



**Concours : AGREGATION INTERNE et CAERPA**

**Section : BIOCHIMIE GENIE BIOLOGIQUE**

**Session 2017**

Rapport de jury présenté par : Jean-Pascal DUMON

Président du jury

## SOMMAIRE

<b>Renseignements statistiques.....</b>	<b>Page 3</b>
<b>Avant-propos du président.....</b>	<b>Page 5</b>
<b>Epreuves d'admissibilité .....</b>	<b>Page 7</b>
<b>Première épreuve</b>	
<b>Sujet.....</b>	<b>Page 10</b>
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 27</b>
<b>Deuxième épreuve</b>	
<b>Sujet.....</b>	<b>Page 32</b>
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 33</b>
<b>Epreuves d'admission</b>	
<b>Première épreuve</b>	
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 39</b>
<b>Deuxième épreuve</b>	
<b>Sujet.....</b>	<b>Page 42</b>
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 57</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>Page 59</b>

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

### Agrégation interne

<b>Nombre de postes</b>	<b>8</b>
<b>Candidats inscrits</b>	<b>101</b>
<b>Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité</b>	<b>52</b>
<b>Candidats admissibles</b>	<b>18</b>
<b>Candidats présents aux épreuves d'admission</b>	<b>18</b>
<b>Candidats proposés pour l'admission</b>	<b>8</b>
<b><u>Epreuves d'admissibilité</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>06,15</b>
<b>Moyenne des candidats admissibles</b>	<b>08,99</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admissible</b>	<b>07,79</b>
<b><u>1<sup>ère</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>06,42</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>08,94</b>
Note maximale	<b>13,92</b>
<b><u>2<sup>ème</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>05,81</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>09,03</b>
Note maximale	<b>12,51</b>
<b><u>Epreuves d'admission</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>09,83</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>11,79</b>
<b><u>1<sup>ère</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>10,06</b>
Moyenne des candidats admis	<b>12,75</b>
Note maximale	<b>17</b>
<b><u>2<sup>ème</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>09,60</b>
Moyenne des candidats admis	<b>10,84</b>
Note maximale	<b>13,45</b>
<b><u>Ensemble du concours</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>09,41</b>
<b>Moyenne la plus élevée</b>	<b>11,18</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>10,52</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admis</b>	<b>09,74</b>

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

### Concours d'accès à l'échelle de rémunération des professeurs agrégés (CAER)

<b>Nombre de postes</b>	<b>1</b>
<b>Candidats inscrits</b>	<b>17</b>
<b>Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité</b>	<b>8</b>
<b>Candidats admissibles</b>	<b>0</b>
<b>Candidats présents aux épreuves d'admission</b>	<b>/</b>
<b>Candidats proposés pour l'admission</b>	<b>/</b>
<b><u>Epreuves d'admissibilité</u></b>	<b>/</b>
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>04.13</b>
<b>Moyenne des candidats admissibles</b>	<b>/</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admissible</b>	<b>/</b>
<b><u>1<sup>ère</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>04,44</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>/</b>
Note maximale	<b>/</b>
<b><u>2<sup>ème</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>03,80</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>/</b>
Note maximale	<b>/</b>
<b><u>Epreuves d'admission</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>/</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	
<b><u>1<sup>ère</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>/</b>
Moyenne des candidats admis	<b>/</b>
Note maximale	<b>/</b>
<b><u>2<sup>ème</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>/</b>
Moyenne des candidats admis	
Note maximale	
<b><u>Ensemble du concours</u></b>	<b>/</b>
<b>Moyenne des candidats présents</b>	
<b>Moyenne la plus élevée</b>	
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>/</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admis</b>	

## Avant-propos

Le jury souhaite en tout premier lieu encourager l'ensemble des candidats qui se sont présentés à ce concours ou qui ambitionnent de le faire. Il s'agit d'un concours certes difficile, qui nécessite une préparation approfondie, tant dans l'approche des contenus scientifiques que dans la prise en compte des attentes du jury pour chaque épreuve. Ce rapport est destiné à aider à cette préparation.

Le jury félicite tous les candidats admissibles de la session 2017, les lauréats, bien sûr, mais aussi ceux qui n'ont pas été retenus. Tous les candidats ayant traversé l'admission de cette session 2017, y compris les collègues qui n'enseignent pas dans un secteur de spécialité des biotechnologies depuis plusieurs années, ont en général fait preuve de qualités scientifique et professionnelle d'un excellent niveau.

L'agrégation interne et le CAER interne de biochimie génie biologique ont pour vocation de permettre à des enseignants en activité d'accéder au grade de Professeur Agrégé de biochimie génie biologique.

La session 2017 a été ouverte pour la quatrième année consécutive et nous nous félicitons que ce concours permette aux collègues enseignants d'accéder au grade d'agrégé. Sur les 121 candidats inscrits, 60 se sont présentés aux deux épreuves d'admissibilité soit un taux de présence de 49,6 %, un peu en retrait par rapport à la session 2015 (56,6 %) et 2016 (53,4 %).

Les domaines couverts par l'agrégation de biochimie génie biologique sont variés et vastes : biochimie, microbiologie, immunologie, biologie cellulaire, hématologie, biologie moléculaire, physiologie humaine...

Il importe donc, pour espérer avoir quelques chances de réussite, que les candidats se préparent sérieusement, non seulement pour mettre en valeur leurs compétences professionnelles, mais également pour intégrer les connaissances et les compétences scientifiques et technologiques attendues d'un professeur agrégé de biochimie génie biologique. Ce rapport du jury a pour objectif d'indiquer aux futurs candidats les objectifs des différentes épreuves.

Les épreuves d'admissibilité conjuguent l'évaluation des connaissances scientifiques et technologiques, mais également les qualités attendues d'un enseignant. Le jury demande donc à ce que les candidats soient capables de construire un développement structuré, concis, scientifiquement à la pointe des connaissances, tout en faisant preuve, notamment, de qualités didactiques et pédagogiques.

La première épreuve s'inscrit dans la présentation de deux thèmes technologiques abordés dans leurs aspects technologiques et pédagogiques. A ce propos, le jury a souhaité favoriser l'identification du registre évalué en signalant les questions par des lettres « C » pour connaissance et « P » pour pédagogie. Le déterminisme de chaque question est donc ainsi sans ambiguïté.

La deuxième épreuve présente un caractère foncièrement scientifique. Elle place le candidat dans la construction d'une réponse disciplinaire à des questions de synthèse portant sur les domaines couverts par les secteurs de la spécialité. Le jury a choisi de limiter cette épreuve à deux questions. L'exercice est scientifiquement très exigeant en terme du niveau de connaissances requis. A ce titre, le jury encourage fortement les candidats à préparer très en amont cette épreuve par un maintien rigoureux et une actualisation permanente de leurs connaissances. Il s'agit notamment de cerner avec précision et justesse chaque sujet.

La première épreuve d'admission s'inscrit dans une démarche de projet qui se doit de combiner une étude scientifique et technologique afin de construire une transposition pédagogique. L'étude peut avantageusement être associée à des aspects sociaux économiques voire de santé publique. Cette démarche préfigure la situation d'un enseignant qui prend appui sur la réalité professionnelle afin d'ancrer son enseignement en lien avec les procédés de biotechnologies (production de biens et de services, recherche, R&D, analyse, contrôle qualité...) et l'évolution des activités dans les laboratoires. Dans cette perspective, l'enseignant s'emploie à approfondir ses savoirs fondamentaux, technologiques et techniques en empruntant aux entreprises ou aux laboratoires les activités effectivement réalisées dans leur contexte propre. Dans cette optique, la démarche peut avantageusement faire l'objet d'un

stage massé ou perlé en entreprise ou en laboratoire. Elle peut aussi être complétée par des publications scientifiques, des données économiques, des problématiques sociétales associées à des procédés biotechnologiques. A terme, cette démarche s'inscrit dans un projet technologique et pédagogique dédié aux élèves pour un niveau donné. Il est donc souhaitable que le projet prenne en compte en tout premier lieu le besoin des élèves et non uniquement le caractère attractif, novateur, moderne d'un procédé technologique découvert lors de la visite d'étudiants en stage.

Le dossier peut donc légitimement comporter deux parties :

- une étude scientifique et technologique que le candidat prendra soin de replacer dans son contexte, notamment en lien avec la problématique à l'origine du projet. Si la réalisation d'un stage en entreprise ou en laboratoire de recherche n'est en rien obligatoire, les dossiers construits à partir d'un stage, d'une visite voire un partenariat d'entreprise, portent une dimension factuelle, réaliste, actualisée dont on ne peut nier l'intérêt ;

- une mise en application pour un niveau de classe donné, un référentiel, une progression choisie et justifiée. La problématique du transfert des activités technologiques et techniques décrites sera abordée afin de prendre en compte les contraintes propres à un environnement enseignant (matériels disponibles, horaires, groupe classe, coût, sécurité...). Elle pourra décliner les modalités de mise en œuvre (opérationnalisation) en lien avec les objectifs de formations ambitionnés, les activités effectuées par les étudiants, les documents supports de ces activités, les évaluations. Des aspects interdisciplinaires peuvent également nourrir l'analyse des choix pédagogiques et opérationnels adoptés.

La deuxième épreuve place les candidats dans la réalisation d'activités technologiques. C'est une épreuve difficile et ce pour plusieurs raisons : tout d'abord, par sa durée, 8 heures, mais aussi par le fait qu'elle couvre des secteurs imposés et divers des biotechnologies. Ainsi, cette année, les candidats devaient mettre en œuvre des activités technologiques de biochimie analytique, de microbiologie et de biologie moléculaire. Si les manipulations proposées évaluent des compétences technologiques et techniques de base, elles obligent une polyvalence, une adaptabilité et une aptitude à intégrer rapidement des protocoles opératoires parfois nouveaux pour certains candidats. Certains professeurs, en poste depuis de nombreuses années sur des responsabilités parfois identiques d'années en années, éprouvent des difficultés à aborder des domaines nouveaux ou oubliés du laboratoire. Il est donc conseillé aux futurs candidats de réinvestir des techniques non pratiquées depuis quelques années mais aussi de s'informer et mettre en œuvre des méthodologies et techniques récentes. La réappropriation de certains gestes techniques en amont de l'épreuve pourrait ainsi s'avérer une aide dans l'appréhension de l'épreuve.

L'épreuve peut ne pas se limiter à la mise en œuvre de protocoles opératoires mais placer le candidat dans une dimension métier à travers des mises en situation.

Les candidats disposent d'une heure, à prendre en une seule fois ou fractionnée, afin de prendre un repas et s'hydrater. L'ensemble de l'épreuve couvre donc 9 heures dont 8 heures d'activités technologiques. Il est recommandé aux candidats de ne pas faire le mauvais choix d'une activité à « marche forcée », durant plus de quatre heures consécutives, sans aucune respiration intellectuelle. Le phénomène dit de fringale ou d'épuisement intellectuel s'installant brutalement affecte alors profondément la lucidité indispensable pour mener à bien l'ensemble de l'épreuve.

Pour conclure cet avant-propos, le jury espère sincèrement que ce rapport sera très utile aux futurs candidats à l'agrégation interne de biochimie-génie biologique.

Jean-Pascal DUMON  
Président du jury

## EPREUVES D'ADMISSIBILITE

### Première épreuve

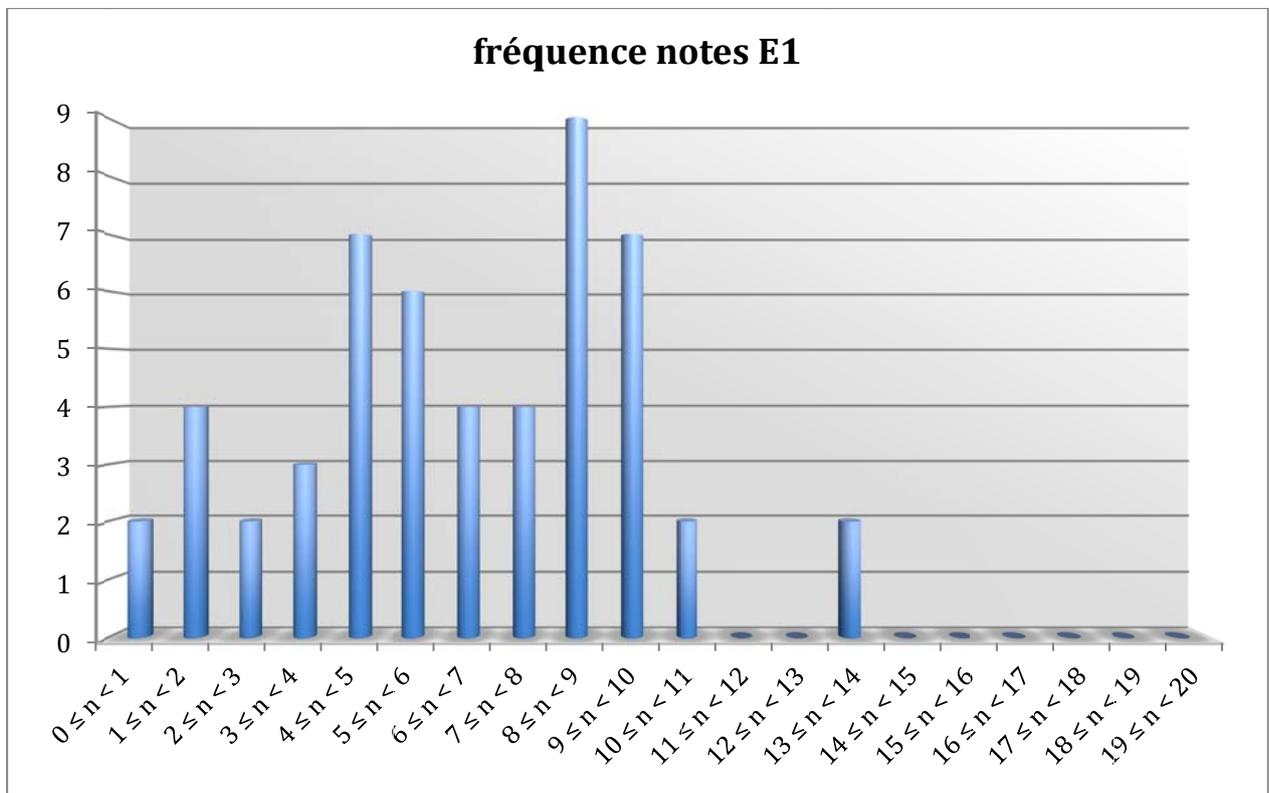
Durée : 6 heures

Coefficient : 1

Résultats :

Agrégation  
interne

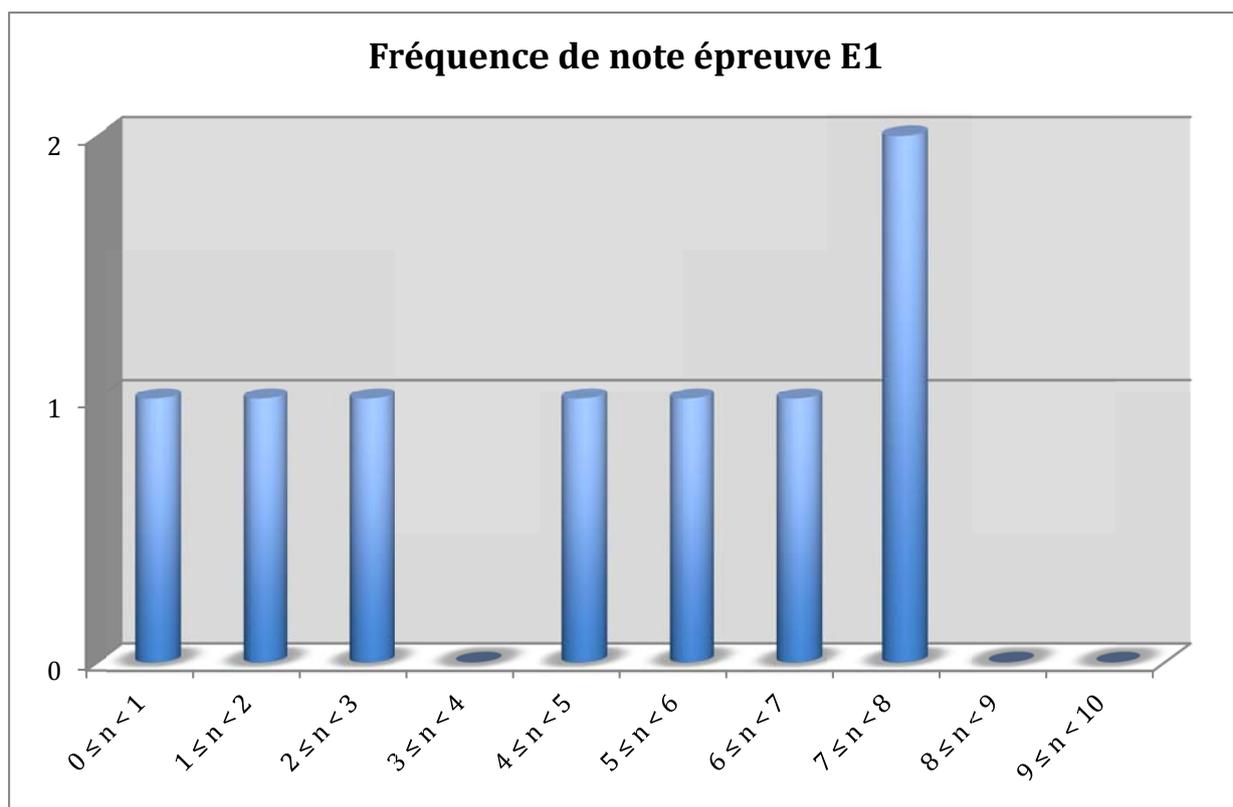
$0 \leq n < 1$	2	$10 \leq n < 11$	2
$1 \leq n < 2$	4	$11 \leq n < 12$	0
$2 \leq n < 3$	2	$12 \leq n < 13$	0
$3 \leq n < 4$	3	$13 \leq n < 14$	2
$4 \leq n < 5$	7	$14 \leq n < 15$	0
$5 \leq n < 6$	6	$15 \leq n < 16$	0
$6 \leq n < 7$	4	$16 \leq n < 17$	0
$7 \leq n < 8$	4	$17 \leq n < 18$	0
$8 \leq n < 9$	9	$18 \leq n < 19$	0
$9 \leq n < 10$	7	$19 \leq n \leq 20$	0



Résultats :

CAER  
agrégation

$0 \leq n < 1$	1	$10 \leq n < 11$	0
$1 \leq n < 2$	1	$11 \leq n < 12$	0
$2 \leq n < 3$	1	$12 \leq n < 13$	0
$3 \leq n < 4$	0	$13 \leq n < 14$	0
$4 \leq n < 5$	1	$14 \leq n < 15$	0
$5 \leq n < 6$	1	$15 \leq n < 16$	0
$6 \leq n < 7$	1	$16 \leq n < 17$	0
$7 \leq n < 8$	2	$17 \leq n < 18$	0
$8 \leq n < 9$	0	$18 \leq n < 19$	0
$9 \leq n < 10$	0	$19 \leq n \leq 20$	0



## Rapport du jury sur la première épreuve

Dossier technique relatif à un problème biotechnologique.  
Rapport du jury.

### Résultats de l'épreuve :

61 candidats ont composé cette épreuve mais seuls ici sont pris en compte les résultats des 60 candidats ayant composé les deux épreuves :

- 2 ont obtenu une note supérieure ou égale à 13/20
- 2 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 11,
- 16 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,
- 11 ont obtenu une note supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 8,
- 29 ont obtenu une note strictement inférieure à 6.

La moyenne générale de l'épreuve est de 6,16. La meilleure note est de 13,92/20.

### Définition et structure de l'épreuve

*L'épreuve, qui prend appui sur un dossier technique relatif à un problème biotechnologique, s'organise en deux parties :*

- *la première permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser ses connaissances scientifiques et techniques pour expliciter ou valider les solutions retenues ;*
- *la seconde permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser le support proposé pour élaborer un exercice permettant l'évaluation des connaissances et méthodes acquises par les élèves à un niveau de formation déterminé.*

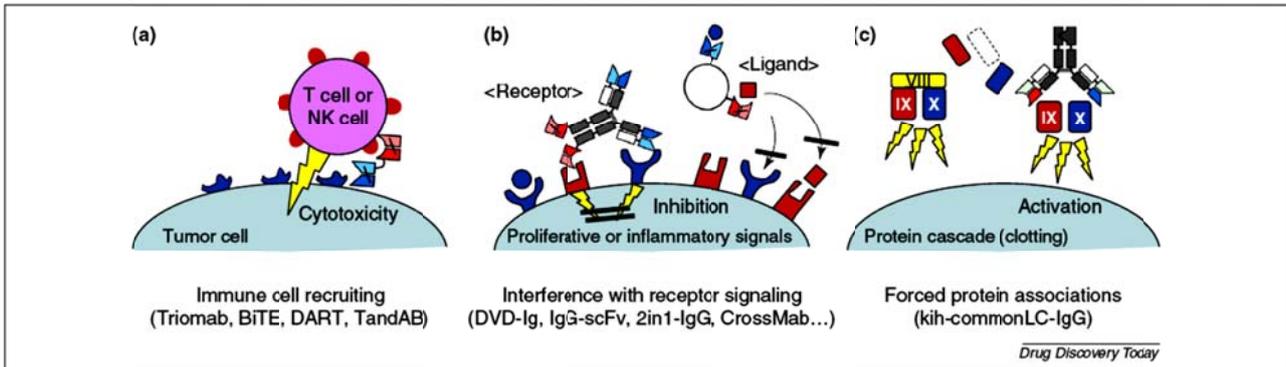
*Le candidat doit situer l'exercice dans un processus d'apprentissage et par rapport aux autres enseignements scientifiques ou techniques qui lui sont associés.*

Le sujet de 2017 était organisé en trois parties, comportant chacune des questions mobilisant des connaissances scientifiques et techniques et des questions pédagogiques. Chaque partie représentait un tiers du sujet.

Développement d'outils thérapeutiques dérivés des systèmes immunitaires

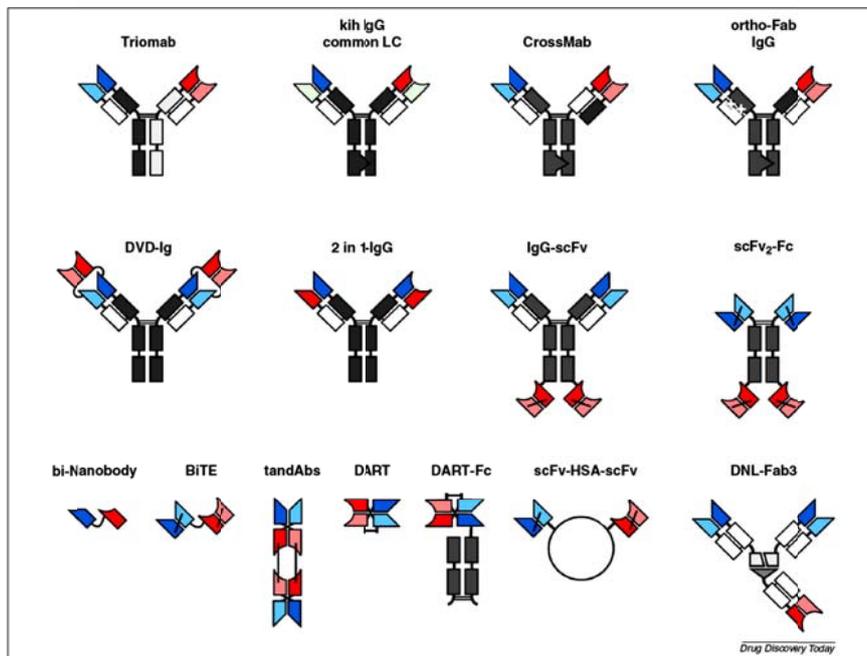
1. Production d'anticorps bispécifiques dans le cadre de thérapies anti-tumorales

Certaines thérapies anti-tumorales nécessitent l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui ciblent des protéines exprimées à la surface des cellules tumorales et impliquées dans leur survie et leur prolifération. Néanmoins, de nombreux phénomènes cellulaires compensatoires peuvent rendre caduque l'effet de l'anticorps monoclonal. Face à ce problème, des équipes ont commencé à développer des anticorps bispécifiques (bsAc). Comme illustré ci-dessous, d'autres applications de ces anticorps bispécifiques peuvent être envisagées telles la mise en contact entre une cellule cible et des cellules effectrices ou l'interaction forcée entre deux protéines.



Kontermann RE et al., *Drug Discovery Today*, 2015, 20(7): 838-47

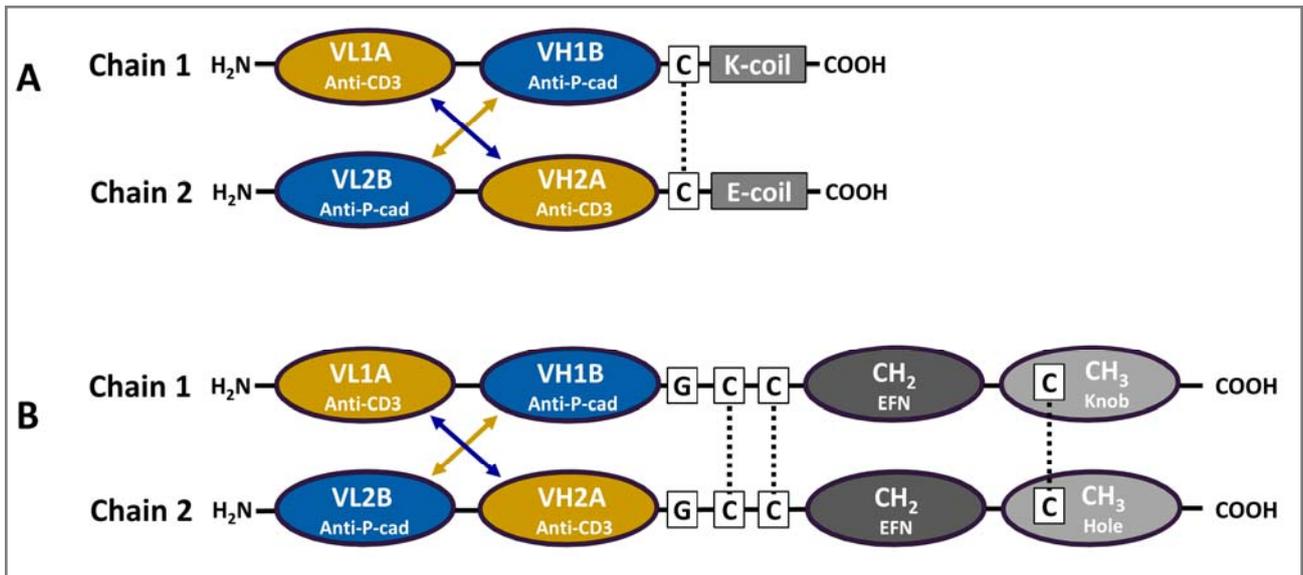
Il existe une très grande diversité d'anticorps bispécifiques dont les DART (*Dual Affinity ReTargeting molecules*) et les DART-Fc (DART fusionné avec un fragment Fc d'une IgG).



Kontermann RE et al., *Drug Discovery Today*, 2015, 20(7): 838-47

Ce type d'anticorps bispécifiques est utilisé dans le traitement de certaines tumeurs (leucémies myéloïdes aigües et cancer colorectal) pour induire une lyse des cellules tumorales.

La publication de Root RA et al., *Antibodies*, 2016 présente une stratégie expérimentale visant à produire des DART (A) et des DART-Fc (B) spécifiques de la cadhérine P et de la protéine CD3.



Une version simplifiée de cette démarche est résumée dans le **document 1**.

La cadhérine P est une cible de choix pour la thérapie de certaines tumeurs solides. En effet, il s'agit d'une protéine d'adhérence cellulaire dont la surexpression dans les cellules tumorales est positivement corrélée à une augmentation de leur mobilité et de leur caractère invasif.

### 1.1. Production et sélection de fragments variables simple brin (scFv) par « phage display »

La structure détaillée du phage M13, support du « phage display », est représentée dans le **document 2**. La technique du « phage display », schématisée dans le **document 3**, repose sur l'expression d'un répertoire protéique à la surface d'un bactériophage, par exemple des banques de fragments d'anticorps (scFv). La sélection des phages recombinants repose sur leur capacité de liaison à l'antigène cible. Le processus de sélection nécessite plusieurs cycles répétitifs, comportant chacun des étapes de capture, lavage, élution et amplification. Les conditions expérimentales de l'étape de capture évoluent au cours des cycles. Les phages sélectionnés sont ensuite testés individuellement pour l'activité recherchée.

Pour produire des fragments d'anticorps à la surface des particules phagiques, le « phage display » associe un phagemide à un phage auxiliaire (**document 3A**). Le génome du phage auxiliaire a été muté sur son origine de répllication, ce qui affecte sa répllication mais pas le niveau de synthèse des protéines.

*C1 Rappeler les particularités du cycle de multiplication du phage M13.*

*C2 Rédiger une synthèse des informations présentées dans le **document 3A** et replacer ce mécanisme dans le **document 3B**.*

*C3 A partir du **document 3B**, présenter l'intérêt de faire varier les conditions expérimentales au cours de l'étape 1 de capture ; indiquer la nature des paramètres concernés. Préciser le mode opératoire de l'étape 4 d'amplification.*

Pour certaines applications, il est indispensable de disposer de suspensions de particules de phagemides affines, parfaitement purifiées.

La technique standard de double précipitation au PEG (polyéthylène glycol) des phages filamenteux est utilisée comme première étape de purification. La seconde étape comporte un traitement avec un détergent ionique suivi d'une ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium.

La chromatographie d'exclusion sur Sephacryl<sup>®</sup> S-500 est une alternative à la deuxième étape de purification. Les caractéristiques du gel employé figurent dans le **document 4**.

Le profil d'élution de la préparation phagique est présenté dans le **document 5.1**. Le suivi qualitatif de la purification par chromatographie d'exclusion est présenté dans le **document 5.2**.

*C4 Expliquer le principe de l'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium.*

*C5 Discuter de la pertinence du choix de la colonne Sephacryl<sup>®</sup> S-500.*

- P1** Proposer un schéma du principe de la chromatographie d'exclusion.  
A l'aide du **document 4**, construire un exercice illustrant cette technique pour des élèves en cycle terminal STL biotechnologies.
- C6** Analyser et interpréter les résultats présentés dans le **document 5**. Dégager les avantages de la méthode alternative de purification.

## 1.2. Détermination des paramètres physico-chimiques et physiologiques des anticorps bispécifiques produits et amélioration de l'affinité des bsAc sélectionnés

Les bsAc sont caractérisés après leur purification. Différents paramètres physico-chimiques sont déterminés : constante de dissociation vis-à-vis des deux épitopes, masse moléculaire, concentration efficace ( $EC_{50}$ ).

Le **document 6** présente certains résultats expérimentaux : une SDS PAGE, une HPLC d'exclusion (SE-HPLC), une HPLC d'interactions hydrophobes (HIC).

- C7** Rappeler la formule semi-développée du SDS et préciser son ou ses rôle(s) dans une SDS-PAGE.
- C8** Expliquer le double intérêt de la SDS-PAGE dans ce contexte.
- C9** Les échantillons déposés dans les pistes 2 et 3 sont traités différemment.  
Citer un réactif potentiellement utilisable et préciser son mode d'action.
- C10** Analyser l'ensemble des résultats présentés dans le **document 6**.

Les  $EC_{50}$  sont déterminées à l'aide de tests de cytotoxicité. L'un de ces tests utilise le coffret de dosage cytotox96 de Proméga™ qui repose sur une mesure par spectrophotométrie de l'activité de la LDH libérée lors de la lyse des cellules. Ce test nécessite la réalisation de trois témoins présentés dans le tableau suivant.

	Cellules cibles tumorales ( $\mu\text{L}$ )	Tampon de dilution ( $\mu\text{L}$ )	Cellules immunitaires effectrices ( $\mu\text{L}$ )	Tampon de lyse ( $\mu\text{L}$ )	DART aux concentrations choisies en tampon de dilution ( $\mu\text{L}$ )
Témoin A	50	150	-	-	-
Témoin B	50	50	100	-	-
Témoin C	50	120	-	30	-
Essai	50	-	100	-	50

- C11** Expliquer l'intérêt de chaque témoin et les résultats attendus.
- C12** Etablir l'équation aux grandeurs permettant la détermination du pourcentage de cytotoxicité.

Les constantes de dissociation des complexes anticorps-antigène sont déterminées par SPR (*Surface Plasmon Resonance*) qui évalue les interactions protéines/protéines par réfractométrie.

- P2** Proposer un document de synthèse présentant le principe d'une autre technique de détermination du  $K_D$ , à des étudiants de classe préparatoire TB.

L'ensemble des valeurs de  $EC_{50}$  et  $K_D$  obtenues est présenté dans le **document 7**.

- C13** Proposer une hypothèse permettant d'expliquer le choix de DART 35 comme matrice de départ pour l'amélioration de l'affinité.

Deux nouveaux DART sont obtenus à partir du DART 35 : DART 153 et 154. Ils sont comparés au DART 35 ainsi qu'à des DART de référence : DART 20, 30 et DART-Fc.

Les résultats sont présentés dans le **document 8**.

- C14** Préciser le domaine extracellulaire (ECD) de la P-cadhérine porteur de l'épitope reconnu pour chaque DART testé.

C15 Choisir le DART à retenir dans l'optique d'une utilisation médicale. Justifier ce choix.

## 2 Les systèmes de défense immunitaire bactériens CRISPR

L'existence de systèmes immunitaires adaptatifs a été mise en évidence chez de nombreuses bactéries. Ces systèmes reposent sur l'intervention de petits ARN permettant de guider l'élimination d'ADN étrangers auxquels les microorganismes ont déjà été exposés.

L'ensemble des gènes codant les différentes molécules impliquées sont regroupés au niveau de loci particuliers, les loci CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Différents types de systèmes ont été décrits. L'organisation du locus CRISPR de type II est présentée dans le **document 9**.

Des fragments d'ADN étrangers sont stockés au niveau du locus CRISPR au fil des infections chez les rares bactéries survivantes, permettant ainsi de constituer une véritable bibliothèque, mémoire transmissible des agressions virales subies. Ce stockage, qui s'effectue lors de la première exposition à l'ADN étranger, s'apparente à une phase d'immunisation (**document 10**).

Lors d'une nouvelle infection par une entité porteuse d'un fragment d'ADN étranger gardé en mémoire, les bactéries « vaccinées » activent le système CRISPR (**document 11**). La cellule produit alors de petits ARN (crRNA) dont la maturation dépend d'un ARN trans-activateur (tracrRNA).

Le complexe Cas9-crRNA-tracrRNA se fixe au niveau de l'ADN étranger grâce au crRNA. L'activité endonucléasique de Cas9 ne s'exprime qu'en présence d'un signal spécifique reconnu par l'enzyme, une courte séquence conservée nommée PAM (*Protospacer-Adjacent Motif*) composée de 2 à 7 nucléotides ; elle coupe alors l'ADN étranger au niveau des deux brins.

La publication de *JINEK M et al. ; Science 2012 ; 337 : 816-821* précise les modalités de certaines étapes du mécanisme de CRISPR-Cas9 type II et propose un outil permettant des modifications ciblées de l'ADN. Une étude de l'activité de Cas9 a été réalisée *in vitro* dans différentes conditions expérimentales (**document 12**).

**P3** *En s'appuyant sur ce document, construire un exercice à destination d'étudiants de STS permettant de dégager les notions suivantes afin de mener à bien l'analyse des résultats : propriétés migratoires des plasmides en fonction de leur forme, spécificité du test, importance des conditions opératoires. Proposer des éléments de corrigé.*

L'étude précédente est complétée par l'étude de l'activité de deux mutants de Cas9. Les résultats figurent sur le **document 13**.

C16 *Analyser et commenter les résultats présentés dans ce document.*

Deux molécules d'ARN chimère combinant les caractéristiques de crRNA et de tracrRNA sont testées (**document 14**).

C17 *Analyser et commenter les résultats présentés dans ce document.*

C18 *Présenter deux autres approches utilisant des nucléases conçues pour modifier l'ADN de façon ciblée, en excluant les endonucléases de type II.*

La technologie CRISPR-Cas9 a été initialement utilisée pour invalider spécifiquement des gènes cibles au sein de différents types cellulaires et organismes. Néanmoins, depuis lors, des modifications de l'enzyme Cas9 ont considérablement élargi le champ d'application de cette technologie, permettant notamment d'activer ou de réprimer sélectivement l'expression de gènes cibles.

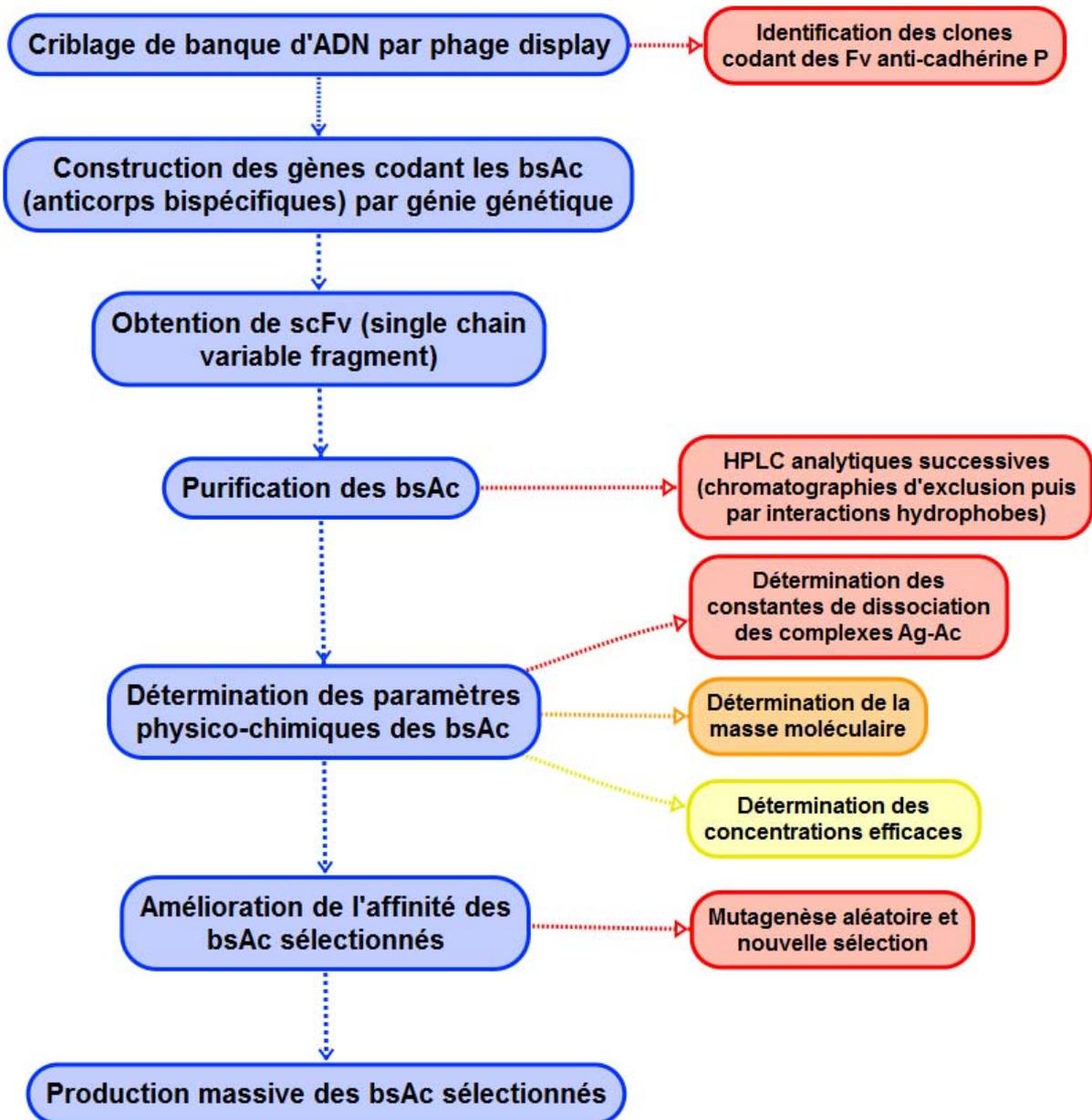
Dans cet objectif, une entreprise de biotechnologies commercialise un système utilisant trois vecteurs d'expression (**document 15 A**) qui, une fois transfectés et exprimés (**document 15 B**), permettent de stimuler spécifiquement l'expression d'un gène cible. Un exemple de stimulation de l'expression de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) au sein des cellules HEK293T grâce à ce système est présenté dans le **document 15 C**.

C19 *Expliquer l'intérêt de l'utilisation de l'enzyme dCas9 pour cette approche expérimentale.*

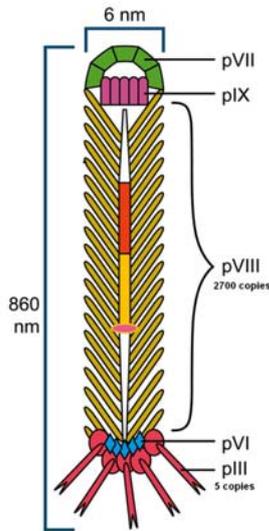
Cette démarche technologique est présentée dans le cadre d'une séance de TD en STS Biotechnologies.

- P4** A partir du **document 15 A**, réaliser un document de synthèse présentant les éléments à expliquer à des étudiants afin qu'ils s'approprient le principe de cette technologie.
- C20** Analyser et commenter les résultats présentés dans le **document 15 C**.

Document 1 : stratégie expérimentale simplifiée  
(adapté de Root RA et al., *Antibodies*, 2016)

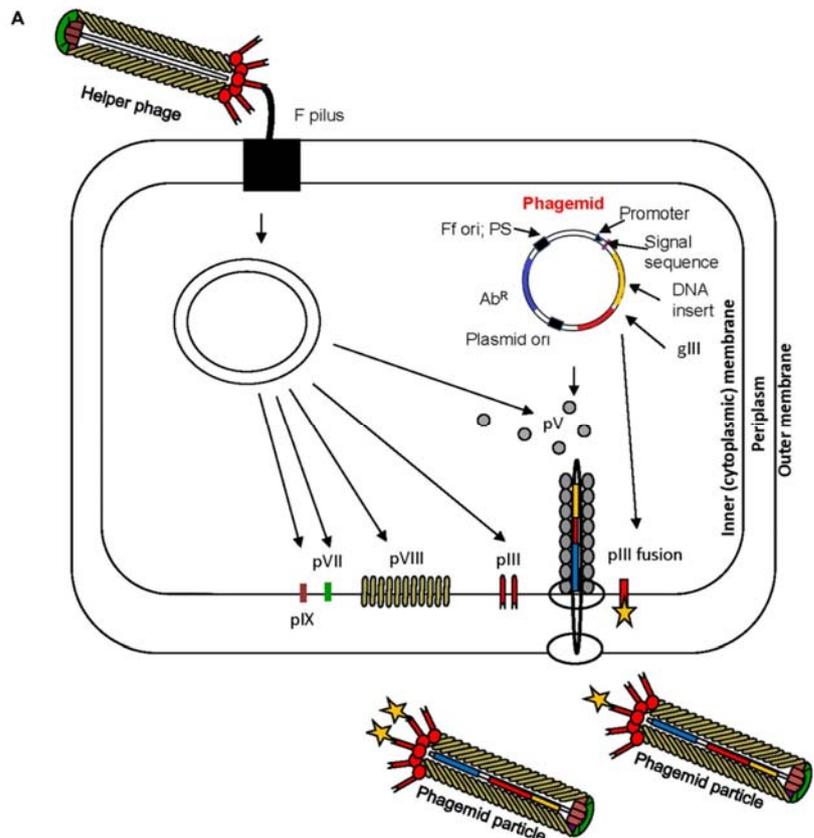


**Document 2 :** schéma du phage M13 (*Gagic D et al., Frontiers in Microbiology 2016*)

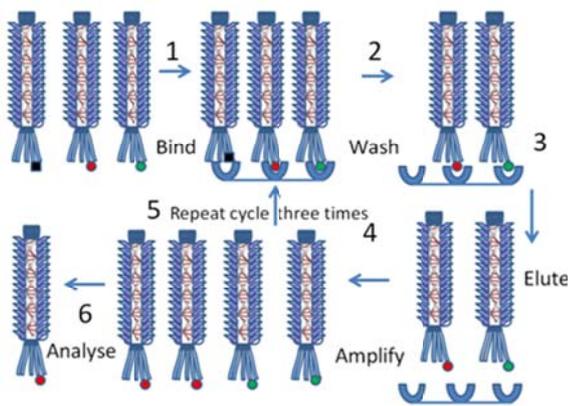


La masse moléculaire d'une particule phagique est voisine de  $17 \cdot 10^7$  Da. Son ADN est logé à l'intérieur d'un cylindre flexible composé d'environ 2 700 monomères de protéine pVIII. Une extrémité de la particule présente 5 copies des protéines pVII et pIX tandis que l'autre extrémité présente 5 copies des protéines pIII et pVI. Les protéines pIII exposées sur la tête du phage sont impliquées dans l'attachement aux pili de la bactérie hôte, généralement *E coli*. Les protéines pVIII composent le manteau du phage.

**Document 3 :** « phage display »



**3A :** production de particules de phagemides (*Gagic D et al., Frontiers in Microbiology 2016*)



**3B** : représentation schématique des étapes du « phage display » (illustration de *Wikipedia*)

### Document 4 : chromatographie d'exclusion (Extrait du catalogue SIGMA)

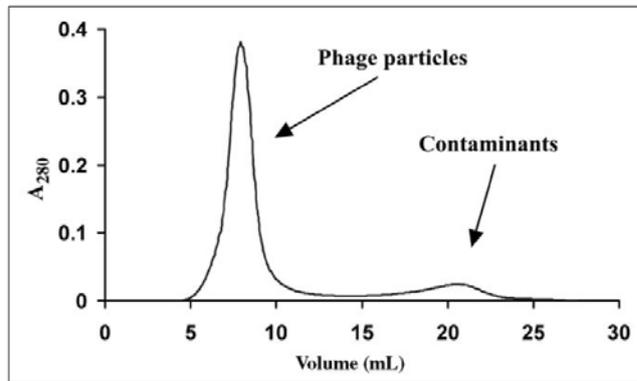
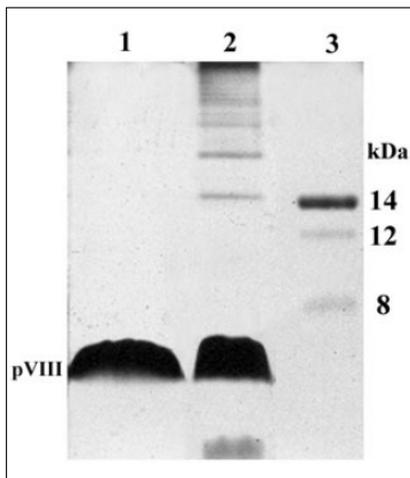
#### Gel Filtration Media

Medium	Fractionation Ranges (kDa, proteins)	Properties/Limitations	Potential Applications
<b>Sephacryl®</b>			
Matrix: acrylic (dextran/bisacrylamide copolymer)			
25-75 µm	S-100 HR: 1-100	Clean with 0.2 M NaOH, 0.1 M HCl, 1.0 M HOAc	S-100 HR: peptides, small proteins
S-1000: 40-105 µm	S-200 HR: 5-250	Compatible with detergents, chaotropic salts, dissociating agents	S-200 HR: proteins, some small serum proteins (e.g., albumin)
0.2 MPa (2.6 x 30 cm column)	S-300 HR: 10-1500	Sterilize by autoclave	S-300 HR: membrane & serum proteins, monoclonal antibodies
pH range: 2-11	S-400 HR: 20-8000	Compatible with organic solvents	S-400 HR: large proteins & macromolecules with extended structures (e.g., proteoglycans, liposomes)
	S-500 HR, S-1000: ND	Scaleable	S-500 HR: large macromolecules, small particles (e.g., plasmids)
		Good recoveries	
		Stable bed volume	
<b>Sephadex®</b>			
Matrix: dextran (crosslinked with epichlorohydrin)			
C: 100-300 µm	G-10: <0.7	Classic support	G-10: very low MW substances; desalting; buffer exchange; peptides
M: 50-150 µm	G-15: <1.5	Swelling 2-40x	G-15: low MW compounds; interact with aromatic compounds; desalting; buffer exchange; peptides
F: 20-80 µm	G-25: 1-5	SF grade for best resolution, low flow rate	G-25: medium grade available in packed PD-10 columns for rapid, routine desalting; interact with aromatic compounds; small peptides & proteins; buffer exchange
SF: 10-40 µm	G-50: 1.5-30	F grade for prep lab work	G-50: desalting; buffer exchange; standard for process scale; very low nonspecific interactions
SF: 0.016-0.160 MPa (2.6 x 30 cm column)	G-75: 3-80	M grade for standard lab work	G-75: very low nonspecific interactions
pH range:	G-100: 4-150	C grade for very crude samples	
2-13 (< G-25)		Can be autoclaved at 120 °C	
2-10 (> G-25)		Compatible with detergents, chaotropic salts, dissociating agents	
		Clean with 0.2 M NaOH	
		Ideal for MW determinations	
		Interact with aromatic compounds	
<b>Sepharose®</b>			
Matrix: agarose			
6B: 45-165 µm	6B: 10-4000	Clean with 0.5 M NaOH	2B: DNA-protein complexes; viruses; asymmetric molecules; affinity support
4B: 45-165 µm	4B: 60-20,000	Good recoveries	4B: tRNAs; membrane proteins; polysaccharides; affinity support
2B: 60-200 µm	2B: 70-40,000	Broad fractionation range	6B: polio virus purification; proteins; polysaccharides
0.004-0.02 MPa (2.6 x 30 cm column)		Temperature range: 4-40 °C	
pH range: 4-9		Cannot be autoclaved	
		Incompatible with oxidizing agents, chaotropic salts, dissociating agents	

#### Sephacryl®

Sephacryl 100-HR, pore size 1-100 kDa MW range (globular proteins)	S100HR
Sephacryl 200-HR, pore size 5-250 kDa MW range (globular proteins), pore size 1-80 kDa MW range (dextrans)	S200HR
Sephacryl 300-HR, pore size 10-1500 kDa MW range (globular proteins), pore size 1-400 kDa MW range (dextrans)	S300HR
Sephacryl 400-HR, pore size 20-8000 kDa MW range (globular proteins)	S400HR
Sephacryl 500-HR, pore size 40-20,000 kDa MW range (dextrans)	S500HR

### Document 5 : purification du phage M13 (d'après Yu M. et al., *BioTechniques*, 2005, 38 : 194-198)

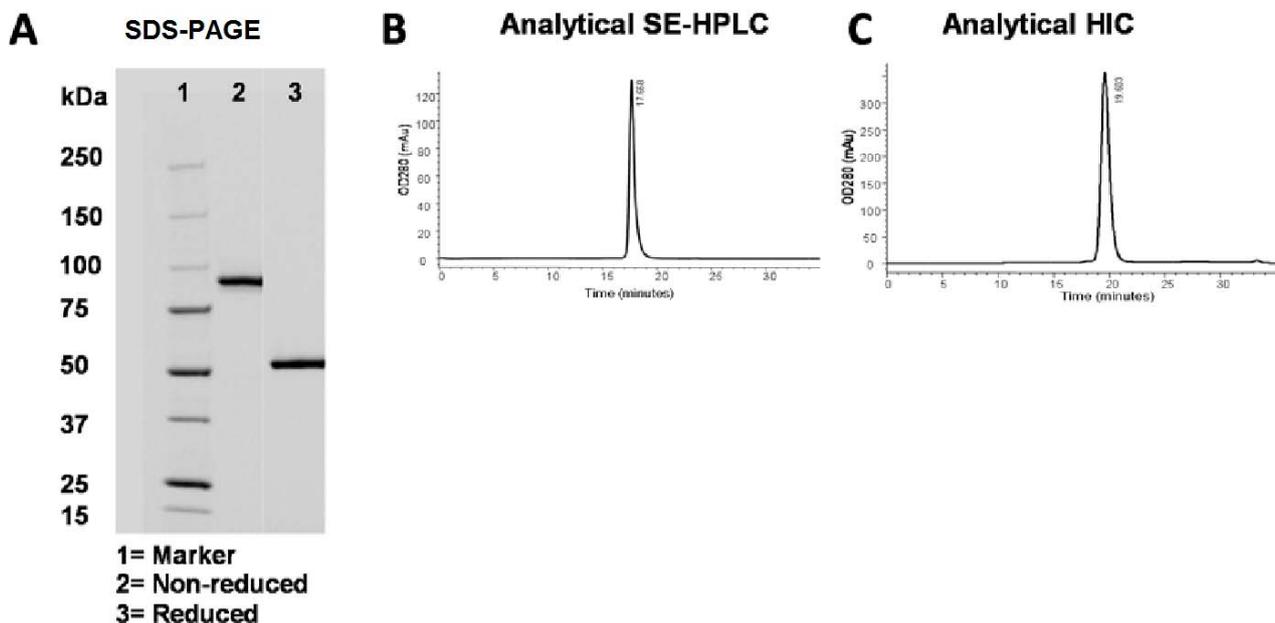


5.1. Elution profile of phage preparation subjected to the size-exclusion chromatography with Sephacryl S-500.

**5.2. Denaturing Tris-tricine electrophoresis of purified phage particles obtained after rescue of a phagemid displayed the single-chain variable fragment (scFv)-pIII fusion.**

Lane 1, phage preparation recovered after size-exclusion chromatography (SEC). The gel revealed single major band corresponding to the pVIII coat protein and faint bands possibly belonging to other phage proteins ; lane 2, same preparation but purified by double-polyethylene glycol (PEG) precipitation only; lane 3, low molecular weight (LMW) marker (Amersham Biosciences).

**Document 6 : détermination des paramètres physico-chimiques**  
(adapté de Root RA et al., *Antibodies*, 2016)



Résultats des analyses réalisées par :

- A SDS-PAGE,
- B SE-HPLC ou HPLC d'exclusion
- C HIC ou HPLC par interactions hydrophobes

**Document 7 : résumé des  $K_D$  et  $EC_{50}$  pour différents DART**  
(adapté de Root RA et al., *Antibodies*, 2016)

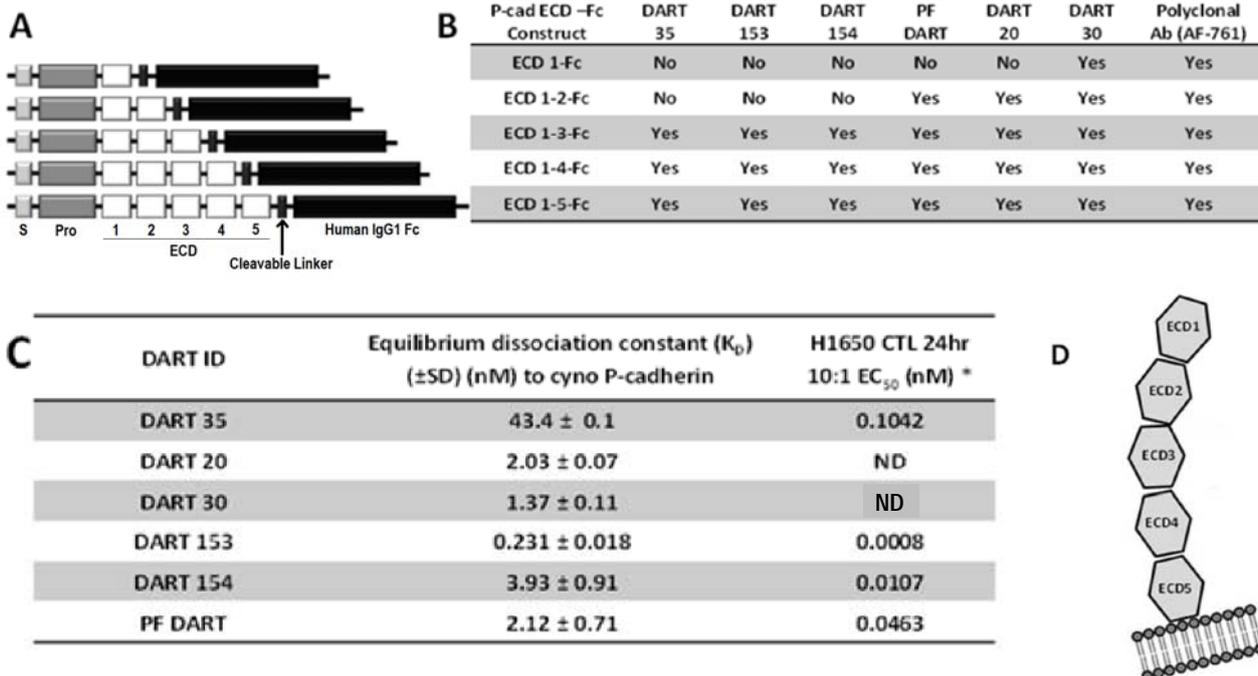
DART ID	Equilibrium Dissociation Constant (K <sub>D</sub> ) to Cyno P-cadherin (±SD) (nM)	Equilibrium Dissociation Constant (K <sub>D</sub> ) to Human CD3 (±SD) (nM)	NCI-H1650 Cell Binding ELISA EC <sub>50</sub> (nM)	CHO Parental Cell Binding ELISA EC <sub>50</sub> (nM)	NCI-H1650 CTL Assay 48 h 10:1 EC <sub>50</sub> (nM)
33 DART	46.4 ± 4.1	18.25 ± 0.55	60.1	NB	1.246
34 DART	129.25 ± 31.75	21.85 ± 0.95	67.95	NB	1.888
35 DART	43.4 ± 0.1	23.15 ± 0.45	24.87	NB	0.1042
PF DART	2.12 ± 0.71	6.80 ± 2.81	19.69	NB	0.0463
20 DART	2.03 ± 0.07	5.19 ± 0.35	-114.7	NB	ND
30 DART	1.37 ± 0.11	13.6 ± 3.49	141.9	NB	ND

Summary table of DART equilibrium dissociation constants (K<sub>D</sub>) to cynomolgus monkey P-cadherin and human CD3, ELISA cell binding EC<sub>50</sub> values to NCI-H1650 and control P-cadherin-negative cells, and CTL-directed of NCI-H1650 adenocarcinoma cells by anti-P-cadherin/anti-CD3 DART proteins.

NB = no binding detected; ND = EC<sub>50</sub> not determined; NR = no response.

**Document 8 : Cartographie des sites de reconnaissance des DART et résultats des  $K_D$  et  $EC_{50}$  associés**

(adapté de Root RA et al., *Antibodies*, 2016)

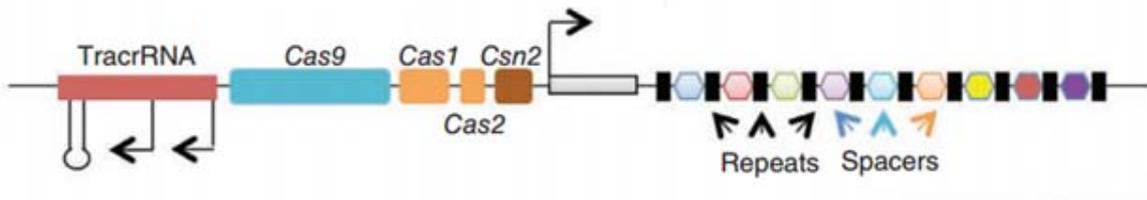


(A) Schematic representation of truncated human P-cadherin ECD constructs generated for epitope mapping studies. Gray shading represents the pro-peptide domain; White represents the P-cadherin ECD; Black shading represents the human IgG1 Fc with cleavable linker; (B) Summary of binding observed for P-cadherin DARTs to P-cadherin ECD-Fc constructs and the polyclonal anti-P-cadherin antibody (AF-761; R & D Systems); (C) CTL killing activity of DARTs tested in epitope mapping study; (D) Cartoon representation showing the presumed binding location of the various DARTs. \* = samples were tested on a separate dates with different donor effector cells. ND =  $EC_{50}$  not determined;

Remarques :

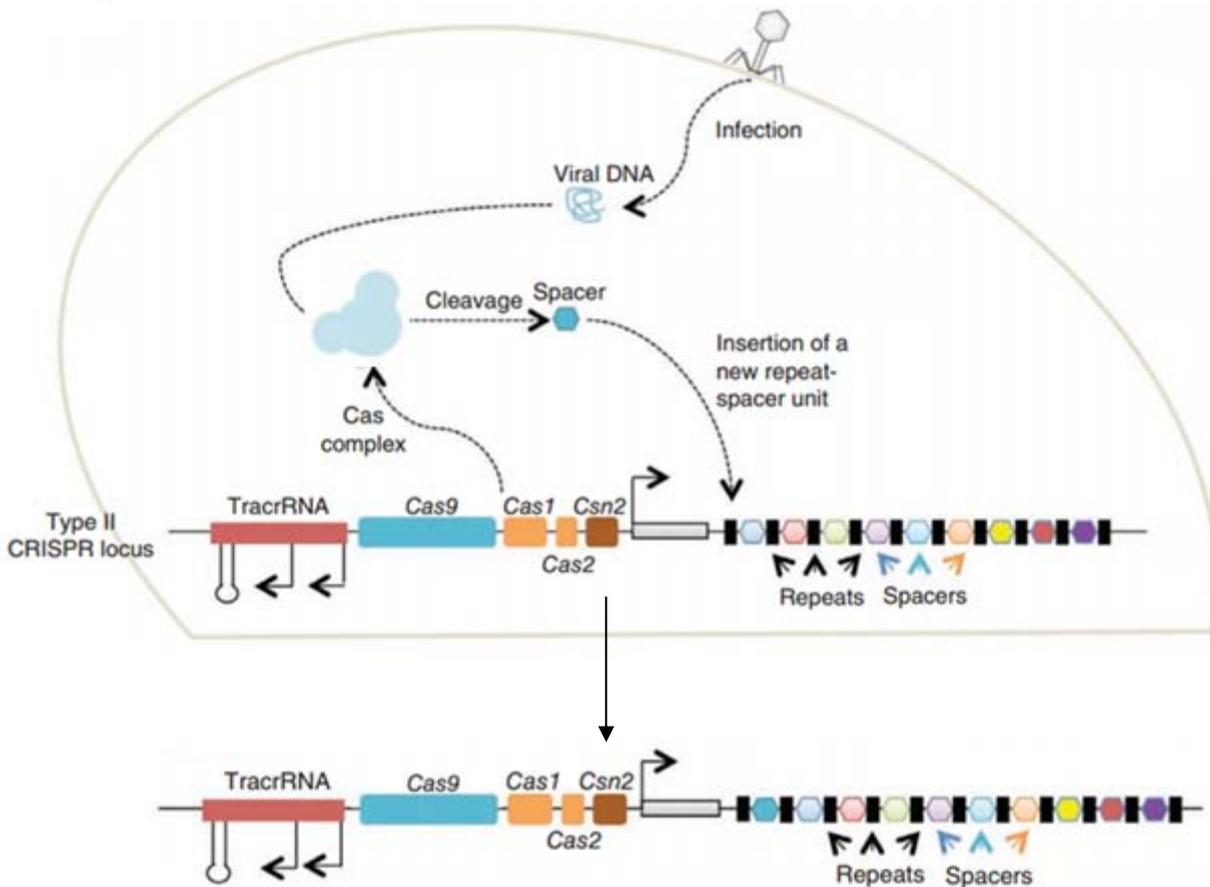
- ✓ ECD = ExtraCellular Domain. Les domaines ECD 1, 2, 3, 4 et 5 possèdent des structures primaires différentes.
- ✓ Les résultats de cartographie sont obtenus sur la base d'une technique ELISA après purification des différentes constructions exprimées transitoirement dans des cellules HEK293.

**Document 9**  
*Locus CRISPR de type II*  
 (adapté de IGEM 2014 SUSTC-Shenzhen)

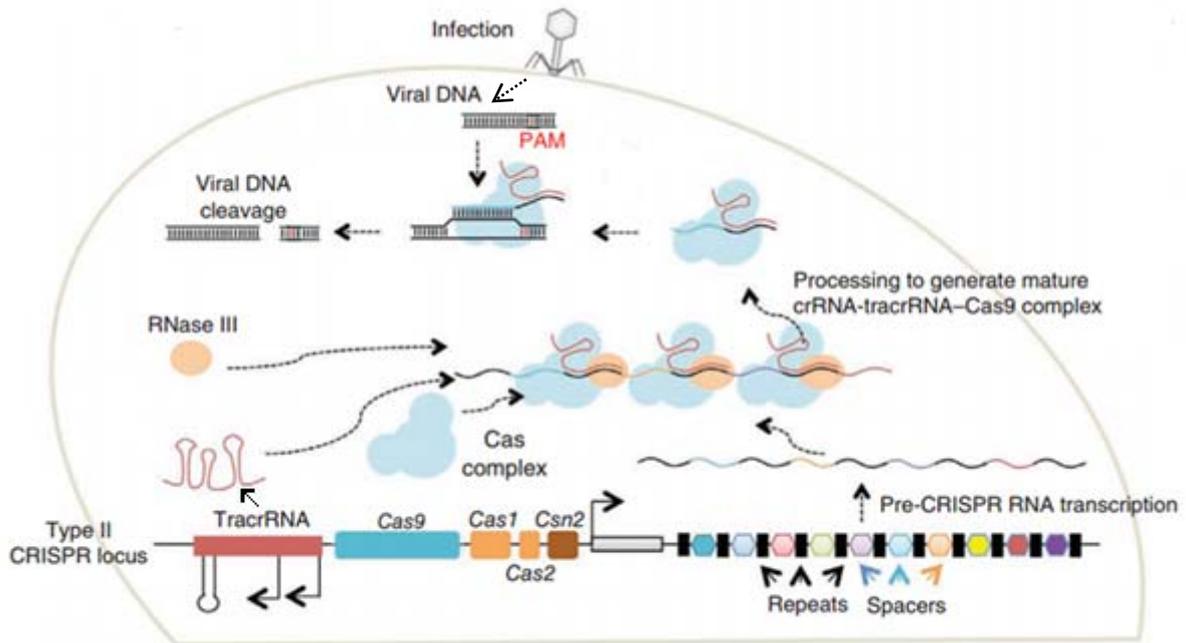


*TracrRNA* = gène codant l'ARN trans-activateur du système CRISPR  
*Cas* et *Csn* = gènes codant les protéines associées au système CRISPR  
*Repeats* = courtes séquences palindromiques du génome bactérien  
*Spacers* = séquences d'ADN étranger

**Document 10** : phase d'immunisation  
 (adapté de IGEM 2014 SUSTC-Shenzhen)



**Document 11** : réponse immunitaire  
 (adapté de IGEM 2014 SUSTC-Shenzhen)



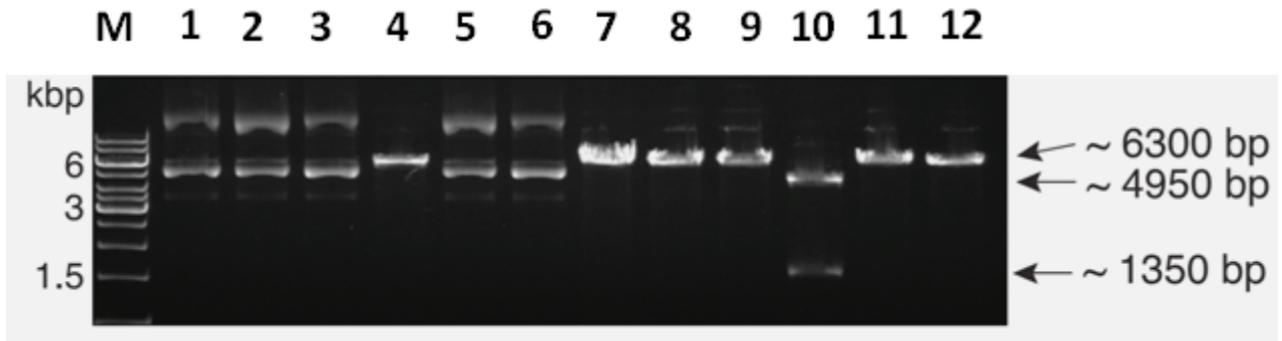
**Document 12**

(adapté de JINEK M et al. ; Science 2012 ; 337 : 816-821)

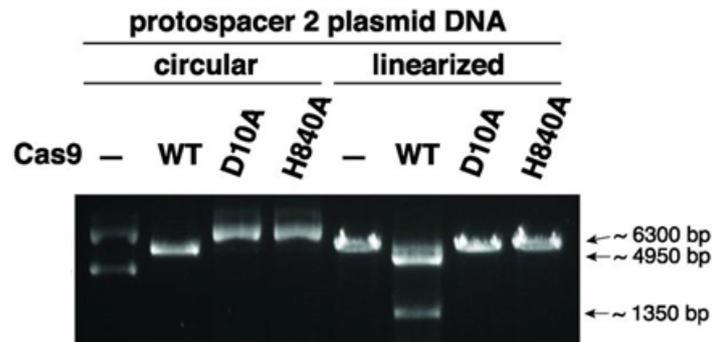
**protospacer 2 plasmid DNA**

	circular						linearized					
<b>protospacer 2 plasmid DNA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Cas9</b>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>crRNA-sp2</b>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
<b>tracrRNA</b>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<b>crRNA-sp1</b>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<b>Mix</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Cas9 was programmed with a 42-nucleotide crRNA-sp2, crRNA containing a spacer 2 sequence, in the presence or absence of 75-nucleotide tracrRNA. The complex was added to circular or XhoI-linearized plasmid DNA bearing a sequence complementary to spacer 2 and a functional PAM (protospacer 2 plasmid DNA). crRNA-sp1, crRNA containing a spacer 1 sequence; M, DNA marker; kbp, kilo-base pair

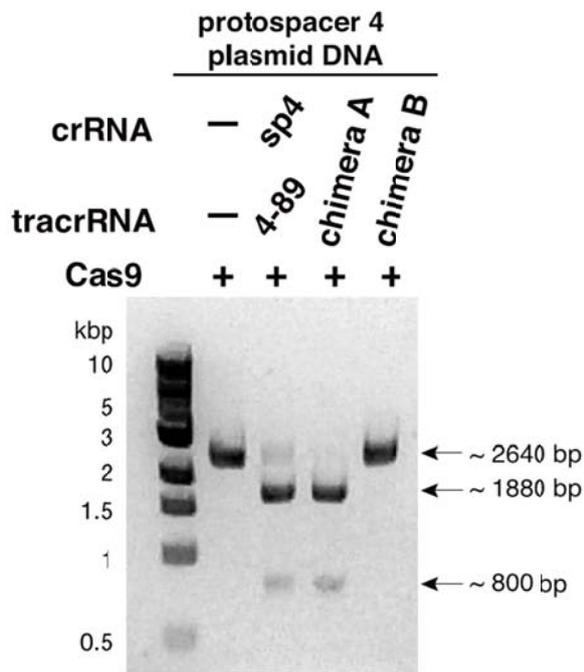


**Document 13**  
 (JINEK M et al. ; Science 2012 ; 337 : 816-821)

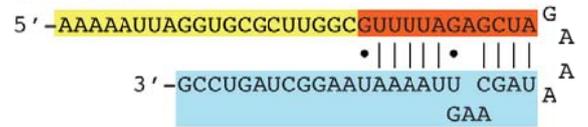


WT: wild type  
 D10A, Asp<sup>10</sup>→Ala<sup>10</sup>  
 H840A, His<sup>840</sup>→Ala<sup>840</sup>

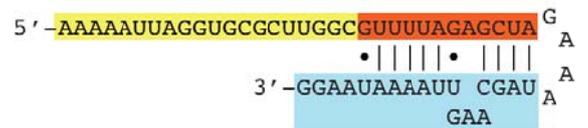
Complexes of WT or nuclease mutant Cas9 proteins with tracrRNA:crRNA-sp2 were assayed for nuclease activity as in document 12



**chimera A**



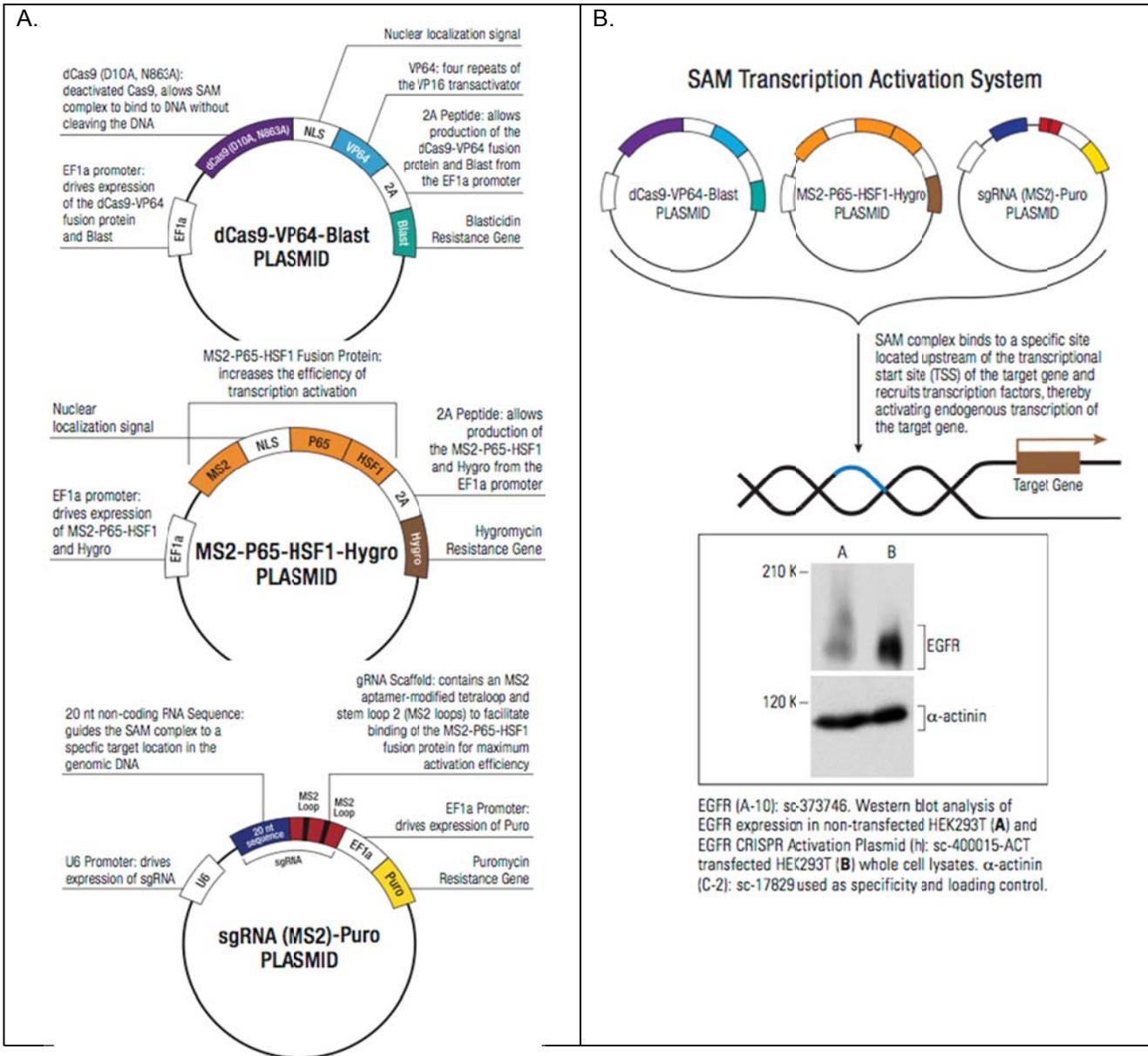
**chimera B**



A plasmid harboring protospacer 4 target sequence and a WT PAM was subjected to cleavage by Cas9 programmed with tracrRNA (4-89):crRNA-sp4 duplex or in vitro-transcribed chimeric RNAs constructed by

joining the 3' end of crRNA to the 5' end of tracrRNA with a GAAA tetraloop. Cleavage reactions were analyzed by restriction mapping with XmnI. Sequences of chimeric RNAs A and B are shown with DNA-targeting (yellow), crRNA repeat-derived sequences (orange), and tracrRNA-derived (light blue) sequences.

**Document 15**  
**Invalidation et stimulation de l'expression des gènes par la technologie CRISPR-Cas9**  
*(Santa Cruz Biotechnology)*



**ANNEXES**

A. Extrait du programme de biotechnologies de terminale STL

## Préparation et analyse biochimique des produits biologiques

### Méthodes de fractionnement

Objectifs de formation et supports théoriques	Compétences transversales et technologiques
<p>- Intérêt du fractionnement pour l'étude d'un produit biologique.</p> <p>- Principe du suivi d'une purification d'une molécule au sein d'un produit complexe.</p> <p>- Méthodes de fractionnement, préparatives ou analytiques, en lien avec les propriétés des biomolécules :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. centrifugation,</li> <li>. électrophorèse,</li> <li>. chromatographie par adsorption, partage, exclusion-diffusion, échange d'ions, affinité,</li> <li>. solubilité différentielle,</li> <li>. dialyse,</li> <li>. distillation.</li> </ul> <p>- Technologies du fractionnement et de la détection associée, appareillages intégrés.</p> <p>Les techniques de fractionnement ont été abordées en classe de première. En classe terminale, l'analyse sera approfondie et complétée en s'appuyant sur la diversité des principes et des technologies dans le cadre de l'étude d'un produit biologique complexe. La démarche de suivi de purification pourra être conduite en lien avec le suivi de purification d'une enzyme par son activité enzymatique.</p> <p>Cette partie sera traitée en lien avec paragraphe 1.5 « Les molécules des organismes vivants présentent des structures et des propriétés spécifiques » de CBSV.</p>	<p>- Choisir et mettre en œuvre une méthode de fractionnement en fonction des propriétés des biomolécules à séparer.</p> <p>- Associer des techniques unitaires pour extraire ou purifier des biomolécules.</p> <p>Le nombre de techniques approfondies en classe terminale sera limité ; les techniques ne seront pas étudiées pour elles-mêmes, mais dans l'objectif d'en comprendre les principales caractéristiques permettant à terme aux élèves de justifier le choix d'une méthode de fractionnement.</p>

## B. Extrait du programme du BTS biotechnologies

### Section 2 : OUTILS, TECHNIQUES ET METHODES DU GENIE GENETIQUE

Compte tenu de la vitesse et de l'importance d'évolution des techniques, il convient de bien distinguer les "fondamentaux", dont la connaissance doit être bien assise, et les connaissances "culturelles", pour lesquelles il convient de dégager les idées "force" sans rechercher l'exhaustivité.

En cas d'utilisation de kits en Travaux Pratiques, on s'attachera à bien en dégager les principes.

INTITULE DU PROGRAMME	COURS	COMMENTAIRES TRAVAUX PRATIQUES	COURS	TP
<b>2-3- Les outils du clonage moléculaire chez <i>E.coli</i></b>				
Les vecteurs : - vecteurs plasmidiques de clonage - autres vecteurs : phagiques (dérivés des phages lambda et filamenteux), cosmides et phagemides, BACs	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Notions simples sur les vecteurs non plasmidiques, incluant cependant les procédés de transfection associés (encapsulation in vitro ...)</li> <li>▪ Les vecteurs d'expression seront développés en Section 3</li> </ul>	Vérification d'une carte de restriction  Restrictions intégrées à d'autres manipulations telles que clonage...	X	X
Les endonucléases de restriction	Principalement celles de type II		X	X
Les autres enzymes usuelles	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ADN ligase</li> <li>▪ Principaux outils de coupure, de polymérisation, de ligature, de modifications ...</li> </ul>		X	X
<b>2-4- Les méthodes du clonage moléculaire</b>				
L'insertion d'une séquence d'ADN dans un vecteur	Logique des principaux procédés de ligature d'un insert et d'un vecteur		X	X
La transformation d' <i>E.coli</i>	Principe et mise en oeuvre des méthodes chimique et électrique	Transformation bactérienne par méthode chimique	X	X
Sélection des transformés, repérage des recombinés, criblage éventuel du clone d'intérêt	Le système de l'alpha-complémentation sera détaillé.	Réalisation d'un clonage ou d'un sous-clonage avec mise en jeu d'un ensemble d'étapes : extraction , restriction, (purification), ligature, transformation, sélection et/ou identification des recombinés	X	X

## C. Extrait du programme de biotechnologies de la CPGE TB

Connaissances clés à construire	Commentaires, capacités exigibles	
<b>1.1. Les protéines : de la structure à la fonction</b>		
<b>1.1.2. Structure primaire</b>	- Présenter la géométrie de la liaison peptidique et les propriétés associées.	S1
La liaison peptidique se crée entre un 1-		

carboxyle et un groupement alpha aminé	L'effet mésomère est étudié en physique-chimie. <b>Limite</b> : <i>L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire n'est pas à traiter.</i>	
<b>1.1.3. Structure tridimensionnelle</b>  Les différents niveaux de structure (secondaire, tertiaire et quaternaire) des protéines sont déterminés par les propriétés des chaînes latérales des résidus d'acides aminés.  Il existe des conditions physico-chimiques qui provoquent la dénaturation des protéines.	- Mettre en relation les propriétés des chaînes latérales des acides aminés et la structure tridimensionnelle des protéines. - Caractériser les différents niveaux de structure en lien avec les liaisons stabilisatrices. - Repérer des motifs et domaines fonctionnels au sein d'une architecture moléculaire.  - Enoncer le mode d'action de quelques agents dénaturants.  Les interactions faibles stabilisatrices sont étudiées en physique-chimie.	S1
<b>1.1.4. Interactions protéine-ligand</b>  La structure tridimensionnelle des protéines et son ajustement induit par la liaison au ligand conditionnent leurs propriétés biologiques.  [.....]	- Relier l'affinité et la stéréospécificité. - Démontrer la relation de Scatchard.  [.....]  La notion de constante d'équilibre est étudiée en physique-chimie. <b>Limite</b> : <i>Seul le cas de l'interaction non coopérative est traité.</i>	S3
<b>1.2. Méthodes d'étude des protéines: de la purification à la caractérisation</b>		

### Commentaire général

Le jury a apprécié les copies contenant des réponses synthétiques et concises, attestant de connaissances solides et d'une lecture attentive des documents du dossier technique.

A l'inverse, trop de candidats ont dilué leurs réponses dans des développements longs, souvent digressifs voire erronés et attestant un manque de connaissances. Ces dernières font parfois appel à une reformulation ou une traduction simple de documents du dossier technique.

Le jury a pu apprécier le soin avec lequel la plupart des candidats ont rédigé leur copie.

Certains schémas explicatifs ont été particulièrement bien présentés. Cependant, cela n'a pas toujours été le cas et le jury déplore que certaines copies soient quasiment illisibles et que d'autres montrent un manque de soin patent et révélateur. De même, une relecture attentive éviterait les fautes d'orthographe et de grammaire inacceptables pour des enseignants.

Il est fortement conseillé aux futurs candidats d'être attentifs aux consignes qui permettent le plus souvent d'organiser les réponses de façon synthétique et concise. Ces qualités sont en effet essentielles pour un enseignant.

Si certains candidats ont su produire un travail très intéressant sur les questions pédagogiques, une majorité, soit n'a pas traité ces questions, soit n'a pas construit de document exploitable par des élèves.

Le jury attire l'attention sur le fait que ces questions nécessitent un temps important pour s'appropriier les documents, puis concevoir des exercices ou des documents de synthèse bien structurés. C'est pourquoi le poids qui leur est attribué dans le barème est toujours conséquent.

Le barème du sujet étant globalement équilibré pour les différentes questions, le jury regrette qu'un nombre non négligeable de candidats n'ait pas traité la deuxième partie du sujet sur le système CRISPR.

Le jury a sanctionné sévèrement les réponses fantaisistes voire totalement hors-sujet.

## **1. Production d'anticorps bispécifiques dans le cadre de thérapies antitumorales**

### **1.1. Production et sélection de fragments variables simple brin (scFv) par « phage display »**

La question C1 portait sur le cycle de multiplication du phage M13. Certains candidats ont bien développé les particularités du cycle de ce phage filamenteux, d'autres par contre ont présenté les spécificités de multiplication du phage lambda.

La question C2 portait sur la synthèse des informations des documents 3 A et 3B ce qui ne présentait pas de difficultés particulières. Certains candidats ont trop développé leur réponse en oubliant l'aspect synthétique et en apportant de la confusion aux éléments décrits.

Concernant l'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium, trop peu de candidats ont évoqué l'aspect continu du gradient.

Le principe de la chromatographie d'exclusion est maîtrisé par de nombreux candidats qui ont pu réaliser des schémas clairs et pédagogiques. Pour quelques candidats cependant, le principe de cette technique de base n'est pas connu. La construction d'un exercice a posé des problèmes à plusieurs candidats qui ont proposé des questions dont le choix et l'intérêt pédagogique sont plus que discutables.

L'analyse du document 5.1 ne présentait pas de difficultés. Le document 5.2 a posé plus de problèmes aux candidats. Une seule bande de forte intensité correspondant à la protéine PVIII fortement majoritaire dans le phage était nettement visible sur la piste 1 de l'électrophorèse dénaturante, ce qui a conduit une partie des candidats à conclure que la protéine était bien purifiée. La légende du document précisait pourtant que d'autres bandes d'intensités plus faibles correspondant aux autres protéines du phage étaient présentes sur le gel, légende qui n'a pas été suffisamment exploitée. L'analyse de la piste 2 a été mal réalisée ; les candidats confondant les contaminants et les autres protéines virales.

### **1.2. Détermination des paramètres physico-chimiques et physiologiques des anticorps bispécifiques produits et amélioration de l'affinité des bsAc sélectionnés**

Le jury déplore les erreurs nombreuses et grossières trouvées dans les copies en ce qui concerne la formule du SDS.

Les questions C8 et C9 ont été globalement bien traitées.

Les témoins du test de cytotoxicité ont posé des problèmes à de nombreux candidats qui considèrent que les résultats sont binaires sans tenir compte du support cellulaire utilisé. Le jury apprécie que certains candidats aient explicité clairement les rôles des témoins et les aspects attendus en évitant d'utiliser les expressions « témoins positifs » et « témoins négatifs » sans autre commentaire.

Le jury s'étonne des difficultés rencontrées pour établir l'équation aux grandeurs permettant la détermination du pourcentage de cytotoxicité.

La question P2 imposait l'élaboration d'un document de synthèse illustrant la détermination du  $K_D$  pour une classe de TB. L'extrait du programme fourni en annexe orientait vers la méthode de Scatchard.

Peu de candidats ont été à même de produire un document satisfaisant.

Les questions portant sur le choix des anticorps spécifiques reposant sur l'affinité et la cytotoxicité ont été globalement bien traitées. Le jury s'étonne du fait que certains candidats confondent constante d'affinité et constante de dissociation et raisonnent à l'envers sur l'EC50.

## **2. Les systèmes de défense immunitaire bactériens CRISPR**

La question P3 a creusé les écarts entre les candidats. En effet, seuls certains d'entre eux ont su utiliser les documents proposés pour construire un exercice de biologie moléculaire très pertinent à destination des élèves. Cela nécessitait bien évidemment des connaissances de base en biologie moléculaire et une bonne capacité d'analyse des documents fournis.

Une introduction résumant simplement le système CRISPR Cas9 était bienvenue pour permettre aux élèves d'exploiter convenablement le document 12 sur lequel devait s'appuyer l'exercice. Il était donc nécessaire de bien s'approprier les éléments évoqués dans le sujet et dans les documents 9 à 11.

L'énoncé guidait la logique des questions et leur difficulté croissante.

De nombreux candidats ont émis une conclusion peu argumentée à partir des résultats présentés dans les questions C16 et C17. Une analyse construite et rigoureuse des documents fournis était attendue.

Le jury a constaté une méconnaissance de la structure d'un plasmide relâché (un seul brin coupé). Ceci a engendré une mauvaise compréhension des résultats obtenus lors de l'étude de l'action de mutants Cas9 qui ne catalysent qu'une coupure simple brin.

Quelques candidats ont bien présenté deux autres approches utilisant des nucléases (nucléases à doigts de zinc et TALENs).

La question P4 exigeait la construction d'un document de synthèse dégageant, d'une part, des notions générales sur la composition d'un plasmide d'expression et, d'autre part, l'intérêt des caractéristiques propres à chacun des 3 plasmides mis en œuvre dans le système SAM.

Quelques candidats ont proposé un schéma récapitulatif particulièrement explicite des différents événements permettant d'aboutir à l'activation du gène cible.

La dernière question portait sur le Western Blot. On attendait en tout premier lieu une analyse des résultats obtenus pour la protéine  $\alpha$ -actinine qui sert de contrôle interne pour une quantification relative.

A ce propos, le jury a noté que d'une façon générale l'analyse des témoins et contrôles n'était globalement pas ou mal réalisée. Or, ces derniers doivent bien évidemment être exploités avant tout autre résultat.

## Deuxième épreuve

Durée : 8 heures

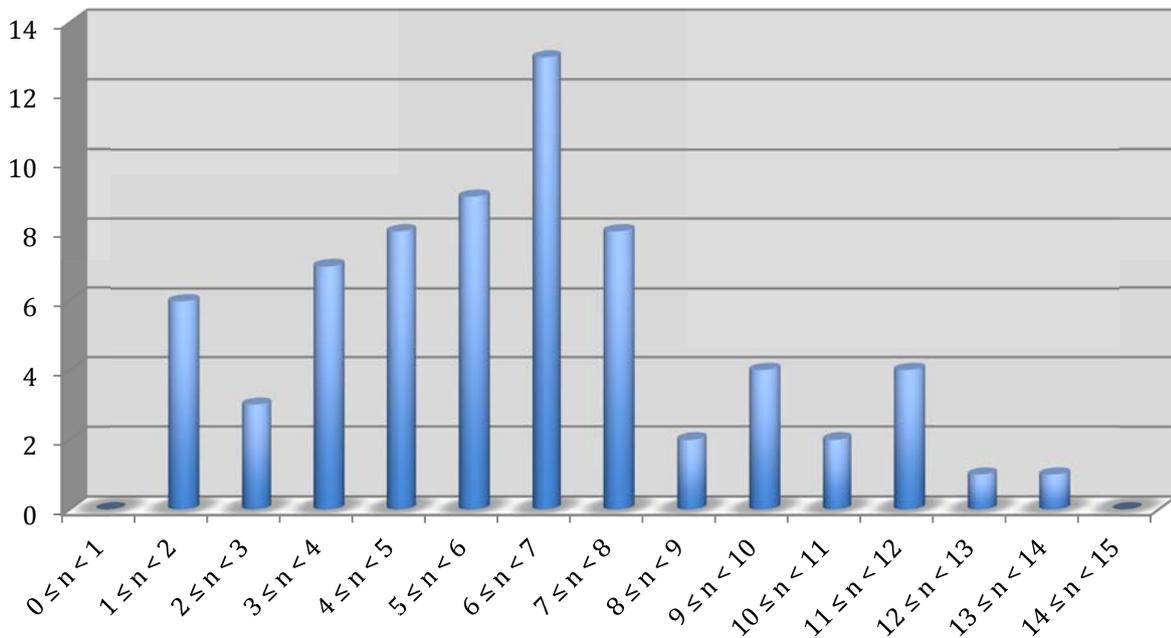
Coefficient : 1

### Résultats

Agrégation  
interne

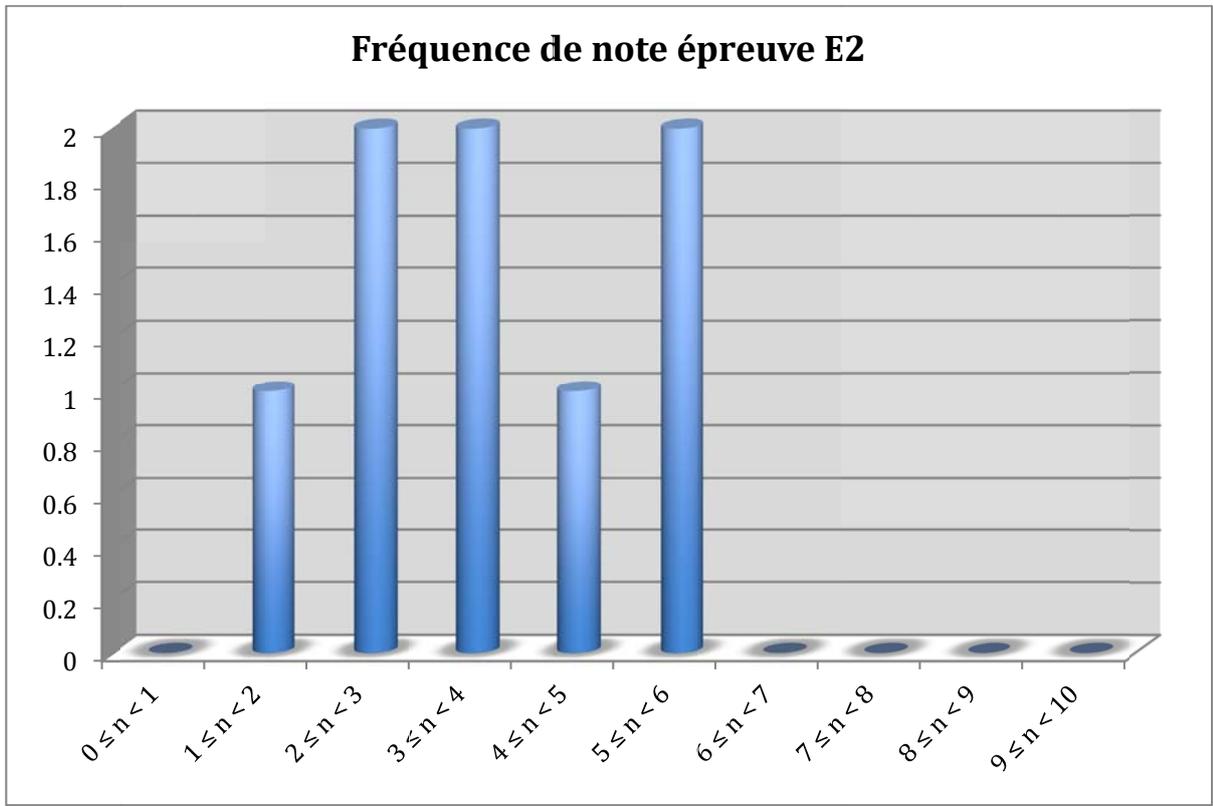
$0 \leq n < 1$	2	$10 \leq n < 11$	4
$1 \leq n < 2$	4	$11 \leq n < 12$	2
$2 \leq n < 3$	4	$12 \leq n < 13$	1
$3 \leq n < 4$	4	$13 \leq n < 14$	0
$4 \leq n < 5$	12	$14 \leq n < 15$	0
$5 \leq n < 6$	6	$15 \leq n < 16$	0
$6 \leq n < 7$	4	$16 \leq n < 17$	0
$7 \leq n < 8$	3	$17 \leq n < 18$	0
$8 \leq n < 9$	2	$18 \leq n < 19$	0
$9 \leq n < 10$	4	$19 \leq n \leq 20$	0

### Fréquence de note épreuve E2



CAER  
agrégation

$0 \leq n < 1$	0	$10 \leq n < 11$	0
$1 \leq n < 2$	1	$11 \leq n < 12$	0
$2 \leq n < 3$	2	$12 \leq n < 13$	0
$3 \leq n < 4$	2	$13 \leq n < 14$	0
$4 \leq n < 5$	1	$14 \leq n < 15$	0
$5 \leq n < 6$	2	$15 \leq n < 16$	0
$6 \leq n < 7$	0	$16 \leq n < 17$	0
$7 \leq n < 8$	0	$17 \leq n < 18$	0
$8 \leq n < 9$	0	$18 \leq n < 19$	0
$9 \leq n < 10$	0	$19 \leq n \leq 20$	0



## **Sujet 2<sup>ème</sup> épreuve**

### **Première question**

Aspects fondamentaux et appliqués de l'organisation tridimensionnelle des protéines.  
Le candidat veillera à illustrer son propos par des exemples ayant valeur de modèle.

### **Deuxième question**

Avantages et contraintes de la compartimentation des cellules animales.

## Rapport du jury sur la deuxième épreuve

### Résultats de l'épreuve :

60 candidats ont composé :

- 1 seul candidat a obtenu une note supérieure à 12
- 6 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12,
- 6 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,
- 9 ont obtenu une note supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 8,
- 38 ont obtenu une note strictement inférieure à 6.

La moyenne générale de l'épreuve est de 5,54. La meilleure note est de 12,51/20.

Comme lors de la session précédente, l'épreuve était composée de deux parties totalement indépendantes et pondérées de manière identique. Ainsi, une durée de travail équivalente pouvait leur être consacrée. Les sujets de synthèse proposés permettaient de couvrir les grands champs disciplinaires de notre spécialité notamment, pour cette session, la biochimie structurale et fonctionnelle des protéines pour la première question et la biologie cellulaire pour la seconde question. Même si des focales disciplinaires précitées s'imposaient, l'épreuve sollicitait de la part des candidats des connaissances dans de nombreux domaines de la biochimie métabolique, l'enzymologie, les méthodes d'analyses des protéines, la biologie cellulaire et moléculaire de la cellule. Ces domaines fondamentaux illustrent la richesse et la diversité des thématiques abordées dans nos enseignements.

Le jury a conscience que traiter deux questions ouvertes en huit heures est un exercice difficile. Il souligne cependant que le choix de limiter l'épreuve à deux questions devrait permettre aux candidats de prendre le temps de cerner chaque question, mobiliser les connaissances appropriées, construire un plan logique et articulé à l'appui de courtes transitions. Les sujets, bien que mobilisant des connaissances pointues, abordaient cependant ce qu'on pourrait appeler des grands classiques de la biochimie et de la biologie cellulaire. Aussi, le jury regrette que trop peu de candidats n'aient atteint la moyenne et ont été à même de se distinguer par une composition de qualité, associant une réflexion pertinente et intégrée des sujets ainsi qu'une mise en exergue de connaissances actualisées.

La nature de cette épreuve impose aux candidats d'avoir une gestion correcte du temps ainsi qu'une capacité à mobiliser efficacement et de façon pertinente leurs connaissances. Ceci implique de s'octroyer un temps réel de réflexion face aux intitulés des sujets afin, d'une part, de construire un plan logique tant dans sa forme que dans son contenu et, d'autre part, d'éviter toute digression hors-sujet. Le jury déplore que, mis à part quelques rares exceptions, ce travail de réflexion en amont ne semble pas être correctement réalisé, ce qui se ressent ensuite cruellement dans l'élaboration des devoirs. Ainsi, beaucoup trop de candidats ont élaboré des développements hors de propos et déconnectés des attentes des sujets pour certaines copies ou des présentations très simplistes intégrant également des détails inutiles pour d'autres. Prenant l'exemple de la première question, quelle utilité de décliner les formules développées des 20 acides aminés ?

De manière générale, le jury a apprécié la qualité de rédaction et de présentation de la majorité des copies dans lesquelles, hormis quelques rares exceptions, l'orthographe et la syntaxe sont correctement respectées. Il tient également à souligner l'effort manifeste de nombreux candidats dans le soin apporté à la construction de transitions logiques et didactiques entre les différentes parties et sous-parties de leurs compositions.

Le jury souligne que la réalisation d'un devoir d'agrégation demande un minimum de rigueur et que les candidats doivent, notamment, écrire intégralement les mots et ne pas user d'un style télégraphique non conventionnel et donc incompréhensible. De même, le jury rappelle que ses membres ne possèdent pas de vocation particulière à déchiffrer des copies et/ou écritures peu soignées ; une attention des candidats à la lisibilité de leur écriture est toujours vivement appréciée.

Le jury regrette pourtant que de trop nombreuses prestations se soient aventurées dans des hors-sujets et rappelle que de tels sujets, de par leur ampleur et leur richesse, ne pouvaient supporter des digressions. Les candidats qui n'ont pas cerné, dès l'introduction, les attendus des questions posées et qui se sont souvent égarés dans des verbiages et étalages de connaissances déconnectés du contexte, se sont systématiquement lourdement auto-pénalisés. Il semble important de rappeler que la note n'est en aucun cas proportionnelle à la quantité de texte rédigé. Les longues digressions, même correctes scientifiquement, ne sont pas utiles et ne donnent pas lieu à une quelconque valorisation.

Comme l'année dernière, le jury s'inquiète du niveau de langage bien trop simpliste de nombreux candidats et d'une absence de rigueur scientifique dans les mots et expressions employés. Cet aspect représente pourtant un élément important car tout mode de communication, et qui plus est celui de nos disciplines scientifiques, repose sur l'usage d'un vocabulaire précis qui ne peut souffrir les approximations et les verbiages communs. Il apparaît que de nombreuses copies n'ont bénéficié d'aucune relecture comme en témoignent certaines contre-vérités qui pour un concours de ce niveau ne peuvent, du moins on peut l'espérer, n'être que des coquilles de vocabulaire. Ainsi le jury a pu lire : « ...certaines protéines à forte activité mécanique comme le glycogène » ou « ... une enzyme allostérique comme l'hémoglobine » ou enfin que « la plupart des enzymes allostériques ont plusieurs sous-unités ».

Le jury rappelle également qu'un devoir doit contenir une introduction de qualité qui positionne correctement le sujet et présente la construction du devoir. Un plan apparent, détaillé, rigoureux et pertinent, articulé de transitions apportant de la fluidité et de la légitimité au récit, était également attendu. Enfin, un devoir doit également contenir une conclusion pertinente, point souvent très mal ou très maladroitement abordé par les candidats. Celle-ci pouvait aisément faire un rapide bilan des notions essentielles abordées et surtout proposer un (des) élargissement(s) en lien avec la thématique.

## 1<sup>ère</sup> question

Le jury est globalement déçu de la façon dont les candidats ont abordé la question : « Aspects fondamentaux et appliqués de l'organisation tridimensionnelle des protéines. Le candidat veillera à illustrer son propos par des exemples ayant valeur de modèle ».

Toutes les copies ont traité (pas toujours correctement) des différents niveaux structuraux des protéines ainsi que des relations structure-fonction mais le jury déplore que la majorité des candidats ne se soit pas suffisamment penchée sur les techniques modernes utilisées dans les laboratoires de biochimie et biophysique des protéines et sur l'apport de celles-ci dans la caractérisation des structures tridimensionnelles des protéines et des mécanismes à l'origine de l'acquisition de ces structures. Le sujet imposait de donner des « exemples ayant valeur de modèle » pour aborder les mécanismes mis en jeu. Les systèmes modèles proposés étaient généralement très peu justifiés et caractérisés précisément ; les aspects moléculaires des mécanismes impliqués étaient très peu développés voire le plus souvent absents.

Il est à noter que, dans un devoir d'agrégation, les approximations scientifiques sont proscrites et que le jury attend l'utilisation d'un vocabulaire approprié et précis compatible avec un enseignement scientifique de haut niveau. L'exposé doit bannir les lieux communs de type « journalistique » qui desservent le propos du candidat. Le jury comprend qu'il est difficile de développer une expertise dans tous les domaines de la biochimie et du génie biologique. Par contre, il ne peut admettre l'écriture de contre-vérités grossières dans une composition d'agrégation. Le candidat doit être en capacité de prendre de la hauteur par rapport au sujet afin de donner sens à son devoir.

Avant de commencer leur composition, les candidats devaient s'efforcer d'analyser le sujet et d'en définir sa problématique. Ainsi l'introduction pouvait, outre la définition du concept de protéine, indiquer leur place au sein des biomolécules, leurs différents niveaux d'organisation, poser clairement la question du passage de la structure primaire à une structure tridimensionnelle tertiaire ou quaternaire et des mécanismes sous-jacents, et aborder leurs méthodes de purification et d'étude. Un aperçu de leurs grandes fonctions pouvait alors être décliné, en lien avec le repliement et l'organisation tridimensionnelle des protéines. Cette introduction pouvait aussi aborder les conséquences d'un repliement anormal de certaines protéines associées à diverses pathologies (thalassémies, maladies génétiques, maladies neurodégénératives).

Pour un sujet aussi vaste, il ne s'agissait surtout pas d'ambitionner l'exhaustivité. Une première partie pouvait s'intéresser aux acteurs moléculaires du repliement spatial et à leur place dans les différents niveaux de structure. Ce qui amenait à détailler les différents niveaux d'organisation tridimensionnelle des protéines. Une description de la structure primaire permettait de mettre en relief l'importance de la séquence des acides aminés pour l'acquisition de la structure tridimensionnelle. Détailler la liaison peptidique permettait d'aborder les contraintes associées à sa structure pour le repliement des protéines. La suite de cette première partie permettait de décliné les structures secondaire, tertiaire et quaternaire à l'appui d'une présentation des interactions faibles (hydrogènes, électrostatiques, van der Waals...) et liaisons covalentes (ponts disulfures) qui participent à la stabilisation de la structure tridimensionnelle des protéines mais également à sa dynamique. Cette première partie se devait ensuite d'envisager l'influence de l'environnement physicochimique sur l'organisation spatiale d'une protéine, sa stabilité et son activité biologique. Des applications analytiques, comme des méthodes électrophorétiques, de précipitation,

l'influence de la force ionique, du pH ou de la température permettaient de dégager les concepts d'ionisation de surface, de domaines enfouis, de pH optimum de fonctionnement, de dénaturation de protéines et d'hystérésis.

Une deuxième partie se devait d'aborder les mécanismes qui sous-tendent l'acquisition d'une structure protéique tridimensionnelle en se basant sur le postulat d'Anfinsen et le paradoxe de Levinthal. Cette partie ne pouvait faire l'économie de présenter, même succinctement, quelques méthodes d'études basées sur les propriétés spectrales des protéines. Ainsi, pouvaient être mentionnées la spectroscopie d'absorption, la fluorescence, la spectroscopie infrarouge, le dichroïsme circulaire, la résonance magnétique nucléaire, la résonance paramagnétique électronique (via les métaux fixés sur certaines protéines) ainsi que la place de la bio-informatique notamment pour les traitements de données et la prédiction de structure 3D. La cristallographie aux rayons X vient également compléter l'étude structurale des protéines et permet, entre autre, de comparer des états conformationnels différents pour certaines protéines (cas classique de la désoxyhémoglobine – oxyhémoglobine, ce qui présentait en outre l'avantage de proposer plusieurs modèles de transition structurale (Koshland, Monod-Wyman-Changeux) sous l'effet de la fixation d'un ligand). Notons que quelques trop rares candidats ont exploité les données « modernes » de mécanistique de l'organisation tridimensionnelle des protéines en abordant les différents modèles qui supportent le repliement tertiaire, comme le modèle de la charpente, de la diffusion-collision, de l'effondrement hydrophobe, en particulier pour l'insertion de certaines protéines dans les membranes biologiques. Aucun candidat ne s'est en revanche attaché à la cinétique du repliement des protéines et méthodes d'étude (cinétique rapide par stopped-flow, T-jump...), bien développées dans les ouvrages bibliographiques, ce qui permettait par exemple de développer le modèle de l'entonnoir. Ce modèle pouvait trouver son illustration au niveau de certaines pathologies comme le diabète de type II ou certaines maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson). La mécanistique « moderne » est aussi nourrie par les expériences de cinétique de repliement – dépliement utilisant des protéines intrinsèquement désordonnées et la théorie du continuum ordre-désordre. Cette sous-partie, trouvée dans aucune copie, permettait là encore de mettre en relation le rôle de la conformation tridimensionnelle de protéines impliquées dans les mécanismes biologiques importants avec les états désordonnés, globules fondus ou repliés. De nombreux candidats ont par contre, parfois assez finement, traité l'ajustement induit avec la formation d'un complexe protéine – ligand. Certains ont par contre mentionné le modèle clé-serrure, dont il est maintenant avéré qu'il est incompatible avec l'ajustement structural et donc très fortement remis en cause pour ne pas dire abandonné. Quelques applications parfois bien présentées ont été appréciées : la place de l'allostérie dans certaines régulations métaboliques, les liaisons antigène anticorps, la transduction d'un signal membranaire et, concernant les méthodes d'analyses, la chromatographie d'affinité, l'immunoélectrophorèse, les expériences de retard sur gel.... Malheureusement, cette partie a souvent donné lieu à des digressions inutiles telles la présentation détaillée (fonctions, graphiques) des différents modèles d'inhibition d'une enzyme michaelienne.

Une troisième partie se devait d'être consacrée au repliement des protéines *in vivo*. En effet, les modèles, souvent élaborés *in vitro* ne peuvent intégrer la multitude d'interactions que subissent les protéines *in vivo* comme le cytoplasme cellulaire visqueux hyperconcentré ou l'environnement membranaire. Cette approche permettait donc de discuter des conditions du repliement *in vivo* en lien avec les interactions moléculaires, l'existence de protéines chaperonnes et de choc thermique, la place du tri cellulaire avec par exemple l'import des protéines dans la mitochondrie, le contrôle-qualité des protéines dans le réticulum endoplasmique, les modifications post-traductionnelles des protéines permettant leur adressage et dégradation au niveau du protéasome. Une pathologie associée pouvait être présentée parmi les mucoviscidoses, les amyloïdoses ou les maladies à prion.

Le jury précise que le plan proposé ci-dessus n'a pas valeur de référence et que toute autre proposition de la part des candidats était appréciée avec intérêt et bienveillance. Ainsi, quelques candidats ont adopté des plans différents, mais malheureusement le plus souvent avec de nombreux oublis ou redondances voire des incohérences dans les notions abordées. A ce propos, le jury rappelle que le libellé de la question faisait référence à des exemples ayant valeur de modèle, il s'agissait donc de les choisir judicieusement et, qui plus est, présenter plusieurs exemples pour illustrer une même idée n'apportait pas grand-chose, bien au contraire. La règle : une idée, un exemple (bien justifiés et argumentés) se suffit à elle-même.

## 2<sup>ème</sup> question

La seconde question de l'épreuve nécessitait une mobilisation des connaissances des candidats essentiellement dans les domaines de la biochimie et de la biologie cellulaire. La construction du plan étant largement suggérée dans l'intitulé de la question, les candidats ont, dans leur plus grande majorité, tenu compte à bon escient de cette suggestion. L'épreuve consistait donc à présenter, dans un premier temps, les avantages apportés par la compartimentation cellulaire puis à exposer les contraintes générées par celle-ci et surtout, comme le suggérait de manière implicite le sujet, les « solutions » apportées par les cellules pour s'affranchir ou s'adapter à ces contraintes. Le jury était sensible au fait que, selon les exemples choisis et le point de vue adopté, un élément pouvait très bien être considéré comme une contrainte ou un avantage. Il a par conséquent, valorisé toutes les idées pertinentes du moment où celles-ci étaient correctement et rigoureusement justifiées.

Avant même d'entrer dans l'énumération raisonnée des contraintes et des avantages de la compartimentation, le jury aurait apprécié que les candidats exposent, dans une partie introductive conforme à un devoir d'agrégation, en quoi la composition biochimique des membranes des organites intracellulaires crée une compartimentation. Il était alors intéressant de mettre en évidence le fait que ces membranes reposent toutes sur une organisation structurale et biochimique commune générant donc des propriétés communes mais que chaque organite possède une membrane particulière lui conférant une spécificité. Des notions rigoureuses de biochimie en lien avec le sujet et une vision intégrée de la problématique étaient ainsi attendues. A ce propos, la majorité des candidats a effectué une présentation exhaustive des organites intracellulaires mais sans aucune contextualisation avec la question posée rendant leur énumération hors-sujet. D'autre part, beaucoup de candidats ont une vision simpliste et erronée de la composition des membranes en stipulant que celle de l'appareil de Golgi et des vésicules de sécrétion est identique à celle du réticulum endoplasmique du fait qu'elles peuvent dériver les unes des autres. Enfin, la schématisation des membranes a donné lieu à des interprétations, certes parfois très artistiques, mais souvent trop éloignées de la réalité et de la rigueur scientifique attendue dans un tel devoir. Le jury a d'ailleurs été fort interpellé que de très nombreux candidats utilisent une codification mouvante au sein de leurs schémas ne permettant plus de savoir si un trait représentait un feuillet membranaire ou une membrane, notions parfois fort mélangées chez certains.

Dans une partie abordant les notions d'« avantages », il pouvait être attendu des candidats qu'ils exposent *a minima* les idées suivantes :

- La membrane nucléaire assure la protection du matériel génétique.  
Cette simple énonciation ne pouvant suffire, il était attendu des candidats qu'ils exposent même succinctement en quoi la membrane nucléaire permet de protéger le matériel génétique, quels sont les agents susceptibles de l'altérer et quelles sont les modifications pouvant survenir sur celui-ci.
- La membrane nucléaire permet, par la régulation contrôlée des échanges qu'elle impose via les pores nucléaires, de réguler l'accessibilité du matériel génétique.  
Dans cet exemple, les candidats pouvaient aisément effectuer une comparaison entre les eucaryotes et les procaryotes et/ou se servir de connaissances de physiologie et de biologie cellulaire en présentant les mécanismes d'activation de récepteurs intracellulaires (ex : récepteurs d'hormones stéroïdes) transloquant dans le noyau après fixation de leur ligand.
- La membrane nucléaire permet de définir un compartiment semi clos dans lequel les cinétiques de maturation des ARNm sont possibles avant leur traduction dans le cytosol.  
Ainsi, les événements de transcription et de traduction sont réalisés dans deux compartiments distincts permettant, entre autre, la genèse de différents ARNm à partir d'un seul gène par le jeu de la maturation intron/exon. Si besoin était, cet exemple pouvait être mis en rapport avec la complexité et la combinatoire accrues des eucaryotes par rapport aux procaryotes.
- La compartimentation permet de concentrer substrats et réactifs et ainsi d'augmenter les vitesses de réaction.  
La démonstration de cette notion ne pouvait s'affranchir de l'écriture de l'équation bilan d'une réaction type que le jury regrette n'avoir jamais observé. Il rappelle à ce propos que, bien que l'intitulé avait une coloration « biologie cellulaire », celle-ci ne devait en aucun cas enfermer le candidat dans ce domaine d'expertise mais, bien au contraire, nécessitait une mobilisation de connaissances dans toutes les autres spécialités de notre discipline.
- La compartimentation représente un moyen de limiter, voire empêcher, que des réactions aient lieu et, de façon réciproque, contraint la réalisation de certaines réactions dans un compartiment donné. A ce titre, pouvaient être mentionnées les notions de dégradation de composés dans des

compartiments spécifiques et la production localisée de composés toxiques. A ce propos, une énumération de composés et une justification de leur toxicité aurait représenté un plus. A ce titre, le jury s'étonne de constater que la plupart des candidats mentionnent que l'acidité du pH intra lysosomal est un élément déterminant pour l'activité des enzymes et que, quelques lignes plus loin, ils évoquent le fait que la libération du contenu d'un lysosome dans le cytosol entraînerait une hydrolyse complète de la cellule. De tels manques de lucidité et de logique, essentiellement motivé par des « on dit » erronés, sont apparus fort regrettables.

- La compartimentation permet la création de gradients de concentration de part et d'autre des membranes.

L'illustration de l'importance de ces gradients pouvait être illustrée de multiples façons (gradient de  $H^+$  dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, gradient de  $Ca^{2+}$  au sein du réticulum dans la conduction du signal...). Alors que ces gradients sont essentiels au fonctionnement de la vie cellulaire, le jury regrette que cet aspect n'ait été que très marginalement, et souvent très incomplètement, abordé.

- La compartimentation permet un réajustement et un recyclage des organites intracellulaires. Cet élément pouvait être présenté comme un certain avantage évolutif des cellules eucaryotes qui vont pouvoir renouveler selon des cinétiques spécifiques leurs compartiments intracellulaires afin de prévenir ou, au contraire, palier à leur dysfonctionnement. Associé à cet item, certains candidats ont jugé bon de disserter longuement sur l'autophagie, sujet d'actualité et d'intérêt croissant dans le monde de la recherche. Si le propos pouvait paraître intéressant, lorsqu'il ne contenait pas des erreurs parfois grossières, le jury rappelle que les digressions hors-sujet, quelle que soit leur pertinence ne sont qu'une perte de temps. Cette démarche est pour souvent d'autant plus contreproductive que le jury a souvent constaté que la genèse d'une longue partie hors-sujet égare définitivement le candidat qui a oublié la question initialement posée.

A l'image de la première partie, la seconde partie pouvait aborder les notions de « contraintes » par le développement des notions suivantes :

- Certaines membranes ne peuvent demeurer stables dans le temps et nécessitent de profonds bouleversements. L'exemple de la disparition de la membrane nucléaire au moment de la division cellulaire permettait d'illustrer parfaitement ce point et faisait écho à un des items présentés dans la première partie.
- La compartimentation nécessite la mise en place de systèmes d'échanges entre les compartiments. Ces échanges peuvent prendre plusieurs formes :
  - échanges de matériels et composés par le jeu du mouvement de vésicules. Les candidats devaient alors aborder de façon succincte, mais néanmoins précise et rigoureuse, les principes de formation d'une vésicule (petites protéines G impliquées, formation d'un manteau...), les règles qui régissent leur déplacement (cytosquelette...) et leur adressage au bon compartiment (rôle des petites protéines G, Rab, et des protéines d'ancrage, R-SNARE, Q-SNARE...). A ce propos, les candidats se devaient de préciser les contraintes d'un tel adressage en termes de spécificité et d'évoquer les systèmes qui existent au sein de la cellule pour « corriger » d'éventuelles erreurs (ex : récepteur KDEL et son principe de fonctionnement) ;
  - adressage de protéines synthétisées dans le cytosol au sein d'un organite intracellulaire. A ce propos, l'entrée dans le compartiment nucléaire pouvait servir d'exemple (séquence NLS) ainsi que celle dans la mitochondrie et ses sous-compartiments ;
  - échanges de molécules de part et d'autre d'une membrane. Ce point faisait écho avec la nature biochimique des membranes et prenait tout son sens lorsque celle-ci avait été correctement et judicieusement présentée en lien avec la question posée. Les adaptations membranaires permettant le flux de molécules ne pouvant pas diffuser librement au travers d'une bicouche lipidique devaient être présentées de façon synthétique. Les notions de transporteurs et de canaux étaient bien évidemment attendues ;
  - les compartiments cellulaires ont besoin de « communiquer » entre eux. Pour cela, il est nécessaire que des informations puissent passer d'un compartiment A à un compartiment B distinct. Pour permettre cela, certaines molécules vont jouer le rôle de seconds messagers. Des notions de vitesse de diffusion et de coefficient de diffusion étaient attendues pour illustrer les particularités de ces seconds messagers ;
  - à l'échelle d'une membrane, il pouvait être aussi intéressant d'évoquer les échanges qui ont lieu d'un feuillet à un autre et qui interviennent dans de nombreux processus biologiques.
- La compartimentation, par tous les aspects qu'elle impose/favorise et qui ont été abordés, est donc un processus coûteux en énergie. Le jury regrette que cette notion qui tombait un peu sous le sens du moment que les candidats avaient parlé d'ATPase, de GTPase et/ou de transports actifs n'ait été que rarement évoquée et correctement explicitée.

Le jury indique que le plan proposé ici n'a pas valeur de référence et que toute autre proposition de la part des candidats était appréciée avec intérêt et bienveillance. Ainsi, quelques candidats ont tenté de proposer des plans plus originaux avec souvent, malheureusement, de nombreux oublis ou redondances dans les notions abordées. A ce propos, le jury rappelle que présenter plusieurs exemples pour illustrer une idée n'apporte pas grand-chose en termes de plus-value et que la règle une idée, un exemple (bien justifiés et argumentés) se suffit à elle-même.

Le jury regrette que, mis à part quelques rares copies, le sujet n'ait pas été abordé dans une dimension intégrée de biologie cellulaire. En effet, le sujet permettait d'aborder différents aspects de cette discipline et d'illustrer de nombreux points associés à des notions considérées comme devant être maîtrisées par un enseignant agrégé. De plus, il permettait au candidat de faire appel à d'autres champs disciplinaires et ainsi de faire montre de sa capacité à mobiliser des connaissances dans d'autres domaines laissés à son choix. De façon générale, le jury a été très déçu du niveau de connaissances très faible des candidats et de l'absence quasi générale de réflexion face à une question posée. D'autre part, il s'étonne des nombreuses approximations scientifiques et de l'abus d'un langage trop familier au détriment d'un vocabulaire précis et rigoureux. Ainsi, nombre de candidats évoquent des « protéines baignant dans une mer de lipides », vision certes littéraire mais peu rigoureuse biochimiquement parlant. De plus, certains candidats confondent des notions sans aucun rapport. Ainsi, le jury rappelle que les maladies lysosomales ne résultent pas d'une libération d'hydrolases lysosomales dans le cytosol mais d'une déficience, d'origine généralement génétique, de certaines d'entre elles.

# EPREUVES D'ADMISSION

## Première épreuve

### Rapport sur la première épreuve

#### Résultats de l'épreuve

18 candidats ont composé à cette épreuve :

- 1 ont obtenu une note supérieure ou égale à 16 ;
- 3 ont obtenu une note supérieure ou égale à 14 et strictement inférieure à 16 ;
- 3 ont obtenu une note supérieure ou égale à 12 et strictement inférieure à 14 ;
- 2 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12 ;
- 4 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10 ;
- 5 ont obtenu une note strictement inférieure à 8.

La moyenne générale de l'épreuve est de 10,06. La meilleure note est de 17,00/20.

Le jury tient très sincèrement à féliciter l'ensemble des candidats qui ont unanimement respecté l'esprit de l'épreuve, que ce soit dans le cadre de la démarche de projet ou dans celui de la présentation et de l'entretien avec le jury.

Le dossier pouvait légitimement comporter deux parties :

- une étude scientifique et technologique que le candidat aura pris soin de replacer dans son contexte, notamment en la positionnant en relation avec la problématique à l'origine du projet. Il s'agit d'une étude s'appuyant sur des données scientifiques ou technologiques actualisées et dont les prolongements économiques et sociétaux sont abordés ;

- une mise en application pour un niveau de classe donné, un référentiel, une progression choisie et justifiée. La problématique du transfert des activités technologiques et techniques décrites devait être abordée afin de prendre en compte les contraintes propres à un environnement enseignant (matériels disponibles, horaires, groupe classe, coût, sécurité,...). Elle pouvait décliner les modalités de mise en œuvre (opérationnalisation) en lien avec les objectifs de formations ambitionnés, les activités effectuées par les étudiants, les documents support de ces activités et les évaluations. Des aspects interdisciplinaires pouvaient également nourrir l'analyse des choix pédagogiques et opérationnels adoptés.

#### Remarques sur les dossiers

La qualité générale des dossiers tant dans leur présentation (figures, orthographe, syntaxe) que dans leurs contenus est particulièrement appréciée par le jury et seules quelques présentations restent significativement perfectibles. Dans l'ensemble, les dossiers comportaient une partie scientifique approfondie, ainsi qu'une transposition pédagogique souvent cohérente et circonstanciée en lien avec la première partie. Le jury rappelle qu'il convient de bien veiller à traiter la partie scientifique à l'appui de données récentes de la littérature qui doivent être associées à une bibliographie rigoureuse et présentée de manière formelle. Le candidat fait ainsi la démonstration qu'il est un spécialiste du domaine traité par la rigueur, le niveau et l'actualisation des informations présentées. De plus, les illustrations, venant en support du texte, doivent comporter des légendes soignées dans la mesure où ces supports visuels ont une portée didactique fondamentale. Les candidats doivent veiller à la qualité (lisibilité après impression) et à la pertinence de ces illustrations.

Le jury insiste d'autre part sur le fait que le caractère novateur de l'application pédagogique n'est absolument pas un prérequis indispensable. Toutefois, le jury est néanmoins particulièrement sensible aux propositions réalistes et rigoureuses permettant l'introduction théorique et/ou pratique de nouvelles approches technologiques auprès des élèves/étudiants. Il est important de clairement positionner ces nouvelles

approches par rapport à celles pré existantes et d'être objectif quant aux apports et faiblesses des unes par rapport aux autres.

Les dossiers particulièrement appréciés ont très souvent été construits à partir d'une problématique d'enseignement cherchant - trouvant une issue dans la prise de contact avec une entreprise et non l'inverse qui consisterait à effectuer un stage et une étude scientifique à partir desquels le candidat tente une mise en situation d'enseignement. En effet, cette dernière stratégie se trouve être souvent artificielle ou réduite à une séance de travaux dirigés en fin de deuxième année de STS biotechnologies et se révèle alors décevante voire contre-productive. La transposition pédagogique doit présenter une mise en application ordonnée et hiérarchisée mettant clairement en évidence le déroulement de la (les) séquence(s) pédagogique(s), les connaissances fondamentales et pratiques apportées ainsi que les notions de sécurité et de coût de réalisation. Certaines applications trop ambitieuses se révèlent artificielles voire impossible à mettre en œuvre. Aussi, le jury propose de réserver parfois la priorité à des approches pratiques moins ambitieuses mais davantage réalistes et abouties.

Certains dossiers étaient cependant trop longs. Le candidat doit faire preuve de concision, d'esprit de synthèse et faire des choix tant dans la structuration que dans les contenus présentés. Il convient notamment de limiter le nombre d'annexes au strict nécessaire.

### **Remarques sur la forme des présentations orales**

Le jury a, de nouveau, particulièrement apprécié les présentations structurées à l'aide de diaporamas de très bonne qualité, illustrés et didactiques dont certains étaient opportunément complétés d'animations vidéo ou de photographies saisies en entreprise ou en laboratoire. Il rappelle, d'une part, qu'il convient d'effectuer un choix pertinent parmi les notions présentées dans le dossier afin de ne pas surcharger dans le temps imparti l'exposé oral et, d'autre part, qu'une construction « allégée » en texte des diapositives possède bien souvent une valeur pédagogique ajoutée. A ce titre, le jury félicite la plupart des candidats pour les qualités didactiques de leurs présentations notamment celles réalisées sans support papier. En effet, ce dernier, bien que reconnu comme une « roue de secours » pour le candidat, génère bien trop souvent un propos peu fluide et décousu qui ne joue pas en faveur du candidat qui devient alors « lecteur ». En effet, l'exercice oral doit faire, entre autre, la démonstration de l'appropriation complète du sujet par le candidat.

Comme lors des sessions précédentes, le jury tient à souligner l'importance qui doit être accordée au support de la présentation. En effet, de mauvais choix de documents, des images de piètre qualité, des constructions peu didactiques, un mauvais contraste entre l'écrit et le fond peuvent parfois irrémédiablement assombrir une prestation pour autant honorable.

L'ancrage du projet sur un secteur professionnel (recherche, R&D, bio-analyse et contrôle...) et sa contextualisation concrète apportent sans conteste de la consistance et du sens au projet et à la présentation. A ce titre, le développement de la séquence pédagogique en lien avec le contexte « régional », lorsqu'il était possible, a été apprécié.

Le jury tient à souligner la qualité de la posture communicante de la plupart des candidats : voix audible mais posée ; volonté de transmettre un message avec conviction ; vitesse d'élocution confortable. En effet, le jury rappelle que l'agrégation est certes un concours exigeant qui requiert une polyvalence et une mise à jour des savoirs mais qu'il est également un concours de recrutement d'enseignants dont les compétences en communication sont évidemment essentielles, tout comme l'est l'attitude générale devant un auditoire. Le jury se plaît à féliciter la majorité des candidats qui se sont prêtés avec enthousiasme et dans un état d'esprit positif au jeu des questions-réponses voulu comme un exercice de réflexion et d'échange constructif.

A de très rares exceptions près, les candidats ont scrupuleusement respecté la durée d'exposé de 30 minutes. En tout état de cause, dans un souci d'équité et en cas d'un possible dépassement du temps imparti, il était aimablement indiqué aux candidats l'impératif de conclure dans les plus brefs délais.

## Remarques sur le fond

Le jury a particulièrement apprécié certains sujets ancrés sur une thématique intéressante, contextualisée et présentant des aspects technologiques novateurs en adéquation avec l'évolution actuelle des techniques. Il souligne de nouveau l'importance portée sur le fait que le candidat, porteur et acteur de son sujet, est censé l'avoir étudié en profondeur afin d'en dominer l'intégralité des aspects scientifiques et technologiques. Il est notamment attendu qu'il soit capable d'expliquer et de justifier les méthodologies présentées, d'expliquer les techniques et les principes scientifiques associés, de situer ces nouvelles méthodologies par rapport à celles qui existent, mais également d'assurer l'analyse approfondie des résultats présentés.

Le « projet original » est d'abord personnel et destiné à répondre à une problématique clairement identifiée. Ainsi, il ne convient pas de l'assimiler à l'exigence professionnelle commune à tous les enseignants : répondre aux attentes de l'institution en lien avec les responsabilités confiées. Il s'agit au contraire d'une démarche volontariste et originale qui se doit de dépasser l'exécution d'un programme pour lui donner du sens, de l'épaisseur et de la hauteur. On rappelle qu'il est important de ne pas construire le dossier à partir d'activités technologiques déjà mises en œuvre au risque de rendre l'étude-scientifique artificielle.

Certains dossiers prenant appui sur des activités liées à un stage de formation en laboratoire ou sur la préparation d'une thèse ont été d'un niveau scientifique très satisfaisant. Il convient cependant de ne pas oublier le fond de l'épreuve qui s'inscrit dans la mise en œuvre d'un projet pédagogique ; le support scientifique étant au service du projet et non l'inverse. Il est crucial de veiller à respecter un équilibre *ad hoc* entre le contexte scientifique et technologique présenté et leur contextualisation pédagogique pertinente. Ainsi, certaines études technologiques et techniques, impossibles à mettre en œuvre dans le contexte d'un établissement scolaire, ont donné lieu à des applications pédagogiques pour le moins peu opportunes.

Il est attendu d'un professeur agrégé qu'il soit capable de faire évoluer les pratiques au sein de son établissement. Cela implique la mise en œuvre de stratégies pédagogiques novatrices, pragmatiques et réalistes qui donnent sens aux apprentissages. Ces activités doivent être construites en appui sur une réalité non seulement professionnelle mais également économique pour l'établissement et transposables à un groupe d'élèves en lien avec les objectifs de formation et la réglementation en vigueur.

Bien que peu nombreuses, le jury regrette que certaines présentations se soient révélées par trop descriptives et incapables de s'affranchir d'un effet catalogue déclinant une succession de séances associées aux processus d'évaluation. En revanche, le jury a apprécié certaines présentations synthétiques et concises s'appuyant de façon pertinente sur un organigramme mettant en relief les objectifs, méthodologies, stratégies pédagogiques et démarches d'évaluation d'une séquence préalablement positionnée au sein d'une progression. Cette présentation synoptique laisse ensuite toute légitimité à une approche détaillée de l'opérationnalisation choisie. Le jury a également été sensible à la prise en compte des contributions des autres disciplines, dans une approche pédagogique moderne et interdisciplinaire.

Au cours de l'entretien, le jury a particulièrement apprécié le comportement remarquable des candidats, faisant preuve de motivation mais aussi d'une probité intellectuelle très appréciée.

Les réponses données aux questions posées ont permis, dans la très grande majorité des cas, d'éclairer le jury sur certains points du projet, notamment sur son déterminisme et les solutions techniques adoptées, mais aussi d'explicitier, de préciser certaines données scientifiques abordées ou décrites dans le dossier. Elles ont également favorisé l'appropriation des démarches pédagogiques choisies ou conçues. En effet, par ce questionnement large, le jury souhaite également apprécier la maîtrise didactique de la discipline ou la position du candidat sur des éléments non mentionnés dans le dossier mais directement associés à la problématique.

Bien évidemment, au cours de cette épreuve, les qualités d'expression et de communication, le sens de l'écoute positive, l'adéquation des réponses aux questions sont aussi des paramètres pris en compte dans la notation.

**AGRÉGATION DE BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE**

**Concours interne**

**Session 2017**

**ÉPREUVES D'ADMISSION**

**DEUXIÈME ÉPREUVE**

Durée : 8 heures

Coefficient : 1

-----

*Cette épreuve consiste à exploiter des documents techniques et pédagogiques relatifs à une séquence de « travaux pratiques » ou à une séquence à caractère expérimental, élément d'un processus d'apprentissage.*

*Elle permet d'évaluer les capacités du candidat à :*

- proposer et justifier les principes, méthodes et modes opératoires à mettre en œuvre et à dégager les concepts auxquels ils se rattachent*
- réaliser, pour tout ou partie, selon la durée impartie, l'activité prévue.*

*Le programme du concours est défini par référence aux programmes des BTS et DUT de la spécialité.*

-----

Le sujet comporte deux parties indépendantes :

- 1. Caractérisation de deux souches bactériennes vis-à-vis de l'expression du gène *lacZ*...p.2**
- 2. Validation d'une souche de levure génétiquement modifiée.....p.3**

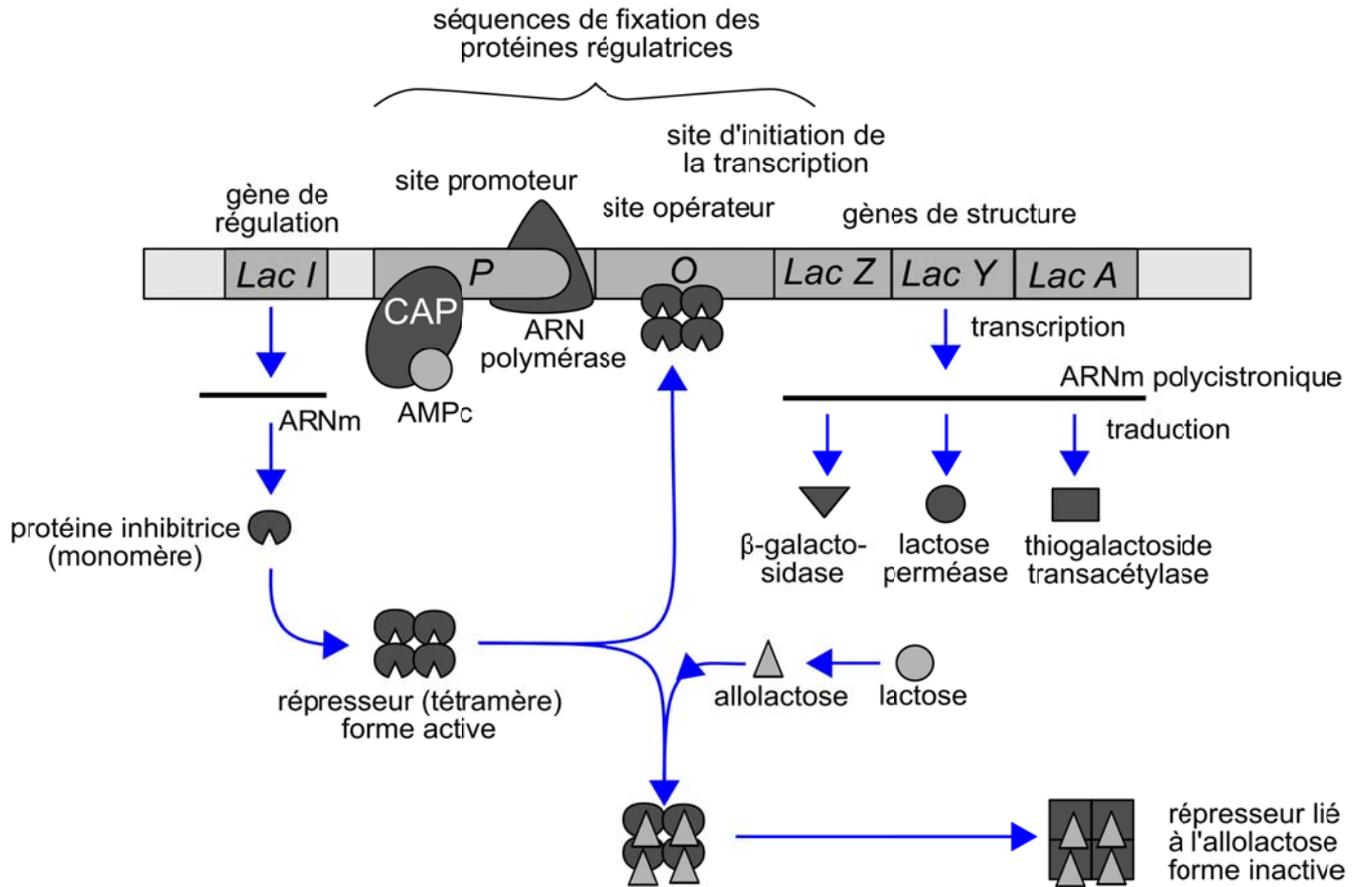
***Une attention particulière sera accordée à la traçabilité et à la présentation de tous les résultats expérimentaux.***

***Les compositions des milieux de culture utilisés sont regroupées dans le document 10.***

## 1. Caractérisation de deux souches bactériennes vis-à-vis de l'expression du gène *lacZ*

On cherche à caractériser deux souches bactériennes d'*Escherichia coli*, nommées Ec1 et Ec2, vis-à-vis :

- de l'induction de l'expression du gène *lacZ* par le lactose ;
- de la répression catabolique de l'expression du gène *lacZ* par le glucose.



Représentation schématique de la régulation de l'opéron lactose

Pour répondre à la problématique posée, des tests devront être réalisés en microplaque pour chacune des deux souches à partir des réactifs proposés dans le **document 1**. Ce document présente les informations utiles à la réalisation de tests qualitatifs.

- 1.1 Indiquer les rôles de l'IPTG et du BCTMA.
- 1.2 Préciser la composition de chaque cupule réalisée.
- 1.3 Expliquer le rôle des témoins réalisés.
- 1.4 Présenter les résultats obtenus après révélation.
  - ☞ **Montrer la microplaque obtenue à un examinateur.**
- 1.5 Déterminer les caractéristiques des deux souches Ec1 et Ec2 concernant :
  - l'induction par le lactose ;
  - la répression catabolique par le glucose.
- 1.6 Schématiser le mécanisme de régulation de l'opéron lactose pour chacune des deux souches.

## 2. Validation d'une souche de levure génétiquement modifiée

*Saccharomyces cerevisiae* PA13 est une souche de levure sélectionnée pour ses performances dans la fermentation alcoolique. Les caractéristiques de cette souche sont décrites dans le **document 2**.

Certaines souches de levures « indigènes », présentes dans les matières premières utilisées par l'usine de transformation, produisent des protéines, appelées toxines killer, qui exercent un effet toxique sur les levures sélectionnées.

*S. cerevisiae* PA13 s'est révélée sensible à la toxine killer K produite par la souche *S. cerevisiae* K. Cela a encouragé des travaux pour obtenir une souche résistante à la toxine killer K mais conservant les performances de *S. cerevisiae* PA13.

Avant son éventuelle utilisation dans le cadre de la production industrielle d'éthanol, la nouvelle souche obtenue, *S. cerevisiae* PA14, est soumise à plusieurs tests :

- un test de sensibilité permettant de vérifier sa résistance à la toxine killer K ;
- la détermination de ses paramètres de croissance et de production.

## 2.1. Test de sensibilité de la souche génétiquement modifiée

La toxine killer K, contenue dans le filtrat d'une culture de la souche *S. cerevisiae* K productrice de cette toxine, a été purifiée par deux méthodes :

- chromatographie d'affinité (P1) ;
- précipitation différentielle suivie d'un dessalage par gel-filtration (P2).

La sensibilité des souches *S. cerevisiae* PA13 et PA14 a été testée vis-à-vis de la toxine killer K, avant et après purification, selon le protocole opératoire du **document 3**.

2.1.1. Analyser les résultats obtenus sur les boîtes de culture fournies et conclure.

Le contrôle qualité des extraits protéiques purifiés selon les deux méthodes précédentes est réalisé par SDS-PAGE suivant le mode opératoire stipulé dans le **document 4**.

2.1.2. Préparer les échantillons et réaliser les dépôts sur le gel.

2.1.3. Analyser le gel obtenu et apporter un éclairage sur les résultats du test de sensibilité (question 2.1.1).

2.1.4. Présenter une exploitation du gel, pouvant être proposée en STS biotechnologies, qui permette de déterminer le poids moléculaire apparent de la toxine killer K.

## 2.2. Réalisation et suivi de la croissance de la souche modifiée

On cherche à s'assurer que les caractéristiques de production n'ont pas été altérées lors de la modification génétique de la souche. Dans cette optique, un suivi de croissance par opacimétrie est réalisé sur une culture de la souche PA14.

Les dosages du glucose et de l'éthanol dans les surnageants des prélèvements effectués peuvent être réalisés ultérieurement.

Le protocole opératoire du suivi de croissance est présenté dans le **document 5**.

2.2.1. Présenter les calculs nécessaires au démarrage de la culture.

☞ **Faire valider le volume d'inoculation par un examinateur.**

2.2.2. Réaliser une mesure d'opacimétrie devant un examinateur.

2.2.3. Présenter le suivi de croissance par opacimétrie (ordinateur à disposition) et son exploitation.

La relation entre  $D_{600\text{ nm}}$  et la concentration en nombre de levures par mL est présentée dans le **document 2**. Cette relation a été établie avec la souche non génétiquement modifiée (PA13).

On se propose d'ajuster cette relation pour la souche modifiée PA14, à l'aide de la technique de numération cellulaire présentée dans le **document 6**.

2.2.4. À partir de la crème de levure fournie, proposer un mode opératoire détaillé permettant de déterminer deux points expérimentaux nécessaires à l'établissement de la nouvelle droite.

2.2.5. Réaliser les expériences.

☞ **Montrer un champ microscopique à un examinateur sur un des deux dénombrements.**

2.2.6. Présenter les résultats et les commenter.

Une unité de  $D_{600\text{ nm}}$  correspond à une concentration en biomasse de levure sèche de  $0,42\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour la souche PA13. On se propose d'établir la correspondance entre l'atténuation et la concentration en biomasse sèche pour la souche PA14 en mettant en œuvre une filtration suivie d'une déshydratation de l'échantillon selon les indications du **document 7**.

2.2.7. Réaliser la détermination de la concentration en biomasse sèche de la souche PA14.

2.2.8. Présenter, exploiter les résultats et conclure.

### 2.3. Détermination des paramètres de croissance et de production de la souche modifiée

La détermination de la productivité de la souche de levure PA14 nécessite le dosage du glucose et de l'éthanol contenus dans les surnageants de culture collectés.

2.3.1. Doser le glucose dans chaque surnageant selon les indications du **document 8**.

2.3.2. Rappeler l'équation bilan de la fermentation alcoolique.

2.3.3. Calculer la concentration maximale théorique d'éthanol produit dans les conditions de culture.

2.3.4. Doser l'éthanol dans chaque surnageant selon le protocole du **document 9**.

2.3.5. Présenter sur le même graphique :

- la concentration en biomasse en fonction du temps ;
- la concentration massique du glucose en fonction du temps ;
- la concentration massique de l'éthanol en fonction du temps.

2.3.6. Calculer :

- $Q_x$ , taux de croissance en phase exponentielle,
- $G$ , temps de génération en phase exponentielle,
- $R_{X/S}$ , rendement pondéral de conversion glucose – biomasse,
- $R_{P/S}$ , rendement pondéral de conversion glucose – éthanol,
- $PVHG_x$ , productivité volumique horaire globale en biomasse,
- $PVHG_p$ , productivité volumique horaire globale en éthanol.

## Document 1

### Caractérisation de deux souches bactériennes vis-à-vis de l'expression du gène *lac Z*

#### Souches, réactifs, matériel

- ✓ Précultures des souches Ec1 et Ec2 en milieu LB (**document 10**) : 2 mL en tube
- ✓ Flacon de 5 mL d'eau peptonée stérile (**document 10**)
- ✓ Flacon de 5 mL d'eau déminéralisée stérile
- ✓ Microtube de 0,5 mL de glucose stérile à 25 %
- ✓ Microtube de 0,2 mL d'IPTG stérile à  $12,5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
- ✓ Microtube de 0,7 mL de BCTMA à  $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
- ✓ Microtube de 1 mL d'ONPG à  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
- ✓ Microplaque stérile à fond rond avec couvercle
- ✓ Étuve à  $37\text{ }^\circ\text{C}$

#### Conditions opératoires

Volume réactionnel dans chaque cupule de la microplaque : 200  $\mu\text{L}$

Concentrations des réactifs éventuellement utilisés :

- IPTG à  $0,5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
- glucose à 1 %
- inoculum au 1/4

- eau peptonée au 3/5

Incubation : 1 h 30 à 37 °C

Révélation :

- ajout de 25 µL de BCTMA et 40 µL ONPG par cupule,
- incubation : 10 min à température ambiante.

Lecture : estimation à l'œil nu de l'intensité de coloration dans chaque cupule.

### **Données**

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

BCTMA : bromure de cétyle-triméthyle-ammonium ; détergent ionique non dénaturant

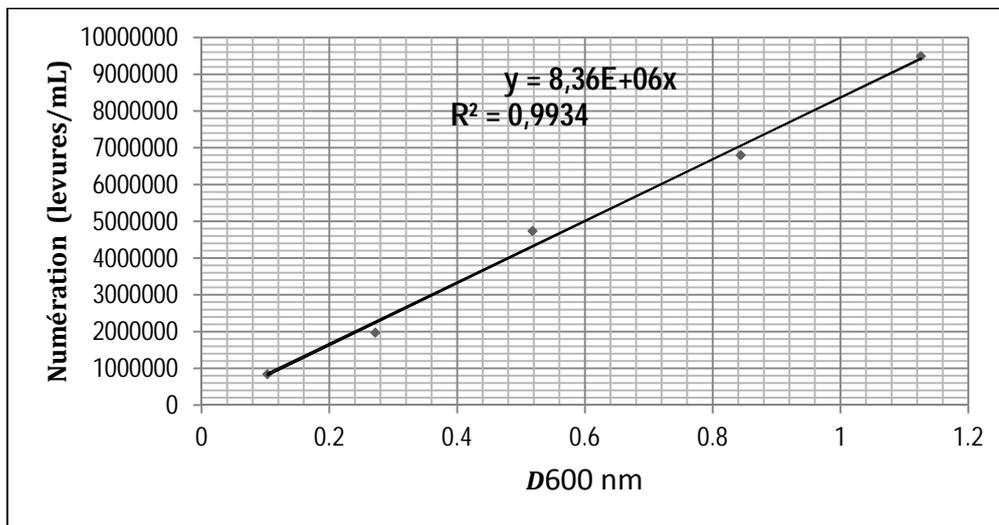
ONPG : ortho-nitrophényl- β-galactoside

## Document 2

### Caractéristiques de la souche *S. cerevisiae* PA13

Espèce	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex Hansen 1883
Souche	PA13
Température de culture	25+, 30+, 35+, 37+, 40-
Source de carbone	cellobiose - ; D-galactose + ; D-glucose + ; maltose + ; melezitose + ; melibiose - ; raffinose + ; saccharose + ; trehalose - ; lactose -
Coefficient de conversion entre la $D_{600\text{ nm}}$ et la concentration en nombre de levures	$8,36 \cdot 10^6$ levures $\cdot$ mL <sup>-1</sup> par unité de $D_{600\text{ nm}}$
Coefficient de conversion entre la $D_{600\text{ nm}}$ et la concentration en biomasse sèche	$0,42$ g $\cdot$ L <sup>-1</sup> par unité de $D_{600\text{ nm}}$
Taux de croissance en phase exponentielle	$Q_x = 0,486$ h <sup>-1</sup>
Temps de génération en phase exponentielle	$G = 1,43$ h
Rendement pondéral de conversion glucose – biomasse	$R_{x/s} = 0,141$ g de biomasse sèche par g de glucose
Rendement pondéral de conversion glucose – éthanol	$R_{p/s} = 0,482$ g d'éthanol par g de glucose
Productivité volumique horaire globale en biomasse	$PVHG_x = 0,914$ g $\cdot$ L <sup>-1</sup> $\cdot$ h <sup>-1</sup>
Productivité volumique horaire globale en éthanol	$PVHG_p = 5,76$ g $\cdot$ L <sup>-1</sup> $\cdot$ h <sup>-1</sup>

Relation entre la  $D_{600\text{ nm}}$  et la concentration cellulaire de la suspension :



L'atténuation  $D_{600\text{ nm}}$  est la grandeur physique qui exprime l'opacité d'une suspension trouble. Certains auteurs emploient le symbole  $DO$  (pour densité optique) ou  $A$  (pour absorbance).

## Document 3

### Recherche de la sensibilité d'une souche de levure à une toxine killer

#### Résumé du mode opératoire

La souche à tester estensemencée dans la masse d'une gélose Sabouraud (**document 10**) à environ 60 000 UFC par boîte.

Après prise en masse de la gélose, des disques imprégnés de 10 µL d'échantillons à tester sont déposés à la surface de la gélose.

Les boîtes sont incubées 48 h à 25 °C.

### **Echantillons testés**

La toxine killer K est purifiée à partir du milieu de culture de la souche productrice *S. cerevisiae* K.

- milieu de culture avant purification (P0)
- toxine killer K purifiée par chromatographie d'affinité (P1)
- toxine killer K purifiée par précipitation différentielle suivi d'un dessalage (P2)
- témoin négatif (T)

## Document 4

### Électrophorèse des protéines SDS-PAGE

#### Réactifs et matériel

- ✓ Toxines killer K purifiées P1 et P2
- ✓ Gel de polyacrylamide « gradient 4-20 % » prêt à l'emploi
- ✓ Tampon de charge (Tris HCl pH 6,8 – SDS 2 % –  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 % – glycérol 20 % – bleu de bromophénol 0,1 %)
- ✓ Marqueur de masses moléculaires (fiche technique fournie par le centre)
- ✓ Tampon de migration (Tris HCl pH 8,3 – glycine)
- ✓ Cuve de migration + générateur

#### Mode opératoire

##### 1- Préparation des échantillons à déposer

Les solutions protéiques à analyser doivent être diluées convenablement dans le **tampon de charge**.

- Pour chaque extrait, introduire dans un microtube :
  - 20  $\mu$ L de tampon de charge
  - 10  $\mu$ L d'extrait protéique.
- Laisser reposer 10 minutes, puis incuber 5 minutes dans un bain d'eau frémissante. Le tube doit être fermé afin d'éviter l'évaporation du petit volume de solution.

##### 2- Montage du gel dans la cuve (déjà réalisé)

Déposer le gel de polyacrylamide sur son support et reconstituer le petit compartiment.

Effectuer le montage complet du petit compartiment puis rincer abondamment les puits du gel avec le tampon de migration.

Une fois l'étanchéité vérifiée, remplir de tampon le petit compartiment jusqu'à recouvrir les puits.

Mettre du tampon de migration dans le grand compartiment (environ 1/3 du compartiment).

##### 3- Dépôts

Déposer environ 5  $\mu$ L d'échantillon ou 2,5  $\mu$ L de marqueur par puits selon le schéma présenté ci-dessous :

##### 4- Migration (réalisée par les examinateurs)

Brancher le générateur, le régler à 200 V, vérifier la présence d'un courant électrique. Laisser migrer jusqu'à ce que le front de migration soit à 1 cm du bas du gel.

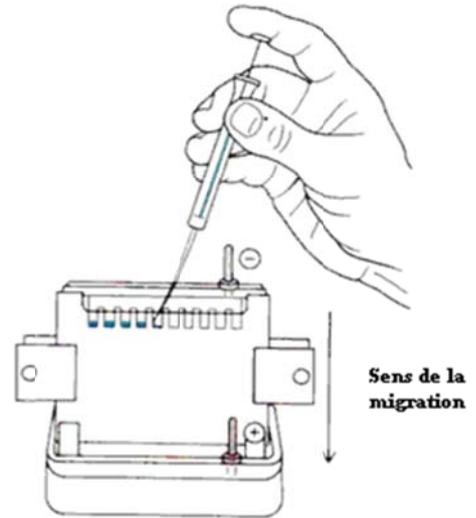
##### 5- Révélation (réalisée par les examinateurs)

Le gel est coloré à l'aide du réactif RAPID BLUE™

Une photographie du gel sera fournie.

SDS-PAGE : Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

SDS : Dodécylsulfate de sodium



## Document 5

### Suivi de croissance d'une levure

#### Matériel disponible

- ✓ Une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL contenant 150 mL de milieu YPG modifié (**document 10**) stérile préchauffé à 30 °C.
- ✓ Une fraction aliquote de la crème de levure de *S. cerevisiae* PA14 ; la valeur exacte d'atténuation  $D_{600\text{ nm}}$  sera précisée en début d'épreuve :  $D_{600\text{ nm}} = \dots\dots\dots$
- ✓ Un bain agité à 120 rpm et thermostaté à 30 °C.

#### Mode opératoire

***À réaliser au maximum 1 h après le début de l'épreuve.***

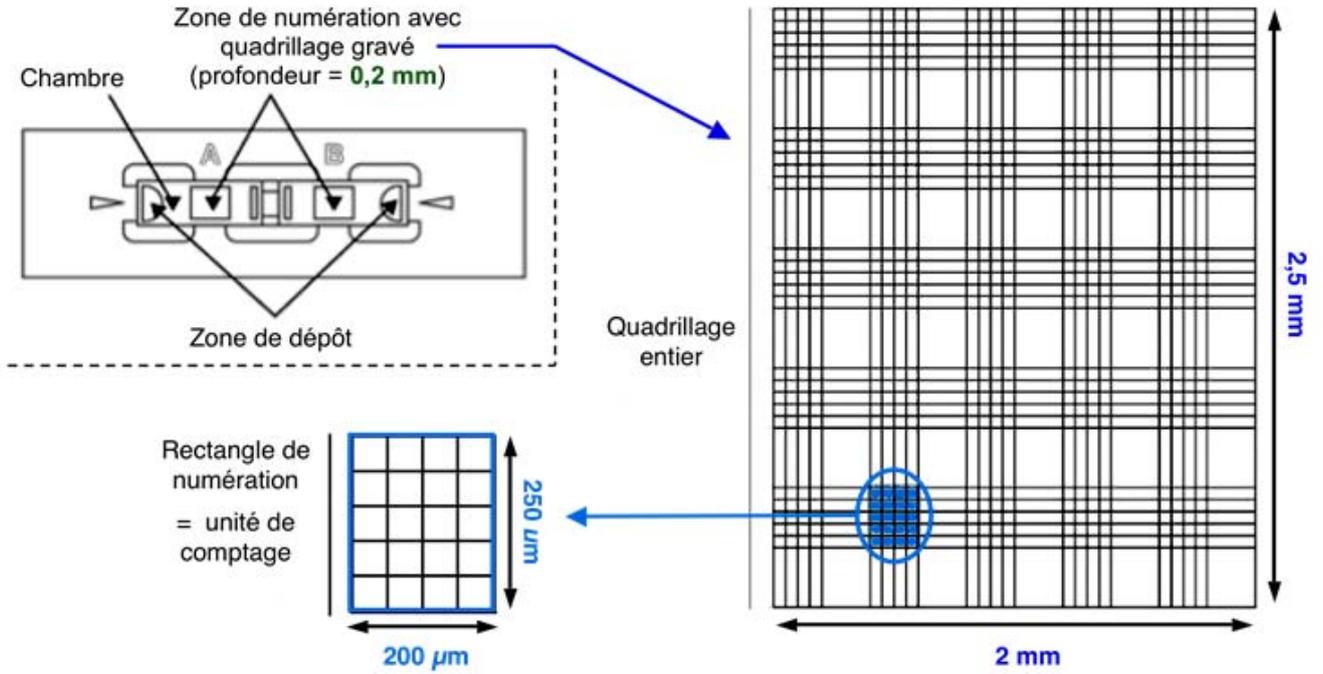
- ensemencer le milieu de culture YPG modifié en fiole d'Erlenmeyer avec la crème de levure de façon à obtenir une atténuation initiale d'environ  $D_{600\text{ nm}} \approx 6$ .
- Effectuer un prélèvement d'1 mL en microtube à l'aide d'une pipette graduée stérile de 1 mL qui sera conservée dans la fiole tout au long de la croissance.
- Mettre la fiole sous agitation à 30 °C.
- Réaliser un prélèvement d'1 mL en microtube, toutes les 30 min environ, pendant 4 h.
- Sur chaque prélèvement :
  - réaliser une mesure par opacimétrie ;
  - centrifuger le reste du prélèvement pendant une minute à 13 000 rpm ;
  - transférer le surnageant dans un microtube et le conserver dans la glace en vue des dosages du glucose et de l'éthanol.

#### Données

La limite de linéarité du spectrophotomètre est de 0,6 à 600 nm.

Numération d'une suspension de levures

La numération est réalisée en utilisant un microscope et un hématomètre jetable dont les caractéristiques sont présentées ci-après.



## Document 7

### Détermination de la concentration en biomasse sèche d'une suspension de levures

#### Matériel

- ✓ coupelle métallique contenant un filtre en fibres de verre GF/C vierge
- ✓ pipettes graduées et dispositif d'aspiration
- ✓ appareil de filtration (dont le montage est décrit dans le schéma de la page 12)
- ✓ pince métallique
- ✓ appareil de séchage infrarouge
- ✓ balance de précision

#### Remarques préliminaires

- les pesées sont effectuées dans la salle des balances ;
- la filtration et le séchage sont effectués dans une salle dédiée ;
- pour éviter un colmatage du filtre, il est demandé de filtrer un **volume de suspension contenant au maximum 50 mg de biomasse sèche** ;
- les conditions d'asepsie ne sont pas requises ;
- **se prémunir du risque de brûlures lors de l'utilisation de l'appareil de séchage.**

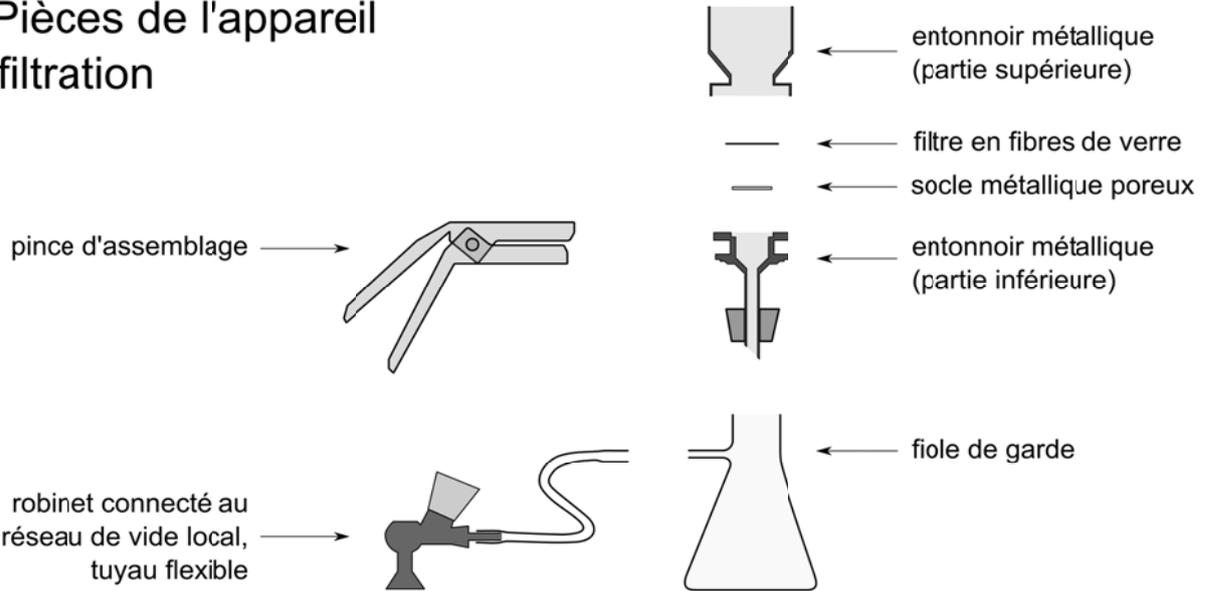
#### Mode opératoire

1. Peser la coupelle contenant le filtre vierge.
2. Assembler l'appareil de filtration en plaçant le filtre selon les indications du schéma en page 12.
3. Déposer sur le filtre exactement 10 mL de la suspension de levures à filtrer.
4. Ouvrir légèrement le robinet pour faire le vide.
5. Laver le filtre en versant environ 50 mL d'eau déminéralisée.
6. Ouvrir grand le robinet pendant 30 s puis le fermer.
7. Débrancher le tuyau qui relie la fiole de garde au robinet afin de casser le vide.
8. Démontez l'appareil de filtration (poser la partie supérieure de l'entonnoir métallique dans le fond d'une boîte de Petri) et transférer avec précaution le filtre dans la coupelle métallique.
9. Placer la coupelle contenant le filtre dans l'appareil de séchage.
10. Enclencher le séchage selon les instructions de l'examineur.
11. Pendant le séchage, nettoyer l'appareil à filtration à l'eau courante et remettre le poste de filtration en ordre (*le chauffage infrarouge s'éteint automatiquement lorsque la masse ne varie plus, généralement après une durée n'excédant pas 5 min*).
12. Retirer la coupelle de l'appareil de séchage (***l'unité de chauffage et la coupelle peuvent être très chaudes***).
13. Peser la coupelle contenant le filtre après quelques minutes de refroidissement.

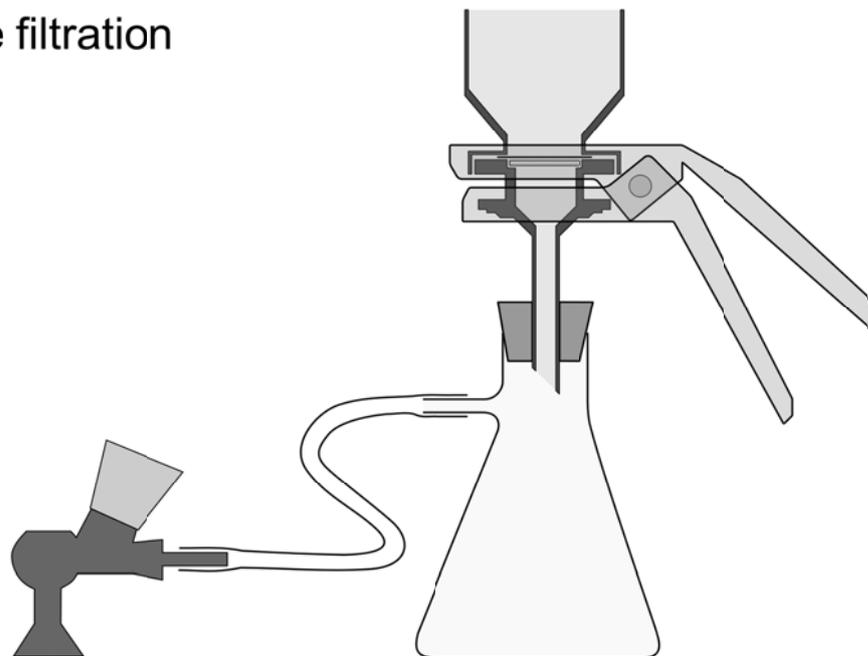
Détermination de la concentration en biomasse sèche d'une suspension de levures

Schémas de l'appareil de filtration

A. Pièces de l'appareil de filtration



B. Appareil de filtration assemblé

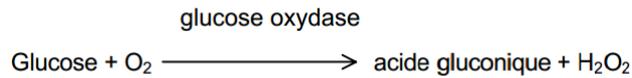


## Document 8

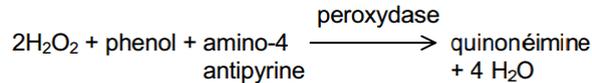
### Dosage enzymatique du glucose : coffret de dosage adapté en microplaque

#### PRINCIPE

Le glucose est dosé en utilisant la séquence glucose oxydase – peroxydase – chromogène.



Le peroxyde d'hydrogène formé est dosé selon la réaction de TRINDER.



L'intensité de la coloration (quinonéimine), mesurée à 492 nm, est proportionnelle à la quantité de glucose présente dans l'échantillon.

#### PRÉSENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET

Tampon phosphate pH 6,6	225 mmol·L <sup>-1</sup>	EDTA	5 mmol·L <sup>-1</sup>
Amino-4-antipyrine	0,3 mmol·L <sup>-1</sup>	Peroxydase	≥ 300 U·L <sup>-1</sup>
Phénol	8,5 mmol·L <sup>-1</sup>	Glucose oxydase	≥ 10 000 U·L <sup>-1</sup>

**Solution étalon de glucose** : 0,5 g·L<sup>-1</sup>

#### CONDITIONS DE STOCKAGE

- Conserver le coffret à 2-8 °C.
- Le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette étui, s'il est conservé dans les conditions préconisées.
- **Ne pas congeler le réactif.**
- **Réactif sensible à la congélation, éviter le contact avec les parois réfrigérantes.**

#### MODE OPÉRATOIRE MANUEL

##### Préparation du réactif

Réactif prêt à l'emploi.

Stabilité après ouverture, dans le flacon d'origine :

- 2 mois à 2-8 °C.
- 21 jours à 20-25 °C.

 **Les réactifs fournis permettent de réaliser 15**

##### Réalisation du test

Longueur d'onde : 492 nm

Zéro de l'appareil : blanc réactif

Réaliser les réactions dans les puits d'une microplaque à fond plat

	Blanc réactif	Etalon	Echantillon
Etalon	-	10 µL	-
Echantillon	-	-	10 µL
Réactif Glucose RTU™	250 µL	250 µL	250 µL
Mélanger. Mesurer les absorbances, à l'aide d'un lecteur de microplaque, après une incubation de 20 minutes à température ambiante.			

**Stabilité de la coloration** : 1 heure à température ambiante.

**Stabilité de l'étalonnage** : effectuer un étalonnage à chaque série de dosages.

**Limite de détection analytique** : elle a été déterminée à partir de dosages effectués sur de l'eau déminéralisée (moyenne + 5 x écart type). La limite de détection est inférieure ou égale à 0,013 g·L<sup>-1</sup>.

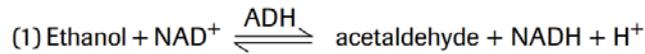
**Limite de linéarité** : 1,00 g·L<sup>-1</sup>

## Document 9

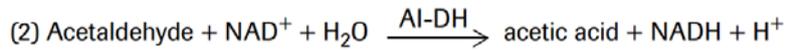
### Dosage enzymatique de l'éthanol : coffret de dosage (méthode UV)

#### PRINCIPE

L'éthanol est oxydé en acétaldéhyde par le  $\text{NAD}^+$ , en présence d'alcool déshydrogénase (ADH) :



Étant donné que l'équilibre précédent est en faveur de la formation d'éthanol, une réaction secondaire est utilisée afin de rendre la réaction (1) quantitative. Au cours de la réaction (2), l'acétaldéhyde est oxydé en acide acétique par le  $\text{NAD}^+$ , en présence de l'aldéhyde déshydrogénase (Al-DH).



La quantité de  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  formé est déterminée à partir de son absorbance à 340 nm.

#### PRÉSENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET

<b>Mélange 1</b>	Contient du tampon pH 9,0, du $\text{NAD}^+$ et de l'Al-DH
<b>Réactif 2</b>	Solution d'ADH

**CONDITIONS DE STOCKAGE** : Conserver les différents réactifs du coffret à 2-8 °C.

#### MODE OPÉRATOIRE MANUEL

**Préparation du réactif** : réactif prêt à l'emploi.

☞ **Les réactifs fournis permettent de réaliser 15**

#### Réalisation du test

Longueur d'onde : 340 nm

Zéro de l'appareil : air

Réaliser les réactions en cuves UV :

	Blanc	Echantillon
Mélange 1	1,220 mL	1,220 mL
Eau déminéralisée	0,050 mL	-
Echantillon	-	0,050 mL
Mélanger ; après environ 2 min, lire l'absorbance des solutions ( $A_1$ ).		
Déclencher les réactions par ajout de :		
Réactif 2	0,010 mL	0,010 mL
Mélanger ; après les réactions terminées (5 min), lire l'absorbance des solutions ( $A_2$ ).		

Il est nécessaire de boucher les cuves afin d'éviter toute évaporation d'éthanol.

Déterminer les différences d'absorbance ( $A_2 - A_1$ ) dans chaque cuve puis calculer  $\Delta A_{\text{éthanol}}$  :

$$\Delta A_{\text{éthanol}} = (A_2 - A_1)_{\text{éthanol}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$$

La concentration massique en éthanol dans l'échantillon est obtenue par la formule suivante :

$$\rho_{\text{éthanol}} = \frac{V_{\text{total}} \times M_{\text{éthanol}} \times \Delta A_{\text{éthanol}}}{\varepsilon_{\text{NADH}} \times l \times V_{\text{échantillon}} \times 2} \times F_d \quad \begin{array}{l} \varepsilon_{\text{NADH}} \text{ à } 340 \text{ nm} = 6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \\ l : \text{trajet optique} = 1 \text{ cm} \end{array}$$

**Stabilité de la coloration** : réaliser les mesures immédiatement après l'incubation.

**Limite de détection analytique** : 0,5 mg.L<sup>-1</sup> d'éthanol dans l'échantillon.

**Domaine de linéarité** : de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> à 0,12 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol dans l'échantillon

**Tableau de dilutions :**

Quantité estimée d'éthanol par litre		Facteur de dilution
Mesures réalisées à :		
334 ou 340 nm	365 nm	
< 0,06 g	< 0,12 g	1
0,06 – 0,6 g	0,12 – 1,2 g	10
0,6 – 6,0 g	1,2 – 12 g	100
6,0 – 60 g	12 – 120 g	1000
> 60 g	> 120 g	10000

**Document 10****Composition des milieux de culture****Eau peptonée**

Peptone trypsique	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau déminéralisée	qsp 1 L
pH	7,2

**Milieu LB (Luria Bertani)**

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium	10 g
Eau déminéralisée	qsp 1 L
pH	7,0

**Milieu SAB (Sabouraud Agar)**

Peptone	10 g
Glucose	40 g
Agar	15 g
Eau déminéralisée	qsp 1 L
pH	5,7 - 6

**Milieu YPG modifié**

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Glucose	40 g
Chloramphénicol	0,5 g
Eau déminéralisée	qsp 1 L
pH	6,2

## Rapport du jury sur la deuxième épreuve

### Résultats de l'épreuve

18 candidats relevant de l'agrégation ont composé:

- 5 candidats ont obtenu une note supérieure ou égale à 12,
- 4 candidats ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12,
- 3 candidats ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,
- 5 candidats ont obtenu une note supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 8,
- 1 candidat a obtenu une note inférieure à 6.

La moyenne générale de l'épreuve est de 9,60 / 20.

La moyenne des candidats admis est de 10,84 / 20.

La meilleure note est de 13,45 / 20.

### Observations générales

Le jury tient à féliciter les candidats pour leur attitude et leur capacité à rester concentrés tout au long de l'épreuve.

Une lecture rapide du sujet permettait d'organiser dans le temps l'ensemble des manipulations à effectuer et d'exploiter au maximum les temps d'attente. Il était, par exemple, essentiel de démarrer rapidement l'étude de l'action de la croissance de la souche de levure.

Le sujet comportait plusieurs manipulations indépendantes explorant différentes facettes des activités technologiques au programme des enseignements de biotechnologie. L'ensemble des manipulations nécessitait de la rigueur, tant au niveau de leur préparation que pour leur mise en œuvre et l'exploitation des résultats (traçabilité...).

Le jury regrette une lecture généralement insuffisante des informations pertinentes fournies par le sujet, notamment celles permettant les calculs préalables (pour les dilutions ou la filtration par exemples) et les quantités de réactifs disponibles, mais également celles correspondant à l'appel d'un examinateur afin de présenter le résultat de certains calculs ou un geste technique. Un mauvais calcul préalable déterminant le volume d'inoculum destiné au suivi de croissance pouvait avoir des conséquences importantes pour la suite des manipulations. Ainsi, le jury souhaitait qu'il lui soit soumis afin de le valider ou d'impulser une révision du raisonnement préalable au calcul.

Un ordinateur portable a été mis à disposition à chaque poste de travail. Le jury regrette cependant que seule une petite moitié des candidats l'a utilisé pour l'exploitation des résultats.

Cette année encore, le jury a intégré une heure de pause qui s'ajoute aux huit heures d'épreuves.

Les candidats disposent à leur gré de cette heure qu'ils peuvent prendre en une ou plusieurs fois. Si quelques candidats ont correctement géré ce temps, quelques-uns n'ont pas respecté cette pause et se sont trouvés dans une forme d'épuisement intellectuel dans les dernières heures de l'épreuve. Le jury rappelle aux futurs candidats l'importance d'une fine organisation du travail qui inclue des périodes de pause afin de rester concentré sur toute la durée de l'épreuve.

### **Partie I : Caractérisation de deux souches bactériennes vis-à-vis de l'expression du gène *lacZ***

La première partie a été traitée dans son intégralité par la grande majorité des candidats.

Le jury a regretté, pour un tiers des candidats, un descriptif peu explicite du plan de la microplaque. Le respect de démarches rigoureuses en termes de traçabilité et dans la perspective des exploitations des résultats est une qualité attendue par le jury du concours.

Concernant les mécanismes biomoléculaires support de l'étude, les candidats ont intégré sans problème de rôle de l'IPTG. Par contre, le rôle du BTCMA, dont la fonction destructrice des membranes était précisée en bas du document 1, n'a pas toujours été compris. De même, les caractéristiques respectives des souches EC1 et EC2 n'ont pas toujours été explicitement présentées ; la souche EC1 était inductible et non soumise à la répression catabolique par le glucose et la souche EC2 était constitutive et non soumise à la répression catabolique par le glucose.

## **Partie II : Validation d'une souche de levure génétiquement modifiée**

### **Partie 2.1.**

L'analyse des boîtes de culture a été globalement satisfaisante. Par contre, les conclusions sont restées trop souvent incomplètes ou perfectibles. La toxine est en fait uniquement active sur la souche PA13 dans l'échantillon P1. Dans l'échantillon P2, elle est soit absente, soit inactive. La souche PA14 se révèle bien être résistante à la toxine killer K.

Concernant l'électrophorèse, considérée comme une technique de base, il était attendu qu'elle soit maîtrisée par l'ensemble des candidats, ce qui ne s'est avéré malheureusement pas le cas. Le jury a en conséquence été dans l'obligation d'apporter parfois une aide substantielle notamment pour la réalisation des dépôts ; l'ensemble des étapes de mise sous tension ayant été réalisé par les examinateurs. Malgré cette aide, seuls 3 candidats sur 4 ont obtenus des résultats conformes. Parmi ceux qui ont obtenu un électrophorégramme exploitable, seuls 5 candidats ont su dégager le temps nécessaire à l'exploitation du gel (question 2.1.4). L'analyse a été satisfaisante. Par contre, le lien avec le test de sensibilité s'est révélé peu pertinent. Il était attendu que, P2 étant présent (dans le gel), elle est rendue inactive par le procédé de purification employé.

### **Partie 2.2.**

Il s'agissait, pour l'organisation générale du travail de lancer la croissance dès le début de l'épreuve afin de disposer ensuite du temps suffisant afin d'exploiter les prélèvements effectués.

Concernant la limite de linéarité de la méthode d'estimation opacimétrique de la biomasse, si l'ensemble des candidats l'a respectée, certains se sont aventurés à rechercher bien inutilement l'obtention de valeurs légèrement inférieures à cette limite. Cette démarche, outre un manque de pertinence scientifique, a occasionné de lourdes pertes de temps par la mise en œuvre de dilutions ainsi que des allers-retours aux postes d'incubation et de mesure.

Pour cette partie qui ne comportait pas de difficulté particulière, le jury a découvert beaucoup trop souvent des corrélations fantaisistes entre nombre de levures et valeur de  $D_{600}$ . Seule une candidate a utilisé la bonne corrélation.

Une seule personne a débuté tardivement le suivi de croissance. Pour cette partie, là encore, le jury regrette le manque de rigueur dans la mise en œuvre des techniques de dilution. Se présenter à l'admission de ce concours implique une préparation dans la réalisation des gestes de base, notamment les techniques de pipetage, omniprésentes en biotechnologie.

### **Partie 2.3.**

Une petite moitié des candidats a traité cette partie, beaucoup ayant manqué du temps nécessaire à sa réalisation.

Les présentations graphiques et leurs exploitations se sont révélées souvent perfectibles et peu rigoureuses. Un tiers des candidats a exprimé l'atténuation et non le logarithme népérien de l'atténuation en fonction du temps, ce qui est inadmissible pour un concours de ce niveau.

Seuls quelques candidats sont allés au terme de l'exploitation demandée.

# CONCLUSION GENERALE

Le jury félicite les 18 candidats admis à la session 2017 de l'agrégation interne de biochimie génie biologique.

Le jury encourage les candidats non admis à persévérer dans leur projet. Les moyennes générales, notamment aux épreuves d'admission, attestent de la qualité des candidats à ce concours d'excellence.

Comme cela a été indiqué tout au long de ce rapport, il est nécessaire que les candidats se préparent aux épreuves dans l'objectif de témoigner des compétences attendues d'un professeur agrégé de biochimie génie biologique.

**Le jury tient à remercier Madame la proviseure du lycée Pierre-Gilles de Gennes-ENCPB et son équipe : proviseurs adjoints, enseignants, techniciens et personnels administratifs, pour l'accueil et l'aide efficace apportés tout au long de l'organisation et du déroulement de ce concours qui s'est effectué dans d'excellentes conditions.**