

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 2017**

**AGRÉGATION**

**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

	<b>Page</b>
<b>RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES</b>	3
<b>ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ</b>	
<b>Composition de Biochimie</b>	
Sujet	5
Rapport de Jury	5
<b>Composition de Microbiologie</b>	
Sujet	8
Rapport de Jury	8
<b>Composition de Biologie Cellulaire et Physiologie</b>	
Sujet	10
Rapport de Jury	10
<b>ÉPREUVES D'ADMISSION</b>	
<b>Travaux Pratiques de Biochimie – Physiologie</b>	
Sujet	15
Rapport de Jury	33
<b>Travaux Pratiques de Microbiologie</b>	
Sujet	40
Rapport de Jury	54
<b>Travaux Pratiques de Chimie</b>	
Sujet	66
Rapport de Jury	79
<b>Épreuve orale de leçon</b>	
Sujets	83
Rapport de Jury	83
<b>Épreuve orale d'étude critique de dossier scientifique et/ou technique</b>	
Sujets	87
Rapport de Jury	89
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	91

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits	348
Candidats présents aux épreuves d'admissibilité	75
Nombre de postes	6
Candidats admissibles	14
Candidats présents aux épreuves d'admission	14
Candidats proposés pour l'admission	6
Barre d'admissibilité	07,82
Barre d'admission	09,47

### ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

Moyenne générale des candidats présents	05,35
Moyenne générale des candidats admissibles	09,69

### COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Moyenne des candidats présents	05,67
Moyenne des candidats admissibles	11,41
Note maximale	16,50

### COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents	04,44
Moyenne des candidats admissibles	09,07
Note maximale	16,00

### COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents	05,59
Moyenne des candidats admissibles	08,60
Note maximale	10,87

## ÉPREUVES D'ADMISSION

Moyenne générale des candidats présents aux épreuves d'admissions 08,71

Moyenne générale des candidats admis 11,96

### TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents 09,59

Moyenne des candidats admis 11,48

Note maximale 15,40

### TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents 09,26

Moyenne des candidats admis 11,60

Note maximale 13,70

### TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

Moyenne des candidats présents 09,43

Moyenne des candidats admis 12,93

Note maximale 17,90

### LEÇON

Moyenne des candidats présents 07,50

Moyenne des candidats admis 12,17

Note maximale 16,00

### ÉTUDE CRITIQUE DE DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Moyenne des candidats présents 08,50

Moyenne des candidats admis 11,87

Note maximale 17,00

## ENSEMBLE DU CONCOURS

Moyenne des candidats admissibles 09,47

Moyenne des candidats admis 11,60

# ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

## COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

### SUJET

Synthèse, contrôle de la qualité et dégradation des protéines dans les cellules animales.

### RAPPORT DU JURY DE BIOCHIMIE

Le devoir se devait d'être structuré et concis et offrir une vision claire et précise du champ disciplinaire concerné au niveau le plus élevé, bien évidemment présentée 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 biochimique, structurale et fonctionnelle des protéines. Il fallait insister sur le fait que la fonction biologique des protéines dépend de l'acquisition d'une ou plusieurs structures tridimensionnelles (3D).

Ceci permettait de poser la question des mécanismes mis en jeu et du contrôle de la structure 3D de la protéine.

En évoquant les altérations possibles des protéines (oxydation, carbonylation...), les notions de stabilité, vieillissement et temps de demi-vie des protéines devaient être abordées avant de s'intéresser aux mécanismes qui assurent la dégradation des protéines et/ou leur recyclage. Tous ces concepts pouvaient être développés à partir d'un exemple issu d'une situation pathologique pertinente.

## **NOTIONS ATTENDUES DANS LA COMPOSITION**

### ***Décodage de l'information génétique & régulation***

Une première partie pouvait être focalisée sur les grandes étapes qui assurent le décodage de l'information génétique jusqu'à la synthèse protéique (acquisition de la structure primaire) et les mécanismes de régulation impliqués.

Il ne s'agissait bien évidemment pas de décrire la structure de la molécule d'ADN, ni de présenter en détail la mécanique de la transcription ou le code génétique. Étaient toutefois attendus les acteurs et mécanismes de la transcription et de la traduction, notamment ceux impliqués dans la régulation spatiotemporelle de la synthèse des protéines (répertoire de facteurs de transcription, signaux du microenvironnement, effecteurs de signalisation, régulations épigénétiques, importance des microARN, épissage alternatif...).

### ***Acquisition de la structure tridimensionnelle des protéines & contrôle qualité***

Une deuxième partie devait être consacrée aux mécanismes qui supportent l'acquisition de la structure 3D des protéines et au contrôle de qualité.

Il fallait alors distinguer les protéines hydrosolubles (dont la plupart se retrouvent dans le cytoplasme) des protéines membranaires. Étaient attendus les niveaux d'organisation des protéines au cours du repliement et les mécanismes classiques de repliement des protéines : repliement spontané, influence de la séquence en acides aminés, structures secondaires et supersecondaires, notion de « globule fondu », rôle des liaisons faibles pour guider le repliement (entropie conformationnelle), interactions avec différents chaperons, influence de l'eau et des ions. Il était aussi pertinent d'évoquer le paradoxe de Levinthal en ce qui concerne la cinétique de repliement. En s'attachant aux protéines membranaires, le candidat devait montrer le couplage entre synthèse/translocation/trafic des protéines dans les différents compartiments endomembranaires et comment ces protéines s'insèrent dans les membranes en formant un ou plusieurs segments transmembranaires. Il était utile de s'intéresser aux modifications post-traductionnelles des protéines qui contribuent à la stabilité et fonction des protéines. La présentation de quelques méthodes spectroscopiques et/ou biochimiques de caractérisation de la structure 3D des protéines pouvait compléter le propos.

Enfin, cette deuxième partie devait s'attacher aux mécanismes qui contrôlent la structure 3D des protéines, *i.e.* contrôle de qualité, au travers de la reconnaissance des régions hydrophobes exposées, des cystéines non appariées, ou des chaînes glycanes immatures, comme autant de signaux caractéristiques d'une protéine incorrectement repliée ou maturée. La réponse UPR (« *Unfolded Protein Response* ») et le système ERAD-C/L propres au réticulum endoplasmique et les voies de signalisation mises en jeu pour la rétrotranslocation des protéines anormales, les modifications des protéines par ubiquitination en vue de leur dégradation, la réduction de la synthèse protéique globale, devaient être présentés. Des exemples précis étaient bien évidemment attendus.

Quelques devoirs ont évoqué la possibilité d'un contrôle de qualité des protéines dans le noyau : afin de vérifier la qualité de l'ARNm avant son export, un premier essai de traduction pourrait avoir lieu dans le noyau. Si la protéine est correctement repliée, ceci garantit un ARNm sans erreur pouvant être exporté et traduit. Le jury félicite les candidats ayant développé ce concept.

### ***Dégradation des protéines***

Enfin, une troisième partie permettait d'aborder la dégradation des protéines.

Il fallait décrire les acteurs et mécanismes de la dégradation protéique en distinguant l'origine des protéines cytosoliques ou membranaires. En particulier, il était attendu les mécanismes précis de dégradation des protéines ubiquitinées par le protéasome (Prix Nobel de Chimie en 2004), de dégradation des protéines membranaires par adressage au lysosome, ainsi que de dégradation de certaines protéines par adressage spécifique à une vésicule d'autophagie (Prix Nobel de Médecine en 2016).

À partir d'exemples précis, il était possible de relier la dégradation des protéines à une ou plusieurs fonctions biologiques comme la dégradation des protéines bactériennes pour la présentation antigénique (voie autophagolysosomale), le recyclage des récepteurs membranaires (signalisation cellulaire et cycle endolysosomal) ou la dégradation des protéines altérées. Il était nécessaire de mentionner l'importance de certaines séquences protéiques (KFERQ/PEST), modifications (glycation), interaction avec des protéines chaperons... pour orienter une protéine vers une voie de dégradation spécifique. En revanche, le devenir des acides aminés après dégradation des protéines était totalement hors-sujet.

## **REMARQUES GÉNÉRALES**

À la lecture de l'ensemble des copies, les correcteurs ont noté le niveau excessivement faible en biochimie d'une grande majorité des candidats pour lesquels les définitions qui constituent les bases de la biochimie des protéines ne sont pas, où très partiellement, maîtrisées.

Par ailleurs, les correcteurs ont noté un grand nombre de copies dans lesquelles les mécanismes proposés étaient fantaisistes, attestant des difficultés majeures rencontrées par certains candidats à traiter d'un sujet pourtant classique. Force est aussi de constater le manque d'esprit de synthèse et le peu de culture scientifique de certains candidats.

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 et perspectives développées. Une ouverture évidente concernait ici les maladies neurodégénératives amyloïdes pour lesquelles l'accumulation de protéines anormalement conformées très peu dégradables (comme les prions) provoque la mort de certaines populations neuronales appartenant au système nerveux central.

Dans leur ensemble, les candidats ont néanmoins fait l'effort d'une présentation soignée.

L'iconographie était quelques fois d'une très grande qualité et, même s'ils ont été très rares, certains devoirs se sont démarqués par des connaissances scientifiques de bon niveau.

# COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

## SUJET

Les virus sont à la fois des pathogènes et des outils au centre de stratégies vaccinales et thérapeutiques. Vous illustrerez ces deux aspects à l'aide d'exemples précis qui privilégient les principes et mécanismes mais excluent les cycles réplicatifs.

## RAPPORT DU JURY DE MICROBIOLOGIE

Ce sujet nécessitait une connaissance approfondie de la virologie animale, des applications qui découlent de ces connaissances, et dans une moindre mesure des mécanismes d'immunologie anti virale.

Il était attendu une introduction définissant les virus avec présentation succincte de différentes pathologies rapportées aux virus, puis, sur la base des propriétés qui leur sont spécifiques, un exposé des différentes possibilités thérapeutiques et prophylactiques qu'ils supportent.

La première partie du sujet pouvait être consacrée, sur la base d'exemples bien choisis, au pouvoir pathogène des virus et des différentes réponses immunitaires qu'ils induisent, afin de dégager les caractéristiques fondamentales des virus en terme de tropisme et d'interactions avec les cellules hôtes. Les différents types d'immunité ainsi que leur participation à la pathogénicité virale devaient également être développés et servir ensuite de support à la partie consacrée à la vaccination. Les mécanismes de prolifération cellulaire viro-induite se devaient d'être évoqués, de même que l'intégration dans le génome de mammifères de certains virus (*Retroviridae*, par exemple) et leurs conséquences en terme de perturbation génomique, d'expression génique de l'hôte et de prolifération cellulaire.

Les deux autres parties, consacrées aux aspects thérapeutiques et vaccinaux, pouvaient ainsi découler de cette première approche.

Les virus agents pathogènes font, depuis le 18<sup>e</sup> siècle, l'objet de vaccination. Jenner et le virus de la vaccine (vaccin vivant hétérologue) puis Pasteur et le virus de la rage (vaccin homologue inactivé) en sont les figures les plus emblématiques. L'évocation de ces premières générations de vaccins (homologue, hétérologue ; vivant, atténué ou non, ou inactivé ; vaccins sous unité), avec leurs avantages et leurs inconvénients étaient attendue. Cette partie devait aussi comporter une présentation des plateformes virales, bases fondamentales pour le développement de vaccins de dernière génération. Les virus, choisis pour leur innocuité (virus sauvage ou vaccinaux) servent de support, après modification génomique (introduction de gènes support des protéines vaccinales

d'autres agents) et permettent ainsi l'élaboration des vaccins multivalents. Cette notion de plateforme vaccinale a été très rarement évoquée dans les copies. Un exemple type attendu était celui du virus vaccinal de la rougeole exprimant les protéines de Flavivirus et de Togavirus. Le virus d'insectes Baculovirus pouvait aussi être pris comme exemple de plateforme de production de protéines vaccinales. Dans tous les cas, les avantages, inconvénients et risques de ces vaccins de dernière génération devaient être développés, notamment sous l'angle de l'innocuité, des contraintes technologiques et de l'efficacité en terme de réponse immunitaire induite. L'identification des cibles vaccinales ou thérapeutiques par phage display n'était pas hors sujet.

La partie consacrée à l'aspect des virus au centre de thérapeutique était moins riche en termes d'exemples mais tout aussi importante. Deux volets étaient attendus : un volet de la thérapeutique antivirale et des médicaments anti-viraux et un volet sur l'utilisation des virus comme agents thérapeutiques. Pour ce dernier aspect, la phagothérapie comme substitut aux thérapeutiques antibiotiques a été souvent citée, mais devait jouer jeu égal avec les thérapeutiques innovantes anticancéreuses ou les thérapies géniques de déficit génétique. La liste des principaux virus vecteurs de gènes (Adenovirus, Herpesvirus, Poxvirus, Lentivirus) était le minimum demandé aux candidats. Des exemples plus précis d'essais thérapeutiques, au minimum ceux connus du grand public (vecteurs rétroviraux et « bébé bulles »), étaient également attendus et n'ont été que trop rarement présentés.

Comme l'an dernier, les notes reflètent un manque crucial, pour une majorité de candidats, de connaissances de base en virologie fondamentale et médicale et en immunologie anti-virale. Même si un plan assez classique structurait la majorité des copies, certains plans originaux fondés sur les propriétés biologiques des virus ont séduit le jury. En tout état de cause, la capacité d'organisation des connaissances selon un plan logique, des notions précises et justes, exposées de façon claire avec recours si possible à des schémas, sont un gage de réussite.

De façon générale, la partie consacrée aux vaccins a été mal appréhendée par les candidats, *ce qui est très préoccupant au regard des enjeux sociétaux actuels dans ce domaine important de santé publique*. Les deux aspects (vaccins classiques et plateformes vaccinales) n'ont que très rarement été traités dans une même copie, la plupart des copies privilégiant la partie vaccins classiques avec de trop fréquentes erreurs (confusion entre vaccins inactivés et vaccins atténués) ou des lacunes plus importantes encore. La réponse immunitaire générée par les virus ne devait pas être hypertrophiée, et devait permettre d'expliquer les mécanismes mis en jeu lors pour une vaccination efficace. Cela n'a pas été le cas de certaines copies, dont l'immunologie constituait l'élément principal, voire unique, frisant donc le hors sujet. À noter que les bénéfices /risques de chacun des vaccins ont été trop rarement évoqués dans les copies.

La partie consacrée à la thérapeutique a été diversement traitée. La majorité des candidats se sont contentés de généralités, principalement sur la phagothérapie et plus rarement sur la thérapie génique. Les différents types de vecteurs développés et évalués à ce jour par des essais cliniques n'ont été que trop peu mentionnés.

De manière générale, le jury est resté sur sa faim quant aux principes et mécanismes mis en jeu. Dans une majorité de copies, cet aspect a été passé sous silence. Dans les copies restantes, les principes n'étaient souvent qu'évoqués, et parfois avec des erreurs. Les connaissances de base de biologie moléculaire étaient souvent mal maîtrisées ou de manière trop approximative, et la technologie de la manipulation des génomes, un aspect incontournable d'un concours d'agrégation en Biochimie et Génie biologique, était parfois inconnue.

Les candidats, à de rares exceptions, ont eu beaucoup de difficultés à organiser leurs connaissances de façon synthétique avec une structuration logique afin de répondre à la problématique qui était assez vaste. Avant d'entamer la rédaction de leur copie, il est nécessaire que les futurs candidats prennent le temps de réfléchir à la problématique du sujet, à l'importance de certaines notions par rapport à cette problématique et aux connaissances qu'ils souhaitent développer pour étayer leur propos. Une réflexion sur l'organisation du devoir est nécessaire à ce stade, afin de pouvoir traiter le sujet dans sa totalité et de manière concise.

Enfin, dans leur ensemble, les candidats font l'effort d'une présentation et d'une rédaction correctes, à l'exception de copies, trop nombreuses, dans lesquelles l'orthographe est plus qu'aléatoire. Les schémas sont souvent de très bonne qualité, bien que parfois mal adaptés au propos ou à la problématique.

# COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

## SUJET

Les vaisseaux sanguins et les réseaux vasculaires sont impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques et certaines pathologies qui leur sont associées. Dans ce cadre, vous développerez à l'aide d'exemples les contributions des différentes organisations anatomiques rencontrées chez l'Homme et le rôle des différents types cellulaires constitutifs des vaisseaux. Les boucles de régulation de la pression artérielle ne sont pas attendues.

## RAPPORT DU JURY DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

### INTRODUCTION

De nombreuses compositions ont abordé directement les exemples sans que le cadre du sujet ait été même partiellement défini. L'introduction est apparue ainsi trop souvent négligée, traduisant un manque de réflexion et un manque de prise de hauteur par rapport au sujet, malheureusement récurrents dans les rapports annuels.

Il apparaissait important avant toute chose de bien cerner les termes essentiels de l'intitulé: Il était indispensable au préalable de revenir sur les notions de vaisseaux sanguins et de réseaux vasculaires : « structures creuses formant un système fermé dans lequel un liquide est mis en mouvement par une pompe (le cœur) ». Un schéma rapide de la circulation sanguine chez l'Homme pouvait être proposé, positionnant les principaux circuits (circulation systémique et pulmonaire), les artères, veines et sens de circulation et certains organes intervenant dans des réseaux associés à des fonctions spécifiques comme le cerveau et la circulation cérébrale, l'intestin, le foie et le système porte entéro-hépatique.

Dans l'introduction devaient également être énoncés les principaux rôles des réseaux sanguins : à savoir assurer le transport, les échanges de matière et de chaleur. À la notion de transport devaient être associées les notions de débit, de pression (hémodynamique) ; à la notion d'échange, les notions de compartimentation, de passages transépithéliaux ou transmembranaires ainsi que de gradients de pression partielle ou de concentration.

Certains devoirs ont fait état de la présence du système lymphatique et de son organisation, sans développement exhaustif. Un tel développement n'était pas attendu par les correcteurs, le terme de vaisseau sanguin étant mentionné dès le début de l'intitulé.

Le sujet devait être traité à différents niveaux d'approche, et l'introduction se devait de préciser leur ordonnancement : ainsi, de bonnes connaissances étaient attendues en physiologie cellulaire, mais avec une capacité à prendre en considération des composantes biophysiques et des aspects intégrés. De la qualité de l'introduction et de la réflexion préalable pouvait donc dépendre la qualité de la composition globale.

## **NOTIONS ATTENDUES DANS LA COMPOSITION**

### ***Principaux vaisseaux constitutifs des réseaux et fonctions***

À ce stade, il apparaissait nécessaire de développer les fonctions générales des vaisseaux sanguins et de les relier à leurs caractéristiques tissulaires. Si les artères, artérioles et veines jouent un rôle dans la distribution et le transport, les capillaires jouent un rôle essentiel dans les processus d'échange et méritaient une réflexion et un développement plus approfondi.

#### *Distribution et transport :*

Concernant les artères, associées à débit et pression sanguine élevés, résistance et élasticité importantes, le jury s'attendait au développement de la notion d'amortissement des pulsations au fur et à mesure de la progression du sang artériel, liée aux caractéristiques structurales de la média, avec l'obtention au niveau des tissus irrigués d'un écoulement laminaire. Pouvaient être mentionnées les structures particulières portées par les vaisseaux, comme les barorécepteurs et chémorécepteurs, impliqués dans les régulations de la pression artérielle ou de la ventilation.

Pour les artérioles caractérisées par la richesse de leurs parois en cellules musculaires lisses, le contrôle de la vasomotricité par des facteurs émis localement (régulation intrinsèque par  $P_{O_2}$ , NO,  $H^+$ , histamine, PGs...) ou par le système sympathique et parasympathique (régulation extrinsèque) devait être évoqué. De nombreux devoirs ont fait état des sphincters précapillaires permettant une régulation importante du débit sanguin local, permettant d'adapter le débit aux besoins métaboliques (effort par exemple) ou de maintenir la température corporelle (thermolyse cutanée).

Pour les veines, les notions de compliance élevée, de réservoir sanguin, de faible résistance à l'écoulement sanguin, la présence de valvules ont été fréquemment évoquées. Il pouvait être intéressant d'associer à leur déformation par la contraction musculaire la fonction de pompe (« cœur veineux »).

#### *Échanges :*

Les capillaires forment un réseau fortement anastomosé et leur abondance dépend des besoins fonctionnels des tissus. Concernant la structure des capillaires et la fonction essentielle associée, à savoir les échanges, il était important de revenir sur certaines particularités. Ainsi, si la majorité des capillaires des tissus périphériques sont continus (muscles, tube digestif, poumons) et possèdent par définition des cellules endothéliales jointives, certains organes sont caractérisés par la présence de capillaires :

- fenestrés (glomérule rénal, intestin grêle, glandes endocrines,...) ;
- discontinus ou sinusoides (foie, rate,...) avec de larges ouvertures entre les cellules (discontinuités paracellulaires), une lame basale discontinue voire absente.

Ceci pouvait permettre de clarifier, selon le type de capillaire, le type et la sélectivité des échanges :

- diffusion passive cytoplasmique (gaz, ions...) ;
- pinocytose (protéines, lipides) ;
- utilisation de transporteurs membranaires ;
- utilisation de l'espace intercellulaire, pour le passage des cellules migratrices par exemple (diapédèse), l'exemple classique à préciser étant celui des processus de l'inflammation.

Un autre aspect était à envisager et concernait les moteurs des échanges transcapillaires, les processus de filtration ou de réabsorption dépendant de la résultante des pressions hydrostatique et oncotique (en relation avec la loi de Starling).

Certaines compositions ont pris le parti de présenter un tableau synthétique, apprécié par les correcteurs, reprenant pour chaque type de vaisseau les principales couches, cellules et molécules constituantes : lame basale, endothélium, media, adventice avec présence de cellules musculaires, fibres de collagène, fibres élastiques.

### ***Structures vasculaires particulières ou réseaux spécifiques***

La composition se devait d'envisager la structure anatomique et la physiologie de réseaux spécifiques (circulation cérébrale, réseaux admirables et systèmes porte essentiellement).

La circulation cérébrale a souvent été éludée ou peu développée sous ses aspects physiologiques, alors qu'elle concerne l'irrigation d'un organe essentiel, le cerveau. Les candidats en sont conscients, mais la circulation cérébrale n'a été évoquée (et rarement développée) dans de nombreux devoirs que sous ses aspects physiopathologiques. Si la circulation cérébrale obéit aux principes généraux, à savoir une circulation artérielle et veineuse, la présence de barorécepteurs à un endroit stratégique de contrôle (barorécepteurs du sinus carotidien), elle présente des caractéristiques tout à fait spécifiques :

- une structure de la microcirculation différente de celle des vaisseaux périphériques. Il était nécessaire de revenir ici sur la structure de l'endothélium vasculaire cérébral, présentant des jonctions serrées, faisant que les échanges de matière sont possibles soit par diffusion ou par passage transcellulaire et non par passage paracellulaire. Cette caractéristique de l'endothélium devait être associée à la notion de barrière hémato-encéphalique. La présence d'astrocytes en pied entourant la microcirculation et contribuant au métabolisme de l'endothélium méritait d'être mentionnée également.
- le développement d'une anatomie particulière, avec la présence notamment du polygone de Willis, pouvant contribuer à une suppléance de circulation inter-hémisphérique.
- une autorégulation du débit cérébral particulièrement développée (protection cérébrale), dépendant de facteurs locaux (CO<sub>2</sub> et NO), d'une innervation intrinsèque (noradrénergique, sérotoninergique et cholinergique) et dans une moindre mesure d'une innervation extrinsèque sympathique et parasympathique.

Très peu de devoirs en ont donné une définition claire des réseaux admirables et les systèmes portes : « un réseau admirable est un réseau capillaire compris entre deux vaisseaux de même nature. Le système porte est branché à ses deux extrémités sur un système ramifié connecté à des capillaires sanguins : il comporte ainsi un vaisseau (artère ou veine) compris entre deux réseaux capillaires dont un est admirable ». Sans être exhaustif, le système porte hypothalamo-hypophysaire et le système porte hépatique méritaient d'être développés avec présentation d'un schéma anatomique précisant les types de vaisseaux et mise en évidence du rôle de ces systèmes dans le transport/non-dilution des hormones ou des nutriments.

Pouvaient être mentionnés également les tissus érectiles, caractérisés par des artères, sinueuses au repos (« hélicines ») et de nombreux capillaires avec une lumière très irrégulière, sinueuse (« sinus vasculaires »). La turgescence ou l'érection se produit lorsque les artères hélicines et leurs artérioles sont dilatées par la commande parasympathique.

Si les fonctions de transport et d'échange constituaient la base de la composition, le maintien de l'intégrité et /ou le remodelage vasculaire méritaient développement dans un chapitre particulier.

#### *Vaisseaux et hémostase :*

L'intégrité structurale et fonctionnelle des vaisseaux nécessite la mise en place de mécanismes de réparation et cicatrisation, faisant intervenir l'endothélium notamment : nécessité d'une vasoconstriction (sécrétion d'endothélines) et mises en jeu de facteurs prothrombotiques (facteur de Willebrand notamment) et facteurs antithrombotiques.

#### *Remodelage vasculaire :*

Le remodelage vasculaire peut intervenir dans un certain nombre de conditions physiologiques ou pathologiques, en étant capable d'adapter la morphologie du lit capillaire aux besoins physiologiques. Le réseau vasculaire n'est donc pas « statique » mais en remodelage permanent au cours de la vie. Il peut concerner le développement embryonnaire, la mise en place et la réparation de l'endomètre, la vascularisation musculaire lors de l'entraînement chez le sportif, la réparation post-ischémique. Elle se caractérise par un processus d'angiogenèse contrôlé positivement par des cytokines (VEGF, FGF), et une possible activation génique par l'hypoxie (HIF), ou négativement par l'angiostatine ou l'endostatine.

### **Aspects physiopathologiques associés**

Les candidats ont abordé ce point lié aux pathologies et présent dans l'intitulé du sujet selon deux stratégies. La première a consisté à illustrer les différentes sections par des aspects physiopathologiques, la seconde à envisager une section spécifique, en précisant le réseau et/ou cellules concernées. Dans ce cadre, les exemples suivants présentent un intérêt certain, associés à un positionnement dans un contexte sociétal et/ou à un aspect thérapeutique :

- développement de l'athérosclérose, responsable d'une augmentation de pression artérielle associée à une possible thrombose ou hémorragie (cas des accidents vasculaires cardiaques – infarctus du myocarde –, ou des accidents vasculaires cérébraux – AVC) ;
- maladie de Willebrand, la plus fréquente des pathologies hémorragiques constitutionnelles,
- insuffisance cardiaque en association avec œdème par défaut de réabsorption ;
- Kwashiorkor en relation avec la malnutrition responsable d'une carence en protéines, suivie d'une diminution de la pression oncotique et d'un œdème (altération des moteurs de transfert transcapillaire) ;
- troubles érectiles pouvant être corrigés par le sildénafil, induisant activation des effets du NO et vasodilatation ;
- progression de la croissance tumorale associée à l'angiogenèse palliant les déficits nutritionnels de la tumeur ;
- récupération post-ischémique, avec activation par l'hypoxie de la synthèse de nouveaux vaisseaux palliant la baisse de débit local due à la thrombose.

## **CONCLUSION**

La conclusion reprend les notions principales de la composition en dégageant les concepts-clés. C'est sur la conclusion que se termine la lecture de la copie. Cette dernière impression du correcteur est importante et ne doit donc pas être négligée par les candidats.

D'une manière générale, les conclusions semblent avoir été rédigées à la hâte et de ce fait ont été peu valorisées. Plusieurs candidats ont réalisé un schéma-bilan en conclusion ce qui s'est révélé souvent pertinent mais ne dispense pas pour autant d'une conclusion rédigée.

Enfin, rappelons que la conclusion d'une composition d'agrégation comprend une ouverture. Cette ouverture pouvait envisager des applications médicales ou biotechnologiques, des méthodologies/modèles utilisés en recherche, en lien avec le contexte sociétal.

## **REMARQUES GÉNÉRALES**

Les schémas proposés ont été variés, mais hors sujet dans un certain nombre de cas (des schémas de boucles de régulation de la pression artérielle ont été retrouvés, bien que l'intitulé précisait clairement que ce point n'était pas à développer). Les légendes et annotations sont souvent insuffisantes.

À noter un bel effort de synthèse de certains candidats proposant des schémas/tableaux bilan auxquels le sujet se prêtait bien.

À niveau de connaissance égal, un devoir concis et logique sera beaucoup mieux noté qu'un devoir étiré et fourre-tout : cette remarque apparaît systématique d'année en année. Les exemples possibles pour illustrer le présent sujet étaient très nombreux. Le jury ne s'attendait pas à une revue exhaustive, mais était en droit par contre d'attendre une présentation logique et argumentée.

# ÉPREUVES D'ADMISSION

## TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

### SUJET

## Épigénétique et cancer

### INTRODUCTION

Les cancers sont des maladies résultant de la prolifération incontrôlée de cellules. L'initiation de la tumorigénèse et la prolifération des cellules sont traditionnellement considérées comme étant dues à une série de modifications génétiques. Cependant, il a été montré récemment que dans certains cas ces modifications n'étaient pas suffisantes pour expliquer le processus de cancérogénèse au niveau cellulaire. Des études montrent que la régulation des mécanismes épigénétiques pourrait avoir un rôle central dans le développement et la progression des cancers. Trois types de mécanismes épigénétiques sont présents au niveau cellulaire et modulent l'expression génétique :

- modification de l'ADN par méthylation,
- modification des histones par acétylation, méthylation,...
- régulation de l'expression par des ARN non codants.

Les modifications épigénétiques sont transmises au cours des divisions cellulaires et sont réversibles. L'étude de ces modifications est fondamentale car elle permettra de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques et de traiter de manière plus ciblée les patients.

On se propose de déterminer et comparer, au cours de cette étude, le pourcentage de méthylation du gène BCL6B et l'activité histone acétyltransférase (HAT) entre une lignée cellulaire issue d'un cancer et des cellules humaines « non pathologiques ».

La lignée cellulaire utilisée, HCT-116, est issue d'un adénocarcinome colique humain.

Des extraits de cellules « non pathologiques » ont été préparés et sont fournis pour chaque partie du sujet. Ils sont issus d'un épithélium intestinal sain.

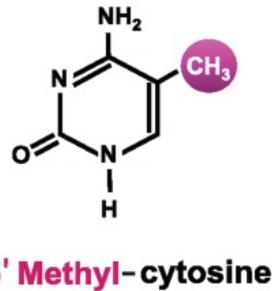
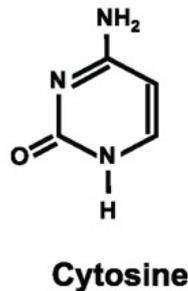
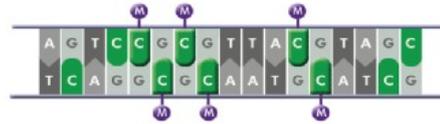
### AVERTISSEMENT

- 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.

## PARTIE 1 : ÉTUDE DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique majeur qui s'effectue sur les cytosines des îlots CpG. Lorsqu'un promoteur est méthylé, le gène exprimé en aval est généralement réprimé.

### Document 1 : Méthylation de l'ADN

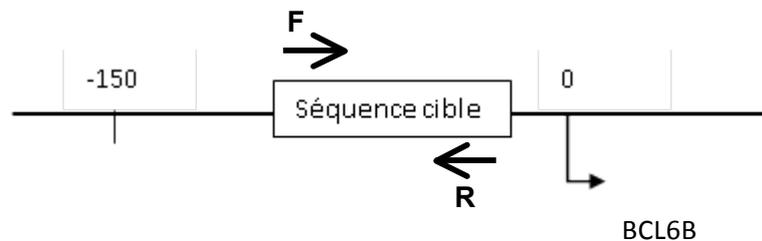


Source : Alcohol Research 2013; 35(1): 6–16.

BCL6B est potentiellement un gène suppresseur de tumeur. Il est localisé sur le chromosome 17p13.1 et exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules de l'organisme.

On se propose de rechercher la présence de méthylation au niveau du promoteur du gène BCL6B en mettant en œuvre une PCR spécifique des méthylations. La séquence étudiée est donnée dans le **document 2**.

### Document 2 : Séquence étudiée



Séquence cible :

5' CCCC GCCCTGGACTCGCCATCTGGAGAGCGAGGGAGGAAGGAAGGATACAGACCCAGGCG  
TTCACCCACCTCCACCCCGCCCCGACATCCCGGCCAGATAAAGGAGCCGAGGCCAAG 3'

Toutes les séquences (séquence cible et amorces) sont présentes dans un fichier word nommé : **Séquence BCL6B** sur le bureau de l'ordinateur mis à votre disposition.

La recherche de méthylation s'effectue en deux étapes :

- traitement au bisulfite puis purification de l'ADN,
- qPCR.

## I. TRAITEMENT AU BISULFITE DE L'ADN

### I.1. Principe

Le principe du traitement au bisulfite de l'ADN est présenté dans l'extrait du kit Qiagen ci-dessous :

**Document 3 :**  
**Extrait de la notice du coffret QIAGEN EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit**

Methylation of DNA occurs on cytosine residues, especially on CpG dinucleotides enriched in small regions of DNA (<500 bp). These regions, with a GC content greater than 55%, are known as CpG islands. They are usually clustered around the regulatory region of genes and can affect the transcriptional regulation of these genes. Methylation of CpG islands by DNA methylases has been shown to be associated with gene inactivation and plays an important role in the development of cancer and cell aging. Reversal of DNA methylation at these sites is a potential therapeutic strategy as this reversal may restore expression of transcriptionally silenced genes. In addition to CpG, methylated cytosine residues are also found at CpNpG or CpNpN sites (N = A, T, or C) in plants.

The methylation status of a DNA sequence can best be determined using bisulfite conversion. Bisulfite treatment of the target DNA results in conversion of unmethylated cytosine residues into uracil, leaving the methylated cytosines unchanged. Therefore, bisulfite treatment gives rise to different DNA sequences for methylated and unmethylated DNA (see below).

	<b>Original sequence</b>	<b>After bisulfite treatment</b>
Unmethylated DNA	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
Methylated DNA	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

### I.2. Mise en œuvre

Les cellules HCT116 ont été cultivées à 37 °C sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U·mL<sup>-1</sup> de pénicilline, 100 mg·L<sup>-1</sup> de streptomycine et 2 mmol·L<sup>-1</sup> de L-glutamine.

Un flacon de cellules HTC116 de 75 cm<sup>3</sup> est maintenu dans l'incubateur. Il sera fourni par les examinateurs à la demande.

Après avoir récupéré les cellules et numéré la suspension cellulaire obtenue à l'aide des **FICHES TECHNIQUES 1 et 2**, mettre en œuvre la réaction de bisulfitation présentée sur la **FICHE TECHNIQUE 3**.

En parallèle, un échantillon d'ADN issu de tissu sain (étiqueté « ADN sain ») vous est fourni. Effectuer la réaction de bisulfitation sur cet échantillon à partir de l'étape 2, afin de traiter les deux échantillons dans les mêmes conditions.

**Q1.** Dans le cadre des bonnes pratiques de laboratoires, indiquer quelles seraient les précautions à mettre œuvre pour éviter les contaminations inter échantillons lors de la bisulfitation et lors de la qPCR à suivre.

### I.3. Compte rendu

**Q2.** Indiquer l'état de confluence des cellules et le volume utilisé pour les resuspendre.

**Q3.** Présenter les résultats obtenus lors de la numération cellulaire.

**Q4.** Indiquer le volume de la suspension cellulaire utilisé pour effectuer la réaction avec le bisulfite.

**Q5.** Présenter les résultats obtenus lors de l'analyse du dosage de l'ADN. Commenter.

## II. Quantification des méthylations par PCR en temps réel (qPCR)

### II.1. Principe

Des amorces spécifiques permettent d'amplifier la séquence d'ADN cible. Un couple d'amorce (M) permet d'amplifier la séquence si elle a été méthylée, un autre couple (U) permet de l'amplifier si elle n'a pas été méthylée.

Les amorces utilisées pour détecter la séquence méthylée sont les suivantes :

	Sens (F)	Antisens (R)
Amorces M	5' CGTTTTGGATTCGTTATTTGGAGAGC 3'	5' TAACCTCGACTCCTTTATCTAACCG 3'

### II.2. Mise en œuvre

Sur les ADN obtenus après transformation au bisulfite, mettre en œuvre les qPCR suivantes à l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 4** :

- amplification de l'ADN méthylé à partir d'ADN issu d'un tissu épithélial sain,
- amplification de l'ADN non méthylé à partir d'ADN issu d'un tissu épithélial sain,
- amplification de l'ADN méthylé à partir d'ADN issu des cellules HCT116,
- amplification de l'ADN non méthylé à partir d'ADN issu des cellules HCT116.

### II.3. Compte rendu

**Q6.** Repérer sur les amorces les sites correspondant à un site potentiellement méthylé de la séquence cible.

**Q7.** Préciser l'intérêt de traiter l'ADN au bisulfite avant d'effectuer la qPCR.

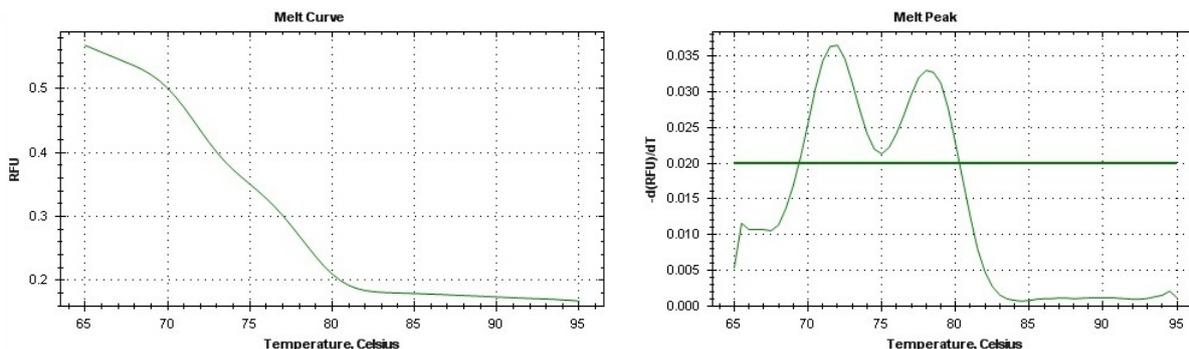
**Q8.** A l'aide des séquences des amorces (M) et de la séquence cible, expliquer sous forme de schémas commentés comment les amplicons seront obtenus à la fin du deuxième cycle de PCR. Les schémas prendront en compte le traitement au bisulfite et feront apparaître les différents brins d'ADN ainsi que les séquences présentes aux extrémités de chaque fragment d'ADN (30 pb).

**Q9.** Proposer une séquence pour les amorces (U) utilisées afin d'amplifier le fragment d'ADN s'il n'a pas été méthylé.

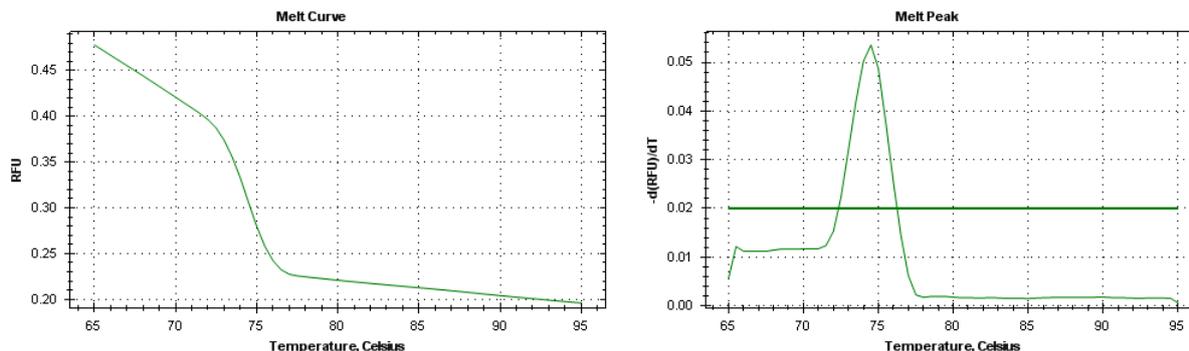
Des essais préliminaires de qPCR ont été effectués avec des températures d'hybridation différentes (T1 et T2 avec T1 supérieur à T2). Des courbes de fusion ont ensuite été réalisées sur les produits de PCR. Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 4**.

**Document 4 : Courbes de fusion réalisées sur les produits d'amplification obtenus pour deux températures d'hybridation (autres conditions identiques par ailleurs)**

Courbes a :



Courbes b :



RFU : Relative fluorescence unit

**Q10.** Rappeler l'influence de la température lors de l'étape d'hybridation. Indiquer comment cette température est choisie théoriquement.

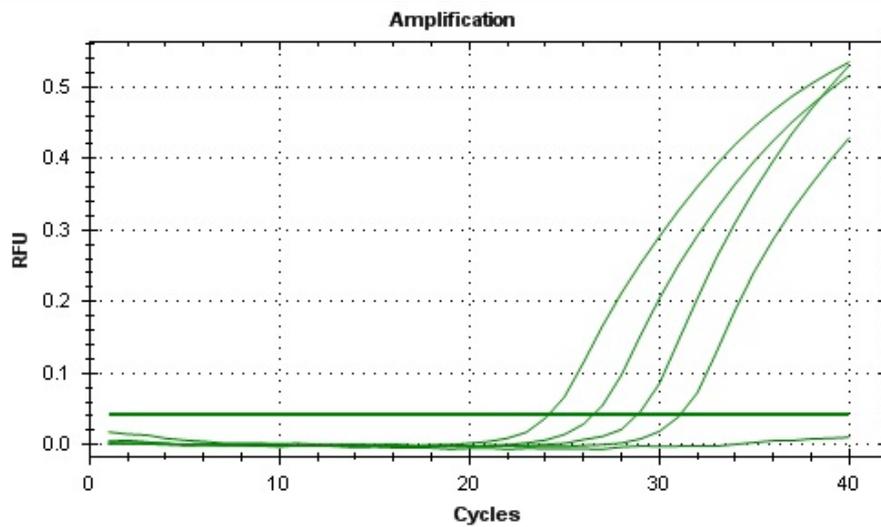
**Q11.** Analyser les **courbes b** du document 4.

**Q12.** Expliquer pourquoi les courbes de fusions peuvent être un indicateur de la qualité des produits de PCR. Attribuer les températures T1 et T2 à chacune des courbes du document. Justifier le choix effectué.

Une fois les conditions de PCR optimisées, une gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'ADN hyperméthylé extrait d'une lignée de cellules de cancer colorectal : les cellules HT-29 (Hu et al., 2015). L'ADN a été préparé dans les conditions des **FICHES TECHNIQUES 1, 2 et 3**. La PCR a été réalisée selon le programme de la **FICHE TECHNIQUE 4** et avec les amorces M.

Les résultats sont présentés dans le **document 5**.

**Document 5 : Gamme d'étalonnage réalisée sur un extrait d'ADN de cellules HT-29 traité au bisulfite avec les amorces M**



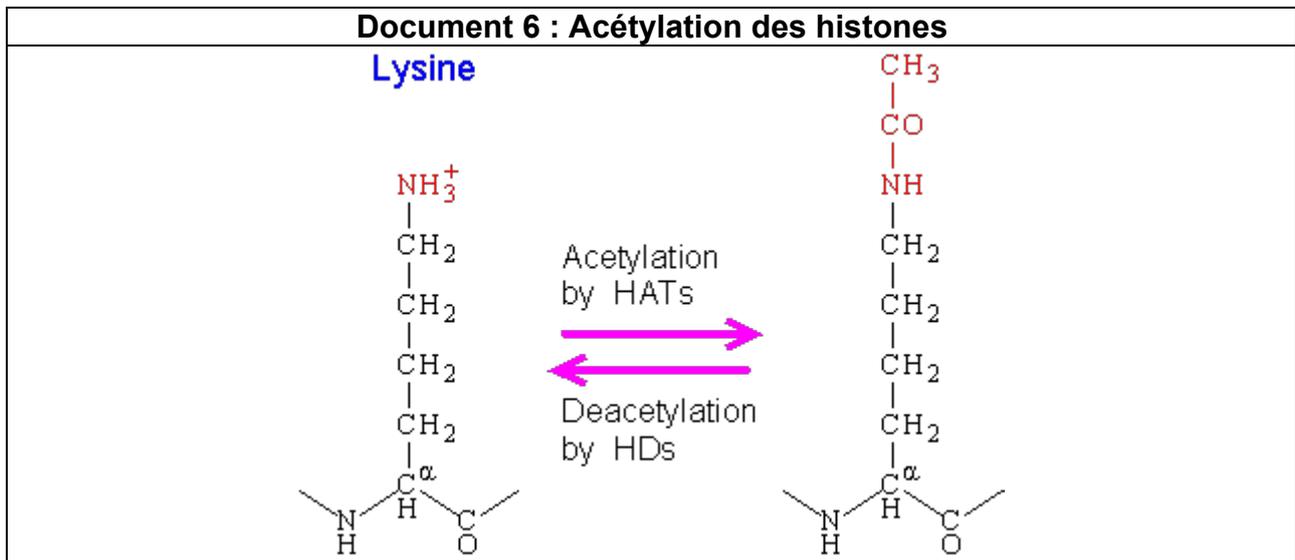
Données :

Quantité d'ADN par réaction (ng)	0	50	10	2	0,4
Cq : Nombre de cycle au seuil de quantification	-	24,12	26,47	28,75	31,07

- Q13.** Expliquer à partir des courbes de gamme comment est déterminé le Cq (nombre de cycles au seuil de quantification). Expliquer pourquoi l'ADN n'est pas quantifié à partir des valeurs de fluorescence en fin de qPCR.
- Q14.** Tracer la courbe  $Cq = f(\text{Log}(m_{ADN\text{ initial}}))$
- Q15.** Présenter les résultats de la qPCR réalisée sur les ADN issus de tissu sain et des cellules HCT116. Commenter ces résultats.
- Q16.** Déterminer le pourcentage de méthylation pour les deux types cellulaires.
- Q17.** Analyser la cohérence des résultats et conclure.

## PARTIE 2 : MESURE DE L'ACTIVITÉ DES HISTONES ACÉTYLTRANSFÉRASES

Les modifications post-traductionnelles des histones sont nombreuses : méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, polyADP-ribosylation,... L'acétylation des histones a des conséquences sur la structure de la chromatine mais également sur le recrutement des facteurs de transcription. Cette acétylation des histones est un processus réversible, comme l'ensemble des modifications épigénétiques. Deux types d'enzymes sont impliqués dans ce processus, présenté dans le **document 6** : les histone acétyltransférases (HAT) et les histone désacétylases (HDAC) qui, respectivement, ajoutent ou enlèvent des groupements acétyles aux lysines présentes sur l'extrémité N terminale des histones.



Source : Neuroscience & Medicine, 2012, 3, 107-123

**Q18.** Proposer des hypothèses pour expliquer pourquoi l'acétylation des histones modifie l'expression génétique et peut avoir une influence sur les processus tumoraux.

Afin de mesurer l'activité spécifique des histone acétyltransférases, le dosage des protéines ainsi que la mesure de l'activité histone acétyltransférase (HAT) seront réalisés sur des extraits nucléaires.

**Un extrait nucléaire est à préparer à partir des cellules cancéreuses HCT116.**

Un extrait nucléaire préparé à partir de cellules épithéliales saines est fourni (200  $\mu$ L ; étiqueté « extrait nucléaire »).

### I- PREPARATION DE L'EXTRAIT NUCLEAIRE

À l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 5**, préparer un extrait nucléaire à partir de la suspension de cellules HCT116 obtenue à l'issue des étapes de récupération des cellules (**FICHE TECHNIQUE 1**).

**Q19.** Indiquer le protocole de préparation du tampon hypotonique complet.

**Q20.** Indiquer le rôle du PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl).

**Q21.** Présenter, sous une forme adaptée, les caractéristiques des cellules observées au microscope lors des différentes étapes de la préparation de l'extrait nucléaire. Justifier leur aspect.

**Q22.** En vue du dosage de l'activité histone acétyltransférase, expliquer l'intérêt de la préparation d'extraits nucléaires par comparaison à un protocole qui ne ferait intervenir qu'une étape de lyse totale des cellules.

## **II- DOSAGE DES PROTÉINES DES EXTRAITS NUCLÉAIRES**

Mettre en œuvre le dosage des protéines sur l'extrait nucléaire issu du tissu sain fourni ainsi que sur l'extrait nucléaire préparé à partir des cellules HCT116 selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 6**.

**Q23.** Présenter le protocole de dosage des protéines ainsi que les résultats obtenus.

**Q24.** Déterminer la concentration en protéines dans les différents extraits.

## **III- MESURE DE L'ACTIVITE DES HISTONE ACÉTYLTRANSFERASES**

### **III.1. Principe**

Les histone acétyltransférases sont impliquées dans la régulation de la transcription des gènes, de la différenciation et de la prolifération cellulaire. La détermination de l'activité HAT se fait selon le principe suivant :

Dans un premier temps, la HAT acétyle un peptide lié au coenzyme A. Le coenzyme A ainsi libéré sert ensuite de cosubstrat à une deuxième enzyme impliquée dans la réduction du NAD. Un sel de tétrazolium réagit alors avec le NADH produit, formant un composé coloré absorbant à 450 nm.

**Q25.** Nommer précisément le type de dosage réalisé.

**Q26.** Préciser l'ensemble des conditions expérimentales à respecter.

### **III.2. Mise en œuvre**

- Déterminer l'activité enzymatique des histone acétyltransférases à l'aide de **FICHE TECHNIQUE 7**, pour l'extrait nucléaire obtenu à partir des cellules cancéreuses HCT116 et pour celui préparé à partir de cellules épithéliales saines, déjà fourni.
- Une solution contrôle positive est fournie afin de valider le bon fonctionnement du kit, elle sera traitée comme un échantillon.

### **III.3. Compte rendu**

**Q27.** Préciser la préparation :

- du blanc réactif,
- des échantillons,
- du mix réactionnel.

**Q28.** Présenter sous une forme appropriée les résultats expérimentaux obtenus.

**Q29.** Valider le bon fonctionnement du kit à l'aide des valeurs mesurées pour le contrôle positif.

**Q30.** Déterminer l'activité spécifique de chaque échantillon.

**Q31.** Analyser les résultats et conclure.

## SYNTHÈSE FINALE

**Q32.** Présenter un bilan succinct de l'étude.

**Q33.** Pour chaque partie, indiquer les limites de l'étude proposée. Présenter des manipulations permettant de compléter les résultats obtenus.

Références :

**Hu S, Cao B, Zhang M, Linghu E, Zhan Q, Brock MV, Herman JG, Mao G, Guo M.**

*Epigenetic silencing BCL6B induced colorectal cancer proliferation and metastasis by inhibiting P53 signaling.*

Am J Cancer Res. 2015; 5:651-62.

**Ahmad A, Azim S, Zubair H, Khan MA, Singh S, Carter JE, Rocconi R, Singh AP.**

*Epigenetic Basis of Cancer Health disparities: looking beyond genetic differences.*

Biochim. Biophys. Acta 2017; 1868: 16-28.

**Mishra MK and Bishnupuri KS.**

*Epigenetic advancements in cancer.*

Springer International Publishing Switzerland. 2016; 1-246.

**Lim DHK, Maher ER.**

*DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression.*

The Obstetrician & Gynaecologist 2010 ;12 :37–42.

---

## DOSSIER TECHNIQUE

*Le dossier technique est distribué à côté du sujet.*

## RISQUES BIOLOGIQUES

Cellules HCT116	Cellules d'origine humaine, de classe 1.
-----------------	--

## RISQUES CHIMIQUES

<p><b>Bleu de Funk</b></p>  <p><b>Attention</b> Nocif en cas d'ingestion.</p>	<p><b>Réactif de Bradford (dosage des protéines)</b></p>  <p><b>Attention</b> Provoque une irritation cutanée. Provoque une irritation des yeux.</p>
<p><b>Triton X-100 pur</b></p>  <p><b>Danger</b> Nocif en cas d'ingestion. Provoque des lésions oculaires graves. Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.</p>	<p><b>Éthanol</b></p>  <p><b>Danger</b> Liquides et vapeurs très inflammables</p>
<p><b>Bisulfite solution</b></p>  <p><b>Attention</b> Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux.</p>	<p><b>Buffer BD</b></p>  <p><b>Danger</b> Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Peut être corrosif pour les métaux.</p>
<p><b>Buffer BL</b></p>  <p><b>Attention</b> Nocif en cas de contact cutané ou d'inhalation. Peut être nocif en cas d'ingestion.</p>	<p><b>Protéinase K</b></p>  <p><b>Danger</b> Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Légère irritation cutanée</p>

**RÉACTIFS ET MATÉRIEL SPÉCIFIQUE**

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
PBS	NaCl 137 mmol·L <sup>-1</sup> ; KCl 2,7 mmol·L <sup>-1</sup> ; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mmol·L <sup>-1</sup> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,8 mmol·L <sup>-1</sup> ; pH 7,4	Flacon 80 mL (glace)

- 1 grattoir « cell spatula »
- 1 tube conique à centrifuger Falcon® de 50 mL
- Centrifugeuse pour tubes coniques Falcon®

**MODE OPÉRATOIRE**

1. Observer les cellules au microscope inversé et évaluer leur état de confluence.
2. Éliminer le milieu de culture par renversement.
3. Rincer les cellules avec 10 mL de PBS froid dans le flacon T75. Éliminer le PBS.
4. Ajouter 5 mL de PBS froid.
5. Détacher les cellules à l'aide du grattoir « *cell spatula* » par des mouvements d'aller-retour sur toute la surface du fond du flacon T75 jusqu'à obtenir une suspension homogène.
6. Transférer la suspension dans un tube conique de 50 mL par renversement.
7. Rincer deux fois le flacon avec 10 mL de PBS ; transférer dans le tube de 50 mL.
8. Centrifuger à 3000 rpm pendant 5 minutes.
9. Éliminer soigneusement le surnageant par renversement, puis en retournant le tube sur du papier filtre.
10. Resuspendre le culot dans x mL de PBS froid, en se référant au tableau ci-dessous. Homogénéiser soigneusement.

Pourcentage de confluence dans le flacon	Volume de PBS à utiliser pour resuspendre les cellules à l'étape 10
100%	1mL
80%	600µL
70%	500 µL
60%	400 µL
Inférieur à 60%	350 µL

- Transférer 300 µL de la suspension dans un microtube de 2 mL. Cette suspension permettra de mesurer l'activité histone acétyltransférase ;
- Le reste de la suspension sera utilisé pour étudier la méthylation de l'ADN ou comme suspension de secours.

**RÉACTIFS ET MATÉRIELS**

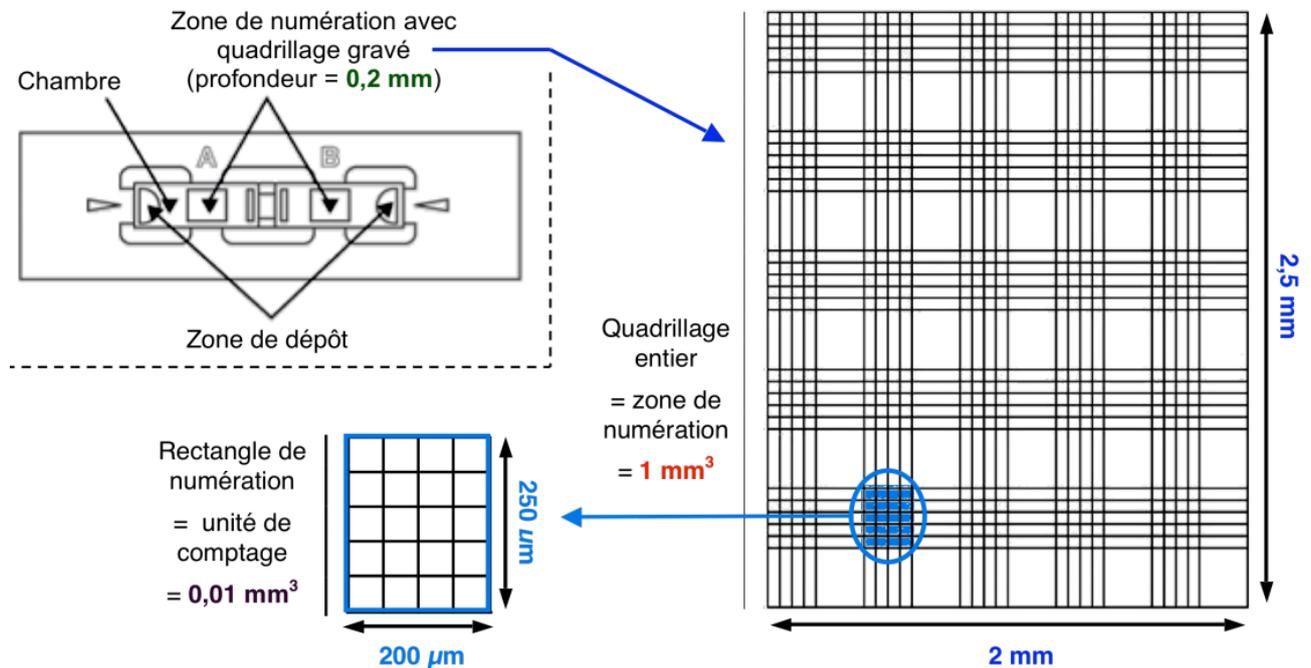
NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Bleu de Funk	Bleu de méthylène tamponné à pH 4	300 µL

- Hématimètre de Malassez ; compte-globules
- Microscope optique

**MODE OPÉRATOIRE**

1. Homogénéiser soigneusement la suspension cellulaire à dénombrer.
2. Préparer 50 à 100 µL d'une dilution au 1/20<sup>ème</sup> de la suspension cellulaire dans le bleu de Funk.
3. Bien homogénéiser et remplir une chambre de l'hématimètre de Malassez en une seule fois avec la suspension, sans déborder et sans faire de bulles.
4. Laisser sédimenter les cellules pendant 2 minutes, hématimètre à l'horizontale.
5. Compter au moins 200 cellules dans un nombre entier de rectangles de numération. Montrer un champ à l'examineur.
6. Renouveler le comptage dans la seconde chambre de l'hématimètre uniquement si l'aspect de la suspension n'est pas conforme (abondance d'amas cellulaires par exemple).

**DONNÉES**



- Constitué de deux chambres de numération, avec une profondeur de **0,2 mm = 200 µm**.
- Le quadrillage représente un grand rectangle de **2,5 mm × 2 mm** (surface **5 mm²**), parcouru de lignes verticales et horizontales, délimitant **100 rectangles de numération** (1 rectangle par champ à l'objectif ×40) : 25 rectangles vides, 25 rectangles avec lignes horizontales, 25 rectangles avec lignes verticales, et 25 quadrillés en 20 petits carrés.
- Volume total du quadrillage (zone de numération) :  $V_T = 5 \text{ mm}^2 \times 0,2 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ µL}$
- Volume correspondant à un rectangle de numération :  $V = 0,01 \text{ mm}^3 = 0,01 \text{ µL}$

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Lysis Buffer FTB	Coffret commercial QIAGEN (EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit Ref: 59824, Qiagen, Germany)	Microtube 40 µL
Proteinase K		Microtube 15 µL
Bisulfite solution		Microtube 200 µL
DNA Protect Buffer		Microtube 40 µL
Buffer BL		Microtube 700 µL
Éthanol		Tube 1,2 mL
Buffer BW		Tube à hémolyse 3,5 mL
Buffer BD		Tube 1,2 mL
Buffer EB		Microtube 40 µL
ADN sain		2 µg d'une préparation d'ADN humain issu d'un épithélium intestinal sain
PBS	NaCl 137 mmol·L <sup>-1</sup> ; KCl 2,7 mmol·L <sup>-1</sup> ; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mmol·L <sup>-1</sup> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,8 mmol·L <sup>-1</sup> ; pH 7,4	Flacon 80 mL (glace)

**RÉACTIFS ET MATÉRIELS**

- Bain thermostaté : 56°C
- Thermocycleur
- Microtubes PCR 200 µL transparents
- Centrifugeuses
- Spectrophotomètre NanoDrop®
- 2 Minicolonnes de centrifugation avec tubes collecteurs + 2 tubes collecteurs
- Vortex

**MODE OPÉRATOIRE** (extrait du kit Qiagen : "EpiTect® Fast Bisulfite Convesion Handbook")

1. In 1.5 microcentrifuge tubes, transfer **10<sup>5</sup> cells**. Use PBS to adjust the volume to 20 µL.
2. Add 15 µL Lysis Buffer FTB and 5 µL proteinase K.
3. Vortex and briefly centrifuge the samples.

Notes: **Samples should be kept at room temperature.** Samples could be viscous. Pipet carefully.

4. Incubate samples for 30 min at 56°C.
5. Prepare the bisulfite reactions in 200 µL PCR tubes according to the table below. Add each component **in the order listed**.

COMPONENT	VOLUME PER REACTION (µL)
Sample	40
Bisulfite solution	85
DNA Protect buffer	15
<b>Total volume</b>	<b>140</b>

6. Close the PCR tubes and mix thoroughly. Store the tubes at **room temperature**.
7. Perform the bisulfite DNA conversion using a thermal cycler:

STEP	TIME	TEMPERATURE
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	10 min	60°C
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	10 min	60°C
Hold	Indefinite	20°C

8. Once the bisulfite conversion is complete, briefly centrifuge the PCR tubes containing the bisulfite reactions and then transfer their mixture into clean 1.5 mL microcentrifuge tubes.
9. Add 310 µL Buffer BL to each sample. Mix the solutions by vortexing and then centrifuge briefly.
10. Add 250 µL ethanol (96-100%) to each sample. Mix the solutions by pulse vortexing for 15s, and centrifuge briefly to remove the drops from inside the lid.
11. Place the necessary number of MinElute DNA spin columns and collection tubes in a suitable rack. Transfer the entire mixture from each tube into the corresponding spin column.
12. Centrifuge the spin columns at maximum speed for 1 min. Discard the flow-through, and place the spin columns back into the collection tubes.
13. Add 500 µL Buffer BW (wash buffer) to each spin column, and centrifuge at maximum speed for 1 min. Discard the flow-through, and place the spin columns back into the collection tubes.
14. Add 500 µL Buffer BD (desulfonation buffer) to each spin column, and incubate for 15 min at room temperature.
15. Centrifuge at maximum speed for 1 min. Discard the flow-through, and place the spin columns back into the collection tubes.
16. Add 500 µL Buffer BW (wash buffer) to each spin column, and centrifuge at maximum speed for 1 min. Discard the flow-through, and place the spin columns back into the collection tubes.
17. Repeat step 16 once.
18. Add 250 µL ethanol (96-100%) to each spin column and centrifuge at maximum speed for 1 min.
19. Place the spin columns into new 2 mL collection tubes, and centrifuge them at maximum speed for 1 min to remove any residual liquid.
20. Place the spin columns into clean 1.5 mL microcentrifuge tubes. Add 15 µL Buffer EB (elution buffer) directly onto the center of each spin-column membrane and close the lids gently.
21. Incubate the spin columns at room temperature for 1 min.
22. Centrifuge for 1 min at 15,000 x g (12,000 rpm) to elute the DNA.
23. Measure DNA purity and concentration using a NanoDrop® spectrophotometer.

**RÉACTIFS ET MATÉRIELS**

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
iTaq™ SYBR® Green Supermix	Mélange 2X de PCR contenant notamment : Taq DNA polymérase, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> et Sybr Green	Microtube 50 µL
Amorce UF à 5 µM	Amorce à 5 µmol·L <sup>-1</sup> en eau déminéralisée	Microtube 10 µL
Amorce UR à 5 µM	Amorce à 5 µmol·L <sup>-1</sup> en eau déminéralisée	Microtube 10 µL
Amorce MF à 5 µM	5' CGTTTTGGATTCGTTATTTGGAGAGC 3' à 5 µmol·L <sup>-1</sup> en eau déminéralisée	Microtube 10 µL
Amorce MR à 5 µM	5' TAACCTCGACTCCTTTATCTAACCG 3' à 5 µmol·L <sup>-1</sup> en eau déminéralisée	Microtube 10 µL
Eau déminéralisée qualité BM	H <sub>2</sub> O	2 Microtubes de 1 mL

- Thermocycleur MiniOpticon Bio-Rad
- Barrette de 4 microtubes blancs de 200 µL
- Barrette de 4 couvercles transparents
- Portoir pour microtubes 200 µL
- Flacon d'huile minérale

**MODE OPÉRATOIRE**

1. Préparer les mélanges pour réaliser les amplifications suivantes :

- ADN humain tissu sain après transformation au bisulfite + amorces UF/UR,
- ADN humain tissu sain après transformation au bisulfite + amorces MF/MR,
- ADN HCT116 après transformation au bisulfite + amorces UF/UR,
- ADN HCT116 après transformation au bisulfite + amorces MF/MR.

**Tableau de composition du mélange de PCR temps réel :**

iTaq™ SYBR® Green Supermix	10 µL
Amorce sens (F)	10 pmol
Amorce antisens (R)	10 pmol
ADN matrice	50 ng*
Eau déminéralisée qualité BM	qsp 20 µL

- (\*) ou quantité inférieure qui sera alors précisée dans le compte-rendu si les échantillons préparés ont une concentration trop faible
2. Recouvrir les mélanges PCR d'une goutte d'huile minérale et fermer les tubes avec les couvercles transparents.
3. Déposer la barrette sur le portoir commun et remplir la fiche de traçabilité des échantillons.

**Le programme PCR sera le suivant :**

- 5 min à 95°C
- 40 cycles :
 

{	- étape 1 : 10 s à 95 °C
	- étape 2 : 10 s à 56 °C
	- étape 3 : 15 s à 60°C
	- lecture de la fluorescence

**RÉACTIFS ET MATÉRIEL**

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Milieu hypotonique	HEPES 10 mmol·L <sup>-1</sup> , pH 7,9 ; MgCl <sub>2</sub> 1,5 mmol·L <sup>-1</sup> ; KCl 10 mmol·L <sup>-1</sup>	Microtube 1,2 mL (glace)
PMSF	PMSF 0,2 mol·L <sup>-1</sup> (fluorure de phénylméthylsulfonyle)	Microtube 10 µL (glace)
Tampon de lyse	Tris 50 mmol·L <sup>-1</sup> ; NaCl 150 mmol·L <sup>-1</sup> ; Triton X-100 0,5 % (V/V) ; pH 7,5	Microtube 2 mL (glace)
Bleu de Funk	Bleu de méthylène tamponné à pH 4	300 µL

- Centrifugeuses
- Seringues et aiguilles
- Lame, lamelles
- Microscope optique

**MODE OPÉRATOIRE**

La manipulation s'effectuera sur la suspension cellulaire obtenue à l'issue des étapes de récupération des cellules (**FICHE TECHNIQUE 1**).

1. Centrifuger le microtube contenant 300 µL de suspension cellulaire à 3000 rpm pendant 5 minutes.
2. Eliminer le surnageant, bien sécher par retournement sur papier filtre.
3. Compléter extemporanément le milieu hypotonique avec du PMSF afin d'obtenir une concentration finale égale à 0,2 mmol·L<sup>-1</sup>.
4. Resuspendre précautionneusement les cellules dans 500 µL de milieu hypotonique complet froid.
5. Incuber les cellules pendant 15 minutes dans la glace en homogénéisant régulièrement.
6. Observer l'aspect des cellules en les diluant au 1/10<sup>ème</sup> dans du bleu de Funk. Montrer à un examinateur.
7. Lyser les cellules par aspiration refoulement avec une aiguille pendant 1 minute,
8. Vortexer 10s.
9. Observer l'aspect des cellules en les diluants au 1/10<sup>ème</sup> dans du bleu de Funk.
10. Renouveler, si nécessaire, les opérations 8 et/ou 9 jusqu'à obtenir une lyse cellulaire importante tout en conservant intacts les noyaux. Montrer à un examinateur l'observation finale.
11. Centrifuger pendant 30 secondes à 13000 rpm.
12. Éliminer soigneusement le surnageant, puis sécher en retournant les tubes sur du papier filtre.
13. Resuspendre le culot cellulaire dans 60 µL de tampon de lyse. Homogénéiser par aspirations-refoulements.
14. Laisser dans la glace pendant 15 minutes.
15. Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm.
16. Transférer le surnageant dans un microtube et le stocker dans la glace.

**RÉACTIFS ET MATÉRIEL**

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
SAB	Solution étalon de sérumalbumine à $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS	Flacon 1 mL (glace)
Réactif de Bradford	Bleu de Coomassie G250 à $0,08 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , acide phosphorique 8,4 %, éthanol 5 %.	Flacon 15 mL
PBS	$\text{NaCl } 137 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; $\text{KCl } 2,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; $\text{KH}_2\text{PO}_4 1,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH 7,4	Flacon 80 mL (glace)
Extrait nucléaire	Extrait nucléaire issu de tissu épithélial sain	Microtube 200 $\mu\text{L}$

- Semi-microcuvettes
- Spectrophotomètre

**MODE OPÉRATOIRE****Étalonnage :**

1. Introduire entre 0 et 10  $\mu\text{g}$  de sérum albumine pour un volume final de 50  $\mu\text{L}$  dans des cuvettes spectrophotométriques.
2. Ajouter 1 mL de réactif de Bradford.
3. Bien homogénéiser.
4. Laisser la réaction se développer entre 5 et 30 minutes.
5. Lire les absorbances à 595 nm.

**Dosage des protéines dans les extraits nucléaires :**

- La concentration en protéines des extraits nucléaires est en général comprise entre 1 et  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- Les dilutions éventuelles de la SAB et des échantillons à doser s'effectueront dans du PBS.

## RÉACTIFS ET MATÉRIELS

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
HAT Assay buffer	Coffret commercial Sigma (HAT Activity Colorimetric Assay Kit, Sigma Aldrich Ref. EPI001, USA)	Microtube 220 $\mu\text{L}$ (glace)
HAT Substrate I		Microtube 20 $\mu\text{L}$ (glace)
HAT substrate II		Microtube 20 $\mu\text{L}$ (glace)
NADH Generating Enzyme		Microtube 10 $\mu\text{L}$ (glace)
Solution contrôle positif		Microtube 200 $\mu\text{L}$ (glace)
Extrait nucléaire	Extrait nucléaire issu de tissu épithélial sain	Microtube 200 $\mu\text{L}$ (glace)

- Microplaque, lecteur de microplaques

## MODE OPÉRATOIRE

1. Diluer dans la plaque les extraits nucléaires afin d'obtenir entre 50 et 100  $\mu\text{g}$  de protéines dans un volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Laisser vide le puits H12 pour faire le zéro du lecteur de microplaques.
2. Introduire 50  $\mu\text{L}$  de témoin positif.
3. Prévoir un blanc réactif.
4. Prévoir le nombre d'essais et préparer un mix réactionnel **extemporanément** contenant pour chaque essai :

Réactifs	Volume
HAT Assay buffer	50 $\mu\text{L}$
HAT Substrate I	4 $\mu\text{L}$
HAT substrate II	4 $\mu\text{L}$
NADH Generating Enzyme	2 $\mu\text{L}$
Total volume	60 $\mu\text{L}$

5. Ajouter 50  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel à chaque puits. Homogénéiser quelques secondes à l'aide d'un agitateur de microplaques. Couvrir et incubé à 37°C.
6. Mesurer l'absorbance à 450 nm contre le puits H12 toutes les 5 à 10 minutes environ (remettre à l'étuve entre chaque mesure). Effectuer au moins 5 mesures.

## DONNÉES

- $b_{\text{contrôle positif}} > 0,2 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$
- $\epsilon_{450\text{nm}} = 37000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Trajet optique pour cette manipulation :  $l = 2,8 \text{ mm}$
- U : quantité d'enzyme qui permet la transformation d'une micromole de substrat par minute dans les conditions de l'expérience.

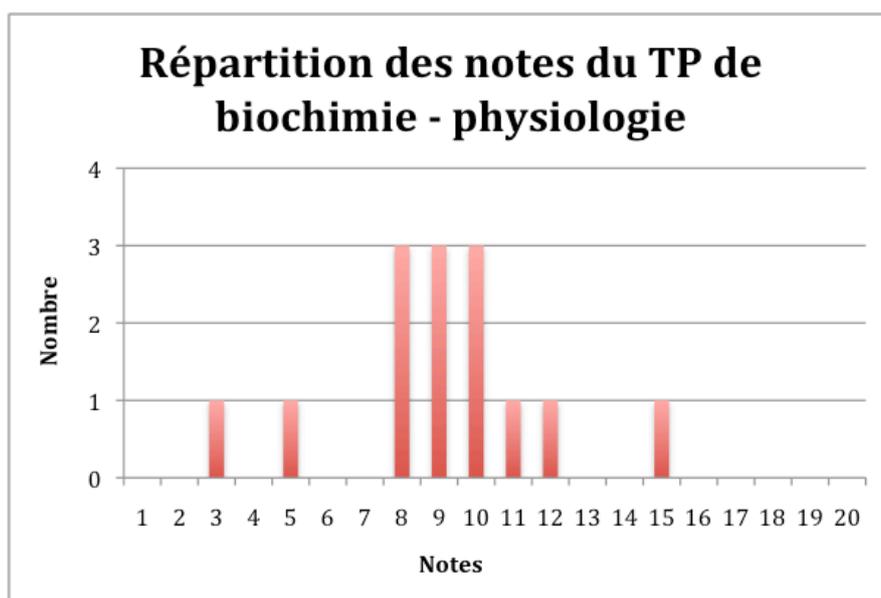
## RAPPORT DU JURY DE TP DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

### Épigénétique et cancer

#### Résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **09,6 / 20**
- Meilleure note : **15,4 / 20**
- Note la plus basse : **03,8 / 20**
- 6 notes sur 14 (**43 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20

#### Histogramme de répartition



#### COMMENTAIRES GÉNÉRAUX SUR L'ÉPREUVE

Le sujet visait l'exploration de 2 mécanismes impliqués dans les modifications épigénétiques :

- la détection de méthylation de l'ADN par une technique de PCR spécifique de la méthylation mise en œuvre après une extraction et traitement de l'ADN au bisulfite ;
- la mesure de l'activité histone acétyltransférase dans des extraits nucléaires.

Les candidats devaient comparer les résultats obtenus pour une lignée de cellules coliques cancéreuses (HCT116) et un tissu épithélial intestinal sain. Les cellules HCT116 étaient fournies en flacon T75 cm<sup>2</sup> et le tissu sain sous forme d'extraits. Pour chacune des parties, les candidats devaient traiter en parallèle les échantillons. De ce fait, les manipulations demandaient une bonne organisation et une optimisation des temps d'incubations spécifiques aux techniques employées. Par ailleurs les candidats étaient informés dès le début des heures de démarrage des PCR : seuls 2 horaires étaient proposés. Le jury félicite les candidats bien organisés qui ont rapidement pris en compte ces aspects et pu ainsi réaliser l'ensemble des manipulations proposées dans le temps imparti. D'autres candidats ont fait le choix de se concentrer sur la première partie jusqu'au

lancement de la PCR en temps réel, au détriment de la seconde partie, pourtant tout aussi importante.

Les protocoles fournis étaient très détaillés et positionnés dans un ordre logique. Les candidats n'avaient que peu d'initiatives à prendre. Le jury a été surpris de voir certains, mal interpréter certaines questions.

### **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. Les gants et lunettes de sécurité doivent donc être portés avec discernement. Il n'y avait nécessité d'en porter que pour manipuler le réactif de Bradford. Or les candidats ont porté des gants pour toutes les étapes de manipulation, y compris pour certains lors de la rédaction de leur compte-rendu. En aucun cas, porter des gants pendant l'étape de "bisulfitation" ou pendant la PCRq ne permettait de limiter les contaminations inter-échantillons.

## **PARTIE 1 : ÉTUDE DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN**

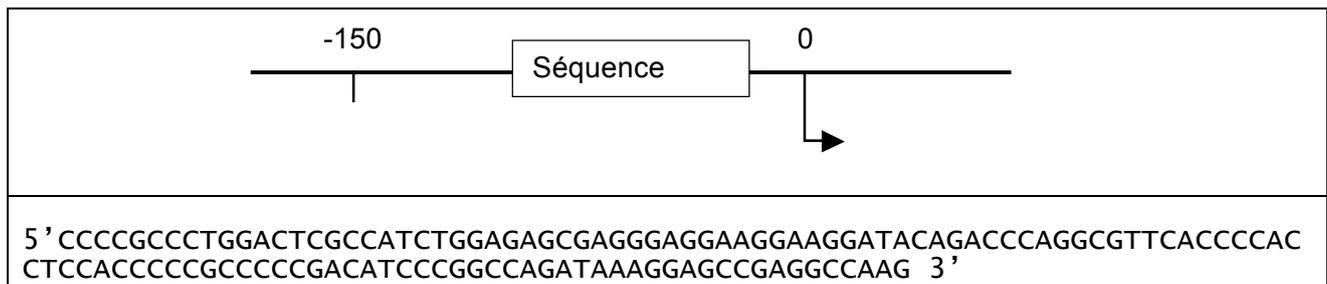
### Traitement au bisulfite de l'ADN

La première étape de récupération des cellules HCT116 par grattage permettait d'obtenir les cellules nécessaires aux deux études du sujet. Très classique, la numération de l'échantillon obtenu était nécessaire pour réaliser par la suite, la bisulfitation de l'ADN sur une quantité donnée de cellules. L'étape clef consistait à bien homogénéiser les suspensions cellulaires pour obtenir des résultats de numération significatifs. Notons qu'en ce qui concerne le calcul, certains candidats ont oublié de prendre en compte le facteur de dilution. D'autres ont perdu du temps sur cette question en détaillant le nombre de cellules mortes et vivantes, voire en calculant un pourcentage de viabilité, ce qui n'était pas utile au vu du sujet.

Le protocole de bisulfitation, rédigé en anglais et issu de la fiche technique du coffret commercial ne présentait pas de difficulté particulière. Notons cependant que le NanoDrop®, utilisé en dernière étape pour analyser l'ADN purifié, était un appareil inconnu de la plupart des candidats. Rappelons que dans ce cas, il est important de respecter la procédure d'utilisation de l'appareil, qui est fournie. De trop nombreux candidats n'ont pas lavé correctement l'appareil ou n'ont pas vérifié ce lavage. Les résultats permettaient de conclure à la fois sur la qualité et sur la quantité d'ADN obtenu.

### Quantification des méthylation par PCR en temps réel (qPCR)

Le sujet demandait de réaliser un schéma des deux premiers cycles de PCR lors de l'utilisation des amorces (M). Pour construire ce schéma, il était judicieux d'utiliser le fichier fourni aux candidats et contenant la séquence cible ainsi que les séquences des amorces M, utilisées pour détecter la séquence méthylée.



Les amorces utilisées pour détecter la séquence méthylée sont les suivantes :

	Sens	antisens
Site méthylé (M)	5' CGTTTTGGATTCGTTATTTGGAGAGC 3'	5' TAACCTCGACTCCTTTATCTAACCG 3'

• Modifications de la séquence d'ADN lors de l'étape de bisulfitation :

Les cytosines suivies de guanine ne sont pas modifiées lors de la bisulfitation (en gras et souligné dans la séquence ci-dessous), alors que les autres cytosines sont remplacées par des uraciles.

5' UUUCCGUUUTGGAUTCGUUATUTGGAGAGCG . .AUATUUCGGUUAGATAAAGGAGUCCGAGGUUAAG 3'  
 3' GGGGCGGGAUUTGAGCGGTAGAUUTUTGC . .TGTAGGGCUGGTUTATTTUUTUGGCTUUGGTTU 5'

• Première dénaturation, hybridation de l'amorce antisens puis élongation :

5' UUUCCGUUUTGGAUTCGUUATUTGGAGAGCG . .AUATUUCGGUUAGATAAAGGAGUCCGAGGUUAAG 3'  
 ← 3' GCCAATCTATTTCTCAGCTCCAAT 5'

(pas d'hybridation)

3' GGGGCGGGAUUTGAGCGGTAGAUUTUTGC . .TGTAGGGCUGGTUTATTTUUTUGGCTUUGGTTU 5'

• Dénaturation et hybridation des 2 amorces lors du second cycle de PCR puis élongation :

5' UUUCCGUUUTGGAUTCGUUATUTGGAGAGCG . .AUATUUCGGUUAGATAAAGGAGUCCGAGGUUAAG 3'  
 ← 3' GCCAATCTATTTCTCAGCTCCAAT 5'

5' CGTTTTGGATTCGTTATTTGGAGAGC 3' →  
 3' AAAGCAAACCTAAGCAATAAACCTCTCGC . .TATAAAGCCAATCTATTTCTCAGCTCCAAT 5'

Pour trouver la séquence des amorces (U), utilisées pour amplifier l'ADN non méthylé, le même raisonnement est réalisé, en remplaçant toutes le cytosines par des uraciles lors de la bisulfitation.

Les données d'essais préliminaires fournies permettaient de réfléchir à la qualité des amplicons obtenus selon la température d'hybridation. Il est surprenant que quelques candidats ne sachent pas proposer une température d'hybridation théorique de première intention. L'augmentation de cette température d'hybridation augmentera la spécificité de la PCR mais une température trop élevée diminuera l'efficacité de celle-ci.

La température de fusion des amplicons dépend de leur séquence (taille et pourcentage en GC). L'analyse des courbes de fusion des amplicons permet de vérifier la spécificité de la PCR. En effet si lors de l'analyse il n'y a qu'une seule température de fusion cela signifie qu'il n'y a qu'un seul type d'amplicon produit lors de la PCR.

Les résultats d'une gamme d'étalonnage obtenue avec des quantités d'ADN connues et réalisée sur une lignée dont la séquence est méthylée, permettaient de tracer la courbe  $Cq = f(\text{Log}(m_{ADN \text{ initial}}))$  et d'extrapoler les quantités d'ADN méthylé à partir des valeurs de Cq déterminées expérimentalement pour le tissu sain et pour la lignée HCT116.

Par exemple pour les résultats expérimentaux suivants :

ADN matrice	Amorces	Cq
ADN sain	UF/UR	28,64
	MF/MR	31,79
ADN obtenu à partir des cellules HCT 116	UF/UR	-
	MF/MR	23,73

En s'attachant à travailler sur les amorces (M), il était possible d'extrapoler les quantités d'ADN méthylé initiales (respectivement 0,24 ng pour le tissu sain et 66 ng pour la lignée HCT116). En rapportant ces quantités à la masse d'ADN initial (normalement 50 ng), on pouvait estimer le taux de méthylation à 0,5% dans le tissu sain et 132% dans la lignée HCT116. Devant un tel résultat, il était indispensable que les candidats fournissent des pistes de réflexion permettant d'expliquer un pourcentage supérieur à 100 %. Des erreurs à l'étape de quantification de l'ADN, un mauvais pipetage des volumes d'ADN pouvaient expliquer ces résultats. Un pourcentage élevé de méthylation de l'ADN des cellules HCT116 était cohérent avec les résultats obtenus pour les amorces U où l'on n'obtenait aucune amplification.

L'ADN est donc méthylé au niveau du promoteur du gène BCL6B dans les cellules HCT116, le gène BCL6B est donc réprimé. Le gène BCL6B étant un gène suppresseur de tumeur, sa répression favorisera l'apparition de cancer.

Dans l'ensemble, alors que presque tous les candidats avaient mené les manipulations jusqu'à la PCR quantitative, les résultats n'ont été exploités que par un nombre restreint d'entre eux, souvent ceux qui avaient anticipé la réflexion lors des temps d'attente et qui ont ainsi pu rapidement tirer parti des résultats obtenus.

## **PARTIE 2 : MESURE DE L'ACTIVITÉ DES HISTONE ACÉTYLTRANSFERASES**

### Préparation d'extraits nucléaires

La préparation des extraits nucléaires avait pour but d'enrichir l'extrait en histone acétyltransférases (HAT), en éliminant les protéines cytoplasmiques. La première incubation en milieu hypotonique permettait d'obtenir des cellules gonflées, bien observables à l'objectif x40, dont les membranes sont fragilisées. Les passages répétés dans une aiguille et au vortex permettaient de lyser les membranes cellulaires et d'observer les noyaux entourés de reliquats de cytoplasme. Il ne fallait donc pas hésiter à faire passer la suspension vigoureusement dans l'aiguille.

L'utilisation du microscope n'est pas maîtrisée par tous : certains ont fait la mise au point sur la lame. De plus, il était peu judicieux de montrer un champ microscopique aux examinateurs à l'objectif x10.

## Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

Alors que tous les autres protocoles étaient très détaillés, cette partie du sujet était la seule qui demandait aux candidats de concevoir la gamme et les essais.

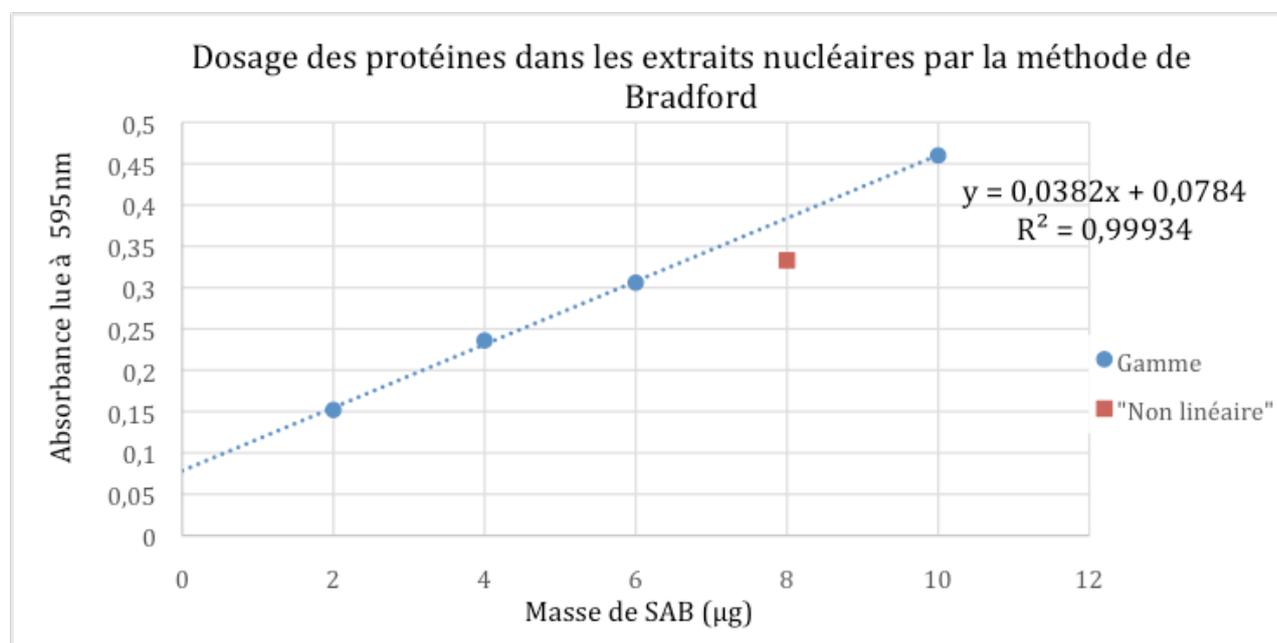
La conception de la gamme a été correctement réalisée d'un point de vue calculatoire, mais manquait parfois de sens pratique. En effet, si quelques candidats ont judicieusement réalisé une dilution intermédiaire de la solution étalon afin de prélever, de manière plus précise et reproductible des volumes plus importants, la plupart ont cependant fait une gamme en prélevant de 1 à 5  $\mu\text{L}$  de solution étalon. Il ne faut alors pas s'étonner d'obtenir un alignement peu satisfaisant.

Les concentrations protéiques des extraits nucléaires pouvant varier de 1 à 8  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , il aurait été judicieux de prévoir 2 dilutions différentes de chaque échantillon (extrait nucléaire sain fourni et extrait nucléaire HCT116 préparé par le candidat), afin d'obtenir des valeurs d'absorbance exploitables. Du fait d'un manque d'anticipation, certains candidats ont obtenu des résultats hors gamme.

Rappelons qu'il convient de traiter la gamme et les essais en même temps.

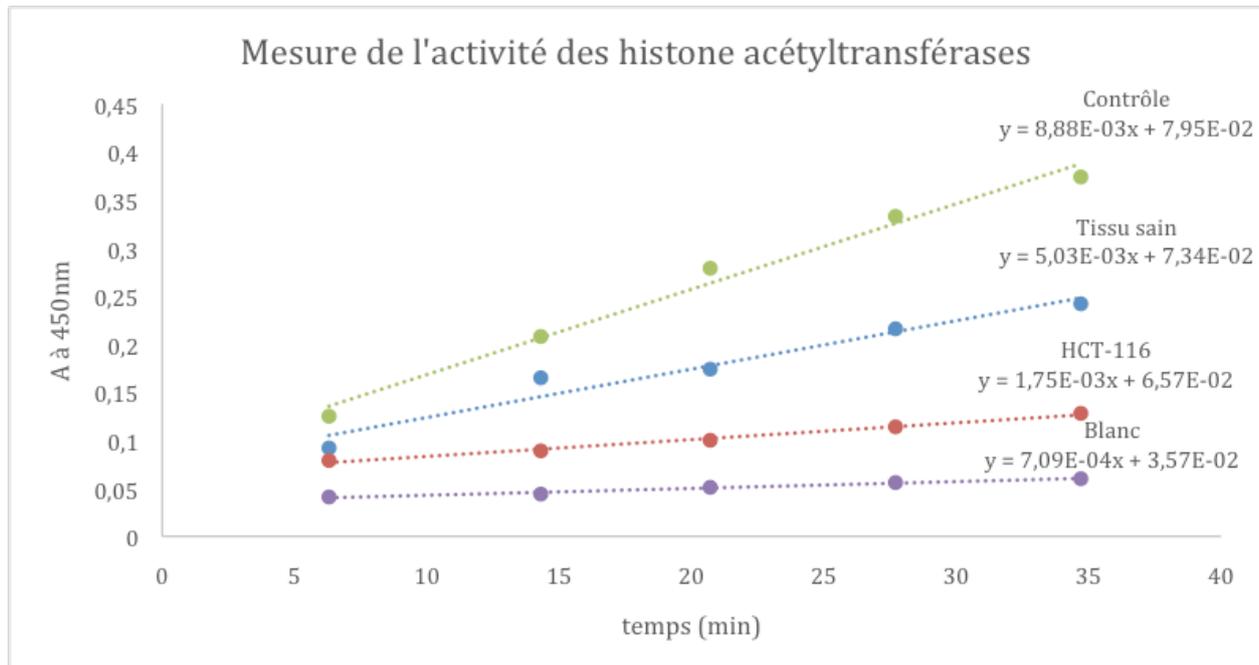
En ce qui concerne l'exploitation des résultats, le jury a été surpris de constater que la méthodologie appropriée fait défaut à de nombreux candidats. Il est recommandé de :

- ne jamais relier les points par une courbe, lorsque le phénomène est modélisable (ici, pour le dosage des protéines, il convenait de tracer une droite de régression linéaire) ;
- penser à ôter les points visiblement aberrants ;
- pour tracer la droite de régression ne jamais forcer le passage par zéro, ce qui parfois modifie grossièrement le coefficient directeur de la droite ;
- ne pas faire d'extrapolation pour calculer la masse de protéines lorsqu'un essai est hors gamme. On peut comprendre que les candidats n'ont parfois pas le temps ou la quantité nécessaire de réactifs pour refaire un dosage mais il est alors indispensable de faire remarquer que la loi de Beer-Lambert n'est valable que pour des concentrations faibles de chromophore et que l'extrapolation n'est pas juste.



## Mesure de l'activité HAT

La mesure de l'activité HAT doit être effectuée à température et pH constants, seule l'activité enzymatique HAT doit être limitante, les substrats et les autres activités enzymatiques doivent être en quantité suffisante. Les résultats attendus étaient du type :



Les coefficients directeurs de chacune des droites correspondent à la vitesse initiale de chaque condition. Il était inutile et erroné de recalculer des vitesses en utilisant uniquement deux points de la courbe.

En cas de manque de temps, il était toujours possible de réduire le nombre de mesures ou le temps d'incubation.

Le jury a regretté de ne voir quasiment aucun calcul d'activité spécifique, peut-être par manque de temps, ou de les trouver erronés. Ces notions d'enzymologie figurent au programme des classes de terminale STL et de BTS de biologie appliquée et leur maîtrise est donc évidemment un attendu pour de futurs enseignants dans ces classes.

Pour le calcul de la concentration d'activité catalytique de l'extrait, il ne fallait pas oublier d'ôter le coefficient directeur du blanc à celui de l'extrait étudié. Un soin particulier devait être apporté à l'équation aux unités correspondante.

$$b_{(HAT,extrait)} = \left[ \left( \frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{extrait} - \left( \frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{blanc} \right] \times \frac{1}{\epsilon \times \ell} \times \frac{V_{milieu\ lecture}}{V_{extrait}}$$

Les calculs d'activités spécifiques permettaient de conclure que l'activité HAT des cellules saines est plus importante que celle mesurée pour les cellules cancéreuses.  $Z_{sp}(HAT; extrait) = \frac{b_{(HAT,extrait)}}{\rho_{(protéines;extrait)}}$

Remarquons qu'en cas de manque de temps ces calculs n'étaient pas absolument nécessaires pour conclure, la comparaison des coefficients directeurs nets aurait pu être utilisée.

## SYNTHÈSE FINALE

Par manque de temps, la plupart des candidats n'ont pas rédigé de synthèse finale reprenant l'ensemble des concepts étudiés dans ce sujet qui portait sur l'étude de certaines modifications épigénétiques impliquées dans le développement de cancers.

- La quantification de la méthylation de l'ADN du promoteur du gène BCL6B, par réaction de « bisulfitation » suivie d'une PCRq, a montré que pour les cellules coliques cancéreuses HCT116, ce promoteur est particulièrement méthylé, alors qu'il ne l'est pas pour le tissu épithélial sain étudié. L'expression de ce gène suppresseur de tumeur est donc réprimée dans ces cellules cancéreuses.
- L'activité enzymatique histone acétyltransférase est plus importante dans les extraits nucléaires de cellules intestinales saines que dans ceux des cellules HCT116, la modification de l'activité HAT provoquerait une modification de l'acétylation des histones ce qui modifierait l'accessibilité de certains gènes.

Il était important repérer les limites de certaines manipulations. Pour la première partie, les manipulations pourraient être complétées par un séquençage afin de connaître plus précisément quelles cytosines ont été méthylées. Les manipulations proposées en seconde partie n'étaient que très partielles, il serait important de doser l'activité histone désacétylase. De plus, il serait également nécessaire de répéter la manipulation pour confirmer les résultats. Enfin, l'étude étant globale, il serait nécessaire de vérifier l'augmentation des interactions ADN-histones au niveau de gènes précis.

# TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

## SUJET

### La phagothérapie : une alternative à l'antibiothérapie ?

#### INTRODUCTION

La multirésistance des bactéries aux antibiotiques est, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, un véritable problème de santé publique. C'est au cours d'infections acquises à l'hôpital, dites « infections nosocomiales », que les risques d'émergence de bactéries multirésistantes sont les plus élevés. Dans les unités de soins et de réanimation, ce type d'infections est associé à une morbidité et mortalité élevées en raison d'échecs thérapeutiques. Parmi les alternatives aux antibiotiques, l'utilisation thérapeutique des bactériophages, appelée phagothérapie, est actuellement en pleine réévaluation dans les pays occidentaux.

*Escherichia coli*, de par sa prévalence élevée en pathologie humaine et ses capacités adaptatives, est une des bactéries qui soulèvent le plus d'inquiétude quant à la problématique de l'antibiorésistance.

Une souche d'*Escherichia coli*, **E coli BE**, a été isolée dans un service de soins intensifs suite à une PAVM, Pneumonie Acquise sous Ventilation Mécanique, chez un patient sous assistance respiratoire avec sonde d'intubation. L'antibiothérapie de première intention s'est soldée par un échec thérapeutique.

Le sujet présente différents aspects de l'étude *in vitro* de la phagothérapie et de l'antibiothérapie qui pourraient être envisagées pour lutter contre cette souche :

- La **partie A** concerne l'étude du spectre de sensibilité de l'agent pathogène (**E coli BE**) vis-à-vis de bactériophages généralement actifs contre les bactéries à Gram négatif et d'antibiotiques couramment utilisés en médecine,
- La **partie B** permet d'évaluer le mode et la cinétique d'action d'agents antibactériens (bactériophages et antibiotiques) potentiellement efficaces sur l'agent pathogène,
- La **partie C** permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice de deux antibiotiques vis-à-vis de l'isolat clinique.

#### AVERTISSEMENT

Pour des raisons de sécurité, la souche d'*Escherichia coli* **E coli BE** a été génétiquement modifiée pour la rendre avirulente et sensible aux aminosides.

## TRAVAIL DU PREMIER JOUR

### DONNÉES

- La linéarité du spectrophotomètre à 600 nm est vérifiée pour une suspension bactérienne dans l'intervalle  $DO_{600} = 0,020 - 0,600$ .
- $DO_{600} = 1 \Leftrightarrow 5,0 \cdot 10^8 E. coli \cdot mL^{-1}$ .

### MATÉRIEL UTILISABLE POUR TOUTES LES MANIPULATIONS

#### Matériel

Tubes à hémolyse stériles de 10 mL à bouchon cellulose  
Tubes à essai stériles de 20 mL à bouchon cellulose  
Microtubes de 2 mL stériles  
Pipettes graduées stériles de 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL  
Pipettes automatiques P1000, P200, P20, P10 + cônes adaptés  
Systèmes d'aspiration à roulette et propipette  
Fond noir  
Vortex  
Chronomètre  
Bac à glace

### PARTIE A

#### Étude de la sensibilité de la souche E coli BE vis-à-vis d'agents thérapeutiques potentiels

L'échec de l'antibiothérapie de première intention est corrélé à une multirésistance de la souche responsable de l'infection (isolat clinique).

Afin de proposer un traitement mieux adapté, deux pistes seront explorées : une phagothérapie (alternative en cas de multi-résistance) et une nouvelle antibiothérapie.

#### A1- Étude de la sensibilité de la souche E coli BE vis-à-vis de bactériophages

Préalablement à toute phagothérapie, une étude de la sensibilité de la souche pathogène vis-à-vis des phages envisagés est nécessaire.

Les bactériophages ont intrinsèquement des spectres étroits : un bactériophage donné ne pourra en général pas infecter deux bactéries d'un genre différent, il sera quasi-systématiquement spécifique d'une espèce, et le plus souvent d'un nombre restreint de souches au sein de cette espèce. L'environnement constitue une source inépuisable de bactériophages.

Parmi une collection de phages potentiellement lytiques pour *Escherichia coli*, six seront testés vis à vis de l'isolat clinique.

### **Culture et phages**

#### **E coli BE - LB**

culture en tube à vis de 18 heures à 37 °C en bouillon **LB** de la souche d'*Escherichia coli* **E coli BE**

Microtubes contenant 40 µL de suspension de phage en bouillon LB à tester : (utilisés en partie A et B)

**Φ1** microtube **vert** contenant le phage **Φ1**  
**Φ2** microtube **bleu** contenant le phage **Φ2**

Microtubes contenant 15 µL de suspension de phage en bouillon LB à tester :

**Φ3** microtube **jaune** contenant le phage **Φ3**  
**Φ4** microtube **rose** contenant le phage **Φ4**  
**Φ5** microtube **blanc** contenant le phage **Φ5**  
**Φ6** microtube **orange** contenant le phage **Φ6**

### **Milieux de culture**

Bouillon **LB 10**

1 flacon de 10 mL de bouillon LB stérile

Eau **Phy 10**

1 tube à vis de 10 mL d'eau physiologique

Gélose **LA**

1 gélose LA coulée en boîte de Pétri 90

### **Matériel spécifique individuel**

1 microplaque stérile à fonds ronds + couvercle

### **Matériel spécifique commun**

Lot d'étalons Mac Farland

## **MANIPULATIONS**

### **A11- Réalisation du tapis bactérien**

- À partir de la souche **E coli BE - LB** fournie, réaliser une suspension bactérienne en eau physiologique d'une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de Mac Farland.
- Réaliser par inondation un tapis bactérien en surface d'une gélose **LA**.

### **A12- Dilutions en série des phages**

- Réaliser en microplaque, en bouillon **LB**, des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-5}$  des différents phages à tester, sous un volume de 50 µL (avant redistribution).
- Sur la gélose **LA**ensemencée précédemment, déposer en pipetage inverse des spots de 2 µL de la suspension mère des phages et des différentes dilutions des phages à tester. Les différents phages seront disposés sur une même ligne et les dilutions d'un phage en colonne.

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

## **COMPTE-RENDU**

1. Expliquer la réalisation des dilutions des phages.
2. Présenter le plan des dépôts réalisés sur la gélose **LA**.

## **A2- Étude de la sensibilité de la souche E coli BE vis-à-vis d'antibiotiques**

Afin de déterminer la sensibilité aux antibiotiques de l'isolat clinique, un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé sera réalisé.

### **Culture**

**E coli BE** isolement sur milieu gélosé non sélectif de la souche **E coli BE**, culture de 18 h à 37 °C

### **Milieux de culture**

**Eau Phy 9** 1 tube de 9 mL d'eau physiologique stérile  
**Gélose MH** 1 gélose Mueller Hinton coulée en boîte de Pétri 90

### **Antibiotiques**

Disques antibiotiques (à demander à un examinateur) :

<b>Amikacine (AKN 30)</b>	1 disque chargé avec 30 µg d'amikacine
<b>Ampicilline (AMP10)</b>	1 disque chargé avec 10 µg d'ampicilline
<b>Gentamicine (GMN 10)</b>	1 disque chargé avec 10 µg de gentamicine
<b>Imipénème (IMP 10)</b>	1 disque chargé avec 10 µg d'imipénème
<b>Chloramphénicol (CML 30)</b>	1 disque chargé avec 30 µg de chloramphénicol
<b>Ceftriaxone (CRO 30)</b>	1 disque chargé avec 30 µg de ceftriaxone

### **Matériel spécifique individuel**

2 écouvillons stériles

### **Matériel spécifique commun**

Lot d'étalons Mac Farland

### **Document technique**

Recommandations 2017 pour la réalisation de l'étude de la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques par diffusion en gélose, éditées par l'EUCAST (European Committee of antimicrobial susceptibility testing) et le CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) – Document fourni en version numérique sur ordinateur

## **MANIPULATIONS**

- À partir du document technique fourni, réaliser l'étude de la sensibilité de la souche **E coli BE** vis-à-vis des antibiotiques fournis par diffusion en gélose.

***L'organigramme des manipulations sera présenté à un examinateur AVANT DE COMMENCER les manipulations.***

***L'ensemencement des géloses sera réalisé en présence d'un examinateur.***

***Appeler un examinateur pour incuber la boîte.***

## **COMPTE-RENDU**

3. Présenter l'organigramme complet des manipulations à réaliser pour déterminer la sensibilité de la souche **E coli BE** vis-à-vis des antibiotiques fournis en disques par diffusion en gélose, selon les recommandations 2017 de l'EUCAST et du CASFM.
4. Donner le principe de la technique de réalisation de l'antibiogramme.
5. Donner les conditions d'incubation de la gélose ensemencée. Justifier.
6. Donner l'aspect du tapis bactérien attendu pour valider la technique.
7. Préciser quel contrôle de qualité pourrait être réalisé en parallèle de cette manipulation.

## **PARTIE B**

### **Étude du mode et de la cinétique d'action d'agents thérapeutiques potentiellement efficaces sur la souche E coli BE**

Cette étude sera réalisée au cours de la croissance de la souche **E coli BE** en présence de deux antibiotiques et de deux phages potentiellement utilisables en thérapeutique.

Les deux antibiotiques retenus sont la ceftriaxone (céphalosporine) et l'imipénème (carbapénème). Ces deux molécules appartiennent à la famille des bêta-lactamines qui ciblent, chez les bactéries, les protéines liant la pénicilline, aussi appelées « Penicillin Binding Proteins » ou PBPs, impliquées dans la synthèse de la paroi. Chez *Escherichia coli*, jusqu'à 11 PBPs ont été caractérisées avec des modes d'action différents.

Les deux phages retenus sont des phages lytiques appartenant à la famille des *Myoviridae* ( $\Phi 1$ ) ou des *Podoviridae* ( $\Phi 2$ ).

#### **Culture et phages**

##### **E coli BE - LB**

culture en tube à vis de 18 heures à 37 °C en bouillon **LB** de la souche **E coli BE**

Microtubes contenant 40  $\mu\text{L}$  de suspension de phage en bouillon LB à tester : (utilisés en partie A et B)

$\Phi 1$

microtube **vert** contenant le phage  $\Phi 1$

$\Phi 2$

microtube **bleu** contenant le phage  $\Phi 2$

#### **Milieus de culture**

Bouillon **LB 60**

2 flacons de 60 mL de bouillon LB stérile

Bouillon **LB**

1 Erlenmeyer de 500 mL contenant 125 mL de LB stérile

Gélose **PCA**

30 géloses PCA coulées en boîte de Pétri 90

Géloses **LA 12**

13 géloses LA 12 mL coulées en boîte de Pétri 90

Géloses **LA 8**

13 tubes de 8 mL de gélose (LB + 0,7 % agar) en surfusion  
(à demander à un examinateur)

#### **Réactifs**

**Ceftriaxone** 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

1 microtube de 300  $\mu\text{L}$  de ceftriaxone à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

**Imipénème** 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

1 microtube de 300  $\mu\text{L}$  d'imipénème à 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

#### **Matériel spécifique individuel**

5 tubes coniques de 50 mL stériles + portoir pour tubes coniques

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

Semi-microcuves

Morceaux de parafilm

Lames + lamelles

2 seringues stériles + 2 filtres 0,22  $\mu\text{m}$

#### **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.**

**Toutes les observations microscopiques seront présentées à un examinateur accompagnées d'un compte-rendu.**

## **B1- Démarrage de la croissance**

- Introduire dans l'Erlenmeyer contenant les 125 mL de bouillon LB stérile, la souche **E coli BE – LB** de façon à obtenir une densité optique initiale à 600 nm aux alentours de 0,05.
- Incuber dans un bain thermostaté à 37 °C agité à 120 rpm jusqu'à atteindre une  $DO_{600}$  d'environ 0,1.

## **B2- Préparation des différentes conditions de culture**

- Transférer la culture dans cinq tubes coniques stériles ; chaque tube conique contiendra 20 mL de culture à  $DO_{600} = 0,1$ .
- Introduire dans les différents tubes les antibiotiques ou phages nécessaires, de manière à pouvoir suivre la croissance dans les cinq conditions suivantes :
  - **Tube T** : croissance témoin
  - **Tube C** : croissance en présence d'une concentration finale de **ceftriaxone** de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
  - **Tube I** : croissance en présence d'une concentration finale d'**imipénème** de  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
  - **Tube F1** : croissance en présence de **20  $\mu\text{L}$  du phage F1**
  - **Tube F2** : croissance en présence de **20  $\mu\text{L}$  du phage F2**.
- Incuber les cinq tubes dans un bain thermostaté à 37 °C agité à 120 rpm, en position inclinée. Cela correspondra au **temps t = 0** du suivi de croissance dans les différentes conditions.

## **B3- Suivi de la croissance dans les différentes conditions de culture**

- Suivre les croissances dans les cinq conditions en fonction du temps pendant 2 heures, par mesure de DO à 600 nm toutes les 30 minutes.
- À t = 30 minutes et t = 1 heure, réaliser des observations microscopiques à l'état frais des différentes cultures, afin de mettre en évidence le mode d'action des agents testés.
- Au-delà de t = 2 heures, poursuivre l'incubation des différents tubes en bain thermostaté à 37 °C agité à 120 rpm jusqu'au lendemain.

## **B4- Dénombrements au temps t = 2 heures**

### **B41- Dénombrement des bactéries survivantes**

- Réaliser un dénombrement des bactéries survivantes dans les cinq conditions par étalement à l'aide de billes de verre en surface sur géloses **PCA** précoulées en boîte. Les dilutions seront réalisées en bouillon **LB** stérile dans des microtubes.
  - **Tube T** : dénombrement en double essai sur trois dilutions judicieusement choisies,
  - **Tubes C, I,  $\Phi$ 1 et  $\Phi$ 2** : dénombrement en simple essai sur les dilutions  $10^0$  à  $10^{-5}$ .

***Un dénombrement de bactéries en surface sera réalisé en présence d'un examinateur.***

## **B42- Dénombrement des phages par la technique en double couche**

Pour chacune des deux cultures  $\Phi 1$  et  $\Phi 2$  réalisées en présence de phages :

- Centrifuger un aliquot de 1 mL en microtube pendant 5 min à 5000 rpm.
- Filtrer le surnageant à l'aide d'une seringue équipée d'un filtre 0,22  $\mu\text{m}$ , et récupérer le filtrat dans un microtube ou un tube à hémolyse stérile.
- Réaliser les dilutions décimales de chaque filtrat en bouillon **LB** stérile et en microtubes jusqu'à la dilution  $10^{-7}$ .
- Pour les dilutions  $10^{-2}$  à  $10^{-7}$  du filtrat, réaliser en simple essai les étapes suivantes en opérant rapidement :
  - Dans un tube contenant 8 mL de milieu **LA** en surfusion, ajouter :
    - ✓ 0,1 mL de culture de bactéries sensibles **E coli BE - LB**
    - ✓ 0,1 mL de la dilution phagique
    - ✓ Homogénéiser au vortex.
  - Verser la totalité du tube dans une boîte de Pétri contenant déjà 12 mL de **LA** solidifiée (**LA 12**), de manière à la répartir en une fine pellicule à la surface de la **LA** précoulée.
  - Réaliser dans les mêmes conditions un témoin.
  - Laisser solidifier les boîtes.

***Un dénombrement de phages sera réalisé en présence d'un examinateur.***

Les gélosesensemencées seront toutes incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

### **COMPTE-RENDU**

8. Présenter les calculs des volumes d'antibiotiques introduits dans les cultures **C et I**.
9. Donner le titre initial en phages dans les cultures  $\Phi 1$  et  $\Phi 2$ , sachant que les suspensions de phages sont fournies à  $1,0 \cdot 10^9$  UFP  $\text{mL}^{-1}$ . Calculer le facteur MOI « Multiplicity Of Infection » correspondant au nombre de phages introduits dans la culture rapporté au nombre de bactéries présentes, au temps  $t = 0$  de la culture.
10. Présenter les résultats des cinq croissances dans un tableau.
11. Présenter les résultats des observations microscopiques réalisées. Des dessins de vos observations sont possibles.
12. Justifier le choix des dilutions testées pour les dénombrements des bactéries survivantes à  $t = 2$  heures dans le tube **T**.
13. Discuter le choix des concentrations d'antibiotiques testées en culture liquide à l'aide du document technique fourni en **partie A2**.
14. Formuler des hypothèses explicatives reliant vos observations microscopiques aux modes d'action probables des agents testés.

## **PARTIE C**

### **Détermination de la concentration minimale inhibitrice de deux antibiotiques vis-à-vis de la souche E coli BE**

Une des limitations de l'utilisation des antibiotiques chez l'homme est la biodisponibilité de l'antibiotique dans les tissus et les fluides. Pour savoir si un antibiotique va être efficace lors d'un traitement il faut alors déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de cet antibiotique vis-à-vis de l'isolat clinique. La valeur de la CMI en antibiotique est confrontée aux données fournies par l'EUCAST afin de définir les modalités du traitement.

#### **Culture**

**E coli BE - MH**

culture en tube à vis de 18 heures à 37 °C en bouillon **MH** de la souche **E coli BE**

#### **Milieux de culture**

Bouillon **MH 30**

1 flacon de 30 mL de bouillon **MH** stérile

Bouillon **MH 9**

5 tubes à vis contenant de 9 mL de bouillon stérile

#### **Réactifs**

**Ceftriaxone 20 µg·mL<sup>-1</sup>**

1 microtube de 500 µL de ceftriaxone à 20 µg·mL<sup>-1</sup>

**Imipénème 20 µg·mL<sup>-1</sup>**

1 microtube de 500 µL d'imipénème à 20 µg·mL<sup>-1</sup>

#### **Matériel spécifique individuel**

1 microplaque stérile à fonds ronds + couvercle

## **MANIPULATIONS**

### **C1- Préparation de l'inoculum**

- Réaliser un inoculum calibré de la souche **E coli BE - MH** à 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> en bouillon **MH**.

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

*Les dilutions de la souche seront réalisées en présence d'un examinateur.*

### **C2- Préparation des gammes de dilutions des antibiotiques**

- À partir de la solution mère de ceftriaxone à 20 µg·mL<sup>-1</sup>, réaliser en microplaque les manipulations suivantes :
  - **Sur les lignes A, B et C** : réaliser, sur chacune des lignes, 12 dilutions successives de raison 1/2 en bouillon Mueller-Hinton stérile sous un volume final de 100 µL. Les dilutions initiales dans les cupules A1, B1 et C1 seront respectivement 1/2, 1/3 et 1/5.
  - **Sur la ligne D** : prévoir les témoins nécessaires.
- Procéder de même **sur les lignes E à H**, à partir de la solution mère d'imipénème à 20 µg·mL<sup>-1</sup>.

### **C3- Inoculation de la microplaque**

- Ensemencer les cupules appropriées avec 100 µL de l'inoculum calibré.
- Incuber 24 heures à 37°C.

## **COMPTE-RENDU**

- 15.** Présenter l'ensemble des résultats des mesures spectrophotométriques, les calculs, ainsi que le mode opératoire permettant la réalisation de l'inoculum calibré.
- 16.** Présenter les gammes de dilutions de l'antibiotique dans un tableau complet : faire apparaître pour chaque cupule les volumes introduits, les dilutions initiales et finales de l'antibiotique, ainsi que les concentrations initiales et finales en antibiotique. Le tableau pourra être réalisé à l'aide de l'outil informatique ; dans ce cas l'imprimer et le joindre au compte-rendu, puis enregistrer le fichier sur la clé USB fournie sous le nom « **n° candidat – Q16** ».
- 17.** Rappeler la définition de la CMI d'un antibiotique.
- 18.** Donner l'intérêt d'avoir plusieurs gammes de dilutions d'antibiotique.
- 19.** Préciser la composition et le rôle des témoins réalisés, ainsi que les résultats attendus.

## TRAVAIL DU SECOND JOUR

*Le sujet du premier jour est restitué au poste de travail.  
Le compte-rendu du premier jour peut être consulté.*

### INTRODUCTION

La multirésistance des bactéries aux antibiotiques est, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, un véritable problème de santé publique. C'est au cours d'infections acquises à l'hôpital, dites « infections nosocomiales », que les risques d'émergence de bactéries multirésistantes sont les plus élevés. Dans les unités de soins et de réanimation, ce type d'infections est associé à une morbidité et mortalité élevées en raison d'échecs thérapeutiques. Parmi les alternatives aux antibiotiques, l'utilisation thérapeutique des bactériophages, appelée phagothérapie, est actuellement en pleine réévaluation dans les pays occidentaux.

*Escherichia coli*, de par sa prévalence élevée en pathologie humaine et ses capacités adaptatives, est une des bactéries qui soulèvent le plus d'inquiétude quant à la problématique de l'antibiorésistance.

Une souche d'*Escherichia coli*, **E coli BE**, a été isolée dans un service de soins intensifs suite à une PAVM, Pneumonie Acquisée sous Ventilation Mécanique, chez un patient sous assistance respiratoire avec sonde d'intubation. L'antibiothérapie de première intention s'est soldée par un échec thérapeutique.

Le sujet présente différents aspects de l'étude *in vitro* de la phagothérapie et de l'antibiothérapie qui pourraient être envisagées pour lutter contre cette souche :

- La **partie A** concerne l'étude du spectre de sensibilité de l'agent pathogène (**E coli BE**) vis-à-vis de bactériophages généralement actifs contre les bactéries à Gram négatif et d'antibiotiques couramment utilisés en médecine,
- La **partie B** permet d'évaluer le mode et la cinétique d'action d'agents antibactériens (bactériophages et antibiotiques) potentiellement efficaces sur l'agent pathogène,
- La **partie C** permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice de deux antibiotiques vis-à-vis de l'isolat clinique.

### PARTIE A

#### Étude de la sensibilité de la souche E coli BE vis-à-vis d'agents thérapeutiques potentiels

##### A1- Étude de la sensibilité de la souche E coli BE vis-à-vis de bactériophages

###### MANIPULATIONS

- Observer les résultats obtenus.

###### COMPTE RENDU

20. Présenter les résultats dans un tableau.

21. Interpréter les résultats en tenant compte du contexte de l'étude.



## **B4- Dénombrements au temps t = 2 heures**

### **B41- Dénombrement des bactéries survivantes**

#### **MANIPULATIONS**

- Dénombrer les colonies obtenues.

#### **COMPTE RENDU**

28. Présenter les résultats sous forme de tableaux.
29. Calculer les concentrations cellulaires dans les cinq cultures à t = 2 heures.
30. Corréler ces résultats aux densités optiques ainsi qu'aux observations microscopiques du jour 1 et discuter en tenant compte du contexte de l'étude.

### **B42- Dénombrement des phages par la technique en double couche**

#### **MANIPULATIONS**

- Dénombrer les plages de lyse obtenues.

#### **COMPTE RENDU**

31. Présenter les résultats sous forme de tableaux.
32. Calculer les concentrations phagiques dans les surnageants de culture  $\Phi 1$  et  $\Phi 2$  à t = 2 heures.
33. Déterminer le facteur d'amplification de chaque phage à t = 2 heures.

## **PARTIE C**

### **Détermination de la concentration minimale inhibitrice de deux antibiotiques vis-à-vis de la souche E coli BE**

#### **MANIPULATIONS**

- Observer les résultats obtenus.

#### **COMPTE RENDU**

34. Présenter les résultats dans un tableau faisant apparaître les références des cupules lues. Le tableau pourra être réalisé à l'aide de l'outil informatique; dans ce cas l'imprimer et le joindre au compte-rendu, puis enregistrer le fichier sur la clé USB fournie sous le nom « n° candidat – Q34 ».
35. Déterminer la CMI de chaque antibiotique vis-à-vis de la souche testée.
36. Conclure.

## **PARTIE D**

### **SYNTHÈSE**

L'endotoxine déclenche *in vivo* des réactions inflammatoires et physiologiques systémiques responsables du choc septique.

Lorsque l'agent pathogène a atteint une concentration élevée au site d'infection, la libération d'endotoxine d'origine bactérienne peut avoir des effets délétères pour l'organisme.

La figure présentée en annexe indique les résultats de l'évolution de la concentration d'endotoxine libérée dans le milieu de culture lors de l'action des antibiotiques et des bactériophages sur l'isolat clinique **E coli BE**.

#### **COMPTE RENDU**

**37.** Discuter, en vous appuyant sur vos résultats et les résultats expérimentaux présentés en annexe, les avantages et les inconvénients de l'utilisation des quatre agents antibactériens testés.

**38.** Discuter de façon plus générale les avantages et les inconvénients de la phagothérapie et de l'antibiothérapie.

---

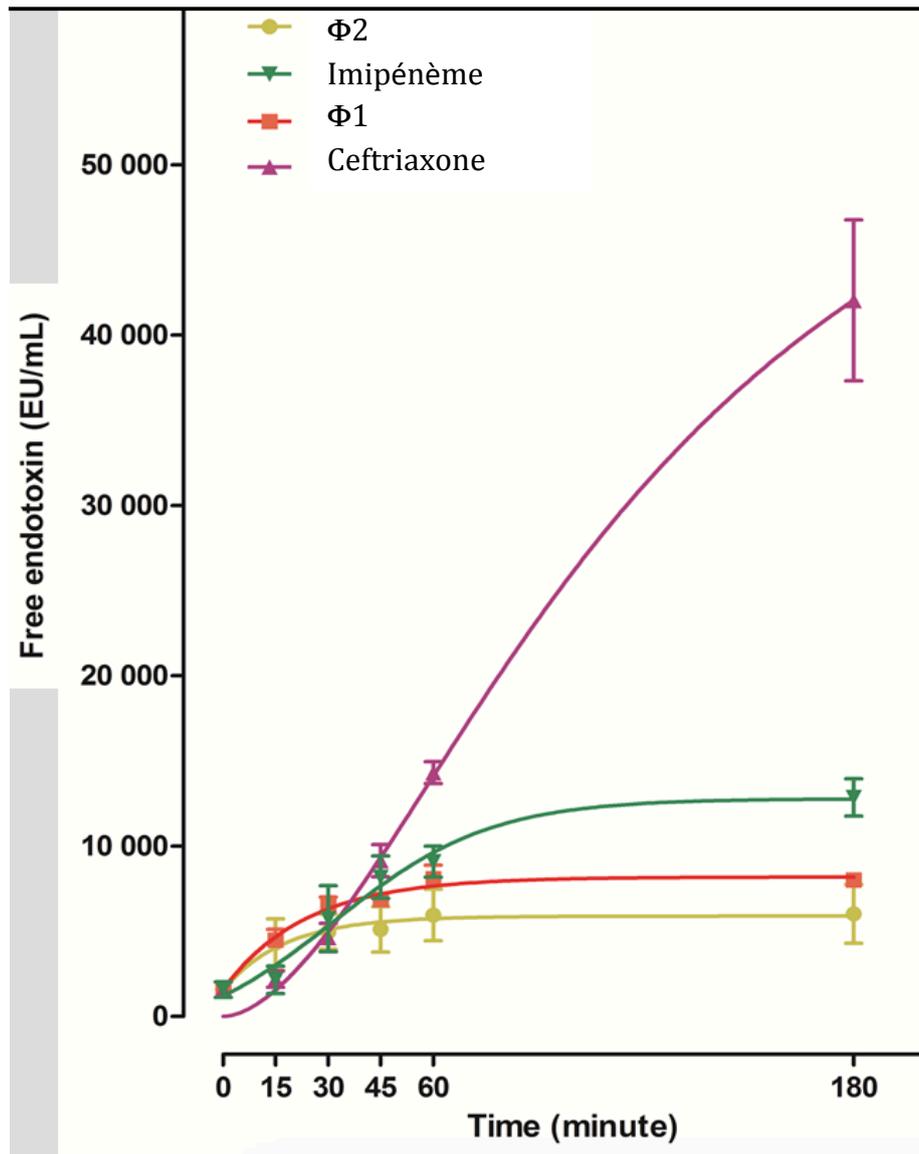
### **Bibliographie**

- (1) Phagothérapie et pneumonies acquises sous ventilation mécanique à *Escherichia coli* : une approche thérapeutique possible ? Aspects fondamentaux et éléments de faisabilité. DUFOR Nicolas, Thèse de Doctorat de l'Université Paris 7 - Denis DIDEROT, École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité, Département Infectiologie Microbiologie, spécialité Microbiologie. Soutenue le 23 octobre 2015.
- (2) The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by  $\beta$ -Lactams, DUFOR N., DELATTRE R., RICARD JD. and DEBARBIEUX L., 2017, *Clinical Infectious Diseases*, 64:15 82-88.

*La souche et les phages utilisés dans ce sujet ont été fournis par Laurent DEBARBIEUX, Unité de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrémophiles, Département Microbiologie, Institut Pasteur.*

**ANNEXE**  
**CONCENTRATION D'ENDOTOXINE BACTÉRIENNE LIBÉRÉE**  
**DANS LE MILIEU DE CULTURE AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE**  
**E COLI BE EN PRÉSENCE DES AGENTS ANTIBACTÉRIENS**

*Adapté de la référence bibliographique (2)*



**Concentration d'endotoxine bactérienne libérée dans le milieu de culture au cours de la croissance de la souche E coli BE en présence des agents antibactériens.**

La souche **E coli BE** a été cultivée en présence des phages ou d'antibiotiques.  
Les symboles correspondent à la moyenne et l'écart type de deux expériences indépendantes.

### La phagothérapie : une alternative à l'antibiothérapie ?

Le sujet portait sur l'étude comparative *in vitro* de la phagothérapie et de l'antibiothérapie pour traiter une infection due à une souche d'*Escherichia coli* multirésistante, **E coli BE**, isolée dans un service de soins intensifs suite à une PAVM, Pneumonie Acquisée sous Ventilation Mécanique.

- La **partie A** correspondait à l'étude du spectre de sensibilité de la souche vis-à-vis de six bactériophages et de six antibiotiques potentiellement actifs,
- La **partie B** étudiait la cinétique et le mode d'action de deux antibiotiques et de deux phages actifs, grâce à un suivi de croissance et un suivi de l'aspect microscopique de la souche en présence de ces agents antimicrobiens,
- La **partie C** permettait la détermination de la concentration minimale inhibitrice des deux antibiotiques actifs vis-à-vis de l'isolat clinique.

### Résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **09,3 / 20**
- Meilleure note : **13,7 / 20**
- Note la plus basse : **03,, / 20**
- 7 notes sur 14 (**50 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20
  - 3 notes < 6 / 20
  - 4 notes ≥ 6 et < 10 / 20
  - 5 notes ≥ 10 et < 12 / 20
  - 2 notes ≥ 12 et < 14 / 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.

L'épreuve faisait appel cette année à des gestes techniques classiques de microbiologie comme par exemple :

- La réalisation d'un antibiogramme,
- Le suivi de croissance par spectrophotométrie,
- Des dénombrements en milieu gélosé (bactéries et phages),
- Des dilutions en microplaques.

Il est donc particulièrement décevant de constater que de nombreux candidats ne maîtrisent pas ces gestes de base. Il est indispensable que les candidats soient suffisamment formés en microbiologie de façon à exécuter ces techniques avec dextérité et qualité.

## COMMENTAIRES TECHNIQUES GÉNÉRAUX

- 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.
- Le jury a déploré cette année plusieurs attitudes et gestes posant des **problèmes de sécurité microbiologique**, qui ont conduit à une contamination de l'environnement (réutilisation de parafilm contaminé, récupération de billes de verre contaminées dans un papier placé ensuite dans la poche de la blouse, projection de culture bactérienne, contamination des pipettes automatiques lors des prélèvements de culture dans les Erlenmeyers ou les tubes hauts,...). Par ailleurs, les règles de sécurité en laboratoire imposent au manipulateur une tenue vestimentaire adéquate (chaussures fermées, vêtements ne touchant pas le sol...).
- Certaines erreurs traduisaient également un **manque de compréhension de la manipulation** et débouchaient sur des résultats erronés (absence ou mauvais choix de blanc lors de la lecture de la densité optique d'une souche au spectrophotomètre, non-respect de la limite de linéarité, lecture de la DO de suspensions trop diluées,...).
- Des maladresses traduisent un **manque de pratique** et parfois conduisent à des pertes de temps importantes. Par exemple, il fallait anticiper les dilutions lors du suivi de croissance ou lors de l'évaluation de la concentration cellulaire d'une culture de 18 heures ; ces dilutions sont à réaliser directement en cuve. Un autre exemple concerne la gestion des consommables, en particulier les cônes, qu'il convient ou non de changer entre deux dilutions ou dépôts, selon la manipulation réalisée.
- La technique de l'examen microscopique n'est souvent pas maîtrisée, ce qui a eu des **conséquences directes sur l'interprétation** des phénomènes étudiés.
- La plupart des candidats a su utiliser l'**outil informatique** pour exploiter les données techniques. La connaissance de cet outil est désormais indispensable en laboratoire. Cependant, certains n'ont pas su optimiser l'utilisation de cet outil pour gagner du temps dans la rédaction de leur compte-rendu (par exemple, le tableau des manipulations réalisé au premier jour pour la détermination de la CMI pouvait être réutilisé pour y noter les résultats le second jour).
- Il est regrettable que les conseils formulés dans les **rapports de jury des années précédentes** n'aient pas été suivis, ce qui aurait évité de nombreuses erreurs techniques aux candidats.

## COMMENTAIRES RÉDACTIONNELS GÉNÉRAUX

- La rédaction du compte rendu doit être réalisée **au fur et à mesure** des manipulations et **directement sur la copie**. 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.
- Il convient de gérer le temps de l'épreuve afin de traiter correctement les questions **sans pénaliser les manipulations**.
- 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.
- Les interprétations des résultats ont été trop superficielles. Il convient, quand cela est possible, de **compléter ses connaissances** entre les deux jours de travaux pratiques de façon à interpréter de manière plus approfondie les résultats obtenus.

## PARTIE A

### Étude de la sensibilité de la souche *E coli* BE vis-à-vis d'agents thérapeutiques potentiels

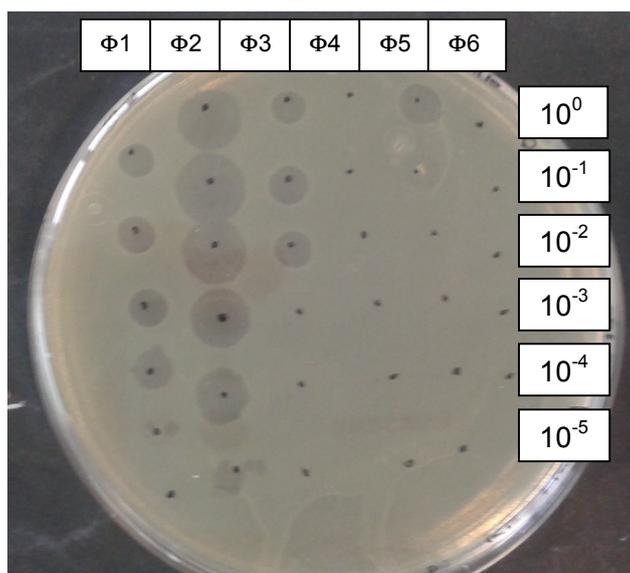
#### A1- ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ DE LA SOUCHE *E COLI* BE VIS-À-VIS DE BACTÉRIOPHAGES

L'objectif de cette partie était de réaliser une étude de la sensibilité de la souche pathogène vis-à-vis des phages envisagés pour la phagothérapie.

#### ASPECTS TECHNIQUES

- Un tapis bactérien devait être réalisé en surface d'un milieu gélosé par inondation. Il convenait de sécher correctement le tapis avant de poursuivre la manipulation.
- Les phages devaient être déposés en spots de 2  $\mu$ L en utilisant la technique du pipetage inverse. Cette technique doit être connue et maîtrisée par les candidats.
- Le dépôt des spots doit être réalisé sur une boîte posée à plat sur la paillasse. Un séchage suffisant doit être effectué avant de retourner la boîte pour incubation.

#### RÉSULTATS ATTENDUS ET COMPTE-RENDU



Screening de six bactériophages potentiellement actifs sur la souche *E coli* BE

- Le screening effectué pour six phages sur la souche *E coli* BE conduisait à l'observation :
  - soit d'une absence de lyse (phages non lytiques sur la souche ou dilutions trop fortes),
  - soit de spots avec une lyse totale,
  - soit d'une lyse partielle avec présence de plages de lyse (UFP) non confluentes.
- Certains candidats ont confondu une plage de lyse avec la lyse totale due à la confluence des UFP. Le diamètre du spot n'avait ici aucun intérêt, il ne s'agissait pas ici de mesurer le diamètre de la zone de lyse car elle ne reflète pas la quantité de phage.
- La souche *E coli* BE était sensible aux phages  $\Phi$ 1 et  $\Phi$ 2 et dans une moindre mesure aux phages  $\Phi$ 3 et  $\Phi$ 5 alors qu'elle résistait aux phages  $\Phi$ 4 et  $\Phi$ 6. Les phages  $\Phi$ 1,  $\Phi$ 2,  $\Phi$ 3 et  $\Phi$ 5 pourraient être utilisés en phagothérapie. Cependant, la sensibilité de la souche étant plus importante vis-à-vis des phages  $\Phi$ 1 et  $\Phi$ 2, l'étude était poursuivie sur ces deux phages.

## **A2- ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ DE LA SOUCHE E COLI BE VIS-À-VIS D'ANTIBIOTIQUES**

L'objectif de cette partie était de réaliser un antibiogramme de l'isolat clinique afin de déterminer les antibiotiques éventuellement utilisables en antibiothérapie.

### **ASPECTS TECHNIQUES**

- Un organigramme complet réalisé à partir des données fournies par l'EUCAST (document fourni en version numérique) était attendu avant de manipuler. Une connaissance préalable des recommandations officielles pour la réalisation d'un antibiogramme permettait un gain de temps. L'organigramme était la plupart du temps incomplet et ne comportait pas les informations techniques nécessaires à la réalisation correcte de la technique.
- La technique officielle impose de ne pas laisser prédiffuser les antibiotiques. Il fallait donc demander à incuber la boîte en cours d'épreuve.

### **RÉSULTATS ATTENDUS ET COMPTE-RENDU**

- Le diamètre des zones d'inhibition devait être mesuré précisément et exprimé en mm.
- Le tableau de résultats devait faire apparaître au minimum le nom des antibiotiques, les diamètres mesurés, les valeurs des diamètres critiques pour les Entérobactéries fournies par l'EUCAST, ainsi que l'interprétation justifiée de la sensibilité ou résistance de la souche vis-à-vis des différents antibiotiques testés.
- La souche présentait une résistance au chloramphénicol et à l'ampicilline, ainsi qu'une sensibilité vis-à-vis des quatre autres antibiotiques testés.
- Pour des raisons de sécurité, la souche avait été rendue artificiellement sensible aux aminosides (amikacine et gentamicine). Cette information apparaissait clairement dans le sujet et n'a jamais été exploitée par les candidats. Ces deux antibiotiques ne pouvaient donc pas être utilisés en thérapeutique pour éliminer la souche.
- Seuls la ceftriaxone et l'imipémène pouvaient éventuellement être utilisés en thérapeutique, ce qui justifiait la poursuite de l'étude sur ces deux antibiotiques.
- L'isolat clinique présentait bien une multirésistance, ce qui pouvait expliquer l'échec thérapeutique constaté lors de l'antibiothérapie de première intention.
- Le contrôle qualité d'un antibiogramme nécessite l'utilisation de souches de référence, et la comparaison des diamètres des zones d'inhibition avec des diamètres attendus pour ces souches : ce contrôle était exposé dans le document EUCAST fourni.

## **PARTIE B**

### **Étude du mode et de la cinétique d'action d'agents thérapeutiques potentiellement efficaces sur la souche E coli BE**

Cette étude était réalisée au cours de la croissance de la souche **E coli BE** en présence des deux antibiotiques (à la valeur de la concentration critique inférieure, CCI) et des deux phages les plus efficaces d'après les résultats obtenus en partie A.

#### **ASPECTS TECHNIQUES**

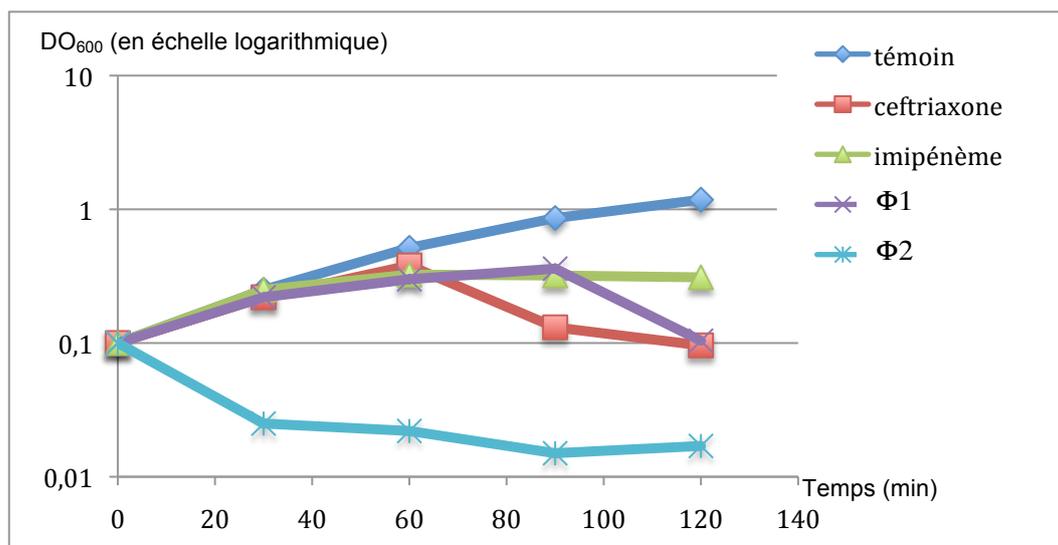
- Une croissance bactérienne doit se faire à une température constante, si possible optimale. Ici, il s'agissait de faire croître une souche d'*Escherichia coli* dont la température de croissance optimale est de 37°C en milieu LB.
- Pour éviter le plus possible les fluctuations de température lors de la croissance, il est recommandé de prélever un aliquot de la culture et de replacer immédiatement la culture dans l'incubateur. De nombreux candidats ont laissé leurs cultures pendant de longues minutes hors de l'incubateur, voire même ont placé les cultures dans la glace à plusieurs reprises. Il s'agissait ici d'évaluer l'effet des différents agents antibactériens à 37°C en milieu LB et non pas l'effet du choc thermique.
- Le suivi de croissance devait être régulier (toutes les 30 min), en effectuant à chaque temps un prélèvement.
- De trop nombreux candidats ont interrompu les cultures à 37°C entre t = 2 heures et la fin de l'épreuve, avant de se rendre compte qu'il fallait les réincuber pour le lendemain. Certains ont même omis de les replacer à 37°C.
- Toutes ces erreurs ont influé de manière significative sur les croissances étudiées aboutissant à des interprétations erronées.
- Certains candidats ont choisi de ne pas réaliser les observations microscopiques à l'état frais qui étaient indispensables à la compréhension du mode d'action des agents antibactériens.
- De même, certains candidats ont choisi de ne pas réaliser les dénombrements bactériens et phagiques en jour 1, se pénalisant ainsi pour les interprétations du jour 2.

#### **RÉSULTATS ATTENDUS ET COMPTE-RENDU**

- Le tableau de suivi de croissance ne précisait souvent pas la grandeur mesurée.
- La question du calcul du facteur MOI « Multiplicity Of Infection » en début de culture n'a pas été traitée alors que la définition permettant de le calculer était donnée.

➤ **SUIVI DE CROISSANCE SUR 2 HEURES**

- Les candidats devaient tracer sur un même graphe les courbes de croissance obtenues dans les cinq conditions de croissance. 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.

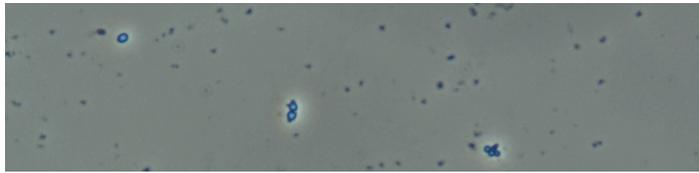
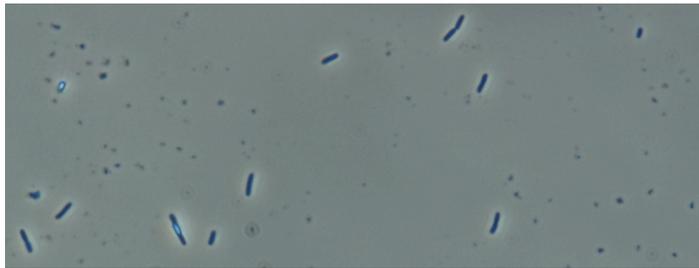
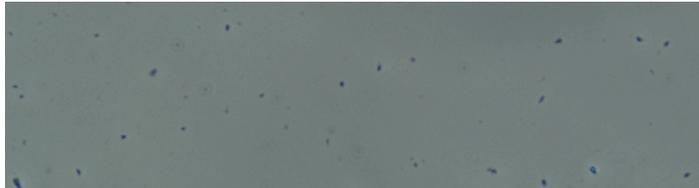


**Cinétique de croissance de la souche *E coli BE* en présence des agents antibactériens sur 2 heures ( $DO_{600} = f(t)$  en échelle semi-logarithmique)**

- 30 minutes après l'ajout des agents antibactériens, la souche **E coli BE** est lysée par le phage  $\Phi 2$  comme l'indique la chute de densité optique, alors que les antibiotiques et le phage  $\Phi 1$  ne montrent pas d'effet significatif sur la culture.
- Un infléchissement de la croissance commence à être observé après 1h en présence des antibiotiques ainsi qu'en présence du phage  $\Phi 1$ .
- Les résultats de densité optique sont proches entre les trois conditions (ceftriaxone, imipénème et phage  $\Phi 1$ ). Cependant les observations en microscopie optique de la souche **E coli BE** montrent des modes d'action très différents des agents antibactériens (voir les images de microscopie).
- Après 2h d'incubation, un effet bactéricide de la ceftriaxone et du phage  $\Phi 1$  sur la souche était observé, tandis que l'imipénème ne semblait avoir qu'un effet bactériostatique à ce stade.
- Trop peu de candidats ont su déterminer le temps de génération et la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle pour la culture témoin. La détermination de ces deux paramètres est pourtant une notion de base d'une étude de croissance.

➤ **SUIVI MICROSCOPIQUE À T = 30 MINUTES ET T = 1 HEURE**

- Les modifications morphologiques provoquées par les différents agents antibactériens étaient visibles dès t = 30 minutes de croissance et étaient amplifiées à t = 1 heure de croissance.
- Les résultats suivants étaient attendus à t = 1 heure :

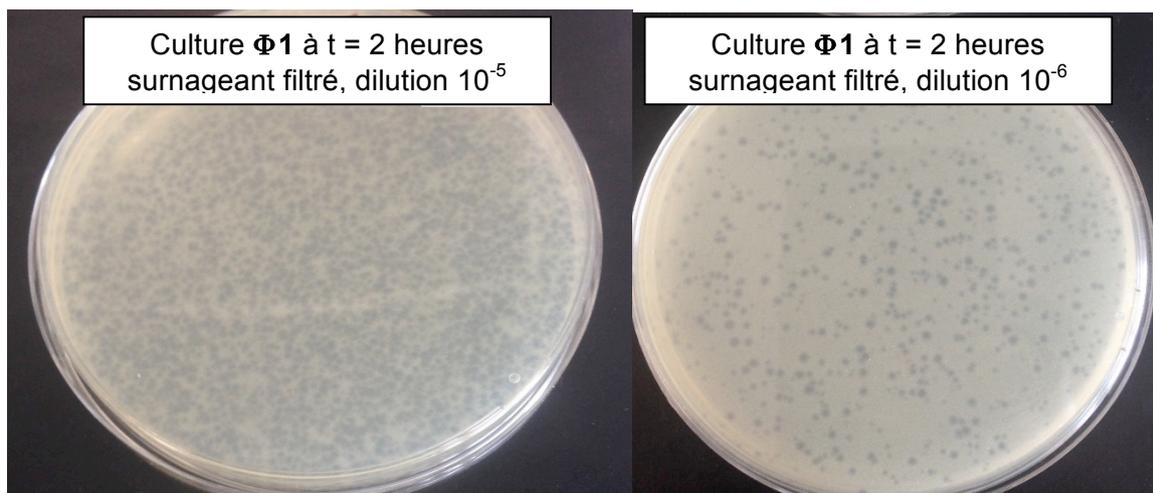
CONDITIONS DE CULTURE	PHOTOGRAPHIES DE L'OBSERVATION À L'ÉTAT FRAIS (x400)	OBSERVATIONS
Culture témoin		Nombreux bacilles en division
Culture en présence de ceftriaxone à 1 µg.mL <sup>-1</sup>		Allongement des bacilles, longs filaments et absence de septum
Culture en présence d'imipénème à 2 µg.mL <sup>-1</sup>		Cellules de forme arrondies (sphéroplastes) et débris cellulaires
Culture en présence du phage Φ1		Quelques bacilles en division (moins nombreux comparativement au témoin) et présence de débris cellulaires
Culture en présence du phage Φ2		Absence de cellules, nombreux débris cellulaires



- La relation fournie reliant la  $DO_{600}$  à la densité bactérienne en  $UFC \cdot mL^{-1}$  varie donc en fonction des conditions de culture :
  - Pour une croissance d'*E. coli* en phase exponentielle en conditions optimales :  $DO_{600} = 0,100 \Leftrightarrow 5,0 \cdot 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,
  - Pour une croissance d'*E. coli* en présence de ceftriaxone :  $DO_{600} = 0,100 \Leftrightarrow 6,0 \cdot 10^3 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  soit 4 log de diminution de survie,
  - Pour une croissance d'*E. coli* en présence d'imipénème :  $DO_{600} = 0,100 \Leftrightarrow 1,3 \cdot 10^3 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ .
  - À  $DO_{600}$  équivalente, il y a plus de mortalité en présence d'imipénème qu'en présence de ceftriaxone.
  - Pour une croissance d'*E. coli* en présence du phage  $\Phi 1$  :  $DO_{600} = 0,100 \Leftrightarrow 5 \cdot 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ .  
À  $DO_{600}$  équivalente, il y a plus de mortalité en présence du phage  $\Phi 1$  qu'avec les deux antibiotiques.
- L'action du phage  $\Phi 2$  est nettement plus efficace que celle des antibiotiques testés puisque que la concentration de bactéries survivantes en présence de  $\Phi 2$  est inférieure au seuil de détection soit  $1,0 \cdot 10^1 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

➤ **NUMÉRATION DES PHAGES PAR LA TECHNIQUE EN DOUBLE COUCHE**

- Un seul candidat a réalisé cette technique qui consiste à mettre en présence les bactériophages et les bactéries sensibles (en large excès) dans une gélose semi-molle. Cette technique permet de quantifier les phages dans un échantillon grâce à la numération des plages de lyses. Chaque plage de lyse correspond initialement à un phage ayant infecté une cellule bactérienne.



Résultat de la numération du phage  $\Phi 1$  par la technique en double couche à  $t = 2$  heures

- Ces manipulations devaient permettre de calculer le facteur d'amplification du phage en 2 heures, connaissant le nombre de phages introduits initialement.

## **PARTIE C**

### **Détermination de la concentration minimale inhibitrice de deux antibiotiques vis-à-vis de la souche E coli BE**

L'objectif de cette partie était de déterminer la concentration minimale inhibitrice de deux antibiotiques actifs vis-à-vis de l'isolat clinique.

#### **ASPECTS TECHNIQUES**

- La réalisation technique ne présentait pas de difficulté particulière, pourtant peu de candidats ont accordé un temps suffisant à cette partie.
- La préparation de l'inoculum ajusté devait se faire dans un volume final suffisant pour remplir l'ensemble des cupules de la microplaque de façon à avoir le même inoculum dans toutes les cupules.
- Pour préparer cet inoculum, il fallait opérer par dilutions décimales successives puis une dernière dilution exacte (non décimale), et non en une seule dilution (volume de souche à prélever beaucoup trop faible).
- Les volumes devaient être identiques dans toutes les cupules.
- La réalisation d'un témoin de croissance de la souche et d'un témoin de stérilité du bouillon de culture était indispensable.

#### **RÉSULTATS ATTENDUS ET COMPTE-RENDU**

- Le tableau de gamme de dilution devait présenter les volumes introduits, les dilutions initiales et finales de l'antibiotique, ainsi que les concentrations initiales et finales en antibiotique.
- Il est indispensable que les candidats connaissent précisément la définition d'une CMI, trop de réponses étaient imprécises.
- Les témoins de croissance et de stérilité devaient être validés avant l'exploitation des résultats.
- Le résultat d'une CMI doit s'exprimer sous la forme d'un intervalle de concentrations en antibiotiques.
- Les dilutions croisées pour chaque antibiotique permettaient de donner un intervalle de CMI plus précis : il fallait donc croiser les trois intervalles.
- Une comparaison des CMI obtenues aux CCI des ATB était attendue, ainsi qu'une conclusion sur la possibilité d'utiliser ces antibiotiques en thérapeutique.
- Une corrélation entre les parties C et A2 était souhaitée mais aucun candidat ne l'a faite.

## **PARTIE D**

### **SYNTHÈSE**

#### **ANALYSE DU DOCUMENT PRÉSENTÉ EN ANNEXE**

- L'endotoxine, présente chez les bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli*, est constituée de la partie hydrophobe du lipopolysaccharide présent dans la membrane externe. Lors de la lyse bactérienne, cette endotoxine est libérée et provoque dans l'organisme une induction de la réponse pro-inflammatoire, qui lorsqu'elle est excessive, conduit à un choc septique. Le niveau d'endotoxine dans le sang des patients infectés est d'ailleurs corrélé à la sévérité du sepsis et à la survie du patient.
- La mesure de la concentration d'endotoxine libérée dans le milieu de culture au cours de la croissance de la souche **E coli BE** en présence des agents anti-bactériens permet d'anticiper les risques de choc septique chez le patient traité. Ici, la figure donnée en annexe indique que les deux antibiotiques provoquent la libération d'endotoxine dans le milieu au cours du temps avec une libération plus forte en présence de ceftriaxone comparativement à celle obtenue avec l'imipénème. En revanche, l'action lytique des deux phages  $\Phi 1$  et  $\Phi 2$  induit une libération d'endotoxine beaucoup plus réduite comparativement à celle obtenue avec les antibiotiques. Il est intéressant de noter que le phage  $\Phi 1$ , bien qu'il lyse la souche avec la même cinétique que la ceftriaxone, ne provoque pas la même libération d'endotoxine, suggérant un mode d'action lytique différent. La quantité d'endotoxine libérée est proportionnelle à la biomasse bactérienne. L'action rapide des phages lytiques sur la souche permet d'arrêter rapidement la croissance bactérienne et d'éviter la production de cellules filles anormales comme observé en présence d'antibiotiques.

#### **MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES**

- L'imipénème et la ceftriaxone sont des antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines. Ils sont connus pour exercer une activité bactéricide en inhibant la synthèse de la paroi. L'imipénème cible préférentiellement la PLP2 (Protéine Liant la Pénicilline) essentielle à l'élongation de la bactérie tandis que la ceftriaxone cible la PLP3 essentielle pour la division.
- Les observations en microscopie optique illustrent bien les effets de ces deux antibiotiques. En présence d'imipénème, la bactérie montre un défaut d'élongation et forme majoritairement des sphéroplastes qui finiront par lyser, alors qu'en présence de ceftriaxone, la bactérie ne forme plus de septum, ce qui conduit à de longs filaments.

#### **MODE D'ACTION DES PHAGES**

- Les phages  $\Phi 1$  et  $\Phi 2$  sont tous les deux des phages lytiques pour la souche **E coli BE**.
- La lyse exercée par  $\Phi 2$  s'observe dès 30 minutes au contact de la souche **E coli BE** tandis que la cinétique d'action du phage  $\Phi 1$  est plus lente. Cela pourrait s'expliquer par une cinétique d'absorption et de réplication plus lente du phage  $\Phi 1$  comparativement au phage  $\Phi 2$ . Ces deux phages n'appartenant pas à la même famille, leur efficacité à reconnaître et infecter la même souche bactérienne est vraisemblablement différente.

## **AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE LA PHAGOTHÉRAPIE**

### ➤ **AVANTAGES**

- La capacité des bactériophages à augmenter leur concentration sur le lieu même de l'infection en fait des alliés particulièrement intéressants sur les sites infectieux où les antibiotiques diffusent mal.
- Du fait de la grande spécificité d'action des phages, ils ont peu d'effet sur le microbiote intestinal.
- Certains phages sont capables d'hydrolyser les polysaccharides bactériens qui composent les biofilms.
- La lyse provoquée par les antibiotiques augmente les concentrations d'endotoxine alors que celle induite par les phages semble l'augmenter dans une bien moindre proportion. Cela diminue le risque de choc septique consécutif au traitement.

### ➤ **INCONVÉNIENTS**

- Le spectre d'action d'un bactériophage est toujours plus étroit que celui d'un antibiotique même lorsqu'il s'agit d'un antibiotique à spectre étroit. C'est à la fois un avantage et un inconvénient.
- Le choix du phage nécessite d'avoir isolé au préalable l'agent pathogène, car il y a peu de chance qu'un phage pris au hasard soit efficace en raison de son spectre étroit d'infection.
- La phagothérapie n'est pas efficace sur les bactéries intracellulaires.
- Comme pour les antibiotiques, l'émergence de souches résistantes au phage ne peut pas être évitée. C'est pourquoi l'association phage/antibiotique peut-être une alternative dans le cas de certaines infections chroniques.

# TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

## SUJET

### L'aluminium

L'aluminium est l'élément le plus abondant de la croûte terrestre derrière l'oxygène et le silicium et représente en moyenne 8 % de la masse des matériaux de la surface solide de notre planète.

Il est naturellement présent sous forme oxydée dans des minerais dont le plus important est la bauxite contenant de l'alumine  $\text{Al}_2\text{O}_3$  hydratée. Ce nom vient du village des Baux de Provence où ce minerai a été découvert pour la première fois.

Sous forme métallique, il est malléable, de couleur argent, de faible densité (2,7), résistant à la corrosion (l'aluminium se recouvre spontanément d'une couche d'oxyde qui permet une passivation), très bon conducteur thermique et électrique et largement recyclable.

Il constitue donc un matériau très utilisé dans l'industrie dans des domaines variés tels que les transports (voiture, train, avion...), l'emballage (briques alimentaires, capsules, canettes...) ou la construction (cadres de fenêtre...). L'élément aluminium est également utilisé sous des formes non métalliques. On retrouve les dérivés de l'ions  $\text{Al}^{3+}$  dans certains catalyseurs ( $\text{AlCl}_3$ ) ou réactifs ( $\text{LiAlH}_4$ ) en chimie organique, ou encore comme adjuvants dans les vaccins.

Après avoir étudié les propriétés de l'élément aluminium, le sujet propose de réaliser le titrage de l'ion  $\text{Al}^{3+}$  d'une solution obtenue à partir d'un vaccin par deux méthodes différentes et s'intéresse enfin à quelques utilisations de dérivés de l'aluminium en chimie organique.

#### I- L'élément aluminium

L'aluminium est l'élément chimique de numéro atomique 13, de symbole Al.

1. Donner la configuration électronique de l'atome d'aluminium dans son état fondamental.
2. A l'aide de la configuration électronique établie précédemment, retrouver la place de l'aluminium dans la classification périodique.
3. Après avoir rappelé la définition, identifier les électrons de valence.
4. Sous forme d'ion, on retrouve souvent l'aluminium au degré d'oxydation III. Donner la formule de l'ion correspondant et justifier qu'il se forme.

L'aluminium possède 22 isotopes connus. Seul  $^{27}\text{Al}$  est stable, ce qui fait de l'aluminium un élément monoisotopique.

Les isotopes plus légers que  $^{27}\text{Al}$  se désintègrent principalement par désintégration  $\beta^+$  en isotopes du magnésium, plus rarement en isotopes du sodium ou du néon, ceux plus lourds par désintégration  $\beta^-$  en isotopes du silicium. Le tableau ci-dessous regroupe quelques informations sur les isotopes de l'aluminium.

Isotope	Abondance (%)	Masse (u)	Temps de demi-vie	Désintégration	Isotope fils
$^{24}\text{Al}$	-	23,999941	2,07 s	$\beta^+$	$^{24}\text{Mg}$
$^{25}\text{Al}$	$< 1,5 \cdot 10^{-4}$	24,990429	7,17 s	$\beta^+$	$^{25}\text{Mg}$
$^{26}\text{Al}$	-	25,986892	$7,1 \cdot 10^5$ ans	$\beta^+$	$^{26}\text{Mg}$
$^{27}\text{Al}$	$\approx 100$	26,981539	-	-	
$^{28}\text{Al}$	$< 5 \cdot 10^{-5}$	27,981910	2,25 min	$\beta^-$	$^{28}\text{Si}$
$^{29}\text{Al}$	$< 2 \cdot 10^{-5}$	28,980446	6,5 min	$\beta^-$	$^{29}\text{Si}$
$^{30}\text{Al}$		29,982940	3,68 s	$\beta^-$	$^{30}\text{Si}$

D'après *propriétés générales de l'aluminium et de ses alliages*, Ed. Techniques Ingénieur et [https://fr.wikipedia.org/wiki/Isotopes\\_de\\_1%27aluminium](https://fr.wikipedia.org/wiki/Isotopes_de_1%27aluminium)

5. Définir le terme « isotopes » et donner le nombre de protons et de neutrons dans les isotopes  $^{27}\text{Al}$  et  $^{26}\text{Al}$ .
6. Définir le temps de demi-vie d'un radio-isotope.
7. Ecrire la réaction de désintégration de  $^{26}\text{Al}$  ainsi que celle de  $^{28}\text{Al}$ .

D'après [http://www.ostralo.net/3\\_animations/swf/spectres\\_abs\\_em.swf](http://www.ostralo.net/3_animations/swf/spectres_abs_em.swf), le spectre d'émission de l'aluminium dans le visible fait apparaître des raies à 708,0 nm, 669,3 nm, 555,0 nm, 510,7 nm, 396,4 nm et 393,8 nm.

8. À quelles couleurs pouvez-vous associer la première et la dernière radiation de ce spectre d'émission ?
9. Quelle différence d'énergie est mise en jeu lors de l'émission du rayonnement de longueur d'onde  $\lambda = 555,0$  nm ? On rappelle que  $h = 6,62 \cdot 10^{-34}$  J.s et  $c = 3,00 \cdot 10^8$  m.s $^{-1}$ .

## II- Les dérivés d'aluminium : des adjuvants couramment utilisés dans les vaccins

Une vaccination préventive consiste à administrer à un individu en bonne santé une forme atténuée ou inactivée d'un agent infectieux avec pour objectif de déclencher une réaction immunitaire permettant d'éviter une contamination ultérieure.

Nous savons aujourd'hui que le niveau de l'immunité est variable selon l'âge et l'état de santé du receveur.

La nécessité de stimuler l'efficacité de certains vaccins paraît donc évidente. C'est tout le défi des adjuvants, dont l'action doit stimuler ou même créer un phénomène limité et contrôlé d'immunité du patient vis-à-vis des pathogènes ciblés. Les adjuvants sont nécessaires dans certains vaccins pour que la réponse immunitaire soit non seulement efficace, mais également de plus longue durée, permettant ainsi d'éviter des vaccinations à répétition et rapprochées tout au long de la vie.

Les adjuvants les plus utilisés sont des dérivés de l'aluminium au degré d'oxydation III (voir tableau ci-dessous).

Dénomination	Formule chimique	Forme
Oxyde d'aluminium, alumine	$Al_2O_3$	Poudre cristalline
Hydroxyde d'aluminium, alumine hydratée	$Al(OH)_3$	Solide cristallisé ou poudre amorphe
Oxyhydroxyde d'aluminium	$AlO(OH)$	Solide cristallisé ou poudre amorphe
Phosphate d'aluminium	$AlPO_4$	Poudre amorphe
Sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium	$AlH_2O_8PS$	Poudre amorphe

L'adjuvant aluminium en général est le seul autorisé actuellement aux Etats-Unis et le seul à être inscrit à la Pharmacopée européenne depuis la suppression du phosphate de calcium des pharmacopées.

*D'après l'actualité chimique, mars 2017, n°416, p 8-10*

- 10.** Donner la formule brute puis la représentation de Lewis des ions sulfate et phosphate retrouvés dans certains adjuvants aluminiques. On représentera quelques formes mésomères le cas échéant.

On s'intéressera dans la suite à un vaccin contenant de l'hydroxyde d'aluminium  $Al(OH)_3$  comme adjuvant, l'INFANRIXETTRA®, dont un extrait de la notice est donné ci-dessous.

*Notice du vaccin INFANRIXETTRA, suspension injectable en seringue préremplie. Vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux acellulaire, poliomyélitique inactivé, adsorbé*

**Liste complète des substances actives et des excipients**

*Que contient INFANRIXETTRA, suspension injectable en seringue préremplie, vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux acellulaire, poliomyélitique inactivé, adsorbé ?*

La substance active est :

*Une dose (0,5 mL) contient :*

*Anatoxine diphtérique<sup>1</sup> ..... au moins 30 UI*

*Anatoxine tétanique<sup>1</sup> ..... au moins 40 UI*

*Antigènes de Bordetella pertussis :*

*- Anatoxine pertussique<sup>1</sup> ..... 25 µg*

*- Hémagglutinine filamenteuse<sup>1</sup> ..... 25 µg*

*- Pertactine<sup>1</sup> ..... 8 µg*

*Virus poliomyélitique (inactivé)<sup>2</sup>*

*- Antigène D de type 1 (souche Mahoney) ..... 40 unités*

*- Antigène D de type 2 (souche MEF-1) ..... 8 unités*

*- Antigène D de Type 3 (souche Saukett) ..... 32 unités*

*<sup>1</sup>adsorbé sur hydroxyde d'aluminium, hydraté ..... 0,5 mg  $Al^{3+}$*

<sup>2</sup>Produit sur cellules VERO.

L'hydroxyde d'aluminium est un adjuvant de ce vaccin. Les adjuvants sont des substances contenues dans certains vaccins pour accélérer, améliorer et/ou prolonger l'effet protecteur du vaccin.

Les autres composants sont :

le chlorure de sodium, le milieu M199 (contenant des acides aminés, des sels minéraux et des vitamines) et l'eau pour préparations injectables.

### **Forme pharmaceutique et contenu**

Qu'est-ce que INFANRIXETRA, suspension injectable en seringue préremplie ? Vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux acellulaire, poliomyélitique inactivé, adsorbé et contenu de l'emballage extérieur.

INFANRIXETRA est une suspension injectable en seringue préremplie (0,5 mL) avec ou sans aiguille - boîte de 1, 10 ou 20.

La suspension est opalescente blanche.

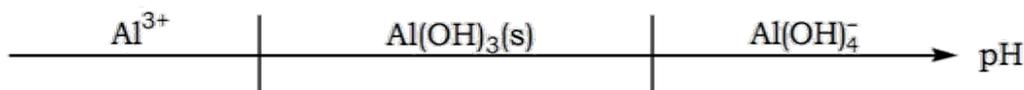
Toutes les présentations peuvent ne pas être commercialisées.

<http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/frames.php?specid=69777706&typedoc=N&ref=N0214495.htm>

Suivant la valeur du pH,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , précipité de couleur blanche, peut être dissous sous forme d'ions  $\text{Al}^{3+}$  ou sous forme d'ions  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ .

11. Représenter la structure de Lewis de  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  puis établir sa géométrie et donner la valeur des angles de liaison dans le cadre de la théorie VSEPR.
12. Ecrire l'équation de la réaction de dissolution de  $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$  caractérisée par le produit de solubilité  $K_s = 10^{-35}$  à 298K.
13. Ecrire l'équation de dissolution de  $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$  en présence d'ion hydroxyde conduisant à  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ . Cette réaction a une constante thermodynamique  $K = 10^2$  à 298K.

Ces différentes espèces peuvent être placées sur le diagramme de prédominance donné ci-dessous.



14. A l'aide des réactions écrites aux questions précédentes, déterminer les deux valeurs de pH à placer sur ce diagramme délimitant le domaine d'existence du solide  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . On travaillera sur une solution modèle de concentration  $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  en aluminium dissous ( $\text{Al}^{3+}$  ou  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  selon la réaction considérée).
15. Justifier la valeur de  $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  utilisée pour l'étude réalisée.
16. Quelle masse d'hydroxyde d'aluminium anhydre  $\text{Al}(\text{OH})_3$  a servi à la préparation d'une dose vaccinale ?
17. Justifier l'aspect de la solution injectable.

## Partie expérimentale

Dans la suite du sujet, on s'intéresse au dosage de l'aluminium contenu dans un vaccin. Pour cela, on travaille sur une solution (S) obtenue à partir de plusieurs doses vaccinales et de la solution acide ayant permis de rincer trois fois chaque seringue. La concentration en ions oxonium  $\text{H}_3\text{O}^+$  dans la solution (S) est d'environ  $1,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ , celle en aluminium d'environ  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .

18. Sous quelle forme se trouve alors l'aluminium dans la solution obtenue ? Justifier. Ecrire éventuellement la réaction ayant eu lieu.
19. Justifier que la concentration de la solution (S) en ions  $\text{Al}^{3+}$  est d'environ  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .
20. Proposer un protocole de dosage utilisant la soude de concentration  $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$  (la concentration exacte sera précisée au début de l'épreuve) comme réactif titrant et le matériel mis à disposition sur la paillasse.
21. Réaliser le dosage de la solution (S).
22. Interpréter le dosage réalisé en écrivant notamment la(les) réaction(s) mise(s) en jeu pour chaque partie du dosage.
23. Les résultats expérimentaux sont-ils conformes à ceux qui étaient attendus ? Justifier.

Il est également possible de réaliser un dosage des ions  $\text{Al}^{3+}$  suivi par colorimétrie utilisant les propriétés complexantes de l'EDTA vis-à-vis des ions  $\text{Al}^{3+}$ . Le complexe incolore formé sera noté  $\text{AlY}^-$ .

Le protocole utilisé est le suivant :

- Dans un erlenmeyer de 250 mL, introduire  $E_1 = 10 \text{ mL}$  de la solution (S).
- Ajouter  $E_2 = 25 \text{ mL}$  d'une solution d'EDTA à  $0,0100 \text{ mol.L}^{-1}$ .
- Ajouter 20 mL de tampon  $\text{pH} = 4,8$  puis attendre 10 minutes.
- Ajouter 60 mL d'éthanol et environ 1 mL de dithizone (indicateur coloré conservé dans la glace et à venir chercher au moment de la manipulation).
- Doser le mélange obtenu par la solution contenant les ions  $\text{Zn}^{2+}$  à la concentration de  $0,0150 \text{ mol.L}^{-1}$ .

En présence d'ions  $\text{Zn}^{2+}$ , la dithizone notée HDz (verte sous forme libre dans les conditions de l'expérience) forme le complexe  $\text{ZnDz}_2$  de couleur rouge.

Les ions  $\text{Zn}^{2+}$  forment également un complexe incolore avec l'EDTA noté  $\text{ZnY}^{2-}$ .

On considèrera que toutes les réactions mises en jeu au cours du dosage sont quantitatives.

Dans les conditions de l'expérience les ions  $\text{Zn}^{2+}$  ne réagissent pas avec le complexe  $\text{AlY}^-$ .

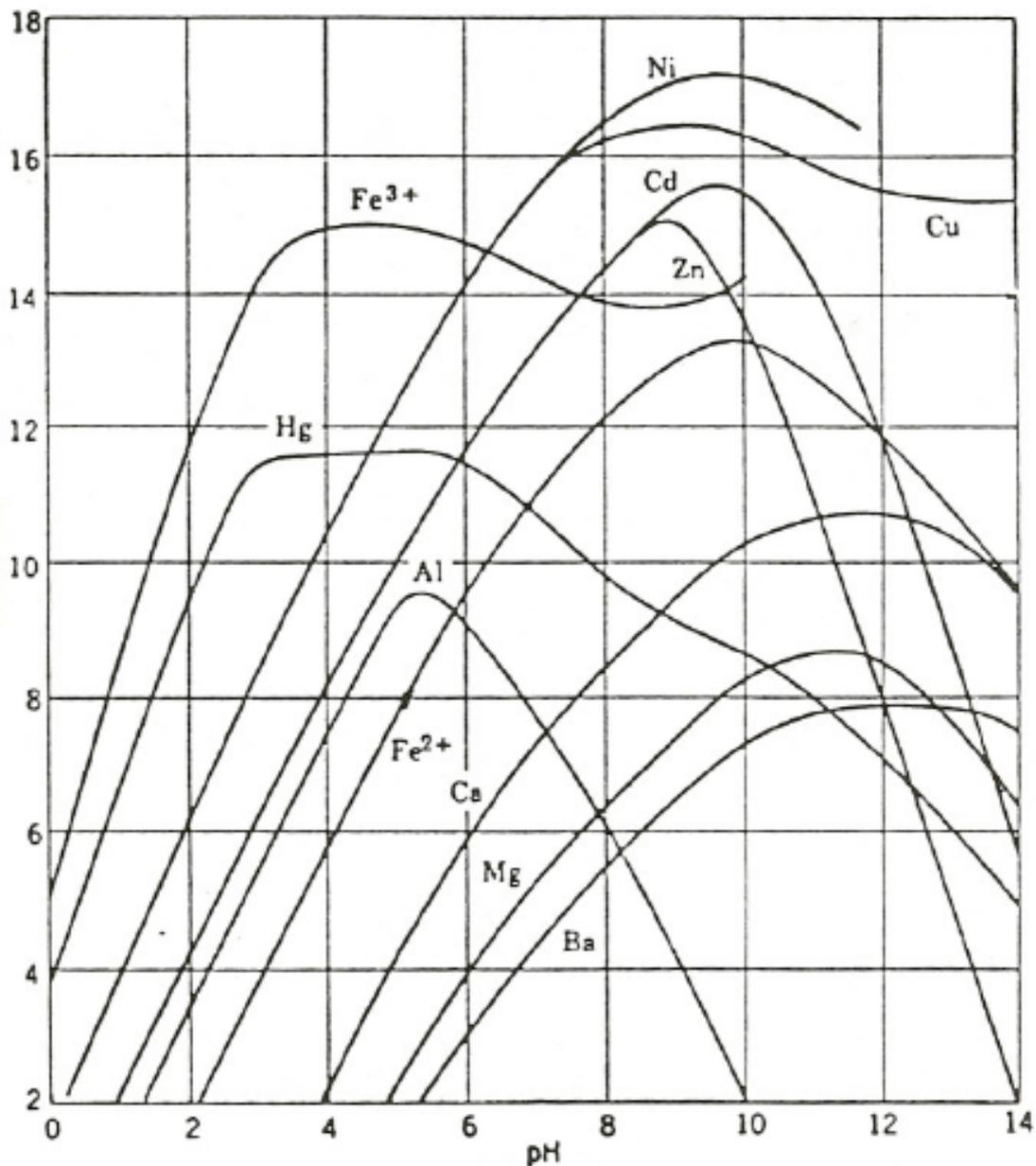
24. Le tampon utilisé est un tampon acétate/acide acétique. Proposer une méthode qualitative de préparation de ce tampon.
25. L'EDTA existe sous différentes formes acido-basiques. En milieu aqueux, la forme la plus acide est notée  $\text{H}_4\text{Y}$ . Les  $\text{p}K_A$  des différents couples mis en jeu sont respectivement 2,0, 2,7, 6,2 et 10,3 à 298 K. Représenter le diagramme de prédominance de l'EDTA. Sous quelle forme retrouve-t-on l'EDTA dans le dosage effectué ?
26. Ecrire les différentes réactions se déroulant au cours du dosage en précisant la coloration de la solution.

## Partie expérimentale

27. Réaliser le dosage proposé.
28. Les résultats expérimentaux sont-ils conformes à ceux qui étaient attendus ? Justifier.

Le document ci-dessous permet de déterminer les constantes des réactions de complexation entre différents cations (la charge n'est pas indiquée quand elle est sans ambiguïté) et l'EDTA en fonction du pH.

La grandeur portée en ordonnée est le  $\log(K_f)$  du complexe  $[MY]^z$  où M représente l'ion central et z la charge du complexe.

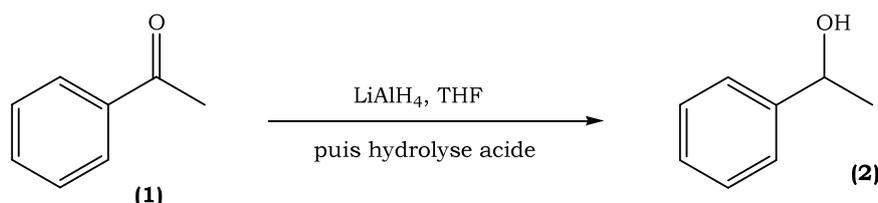


29. Déterminer les constantes de la réaction de complexation entre l'EDTA et l'ion  $Zn^{2+}$  d'une part puis entre l'EDTA et l'ion  $Al^{3+}$  d'autre part. Commenter.

### III- Quelques exemples d'utilisation de l'aluminium en synthèse organique

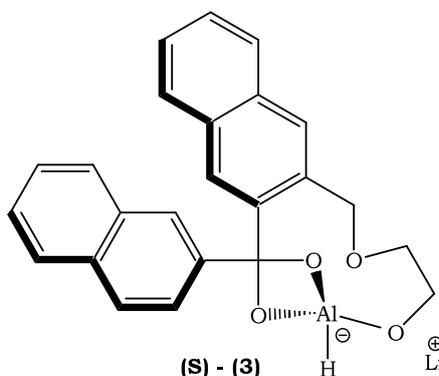
Divers dérivés de l'aluminium sont utilisés en chimie organique. On peut citer par exemple l'alumine  $\text{Al}_2\text{O}_3$  mise à profit en tant que catalyseur, phase stationnaire en chromatographie mais également comme réactif de par ses propriétés basiques. Nous étudierons plus particulièrement dans cette partie les hydrures et halogénures d'aluminium à travers différentes réactions présentées ci-dessous.

On s'intéresse dans un premier temps à la réaction de transformation du composé **(1)** en **(2)**.



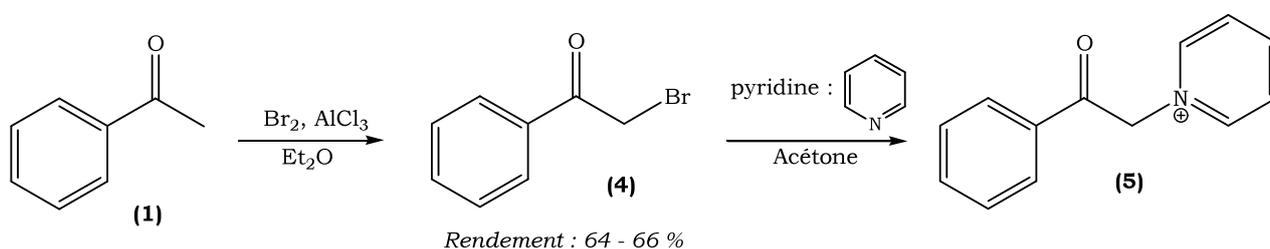
30. Nommer les composés **(1)** et **(2)**.
31. Quelle est la nature de la réaction **(1)**  $\rightarrow$  **(2)**. Justifier précisément votre réponse.
32. Proposer un mécanisme pour cette réaction. Pourquoi réalise-t-on une hydrolyse acide ?
33. Combien de stéréoisomères présente la molécule **(2)** ? Les représenter en précisant les descripteurs stéréochimiques adéquats.
34. En quelles proportions sont obtenus ces stéréoisomères à l'issue de la séquence **(1)**  $\rightarrow$  **(2)**. Indiquer s'il est possible de les séparer simplement.

L'utilisation de l'hydruire d'aluminium chiral (S)-**(3)** ci-dessous permet de passer de **(1)** à **(2)** à température ambiante.

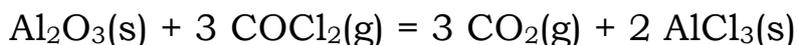


35. Un mélange de composé (S)-**(2)** et (R)-**(2)** dans les proportions 92 : 8 est obtenu avec un rendement quantitatif. Comment peut-on qualifier cette réaction ?

On s'intéresse à présent à la séquence décrite ci-dessous.



Le trichlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  peut être synthétisé à partir d'alumine et de phosgène suivant la réaction suivante :



36. Etablir une représentation de Lewis des molécules  $\text{COCl}_2$  et  $\text{AlCl}_3$ . Quels sont les points communs et les différences concernant leur géométrie dans le cadre de la théorie VSEPR?
37. Cette réaction est-elle endo ou exothermique ?
38. Calculer l'enthalpie libre molaire standard de cette réaction  $\Delta_r G^\circ$  à 298 K.
39. Calculer la constante de cette réaction  $K^\circ$  à 298 K et commenter votre résultat. On donne  $R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ .

Données à 298 K	$\text{Al}_2\text{O}_3(\text{s})$	$\text{COCl}_2(\text{g})$	$\text{CO}_2(\text{g})$	$\text{AlCl}_3(\text{s})$
$\Delta_f H^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	-1669,8	-233,0	-393,1	-695,4
$S^\circ_m$ (J.K <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup> )	51,0	298,2	213,6	167,4

40. Pour l'étape **(1) → (4)**, on pourrait envisager une réaction parasite de bromation du cycle aromatique. Proposer une structure pour le ou les produit(s) issu(s) de cette réaction de bromation en justifiant précisément votre réponse.
41. Ecrire le mécanisme de la réaction entre le composé **(4)** et la pyridine menant au produit **(5)**. Justifier précisément. En déduire la loi de vitesse pour la réaction **(4) → (5)**.

Pour vérifier cette loi cinétique, on propose le protocole suivant :

### **Préparation des solutions :**

Dans une fiole jaugée de 100 mL, introduire 0,790 g de pyridine et compléter à 100 mL avec de l'acétone pour obtenir une solution de concentration 0,100 mol.L<sup>-1</sup> en pyridine.

Peser 0,020 g de composé **(4)** (2-bromoacétophénone de masse molaire  $M = 199,0 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et l'introduire dans un erlenmeyer de 100 mL. Verser les 100 mL de solution de pyridine précédemment préparée dans cet erlenmeyer. Agiter la solution **jusqu'à dissolution complète du solide**.

### **Conductimétrie :**

Introduire une cellule conductimétrique (préalablement plongée dans un b cher contenant de l'acétone) dans l'erlenmeyer contenant le mélange pyridine / 2-bromoacétophénone. La conductivité de la solution est mesurée toutes les minutes pendant 10 minutes (chronomètre), puis après un temps d'attente de 20 minutes, de nouveau toutes les minutes pendant 10 minutes.

*D'après BARNARD P.W.C. et SMITH B.V., 1981, J.Chem. Educ., 58, p 282*

42. En quoi la conductim trie est une méthode de choix pour suivre l'avancement de cette réaction ?
43. Montrer que dans les conditions de l'expérience, une dégénérescence de l'ordre peut être appliquée. Donner l'expression de la nouvelle loi cinétique en notant  $k_{app}$  la constante de vitesse apparente.
44. Donner l'expression de la concentration en **(4)** (2-bromoacétophénone), notée C en fonction de  $C_0$ , la concentration initiale en 2-bromoacétophénone, de  $k_{app}$  et de t.
45. Donner l'expression des concentrations en produits formés en fonction de  $C_0$ , t et de  $k_{app}$ .

46. Montrer que la conductivité à un instant  $t$  peut se mettre sous la forme :

$$\sigma = \alpha \times (1 - e^{-k_{app}t})$$

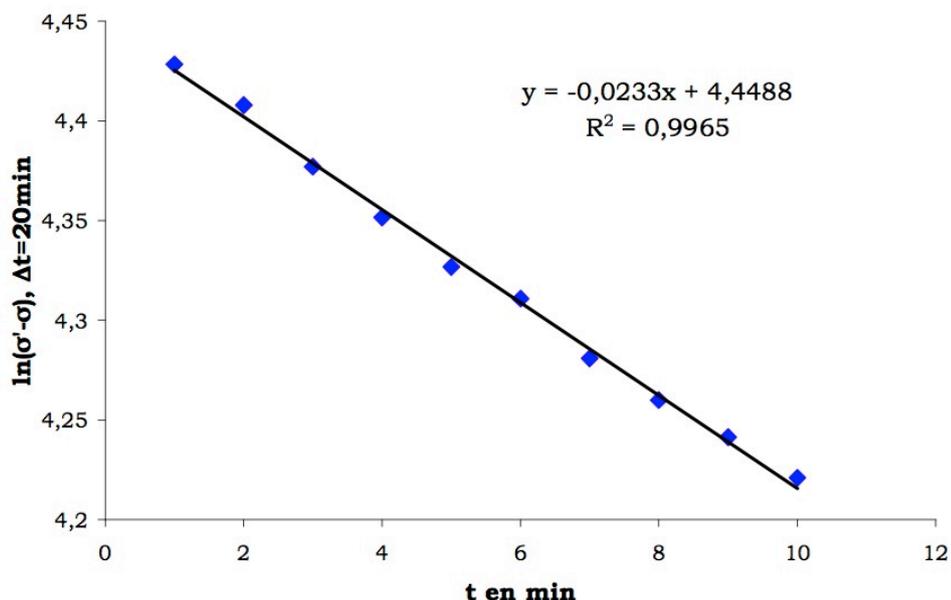
Où  $\alpha$  est une constante **dont on donnera l'expression**. On notera  $[^+]$  et  $[^-]$  les conductivités molaires du cation et de l'anion présents dans le milieu et on assimilera ces grandeurs aux conductivités molaires limites, constantes.

À l'issue de l'expérience, l'expérimentateur dispose de deux séries de données :

- a. À  $t$  où :  $\sigma = \alpha \times (1 - e^{-k_{app}t})$   
 b. À  $t+\otimes t$  où :  $\sigma' = \alpha \times (1 - e^{-k_{app}(t+\Delta t)})$  avec dans ce cas  $\otimes t = 20$  minutes.

47. Montrer que le tracé de  $\ln(f' - f)$  en fonction  $t$  permet de déterminer la constante de vitesse apparente. Ce traitement de données constitue la méthode de Guggenheim.

48. À partir de la figure ci-dessous déterminer la valeur de la constante de vitesse  $k$  de la réaction **(4)**  $\rightarrow$  **(5)**.



49. Une expérience similaire, menée dans le solvant méthanol, a permis d'évaluer la constante de vitesse de la réaction **(4)**  $\rightarrow$  **(5)** à  $4 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ . Commenter ce résultat sachant que les moments dipolaires de l'acétone et du méthanol valent respectivement 2,88 D et 1,65 D.

## Annexe 1 – Données de sécurité relatives aux produits utilisés

<b>Produits</b>	<b>Pictogramme</b>	<b>Phrases H et P</b>
Solution vaccinale notée (S)		H319, H315 P102, P280, P302+P352 P305+P351+P338+P337+P313
Solution d'hydroxyde de sodium à 0,15 mol.L <sup>-1</sup>		H314 P301+P330+P331, P305+P351+P338 P309+P310
Solution de sulfate de zinc à 0,0150 mol.L <sup>-1</sup>		H319, H412 P264, P280 P305+P351+P338, P337+P313
Solution d'EDTA à 0,0100 mol.L <sup>-1</sup>		H315, H319 P305+P351+P338, P302+P352
Tampon pH =4,8		H314 P102, P280, P302+P352 P305+P351+P338+P308+P321
Ethanol		H225 P210, P233, P240, P243, P280, P403+P235
Solution de dithizone		H315, H319 P305+P351+P338

## Annexe 2 – 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 : Obturer 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 : obturer la fuite si cela peut se faire sans danger.

P370+P378 : En cas d'incendie : utiliser de l'eau vaporisée pour l'extinction.

P370+P380 : En cas d'incendie : évacuer la zone.

P370+P380+P375 : En cas d'incendie : évacuer la zone. Combattre l'incendie à distance à cause du risque d'explosion.

P371+P380+P375 : En cas d'incendie important et s'il s'agit de grandes quantités : évacuer la zone. Combattre l'incendie à distance à cause du risque d'explosion.

P4xx : conseils de prudence de stockage

P402 : Stocker dans un endroit sec.

P403 : Stocker dans un endroit bien ventilé.

P404 : Stocker dans un récipient fermé.

P405 : Garder sous clef.

P406 : Stocker dans un récipient résistant à la corrosion/récipient en ... avec doublure intérieure résistant à la corrosion.

P407 : Maintenir un intervalle d'air entre les piles/palettes.

P410 : Protéger du rayonnement solaire.

P411 : Stocker à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F.

P412 : Ne pas exposer à une température supérieure à 50 °C / 122 °F.

P413 : Stocker les quantités en vrac de plus de ... kg / ... lb à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F.

P420 : Stocker à l'écart des autres matières.

P402+P404 : Stocker dans un endroit sec. Stocker dans un récipient fermé.

P403+P233 : Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

P403+P235 : Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais.

P410+P403 : Protéger du rayonnement solaire. Stocker dans un endroit bien ventilé.

P410+P412 : Protéger du rayonnement solaire. Ne pas exposer à une température supérieure à 50 °C / 122 °F.

P411+P235 : Stocker à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F. Tenir au frais.

P501 : Éliminer le contenu/récipient dans ...

P502 : Se reporter au fabricant/fournisseur pour des informations concernant la récupération/le recyclage.



## L'aluminium

L'épreuve de travaux pratiques de chimie de cette année s'intéressait à l'élément Aluminium.

La partie expérimentale portait sur le dosage des ions  $\text{Al}^{3+}$  d'une solution vaccinale modèle suivant deux techniques :

- Un titrage par la soude suivi par pH-métrie, dont le protocole devait être entièrement proposé par le candidat.
- Un titrage en retour suivi par colorimétrie dont le protocole était décrit.

Une comparaison des résultats obtenus par les deux techniques de dosage était attendue en conclusion.

Après quelques questions générales sur l'élément Aluminium (partie I), suivies de l'étude de l'influence du pH sur la solubilité de  $\text{Al(III)}$  (partie II), la partie théorique se terminait sur l'utilisation de cet élément en synthèse organique (partie III). Les exemples étudiés dans cette partie permettaient d'aborder également des questions de thermochimie et de cinétique.

Le jury rappelle que la note finale prend à parts égales la partie expérimentale (questions 20 à 23 et 26 à 28 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 correct, le jury a constaté des difficultés quant à la mise en œuvre et la compréhension des manipulations réalisées, en particulier pour le dosage suivi par pH-métrie.

### I. L'élément aluminium

L'écriture d'une configuration électronique est en général bien réalisée. Concernant la place de l'aluminium dans la classification périodique, une justification précise était attendue, d'autant plus que la classification périodique se trouvait en annexe du sujet...

La définition des électrons de valence reste trop superficielle : le jury attendait « les électrons de valence sont les électrons situés sur les sous-couches de plus grand nombre quantique principal  $n$  et ceux situés sur les sous-couches en cours de remplissage ».

La notion d'isotopes est comprise mais le vocabulaire n'est pas toujours rigoureux.

Les réactions de désintégration  $\beta^+$  ou  $\beta^-$  ne sont pas suffisamment maîtrisées.

### II. Les dérivés d'aluminium : des adjuvants couramment utilisés dans les vaccins

#### Partie théorique

En ce qui concerne la géométrie d'une molécule dans le cadre de la théorie VSEPR, il est attendu que les candidats connaissent les angles de référence des géométries les plus usuelles (à partir d'une molécule du type  $\text{AX}_m\text{E}_n$ , l'angle est voisin de  $109,5^\circ$  si  $m + n = 4$ , voisin de  $120^\circ$  si  $m + n = 3$ ).

Si les réactions de dissolution de  $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$  ont été correctement écrites, leurs exploitations pour déterminer les pH fixant son domaine d'existence n'ont que trop rarement abouti.

La préparation d'une solution tampon n'est pas maîtrisée : la valeur du pH doit permettre de déterminer les proportions relatives d'acide et de base conjugués à mélanger.

Les formes acide/base de l'EDTA sont parfois farfelues : il n'est pas rare de trouver «  $\text{H}_4\text{Y}$ ,  $\text{H}_3\text{Y}$ ,  $\text{H}_2\text{Y}$ ,  $\text{HY}$ ,  $\text{Y}^-$  », la charge n'ayant pas été prise en compte.

## Partie expérimentale

### *Gestes techniques :*

Le jury a constaté que l'utilisation de la verrerie usuelle (pipettes jaugées, burette graduée) était soignée par bon nombre de candidats.

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

- Le candidat doit être debout et non assis sur un tabouret.
- La pipette jaugée doit être tenue verticalement et ajustée au trait de jauge à la descente (et pas à la montée).
- Attention aux erreurs de parallaxe lors de l'ajustement des traits de jauge (burette, pipette jaugée). Des marchepieds sont à la disposition des candidats et peuvent être demandés au besoin.
- Beaucoup de titrages ont été réalisés avec une bulle d'air dans la pointe de la burette : il est nécessaire de vérifier l'absence de bulle d'air avant de commencer un titrage.
- Un dosage colorimétrique doit se faire au goutte à goutte et l'expérimentateur doit, pendant cet ajout, porter son regard sur la solution titrée et non sur les graduations de la burette.
- Il est d'usage de réaliser un dosage colorimétrique rapide puis au moins deux dosages colorimétriques cohérents.
- Enfin, l'utilisation des gants doit se faire à bon escient : le port de gants est à proscrire pour l'utilisation de l'ordinateur, de la calculatrice, des stylos...

### *Dosage pH-métrique :*

Lors de l'élaboration du protocole le jury attendait que le candidat :

- Ecrive les réactions ayant lieu au cours du dosage.
- Ecrive les relations attendues aux équivalences.
- Exploite ces relations pour en déduire un volume convenable de prise d'essai (de l'ordre de 15 mL pour le second volume équivalent).
- Envisage un protocole mettant en œuvre un suivi pH-métrique.

L'utilisation de regressi était recommandée pour le tracé de la courbe ainsi que son exploitation (méthode des tangentes ou préférentiellement méthode de la dérivée première (extremum) ou de la dérivée seconde (annulation)).

Tout candidat ayant un second volume équivalent très faible (inférieur à 5 mL) aurait dû être amené à se questionner sur la pertinence de la valeur de sa prise d'essai et éventuellement à la modifier en conséquence lors d'un second essai souvent réalisé.

Le resserrage des points a trop souvent été négligé voire était inexistant.

### *Dosage colorimétrique en retour :*

Il était nécessaire d'écrire dans l'ordre les réactions ayant lieu, en tenant compte des indications données dans le sujet (structure et stabilité des différentes espèces).

Le jury rappelle que les équations des réactions chimiques doivent être équilibrées (trop d'oubli d'ion  $\text{H}^+$ , de charge, de coefficient...).

L'exploitation du dosage en retour a été correctement traitée par bon nombre de candidats.

### III. Quelques exemples d'utilisation de l'aluminium en synthèse organique

La partie III a été abordée par la majorité des candidats même si peu d'entre eux sont parvenus à la traiter dans son intégralité.

La première réaction envisagée était une réduction d'une fonction cétone en fonction alcool par  $\text{LiAlH}_4$ . Bon nombre de candidats ont reconnu la nature de cette réaction mais peu ont su la justifier avec soin par un calcul de degré d'oxydation ou l'écriture d'une demi-équation électronique par exemple.

Les questions de stéréochimie ont été abordées avec plus ou moins de rigueur. Le jury tient à rappeler qu'une représentation tridimensionnelle (Cram par exemple) est indispensable pour représenter le stéréoisomère d'une molécule et justifier son descripteur stéréochimique. Il est apprécié de voir précisé l'ordre de priorité des différents substituants du carbone asymétrique d'après les règles de Cahn, Ingold et Prelog sur la copie. Enfin, l'obtention d'un mélange racémique devait être justifiée (par le caractère équiprobable de l'attaque nucléophile de part et d'autre du plan du C réduit dans le cas étudié) et le caractère énantiosélectif (ou plus largement stéréosélectif) de la réaction, lors de l'utilisation de l'hydrure d'aluminium chiral, souligné.

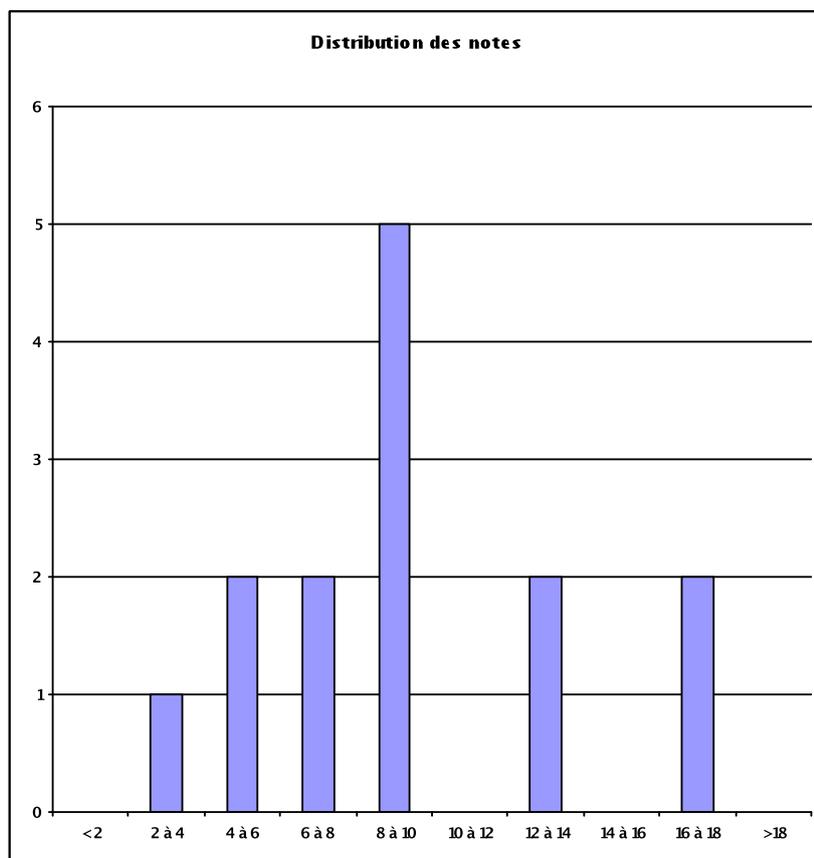
Les questions de thermochimie ont été abordées par bon nombre de candidats. Il est rappelé que le caractère endo ou exothermique d'une réaction se justifie par le signe de  $\Delta_r H^\circ$  (et non de  $\Delta_r G^\circ$ ) et que sans application numérique, les points à cette question ne peuvent être attribués. De nombreux problèmes d'applications numériques (à partir de formules littérales justes) ont été remarqués dans les copies : attention aux ordres de grandeurs de  $\Delta_r H^\circ$  (souvent en  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et  $\Delta_r S^\circ$  (souvent en  $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) pour le calcul de  $\Delta_r G^\circ$  : il est nécessaire de convertir l'unité de  $\Delta_r H^\circ$  ou celle de  $\Delta_r S^\circ$  puis d'adapter l'unité de  $\Delta_r G^\circ$  en conséquence.

Diverses questions de chimie organique demandaient d'établir un mécanisme réactionnel (addition nucléophile sur une cétone et substitution nucléophile d'ordre 2,  $\text{S}_{\text{N}}2$ ) ou d'appliquer les règles de Holleman dans le cas de substitutions électrophiles aromatiques. Il est étonnant de constater que ces questions ont été très peu traitées et avec un manque de rigueur notable, ce qui illustre le manque de maîtrise des règles mécanistiques de base (flèche partant du site nucléophile vers le site électrophile, équilibre des charges etc...) par de nombreux candidats.

Les dernières questions du sujet s'intéressaient à l'étude cinétique d'une réaction de type  $\text{S}_{\text{N}}2$  par un suivi conductimétrique mettant en jeu une exploitation par la méthode de Guggenheim. Cette partie a été très peu traitée mais le jury tient néanmoins à féliciter les candidats qui l'ont abordée et ce, de manière souvent très satisfaisante.

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

Moyenne **09,4 / 20**  
Ecart type **4,2**



	I. L'élément aluminium									II. Les dérivés d'aluminium				
N° question	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
% réponses	100	93	100	100	93	100	71	100	100	93	100	100	93	57
% bonnes réponses	98	29	46	89	80	89	30	71	84	58	64	79	100	44

	II. Les dérivés d'aluminium : des adjuvants couramment utilisés dans les vaccins														
N° question	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
% réponses	50	86	79	93	71	100	93	86	64	71	100	100	79	86	57
% bonnes réponses	43	46	80	50	25	27	32	44	15	25	75	46	95	46	31

	III. Quelques exemples d'utilisation de l'aluminium en synthèse organique														
N° question	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
% réponses	71	79	71	93	64	50	79	71	57	50	29	29	64	21	29
% bonnes réponses	38	49	21	44	41	58	60	64	50	48	50	47	53	56	50

	III. l'aluminium en synthèse organique				
N° question	45	46	47	48	49
% réponses	29	14	14	29	7
% bonnes réponses	50	50	50	24	100

# ÉPREUVE ORALE DE LEÇON

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

## SUJETS

BIOCHIMIE	MICROBIOLOGIE	BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE
Les groupements Fer-Soufre	Virus et cancer	Le spermatozoïde, une cellule spécialisée.
Les métaux dans la cellule	La variabilité génomique des virus.	L'immunité innée.
Compétence des cellules souches et destin cellulaire	Les virus entériques	La nociception.
Le pore nucléaire	Mobilité des bactéries.	Le calcium dans l'organisme.
	Les toxines protéiques bactériennes	Les hormones du stress

## RAPPORT DU JURY DE LEÇONS

### **Statistiques de l'épreuve**

14 candidats ont composé.

La moyenne des notes obtenues est de 7,50 avec :

- la meilleure note : 16/20 ;
- la note la plus basse : 01/20.

Moyenne des candidats admis : 12,17.

### **Commentaires généraux**

Il convient de rappeler que l'épreuve est une leçon, et non un exposé ; à ce titre, le candidat se doit d'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). Cette notion ne doit pas être négligée par le candidat car selon qu'il s'agisse d'une leçon de Biochimie ou de Biologie Cellulaire par exemple, le sujet proposé doit être traité différemment. Néanmoins, pour certains sujets, le

jury appréciera, notamment lors de l'entretien, que le candidat soit capable de faire preuve d'une approche plus intégrée de la problématique, à l'interface entre les trois disciplines.

Cette année encore, le jury regrette un niveau général trop faible de certains candidats quel que soit le champ thématique abordé, comme en témoigne une moyenne d'épreuve de 7,50, très proche de celle de 2016 (7,14) et beaucoup plus faible que la moyenne de 8,80 obtenue lors de la session 2015.

De nombreux candidats n'ont pas pris suffisamment le temps d'analyser tous les termes du sujet, en préalable à toute consultation d'ouvrage. Le candidat devrait avant tout veiller à cerner très précisément la problématique du sujet, hiérarchiser ses idées et effectuer un choix quant au(x) message(s) qu'il souhaite transmettre lors de la leçon. Une bonne connaissance des ouvrages mis à disposition est un atout majeur afin de se constituer une bonne bibliographie. Il est en effet illusoire d'imaginer réaliser une synthèse d'un nombre trop important d'ouvrages en quatre heures de préparation. Plus de 15 ouvrages ont été utilisés pour traiter un sujet lors de la présente session. A contrario, la leçon ne doit en aucun cas être basée sur un seul livre : elle ne serait alors qu'une présentation partielle et partielle du sujet.

### **Remarques sur le fond**

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 faire l'effort d'un vrai travail de synthèse et d'organisation pédagogique. Les sujets doivent être abordés en gardant à l'esprit tous les niveaux d'organisation biologiques (molécule, édifice supramoléculaire, cellule, tissu, organe, organisme et son environnement selon le thème proposé). 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 intégré. Ceci est patent au moment des questions, et se traduit par un mutisme des candidats ou par un ensemble de contre-vérités scientifiques assénées avec un aplomb déconcertant, ce qui est inacceptable pour un concours de ce niveau. 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 étant pour la plupart d'entre eux assez vastes, il convient de prendre de la hauteur, de fixer des objectifs, d'effectuer des choix judicieux quant aux notions développées, de traiter des exemples ayant valeur de modèle afin de faire ressortir les concepts importants tout en distillant des touches d'accessoire. Un trop grand nombre de candidats s'est contenté de compiler ou juxtaposer des informations provenant de différents ouvrages (parfois totalement illisibles, très denses, inexploitable ou inexploités) et/ou des connaissances personnelles au lieu de les intégrer pour asseoir leur propos ce qui altère la clarté du (des) message(s) et la logique intrinsèque de la leçon. Le jury apprécie la construction de documents didactiques personnels (schémas, tableaux, organigrammes, cartes euristiques...), qui témoignent de l'appropriation et de la maîtrise du sujet.

### **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 regrette que la grande majorité des candidats n'ait pas utilisé tout le temps qui leur était imparti, une présentation n'ayant duré que 17 minutes.

Le jury rappelle que l'introduction doit permettre de cerner le sujet et d'apporter quelques notions qui permettent de dégager la problématique centrale. L'annonce du plan projette les auditeurs sur le déroulement ultérieur tout en apportant une légitimité aux choix effectués.

Les items du développement doivent être équilibrés, articulés et régulièrement resitués en appui sur le plan, ce qui permet à l'auditoire de suivre la logique de la leçon.

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

Le jury a apprécié les grandes qualités de communication de certains candidats : respect du temps imparti, structuration de l'exposé, dynamisme et posture enseignante, qualité des supports, du plan, des conclusions partielles, des transitions, l'ensemble apportant de la légitimité au propos. A noter que sur les diapositives doivent figurer les illustrations supportant le propos et un minimum de texte (*i.e.* un ensemble de mots-clés) qui permettent au candidat de se rappeler 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 tient à insister sur le fait qu'il n'est plus temps de rechercher dans les ouvrages bibliographiques des illustrations et données au moment de la présentation orale. Le jury regrette que certains diaporamas soient presque quasi-exclusivement constitués de clichés photographiques, d'ouvrages souvent illisibles (flous ou de trop petite dimension), sans articulation réellement logique et associés à un support de commentaires qui sont trop souvent lus. Enfin, le jury insiste sur le fait qu'au moment de la présentation orale, il n'est plus temps de rechercher des illustrations et données dans les ouvrages bibliographiques. 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, approfondir, compléter certains points de la leçon ;
- d'élargir le sujet dans des domaines connexes ou non abordés.

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 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 jury a déploré, pour certains candidats, la difficulté à réaliser cet exercice avec un vocabulaire scientifique rigoureux.

### **Rapport sur les leçons de Biochimie**

Concernant les leçons de Biochimie et questions se rapportant à des concepts de Biochimie, le jury a encore cette année été extrêmement frappé par le niveau très faible de nombreux candidats. Certains fondamentaux et des notions plus complexes mais néanmoins classiques (comme la structure des groupements fer-soufre et leur implication dans des réactions d'oxydo-réduction ou la catalyse enzymatique ; la régulation transcriptionnelle par les IRE-IREBP des acteurs biochimiques impliqués dans l'homéostasie du fer ; la compétence des cellules souches en terme de signaux, répertoire de récepteurs et facteurs de transcription, état de la chromatine à la base de l'enclenchement d'un programme génétique de différenciation ; les caractéristiques biochimiques et fonctionnelles des toxines protéiques bactériennes de type AB, par exemple) sont au mieux partiellement acquis, au pire totalement méconnus des candidats.

Force est de constater que le niveau général en Biochimie de la plupart des candidats à l'agrégation de Biochimie-Génie Biologique reflète plus celui d'un étudiant en début de Licence que celui de niveau Master. Très peu de candidats semblent percevoir que les réactions biochimiques sous-tendent les activités cellulaires, ce qui limite la vision intégrée que devrait avoir le candidat du fonctionnement de l'organisme dans diverses situations physiopathologiques.

## **Rapport sur les leçons de Microbiologie**

Les sujets proposés étaient classiques et assez ciblés, donc sans difficulté majeure pour un candidat bien préparé à cette épreuve. Cette année encore, trop de candidats manquaient de connaissances générales en Microbiologie, à savoir à minima les concepts de base en bactériologie et en virologie et une vision intégrée du monde microbien dans son environnement et avec leurs hôtes. Dans bien des cas, une vision trop restreinte du sujet a affecté la compréhension de la problématique et a limité l'exposé à un des aspects qui devaient être développés. Par exemple, une leçon sur « La variabilité génomique des virus » doit inclure ses conséquences en terme d'adaptation à l'environnement et à l'hôte, et pour la pathogénèse virale.

La plupart des sujets (en particulier « les toxines protéiques bactériennes » ou « Virus et cancer ») nécessitaient des connaissances de base dans d'autres domaines, Biologie cellulaire et Physiologie ou Biochimie, qui donnaient tout son sens à la problématique de la leçon. Ces connaissances n'étaient soit pas acquises, soit pas intégrées dans la leçon.

À noter que le niveau de connaissance des candidats en Immunologie et en Biologie Cellulaire s'est encore avéré particulièrement faible cette année. Des notions de base (telles que protooncogène/oncogène/anti-oncogène, populations cellulaires et mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les réponses immunitaires, compartiments cellulaires et mécanismes impliqués dans le trafic intracellulaire) sont très mal maîtrisées et ne sont souvent même pas évoquées dans les leçons qui le nécessitent.

De manière plus générale, il convient de rappeler que dans cet exercice (leçon et questions), le candidat doit être capable de présenter les processus biologiques de façon globale et synthétique, et de connaître parfaitement certains exemples pour illustration précise. Ceci nécessite un travail de fond en Microbiologie comme dans les autres matières.

## **Rapport sur les leçons de Biologie Cellulaire et Physiologie**

Les commentaires généraux développés précédemment s'appliquent aux leçons de Biologie Cellulaire et Physiologie pour lesquelles ils prennent tout leur sens.

En 2000, l'Académie des Sciences, dans son rapport « Physiologie animale et humaine, vers une physiologie intégrative », précisait que « la physiologie [...] a pour objet d'expliquer, pour chacun des niveaux d'intégration que comporte tout organisme vivant, comment ses différents éléments constitutifs permettent l'émergence des fonctions qui caractérisent ce niveau. [...] Science plurielle du vivant organisé [...], elle s'enrichit des stratégies et techniques que lui apportent les autres disciplines, biologiques ou non ».

Cette conception de la physiologie nécessite donc de replacer systématiquement les mécanismes physiologiques dans le contexte de l'organisme, c'est-à-dire au-niveau de populations cellulaires structurées et interdépendantes. Dans ce cadre, les aspects cellulaires et moléculaires sont bien évidemment indispensables à la compréhension du fonctionnement de l'organisme : ils doivent être explicités au cours de la leçon. De la même manière doivent être connus des candidats, les mécanismes physico-chimiques qui sous-tendent, au travers de grandes lois fondamentales, le fonctionnement cellulaire.

Le jury regrette que certaines leçons de biologie cellulaire et physiologie aient été présentées uniquement de manière « mécanistique », en occultant la place et le rôle de la cellule dans l'organisme. L'exposé des détails de l'interaction d'une hormone avec son récepteur ou d'un flux de molécules à travers une membrane cellulaire n'est pas pertinent si la cellule n'est pas identifiée à l'échelle d'un tissu ou d'un organe et/ou si son rôle dans la réalisation d'une fonction physiologique n'est pas connu du candidat.

Dans une perspective didactique, les candidats pourraient s'appuyer davantage sur la physiopathologie et les syndromes cliniques les plus caractéristiques pour expliquer le fonctionnement physiologique normal. Enfin, il serait parfois judicieux d'intégrer à la leçon, le contexte historique de la construction des connaissances en physiologie.

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

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

## SUJETS

<b>Relation structure-fonction des canaux calcium dans les signaux électriques</b>	Tang L, Gamal El-Din TM, Swanson TM, Pryde DC, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA <b>Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel by Ca<sup>2+</sup> antagonist drugs</b> <i>Nature</i> , 2016, vol. 537, p. 117-121 + <i>METHODS</i> (+ <i>EXTENDED DATA</i> sur la clé)
	Catterall WA, Wisedchaisri G, Zheng N <b>The chemical basis for electrical signaling</b> <i>Nature Chemical Biology</i> , 2017, vol. 13, p. 455-463
<b>ARN circulaires et cancers</b>	Zhu M, Wu Y, Chen Y, Yan F <b>Circular BANP, an upregulated circular RNA that modulates cell proliferation in colorectal cancer</b> <i>Biomedicine &amp; Pharmacotherapy</i> , 2017, vol. 88, p. 138-144
	Qu S, Yang X, Li X, Wang J, Gao Y, Shang R, Sun W, Dou K, Li H <b>Circular RNA: A new star of noncoding RNAs</b> <i>Cancer Letters</i> , 2015, vol. 365, p. 141-148
<b>Transport rétrograde</b>	Gupta N, Noël R, Goudet A, Hinsinger K, Michau A, Pons V, Abdelkafi H, Secher T, Shima A, Shtanko O, Sakurai Y, Cojean S, Pomel S, LiévinLe Moal V, Leignel V, Herweg JA, Fischer A, Johannes L, Harrison L, Beard PM, Clayette P, Le Grand R, Rayner JO, Rudel T, Vacus J, Loiseau PM, Davey RA, Oswald E, Cintrat JC, Barbier J, Gillet D <b>Inhibitors of retrograde trafficking active against ricin and Shiga toxins also protect cells from several viruses, <i>Leishmania</i> and Chlamydiales</b> <i>Chemico-Biological Interactions</i> , 2017, vol. 267, p. 96-103
	Trousdale C, Kim K <b>Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease</b> <i>European Journal of Cell Biology</i> , 2015, vol. 94, p. 513-521
<b>Les longs ARN et l'auto-immunité</b>	Zemmour D, Pratama A, Loughhead SM, Mathis D, Benoist C <b>Flicr, a long noncoding RNA, modulates Foxp3 expression and autoimmunity</b> <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i> , 2017, published online, p. E3472-E3480 (+ <i>SUPPORTING INFORMATION</i> sur la clé)
	Wahlestedt C <b>Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression</b> <i>Nature Reviews Drug Discovery</i> , 2013, vol. 12, p. 433-446
<b>Les récepteurs Toll dans les allergies au nickel</b>	Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, Keck S, Kalis C, Nielsen PJ, Galanos C, Roth J, Skerra A, Martin SF, Freudenberg MA, Goebeler M <b>Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel</b> <i>Nature Immunology</i> , 2010, vol. 11, p. 814-819 + <i>ONLINE METHODS</i> (+ <i>SUPPLEMENTARY FIGURES</i> sur la clé)
	Schmidt M, Goebeler M <b>Nickel allergies: paying the Toll for innate immunity</b> <i>Journal of Molecular Medicine</i> , 2011, vol. 89, p. 961-970
<b>Lyse ou lysogénie, là est la question?</b>	Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, Doron S, Stokar-Avihail A, Peleg Y, Melamed S, Leavitt A, Savidor A, Albeck S, Amitai G, Sorek R <b>Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions</b> <i>Nature</i> , 2017, vol. 541, p. 488-493 + <i>METHODS</i> (+ <i>EXTENDED DATA</i> sur la clé)

<p><b><i>Myxococcus xanthus</i>, prédateur de bactéries</b></p>	<p>Müller S, Strack SN, Ryan SE, Shawgo M, Walling A, Harris S, Chambers C, Boddicker J, Kirby JR  <b>Identification of Functions Affecting Predator-Prey Interactions between <i>Myxococcus xanthus</i> and <i>Bacillus subtilis</i></b>  <i>Journal of Bacteriology</i>, 2016, vol. 198(24), p. 3335-3344 (+ SUPPLEMENTARY MATERIAL sur la clé)</p> <hr/> <p>Keane R, Berleman J  <b>The predatory life cycle of <i>Myxococcus xanthus</i></b>  <i>Microbiology</i>, 2016, vol. 162, p. 1-11</p>
<p><b>La germination de <i>Clostridium difficile</i></b></p>	<p>Donnelly ML, Li W, Li YQ, Hinkel L, Setlow P, Shen A  <b><i>Clostridium difficile</i>-Specific, Gel-Forming Protein Required for Optimal Spore Germination</b>  <i>mBio</i>, 2017, vol. 8(1), p. 1-17 (+ SUPPLEMENTAL MATERIAL sur la clé)</p> <hr/> <p>Bhattacharjee D, McAllister KN, Sorg JA  <b>Germinants and Their Receptors in Clostridia</b>  <i>Journal of Bacteriology</i>, 2016, vol. 198(20), p. 2767-2775</p>
<p><b><i>Bordetella</i> et <i>bvgAS</i> : le régulateur du régulateur</b></p>	<p>Mason E, Henderson MW, Scheller EV, Byrd MS, Cotter PA  <b>Evidence for phenotypic bistability resulting from transcriptional interference of <i>bvgAS</i> in <i>Bordetella bronchiseptica</i></b>  <i>Molecular Microbiology</i>, 2013, vol. 90(4), p. 716-733* (* p. 1 à 33 en AUTHOR MANUSCRIPT)</p> <hr/> <p>Bone MA, Wilk AJ, Perault AI, Marlatt SA, Scheller EV, Anthouard R, Chen Q, Stibitz S, Cotter PA, Julio SM  <b><i>Bordetella</i> PirSR regulatory system controls BvgAS activity and virulence in the lower respiratory tract</b>  <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2017, published online, p. E1519-E1527 (+ SUPPORTING INFORMATION sur la clé)</p>
<p><b>Métabolisme glucidique et pathologies neurodégénératives</b></p>	<p>Perruolo G, Viggiano D, Fiory F, Cassese A, Nigro C, Liotti A, Miele C, Beguinot F, Formisano P  <b>Parkinson-like phenotype in insulin-resistant PED/PEA-15 transgenic mice</b>  <i>Scientific Reports</i>, 2016, vol. 6:29967; DO I: 10.1038/srep29967, p. 1-7 (+ SUPPLEMENTARY INFORMATION sur la clé)</p> <hr/> <p>Paillard T, Rolland Y, de Souto Barreto P  <b>Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Narrative Review</b>  <i>Journal of Clinical Neurology (JCN)</i>, 2015, vol. 11(3), p. 212-219</p>
<p><b>Cancer de la prostate et récepteurs stéroïdiens ; études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i></b></p>	<p>Pisolato R, Lombardi APG, Vicente CM, Lucas TFG, Lazari MFM, Porto CS  <b>Expression and regulation of the estrogen receptors in PC-3 human prostate cancer cells</b>  <i>Steroid</i>, 2016, vol. 107 p. 74-86</p> <hr/> <p>Slusarz A, Jackson GA, J Day JK, Shenouda NS, Bogener JL, Browning JD, Fritsche KL, MacDonald RS, Besch-Williford CL, Lubahn DB  <b>Aggressive Prostate Cancer Is Prevented in ER_KO Mice and Stimulated in ER_KO TRAMP Mice</b>  <i>Endocrinology</i>, 2012, vol. 153(9), p. 4160-4170</p>
<p><b>Implication du cytochrome P450 et des récepteurs AhR dans les pathologies osseuses et pulmonaires?</b></p>	<p>Iqbal J, Sunc L, Caod J, Yuen T, Luc P, Babe I, Leua NA, Srinivasana S, Wagagef S, Hunterf CA, Nebertg DX, Zaidic M, Narayan, Avadhania NA  <b>Smoke carcinogens cause bone loss through the aryl hydrocarbon receptor and induction of Cyp1 enzymes</b>  <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2013, vol. 110(27), p. 11115-11120</p> <hr/> <p>Wu JP, Chang LW, Yao HT, Chang H, Tsai HT, Tsai MH, Yeh TK, Lin P  <b>Involvement of Oxidative Stress and Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor in Elevation of CYP1A1 Expression and Activity in Lung Cells and Tissues by Arsenic: An In Vitro and In Vivo Study</b>  <i>Toxicological Sciences</i>, 2009, vol. 107(2), p. 385-393</p>
<p><b>Régime alimentaire et dégénérescence neuronale</b></p>	<p>Park YJ, Ko JW, Jeon S, Kwon YH  <b>Protective Effect of Genistein against Neuronal Degeneration in ApoE-/- Mice Fed a High-Fat Diet</b>  <i>Nutrients</i>, 2016, vol. 8(692), p. 1-11</p> <hr/> <p>Messina M  <b>Soy and Health Update: Evaluation of the Clinical and Epidemiologic Literature</b>  <i>Nutrients</i>, 2016, vol. 8(754), p. 2-42</p>
<p><b>Virome digestif et inflammation</b></p>	<p>Yang JY, Kim MS, Kim E, Cheon JH, Lee YS, Kim Y, Lee SH, Seo SU, Shin SH, Choi SS, Kim B, Chang SY, Ko HJ, Bae JW, Kweon MN  <b>Enteric Viruses Ameliorate Gut Inflammation via Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7-Mediated Interferon-<math>\beta</math> Production</b>  <i>Immunity</i>, 2016, vol. 44, p. 889-900 (+ SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURE sur la clé)</p> <hr/> <p>Karst SM  <b>Viral Safeguard: The Enteric Virome Protects against Gut Inflammation</b>  <i>Immunity</i>, 2016, vol. 44, p. 715-718</p>

## RAPPORT DU JURY D'ECD

### **Rapport sur l'épreuve d'ECD**

Chaque dossier comporte au maximum deux articles en anglais : un article de recherche associé à une revue présentant l'état des connaissances sur le sujet de l'article de recherche ; un article de recherche suffisamment conséquent pour répondre à ces deux critères ; deux articles de recherche se répondant sur une problématique commune. Les thèmes choisis sont *a minima* d'actualité, souvent fondés sur des technologies de rupture. Dans l'esprit du dossier, l'article de revue fournit aux candidats un état récent de l'art dans le domaine traité, il place le candidat en situation de comprendre la problématique des articles de recherche. L'accès à Internet amoindrit cet intérêt et peut se substituer à l'article de revue.

L'exercice impose aux candidats une première lecture rapide des documents de façon à dégager d'emblée la ou les hypothèses formulées dans l'article de recherche, dans quelle perspective elle(s) se situe(nt) et les points essentiels supportant les conclusions des auteurs.

Pour cet exercice, les candidats doivent posséder une solide culture méthodologique et des connaissances théoriques étendues dans les différents domaines de la biologie. Cette culture générale permet aux candidats de ne pas être déstabilisés par le sujet, souvent nouveau pour eux. Nantis de ces deux qualités, les candidats peuvent présenter 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 de l'article 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 précisément l'objectif scientifique ainsi que la démarche expérimentale et les avantages et limites des méthodes employées.

La revue, lorsqu'elle est fournie, ne doit pas non plus être négligée, l'un des objectifs de cet exercice est d'expliquer le lien entre revue et article et de dire en quoi le sujet traité est important pour la connaissance académique et/ou les implications technologiques ou sociétales. L'accès à internet durant l'épreuve permet aussi de répondre à cet objectif.

Pour les trois domaines des ECD (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 mises en jeu et de justifier leurs choix pour documenter une hypothèse. Peu de candidats ont « critiqué » les résultats présentés par les auteurs des articles. De même, rares ont été les candidats qui ont proposé des suites technologiques et/ou méthodologiques aux résultats décrits dans les articles concernés.

Les notes en dessous de la moyenne sont souvent dues à un manque de maîtrise du langage scientifique anglo-saxon et des techniques utilisées. Nous recommandons la lecture régulière de la littérature scientifique, notamment certains journaux généralistes comme « *PNAS* » ou « *Frontiers in...* ». Ils sont en libre accès et permettront aux candidats non seulement de s'améliorer pour cette épreuve mais aussi de réactualiser leurs connaissances.

Cette année, le jury a pu apprécier que la plupart des candidats maîtrisaient suffisamment l'outil mis à leur disposition pour agrémenter leurs propos par les illustrations issues des documents (ou de sites internet, dont les sources doivent être évidemment citées) et retravaillées afin qu'elles soient des appuis aux explications. La copie *in extenso* de figures complexes d'article voire de tableaux, sans remise en forme ni remis dans leur contexte, voire le dessin *in extremis* au tableau de figure de synthèse d'un article peuvent évidemment s'avérer contre-productifs dans une présentation qui reste aussi un exercice pédagogique

## **Rapport sur les questions relatives à la Chimie**

L'épreuve d'ECD fait l'objet de questions de chimie. Ces dernières portent, dans un premier temps, sur les notions abordées par le candidat lors de sa présentation, et dans un deuxième temps sur des points de chimie soulevés dans les publications étudiées. Les questions sont généralement plus faciles que celles qui peuvent être posées lors de l'épreuve de TP.

Le jury attend en priorité de la part des candidats une bonne maîtrise des techniques expérimentales utilisées dans les publications, ainsi qu'une bonne compréhension de la structure et de la réactivité des molécules. Si les réponses sont majoritairement satisfaisantes, les candidats manquent souvent d'aisance pour repérer les carbones asymétriques d'une molécule organique, connaître les fonctions chimiques classiques ou relier la structure d'une molécule à sa capacité à faire des interactions intermoléculaires. Enfin, le jury déplore une utilisation hasardeuse de la classification périodique des éléments : les candidats doivent pouvoir discuter de la chimie d'un élément sans nécessairement écrire leur configuration électronique.

## **Conclusions**

À part quelques exceptions notables, l'article de revue (ou l'accès à internet lorsque n'était proposé qu'un article de recherche) n'a pas été exploité pour mettre en situation la problématique de recherche de l'article. La présentation d'emblée de résultats, sans même parfois exposer le contexte et modèle expérimental, rend la compréhension de l'article difficile pour les membres du jury étrangers au domaine.

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. Cette deuxième partie de l'épreuve n'est pas à négliger : elle représente la moitié du temps de l'épreuve. Elle permet au jury, par des questions dans le domaine de l'ECD et dans d'autres domaines, dont la chimie, 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. Le jury a apprécié la clarté et l'exactitude des réponses mais aussi, le temps de réflexion que se donnent certains candidats pour répondre au mieux. L'ECD reste une épreuve difficile : raconter une histoire et suivre une logique expérimentale nécessitent autant de pédagogie que de connaissances scientifiques...

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Depuis deux ans, le jury se répartit en deux sous-jurys, un par épreuve orale et travaillant en parallèle. Avec deux années de recul, ce dispositif remplit au mieux les objectifs qui avaient présidé à sa mise en place : une impartialité optimale puisque chaque sous-jury évalue tous les candidats sur une seule et même épreuve sans connaître le résultat de l'autre épreuve. Et une amélioration du bien être des candidats dont les deux épreuves orales sont bloquées sur deux jours consécutifs et non une semaine.

Les candidats présents aux épreuves d'admissibilité et d'admission venaient, comme chaque année, d'horizons très divers. À côté des étudiants, normaliens ou non, ayant préparé le concours ENS, ont été admissibles des enseignants du secondaire et du supérieur dont certains ont suivi une préparation dans leur académie. Cette pluralité de candidats traduit l'intérêt jamais démenti pour ce concours d'excellence en biochimie et génie biologique. La forte diminution des candidats titulaires d'un doctorat d'Université, attirés par l'ouverture d'un nouveau concours qui leur est destiné, ne s'est pas faite sentir.

Les résultats aux différentes épreuves d'admissibilité comme d'admission montrent qu'un concours de cette dimension doit se préparer sans négliger aucun champ mentionné dans le programme et ce dans le souci d'une actualisation des savoirs, tout en assurant les connaissances de bases qui constituent le socle indispensable à la construction d'une expertise disciplinaire.

L'évolution continue des techniques et des connaissances dans les domaines couverts par le programme demandera une remise en question permanente de la part des futurs agrégés. Juger de la capacité des candidats à assurer leur mise à niveau permanente est un des objectifs assignés à ce concours. Les sujets (écrit, TP et Oral) se fondent sur un équilibre entre des connaissances de bases (plus sollicitées dans l'épreuve écrite) et des connaissances actualisées (majoritaires dans les épreuves orales). Chaque épreuve nécessite la mise en œuvre d'une méthodologie ne faisant pas l'économie d'un temps de réflexion, de bon sens, de la volonté de transmettre un message et qui aidera, certes, à la structuration d'une composition mais aussi à distinguer l'essentiel de l'accessoire.

Les travaux pratiques, ont, cette année encore, rempli leur rôle, emblématique de notre agrégation. Ces épreuves constituent une des originalités de ce concours. Et dans l'esprit des initiateurs de cette agrégation, elles préfiguraient une part non négligeable des enseignements auxquels serait confronté le futur agrégé. D'ailleurs, leur poids n'est pas moindre que celui des autres épreuves d'admission et une bonne préparation à ces épreuves est un gage de réussite. Cette année encore elles ont permis d'apprécier l'adaptabilité des candidats placés devant des sujets innovants pour lesquels ils doivent faire preuve d'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 fondée sur la lecture d'articles récents dans des revues de haut niveau.

Le jury félicite les candidats lauréats de cette session 2017. 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 cette année encore Madame la Proviseure du lycée Pierre-Gilles de Gennes, ENCPB et son équipe : proviseurs 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.