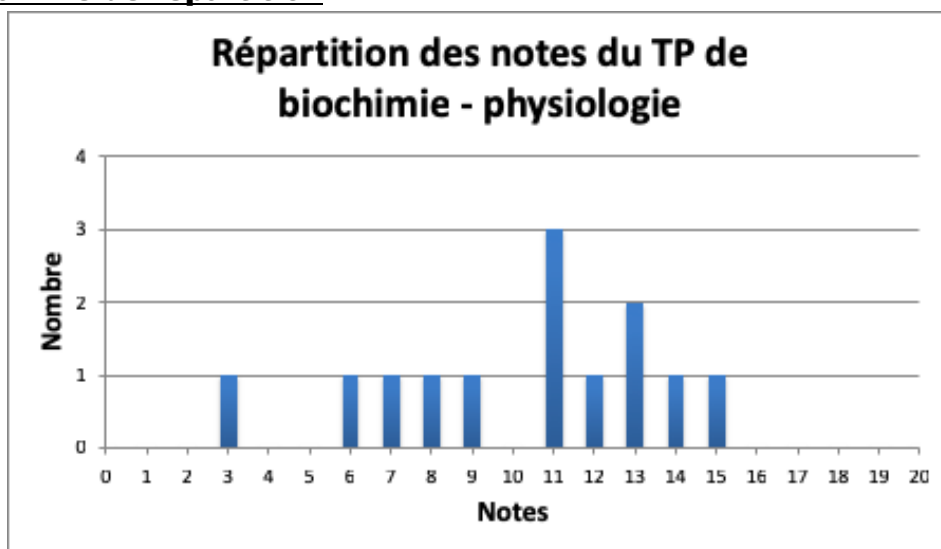
RAPPORT DU JURY DE TP DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Du malt au diabète

Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,62 / 20**
- Meilleure note : **15,30 / 20**
- Note la plus basse : **03,00 / 20**
- 8 notes sur 13 (**61 %**) sont supérieures ou égales à **10 / 20**
- Moyenne des candidats admis : **12,21 / 20**

Histogramme de répartition



COMMENTAIRES GÉNÉRAUX SUR L'ÉPREUVE

L'objectif du sujet était de déterminer si la dipeptidyl peptidase (DPP IV) d'orge était utilisable, une fois purifiée, pour étudier l'effet d'inhibiteurs de cette enzyme, ces inhibiteurs étant aujourd'hui prescrits dans le traitement du diabète. En effet, chez les mammifères, la protéase DPP IV hydrolyse la deuxième liaison peptidique de deux hormones hypoglycémiantes : GLP-1 et GIP. Le document 4 montrait que cette spécificité de position n'était pas liée à la présence d'acides aminés particuliers. Ces acides aminés N-terminaux sont par contre indispensables à la fixation des hormones hypoglycémiantes GLP-1 et GIP sur leur récepteur. Leur élimination par la DPP IV conduit donc à leur inactivation et entretient l'hyperglycémie.

- Dans un premier temps, il s'agissait d'extraire et de purifier la DPP IV d'orge, tout en réalisant un suivi de cette purification par dosage protéique et dosage d'activité enzymatique des différentes fractions grâce à un substrat synthétique, le Gly-Pro-p nitroanilide.
- Dans un second temps, après avoir choisi la fraction la plus riche en DPP IV d'orge, les candidats devaient comparer cette DPP IV à une DPP IV de mammifère :
 - à partir de la détermination de leurs constantes cinétiques respectives (K_M et v_{imax})
 - et en étudiant l'effet inhibiteur de la sitagliptine, molécule utilisée dans le traitement du diabète, sur ces deux DPP IV.

Les manipulations de la seconde partie devaient nécessairement être réalisées une fois la première partie terminée. Il était donc important de ne pas perdre de temps pour commencer les manipulations. Les mesures d'activités nécessitaient de prendre plusieurs mesures sur une durée d'une demi-heure ; il est à noter qu'un candidat qui manquait de temps pouvait prendre la décision de laisser la réaction se dérouler pendant une durée plus courte, dans la mesure où ses résultats étaient exploitables. Le jury félicite les candidats bien organisés qui ont réalisé l'ensemble des manipulations proposées dans le temps imparti, cependant il regrette que l'exploitation des résultats ait été très peu développée. Les candidats qui ont réussi à montrer qu'ils étaient capables d'exploiter leurs résultats de manière rigoureuse, et de mener à bien des calculs d'enzymologie ont été valorisés, de même que les candidats ayant pris suffisamment de recul pour conclure.

Au cours des manipulations le jury a pu apprécier l'organisation des candidats au travers de différents aspects comme l'organisation de leur poste de travail, l'annotation des tubes, la mise en œuvre d'un montage simple (réalisation de la colonne de chromatographie et collecte des fractions dans la glace), ... et évaluer le choix et l'utilisation (malheureusement pas toujours pertinents) de la verrerie et des pipettes à disposition.

Étant donné qu'il y avait un nombre important d'échantillons à traiter en parallèle, il était indispensable de bien maîtriser l'outil informatique afin de reproduire rapidement le même calcul sur l'ensemble des résultats obtenus.

Une attention particulière a été accordée aux qualités de communication des candidats. Ont été notamment évaluées la qualité de la présentation des graphes et des tableaux de résultats ainsi que la rédaction des calculs.

Sur ce dernier critère, il était rappelé en début de sujet que pour chaque calcul il fallait donner l'équation aux grandeurs, l'équation aux unités, ainsi qu'un exemple d'équation aux valeurs numériques. À propos des grandeurs calculées, les candidats doivent être attentifs à systématiquement préciser à l'aide d'indices clairs, la molécule et la solution concernée : il existe une grande différence de rigueur entre celui qui écrit « $z = \dots$ » et celui qui écrit « Z_{DPPIV} , fraction D24 = ... », cela permet de communiquer clairement et d'éviter les erreurs de calcul. Enfin, il est malheureusement encore bien trop rare de voir rédigées les équations aux unités, pourtant nécessaires à la vérification de l'équation aux grandeurs proposée.

Un certain nombre de questions visaient à vérifier la culture technologique des candidats (Q1, Q2, Q3, Q17, Q19, Q22) et auraient dû être traitées par tous. Étonnamment, elles ont souvent été très mal traitées.

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

Rappelons que l'enseignant doit quotidiennement apprendre à ses élèves à identifier les dangers, évaluer les risques associés et mettre en œuvre les moyens de prévention appropriés. Peu de manipulations nécessitaient d'utiliser des équipements de protection individuelle (gants – lunettes) et en règle générale, les candidats les ont utilisés avec discernement. Cependant quelques candidats ont abusé de l'usage des gants rendant incohérente cette utilisation, voire dangereuse pour les autres manipulateurs (dispersion du produit à risque par exemple).

PARTIE 1 : PURIFICATION DE LA DPP IV D'ORGE



La première partie de la purification correspondant à l'extraction de la DPP IV avait déjà été effectuée. Le tampon d'extraction comportait un détergent non ionique, le Triton X-100, nécessaire à l'extraction de l'enzyme membranaire et l'étape suivante de chromatographie allait permettre, entre autres, de se débarrasser de ce détergent qui, en modifiant la structure de l'enzyme, pouvait diminuer son activité. Le tampon était également additionné d'EDTA, molécule chélatrice des cations divalents et, à ce titre, inhibiteur des métalloprotéases à zinc. Son addition limitait ainsi l'hydrolyse des protéines dans l'extrait. Le maintien de toutes les fractions dans la glace avait aussi pour but de limiter l'action de ces protéases et conserver l'activité enzymatique de la DPP IV intacte.

La purification avait lieu en une étape à l'aide d'une chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-cellulose. Le coulage de la colonne et les dépôts devaient être réalisés avec soin pour garder une colonne homogène avec une surface plane. Le premier effluent (Flow Through) contenait donc toutes les molécules neutres ou chargées positivement (protéines, sels) et en particulier le Triton.

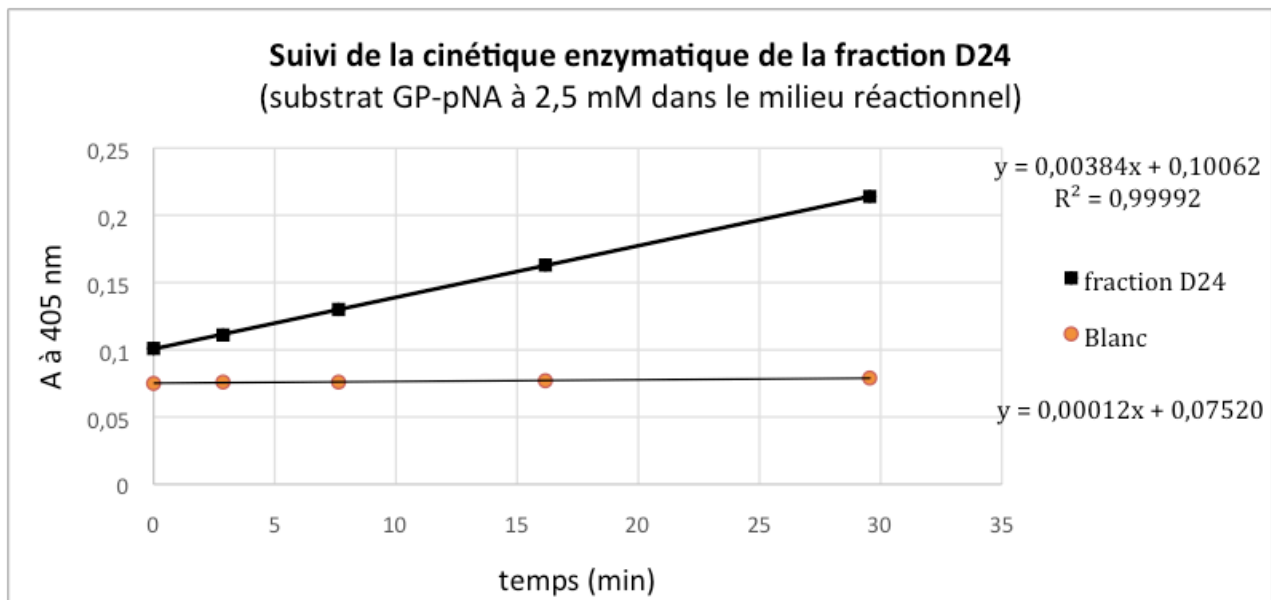
Le jury a été surpris de voir sur ces questions pourtant en tout début de sujet, soit une absence de réponse, soit des propositions qui montraient un manque flagrant de culture technologique (le jury a pu lire que le Tris était un détergent et le HCl avait un rôle de tampon !)

Trois types de suivis devaient être mis en œuvre. Il importait d'obtenir les résultats concernant le dosage des protéines totales et de l'activité enzymatique avant de déposer des fractions sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE, afin d'effectuer un choix judicieux des fractions intéressantes. La mesure d'activité imposait un temps de lecture de 30 minutes environ, temps qui pouvait être mis à profit pour réaliser le dosage des protéines. Par ailleurs, même sans faire les calculs détaillés, une évaluation des fractions présentant une plus forte activité était possible par simple lecture des résultats bruts.

Les résultats devaient être présentés avec soin dans un tableau complet et clairement annoté. La courbe d'étalonnage du dosage par la méthode de Bradford pouvait être tracée pour s'assurer de la qualité de celui-ci. L'équation de la régression linéaire permettait le calcul de la concentration protéique dans chaque fraction.

Le jury a apprécié les commentaires critiques des candidats sur leurs résultats et notamment l'exclusion de points erronés ou d'essais hors gamme. Lorsque la purification avait été bien conduite, certaines fractions trop riches en protéines nécessitaient en effet une dilution supplémentaire.

Concernant le suivi de l'activité enzymatique, la quantité de valeurs à récolter et à traiter imposait une bonne organisation ainsi qu'une bonne maîtrise du tableur. La cinétique de l'activité de DPP IV était maximale dans la fraction D24. La courbe était demandée :



Il convient de présenter les graphiques en suivant certaines règles : présence d'un titre judicieux, axes légendés avec les unités. Lorsqu'une régression linéaire est nécessaire, les points ne doivent pas être reliés, ni les courbes lissées.

Pour le calcul de vitesse initiale, il fallait penser à soustraire le « blanc » qui correspondait à une cinétique de transformation spontanée du substrat.

Pour l'exemple de la fraction D24 on a : $v_{i,D24} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon \times \ell}$

Où $\frac{\Delta A}{\Delta t} = \left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{brut} - \left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{blanc} = 0,00384 - 0,00012 = 3,72 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$

Le coefficient d'extinction molaire devait être calculé à l'aide du spectre d'absorption à 405 nm :

$$\epsilon = \frac{A}{\ell \times c} = \frac{0,950}{1 \times 0,1} = 9,50 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = 9,5 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Attention lors du calcul de la vitesse initiale, il fallait évaluer la longueur du trajet optique dans la cupule : la surface du puits étant de 0,32 cm², le volume de milieu réactionnel (V_{MR}) de 100 µL, la hauteur de liquide est de 3,1 mm, soit 0,31 cm.

Équation aux unités : $[\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}] = [\text{min}^{-1}] \times \frac{1}{[\text{L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \times [\text{cm}]}$

Calcul de la vitesse initiale pour la fraction D24 :

$$v_{i,D24} = 3,72 \cdot 10^{-3} \times \frac{1}{0,0095 \times 0,31} = 1,26 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

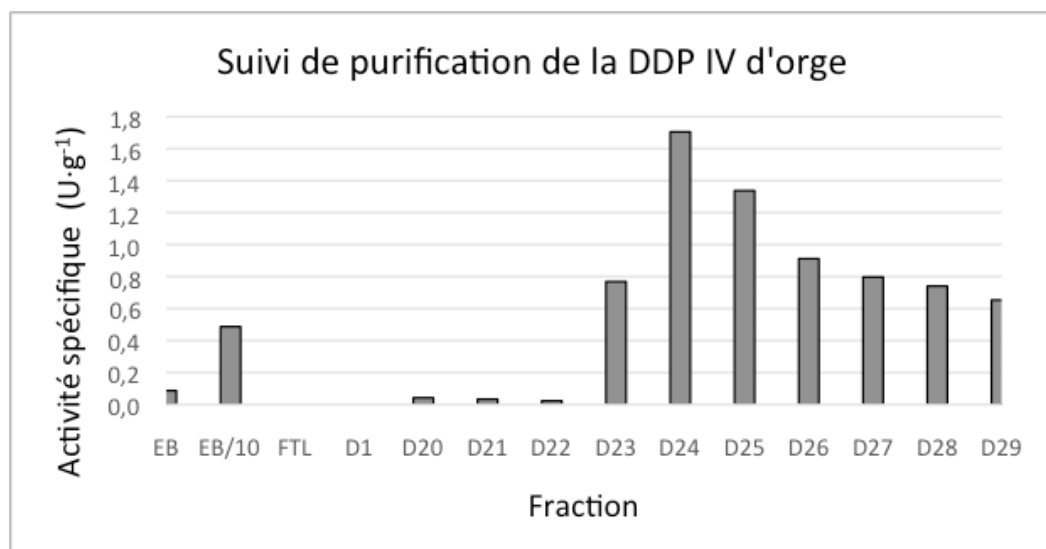
Pour l'ensemble des calculs suivants : concentration d'activité catalytique, activité spécifique et facteur d'enrichissement, il convenait d'expliquer ces calculs pour une fraction donnée et de construire le tableau de résultats pour l'ensemble des fractions à l'aide d'un tableur.

Tableau récapitulatif des résultats du suivi de purification :

Échantillons	EB	EB 1/10	FTL	D1	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29
V_i (réaction ; échantillon) ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,12	0,07	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,35	1,26	0,88	0,47	0,31	0,23	0,20
$b_{\text{(DPP IV ; échantillon)}}$ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,23	0,13	0,00	0,00	0,02	0,02	0,01	0,69	2,52	1,77	0,93	0,62	0,45	0,40
ρ (protéines ; échantillon) ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	2,68	0,27	0,51	0,79	0,55	0,47	0,43	0,9	1,48	1,32	1,02	0,78	0,61	0,61
Z_{sp} (DPP IV ; échantillon) ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	0,09	0,49	0,00	0,00	0,04	0,03	0,02	0,77	1,71	1,34	0,91	0,80	0,74	0,65
Taux purification par comparaison à EB/10						0,07	0,05	1,58	3,50	2,75	1,87	1,64	1,52	1,34

L'activité spécifique de l'enzyme dans la fraction EB diluée au dixième est bien supérieure à l'activité mesurée pour EB non dilué. Ceci peut s'expliquer par la présence de Triton dans le tampon d'extraction, qui inhiberait l'activité de l'enzyme. En diluant EB cette inhibition est masquée. Il convenait donc de comparer l'activité spécifique des différentes fractions à celle mesurée pour l'extrait brut dilué au 1/10.

Le graphe de synthèse pouvait consister à tracer l'évolution de l'activité spécifique au cours de la purification.

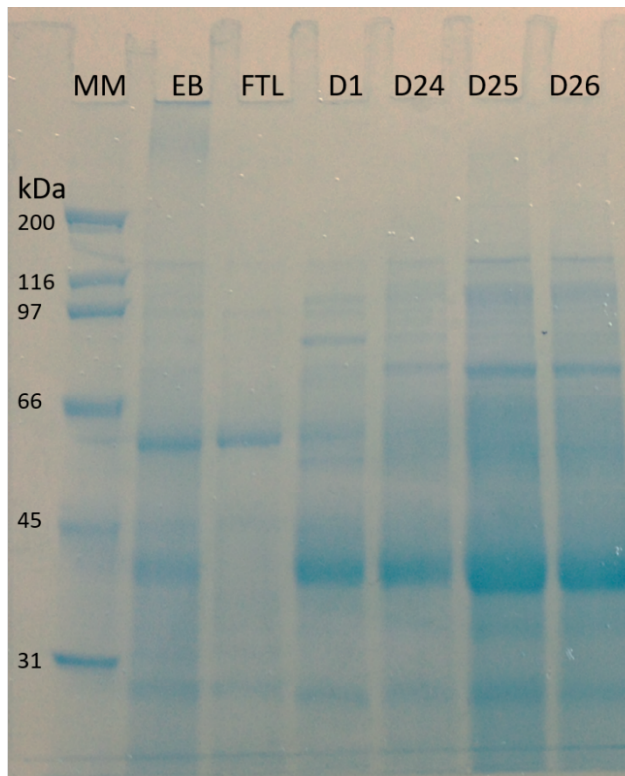


La fraction D24 est donc la fraction présentant la plus forte activité spécifique. Afin de visualiser l'enrichissement en DPP IV dans cette fraction, pouvaient être déposés sur le gel d'électrophorèse SDS-PAGE :

- l'extrait brut ;
- le Flow Though (FTL) ;
- des éluions présentant peu ou pas d'activité : D1 et D22 ;
- D24 et quelques autres fractions riches en activité.

Il ne fallait pas omettre le dépôt du marqueur de poids moléculaire. Un schéma du gel ou un plan des dépôts devait absolument figurer dans le compte-rendu pour permettre l'exploitation du gel une fois coloré.

Exemple de photo de résultat attendu :



Note : le marqueur de taille n'est pas identique à celui fourni le jour de l'épreuve

Sur cette partie, le jury évaluait tant la technicité des candidats lors de la préparation des échantillons et du dépôt sur gel, que l'interprétation des résultats en lien avec la structure de la DPP IV (glycoprotéine monomérique de 105 kDa). Très peu de candidats ont exploité leur gel, bien que certains, bien organisés aient lancé cette technique assez tôt durant l'épreuve. Pour une bonne résolution, il convenait de bien laisser migrer le gel (le bleu de bromophénol utilisé comme indicateur de migration doit atteindre le bas du gel) et de le colorer en respectant tant le temps d'action du colorant, que le rinçage. Le jury attendait des candidats une exploitation en évaluant la zone où est attendue la migration de la DPP IV, tout en rappelant que cette technique n'est que peu spécifique et que comme souvent pour ce type d'enzyme, la protéine n'étant pas surexprimée dans ce système, elle peut être présente en faible quantité et reste difficile à détecter. Était attendu des candidats qu'ils proposent d'autres techniques plus spécifiques, comme le Western blot. Là encore, un minimum de culture technologique a permis à certains candidats de se démarquer.

À l'issue de cette première partie les candidats devaient choisir la fraction la plus active qui était en général D24 (ou le cas échéant, proposer un pool des fractions les plus actives). Même si le taux d'enrichissement de cette fraction reste faible, il n'est ici le fruit que d'une seule étape de purification et d'autres techniques complémentaires devaient être proposées (chromatographie échangeuse de cations, chromatographie d'exclusion, immunoprécipitation ...).

PARTIE 2 : CARACTÉRISATION DE LA DPP IV ET DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA SITAGLIPTINE

La validation du modèle 'orge' devait se faire par comparaison des activités enzymatiques des DPP IV extraites du foie et du grain d'orge germé. Les manipulations de cette partie devaient être réalisées simultanément et le traitement fait grâce à un tableur.

L'inhibiteur était préalablement préparé par dissolution du comprimé de sitagliptine dans 250 mL d'eau distillée en fiole jaugée. La solution peu homogène obtenue devait être diluée en tampon Tris pH 7,4 (et non pas en eau distillée) au 1/50^{ème}. Une réflexion sur le volume final nécessaire (de l'ordre de 1mL) était attendue de la part des candidats afin d'utiliser la verrerie adaptée.

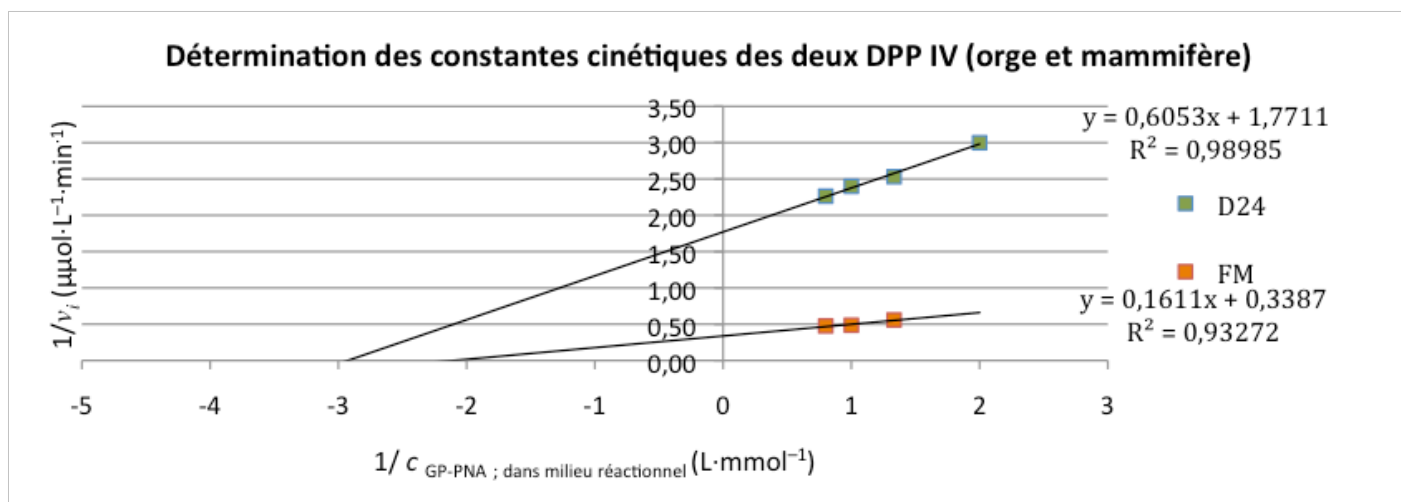
La réalisation des mesures de vitesses initiales pour les deux DPP IV (orge et mammifère) en différentes conditions de concentration en substrat, et en présence ou non de sitagliptine permettait d'évaluer les constantes cinétiques K_M et v_{max} . La représentation en double inverse pouvait par exemple être réalisée ; les candidats étaient libres d'utiliser d'autres représentations.

Exemple de résultats obtenus pour l'ensemble de ces mesures pour l'extrait de foie de mammifère fourni (FM) et pour la fraction D24 étudiée (D24) :

	FM				FM + sitagliptine			
$C_{GP-PNA, MR} (mmol \cdot L^{-1})$	1,25	1	0,75	0,5	1,25	1	0,75	0,5
$1/C_{GP-PNA, MR} (L \cdot mmol^{-1})$	0,8	1	1,33	2	0,8	1	1,33	2
$v_i (\mu mol \cdot min^{-1} \cdot L^{-1})$	0,910	2,101	2,056	1,791	0,146	0,116	0,090	0,054
$1/v_i (\mu mol^{-1} \cdot min \cdot L)$		0,48	0,49	0,56	6,87	8,65	11,09	
$1/v_i$ Valeurs non conservées	1,10							18,41

	D24				D24 + sitagliptine			
$C_{GP-PNA, MR} (mmol \cdot L^{-1})$	1,25	1	0,75	0,5	1,25	1	0,75	0,5
$1/C_{GP-PNA, MR} (L \cdot mmol^{-1})$	0,8	1	1,33	2	0,8	1	1,33	2
$v_i (\mu mol \cdot min^{-1} \cdot L^{-1})$	0,442	0,417	0,395	0,333	0,431	0,403	0,361	0,302
$1/v_i (\mu mol^{-1} \cdot min \cdot L)$	2,26	2,40	2,53	3,00	2,32	2,48	2,77	3,31
$1/v_i$ Valeurs non conservées								

Ci-dessous, la représentation de Lineweaver-Burk permet de déterminer K_M et v_{max} pour chaque DPP IV.

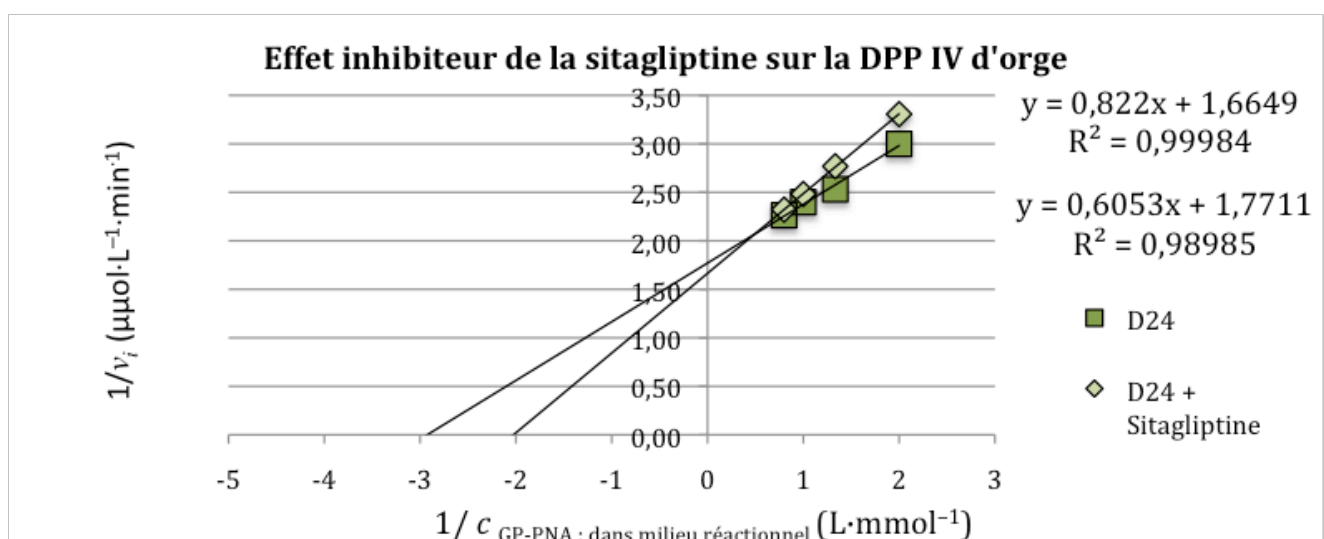
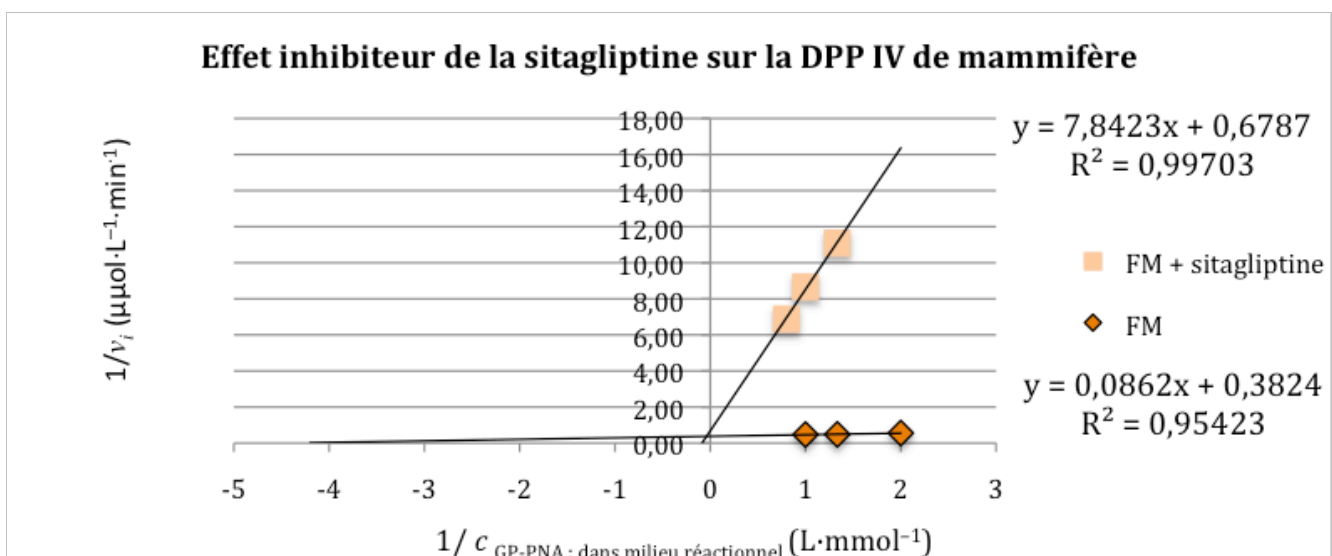


Par simple observation graphique en double inverse, on remarquait que la DPP IV de mammifère possédait une $v_{\max}$ et une affinité pour le substrat plus importantes que la DPP IV d'orge.

Concernant l'activité inhibitrice de la sitagliptine sur les deux DPP IV, sans même tracer les courbes, il était possible de comparer le pourcentage d'inhibition due à la sitagliptine pour une concentration donnée en substrat :

	DPP IV de mammifère (FM)	DPP IV extraite (D24)
% d'inhibition	96 %	16 %

La sitagliptine est donc un inhibiteur de la DPP IV bien moins efficace pour l'orge. Ceci pouvait aussi être mis en évidence par représentation graphique. Cette dernière permettant alors de qualifier le type d'inhibition exercée par la sitagliptine :



On pouvait effectivement observer, pour les deux DPP IV, que les $v_{i,max}$ en présence ou en absence d'inhibiteur étaient très proches, alors que l'affinité de l'enzyme pour le substrat PG-PNA ($1/K_M$) était diminuée en présence de sitagliptine ; cette diminution est extrêmement importante pour la DPP IV de mammifère et légère dans le cas de la DPP IV extraite d'orge.

Ces résultats montraient donc une inhibition de type compétitive de la sitagliptine sur la DPP IV, avec une inhibition très efficace sur la DPP IV de mammifère, alors que l'effet est faible sur l'enzyme d'orge. Les alignements moléculaires des deux enzymes permettaient d'expliquer cette observation : les acides aminés impliqués dans le site de liaison avec la sitagliptine ne sont que partiellement conservés (7 acides aminés sont conservés et R125 ; F357 ; R358 sont absents de DPP IV d'orge).

SYNTHÈSE FINALE

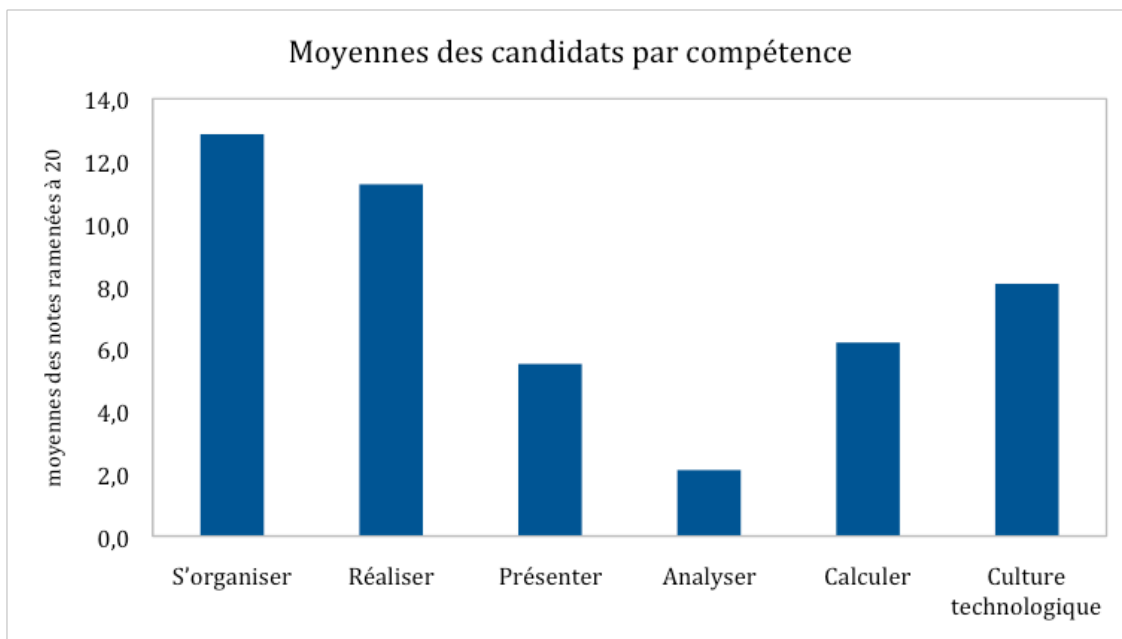
Si la purification en une étape de chromatographie de la DPP IV de l'orge permettait d'obtenir une activité enzymatique correcte avec un taux d'enrichissement significatif, le modèle d'étude ne peut cependant pas être validé car l'enzyme n'est pas sensible à un inhibiteur classiquement utilisé en milieu médical pour le traitement du diabète : la sitagliptine.

La production d'une enzyme humaine DPP IV recombinante est une alternative déjà envisagée. Cette production peut être réalisée dans deux systèmes aux intérêts différents. D'une part par la production en système procaryote après transformation des bactéries *E. coli* par un vecteur contenant l'ADNc de la DPP IV humaine qui peut être étiquetée avec une séquence de type 6 Histidines permettant une purification à l'aide d'une colonne d'affinité au cobalt ou au nickel. Cependant la DPP IV possédant un domaine transmembranaire, il y a un risque de routage de la protéine dans les corps d'inclusion bactérien ce qui limiterait fortement la production de cette protéine recombinante. L'autre alternative, est la production de la DPP IV humaine dans des cellules eucaryotes (levures, cellules d'insectes et/ou cellules de mammifères). Après transfection à l'aide d'un vecteur eucaryotique contenant la séquence de la DPP IV (étiquetée ou non), les cellules sont mises en culture en réacteur avec l'ensemble des composants nécessaires à leur croissance. Le principal écueil de cette approche est d'une part la mise en place d'un matériel spécifique (roller, réacteur, étuve adaptée...) et d'autre part le coût non négligeable en termes de composés permettant la croissance cellulaire comme le sérum pour les cellules de mammifère. La purification se fera soit par l'intermédiaire de l'étiquette soit en utilisant une colonne d'immuno-affinité.

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), ils négligent très généralement la présentation des résultats sous forme de tableau, graphe, ... clairement annotés et complets.

Ils mobilisent également insuffisamment leur culture scientifique et technologique et répondent peu aux questions d'analyse et de synthèse pourtant nécessaires pour une bonne compréhension du sujet et de la problématique.



La maîtrise de ces compétences technologiques est indispensable pour enseigner dans les filières STL-Biotechnologies et les BTS affiliés. Les candidats ne peuvent donc pas se dispenser d'une maîtrise minimale de celles-ci.

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

CRISPR-Cas : un système d'adaptation bactérien contre les infections phagiques et un outil révolutionnaire d'édition du génome

INTRODUCTION

Dans leur environnement naturel, les bactéries ont souvent à faire face à l'action délétère des bactériophages. Dans cette lutte permanente, elles ont développé de nombreux mécanismes de résistance. L'un d'entre eux, appelé CRISPR-Cas (Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated protein), est un système d'adaptation qui permet à la bactérie de reconnaître spécifiquement l'ADN phagique entrant et de le neutraliser par l'action d'une nucléase (Cas). Le mécanisme très sophistiqué de ce système permet à la bactérie de mémoriser les infections phagiques passées pour ensuite résister lors d'une nouvelle infection. Le système CRISPR-Cas est retrouvé dans 50% des *Eubacteria* et presque 90% des *Archaea* séquencées. La compréhension récente du mécanisme d'action du système CRISPR-Cas révolutionne les biotechnologies avec des perspectives très encourageantes pour la thérapie génique.

Le sujet propose :

- En **partie A**, d'étudier la cinétique de l'infection de souches de *Staphylococcus aureus* par un phage lytique.
- En **partie B**, d'illustrer l'adaptation d'un *Staphylococcus aureus* exprimant le système CRISPR-Cas pour lutter contre une infection phagique.
- En **partie C**, d'utiliser le système CRISPR-Cas comme outil génétique pour réprimer l'expression d'un gène rapporteur dans une souche d'*Escherichia coli*.

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 $DO_{600} = 0,020 - 0,800$.
- $DO_{600} = 0,100 \Leftrightarrow 5,0 \cdot 10^7$ *S. aureus* $\cdot \text{mL}^{-1}$ (bouillon TSB).
- $DO_{600} = 0,100 \Leftrightarrow 1,0 \cdot 10^8$ *E. coli* $\cdot \text{mL}^{-1}$ (bouillon LB).

MATÉRIEL UTILISABLE POUR TOUTES LES MANIPULATIONS

Matériel

Tubes à essai stériles de 20 mL à bouchon cellulose

Tubes à hémolyse stériles de 10 mL à bouchon cellulose

Microtubes de 1,5 mL stériles

Pipettes graduées stériles de 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL

Pipettes automatiques P1000, P200, P50, P10 et cônes adaptés

Pipettes Pasteur stériles

Systèmes d'aspiration à roulette et propipette

Fond noir

Vortex

Chronomètre

Bacs à glace

Lunettes de sécurité

Ordinateur et imprimante

PARTIE A

Étude de l'effet du phage NM4 sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en culture liquide

La sensibilité de *Staphylococcus aureus* à l'action d'un phage lytique et la cinétique de l'infection par ce phage seront étudiées.

Pour cela, deux souches SA1 et SA2 seront mises en contact du phage lytique NM4 et la multiplication bactérienne sera suivie au cours du temps. En fin de croissance, la quantité de bactéries survivantes à l'infection sera évaluée et le titre du phage dans le surnageant de culture sera déterminé.

Cultures et phage

SA1 - TSB 2 cultures de 18 heures à 37°C en bouillon TSB de la souche de *Staphylococcus aureus* SA1 (tubes de 10 mL)

SA2 - TSB 2 cultures de 18 heures à 37°C en bouillon TSB de la souche de *Staphylococcus aureus* SA2 (tubes de 10 mL)

Φ 1 microtube **vert** contenant 500 µL de phage **NM4** à $1,0 \cdot 10^{10}$ UFP·mL⁻¹ (utilisé en partie A et B)

Milieux de culture

Bouillon TSB 2 flacons de 100 mL de bouillon TSB stérile

Bouillon TSB 2 Erlenmeyers de 250 mL contenant 45 mL de TSB stérile

Gélose TSA18 24 géloses TSA, 18 mL, coulées en boîte de Pétri 90

Gélose TSA13 - CaCl₂ 1 gélose TSA + CaCl₂ à 5 mmol·L⁻¹, 13 mL, coulée en boîte de Pétri 90

Gélose TSA Top agar 1 tube de 8 mL de gélose TSB + 0,7% agar en surfusion
(à demander à un examinateur)

Réactif

CaCl₂ 1 flacon de 20 mL de CaCl₂ à 0,1 mol·L⁻¹
(utilisé en partie A et B)

Matériel spécifique individuel

4 tubes coniques de 50 mL stériles et portoir pour tubes coniques

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

Semi-microcuvettes et portoir

Morceaux de parafilm

2 seringues stériles et 2 filtres 0,22 µm

1 microplaque stérile à fonds ronds et couvercle (volume maximal d'une cupule = 250 µL), utilisée également en partie C

2 microtubes stériles de 2 mL

Matériel spécifique commun

Bain thermostaté à 37°C, agité à 120 rpm

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Microcentrifugeuse

MANIPULATIONS

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

A1- Démarrage de la croissance

- Introduire dans chaque Erlenmeyer du CaCl_2 à une concentration finale de $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.
- Dans un des deux Erlenmeyers, introduire la souche SA1 à une densité optique initiale à 600 nm d'environ 0,08. Vérifier la DO_{600} obtenue au spectrophotomètre.
- Procéder de même pour la souche SA2 dans le second Erlenmeyer.
- Incuber les deux Erlenmeyers dans un bain thermostaté à 37°C agité à 120 rpm. Cela correspondra au **temps $t = 0$** du suivi de croissance dans les différentes conditions.
- Suivre les deux croissances régulièrement par mesure de DO à 600 nm, jusqu'à atteindre une DO_{600} comprise entre 0,150 et 0,200.

A2- Suivi de la croissance dans les différentes conditions de culture

- Pour chaque Erlenmeyer, transférer la culture dans deux tubes coniques stériles ; chaque tube conique contiendra 15 mL de culture à $\text{DO}_{600} = 0,150\text{-}0,200$.
- Introduire les phages nécessaires, afin de suivre la croissance dans les quatre conditions suivantes :
 - **Tube SA1-T** : croissance **témoin** de la souche SA1,
 - **Tube SA1 - Φ** : croissance de la souche SA1 en présence de 100 μL du **phage NM4**,
 - **Tube SA2-T** : croissance **témoin** de la souche SA2,
 - **Tube SA2 - Φ** : croissance de la souche SA2 en présence de 100 μL du **phage NM4**.
- Incuber les quatre tubes coniques dans un bain thermostaté à 37°C agité à 120 rpm, en position inclinée.
- Continuer à suivre les croissances dans les quatre conditions pendant encore au minimum 2 heures, par mesure de DO à 600 nm toutes les 30 minutes.

A3- Dénombrements en fin de croissance

A31- Dénombrement des bactéries survivantes

- Réaliser un dénombrement des bactéries survivantes dans les quatre conditions testées, par étalement d'un volume d'inoculum de 50 μL , en surface de géloses **TSA18** précoulées en boîte, à l'aide de billes de verre. Les dilutions seront réalisées en bouillon **TSB** stérile dans une microplaque. Les dénombrements seront réalisés en double essai sur trois dilutions judicieusement choisies.

Une dilution en microplaque et un dénombrement de bactéries en surface seront réalisés en présence d'un examinateur.

A32- Dénombrement des phages par la technique des spots

Pour chacune des deux cultures réalisées en présence de phages :

- Centrifuger un aliquot de 1,5 mL en microtube de 2 mL pendant 5 min à 4000 rpm.
- Filtrer les 1,5 mL de surnageant à l'aide d'une seringue équipée d'un filtre 0,22 μm , et récupérer le filtrat dans un tube à hémolyse stérile.

Une filtration sera réalisée en présence d'un examinateur.

- Réaliser les dilutions décimales de chaque filtrat en bouillon **TSB** stérile et en microplaque jusqu'à la dilution 10^{-8} .

- Dans un tube de **TSA Top agar**, introduire :
 - le CaCl_2 à $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ final
 - 0,1 mL de la souche **SA1 - TSB**.
- Couler la double-couche précédemment préparée sur une boîte **TSA13 - CaCl_2** .
- Sur cette gélose, déposer par pipetage inverse des spots de $2 \mu\text{L}$ du filtrat et des différentes dilutions à tester. Les deux filtrats et leurs dilutions seront testés sur la même boîte.

Un dépôt de phages par pipetage inverse sera réalisé en présence d'un examinateur.

Les géloses ensemencées seront incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

COMPTE-RENDU

1. Justifier le volume de CaCl_2 introduit dans chaque Erlenmeyer de culture.
2. Présenter l'ensemble des résultats des mesures spectrophotométriques, les calculs, ainsi que le mode opératoire permettant l'ensemencement des Erlenmeyers en début de croissance.
3. Présenter les suivis de croissance dans un tableau.
4. Donner le titre initial en phages dans les cultures **SA1 - Φ** et **SA2 - Φ** .
5. Calculer les facteurs MOI « Multiplicity Of Infection » correspondant au nombre de phages introduits dans la culture rapporté au nombre de bactéries présentes, pour les cultures **SA1 - Φ** et **SA2 - Φ** au moment de l'ajout du phage.
6. Pour chacune des conditions de culture, justifier le choix des dilutions testées pour les dénombrements des bactéries survivantes en fin de croissance.

PARTIE B

Sélection et étude de clones résistants à l'infection phagique : mise en évidence de l'adaptation de la bactérie face à une infection par un phage lytique

Le mécanisme de résistance via le système CRISPR-Cas se fait en trois étapes (**annexe 1**).

Étape 1 - Adaptation :

La bactérie infectée reconnaît l'ADN phagique intrus et intègre une partie du génome phagique, appelé « spacer » dans le locus CRISPR. Ce locus constitue la mémoire des infections passées. Il est composé d'une succession de « spacers » séparés par des séquences palindromiques répétées.

Étape 2 - Synthèse de l'ARN guide (crRNA) :

La transcription du locus CRISPR produit un long ARN précurseur appelé pre-crRNA qui sera ensuite coupé par des nucléases pour donner un ensemble d'ARN guides (crRNA) spécifiques des ADN viraux déjà rencontrés.

Étape 3 - Interférence :

Le crRNA forme un complexe avec la nucléase Cas. La séquence complémentaire du crRNA avec l'ADN viral permettra de guider la nucléase de manière spécifique pour dégrader le génome viral au moment de son entrée dans la cellule bactérienne.

L'étape d'adaptation d'un *Staphylococcus aureus* exprimant le système CRISPR-Cas sera étudiée par analyse PCR du locus CRISPR de clones ayant survécu à l'infection phagique.

Pour faciliter la sélection et l'étude de clones de *S. aureus* résistants à l'infection, le système CRISPR-Cas a été cloné sur un plasmide et introduit dans la souche SA1 pour donner la souche SA3. Le plasmide, porteur du gène de résistance au chloramphénicol, est maintenu dans la population bactérienne grâce à l'ajout de chloramphénicol dans le milieu de culture.

Cultures et phage

SA3 -TSB - CMP

1 culture de 18 heures à 37°C en bouillon TSB + chloramphénicol à 10 µg·mL⁻¹, de la souche de *Staphylococcus aureus* SA3 (tube de 10 mL)

Φ

1 microtube **vert** contenant 500 µL de phage **NM4** à 1,0.10¹⁰ UFP·mL⁻¹ (utilisé en partie A et B)

Clones PCR

5 clones (n°1 à 5), 1 clone adapté (+), 1 clone non adapté (-) présentés sur gélose TSA + chloramphénicol à 10 µg·mL⁻¹, culture en stries

Milieux de culture

Gélose TSA13 - CaCl₂ - CMP

1 gélose TSA + CaCl₂ à 5 mmol·L⁻¹ + chloramphénicol à 10 µg·mL⁻¹, 13 mL, coulée en boîte de Pétri 90

Gélose TSA Top agar

1 tube de 8 mL de gélose TSB + 0,7% agar, en surfusion
(à demander à un examinateur)

Réactifs

CaCl₂	1 flacon de 20 mL de CaCl ₂ à 0,1 mol·L ⁻¹ (utilisé en partie A et B)
CMP	1 microtube bleu de 50 µL de chloramphénicol à 2 mg·mL ⁻¹
Tpn lyse	1 microtube rose contenant 500 µL de tampon de lyse : Lysostaphine à 50 ng·µL ⁻¹ , KCl à 250 mmol·L ⁻¹ , MgCl ₂ à 5 mmol·L ⁻¹ , Tris-HCl pH9 à 50 mmol·L ⁻¹ , TritonX-100 à 0,5%.
Tp PCR	1 microtube de 60 µL de tampon PCR 10X
MgCl₂	1 microtube de 60 µL de MgCl ₂ à 25 mmol·L ⁻¹
dNTP	1 microtube de 12 µL d'un mélange des 4 dNTP à 10 mmol·L ⁻¹ chacun
P1	1 microtube de 12 µL d'amorce P1
P2	1 microtube de 12 µL d'amorce P2
Taq pol	1 microtube de 7 µL de Taq polymérase à 1,25 U·µL ⁻¹
H₂O BM	1 microtube de 500 µL d'eau qualité Biologie Moléculaire

Matériel spécifique individuel

1 microbarrette PCR contenant 8 tubes PCR, présentée dans une boîte
10 cure-dents stériles dans un pot

Matériel spécifique commun

Microcentrifugeuse
Bloc thermostaté à sec réglé à 37°C
Bloc thermostaté à sec réglé à 98°C
Thermocycleur

MANIPULATIONS**B1- Sélection des clones survivants après l'infection phagique**

- Dans un tube de **TSA Top agar**, introduire :
 - le CaCl₂ à 5 mmol·L⁻¹ final
 - le chloramphénicol à 10 µg·mL⁻¹ final
 - 0,1 mL de la souche **SA3 -TSB - CMP**
 - 0,1 mL du phage **Φ**.
- Couler la double-couche précédemment préparée sur une boîte **TSA13 - CaCl₂ - CMP**.
- Incuber la gélose ensemencée à 37°C pendant 18 à 24 heures.

COMPTE-RENDU

7. Expliquer le rôle du CaCl₂ et du chloramphénicol.
8. Donner les caractéristiques des clones obtenus après incubation. Proposer plusieurs mécanismes expliquant ces caractéristiques.

B2- Étude de clones survivants après l'infection phagique par PCR

Cinq clones, numérotés de **1** à **5**, obtenus selon le protocole présenté en partie B1 à partir de la souche SA3, sont présentés sur une gélose TSA additionnée de chloramphénicol à 10 µg·mL⁻¹ (boîte notée **Clones PCR**). Deux contrôles sont également présents sur cette boîte : un clone adapté (noté **+**) et un clone non adapté (noté **-**).

- Pour chaque clone et contrôle :
 - À l'aide d'un cure-dent, piquer la colonie.
 - Resuspendre en microtube la culture prélevée dans 40 μL de tampon de lyse.
 - Incuber 20 minutes à 37°C dans un bloc thermostaté à sec.
 - Incuber 10 minutes à 98°C dans un bloc thermostaté à sec.
 - Incuber 5 minutes dans la glace.
 - Centrifuger 1 minute à 4000 rpm.
- Réaliser une PCR en microbarrette sur **2 μL** de chacun des échantillons préparés précédemment. Prévoir également un **témoin de PCR**.

Pour chaque PCR, le mix doit être composé de :

- Tampon PCR : 1X final
- MgCl_2 : 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ final
- dNTP : 1 μL
- amorce P1 : 1 μL
- amorce P2 : 1 μL
- Taq polymérase : 0,5 μL
- H_2O qualité BM : qsp 48 μL

Donner la microbarrette fermée à un examinateur. Le programme de PCR suivant sera appliqué :

- 1 cycle : 3 min à 95°C,
- 35 cycles : 30 s à 95°C + 30 s à 55°C + 1 min à 72°C,
- 1 cycle : 5 min à 72°C.

COMPTE-RENDU

9. Présenter les calculs et le mode opératoire de la réalisation du mix PCR.

10. Expliquer comment déterminer la température d'hybridation des amorces lors d'une PCR.

PARTIE C

Utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 pour réguler l'expression du gène de la GFP chez *Escherichia coli*

De par ses propriétés d'édition de génome le système CRISPR-Cas constitue un formidable outil biotechnologique. Par exemple, ce système peut être modifié par génie génétique et servir d'outil de contrôle de l'expression d'un gène. La nucléase Cas9 a été modifiée pour supprimer son activité nucléase tout en conservant sa capacité de liaison à l'ADN. Cette nucléase modifiée est appelée dCas9. Sa spécificité de liaison à l'ADN est assurée par un ARN guide dessiné pour être dirigé vers une région promotrice d'un gène rapporteur.

L'utilisation du système CRISPR-Cas comme outil de régulation de l'expression d'un gène sera mis en œuvre dans une souche d'*Escherichia coli* hébergeant le gène *gfp* codant la Green Fluorescent Protein (GFP) et le gène *dCas9*. En l'absence d'ARN guide pour la dCas9, la souche d'*E. coli* produit de manière constitutive la GFP. La souche sera transformée par un plasmide exprimant un ARN guide (crRNA) dont la séquence est complémentaire de la région promotrice du gène *gfp*. Après transformation efficace de la bactérie par ce plasmide, les bactéries voient leur expression de GFP diminuée. Ce système est induit par un antibiotique, l'anhydrotétracycline (aTc). La manipulation sera également effectuée avec un plasmide contrôle, ne contenant pas de séquence crRNA. Ces deux plasmides portent un gène de résistance à la kanamycine.

Culture et plasmides

AV02 - LA

1 isolement sur gélose **LA** de la souche d'*Escherichia coli* **E coli gfp-dCas9 AV02**

pEC

1 microtube **jaune** contenant 5 μL du plasmide contrôle pEC à 12 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$

pEF

1 microtube **orange** contenant 5 μL du plasmide codant l'ARN guide pEF à 12 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$

Milieux de culture

Bouillon LB

1 flacon de 100 mL de bouillon LB stérile

Gélose LA - Km - aTc

2 géloses LA + kanamycine à 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + anhydro-tétracycline à 1 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, coulées en boîte de Pétri 90

Gélose LA

6 géloses LA coulées en boîte de Pétri 90

Réactif

CaCl₂

1 flacon de 20 mL de CaCl₂ à 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (**dans bac à glace**)

Matériel spécifique individuel

1 tube conique de 50 mL stérile et portoir pour tubes coniques

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

Flotteur pour microtubes

1 microplaque stérile à fonds ronds et couvercle (volume maximal d'une cupule = 250 μL), utilisée également en partie A

1 **bac à glace** contenant :

1 tube à centrifuger stérile de 50 mL

4 pipettes stériles de 10 mL et 1 pipette stérile de 2 mL

1 sachet de 2 cônes jaunes stériles et 5 cônes cristal stériles

Pot contenant 5 microtubes stériles vides

Matériel spécifique commun

Centrifugeuse réfrigérée pour tubes coniques de 50 mL
Bain thermostaté à 42°C
Bain thermostaté à 37°C, agité à 120 rpm
Spectrophotomètre réglé à 600 nm

MANIPULATIONS

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

C1- Préparation de la souche à transformer**C11. Culture d'*E. coli***

- À partir de la souche **AV02**, réaliser une suspension riche en tube à essai, dans 5 mL de bouillon **LB**. Mesurer la densité optique de la suspension préparée à 600 nm.
- À partir de cette première suspension, préparer en tube conique, 15 mL d'une suspension de **AV02** en bouillon **LB** à environ $2,0 \cdot 10^8$ bactéries $\cdot$ mL⁻¹. Vérifier la DO₆₀₀ obtenue à t₀ au spectrophotomètre.
- Incuber dans un bain thermostaté à 37°C agité à 120 rpm, en position inclinée.
- Suivre la croissance régulièrement par mesure de DO à 600 nm, jusqu'à atteindre une densité cellulaire d'environ $8,0 \cdot 10^8$ bactéries $\cdot$ mL⁻¹.
- Stopper la croissance en plaçant la culture dans la glace.

C12. Préparation des bactéries en vue de la transformation

*À partir de ce point, le matériel et les réactifs
doivent être froids et donc conservés dans la glace.*

- Centrifuger 10 mL de culture dans un tube conique froid, 10 minutes à 3000 rpm à 4°C.
- Éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 10 mL de **CaCl₂** froid.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm à 4°C.
- Éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 2 mL de **CaCl₂** froid.

C2- Transformations de la souche

Pour chacun des deux plasmides testés :

- Placer dans un microtube froid 100 µL de bactéries préparées.
- Ajouter 3 µL du plasmide à tester.
- Mélanger doucement en tapotant légèrement le microtube.
- Placer le microtube 90 secondes à 42°C.
- Placer immédiatement le microtube 2 minutes dans la glace.
- Ajouter 800 µL de bouillon **LB** stérile.
- Incuber les deux microtubes sur le flotteur dans le bain thermostaté à 37°C agité pendant 45 minutes.

C3- Dénombrement des bactéries totales après transformation

- Effectuer un dénombrement des bactéries transformées par le plasmide pEC, par étalement d'un volume d'inoculum de 50 µL, en surface de gélose **LA** précoulées en boîte, à l'aide de billes de verre. Les dilutions seront réalisées en milieu LB stérile, dans une microplaque. Les dénombrements seront réalisés en double essai sur trois dilutions judicieusement choisies.

C4- Sélection des transformants

- Étaler 100 µL du contenu de chaque microtube à l'aide de billes sur une gélose **LA - Km - aTc**.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

COMPTE-RENDU

11. Présenter l'ensemble des résultats des mesures spectrophotométriques, les calculs, ainsi que le mode opératoire permettant l'ensemencement du bouillon LB.
12. Indiquer la valeur de DO₆₀₀ correspondant à l'arrêt de cette croissance.
13. Expliquer l'intérêt des différentes étapes décrites en parties **C12** et **C2**.
14. Justifier le choix des dilutions pour la numération des bactéries totales après transformation.
15. Justifier la méthode de sélection des clones transformés.
16. Préciser le rôle de l'anhydrotétracycline dans le milieu de culture.

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 l'effet du phage NM4 sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en culture liquide

A3- Dénombrements en fin de croissance

A31- Dénombrement des bactéries survivantes

MANIPULATIONS

- Dénombrer les colonies obtenues.

COMPTE-RENDU

17. À l'aide de l'outil informatique (EXCEL), tracer sur un même graphique les courbes de croissance correspondant aux différentes conditions de culture. Imprimer ce graphe, ainsi que le tableau de valeurs de DO_{600} correspondant et les joindre au compte-rendu.
18. Analyser les courbes de croissance obtenues dans les différentes conditions.
19. Déterminer le temps de génération G et la vitesse spécifique de croissance μ_{expo} des deux souches.
20. Présenter les résultats des dénombrements sous forme de tableaux.
21. Calculer les concentrations cellulaires en fin de croissance dans les quatre conditions.
22. Corréler ces résultats aux densités optiques obtenues en jour 1. Commenter les résultats en tenant compte du contexte de l'étude.
23. Calculer la correspondance entre DO_{600} et $UFC \cdot mL^{-1}$ pour les souches SA1 et SA2 en fin de croissance en absence de phage et commenter.

A32- Dénombrement des phages par la technique des spots

MANIPULATIONS

- Dénombrer les plaques de lyse obtenues.

COMPTE-RENDU

24. Présenter les résultats sous forme de tableaux.
25. Calculer les concentrations phagiques dans les surnageants de culture **SA1 - Φ** et **SA2 - Φ** en fin de croissance.
26. Calculer le facteur d'amplification du phage dans les cultures **SA1 - Φ** et **SA2 - Φ** en fin de croissance et le commenter.

PARTIE B

Sélection et étude de clones résistants à l'infection phagique : mise en évidence de l'adaptation de la bactérie face à une infection par un phage lytique

B1- Sélection des clones survivants après l'infection phagique

MANIPULATIONS

- Dénombrer les colonies obtenues.

COMPTE RENDU

27. Indiquer le nombre de clones résistants obtenus et analyser ces résultats.

B2- Étude de clones survivants après l'infection phagique par PCR

Echantillons PCR

Microbarrette après réalisation de la PCR

Réactifs

Tp charge
100pb

1 microtube de 20 µL de tampon de charge 6X
1 microtube de 12 µL de marqueur de taille 100pb DNA Ladder prêt à être déposé (annexe 2)

Matériel spécifique individuel

1 cuve à électrophorèse remplie de tampon TAE 1X + générateur
1 gel d'agarose à 2% + RedGel 1X en tampon TAE 1X
Feuille de papier noir
Sac de récupération des déchets RedGel
1 boîte de Pétri carrée (pour transport du gel)

Matériel spécifique commun

Gants à usage unique
Lecteur de gel

MANIPULATIONS

- Préparer les échantillons à déposer sur gel en tampon de charge **Tp charge** 1X final.
- Déposer, dans le gel d'agarose, 10 µL des échantillons préparés précédemment.
- Déposer également 10 µL du marqueur de taille **100pb**.

Un dépôt de produit de PCR en gel d'agarose sera réalisé en présence d'un examinateur.

- Faire migrer à 150 V pendant le temps nécessaire.
- Observer les résultats obtenus sous UV à l'aide d'un lecteur de gel.

COMPTE-RENDU

28. Sachant que l'oligonucléotide P1 a pour séquence (5'-CGAAATTTTTTAGACAAAAATAGTC-3') et P2 a pour séquence 5'-AAAACAAAAAGCGCAAGAAGAAATCAACCAGCGCA-3', positionner sur le document **annexe 3A** les oligonucléotides utilisés pour la PCR.
29. En utilisant l'**annexe 3**, calculer la taille attendue du produit d'amplification avant adaptation.
30. En s'appuyant sur l'**annexe 4**, schématiser la structure attendue du locus CRISPR après adaptation de SA3 pour le phage NM4. En déduire la taille attendue du produit d'amplification après adaptation.
31. Légender la photo du gel et interpréter les résultats obtenus après migration des produits PCR.

PARTIE C

Utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 pour réguler l'expression du gène de la GFP chez *Escherichia coli*

Adapté de la référence bibliographique (3)

C3- Dénombrement des bactéries totales après transformation

MANIPULATIONS

- Dénombrer les colonies obtenues.

COMPTE RENDU

32. Présenter les résultats du dénombrement sous forme d'un tableau.
33. Calculer la concentration cellulaire de la suspension de bactéries après transformation.

C4- Sélection des transformants

MANIPULATIONS

- Dénombrer les colonies obtenues.

COMPTE RENDU

34. Présenter les résultats du dénombrement sous forme d'un tableau.
35. Calculer l'efficacité de transformation par microgramme d'ADN plasmidique.

C5- Analyse des clones transformés

Milieux de culture

PHY10

1 flacon de 10 mL d'eau physiologique stérile

Matériel spécifique individuel

Lames et lamelles

Microplaque transparente à fond plat 96 puits pour mesure de densité optique

Microplaque noire à fond plat 96 puits pour mesure de fluorescence

Matériel spécifique commun

Microscope à fluorescence
Spectrophotomètre pour microplaque + imprimante
Spectrofluorimètre + imprimante

MANIPULATIONS

C51. Vérification de l'expression du gène rapporteur (GFP) par la souche d'*E. coli* AV02

- Réaliser l'observation à l'état-frais des bactéries issues des colonies de la boîte contrôle au microscope à fluorescence.

L'observation microscopique sera effectuée en présence d'un examinateur.

C52. Quantification de l'effet de la transformation sur l'expression de la GFP

Trois transformants obtenus avec le plasmide pEC et trois transformants obtenus avec le plasmide pEF sont testés.

Pour chaque transformant testé :

- Introduire 425 µL d'eau physiologique dans un microtube.
- Prélever un clone en totalité à la pipette Pasteur fermée et le mettre en suspension dans l'eau physiologique.
- Répartir dans la première ligne des microplaques fournies :
 - 200 µL de la suspension obtenue dans une cupule de la microplaque transparente à fond plat pour la mesure de la densité optique à 630 nm.
 - 200 µL de la suspension obtenue dans une cupule de la microplaque noire pour la mesure de fluorescence.
- Prévoir un blanc de lecture dans chaque plaque en A12.
- Mesurer la densité optique à 630 nm de chaque cupule.
- Mesurer la fluorescence de chaque cupule.

COMPTE RENDU

36. Présenter et interpréter les résultats de l'observation microscopique.

37. Présenter vos résultats de mesure de densité optique et de fluorescence dans un tableau.

38. Rapporter les valeurs de fluorescence obtenues par unité de densité optique.

39. Commenter les résultats.

Bibliographie

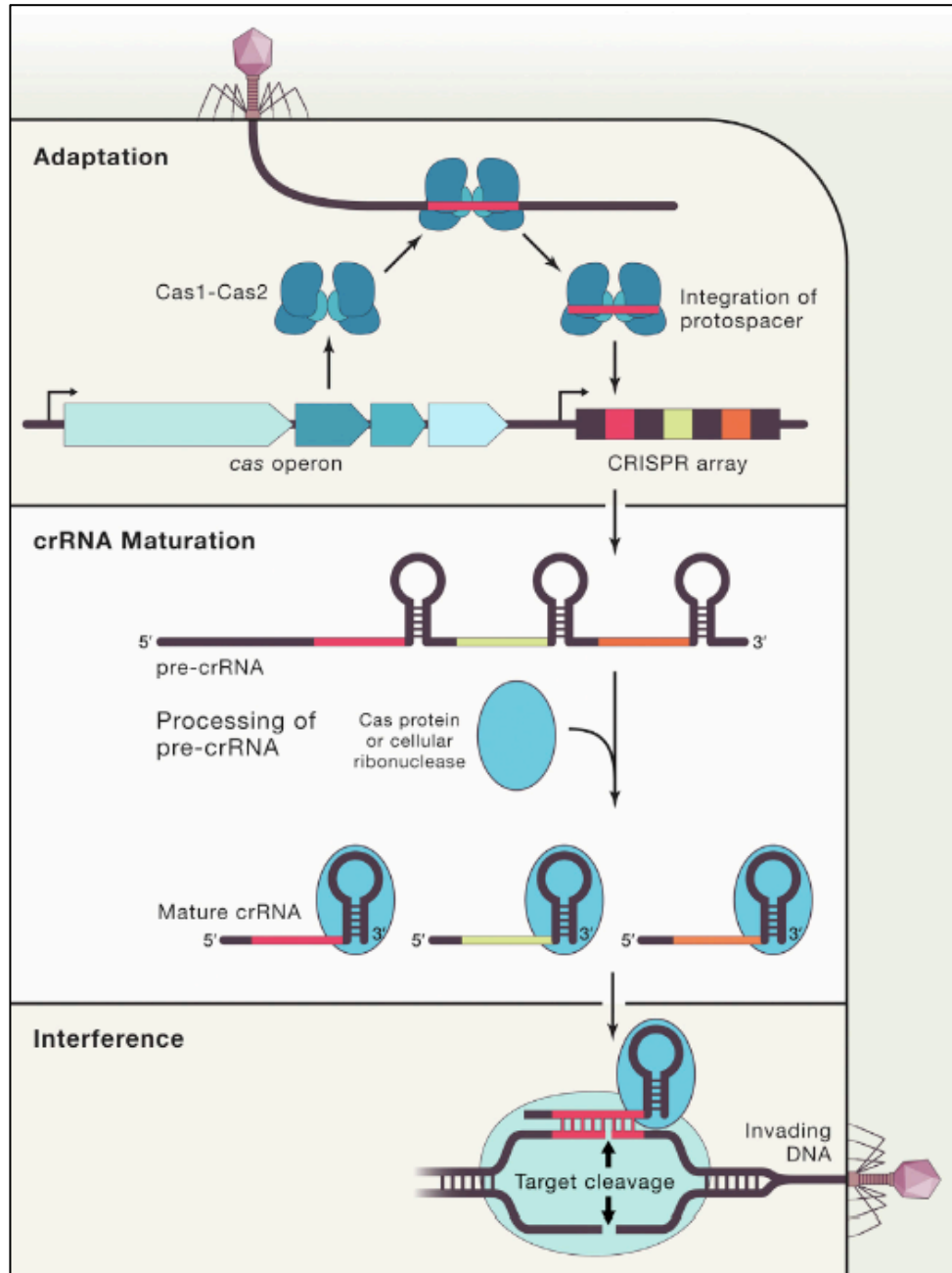
- (1) The Biology of CRISPR-Cas : Backward and Forward, HILLE F., RICHTER H., WONG SP. BRATOVIČ M., RESSEL S., CHARPENTIER E., CELL 172, March 8, 2018.
- (2) CRISPR-Cas adaptation : insights into the mechanism of action, G. AMITAI and R. SOREK, Nature Reviews Microbiology volume 14, pages 67–76 (2016)
- (3) Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system, DAVID BIKARD, WENYAN JIANG, POULAMI SAMAI, ANN HOCHSCHILD, FENG ZHANG and LUCIANO A. MARRAFFINI, Nucleic Acids Research, 2013, Vol. 41, No. 15 7429–7437.

Les souches bactériennes et le phage utilisés dans ce sujet ont été fournis par David BIKARD, Groupe « Biologie de synthèse », Département Microbiologie, Institut Pasteur.

ANNEXE 1

LES TROIS ÉTAPES DU MÉCANISME DE RÉSISTANCE VIA CRISPR-CAS

Adapté de la référence bibliographique (1)



During adaptation, the Cas1-Cas2 complex selects a part of the foreign DNA and integrates it into the host's CRISPR array. In the next stage (crRNA maturation), the CRISPR array is transcribed into a long pre-crRNA that is further processed by Cas proteins or, in some cases, by cellular RNases. In the interference stage, the mature crRNAs guide Cas nucleases to the cognate foreign DNA. The Cas proteins cleave the foreign nucleic acid upon binding of the crRNA to the target sequence. In class 1 systems, the interference machinery is a multi-Cas-protein complex, whereas class 2 systems utilize a single Cas protein for target cleavage.

ANNEXE 2

MARQUEUR DE TAILLE 100 pb DNA LADDER

100 bp DNA Ladder

100 gel lanes (50 µg)
500 µg/ml Store at -20°C

1.5 ml Gel Loading
Dye, Blue (6X) Store at 25°C

Description: A number of proprietary plasmids are digested to completion with appropriate restriction enzymes to yield 12 bands suitable for use as molecular weight standards for agarose gel electrophoresis. The digested DNA includes fragments ranging from 100–1,517 base pairs. The 500 and 1,000 base pair bands have increased intensity to serve as reference points.

Supplied in: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

Reagents supplied:
6X Gel Loading Dye, Blue

1X Gel Loading Dye, Blue:
2.5% Ficoll-400
11 mM EDTA
3.3 mM Tris-HCl (pH 8.0@25°C)
0.017% SDS
0.015% bromophenol blue

Preparation: The double-stranded DNA is digested to completion with appropriate restriction enzymes, phenol extracted and equilibrated to 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA.

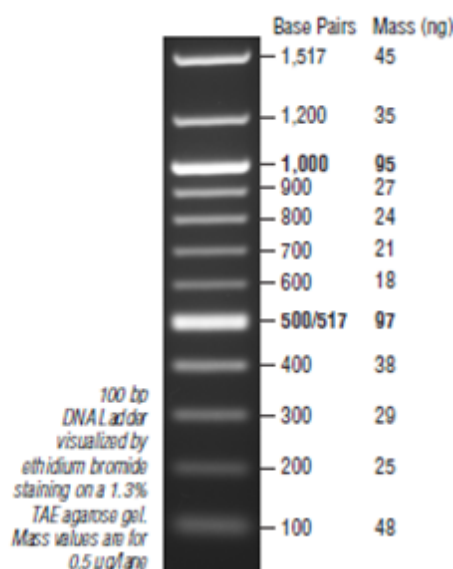
Usage Recommendation: We recommend loading 0.5 µg of 100 bp DNA Ladder diluted in sample buffer. The 100 bp DNA Ladder was not designed for precise quantification of DNA mass, but can be used for approximating the mass of DNA in comparably intense samples of similar size. The approximate mass of DNA in each of the bands in our 100 bp DNA Ladder is as follows (assuming a 0.5 µg loading):

Fragment	Base Pairs	DNA Mass
1	1,517	45 ng
2	1,200	35 ng
3	1,000	95 ng
4	900	27 ng
5	800	24 ng
6	700	21 ng
7	600	18 ng
8	500,517	97 ng
9	400	38 ng
10	300	29 ng
11	200	25 ng
12	100	48 ng

Notes: All fragments have 4-base, 5' overhangs that can be end labeled using T4 Polynucleotide Kinase (NEB #M0201) or filled-in using DNA Polymerase I, Klenow Fragment (NEB #M0210) (1). Use α -[³²P] dATP or α -[³²P] dTTP for the fill-in reaction.

100 bp DNA Ladder is stable for at least 3 months at 4°C.

For long term storage store at -20°C. If samples need to be diluted, use TE or other buffer of minimal ionic strength. DNA may denature if diluted in dH₂O.



N° CANDIDAT :

ANNEXE 3A

**SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE (5'-3') DE LA RÉGION DU PLASMIDE PCRISPR PORTANT LE
LOCUS CRISPR AVANT ADAPTATION AU PHAGE NM4**

5'-atatggtataataactcttaataaatgcagtaatacaggggctttcaagactgaagtctagctgagacaaatagtc

gattacgaaattttagacaaaaatagctacgaggttttagagctatgctgtttgaatggtcccaaacTGCGCTGG

TTGATTCTTCTTGCGCTTTTTgttttagagctatgctgtttgaatggtcccaaacttcagcca-3'

En souligné : les séquences répétées.

En majuscule : un SPACER d'origine phagique.

ANNEXE 3B

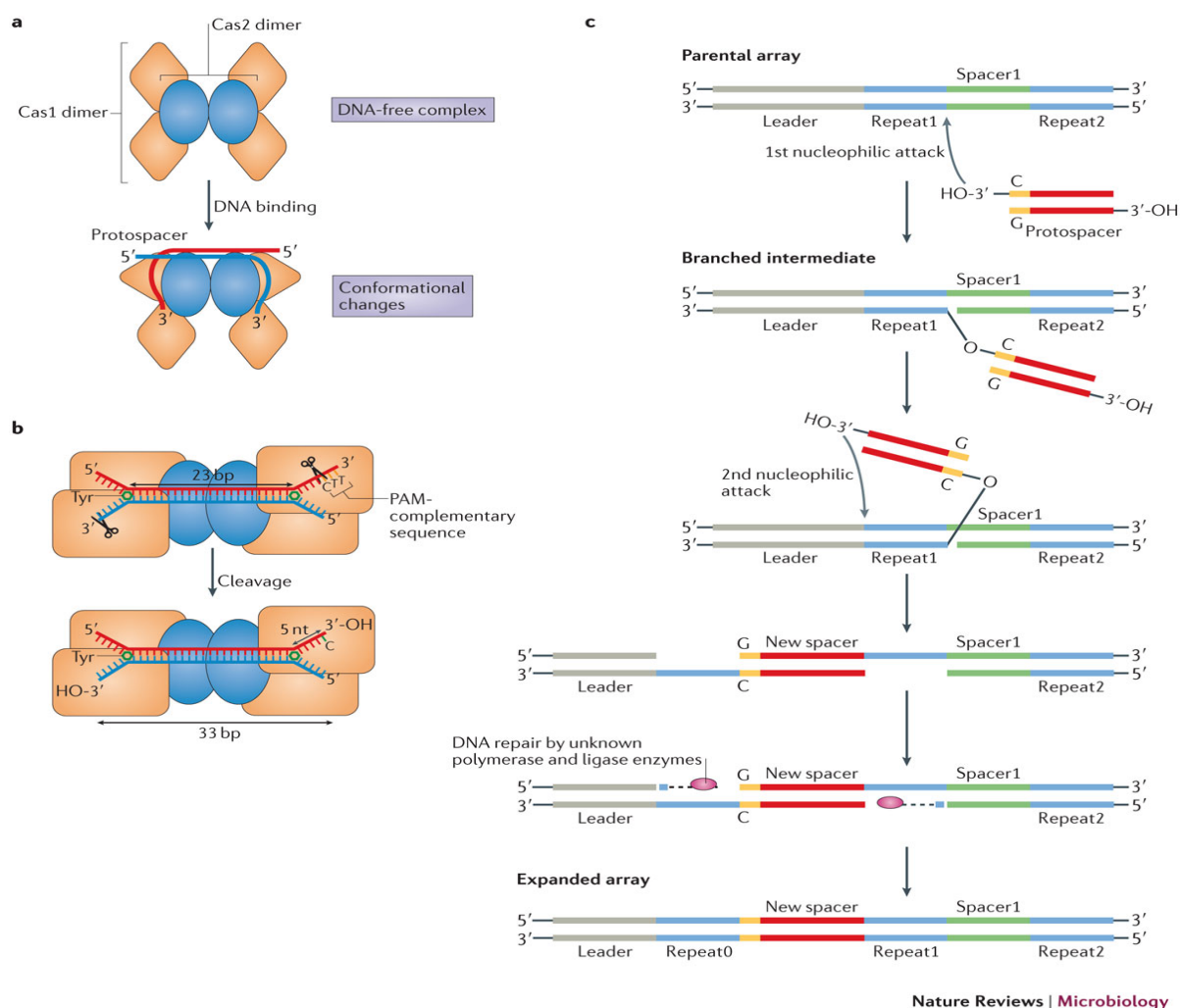
SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE (5'-3') DU SPACER PHAGIQUE NM4

5'-ATGTTAAAAGAAGTCGAGTTTATAAATCAA-3'

ANNEXE 4

DÉTAILS DE L'ÉTAPE D'ADAPTATION VIA CRISPR-Cas

Adapté de la référence bibliographique (2)



a | Schematic depiction of protospacer binding by the Cas1–Cas2 complex, comprising two Cas1 dimers and one Cas2 dimer. Conformational changes occur upon binding of protospacer DNA. The protospacer DNA, composed of a 23 bp double-stranded DNA (dsDNA) with single-stranded DNA (ssDNA) overhangs, is displayed on top of an arch that is formed by components of all six subunits. b | Schematic depiction of protospacer-adjacent motif (PAM)-specific protospacer cleavage by the Cas1–Cas2 complex prior to integration into the CRISPR array, showing the top view of the protospacer-bound complex. The ends of the protospacer on either side of a 23bp dsDNA core are splayed into ssDNA by wedges formed by the conserved Tyr22 residue in two Cas1 monomers. A PAM-complementary sequence (5'-CTT-3') in the 3' ssDNA overhang is positioned within the active site (black scissors) of the catalytically active Cas1 subunit, where it is specifically recognized and cleaved. Cleavage results in a protospacer intermediate with a precise length of 33 nucleotides, comprising the 23 bp dsDNA core and two splayed 5-nucleotide ssDNA overhangs with 3'-OH groups. It is suggested that this intermediate forms the substrate for spacer integration into the CRISPR array. c | A model for protospacer integration into the CRISPR array. The protospacer 3'-OH group carries out a nucleophilic attack on the 5' end of the first repeat, thus initiating spacer acquisition by forming a branched intermediate in which a single strand of the protospacer is ligated to a single strand of the CRISPR array. The 3'-OH group on the other protospacer strand generates a second nucleophilic attack on the 5' end of the opposing DNA strand of the repeat, which is juxtaposed to the leader sequence. The product of this reaction is an expanded CRISPR array with a new spacer and a duplicated repeat. The ssDNA gaps that are produced at the repeat sequences are filled and repaired by uncharacterized enzymes.

RAPPORT DU JURY DE TP DE MICROBIOLOGIE

CRISPR-Cas : un système d'adaptation bactérien contre les infections phagiques et un outil révolutionnaire d'édition du génome

Le sujet portait sur le système d'adaptation CRISPR-Cas (Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated protein) qui permet à la bactérie de reconnaître spécifiquement un ADN phagique et d'éliminer le phage avant sa réplication. L'épreuve de travaux pratiques proposée permettait d'étudier d'une part l'action naturelle de ce système, d'autre part une application biotechnologique dérivée de ce système.

- La **partie A** correspondait à l'étude de la cinétique de l'infection de souches de *Staphylococcus aureus* par un phage lytique,
- La **partie B** illustre l'adaptation d'un *Staphylococcus aureus* exprimant le système CRISPR-Cas pour lutter contre une infection phagique,
- La **partie C** permettait d'utiliser le système CRISPR-Cas comme outil génétique pour réprimer l'expression d'un gène rapporteur dans une souche d'*Escherichia coli*.

Statistiques des résultats

- | | |
|---|-------------------|
| • Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : | 08,96 / 20 |
| • Meilleure note : | 16,00 / 20 |
| • Note la plus basse : | 03,30 / 20 |
| • 5 notes sur 13 (38 %) sont supérieures ou égales à | 10 / 20 |
| • Moyenne des candidats admis : | 10,49 / 20 |

Répartition

3 notes < 6 / 20
5 notes ≥ 6 et < 10 / 20
3 notes ≥ 10 et < 12 / 20
2 notes ≥ 12 / 20

Il convient de rappeler que l'évaluation de cette épreuve porte autant sur l'aspect technique que sur l'aspect rédactionnel du compte-rendu.

COMMENTAIRES TECHNIQUES GÉNÉRAUX

- Malgré, les recommandations formulées en début d'épreuve, la plupart des candidats n'ont pas su faire preuve d'une organisation suffisante et efficace pour mener de front les différentes parties. Beaucoup d'entre eux ont perdu un temps précieux en début d'épreuve et n'ont pas pu achever l'ensemble des manipulations.
- L'épreuve faisait appel cette année encore, à des techniques classiques de microbiologie comme par exemple :
 - le suivi de croissance par spectrophotométrie,
 - des dénombrements en milieu gélosé (bactéries et phages),
 - des dilutions en microplaques.

Pourtant certains candidats ne maîtrisent toujours pas ces gestes de base, ce qui impacte les résultats obtenus.

Les problèmes suivants ont été souvent rencontrés : organisation du poste peu pertinente, lenteur excessive de réalisation, homogénéisations oubliées ou insuffisantes, erreurs de suivi de consignes en particulier concernant les milieux gélosés attribués à chacune des parties.

- Des techniques de biologie moléculaire et de mesure de la fluorescence (fluorimétrie et microscopie à fluorescence) ont été également utilisées.

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

- L'outil informatique était mis à disposition durant les deux jours de TP. La maîtrise de cet outil est désormais **indispensable en laboratoire**. Si la plupart des candidats ont su utiliser l'outil informatique pour exploiter les données techniques, beaucoup ne l'ont pas utilisé dès le premier jour. Ainsi, certains n'ont pas su optimiser l'utilisation de cet outil pour gagner du temps dans la rédaction de leur compte-rendu (par exemple, certains tableaux de résultats ont été réalisés à la fois sur la copie et en version informatique).
- La rédaction du compte rendu 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, les brouillons n'étant pas pris en compte dans la notation.
- La présentation du compte-rendu doit être réalisée dans un **souci de clarté et de qualité**. Pour un futur enseignant, ces objectifs doivent être majeurs. L'écriture doit être lisible et les réponses aux questions correctement numérotées.
- Le jury comprend que pour un calcul très simple la rédaction soit concise, mais elle doit rester précise. **Les équations aux grandeurs, aux unités ainsi qu'aux valeurs numériques doivent apparaître clairement**. Les résultats doivent être exprimés avec un **nombre de chiffres significatifs convenables et une unité**.

PARTIE A

Étude de l'effet du phage NM4 sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en culture liquide

L'objectif de cette partie était de réaliser un suivi de la croissance de deux souches de *Staphylococcus aureus* en présence et en absence de phage NM4.

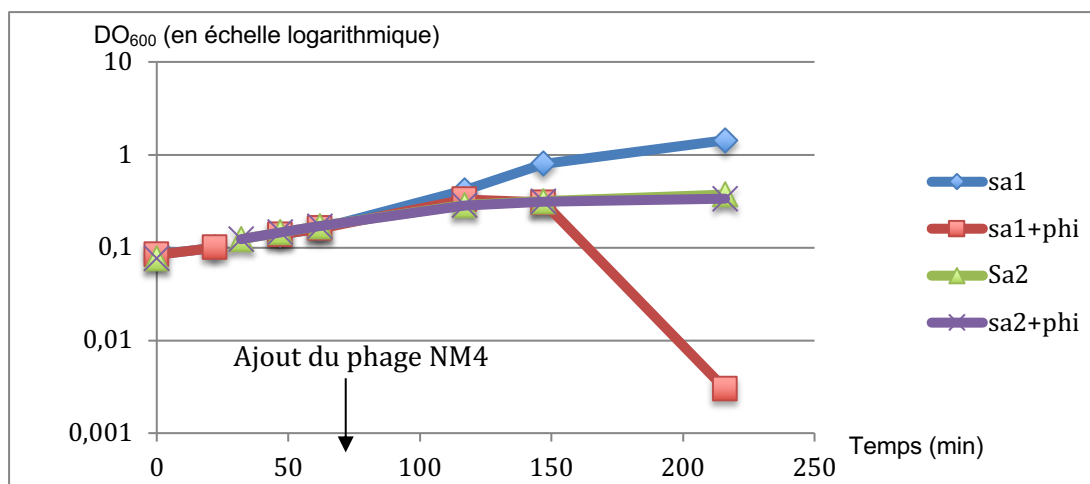
ASPECTS TECHNIQUES

- Le point de départ d'une croissance est toujours l'introduction d'un inoculum calibré préparé après mesures spectrophotométriques. Trop peu de candidats réalise rapidement les calculs nécessaires à cet ajustage. Cela entraîne une perte de temps préjudiciable et un non-respect des consignes données pour la réalisation du suivi de croissance. En revanche, les conseils donnés dans les rapports précédents en termes de respect de la zone de linéarité du spectrophotomètre ont correctement été suivis.
- Une croissance bactérienne doit se faire à une température constante, si possible optimale. Ici, il s'agissait de faire croître deux souches de *Staphylococcus aureus* dont la température de croissance optimale est de 37°C en milieu TSB. Pour éviter le plus possible les fluctuations de température lors de la croissance, il est recommandé de prélever un aliquote de la culture et de replacer immédiatement la culture dans l'incubateur. Certains candidats ont laissé leurs cultures pendant de longues minutes hors de l'incubateur, voire les ont placées dans la glace.
- Les dilutions décimales en microplaque ont donné lieu à de graves erreurs (facteur de dilution non respecté, volume restant dans les cupules insuffisant pour assurer le dénombrement en double essai, technique inadéquate).
- De nombreux candidats ont choisi de ne pas réaliser les dénombrements phagiques en jour 1, se pénalisant ainsi pour les interprétations du jour 2.

RÉSULTATS ATTENDUS ET COMPTE-RENDU

➤ SUIVI DE CROISSANCE

- Les candidats devaient tracer sur un même graphe les courbes de croissance obtenues pour les quatre conditions de croissance. Comme précisé dans le rapport de l'année précédente, une courbe de croissance doit représenter $\text{Ln } DO_{600} = f(t)$, $\text{Log } DO_{600} = f(t)$ ou être tracée avec une échelle semi-logarithmique, de façon à pouvoir linéariser la phase exponentielle de croissance et pouvoir exploiter directement les résultats des différentes croissances.



Cinétique de croissance des souches SA1 et SA2 en présence et en absence de phage NM4
($DO_{600} = f(t)$ en échelle semi-logarithmique)

- Il était attendu une analyse rapide des courbes témoins en précisant les différentes phases de la croissance visibles sur le graphique, et en mentionnant notamment une croissance plus lente pour la souche SA2.
- L'analyse des croissances en présence de phages devait être faite par comparaison avec les courbes témoins. La souche SA1 est sensible au phage, comme le montre la chute d'absorbance après l'ajout de la suspension phagique. La souche SA2 résiste à l'action du phage, comme illustré par une croissance similaire en présence ou en absence de phage dans la culture.
- Certains candidats n'ont pas su déterminer le temps de génération et la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle pour les cultures témoins. La détermination de ces deux paramètres est pourtant une notion de base d'une étude de croissance.

➤ **NUMÉRATION DES BACTÉRIES SURVIVANTES**

- Il est surprenant que tous les candidats n'aient pas réussi à déterminer la dilution cible permettant une numération correcte des bactéries survivantes (en utilisant la valeur de densité optique obtenue au spectrophotomètre en fin de croissance et la relation fournie reliant la DO_{600} à la densité bactérienne en UFC.mL⁻¹).
- Il était demandé de vérifier la correspondance entre la DO_{600} et la densité bactérienne en UFC.mL⁻¹ en fin de croissance. Il apparaissait que la correspondance était respectée pour la souche SA1, mais pas pour SA2. La souche SA2, pour une même absorbance, génère moins de cellules dénombrables que SA1.

Cette observation pourrait s'expliquer par un défaut de séparation des cellules filles dans la dernière phase de la division cellulaire. Il y aurait accroissement de la masse biologique (révélée par l'augmentation de l'absorbance) tout en ayant un défaut de division. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une observation microscopique.

➤ **NUMÉRATION DES PHAGES PAR LA TECHNIQUE DES SPOTS**

- Un seul candidat a réalisé avec succès cette technique.
- Cette technique permettait de quantifier les phages dans les surnageants de culture. À partir de ces résultats et connaissant le nombre de phages introduit initialement, les facteurs d'amplification du phage dans les cultures devaient être calculés.

PARTIE B

Sélection et étude de clones résistants à l'infection phagique : mise en évidence de l'adaptation de la bactérie face à une infection par un phage lytique

Cette étude proposait de réaliser la sélection de clones bactériens survivant à l'infection phagique puis d'étudier le mécanisme de résistance mis en œuvre par ces bactéries.

B1- Sélection des clones survivants après l'infection phagique

ASPECTS TECHNIQUES

- Il est dommage que peu de candidats ait réalisé cette manipulation d'autant plus qu'elle était simple et d'exécution rapide.
- Il fallait cependant prendre garde à laisser refroidir suffisamment la gélose « Top agar » afin de ne pas tuer les bactéries avant infection par le phage. À défaut, très peu de clones adaptés ont été obtenus.

RÉSULTATS ATTENDUS ET COMPTE-RENDU

- Au moins cinquante clones, résistants au phage et au chloramphénicol, devaient être obtenus. Certains ont intégré le spacer NM4 dans le locus CRISPR donc résistent au phage via ce système, d'autres ont développé un mécanisme de résistance au phage différent, comme par exemple une mutation du récepteur spécifique du phage.
- L'intégration du spacer NM4 dans le locus CRISPR était explorée par PCR dans la partie B2 sur des clones fournis.

B2- Étude de clones survivants après l'infection phagique par PCR

ASPECTS TECHNIQUES

- Chaque PCR devait être menée sur un volume de 2 µL d'ADN extrait, additionné de 48 µL de Mix, soit un volume total de 50 µL. Il fallait préparer un volume de Mix suffisant pour l'ensemble des PCR à réaliser et non préparer chaque tube indépendamment.
- Les pipetages devaient être soignés pour ne pas impacter les résultats.
- Il convenait de surveiller régulièrement la migration des produits de PCR.
- Le port des gants a été globalement bien respecté mais leur gestion pas toujours maîtrisée.

RÉSULTATS ATTENDUS ET COMPTE-RENDU

- L'étude des annexes permettait de positionner les amorces et de déterminer la taille attendue des amplicons avant et après adaptation.

Séquence nucléotidique (5'-3') de la région du plasmide pCRISPR portant le locus CRISPR avant adaptation au phage NM4

5' -atatggtataataactcttaataaatgcagtaatacaggggcttttcaagactgaagtctagctgagacaaatagtgc

gattacgaaattttttagacaaaaatagtctacgaggttttagagctatgctggtttgaatg

5' -cgaaattttttagacaaaaatagtc-3'

gtcccaaaacTGCCTGGTTGATTTCTTCTTGCCTTTTgttttagagctatgctggtttg

3' -ACGCGACCAACTAAAGAAGAACGCGAAAAACAAAA-5'

aatggtcccaaaacttcagcca-3'

⇒

Taille attendue du fragment avant adaptation : 102 nt

Séquence nucléotidique (5'-3') de la région du plasmide pCRISPR portant le locus CRISPR après adaptation au phage NM4

```

5'-atatggtataataactcttaataaatgcagtaatacaggggcttttcaagactgaagtctagctgagacaaatagtgc
gattacgaaatttttttagacaaaaatagtctacgaggttttagagctatgctgttttgaatg
5'-cgaaatttttttagacaaaaatagtc-3'

gtcccaaaacATGTTAAAAGAAGTCGAGTTTATAAATCAAgttttagagctatgctgttttg
Spacer phage NM4

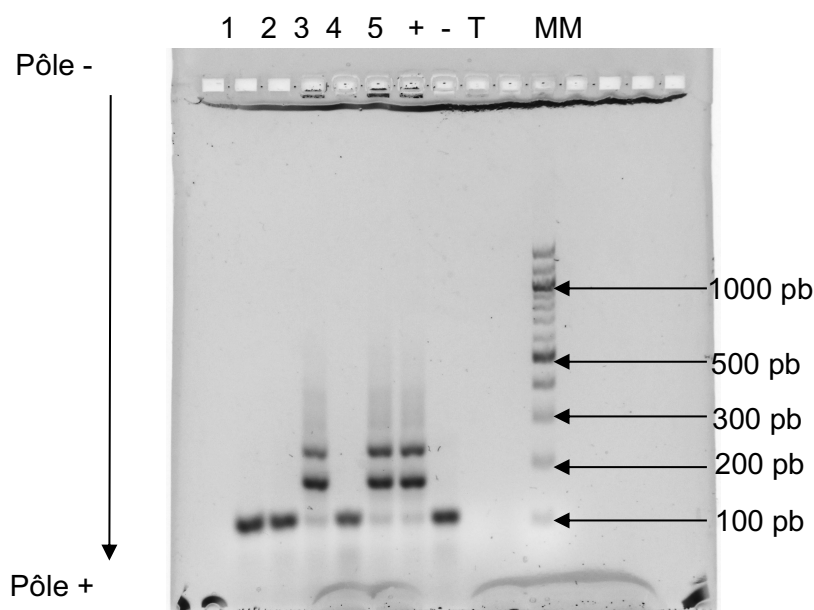
aatggtcccaaaacTGCCTGGTTGATTTCTTCTTGCCTTTTTgttttagagctatgctgt
3'-ACGCGACCAACTAAAGAAGAACGCGAAAAACAAAA-5'

tttgaatggtcccaaaacttcagcca-3'

```

⇒ **Taille attendue du fragment après adaptation : 168nt**

- Les amplicons obtenus par PCR étaient ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose. La photographie de révélation du gel sous UV devait être annotée précisément.



Résultats d'analyse PCR de clones résistants au phage NM4
Amplification d'une partie du locus CRISPR

- Les contrôles et le témoin devaient être validés avant l'interprétation des clones à tester.
- Une bande unique à environ 100 pb permettait de conclure à la présence du plasmide contenant le locus CRISPR mais également à une absence d'adaptation de la souche. Ces clones résistaient donc au phage par un autre mécanisme.
- L'observation de deux bandes, une entre 100 et 200 pb, et l'autre entre 200 et 300 pb, permettait de conclure à une adaptation de la souche via CRISPR par insertion d'un ou plusieurs spacer(s) dans le locus CRISPR.
 Lors de l'insertion d'un seul spacer, la taille attendue était de 168 pb. Une insertion supplémentaire donnait une taille attendue de 234 pb.

PARTIE C

Utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 pour réguler l'expression du gène de la GFP chez *Escherichia coli*

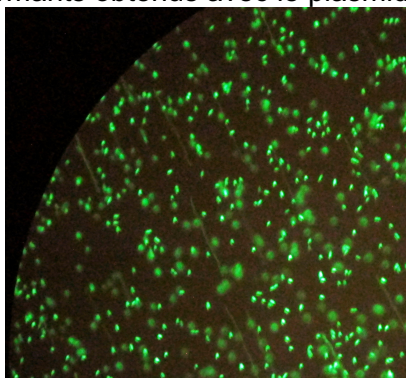
Cette partie proposait d'illustrer l'utilisation du système CRISPR-Cas9 comme outil de régulation de l'expression d'un gène au sein d'une souche d'*Escherichia coli* hébergeant le gène *gfp* et le gène *dCas9*.

ASPECTS TECHNIQUES

- Il s'agissait d'une manipulation longue, qui aurait dû être mise en œuvre dès le début de l'épreuve.
- De plus, la préparation de la souche à transformer a été très chronophage pour les candidats alors qu'il s'agissait d'une manipulation simple. La suite de la manipulation étant relativement longue, cette perte de temps a été préjudiciable aux candidats. Beaucoup n'ont pas pu terminer, ce qui n'a pas permis les exploitations prévues en jour 2.
- Un contrôle microscopique de la fluorescence en jour 2 était prévu. La manipulation de base du microscope (mise au point d'un état frais) devrait être maîtrisée par tous.
- Une quantification de la fluorescence au fluorimètre permettait de mettre en évidence une répression d'expression de la GFP sous le contrôle de CRISPR-Cas.

RÉSULTATS ATTENDUS ET COMPTE-RENDU

- Les candidats devaient obtenir à peu près le même nombre de transformants avec le plasmide contrôle et le plasmide codant l'ARN guide de la Cas9.
- Le calcul de l'efficacité de la transformation n'a été que rarement réalisé. Il fallait calculer la fréquence de transformation (nombre de transformants obtenus sur le nombre de cellules transformées), et le rapporter à la quantité d'ADN utilisée.
- La fluorescence des transformants obtenus avec le plasmide contrôle était maximale.



Observation à l'état frais au microscope à fluorescence (x400)
de la souche AV02 transformée par le plasmide contrôle

- La quantification de la fluorescence ramenée à la densité optique à 630 nm sur plusieurs transformants permettait de mettre en évidence une atténuation significative de la fluorescence pour les transformants avec le plasmide codant l'ARN guide. Ceci permettait de montrer que le système CRISPR-Cas peut être utilisé comme outil moléculaire de régulation de l'expression des gènes.

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

Chimie et développement durable

La chimie verte a été introduite au début des années 90 et son enseignement au niveau mondial n'a cessé depuis de se développer. Le but est de concevoir des outils et méthodes permettant d'utiliser des solvants et réactifs peu chers, biosourcés et recyclables ; de limiter l'usage de produits toxiques ou dangereux ; de limiter les consommations énergétiques (réaction à température ambiante)... Cette démarche conduit les chimistes à explorer de nouveaux catalyseurs, de nouveaux solvants (CO₂ supercritique, liquides ioniques, pas de solvant du tout), de nouvelles méthodes d'activation de la transformation (délaisser le chauffage par des irradiations de microondes ou d'ultrasons).

Afin de guider les chercheurs, les chimistes américains ANASTAS et WARNER¹ ont isolé **douze principes de la chimie verte** qui ont été largement adoptés par la communauté scientifique² :

- | | |
|--|--|
| 1. La prévention de la pollution à la source en évitant la production de résidus. | 8. La réduction du nombre de dérivés en minimisant l'utilisation de groupes protecteurs ou auxiliaires |
| 2. L'économie d'atomes et d'étapes qui permet de réaliser, à moindre coût, l'incorporation de fonctionnalités dans les produits recherchés tout en limitant les problèmes de séparation et de purification. | 9. L'utilisation des procédés catalytiques de préférence aux procédés stoechiométriques avec la recherche de nouveaux réactifs plus efficaces et minimisant les risques en termes de manipulation et de toxicité. La modélisation des mécanismes par les méthodes de la chimie théorique doit permettre d'identifier les systèmes les plus efficaces à mettre en œuvre (incluant de nouveaux catalyseurs chimiques, enzymatiques et/ou microbiologiques). |
| 3. La conception de synthèses moins dangereuses grâce à l'utilisation de conditions douces et la préparation de produits peu ou pas toxiques pour l'homme et l'environnement. | |
| 4. La conception de produits chimiques moins toxiques avec la mise au point de molécules plus sélectives et non toxiques | |

¹ Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry : Theory and Practice*, Oxford University Press : New York, **1998**, p.30

² <http://www.cnrs.fr/inc/recherche/programmes/docs/chimieverte.pdf>

impliquant des progrès dans les domaines de la formulation et de la vectorisation des principes actifs et des études toxicologiques à l'échelle cellulaire et au niveau de l'organisme.

5. La recherche d'**alternatives aux solvants polluants** et aux auxiliaires de synthèse.

6. La **limitation des dépenses énergétiques** avec la mise au point de nouveaux matériaux pour le stockage de l'énergie et la recherche de nouvelles sources d'énergie à faible teneur en carbone.

7. L'utilisation de **ressources renouvelables** à la place des produits fossiles. Les analyses économiques montrent que les produits issus de la biomasse représentent 5 % des ventes globales de produits chimiques et pourraient atteindre 10 à 20 % en 2010.

Plus de 75% de l'industrie chimique globale aurait alors pour origine des ressources renouvelables.

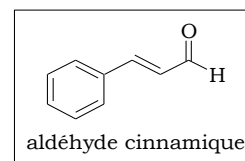
10. La conception des produits en vue de leur **dégradation finale dans des conditions naturelles** ou forcées de manière à minimiser l'incidence sur l'environnement.

11. La mise au point des **méthodologies d'analyses en temps réel** pour prévenir la pollution, en contrôlant le suivi des réactions chimiques. Le maintien de la qualité de l'environnement implique une capacité à détecter et si possible à quantifier, la présence d'agents chimiques et biologiques réputés toxiques à l'état de traces (échantillonnage, traitement et séparation, détection, quantification).

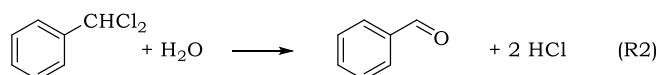
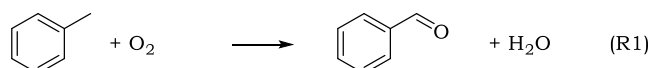
12. Le développement d'une **chimie fondamentalement plus sûre** pour prévenir les accidents, explosions, incendies et émissions de composés dangereux.

I. Oxydation de l'alcool benzylique par de l'eau de Javel

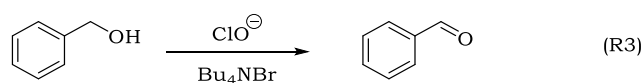
Le benzaldéhyde est un composé largement utilisé, pour ses propriétés olfactives et aromatiques, soit directement ajouté dans des parfums ou produits agro-alimentaires soit préalablement fonctionnalisé (par exemple pour la synthèse de l'aldéhyde cinnamique, composant principal de l'essence de cannelle).



Industriellement, le benzaldéhyde est obtenu à partir du toluène (R1) ou du (dichlorométhyl)benzène (R2)³.



Le but de l'expérience ici étudiée n'est pas de proposer une synthèse alternative, mais plutôt de tester une réaction d'oxydation en milieu biphasique, utilisant un catalyseur par transfert de phase. Le schéma de synthèse est le suivant (R3) :



³ Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry

A. Mise en œuvre du protocole

Réaliser le protocole suivant :

Introduire successivement, dans un erlenmeyer, 25 mL d'éthanoate d'éthyle ; 2 mL d'alcool benzylique et 50 mL de la solution aqueuse d'eau de javel à 4,8 %.

Ajouter 0,6 g de bromure de tétrabutylammonium ; ajuster le réfrigérant à air et laisser sous vive agitation.

Au bout de 5 minutes, arrêter l'agitation, prélever 3 mL de la phase organique et les disposer dans un pilulier.

Répéter l'opération au bout de 15 minutes.

Vérifier que le milieu est encore oxydant en déposant une goutte de phase aqueuse sur du papier iodo-amiloné. Si le test est négatif (pas d'apparition de coloration sur le papier), ajouter à nouveau l'eau de javel diluée.

Poursuivre l'agitation pendant 20 minutes supplémentaires.

Introduire le mélange dans une ampoule à décanter, conserver la phase organique et la laver avec 10 mL d'une solution de thiosulfate de sodium à 1 mol.L⁻¹.

Vérifier que le milieu n'est plus oxydant en déposant une goutte de phase aqueuse sur du papier iodo-amiloné. Répéter le lavage si nécessaire.

Sécher la phase organique sur sulfate de sodium anhydre, prélever 3 mL et les disposer dans un pilulier.

Analyser le brut réactionnel, ainsi que le premier échantillon prélevé, par chromatographie sur couche mince (CCM). On utilisera comme éluant un mélange cyclohexane / acétone (2/1 en volume).

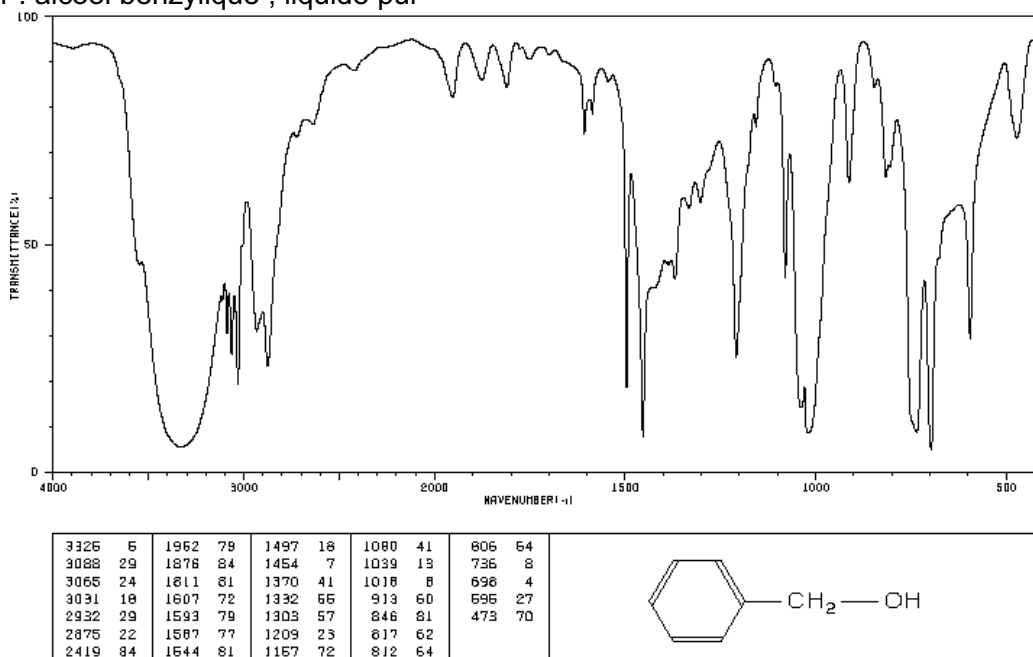
1. Appeler un membre du jury pour discuter de la CCM et du déroulement de la synthèse.
2. Interpréter la CCM obtenue en termes d'interactions intermoléculaires.
3. Proposer une méthode expérimentale de détermination de la quantité de benzaldéhyde obtenue.

B. Questions sur l'expérience réalisée

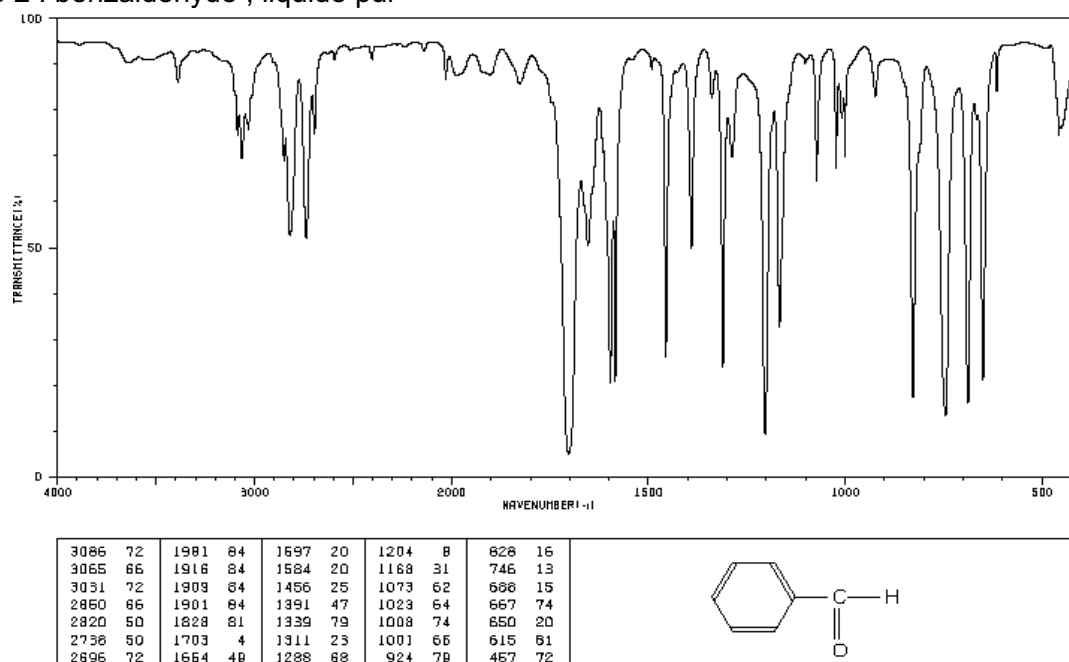
4. Écrire l'équation de la réaction (R3) en ajustant les nombres stœchiométriques et expliquer en quoi il s'agit d'une réaction d'oxydation.
5. Les réactions (R1) et (R2) sont-elles également des réactions d'oxydation ?
6. La concentration en ions ClO⁻ de la solution utilisée est environ de 0,76 mol.L⁻¹. Peut-on dire que l'oxydant est en excès ?
7. Écrire la formule de Lewis de l'ion tétrabutylammonium. Expliquer pourquoi ce composé est qualifié d'agent de transfert de phase. Pourquoi est-il utilisé lors de cette réaction ?
8. Pourquoi le milieu doit-il être fortement agité lors de la réaction ?
9. Le papier iodo-amiloné est une bandelette de papier sur laquelle sont déposés de l'iodure de potassium et de l'amilon. Expliquer son utilisation pour tester le caractère oxydant des solutions dans le protocole réalisé.

10. Lors de la réaction, une couleur jaune apparaît puis disparaît lors du traitement par la solution de thiosulfate de sodium. Interpréter cette observation.
11. Interpréter les spectres IR 1 et 2 des réactifs et produits fournis ci-après⁴. Préciser en particulier les bandes d'absorption permettant de conclure que la réaction s'est bien déroulée.
12. Expliquer les différences, pour des nombres d'onde compris en 3000 et 4000 cm^{-1} , entre les spectres 1 et 3.
13. Les spectres RMN- ^1H pourraient-ils nous permettre de distinguer facilement les réactifs et produits ?

Spectre 1 : alcool benzylique ; liquide pur

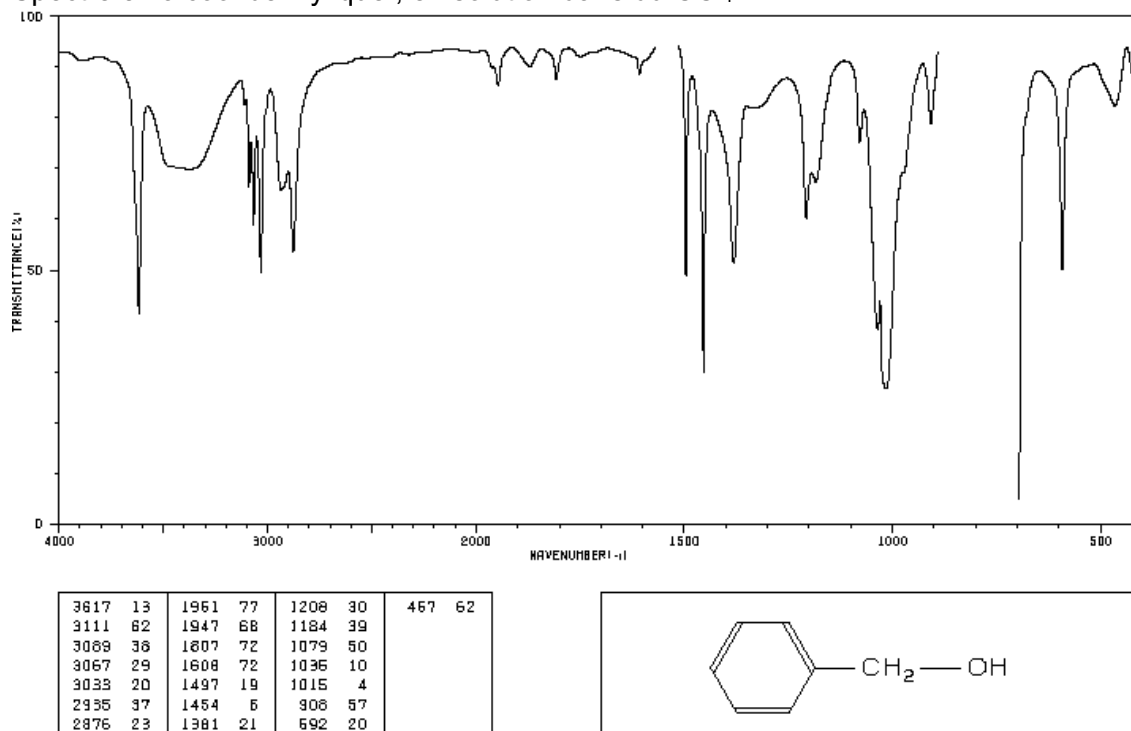


Spectre 2 : benzaldéhyde ; liquide pur



⁴ Spectral Database for Organic Compounds, SDBS

Spectre 3 : alcool benzylique ; en solution dans du CCl₄.



C. Titrage de la solution d'eau de javel

La concentration d'une eau de javel évolue avec le temps et selon les conditions de conservation, car les ions hypochlorite ClO⁻ se dismutent pour former des ions chlorure Cl⁻ et chlorate ClO₃⁻. Il peut donc être utile de titrer l'eau de javel utilisée pour la première expérience.

14. Écrire l'équation de la réaction de dismutation des ions ClO⁻.

Réaliser le protocole suivant :

Diluer par 10 la solution à votre disposition.

Prélever 10 mL de la solution fille et ajouter 10 mL d'une solution d'iodure de potassium à 10 %. Ajouter 5 mL d'acide éthanoïque dilué au tiers.

Titre la solution par une solution d'ions thiosulfate à $(1,00 \pm 0,01) \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$.

Réaliser le tirage 2 fois.

15. Reporter la valeur des différents volumes versés à l'équivalence.

16. Écrire la (les) réaction(s) ayant lieu lors de ce titrage.

17. À partir des différents essais réalisés, exprimer puis calculer les concentrations en ions ClO⁻ de l'eau de javel à 4,8 % utilisée.

18. Vérifier d'après l'annexe 5 page 20/20 que les résultats obtenus sont compatibles.

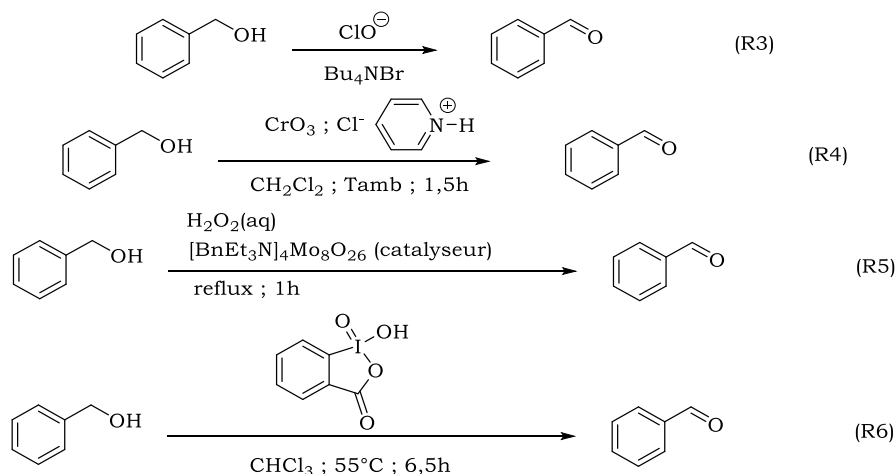
19. Proposer une évaluation de l'incertitude sur cette mesure.

II. Concept de chimie verte en chimie organique

Nous allons, à travers l'étude de différents exemples, évaluer le caractère *vert* ou non d'une réaction chimique.

A. Oxydation d'un alcool

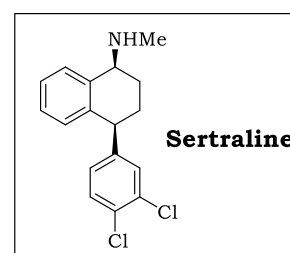
L'obtention du benzaldéhyde peut se réaliser à l'aide des différentes conditions opératoires suivantes :



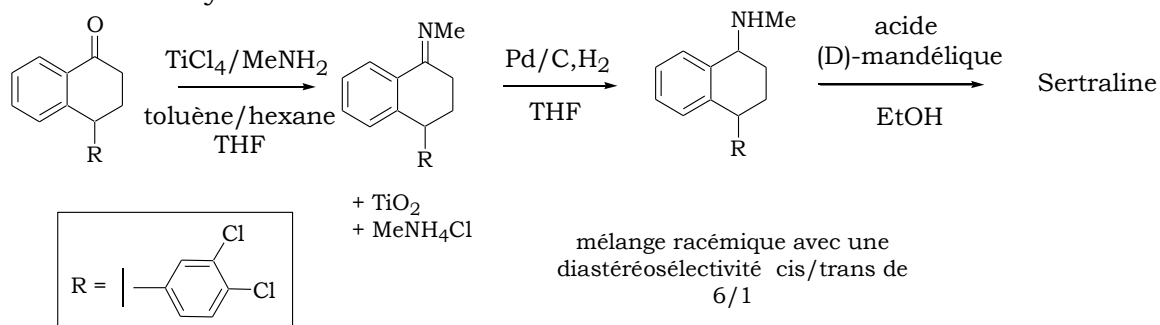
20. Parmi ces différentes synthèses (R3 ; R4 ; R5 et R6), préciser en le justifiant lesquelles respectent au mieux les principes de chimie verte. Énoncer les avantages et inconvénients de la synthèse menée au I.1.

B. Synthèse de la Sertraline

L'entreprise Pfizer® s'illustra en 2002 en optimisant la synthèse de la Sertraline⁵ ce qui permit de diviser par 4 la consommation de solvant⁶.



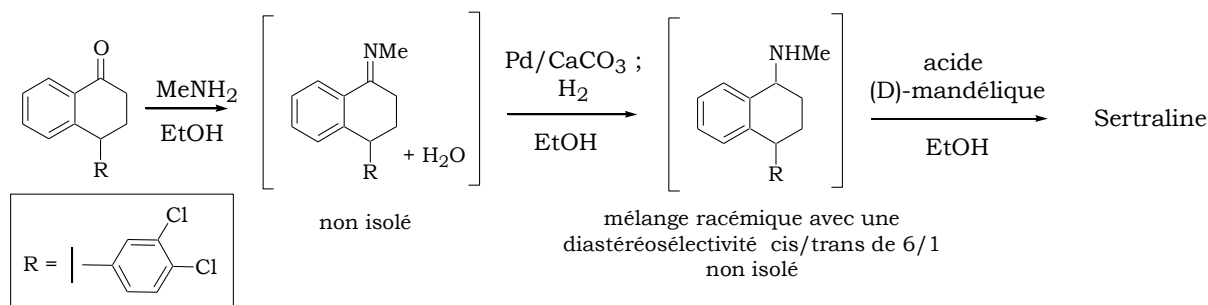
Ancienne voie de synthèse :



⁵ principe actif du Zoloft®, un antidépresseur

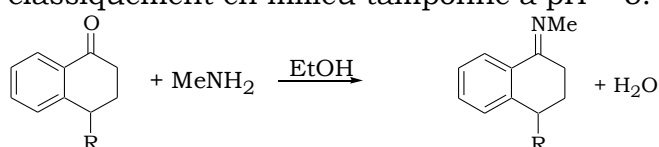
⁶ Cue B. W., Zhang J., Green process chemistry in the pharmaceutical industry, *Green Chemistry Letters and Reviews*, **2009**, 2:4, p.193-211

Voie de synthèse optimisée (les composés entre crochets ne sont pas isolés et sont réutilisés directement dans la synthèse suivante) :



21. En quoi les choix de solvants ont-ils réduit l'impact environnemental de la nouvelle synthèse ?
22. Préciser l'intérêt de ne pas isoler un produit intermédiaire formé avant de l'engager dans la réaction suivante.

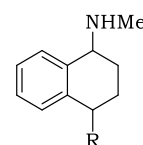
La première étape de ces voies de synthèse, rappelée ci-dessous, permet de former une imine. Elle se déroule classiquement en milieu tamponné à pH = 5.



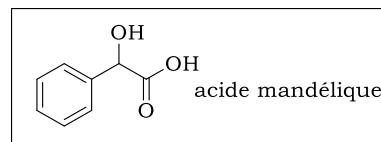
23. Proposer, pour cette réaction, un mécanisme cohérent avec les conditions expérimentales.
24. En utilisant un ou plusieurs des acides et bases ci-dessous, proposer un protocole permettant d'obtenir une solution tampon à pH = 5.

Acide	Base	pK _A
C ₆ H ₅ COOH	C ₆ H ₅ COO ⁻	4,2
CH ₃ COOH	CH ₃ COO ⁻	4,8
CO ₂ , H ₂ O	HCO ₃ ⁻	6,4
H ₂ PO ₄ ⁻	HPO ₄ ²⁻	7,2
NH ₄ ⁺	NH ₃	9,2

25. Représenter tous les stéréoisomères de la molécule ci-contre, précurseur de la Sertraline et indiquer la (les) relation(s) de stéréoisomérisie qui les lie.



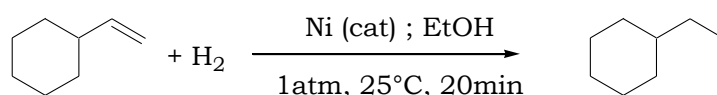
L'acide (D)-mandélique représenté ci-contre est utilisé dans la dernière étape de chacune des voies de synthèse proposées.



26. Dessiner l'acide (D)-mandélique en représentation de Fischer puis de Cram.
27. Expliquer l'intérêt de l'acide (D)-mandélique pour la dernière étape dans chacune des deux synthèses proposées.
28. Donner les descripteurs stéréochimiques des carbones asymétriques de la Sertraline.

III. Le dihydrogène : un réactif de choix pour une chimie durable

Certaines réactions de réduction peuvent être réalisées à l'aide de dihydrogène H_2 . Par exemple, l'alcane ci-dessous est obtenu avec des rendements supérieurs à 95 % :



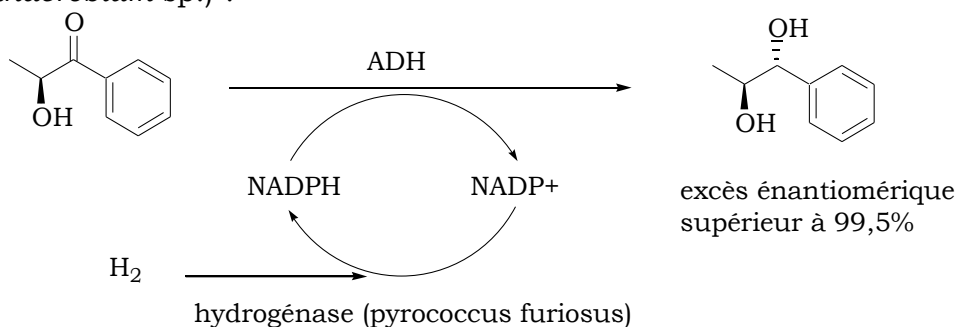
29. Préciser en quoi cette réaction traduit certains principes de la chimie verte.

A. Étude d'une réaction de réduction par H_2

On étudie la réaction d'hydrogénation suivante :

30. Donner la définition d'une enthalpie standard de formation $\Delta_f H^\circ$.
31. Calculer l'enthalpie standard de réaction $\Delta_r H^\circ$ et l'entropie standard de réaction $\Delta_r S^\circ$ pour l'hydrogénation de l'acétone à $25^\circ C$.
32. Commenter le signe de $\Delta_r S^\circ$.
33. Calculer la constante d'équilibre pour l'hydrogénation de l'acétone à $25^\circ C$.
34. Expérimentalement, l'avancement de cette réaction à $25^\circ C$ au bout de 24 h est nul. Proposer une interprétation.

L'hydrogénation d'une cétone a été menée en présence d'alcool déshydrogénase ADH (issu de *Thermoanaerobium* sp.)⁷.



⁷ Mertens et col. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, **2003**, 24–25, p.39–52

35. Quels sont les intérêts de ADH dans cette réaction ?
36. Au vu de l'équation ci-dessus, que peut-on dire quant à la stéréosélectivité de la réaction d'hydrogénation en présence d'alcool déshydrogénase ? Cette réaction est-elle stéréospécifique ?

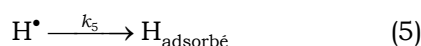
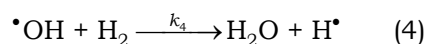
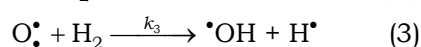
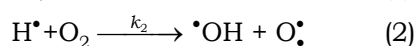
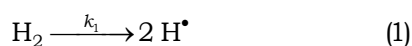
B. Danger associé à l'utilisation de H₂

La dangerosité du dihydrogène s'est dévoilée au grand public lors de la catastrophe du Zeppelin HINDENBURG, le 6 mai 1937. Le Zeppelin, alors gonflé au dihydrogène, s'enflamme en moins d'une minute et provoque la mort de 35 passagers.

Si des accidents d'une telle ampleur sont rarissimes, le danger lié à l'utilisation ou la formation non désirée de H₂ ne doit pas être minimisé : l'accumulation de quelques dizaines de grammes de H₂ peut suffire à provoquer l'explosion d'une canalisation ou d'une cuve métallique.



Au sein d'un réacteur métallique, la réaction entre le dioxygène et le dihydrogène peut former de l'eau selon le mécanisme suivant :



37. Donner la configuration électronique de l'atome d'oxygène dans son état fondamental et expliquer l'écriture O^{••}.
38. Pourquoi parle-t-on ici de mécanisme en chaîne ?
39. Faire le bilan des étapes de propagation. Que peut-on remarquer ?
40. Les étapes (5) et (6) font intervenir les espèces H_{adsorbé} et OH_{adsorbé} qui correspondent à la consommation des radicaux au contact de la paroi du réacteur. Dans un mécanisme en chaîne, quel est le nom de telles étapes ?
41. Comment peut-on démontrer expérimentalement l'impact de ces deux étapes sur la vitesse de réaction ?
42. Donner la définition de la vitesse d'apparition de H₂O.
43. Démontrer, en utilisant une approximation classique que l'on définira, que la vitesse d'apparition de H₂O s'écrit :

$$v = \frac{4k_1k_2k_4 \cdot [\text{H}_2]^2 [\text{O}_2]}{k_5k_6 + k_4[\text{H}_2](k_5 - 2k_2[\text{O}_2])}$$

44. Cette réaction admet-elle un ordre ?

Annexe 1 – Données physico-chimiques à 298 K (25°C)

Alcool benzylique : densité : $d = 1,04$; masse molaire : $M = 108,14 \text{ g.mol}^{-1}$

Eau de javel à 4,8 % : densité : $d = 1,07$

Potentiels standard d'oxydoréduction :

Couple	$E^\circ \text{ (V)}$
$\text{HClO(aq)} / \text{Cl}^-(\text{aq})$	1,49
$\text{ClO}^-(\text{aq}) / \text{Cl}^-(\text{aq})$	1,71
$\text{Br}_2(\text{aq}) / \text{Br}^-(\text{aq})$	1,07
$\text{I}_2(\text{aq}) / \text{I}^-(\text{aq})$	0,54
$\text{S}_4\text{O}_6^{2-}(\text{aq}) / \text{S}_2\text{O}_3^{2-}(\text{aq})$	0,09

Numéros atomiques de quelques éléments

Élément	H	C	N	O	Cl
Numéro atomique	1	6	7	8	17

Enthalpies standard de formation $\Delta_f H^\circ$ et entropies molaires standard S_m° :

Formule brute	Nom	$\Delta_f H^\circ \text{ (kJ.mol}^{-1}\text{)}$	$S_m^\circ \text{ (J.K}^{-1}\text{.mol}^{-1}\text{)}$
$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	propan-2-ol	-318,1	181,1
$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	propanone (acétone)	-248,4	199,8
H_2	dihydrogène	0	130,7

Énergie de dissociation $D_{\text{A-B}}$ en kJ.mol^{-1} des liaisons A-B :

liaison	O–H	C–C	C–O	C=O	H–H
$D_{\text{A-B}}$	464	347	351	730	435

Constante des gaz parfaits : $R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}\text{.mol}^{-1}$

Annexe 2 – Données de sécurité relatives aux produits utilisés

Produits	Pictogramme	Phrases H et P
Alcool benzylique		H302, H319, H332 P261, P301 + P312 + P330, P304 + P340 + P312, P305 + P351 + P338
Benzaldéhyde		H302+H312, H315 P280, P301 + P312 + P330
Bromure de tétrabutylammonium		H302, H319 P301 + P312 + P330 P305 + P351 + P338
Éthanoate 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
Acétone	 	H225, H319, H336 P210, P280, P304 + P340 + P312, P305 + P351 + P338 P337 + P313, P403 + P235
Dichlorométhane	 	H315, H319, H335, H336, H351, H371, H371, P260, P280, P305 + P351 + P338
Trichlorométhane	 	H302, H315, H319, H331, H336, H351, H361d, H372, P261, P281, P305 + P351 + P338, P311

Éthanol	 	H225, H319 P210, P280, P337 + P313, P305 + P351 + P338, P403 + P235
Toluène	  	H225, H304, H315, H336, H361d, H373, P210, P260, P280, P301 + P310, P370 + P378, P403 + P235
Tétrahydrofurane	  	H225, H302, H319, H335, H351, P210, P280, P370 + P378, P301 + P312 + P330, P305 + P351 + P338, P403 + P235
Hexane	   	H225, H304, H315, H336, H361f, H373, H411 P201, P210, P273, P301 + P310, P308 + P313, P331
Acide éthanoïque	 	H226, H314 P280, P305 + P351 + P338, P310
Solution de thiosulfate de sodium à 0,1 mol.L ⁻¹ (2 Na ⁺ (aq), S ₂ O ₃ ²⁻ (aq))	-	-
Solution d'iodure de potassium à 10 % (K ⁺ (aq), I ⁻ (aq))		H302, H315, H319
Eau de Javel à 4,8 %	 	H290, H315, H318, H411 P101, P102, P103, P264, P273, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P310
Sulfate de sodium	-	-

Annexe 3 – 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

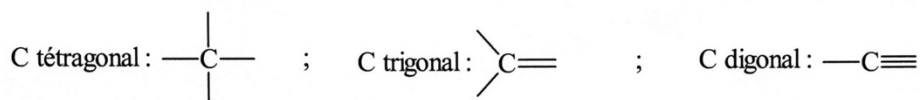
P101 : En cas de consultation d'un médecin, garder à disposition le récipient ou l'étiquette
P102 : Tenir hors de portée des enfants.
P103 : Lire l'étiquette avant utilisation.
P201 : Se procurer les instructions avant l'utilisation.
P202 : Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions 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/aérosols.
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 : Obtenir la fuite si cela peut se faire sans danger.
P377 : Fuite de gaz enflammé: 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 : obtenir 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 résistante à la corrosion.
P407 : Maintenir un intervalle d'air entre les piles/palettes.

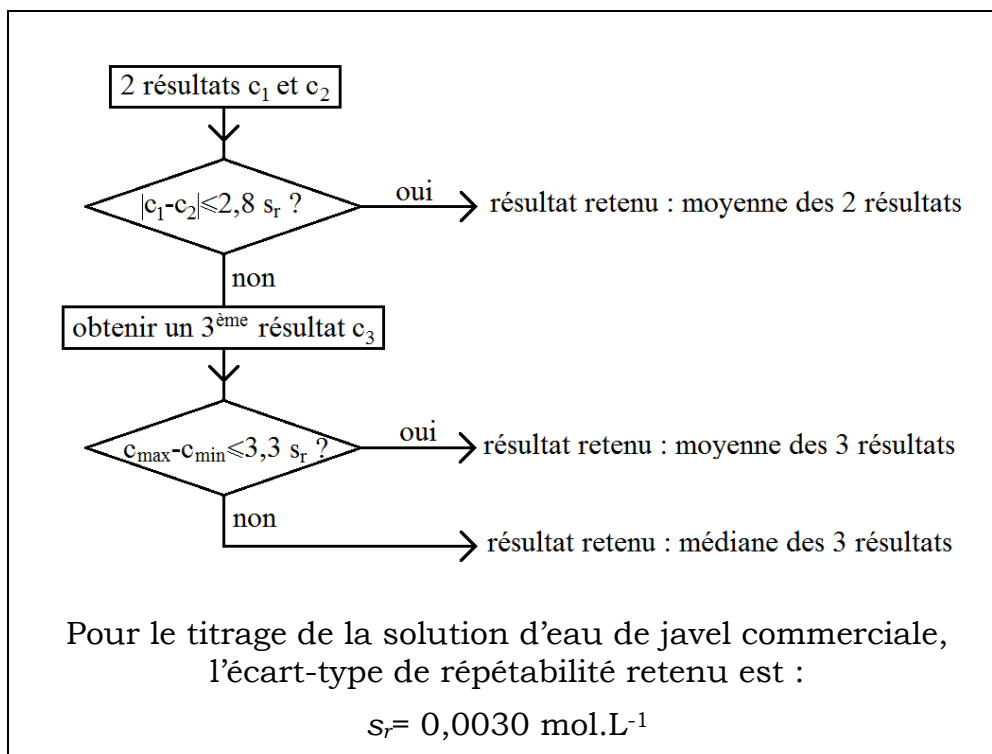
P410 : Protéger du rayonnement solaire.
P411 : Stocker à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F.
P412 : Ne pas exposer à une température supérieure à 50 °C / 122 °F.
P413 : Stocker les quantités en vrac de plus de ... kg / ... lb à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F.
P420 : Stocker 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 4 – 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	F ; 2 bandes
		1740-1790	
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	F ; 2 bandes
		1290-1360	
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) (Z)	Déformation Déformation	960-970 670-730	F 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 5 – Procédure de vérification de la compatibilité en répétabilité des résultats de titrage⁸



⁸ procédure proposée par la norme ISO 5725-6

RAPPORT DU JURY DE TP DE CHIMIE

Chimie et développement durable

Statistiques des résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **09,62 / 20**
- Meilleure note : **17,10 / 20**
- Note la plus basse : **03,20 / 20**
- 4 notes sur 13 (**31 %**) sont supérieures ou égales à **10 / 20**
- Moyenne des candidats admis : **12,44 / 20**

L'épreuve de travaux pratiques de chimie de cette année s'intéressait à la chimie verte.

La partie expérimentale (partie I) portait sur la réalisation :

- D'une oxydation de l'alcool benzylique en benzaldéhyde par l'eau de Javel en présence d'un catalyseur par transfert de phase (bromure de tétrabutylammonium),
- Du titrage indirect de l'eau de Javel par une solution de thiosulfate de sodium avec détection visuelle de l'équivalence.

Le concept de chimie verte était alors approfondi dans la partie II avec l'étude de différentes synthèses organiques, en particulier celle de la Sertraline (principe actif du Zoloft®, antidépresseur). Enfin, la dernière partie (partie III) s'intéressait à un réactif de choix pour la chimie durable, le dihydrogène, et permettait ainsi d'aborder des notions de thermodynamique et de cinétique chimique.

Le jury rappelle que la note finale prend à parts égales la partie expérimentale (questions 1 à 3, 8 à 10 et 15 à 19 ainsi que la qualité des manipulations) et la partie théorique, soit l'intégralité du reste du sujet. Dès lors, une copie même brillante ne pourra compenser une absence de résultats expérimentaux.

Bien que le temps accordé à la manipulation par les candidats ait été conséquent, le jury a constaté des difficultés quant à la mise en œuvre et la compréhension des manipulations réalisées. Ces difficultés ont conduit les candidats à consacrer trop peu de temps aux réponses aux questions.

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

I. Oxydation de l'alcool benzylique par de l'eau de Javel

Partie expérimentale

Le choix de la verrerie de prélèvement doit être réfléchi : un réactif limitant doit toujours être prélevé avec une verrerie de précision (pipette jaugée dans la plupart des cas). Au contraire, un réactif en excès peut être prélevé à l'éprouvette graduée.

Enfin, une dilution doit être effectuée dans une fiole jaugée (et non un bécher ou un erlenmeyer).

Gestes techniques en chimie organique :

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

- Le réacteur (erlenmeyer ici) doit être fixé à une potence.

- Un candidat doit savoir identifier la position des phases aqueuse et organique et prélever les échantillons dans la phase indiquée.
- Le transvasement dans l'ampoule à décanter doit être quantitatif (penser à enlever le barreau aimanté du réacteur avant transfert).
- 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).
- Le séchage d'une phase organique n'est ni compris ni maîtrisé.
- La réalisation des CCM n'est pas maîtrisée : le jury rappelle que les produits de référence doivent figurer sur la plaque et ne doivent pas être déposés purs. L'absence de ces références rend l'interprétation difficile.

Gestes techniques en chimie générale :

Le jury a constaté que la verrerie de précision (pipette jaugée, burette graduée, fiole jaugée) n'était pas utilisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.

La détermination de l'équivalence par changement de couleur doit être effectué à la goutte près, de manière répétable et donc correspondre à un changement de couleur net.

Partie théorique

Les interactions intermoléculaires sont mal maîtrisées (interaction entre molécules polaires à distinguer des liaisons hydrogène).

Pour ajuster les nombres stoechiométriques d'une équation d'oxydoréduction, il est recommandé d'écrire les $\frac{1}{2}$ équations électroniques des couples précisés dans le sujet puis de vérifier que l'équation obtenue respecte la conservation des éléments et des charges.

Le calcul d'une quantité de matière pour un liquide pur à partir de sa densité et du volume utilisé n'est pas maîtrisé.

L'interprétation de spectres IR pour justifier du bon déroulement de la réaction a été globalement bien traitée. La RMN ^1H semble en revanche poser problème à la plupart des candidats.

La compréhension et l'exploitation du titrage indirect sont inégales et nécessitent l'écriture des différentes équations de réaction intervenant. Il n'est pas envisageable de calculer une concentration sans les avoir écrites.

Peu de méthodes d'évaluation de l'incertitude ont été proposées.

II. Concept de chimie verte en chimie organique

La notion de chimie verte ne se limite pas à la recherche de la toxicité des produits utilisés.

La représentation de Fischer est peu maîtrisée.

III. Le dihydrogène : un réactif de choix pour une chimie durable

La définition d'une enthalpie standard de réaction n'est pas connue.

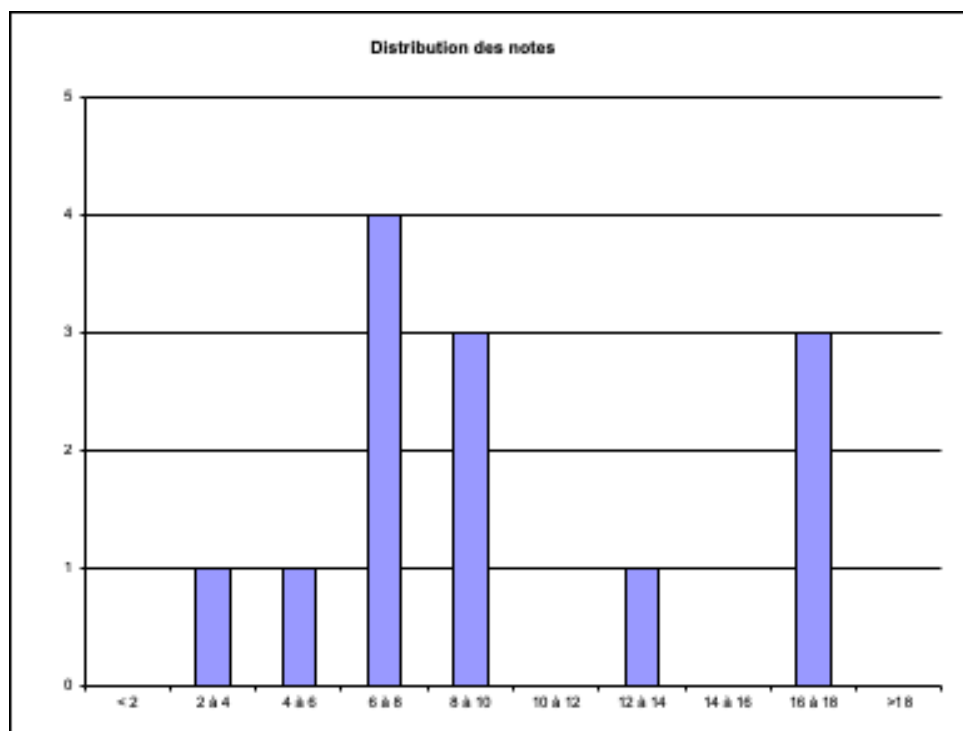
L'interprétation du signe d'une entropie standard de réaction n'est globalement pas comprise.

Les notions de stéréospécificité et de stéréosélectivité à 100% sont confondues.

Les questions de cinétique ont globalement été peu abordées par manque de temps suite à l'inefficacité dans la réalisation des manipulations.

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

Moyenne 09,6 20
Ecart type 4,4



	I. Oxydation de l'alcool benzylique par de l'eau de Javel																		
N° question	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
% réponses	100	69	46	92	92	100	100	100	85	54	77	62	69	85	100	85	85	77	46
% bonnes réponses	43	34	36	43	39	44	35	69	69	0	81	29	33	57	69	68	48	65	13

	II. Concept de chimie verte en chimie organique								
N° question	20	21	22	23	24	25	26	27	28
% réponses	77	69	69	62	54	54	62	38	46
% bonnes réponses	50	70	59	46	57	71	44	60	58

	III. Le dihydrogène : un réactif de choix pour une chimie durable															
N° question	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
% réponses	77	77	54	54	54	54	62	54	62	54	15	15	0	8	8	8
% bonnes réponses	68	13	68	21	64	57	44	8	81	14	25	50	-	100	100	0

ÉPREUVE ORALE DE LEÇON

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

SUJETS

BIOCHIMIE	MICROBIOLOGIE	BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE
Les seconds messagers dans la signalisation cellulaire	Les vaccins.	Les mouvements d'eau et de solutés dans l'organisme (la convection sanguine ne sera pas traitée).
Les interactions enzyme-substrat.	Les Procaryotes vivant dans des conditions extrêmes.	Mécanismes cellulaires et moléculaires de la fécondation
Les dérivés réactifs de l'oxygène.	Les virus à tropisme nerveux.	Les rôles du foie.
	L'impact sanitaire des biofilms microbiens.	Diversité et rôles physiologiques des épithéliums.
	Les virus des fièvres hémorragiques.	Les canaux potassium et leurs implications dans les fonctions de l'organisme.

RAPPORT DU JURY DE LEÇONS

Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,38** / 20
- Meilleure note : **20,00** / 20
- Note la plus basse : **04,00** / 20
- 7 notes sur 13 (**54 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20
- Moyenne des candidats admis **12,29** / 20

Commentaires généraux

Il convient de rappeler que l'épreuve est une leçon, et non un exposé ; 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 synthèse et d'organisation pédagogique. 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. Il est fondamental de ne pas restreindre l'exposé à une succession de mécanismes moléculaires en oubliant ou en négligeant de les replacer dans un contexte plus général. Inversement, 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. La problématique du sujet doit être cernée, les idées hiérarchisées et le choix de concepts et notions à présenter est indispensable dans le temps évidemment limité de la leçon.

L'épreuve de leçon est donc avant tout une épreuve de synthèse plus qu'une érudition ponctuelle : elle nécessite un travail de fond durant toute la préparation au concours. 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.

Une bonne connaissance des ouvrages mis à disposition est un atout majeur afin de se constituer une bibliographie permettant d'être efficace au cours de la préparation. Il est en effet illusoire d'imaginer 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 d'apporter quelques notions permettant de dégager la problématique centrale. Cette année, le jury a apprécié la qualité des introductions qui, le plus souvent, permettaient de contextualiser la leçon.

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 est important pour la compréhension de la leçon que le plan reste apparent tout au long de l'exposé.

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

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.

Le jury a également apprécié les approches historiques pour montrer l'évolution des concepts scientifiques.

La conclusion ne peut être réduite à un simple résumé des notions évoquées au cours de la leçon. Elle doit tirer avantage 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. Globalement, la communication orale a été de qualité pour ce qui concerne la syntaxe et le vocabulaire choisi ; 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.

Rappelons aussi que doivent figurer sur les diapositives les illustrations supportant le propos et 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 affranchissent le candidat d'une réelle 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 donc peu visibles), s'affranchissant d'un plan et support de commentaires généralement lus et souvent mal structurés. 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. Au contraire, l'échange n'a pas été véritablement possible avec certains qui n'ont pas adopté une posture réflexive ou qui ont formulé des réponses trop laconiques.

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.

Rapport sur les leçons de Biochimie

Concernant les leçons et les questions se rapportant à des concepts de biochimie, le jury a pu constater les connaissances très vagues de certains candidats ne maîtrisant pas les fondamentaux (définition, propriété et exemples d'enzymes Michaeliennes et allostériques, métabolisme énergétique) ou ne démontrant pas une vision spécialisée et intégrée de la discipline (nature des seconds messagers intracellulaires en ne se limitant pas à l'AMPc, à l'IP₃ et au DAG mais en incluant des molécules telles que le Ca²⁺, le NO ou le PIP₃, présentation des effets différenciés du glucagon sur les différentes cellules cibles, propriétés dynamiques de la signalisation calcique, mécanismes transcriptionnels de défenses cellulaires en réponse à un stress).

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

Les sujets proposés étaient cette année encore relativement classiques et 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 (par exemple, nerveux *versus* neuronal). 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, et en particulier la Virologie, ne se limite pas à une classification des virus et à quelques cycles viraux que trop de candidats utilisent de manière inappropriée.

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, notion de mémoire immunitaire dans une leçon sur « les vaccins »). 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. Il est donc attendu, même si le sujet est libellé à l'échelle de l'organisme, comme par exemple « Les rôles du foie », la présentation de quelques mécanismes moléculaires ou cellulaires que le candidat choisira en fonction de leur pertinence ou de l'avancée des connaissances dans le domaine. Pour cet exemple, il était possible de détailler l'équipement de l'hépatocyte en transporteurs membranaires et en enzymes, ainsi que leurs caractéristiques cinétiques, comme en récepteurs de l'insuline et du glucagon, pour étayer le rôle fondamental du foie dans le métabolisme glucidique. Les réactions de conjugaison des acides biliaires pouvaient être produites à l'appui de la présentation du cycle entéro-hépatique de ces acides.

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 et incluant le microbiote.

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

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

SUJETS

Horloges moléculaires internes.	Kaiser TS, Poehn B, Szkiba D, Preussner M, Sedlazeck FJ, Zrim A, Neumann T, Nguyen LT, Betancourt AJ, Hummel T, Vogel H, Dorner S, Heyd F, von Haeseler A, Tessmar-Raible K The genomic basis of circadian and circalunar timing adaptations in a midge <i>Nature</i> , 2016, vol. 540, p. 69-73 + <i>METHODS</i> + <i>EXTENDED DATA</i>
Bactéries : quoi de neuf sur le Zinc ?	Moreau GB, Qin A, Mann BJ Acquisition Mechanisms Differ between Environmental and Virulent <i>Francisella</i> Species <i>Journal of Bacteriology</i> , 2018, vol. 200 (4), p. 1-16 (+ <i>SUPPLEMENTAL MATERIAL</i> sur la clé) Cesari M, Ammendola S, Battistoni A Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction <i>Frontiers in Cellular and Infection Microbiology</i> , 2013, vol. 3, p. 1-7
Toxines et nociception.	Deplazes E, Troeira Henriques S, Smith JJ, King GF, Craik DJ, Mark AE, Schroeder CI Membrane-binding properties of gating modifier and pore-blocking toxins: Membrane interaction is not a prerequisite for modification of channel gating <i>Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes</i> , 2016, vol. 1858 (4), p. 872-882 Patel R, Montagut-Bordas C, Dickenson AH Calcium channel modulation as a target in chronic pain control <i>British Journal of Pharmacology</i> , 2017, vol 175, p. 2173-2184
Biofilm : une question de mémoire de générations ?	Lee CK, de Anda J, Baker AE, Bennett RR, Luo Y, Lee EY, Keefe JA, Helali JS, Ma J, Zhao K, Golestanian R, O'Toole GA, Wong GCL Multigenerational memory and adaptive adhesion in early bacterial biofilm communities <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i> , 2018, vol. 115 (17), p. 4471-4476 + <i>SUPPORTING INFORMATION</i> (+ <i>FILM</i> sur la clé)
Rôle de détection des cellules entérochromaffines.	Bellono NW, Bayrer JR, Leitch DB, Castro J, Zhang C, O'Donnel TA, Brierley SM, Ingraham HA, Julius D Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways <i>Cell</i> , 2017, vol. 170 (1), p. 185-198 (+ <i>STARS METHODS</i> + <i>METHODS</i> + <i>SUPPLEMENTAL FIGURES</i> sur la clé) Diwakarla S, Fothergill LJ, Fakhry J, Callaghan B, Furness JB Heterogeneity of enterochromaffin cells within the gastrointestinal tract <i>Neurogastroenterology & Motility</i> , 2017, vol. 19 (6), p. 1-5
Des RCPG internalisés et actifs !	Ismail S, Gherardi MJ, Froese A, Zanon M, Gigoux V, Clerc P, Gaits-Iacovoni F, Steyaert J, Nikolaev VO, Fourmy D Internalized Receptor for Glucose-dependent Insulinotropic Peptide stimulates adenylyl cyclase on early endosomes <i>Biochemical Pharmacology</i> , 2016, vol. 120, p. 33-45
Des RCPG internalisés et actifs !	Ismail S, Gherardi MJ, Froese A, Zanon M, Gigoux V, Clerc P, Gaits-Iacovoni F, Steyaert J, Nikolaev VO, Fourmy D Internalized Receptor for Glucose-dependent Insulinotropic Peptide stimulates adenylyl cyclase on early endosomes <i>Biochemical Pharmacology</i> , 2016, vol. 120, p. 33-45

Enzyme de conversion de l'angiotensine et maturation des spermatozoïdes.	Fujihara Y, Tokuhira K, Muro Y, Kondoh G, Araki Y, Ikawa M, Okabe M Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2013, vol. 110 (20), p. 8111-8116 Okabe M The cell biology of mammalian fertilization <i>Development</i>, 2013, vol. 140, p. 4471-4479
Récepteurs aux xénobiotiques.	Delfosse V, Dendele B, Huet T, Grimaldi M, Boulahtouf A, Gerbal-Chaloin S, Beucher B, Roecklin D, Muller C, Rahmani R, Cavailles V, Daujat-Chavanieu M, Vivat V, Pascucci JM, Balaguer P, Bourguet W Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds <i>Nature Communications</i>, 2015, vol. 6, DOI: 10.1038/ncomms9089, p. 1-10 Banerjee M, Robbins D, Chen T Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases <i>Drug Discovery Today</i>, 2015, vol. 20 (5), p. 618-628
Mémoire de l'immunité innée : rôle de la voie du mévalonate.	Bekkering S, Arts RJW, Novakovic B, Kourtzelis I, van der Heijden CDCC, Li Y, Popa CD, Ter Horst R, van Tuijl J, Netea-Maier RT, van de Veerdonk FL, Chavakis T, Joosten LAB, van der Meer JWM, Stunnenberg H, Riksen NP, Netea MG Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway <i>Cell</i>, 2018, vol. 172, p. 135-146 (+ <i>STARS METHODS + METHODS + SUPPLEMENTAL FIGURES</i> sur la clé)
ARN circulaires et système nerveux.	Piwecka M, Glazar P, Hernandez-Miranda LR, Memczak S, Wolf SA, Rybak-Wolf A, Filipchuk A, Klironomos F, Cerda Jara CA, Fenske P, Trimbuch T, Zywtatza V, Plass M, Schreyer L, Ayoub S, Kocks C, Kuhn R, Rosenmund C, Birchmeier C, Rajewsky N Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function <i>Science</i>, 2017, vol. 357, p. 1 (Digest) <i>Science</i>, 2017, vol. 357, p. 1-7 (Article) Haque S, Harries LW Circular RNAs (circRNAs) in Health and Disease <i>Genes</i>, 2017, vol. 8 (353), p. 1-17
Shigella et système de sécrétion de type 3.	Pinaud L, Ferrari ML, Friedman R, Jehmlich N, von Bergen M, Phalipon A, Sansonetti PJ, Campbell-Valois FX Identification of novel substrates of Shigella T3SA through analysis of its virulence plasmid-encoded secretome <i>PLoS ONE</i>, 2017, vol. 12 (10), p. 1-23 (+ <i>SUPPORTING INFORMATION</i> sur clé)
Anticorps thérapeutiques via leurs Fc.	Li T, DiLillo DJ, Bournazos S, Giddens JP, Ravetch JV, Wang LX Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2017, vol. 114, p. 3485-3490 + <i>SUPPORTING INFORMATION</i> Liu H, Saxena A, Sidhu SS, Wu D Fc engineering for Developing Therapeutic Bispecific Antibodies and Novel Scaffolds <i>Frontiers in Immunology</i>, 2017, vol. 8 (38), p. 1-15
Le foie comme régulateur de la prise alimentaire.	von Holstein-Rathlou S, BonDurant LD, Peltekian L, Naber MC, Yin TC, Claflin KE, Ibarra Urizar A, Madsen AN, Ratner C, Holst B, Karstoft K, Vandenbeuch A, Anderson CB, Cassel MD, Thompson AP, Solomon TP, Rahmouni K, Kinnamon SC, Pieper AA, Gillum MP, Potthoff MJ FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver <i>Cell Metabolism</i>, 2016, vol. 23, p. 335-343 (+ <i>SUPPLEMENTAL INFORMATION</i> sur la clé) Adams AC, Gimeno RE The Sweetest Thing: Regulation of Macronutrient Preference by FGF21 <i>Cell Metabolism</i>, 2016, vol. 23, p. 227-228

RAPPORT DU JURY D'ECD

Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,77 / 20**
- Meilleure note : **19,00 / 20**
- Note la plus basse : **03,00 / 20**
- 7 notes sur 13 (**54 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20
- Moyenne des candidats admis **13,57 / 20**

Rapport sur l'épreuve d'ECD

Chaque dossier comporte un ou deux articles en anglais : soit deux articles de recherche se répondant sur une problématique de recherche, soit un seul article suffisamment conséquent quand à l'étendue des techniques mises en œuvre pour répondre à la problématique scientifique soulevée par l'article, soit enfin une revue présentant l'état des connaissances sur un sujet associée à un article de recherche détaillant des résultats expérimentaux sur une des dimensions évoquée dans la revue. Les thèmes choisis sont en général à la pointe de l'actualité, souvent fondés sur des technologies de rupture.

L'exercice suppose de posséder une culture générale suffisante en biologie et technologie appliquée à la biologie qui permet aux candidats de ne pas être déstabilisés par le sujet, souvent nouveau pour eux.

Les candidats possédant cette solide culture méthodologique et des connaissances théoriques étendues dans les différents domaines de la biologie sont assurés, lors d'une première lecture rapide du ou des articles, de pouvoir dégager d'emblée la ou les hypothèses formulées dans l'article de recherche, et les points essentiels supportant les conclusions des auteurs.

Les candidats pourront, après approfondissement du dossier, présenter sans difficulté la problématique scientifique dans son ensemble, les hypothèses des auteurs, les choix expérimentaux, et les résultats majeurs permettant d'étayer leurs conclusions.

L'objectif de l'exposé n'est donc pas une présentation exhaustive du ou des articles de recherche (le temps n'y suffirait pas) mais bien une présentation des points essentiels faisant ressortir la logique des auteurs. Il faut bien entendu présenter la démarche scientifique expérimentale et les avantages et limites des méthodes employées. L'accès à internet durant l'épreuve tout en facilitant la compréhension du sujet traité, permet de répondre à cet objectif. Cependant, la critique systématique de l'approche de la problématique par les auteurs n'est pas une obligation.

Pour les trois domaines (Microbiologie, Biochimie et Biologie Cellulaire et Physiologie), les remarques sont approximativement les mêmes : cette année encore, le jury a constaté que certains candidats n'étaient pas en mesure d'expliquer les principes des méthodes et de justifier leurs choix pour documenter une hypothèse. Ces lacunes sont suffisamment flagrantes pour ne pas être masquées par un aplomb à l'oral qui dessert de ce fait le candidat.

La moitié des notes en dessous de la moyenne s'expliquent en premier lieu par un défaut de fond souvent dus à une méconnaissance du domaine de recherche du /des articles rendant difficile la prise de recul nécessaire pour une analyse et une synthèse correcte. La découverte de certaines techniques au moment de la lecture n'aide pas à la compréhension et ajoute sans doute à la confusion. Ce défaut de fond retentit sur la forme de l'exposé, qui dans certains cas pâtit de l'absence de maîtrise de l'outil informatique par le candidat.

Les efforts des candidats pour illustrer leurs propos par des documents issus des articles ou de sites internet (dont les sources doivent être évidemment citées) et retravaillés ont été appréciés par le jury. Cependant, la copie *in extenso* de figures complexes d'article voire de tableaux, sans remise

en forme ni remis dans leur contexte peut s'avérer contreproductive dans une présentation qui reste aussi un exercice pédagogique.

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 solidité de ses connaissances et sa capacité à répondre à des questions hors du contexte du dossier.

Pour se préparer au mieux à cette épreuve d'ECD, la lecture régulière de la littérature scientifique, notamment certains journaux généralistes comme « *PNAS* » ou « *Frontiers in...* » est recommandée. Ils sont en libre accès et permettront aux candidats non seulement de s'améliorer pour cette épreuve mais aussi de réactualiser leurs connaissances.

Rapport sur les questions relatives à la Chimie

L'épreuve des 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 parfaitement maîtrisée.

La connaissance des structures électroniques des atomes semble maîtrisées mais pas forcément le lien avec la réactivité de l'atome en question.

Les notions liées à la bioluminescence et la fluorescence sont souvent connues mais pas nécessairement la relation entre l'énergie E et λ .

Les molécules de bases ne sont pas toujours connues des candidat(e)s (bases puriques, pyrimidiques, cholestérol, sucres simples ou diholosides, acides gras...). Les représentations sont parfois approximatives.

La notion de pK_a , en particulier pour les acides aminés, et celle de solution tampon ne sont pas complètement assimilées.

La justification de l'utilisation de certaines substances chimiques pour des expériences de routine (ex : extraction d'ADN plasmidique par exemple) n'est pas évidente pour certain(e)s candidat(e)s.

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.

Les expressions des constantes (constante d'acidité, produit de solubilité...) manquent de rigueur dans leur écriture. Le lien entre ces constantes et le ΔG° n'est toutefois pas connu.

Conclusion

Cette année, la moitié des candidats étaient satisfaisant pour cette épreuve. Le recours possible à internet a considérablement amélioré l'approche du dossier.

Cependant, dans certains cas, le manque de connaissance était flagrant, aussi bien dans le domaine scientifique concerné par le sujet de l'ECD que dans les notions méthodologiques. Ces lacunes, décelables au cours de l'exposé sont souvent confirmées durant l'entretien qui suit. Celui-ci permet au jury, par des questions dans le domaine de l'ECD et dans d'autres domaines, de parfaire l'évaluation des candidats.

Le jury, en particulier lors des échanges, a noté l'attitude positive des candidats, cherchant à répondre aux questions du jury, suivant celui-ci sur les pistes qu'il proposait, de même que la maîtrise informatique générale.

L'ECD reste une épreuve difficile dans lequel la pédagogie tient une place certaine mais qui ne peut masquer les lacunes des candidats.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Pour la deuxième année, le jury s'est réparti en deux sous-jurys, un par épreuve et 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 divers. Cependant cette diversité s'est amenuisée depuis deux ans compte tenu de l'ouverture d'un Concours destiné aux titulaires d'un doctorat d'Université.

Les résultats aux épreuves d'admissibilité comme d'admission révèlent encore une fois qu'un concours de cette dimension doit se préparer en assurant 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 pourront 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 leur mise à niveau 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, 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 tout en faisant preuve de qualités pédagogiques et didactiques.

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. 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 mais aussi de maîtrise des techniques.

Pour les ECD, 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 les manques de connaissances majeures et ne doit pas faire négliger la préparation à cette épreuve par la lecture de nombreux et variés journaux scientifiques.

Le jury félicite les candidats lauréats de cette session 2018. 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 : proviseures-adjointes, enseignants, techniciens, et personnel administratif, pour l'accueil et l'aide efficace apportés tout au long de l'organisation et du déroulement de ce concours qui a eu lieu dans d'excellentes conditions.