



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 2016

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

	Page
RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES	3
 ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ	
Composition de Biochimie	
Sujet	5
Rapport de Jury	5
Composition de Microbiologie	
Sujet	8
Rapport de Jury	8
Composition de Biologie Cellulaire et Physiologie	
Sujet	11
Rapport de Jury	11
 ÉPREUVES D'ADMISSION	
Travaux Pratiques de Biochimie – Physiologie	
Sujet	14
Rapport de Jury	35
Travaux Pratiques de Microbiologie	
Sujet	44
Rapport de Jury	64
Travaux Pratiques de Chimie	
Sujet	69
Rapport de Jury	85
Épreuve orale de leçon	
Sujets	90
Rapport de Jury	91
Épreuve orale d'étude critique de dossier scientifique et/ou technique	
Sujets	94
Rapport de Jury	97
 CONCLUSION GÉNÉRALE	 99

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits	372
Candidats présents aux épreuves d'admissibilité	105
Nombre de postes	12
Candidats admissibles	23
Candidats présents aux épreuves d'admission	21
Candidats proposés pour l'admission	11
Barre d'admissibilité	05,70
Barre d'admission	08,27

ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

Moyenne générale des candidats présents	04,23
Moyenne générale des candidats admissibles	08,22

COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Moyenne des candidats présents	03,63
Moyenne des candidats admissibles	07,78
Note maximale	16

COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents	04,88
Moyenne des candidats admissibles	08,76
Note maximale	16

COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents	04,17
Moyenne des candidats admissibles	08,11
Note maximale	18

ÉPREUVES D'ADMISSION

Moyenne générale des candidats présents 08,59

Moyenne générale des candidats admis 10,59

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents 10,31

Moyennes des candidats admis 10,99

Note maximale 14,30

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents 10,60

Moyennes des candidats admis 11,95

Note maximale 15,70

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

Moyenne des candidats présents 09,27

Moyennes des candidats admis 11,29

Note maximale 20,00

LEÇON

Moyenne des candidats présents 07,14

Moyennes des candidats admis 09,27

Note maximale 15,00

ÉTUDE CRITIQUE DE DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Moyenne des candidats présents 07,76

Moyennes des candidats admis 10,27

Note maximale 19,00

ENSEMBLE DU CONCOURS

Moyenne des candidats présents 08,47

Moyenne des candidats admis 10,18

ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Les dérivés radicalaires dans les cellules animales : de l'importance fonctionnelle aux effets toxiques.

RAPPORT DU JURY DE BIOCHIMIE

Le sujet portait sur les fonctions et les effets toxiques des dérivés radicalaires dans les cellules animales.

Le devoir se devait d'être structuré, concis et pédagogique et offrir une vision claire et précise du champ disciplinaire concerné au niveau le plus élevé.

Pour la forme, rappelons qu'un devoir d'agrégation débute toujours par une introduction qui définit les termes du sujet, pose la problématique et propose un plan détaillé et logique permettant de répondre à la/les question(s) posée(s).

Dans cette introduction était attendue une définition des dérivés radicalaires au sens chimique du terme, *i.e.* toute atome qui possède au moins un électron non apparié sur sa couche de valence la plus externe. En prenant le dioxygène comme exemple, il fallait montrer qu'il s'agit intrinsèquement d'un bi-radical. Bien que nécessaire à la vie, les électrons non appariés du dioxygène en font une molécule hautement réactive, apte à capter des électrons (agent oxydant), à l'origine d'espèces radicalaires dérivés du dioxygène plus ou moins toxiques pour les systèmes vivants. Cette définition ainsi établie permettait de discriminer « ion » et « dérivé radicalaire » et de poser plusieurs questions relatives à la diversité des espèces radicalaires, des systèmes producteurs de dérivés radicalaires et réactions (bio)chimiques sous-jacentes, de leur réactivité vis-à-vis des systèmes vivants, des rôles physiologiques de ces entités moléculaires, des effets toxiques et moyens mis en œuvre par les cellules animales pour limiter l'action des espèces radicalaires.

Une première partie pouvait être focalisée sur la caractérisation chimique et biochimique des espèces radicalaires produites au sein des cellules animales en insistant notamment sur l'ensemble des dérivés réactifs de l'oxygène (anion superoxyde, radical hydroxyle) et de l'azote (monoxyde d'azote). Cette partie offrait la possibilité d'évoquer les techniques qui permettent la détection et/ou la mesure quantitative des espèces radicalaires : sondes de fluorescence spécifiques d'une entité radicalaire, résonnance paramagnétique électronique, mesures indirectes de la production de dérivés radicalaires par la modification de composés cellulaires (peroxydation lipidique, oxydation des bases nucléotidiques) par immunocytochimie ou par utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des systèmes producteurs de dérivés radicalaires ou encore la détection du NO par le réactif de Griess. Cette partie permettait de mettre en évidence les sources productrices de dérivés radicalaires tels que les rayons ionisants, les systèmes enzymatiques générateurs de dérivés radicalaires (comme les NADPH oxydases, les NO synthases, les Cytochromes P450) et de développer certaines réactions d'oxydoréduction (réaction de Fenton, réaction d'Haber-Weiss).

Enfin, dans cette première partie se devaient d'être présentées les propriétés des dérivés radicalaires en terme de temps de demi-vie, capacité diffusionnelle, réactivité avec les macromolécules biologiques (propriétés oxydantes des dérivés radicalaires) aboutissant à un classement des dérivés radicalaires selon leur « agressivité » envers les systèmes vivants.

Une deuxième partie devait être consacrée aux rôles fonctionnels des dérivés radicalaires en s'appuyant sur les mécanismes biochimiques qui supportent leur action. En particulier, le devoir pouvait s'attacher aux rôles des dérivés radicalaires dans le métabolisme oxydatif du glucose et le fonctionnement de la mitochondrie (cycle radicalaire de l'ubiquinone assurant un flux concerté d'électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale). Les dérivés radicalaires comme molécules de signalisation devaient être décrits en s'appuyant sur des exemples précis, comme l'activation de facteurs de transcription redox-sensibles (en insistant sur les déterminants protéométallique capables de « sentir » les variations redox) et la régulation de l'expression de certains gènes ; la production de radical NO par les cellules endothéliales en réponse à l'étirement et la régulation de la vasomotricité locale et à distance. Enfin, l'importance des dérivés radicalaires oxygénés pour la défense de l'organisme vis-à-vis d'une infection bactérienne devait être illustrée. Cet exemple permettait de manière intégrée de présenter comment, dans le cadre de l'immunité non spécifique, les macrophages participent à la destruction d'un organisme étranger en libérant des quantités massives d'anion superoxyde dans le phagosome (« *burst* oxydatif ») via la NADPH oxydase de type 2 et la conversion de l'anion superoxyde en ion hypochlorite via la myéloperoxydase.

En illustrant les rôles physiologiques des dérivés radicalaires, cette partie permettait d'illustrer la notion que, produits en faible quantité et de façon contrôlée, les dérivés radicalaires exercent des effets bénéfiques dans les cellules animales.

Enfin, une troisième partie permettait d'aborder la toxicité des dérivés radicalaires et notamment des dérivés réactifs de l'oxygène vis-à-vis des systèmes vivants. Il fallait aborder la notion de stress oxydant, *i.e.* le déséquilibre entre la production de dérivés radicalaires et l'efficacité des défenses oxydantes. Cette partie permettait ainsi de lister et de décrire au niveau biochimique (structure, réactions mises en jeu) les systèmes impliqués dans le contrôle de la balance redox dans les cellules animales et comment le débordement de ces systèmes mène à un état pathologique (maladies neurodégénératives, cancers, cardiomyopathies). La conséquence de l'établissement de conditions de stress oxydant dans les cellules animales devait être abordée au travers des dommages cellulaires causés par les dérivés radicalaires tels que la déstabilisation des membranes biologiques par peroxydation lipidique des acides gras insaturés, les modifications des bases de l'ADN, la déstabilisation des structures protéiques (attaques sur les résidus cystéines, altération des interactions protéines/métaux). Enfin, pouvait être évoquée la combinaison des dérivés radicalaires entre-eux comme l'anion superoxyde et le radical NO à l'origine de la production des radicaux peroxy-nitrites, espèces chimiques très délétères pour les systèmes vivants.

L'utilisation d'antioxydants en médecine clinique et leur mode d'action permettaient d'étayer le propos. L'utilisation des effets toxiques des radicaux générés par les rayonnements ionisants en radiothérapie et de leurs conséquences pouvait être un bon exemple d'application en thérapeutique.

À la lecture de l'ensemble des copies, les correcteurs ont noté le niveau extrêmement faible en biochimie d'une très grande majorité des candidats pour lesquels les définitions sont pas du tout à partiellement maîtrisées et les mécanismes proposés fantaisistes, attestant de l'incapacité de certains candidats à traiter d'un sujet à l'interface entre la chimie et la biologie. Comme les années précédentes, nous ne pouvons que constater un grand déséquilibre dans la construction des devoirs avec une introduction et une conclusion très largement négligées, sans problématique affichée et perspectives développées. Rappelons aussi qu'un devoir d'agrégation n'est pas un « devoir pour les nuls » construit sous la forme d'un dialogue « professeur élève » dans lequel figurent des références à des films à grand succès pour illustrer des concepts de biochimie. 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

À l'aide d'exemples précis, vous illustrerez le détournement des fonctions cellulaires par les virus eucaryotes et leurs conséquences.

RAPPORT DU JURY DE MICROBIOLOGIE

Le sujet proposé était un sujet de virologie, à la frontière avec la biologie cellulaire et l'immunologie. Ce sujet permettait à chaque candidat de puiser dans ses connaissances en virologie pour illustrer les différents aspects de la relation virus-cellules eucaryotes. Il était restreint aux virus des eucaryotes et ne devait donc pas comporter de partie consacrée aux procaryotes et à leurs virus.

Il était attendu des candidats des connaissances générales sur les mécanismes de réplication des virus, sur les processus cellulaires qu'ils utilisent pour accomplir leur cycle répliatif ainsi que sur les réponses cellulaires et immunologiques qu'ils doivent au moins en partie déjouer. Il était également attendu des connaissances précises et exactes sur les acteurs moléculaires cellulaires et viraux mis en jeu, afin d'illustrer très concrètement les propos. Ce sujet conjugait donc concision et précision.

Comme pour tout devoir d'agrégation, un plan devait être construit afin de permettre de traiter l'ensemble du sujet et de donner une logique au déroulement de l'exposé.

L'introduction pouvait partir de la définition générale des virus et de la description rapide de la grande diversité des virus d'un point de vue structural, pour arriver à la notion de parasitisme strict. La définition de Lwoff était tout à fait adaptée et complète à cet effet. Ceci permettait une présentation très simple de la problématique, à savoir la nécessité pour les virus de détourner certaines fonctions cellulaires afin de se multiplier, disséminer et échapper à la réponse de l'hôte (cellulaire intrinsèque et réponses immunes systémiques innée et adaptative). Une présentation du plan en fin d'introduction était la bienvenue.

Les fonctions cellulaires détournées incluait donc :

- le trafic intracellulaire (endocytose, compartimentalisation) ;
- la biosynthèse des macromolécules, en particulier les protéines (de l'expression génique à la maturation).

Beaucoup d'exemples classiques pouvaient être utilisés comme illustration de cette partie :

- la réponse cellulaire anti-virale ;
- et à l'échelle de l'organisme, les différentes composantes de la réponse immunitaire systémique innée et adaptative.

À noter que la structure des virus pouvait être évoquée sans pour autant faire l'objet d'un développement en soi étant donné l'ampleur du sujet à traiter.

D'emblée, il était important de préciser que les mécanismes moléculaires mis en jeu sont propres à chaque famille de virus et très souvent à chaque virus, et dépendent également du type de cellule infectée. Par la suite, ceci nécessitait donc le choix judicieux de certains exemples permettant d'illustrer de manière précise les mécanismes physiologiques et leur détournement.

Les conséquences à l'échelle cellulaire ne se limitaient pas à la destruction ou la transformation cellulaire mais pouvaient faire intervenir : des systèmes de restriction cellulaire, les RNAi, les granules de stress, l'apoptose et l'autophagie, la synthèse d'interférons... Quant aux conséquences à l'échelle de l'organisme c'est-à-dire la pathogénèse virale, elle ne pouvait qu'être évoquée, compte tenu de l'ampleur du sujet.

En conclusion, différentes ouvertures pouvaient être envisagées telles que l'utilisation de vecteurs viraux en thérapeutique, les difficultés à mettre au point des médicaments antiviraux, l'impact sur l'évolution/adaptation de leur hôte.

Ce sujet, bien que faisant partie du programme, sortait quelque peu des sentiers battus des années précédentes et nombre de candidats n'étaient pas en mesure de le traiter correctement. Le nombre de copie ayant obtenu une note basse est suffisamment important pour qu'il nous semble nécessaire de rappeler ce qui est attendu d'un(e) candidat(e) à un concours d'agrégation : un nombre raisonnable de connaissances actualisées (à ne pas confondre avec des actualités « grand public » : le virus Zika) sur les domaines listés dans le programme, une capacité d'organisation de ces connaissances selon un plan logique, des notions précises et justes, exposées de façon claire avec recours si possible à des schémas, et une capacité certaine d'analyse du sujet.

Cette année encore, le jury a été surpris du nombre d'exposés sans plan, ou avec un plan très mal pensé, qui occultait toute une partie de la problématique. Trop de devoirs se sont limités à la classification et/ou la structure des virus, à une vision très générale du cycle viral ou à la présentation d'une succession de cycles viraux, et ceci, avec de nombreuses et grosses erreurs (exemples : « les virus à ARN sont des Rétrovirus et les virus à ADN des Adénovirus »). À noter que les bactériophages et donc les notions de lysogénie et de cycle lytique ne pouvaient être incluses dans l'exposé.

Le jury a également été très surpris de noter que les connaissances de base de biologie cellulaire et d'immunologie étaient trop souvent mal maîtrisées ou de manière très approximative. Le sujet nécessitait à la fois un travail de synthèse important pour décrire dans ses grandes lignes les processus dans les conditions physiologiques, et des connaissances précises au niveau moléculaire, pour montrer comment les virus détournent ces fonctions à l'aide d'exemples concrets. Des exemples classiquement étudiés, tels que le « vol de coiffe » par virus de la grippe, pouvaient être utilisés. Ils n'ont été que très peu évoqués dans les copies.

Pour de trop rares copies, les connaissances scientifiques étaient de très bon niveau. 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'intérêt de certaines notions par

rapport à cette problématique et aux connaissances qu'ils souhaitent développer. Une réflexion sur l'organisation du devoir est également 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 même 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. Le recours à des schémas clairs et holistiques a été apprécié.

COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

L'Homme a besoin de puiser dans son environnement les éléments nécessaires à sa survie. En excluant les aspects ventilatoires, vous mettrez en évidence les différents acteurs guidant le choix de ces éléments et la quantité ingérée. Vous développerez notamment les mécanismes, les régulations et les aspects physiopathologiques sous-jacents.

RAPPORT DU JURY DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Le sujet portait sur les acteurs guidant le choix et la quantité des éléments ingérés par l'Homme.

INTRODUCTION

L'absence de réflexion a caractérisé de nombreuses compositions qui ont abordé directement des exemples sans que le cadre du sujet ait été même partiellement défini. L'introduction est apparue ainsi trop souvent négligée. Cette remarque s'avère récurrente dans les rapports annuels.

Il apparaissait important avant toute chose de bien cerner les notions essentielles de l'intitulé :

- les éléments nécessaires à la survie : ceux-ci sont captés dans le milieu extérieur et comprennent essentiellement l'oxygène, élément gazeux indispensable au métabolisme cellulaire, les aliments solides ou liquides. L'intitulé précisant que les aspects ventilatoires ne devaient pas être traités, la ventilation, la respiration et le rôle de l'oxygène n'avaient pas à être développés, éventuellement tout juste rappelés dans l'introduction. Les différents aliments, leurs compositions en glucides, lipides, protéines et leurs transformations en nutriments, ainsi que les apports en eau et sels minéraux, devaient retenir toute l'attention des candidats dans le développement de leur composition ;

- les acteurs : ils se répartissent entre signaux afférents déclencheurs (internes ou externes à l'organisme), centres cérébraux intégrateurs, et signaux efférents régulateurs ;
- le choix/quantité des éléments ingérés. La notion de choix, pourtant essentielle, a été peu développée dans nombre des compositions, si ce n'est totalement occultée. Il va de soi que son absence a pesé lourdement dans la notation de certaines compositions. La notion de choix fait appel ici à des processus psychiques, faisant donc intervenir le système nerveux central, la mise en jeu de circuits neuronaux particuliers capables d'engendrer des modifications comportementales. Les comportements à prendre en considération dans le choix/quantité des éléments ingérés étaient le comportement alimentaire (faim, satiété), le comportement dipsique ainsi que l'appétit pour le sel ;
- les aspects physiopathologiques : ils concernaient ici les dérèglements des comportements alimentaires ou dipsiques, conséquence d'altérations dans la réception/intégration des signaux et les dérèglements des réseaux neuronaux impliqués.

Le sujet devait être traité à différents niveaux d'approche, et l'introduction se devait de préciser ces niveaux et leur ordonnancement : de la qualité de l'introduction et de la réflexion préalable pouvait donc dépendre la qualité de la composition globale. De bonnes connaissances étaient attendues, aussi bien en endocrinologie qu'en neurophysiologie, mais avec une capacité à prendre en considération un aspect intégré.

DÉVELOPPEMENT DE LA COMPOSITION

Comportement alimentaire et besoins

La composition pouvait rapidement à ce niveau revenir sur les nutriments (glucides, lipides, protéines). Beaucoup trop de copies ont directement commencé par détailler la digestion, comme si la prise alimentaire commençait dans l'estomac ! Cela présentait un hors sujet important qui a pénalisé les candidats prenant cette voie.

La composition devait ensuite développer les deux composantes du comportement alimentaire (faim/déclenchement alimentaire et satiété/arrêt de la prise alimentaire) en considérant au prime abord les signaux impliqués : la sensation de faim est une sensation subjective et émotionnelle mettant en jeu en amont de nombreux signaux déclencheurs de la prise alimentaire, visant en principe à maintenir un bilan énergétique nul (les apports doivent équilibrer les dépenses) mais également à reconstituer les réserves ; parmi ceux-ci, des signaux sensoriels (odeur, goût), associés à des facteurs métaboliques (notamment rapport glucose/insuline, cortisol plasmatique, NPY). Ces signaux doivent être enregistrés et les informations transmises à des centres d'intégration hypothalamiques. La prise de nourriture et la digestion conduiront à la satiété, avec là aussi intervention de signaux variés pouvant être par exemple mécaniques (comme la distension de la paroi stomacale) ou métaboliques. Pouvaient être distingués les messages activateurs de la prise de nourriture, les messages satiétogènes (CKK, glucagon-like peptide, insuline), les messages afférents régulateurs des réserves (leptine, ghréline, obstatine). Les compositions se devaient de préciser les principales structures impliquées au niveau du SNC : hypothalamus avec noyau arqué et noyau paraventriculaire (NPV) avec activation/inhibition de neurones orexigènes (NPY, AgRP) ou anorexigènes (α MSH, cocaïne amphetamine related transcript (CART)) et à partir du NPV, l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. La sérotonine (induisant bien-être et satiété) et son précurseur le tryptophane, dont les taux libres circulants et la capture cérébrale sont dépendants de l'insuline, pouvaient faire l'objet d'une mention particulière.

Comportement dipsique et appétit pour le sel

Ce chapitre pouvait rapidement repréciser les deux grands aspects de la régulation du bilan hydrominéral, à savoir la prise d'eau et de sels minéraux avec les deux systèmes d'alerte que sont l'osmolalité plasmatique et la volémie, en lien avec la pression artérielle. La diurèse,

physiologie rénale et ses régulations n'étaient pas bien sûr à développer. Comme pour le comportement alimentaire, une composition structurée sur signaux, centre intégrateurs et réponses semblait la plus appropriée.

Parmi les signaux, la déshydratation intracellulaire des « neurones centraux de la soif » (région préoptique) et la déshydratation extracellulaire (avec chute de la volémie) devaient être mentionnés. Ainsi, la stimulation des volorécepteurs atriaux, des récepteurs de l'ANF avec production d'aldostérone ou d'angiotensine II est intéressante : la rétroaction des deux hormones au niveau du NTS (Noyau du Tractus Solitaire) ou de l'Organe Vasculaire de la Lame Terminale (OVLT) permettait de faire le lien entre couplage du comportement dipsique et régulation homéostasique hydrominérale.

Une régulation sensorielle par stimulation de récepteurs linguaux notamment avec rétroaction hypothalamique pouvait également être mentionnée. Elle permet un étanchement provisoire le temps nécessaire à l'eau buée de pénétrer dans le compartiment extracellulaire.

Aspects physiopathologiques

Les aspects pathologiques peuvent avoir des origines variées, liées à des mutations ponctuelles par exemple ou des dérèglements des réseaux neuronaux. Si diabète et obésité ont souvent été mentionnés – souvent sans explications associées –, boulimie sucrée et anorexie mentale méritaient d'être développées. En effet, les deux pathologies impliquent respectivement la sérotonine et la dopamine (neuromédiateur du « plaisir » et élément clef des circuits de récompense). Si un développement exhaustif n'était pas attendu dans le cadre de la composition de l'Agrégation BGB, ces exemples permettaient de revenir sur la composante psychique de la prise alimentaire, notamment ses liens avec le contexte sociétal, les notions de désir/plaisir dans le choix des aliments et leurs dérivés (altération des comportements de faim/prise de nourriture associée à une recherche compulsive). Concernant les mutations, l'exemple de la mutation des MC4-Récepteurs de l' α MSH, induisant une obésité héréditaire est séduisant.

REMARQUES GÉNÉRALES

Un certain nombre de devoirs se sont contentés d'un catalogue d'exemples incluant de nombreux hors sujets, reflétant un manque de réflexion vis-à-vis du sujet, mais probablement aussi un manque de connaissances générales en physiologie. Par exemple, de nombreux devoirs ont développé de manière exhaustive le système digestif et la digestion, le contrôle de la glycémie par l'insuline et le glucagon, ou le contrôle rénal de la volémie/natrémie, aspects classiques mais hors sujet, chronophages et néfastes pour le candidat. De même, au niveau pathologique, le diabète de type I a été très souvent détaillé dans les copies bien qu'hors sujet car étant centré sur une mauvaise gestion des ressources circulantes et non des apports externes.

Les schémas ont été nombreux, hors sujet dans un certain nombre de cas. Les légendes et annotations sont souvent insuffisantes. À noter un bel effort de synthèse de certains candidats proposant des schémas-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. Le nombre des exemples possibles pour illustrer la composition, des acteurs des comportements dipsique ou alimentaire est très nombreux et le jury ne s'attendait pas à une revue exhaustive. Il 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

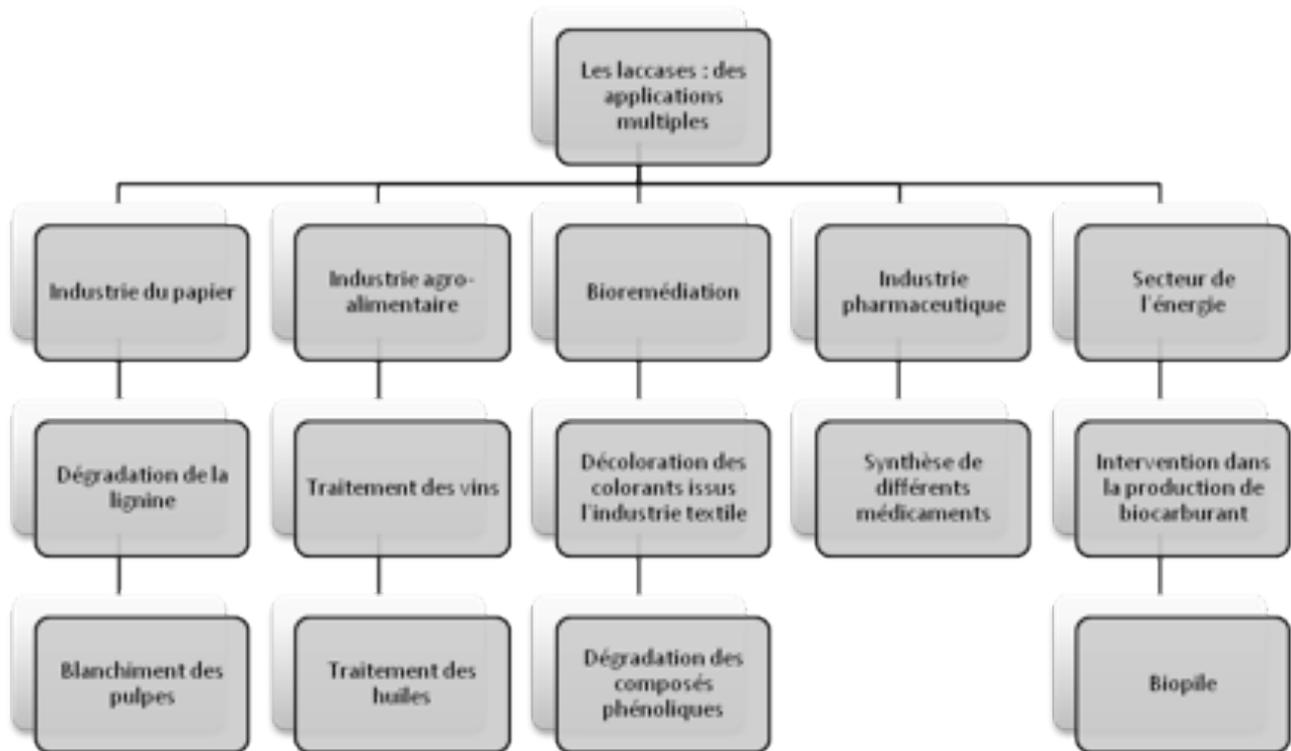
Coefficient : 2

SUJET

Des enzymes bleues pour la chimie verte

INTRODUCTION

Les laccases appartiennent à la famille des oxydases « bleu cuivre » (*blue copper oxidases*) qui présentent une bande d'absorption très intense vers 600 nm (bleu profond). Elles catalysent l'oxydation de nombreux substrats et sont considérées comme écologiques car la réaction se fait à partir du dioxygène de l'air et produit de l'eau comme seul sous-produit. Les travaux sur ces enzymes se sont démultipliés ces dernières années, sur fond de promotion des politiques de développement durable. Les secteurs d'application sont multiples :



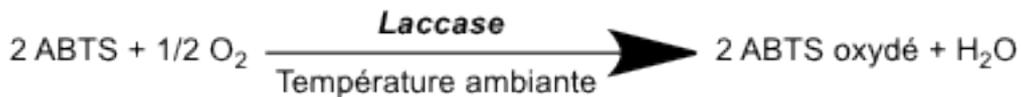
Parmi les stratégies déployées pour améliorer les performances des laccases (gain de stabilité, possibilité de réutilisation, etc.), l'immobilisation occupe une place de choix. D'autre part, des essais de stabilisation de l'enzyme soluble ont été mis en œuvre, par recouvrement avec un polymère de synthèse et pontage chimique.

Le sujet propose l'exploration de différents axes :

- 1) comparaison des performances d'une laccase « stabilisée » (**LacPG**) avec la laccase native : **PARTIE 1**
- 2) immobilisation de la laccase par deux méthodes :
 - rétention physique dans des billes d'alginate : **PARTIE 2**
 - fixation à la surface d'une membrane de nylon : **PARTIE 3**

SYSTÈME D'ÉTUDE ET EXTRAITS ENZYMATIQUES FOURNIS

Le système de référence des différentes études proposées est le suivant :



L'origine et les caractéristiques de la laccase étudiée ainsi que la formule du substrat et du produit sont détaillées dans le **DOCUMENT 1** du dossier technique.

La plupart des manipulations seront mises en œuvre à partir des solutions suivantes :

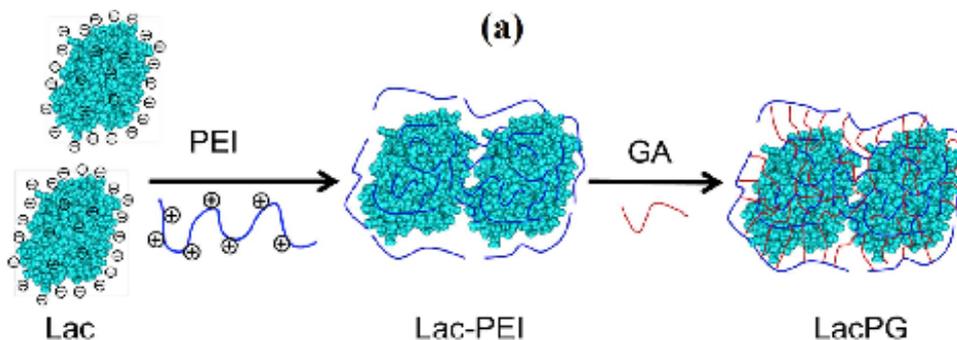
NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT	PARTIE(S) DU SUJET CONCERNÉE(S)
Lac	Laccase native à 20 g·L⁻¹ en tampon phosphate 0,05 mol·L ⁻¹ pH 5	Microtube 1 mL (glace)	Toutes les parties
LacPG	Laccase stabilisée à 0,2 g·L⁻¹ en tampon phosphate 0,05 mol·L ⁻¹ pH 5	Microtube 1,8 mL (glace)	PARTIE 1
ABTS	ABTS à 1 mmol·L⁻¹ en tampon phosphate 0,05 mol·L ⁻¹ pH 5	Flacon 150 mL	Toutes les parties
Tp pH 5	Tampon phosphate 0,05 mol·L ⁻¹ pH 5	Flacon 100 mL	Toutes les parties

Plusieurs des manipulations se font sur l'extrait **Lac** dilué au 1/100.

Préparer 10 mL de Lac au 1/100 en tampon phosphate 0,05 mol·L⁻¹ pH 5. Un flacon en plastique et une étiquette sont à disposition pour conserver cet extrait.

LacPG a été préparée en deux étapes :

- recouvrement de la laccase native au polyéthylène imine (PEI)
- pontage grâce au glutaraldéhyde (GA)



Extrait de Zhang et coll (2015), Ionic Polymer-Coated Laccase with High Activity and Enhanced Stability : Application in the Decolourisation of Water Containing AO7, Sci Rep. 2015; 5: 8253.

AVERTISSEMENT

1. Certains des produits utilisés présentent des risques chimiques ou biologiques. Le **DOCUMENT 2** présente les données de sécurité correspondantes. Veiller à manipuler ces produits en adoptant les mesures de précaution adaptées.
2. Le sujet est composé de trois parties comportant chacune plusieurs activités. L'ordre de réalisation des manipulations est laissé au choix du candidat.

PARTIE 1 :

ÉTUDE DES PERFORMANCES DE LA LACCASE STABILISÉE LACPG

L'étude ci-dessous complète les résultats présentés dans l'**ANNEXE 1**, qui montrent la stabilité de LacPG par rapport à la laccase native sur des temps de traitement importants.

I- DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES DE LA LACCASE STABILISÉE ET DE LA LACCASE NATIVE

I.1. Étude préliminaire : mise au point de la méthode en deux points

La **FICHE TECHNIQUE 1** présente différentes méthodes de mesure de l'activité laccase.

Le passage de la méthode cinétique en continu à la méthode deux points nécessite :

- le choix de la durée d'incubation ;
- le choix du réactif d'arrêt ;
- la détermination du coefficient d'absorption molaire de l'ABTS oxydé dans les conditions de la réaction arrêtée.

II.3.1) Détermination de la durée d'incubation

Effectuer une cinétique en continu pendant 5 minutes selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 1** avec Lac dilué au 1/100.

- Q1.** Indiquer quel témoin devrait être préparé en parallèle de la cinétique en précisant sa composition et son rôle.
- Q2.** Tracer la courbe $A_{405\text{ nm}} = f(t)$.
- Q3.** Commenter. En déduire la durée d'incubation retenue pour la méthode en deux points en semi-microcuvettes.

II.3.2) Choix du réactif d'arrêt

Plusieurs réactifs classiques sont disponibles afin d'arrêter la réaction :

NaOH 1 M	Solution d'hydroxyde de sodium à $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Tp pH 8	Tampon phosphate à $0,05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8
HCl 1 M	Solution d'acide chlorhydrique à $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
SDS 0,5 %	Solution de dodécylsulfate de sodium à 0,5 % (V/V) en eau déminéralisée

Mettre en œuvre une manipulation permettant de choisir le réactif d'arrêt le plus approprié.

- Q4.** Décrire le protocole mis en œuvre. Présenter les résultats obtenus.
- Q5.** Conclure.

II.3.3) Détermination du coefficient d'absorption molaire dans les conditions de la réaction arrêtée

ABTS oxydé	Solution d'ABTS oxydé en tampon phosphate pH 5
Tp pH 5	Tampon phosphate à 0,05 mol·L ⁻¹ pH 5
	Réactif d'arrêt choisi

Mettre en œuvre une ou plusieurs manipulations permettant de déterminer le coefficient d'absorption molaire de l'ABTS oxydé dans les conditions de la méthode en deux points, en utilisant les données du **DOCUMENT 1** du dossier technique.

Donnée :

Pour l'ABTS oxydé, la loi de Beer-Lambert est vérifiée jusqu'à une unité d'absorbance.

- Q6.** Décrire et justifier le protocole mis en œuvre. Présenter les résultats obtenus.
- Q7.** Calculer le coefficient d'absorption molaire de l'ABTS oxydé (L·mol⁻¹·cm⁻¹) dans les conditions de l'expérience.

I.2. Détermination des paramètres cinétiques

Les cinétiques sont effectuées sur différentes concentrations en ABTS par la **méthode en deux points en semi-microcuvés** selon la **FICHE TECHNIQUE 1**.

Préparer une série de dilutions de la solution mère d'ABTS en tampon pH 5 pour obtenir les concentrations suivantes :

[ABTS] μmol·L ⁻¹	20	40	80	160	320	640
--------------------------------	----	----	----	-----	-----	-----

Effectuer les cinétiques sur chacune des dilutions d'ABTS avec **LacPG non diluée** et **Lac diluée au 1/100^e**.

NB. : Pour la lecture des absorbances, préparer un seul témoin pour la concentration en substrat la plus élevée.

I.3. Compte rendu

- Q8.** Présenter le protocole suivi et les résultats.
- Q9.** Déterminer les paramètres cinétiques de la laccase et la laccase stabilisée en choisissant, à l'aide de l'**ANNEXE 2**, la représentation la plus adaptée.
- Q10.** Calculer la constante catalytique ou turnover (k_{cat} en s⁻¹) de chaque forme.
- Q11.** Calculer l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) de chaque forme.
- Q12.** Analyser les résultats obtenus.
- Q13.** Calculer la concentration d'activité catalytique (b en U·mL⁻¹) de la laccase native.

II- ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU PH

II.1. Mesure de l'activité laccase à différents pH

Les cinétiques sont effectuées à partir de la solution mère d'ABTS, à différents pH, par la **méthode en deux points en microplaques en adaptant le protocole de la FICHE TECHNIQUE 1.**

Une solution d'ABTS à $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en eau déminéralisée (**ABTS-ED**) est fournie, ainsi qu'une série de tampons phosphate $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$:

Tp pH 2,0 Tp pH 3,0 Tp pH 3,5 Tp pH 4,0 Tp pH 4,5 Tp pH 5,0 Tp pH 6,0 Tp pH 7,0

Effectuer les cinétiques aux différents pH avec **LacPG non dilué** et **Lac dilué au 1/100**.

Préparer en parallèle une série de témoins.

II.2. Compte rendu

- Q14.** Donner le protocole mis en œuvre pour la mesure de l'activité laccase à un pH donné. Indiquer la composition du témoin à un pH donné.
- Q15.** Tracer sur un même graphe les courbes $\Delta A_{405 \text{ nm}} = f(\text{pH})$ pour Lac et LacPG.
- Q16.** Analyser les résultats et conclure.

PARTIE 2 :

ÉTUDE DES PERFORMANCES DE LA LACCASE IMMOBILISÉE PAR INCLUSION EN BILLES D'ALGINATE

I- IMMOBILISATION PAR INCLUSION EN BILLES D'ALGINATE

Réaliser une immobilisation de la laccase à partir de Lac non dilué par inclusion en billes d'alginate selon la **FICHE TECHNIQUE 2**.

II- UTILISATION EN BATCH

II.1. Mesure de l'activité enzymatique

À l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 3**, mesurer l'activité de la laccase immobilisée en batch.

Q17. Analyser les différentes phases de la cinétique.

Q18. Déterminer l'activité enzymatique immobilisée (U par bille).

Q19. Calculer le rendement d'immobilisation.

II.2. Mesure de la fuite d'enzyme

Mesurer la fuite d'enzyme à l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 6**.

Q20. Calculer l'activité libérée dans le milieu en 15 minutes par bille.

Q21. Estimer le pourcentage d'activité libérée en 15 minutes dans le milieu.

III- UTILISATION EN RÉACTEUR À LIT FIXE

III.1. Mise en œuvre

Préparer un réacteur enzymatique à lit fixe et mettre en œuvre une production à partir de la **FICHE TECHNIQUE 3**.

III.2. Compte-rendu

Q22. On suppose l'état stationnaire atteint lors de l'expérience. Donner la signification de « état stationnaire » pour un réacteur enzymatique à lit fixe.

Q23. Tracer la courbe $A_{405\text{ nm}} = f(\text{volume cumulé des fractions})$. Analyser les résultats obtenus.

Q24. Calculer le taux de conversion (fraction de substrat convertie en produit pendant la réaction).

PARTIE 3 :

ÉTUDE DES PERFORMANCES DE LA LACCASE IMMOBILISÉE SUR MEMBRANE DE NYLON

I- IMMOBILISATION MEMBRANE DE NYLON

Réaliser une immobilisation de la laccase par liaison covalente sur quatre membranes de nylon selon la **FICHE TECHNIQUE 4**.

Q28. Donner les volumes de SAB et de glutaraldéhyde utilisés pour l'immobilisation.

II- UTILISATION EN BATCH

II.1. Mesure de l'activité enzymatique

À l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 3**, mesurer l'activité de la laccase immobilisée sur membrane de nylon.

Q29. Représenter la cinétique d'oxydation de l'ABTS par la laccase immobilisée sur membrane. Analyser les différentes phases.

Q30. Déterminer l'activité enzymatique immobilisée (U par membrane).

Q31. En déduire le rendement d'immobilisation.

Q32. Critiquer la méthode mise en œuvre pour la mesure de l'activité. Proposer un protocole alternatif. Dégager les avantages et les inconvénients du protocole proposé.

II.2. Mesure de la fuite d'enzyme

Mesurer la fuite d'enzyme à l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 6**.

Q33. Calculer l'activité libérée dans le milieu en 15 minutes.

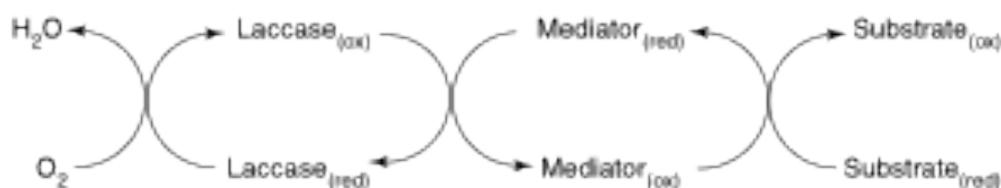
Q34. Estimer le pourcentage d'activité libérée dans le milieu par membrane.

II.3. Décoloration d'un colorant

II.3.1) Principe

Les colorants sont la partie la plus visible de la pollution des eaux usées. Les techniques usuelles de décoloration (coagulation, adsorption, oxydation par l'ozone...) sont longues et coûteuses et requièrent souvent l'utilisation de produits néfastes pour l'environnement. Dans cette mesure, les procédés utilisant des laccases semblent être une alternative très attractive.

Dans de nombreux cas les substrats d'intérêt ne peuvent être oxydés directement par la laccase, soit parce qu'ils sont trop grands pour pénétrer dans le site actif de l'enzyme, soit parce qu'ils ont un potentiel redox très élevé. Il est possible de contourner cette limite en ajoutant des « médiateurs chimiques » qui agissent comme intermédiaires entre l'enzyme et le substrat cible à oxyder :



Extrait de Riva S., *Laccases : blue enzymes for green chemistry*, Trends in Biotechnology, Vol.24 No.5 May 2006

Le médiateur le plus couramment utilisé est le HBT (1-HydroxyBenzoTriazol).

Le colorant modèle choisi pour cette étude est l'orange G.

Les cinétiques de décoloration à température ambiante étant lentes, l'étude sera menée à 50°C.

II.3.2) Mise en œuvre

Mettre en œuvre le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 7**.

II.3.3) Compte-rendu

Q35. Décrire les observations.

Q36. Calculer le pourcentage de décoloration pour chaque condition.

Q37. Analyser les résultats obtenus et discuter de l'utilisation des laccases dans le cadre de la décoloration des eaux usées.

SYNTHÈSE

Q38. Proposer une synthèse de l'ensemble des résultats.

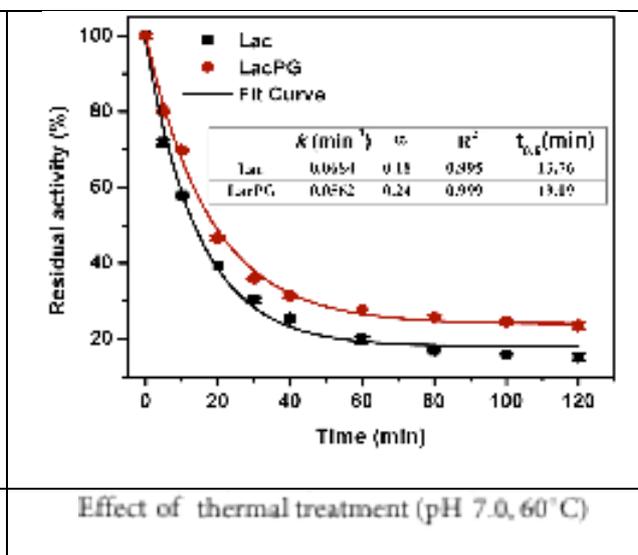
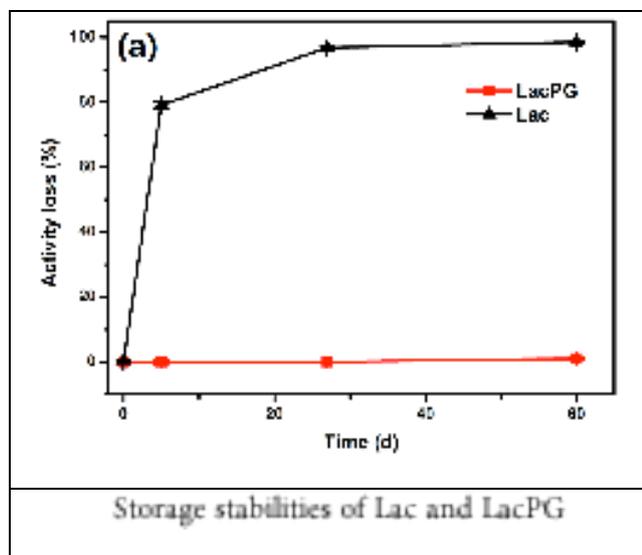
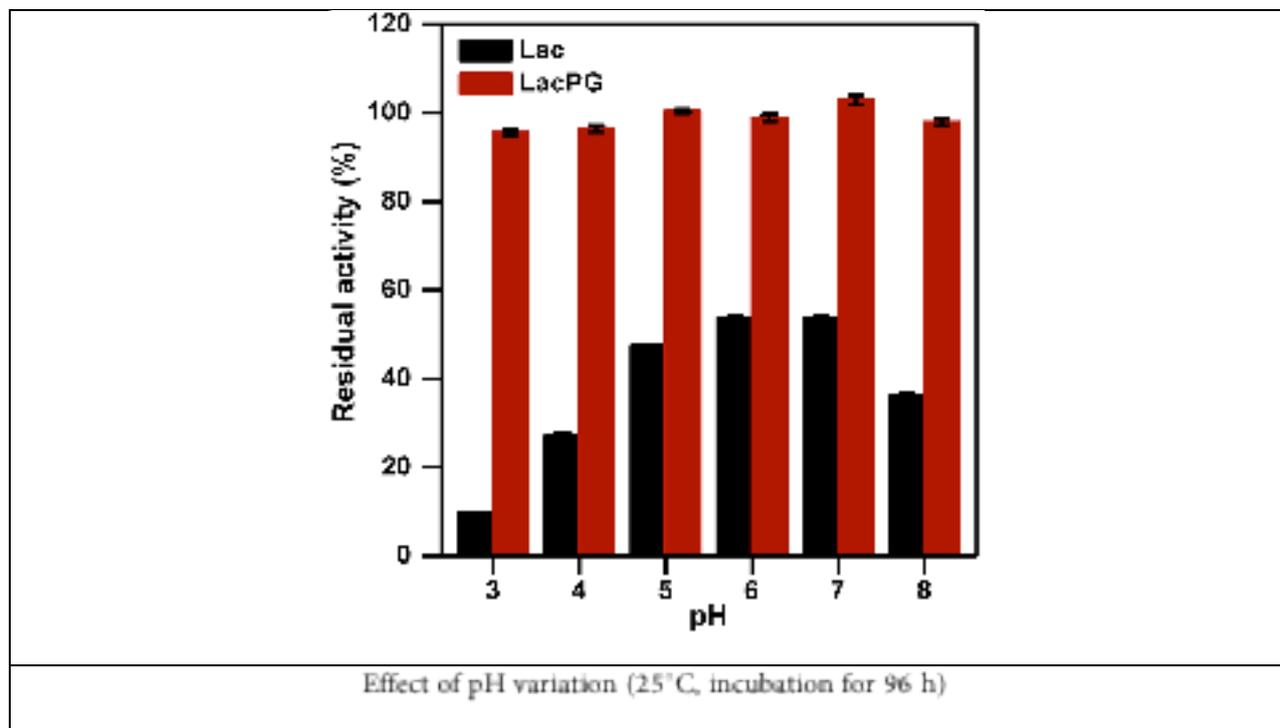
Q39. Dégager des perspectives.

Références :

Zhang X., Hua M., Lv L. & Pan B. (2015), *Ionic Polymer-Coated Laccase with High Activity and Enhanced Stability: Application in the Decolourisation of Water Containing AO7*, Scientific Reports, 5 : 8253.

Riva S. (2016), *Laccases : blue enzymes for green chemistry*, Trends in Biotechnology, Vol.24 No.5.

Extraits de Zhang et coll (2015), *Ionic Polymer-Coated Laccase with High Activity and Enhanced Stability : Application in the Decolourisation of Water Containing AO7*, Sci Rep. 2015; 5: 8253.



Extrait et adapté de Ritchie & Prvan (1996), *Current Statistical Methods for Estimating the K_M and V_{max} of Michaelis-Menten Kinetics*, Biochemical Education, Vol. 24, Issue 4

Table 1 Sample Data No 1 for Comparison of Different Methods of Estimating K_m and V_{max} . A set of sample enzymatic kinetic data, originally from Atkinson, Jackson and Morton⁴⁰ for comparison of various methods for estimating K_m and V_{max} . The approximate position of the K_m is shown by an arrow

Substrate [S]	Velocity V
0.138	0.148
0.220	0.171
0.291	0.234
0.560	0.324
	← K_m
0.766	0.390
1.460	0.493

Table 2 Unweighted and Weighted Double Reciprocal and Eadie-Hofstee Plots Compared to a Non-Linear Least Squares Michaelis-Menten Fit. Comparison of estimates of K_m and V_{max} using different fitting techniques using the data set shown in Table 1

	Lineweaver-Burk Fit	Hanes-Woolf Fit	Eadie-Hofstee Fit	Least Squares Michaelis-Menten Fit
$K_m \pm SE$	0.441 ± 0.0906	0.583 ± 0.0523	0.490 ± 0.0834	0.597 ± 0.0683
$V_{max} \pm SE$	0.585 ± 0.104	0.685 ± 0.0384	0.626 ± 0.0600	0.690 ± 0.0368
Regression (r)	0.979	0.994	-0.947	0.996
Probability (p)	0.06%	0.006%	0.42%	0.003%

Lineweaver-Burk Fit	$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$
Hanes-Woolf Fit	$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{max}} [S] + \frac{K_M}{V_{max}}$
Eadie-Hofstee Fit	$v = V_{max} - K_M \frac{v}{[S]}$

DOSSIER TECHNIQUE

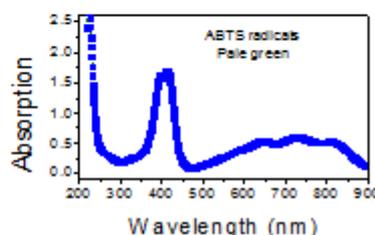
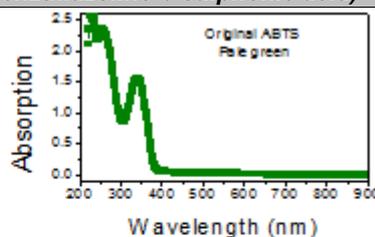
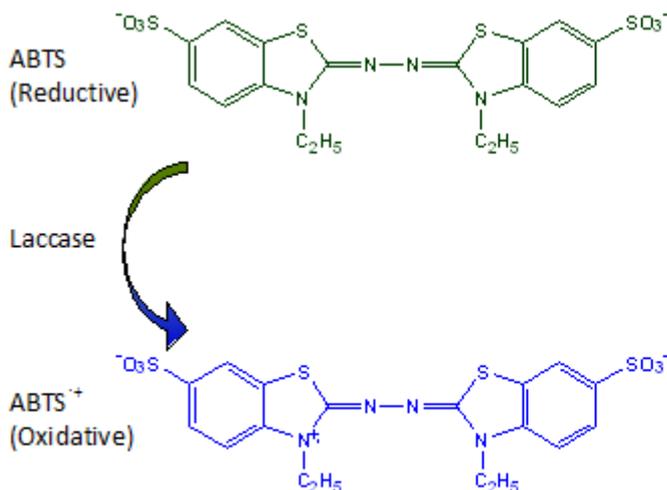
Le dossier technique est distribué à côté du sujet.

Caractéristique de la laccase utilisée

- EC. 1.10.3.2
- Organisme producteur : *Trametes versicolor*
- 520 acides aminés
- Masse moléculaire : 64 kDa
- pI : 3,1-3,3
- 10 à 12 % de glycosylation
- Laccase is a blue copper oxidase that reduces molecular oxygen to water. Laccase oxidizes polyphenols, methoxy-substituted phenols and diamines, but not tyrosine. Oxidation by laccase is an one-electron reaction that generates a free radical

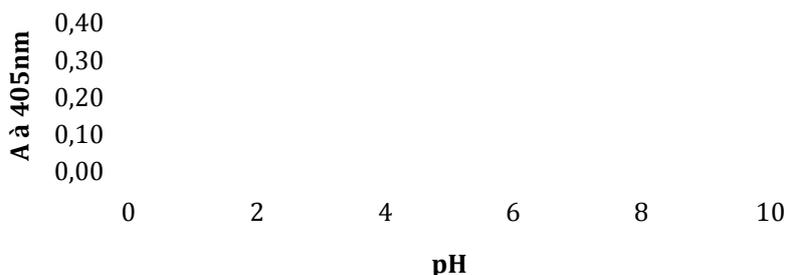


Furukawa et coll (2014), *Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation*, Frontiers in Biology, Volume 9, Issue 6, pp 448-471

Un substrat de la laccase : l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))

Liu, H.; Zhou, P.; Wu, X.; Sun, J.; Chen, S. Radical Scavenging by Acetone: A New Perspective to Understand Laccase/ABTS Inactivation and to Recover Redox Mediator. *Molecules* **2015**, *20*, 19907-19913

$\epsilon_{(ABTS \text{ oxydé})} = 36\,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 405 nm et en tampon phosphate pH 5

Influence du pH sur l'absorption de l'ABTS oxydé

Une **UNITÉ LACCASE (U)** correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la transformation d'une micromole d'ABTS par minute dans les conditions de l'expérience.

RISQUES CHIMIQUES

Acide chlorhydrique 1 mol·L⁻¹**Danger**

Peut être corrosif pour les métaux

Hydroxyde de sodium 1 mol·L⁻¹**Danger**

Peut être corrosif pour les métaux

Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires

Dodécyl Sulfate de Sodium 10 % (m/V)

**Danger**

Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.

Provoque des lésions oculaires graves

Glutaraldéhyde à 25% (V/V)



Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation

Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.

Peut provoquer une allergie cutanée.

Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.

Peut irriter les voies respiratoires.

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

MÉTHODE EN CONTINU EN SEMI-MICROCUVE

NB. : Pour les cinétiques en continu, le zéro du spectrophotomètre sera fait contre l'air, le substrat ou le milieu réactionnel.

1. Pré-incuber les réactifs à la température de l'expérience.
2. Introduire dans une semi-microcuve :
 - 1 mL de substrat tamponné ;
 - 100 μ L de solution enzymatique.
3. Mesurer la variation d'absorbance à 405 nm pendant 1 à 5 minutes.

MÉTHODE EN DEUX POINTS EN SEMI-MICROCUVE

1. Pré-incuber les réactifs à la température de l'expérience.
2. Introduire dans une semi-microcuve :
 - 1 mL de substrat tamponné ;
 - 100 μ L de solution enzymatique.
3. Incuber *x* minutes à température ambiante.
4. Arrêter la réaction avec 200 μ L de solution d'arrêt.
5. Lire l'absorbance à 405 nm contre un témoin.

MÉTHODE EN DEUX POINTS EN MICROPLAQUE 96 PUIITS

1. Introduire dans un puits :
 - 100 μ L de substrat tamponné ;
 - 10 μ L de solution enzymatique.
2. Incuber 4 minutes à température ambiante.
3. Arrêter la réaction avec 50 μ L de solution d'arrêt.
4. Lire l'absorbance à 405 nm contre l'air.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL SPÉCIFIQUES

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
<i>Alginate</i>	Solution d'alginate à 2 % (m/V) en eau déminéralisée	Tube à hémolyse 2 mL
<i>CaCl₂</i>	Solution de chlorure de calcium à 0,1 mol·L ⁻¹	Flacon de 100 mL

- Becher de 200 mL
- Compresse, élastique
- Boîte de Petri
- Spatule métallique
- Fond noir

MODE OPÉRATOIRE

Remarque préliminaire :

La forte viscosité de l'alginate impose d'effectuer les pipetages lentement pour éviter la formation de bulles.

1. Introduire dans un becher environ 100 mL de **CaCl₂**.
2. Ajouter 100 µL de **Lac** aux 2 mL d'alginate.
3. Homogénéiser soigneusement à la spatule ou par aspiration/refoulement. Laisser reposer 5 minutes. Si d'importantes bulles persistent, centrifuger 2 minutes à 1500 RPM.
4. Prélever le mélange *alginate* + *laccase* à la P1000.
5. Laisser tomber le mélange *alginate* + *laccase* goutte à goutte quelques cm au-dessus de la solution de CaCl₂. L'expulsion des gouttes peut se faire par pression modérée sur le piston.
6. Laisser reposer au moins 10 minutes.
7. Éliminer la solution de chlorure de calcium en retenant les billes à l'aide d'une compresse en utilisant éventuellement un élastique pour retenir la compresse.
8. Rincer les billes avec 50 mL d'eau déminéralisée. Répéter 1 fois (2 fois en tout).
9. Placer les billes dans une boîte de Petri. Éliminer l'éventuel surplus de liquide avec un papier filtre. Compter les billes en plaçant la boîte sur fond noir. Sélectionner les billes de forme régulière et sans bulles. Montrer l'ensemble des billes à l'examineur.
10. Conserver sur la glace jusqu'à utilisation.

PROCÉDÉ EN BATCH**MODE OPÉRATOIRE**

1. Introduire 5 billes dans une semi-microcuve à l'aide d'une spatule ou/et d'une pince.
2. Ajouter 1 mL d'ABTS.
3. Lire l'absorbance à 405 nm toutes 30 secondes pendant 6 minutes en homogénéisant après chaque lecture.

PROCÉDÉ EN FLUX : RÉACTEUR ENZYMATIQUE À LIT FIXE**RÉACTIFS ET MATÉRIEL SPÉCIFIQUES**

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Réactif d'arrêt	Choisi en fonction du résultat de l'étude préliminaire	Flacon 10 mL

- Colonne de 10 mL + capillaire à l'extrémité
- Potence + support pour fixer la colonne
- Pince de Mohr
- Seringue

MODE OPÉRATOIRE**Remarque préliminaire :**

Lors de la percolation du tampon ou du substrat, veiller à maintenir le volume au dessus des billes à un niveau supérieur à la graduation 5 de la colonne (au-dessus de l'étranglement) de façon à assurer une pression à peu près constante.

Réglage du débit

Le réglage du débit se fait avec du tampon pH 5. Lors de cette opération l'effluent est récupéré dans une poubelle (becher ou autre). Si le débit semble varier de façon importante dans la suite de l'expérience, le réajuster.

1. Fixer la colonne sur la potence.
2. Introduire 10 billes dans la colonne à l'aide d'une pince ou d'une spatule.
3. Remplir la colonne de tampon pH 5 en le versant directement au flacon ou à l'aide d'une pipette. Si le tampon ne coule pas, le pousser en tête de colonne avec le piston de la seringue.
4. Ajuster le débit à $1,5 \pm 0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ avec la pince de Mohr.

Mise en œuvre du réacteur enzymatique

5. Éliminer le tampon pH 5 à la P1000. Le remplacer par l'ABTS. Lors de cette opération, les billes peuvent rester brièvement à sec.
6. Récolter 10 fractions de 1,1 mL dans des semi-microcuves contenant 200 μL de réactif d'arrêt.
7. Lire l'absorbance de chaque fraction à 405 nm.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL SPÉCIFIQUES

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Glutaraldéhyde	Glutaraldéhyde à 25 % (m/V) en eau déminéralisée	Microtube 100 µL
SAB	Solution étalon de sérumalbumine à 70 mg·mL ⁻¹ en eau physiologique	Microtube 500 µL

- Pince métallique
- Plaque 6 puits contenant quatre membranes de nylon

MODE OPÉRATOIRE

1. Dans un microtube préparer un mélange contenant 0,42 mg de SAB, 2 % (m/V) de glutaraldéhyde et compléter avec la solution enzymatique pour un volume final de 100 µL. Ajouter le glutaraldéhyde en dernier.
2. Mélanger soigneusement et déposer immédiatement 10 µL du mélange sur une membrane de nylon.
3. Laisser sécher 30 minutes à température ambiante.
4. Ajouter 10 mL de tampon pH 5 dans le puits.
5. Homogénéiser la solution par aspiration/refoulement pendant 30 secondes.
6. Rincer la membrane avec 50 mL d'eau déminéralisée.
7. Laisser sécher jusqu'à utilisation.
8. Avant utilisation, immerger la membrane pendant 2 minutes dans du tampon pH 5.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL SPÉCIFIQUES

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Réactif d'arrêt	Choisi en fonction du résultat de l'étude préliminaire	Flacon 10 mL

- Becher de 50 mL
- Plaque 96 puits
- Agitateur magnétique

MODE OPÉRATOIRE

1. Introduire dans un becher 25,0 mL d'ABTS.
2. Mettre sous agitation douce à température ambiante.
3. Ajouter l'enzyme immobilisée sur membrane de nylon. Veiller à ce que la membrane ne reste pas bloquée sous l'agitateur magnétique.
4. Prélever 220 μ L toutes les minutes pendant 10 minutes. Transférer dans un puits contenant 40 μ L de solution d'arrêt.
5. Lire l'absorbance à 405 nm contre un témoin adapté.

Donnée :

- Trajet optique pour cette manipulation : $l = 8,3$ mm

MODE OPÉRATOIRE

1. Dans un microtube introduire une membrane de nylon préparée à l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 5** ou quatre billes préparées à l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 3**.
2. Ajouter 1,4 mL de tampon pH 5.
3. Incuber 15 minutes à température ambiante en homogénéisant régulièrement par retournement.
4. Pour chaque échantillon, transférer dans une semi-microcuve, 500 μ L de surnageant.
5. Ajouter 1 mL d'ATBS.
6. Lire immédiatement l'absorbance à 405 nm contre l'air.
7. Incuber pendant un temps exact compris entre 10 à 20 minutes.
8. Mesurer l'absorbance à 405 nm contre l'air.
Effectuer un témoin approprié.

RÉACTIFS

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
HBT	1-hydroxybenzotriazole hydrate à $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en tampon phosphate $0,05 \text{ M}$ pH 7	Microtube 1 mL
AO 7	Orange G à $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en tampon phosphate $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 5	Flacon 15 mL
Tp pH 7	Tampon phosphate $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7	Flacon 20 mL

MODE OPÉRATOIRE

1. Introduire dans des semi-microcuvettes les réactifs suivants :

Cuve	0	1	2	3	4	5
V_{AO7} (mL)		1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$V_{\text{tampon pH 5}}$ (mL)	1,5					
V_{HBT} (μL)		100	100		100	
$V_{\text{tampon pH 7}}$ (μL)	100			100		100

2. Lire l'absorbance à 470 nm contre la cuvette 0.
3. Préincuber 3 minutes environ à 50°C .
4. Ajouter dans les tubes 2 et 3 : $10 \mu\text{L}$ de **Lac**.
5. Ajouter dans les tubes 4 et 5 une membrane de nylon préparée à l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 5**. Veiller à l'immersion complète de la membrane.
6. Incuber de 40 minutes à 1 heure à 50°C .
7. Observer l'aspect des différentes cuvettes.
8. Lire l'absorbance à 470 nm contre la cuvette 0 après avoir retiré la membrane le cas échéant.

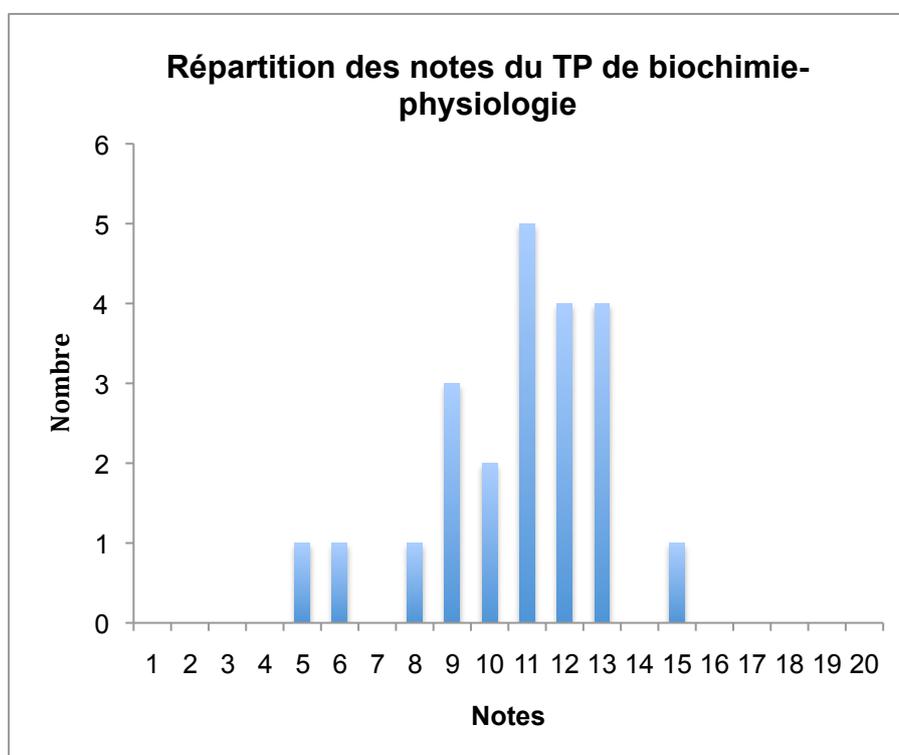
RAPPORT DU JURY DE TP DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Des enzymes bleues pour la chimie verte

Résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,3 / 20**
- Meilleure note : **14,4 / 20**
- Note la plus basse : **04,4 / 20**
- 14 notes sur 22 (**64 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20

Histogramme de répartition



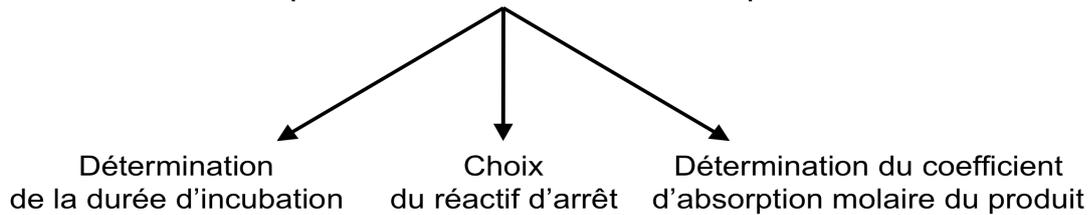
COMMENTAIRES GÉNÉRAUX SUR L'ÉPREUVE

Description de l'épreuve

Le sujet portait sur des essais d'optimisation de la laccase, oxydase catalysant la transformation d'un large spectre de substrats. Il s'agissait de préparer et de tester les performances de différentes formes modifiées de l'enzyme dans la perspective d'applications bio-industrielles. Presque toutes les manipulations portaient sur le même système d'étude : l'oxydation d'un substrat chromogène à température ambiante. La simplicité du système permettait la démultiplication des tests, à commencer par des manipulations préliminaires permettant de déterminer les conditions de mise en œuvre de la méthode en deux points.

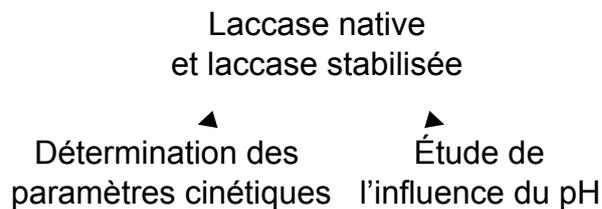
Étude préliminaire

Mise au point de la méthode en deux points



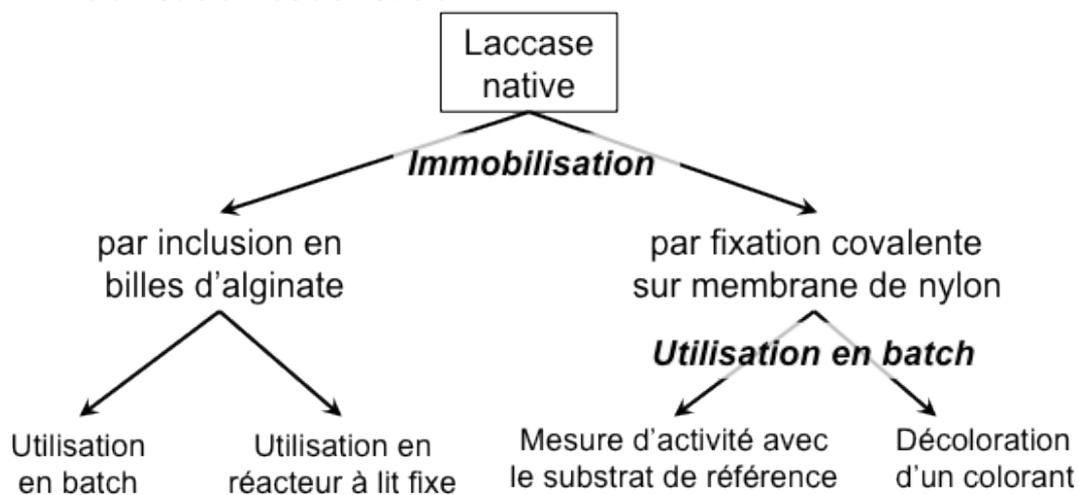
La première partie proposait des études classiques d'enzymologie en **phase homogène** :

Étude des performances d'une forme « stabilisée » soluble (extrait fourni)



Les deux parties suivantes consistaient à mettre en œuvre divers procédés en **phase hétérogène** :

Immobilisation et utilisation



Aspects techniques

L'organisation du travail nécessite que les candidats prennent le temps de bien lire l'ensemble du sujet, afin de :

- faire l'inventaire du matériel et des réactifs à disposition, pour s'assurer de la bonne identification des réactifs et les relier à une manipulation donnée ;
- prévoir les manipulations présentant des temps d'attente pendant lesquels d'autres manipulations ou la rédaction du compte rendu peuvent être réalisées.
- lire les principes avant de se lancer dans les manipulations pour identifier les gestes critiques ou élaborer un protocole ;
- effectuer en parallèle des opérations identiques (ex. : immobilisation des enzymes) pour optimiser le temps de manipulation.

Précisons d'autre part que, s'il est préférable de respecter les durées d'incubation indiquées dans les protocoles, certains aménagements sont parfois possibles dans le but de terminer une manipulation dans le temps imparti.

Pour ce qui est de la maîtrise des techniques de base en enzymologie, pour le moins importante dans le cadre d'un concours de recrutement de professeurs de biotechnologies, rappelons que la pré-incubation des réactifs à la température de l'expérience et l'homogénéisation du milieu réactionnel sont indispensables.

Rappelons enfin que la gestion des risques au laboratoire fait partie du métier d'enseignant. L'attitude appropriée ne consiste pas à porter gants et lunettes tout le long de l'épreuve (y compris lors de la rédaction du compte rendu) mais à en limiter l'usage aux situations à risque. Au-delà de ces manquements, quelques attitudes extrêmes ont été observées : organisation chaotique de la paillasse entraînant une contamination non contrôlée, mâchage de chewing-gum (!)...

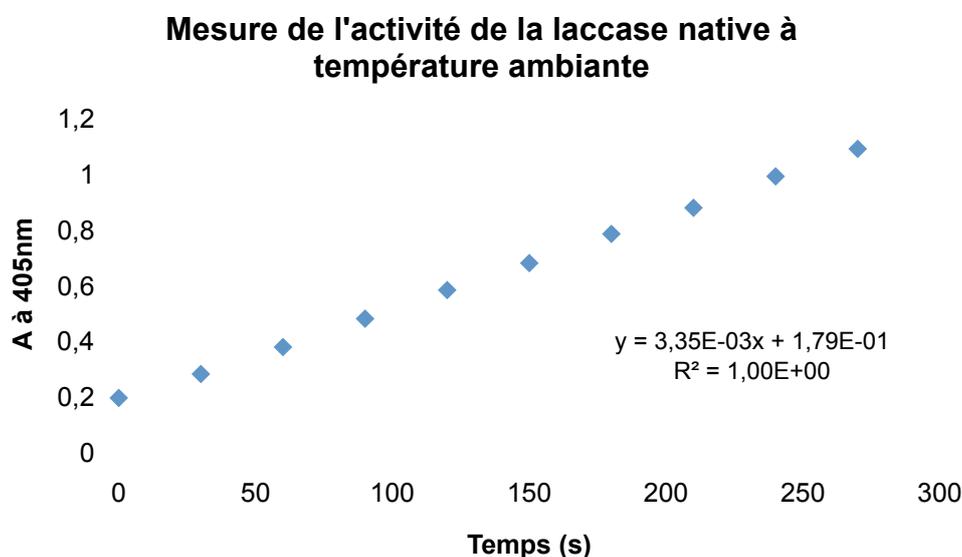
Aspects rédactionnels

Même dans le cas d'une épreuve pratique, la forme écrite est prise en compte. Les efforts de présentation du compte rendu sont toujours valorisés : questions bien numérotées, résultats clairement identifiés, schémas d'organisation, etc. La plupart des résultats bruts étant consignés sur des carnets mis à disposition, il est inutile de les recopier sur la copie. Lorsque les résultats sont édités automatiquement par un appareil (lecteur de microplaques par exemple), les enregistrements doivent être identifiés, éventuellement annotés. Ces efforts peuvent s'étendre aux fichiers informatiques construits par les candidats : graphiques avec titre, axes, unités, coefficients de corrélation, etc.

PARTIE 1

ÉTUDE DE LA LACCASE STABILISÉE LAC-PG

La **cinétique en continu** permettait de déterminer le temps de réaction adéquat pour transposer la méthode en méthode en deux point.



La vitesse est constante pendant les cinq minutes de réaction, la cinétique est toujours en phase initiale. Une durée d'incubation inférieure ou égale à cinq minutes assure donc la mesure de la vitesse initiale par la méthode en deux points. Il était judicieux de choisir une durée suffisante pour faciliter la réalisation des mesures et permettant d'obtenir une variation de signal significative, pas trop importante pour limiter la durée des manipulations. Une incubation comprise entre une trois minute était satisfaisante.

Ce choix ne présentait aucune difficulté théorique ni pratique et permettait de vérifier la maîtrise d'une des activités les plus courantes au laboratoire de biotechnologie. De manière surprenante, un nombre significatif de candidats n'a pas obtenu de cinétique linéaire dans les conditions proposées, faute d'avoir pré-incubé l'enzyme à température ambiante ou homogénéisé convenablement le milieu réactionnel. Le plus gênant est de ne pas avoir tenu compte d'un résultat non conforme. Refaire une cinétique ne présentait pourtant aucune difficulté et ne prenait que quelques minutes.

Pour le **choix du réactif d'arrêt**, parmi les quatre proposés (soude ou acide chlorhydrique concentrés, tampon pH 8, dodécylsulfate de sodium), aucun protocole n'était imposé : il s'agissait d'une mise au point. Plusieurs solutions étaient envisageables, la plus simple consistant à mettre en œuvre en parallèle quatre cinétiques par méthode en deux points et d'arrêter chaque réaction avec un réactif différent. Le tampon pH 8 et le SDS s'avèrent inefficaces, l'absorbance continuant à augmenter après ajout du réactif. Les deux autres réactifs stoppent bien la réaction mais la soude concentrée décolore le produit, le signal obtenu est donc trop faible. Rappelons que l'influence du pH sur l'absorbance d'un produit est un classique de l'enzymologie, avec l'exemple du 4-nitrophénol, produit d'hydrolyse du 4-nitrophénylphosphate, substrat de référence de la phosphatase alcaline (produit jaune en milieu alcalin, incolore en milieu acide). En conséquence, dans le cas du produit d'oxydation de l'ABTS, c'est l'acide chlorhydrique qu'il fallait sélectionner comme réactif d'arrêt.

La **détermination du coefficient d'absorption molaire de l'ABTS oxydé** dans les conditions de l'expérience était également laissée à l'initiative des candidats. Le protocole suivant pouvait être appliqué :

- réaliser une dilution de la solution d'ABTS oxydée dans du tampon pH 5 pour obtenir une absorbance inférieure à 1 ;
- en déduire la concentration de la solution d'ABTS oxydé grâce à la loi de Beer-Lambert ;
- transférer dans une cuve 1,1 mL de la solution d'ABTS oxydé diluée dans du tampon pH 5 et ajouter 200 μ L de réactif d'arrêt ;
- calculer la concentration de la solution d'ABTS après dilution dans la cuve ;
- mesurer l'absorbance de la solution ;
- en déduire la valeur du coefficient d'absorption molaire.

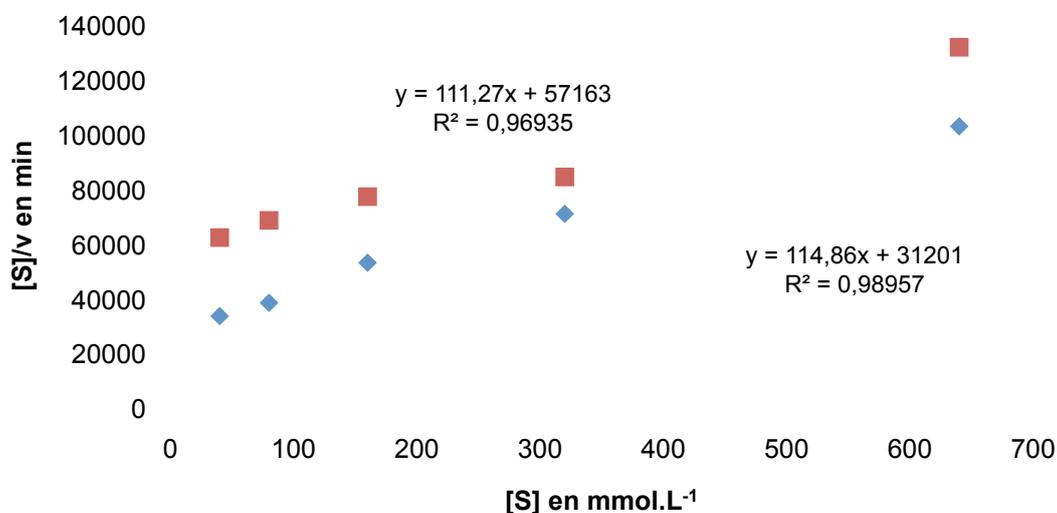
Une absorbance molaire de l'ordre de $36.10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ était attendue.

La **détermination des paramètres cinétiques** des deux enzymes solubles fournies était des plus classiques. Ce type d'activité met en valeur le sens de l'organisation puisqu'il faut gérer un ensemble de tubes en décalant le déclenchement et l'arrêt de la réaction. Dans cette mesure, il est étonnant de voir certains candidats se lancer dans la manipulation sans protocole. Car ici encore, il ne s'agissait pas d'exécuter une recette mais de mettre au point un petit protocole très classique d'enzymologie.

Une fois les résultats obtenus, il était inutile de tracer la courbe de saturation $v_i = f([S])$, la détermination des paramètres cinétiques devant se faire après linéarisation. Le choix de la méthode d'Hanes et Woolf était orienté par l'extrait de publication de l'annexe 2 indiquant la corrélation des principaux modèles de détermination de K_M et $v_{i \text{ max}}$.

Détermination des paramètres cinétiques de Lac et Lac-PG

Réprésentation d'Hanes et Woolf



	Lac	LacPG
$v_i \text{ max}$ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	8,7	8,9
K_M ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$2,7\cdot 10^2$	$4,9\cdot 10^2$

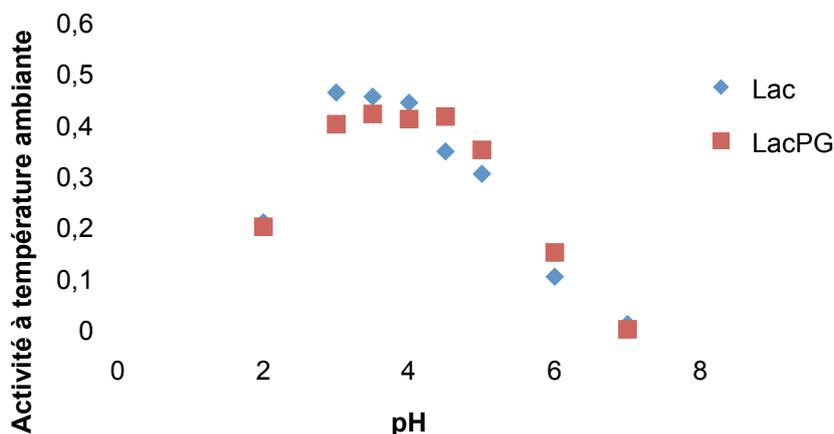
La mesure de la vitesse maximale permettait de calculer la concentration d'activité catalytique nécessaire aux calculs ultérieurs :

$$b = v_{i \text{ max}} \times \frac{V_{\text{milieu réactionnel}}}{V_{\text{enzyme}}} \times Fd \quad \text{avec } Fd = \text{facteur de dilution}$$

La concentration d'activité catalytique est donc de $9,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Enfin, l'étude de l'influence du pH passait par l'adaptation du protocole de la méthode en deux points, puisqu'il n'était plus question d'utiliser le substrat tamponné à pH 5. Il fallait lui substituer un mélange de substrat non tamponné, en eau distillée, et de tampon au pH étudié.

Influence du pH sur l'activité laccase



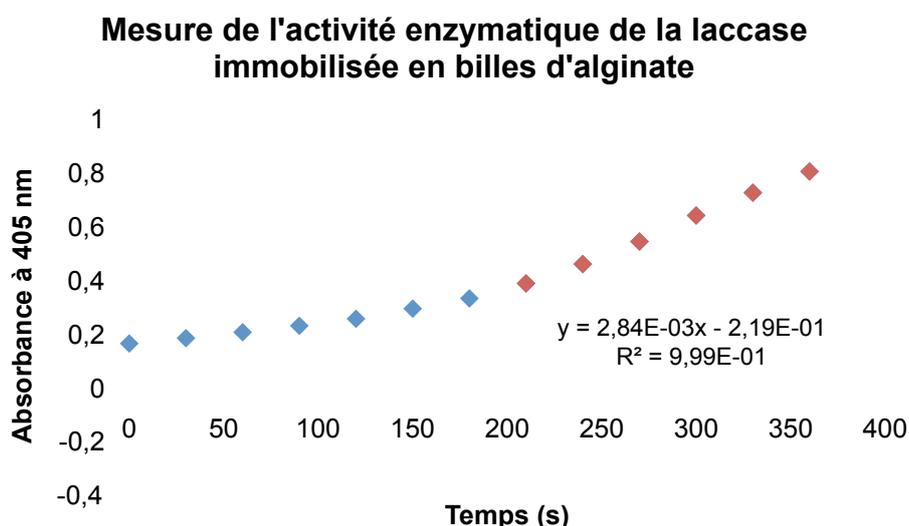
La comparaison des deux courbes montre que la forme stabilisée LacPG ne présente pas une grande différence avec l'enzyme native. À peine perçoit-on un léger élargissement de la courbe qui pourrait soutenir l'idée d'un gain de stabilité vis-à-vis du pH, mais il est clair que ce seul résultat ne fait pas la preuve de l'efficacité du procédé. Dans les commentaires, il est essentiel de rester proche des résultats effectivement obtenus, de ne pas leur faire dire ce qu'ils ne disent pas s'ils ne vont pas dans le sens attendu.

PARTIE 2

ÉTUDE DES PERFORMANCES DE LA LACCASE IMMOBILISÉE PAR INCLUSION EN BILLES D'ALGINATE

L'immobilisation par inclusion dans l'alginate ne pose pas de problèmes particuliers, elle donne un ensemble de billes plus ou moins homogènes faciles à manipuler.

Le premier test proposé, en « batch », c'est-à-dire en système fermé, sans flux de substrat, se fait directement en cuve de spectrophotométrie.



La cinétique obtenue montre clairement deux phases :

- une phase de latence, précédant l'état stationnaire, caractéristique des cinétiques en phase hétérogène. Dans le cas d'une immobilisation par inclusion dans un solide poreux, il s'agit d'un transfert de matière par **diffusion** intraparticulaire, ce qu'une poignée de candidats a mentionné.
- la phase stationnaire ou phase de vitesse initiale, à partir de laquelle on calcule la vitesse de réaction.

$$z = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon \cdot l} \times \frac{V_{\text{milieu réactionnel}}}{\text{nombre de billes}} \quad \text{en négligeant le volume des billes.}$$

L'activité enzymatique par bille est donc de $0,95 \cdot 10^{-3}$ U

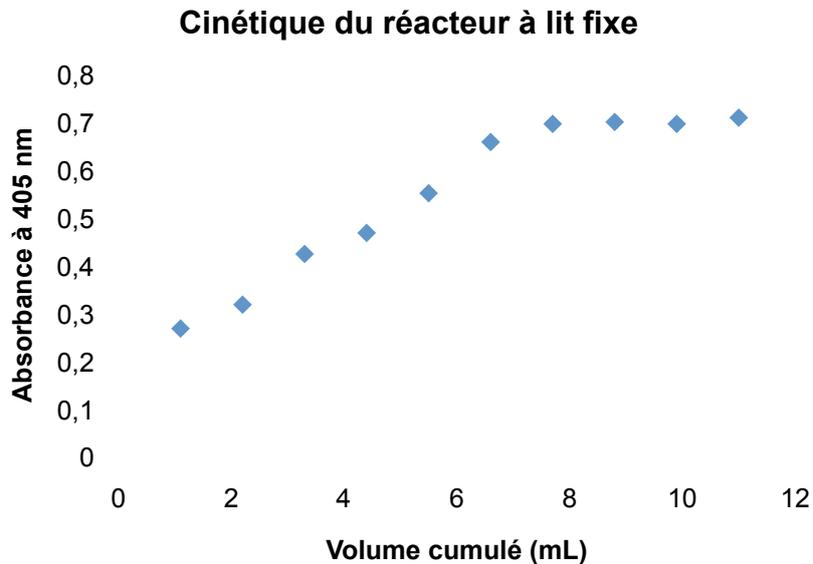
Le nombre de billes obtenues en utilisant 100 μ L d'enzyme lors de l'immobilisation est proche de 50. Chaque bille contient théoriquement l'équivalent de 2 μ L de solution enzymatique initiale.

L'activité enzymatique par bille devrait être de $19 \cdot 10^{-3}$ U car $z_{\text{théorique par bille}} = b \times V_{\text{immobilisé}}$

Le rendement de l'immobilisation est donc de 5 %.

Concernant la **fuite d'enzyme**, à considérer pour évaluer la qualité de procédés d'immobilisation, l'exploitation des résultats la plus adaptée passe par le calcul de l'activité libérée, qui permet une comparaison avec l'activité fixée. L'utilisation directe des variations d'absorbance par unité de temps est plus délicate.

L'adaptation du procédé à un système en flux descendant ou **réacteur à lit fixe** passait par un montage simple à l'aide d'une petite colonne fixée à une potence, le substrat étant rajouté à la pipette et percolant par gravité.



Dans la première phase, l'augmentation progressive de concentration en produit dans les fractions correspond à la diffusion du substrat dans les billes d'alginate.

Le plateau indique que la phase stationnaire est atteinte : la vitesse de formation du produit est constante, les fractions recueillies en sortie de colonne ont une concentration en produit constante. Les cinétiques en phase hétérogène sont certes peu connues des candidats, mais ici l'analyse devait rester essentiellement qualitative. Pour la question 25 évoquant l'influence du débit sur le taux de conversion, il était possible de s'appuyer sur l'équation fournie (modèle de Lily Hornby).

PARTIE 3

ÉTUDE DES PERFORMANCES DE LA LACCASE IMMOBILISÉE SUR MEMBRANE DE NYLON

L'immobilisation de la laccase à la surface d'une membrane de nylon passe par un séchage d'au moins 30 minutes à température ambiante mais ne présente pas de difficultés techniques. Pour le procédé en batch avec prélèvements réguliers, la cinétique d'oxydation de l'ABTS peut être représentée de deux manières :

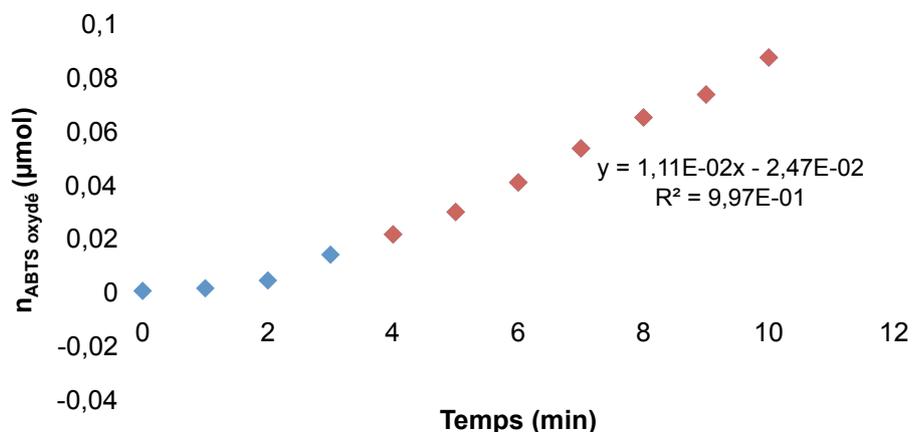
- en traçant directement $A_{405\text{ nm}} = f(t)$, cette représentation supposant que le volume prélevé dans le bécher était négligeable devant le volume résiduel ;
- en calculant le nombre mole d'ATBTS oxydé puis en traçant : $n_{\text{ABTS oxydé au temps } t} = f(t)$ avec

$$n_{\text{ABTS oxydé au temps } t} = n_{\text{ABTS oxydé dans le bécher au temps } t} + n_{\text{ABTS prélevé au temps } t-1}$$

$$n_{\text{ABTS oxydé dans le bécher au temps } t} = A_{\text{au temps } t} \times \frac{1}{\epsilon \cdot l} \times V_{\text{bécher au temps } t}$$

$$n_{\text{ABTS prélevé au temps } t-1} = A_{\text{au temps } t-1} \times \frac{1}{\epsilon \cdot l} \times V_{\text{lecture}}$$

Mesure de l'activité de l'enzyme immobilisée sur membrane de nylon



Les deux phases caractéristiques de la catalyse hétérogène sont de nouveau observées. La première phase est liée au transfert de matière liquide-solide : le substrat se déplace du cœur de la phase liquide à l'interface liquide-solide où il est consommé. Un régime quasi-stationnaire est rapidement atteint, la concentration en substrat à l'interface s'établit à une valeur telle que la vitesse de transfert de matière soit égale à la vitesse de la bioréaction.

Avec les unités retenues sur le graphe ci-dessus, l'activité enzymatique fixée par membrane est obtenue directement par la pente de la partie linéaire de la courbe.

$$\text{Ici, } z = 11 \cdot 10^{-3} \text{ U}$$

10 μL de mélange SAB + glutaraldéhyde + enzyme ont été déposés, soit 8,6 μL d'enzyme. L'activité correspondante est de $82 \cdot 10^{-3} \text{ U}$.

Le rendement de l'immobilisation est donc de 14 %.

Pour la **fuite d'enzyme**, de nombreux candidats ont traité en parallèle les manipulations et le compte rendu pour les deux méthodes d'immobilisation. Les résultats bruts ne pouvaient être comparés directement car la fuite dépend à la fois du support mais également de la quantité d'enzyme immobilisée initialement. Le témoin permettait de mesurer l'absorbance du substrat.

	Billes d'alginate	Membranes de nylon	Témoin
A à 405 nm (t = 0)	0,111	0,104	0,103
A à 405 nm (t = 10 min)	0,276	0,122	0,105
Activité libérée dans le milieu en 15 minutes par bille/membrane (U/bille ou U/membrane)	$4,7 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-4}$	-
Activité par bille ou par membrane calculée précédemment (U)	$9,5 \cdot 10^{-4}$	$11,1 \cdot 10^{-3}$	-
Pourcentage d'activité libérée par bille ou par membrane en 15 minutes	50 %	2 %	

$$z = \frac{\Delta A_{\text{essai}} - \Delta A_{\text{témoin}}}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon \cdot l} \times \frac{V_{\text{milieu réactionnel}}}{V_{\text{prise d'essai}}} \times \frac{V_{\text{surchargeant}}}{\text{nombre de billes}}$$

Les tests de **décoloration d'un colorant orange** étaient entièrement décrits dans la fiche technique 7. Cette partie ne nécessitait aucune mise au point. Il fallait juste tenir compte d'une durée d'incubation conséquente (au moins 40 minutes) dans l'organisation du travail. En revanche, l'exploitation des résultats était très rapide puisqu'il s'agissait, pour chaque condition testée, de comparer l'absorbance initiale et l'absorbance après l'incubation.

Cuve	1	2	3	4	5
A à 470 nm	0,294	0,297	0,294	0,295	0,296
A à 470 nm après 1h à 50°C	0,293	0,075	0,290	0,088	0,090
Observation après 1h à 50°C	Aucun changement	Liquide peu coloré	Aucun changement	Liquide peu coloré /membrane orange	Liquide peu coloré /membrane orange
Pourcentage de décoloration	0 %	75 %	1 %	70 %	70 %

L'auxiliaire d'oxydoréduction (HBT) seul n'est pas suffisant pour provoquer la décoloration de la solution (cuve 1). Il est cependant indispensable pour que l'enzyme puisse agir efficacement (comparaison des cuves 2 et 3).

Les solutions mises en présence des enzymes immobilisées sur membrane sont décolorées de manière identique en présence ou en l'absence de HBT (cuves 4 et 5). Les membranes sont fortement colorées, le colorant orange s'adsorbe sur les membranes. Ce phénomène est plus rapide que la décoloration enzymatique.

SYNTHÈSE

D'après les résultats des tests mis en œuvre, les performances de la forme soluble « stabilisée » LacPG ne semblent pas spectaculairement améliorées par rapport à l'enzyme native. La consultation de l'annexe 1, présentant des résultats obtenus avec des temps de traitement importants, montre des différences plus marquées. Les formes solubles ne peuvent cependant pas être réutilisées et n'autorisent pas les procédés en flux, ce qui limite leur utilisation dans un contexte de dépollution.

En phase hétérogène, que l'immobilisation soit réalisée en surface ou par inclusion dans un solide poreux, une phase de latence s'observe, liée au déplacement des molécules de substrat vers les enzymes. Cette phase est suffisamment brève pour qu'on puisse considérer qu'elle ne limite pas l'utilisation de ces formes. La décoloration de l'orange fonctionne mais plutôt lentement, et la nécessité d'utiliser un auxiliaire d'oxydo-réduction est peut-être un inconvénient dans une perspective de dépollution.

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

Développement d'un vaccin contre la pseudotuberculose

INTRODUCTION

La pseudotuberculose est une maladie bactérienne contagieuse, causée par *Yersinia pseudotuberculosis*, qui touche de nombreuses espèces animales. La pseudotuberculose est également une zoonose car elle est transmissible à l'homme.

La contamination se fait principalement par voie oro-fécale. Après son ingestion, *Yersinia pseudotuberculosis* est capable de disséminer vers les ganglions mésentériques entraînant une adénite mésentérique. Ceci se traduit par un syndrome d'appendicite aiguë pouvant conduire dans les formes les plus graves à une septicémie fatale.

De nombreuses espèces sont particulièrement sensibles à ce germe comme les oiseaux, les rongeurs et les primates. De graves épizooties sont parfois constatées dans les élevages ou parcs zoologiques mettant en danger à la fois des espèces protégées mais aussi les hommes qui les manipulent. La vaccination pourrait être un moyen efficace de lutter contre la pseudotuberculose.

Une des stratégies vaccinales envisagées repose sur le développement d'une souche d'*Escherichia coli* non pathogène exprimant à sa surface un antigène spécifique de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Le sujet aborde différents aspects de l'élaboration et de la validation du pouvoir vaccinant du candidat vaccin :

- la **partie A** concerne la préparation d'une souche vaccinale d'*Escherichia coli* exprimant un antigène de surface spécifique de *Yersinia pseudotuberculosis* ;
- la **partie B** permet la validation de l'efficacité du pouvoir vaccinant de la souche mise au point.

TRAVAIL DU PREMIER JOUR

DONNÉES

- La linéarité du spectrophotomètre à 600 nm est vérifiée pour une suspension bactérienne dans l'intervalle $DO_{600} = 0,020 - 0,700$.
- $DO_{600} = 1 \Leftrightarrow 5,0 \cdot 10^8$ bactéries \cdot mL⁻¹.

MATÉRIEL UTILISABLE POUR TOUTES LES MANIPULATIONS

Matériel

Tubes à hémolyse stériles de 10 mL
Tubes à essai stériles à bouchon cellulose
Microtubes stériles
Pipettes graduées stériles de 1 mL
Pipettes automatiques P1000, P200, P20 + cônes adaptés
Systèmes d'aspiration à roulette et propipette
Vortex
Chronomètre
Bacs à glace
Lunettes de sécurité
Gants à usage unique

PARTIE A

Préparation d'une souche vaccinale d'*Escherichia coli* exprimant un antigène de surface de *Yersinia pseudotuberculosis*

Une souche d'*Escherichia coli*, non pathogène pour l'homme et les animaux, est utilisée pour préparer le vaccin contre la pseudotuberculose. Afin de s'assurer d'une expression stable et constitutive de l'antigène de surface de *Yersinia pseudotuberculosis*, le gène (*agP*) codant l'antigène (AgP) est porté par un mini-transposon.

Ce mini-transposon appelé mini-Tn7K-AgP sera intégré par transposition dans un site unique du chromosome de la souche d'*Escherichia coli*, sous l'effet de la transposase.

Le mini-transposon est porté par un plasmide suicide, pUCR6K-Tn7-AgP (non réplcatif dans la souche d'*Escherichia coli* utilisée). Voir **annexe 1**.

La transposase, formée de quatre sous-unités (A, B, C et D) est codée par un autre plasmide suicide, pTNS2. Voir **annexe 2**.

Les deux plasmides seront introduits par coélectrotransformation dans la souche réceptrice d'*Escherichia coli*.

Le schéma du principe de la transposition dans le chromosome d'*Escherichia coli* est présenté en **annexe 3**.

Culture

Culture de 18 heures à 37°C en bouillon **LB** agité à 120 rpm, en Erlenmeyer contenant 120 mL :
Ec comp souche d'*Escherichia coli* électrocompétente

Plasmides

Plasmides purifiés fournis en microtubes contenant 10 µL (**bac à glace**) :

P1 plasmide pUCR6K-Tn7-AgP à 210 ng·µL⁻¹

P2 plasmide pTNS2 à 210 ng·µL⁻¹

Milieux de culture

Bouillon **LB** stérile 1 flacon de 70 mL

Eau Δ 1 flacon de 250 mL (**bac à glace**), eau distillée extrapure stérile

Eau Δ glycérol 1 flacon de 25 mL (**bac à glace**), eau distillée extrapure stérile + 10% glycérol (v/v)

Géloses **LB** 17 géloses LB + agar coulées en boîte de Petri

Géloses **LB + kan** 7 géloses LB + agar + 30 µg·mL⁻¹ kanamycine coulées en boîte de Petri

Matériel spécifique individuel

1 **bac à glace** contenant :

2 tubes à centrifuger stériles de 50 mL (**bac à glace**)

1 tube à centrifuger stérile de 15 mL (**bac à glace**)

1 pipette stérile de 25 mL et 8 pipettes stériles de 5 mL (**bac à glace**)

1 sachet de cônes jaunes stériles et 1 sachet de cônes bleus stériles (**bac à glace**)

Pot contenant 5 microtubes stériles vides (**bac à glace**)

3 cuves à électroporation 0,2 cm (**à placer dans le bac à glace**)

Semi-microcuves + morceaux de parafilm

3 tubes à centrifuger stériles de 15 mL

2 boîtes de Petri vides stériles de 55 mm

2 membranes de nitrocellulose 0,025 µm dans une boîte de Petri

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

Pincettes à bouts fins

Matériel spécifique commun

Bain thermostaté à 37°C, agité à 120 rpm

Centrifugeuses réfrigérées

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Électroporateur (Biorad)

MANIPULATIONS

A1- Préparation des cellules d'*Escherichia coli* électrocompétentes

A11- Suivi opacimétrique de la croissance

- Réaliser un prélèvement de 1 mL de la culture en Erlenmeyer **Ec comp** fournie et mesurer sa densité optique à 600 nm contre un blanc adapté.
Utiliser pour les prélèvements la même pipette graduée restant dans l'Erlenmeyer.

Un prélèvement sera réalisé en présence d'un examinateur.

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

- Poursuivre l'incubation de la souche **Ec comp** à 37°C en bain thermostaté agité à 120 rpm jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm d'environ 0,8. Le temps de génération de la souche dans ces conditions est estimé entre 25 et 30 minutes.
- Lorsque la densité optique atteint cette valeur, placer l'Erlenmeyer de culture dans la glace. Un aliquot de cette culture sera réservé dans la glace pour une numération.

***Indiquer à un examinateur l'heure du prélèvement
et la valeur de la densité optique correspondant à l'arrêt de la croissance.***

Lorsque les bactéries sont dans l'eau, elles doivent impérativement être maintenues à 4°C afin de limiter leur mortalité. Le matériel et les réactifs qui seront en contact avec les bactéries doivent être froids et donc conservés dans la glace.

A12- Concentration des cellules électrocompétentes

- À l'aide d'une pipette graduée stérile de 25 mL, transférer 100 mL de cette culture dans 2 tubes à centrifuger de 50 mL.
- Centrifuger 15 minutes à 3500 rpm et à 4°C.
- Éliminer les surnageants par renversement dans la Javel. Resuspendre délicatement chaque culot à l'aide d'une pipette de 5 mL dans un peu d'eau extrapure stérile froide **Eau Δ**, puis compléter à 45 mL en versant l'eau directement jusqu'à la graduation voulue. Utiliser la même pipette pour les 2 tubes.
- Centrifuger 15 minutes à 3500 rpm et à 4°C.
- Éliminer les surnageants par renversement. Resuspendre délicatement chaque culot à l'aide d'une pipette de 5 mL dans un peu d'eau extrapure stérile froide **Eau Δ**, puis compléter à 20 mL en versant l'eau directement jusqu'à la graduation voulue. Utiliser la même pipette pour les 2 tubes.
- Centrifuger 10 minutes à 3500 rpm et à 4°C.
- Éliminer les surnageants par renversement. Resuspendre chaque culot bactérien dans environ 2 mL d'eau extrapure glycérolée stérile froide **Eau Δ glycérol**.
- Regrouper les deux culots resuspendus dans un seul tube à centrifuger de 15 mL. Compléter à 10 mL avec de l'eau glycérolée **Eau Δ glycérol**.
- Centrifuger 10 minutes à 3500 rpm et à 4°C.
- Aspirer au maximum le surnageant (à la pipette graduée de 5 mL puis à la pipette automatique) et reprendre le culot dans 100 µL d'eau glycérolée **Eau Δ glycérol** froide. Le culot représente un volume approximatif de 150 µL : on a donc un volume total d'environ 250 µL.
- Estimer à la pipette automatique le volume final des bactéries concentrées obtenues et le noter dans le compte-rendu.
- Aliquoter en microtubes froids les cellules en cinq fractions de même volume, notées **E1, E2, E3, E4 et E5**.
- Conserver les aliquots **E1, E2, E3, E4 et E5** dans la glace.

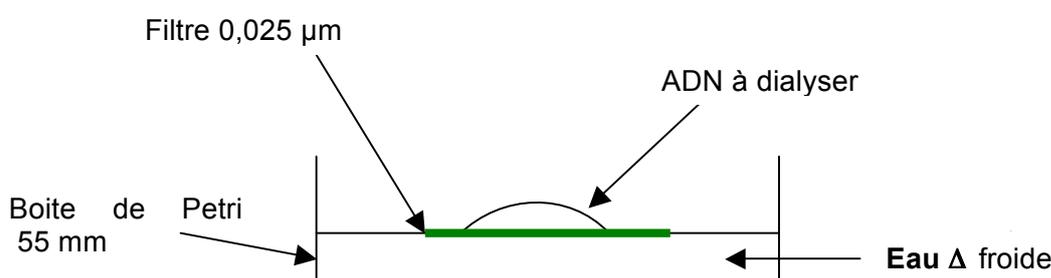
A2- Préparation des plasmides à introduire dans la souche compétente

Les deux ADN plasmidiques **P1** et **P2** fournis doivent être dialysés.

- Pour chaque plasmide, dialyser la totalité du volume fourni sur filtre de nitrocellulose 0,025 µm contre de l'eau extrapure froide pendant 20 minutes.

Dialyser les deux plasmides dans deux petites boîtes de Petri différentes. Pour chaque dialyse :

- Couvrir la surface de la boîte d'eau extrapure **Eau Δ** froide.
- À l'aide de pinces fines propres, préalablement nettoyées à l'alcool, déposer délicatement un filtre de nitrocellulose 0,025 µm à la surface de l'eau, sans le retourner.
- Déposer très délicatement, à la pipette automatique, l'ADN à dialyser au centre du filtre de nitrocellulose.



- À l'issue de la dialyse, transférer la totalité du volume récupéré pour chaque plasmide dialysé dans un microtube propre et le placer dans la glace.

Un dépôt sur membrane sera réalisé en présence d'un examinateur.

La récupération du volume dialysé sera réalisée en présence d'un examinateur.

A3- Électrotransformation des bactéries compétentes

La manipulation d'électrotransformation est effectuée sur les aliquots **E1**, **E2** et **E3** de cellules compétentes préparés précédemment.

- Ajouter directement dans le microtube de cellules compétentes les ADN comme indiqué ci-dessous :

Aliquot de cellules compétentes	E1	E2	E3
Plasmide P1 dialysé	4 µL	4 µL	-
Plasmide P2 dialysé	4 µL	-	-
Eau extrapure Eau Δ	-	4 µL	8 µL

- Replacer les microtubes **E1**, **E2** et **E3** contenant les mélanges cellules compétentes/plasmides dans la glace.
- Transférer le contenu du microtube **E1** dans une cuve à électroporation 0,2 cm préalablement maintenue dans la glace.
- Procéder de même pour les contenus des microtubes **E2** et **E3**.
- Conserver les cuves **E1**, **E2** et **E3** dans la glace.

Le passage à l'électroporateur se fera en présence d'un examinateur et selon l'ordre d'inscription des candidats en fonction de l'avancée de leur manipulation.

Apporter tout le matériel nécessaire dans le petit bac à glace.

- Positionner le bac à glace à côté de l'électroporateur :
 - Placer la cuve **E1** dans l'électroporateur. Bien essuyer les faces de la cuve si elles sont humides.
 - Appliquer un choc électrique de 2500 volts, 25 μ F, 200 Ohms (Appareil pré-réglé).
 - Introduire immédiatement 950 μ L de bouillon **LB** dans la cuve à électroporation.
 - Procéder de même pour les cuves **E2** et **E3**.

Après retour à la paillasse :

- Transférer le contenu de chaque cuve à électroporation dans un tube à centrifuger de 15 mL stérile (il est conseillé d'incliner la cuve de façon à récupérer la totalité du contenu).
- Ajouter au microtube **E4** (non électroporé) un volume de 950 μ L de bouillon **LB**. Transférer le contenu dans un tube à centrifuger de 15 mL stérile.
- Placer les tubes à centrifuger **E1**, **E2**, **E3** et **E4** en position légèrement inclinée en bain thermostaté à 37°C sous agitation à 120 rpm, pendant 40 minutes.

A4- Numération des bactéries avant et après électrotransformation

A41- Numération des bactéries lors de l'arrêt de la croissance

- Réaliser la numération des bactéries de la culture de $DO_{600} = 0,8$ par étalement en surface sur géloses **LB** précoulées en boîte :
 - Étalement à l'aide de billes de verre.
 - Volume d'inoculum de 0,1 mL.
 - Dilutions décimales en microtubes stériles et en bouillon **LB** stérile.
 - À réaliser sur 3 dilutions successives judicieusement déterminées.
 - Double essai.

Les dilutions seront réalisées en présence d'un examinateur.

Un ensemencement et un étalement en surface seront réalisés en présence d'un examinateur.

A42- Numération des bactéries après concentration

- Ajouter au microtube **E5** un volume de 950 µL de bouillon **LB**.
- Réaliser la numération des bactéries dans le microtube **E5** par étalement en surface sur géloses **LB** précoulées en boîte :
 - Étalement à l'aide de billes de verre.
 - Volume d'inoculum de 0,1 mL.
 - Dilutions décimales en microtubes stériles et en bouillon **LB** stérile.
 - À réaliser sur 3 dilutions successives judicieusement déterminées.
 - Simple essai.

A43- Numération des bactéries sans électroporation

- Réaliser la numération des bactéries provenant du tube à centrifuger **E4** par étalement en surface sur géloses **LB** précoulées en boîte :
 - Étalement à l'aide de billes de verre.
 - Volume d'inoculum de 0,1 mL.
 - Dilutions décimales en microtubes stériles et en bouillon **LB** stérile.
 - À réaliser sur les dilutions 10^{-5} à 10^{-8} .
 - Simple essai.

A44- Numération des bactéries après électroporation

- Réaliser la numération des bactéries provenant du tube à centrifuger **E3** par étalement en surface sur géloses **LB** précoulées en boîte :
 - Étalement à l'aide de billes de verre.
 - Volume d'inoculum de 0,1 mL.
 - Dilutions décimales en microtubes stériles et en bouillon **LB** stérile.
 - À réaliser sur les dilutions 10^{-5} à 10^{-8} .
 - Simple essai.

A45- Contrôle qualitatif et quantitatif de la transposition

- Réaliser la numération des bactéries provenant des suspensions suivantes, à l'aide de billes de verre stériles, en surface sur géloses **LB + kan** précoulées en boîte :
 - Numération de la suspension contenue dans le tube à centrifuger **E1**, par étalement de cinq fractions de 100 µL.
 - Numération d'une seule fraction de 100 µL de la suspension contenue dans le tube à centrifuger **E2**.
 - Numération d'une seule fraction de 100 µL de la suspension contenue dans le tube à centrifuger **E3**.

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

COMPTE-RENDU

1. Présenter les résultats des mesures spectrophotométriques. Indiquer la valeur de DO_{600} et l'heure correspondant à l'arrêt de cette croissance.
2. Justifier le choix des dilutions pour la numération des bactéries lors de l'arrêt de la croissance (partie **A41**).
3. Calculer le facteur maximal théorique de concentration des cellules (partie **A12**).
4. Justifier le choix des dilutions pour la numération des bactéries après concentration (partie **A42**).
5. Préciser l'intérêt de la dialyse des plasmides (partie **A2**).
6. Préciser l'intérêt de l'étape d'incubation des cellules électrotransformées pendant 40 minutes à 37°C en bouillon LB (partie **A3**).
7. Expliquer le principe d'obtention d'une souche recombinante exprimant de manière stable l'antigène de surface AgP. Justifier l'utilisation de plasmides suicides.
8. Justifier la méthode de sélection des clones transformés.
9. Expliquer le rôle et les résultats attendus sur **LB + kan** pour les fractions **E2** et **E3** électrotransformées.

PARTIE B

Dosage d'immunoglobulines anti-*Yersinia pseudotuberculosis* par méthode ELISA

La souche vaccinale a été administrée par voie orale à des lots de souris ayant reçu différentes doses. Trois semaines après vaccination un prélèvement sanguin a été effectué afin d'évaluer la réponse humorale à l'antigène spécifique de *Yersinia pseudotuberculosis* (AgP).

Dans cette partie, les immunoglobulines anti-*Yersinia pseudotuberculosis* contenues dans les sérums prélevés sur les souris sont dosées par une méthode ELISA. Le sérum d'une souris de chaque lot sera testé.

Plaque ELISA

Plaque ELISA (fond plat, 96 puits) sensibilisée des **cupules 1 à 6 sur les lignes A à F** par un lysat de *Y. pseudotuberculosis* et saturée par une solution protéique, notée **E+n°**

Sérums à tester

S1 à S6 6 microtubes de 8 µL des 6 sérums à tester (**bac à glace**)

Réactifs

E Tp lavage

1 pot à bouchon rouge de 100 mL de PBS-Tween

E diluant

1 flacon de 10 mL de PBS-Tween-lait

E Ac II

1 tube de 5 mL d'anticorps secondaire (IgG de souris conjuguée à la peroxydase)

TMB1

1 pot à bouchon rouge de 3 mL de réactif n°1 du substrat TMB

TMB2



1 tube de 3 mL de réactif n°2 du substrat TMB protégé de la lumière

E arrêt



ATTENTION

H315 provoque une irritation cutanée

1 tube de 3 mL de H₂SO₄ à 0,5 mol·L⁻¹

Matériel spécifique individuel

4 demi-feuilles de papier filtre

Bol bleu (**recouvrir le fond de détergent avant utilisation**)

1 plaque 96 puits à fond rond

1 pastette (compte-goutte) de 7 mL

Matériel spécifique commun

Lecteur de microplaque réglé à 450 nm

MANIPULATIONS

B1- Dilutions des échantillons à tester

Dans une microplaque à fond rond :

- Déposer 196 µL de diluant **E diluant** dans les cupules 1 à 6 de la ligne A.
- Déposer 160 µL de diluant **E diluant** dans les cupules 1 à 6 des lignes B à F.
- Ajouter 4 µL de sérum **S** dans la cupule A (sérum 1 en A1, sérum 2 en A2...) et homogénéiser par aspiration refoulement.
- Prélever avec un nouveau cône 40 µL du contenu de la cupule A1 et les transférer dans la cupule B1.
Homogénéiser par aspiration refoulement.
Sans changer de cône, transférer 40 µL de B1 en C1.
Poursuivre de même ces dilutions en série jusqu'à F1.
- Faire de même pour les cinq autres sérums dans les colonnes correspondantes.

B2- Étapes de la technique ELISA

Les manipulations seront réalisées dans la microplaque sensibilisée à fond plat notée **E+n°**.

B21- Élimination du liquide de saturation

- Vider le contenu des cupules dans le bol bleu par retournement.
- Éliminer le liquide restant en tapotant la plaque sur le papier filtre plié en quatre.

B22- Dépôt des échantillons

- Pour chaque sérum, transférer 100 µL du contenu de chaque cupule de la plaque de dilution dans la cupule correspondante de la plaque ELISA **E+n°** sans changer de cône en commençant par la dilution la plus forte.
- Recouvrir la plaque avec la feuille adhésive et incuber 1 heure à température ambiante.

B23- Lavages

- Réaliser trois lavages avec le tampon de lavage **E Tp lavage** en utilisant la pastette fournie (à conserver pour les autres lavages).

B24- Ajout de l'anticorps secondaire (à demander à l'examineur)

- Déposer 100 µL de l'anticorps secondaire **E Ac II** dans les cupules.
- Recouvrir la plaque avec la feuille adhésive et incuber 1 heure à température ambiante à l'abri de la lumière.

B25- Lavages

- Réaliser trois lavages avec le tampon de lavage **E Tp lavage**.

B26- Ajout du substrat (à demander à l'examinateur)

- Pour préparer le substrat, verser extemporanément le contenu du tube **TMB2** dans le pot **TMB1**. Homogénéiser.
- Déposer 100 µL du substrat dans les cupules.
- Recouvrir la plaque avec la feuille adhésive et incuber 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.

B27- Arrêt de la réaction

- Ajouter 50 µL de la solution d'arrêt **E arrêt** dans les cupules.
- Recouvrir la plaque avec la feuille adhésive en attendant la lecture.

B28- Lecture de l'absorbance à 450 nm

- Lire les absorbances des cupules de la microplaque ELISA contre l'air (cupule A12).

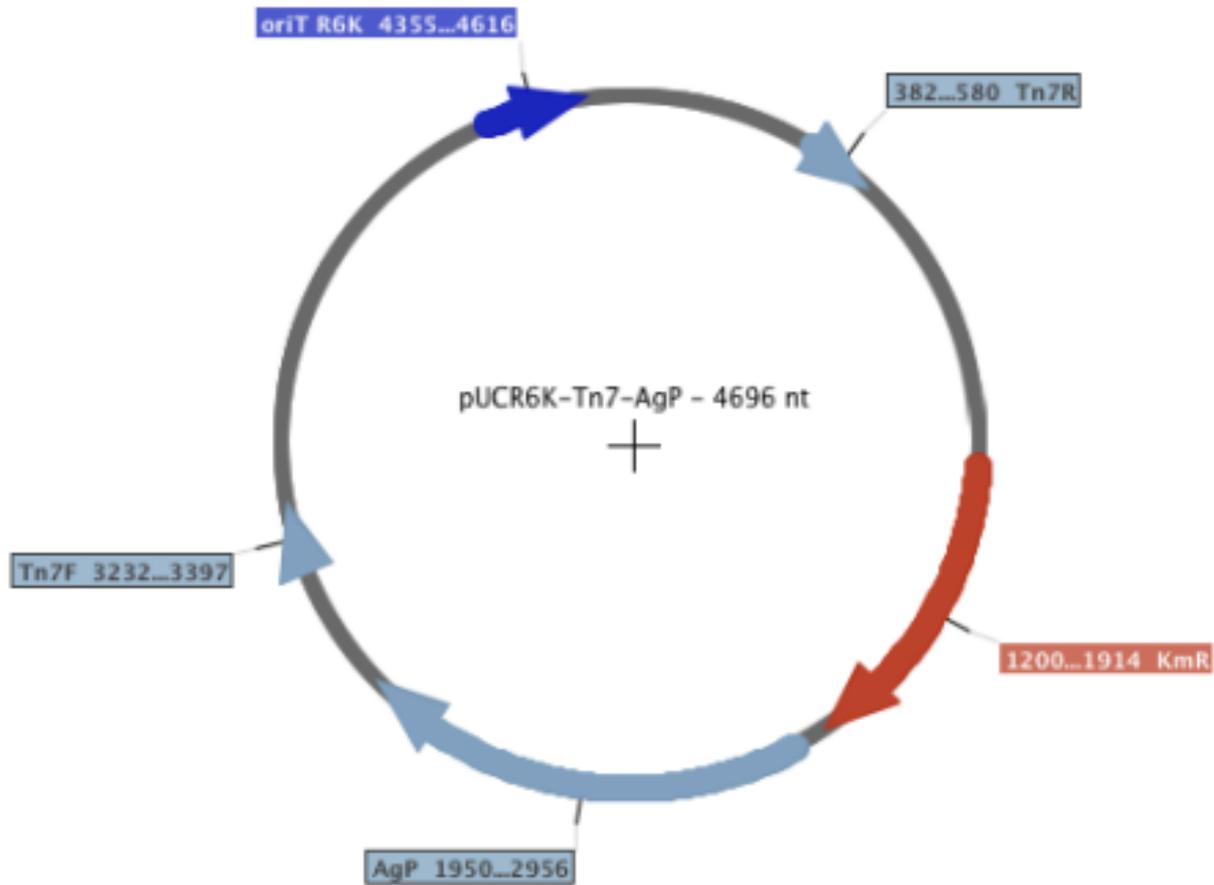
La lecture sera effectuée en fin d'épreuve

COMPTE-RENDU

- 10.** Réaliser un schéma de principe détaillé de la technique utilisée.
- 11.** Qualifier cette technique.
- 12.** Préciser le rôle de la saturation.
- 13.** Déterminer les facteurs de dilution des différentes lignes.
- 14.** Donner la composition (en précisant les volumes), le rôle et le résultat attendu des différents témoins qu'il aurait fallu réaliser pour valider la technique.

ANNEXE 1

CARTE GÉNÉTIQUE DU PLASMIDE pUCR6K-Tn7-AgP (plasmide P1)



KmR : gène de résistance à la kanamycine

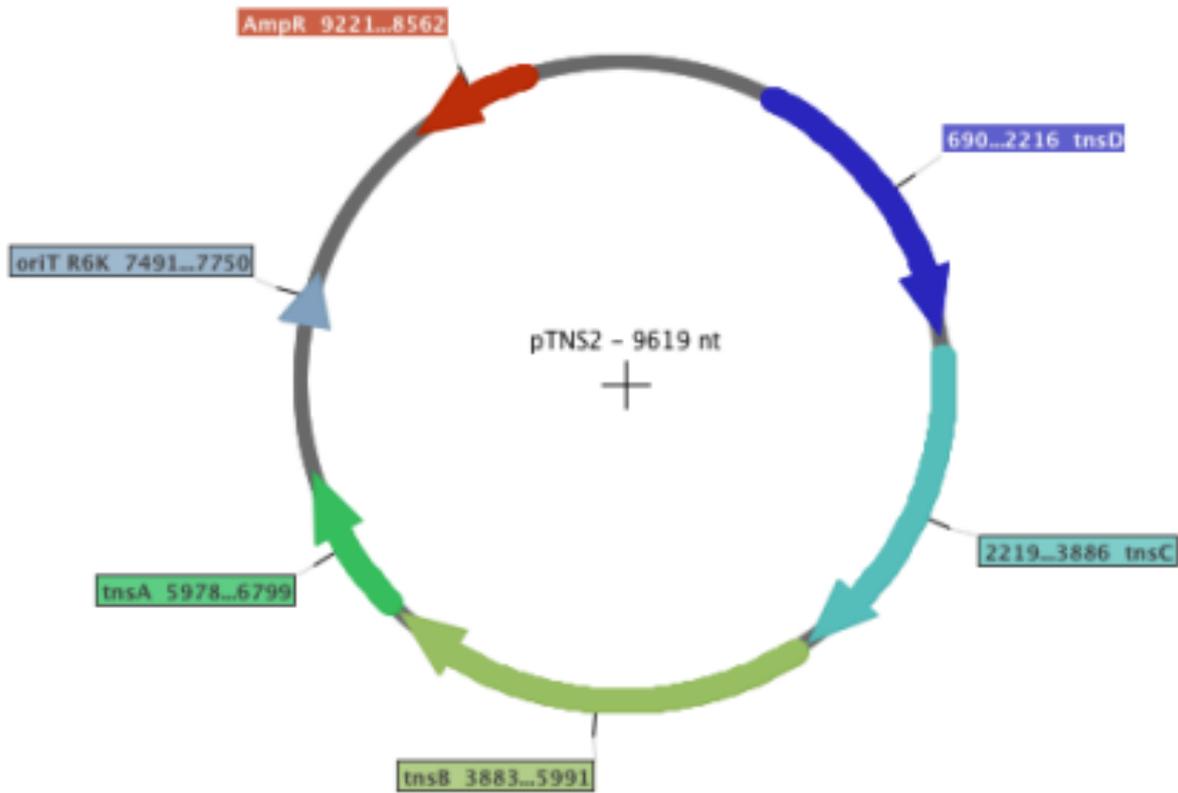
AgP : antigène de surface de *Yersinia pseudotuberculosis*

Tn7R : séquence terminale R du mini-transposon reconnue par la transposase

Tn7F : séquence terminale F du mini-transposon reconnue par la transposase

oriT R6K : origine de réplication

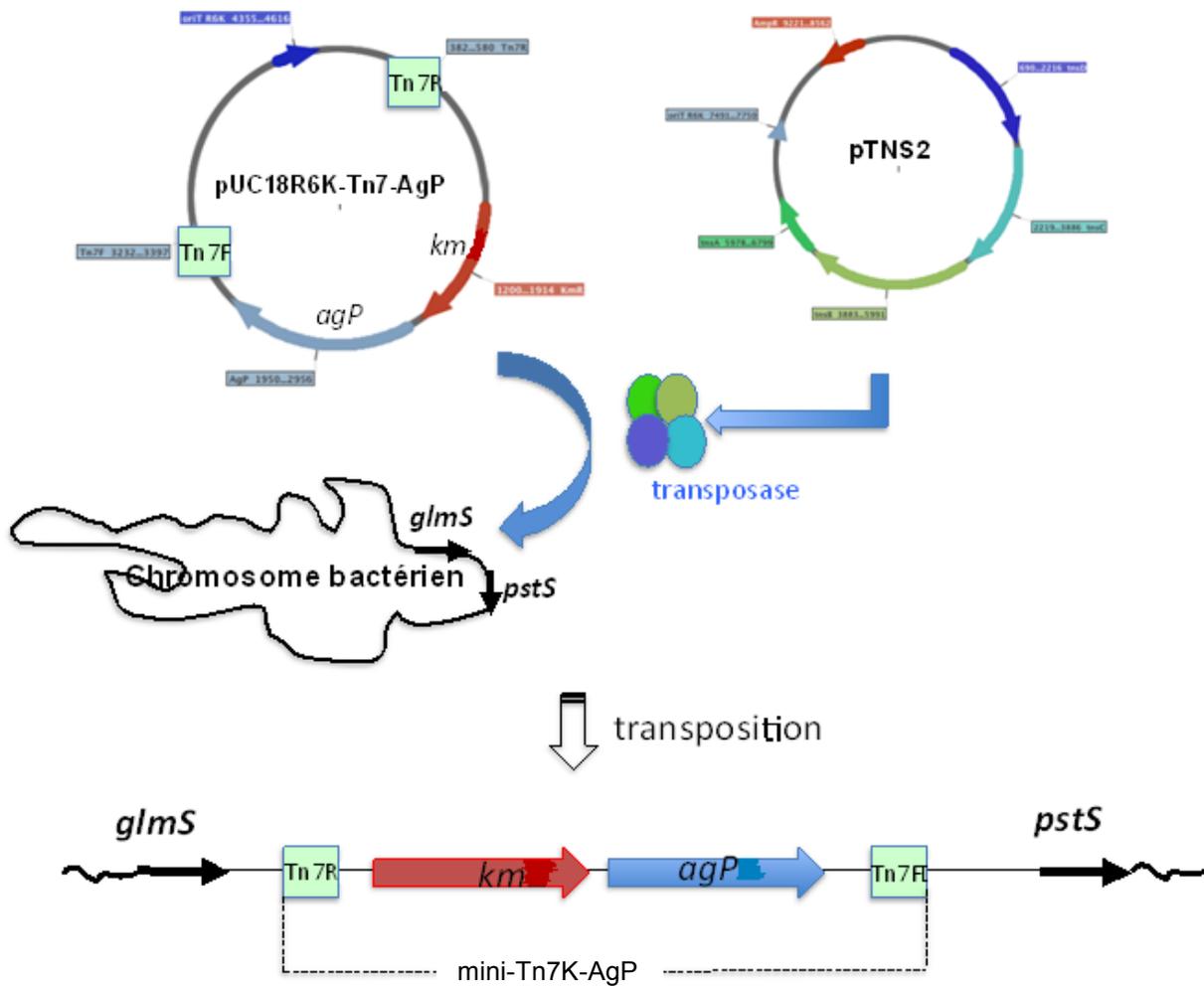
ANNEXE 2
CARTE GÉNÉTIQUE DU PLASMIDE pTNS2 (plasmide P2)



AmpR : gène de résistance à l'ampicilline
tns : gènes codant la transposase
oriT R6K: origine de réplication

ANNEXE 3

SCHÉMA DU PRINCIPE DE LA TRANSPOSITION DU MINI-Tn7 DANS LE CHROMOSOME D'*ESCHERICHIA COLI*



Sous l'action de la transposase le mini-Tn7K-AgP va s'insérer dans un site unique du génome bactérien situé entre les gènes *glmS* et *pstS*.

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 pseudotuberculose est une maladie bactérienne contagieuse, causée par *Yersinia pseudotuberculosis*, qui touche de nombreuses espèces animales. La pseudotuberculose est également une zoonose car elle est transmissible à l'homme.

La contamination se fait principalement par voie oro-fécale. Après son ingestion, *Yersinia pseudotuberculosis* est capable de disséminer vers les ganglions mésentériques entraînant une adénite mésentérique. Ceci se traduit par un syndrome d'appendicite aiguë pouvant conduire dans les formes les plus graves à une septicémie fatale.

De nombreuses espèces sont particulièrement sensibles à ce germe comme les oiseaux, les rongeurs et les primates. De graves épizooties sont parfois constatées dans les élevages ou parcs zoologiques mettant en danger à la fois des espèces protégées mais aussi les hommes qui les manipulent. La vaccination pourrait être un moyen efficace de lutter contre la pseudotuberculose.

Une des stratégies vaccinales envisagées repose sur le développement d'une souche d'*Escherichia coli* non pathogène exprimant à sa surface un antigène spécifique de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Le sujet aborde différents aspects de l'élaboration et de la validation du pouvoir vaccinant du candidat vaccin.

- La **partie A** concerne la préparation d'une souche vaccinale d'*Escherichia coli* exprimant un antigène de surface spécifique de *Yersinia pseudotuberculosis*.
- La **partie B** permet la validation de l'efficacité du pouvoir vaccinant de la souche mise au point.
- La **partie C** permet la vérification de l'expression de l'antigène spécifique de *Yersinia pseudotuberculosis* en surface des clones transformés d'*Escherichia coli*.

PARTIE A

Préparation d'une souche vaccinale d'*Escherichia coli* exprimant un antigène de surface de *Yersinia pseudotuberculosis*

MANIPULATIONS

- Dénombrer les colonies obtenues sur les boîtesensemencées.

COMPTE-RENDU

15. Calculer la concentration cellulaire dans la culture à l'arrêt de la croissance.
16. Calculer la concentration cellulaire dans les fractions **E** et en déduire le facteur de concentration obtenu lors des étapes de centrifugation. Comparer au facteur théorique de concentration.
17. Calculer le pourcentage de survie des cellules à l'électrotransformation.
18. Discuter les résultats obtenus pour les essais **E1**, **E2** et **E3** sur **LB + kan**.
19. Déterminer l'efficacité de transposition par μg d'ADN.

PARTIE B

Dosage d'immunoglobulines anti *Yersinia pseudotuberculosis* par méthode ELISA

Quatre semaines post-vaccination, les souris ont été soumises à un challenge par injection par voie intragastrique d'une dose létale de *Yersinia pseudotuberculosis*. Des souris naïves (non vaccinées) sont utilisées comme contrôle de la mortalité. La mortalité des souris naïves et vaccinées a été enregistrée et le résultat de la survie des souris pour lesquelles les sérums ont été testés est fourni dans l'**annexe 4**.

Les résultats du dosage ELISA réalisé au jour 1 seront exploités à l'aide de l'outil informatique (EXCEL). On considère que la technique est validée (témoins conformes).

COMPTE-RENDU

20. À partir des lectures d'absorbance, tracer pour chaque sérum sur un même graphe, la courbe absorbance en fonction du logarithme décimal du facteur de dilution. Imprimer le tableau de valeurs ainsi que le graphe.
21. Déterminer le titre en immunoglobulines de chacun des sérums. Pour cela, pour chaque sérum, assimiler à une droite la partie de la courbe constituée par les deux points ayant une absorbance située de part et d'autre de la valeur 0,2 uA. Le titre est égal à la valeur du facteur de dilution correspondant à 0,2 uA d'absorbance.
22. Interpréter les résultats obtenus et donner l'encadrement du titre minimal protecteur en immunoglobulines en utilisant le tableau fourni (**annexe 4**). Rendre l'**annexe 4** après l'avoir complétée.

PARTIE C

Mise en évidence de l'expression de la protéine recombinante de *Yersinia pseudotuberculosis* chez *Escherichia coli* par DOT BLOT

Différents clones d'*Escherichia coli* ont été obtenus par la technique utilisée dans la partie A. Ils sont testés pour mettre en évidence une éventuelle expression en surface de la protéine recombinante de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Cultures

Culture de huit clones numérotés de 1 à 8 présentés sous forme de stries, sur gélose LB notée **DB+n°**

Réactifs

DB Tp blocage	1 tube de 5 mL de PBS-SAB (sérum albumine bovine)
DB Tp lavage	1 pot de 50 mL de PBS-Tween
DB PBS	1 microtube de 10 µL de PBS
DB Prot	1 microtube de 5 µL de solution de protéine recombinante (AgP)
DB Ac I	1 tube de 5 mL d'anticorps primaire anti-AgP de <i>Y. pseudotuberculosis</i>
DB Ac II	1 tube de 5 mL d'anticorps secondaire : IgG conjuguée à la phosphatase alcaline

DB substrat



ATTENTION

H317 peut provoquer une allergie cutanée

1 tube de 5 mL de BCIP/NBT protégé de la lumière

Eau phy

1 tube de 4 mL d'eau physiologique

Matériel spécifique individuel

Membrane de nitrocellulose fournie dans une petite boîte
Microtubes stériles
1 pastette (compte-goutte) de 7 mL
Bol bleu (**recouvrir le fond de détergent avant utilisation**)
Pissette d'eau distillée

MANIPULATIONS

C1- Préparation des suspensions des clones à tester

- Préparer pour chaque clone un microtube contenant 20 μ L d'eau physiologique **Eau phy**.
- Réaliser une suspension à partir de chaque strie de culture. Pour cela, prélever la strie sur un demi-centimètre avec une pipette Pasteur fermée. La quantité prélevée pour chaque clone avec la pipette Pasteur doit être du même ordre de grandeur.

La réalisation d'une suspension sera effectuée en présence d'un examinateur.

C2- Étapes de la technique du DOT BLOT

C21- Préparation de la membrane de nitrocellulose

- Sans sortir la membrane de la boîte de Petri, délimiter à l'aide d'un crayon à papier à mine fine les zones de dépôts (voir **annexe 5**) et repérer au stylo bille le haut de la membrane.

C22- Dépôt des échantillons

- Déposer sur la membrane 2 μ L de chacune des suspensions préalablement préparées au centre des zones 1 à 8.

Un dépôt sera réalisé en présence d'un examinateur.

- Déposer 2 μ L de protéine recombinante (AgP) **DB Prot** dans la zone 9.
- Déposer 2 μ L de PBS **DB PBS** dans la zone 10.
- Laisser sécher les dépôts au minimum 15 minutes.

C23- Saturation de la membrane

- Verser le contenu du tube de tampon de blocage **DB Tp blocage** sur la membrane.
- Incuber 15 minutes à température ambiante.
- Eliminer le tampon de blocage par retournement au-dessus du bol bleu.

C24- Ajout de l'anticorps primaire (à demander à l'examinateur)

- Verser le contenu du tube contenant l'anticorps primaire **DB Ac I**.
- Incuber 30 minutes à température ambiante.
- Eliminer l'anticorps primaire par retournement au-dessus du bol bleu.

C25- Lavages

- Réaliser trois lavages avec le tampon de lavage **DB Tp lavage** en utilisant la pastette fournie (à conserver pour les autres lavages). Le tampon sera ajouté avec la pastette de façon à recouvrir la membrane et vidé par retournement au-dessus du bol bleu.

C26- Ajout de l'anticorps secondaire (à demander à l'examineur)

- Verser le contenu du tube contenant l'anticorps secondaire **DB Ac II**.
- Incuber 30 minutes à température ambiante.
- Eliminer l'anticorps secondaire par retournement au-dessus du bol bleu.

C27- Lavages

- Réaliser trois lavages avec le tampon de lavage **DB Tp lavage**.

C28- Révélation

- Verser le contenu du tube contenant le substrat **DB substrat**.
- Incuber 1 à 2 minutes à température ambiante.
- Eliminer le substrat par retournement au-dessus du bol bleu.

C29- Arrêt de la réaction

- Rincer en utilisant la pissette d'eau distillée.
- Eliminer l'eau par retournement au-dessus du bol bleu.
- Laisser sécher.

C210- Lecture du DOT BLOT

- Attendre 10 minutes avant d'effectuer la lecture.

COMPTE-RENDU

23. Réaliser un schéma de principe de la technique utilisée. Justifier le choix de la technique employée en fonction de l'objectif recherché.
24. Interpréter les résultats obtenus.

CONCLUSION

25. Proposer un schéma bilan de l'élaboration du vaccin contre la pseudotuberculose.

Ce sujet a été proposé par Joëlle BISSERY, Anne DERBISE, Edith LALIQUÉ, Isabelle MOIZAN et Lucile TIGER.

Bibliographie

- A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. Kyoung-Hee Choi, Jared B. Gaynor, Kimberly G. White, Carolina Lopez, Catharine M. Bosio, RoxAnn R. Karkhoff-Schweizer, Herbert Schweizer. Nature Methods (2005), volume 2(6), pp 443-448

Les souches, les plasmides et les sérums utilisés dans ce sujet ont été fournis par l'Institut Pasteur.

Numéro de candidat :

ANNEXE 4 à rendre
DOSAGE D'IMMUNOGLOBULINES ANTI-*YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*
PAR MÉTHODE ELISA

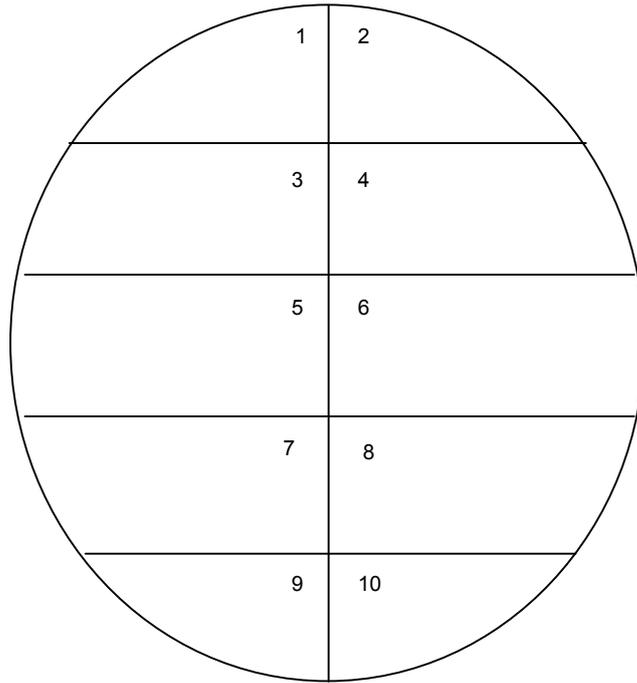
Les animaux dont les sérums ont été testés, ont été infectés avec une dose létale de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Le tableau ci-dessous présente la survie de ces animaux suite à cette infection.

Animal	1 non vacciné	2 vacciné	3 vacciné	4 vacciné	5 vacciné	6 vacciné
Titre du sérum en immunoglobulines						
Survie	NON	OUI	OUI	OUI	NON	NON

ANNEXE 5

Schéma de dépôt des échantillons sur la membrane de nitrocellulose pour la réalisation du DOT BLOT



RAPPORT DU JURY DE TP DE MICROBIOLOGIE

Développement d'un vaccin contre la pseudotuberculose

Le sujet portait sur le développement d'un vaccin vivant pour lutter contre la pseudotuberculose, une zoonose particulièrement contagieuse.

Il s'agissait de :

- construire par génie génétique une souche d'*Escherichia coli* exprimant à sa surface un antigène spécifique de *Yersinia pseudotuberculosis*, l'agent de la pseudotuberculose ;
- vérifier l'expression de l'antigène spécifique de *Yersinia pseudotuberculosis* en surface des clones transformés d'*Escherichia coli* ;
- valider le pouvoir protecteur de la souche recombinante.

Résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,6 / 20**
- Meilleure note : **15,7 / 20**
- Note la plus basse : **04,9 / 20**
- 14 notes sur 22 (**64 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20
 - 2 notes < 6
 - 6 notes entre 6 et 9
 - 6 notes entre 10 et 12
 - 6 notes entre 12 et 14
 - 2 notes > 15

COMMENTAIRES GÉNÉRAUX SUR L'ÉPREUVE

Il convient de rappeler que l'évaluation de cette épreuve porte autant sur l'aspect technique (prévention des risques biologique et chimique, technicité du geste, résultats obtenus) que sur l'aspect rédactionnel du compte-rendu (soin apporté dans la rédaction, calculs, interprétation des résultats, raisonnement, capacité de synthèse).

Les candidats ont fait preuve d'une bonne organisation dans le temps pour mener en parallèle les différentes parties, qui présentaient chacune des temps d'incubation ou d'attente importants. Cependant, de nombreuses erreurs techniques ont été commises, relevant fréquemment du non suivi du protocole pourtant très détaillé : il convient de lire scrupuleusement les consignes techniques et de les suivre.

En particulier, il était clairement indiqué qu'une grande partie des manipulations devait être réalisée dans la glace avec du matériel froid. La plupart des candidats n'a pas respecté cette consigne, ce qui a eu des conséquences sur la qualité des résultats.

De même, le port de gants à proximité du bec électrique, pourtant clairement interdit en début d'épreuve, a été constaté à plusieurs reprises.

Les candidats disposaient d'un temps suffisant au cours de l'épreuve pour rédiger leur compte-rendu, cependant il est apparu qu'aucun candidat n'a su faire une analyse approfondie de la problématique proposée.

PARTIE A

Préparation d'une souche vaccinale d'*Escherichia coli* exprimant un antigène de surface de *Yersinia pseudotuberculosis*

L'objectif de cette partie était la construction, en deux étapes, d'une souche d'*Escherichia coli* non pathogène exprimant à sa surface un antigène spécifique de *Yersinia pseudotuberculosis* :

- la première étape consistait à préparer les bactéries en vue d'une électrotransformation ;
- la seconde étape correspondait au transfert par électroporation de deux plasmides, qui constituaient les outils génétiques permettant l'intégration de manière stable du gène codant l'antigène de *Y. pseudotuberculosis* dans le génome de la souche vaccinale d'*E. coli*.

Les manipulations réalisées permettaient d'évaluer l'efficacité des différentes étapes telles que :

- la concentration des bactéries ;
- la survie des bactéries au choc électrique ;
- la proportion de transformants.

Aspects techniques

Des erreurs portant sur un simple suivi de croissance ont été fréquentes :

- Erlenmeyer de culture non essuyé à la sortie du bain-marie et coton cardé contaminé posé sur la paillasse : sources de contaminations potentielles de la paillasse et de la culture ;
- prélèvement de la culture dans l'Erlenmeyer à la pipette automatique au lieu de la pipette graduée : contamination de la pipette automatique ;
- non-respect de la limite de linéarité indiquée du spectrophotomètre : prélèvements non dilués alors que les valeurs de DO dépassaient la limite de linéarité ;
- prolongation de la croissance bien au-delà de la valeur de DO souhaitée ;
- absence de parafilm sur la cuve, pourtant indispensable pour éviter toute contamination et homogénéiser la suspension avant la lecture de la DO.

Les candidats se sont dans l'ensemble bien adaptés aux gestes techniques nouveaux : dialyse et électroporation. On peut cependant relever les éléments suivants :

- confusion entre la membrane de nitrocellulose blanche et le papier protecteur bleu ;
- mauvaise compréhension du principe de la dialyse : l'ADN devait être récupéré sur la membrane ;
- formation d'un arc électrique lors de l'électroporation, dû à un mauvais lavage préalable des cellules, et provoquant la mort cellulaire.

En ce qui concerne les numérations :

- les dilutions décimales en cascade des suspensions bactériennes en microtubes et à la pipette automatique nécessitent une homogénéisation efficace préalable et un changement de cône entre chaque dilution ;
- la technique de numération en surface avec les billes est mal maîtrisée :
 - le dépôt doit être dispersé en plusieurs gouttes avant l'étalement ;

- il convient d'agiter les boîtes à plat sur la paillasse, vigoureusement et suffisamment longtemps pour obtenir une répartition homogène de la suspension bactérienne ;
- la récupération des billes peut se faire par renversement dans le détergent.

Des erreurs dans les milieux ensemencés (gélouses LB ou LB + kanamycine) ont conduit à des résultats non interprétables.

Le marquage des boîtes, indispensable, est parfois peu précis et illisible.

Compte rendu

Jour 1

- Le choix des dilutions ensemencées n'est pas correctement justifié : à ce niveau, il est inutile de détailler le nombre d'UFC que l'on obtiendrait dans chaque dilution intermédiaire. Le jury attend une formule littérale qui prenne en compte le nombre d'UFC attendues en dilution centrale et une application numérique directe.
- Un grand nombre de candidats n'a pas compris la notion de facteur de concentration cellulaire suite aux différentes étapes de centrifugation.
- Il était important d'insister sur le rôle des plasmides lors de la transposition : l'AgP porté par le plasmide P1 s'intégrait dans le chromosome de façon stable grâce à la transposase codée par le plasmide P2. L'évènement de transposition étant un évènement rare, il était indispensable de travailler avec des plasmides suicides pour pouvoir sélectionner de tels évènements, et éviter que l'expression ultérieure de la transposase puisse entraîner l'excision du gène codant l'AgP.

Jour 2

- Un résultat de dénombrement doit être présenté sous la forme d'un tableau indiquant le nombre d'UFC comptées sur toutes les boîtes : le résultat final est impérativement exprimé sous la forme de $x,y.10^z$ unité, c'est-à-dire avec deux chiffres significatifs.
- Le calcul du taux de survie à l'électroporation a été bien mené, en comparant les résultats des dénombrements des fractions E3 et E4. Le taux était proche de 50 % pour *E.coli* dans les conditions expérimentales.
- Le calcul de l'efficacité de la transposition n'a été que rarement réalisé correctement : il fallait calculer la fréquence de transposition (nombre de transposants obtenus sur le nombre de cellules électroporées), et la ramener à la quantité d'ADN utilisée.
- De nombreuses confusions ont été notées quant au contenu des fractions E1, E2 et E3.
- La fraction E3 servait à tester deux phénomènes :
 - le taux de survie à l'électroporation (ensemencement sur gélose non sélective) ;
 - la fréquence d'apparition de mutants spontanés résistants à la kanamycine (ensemencement sur gélose avec kanamycine).
L'apparition de résistance spontanée supérieure ou égale à la transposition rendrait difficile la sélection des transposants. Très peu de candidats ont clairement expliqué ce point.

PARTIE B

Dosage d'immunoglobulines anti-*Yersinia pseudotuberculosis* par méthode ELISA

Il s'agissait dans cette partie de valider le pouvoir vaccinal de la souche recombinante d'*E. coli*. Pour cela, des sérums de souris vaccinées avec la souche d'*E. coli* exprimant l'antigène de *Y. pseudotuberculosis* étaient fournis, et il était demandé de titrer le taux d'anticorps induits par la vaccination à l'aide d'un test ELISA. Un tableau indiquait la capacité de chaque souris de survivre à l'infection par *Y. pseudotuberculosis* et devait permettre de définir l'intervalle du titre minimal en anticorps prédisant la survie de l'animal.

Aspects techniques

- Le test ELISA pouvait être effectué en zone non aseptique.
- Le respect des consignes aurait dû éviter les erreurs de volume, d'inversion de cupules, de réactifs oubliés.
- Il était nécessaire de bien vider les cupules de la microplaque lors de chaque étape au cours du test ELISA par retournement et en tapant efficacement la plaque sur un papier absorbant.
- Les pictogrammes de sécurité et les phrases de risque associées, explicites dans le sujet, doivent être pris en compte.

Compte rendu

- Le principe du test ELISA a été en général bien compris. Un schéma était demandé et donc attendu.
- Des erreurs persistent dans le calcul des dilutions et certains candidats confondent dilution et facteur de dilution.
- Les témoins ont été présentés de façon trop superficielle : manque de précision dans leur composition, leur rôle et les résultats attendus.
- Le tracé des diagrammes sur le logiciel Excel a posé problème à plusieurs candidats. La détermination des titres des sérums devait se faire en effectuant une régression linéaire sur la portion de courbe définie.
- Le jury attendait une interprétation des résultats : il fallait corréliser le titre en anticorps avec la survie éventuelle de la souris correspondante. Cette analyse permettait de déterminer le titre en anticorps protecteur lors d'une infection par *Y. pseudotuberculosis*.

PARTIE C

Mise en évidence de l'expression de la protéine recombinante de *Yersinia pseudotuberculosis* chez *Escherichia coli* par DOT-BLOT

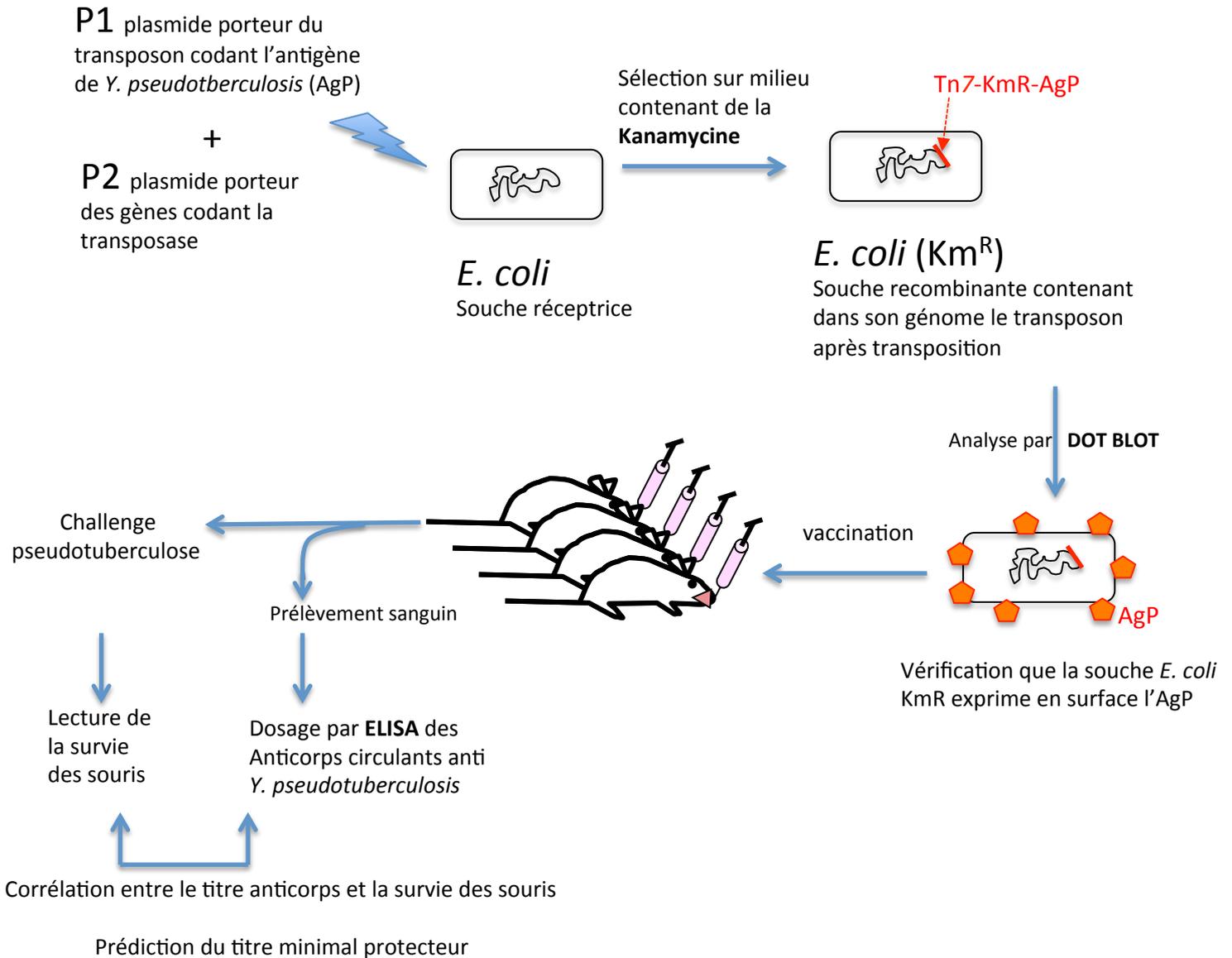
L'objectif de cette partie était de vérifier que la souche vaccinale d'*E. coli* exprimait bien à sa surface l'antigène protecteur de *Y. pseudotuberculosis*. Pour cela les candidats disposaient de plusieurs clones issus de la transposition et devaient tester, à l'aide d'une expérience de Dot-Blot sur membrane de nitrocellulose, leur réactivité avec des anticorps dirigés contre l'antigène de *Y. pseudotuberculosis*. L'absence d'une étape de lyse des bactéries devait valider l'expression en surface de l'antigène.

Compte rendu

- Il est indispensable de valider les témoins avant la lecture des tests.
- Peu de candidats ont compris que le Dot-Blot permettait de contrôler l'expression en surface de la protéine recombinante de *Y. pseudotuberculosis*, donc la présence de l'AgP en surface de la bactérie *E. coli*.

BILAN

Le schéma bilan attendu devait montrer le lien entre les trois parties, il devait être aéré et lisible. Il devait intégrer les différentes techniques décrites dans le sujet permettant de valider les différentes étapes de l'élaboration d'un vaccin.



TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

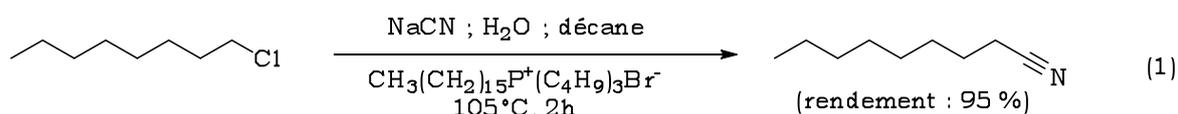
Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

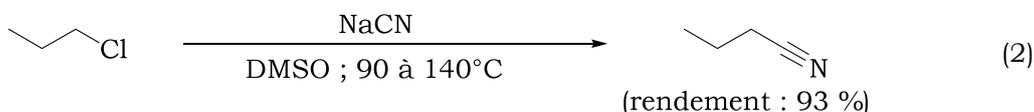
SUJET

Les catalyseurs par transfert de phase

Le terme de catalyse par transfert de phase est introduit par Charles M. Starks en 1971 pour expliquer l'influence des sels de phosphonium sur les vitesses de réaction de S_N2 des ions cyanure sur le 1-chlorooctane. Sans catalyseur, la réaction ci-dessous est inexploitable du fait de son extrême lenteur :



De telles conditions opératoires permettent d'éviter l'utilisation de solvants aprotiques polaires tels le DMSO dont la température d'ébullition élevée et la viscosité rendent l'utilisation assez contraignante :



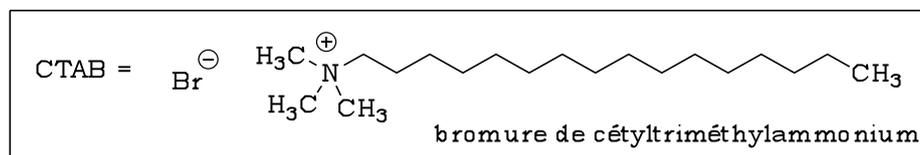
Un catalyseur par transfert de phase (noté **CTP** dans le reste du document) permet de mettre en contact deux réactifs initialement dans des phases différentes. Pour la réaction (1), l'ion CN^- en phase aqueuse réagit très lentement avec le 1-chlorooctane présent dans le décane. Après ajout du bromure de phosphonium, il se forme une paire d'ions lipophile $\{\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{P}^+(\text{C}_4\text{H}_9)_3, \text{CN}^-\}$ capable de transporter l'ion cyanure dans le décane et l'amener à réagir avec le 1-chlorooctane.

Un **CTP** doit réunir les qualités suivantes :

- être stable dans les conditions expérimentales ;
- ne pas gêner les opérations principales de la synthèse ni celles de la séparation des produits ;
- être économiquement intéressant (faible prix de revient, récupération aisée).

En particulier, les sels d'ammonium quaternaires sont couramment rencontrés : ils sont aisés à synthétiser, peu chers et l'on peut moduler leur lipophilie en changeant le contre ion ou la longueur des chaînes carbonées.

Le sujet porte plus particulièrement sur l'un d'entre eux, le bromure de cétyltriméthylammonium noté CTAB. Son utilisation en synthèse organique, la mesure de sa concentration micellaire critique notée CMC et l'exploitation de son titrage seront étudiées.

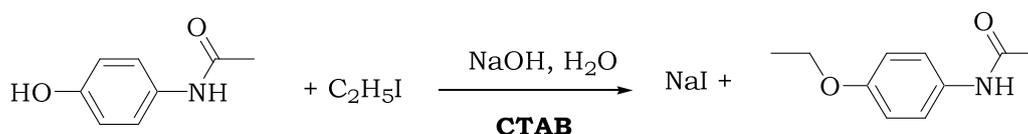


Nous verrons également que des **CTP** intelligemment fonctionnalisés peuvent être utilisés en catalyse asymétrique.

I. Synthèse de la phénacétine

La phénacétine a été utilisée par le passé, pour ses propriétés analgésiques et antipyrétiques, comme principe actif de médicaments. Du fait de sa toxicité, elle a été progressivement retirée de la vente dans les années 80.

La synthèse proposée dans ce sujet est une synthèse de Williamson, c'est-à-dire une réaction de substitution nucléophile entre le 4-acétamidophénol (paracétamol) déprotoné et un halogénure d'alkyle. Dans notre cas, l'utilisation d'un **CTP** permet d'accélérer notablement la réaction.



Vous avez à votre disposition un échantillon d'environ 1 g du brut réactionnel obtenu en suivant le protocole ci-dessous :

Dans un tricol de 100 mL muni d'une agitation mécanique et d'un réfrigérant, préparer une solution constituée de 2 g d'hydroxyde de sodium en pastilles dans 15 mL d'eau. Agiter le mélange jusqu'à dissolution totale (la dissolution est exothermique).

À la solution chaude, ajouter 7,55 g de 4-acétamidophénol et agiter jusqu'à complète dissolution.

*Ajouter 0,57 g de **CTAB** et 4,5 mL de iodoéthane. Ce dernier doit former une seconde phase.*

Vérifier que l'agitation est vigoureuse et chauffer au reflux le mélange biphasique pendant une heure.

Laisser refroidir le mélange réactionnel, ajouter 10 mL d'eau et 50 mL de dichlorométhane. Séparer la phase organique, la conserver, et extraire la phase aqueuse par trois fois 30 mL de dichlorométhane.

Réunir toutes les phases organiques, les sécher sur sulfate de magnésium, et évaporer le solvant à l'évaporateur rotatif.

Partie expérimentale

1. Recristalliser le brut réactionnel dans de l'eau (solubilité de la phénacétine : 12,2 g par litre d'eau bouillante ; inférieure à 1 g par litre d'eau froide). Le schéma du montage ainsi que le volume d'eau ajouté devront apparaître dans la copie.

2. Mesurer la masse du produit recristallisé sec. Une étuve est à votre disposition dans la salle. Vous préciserez dans la copie ce qui vous a permis de considérer que le produit était sec.
3. Analyser le produit obtenu par chromatographie sur couche mince sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'un volume égal d'acétone et d'éther de pétrole. On précise que l'éther de pétrole est un mélange d'alcane obtenu par distillation du pétrole (fraction volatile). La(les) CCM comportant le numéro de poste sera(ont) laissée(s) sur la paillasse à la fin de l'épreuve.
4. Conclure.

Questions sur le protocole

5. Expliquer pourquoi la solubilité du 4-acétamidophénol, de seulement 14 g.L^{-1} dans l'eau à 20°C , devient très élevée dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium.
6. Pourquoi, selon le protocole, l'iодоéthane *doit former une seconde phase* ?
7. Proposer un schéma expliquant l'intérêt de l'utilisation du **CTAB** dans cette synthèse.
8. Pourquoi est-il précisé dans le protocole qu'une agitation vigoureuse est nécessaire ?
9. Expliquer pourquoi l'utilisation de **CTP** s'inscrit dans le développement d'une chimie plus écologique.
10. La synthèse ici proposée ne respecte pas totalement les principes de la chimie verte. Préciser ce qui pourrait être amélioré dans le protocole.
11. Rappeler le principe de la purification par recristallisation. L'eau est-elle un bon solvant de recristallisation pour purifier le brut réactionnel à votre disposition ?
12. Calculer les rapports frontaux du 4-acétamidophénol et de la phénacétine pour la CCM que vous avez réalisée et interpréter la différence entre ces deux valeurs.

Le spectre RMN ^1H du produit obtenu après recristallisation a été réalisé dans le chloroforme deutéré CDCl_3 à la fréquence de 300 MHz. Il est fourni en annexe 3. Le singulet à 7,27 ppm correspond au chloroforme CHCl_3 résiduel dans le chloroforme deutéré. Les tables IR et RMN ^1H sont données en annexes 4 et 5.

13. Interpréter le plus précisément possible ce spectre RMN ^1H . Le chiffre indiqué sous chaque signal correspond à l'intégration.
14. Quelle(s) bande(s) caractéristique(s) doi(ven)t différer entre les spectres IR du 4-acétamidophénol et celui de la phénacétine ?

II. Mesure de la concentration micellaire critique d'un CTP

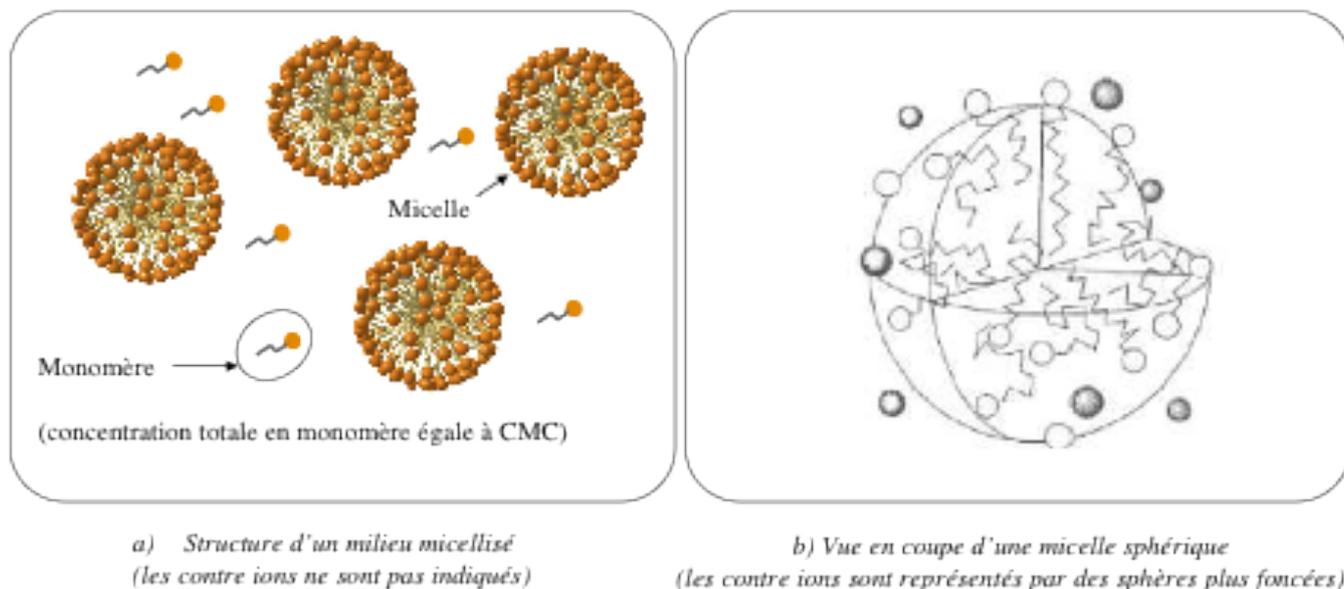
L'ion cétyltriméthylammonium (noté CTA^+) est qualifié d'entité amphiphile de par la présence dans sa structure d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe.

15. Identifier ces deux parties sur la structure de l'ion cétyltriméthylammonium en justifiant votre réponse.

L'existence d'une partie hydrophobe confère à l'ion cétyltriméthylammonium une faible solubilité dans l'eau. À partir d'une certaine concentration, appelée concentration micellaire critique et notée *CMC* (en mol.L^{-1}), on observe un phénomène d'auto-association des ions CTA^+ monomères en édifices supramoléculaires. On appellera « micelle » l'association des ions CTA^+ et des contre

ions Br^- présents à la surface de l'édifice supramoléculaire de CTA^+ . Dès que les micelles sont présentes, la concentration en CTA^+ monomère reste égale à CMC .

La figure ci-dessous, extraite du *Bulletin de l'Union des Physiciens*, M. SCHWING, Vol. 97, n°851, 2003, pp. 323 - 328, présente la structure d'une micelle sphérique :



16. Justifier pourquoi l'association en micelles permet d'augmenter la solubilité dans l'eau de l'ion CTA^+ .

Au niveau microscopique, une micelle est caractérisée par :

- Le nombre N_{ag} d'ions CTA^+ qu'elle contient. Ce nombre sans dimension est appelé nombre d'agrégation.
- Le nombre de contre-ions Br^- présents en surface. Ce nombre est égal à : $\beta \times N_{ag}$. Expérimentalement, on constate que : $\beta < 1$.
- Sa concentration micellaire critique (CMC) qui correspond à la concentration de CTA^+ monomère au-delà de laquelle il y a formation de micelles.

On notera dans la suite de l'énoncé $[mic]$ la concentration (en mol.L^{-1}) en micelles dans le milieu (on rappelle que ce terme englobe les ions CTA^+ micellisés et les ions Br^- présents à la surface des micelles).

Par conséquent, en présence de micelles, les ions Br^- libres (c'est-à-dire non présents à la surface des micelles) ont une concentration égale à :

$$\text{CMC} + (1 - \beta) \times N_{ag} \times [mic]$$

On considère une solution de **CTAB** de concentration C . Les réponses aux questions 17. et 18. pourront être présentées sous forme d'un tableau.

17. Identifier les entités présentes dans le milieu pour $C < \text{CMC}$. Préciser pour chaque entité l'expression de sa concentration (en mol.L^{-1}).
18. Identifier les entités présentes dans le milieu pour $C > \text{CMC}$. Préciser pour chaque entité l'expression de sa concentration (en mol.L^{-1}) en utilisant les notations introduites dans l'énoncé.

De nombreuses techniques expérimentales ont été développées pour réaliser des mesures de *CMC* : par mesure de tension superficielle (car les molécules amphiphiles ont la propriété d'abaisser la tension superficielle à l'interface air – liquide), par mesure conductimétrique pour les entités ioniques, par spectroscopie de fluorescence, par dosage colorimétrique, par spectroscopie RMN...

Nous réaliserons la mesure de la *CMC* du **CTAB** par mesures conductimétriques.

Données à 25°C : Conductivités ioniques molaires limites de quelques ions :

$$\lambda^\circ(\text{Br}^-) = 7,81 \text{ mS.m}^2.\text{mol}^{-1} ; \lambda^\circ(\text{CTA}^+ \text{ monomère}) = 0,32 \text{ mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$$

On négligera dans toutes les questions qui suivent la contribution de HO^- et H_3O^+ présents dans le milieu à la conductivité de la solution.

19. Dans quel cas une mesure conductimétrique est-elle pertinente ? Quelle est la relation entre la conductivité et la concentration des espèces en solution diluée ?
20. Exprimer la conductivité, notée σ (en mS.m^{-1}), d'une solution de **CTAB** à une concentration $C \leq \text{CMC}$. Faire l'application numérique pour $C = 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ à 25°C .
21. Exprimer la conductivité d'une solution de **CTAB** à une concentration $C > \text{CMC}$. On notera λ_{mic} la conductivité ionique molaire d'une micelle et $[\text{mic}]$ la concentration en micelles.
22. On appelle $[\text{CTA}^+]_{\text{micellisé}}$ la concentration en ions CTA^+ associés dans les micelles. Exprimer $[\text{CTA}^+]_{\text{micellisé}}$ en fonction de C et de *CMC*.

On pose $[\text{mic}] = \frac{[\text{CTA}^+]_{\text{micellisé}}}{N_{\text{ag}}}$ et on admet que $\lambda_{\text{mic}} = (1 - \beta) \times N_{\text{ag}} \times \lambda^\circ(\text{CTA}^+)$

23. Démontrer que l'expression établie à la question 21. peut être réécrite sous la forme :

$$\sigma = (\lambda^\circ(\text{Br}^-) + \lambda^\circ(\text{CTA}^+)) \times \beta \times \text{CMC} + (\lambda^\circ(\text{Br}^-) + \lambda^\circ(\text{CTA}^+)) \times (1 - \beta) \times C$$

24. Sachant que la *CMC* du **CTAB** est inférieure à $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, présenter de manière qualitative l'allure du tracé de σ en fonction de C pour une gamme de concentration en **CTAB** comprise entre $C = 0$ et $C = 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ à 25°C . Ce tracé sera justifié.
25. En déduire une méthode graphique de détermination de la *CMC*.

Partie expérimentale

La *CMC* va être déterminée en réalisant un suivi conductimétrique lors de la dilution d'une solution de **CTAB** de concentration $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

On prélèvera un volume de 20 mL de la solution de **CTAB** qu'on diluera par ajouts successifs d'eau.

Ordre de grandeur attendu pour la gamme réalisée : $[3 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}]$.

26. Proposer un protocole expérimental permettant de réaliser la gamme attendue à partir du matériel à disposition sur la paillasse. Compléter le tableau de mesures donné en annexe 6.
27. Exploiter vos résultats expérimentaux afin de déduire la *CMC* du **CTAB**. On s'attachera à présenter un résultat final prenant en compte les incertitudes associées aux mesures. Un tableur (Excel ou Regressi) est à votre disposition sur les ordinateurs. Le graphe où figurera le numéro de poste sera rendu avec la copie.

Cet extrait de l'ouvrage *Chimie physique* d'après P. W. ATKINS, De Boeck universités, **2000**, s'intéresse à la thermodynamique de formation des micelles.

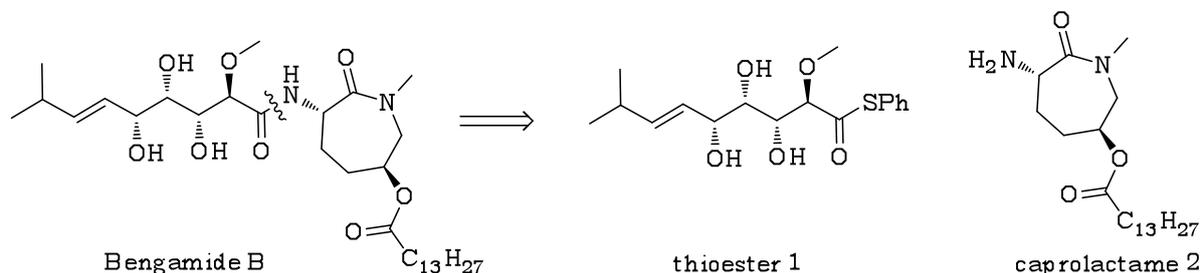
*La formation de micelles dans les systèmes aqueux est généralement endothermique, avec $\Delta H \approx 1-2$ kJ par mole de tensioactif. Le fait que les micelles se forment au-dessus de la CMC indique que la variation d'entropie accompagnant leur formation doit être positive, et les mesures donnent une valeur d'environ $+140 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ à température ambiante. Le fait que la variation d'entropie soit positive bien que les molécules s'agglomèrent montre qu'il doit y avoir une contribution à l'entropie de la part du solvant dont les molécules doivent être plus libres de se déplacer une fois que les molécules de soluté se sont rassemblées. Cette interprétation est plausible, car chaque molécule individuelle de soluté est contenue dans une cage de solvant organisée mais, une fois que la micelle s'est formée, les molécules de solvant n'ont besoin de former qu'une seule cage (sans doute plus grande). L'augmentation d'énergie quand les groupes hydrophobes s'assemblent en réduisant l'effet qu'ils exercent sur la structuration du solvant est à l'origine de l'**interaction hydrophobe**, qui tend à stabiliser les regroupements hydrophobes dans les macromolécules biologiques. L'interaction hydrophobe est un exemple de processus d'organisation d'un soluté, que la thermodynamique favorise par suite de la tendance du solvant à aller vers un plus grand désordre.*

- 28.** Justifier précisément la phrase « *Le fait que les micelles se forment au-dessus de la CMC indique que la variation d'entropie accompagnant leur formation doit être positive* ».
- 29.** Pourquoi le fait que la variation d'entropie lors de la formation des micelles soit positive implique une contribution à l'entropie de la part du solvant ?

III. Synthèse stéréosélective à l'aide d'un CTP chiral

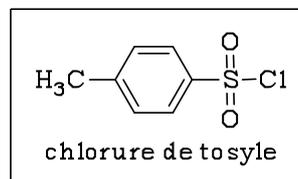
Les bengamides naturels font l'objet d'activités de recherche intenses tant d'un point de vue chimique que biologique car elles présentent des propriétés antitumorales, antibiotiques et vermifuges. En particulier, le bengamide B, issu de certaines éponges de la famille des Jaspidae, ainsi que ses analogues, sont des cibles de choix pour la mise en place de nouvelles thérapies luttant contre les tumeurs.

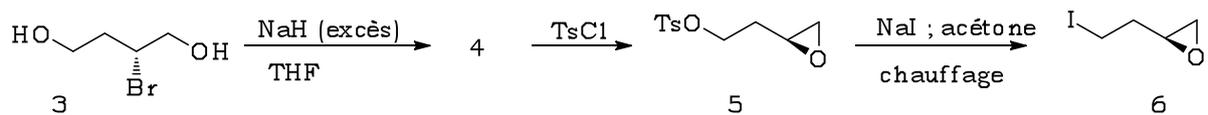
Une synthèse convergente dont l'étape finale est le couplage entre un thioester et un caprolactame a été mise au point. Les diverses fonctionnalisations de ce dernier permettent d'accéder à une large variété de bengamides.



Cette partie du sujet porte sur la synthèse du caprolactame **2** dont une étape clef fait intervenir un catalyseur par transfert de phase chiral.

Le bromoalcool **3** est mis à réagir avec un excès d'hydrure de sodium pour donner l'intermédiaire **4** qui n'est pas isolé et mis à réagir avec le chlorure de tosylate (TsCl) afin d'obtenir **5**. Le groupe tosylate (TsO⁻) est un bon groupe partant. Il est donc aisé d'obtenir **6** à l'aide d'une réaction de substitution nucléophile en faisant réagir **5** avec des ions iodures I⁻.



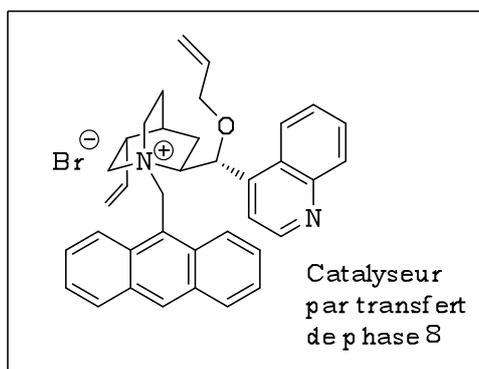
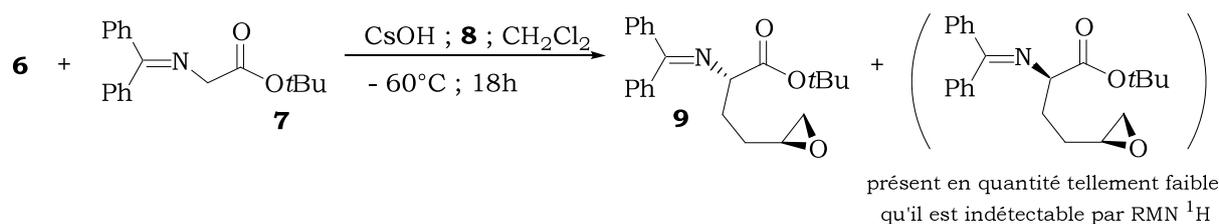


30. Donner la structure de **4**.

31. Écrire le mécanisme de la réaction **3** → **4**.

32. Comment qualifier la réaction **3** → **4** en terme de stéréosélectivité / stéréospécificité ? La définition de ces deux derniers termes sera précisée.

Le iodoépoxyde **6** est mis à réagir avec l'imine **7** en présence d'hydroxyde de césium (CsOH) et d'un catalyseur par transfert de phase **8**.



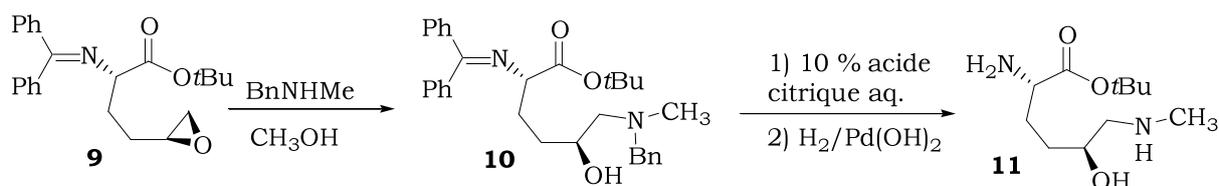
33. Outre l'orientation stéréochimique de la réaction, préciser en quoi un catalyseur par transfert de phase est nécessaire pour que la réaction ait lieu en un temps raisonnable.

34. Quelle est la relation de stéréochimie entre les deux isomères de **9** ?

35. À l'aide de formules mésomères différentes, expliquer pourquoi il est aisé de déprotoner l'imine **7**.

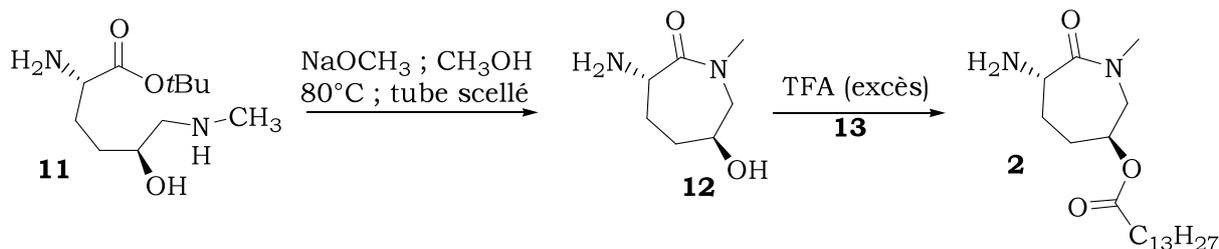
36. Combien de carbones asymétriques possède le composé **9** ? Préciser la configuration de chacun d'entre eux. En déduire le nombre de stéréoisomères de **9**.

L'époxyde **9** est ouvert par de la N-benzylméthylamine puis les fonctions amine sont déprotégées conduisant à **11**.



37. Proposer un mécanisme pour la réaction **9** → **10**.

La fin de la synthèse est décrite ci-dessous :



38. Proposer un mécanisme pour la réaction **11** → **12**.
39. Le TFA est l'acide trifluoroacétique. Proposer une structure pour le réactif **13**.
40. Quel sous-produit non désiré est-on susceptible d'obtenir en l'absence de TFA (introduit en excès) ?

IV. Titrage d'un CTP

On se propose ici d'étudier le titrage d'une solution aqueuse de l'ammonium quaternaire **CTAB** utilisé dans la première synthèse.

Dans ce titrage, le **CTAB** (bromure de cetyltriméthylammonium) est mis en présence d'un excès d'ions iodure. Le CTAI (iodure de cetyltriméthylammonium) très lipophile peut alors être extrait de la phase aqueuse.

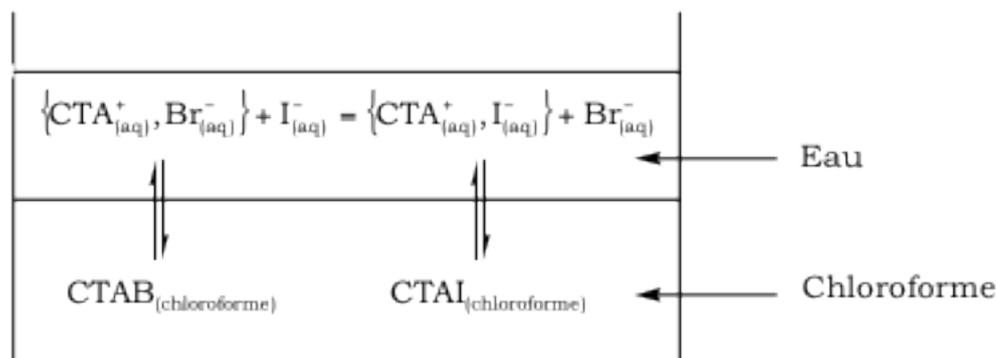
Le protocole suivant, inspiré de la publication *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, C. D. RASMUSSEN, H. B. NIELSEN and J. E. T. ANDERSEN, vol. 60, n°2, **2006**, pp. 104 – 110, peut être envisagé.

Dans une ampoule à décanter sont ajoutés :

- $V_0 = 25,0 \text{ mL}$ d'une solution aqueuse de **CTAB** de concentration $C_0 \text{ mol.L}^{-1}$
- 25 mL de chloroforme (CHCl_3)
- 10 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium de concentration $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$
- $V_1 = 10,0 \text{ mL}$ d'une solution de iodure de potassium (KI) de concentration massique $c_1 = 50,0 \text{ g.L}^{-1}$

Les phases sont séparées et la phase aqueuse est à nouveau extraite 3 fois par des portions de 10 mL de chloroforme de façon à s'assurer qu'il ne reste plus de CTAI en solution aqueuse.

Au cours des extractions, il s'établit une succession d'équilibres comme décrit sur le schéma ci-dessous.



Compte tenu de :

- La plus grande lipophilie du CTAI par rapport au **CTAB**
- L'excès d'ions iodure
- La répétition de l'extraction

On considèrera que la totalité du **CTAB** introduit initialement est transformée en CTAI et que la totalité du CTAI est solubilisée dans le chloroforme.

Les ions iodure en excès dans la phase aqueuse peuvent ensuite être titrés comme décrit dans le protocole ci-dessous :

La phase aqueuse est récupérée, acidifiée par 40 mL d'acide chlorhydrique et les ions iodure (I⁻) restant sont titrés par une solution de iodate de potassium (K⁺, IO₃⁻) de concentration molaire C₂ = 5,00.10⁻² mol.L⁻¹. La solution se colore. Lorsque le milieu devient presque incolore, 2 mL de chloroforme sont ajoutés, la solution est vivement agitée et le titrage se poursuit jusqu'à la décoloration du chloroforme.

On trouve un volume à l'équivalence V_{eq} = 15,80 mL.

Lors de ce titrage, deux réactions quantitatives et successives ont lieu :

- Réaction (1) entre I⁻ et IO₃⁻ conduisant à la formation de I₂ : la solution se colore.
- Réaction (2) entre I₂ et IO₃⁻ en présence de Cl⁻ conduisant à la formation de ICl₂⁻ et donc à la décoloration du milieu.

Le bilan de ces deux réactions s'écrit :



Donnée : Masse molaire de KI = 166,0 g.mol⁻¹

- 41.** Donner les nombres d'oxydation de l'iode dans les ions iodure et iodate.
- 42.** Écrire l'équation de la réaction (1) sachant qu'elle met en jeu les couples redox IO₃⁻/I₂ et I₂/I⁻.
- 43.** Calculer la concentration C₀ ainsi que la masse de **CTAB** présente dans l'échantillon titré.
- 44.** Expliquer pourquoi l'ajout de 2 mL de chloroforme en fin de titrage permet d'améliorer la précision du titrage.

Annexe 1 – Données de sécurité relatives aux produits utilisés

Produits	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	T _{fus} (°C)	Sécurité
CTAB	364,45	237 à 243	 H 302 – 315 – 318 – 335 – 373 – 400 P 261 – 273 – 280 – 305+351+338
Dichlorométhane	-	-	 H 315 – 319 – 351 – 336 – 335 – 373 P 261 – 281 – 280 – 305+351+338
Phénacétine	179,22	134 - 136	 H 302 – 350 P 201 – 308+313
4-acétamidophénol	151,17	167	 H 302 – 315 – 319 – 335 P 261 – 305+351+338
Ether de pétrole	-	-	 H 225 – 304 – 315 – 336 – 411 P 210 – 301+310 – 331 – 370+378 – 403+235
Acétone	--	-	 H 225 – 319 – 336 P 210 – 305+351+338 – 370+378 – 403+235

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.

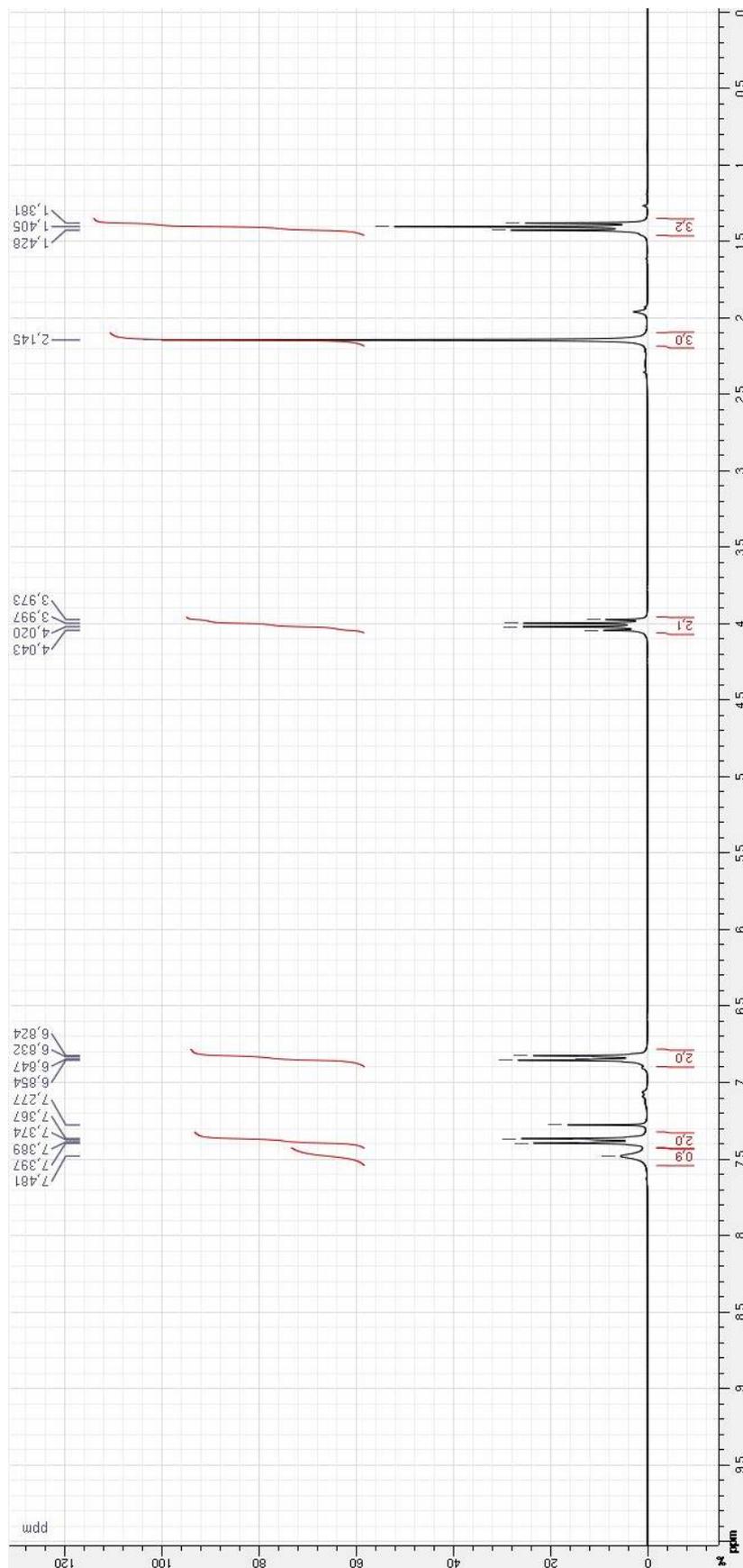
Conseils de prudence

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.

Annexe 3 – Spectre RMN ¹H de la phénacétine



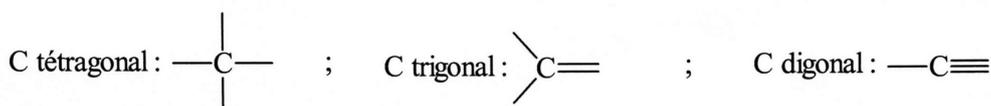
Annexe 4 – Table de valeurs de déplacements chimiques en RMN ¹H

Protons CH ₃	δ	Protons CH ₂	δ	Protons CH	δ
Lié à un C AX ₃ :		Lié à un C AX ₃ :		Lié à un C AX ₃ :	
CH ₃ -C	0,9	CH ₂ -C	1,3	CH-C	1,5
CH ₃ -C-NH ₂ (ou NR ₂)	1,15	CH ₂ -C-NH ₂ (ou NR ₂)	1,3	CH-C-OH(ou OR)	1,6-2
CH ₃ -C-Ar	1,25	CH ₂ -C-Ar	1,6	CH-C-Cl	1,6
CH ₃ -C-OH(ou OR)	1,15-1,3	CH ₂ -C-OH(ou OR)	1,8		
En α d'une insaturation:		En α d'une insaturation:		En α d'une insaturation:	
CH ₃ -C=C	1,6	CH ₂ -C=C	2,1-2,3	CH-C=C	2,5
CH ₃ -CO-OR	2,0	CH ₂ -C≡C	2,6	CH-C≡N	2,7
CH ₃ -CO-OH	2,1	CH ₂ -CO-OR	2,2	CH-CO-OH	2,6
CH ₃ -CO-NH ₂ (ou NR ₂)	2-2,1	CH ₂ -CO-OH	2,35	CH-CO-R	2,5-2,7
CH ₃ -C=C-C=O		CH ₂ -CO-NH ₂ (ou NR ₂)	2,1-2,2	CH-Ar	3,0
CH ₃ -CO-R	2,0	CH ₂ -C=C-C=O		CH-CO-Ar	3,3
CH ₃ -Ar	2,1-2,2	CH ₂ -CO-R	2,4		
CH ₃ -CO-Ar	2,3-2,4	CH ₂ -Ar	2,4		
	2,6	CH ₂ -CO-Ar	2,7		
			2,9		
Lié à un hétéroatome		Lié à un hétéroatome		Lié à un hétéroatome	
CH ₃ -NH ₂ (ou NR ₂)	2,1-2,3	CH ₂ -NH ₂ (ou NR ₂)	2,5	CH-NH ₂ (ou NR ₂)	2,9
CH ₃ -NH-COR	2,8-2,9	CH ₂ -NH-COR	3,3	CH-NH-COR	3,8-4,1
CH ₃ -OR	3,3	CH ₂ -OR	3,4	CH-OR	3,7
CH ₃ -OH	3,4	CH ₂ -OH	3,6	CH-OH	3,9
CH ₃ -OCOR	3,7	CH ₂ -OCOR	4,2	CH-OCOR	4,8-5,1
CH ₃ -OAr	3,8	CH ₂ -OAr	4,0	CH-OAr	4,0
CH ₃ -NO ₂	4,3	CH ₂ -NO ₂	4,4	CH-NO ₂	4,5-4,7
Protons liés à un C insaturé:	δ	Protons portés par un hétéroatome. Leur position dépend considérablement du solvant et de la concentration.			
-C≡CH	1,8-3,1	OH	NH		
-C=CH-	4,5-6,0	Alcool (ROH) : 0,7-5,5	Amine aliphatique (RNH ₂ , RNH-) : 0,6-5,0		
ArH	6,5-8,2	Phénol (ArOH) : 4,5-7,1	Amine aromatique (ArNH ₂ , ArNH-) : 2,9-4,7		
	(benzène : 7,27)	Amides (-CO-NH ₂ , CO-NH-) : 6,0-8,5			
RCH=O	9,5-10,0	Acide (R-CO-OH) : 10,5-12,5			
ArCH=O	9,7-10,5				

Annexe 5 – Table des nombres d'onde en spectroscopie infrarouge

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

F : fort ; m : moyen ;
f : faible



Le nitrate d'ammonium

L'épreuve de travaux pratiques de chimie de cette année s'intéressait aux catalyseurs par transfert de phase.

La partie expérimentale mettait un jeu une recristallisation, une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) et une détermination de concentration micellaire critique (CMC) par conductimétrie.

La partie théorique s'intéressait à l'utilisation des catalyseurs par transfert de phase en synthèse organique, à leur propriété d'auto-association en micelles et à leur dosage sur l'exemple du bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB).

Le jury a rappelé au début de l'épreuve que la note finale prend à parts égales la partie expérimentale (questions 1, 2, 3, 4, 26 et 27 ; feuille de résultat et qualité des manipulations) d'une part et la partie théorique soit l'intégralité du reste du sujet d'autre part. Dès lors, une copie même brillante ne pourra compenser une absence de résultats expérimentaux.

Cette année, le jury a apprécié le bon investissement des candidats dans la partie expérimentale.

Le jury attire toutefois l'attention des futurs candidats sur le soin apporté à la rédaction (construction de phrases, orthographe, propreté...)

I. Synthèse de la phénacétine

Partie expérimentale

Les candidats devaient réaliser une recristallisation d'un brut réactionnel contenant de la phénacétine et du 4-acétamidophénol (paracétamol) dans l'eau.

Le jury a constaté beaucoup d'hésitations et d'erreurs dans la mise en place d'un chauffage à reflux :

- Mauvaise utilisation de la graisse sur les rodages.
- Mauvaise utilisation de différentes pinces.
- Absence de contrôle de la verticalité du montage.
- Manque d'étanchéité du montage à reflux.
- Support élévateur non relevé.
- Inversion des branchements d'arrivée d'eau au niveau du réfrigérant.

De même, bon nombre de candidats ne maîtrisent pas la technique de recristallisation.

Celle-ci consiste à solubiliser dans un minimum de solvant (volume à mesurer à l'éprouvette) chaud le solide à purifier. Lors du refroidissement, les impuretés restent solubles dans le solvant de recristallisation tandis que le composé majoritaire atteint sa limite de saturation et précipite.

En pratique, le volume de solvant introduit initialement dans le ballon ne doit donc pas être trop important. Si ce dernier est insuffisant pour une solubilisation complète au reflux, un nouvel ajout modéré de solvant s'avère nécessaire jusqu'à dissolution totale.

Une fois cette dissolution totale atteinte, il n'est pas nécessaire d'attendre plus longtemps pour stopper le chauffage. Il convient alors d'attendre l'arrêt du reflux avant l'ouverture du montage.

Une fois le solide obtenu, il était nécessaire de l'isoler par filtration sur Büchner. Très peu de candidats réalisent correctement cette filtration. Le jury rappelle que :

- La fiole à vide doit être fixée
- Le solide doit être nettoyé avec un peu d'eau et trituré
- Lors de ce dernier lavage, le vide doit être coupé

Afin d'enlever les dernières traces d'eau, le solide devait être séché à l'étuve jusqu'à masse constante.

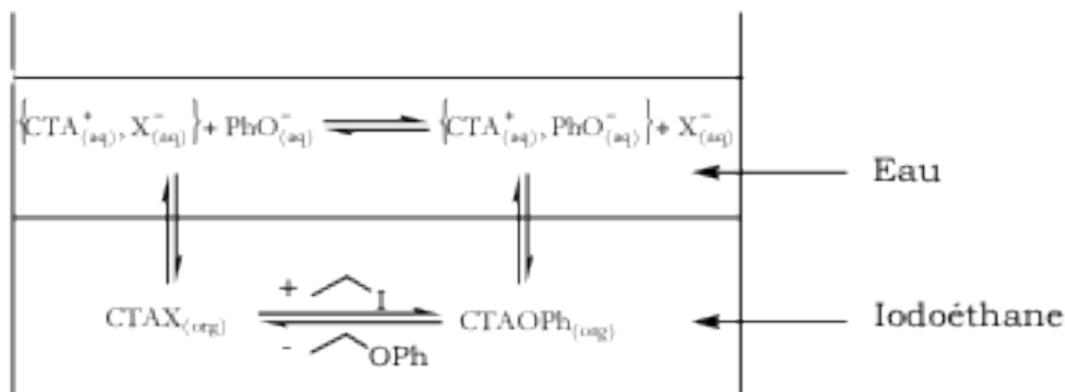
Enfin, la qualité de la purification devait être contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM). Bien que cette technique soit globalement mieux maîtrisée par les candidats, le jury rappelle néanmoins que :

- La cuve (pot de confiture par exemple) doit être saturée avant l'élution.
- Les produits doivent être solubilisés dans un solvant organique adapté (pas dans l'eau !).
- La concentration des dépôts doit être vérifiée sous lampe UV avant élution.
- Une fois la plaque déposée, la cuve ne doit plus être déplacée pendant l'élution.
- Le front de l'éluant doit être repéré dès que la plaque est sortie de la cuve.
- L'excès d'éluant est à évaporer (au sèche-cheveux).
- Les tâches doivent être entourées lors de la révélation (sous UV dans ce cas).

Questions sur le protocole

Il est rappelé aux candidats que le phénol est un acide faible ($pK_A = 10$) : en milieu basique, il est donc déprotoné sous forme d'ion phénolate, beaucoup plus soluble que le phénol dans l'eau en raison de son caractère ionique.

Le mode d'action du bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) comme catalyseur par transfert de phase n'est pas compris. Le jury attendait un schéma du type (avec $X^- = Br^-$ ou I^-) :



Concernant l'amélioration du protocole de synthèse de la phénacétine, le dichlorométhane devrait être substitué par un autre solvant afin de respecter les principes de la chimie verte (*cf* phrases H et P).

Les rapports frontaux sont bien définis et calculés dans l'ensemble. Toutefois dans l'interprétation de la différence entre les rapports frontaux, il est nécessaire de ne pas considérer uniquement la polarité, mais aussi la possibilité de liaisons hydrogène entre les groupes silanol (Si-OH) de la silice et le groupement phénol du 4-acétamidophénol dans l'exemple étudié.

Enfin, de grosses difficultés sont à noter en spectroscopie :

- Pour l'interprétation d'un spectre RMN. Une analyse systématique peut aider à l'interprétation en présentant les résultats sous forme d'un tableau du type :

H	Nombre de H	Nombre de H voisins	Multiplicité	Déplacement chimique δ (ppm)	Commentaire éventuel

- En spectroscopie IR, le jury attend que les candidats repèrent l'apparition ou la disparition des bandes caractéristiques modifiées au cours de la réaction (bande caractéristique de la liaison O–H dans la réaction étudiée).

II. Mesure de la concentration micellaire critique d'un CTP

Partie théorique

L'objectif de cette partie théorique était d'aider les candidats à élaborer un protocole expérimental de détermination de la concentration micellaire critique (CMC) du CTAB par conductimétrie. Pour ce faire, l'établissement des expressions de la conductivité σ en fonction de la concentration en CTAB (notée C), avant et après micellisation, était réalisé. Peu de candidats sont parvenus à démontrer l'expression de σ après micellisation (expression donnée dans l'énoncé) faute d'un bilan correct des espèces présentes dans le milieu pour $C > \text{CMC}$. Le tracé de σ en fonction de C, mettant en évidence une évolution affine et une rupture de pente (plus faible pour $C > \text{CMC}$), a rarement été présenté correctement. Par conséquent, peu de candidats ont été en mesure de proposer une méthode graphique de détermination de la CMC (questions 24, 25 et 26 très peu traitées).

Néanmoins, le caractère amphiphile de l'ion CTA^+ et l'intérêt de l'auto-association en micelles pour augmenter sa solubilité dans l'eau ont été dans l'ensemble bien justifiés. Le bilan des espèces présentes dans le milieu avant micellisation et le calcul de la conductivité σ ont été réalisés par la majorité des candidats. Toutefois, certains candidats n'aboutissent pas au bon résultat numérique à cause d'une expression de σ erronée ou à cause de problèmes d'unités. Le jury a été surpris des nombreuses confusions rencontrées dans les copies entre les termes « conductivité », « conductance » et « conductimétrie ».

Partie expérimentale

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

- Précise la verrerie utilisée pour le prélèvement des solutions (pipette jaugée de 20 mL pour la solution mère de CTAB, burette graduée pour les ajouts d'eau).
- Détermine le volume maximal d'eau à ajouter pour obtenir la concentration limite de la gamme précisée dans l'énoncé ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).
- Prévoit un nombre de points de mesure suffisant : il n'est pas acceptable de tracer 2 portions de droites avec seulement 2 ou 3 points par droite.

L'utilisation d'un tableur permettait de calculer très rapidement toutes les concentrations.

Lors de la réalisation de la manipulation, le jury rappelle que :

- Les manipulations doivent être faites 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).

- Le capuchon de la cellule conductimétrique (et de toute autres électrodes de manière générale !) doit être ôté.

Une fois les mesures réalisées, une exploitation était attendue. Le jury regrette que l'exploitation n'ait pas été menée jusqu'au bout de manière informatique pour le tracé des droites de modélisation. Lors du tracé d'un graphe, un titre explicite ainsi que des légendes et unités sur les axes sont attendus.

Très peu de candidats ont réussi à exploiter totalement cette manipulation.

Enfin, l'utilisation des gants doit se faire à bon escient : dans ce sujet, le port de gants était attendu pour la manipulation de la phénacétine mais proscrit pour l'utilisation de l'ordinateur.

III. Synthèse stéréosélective à l'aide d'un CTP chiral

La partie III a rencontré peu de succès auprès des candidats.

- Si la structure de l'époxyde 4 a été trouvée par quelques candidats, le mécanisme S_N2 n'a quasiment jamais été écrit avec succès.
- Il est surprenant de constater que les termes de stéréosélectivité et stéréospécificité ne sont pas connus des candidats.
- Si la question 37 portait encore sur la S_N2 , la question 38 demandait de connaître le mécanisme d'addition/élimination (pour décrire la formation d'un amide).
- Enfin, la question 39 n'a pas été comprise par les candidats qui ont donné la structure du TFA et non du composé 13 comme demandé par l'énoncé.

IV. Titrage d'un CTP

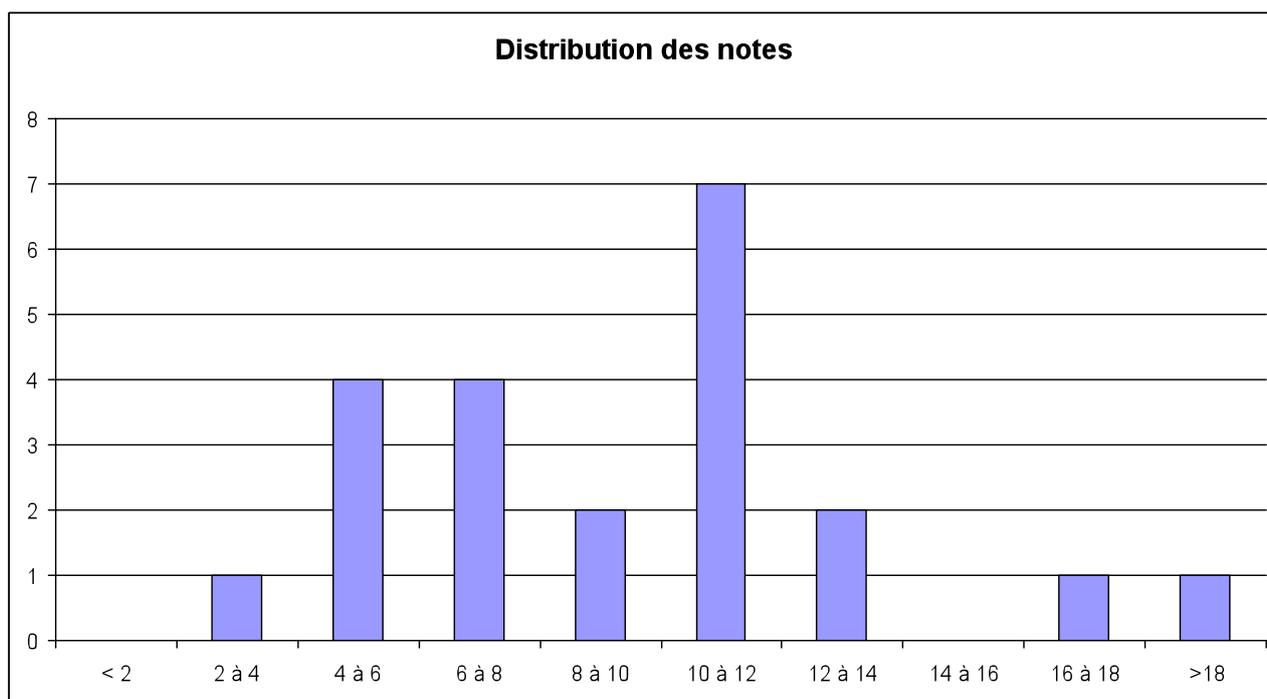
La détermination du nombre d'oxydation d'un élément chimique n'est pas toujours correcte.

De même, l'écriture d'une réaction redox n'est que très rarement maîtrisée : si les demi-équations redox sont souvent proposées, elles sont trop souvent fausses (en particulier pour le couple IO_3^-/I_2) et quand elles sont correctes, il n'est pas rare de trouver des électrons dans le bilan.

Concernant le dosage, quelques rares candidats ont réussi à exploiter totalement le dosage indirect par excès des ions iodure.

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

Moyenne 09,3/20
Ecart type 4,0



	I. Synthèse de la phénacétine													
N° question	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
% réponses	91	82	exp	86	77	68	50	73	59	18	82	77	32	41
% bonnes réponses	76	47	exp	68	50	73	20	68	50	13	36	56	53	67

exp = évalué dans la partie expérimentale

	II. Mesure de la concentration micellaire critique d'un CTP														
N° question	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
% réponses	95	91	77	68	68	59	41	41	27	36	36	91	41	41	45
% bonnes réponses	76	66	57	54	52	49	11	67	33	27	32	33	32	46	25

	III. Synthèse stéréosélective à l'aide d'un CTP chiral										IV. Titrage d'un CTP				
N° question	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
% réponses	36	36	32	32	45	32	45	23	9	18	5	77	86	45	27
% bonnes réponses	50	6	6	19	30	17	33	0	0	0	0	79	57	50	8

ÉPREUVE ORALE DE LEÇON

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

SUJETS

BIOCHIMIE	MICROBIOLOGIE	BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE
Les cellules souches : des propriétés aux applications biotechnologiques et biomédicales.	Les procaryotes vivant en conditions extrêmes.	Plaques motrices : ontogenèse, activation musculaire et méthodes d'exploration musculaire.
Le transport nucléaire.	Les virus à tropisme nerveux.	Les muscles lisses.
Le réticulum endoplasmique.	Les biofilms.	Équilibres acide-base et bicarbonates.
L'autophagie.	Les mécanismes de résistance aux antibiotiques.	Les cytokines régulatrices de la réponse immunitaire.
De la cinétique à la structure des enzymes.	Les vaccins.	Hématies, hémoglobine et adaptations physiologiques.
Réponses cellulaires aux molécules toxiques exogènes et endogènes.	Les virus de la grippe.	Vaisseaux sanguins centraux et périphériques.
Contrôle de l'agrégation des protéines.	Les infections virales : du diagnostic à la thérapeutique.	Protéines G et signalisation intracellulaire.

RAPPORT DU JURY DE LEÇONS

Statistiques de l'épreuve

21 candidats ont composé.

La moyenne des notes obtenues est de 7,14 avec une erreur standard de 3,732 avec :

- la meilleure note : 15/20 ;
- la note la plus basse : 02/20.

Moyenne des candidats admis : 9,27 avec une erreur standard de 3,495.

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, le jury n'a pu que constater un niveau général trop faible de certains candidats quel que soit le champ thématique abordé, comme en témoigne une moyenne d'épreuve de 7,14 contre 8,80 pour la session 2015.

Ceci est en particulier lié au fait que 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. Jusqu'à 17 livres 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 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 général. Ceci est patent au moment des questions, ce qui 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 se sont contentés 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 altérant à la fois 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 par exemple n'ayant duré que 19 minutes.

Le jury rappelle que l'introduction doit permettre de cerner le sujet et d'apporter quelques notions permettant 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 se doivent d'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 avantage d'une démarche d'ouverture sur des projets de recherche, des enjeux éthiques, économiques, sociétaux, de santé publique et/ou des applications biotechnologiques ou biomédicales.

Le jury a apprécié les grandes qualités de communication de certains candidats : respect du temps imparti, structuration de l'exposé, dynamisme et posture enseignante, qualité des supports, du plan, des conclusions partielles, des transitions, l'ensemble apportant de la légitimité au propos. Rappelons aussi que doivent figurer sur les diapositives les illustrations supportant le propos et un minimum de texte (*i.e.* un ensemble de mots-clés) permettant 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.

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, le candidat se doit de faire 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 pour le vocabulaire scientifique pour 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, force est de constater le niveau extrêmement faible de certains candidats. Les fondamentaux (définition et propriété d'une enzyme allostérique, propriétés réactionnelles du radical NO, propriétés physiques des membranes biologiques, mécanismes biochimiques de défenses cellulaires en réponse à un stress, métabolisme énergétique, par exemple) sont au mieux partiellement acquis, au pire inconnus des candidats. Le niveau général en Biochimie de la plupart des candidats à l'agrégation de Biochimie-Génie Biologique reflète plus celui d'un étudiant de L1 que celui de niveau M2. Sans cette connaissance de base des principaux fondamentaux de Biochimie, il devient particulièrement difficile pour le candidat de mettre en perspective ses connaissances dans un cadre plus global se situant à l'échelle de l'organisme et pour plusieurs situations physiopathologiques.

Rapport sur les leçons de Microbiologie

Les sujets proposés cette année étaient relativement classiques et assez ciblés, donc sans difficulté majeure pour un candidat bien préparé à cette épreuve. De trop nombreux candidats manquaient de connaissances générales en microbiologie : concepts de base dans ce domaine et vision intégrée en particulier concernant les interactions du monde microbien avec leur environnement et leurs hôtes. Ceci a affecté leur compréhension de la problématique et limité leur exposé à seulement un des aspects qui devaient être développés. À noter que la Microbiologie, et en particulier la Virologie, ne se limite pas à une classification des virus et à quelques cycles viraux que les candidats utilisent trop souvent de manière inappropriée.

Certains sujets 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 notions n'ont très souvent pas été introduites de manière satisfaisante (globales et synthétiques, ou ponctuelles pour illustration précise) et n'ont même parfois pas été évoquées. En particulier, le niveau de connaissance des candidats en immunologie et en biologie cellulaire s'est avéré particulièrement faible cette année.

Rapport sur les leçons de Biologie Cellulaire et Physiologie

Les commentaires généraux développés précédemment s'appliquent intégralement bien sûr aux leçons de Biologie Cellulaire et Physiologie. Une remarque spécifique mérite d'être mentionnée. Les objectifs et les programmes de Physiologie/Biologie cellulaire de l'agrégation BGB sont orientés sur l'humain. Certaines leçons de physiologie (par exemple les adaptations à des milieux hypoxiques) peuvent se prêter à des comparaisons inter-espèces. Celles-ci se doivent toutefois d'être limitées dans le cadre du concours BGB : d'une part les risques d'erreur inhérents à un élargissement du sujet sont fortement accrus. D'autre part, le temps monopolisé par ces aspects ne sera plus disponible pour aborder de façon plus posée et précise des aspects cellulaires ou moléculaires spécifiques de l'espèce humaine, dans la problématique imposée.

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

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

SUJETS

La plasticité des cellules lymphoïdes innées	<p>Silver JS, Kearley J, Copenhaver AM, Sanden C, Mori M, Yu L, Pritchard GH, Berlin AA, Hunter CA, Bowler R, Erjefalt JS, Kolbeck R, Humbles AA Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs <i>Nature Immunology</i>, 2016, vol. 17(6), p. 626-635</p>
	<p>McKenzie AN, Spits H, Eberl G Innate lymphoid cells in inflammation and immunity <i>Immunity</i>, 2014, vol. 41, p. 366-374</p>
Cellules de Merkel et toucher	<p>Ikeda R, Cha M, Ling J, Jia Z, Coyle D, Gu JG Merkel cells transduce and encode tactile stimuli to drive Aβ-afferent impulses <i>Cell</i>, 2014, vol. 157, p. 664-675</p>
	<p>Woo SH, Lumpkin EA, Patapoutian A Merkel cells and neurons keep in touch <i>Trends in Cell Biology</i>, 2015, vol. 25(2), p. 74-81</p>
Nouvelle stratégie contre les bactéries cachées	<p>Lehar SM, Pillow T, Xu, M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos W, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee, BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis, E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Tan MW, Brown EJ, Mariathasan S Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular <i>S. aureus</i> <i>Nature</i>, 2015, vol. 527, p. 323-328 + METHODS (+ EXTENDED DATA sur la clé)</p>
	<p>Nannini E, Murray BE, Arias CA Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Current Opinion in Pharmacology</i>, 2010, vol. 10, p. 516-521</p>
Ligand supramoléculaire de PXR	<p>Delfosse V, Dendele B, Huet T, Grimaldi M, Boulahtouf A, Gerbal-Chaloin S, Beucher B, Roeck D, Muller C, Rahmani R, Cavailles V, Daujat-Chavanieu M, Vivat V, Pascussi JM, Balaguer P, Bourget W Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds <i>Nature Communications</i>, 2015, p. 1-10</p>
	<p>Wang YM, Chai SC, Brewer CT, Chen T Pregnane X receptor and drug-induced liver injury <i>Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology</i>, 2014, vol. 10(11), p. 1521-1532</p>
Un sésame pour entrer dans les cellules	<p>Coyne CB, Bergelson JM Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit Coxsackievirus entry through epithelial tight junctions <i>Cell</i>, 2006, vol. 124, p. 119-131</p>
	<p>Diaz F, Rogriguez-Boulan E Open Sesame! Coxsackieviruses conspire to trespass the tight junctional gate <i>Developmental Cell</i>, 2006, vol. 10, p. 151-152</p>

Bases moléculaires de la détection du taux de dioxygène circulant	Chang AJ, Ortega FE, Riegler J, Madison DV, Krasnow MA Oxygen regulation of breathing through an olfactory receptor activated by lactate <i>Nature</i> , 2015, vol. 527, p. 240-244 + <i>METHODS</i> (+ <i>EXTENDED DATA</i> sur la clé)
	Smith KA, Yuan JXJ H₂S, a gasotransmitter for oxygen sensing in carotid body. Focus on “Endogenous H₂S is required for hypoxic sensing by carotid body glomus cells”. <i>American Journal of Physiology and Cell Physiology</i> , 2012, vol. 303, p. C911-C912
Inhibition de la voie oncogénique RAS-ERK	Herrero A, Pinto A, Colon-Bolea P, Casar B, Jones M, Agudo-Ibanez L, Vidal R, Tenbaum SP, Nuciforo P, Valdizan EM, Horvath A, Orfi L, Pineda-Lucena A, Bony E, Keri G, Rivas G, Pazos A, Gozalbes R, Palmer HG, Hurlstone A, Crespo P Small molecule inhibition of ERK dimerization prevents tumorigenesis by RAS-ERK pathway oncogenes <i>Cancer Cell</i> , 2015, vol. 28, p. 170-182
	Little AS, Smith PD, Cook SJ Mechanisms of acquired resistance to ERK1/2 pathway inhibitors <i>Oncogene</i> , 2013, vol. 32, p. 1207-1215
Immunologie de la surinfection	Schliehe C, Flynn EK, Vilagos B, Richson U, Swaminathan S, Bosnjak B, Bauer L, Kandasamy RK, Griesshammer IM, Kosack L, Schmitz F, Litvak V, Sissons J, Lercher A, Bhattacharya A, Khamina K, Trivett AL, Tessarollo L, Mesteri I, Hladik A, Merkler D, Kubicek S, Knapp S, Epstein MM, Symer DE, Aderem A, Bergthaler A The methyltransferase Setdb2 mediates virus-induced susceptibility to bacterial superinfection <i>Nature Immunology</i> , 2015, vol. 16(1), p. 67-74 + <i>ONLINE METHODS</i>
	Rynda-Apple A, Robinson KM, Alcorn JF Influenza and bacterial superinfection: illuminating the immunologic mechanisms of disease <i>Infection and Immunity</i> , 2015, vol. 83(10), p. 3764-3770
Régénération à distance par les exosomes	Khan M, Nickoloff E, Abramova T, Johnson J, Kumar Verma S, Krishnamurthy P, Mackie AE, Vaughan E, Garikipati VNS, Benedict C, Ramirez V, Lambers E, Ito A, Gao E, Misener S, Luongo T, Elrod J, Qin G, Houser SR, Kochj WJ, Kishore R Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction <i>Circulation Research</i> , 2015, vol. 117, p. 52-64 (+ <i>SUPPLEMENTAL MATERIAL</i> sur la clé)
	Singla DK Stem cells and exosomes in cardiac repair <i>Current Opinion in Pharmacology</i> , 2016, vol. 27, p. 19-23
Chlamydia : un peptidoglycane a minima	Liechti G, Kuru E, Packiam M, Hsu YP, Tekkam S, Hall E, Rittichier JT, VanNieuwenhze M, Brun YV, Maurelli AT Pathogenic <i>Chlamydia</i> lack a classical sacculus but synthesize a narrow, mid-cell peptidoglycan ring, regulated by MreB, for cell division <i>PLOS Pathogens</i> , 2016, vol. 12(5), p. 1-30
Organe synthétique fonctionnel	Takasato M, Er, PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, Parton RG, Wolvetang EJ, Roost MS, Chuva de Sousa Lopes SM, Little MH Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis <i>Nature</i> , 2015, vol. 526, p. 564-568 + <i>METHODS</i> (+ <i>EXTENDED DATA</i> sur la clé)
	Davies JA Kidney tissue grown from induced stem cells <i>Nature</i> , 2015, vol. 526, p. 512-513
Diversité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et pathogénie	LaFayette SL, Houle D, Beaudoin T, Wojewodka G, Radzioch D, Hoffman LR, Burns JL, Dandekar AA, Smalley NE, Chandler JR, Zlosnic JE, Speert DP, Bernier J, Matouk E, Brochiero E, Rousseau S, Nguyen D Cystic fibrosis-adapted <i>Pseudomonas aeruginosa</i> quorum sensing lasR mutants cause hyperinflammatory responses <i>Science Advances</i> , 2015, vol. 1(6), p. 1-15
	Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections <i>Trends in Microbiology</i> , 2016, vol. 24(5), p. 327-337
Les virus intestinaux comme probiotiques ?	Kernbauer E, Ding Yi, Cadwell K An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria <i>Nature</i> , 2014, vol. 516(7529), p. 94-98 + <i>METHODS</i> (+ <i>EXTENDED DATA</i> sur la clé)
	Wang Y, Pfeiffer JK A backup for bacteria <i>Nature</i> , 2014, vol. 516, p. 42-43

<p>Les biais des manipulations des circuits neuronaux</p>	<p>Otchy TM, Wolff SBE, Rhee JY, Pehlevan C, Kawai R, Kempf A, Gobes SMH, Ölvecsky BP Acute off-target effects of neural circuit manipulations <i>Nature</i>, 2015, vol. 528, p. 358-363 + <i>METHODS</i> (+ <i>EXTENDED DATA</i> sur la clé)</p> <hr/> <p>Südhof TC Experimental mismatch in neural circuits <i>Nature</i>, 2015, vol. 528, p. 338-339</p>
<p>L'approvisionnement en fer des bactéries intracellulaires : l'exemple de <i>Legionella</i></p>	<p>Isaac DT, Laguna RK, Valtz N, Isberg RR MavN is a <i>Legionella pneumophila</i> vacuole-associated protein required for efficient iron acquisition during intracellular growth <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2015, published online, p. E5208-E5217</p> <hr/> <p>Cianciotto NP An update on iron acquisition by <i>Legionella pneumophila</i>: new pathways for siderophore uptake and ferric iron reduction <i>Future Microbiology</i>, 2015, vol. 10, p. 841-851 (p. 1 à 16 en <i>AUTHOR MANUSCRIPT</i>)</p>
<p>Réponses au stress chez les bactéries à Gram positif</p>	<p>Corrigan RM, Bellows LE, Wood A, Gründling A ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2016, published online, p. E1710-E1719</p> <hr/> <p>Steinchen W, Bange G The magic dance of the alarmones (p)ppGpp <i>Molecular Microbiology</i>, 2016, accepted article, p. 1-24</p>
<p>Riboswitch régulé par l'ARN</p>	<p>DebRoy S, Gebbie M, Ramesh A, Goodson JR, Cruz MR, Van Hoof A, Winkler WC, Garsin DA A riboswitch-containing sRNA controls gene expression by sequestration of a response regulator <i>Science</i>, 2014, vol. 345(6199), p. 937-940</p> <hr/> <p>Chen J, Gottesman S Roboswitch regulates RNA <i>Science</i>, 2014, vol. 345(6199), p. 876-877</p>
<p>Édition de gène simplifiée par Cpf</p>	<p>Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, Van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system <i>Cell</i>, 2015, vol. 162, p. 1-13</p> <hr/> <p>Ma Y, Zhang L, Huang X Genome modification by CRISPR/Cas9 <i>FEBS Journal</i>, 2014, vol. 281, p. 5186-5193</p>
<p>Contrôle moléculaire de l'arrêt méiotique de l'ovocyte</p>	<p>Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikilaev VO, Thunemann M, Wen L, Feil R, Jaffe LA Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2015, vol. 112(17), p. 5527-5532 (+ <i>SUPPORTING INFORMATION</i> sur la clé)</p> <hr/> <p>Liu L, Kong N, Xia G, Zhang M Molecular control of oocyte meiotic arrest and resumption <i>Reproduction, Fertility and Development</i>, 2013, vol. 25, p. 463-471</p>

Rapport sur l'épreuve d'ECD

Chaque dossier comporte au maximum deux documents en anglais : soit une revue présentant l'état des connaissances sur un sujet associée à un article de recherche détaillant des résultats expérimentaux sur une des dimensions évoquée dans la revue, soit un article suffisamment conséquent pour répondre à ces deux critères soit enfin deux articles de recherche se répondant sur une problématique de recherche. Les thèmes choisis sont *a minima* d'actualité, souvent fondés sur des technologies de rupture.

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) dans l'article de revue 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. Nanti 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 la démarche scientifique expérimentale et les avantages et limites des méthodes employées.

La revue 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 (microbiologie, biochimie et Biologie Cellulaire et Physiologie), les remarques sont approximativement les mêmes :

Cette année encore, le jury a constaté que certains candidats n'étaient pas en mesure d'expliquer les principes des méthodes et de justifier leurs choix pour documenter une hypothèse. Les échecs (13 notes en dessous de la moyenne) sont souvent dus à un manque de maîtrise du langage scientifique anglo-saxon (le recours de traducteur automatique sur internet pallie partiellement ce handicap) et des techniques modernes 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.

En revanche, le jury a apprécié les efforts des candidats en général pour illustrer leurs propos par les illustrations issus des documents (ou de sites internet, dont les sources doivent être évidemment citées) et retravaillés afin qu'ils soient des appuis aux explications. Cependant, la copie *in extenso* de figures complexes d'article voire de tableaux, sans remise en forme ni remis dans leur contexte peut s'avérer contre productif dans une présentation qui reste aussi un exercice pédagogique

CONCLUSIONS

À part quelques exceptions notables, un seul des deux articles proposés a été lu correctement. La conséquence étant, au mieux, un survol soit de l'article de recherche soit de la revue au pire l'impasse sur l'un des deux. Il était alors difficile de faire le lien entre les deux et d'exploiter l'un pour éclairer l'autre. Dans certain 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 permet au jury, par des questions dans le domaine de l'ECD et dans d'autres domaines, de parfaire l'évaluation des candidats. Le jury, en particulier lors des échanges, a noté l'attitude positive des candidats, cherchant à répondre aux questions du jury, suivant celui-ci sur les pistes qu'il proposait, de même que la maîtrise informatique générale. L'ECD reste une épreuve difficile dans lequel la pédagogie tient une place certaine mais qui ne peut masquer les lacunes des candidats.

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.

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

D'une manière générale, le jury attend également de la part des candidats une bonne compréhension de la structure et de la réactivité des molécules. Cela implique de maîtriser les domaines suivants : structures électroniques des atomes, connaissance des fonctions chimiques classiques, stéréochimie des molécules simples et interactions intermoléculaires. Enfin, des questions sur les mécanismes des réactions au programme peuvent être posées.

Ainsi, le jury tient à insister sur les points spécifiques suivants :

En chimie organique :

- la notion de chiralité pose encore problème, tous les candidats ne repèrent pas facilement les carbones asymétriques d'une molécule organique ;
- la structure chimique de molécules organiques très usuelles n'est pas connue ;
- tous les candidats ne sont pas à l'aise avec la reconnaissance des groupes fonctionnels caractéristiques classiques (aldéhyde, cétone, ester, amide...).

En chimie générale :

- les définitions de base telle que la définition du numéro atomique ne sont pas connues de tous les candidats ;
- la notion de délocalisation électronique (exemple du groupe phosphate) n'est pas toujours maîtrisée ;
- les interactions intermoléculaires type liaison hydrogène ou liaisons de van der Waals semblent mieux maîtrisées que les années précédentes ;
- les notions de base concernant les solutions tampon semblent connues ainsi que le principe des méthodes spectroscopiques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette année, une modification notable a été introduite dans le déroulement des épreuves orales. Le jury s'est réparti en deux sous jurys, un par épreuve et travaillant en parallèle.

Cette modification obéissait à plusieurs objectifs :

- d'une part, la possibilité pour chaque sous jury d'évaluer tous les candidats pour une même épreuve dans un laps de temps autorisant une meilleure comparaison entre eux. Pour aller dans ce sens, lorsque la répartition temporelle des candidats le permettait, certains sujets ont été proposés deux fois. Le fait de ne pas connaître la prestation du candidat à la leçon a permis sans doute au jury des ECD une évaluation plus impartiale de l'épreuve. Cette meilleure objectivité a été confirmée par certaines notes qui, rétrospectivement, ont pu apparaître comme des surprises ;
- d'autre part, un autre objectif était d'aménager le planning des épreuves au mieux pour les candidats. Passer les deux épreuves pendant deux jours consécutifs limitait déplacement et réservation de chambres pour les candidats non franciliens. Et réduire le temps entre la fin des épreuves pratiques et le début de l'oral diminuait les inégalités entre candidats. Lors de l'accueil des candidats, il semble que ce type de planning ait fait l'unanimité, même si certains candidats ont estimé qu'un jour de repos supplémentaire entre la fin des TP et le début de l'oral aurait été bienvenu.

Les candidats présents aux épreuves d'admissibilité et d'admission venaient, comme les années précédentes, 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. Le jury ne peut que se réjouir de cette diversité, qui, avec l'ouverture l'an prochain, dans cette discipline, d'un Concours destinés aux titulaires d'un doctorat d'Université, va sans doute se restreindre.

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. Chaque épreuve nécessite d'autre part, comme cela a été précisé dans les rapports spécifiques, 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 qui aidera, certes, à la structuration d'une composition (écrite ou orale), mais aussi à distinguer l'essentiel de l'accessoire. Il convient de ne pas oublier que l'agrégation est un concours d'enseignement qui évalue également l'aptitude des candidats à organiser, structurer, présenter un propos tout en faisant preuve de qualités pédagogiques et didactiques.

Les travaux pratiques, 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.

Toutes ces qualités sont requises tout au long de la carrière d'un professeur agrégé et le jury a à cœur de les apprécier à chaque étape de ce concours.

Le jury félicite les candidats lauréats de cette session 2016. 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 la Proviseure du lycée Pierre-Gilles de Gennes, ENCPB et son équipe : proviseures adjointes, enseignants, techniciens, et personnel administratif, pour l'accueil et l'aide efficace apportés tout au long de l'organisation et du déroulement de ce concours qui a eu lieu dans d'excellentes conditions.