



Secrétariat Général

**Direction générale des
ressources humaines**

Sous-direction du recrutement

Concours du second degré – Rapport de jury

Session 2010

AGRÉGATION

Externe

Biochimie génie biologique

**Rapport de jury présenté par Monsieur François LASBENNES
Président de jury**

Sommaire

Composition du jury.....[page 3](#)

Renseignements statistiques[page 4](#)

Epreuves d'admissibilité

Composition de biochimie[page 6](#)

Composition de microbiologie[page 9](#)

Composition de biologie cellulaire et de physiologie[page 11](#)

Epreuves d'admission

Epreuve pratique de chimie[page 14](#)

Rapport sur l'épreuve de chimie[page 37](#)

Epreuve pratique de microbiologie[page 43](#)

Rapport sur l'épreuve de microbiologie[page 61](#)

Epreuve pratique de biochimie – physiologie[page 65](#)

Rapport sur l'épreuve de biochimie-physiologie[page 85](#)

Epreuves orales[page 87](#)

Rapport sur les leçons de biochimie[page 88](#)

Rapport sur les leçons de microbiologie[page 89](#)

Rapport sur les leçons de biologie humaine[page 90](#)

Rapport sur les études critiques de dossiers[page 94](#)

Rapport sur la chimie à l'oral.....[page 96](#)

Reflexions sur la session 2010.....[page 97](#)

Annexes

Liste des ouvrages disponibles[p 98](#)

COMPOSITION DU JURY

Président

M. François LASBENNES, professeur des Universités, Université de Strasbourg ,
STRASBOURG

Vice-président

M. Michel GAVRILOVIC, inspecteur général de l'Education Nationale, Groupe Sciences et
Techniques Industrielles : Biotechnologies

Secrétaire général

Mme Florence RIVENET, professeur agrégée de BGB, TZR, Lycée Pierre-Gilles de Gennes
(ENCPB), PARIS

Membres

M. Xavier BATAILLE, professeur agrégé, Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS
M. Erwan BEAUVINEAU, professeur agrégé, Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB),

PARIS

M. Christophe BELOIN, Chargé de recherche, Institut Pasteur, PARIS

Mlle Christine BENAYOUN, professeur agrégée de BGB, Lycée Pierre-Gilles de Gennes
(ENCPB), PARIS

Mme Hélène CARRIE, professeur agrégée, Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS

M. Fabien CEZARD, professeur agrégé, Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS

Mlle Jeanne-Laure DORMIEUX, professeur agrégée, Lycée d'Arsonval SAINT-MAUR-DES-
FOSSES

M. Frédéric DUCANCEL, Ingénieur de recherche, CEA D'études des protéines GIF-SUR-
YVETTE

M. Marc LANDRY, professeur des Universités à l'INSERM, BORDEAUX

M. Philippe LEJEUNE, Professeur des Universités, Institut national des sciences appliquées,
VILLEURBANNE

M. Daniel LONCLE, professeur agrégé HC, Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS

M. Alain MOREL, Professeur des Universités, Université ANGERS

M. Fabrice ROBLES, Professeur Agrégé

Mme Lucille TIGER YVERNAULT, professeur agrégée, Lycée Pierre-Gilles de Gennes
(ENCPB), PARIS

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits.....	275
Candidats présents à l'épreuve d'admissibilité.....	72
Nombre de postes	10
Candidats admissibles.....	21
Candidats présents aux épreuves d'admission.....	21
Candidats proposés pour l'admission	10
Barre d'admissibilité	07,50
Barre d'admission	09,34

Epreuves d'admissibilité

Moyenne générale des candidats présents.....	06,22/20
Moyenne générale des candidats admissibles.....	09,35/20

Biochimie

Moyenne des candidats présents.....	05,76/20
Moyenne des candidats admissibles	09,10/20
Note maximale	15,50/20

Microbiologie

Moyenne des candidats présents	07,13/20
Moyenne des candidats admissibles	10,36/20
Note maximale	13,50/20

Biologie cellulaire et Physiologie

Moyenne des candidats présents	05,42/20
Moyenne des candidats admissibles	08,60/20
Note maximale	15,00/20

Epreuves d'admission

Moyenne générale des candidats présents	09,81/20
Moyenne générale des candidats admis	11,79/20

Travaux pratiques de biochimie-physiologie

Moyenne des candidats présents.....	11,36/20
Moyennes des candidats admis	14,15/20
Note maximale	14,90/20

Travaux pratiques de microbiologie

Moyenne des candidats présents.....	10,47/20
Moyennes des candidats admis	11,42/20
Note maximale	14,90/20

Travaux pratiques de chimie

Moyenne des candidats présents.....	10,90/20
Moyennes des candidats admis	10,85/20
Note maximale	14,50/20

Leçon

Moyenne des candidats présents	08,71/20
Moyennes des candidats admis	12,00/20
Note maximale	18,00/20

Epreuve critique de dossier

Moyenne des candidats présents	08,71/20
Moyennes des candidats admis	10,90/20
Note maximale	14,00/20

Ensemble du concours

Moyenne des candidats présents	09,66/20
Moyenne des candidats admis	11,18/20

EPREUVES D'ADMISSIBILITE

Composition de Biochimie

Durée : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Importance des liaisons faibles en biologie.

RAPPORT SUR LA COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Rapport établi par Messieurs A. MOREL et M. GAVRILOVIC

Résultats

Moyenne générale de l'épreuve : 5,76/20

Répartition des notes sur 72 copies corrigées

2	notes > 14
1	note ≥ 12 et ≤ 14
3	notes ≥ 10 et < 12
12	notes ≥ 8 et < 10
26	notes ≥ 5 et < 8
28	notes < 5

Pourcentage des notes supérieures ou égales à 10/20 : 8,33 %

Meilleure note : 15,5/20

Réflexions sur l'épreuve

Le sujet « importance des liaisons faibles en biologie » étant vaste, chaque candidat pouvait aisément montrer l'état, l'actualité et la pertinence de ses connaissances scientifiques et technologiques. Comme attendu dans cet exercice, le candidat devait montrer un esprit de synthèse utilisant les acquis de diverses disciplines biologiques afin de structurer un devoir au plus haut niveau de ses connaissances. Le plan n'étant pas suggéré, celui-ci était au choix de chaque candidat, toutefois un cadrage préliminaire des objectifs devait être proposé. Dans la grande majorité des cas, lorsqu'un plan est proposé, il n'est pas justifié. La logique suggère que l'introduction rappelle, comme préliminaire incontournable, les différentes liaisons faibles et leurs natures. Ainsi, il est important d'argumenter sur l'importance en biologie des interactions faibles dans tous les réseaux fonctionnels régulés de la cellule. En d'autres termes, il faut montrer que l'instabilité ou la dynamique des relations physiques entre protéines sont à la base de la régulation phénotypique et des fonctions physiologiques. Pour cela, un rappel de la notion d'interactions, de leur nature et de leur valeur thermodynamique est très important. La mise en perspective des différents niveaux de structure des macromolécules permet d'introduire la question des rapports entre structures et interactions faibles.

On peut noter que les généralités sur les liaisons faibles sont souvent superficielles, et ne sont relativement bien développées que dans quelques rares copies. Dans le meilleur des cas, un classement des forces est indiqué mais aucun commentaire sur l'importance fondamentale des interactions faibles en biologie n'est formalisé. La biologie étant une discipline essentiellement expérimentale, il était souhaitable de décliner par la suite, des méthodes permettant de déterminer les interactions entre deux ou plusieurs partenaires moléculaires. Pour ce faire, le rappel des équations qui régissent les équilibres de liaison est essentiel. Dans ce cadre, le nombre de devoirs évoquant la notion de constante de dissociation est marginal et quand cette notion existe, elle est souvent erronée. L'évocation et le rappel de la détermination des constantes de liaison par le développement de l'équation de Scatchard est quasi inexistante et lorsqu'elle est évoquée, elle est souvent fautive. Ce point est crucial pour le devoir puisque ces notions sont à la base de l'ensemble de technologies développées pour caractériser de tels contacts. Lorsque ce travail est réalisé, il est facile d'expliquer les différentes méthodes de caractérisation de ces contacts et d'expliquer les limites de leurs champs d'application en fonction des paramètres thermodynamiques qui régissent leurs interactions. Si dans quelques copies, certaines méthodes biochimiques ou génétiques sont développées, il est très rarement fait mention des restrictions de leur utilisation en fonction des paramètres de l'équilibre de liaison. Ceci montre que la plupart des candidats ne savent pas faire le lien entre les notions fondamentales d'une interaction et l'utilisation d'une méthodologie adaptée révélant la nature du contact que l'on souhaite mettre en évidence : constantes d'affinité fortes ou faibles et liaisons non spécifiques. Si peu de copies expliquent de façon claire quelques méthodologies permettant cette mise en évidence, aucune n'explique le rapport entre la méthode et les paramètres de liaison. Ainsi, on trouve dans les meilleurs devoirs, une suite de méthodes développées sans critique sur leurs modes d'utilisation. Par ailleurs dans nombres de copies les méthodes sont citées sans qu'il y ait de lien avec le sujet traité. Cette lacune dans une composition de biochimie est étonnante car ces méthodes permettent de caractériser la mise en place de réseaux moléculaires responsables de l'ensemble des activités biologiques.

Par la suite, plusieurs exemples concernant des interactions moléculaires peuvent être développés et ces exemples peuvent être justifiés en se référant aux différents cas de figure des interactions rencontrées dans une cellule eucaryote. Le cytosquelette, la signalisation intracellulaire, la modulation des activités enzymatiques, la modulation des complexes de translocation, la protéolyse intracellulaire, l'allostérie enzymatique sont des exemples classiques pouvant illustrer l'importance des interactions faibles dans la cellule. Les candidats devaient choisir quelques exemples illustrant leur argumentation et surtout développer le plus possible les exemples choisis afin de montrer l'importance des interactions faibles dans les processus vitaux. Il faut noter que le recours à des schémas illustrant le propos est toujours un plus dans une démonstration scientifique, à la condition que ceux ci soient clairs et pédagogiques. Trop de copies utilisent des schémas peu informatifs et quelquefois, sans texte de soutien. En général les exemples sont bien choisis mais une très grande disparité des connaissances est visible selon les devoirs. Si quelques candidats montrent une connaissance très approfondie des exemples qu'ils illustrent, dans la majorité des cas, l'illustration est pauvre et montre un manque de maîtrise ou de connaissance. Cette méconnaissance se traduit par une suite exhaustive d'exemples dont seule la citation sert de support au devoir. Ceci est d'autant plus préjudiciable, que le choix des exemples étant à la disposition des candidats, ils doivent être développés en nombre raisonnable mais chaque exemple doit être approfondi.

Pour l'ensemble des copies, les conclusions sont souvent au mieux un pâle résumé du texte. Il est étonnant, dans ce style d'exercice, de ne pas proposer une conclusion avec une perspective scientifique d'envergure sur le décryptage de l'interactome, l'importance des liaisons faibles dans de nombreuses pathologies, la définition des zones de contacts entre

protéines, le développement de molécules thérapeutiques et éventuellement sur les nouvelles technologies que stimulent ces liaisons.

Par ailleurs, il faut noter que la plupart des copies sont présentées convenablement et sont rédigées en bon français, avec quelques exceptions inacceptables en terme d'erreurs orthographiques ou pire, de lisibilité. En outre pour les meilleurs devoirs, les exemples choisis sont traités avec une connaissance remarquable. En conclusion, il semble donc que dans de nombreux cas, les bases de biochimie ne sont, soit pas assimilées, soit difficilement mises en perspective pour expliquer les phénomènes fondamentaux de la biologie.

Composition de microbiologie

Durée : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Un laboratoire a isolé de l'environnement une souche bactérienne produisant une amylase. Décrivez les étapes de clonage du gène codant pour cette enzyme dans une souche d'*Escherichia coli*, incapable de cataboliser l'amidon.

Décrivez aussi les étapes de l'identification de la souche de départ, ainsi que celle de l'extraction, de la purification et de la caractérisation de l'enzyme produite par la souche recombinante d'*Escherichia coli*.

RAPPORT SUR LA COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Rapport établi par Messieurs P. LEJEUNE et D. LONCLE

1- RÉSULTATS

Moyenne générale de l'épreuve : 07,1 / 20

Répartition des notes sur 71 copies corrigées :

5 notes ≥ 12

10 notes $\geq 10 < 12$

9 notes $\geq 09 < 10$

notes $\geq 08 < 09$

19 notes < 05

Pourcentage des notes supérieures ou égales à 10 : 21 %

Note la plus haute : 13,5 Note la plus basse : 00,5

2- RÉFLEXIONS SUR L'ÉPREUVE

Le sujet est pluridisciplinaire et comporte une dimension technologique. La problématique en est explicitement définie et le plan suggéré. Peu de candidats développent la totalité des différents aspects du sujet alors que les notions à exposer dans chacune des trois parties sont très classiques et font appel à des connaissances de base. Aucune copie n'est complète, au moins dans sa démarche.

En introduction, il importe d'indiquer l'intérêt des amylases et de leur diversité, ainsi que celui du clonage chez *E.coli* plutôt que d'utiliser directement la souche isolée de l'environnement.

Concernant le clonage, il convient d'abord de proposer une stratégie d'obtention du gène. Une stratégie classique consiste à obtenir une banque génomique par digestion partielle de l'ADN de la souche isolée de l'environnement par une ou deux endonucléases de restriction. La digestion partielle est fondamentale pour moduler la fréquence de coupure et limiter les risques de rupture du gène. Remarque sur le chromosome bactérien circulaire : on sait aujourd'hui que certaines espèces bactériennes possèdent deux chromosomes et que certains chromosomes bactériens sont linéaires. L'approche PCR est possible si l'on dispose de la séquence du génome de la bactérie isolée. Le gène sera localisé par homologie avec les gènes répertoriés dans les bases de données et des amorces spécifiques pourront être définies. Il est également possible de choisir ces amorces par analogie avec celles définies pour un gène codant une amylase chez une bactérie

phylogénétiquement proche. L'approche ADN complémentaire n'offre pas d'intérêt particulier pour le clonage d'un gène bactérien, contrairement aux eucaryotes.

Il convient ensuite de choisir un système hôte-vecteur de clonage. Compte tenu de la taille des gènes bactériens, le vecteur plasmidique est le plus indiqué. La souche hôte doit être impérativement restriction négative pour ne pas hydrolyser l'ADN exogène après la transformation. Ce point n'a été abordé par aucun candidat. Le vecteur sera si possible un vecteur d'expression, ce qui évitera un sous-clonage pour la production de l'enzyme. Une étiquette (tag) facilitera la purification. Le gène sera inséré sous le contrôle d'un promoteur si possible inductible. La toxicité des produits des gènes clonés est en effet l'un des problèmes majeurs rencontrés dans les clonages. L'adjonction d'une séquence d'adressage vers le périplasme facilitera la purification de l'enzyme. Pour l'étape de ligature, le ratio insert/vecteur est important et n'est malheureusement abordé dans aucune copie.

Il convient enfin de présenter la démarche de sélection et de criblage des clones d'intérêt : sélection des bactéries ayant reçu un plasmide, repérage des clones « avec insert », repérage ou sélection des clones qui expriment l'amylase, par visualisation à l'iode de l'hydrolyse de l'amidon ou en utilisant l'amidon comme seule source de carbone.

L'identification (de la souche donneuse du gène et non d'*E.coli*).

Très peu de candidats se sont posé la question de l'intérêt de cette identification dans le contexte du sujet. L'absence d'indication sur la souche de départ devait inciter les candidats à prendre du recul et à mettre l'accent sur la démarche générale d'identification d'une bactérie, en en faisant ressortir les points forts tels que l'orientation vers le groupe, le choix d'une galerie adaptée, les tests complémentaires éventuels, les démarches dichotomique et numérique. Il importe d'envisager les méthodes moléculaires.

L'enzyme produite.

Le choix de la technique d'extraction dépend de la localisation attendue de l'enzyme. Pour *E.coli*, l'adressage périplasmique suivi d'un choc osmotique est classique mais est rarement évoqué. Pour la purification, beaucoup de candidats ont à juste titre utilisé une chromatographie de bioaffinité et souvent proposé dans ce but un étiquetage de l'enzyme. Il convient également d'évoquer le suivi de cette purification, qualitativement par SDS PAGE et quantitativement par détermination de l'enrichissement et du rendement. Pour sa caractérisation, il convient d'en montrer l'intérêt, de choisir des paramètres à caractériser, de justifier leur choix plutôt que de présenter un catalogue des caractéristiques structurales et fonctionnelles d'une protéine enzymatique. En particulier l'étude de la thermostabilité de l'enzyme est une propriété fondamentale dans un contexte industriel qui est très peu abordée.

Une ouverture sur l'amélioration des propriétés de l'enzyme dans un contexte industriel est attendue en conclusion.

Composition de biologie cellulaire et physiologie

Durée : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Le bilan hydro-sodé et le pH sanguins, ainsi que la pression artérielle sont étroitement régulés.

Montrez que la régulation de chacun de ces paramètres dépend de l'activité de plusieurs systèmes physiologiques interdépendants et expliquez comment différents capteurs permettent aux systèmes nerveux et endocrinien de réguler simultanément les trois paramètres. Vous illustrerez votre propos par deux ou trois exemples physiologiques.

RAPPORT SUR LA COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Rapport établi par Messieurs M. LANDRY et F. LASBENNES

1- RÉSULTATS

Moyenne générale de l'épreuve : 05,42 / 20

Répartition des notes sur 70 copies corrigées :

5 notes ≥ 12

3 notes ≥ 10 et < 12

9 notes ≥ 8 et < 10

16 notes ≥ 5 et < 8

37 notes < 5

Pourcentage des notes supérieures ou égales à 10 : 11 %

Meilleure note : 15/20. Note la plus basse : 00,5/20 (plus une copie blanche)

2-REFLEXIONS SUR L'EPREUVE

Les résultats obtenus sont faibles en raison de connaissances insuffisantes. Le jury rappelle que des connaissances insuffisantes sont sanctionnées. Par ailleurs, elles handicapent lourdement le candidat qui faute d'éléments, ne peut construire correctement le sujet. Dans son acceptation la plus large, le sujet proposé cette année est une réflexion sur le fonctionnement coordonné du corps humain. Malheureusement, de nombreux candidats limitent leur réflexion à la première phrase du sujet. Elle ne définit pourtant que les régulations sur lesquelles doit s'articuler le raisonnement. En revanche, la seconde phrase offre une ouverture permettant au candidat de construire son devoir. En effet, le mot interdépendance figurant dans cette phrase doit représenter la clé de voûte du sujet. Les indications qui suivent, demandant d'expliquer le rôle des systèmes nerveux et endocriniens ainsi que celui des capteurs dispersés dans l'organisme, auraient pu être omises en raison de leur évidence. Elles doivent toutefois attirer l'attention sur l'importance que le jury accorde au développement de ces parties.

La grande majorité des copies présentent un plan sans originalité, abordant successivement les trois régulations proposées alors que l'interdépendance n'est réellement abordée que dans les exemples, les plus fréquents étant la physiologie de l'effort musculaire et l'hémorragie. Cette absence d'originalité transparait dès l'introduction. La quasi totalité des candidats fondent leur introduction sur l'homéostasie. Bien que cette notion soit au coeur du sujet, elle n'en est pas l'objet. La question n'est pas tant de montrer la nécessité de l'homéostasie, souvent exagérément développée, que de montrer comment celle-ci est mise en oeuvre. Il est intéressant d'approfondir cette notion en notant que les événements déstabilisants de l'homéostasie affectent rarement un seul paramètre physiologique mais

plusieurs et de manière différente selon l'évènement. Il est alors possible d'introduire l'importance de la multiplicité des capteurs et de leur localisation, ainsi que celle d'un système de régulation complexe qui ne se limite pas à une simple boucle de rétro-contrôle, comme il a souvent été présenté, mais à un système d'intégration permettant une réponse coordonnée. A défaut de s'appuyer sur le principe d'homéostasie, il est possible de structurer un tel devoir par un rappel montrant que des corrections appliquées à un des systèmes a des répercussions sur au moins, un des deux autres. Dans cet esprit, plusieurs candidats rappellent les interactions entre volémie et pression artérielle mais l'origine de ces interactions reste confuse, voire erronée car les propriétés élastiques du coeur et leurs conséquences sont mal connues. A cet égard, il est à noter que la loi de Franck-Starling est rarement citée. Plusieurs copies rappellent que les constantes de temps propres au système nerveux et au système endocrinien sont différentes. C'est un élément qui doit être pris en compte à condition d'en tirer toutes les conséquences et il ne peut être correctement traité sans maîtriser les aspects respiratoires et métaboliques de la régulation du pH plasmatique.

A cet égard, il est à noter que la connaissance du fonctionnement des organes est très souvent insuffisante, voire superficielle. La fonction rénale en est l'exemple le plus significatif. La description se limite trop souvent au simple rappel du jeu de filtration, réabsorption, sécrétion. En revanche, le gradient cortico-papillaire n'est pas toujours cité et lorsqu'il l'est, les transporteurs, canaux ioniques et perméabilités impliqués sont souvent faux et mal localisés. D'autre part, de trop rares copies discutent des mécanismes impliqués dans l'élimination des protons et la régulation du pH plasmatique. Le chapitre consacré à cette régulation débute le plus souvent par la citation des différents tampons intervenant dans le plasma sanguin. Plusieurs copies indiquent également que le tampon bicarbonate intervient dans un système ouvert. Ces développements sont légitimes mais le jury regrette que les différents pKas soient rarement cités ainsi que la description des centres respiratoires bulbaires, de leur mode de fonctionnement et de leur régulation. Le jury note toutefois avec satisfaction que quelques copies indiquent comment les centres bulbaires peuvent percevoir le pH plasmatique et le rôle de la barrière hémato-encéphalique dans ce mécanisme.

La méconnaissance des centres bulbaires se manifeste également dans la régulation de la pression artérielle, souvent limitée à la description simpliste du baroreflexe. De plus, le coeur est trop souvent considéré comme le seul organe intervenant dans la régulation de la pression artérielle. Il convenait en effet de montrer que cette régulation est partagée par le coeur et le système vasculaire et que la réponse, variable selon les circonstances, est organisée par les centres bulbaires dont l'influence s'exerce également sur la réponse humorale.

En ce qui concerne l'aspect endocrinien, le jury note une grande hétérogénéité selon les copies, donnant l'impression d'un jeu de hasard duquel sortent le plus souvent l'arginine-vasopressine, l'adrénaline, l'angiotensine et l'aldostérone. Le facteur natriurétique auriculaire est en revanche le parent pauvre de ce tirage au sort. Comme indiqué plus haut, plusieurs candidats ont vu l'aspect temporel lié à l'action humorale et tous se sont contentés pour le reste, de rappeler avec plus ou moins de bonheur, les modes d'action des hormones citées. A l'évidence, une présentation sous forme de catalogue est mal adaptée à la question. Il est en revanche pertinent d'aborder la question sous l'angle des différentes caractéristiques qui peuvent être extraites des modes d'action des hormones. Par exemple, le lien avec le système nerveux autonome est un élément qui mérite un développement puisqu'il existe pour toutes les hormones impliquées. Il est alors possible de montrer que les deux systèmes, nerveux et endocrinien, sont interdépendants. De même, aucune des hormones ne possède un effet unique. Elles agissent sur la fonction rénale, sur les vaisseaux sanguins et souvent sur le coeur. Il s'agit donc d'une autre caractéristique méritant discussion.

La description des capteurs souffre du même défaut que celle des hormones. Elle est souvent incomplète et sans vue synthétique. Il convenait ici de dégager les caractéristiques les plus pertinentes, donc de discuter non seulement de leur domaine de sensibilité mais

aussi de leurs localisations et des caractéristiques des paramètres qu'elles détectent en ces lieux. D'autres aspects tels que la multiplicité des capteurs liés à un type de réponse et la multiplicité des réponses pour un seul capteur devaient également être discutés. Il est frappant par exemple, que différents capteurs sont localisés dans la crosse aortique où ils sont impliqués dans la correction de la pression artérielle et dans la régulation de la ventilation. Par ailleurs l'une et l'autre de ces deux fonctions ne dépend pas uniquement de ces capteurs mais d'un ensemble distribué en différents lieux de l'organisme.

Dans la très grande majorité des cas, les exemples sont mal traités. Manifestement, les candidats ont accordé peu d'attention aux chapitres consacrés aux systèmes intégrés. La physiologie de l'effort musculaire ou les conséquences d'une hémorragie ne s'inventent pas. Le jury insiste sur l'importance des connaissances dans ce domaine, en particulier dans un sujet traitant des interrelations entre les systèmes de régulation. De plus, de telles régulations n'ont de sens que dans le contexte des conditions nécessitant leur mise en oeuvre. C'est le sens même du terme homéostasie.

En conclusion, le jury regrette que la session 2010 montre une fois de plus, que les connaissances des candidats en biologie cellulaire et physiologie soient faibles. Aucun domaine de cette discipline n'échappe à cette constatation. Le jury insiste sur la nécessité d'acquérir un bon niveau dans la connaissance des systèmes physiologiques, de l'échelle moléculaire et cellulaire jusqu'au niveau le plus intégré dans la cellule et l'organisme. Il est également important de posséder de bonnes connaissances en neurophysiologie et tout particulièrement sur le système nerveux autonome. Bien que la grande majorité des copies présentent des figures illustrant les propos du candidat, ces figures manquent souvent d'intérêt en raison de leur caractère simpliste ou mal adapté ou d'annotations insuffisantes ou maladroitement. Il est bon à cet égard, de prêter attention aux figures des ouvrages. Elles ont un titre, sont légendées et adaptées au propos illustré. Enfin, le jury rappelle qu'un nombre élevé de fautes d'orthographe montrant une insuffisance dans ce domaine est sanctionné.

**AGREGATION
BIOCHIMIE - GENIE BIOLOGIQUE**

Session 2010

Travaux Pratiques de CHIMIE

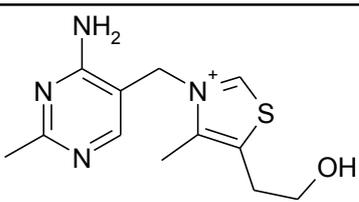
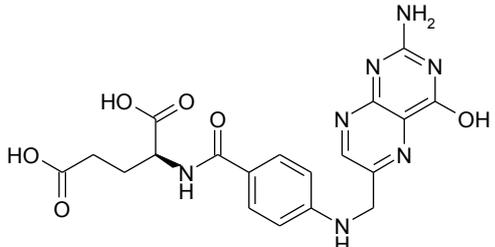
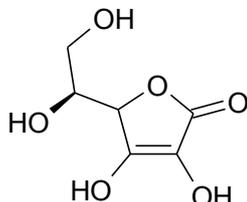
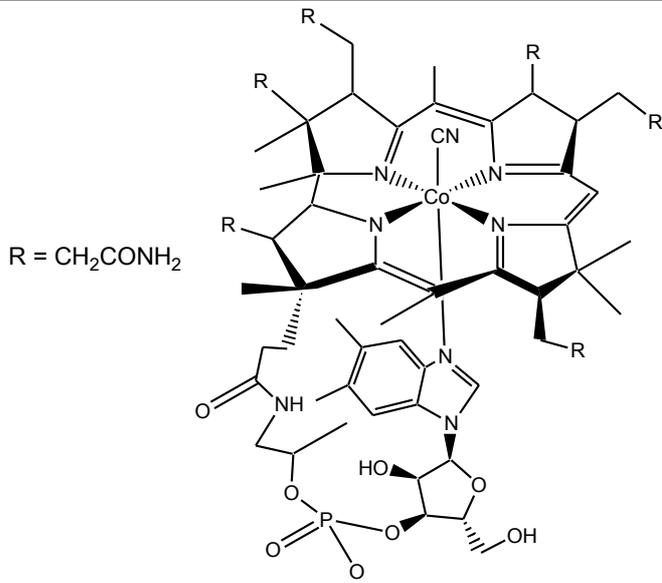
Sommaire

Travaux Pratiques de CHIMIE.....	
Partie expérimentale.....	
A.1. Titrage direct de l'acide ascorbique par l'ion iodate	
A.2. Dosage spectrophotométrique indirect de l'acide ascorbique par l'ion fer(III).....	
A.3. Etude d'une isomérisation : l'azobenzène.....	
A.4. Titrage d'un précurseur de la vitamine B9 : le PABA.....	
B. Exploitation des résultats.....	
B.1. Titrage direct de l'acide ascorbique par l'ion iodate.....	
B.2. Dosage spectrophotométrique indirect de l'acide ascorbique par l'ion fer(III).....	
B.3. Etude d'une isomérisation : l'azobenzène.....	
B.4. Titrage d'un précurseur de la vitamine B9 : le PABA.....	
C. Autour des vitamines.....	
C.1. Chimie structurale.....	
C.2. Chimie organique.....	
C.3. Cinétique et thermodynamique.....	
Données.....	
Annexe 1 – Photochemistry of rhodopsin.....	
Annexe 2 – Spectre UV-visible du PABA	
Annexe 3 – Diagramme d'OM de l'ion cyanure.....	
Annexe 4 – Synthèse de la vitamine A	
.....	
Données de Sécurité sur les produits utilisés.....	
Phrases R&S (risque et sécurité).....	
Feuille de Résultats.....	

LES VITAMINES

Lorsqu'en 1911 Funk (1884–1967) isola la thiamine de l'enveloppe du riz, il la nomma « vitamine », c'est-à-dire amine vitale. Bien qu'il ait été mis en évidence que la fonction amine n'était pas toujours présente, le terme a subsisté pour décrire les substances organiques indispensables à la croissance et au développement d'un organisme qui ne peut en effectuer lui-même la synthèse.

Les vitamines sont séparées selon leur solubilité en vitamines hydrosolubles et en vitamines liposolubles. Quelques exemples sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Vitamines hydrosolubles		
Nom	Formule	Rôle
Vitamine B1 Thiamine		Sert dans le métabolisme des glucides
Vitamine B9 Acide folique		Sert dans la synthèse d'acides aminés et de quelques bases azotées comme l'adénine
Vitamine C Acide ascorbique		Joue un rôle dans les défenses immunitaires, synthèse des globules rouges
Vitamine B12		Intervient dans la synthèse de l'ADN et de l'ARN ainsi que dans la synthèse de protéines

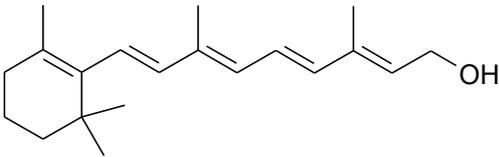
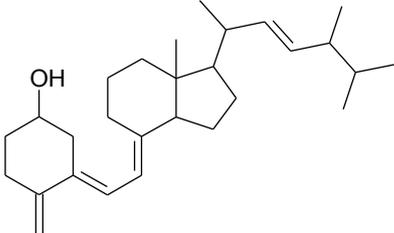
Vitamines liposolubles		
Nom	Formule	Rôle
Vitamine A all-trans-rétinol		Participe au mécanisme de la vision et aide à la croissance
Vitamine D2 Ergocalciférol		Intervient dans le mécanisme d'absorption du calcium et du phosphore.

Tableau 1 : Exemples de vitamines

Dans ce sujet on se propose d'étudier certaines vitamines. Leurs propriétés chimiques seront en particulier mises à profit pour leur dosage. Le mécanisme de la vision lié à la vitamine A sera également illustré.

L'attention des candidats est attirée sur la toxicité de certains des produits manipulés. Les phrases « Risque et Sécurité » des produits sont annexées au sujet et répertoriées dans les données. Les résultats expérimentaux seront consignés dans la feuille de résultats fournie en annexe.

A. Partie expérimentale

Le but des deux premières manipulations est de déterminer la teneur en acide ascorbique d'un comprimé de vitamine C. Pour cela, 250,0 mL d'une solution S ont été préparés en dissolvant un comprimé de vitamine C dit « à 500 mg » dans de l'eau distillée.

A.1. Titrage direct de l'acide ascorbique par l'ion iodate

Introduire dans un erlenmeyer E = 25,0 mL de solution S à doser, 15 mL de solution d'iodure de potassium à 10 %, 15 mL d'acide chlorhydrique à 2 mol.L⁻¹ ainsi que l'indicateur coloré approprié pour ce titrage. Titrer par la solution d'iodate de potassium (C = 0,010 mol.L⁻¹).

On note $V_{I_{O3,1}}$ et $V_{I_{O3,2}}$ les volumes équivalents obtenus. **Compléter la feuille de résultats.**

On prendra un soin tout particulier à noter les observations concernant les changements de couleurs lors de ce dosage.

A.2. Dosage spectrophotométrique indirect de l'acide ascorbique par l'ion fer(III)

Le dosage proposé dans cette partie est indirect : l'acide ascorbique à doser est mis à réagir avec des ions fer(III) pour donner des ions fer(II) qui seront alors complexés par l'*o*-phénanthroline. La quantité de complexe formé est déterminée par spectrophotométrie grâce à une gamme d'étalonnage préalablement préparée.

Préparation de la gamme d'étalonnage

Dans une fiole jaugée de 100,0 mL dissoudre une masse d'environ 100 mg d'acide ascorbique mesurée précisément et 0,5 g d'acide oxalique dihydraté (l'acide oxalique sert ici à éviter l'oxydation de l'acide ascorbique par le dioxygène de l'air). Diluer cette solution au 1/10^e dans une fiole jaugée de 50,0 mL pour obtenir la solution S1.

Dans une fiole jaugée de 50,0 mL introduire 100 mg d'*o*-phénanthroline monohydraté mesurée précisément et 100 mg de sulfate double d'ammonium et de fer(III) dodécahydraté. Ajouter 1 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 2 mol.L⁻¹ et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée pour obtenir la solution S2. Laisser la solution S2 sous agitation jusqu'à dissolution complète des solides.

Dans cinq fioles jaugées de 100,0 mL, introduire à l'aide d'une burette 0, 2, 4, 6 et 8 mL de la solution S1. Ajouter 5,0 mL de la solution S2. Agiter et laisser la couleur s'intensifier pendant 40 min. Compléter jusqu'au trait de jauge, agiter et mesurer l'absorbance à 510 nm.

Dosage de la solution S

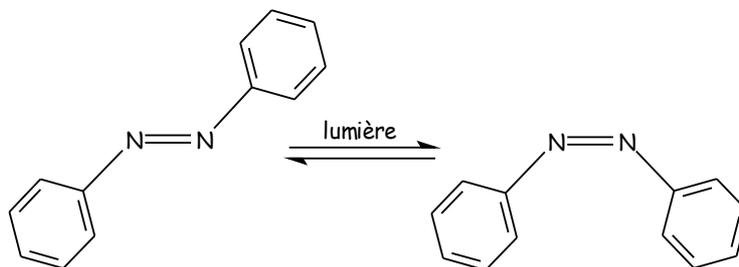
Dans une fiole de 250,0 mL, introduire 10,0 mL de la solution S et 10 mL d'une solution d'acide oxalique à 4 g.L⁻¹. Compléter avec de l'eau jusqu'au trait de jauge. Soit S' la solution obtenue. Dans une fiole jaugée de 100,0 mL, introduire 10,0 mL de la solution S' et 5,0 mL de la solution S2. Agiter et laisser la couleur s'intensifier pendant 40 min. Compléter jusqu'au trait de jauge, agiter et mesurer l'absorbance à 510 nm.

Compléter la feuille de résultats

A.3. Etude d'une isomérisation : l'azobenzène

Afin d'étudier le mode d'action de la vitamine A, sous forme de rétinal, dans le mécanisme de la vision, on se propose de mettre en évidence expérimentalement une réaction d'isomérisation provoquée par un rayonnement lumineux.

En effet, le (*E*)-azobenzène, peut être isomérisé en (*Z*)-azobenzène sous l'action de la lumière. Les deux stéréoisomères absorbent tous les deux les rayonnements UV et peuvent être séparés par CCM (adsorbant : gel de silice ; éluant : toluène).



- Préparer la cuve à chromatographie.
- Sur la plaque, prévoir deux points de dépôts puis effectuer sur l'un des emplacements un dépôt d'une solution de (*E*)-azobenzène dans le toluène (10 g.L⁻¹). La solution se trouve dans un flacon protégé de la lumière et ne doit en aucun cas être exposée à la lumière.
- Exposer la plaque à la lumière pendant environ deux heures.
- Effectuer alors, sur la même plaque et au niveau du deuxième emplacement prévu, un dépôt de la même solution de (*E*)-azobenzène dans le toluène (10 g.L⁻¹).
- Eluer avec du toluène.
- Révéler la plaque à la lumière naturelle ou éventuellement sous lampe UV.

A.4. Titrage d'un précurseur de la vitamine B9 : le PABA

L'acide 4-aminobenzoïque, usuellement nommé PABA, est utilisé dans certains médicaments afin d'assurer la protection de la peau envers les UVB. Effectuer le titrage d'une solution de PABA, de concentration de l'ordre de 10⁻² mol.L⁻¹ par de la soude à C₀ = 0,015 mol.L⁻¹. Le suivi se fera par pH-métrie. On note E la prise d'essai et V_{OH} le volume à l'équivalence.

Compléter la feuille de résultats

B. Exploitation des résultats

B.1. Titrage direct de l'acide ascorbique par l'ion iodate

L'histoire de la vitamine C est liée au scorbut, dont les effets sont connus depuis l'antiquité. Cette maladie grave touchait en particulier les marins qui ne disposaient pas d'aliments frais pour se nourrir. James Lind, un physicien anglais, montra en 1753 qu'il était possible de lutter efficacement contre le scorbut en absorbant quotidiennement un jus d'orange ou de citron.

C'est un biochimiste hongrois Albert Szent-Györgyi qui réussit en 1932 à isoler à partir de jus de citron une substance cristalline proche du glucose, qu'il appela acide ascorbique en référence à son effet contre le scorbut, c'était la vitamine C.

1. Justifier le choix de l'indicateur coloré utilisé.

2. Ecrire les différentes réactions se produisant lors de ce titrage. La forme réduite de l'acide ascorbique pourra être notée H_2Asc et la forme oxydée Asc .
3. Exprimer et calculer la concentration en vitamine $C_{asc,1}$ dans la solution dosée.
4. Noter les observations concernant les changements de couleur lors des dosages et interpréter chacun d'eux (on pourra distinguer trois « étapes »).

B.2. Dosage spectrophotométrique indirect de l'acide ascorbique par l'ion fer(III)

5. Tracer le graphe représentant l'absorbance en fonction de la quantité de matière initiale d'acide ascorbique présent dans les cinq solutions.
6. Calculer la concentration en ions fer(III) de la solution **S2** : pour quelle valeur du pH a-t-on précipitation d'hydroxyde de fer(III) ? En déduire le rôle de l'ajout de l'acide chlorhydrique (justifier par un calcul de pH).
7. Ecrire l'équation de la réaction entre les ions fer(III) et l'acide ascorbique. On prendra en compte la complexation des ions fer(II) par trois molécules d'o-phénanthroline.
8. Le choix de la longueur d'onde de mesure de l'absorbance est-il cohérent avec la couleur des solutions ?
9. La loi de Beer-Lambert est-elle vérifiée ? La réponse sera précisément justifiée.
10. Exprimer et calculer $C_{asc,2}$ la teneur en acide ascorbique de la solution **S**. Comparer à $C_{asc,1}$.
11. Pourquoi est-il nécessaire de diluer la solution **S** pour la doser ?

B.3. Etude d'une isomérisation : l'azobenzène

12. Etudier la CCM après révélation : observations, interprétation (nombre de taches, ordre de migration, etc.). Conclure.
13. L'un des isomères de l'azobenzène est plus stable que l'autre de 50 kJ.mol^{-1} : lequel ? Justifier.
14. L'énergie d'activation de cette réaction d'isomérisation (du plus stable au moins stable) est de 200 kJ.mol^{-1} : en déduire la longueur d'onde maximale permettant d'initier cette réaction. Représenter sur un diagramme l'évolution de l'énergie du système en fonction de la coordonnée réactionnelle.

La vitamine A (voir **tableau 1**) joue un rôle très important dans la chimie de la vision : en effet, il existe au niveau des cônes et des bâtonnets, des protéines appelées opsines, capables de créer avec la vitamine A (sous forme de 11-cis-rétinal) des complexes sensibles à la lumière (appelés rhodopsines dans le cas des bâtonnets et iodopsines dans le cas des cônes). Il n'existe qu'un type de rhodopsine alors qu'il existe trois types d'iodopsine, chacune absorbant à une longueur d'onde qui lui est propre.

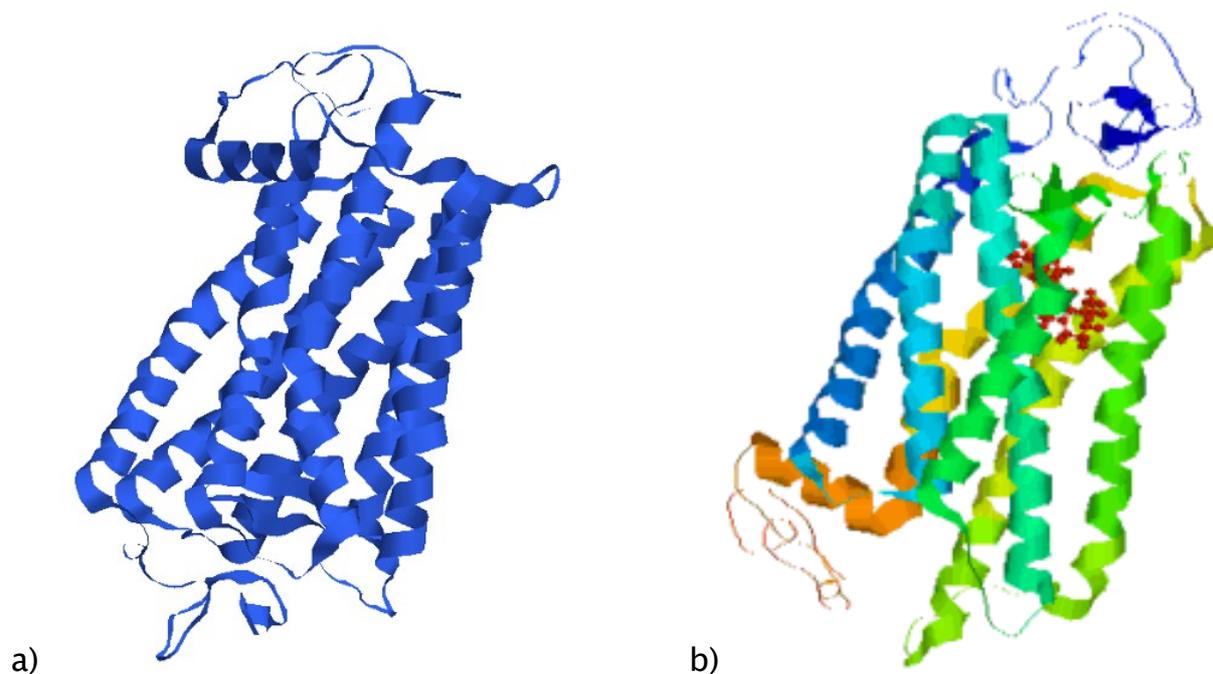
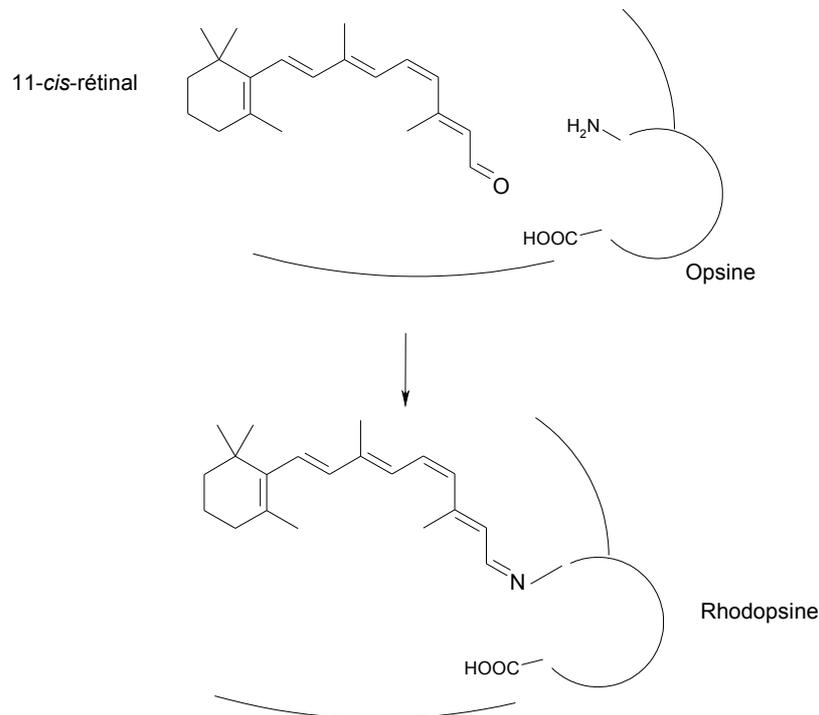


Figure 1. a) Opsine b) Rhodopsine (opsine + 11-cis-rétinal)

15. Que signifie le « 11 » dans 11-cis-rétinal ?
16. Proposer des conditions opératoires (réactifs, solvant, etc.) permettant de synthétiser le 11-cis-rétinal à partir de la vitamine A.
17. La séquence d'acides aminés composant l'opsine est totalement connue : quelle technique expérimentale a permis cette détermination ?

La réaction entre une opsine et le 11-*cis*-rétinal conduisant à la formation de la rhodopsine se fait par l'intermédiaire d'un résidu lysine (les résidus sont en réalité sous la forme amphionique) :



18. Donner le mécanisme de la réaction entre le résidu amine de la lysine et la fonction aldéhyde du rétinal. Quelle fonction a été créée ?
19. Le 11-*cis*-rétinal absorbe vers 380 nm alors que la rhodopsine absorbe vers 500 nm. Expliquer.

Le mécanisme ayant lieu entre les photons incidents et la rhodopsine, l'évolution du système, la naissance du message nerveux et le retour à la conformation initiale a été discuté dans de très nombreuses publications, tant dans des revues spécialisées en chimie que dans celles traitant de biochimie.

20. Il est important d'enseigner aux élèves la notion de bibliographie : citer deux revues susceptibles de contenir des articles se rapportant au mécanisme décrit dans ce problème, une en chimie et une en biochimie.

La rhodopsine présente un maximum d'absorption vers 500 nm : lorsqu'un photon d'énergie suffisante arrive sur la rhodopsine, il se produit une isomérisation qui transforme la partie « *cis*-rétinal » en « *trans*-rétinal ». La protéine change alors de conformation, le rétinal se détache de l'opsine, est réduit en *trans*-rétinol par une enzyme et est estérifié (les réactions d'estérifications se font grâce aux phospholipides de la membrane). Les esters sont ensuite hydrolysés en *cis*-rétinol, avant d'être oxydés à nouveau en *cis*-rétinal. Ce cycle est schématisé par la **figure 2** et les changements successifs de conformation de la protéine sont donnés en **annexe 1**.

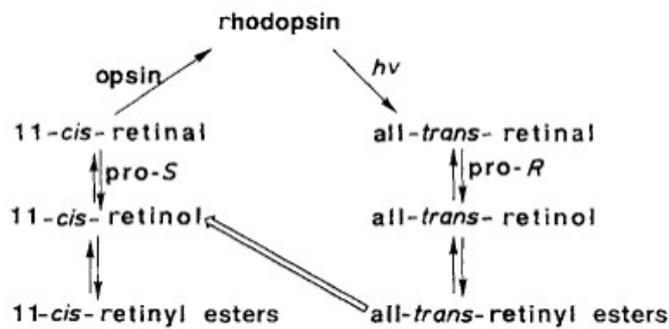


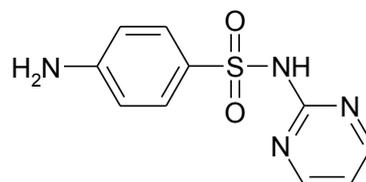
Figure 2 : Cycle simplifié de la vision

21. En négligeant l'influence de la partie estérifiée, préciser quelle espèce est la plus stable entre l'ester « trans » et le cis-rétinol.
22. Les réactions d'hydrolyse d'esters libèrent en moyenne environ 50 kJ.mol^{-1} sous forme d'énergie libre : en déduire l'importance de cette étape dans le cycle.

B.4. Titrage d'un précurseur de la vitamine B9 : le PABA

23. Que signifie l'acronyme PABA ?
24. Préciser le domaine de longueur d'onde associé aux UVB.
25. Déduire du spectre UV-visible du PABA donné en **annexe 2** son mode d'action.
26. Toutefois, le PABA présente un intérêt limité en tant qu'écran solaire : en effet, il s'oxyde facilement en une espèce colorée qui peut alors tacher les vêtements. Proposer une formule de produit d'oxydation.
27. Sous quelle forme se trouve le PABA en solution ?
28. Ecrire l'équation de la réaction de dosage. Exprimer et calculer la concentration en PABA dans la solution fournie. On justifiera le choix de la prise d'essai E.
29. Est-il possible de déterminer les constantes d'acidité sur la courbe ? Justifier.

Le PABA est la cible d'action des sulfonamides comme la sulfadiazine dont la formule est la suivante :



30. A quelle fin utilise-t-on les sulfonamides ? Quel personnage célèbre est souvent pris comme exemple pour illustrer l'action des sulfonamides ?

C. Autour des vitamines

C.1. Chimie structurale

La vitamine B12 ne fut identifiée qu'en 1948 après des années de recherche, permettant de guérir ainsi l'anémie pernicieuse. Cette vitamine présente la particularité d'être constituée d'un atome de cobalt chélaté par un noyau corrin.

31. Etablir la configuration électronique de l'atome de cobalt dans son état fondamental.
32. Le cobalt est au degré d'oxydation III dans la vitamine B12. Donner la configuration électronique correspondante.
33. Préciser le sens du mot chélaté.
34. Expliquer pourquoi le cobalt(III) est stable lorsqu'il est hexacoordiné.

La vitamine B12 n'est en réalité pas la molécule utilisée par l'organisme. En effet, c'est la méthylcobalamine (vitamine B12_b) qui est métabolisée, mais les techniques utilisées lors de l'identification de la molécule utilisaient du charbon actif pour la purification, causant ainsi l'échange du groupe méthyle par l'ion cyanure.

35. Donner la structure de Lewis de l'ion cyanure.

Dans le modèle de Lewis, la liaison covalente est décrite comme la mise en commun de deux électrons de valence. En mécanique quantique, les électrons de valence d'une molécule sont décrits par des orbitales moléculaires (OM) tout comme les électrons d'un atome sont décrits par des orbitales atomiques (OA). Les OM résultent d'une combinaison des OA des électrons de valence des atomes constituant la liaison. Les règles de remplissage des OM sont similaires à celles des OA. Le diagramme fourni en **annexe 3** est le diagramme d'OM de l'ion cyanure. Il donne les niveaux d'énergie des OA des électrons de valence des atomes constituant la molécule et les niveaux d'énergie des OM (au centre).

36. Rappeler les règles de remplissages des OA.
37. Préciser la nature des orbitales des électrons de valence de C et N.
38. Préciser quelles OA correspondent à l'atome de carbone et d'azote. **Rendre le diagramme avec la copie.**
39. Remplir le diagramme d'OM.

C.2. Chimie organique

C.2.1. Action de la vitamine B₁

La thiamine, dont une structure est proposée dans le **tableau 1**, est un ion thiazolium substitué par un groupe aminopyrimidinylméthyle.

40. Proposer une forme mésomère faisant intervenir l'atome de soufre. Laquelle a le plus de poids statistique dans la description de la molécule ?

Dans le commerce on trouve la thiamine sous forme de chlorhydrate ou dichlorure de thiaminium. La thiamine est alors protonée.

41. Quels sont les trois sites prévisibles de protonation ?

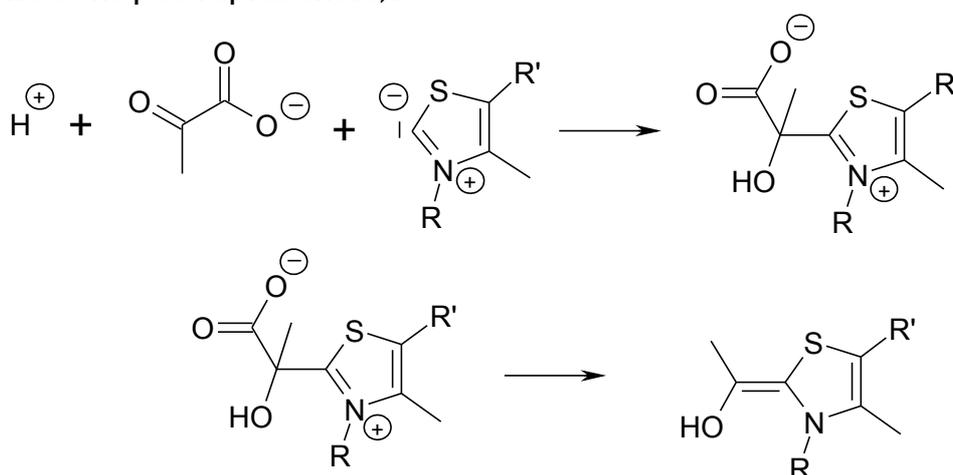
42. L'aniline a un pK_A égal à 4,6 tandis que la cyclohexylamine a un pK_A de 10,7. Expliquer cette différence.

43. En utilisant la remarque précédente et en prenant en compte l'encombrement stérique, prévoir quel site sera protoné dans l'ion thiaminium.

La thiamine présente également un caractère acide. L'hydrogène en position α du soufre est en effet mobile.

44. Justifier cette affirmation.

La thiamine sous forme de diphosphate (ou pyrophosphate) TPP est un coenzyme qui intervient en particulier avec l'enzyme **pyruvate déshydrogénase** pour catalyser la décarboxylation du pyruvate lors de sa conversion en acétylCoA. La mobilité du proton en position α du soufre est alors mise en jeu. Le TPP s'ionise pour former un carbanion qui s'additionne sur le groupe carbonyle du pyruvate. Le produit d'addition subit alors une décarboxylation (tous les doublets non liants ne sont pas représentés):



45. Proposer un mécanisme pour ces deux étapes.

C.2.2. Synthèse de la vitamine A

Une des synthèses de la vitamine A a été développée à partir du 1-bromo-3-méthylbut-2-ène et du 3-oxobutanoate d'éthyle selon la séquence donnée en annexe 4.

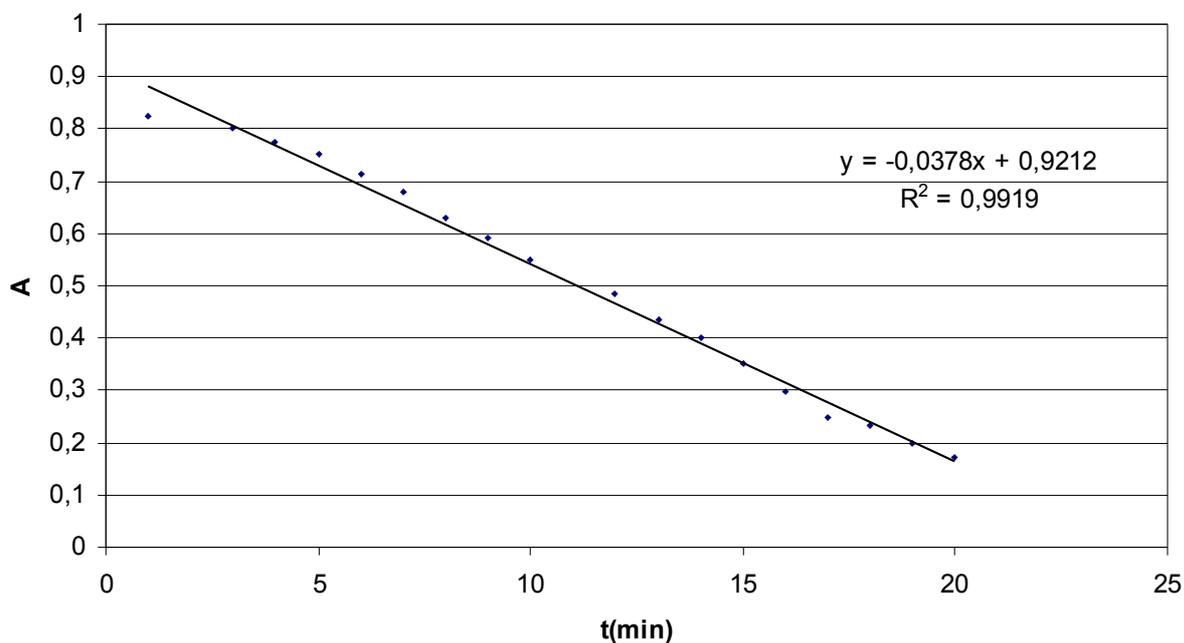
46. Identifier **A**. Préciser le mécanisme d'obtention de **A**.
47. Identifier **B** et **C**.
48. Quels sites acides présente **C** ? Quels pK_A usuels sont associés à ces fonctions ?
49. Ecrire le mécanisme expliquant la formation de **D**.
50. Proposer un mécanisme de formation de la pseudoionone **E** à partir de **D** sachant que le triisopropyl aluminium permet la formation de l'énol et qu'il peut être proposé un mécanisme intramoléculaire concerté à six centres permettant la formation d'un allène.
51. Expliquer la formation de **F** à partir de **E**
52. Proposer une voie de synthèse de **G** à partir de **F**.
53. Donner la formule de **H**.
54. Comment se nomme la réaction de formation de **H** à partir de **G** ?
55. Expliciter les différentes étapes de cette réaction.
56. Comment synthétiser la vitamine A à partir de **H** ? Proposer un réactif.

C.3. Cinétique et thermodynamique

En plus de ses propriétés de vitamine, l'acide ascorbique est également largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour ses propriétés anti-oxydantes. On s'intéresse ici à la cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique par le dioxygène dissous dans l'eau, conduisant à la formation d'eau oxygénée.

Celle-ci est suivie par spectrophotométrie à 298 K, les solutions de vitamine C dans l'eau présentant un maximum d'absorption à 272 nm. Le graphe ci-dessous donne l'évolution de l'absorbance d'une solution **Y** d'acide ascorbique obtenue en dissolvant 150 mg d'acide ascorbique dans 100 mL d'eau puis en diluant au 1/100^e. L'équilibre de solubilisation du dioxygène sera considéré comme très rapide. On considèrera que seul l'acide ascorbique absorbe à 272 nm.

**Oxydation de la vitamine C par O₂ :
évolution de l'absorbance (272nm) en fonction du temps**



57. Calculer la solubilité du dioxygène dans l'eau à 298 K. On rappelle que la pression partielle en dioxygène est reliée à la fraction molaire en dioxygène dissous par la loi de Henry : $P_{O_2} = k_H \cdot x_{O_2}$. La pression partielle en dioxygène sera prise égale à 0,20 bar, $k_H = 4,40 \cdot 10^9$ Pa.
58. Ecrire l'équation de dissolution du dioxygène dans l'eau. Donner l'expression de sa constante thermodynamique d'équilibre.
59. Le tableau suivant donne la teneur en dioxygène d'une eau déminéralisée à différentes températures pour une pression partielle en dioxygène de 0,20 bar.

Température (°C)	5	10	15	20	25	30	35
[O ₂] (mol.L ⁻¹)	3,86.10 ⁻⁴	3,41.10 ⁻⁴	3,05.10 ⁻⁴	2,76.10 ⁻⁴	2,53.10 ⁻⁴	2,30.10 ⁻⁴	2,19.10 ⁻⁴

Tableau 2 : Evolution de la concentration en dioxygène dissous en fonction de la température

En utilisant l'approximation d'Ellingham, déterminer l'enthalpie standard de dissolution du dioxygène dans l'eau $\Delta_{dissolution}H^\circ$.

60. Calculer l'entropie standard de dissolution du dioxygène. Son signe était-il prévisible ?
61. Pourquoi peut-on considérer que la concentration en dioxygène dans la solution d'acide ascorbique est constante ?

62. Montrer que le graphe $A = f(t)$ est compatible avec une cinétique d'ordre 0 par rapport à l'acide ascorbique et d'ordre 1 par rapport au dioxygène.
63. Déterminer le coefficient d'absorption molaire de l'acide ascorbique à 272 nm. La longueur de la cuve est de 1cm. L'équation de la courbe est donnée sur le graphe.
64. Déterminer la constante de vitesse apparente d'ordre zéro de la réaction puis la constante de vitesse réelle d'ordre 1 à 298K.
65. Calculer le pourcentage d'acide ascorbique oxydé au bout d'une minute par le dioxygène de l'air dans le titrage de la manipulation 1. Le comparer au pourcentage d'acide ascorbique qui serait oxydé dans la manipulation 2 en absence d'acide oxalique. Commenter.
66. *Comment évoluerait la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique si on augmentait la température ?*
67. Si on ajoute des ions thiosulfate à la solution (Y), l'absorbance ne varie pas pour une durée d'expérience semblable. Commenter.
68. Si on ajoute des ions cuivre(II) à la solution (Y), la réaction est achevée en moins d'une minute. Commenter.

Données

Pour simplifier et ne pas surcharger les écritures, les ions en solution aqueuse sont écrits sans la notation (aq) ; les espèces solides, liquides ou gazeuses sont, elles, suivies de la notation (s), (l) ou (g).

Constantes fondamentales

$$R = 8,31 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$$

$$h = 6,62.10^{-34} \text{ J.s}$$

$$c = 3,00.10^8 \text{ m.s}^{-1}$$

$$N_A = 6,02.10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

Numéro atomique

$$\text{Co} : Z = 27$$

Masse volumique de l'eau à 298K

$$\rho = 1,0.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$$

Masses molaires

$$\text{H} : 1,01 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$\text{O} : 16 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 : 176,13 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4, 2 \text{ H}_2\text{O} : 126,04 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$\text{Orthophénanthroline hydraté} :$$

$$198,23 \text{ g.mol}^{-1}$$

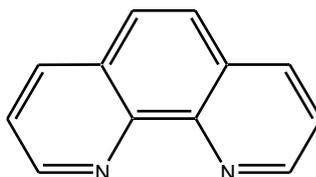
$$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2, 12\text{H}_2\text{O} : 482,19 \text{ g.mol}^{-1}$$

Conversions

$$T(\text{K}) = \theta (\text{°C}) + 273,15$$

$$1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$$

Formule de l'orthophénanthroline:



$$\text{PABA} : 137,0 \text{ g.mol}^{-1}$$

Produits de solubilité à 298 K

$$pK_S(\text{Fe}(\text{OH})_3) = 38$$

Produit ionique de l'eau à 298K

$$pK_e = 14,0$$

Potentiels standards

$$E^\circ(\text{IO}_3^- / \text{I}_2) = 1,19 \text{ V}$$

$$E^\circ(\text{I}_2 / \text{I}^-) = 0,54 \text{ V}$$

$$E^\circ(\text{Fe}(\text{ophen})^{3+} / \text{Fe}(\text{ophen})^{2+}) = 1,14 \text{ V}$$

$$E^\circ(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6 / \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) = 0,18 \text{ V}$$

$$E^\circ(\text{CO}_2(\text{g}) / \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4) = -0,20 \text{ V}$$

$$E^\circ(\text{O}_2(\text{aq}) / \text{H}_2\text{O}_2) = 0,69 \text{ V}$$

$$E^\circ(\text{S}_4\text{O}_6^{2-} / \text{S}_2\text{O}_3^{2-}) = 0,09 \text{ V}$$

$$E^\circ(\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}) = 0,34 \text{ V}$$

Constantes d'acidité à 298 K

$$\text{PABA} \quad pK_A : 2,5 ; 4,9$$

$$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \quad pK_A : 1,2 ; 4,2$$

Extrait de la classification périodique des éléments

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18						
H					He						
Li	Be										
B	C	N	O	F	Ne						
Na	Mg										
Al	Si	P	S	Cl	Ar						
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
Ga	Ge	As	Se	Br	Kr						
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd
In	Sn	Sb	Te	I	Xe						
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg
Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn						
Fr	Ra	Ac									

Annexe 1 – Photochemistry of rhodopsin

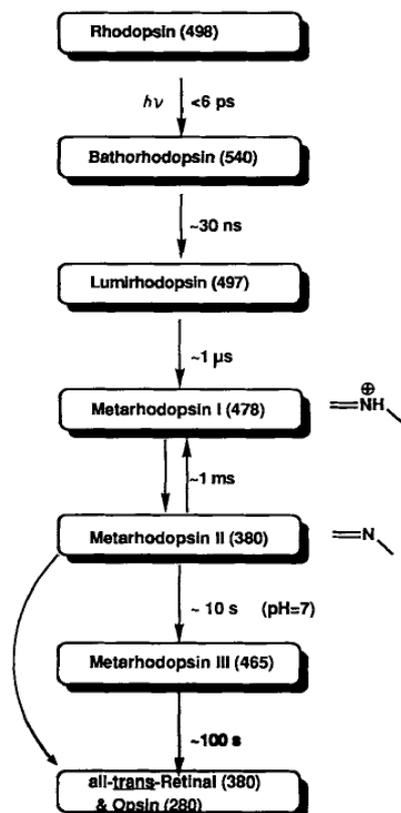
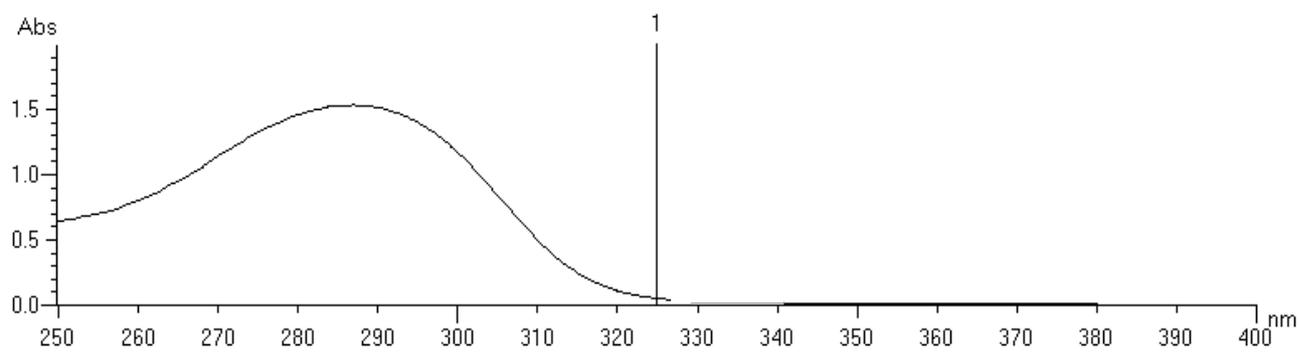


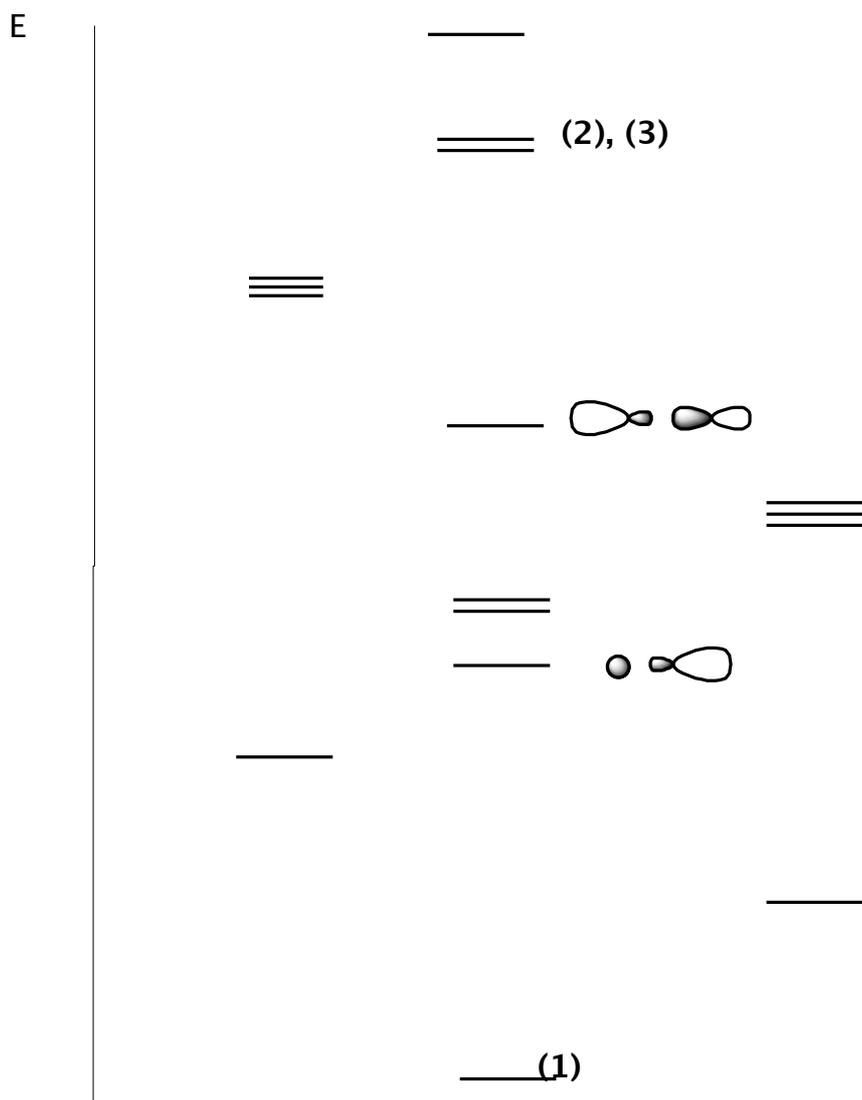
Fig. 5. Photochemistry of rhodopsin. The bleaching of rhodopsin results in the formation of the spectroscopically defined intermediates shown in the above figure. The λ_{max} values for the different intermediates are given in parentheses and their half-lives at room temperature are provided adjacent to the arrows.

D'après R. R. Rando, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **29** (1990) 461 – 480

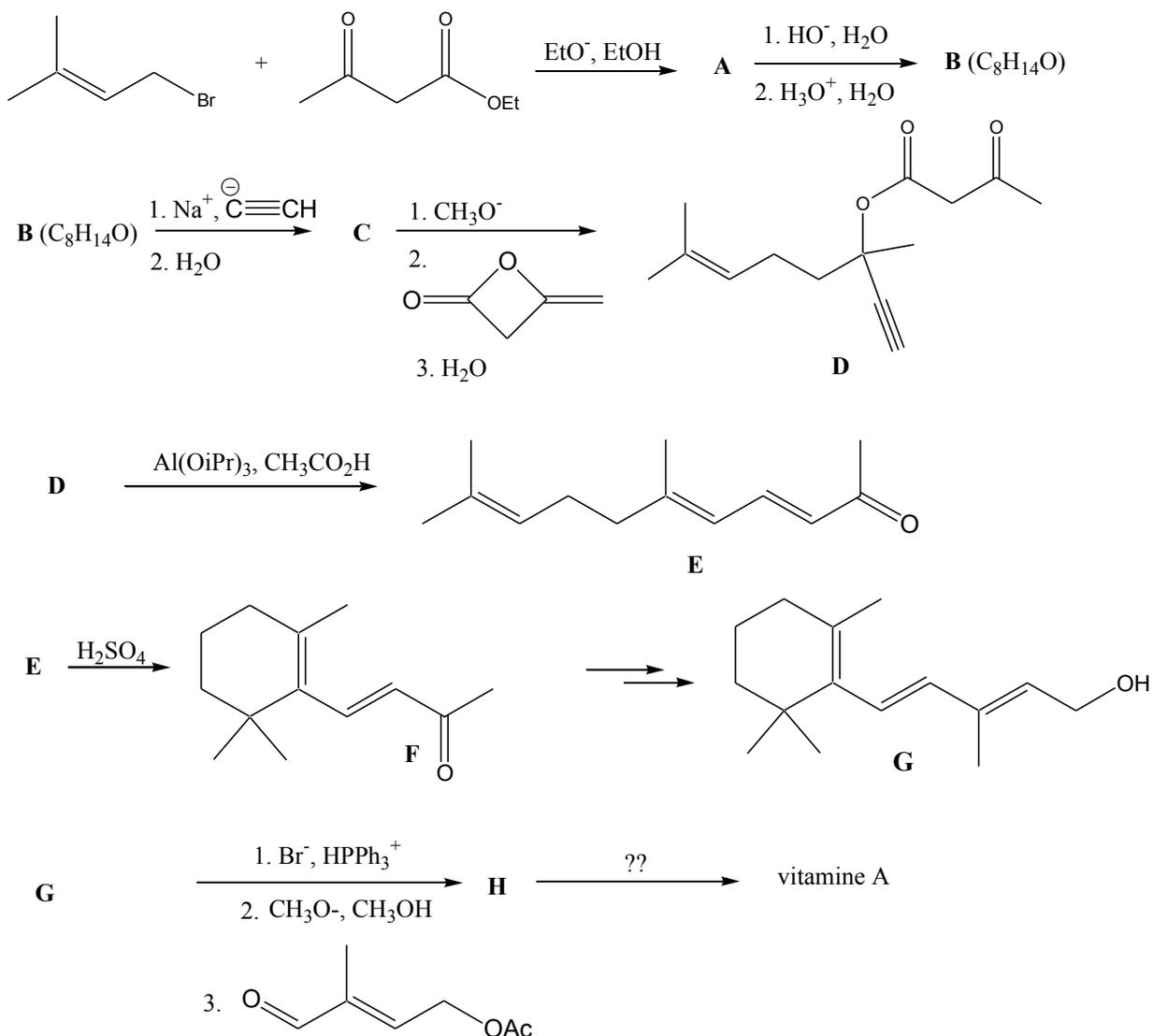
Annexe 2 – Spectre UV-visible du PABA



Annexe 3 – Diagramme d'OM de l'ion cyanure



Annexe 4 – Synthèse de la vitamine A



Données de Sécurité sur les produits utilisés

Produit	Sécurité		
PABA		Nocif	R:22-36/37/38-43 S:26-36
Acide ascorbique			S : 24-25
Soude à 0,01 mol.L ⁻¹		Irritant	R:36/38 S:26-37/39
Orthophénanthroline		Toxique	R:25-50/53 S:45-60-61
Acide oxalique		Irritant	R : 21/22 S: 24/25
FeNH ₄ (SO ₄) ₂			S:24/25
Toluène	 	Nocif	R:11-38-48/20-63-65-67 S:36/37-62
Azobenzène	 	Toxique	R:20/22-45-48/22-50/53-68 S:45-53-60-61

Remarque : les pictogrammes représentés ici sont ceux du nouveau règlement CLP (*Classification, Labelling and Packaging*), entré en vigueur le 20 janvier 2009 qui met en application les recommandations internationales du SGH (Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques).

Phrases R&S (risque et sécurité)

1. Phrases de risques R

R1	Explosif à l'état sec
R2	Risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition.
R3	Grand risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition.
R4	Forme des composés métalliques très sensibles.
R5	Danger d'explosion sous l'action de la chaleur.
R6	Danger d'explosion en contact ou sans contact avec l'air.
R7	Peut provoquer un incendie.
R8	Favorise l'inflammation des matières combustibles.
R9	Peut exploser en mélange avec des matières combustibles.
R10	Inflammable
R11	Facilement inflammable
R12	Extrêmement inflammable
R13	Gaz liquéfié extrêmement inflammable
R14	Réagit violemment au contact de l'eau
R15	Au contact de l'eau dégage des gaz extrêmement inflammables
R16	Peut exploser en mélange avec des substances comburantes
R17	Spontanément inflammable à l'air
R18	Lors de l'utilisation, formation possible de mélange va peur/air inflammable/explosif
R19	Peut former des peroxydes explosifs
R20	Nocif par inhalation
R21	Nocif par contact avec la peau
R22	Nocif en cas d'ingestion
R23	Toxique par inhalation
R24	Toxique par contact avec la peau
R25	Toxique en cas d'ingestion
R26	Très toxique par inhalation
R27	Très toxique par contact avec la peau
R28	Très toxique en cas d'ingestion
R29	Au contact de l'eau dégage des gaz toxiques
R30	Peur devenir facilement inflammable pendant l'utilisation
R31	Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique
R32	Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique
R33	Danger d'effets cumulatifs
R34	Provoque des brûlures
R35	Provoque de graves brûlures
R36	Irritant pour les yeux
R37	Irritant pour les voies respiratoires
R38	Irritant pour la peau
R39	Danger d'effets irréversibles très graves
R40	Effet cancérigène suspecté - preuves insuffisantes
R41	Risque de lésions oculaires graves
R42	Peut entraîner une sensibilisation par inhalation
R43	Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau
R44	Risque d'explosion si chauffé en ambiance confinée
R45	Peut causer le cancer
R46	Peut causer des altérations génétiques héréditaires
R47	Peut causer des malformations congénitales
R48	Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée
R49	Peut causer le cancer par inhalation
R50	Très toxique pour les organismes aquatiques
R51	Toxique pour les organismes aquatiques
R52	Nocif pour les organismes aquatiques
R53	Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique
R54	Toxique pour la flore
R55	Toxique pour la faune
R56	Toxique pour les organismes du sol
R57	Toxique pour les abeilles
R58	Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement
R59	Dangereux pour la couche d'ozone
R60	Peut altérer la fertilité
R61	Risques pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant
R62	Risque possible d'altération de la fertilité
R63	Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant
R64	Risque possible pour les bébés nourris au lait maternel
R65	Nocif, peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion.
R66	L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau
R67	L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges.
R68	Possibilité d'effets irréversibles

2. Conseils de prudence S

S1	Conserver sous clé
S2	Conserver hors de la portée des enfants
S3	Conserver dans un endroit frais
S4	Conserver à l'écart de tout local d'habitation
S5	Conserver sous ... (liquide approprié à spécifier par le fabricant)
S6	Conserver sous ... (gaz inerte à spécifier par le fabricant)
S7	Conserver le récipient bien fermé
S8	Conserver le récipient à l'abri de l'humidité
S9	Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé
S12	Ne pas fermer hermétiquement le récipient
S13	Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux
S14	Conserver à l'écart des ... (matières incompatibles à indiquer par le fabricant)
S15	Conserver à l'écart de la chaleur
S16	Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles - Ne pas fumer
S17	Tenir à l'écart des matières combustibles
S18	Manipuler et ouvrir le récipient avec prudence
S20	Ne pas manger et ne pas boire pendant l'utilisation
S21	Ne pas fumer pendant l'utilisation
S22	Ne pas respirer les poussières
S23	Ne pas respirer les gaz / vapeurs / fumées / aérosols (termes appropriés à indiquer par le fabricant)
S24	Eviter le contact avec la peau
S25	Eviter le contact avec les yeux
S26	En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste
S27	Enlever immédiatement tout vêtement souillé ou éclaboussé
S28	Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec (produits appropriés à indiquer par le fabricant)
S29	Ne pas jeter les résidus à l'égout
S30	Ne jamais verser de l'eau dans ce produit
S33	Eviter l'accumulation des charges électrostatiques
S35	Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes précautions d'usage
S36	Porter un vêtement de protection approprié
S37	Porter des gants appropriés
S38	En cas de ventilation insuffisante, porter un appareil respiratoire approprié
S39	Porter un appareil de protection des yeux / du visage
S40	Pour nettoyer le sol ou les objets souillés par ce produit, utiliser (à préciser par le fabricant)
S41	En cas d'incendie et/ou d'explosion, ne pas respirer les fumées
S42	Pendant les fumigations / pulvérisations, porter un appareil respiratoire approprié (termes appropriés à indiquer par le fabricant)
S43	En cas d'incendie, utiliser ... (moyens d'extinction à préciser par le fabricant. Si l'eau augmente les risques, ajouter "Ne jamais utiliser d'eau")
S45	En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)
S46	En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette
S47	Conserver à une température ne dépassant pas ... °C (à préciser par le fabricant)
S48	Maintenir humide avec ... (moyen approprié à préciser par le fabricant)
S49	Conserver uniquement dans le récipient d'origine
S50	Ne pas mélanger avec ... (à spécifier par le fabricant)
S51	Utiliser seulement dans des zones bien ventilées
S52	Ne pas utiliser sur de grandes surfaces dans les locaux habités
S53	Eviter l'exposition - se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation
S56	Eliminer ce produit et son récipient dans un centre de collecte de déchets dangereux ou spéciaux
S57	Utiliser un récipient approprié pour éviter toute contamination du milieu ambiant
S59	Consulter le fabricant / fournisseur pour des informations relatives à la récupération / au recyclage
S60	Eliminer le produit et le récipient comme un déchet dangereux
S61	Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales / la fiche de données de sécurité
S62	En cas d'ingestion, ne pas faire vomir : consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette
S63	En cas d'accident par inhalation, transporter la victime hors de la zone contaminée et la garder au repos
S64	En cas d'ingestion, rincer la bouche avec de l'eau (seulement si la personne est consciente).

Feuille de résultats

Nom :

Prénom :

Numéro de

poste :

A.1. Titrage direct de l'acide ascorbique par l'ion iodate

Coefficient de variation de la méthode : $CV = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Valeur cible}} = 0,8\%$. Intervalle de validation : 2 écarts-types.

$V_{I_{O_3},1} =$ mL $V_{I_{O_3},2} =$ mL
 $C_{asc,1} =$ ± mol.L⁻¹

A.2. Dosage spectrophotométrique indirect de l'acide ascorbique par l'ion fer(III)

Coefficient de variation de la méthode : $CV = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Valeur cible}} = 2\%$. Intervalle de validation : 2 écarts-types.

Cuve	1	2	3	4	5	S'
A						

$C_{asc,2} =$ ± mol.L⁻¹

A.3 Titrage pH-métrique du PABA par l'ion hydroxyde

Coefficient de variation de la méthode : $CV = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Valeur cible}} = 0,8\%$. Intervalle de validation : 2 écarts-types

Pise d'essai choisie : E = mL

$V_{OH} =$ mL

$C_{PABA} =$ ± mol.L⁻¹

Rapport sur l'épreuve de travaux pratiques de chimie

Rapport établi par M. E. Beauvineau, Mlle H. Carrié et Mlle J-L. Dormieux

L'épreuve de travaux pratique de chimie de cette année avait pour thème les vitamines. La partie expérimentale consistait :

- à doser une solution d'acide ascorbique de deux manières, l'une par titrage direct (iodométrie), l'autre par dosage indirect (spectrophotométrie) ;
- à mettre en évidence une réaction d'isomérisation par CCM ;
- à doser le PABA par titrage acido-basique (suivi pH-métrie).

Le sujet proposé était délibérément long : il couvrait ainsi différents domaines de la chimie, (thermodynamique, cinétique, chimie structurale, chimie organique) permettant à chaque candidat de travailler sur une ou plusieurs parties mieux maîtrisées. Il n'était donc pas attendu de la part des candidats de traiter l'intégralité du sujet

A- Partie expérimentale :

Le jury a constaté que le niveau expérimental de base global des candidats est correct (manipulation de la burette, de la fiole jaugée et de la pipette) et en amélioration depuis quelques années.

Cependant, il est à noter que le soin apporté à la manipulation doit intervenir dès le prélèvement des produits : il faut donc éviter de prélever les réactifs directement dans les flacons. Il est nécessaire de transvaser d'abord dans un bécher propre les solutions à prélever, afin d'éviter de polluer des flacons entiers en cas de problème.

Il est aussi dommage de devoir encore rappeler que le port des lunettes est obligatoire dès lors qu'une manipulation est en cours dans le laboratoire. Il est dangereux pour un candidat de ne pas en porter. De plus, un futur professeur se doit de montrer l'exemple. Toujours concernant la sécurité, les gants doivent aussi être utilisés à bon escient : ils ne doivent pas être portés en continu mais seulement au moment de prélèvement de produits potentiellement toxiques.

Les candidats ont pour la plupart fait des efforts sur le rejet des déchets, mais malheureusement une réflexion plus poussée est attendue : une solution d'acide ascorbique très diluée peut être jetée à l'évier, une solution contenant des ions

métalliques comme les ions fer(II) ou fer(III) doit être jetée dans un bidon de récupération pour métaux lourds, et non dans un bidon pour produits organiques (la quantité d'acide ascorbique étant très faible). Les rejets de l'éluant de CCM (toluène) devaient être jetés dans ce dernier bidon.

Partie A1 : titrage direct de l'acide ascorbique

Cette partie n'a pas été traitée par l'ensemble des candidats. Il est à noter que ce dosage avec suivi colorimétrique, bien que facile à mettre en œuvre, a posé problème lors du choix de l'indicateur coloré. Le choix entre trois indicateurs était donné : la phénolphthaléine, le NET et le thiodène. Le jury attire l'attention des candidats sur le fait que les conditions d'utilisation d'indicateurs classiques doivent être connues de tous.

Partie A2 : dosage spectrophotométrique indirect de l'acide ascorbique par l'ion fer(III)

Un certain nombre de candidats n'utilisent pas d'entonnoir à solide lors du transfert d'un solide dans une fiole jaugée ce qui rend la manipulation particulièrement délicate. Pour l'utilisation de la fiole, les étapes à réaliser successivement sont : la dissolution complète du solide, l'ajustement au trait de jauge puis l'homogénéisation de la solution, la fiole étant fermée avec un parafilm.

Pour le traitement des mesures expérimentales, des ordinateurs sont à la disposition des candidats. Le jury regrette le fait que trop peu de candidats manient aisément les logiciels disponibles (Excel®, Regressi®). En effet, une régression linéaire est bienvenue dans ce type de dosage mais a été trop peu réalisée par les candidats.

Partie A3 : étude d'une isomérisation : l'azobenzène

La CCM est une technique analytique de base et tous les aspects doivent en être maîtrisés. La ligne de dépôt doit être au-dessus du niveau de l'éluant (afin d'éviter la solubilisation des dépôts). Le manque d'organisation de certains candidats leur ont fait oublier leur CCM : certaines CCM étaient donc ininterprétables. Chaque candidat disposait d'un capillaire : il était donc nécessaire de le casser afin de pouvoir réaliser deux dépôts et surtout ne pas réutiliser le même capillaire pour les deux dépôts.

De plus, une fois l'éluion commencée, une cuve à chromatographie ne doit plus être déplacée. Enfin, dès la sortie de la plaque CCM, il est nécessaire de penser à tracer le front de l'éluant pour pouvoir calculer les rapports frontaux. Très peu de candidats ont utilisés la lampe UV pour révéler leur plaque : ceci est regrettable car beaucoup de composés organiques absorbent dans l'UV et ne sont pas détectables à l'œil.

Partie A4 : titrage avec suivi pH-métrique d'un précurseur de la vitamine B9 : le PABA

Cette manipulation a été globalement bien réalisée. Cependant, dans le cadre de cette manipulation, le choix de la prise d'essai était laissé à l'appréciation du candidat. Dans ce cas, il faut alors faire en sorte d'obtenir un volume équivalent compris entre 10 et 15 mL pour une burette fournie de 25 mL, et de pouvoir prélever cette prise d'essai avec une pipette jaugée (aucune pipette jaugée de 15 mL n'étant fournie, cette prise d'essai n'est ici pas adaptée).

La courbe pH-métrique pouvait être tracée à l'aide un logiciel ou sur papier millimétré. Le jury regrette encore une fois le manque d'utilisation de l'outil informatique bien qu'il n'en ait bien évidemment pas tenu compte dans l'appréciation des candidats. Idéalement, cette courbe doit être tracée lors de la manipulation, la détermination de l'équivalence n'en étant que plus aisée.

Le jury rappelle également que, quelle que soit la manière dont le graphique ait été réalisé, il doit contenir un titre décrivant l'expérience réalisée ainsi que la méthode de détermination du volume équivalent décrite explicitement (tangentes tracées, dérivée..).

B- Exploitation des résultats :

Partie B1 : titrage direct de l'acide ascorbique

Les équations des réactions redox mises en jeu ont été souvent écrites de manière fautive ou incomplète, ce qui a entraîné une mauvaise détermination de la valeur de la concentration en acide ascorbique de la solution S.

Le jury attire l'attention des candidats sur les données fournies en fin d'énoncé : en effet, les valeurs des potentiels redox standard fournies étaient utiles.

Partie B2 : dosage spectrophotométrique indirect de l'acide ascorbique par l'ion fer(III)

L'équation de la réaction de l'ion fer(III) sur l'acide ascorbique a généralement été bien traitée. Toutefois, la majorité des candidats n'indique pas qu'une solution absorbe les radiations de couleur complémentaire à sa propre couleur.

Les candidats connaissent l'expression de la loi de Beer-Lambert mais ne se préoccupent pas de l'abscisse du graphe tracé qui n'était pas la concentration de l'espèce absorbante à savoir le complexe fer(II)-phen.

En revanche la question concernant l'intérêt de la dilution de la solution S a été bien traitée.

Partie A3 : étude d'une isomérisation : l'azobenzène

Il n'y a quasiment eu aucune interprétation des CCM. De plus, de nombreux candidats ont fait une confusion sur l'azobenzène : celui fourni était le (E)-azobenzène : beaucoup de candidats ont expliqué que l'azobenzène s'était isomérisé en (E) et en (Z)-azobenzène !

Peu ont calculé les rapports frontaux et encore moins ont expliqué l'ordre de migration : la notion de moment dipolaire et d'interaction avec la silice ne semble pas acquise.

La question portant sur le diagramme de l'énergie en fonction de la coordonnée réactionnelle n'a presque pas été traitée. Enfin, la notion de bibliographie ne semble pas connue des candidats.

Partie A4 : titrage d'un précurseur de la vitamine B9 : le PABA

Le jury a été très surpris de constater que des candidats préparant une agrégation de biochimie ne connaissaient pas la forme zwitterionique d'un acide aminé. Personne n'a su écrire correctement l'équation de titrage.

C- Autour des vitamines :

Partie C1 : chimie structurale

Cette partie a été traitée par l'ensemble des candidats. Les règles de remplissage des orbitales atomiques sont correctement sues.

Le jury souligne le fait que les programmes de l'agrégation changent lors de la prochaine session. La construction des diagrammes d'orbitales moléculaires sera à connaître.

Partie C2 : chimie organique

Cette partie a malheureusement été très peu traitée. Le jury attire l'attention des candidats sur la gestion de l'épreuve : le jury apprécie le fait que les candidats manipulent et exploitent leurs manipulations, mais le temps restant doit être utilisé non pas à traiter le sujet de manière linéaire mais à traiter les domaines dans lesquels les candidats sont plus aisés.

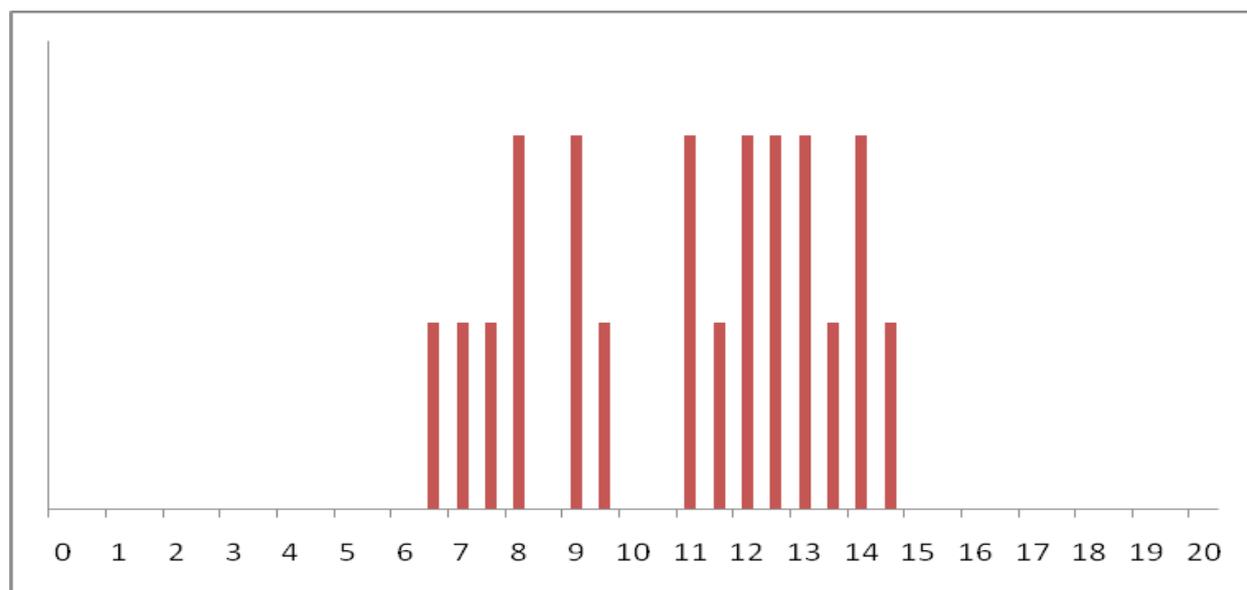
Lors de la prochaine session, la spectroscopie RMN sera au programme de chimie de l'agrégation.

Partie C3 : cinétique et thermodynamique

Les remarques de la partie C2 sont également valables pour cette partie

Bilan

La moyenne de l'épreuve est de 10,9. Les notes se répartissent entre 6,5 et 14,5 selon l'histogramme ci-dessous :



Statistiques

Q = Question

R = Pourcentage de réponses

BR = Pourcentage de bonnes réponses

B.1.

Q	1	2	3	4
R	57	67	52	33
B				
R	70	48	30	54

B.2.

Q	5	6	7	8	9	10	11
R	-	52	43	43	57	57	57
B							
R	-	50	72	20	20	62	88

B.3.

Q	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
R	71	57	48	62	10	57	33	29	24	14	0
B											
R	35	68	43	78	0	83	50	52	60	33	0

B.4.

Q	23	24	25	26	27	28	29	30
R	57	62	52	14	52	71	24	38
B								
R	96	60	60	33	36	31	18	46

C.1. Chimie structurale

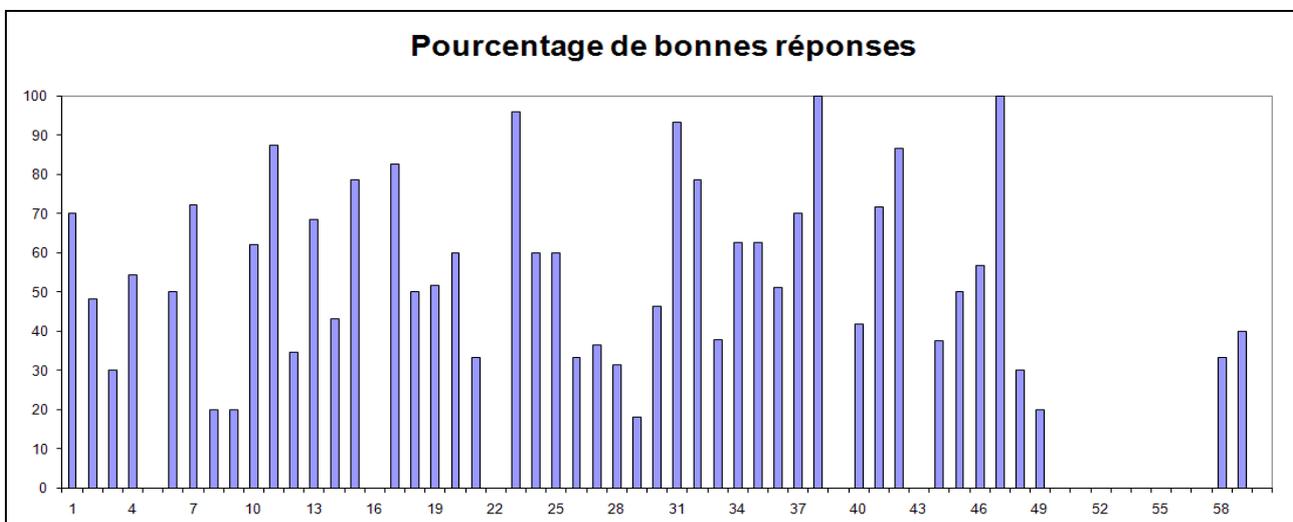
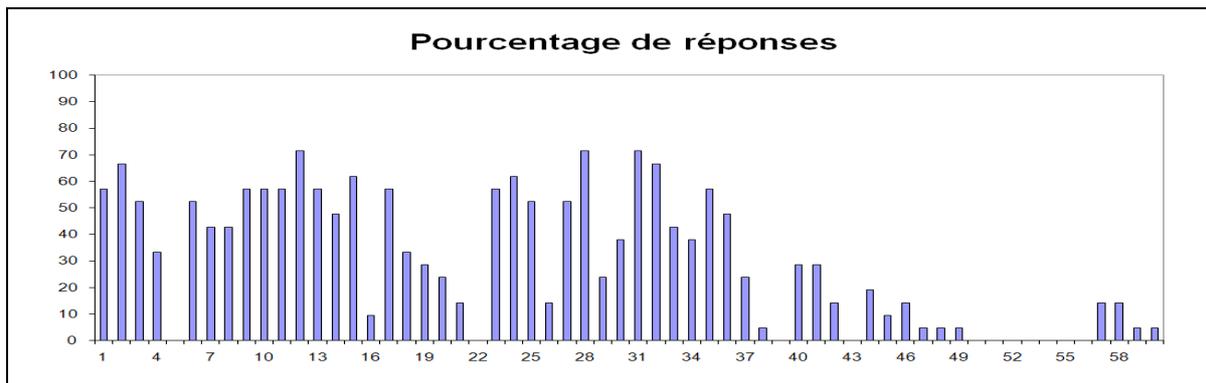
Q	31	32	33	34	35	36	37	38	39
R	71	67	43	38	57	48	24	5	0
B									
R	93	79	38	63	63	51	70	100	0

C.2. Chimie organique

Q	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
R	29	29	14	0	19	10	14	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
B																	
R	42	72	87	0	38	50	57	100	30	20	0	0	0	0	0	0	0

C.3. Cinétique et thermodynamique

Q	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
R	14	14	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
B												
R	0	33	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0



AGRÉGATION EXTERNE DE BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

SESSION 2010

ÉPREUVE PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE

Mobilité et chimiotactisme chez *Escherichia coli*

Introduction

La capacité d'un organisme à se mouvoir par auto-propulsion est appelée mobilité.

Chez les Procaryotes, cette capacité fait appel à différents mécanismes :

- la **nage lisse** (« *swimming* ») résulte de la présence de flagelles ou cils et s'observe dans des milieux liquides ou semi-solides ;
- l'**essaimage** (« *swarming* ») est une alternative à la nage pour certaines bactéries flagellées en milieu solide. Ce phénomène, bien connu chez *Proteus mirabilis*, se traduit par l'invasion de la gélose par des « vagues » successives ou « nappes » ;
- le **glissement** (« *gliding* ») sur des surfaces solides se rencontre chez des bacilles à Gram négatifs non flagellés, souvent entourés de sécrétions visqueuses (slime, EPS...);
- la **contraction ou convulsion** (« *twitching* ») consiste en des mouvements désordonnés et saccadés, et se traduit par un étalement des colonies de *Neisseria*, *Moraxella* et *Acinetobacter*

La nage lisse est le type de mobilité le plus fréquent chez les bactéries.

La structure d'un **flagelle** est décrite dans l'annexe 1.

La mobilité des bactéries peut être orientée, en fonction de la composition du microenvironnement, et résulter d'une fuite devant des substances répulsives ou d'une attraction vers des substances attractives. Cette attraction ou répulsion par un gradient chimique est appelé **chimiotactisme**. Son mécanisme met en jeu un système de régulation complexe à deux composants résumé dans l'annexe 2.

Le sujet aborde différents aspects de la mobilité et du chimiotactisme chez *Escherichia coli* en faisant appel à différentes souches mutantes.

- La **partie A** propose de caractériser la mobilité de trois souches (souche sauvage et mutants délétés de certaines protéines du système flagellaire).
- La **partie B** permet de mettre en évidence le chimiotactisme vis-à-vis de substances répulsives et attractives. De nouveaux mutants seront introduits.
- La **partie C** concerne la chrono-expression du gène *fliC*, codant la flagelline, au cours d'une croissance en milieu non renouvelé.

Avertissements

Les **manipulations** des différentes parties sont **indépendantes** ; il convient d'en mener certaines en **parallèle**.

Il est fortement suggéré de s'intéresser **dès le début** à la **partie C** et de prendre en compte le temps d'incubation pour la **partie B1**. La **partie A1** est à faire **en dernier**.

Dans le sujet, les souches d'*E.coli* sont désignées par une lettre ; une même lettre désigne toujours une même souche.

Cette désignation est indépendante de celle des parties.

TRAVAIL DU PREMIER JOUR

DONNÉES

La linéarité du spectrophotomètre à 600 nm est vérifiée pour une suspension bactérienne dans l'intervalle 0,020 - 0,700 de valeurs d'absorbance.

1 unité d'absorbance à 600 nm correspond à une concentration de $6,0 \cdot 10^8$ *E. coli*.mL⁻¹

PARTIE A

Caractérisation de la mobilité de différentes souches d'*E. Coli*

L'objectif est ici de mettre en évidence la mobilité éventuelle de différentes souches d'*E. coli* par des techniques indirectes après culture.

Cultures

Culture de 18h sur GNi (gélose nutritive inclinée) de trois souches d'*E. coli*, notées **A**, **B**, et **C**

Culture de 18h en bouillon LB des trois mêmes souches d'*E. coli*, notées **A**, **B**, et **C** : 10 mL en tube à vis

Culture de 18h sur GNi d'une souche mobile, notée **T+**

Culture de 18h sur GNi d'une souche immobile, notée **T-**

Milieus de culture

Bouillon **LB** stérile : 50 mL en flacon

Gélose semi-solide **TS 0,3%** en agar : 2 boîtes carrées 120 x 120 (« boîtes à nage »)
[tryptone (10 g.L⁻¹) NaCl (5 g.L⁻¹) agar (3 g.L⁻¹)]

Gélose semi- solide **LA 0,3%** en agar : 50 mL en flacon en surfusion à 60°C
[tryptone (10 g.L⁻¹) extrait de levure (5 g.L⁻¹) NaCl (5 g.L⁻¹) agar (3 g.L⁻¹)]

Réactifs

TTC (chlorure de tétrazolium à 10 mg.mL⁻¹) : 1 mL en microtube de couleur jaune

Matériel spécifique

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Tubes stériles de 15 mL à bouchon violet

Tubes en verre stériles de 5 mm de diamètre, dans un pot

A1- Observation de la mobilité des souches sur « boîte à nage »

MANIPULATIONS

Inoculer les « boîtes à nage » (gélouses **TS 0,3%**) selon les gabarits fournis en **annexe 3**, en respectant le mode opératoire suivant.

Pour chaque souche présentée sur GNi (**A**, **B**, **C**, **T+**, **T-**) :

Piquer la culture avec l'extrémité boutonnée d'une pipette Pasteur.

Transférer les bactéries sur la « boîte à nage » (**TS 0,3%**) en piquant légèrement la surface de la gélose sans enfoncer la pipette.

Incuber à 30°C pendant 18 heures, en prenant soin de **ne pas retourner** les boîtes.

COMPTE-RENDU

1. Schématiser les résultats attendus pour les souches témoins **T+** et **T-**.

A2- Observation de la mobilité par une technique en tube

Le TTC, incolore, donne par réduction bactérienne un produit rouge qui facilitera l'observation.

MANIPULATIONS

A21- Préparation des inocula

Pour chaque souche présentée en bouillon LB (**A, B, C**) :

Préparer en bouillon LB une suspension à environ $1,0 \cdot 10^8$ bactéries.mL⁻¹.

Pour cela :

Mesurer l'absorbance à 600 nm de la culture fournie sur une dilution au 1/5 en bouillon LB.

Préparer environ 2 mL de suspension ajustée dans un tube à hémolyse en bouillon LB.

Contrôler l'ajustage par une mesure de l'absorbance à 600 nm.

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

A22- Préparation du milieu et du matériel

Supplémenter le flacon contenant 50 mL de gélose LA 0,3% en surfusion par du TTC à 100µg.mL⁻¹ final.

Homogénéiser soigneusement.

Pour la suite, travailler séquentiellement, tube après tube, en opérant rapidement pour éviter la prise en masse de la gélose.

Introduire environ 8 mL de gélose préalablement supplémentée dans un tube de 15 mL à bouchon violet.

Introduire immédiatement dans la gélose encore liquide, un tube en verre de 5 mm de diamètre.

Le haut de ce tube doit dépasser de la gélose d'environ 2 cm.

A23- Inoculation

Chaque tube en verre sera inoculé avec une souche différente (**A, B** ou **C**) :

Déposer à l'intérieur du tube en verre 5,0.10⁶ bactéries : le dépôt doit se faire en surface de la gélose à l'intérieur du tube, mais sans introduire le cône dans la gélose.

Recommencer avec les deux autres tubes et les deux autres souches.

Incuber à 30°C pendant 18 heures, bouchon légèrement dévissé.

L'inoculation d'un tube en verre sera réalisée en présence d'un examinateur.

COMPTE-RENDU

2. Présenter l'ensemble des calculs réalisés pour la préparation des suspensions ajustées.
3. Préciser le volume de TTC ajouté à la gélose LA 0,3%.
4. Préciser le volume des inocula déposés à l'intérieur des tubes en verre.

PARTIE B

Mise en évidence du chimiotactisme chez *E. coli*

L'objectif est ici d'observer et d'expliquer le comportement de différentes souches d'*E. coli* vis-à-vis de molécules répulsives ou attractives.

Cultures

Culture de 18h sur GNi (gélose nutritive inclinée) de cinq souches d'*E. coli*, notées **A, B, C, E** et **F**

A, B et **C** sont les mêmes souches que dans les parties précédentes.

Les deux nouveaux mutants, **E** et **F**, ont un flagelle fonctionnel, mais sont affectés au niveau de la voie de signalisation du chimiotactisme.

Milieus de culture

Gélose de **chimiotactisme** (tampon de chimiotactisme + 4% en agar) : 20 mL en flacon en surfusion à 60°C Géloses **LA** (bouillon LB + 1,5% en agar) : 18 boîtes de Pétri

Réactifs

Tampon de chimiotactisme stérile **TpChimio** : 100 mL en flacon
[tampon phosphate pH 7 (10^{-2} mol.L⁻¹) EDTA (10^{-4} mol.L⁻¹)]

L-Leucine à 2 mol.L⁻¹ en TpChimio : 10 mL en flacon

L-Aspartate à $5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ en TpChimio : 1 mL en microtube de couleur verte

Matériel spécifique

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Tubes à hémolyse stériles vides

Billes de verre stériles et récipient de récupération

Microplaque stérile, dont le couvercle a été percé au dessus des puits indiqués et recouvert d'un film adhésif

Capillaires stériles dans un tube à hémolyse

Minipoire d'éjection dans un tube à hémolyse

B1- Répulsion en milieu liquide

L'effet répulsif de la L-leucine est testé pour chacune des souches **A, B, C, E** et **F**.

MANIPULATIONS

B11- Préparation des milieux répulsifs

Opérer rapidement pour éviter la prise en masse de la gélose.

Préparer six tubes à hémolyse, numérotés de 1 à 6, contenant chacun 2 mL de gélose de chimiotactisme à 2% en agar et 1 mol.L⁻¹ de L-Leucine (en concentrations finales). Introduire la L-Leucine dans les tubes avant la gélose.

Préparer un tube à hémolyse, numéroté 7, contenant 2 mL de gélose de chimiotactisme à 2% en agar final.

Laisser reposer les tubes ainsi préparés 30 minutes à l'écart du bec.

B12- Préparation des inocula

Homogénéiser délicatement les suspensions bactériennes (sans utiliser de vortex).

Pour chaque souche présentée sur GNi (**A, B, C, E** et **F**) :

Préparer un tube à essai contenant 6 mL de tampon de chimiotactisme.

À l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, prélever délicatement la culture dans la zone située juste au dessus de l'eau de condensation, en bas de la pente.

Plonger la pipette dans le tampon de chimiotactisme ; laisser diffuser les bactéries sans trop agiter la pipette, jusqu'à obtenir une suspension dont le trouble modéré est nettement visible.

Mesurer l'absorbance à 600 nm sur 1 mL de la suspension obtenue.

Ajuster le reste de la suspension bactérienne à une densité cellulaire comprise entre $8,0 \cdot 10^7$ et

$1,0 \cdot 10^8$ bactéries.mL⁻¹. Le volume de la suspension ajustée doit être d'au moins 5 mL.

Contrôler l'ajustage par mesure de l'absorbance à 600 nm.

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

B13- Test de répulsion

Déposer délicatement, à la surface des milieux répulsifs solidifiés, 2 mL de suspension bactérienne ajustée (ou de tampon de chimiotactisme), en respectant la répartition suivante :

- Tube 1 : suspension **A**
- Tube 2 : suspension **B**
- Tube 3 : suspension **C**
- Tube 4 : suspension **E**
- Tube 5 : suspension **F**
- Tube 6 : **TpChimio**
- Tube 7 : suspension **A**

Laisser les tubes à température ambiante pendant 2 heures 30.

Observer la phase liquide au contact de la gélose.

Présenter les tubes de répulsion à un examinateur accompagnés du compte-rendu de l'observation.

COMPTE-RENDU

5. Présenter l'ensemble des calculs réalisés pour la préparation des suspensions ajustées.
6. Présenter le mode opératoire pour la préparation des sept tubes de milieu répulsif.
7. Préciser les rôles des tubes 6 et 7.
8. Présenter et analyser les résultats obtenus.
Formuler une hypothèse sur la nature de la mutation pour les souches **E** et **F**.

B2- Attraction en tube capillaire

L'effet chimioattractant d'une molécule vis-à-vis d'une souche bactérienne peut être évalué en immergeant un tube capillaire contenant cette molécule dans la suspension bactérienne et en dénombrant après une période de contact les cellules entrées dans le capillaire.

On se propose d'étudier la faisabilité d'un mode opératoire en microplaque permettant de réaliser plusieurs tests en parallèle.

On utilise comme chimioattractant le L-aspartate et comme bactéries les souches **A** et **E**.

PLAN D'EXPÉRIENCE		COLONNE 2	COLONNE 5	COLONNE 8
LIGN E C	Suspension à introduire dans les puits	Suspension A	Suspension A	Suspension E
	Solution de charge du capillaire	L-Aspartate à 5.10^{-3} mol.L ⁻¹	L-Aspartate à 5.10^{-3} mol.L ⁻¹	L-Aspartate à 5.10^{-3} mol.L ⁻¹
	Temps de contact	60 minutes	30 minutes	30 minutes
LIGN E F	Suspension à introduire dans les puits	Suspension A	Suspension A	Suspension E
	Solution de charge du capillaire	Tampon de chimiotactisme	Tampon de chimiotactisme	Tampon de chimiotactisme
	Temps de contact	60 minutes	30 minutes	30 minutes

MANIPULATIONS

B21- Préparation des inocula

Homogénéiser délicatement les suspensions bactériennes (sans utiliser de vortex).

Pour chaque souche présentée sur GNi (**A** et **E**) :

Préparer un tube à hémolyse contenant 2 mL de tampon de chimiotactisme.

À l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, prélever délicatement la culture dans la zone située juste au dessus de l'eau de condensation, en bas de la pente.

Plonger la pipette dans le tampon de chimiotactisme ; laisser diffuser les bactéries sans trop agiter la pipette, jusqu'à obtenir une suspension dont le trouble modéré est nettement visible.

Mesurer l'absorbance à 600 nm sur 1 mL de la suspension obtenue.

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

Ajuster le reste de la suspension bactérienne à une absorbance à 600 nm égale à 0,100.

B22- Préparation de la microplaque

Avant de déposer les suspensions bactériennes dans les puits :

Pour chaque puits destiné à recevoir une suspension bactérienne, percer le film adhésif au niveau du trou du couvercle avec une aiguille de même diamètre que le capillaire.

Utiliser un capillaire vide pour vérifier (avec précaution) que le diamètre de la perforation est suffisant pour son passage, tout en en assurant un maintien correct.

Les puits situés en A11 et A12 peuvent être utilisés pour des essais de perçage du film et de mise en place des capillaires.

Les puits situés en lignes C et F de la colonne 11 constituent des puits de secours.

B23- Distribution en microplaque des suspensions bactériennes

Déposer 200 μ L de suspension ajustée dans chaque puits de la microplaque selon le plan d'expérience fourni.

B24- Mise en place des capillaires

Chaque puits préalablement inoculé recevra un capillaire chargé, comme indiqué dans le plan d'expérience.

Pour cela :

Charger le capillaire en trempant une de ses extrémités dans la solution de charge adéquate (L-Aspartate ou tampon de chimiotactisme). Laisser monter la solution de charge dans le capillaire (sur environ 2 cm).

Égoutter l'extrémité du capillaire contre le bord du récipient contenant la solution de charge.

Positionner avec précaution le capillaire à l'emplacement prévu dans la microplaque : l'amener au contact du fond du puits puis le remonter légèrement.

La charge et la mise en place d'un capillaire chargé seront réalisées en présence d'un examinateur.

Placer la microplaque derrière le bec, distante de 10 cm environ.

B25- Récolte des capillaires

Préparer au préalable une série de tubes à hémolyse contenant, pour chaque capillaire :

1 mL de tampon de chimiotactisme pour la récupération du contenu du capillaire. Ce tube sera dénommé « éjectat ».

0,9 mL de tampon de chimiotactisme pour la dilution 10^{-1} de l'éjectat.

0,9 mL de tampon de chimiotactisme pour la dilution 10^{-2} de l'éjectat.

À la fin du temps de contact défini dans le plan d'expérience :

Retirer délicatement le capillaire et le placer dans le tube à hémolyse prévu pour la récupération de l'éjectat, sans toucher le tampon.

Introduire l'extrémité effilée de la minipoire dans l'extrémité supérieure du capillaire.

Éjecter le contenu du capillaire dans le tampon de chimiotactisme en pressant fermement le bulbe de la minipoire.

Réaliser les 2 dilutions décimales successives en tampon de chimiotactisme.

Une série de dilutions sera réalisée en présence d'un examinateur.

À l'aide de billes stériles, étaler en surface des boîtes de gélose LA, 100 μ L de l'éjectat et de ses dilutions, selon le mode opératoire suivant :

Répartir 5 à 10 billes par boîte.

Effectuer des translations brusques, alternées avec des rotations de la boîte.

Récupérer les billes dans le récipient de récupération contenant de l'eau de Javel.

Étaler immédiatement après le dépôt sur boîte de l'inoculum.

Incuber à 30°C pendant 18 heures.

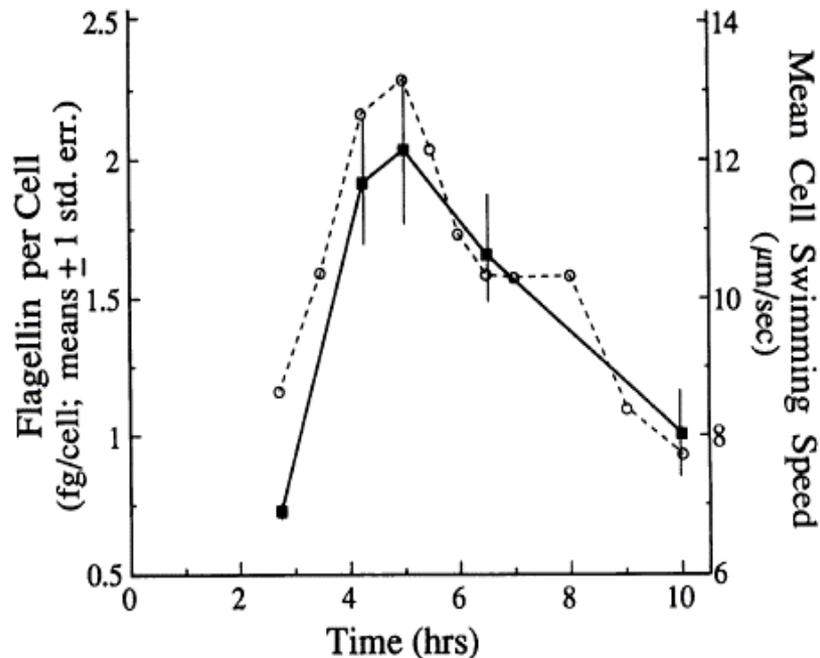
COMPTE-RENDU

9. Présenter l'ensemble des calculs réalisés pour la préparation des suspensions ajustées.
10. Si 1% des bactéries présentes dans le puits montent dans le capillaire, montrer que l'on obtiendra 120 colonies sur la boîte correspondant à la dilution 10^{-2} de l'éjectat.
11. Discuter des différences attendues entre les lignes C et F, pour une souche donnée.

PARTIE C

Chrono-expression chez *E. coli* du gène *fliC* codant la flagelline

Des données bibliographiques, dont un extrait est donné ci-dessous, font état d'une variation de la mobilité selon la phase de croissance.



Flagellin protein per cell as a function of time after culture initiation.

- open circles : mean cell swimming speed data in micrometre per second
- filled squares : amount of flagellin per cell in femtograms

L'objectif est ici de vérifier que le gène *fliC*, codant la flagelline, est exprimé différemment selon la phase de croissance.

Dans la souche **K** d'*E. coli*, le gène endogène de la β -galactosidase a été délété et un nouveau gène *lacZ* a été introduit sous le contrôle du promoteur du gène *fliC*.

L'activité β -galactosidase chez cette souche sera mesurée régulièrement au cours du suivi de sa croissance. Les cellules seront lysées par addition de BCTMA (bromure de cétyl-triméthylammonium), détergent non dénaturant, et l'activité sera déterminée en méthode enzymatique « 2 points » en utilisant un substrat chromogène, l'ONPG (orthonitrophényl- β galactoside).

Culture

Culture agitée de 18h à 36°C en LB d'*E. coli* **K** : 10 mL en erlenmeyer à vis

Milieux de culture

Bouillon **LB** stérile : 50 mL en erlen de 150 mL, préchauffé à 36°C
50 mL en flacon (le même que pour la **partie A**)

Réactifs

Chloramphénicol à 0,1% : 3 mL en tube à hémolyse

BCTMA à 6 mg.mL⁻¹ : 1 mL en microtube de couleur orange (à conserver à température ambiante)

ONPG-Phos : 20 mL en flacon

[*ONPG* (10 mmol.L⁻¹) *MgCl*2 (1,5 mmol.L⁻¹) *β*-mercaptoéthanol (15 mmol.L⁻¹)
1) en tampon phosphate de sodium pH 7 (0,05 mol.L⁻¹)]

Na₂CO₃ 1 mol.L⁻¹ + EDTA 4 mmol.L⁻¹ : 20 mL en flacon

Matériel spécifique

Chronomètre

Bain thermostaté à 36°C agité, équipé d'un portoir adapté aux erlenmeyers de culture

Bain thermostaté à 36°C non agité, équipé d'un portoir pour tubes à hémolyse

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Spectrophotomètre réglé à 420 nm

MANIPULATIONS

C1- Culture de la souche K

C11- Démarrage de la culture

Ensemencer l'erlenmeyer contenant 50 mL de bouillon LB préchauffé à 36°C avec 3 mL de préculture.

Réaliser immédiatement le prélèvement à t_0 (*voir C12 pour la préparation du tube de prélèvement*).

Incuber l'erlenmeyer en bain thermostaté à 36°C sous agitation.

Placer la préculture dans la glace.

C12- Prélèvements

Préparer au préalable une série de tubes à hémolyse contenant 200 µL de chloramphénicol à 0,1%. Placer les tubes en attente dans la glace.

Au temps t_0 , puis **toutes les 30 minutes pendant 3 heures 30**, prélever 2 mL de culture et les transférer dans les tubes à hémolyse contenant le chloramphénicol.

Utiliser pour les prélèvements une même pipette à usage unique de 2 mL restant dans l'erien.

Effectuer de manière identique un prélèvement de la préculture fournie.

Mélanger et placer dans la glace.

Un prélèvement sera réalisé en présence d'un examinateur.

C2- Suivis de la croissance et de l'activité β -galactosidase

L'opération C21 est à réaliser pour la préculture et pour tous les prélèvements de la culture.

Les opérations C22 et C23 sont à réaliser pour la préculture et pour les prélèvements de la culture à partir du temps 60 minutes.

C21- Quantification de la biomasse par absorptiométrie

Mesurer l'absorbance à 600 nm de chaque prélèvement contre du milieu LB, sur une dilution appropriée.

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

C22- Lyse chimique des bactéries

Introduire dans un microtube 500 µL de prélèvement et 50 µL de BCTMA.

Vortexer pendant 15 secondes.

Laisser 5 minutes dans la glace.

Vortexer à nouveau pendant 15 secondes.

C23- Détermination de l'activité enzymatique

Pour chaque lysat obtenu précédemment :

Introduire dans un tube à hémolyse :

1 mL de solution ONPG-Phos préchauffée 5 minutes environ à 36°C

200 µL de lysat

Incuber à 36°C pendant un temps Δt minutes.

Arrêter la réaction par ajout de 1 mL de Na_2CO_3 à 1 mol.L⁻¹.

Arrêter la réaction dès l'apparition dans le milieu réactionnel d'une coloration nettement visible, en restant

toutefois dans des limites de 2 à 15 minutes pour le temps d'incubation Δt à 36°C, et en mesurant

précisément ce temps d'incubation.

Laisser le contenu de la cuve reposer environ 5 minutes avant la lecture de l'absorbance.

Lire l'absorbance à 420 nm contre la solution ONPG-Phos.

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

COMPTE-RENDU

12. Commenter l'extrait bibliographique fourni.
13. Exposer l'intérêt du suivi de l'activité β -galactosidase dans le cadre de l'étude réalisée ici.
14. Justifier l'ajout de chloramphénicol dans les prélèvements.
15. Discuter la pertinence de la composition du « blanc » utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique.

Tous les résultats, bruts et issus d'un calcul, seront regroupés dans un seul tableau.

16. Calculer pour chaque temps et pour la préculture :

$$\text{« } \Delta A_{420\text{nm}} \text{ normalisée »} = \frac{A_{420\text{nm}} \times 1000}{\Delta t} \times \frac{1}{A_{600\text{nm}}}$$

17. Tracer sur un même graphe :

- la courbe de croissance ;
- la courbe « $\Delta A_{420\text{nm}}$ normalisée » en fonction du temps.

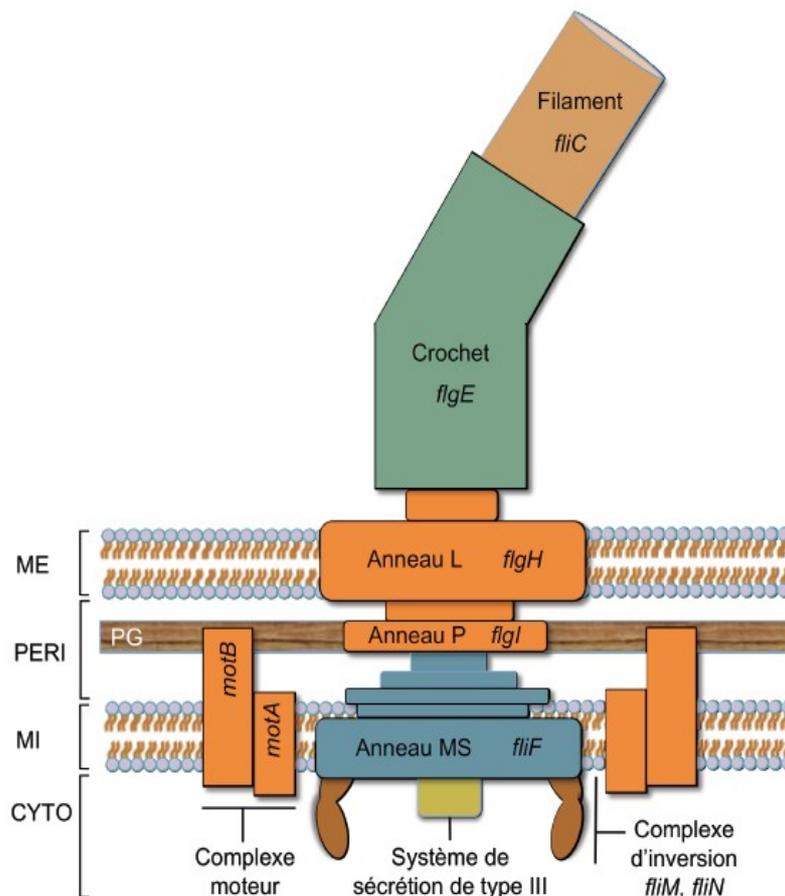
Faire apparaître sur ces courbes les données correspondant à la préculture de 18h.

18. Commenter la courbe de croissance, et en déterminer les paramètres cinétiques.
19. Commenter la courbe « $\Delta A_{420\text{nm}}$ normalisée » en fonction du temps et conclure quant à l'objectif visé.

Le sujet du jour 1 est à remettre avec la copie.

ANNEXE 1

Structure simplifiée d'un flagelle bactérien chez *E. coli*



ME membrane externe

PERI périplasme

PG peptidoglycane

MI membrane interne

CYTO cytoplasme

Les flagelles, ou cils, sont de longs appendices hélicoïdaux et flexibles (de 6 à 20 μm de long, et de 12 à 30 nm de diamètre), composés de nombreuses protéines parmi lesquelles les protéines FliC (ou flagelline) qui constituent le filament flagellaire, et les protéines Mot (ou moteur) qui composent le complexe moteur du corpuscule basal. C'est la rotation des anneaux de ce corps basal qui assure la propulsion bactérienne, à l'instar des hélices d'un bateau.

Selon les bactéries, le nombre de flagelles est variable.

La localisation du ou des flagelles sur le corps bactérien, ou ciliature, conditionne le type de mouvement.

Le sens de rotation des flagelles joue un rôle majeur :

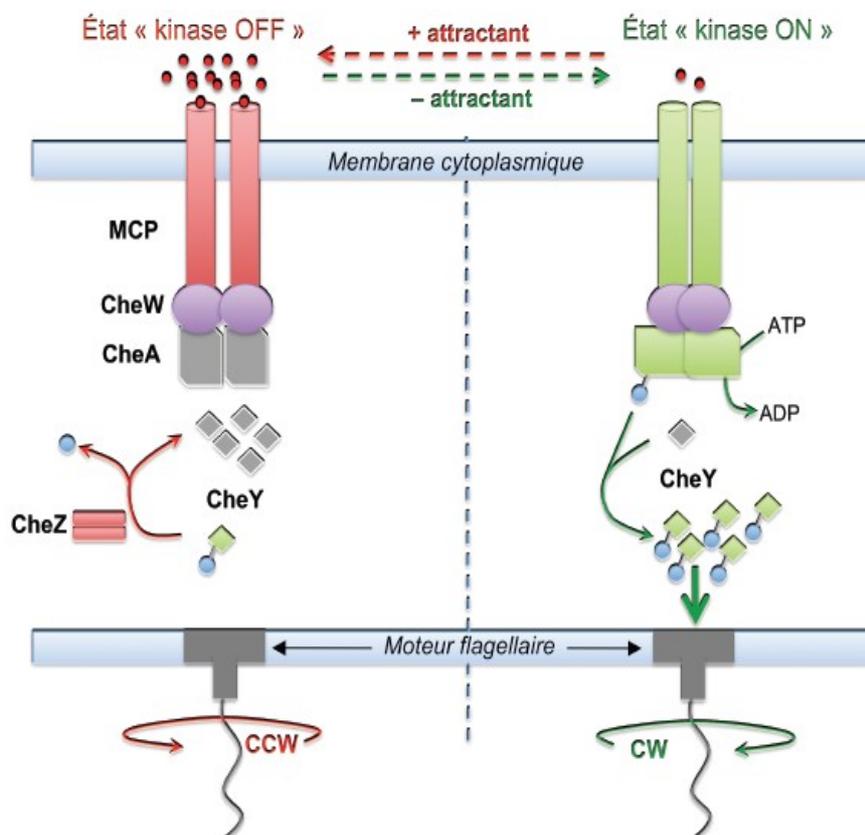
- lorsque les flagelles tournent dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (CCW, « *counterclockwise* »), ils sont en faisceau, et la bactérie se déplace selon un mouvement relativement rectiligne ;
- si le sens de rotation est inversé (CW, « *clockwise* »), les flagelles s'étaient, et la bactérie réalise des changements directionnels aléatoires, ou culbutes (« *tumbling* »).

Lorsque la rotation CCW est rétablie, la cellule se déplace alors dans une nouvelle direction.

Cette capacité des bactéries de changer de direction, par inversion du sens de rotation du flagelle (CCW ou CW) est une conséquence de la voie de signalisation du chimiotactisme sur le complexe d'inversion (cf. **annexe 2**).

ANNEXE 2

Représentation simplifiée d'un système à deux composants pour le chimiotactisme chez *E. coli*



Le chimiotactisme est assuré par un système de phosphorelais à deux composants : un senseur et un régulateur. Chez *E. coli* :

- le **senseur** est constitué du complexe CheW / CheA, associé au chimiorécepteur transmembranaire spécifique MCP (*Methyl-accepting Chemotaxis Proteins*) ;
- le **régulateur** est la protéine CheY, qui contrôle le sens de rotation de l'effecteur, le moteur flagellaire. CheY est la cible de la kinase CheA. CheZ déphosphoryle CheY.

Il existe pour le complexe MCP / CheW / CheA deux conformations en équilibre :

- une conformation « kinase ON » favorisant l'autophosphorylation de la kinase CheA (qui détecte le changement de conformation du chimiorécepteur grâce à CheW) ;
- et une conformation « kinase OFF » qui diminue l'autophosphorylation de CheA.

Une concentration croissante d'attractant déplace l'équilibre vers l'état « kinase OFF » ; une diminution de la concentration d'attractant ou une augmentation de la concentration de substance répulsive déplace l'équilibre vers l'état « kinase ON ».

Le passage de l'état « kinase OFF » vers l'état « **kinase ON** » augmente l'activité kinase de CheA envers CheY. CheY phosphorylé se fixe alors sur le complexe d'inversion du moteur flagellaire (FliM et FliN, cf. **annexe 1**), entraînant sa **rotation dans le sens « clockwise » CW** ce qui conditionne un changement directionnel aléatoire (« *tumbling* », ou **culbute**). La rotation « *counter-clockwise* » CCW, le comportement par défaut, permet à la bactérie de nager dans une direction relativement rectiligne.

Lorsqu'une bactérie se déplace en remontant le gradient d'une molécule attractive, la probabilité que CheY soit phosphorylé diminue : la nage reste directionnelle (CCW), et la culbute (CW) n'intervient que très rarement. En revanche, lorsqu'une bactérie s'éloigne d'un attractant, ou si elle se dirige accidentellement vers une molécule répulsive, la culbute intervient souvent, jusqu'à ce que le mouvement soit réorienté correctement : on observe une « fuite » de la bactérie.

ANNEXE 3

Gabarit pour le dépôt des souches sur les « boîtes à nage » (partie A1)



AGRÉGATION EXTERNE DE BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

SESSION 2010

ÉPREUVE PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE

TRAVAIL DU DEUXIÈME JOUR

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

PARTIE A

Caractérisation de la mobilité de différentes souches d'*E. coli*

Cette caractérisation effectuée par des techniques indirectes après culture sera confirmée et précisée pour la souche **A** par des techniques directes d'observation microscopique. Des résultats d'expériences complémentaires de western blot seront également analysés.

Cultures

Culture de 18h sur GNi (gélose nutritive inclinée) d'*E. coli*, notée A

Réactifs

Mordant : 10 mL en flacon

- solution aqueuse de phénol à 5% 5 mL
- acide tannique poudre 2 g
- solution aqueuse saturée d'aluminium potassium sulfate 5 mL

Violet : 2 mL en tube à hémolyse

[solution aqueuse saturée de violet cristal en éthanol 95%]

Eau physiologique stérile : 1 tube à vis

Matériel spécifique

Lames de verre et lamelles

MANIPULATIONS

A1- Observation de la mobilité des souches sur « boîte à nage »

Observer les halos autour des points d'inoculation.

A2- Observation de la mobilité par une technique en tube

Cette technique est une adaptation de celle de Craigie.

Observer les trois tubesensemencés la veille.

COMPTE-RENDU

20. Décrire les résultats obtenus en A1 et proposer une interprétation.
21. Décrire et interpréter les résultats obtenus en A2.
22. Conclure sur les phénotypes des trois souches **A**, **B**, et **C**.

A3- Observation de la mobilité à l'état frais

MANIPULATIONS

À partir de la culture en GNi de la souche A, réaliser une observation microscopique à l'état frais selon le mode opératoire suivant :

Déposer une petite goutte d'eau stérile sur une lame.

À l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, prélever délicatement la culture dans la zone située juste au dessus de l'eau de condensation, en bas de la pente.

Plonger la culture prélevée dans la goutte d'eau sans remuer la pipette.

Laisser les bactéries diffuser dans la goutte pendant 15 secondes.

Recouvrir d'une lamelle.

Observer à l'objectif « x40 ».

Montrer à un examinateur l'observation microscopique avec son compte-rendu.

COMPTE-RENDU

23. Décrire les résultats de l'observation, en relation avec la technique de préparation et la thématique générale de l'étude.

A4- Coloration de flagelles

Il s'agit ici de mettre en oeuvre une technique de coloration rapide.

MANIPULATIONS

A41- Préparation du colorant

Transférer 1 mL de « violet » dans le flacon contenant le « mordant ».

Homogénéiser et laisser reposer 5 minutes avant utilisation.

A42- Réalisation du frottis

À partir de la culture en GNi de la souche A, réaliser un frottis selon le mode opératoire suivant :

Déposer une petite goutte d'eau stérile à une des extrémités d'une lame.

À l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, prélever délicatement la culture dans la zone située juste au dessus de l'eau de condensation, en bas de la pente.

Plonger la culture prélevée dans la goutte d'eau sans remuer la pipette.

Laisser les bactéries diffuser dans la goutte pendant 15 secondes.

Étirer le frottis sur toute la lame à l'aide de l'effilure de la pipette Pasteur.

Sécher et fixer le frottis à la chaleur.

A43- Réalisation de la coloration de flagelles

Poser la lame sur le cavalier au-dessus du bac à coloration.

Prélever le colorant en surface du flacon à l'aide d'une pipette Pasteur.

Recouvrir totalement le frottis de colorant.

Laisser colorer 15 minutes.

Rincer à l'eau distillée.

Sécher délicatement la lame.

Observer à l'objectif « x100 » sous huile à immersion.

Montrer à un examinateur l'observation microscopique avec son compte-rendu

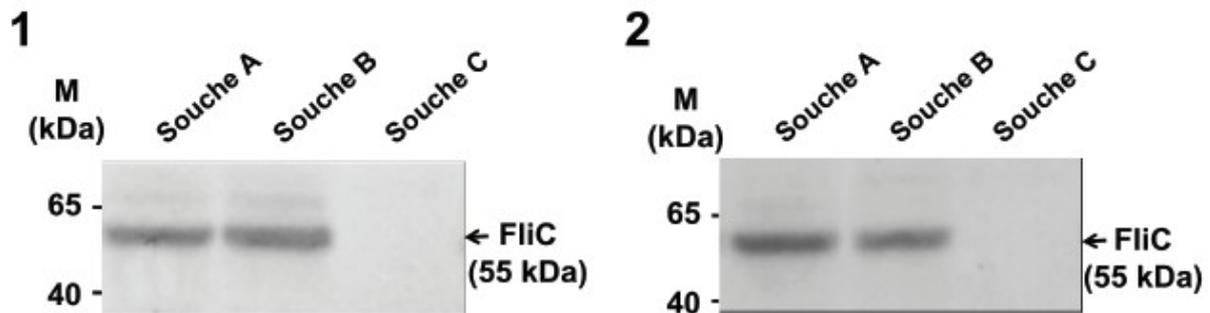
COMPTE-RENDU

24. Justifier l'utilisation du « mordant ».

25. Décrire le résultat de l'observation.

A5- Analyse des souches en western blot

La figure ci-dessous représente le résultat d'une immunodétection de la flagelline (FliC) à partir de deux fractions d'extraits cellulaires des 3 souches **A**, **B** et **C**.



Le synoptique de l'expérience réalisée sur chaque souche est le suivant :

<ul style="list-style-type: none"> - Obtention d'une suspension ajustée - Détachement des flagelles à l'aide d'un mixeur de laboratoire - Séparation des flagelles et des cellules par centrifugation 	
<p>Fraction 1 : Flagelles</p> <ul style="list-style-type: none"> - Concentration des protéines - SDS-PAGE - Transfert sur membrane de nitrocellulose - Révélation spécifique par un anticorps anti-flagelline 	<p>Fraction 2 : Cellules</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lyse par la chaleur - SDS-PAGE - Transfert sur membrane de nitrocellulose - Révélation spécifique par un anticorps anti-flagelline

COMPTE-RENDU

26. Indiquer l'intérêt de l'analyse de la fraction 2.
27. Analyser les résultats obtenus.
28. À partir de l'ensemble des résultats de la partie A, caractériser les souches **A**, **B** et **C**, vis-à-vis de leur mobilité éventuelle

PARTIE B

Mise en évidence du chimiotactisme chez *E. coli*

Il existe différents types de récepteurs MCP (cf. **annexe 2**) chez *E. coli* qui reconnaissent spécifiquement différentes molécules attractives ou répulsives.

NOM DU RÉCEPTEUR MCP	MOLÉCULES RECONNUES PAR LE RÉCEPTEUR	
	ATTRACTIVES	RÉPULSIVES
Tar	Maltose, Aspartate, Glutamate	Ni ²⁺ , Co ²⁺
Tsr	Sérine, Alanine, Glycine	Leucine
Trg	Ribose, Galactose, Glucose	Phénol
Tap	Dipeptides	
Aer	Oxygène	

MANIPULATIONS

B2- Attraction en tube capillaire

Observer toutes les boîtes.

Compter les colonies sur les dilutions appropriées.

COMPTE-RENDU

29. Présenter l'ensemble des résultats des dénombrements sous forme d'un tableau.

30. Analyser ces résultats de manière méthodique.

31. Conclure quant à la faisabilité du mode opératoire utilisé.

32. À partir de l'ensemble des résultats et des données de la partie B, caractériser les souches **A, B, C, E et F**, vis-à-vis du chimiotactisme.

Ce sujet a été proposé par Lucile TIGER, Christophe BELOIN, Fabien CÉZARD et Daniel LONCLE.

Bibliographie

Chemotaxis in bacteria. Julius Adler.

Science (1966), Volume 153, Number 737, p. 708-16.

An overview on bacterial mobility detection. Ashabil Aygan and Burhan Arikan.

International Journal of Agriculture and Biology (2007), Volume 9, Number 1, p. 193-196.

Negative chemotaxis in Escherichia coli. Wung Wai Tso and Julius Adler.

Journal of Bacteriology (1974), Volume 118, Number 2, p. 396-398.

A modified capillary assay for chemotaxis. Guocheng Han and Joseph J. Cooney.

Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (1993), Volume 12, Number 6, p. 396-398.

Multiple factors underlying the maximum motility of Escherichia coli as cultures enter post-exponential growth. Charles D. Amsler, M. Cho, and P. Matsumara

Journal of Bacteriology (1993), Volume 175, Number 19, p. 6238-6244.

Staining bacterial flagella easily, Margaret E. Heimbrook. Wen Lan L. Wang and Gail Campbell.

Journal of Clinical Microbiology (1989), Volume 27, Number 11, p. 2612-2615.

Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. Gerald L. Hazelbauer, Joseph J. Falke and John S. Parkinson.

Trends in Biochemical Sciences (2008), Volume 33, Number 1, p. 9-19.

Stimulus response coupling in bacterial chemotaxis: receptor dimers in signalling arrays.

Mikhail N. Levit, Yi Liu and Jeffry B. Stock.

Molecular Microbiology (1998), Volume 30, Number 3, p. 459-66.

Les souches d'*E. coli* **A, B, C, E, et F** utilisées dans ce sujet sont issues de la Keio Collection.

RAPPORT SUR L'ÉPREUVE DE TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Établi par Lucile TIGER, Christophe BELOIN, Fabien CÉZARD et Daniel LONCLE

Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : 10,5.

Meilleure note : 14,9 ; note la plus basse : 06,6.

13 notes sur 21 (62%) sont supérieures ou égales à 10.

Le sujet s'articulait sur une thématique microbiologique classique : la mobilité et le chimiotactisme. Il comportait trois parties de difficultés variables, mais faisant toujours appel à des savoir-faire techniques de base.

Certaines manipulations étaient toutefois moins classiques, mais elles n'ont cependant pas dérouté les candidats qui se sont montrés concentrés et motivés.

Il convenait, comme les années précédentes, de bien gérer les temps d'attente et le parallélisme de certaines opérations.

La préparation des suspensions ajustées a parfois été difficile ; il convenait d'opérer avec méthode et rigueur, sans oublier de prendre en compte, dans le calcul, le volume de suspension prélevé pour la mesure au spectrophotomètre.

Rappelons que les cuves de spectrophotomètre doivent être par sécurité obturées par du parafilm et que leur contenu ne peut être récupéré ensuite.

Rappelons également que lorsque le sujet indique qu'une opération doit être réalisée devant un examinateur, il convient d'en montrer l'intégralité, afin que le jury puisse valider le savoir-faire technique impliqué.

Pour les comptes-rendus, la lisibilité, qui permet de retrouver rapidement et sans ambiguïté l'information, et la pertinence, à savoir la réponse appropriée à la question posée, sont des qualités majeures.

Rappelons que les tableaux sont des outils précieux pour la structuration et la lisibilité de la présentation des résultats.

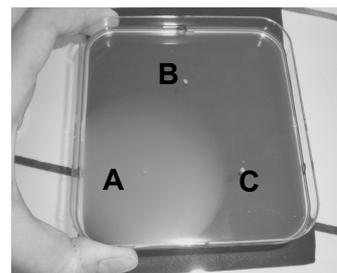
PARTIE A **Caractérisation de la mobilité de différentes souches d'*E. coli***

Cette partie s'intéressait à la mobilité, indépendamment de son orientation, en faisant appel à différentes techniques simples et visuelles.

Il convenait de prendre en compte, pour leur bonne exécution, la fragilité mécanique des flagelles.

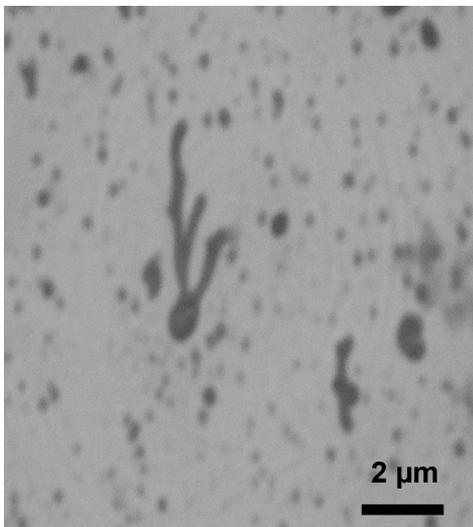
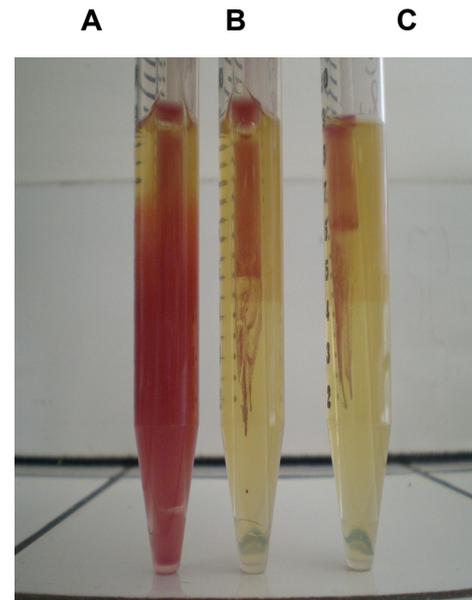
Il est regrettable que certains candidats aient omis de réaliser au jour 1 des manipulations d'exécution rapide et donnant de manière sûre des résultats faciles à interpréter.

Peu de candidats ont observé la présence de deux halos sur la « boîte à nage », interprétable par l'utilisation métabolique et l'épuisement successifs de deux acides aminés.



La mobilité en tube était une adaptation de la technique de Craigie, permettant de montrer qu'une souche mobile (souche A) inoculée à l'intérieur d'un tube de verre immergé dans une gélose semi-solide, pouvait se déplacer et sortir du tube ; une souche immobile (souches B et C) restait dans la partie supérieure du tube intérieur.

L'addition de TTC permettait la visualisation du déplacement des bactéries par une coloration rouge.



Le sujet proposait également au jour 2 une coloration des flagelles selon un protocole rapide, à l'aide d'un réactif permettant d'épaissir les flagelles avant de les colorer au cristal violet. La réussite de cette manipulation était directement conditionnée par la conservation des flagelles sur le corps bactérien, et dépendait donc d'une préparation précautionneuse du frottis.

Il convenait de dresser un bilan des résultats obtenus et déduits de l'analyse d'un extrait bibliographique (western blot) pour compléter l'analyse et la caractérisation des souches, et émettre des hypothèses simples, en référence à l'annexe 1, sur la nature moléculaire des mutations des souches B et C. La souche A présentait un phénotype sauvage.

PARTIE B Mise en évidence du chimiotactisme chez *E. coli*

Cette partie s'intéressait à l'orientation de la mobilité par chimiotactisme négatif et positif.

On étudiait d'abord l'effet répulsif en milieu liquide de la leucine à forte concentration. Pour la lecture délicate de ce test, il convenait :

- d'avoir ajusté correctement les suspensions cellulaires,
- de respecter le temps de lecture,

- de s'appuyer sur les témoins montrant un trouble et une absence de trouble,
- de chercher dans de bonnes conditions d'observation la disparition du trouble au contact de la gélose contenant le répulsif.

La technique d'attraction en tube capillaire était une adaptation de la technique classique d'Adler qui s'inscrit dans la tendance actuelle des expériences en « arrays » permettant de réaliser simultanément de nombreux tests en parallèle.

Lors de cette manipulation inhabituelle et d'exécution délicate, les candidats ont eu l'occasion de montrer leur faculté d'adaptation.

Pour l'analyse des résultats, il convenait d'abord de s'assurer de la bonne répétabilité des dénombrements obtenus pour les capillaires témoins contenant le tampon sans aspartate.

Le bilan des résultats et les hypothèses quant à la caractérisation des souches devaient intégrer les résultats de la partie précédente, à savoir l'immobilité des souches B et C, ainsi que la donnée indiquant que les souches E et F possédaient des flagelles fonctionnels.

PARTIE C Chrono-expression chez *E. coli* du gène *fliC* codant la flagelline

Cette partie consistait à confirmer des données bibliographiques suggérant que l'expression du gène *fliC* est maximale en fin de phase exponentielle, en utilisant le gène *lacZ* comme gène rapporteur. L'objectif de cette partie a généralement été bien compris par les candidats.

Cependant certains ont omis d'analyser la préculture fournie, comme indicateur d'une phase stationnaire prolongée.

Rappelons que lors d'un suivi de croissance, il faut anticiper les dilutions à réaliser pour une mesure au spectrophotomètre respectant la limite de linéarité imposée, mais qu'un facteur de dilution excessif introduit une erreur expérimentale supplémentaire.

Comme l'année précédente, trop de candidats ont omis de tracer leur courbe en coordonnées semi-logarithmiques. La phase exponentielle ne ressortant pas alors nettement, ils ont été gênés pour leur analyse et leur conclusion.

Certains candidats ont de plus perdu du temps dans le calcul inutile des concentrations bactériennes.

Pour la mesure au cours du temps de l'activité enzymatique en méthode « 2 points », peu de candidats ont bien compris l'intérêt d'adapter la durée d'incubation (t à 36°C) de manière à obtenir un signal fiable malgré la variation de la biomasse et donc *a priori* de la quantité d'enzyme déposée dans le milieu réactionnel. Il va de soi que cette durée devait être déterminée avec précision.

Une erreur fréquente a été de considérer que la lecture spectrophotométrique contre la solution substrat non incubée permettait de soustraire l'hydrolyse non enzymatique du substrat.

L'utilisation d'un code couleur pour le tracé des deux courbes sur un même graphe a été appréciée.

Quelques candidats ont avec pertinence proposé une hypothèse pour justifier la surexpression de *FliC* en fin de phase exponentielle.

L'implication technique de cette donnée quant à l'observation microscopique de la mobilité est également intéressante.

ANNEXE **Caractérisation des différentes souches proposées**

EXPÉRIENCE	TEST	SOUCHES				
		A	B	C	E	F
Boîte à nage (partie A1)	Halo(s) de nage (= mobilité sur gélose)	oui	non	non	--	--
Tubes en verre (partie A2)	Sortie du tube en verre (= mobilité en gélose)	oui	non	non	--	--
État frais (partie A3)	Mobilité sineuse due à une ciliature péritriche	oui	--	--	--	--
Coloration de flagelles (partie A4)	Flagelles péritriches	oui	--	--	--	--
Western blot (partie A5)	Flagelline synthétisée et présente dans les flagelles	oui	oui	non	--	--
<i>Bilan mobilité (partie A)</i>						
<p>A : Mobile ; <i>a priori</i> sauvage</p> <p>B : Immobile ; flagelle présent mais non fonctionnel ; mutée par exemple au niveau du moteur</p> <p>C : Immobile ; flagelle absent ; mutée par exemple au niveau de la séquence codante de FliC ou au niveau d'une séquence nécessaire à son expression</p>						
Répulsion par la leucine (partie B1)	Zone claire à l'interface gélose/phase liquide, marquant la fuite	oui	non	non	non	oui
Attraction par l'aspartate (partie B2)	Nombre de bactéries dans le capillaire significativement plus élevé que dans le témoin	oui	--	--	non	--
<i>Bilan chimiotactisme (partie B)</i>						
<p>A : Système de chimiotactisme fonctionnel ; <i>a priori</i> sauvage</p> <p>B : Immobile (partie A)</p> <p>C : Immobile (partie A)</p> <p>E (flagelle fonctionnel) : Mutant de la voie de signalisation commune (Che...) ou double mutant des récepteurs Tar et Tsr</p> <p>F (flagelle fonctionnel) : Récepteur Tsr et voie de signalisation commune fonctionnels donc mutant d'un autre récepteur</p>						

**AGREGATION
DE
BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE**

CONCOURS EXTERNE
Session 2010

**TRAVAUX PRATIQUES
DE
BIOCHIMIE – PHYSIOLOGIE**

**« Effet d'un iridoïde d'origine végétale
sur des cellules neuronales »**

Sujet proposé par :

*Christine Benayoun, Frédéric Ducancel
Florence Rivenet et Fabrice Roblès.*

Effet d'un iridoïde d'origine végétale sur des cellules neuronales.

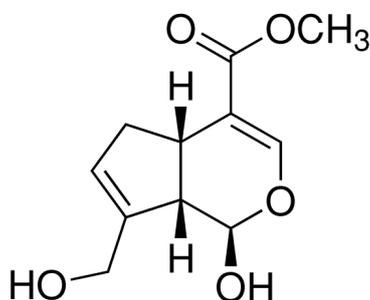
Les maladies neuro-dégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, sont souvent associées à une perte de neurones. Il a été démontré que le déclenchement de ces pathologies résultait d'un déséquilibre de l'homéostasie calcique et du stress oxydatif. C'est pourquoi parmi les pistes explorées, les cliniciens cherchent à identifier des substances naturelles ou synthétiques qui protégeraient les neurones de ces stress ou pourraient favoriser la différenciation des cellules souches neuronales. Toutefois beaucoup de molécules, testées à ce jour, ne passent pas la barrière hémato-encéphalique, ce qui pousse les chercheurs à explorer la pharmacopée traditionnelle dans le but d'identifier des substances lipophiles.

Les iridoïdes sont des métabolites présents dans de nombreuses plantes et certains animaux. Ce sont des dérivés monoterpéniques, présentant souvent une structure avec une partie cyclopentane fusionnée avec un hétérocycle à six atomes. Ces substances exercent une grande variété d'effets pharmacologiques et sont d'ailleurs utilisées empiriquement depuis des siècles dans la médecine traditionnelle chinoise.

La génipine (figure 1) est le dérivé aglycone de la géniposide, iridoïde glycoside extrait de différentes plantes du genre *Gardenia*. L'intérêt des chercheurs pour cette substance s'est récemment accru lorsque l'on a mis en évidence des effets neurotrophiques sur des neurones en culture primaire et des lignées cellulaires neuronales. Plus précisément, il a été démontré que la génipine induit la différenciation neuronale des cellules de phéochromocytome PC12h (cellules tumorales humaines dérivant de cellules chromaffines de la médullosurrénale) et de neuroblastomes de souris (cellules Neuro2a ou N2a). La génipine activerait la croissance des neurites par stimulation de la voie des MAP kinases notamment. De plus, la génipine semble également exercer un effet cytoprotecteur vis-à-vis de différents stress cellulaires (privation de sérum, stress oxydant, exposition au peptide - amyloïde, ...) pour les cellules N2a.

Afin d'explorer les mécanismes impliqués dans la neuroprotection conférée par la génipine, le sujet propose d'évaluer l'action de la génipine (G) sur des neuroblastomes de souris (cellules N2a) en culture soumis à l'action d'un ionophore calcique (I), l'A23187.

Figure 1: structure chimique de la génipine



Le candidat dispose de 5 flasques de cellules N2a à demi-confluence qui ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF (DMEM complet, noté DMEMc) à 37°C. Ces flasques (75 cm²) viennent de subir différents traitements au cours du temps (tableau 1). Elles sont notées : flasque 1 (G+I), flasque 2 (G), flasque 3 (I) flasque 4 et 5 (NT).

Tableau 1
Cinétique des différents traitements à la génipine et/ou au ionophore A23187
des cellules N2a à demi-confluence.

flasque	G+I	G	I	NT (x 2)
temps				
t = 0 heure	10 mL de DMEMc + génipine 20 µmol.L ⁻¹	10 mL de DMEMc + génipine 20 µmol.L ⁻¹	10 mL de DMEMc	10 mL de DMEMc
t = 1 heure	Ajout de A23187 6 µmol.L ⁻¹	-	Ajout de A23187 6 µmol.L ⁻¹	-
t = 4 heures	Début des manipulations			

Les valeurs indiquées dans le tableau sont des concentrations finales.

1- Détermination de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) des surnageants de culture, dans les différentes conditions de traitement

1.1- Principe

Cette technique permet une mesure de l'intégrité membranaire des cellules N2a : les cellules dont la membrane a été rompue libèrent leur contenu cytosolique, notamment de la LDH, dans le milieu extracellulaire.

La mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture est effectuée par un dosage enzymatique spectrophotométrique à l'aide du Kit LDH (Biomérieux 63 411, fiche technique en **Annexe 1**).

1.2- Mode opératoire

- Prélever une aliquote de chaque surnageant de culture des flasques 1 à 4.
- Centrifuger les aliquotes à 1 000 rpm pendant 3 minutes.
- Transférer les surnageants et les stocker dans la glace.
- Déterminer l'activité LDH de chaque surnageant à 37°C en suivant le protocole fourni en **Annexe 1** mais en respectant les volumes suivants pour chaque test :
 - .1 mL de réactif R2 repris par le réactif R1.
 - .50 µL de surnageant.

Réaliser également la mesure pour un témoin "100% de lyse" obtenu à partir de la flasque 5, en suivant le protocole suivant :

- Eliminer le milieu de culture.
- Recouvrir le tapis cellulaire avec 3 mL de triton X-100 10%.
- Incuber 15 minutes à 37°C.
- Ajouter 12 mL de DMEMc.
- Prélever une aliquote et centrifuger à 1 000 rpm pendant 3 minutes.
- Stocker le surnageant dans la glace.

Réactifs

- Flacon de réactif 2 "R2" lyophilisé (kit LDH réf 63 411)
- Tube de réactif 1 "R1"
- Triton X-100 10 %
- DMEMc.

1.3- Compte rendu

- Expliquer l'intérêt de la détermination de l'activité LDH dans les surnageants de culture des cellules.
- Indiquer l'effet du traitement du triton X-100 10% sur les cellules.
- Etablir la formule permettant d'exprimer le pourcentage de mortalité des cellules en culture en fonction des variations d'absorbance à 340 nm par minute ($\Delta A/\Delta t$) en notant :
 - . Echantillon : test effectué à partir d'un surnageant de culture soumis à un traitement
 - .T_{NT} : « témoin non traité »
 - .T₁₀₀ : « témoin 100% de lyse ».
- Analyser et commenter les résultats.

2- Etude de la morphologie des noyaux et détermination de l'activité caspase-3 des cellules ayant été soumises aux différents traitements

2.1- Préparation des suspensions cellulaires

2.1.1- Mode opératoire

Appliquer à chaque flasque de culture le protocole décrit ci-dessous :

- Observer au microscope inversé la morphologie des cellules.
- Eliminer le milieu de culture.
- Rincer les cellules avec 15 mL de PBS froid.
- Attendre 3 minutes et éliminer le PBS.
- Ajouter 1,5 mL de la solution de Trypsine-EDTA.
- Incuber à 37°C et suivre le décollement des cellules.
- Ajouter 3 mL de DMEMc pour arrêter l'action de la trypsine.
- Homogénéiser par aspirations/refoulements à l'aide d'une pipette, afin de dissocier les amas cellulaires qui pourraient persister.
- Stocker les différentes suspensions cellulaires dans la glace.
- Prélever une aliquote de chaque suspension cellulaire et mélanger volume à volume avec la solution de Bleu trypan.
- Dénombrer les cellules en hématimètre de Malassez (voir **Annexe 2**).

Réactifs

- PBS froid
- Solution de Trypsine-EDTA
- DMEMc
- Solution de Bleu trypan 0,4% (m/v).

2.1.2- Compte-rendu

Analyser et commenter les résultats obtenus.

2.2- Observation de l'aspect morphologique des noyaux

2.2.1- Principe

Le DAPI ou 4',6-diamidino-2-phénylindole est un agent intercalant de l'ADN qui forme un complexe fluorescent lorsqu'il se fixe à de l'ADN double brin (ADNdb). Il s'intercale préférentiellement au niveau de groupes de séquences AT dans le petit sillon de l'ADN, ce qui augmente l'intensité de sa fluorescence d'un facteur 20. La longueur d'onde maximale d'excitation du complexe DAPI-ADNdb est aux environs de 360 nm et la longueur d'onde maximale d'émission est aux environs de 480 nm.

Le DAPI se fixe également à l'ARN (par intercalation au niveau de séquences AU) mais le complexe DAPI-ARN a un maximum de fluorescence à 500 nm et son rendement quantique de fluorescence est 5 fois plus faible que celui des complexes DAPI-ADNdb.

2.2.2- Mode opératoire

- Prélever un volume de chaque suspension cellulaire, afin de traiter de 10^4 à $5 \cdot 10^4$ cellules.
- Centrifuger 3 minutes à 1 000 rpm.
- Laver les culots cellulaires 3 fois avec du PBS froid.

- Reprendre les culots dans 100 μL de PBS froid (à ce stade, les suspensions de cellules peuvent être conservées dans la glace avant le marquage au DAPI).
- Déposer 50 μL de chaque suspension de cellules sur une même lame.
- Laisser sécher à l'air libre.
- Fixer les cellules en recouvrant la lame avec du paraformaldéhyde à 4 % (m/v), pendant 15 minutes à température ambiante sous une hotte chimique à filtre.
- Rincer trois fois avec du PBS froid.
- Préparer extemporanément une solution de DAPI à 1 mg/L en PBS.
- Recouvrir la lame avec cette solution.
- Incuber à l'abri de la lumière pendant 10 à 15 minutes à température ambiante.
- Rincer la lame trois fois avec du PBS et une fois avec de l'eau distillée.
- Recouvrir chaque dépôt avec une goutte de Fluoprep.
- Couvrir avec une grande lamelle de verre.
- Observer au microscope à fluorescence (excitation : 360 nm et émission : 480 nm).

Réactifs

- PBS froid
- Solution stock de DAPI à 0,1 mg/mL, conservée dans la glace et à l'abri de la lumière
- Solution de paraformaldéhyde à 4% (m/v)
- Fluoprep.

2.2.3- Compte-rendu

- Indiquer le volume prélevé pour chaque suspension cellulaire.
- Représenter les résultats obtenus, les analyser et les commenter.

2.3- Détermination de l'activité caspase-3 et de la concentration en protéines

2.3.1- Principe

Les caspases sont des protéases à cystéine, hydrolysant des protéines cibles au niveau de séquences consensus contenant un résidu aspartate.

Après extraction des protéines cellulaires, l'activité caspase-3, est mesurée en suivant l'hydrolyse d'un tétrapeptide fluorogénique spécifique " AC-DEVD-MCA" (Acétyl- L-aspartyl- L-glutamyl- L-valyl- L-acide aspartique α -(4-méthyl- coumaryl- 7- amide)).

Le produit d'hydrolyse fluorescent, AMC, est quantifié par spectrofluorimétrie.

Les résultats seront normalisés par rapport à la concentration en protéines de chaque lysat qui sera déterminée par la méthode de Bradford (**Annexes 3**).

2.3.2- Mode opératoire

Sur chaque extrait cellulaire, réaliser le dosage des protéines totales et la détermination de l'activité caspase-3.

1) Préparation des lysats cellulaires :

- Prélever un volume de suspension cellulaire permettant de traiter entre 1.10^5 et 7.10^5 cellules.
- Centrifuger 5 minutes à 2 500 rpm.
- Rincer le culot avec 250 μL de PBS froid.
- Reprendre le culot avec 100 μL de tampon de lyse « protéines ».
- Agiter au vortex pendant au moins 15 secondes.
- Incuber 15 minutes à l'étuve à 37°C, en mélangeant au vortex à demi-incubation.
- Procéder énergiquement au broyage mécanique à l'aide d'un piston GDS.
- Rincer le piston GDS avec 30 μL de tampon de lyse « protéines ».
- Placer les tubes 10 minutes dans la glace.

- Agiter au vortex.
 - Centrifuger à 13 000 rpm pendant 5 minutes.
 - Le surnageant obtenu constitue le lysat et doit être conservé dans la glace.
- 2) Dosage des protéines par la méthode de Bradford (**Annexes 3**) :
- Réaliser, sous un volume de 100 μL et à partir de la solution étalon de sérum albumine bovine, une gamme d'étalonnage adéquate en eau physiologique.
 - Ajouter 3 mL de réactif de Bradford.
 - Incuber à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 minutes au moins.
 - Mesurer l'absorbance contre un témoin de compensation adapté.
 - Déterminer la concentration protéique de chaque lysat.
- 3) Détermination de l'activité caspase-3 par méthode cinétique deux points :

Pour chaque extrait cellulaire, mesurer l'activité caspase pour deux temps d'incubation judicieusement choisis, en suivant le protocole ci-dessous.

- Dans une microplaque pour fluorescence, déposer dans chaque puits, 140 μL de substrat AC-DEVD-MCA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (utiliser la ligne signalée par une gomme).
- Déclencher la réaction par ajout de 10 μL de lysat.
- Incuber durant le temps choisi à 37°C à l'abri de la lumière.
- Stopper la réaction par ajout de 50 μL de la solution d'acide monoiodoacétique 10 mmol.L^{-1} .
- Mesurer l'intensité de la fluorescence émise après excitation au spectrofluorimètre (excitation à 380 nm, émission à 460 nm).

Données

- *Le protocole d'extraction des protéines permet de récupérer environ 0,5 mg de protéines par million de cellules utilisées pour l'extraction.*
- *La durée de la phase initiale est d'au moins 75 minutes.*
- *Pour que le signal soit significatif, il convient d'incuber le plus longtemps possible.*
- *Le produit d'hydrolyse est stable plus d'une heure.*
- *La plaque sera lue par l'examineur en une seule fois.*

Réactifs

- Tampon de lyse « protéines » : 50 mmol.L^{-1} de Tris, 1 mmol.L^{-1} d'EDTA et 1 mmol.L^{-1} de dithiothréitol, pH 7,5
- Solution étalon de SAB (sérum albumine bovine) à 0,5 g/L
- Réactif de Bradford
- Eau physiologique
- PBS froid
- AC-DEVD-MCA, 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ en tampon de lyse
- Acide monoiodoacétique 10 mmol.L^{-1} .

2.3.3- Compte-rendu

- Indiquer le volume prélevé pour chaque suspension cellulaire.
- Présenter un tableau complet du dosage des protéines.
- Déterminer la concentration protéique des différents extraits.
- Préciser et justifier les conditions opératoires choisies pour la mesure de l'activité caspase-3.
- Pour chaque condition de traitement, exprimer l'activité de la caspase-3 en tenant compte de la teneur en protéines de chaque lysat.
- Analyser et conclure.

3- Extraction et contrôle de l'intégrité de l'ADN génomique des cellules soumises aux différents traitements.

3.1- Mode opératoire

3.1.1- Extraction de l'ADN

- Prélever un volume de suspension cellulaire permettant de traiter entre $5 \cdot 10^4$ et 10^5 cellules.
- Centrifuger 5 minutes à 2 500 rpm.
- Rincer le culot avec 250 μ L de PBS froid.
- Ajouter 100 μ L de tampon de lyse « ADN ».
- Resuspendre les cellules par aspirations/refoulements successifs.
- Incuber 1 heure à 65°C.
- Ajouter 5 μ L de RNase A à chaque solution de lyse « ADN ».
- Agiter au vortex.
- Centrifuger brièvement.
- Incuber 1 heure à 37°C.

3.1.2- Précipitation de l'ADN

- Ajuster le volume de chaque tube à 200 μ L par ajout d'H₂O qualité BM.
- Ajouter 10 μ L de la solution d'acétate d'ammonium.
- Agiter au vortex.
- Ajouter 400 μ L d'éthanol 100 % froid (conservé à -20°C).
- Homogénéiser par retournement.
- Placer au moins 15 minutes dans la glace.
- Centrifuger 5 minutes à 13 000 rpm, à température ambiante.
- Reprendre le culot dans 400 μ L d'éthanol 70 %.
- Centrifuger 5 minutes à 13 000 rpm, à température ambiante.
- Eliminer soigneusement la solution alcoolique.
- Sécher 15 minutes à l'air libre.

3.1.3- Migration et visualisation de l'ADN

- Resuspendre chaque culot dans 20 μ L de tampon TE.
 - Prélever et transférer 10 μ L de chaque solution d'ADN dans un nouveau tube Eppendorf bien identifié.
 - La solution de charge sera ajoutée par un examinateur.
 - Déposer la totalité de chaque tube sur un gel d'agarose 1% + Bromure d'éthidium (Bet).
 - Faire migrer 20 minutes à 150 volts.
 - Arrêter la migration.
 - Visualiser l'ADN sous ultra-violets.
 - Prendre une photo du gel.
- } Partie réalisée par un examinateur

Réactifs

- Tampon de lyse « ADN » (concentrations ou pourcentages finaux) :
 - Tris-HCl 30 mmol.L⁻¹, pH 8,0
 - EDTA 30 mmol.L⁻¹
 - Triton X-100 0,5 %
 - Tween 20 5 %
 - Protéinase K 0,1 mg.mL⁻¹
- PBS froid

- Solution de RNase A : 1 mg.mL⁻¹
- Solution d'acétate d'ammonium : 7,5 mol.L⁻¹
- Ethanol : 100% conservé à - 20°C (à demander aux examinateurs)
- Ethanol : 70% froid
- Tampon TE : Tris/HCl 10 mmol.L⁻¹ pH 8, EDTA 1 mmol.L⁻¹, pH 8
- Solution de charge : saccharose 40% et bleu de bromophénol 0,25 %
- Eau qualité BM.

3.2- Compte-rendu

Analyser de manière comparative le profil des ADN génomiques extraits à partir de chacune des quatre suspensions cellulaires.

4- Conclusion

Formuler une conclusion générale de l'étude, à la lumière des différents résultats obtenus.

Remerciements

- Remerciements au Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé (LIAS) du Service de Pharmacologie et d'Immuno-analyse (SPI) au sein de l'Institut de Biologie et Technologie de Saclay (CEA).
- Un grand merci aux Drs Anne Wijkuisen et Fabienne Priam de l'Université Paris 7 Diderot et au Professeur Zahra Tanfin de l'Université Paris XI, pour leurs aide et conseils.
- Merci également au Pr. Matsumi Yamazaki de l'Université de Hokuriku, Japon.

Bibliographie

- 1] Matsumi Yamazaki and al. (2009). Genipin Suppresses A23187-Induced Cytotoxicity in Neuro2a Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **32** (6) 1043-1046.
- 2] Marie-Noëlle Raymond and al. (2006) Endothelin-1 Inhibits Apoptosis through a Sphingosine Kinase 1-Dependent Mechanism in Uterine Leiomyoma ELT3 Cells. *Endocrinology*, **147** (12) 5873-5882.

Annexe 1 Protocole LDH

REF 63 411

04016 G - fr - 2008/07

ENZYLINE™ LDH optimisé 10

IVD

Mesure cinétique de l'activité lactate déshydrogénase dans le sérum humain, selon les recommandations de la Société de Chimie Clinique Allemande (DGKC).

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST (1, 2)

La lactate déshydrogénase (LDH) joue un rôle important dans le métabolisme des glucides ; elle catalyse l'interconversion pyruvate ↔ lactate. Elle est présente dans de nombreux tissus des mammifères, principalement dans le myocarde, le rein, le foie, les muscles squelettiques, les hématies, les poumons.

L'activité LDH sérique totale est déterminée pour détecter une souffrance cellulaire, sans indication à elle seule sur l'organe atteint. C'est un des tests les plus fréquemment exécutés dans l'aide au diagnostic de l'infarctus du myocarde et de l'infarctus pulmonaire.

La LDH existe sous 5 formes (isoenzymes). Chaque isoenzyme est un tétramère formé par l'association de deux sous-unités codées par des gènes différents : la sous-unité H (= Heart) cardiaque, et la sous-unité M (= Muscle) musculaire et hépatique. Les 5 combinaisons possibles (H4 = LDH-1, H3M = LDH-2, H2M2 = LDH-3, HM3 = LDH-4 et M4 = LDH-5) sont retrouvées dans le plasma.

La LDH-1 prédomine dans le myocarde et les hématies.

La LDH-2 prédomine dans les leucocytes.

La LDH-3 prédomine dans le poumon.

La LDH-4 prédomine dans le rein, le placenta et le pancréas.

La LDH-5 prédomine dans le foie et le muscle squelettique.

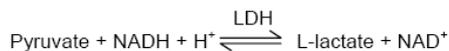
En cas d'infarctus du myocarde, la LDH-1 sérique augmente après 8 à 12 heures, présente un pic au bout de 48 heures et se normalise en 7 à 15 jours. Son dosage est un test très sensible car elle augmente de façon précoce et reste élevée plus longtemps que la CK-MB et la GOT.

Une augmentation de l'activité sérique LDH totale est observée en cas de :

- affections musculaires et cardiaques,
- affections hépatiques,
- maladies pulmonaires,
- maladies hématologiques,
- Autres maladies : insuffisance rénale aiguë, rejet de greffe rénale, tumeur rénale, connectivites, collagénoses...
- grossesse, surtout 2^{ème} et 3^{ème} trimestre.

PRINCIPE (3)

ENZYLINE™ LDH optimisé permet la détermination cinétique de l'activité lactate déshydrogénase totale dans le sérum humain, en utilisant comme substrat le pyruvate.



La vitesse de disparition du NAD réduit est proportionnelle à l'activité LDH totale dans l'échantillon.

Code SFBC : BN

PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET (106 tests)

Réactif 1 Tampon 2 x 90 ml (liquide)	R1	Tampon phosphate pH 7,5 Pyruvate NaN ₃	61,8 mmol/l 0,62 mmol/l 1 g/l
Réactif 2 (repris par R1) Coenzyme 16 x 10 ml (lyophilisé)	R2	NADH	0,22 mmol/l
1 notice			

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

Equipeement général de laboratoire.

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Vérifier l'intégrité des réactifs avant leur utilisation.
- Ne pas utiliser le réactif après la date de péremption indiquée sur l'étiquette étui.
- Le réactif contient un conservateur (azoture de sodium), susceptible de réagir avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre et de former des azotures métalliques explosifs. Il est recommandé de rincer à l'eau tout rejet.

CONDITIONS DE STOCKAGE

- Conserver le coffret à 2-8°C.
- Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette étui, s'ils sont conservés dans les conditions préconisées.

ECHANTILLONS

Nature des échantillons (1, 4)

Sérum.

Stabilité (4, 5)

- 4 jours à 2-8°C.
- 3 jours à 20-25°C.

Interférences

Il n'a pas été observé, pour ce dosage, d'influence significative :

- de la lipémie, après surcharge d'échantillons en lipides, jusqu'à 7 mmol/l d'équivalent triglycérides,
- de la bilirubinémie, après surcharge d'échantillons en bilirubine, jusqu'à 139 µmol/l.

Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés en raison de la grande quantité de LDH présente dans les érythrocytes (1, 4).

Il est néanmoins conseillé de ne pas utiliser d'échantillons visiblement lipémiques ou ictériques et d'effectuer si possible un nouveau prélèvement.

MODE OPERATOIRE MANUEL

Préparation des réactifs

Prendre le contenu d'un flacon de Réactif 2 par 10 ml de Réactif 1.

La DO à 340 nm doit être supérieure à 1,0.

Stabilité après ouverture, dans le flacon d'origine

- 5 jours à 2-8°C.
- 24 heures à 20-25°C.

Réalisation du test

Longueur d'onde : ____ 340 nm (Hg 334 nm – Hg 365 nm)

Température : _____ 30°C ou 37°C

Cuve : _____ trajet optique 1 cm

Zéro de l'appareil : _____ air ou eau déminéralisée

Introduire dans un tube ou une cuve de mesure thermostaté à 30°C ou 37°C :		
	30°C	37°C
Réactif 2 repris	1,5 ml	1 ml
Echantillon	50 µl	20 µl
Mélanger. Attendre 45 secondes. Mesurer la diminution moyenne de DO par min (n) pendant 2 minutes maximum.		

- Pour une variation moyenne de DO par min $\geq 0,100$ à 340 nm, refaire la détermination en diluant l'échantillon au 1/5 ou 1/10 dans une solution de NaCl à 9 g/l.
- **Une variation de DO moyenne par minute très faible peut indiquer une consommation totale du NADH avant lecture (DO de départ < 0,900) et donc signifier une activité LDH élevée. Refaire la détermination après dilution de l'échantillon.**

RESULTATS ET INTERPRETATION

L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

Calcul

	30°C	37°C
340 nm	U/l = n x 4920	U/l = n x 8095
334 nm	U/l = n x 5016	U/l = n x 8252
365 nm	U/l = n x 9118	U/l = n x 15000

CONTROLE DE QUALITE

- LYOTROL™ N (Réf. 62 373)
- LYOTROL™ P (Réf. 62 383)
- UNITROL™ (Réf. 62 453)
- Zymo-Trol™ (Réf. 62 952)

Pour s'assurer de la validité de la série, effectuer un contrôle à chaque série de dosages. La valeur obtenue doit être dans l'intervalle d'acceptation.

Remarque

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

VALEURS ATTENDUES (6)

Ces valeurs sont données à titre indicatif, il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence sur une population rigoureusement sélectionnée.

30°C (U/l) *	37°C (U/l) *
156 - 312	228 - 456

* valeurs recalculées. Pour obtenir les valeurs attendues à 30°C et à 37°C à partir des valeurs attendues à 25°C, les facteurs utilisés sont respectivement de 1,30 et 1,90.

PERFORMANCES (7)

Les études du réactif ENZYLINE™ LDH optimisé 10 ont donné les résultats suivants à 37°C.

Les performances présentées ont été obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice.

Toute déviation de méthodologie peut modifier les résultats.

Les performances sont données à titre indicatif.

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 18 U/l

Linéarité

Le réactif est linéaire jusqu'à 800 U/l

Précision

Précision intra-série

Trois échantillons ont été dosés dans la même série.

- A 30°C

	n	Moyenne (U/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	86	3,20
Niveau 2	20	203	2,24
Niveau 3	20	519	2,61

- A 37°C

	n	Moyenne (U/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	120	3,64
Niveau 2	20	261	4,22
Niveau 3	20	684	2,40

Précision inter-séries (8)

Trois échantillons ont été dosés en triple dans 15 séries différentes (3 séries par jour). La reproductibilité (précision inter-série) a été calculée selon les recommandations du CLSI® / NCCLS EP5-T2, vol.12, n°4.

	n	Moyenne (U/l)	C.V (%)
Niveau 1	45	142	5,80
Niveau 2	45	286	5,12
Niveau 3	45	728	3,15

Corrélation

• A 30°C

50 échantillons de patients ont été dosés en parallèle sur un autre automate.

L'équation de la droite d'allométrie obtenue est :

$y = 1,06 x + 1,89$ (en U/l) avec un coefficient de corrélation de 0,990.

• A 37°C

24 échantillons de patients ont été dosés en parallèle sur un autre automate.

L'équation de la droite d'allométrie obtenue est :

$y = 1,06 x - 2,65$ (en U/l) avec un coefficient de corrélation de 1,000.

APPLICATIONS DISPONIBLES SUR DEMANDE

- Applications spectrophotomètres (12358B)
- AU 400 / 640 / 2700 (13560A)
- CX 5 / CX 7 / CX 9 (12359A)
- HITACHI 704 (12360A)
- HITACHI 717 (12361A)
- KONELAB 20 (13258A)
- MASCOTT PLUS / LISA (12362A)
- MIRA S / MIRA PLUS (12363A)
- RA 1000 / XT (12364A)
- SELECTRA 2 / E / XL (12365B)
- TARGA / FALCOR 250 / BT 3000 Plus (13259B)

ELIMINATION DES DECHETS

- Les réactifs non utilisés peuvent être éliminés comme déchets non dangereux.
- Éliminer tous les réactifs utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WOLF P.L.- Lactate dehydrogenase isoenzymes in myocardial disease – *Clinics in Laboratory Medicine* – 1989, vol. 9, n°4, p.655-665.
2. DRENT M., COBBEN N.A.M., HENDERSON R.F., et al – Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation – *Eur. Respir. J.* – 1996, vol. 9, p. 1736-1742.
3. BERGMAYER H.U. et al - Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. - *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem* - 1970, vol. 8, p. 658-660, 1972, vol. 10, p. 182-192.
4. MOSS D.W., HENDERSON A.R. – Chap.22 : Clinical enzymology – *In TIETZ Text-book of Clinical Chemistry*. – Ed. W.B. SAUNDERS COMPANY - Philadelphia, 1999 - p. 671-673 – ISBN 0-7216-5610-2.
5. CHEVILLON I., LARROSE C., MOREAU N., et al. – Conservation des échantillons de sang avant analyse des paramètres biochimiques les plus courants. – *Ann. Biol. Clin. (Paris)* - 1998, vol. 56, p. 200-204.
6. WEISSHAAR D., GOSSRAU E., FADERL B. – Normbereiche von α -HBDH, LDH, AP und LAP bei Messung mit substrat-optimierten Testansätzen. – *Med. Welt* – 1975, vol. 26, n°9, p. 387-390.
7. VASSAULT A., GRAFMEYER D., NAUDIN C. et al. - Protocole de validation de techniques (document B) - *Ann. Biol. Clin. (Paris)* - 1986, vol. 44, p. 686-745.
8. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices – Kennedy J.W. et al. – 2nd ed – vol. 12, n° 4, EP5-T2 – ISBN 1-56238-145-8.

TABLE DES SYMBOLES

Symbole	Signification
 ou REF	Référence du catalogue
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Limites de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation

CLSI est une marque utilisée, déposée et/ou enregistrée appartenant à Clinical Laboratory and Standards Institute Inc.



 **bioMérieux® SA**
au capital de 12 029 370 €
673 620 399 RCS LYON

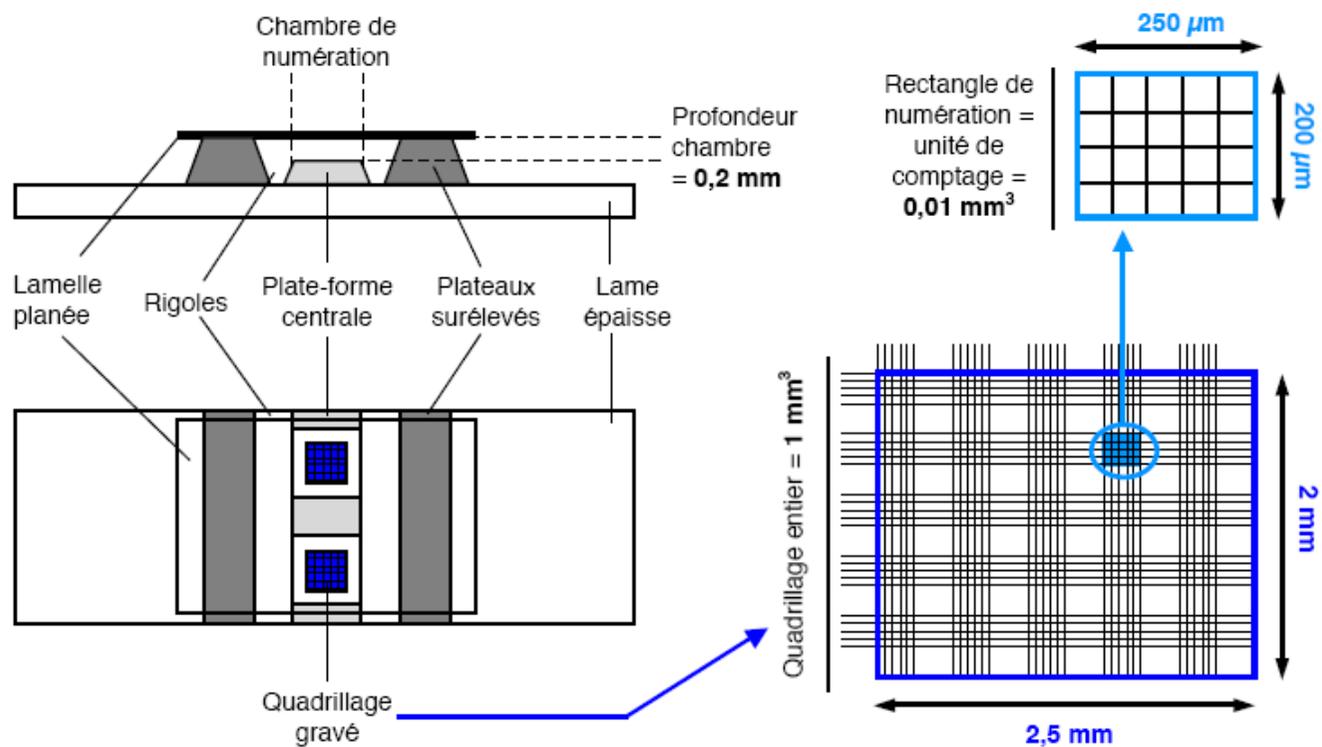
bioMérieux, le logo bleu, ENZYLINE, LYOTROL, UNITROL et Zymo-Trol sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>



Imprimé en France

Annexe 2 Hématimètre de Malassez



Extrait de "Biotechnologies en 26 fiches" de Fabien Cézard, collection express chez Dunod

Annexe 3a

Chemistry of Coomassie-based Protein Assays

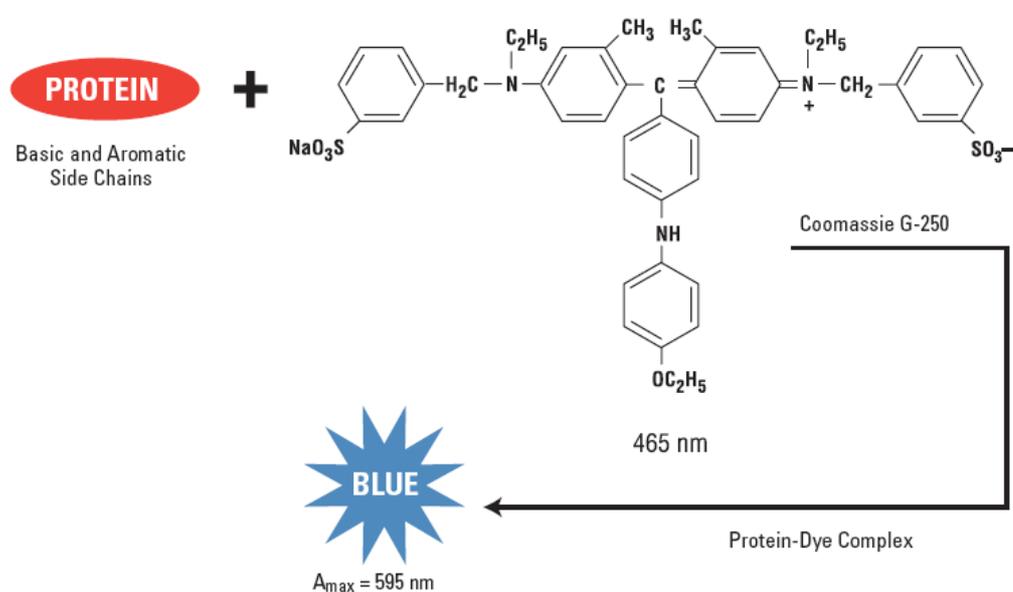


Figure 1. Reaction schematic for the Coomassie dye-based protein assays in the Bradford Protein Assay.

In the acidic environment of the reagent, protein binds to the Coomassie dye. This results in a spectral shift from the reddish brown form of the dye (absorbance maximum at 465 nm) to the blue form of the dye (absorbance maximum at 610 nm) (Figure 1). The difference between the two forms of the dye is greatest at 595 nm. If desired, the blue color can be measured at any wavelength between 575 nm and 615 nm. At the two extremes (575 nm and 615 nm) there is a loss of about 10% in the measured amount of color (absorbance) compared to that obtained at 595 nm.

Development of color in Coomassie dye-based protein assays has been associated with the presence of certain basic amino acids (primarily arginine, lysine and histidine) in the protein. Van der Waals forces and hydrophobic interactions also participate in the binding of the dye by proteins. The number of Coomassie dye ligands bound to each protein molecule is approximately proportional to the number of positive charges found on the protein. Free amino acids, peptides and low molecular weight proteins do not produce color with Coomassie dye reagents. In general, the mass of a peptide or protein must be at least 3 000 daltons to be assayed with this reagent.

Annexe 3b

General Characteristics of Coomassie-based Protein Assays (Bradford Assays)

Coomassie dye-binding assays are the fastest and easiest methods to perform of all protein assays. The assay is performed at room temperature and no special equipment is required. Briefly, the sample is added to the tube containing reagent and the resultant blue color is measured at 595 nm following a short room-temperature incubation. The Coomassie dye-containing protein assays are compatible with most salts, solvents, buffers, thiols, reducing substances and metal chelating agents encountered in protein samples.

The Bradford Protein Assay produces a nonlinear standard curve (figure 2).

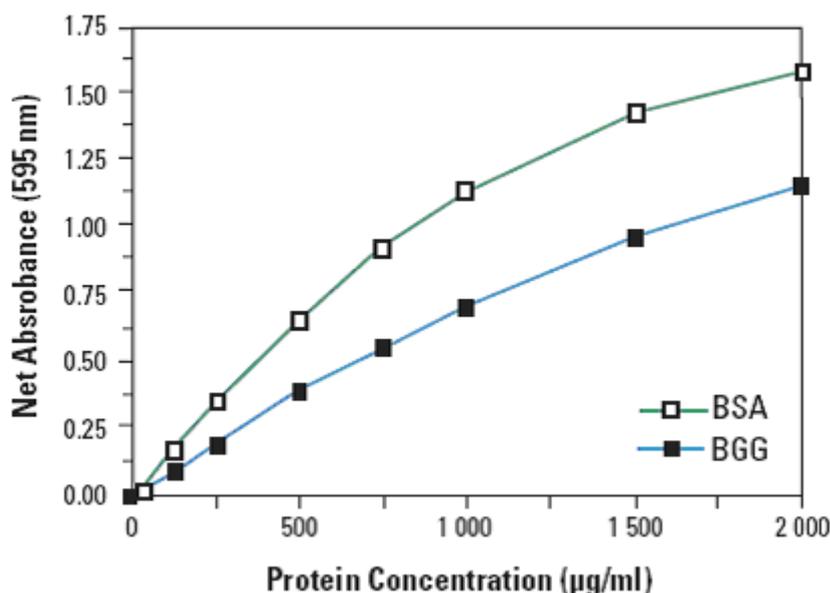


Figure 2. Color response curves obtained with Thermo Scientific Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay using bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma globulin (BGG).

The standard tube protocol was performed and the color was measured at 595 nm.

Annexe 4 **Données de sécurité**

ÉTIQUETAGE ET ELIMINATION DES PRÉPARATIONS AU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

D'après l'arrêté du 9 novembre 2004, transposant la directive 1999/45/CE du 31 mai 1999

L'étiquetage dépend des concentrations finales des produits dans la préparation

L'évaluation de la dangerosité des produits utilisés au laboratoire de biochimie est complexe, car il s'agit de mélanges de plusieurs produits chimiques. Il existe des règles, elles tiennent compte de la concentration des différents produits dans le réactif.

Les limites de concentration sont exprimées en pourcentage :

$$\frac{\text{Masse du produit}}{\text{Masse de la préparation}}$$

Comme les préparations sont souvent diluées et se réalisent généralement en solution aqueuse, ce pourcentage masse/masse peut être remplacé par un pourcentage en g/100 mL :

$$\frac{\text{Masse du produit}}{\text{Volume de la préparation}}$$

Lors de la manipulation d'un réactif contenant une substance à risque, il faut tenir compte de la concentration de cette substance dans le réactif, pour suivre les précautions d'usage.

Par la suite, il faut tenir compte de sa concentration dans le mélange réactionnel, pour savoir si les précautions sont toujours nécessaires.

Gestion des déchets

À la fin d'une manipulation, les mélanges réactionnels et les restes de réactif sont à considérer comme déchets chimiques. Pour savoir si une récupération est nécessaire, afin de les acheminer vers une usine de traitement, il suffit de connaître la concentration finale dans le mélange réactionnel des substances à risque et de suivre les recommandations.

Etiquetage des produits chimiques

Effets corrosifs et irritants

	Phrases R et S associées	Concentrations limites (m/v)	Pictogramme	Phrases R	Concentration de la solution fournie
DAPI  Xi	R 36/37/38 S 26-37	C ≥ 20%	 Xi	R 36/37/38	0,1 mg.mL ⁻¹
		C < 20 %	-	-	

	Phrases R et S associées	Concentrations limites (m/v)	Pictogramme	Phrases R	Concentration dans les flasques
A23187  Xi	R 36/37/38 S 26-36	C ≥ 20%	 Xi	R 36/37/38	6 μmol.L ⁻¹ MM = 524 g.mol ⁻¹
		C < 20 %	-	-	

	Phrases R et S associées
Réactif de Bradford fourni  C	R 34

Effets létaux aigus (et corrosifs)

	Phrases R et S associées	Concentrations limites (m/v)	Pictogramme	Phrases R	Concentration de la solution fournie
Acide mono-iodoacétique  T	R25, 35	$C \geq 25\%$	 T	R25,35	10 mmol.L^{-1} $\text{MM} = 186 \text{ g.mol}^{-1}$
		$10\% \leq C < 25\%$	 C	R 20, 21, 22, 35	
		$5\% \leq C < 10\%$	 C	R 20, 21, 22, 34	
		$3\% \leq C < 5\%$	 Xn	R 20, 21, 22	
		$1\% \leq C < 3\%$	 Xi	R 36/38	
		$C < 1\%$	-	--	

Effets létaux aigus

	Phrases R et S associées	Concentrations limites (m/v)	Pictogramme	Phrases R	Concentration de la solution fournie
Dithiothréitol  Xn	R 22, 36/37/38	$C \geq 25\%$	 Xn	R 22, 36/37/38	1 mmol.L^{-1} $\text{MM} = 154 \text{ g.mol}^{-1}$
		$20\% \leq C < 25\%$	 Xi	R 36/37/38	
		$C < 20\%$	-	-	

	Phrases R et S associées	Concentrations limites (m/v)	Pictogramme	Phrases R	Concentration dans les flasques
Génipine  Xn	R 22	$C \geq 25\%$	 Xn	R 22	$6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ MM = 226 g.mol^{-1}
		$C < 25\%$	-	-	

Cancérogènes de catégorie 3

	Phrases R et S associées	Concentrations limites (m/v)	Pictogramme	Phrases R	Concentration de la solution fournie
Paraformaldéhyde  Xn	R 20/22-36/37/38-40-43 S 24-26-36/37/39-45	$20\% \geq C \geq 1\%$	 Xn	R 40-43	4% (m/v)
		$C < 1\%$	-	-	

Cancérogènes de catégorie 1 ou 2

	Phrases R et S associées	Concentrations limites (m/v)	Pictogramme	Phrases R	Concentration de la solution fournie
Bleu Trypan  T	R 45 S 53-45	$C \geq 0,1\%$	 T	R 45	0,4% (m/v)
		$C < 1\%$	-	-	

Gestion des déchets chimiques

D'après le décret N° 2002-540 du 18 avril 2002, les déchets chimiques sont considérés comme dangereux, lorsque :

- ils contiennent une ou plusieurs substances classées T, C, Xn, Xi ;
- la concentration totale est supérieure ou égale à certains seuils.

Symbole	Signification	Seuil de concentration totale (m/v)
 T	Toxique Cancérogène R 45	≥ 0,1%
 Xi	Irritant R 36, 37, 38 R 41	≥ 20 % ≥ 5 %
 Xn	Nocif R 20, 21, 22 Cancérogène catégorie 3 R40	≥ 25% ≥ 1 %

Le réactif de Bradford est à récupérer.

RAPPORT DE L'ÉPREUVE DE TP DE BIOCHIMIE PHYSIOLOGIE

Rapport établi par Mesdames BENAYOUN et RIVENET,
Messieurs DUCANCEL et ROBLÈS,

- nombre de candidats présents : 21
- moyenne de l'épreuve : 11,4
- écart-type : 3,4
- note maximale : 15,5
- note minimale : 4,5
- notes inférieures à 11,4 : 13
- notes supérieures ou égales à 11,4 : 8

Le jury a été surpris par le fait que de nombreux candidats se soient précipités dans la manipulation sans réfléchir au préalable au déroulement des différentes parties du travail expérimental.

Le jury souligne que le protocole fourni n'est pas à suivre linéairement et qu'à ce niveau d'exigence de concours, l'évaluation de l'organisation spatio-temporelle est un critère important.

Le temps nécessaire à l'élaboration du plan de manipulation n'est pas du temps perdu, bien au contraire.

Néanmoins le comportement de l'ensemble des candidats s'est révélé assez satisfaisant.

La moitié d'entre eux a réalisé l'ensemble des expériences, mais parfois à la dernière minute.

L'objectif de ce sujet était d'étudier l'effet protecteur de la génipine vis-à-vis d'un effet pro-apoptotique d'un ionophore calcique.

L'étude était réalisée à partir de cellules neuronales en culture, soumises à différents traitements : ionophore seul, génipine + ionophore, génipine seule et cellules non traitées.

Quatre aspects ont été explorés :

- l'activité LDH révélatrice de la mort cellulaire
- l'activité caspase indicatrice d'apoptose
- l'étude comparative de la morphologie des noyaux par marquage fluorescent au DAPI
- l'analyse de l'intégrité de l'ADN génomique

La mesure de l'activité LDH était réalisée sur les surnageants conservés dans la glace, indépendamment des autres manipulations.

Le témoin 100% de lyse, réalisé sur les cellules normales traitées avec du Triton, permettait de calculer le % de mortalité :

$$\text{Pourcentage mortalité} = \frac{((\Delta A / \Delta t)_{\text{échantillon}} - (\Delta A / \Delta t)_{\text{TNT}})}{((\Delta A / \Delta t)_{\text{T100}} - (\Delta A / \Delta t)_{\text{TNT}})} \times 100$$

Les cinq mesures devaient être réalisées dans un court laps de temps, les unes par rapport aux autres.

Comme pour les autres manipulations, le jury a déploré la mauvaise homogénéisation lors des pipetages, l'absence de parafilm sur les cuves, les pipetages non verticaux.

De plus le milieu réactionnel n'a souvent pas été pré-incubé, la fiche technique fournie en annexe n'a pas toujours été respectée.

Quant à l'utilisation des gants, elle a rarement été pertinente !

L'ensemble des autres expériences à réaliser dépendait de la numération des différentes cultures cellulaires fournies. Le jury a constaté que l'utilisation de l'hématimètre n'était pas toujours maîtrisée par les candidats. Il était en effet essentiel de réussir les calculs car ces derniers étaient indispensables à la bonne réalisation des autres manipulations.

La détermination de l'activité caspase était effectuée par la méthode 2 points, mal appréhendée par certains candidats. Le dosage des protéines totales selon la technique de Bradford permettait de rapporter l'activité caspase à la quantité de protéines totales des différents lysats.

Par ailleurs, une étude morphologique des noyaux des différentes cellules était réalisé par marquage au DAPI et visualisé par microscopie à fluorescence. La plupart des candidats ont mené à bien cette partie. Des problèmes expérimentaux (numération, dépôts, fixation), sont à l'origine de certains échecs.

L'analyse de l'intégrité de l'ADN génomique permettait de compléter l'étude. Certains candidats n'ont pas anticipé le délai minimum nécessaire à sa réalisation (3 heures), ce qui ne leur a pas permis de mener à son terme cette partie de l'épreuve. Parmi les candidats qui ont réalisé cette partie, un certain nombre n'a pas extrait avec succès l'ADN génomique soit par défaut de numération et/ou par non respect des étapes critiques du protocole : élimination des traces d'éthanol, perte du culot lors du rinçage, mauvaise resolubilisation.

Le jury rappelle que la maîtrise des risques chimiques et biologiques est indispensable à la bonne réalisation de toute expérimentation.

EPREUVES ORALES
LEÇONS

- 1 Biochimie
Glycosylation des protéines
- 2 Biochimie
Régulation épigénétique de l'expression des gènes
- 3 Biologie humaine
Les canaux ioniques dans la transmission du message nerveux
- 4 Biochimie
Bases moléculaires des morts cellulaires
- 5 Microbiologie
Les rétrovirus, vecteurs de gènes en thérapie génique
- 6 Biologie humaine
Les peptides dans l'organisme
- 7 Microbiologie
Le quorum sensing
- 8 Biochimie
Flux de membranes et trafic d'organelles
- 9 Microbiologie
La flore intestinale humaine, commensalisme ou symbiose?
- 10 Biologie humaine
La désensibilisation des récepteurs
- 11 Biochimie
Intérêts fonctionnels des structures quaternaires pour les protéines
- 12 Microbiologie
La mesure des paramètres physico-chimiques chez les bactéries
- 13 Microbiologie
La régulation du démarrage de la transcription chez les bactéries
- 14 Biologie humaine
La présentation de l'antigène
- 15 Biochimie
Altérations et réparation de l'ADN nucléaire
- 16 Biologie humaine
Débit sanguin et échange de molécules
- 17 Microbiologie
Les méthodes qui permettent de générer des fragments d'ADN à cloner
- 18 Biologie humaine
Récepteurs olfactifs et anticorps : des points communs pour des fonctions différentes
- 19 Microbiologie
L'amélioration des souches de production en microbiologie industrielle
- 20 Biologie humaine
Les réflexes
- 21 Biochimie
Les enzymes, hier aujourd'hui et demain

RAPPORT SUR LES LECONS DE BIOCHIMIE

Etabli par Messieurs Alain MOREL et Michel GAVRILOVIC

Notes : 2, 3, 3, 5, 6, 8, 11

Moyenne : 05,43/20

Le but des leçons pour le candidat est de proposer un exposé structuré clair et exhaustif sur un sujet de biochimie ou de biologie moléculaire. Ces exposés doivent être le résultat d'un vrai travail pédagogique et donc être plus précisément la somme ou la compilation d'éléments existant dans les différents manuels et des connaissances personnelles. En aucun cas, ils ne doivent être une redite d'un seul manuel à disposition. L'originalité de la présentation par rapport aux documents disponibles, mais aussi l'aspect formateur que le candidat veut montrer sont des éléments très importants qui nécessitent une bonne connaissance personnelle du domaine, des documents à disposition et une bonne maîtrise pédagogique. Il est nécessaire de garder à l'esprit ce qui est essentiel de transmettre dans une leçon. Elle est nécessairement descriptive et doit s'appuyer sur des méthodologies scientifiques clairement expliquées, sans lesquelles aucune formation pratique ne pourrait être effectuée. La bonne transmission de l'information dépend de la bonne compréhension des principes, des méthodes et des mécanismes au niveau moléculaire nécessaires au sujet. Une explication logique basée sur les fondamentaux de la biochimie permet à l'auditoire de mieux comprendre et donc de retenir des notions qui peuvent paraître complexes. On constate malgré cela que trop de candidats ont du mal à réellement présenter une synthèse et transmettre un message scientifique lors de cet exercice. Ce défaut est la plupart du temps, dû à un manque de recul et donc quelquefois de connaissances dans la présentation d'éléments de cours qui sont mal compris et donc pas toujours utilisés correctement. La synthèse de plusieurs ouvrages peut être un piège pour les candidats, soit, par la méconnaissance des ouvrages utilisés ou encore par l'usage pléthorique de manuels pour construire une leçon. Enfin, si dans beaucoup de cas l'exercice est plutôt réussi, l'exposé manque souvent d'attractivité et de vivacité. A l'heure où l'on constate une désaffection des jeunes élèves pour les sciences, ce point nous paraît important et demande un effort important dans la présentation. Les leçons nécessitent toujours un support sous forme de schéma et de figures simples et claires, il y a souvent une imprécision concernant les titres, les unités et les indications qui doivent figurer sur ces illustrations. En revanche dans la plupart des cas un effort sur la présentation est fait. Lors de l'entretien avec le jury, les réponses aux questions doivent être concises et claires et doivent permettre d'évaluer les choix pédagogiques et les connaissances générales sur le sujet de la leçon.

RAPPORT SUR LES LECONS DE MICROBIOLOGIE

Etabli par Monsieur Philippe LEJEUNE

Notes : 6, 7, 9, 9, 13, 14, 16.

Moyenne : 10,57/20

Les résultats des leçons de microbiologie sont honorables, seulement deux candidats ont obtenu des notes décevantes. Trois sujets de génie génétique et quatre sujets de physiologie microbienne étaient proposés.

En génie génétique, si le sujet le plus classique sur les rétrovirus et la thérapie génique est très correctement traité, les deux sujets consacrés au génie génétique chez les microbes révèlent des lacunes dans la connaissance des méthodes modernes de génération des fragments d'ADN à cloner (PCR, synthèse chimique), des obstacles à l'introduction d'ADN recombinant (systèmes de restriction-modification, concept de systèmes hôtes-vecteurs) et des problèmes rencontrés en microbiologie industrielle lors de l'utilisation de souches recombinantes (stabilité de l'information génétique clonée, toxicité cellulaire des protéines étrangères, dérive des souches).

Les sujets de physiologie microbienne révèlent, chez certains candidats, une méconnaissance des processus intra- et inter-cellulaires de signalisation. Des concepts récemment émergés, comme l'importance des flores commensales, les biofilms et le quorum sensing, ont en revanche été assez correctement perçus.

RAPPORT SUR LES LECONS DE BIOLOGIE HUMAINE

Etabli par Messieurs François LASBENNES et Marc LANDRY

Notes : 4, 6, 8, 9, 10, 16, 18.

Moyenne : 10,14/20

Les résultats des leçons de physiologie sont très variables, s'échelonnant de 4/20 à 18/20. Compte tenu du faible nombre de leçons, il n'est pas possible de dégager des tendances en fonction du type de sujet. Les deux notes les plus faibles s'expliquent par une grande partie hors sujet ou des exemples inappropriés. Les difficultés rencontrées par les candidats ayant obtenu des notes comprises entre 8/20 et 10/20 s'apparentent à celles observées lors de l'écrit. Le jury rappelle que les sujets proposés sont très rarement traités en tant que tels dans les ouvrages. Ils demandent donc de la part des candidats, une connaissance suffisante pour savoir où trouver l'information. Il est illusoire d'espérer recueillir l'information nécessaire le jour de l'épreuve sans une bonne maîtrise du sujet sous toutes les formes qu'il implique.

Le plan des leçons témoigne en général d'un effort de synthèse mais les différents chapitres développés révèlent souvent les faiblesses des candidats, confirmées par la suite lors de la séance des questions. Le jury souligne à cet égard, qu'il est nécessaire d'avoir de bonnes connaissances en électrophysiologie et neuroanatomie, deux domaines où les défaillances sont fréquentes. La séance des questions montre également que l'imagerie est un sujet mal connu des candidats. Il est rappelé qu'il s'agit d'un domaine qui, de l'échelle moléculaire à celle de l'organisme, est en pleine expansion. Depuis plusieurs années, des questions relatives aux différentes méthodes de microscopie et d'imagerie de l'organisme sont posées par plusieurs membres du jury, en particulier, physiologistes, biochimistes et chimistes. De plus, l'imagerie biologique a été proposée à plusieurs reprises dans des ECDs. Cette tendance s'est amplifiée lors des deux dernières sessions et se poursuivra. De plus, les techniques utilisées en biologie font partie intégrante du programme, aussi le jury recommande aux futurs candidats de se documenter, y compris dans les techniques innovantes.

Enfin, le jury rappelle que la leçon doit être présentée au plus haut niveau possible mais n'en reste pas moins une leçon. Elle doit donc respecter les critères habituels de clarté nécessaires à une bonne communication, qu'il s'agisse de l'élocution, des commentaires accompagnant les figures, de la tenue du tableau ou de la gestion du temps.

ETUDES CRITIQUES DE DOSSIERS

Identification systématique des complexes protéines de ségrégation des chromosomes.

Documents joints :

- *Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome Segregation Proteins.* Hutchins J.R.A. et al ; Science (2010) 328 : 593-599.
- *The tandem affinity purification method: An efficient system for protein complex purification and protein interaction identification.* Xu X. et al ; Protein expression and purification (2010) in Press.

La pathogénicité de *Bacillus thuringiensis* vis-à-vis des insectes.

Documents joints :

- *Bacillus thuringiensis: an impotent pathogen ?* Raymond B., Johnston P. R., Nielsen-LeRoux C. et al ; Trends in Microbiology (2010) 18 : 189-194.
- *Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm *Manduca sexta*.* Johnston P. R. et al ; Applied and Environmental Microbiology (2009) 75 : 5094-5099.

Production de bio-plastiques grâce aux granules lipidiques bactériens.

Documents joints :

- *Spontaneous liberation of intracellular polyhydroxybutyrate granules in *Escherichia coli*.* Jung I. L. et al ; Research in Microbiology (2005) 156 : 865-873.
- *Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications.* Grage K. et al ; Biomacromolecules (2009) 10 : 660-669.

Les "nucleoid-associated proteins" (NAP) chez les bactéries : protéines de structure et/ou de régulation ?

Documents joints :

- *H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen.* Castang S. et al ; Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (2008) 105 : 18947-18952.
- *Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression.* Dillon S. C. and Dorman C. J. Nature Reviews Microbiology (2010) 8 : 185-195.

Un nouveau RCPG activé par des protéases et un nouveau mécanisme d'activation.

Documents joints :

- *Role of the PAR1 Receptor 8th Helix in Signaling.* Swift S. et al ; J. Biol. Chem. (2006) 281, (7) : 4109–4116.
- *A Novel Protease-activated Receptor-1 Interactor, *BicaudalD1*, Regulates G Protein Signaling and Internalization.* Swift S. et al ; J. Biol. Chem. (2010) 285, (15) : 11402–11410.

Le développement des colonies de *Bacillus subtilis*.

Documents joints :

- *DegU and SpoA jointly control transcription of two loci required for complex colony development by *Bacillus subtilis*.* Verhamme D. T. et al ; Journal of Bacteriology (2009) 191 : 100-108.

- *Thinking about Bacillus subtilis as a multicellular organism.* Aguilar C. et al ; Current Opinion in Microbiology (2007) 10 : 638-643.

Facteurs de croissance et pathologies respiratoires.

Documents joints :

- *Brain-derived neurotrophic factor in TNF- α modulation of Ca²⁺ in human airway smooth muscle.* Prakash et al ; American journal of respiratory cell and molecular biology (2009) 41.

- *Nerve growth factor: The central hub in the development of allergic asthma?* Nassenstein et al ; European Journal of Pharmacology (2006) 533 : 195–206.

Les radicaux libres lors d'un exercice physique.

Documents joints :

- *Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans.* Ristowa M. et al ; P.N.A.S. (2009) 106, (21) : 8665–8670.

- *Functional, structural, and chemical changes in myosin associated with hydrogen peroxide treatment of skeletal muscle fibers.* Prochniewicz E. et al ; Am. J. Physiol. Cell. Physiol (2008) 294 : C613–C626.

Dégradation protéique et fonction neuronale.

Documents joints :

- *Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression.* Colledge and al ; Neuron (2003) 40, (October 30) : 595–607.

- *Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction.* Hwan-Ching T. and Schuman E.M. Nature reviews neuroscience (november 2008) 9 : 826-838.

Cancer du sein et voie de signalisation Notch.

Documents joints :

- *High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival.* Reedijk et al ; Cancer Res .(2005) 65 (18 ; September 15).

- *Rational targeting of Notch signaling in cancer.* Rizzo et al ; Oncogene (2008) 27 : 5124–5131.

L'origine de la pathogénicité de *Bacillus anthracis*.

Documents joints :

- *What sets Bacillus anthracis apart from other Bacillus species ?* Kolsto A. B. et al ; Annual Review of Microbiology (2009) 63 : 451-476.

- *Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the Bacillus anthracis virulence plasmid pXO2 and of the Bacillus thurigiensis plasmid pBT9721.* Van Der Auwera G. A. et al ; Genomics (2005) 6 : 103.

Les greffes rénales: un espoir pour moins de rejets.

Documents joints :

- *Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection.* Banu Sis, and Philip F. Halloran. Current Opinion in Organ Transplantation (2010) 15 : 42–48.

- *Endothelial Gene Expression in Kidney Transplants with Alloantibody Indicates Antibody-Mediated Damage Despite Lack of C4d Staining.* Banu Sis, Gian S. et al ; American Journal of Transplantation (2009) 9 : 2312–2323.

Un rôle de l'ordre des codons dans la traduction.

Documents joints :

- *A role for codon order in translation dynamics.* G Cannarozzi et al ; Cell (2010) 141 : 355-367.
- *An evolutionary conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation.* Tuller T. et al ; Cell (2010) 141 : 344-354

Ras, CraF une nouvelle voie aux conséquences inattendues pour les inhibiteurs de Raf.

Documents joints :

- *The Raf Inhibitor Paradox: Unexpected Consequences of Targeted Drugs.* Cox A et al ; Cancer cell (2010) 17 : 221-223.
- *Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF.* Heidom et al ; Cell (2010) 140 : 209-221.

Coloration et imagerie des cellules vivantes.

Documents joints :

- *Recombinant aequorin and green fluorescent protein as a valuable tool in the study of cell signalling.* Chiesa et al ; Biochem J. (2001) 355 : 1-12.
- *Two-color photoactivatable probe for selective tracking of proteins and cells.* A. Welman et al ; J. Biol. Chem. (2010) 285 : 11607-11616.

Une thérapie antitumorale qui favorise la dissémination des métastases.

Documents joints :

- *Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis.* Paez-Ribes M. et al ; Cancer Cell (2009) 15 : 220-231.
- *Playing only one instrument may not be enough : limitations and future of the antiangiogenic treatment of cancer.* Quesada A.R. et al ; BioEssays (2007) 29 : 1159-1168.

La plasticité phénotypique du coeur.

Documents joints :

- *Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms.* Swynghedauw B. J. Exp. Biol. (2006) 209 : 2320-2327.
- *Diurnal profiling of neuroendocrine genes in murine heart, and shift in proopiomelanocortin gene expression with pressure-overload cardiac hypertrophy.* Jennifer A. et al ; J. Mol. Endoc. (2008) 41 : 117-124.

L'acquisition et les conséquences des résistances aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes.

Documents joints :

- *The clinical consequences of antimicrobial resistance.* Rice L. B. Current Opinion in Microbiology (2009) 12 : 476-481.
- *Ciprofloxacin-resistant Gram-negative bacilli in the fecal microflora of children.* Qin X. et al ; Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2006) 50 : 3325-3329.

La logique du quorum-sensing dans la "vraie vie".

Documents joints :

- *Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats.* Decho A. W. et al ; Trends in Microbiology (2010) 18 : 73-80.

- *Vibrio harveyi quorum-sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression*. Mok K. C. et al ; EMBO Journal (2003) 22 : 870-881.

Diabète et rétinopathie: quels liens?

Documents joints :

- *The Retinal Proteome in Experimental Diabetic Retinopathy*. Patrice E. Fort. et al ; Molecular & Cellular Proteomics 8 (2009) : 767–779.

- *New Insights into Hyperglycemia-induced Molecular Changes in Microvascular Cells*. Roy S. et al ; A. J. Dent. Res. 89,(2) (2010) : 116-127.

Une signature moléculaire commune a différentes pathologies et nouvelles thérapie.

Documents joints :

- *A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases*. Hirsch H. A. et al ; Cancer Cell (2010) 17 : 348-361.

- *Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission*. Hirsch H. A. et al ; Cancer Res. (2009) 69 : 7507-7511.

RAPPORT SUR LES ETUDES CRITIQUES DE DOSSIERS

Rapport établi par Messieurs M. GAVRILOVICH, M. LANDRY,
F. LASBENNES, P. LEJEUNE et A. MOREL.

1- RÉSULTATS

3, 4, 5, 6, 6, 7, 7, 7, 8, 8, 8, 8, 9, 10,10, 11,12, 13, 13, 14, 14

Moyenne générale de l'épreuve : 8,71 / 20

L'épreuve d'ECD est un exercice difficile mais incontournable pour de futurs enseignants en sciences. En effet, un cours doit pouvoir être actualisé constamment et l'enseignant se doit d'effectuer une veille des connaissances par l'intermédiaire de publications originales concernant l'ensemble des disciplines de la biologie. Cette veille est essentielle pour transmettre des données d'actualité car les manuels, si bien soient ils, présentent invariablement un retard par rapport à l'actualité scientifique qui dans les meilleurs des cas est de 4 à 5 années. Par ailleurs, ces manuels, dans le but louable de simplifier les concepts pour les rendre plus faciles à appréhender, ne permettent pas de connaître l'ensemble des découvertes. Ces manuels sont cependant indispensables pour comprendre les données fondamentales. Une difficulté consiste dans le fait que la grande majorité des articles scientifiques sont en langue anglaise. Le langage scientifique est toutefois relativement simple et ne doit pas être une gêne majeure. L'exercice consiste donc à présenter une synthèse cohérente, comprenant la présentation du contexte scientifique, la formalisation de la question scientifique et la description des méthodes adaptées à la résolution de la question posée. Enfin dans la mesure du possible une étude critique doit apparaître dans la discussion qui montre les limites des arguments expérimentaux fournis et/ou met les intérêts scientifiques en perspective. Afin de rendre l'exposé compréhensible, des schémas doivent illustrer le propos mais, à la différence des leçons, les résultats expérimentaux majeurs doivent être illustrés et commentés.

Certains candidats n'ont pas du tout abordé l'article de recherche. La lecture du résumé et de l'introduction aurait pourtant été suffisante pour situer le travail de recherche dans la problématique de l'article de synthèse. Il importe de souligner l'importance de cette approche : même si le candidat ne peut maîtriser tous les détails de la démarche expérimentale, il est essentiel qu'il apporte des éléments montrant sa capacité à passer du général au particulier, et inversement. D'autre part, lorsque le sujet fait appel à des notions de microbiologie, plusieurs candidats font preuve de difficultés à considérer les microorganismes comme autre chose que des objets de laboratoire ou des entités purement théoriques. Une des tendances lourdes de la microbiologie actuelle est de chercher à comprendre les microorganismes dans la "vraie vie" plutôt que dans des récipients de laboratoire. La fatigue conjuguée pour certains candidats avec une démotivation due à un succès connu au CAPET ont contribué à ces difficultés mais le manque d'expérience de l'analyse d'articles scientifiques et la durée de l'entretien qui le suit sont néanmoins les facteurs les plus importants.

Manifestement, certains candidats sont peu habitués à lire des articles scientifiques. Il est donc important de se familiariser avec une telle lecture. Le candidat pourra constater qu'il existe des constantes dans la présentation des articles sur lesquelles il s'appuiera pour extraire l'information qui l'intéresse. Par exemple, l'introduction donne des renseignements utiles pour identifier la question abordée par l'article de recherche ainsi que l'état des connaissances relatives à cette question. La plupart du temps, une revue fait partie des articles proposés. Elle dépasse très souvent le cadre des articles de recherche qui l'accompagnent. Il est donc important de lire en premier lieu les introductions des articles fondamentaux afin de savoir ce qui est nécessaire de rechercher dans l'article de synthèse. Cet article de synthèse doit aider le candidat à mieux comprendre les notions abordées succinctement dans l'introduction des articles de recherche. Il n'est donc pas toujours nécessaire de le lire en entier. Il doit également permettre au candidat de replacer les notions abordées dans le contexte de ses propres connaissances. Les résultats présentés peuvent schématiquement se diviser en deux parties qu'il est important d'identifier. Une de ces deux parties est constituée par les contrôles nécessaires pour valider l'expérimentation. Une autre partie a pour but de présenter les résultats répondant à la question posée. Le choix des exemples présentés doit permettre de structurer la présentation. Il appartient au candidat d'évaluer ce qui est indispensable de présenter et ce qui peut être omis ou signalé rapidement. Enfin, le chapitre dédié à la conclusion doit permettre d'évaluer les perspectives offertes par le travail réalisé. Il est rare que les auteurs ne défendent pas leur travail mais ils sont souvent tenus de nuancer leurs propos par les spécialistes qui ont analysé l'article et donné leur accord pour publication. Il appartient donc au candidat d'analyser tous les termes de cette conclusion pour en percevoir les nuances et dégager les perspectives qu'elle ouvre.

Enfin, la séance de 30min consacrée aux questions révèle souvent de grandes faiblesses. Les 15 premières minutes consacrées aux articles montrent les difficultés rencontrées lors de leur lecture, expliquant par là les maladroites relevées lors de l'exposé. Elles expliquent en particulier, que cet exposé se limite souvent à un résumé de la revue, l'article de recherche ayant été très mal compris. Les 15 minutes suivantes, consacrées à la culture générale déstabilisent souvent le candidat qui montre des difficultés pour réinvestir des connaissances hors du champ des articles proposés.

Le jury a cherché à sonder la culture scientifique des candidats ainsi que leur intérêt pour des thèmes biologiques généraux. Une corrélation entre les connaissances en biologie et le niveau de réflexion plus globale était manifeste.

RAPPORT SUR LA CHIMIE A L'ORAL

Rapport établi par Monsieur Xavier BATAILLE

Nous rappelons que les concepts et techniques fondamentaux de la chimie sont évalués lors de l'épreuve de travaux pratiques, et que trois aspects de la chimie sont particulièrement importants pour l'oral de l'agrégation de Biochimie-Génie Biologique : la chimie structurale (essentiellement la chimie organique, descriptive ou mécanistique, appliquée dans un contexte biochimique), la chimie-physique et les techniques analytiques.

Il est important de ne pas négliger les représentations bidimensionnelle (la simple représentation de Lewis) et tridimensionnelle de la stéréochimie des molécules (savoir repérer des atomes de carbone asymétriques, savoir faire des représentations chaises de cycles, passer d'une représentation de Fischer à une représentation de Cram, connaître la stéréochimie des acides aminés etc.).

En chimie-physique, nous avons observé un mieux mais la liaison hydrogène, pourtant essentielle, ainsi que les différentes interactions intermoléculaires ne sont pas souvent connues avec suffisamment de précision.

Lors des ECD, concernant les techniques analytiques, nous avons constaté globalement la méconnaissance des concepts et des techniques de Spectrométrie de Masse (MALDI-TOF notamment, simple ou en tandem appliquée au séquençage de peptides), de la Microscopie à Effet Tunnel, ainsi que des notions plus générales comme la fluorescence et ses utilisations, comme le FRET.

Nous rappelons que la chimie, tant sous ses aspects structuraux, mécanistiques qu'analytiques, demeure une discipline fondamentale dans l'apprentissage et l'enseignement de la biochimie ainsi que dans la maîtrise des techniques du génie biologique.

Nous avons pu constater cette année encore qu'un nombre important de candidats se sont investis dans cette discipline.

REFLEXIONS SUR LA SESSION 2010

Rapport établi par Monsieur François LASBENNES

L'intérêt suscité par ce concours se maintient puisque l'on retrouve, d'une année à l'autre, des nombres de candidats inscrits et présents à l'épreuve d'admission à peu près identiques. En revanche, il faut noter une évolution de la population, les deux traits les plus significatifs étant une réduction importante du nombre de candidats ayant préparé le concours à l'ENS et une augmentation du nombre de candidats actuellement professeurs du secondaire. Il faut également noter que plusieurs candidats sont titulaires d'une thèse. Il n'est pas difficile de comprendre l'origine de cette évolution. Si les candidats de l'ENS boudent la préparation du concours, jugée comme une perte de temps pour les carrières auxquelles ils se destinent, les professeurs tiennent à cette reconnaissance et, constatant que le concours interne n'est pas ouvert depuis plusieurs années, ils se présentent au concours externe. Le cas des candidats titulaires d'une thèse montre les difficultés que rencontrent les étudiants pour s'insérer dans le monde de la recherche.

Il est à noter que l'évolution du profil des candidats n'affecte pas le niveau du concours. On constate une augmentation de la barre d'admissibilité qui passe de 6,5/20 en 2008 à 7,5/20 en 2010 et une stabilité de la moyenne générale obtenue par les candidats admis pour l'ensemble du concours. Ce résultat montre que la personnalité des candidats joue un rôle important car, à niveau de connaissance identique, elle peut largement influencer les performances. Les différentes épreuves demandent certes, des connaissances mais également un savoir faire pour les restituer au mieux. Le jury constate régulièrement des maladroites qui semblent simples à éviter. Elles montrent que le contexte dans lequel se déroule le concours est déstabilisant et ne peut être comparé à celui rencontré lors de la préparation en toute sérénité d'un devoir. Dans le cadre d'un examen comme celui ci, la maîtrise d'un sujet quel qu'il soit ne peut s'obtenir sans dominer l'ensemble du programme de l'agrégation afin de cerner rapidement tous les aspects qui doivent être développés et sans la souplesse d'esprit qui permet de passer rapidement d'un sujet à un autre. D'autre part, la force de caractère du candidat, sa motivation et un sens de l'esprit du concours sont des facteurs importants pour affronter une succession d'épreuves longues et difficiles. Un bon niveau culturel n'est pas non plus sans intérêt.

Dès lors que ces capacités se conjuguent avec un niveau correct de connaissances, tout candidat a une chance de succès. Cette fusion est dans l'esprit même du concours. En effet, la rapidité de l'évolution des techniques et des connaissances en biochimie comme dans de nombreux autres domaines demandera une remise en question permanente de la part des nouveaux agrégés. Il est donc important de pouvoir juger des capacités des candidats à assurer cette mise à niveau permanente. Dans cet esprit, le concours accorde une place primordiale à tous les moyens permettant au candidat de faire valoir ses capacités. Il faut noter à cet égard que l'épreuve de travaux pratiques, à la pointe des techniques actuelles et des découvertes qu'elles sous-tendent et l'étude critique de dossiers fondée sur l'analyse de travaux de recherche récents s'inscrivent totalement dans cet objectif.

Le jury espère que les nouveaux agrégés sauront conserver l'esprit qui les a animés lors du concours.

**LISTE DES OUVRAGES MIS A LA DISPOSITION DES CANDIDATS POUR LES
EPREUVES ORALES**

Biochimie

AUTEURS	DOCUMENT	EDITEUR	COLLECTIO N	DAT E	ISBN
Ameziane Lamoril	Principes de biologie moléculaire en biologie clinique	Elsevier			
Bhagavan, N.V.	Medical biochemistry (4e éd.)	Harcourt academic press		2001	0-12- 095440-0
Bogard, Marc /	Biologie moléculaire en biologie clinique. 1, Méthodes	Elsevier	OPTION BIO	1998	2-84299- 007-2
Bogard, Marc /	Biologie moléculaire en biologie clinique. 2, Application en infectiologie et en cancérologie	Elsevier	OPTION BIO	1999	2-84299- 094-3
Bogard, Marc /	Biologie moléculaire en biologie clinique. 3, Applications en génétique	Elsevier	OPTION BIO	1999	2-84299- 150-8
Borel, Jacques- Paul/ Maquart, François- Xavier/ Le Peuch, Christian/ Randoux, A.	Biochimie dynamique	De Boeck		1997	2-8041- 2453-3
BRANDEN, C. / TOOZE, J.	Introduction à la structure des protéines	De Boeck		1996	2-8041- 2109-7
Cheftel, Jean- Claude /Cheftel, Henri /	Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Volume 1	Technique et Documentation- Lavoisier	INGENIEUR S PRATICIENS	1992	2-85206- 827-3

Cheffel, Jean-Claude / Cheffel, Henri /	Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Volume 2	Technique et Documentation	INGENIEURS PRATICIENS	1977	2-85206-828-1
Combarrous, Yves	Biochimie des communications cellulaires (hormones, neuromédiateurs, cytokines, facteurs de croissance)	Technique et Documentation		2004	
Delattre, Durand, Jardillier	Biochimie pathologique	Flammarion Med Scien		2003	
Durliat, Guy /	Biochimie structurale	Diderot	BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES	1997	2-84352-002-9
Etienne, Jacqueline	Biochimie génétique, biologie moléculaire (8e éd.)	Masson	Abrégés	2004	2-225-85665-6
GLICK, BERNARD R. / PASTERNAK, JACK J.	Molecular Biotechnology : Principles and Applications of Recombinant D.N.A. (3è ed)	American society for microbiology		2003	1-5581-224-4
Griffiths, Anthony J.F. / Miller, Jeffrey H. / Suzuki, David T. / ... [et al.]	Introduction à l'analyse génétique (3e éd.)	De Boeck		2002	2-7445-0097-6
HENNEN, GEORGES	Biochimie (1er cycle : DEUG SNV, PCEM, Pharmacie)	Dunod		1995	2-10-002620-8
HERBOMEL, PHILIPPE	L'expression du génome, du noyau à l'organisme	ESTEM		1993	2-909455-14-9
HORTON, R. / MORAN, L., / OCHS, R. / RAWN, J.	Principes de biochimie	De Boeck-Wesmaël		1994	2-8041-1578-X
Kamoun, Pierre	Biochimie et biologie moléculaire	Flammarion médecine-sciences	De la biologie à la clinique	2003	2-257-10121-9
LEHNINGER, A.L.	Lehninger Principles OF Biochemistry (4 th ed)	WH Freeman		2005	0-7167-4339-6

LEHNINGE R, A.L.	Principes de biochimie	Flammarion médecine-sciences		2000	
LEWIN, B.	Gènes VIII	Prentice Hall		2004	0-13-123924-4
LIPPARD, STEPHEN / BERG, JEREMY	Principes de biochimie minérale	De Boeck		1997	2-8041-2517-3
Moussard	Biologie moléculaire : biochimie des communications cellulaires	De Boeck			2-8041-3488-1
Metzler, David	Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Vol. 1	Harcourt academic press		2001	0-12-492540-5
Metzler, David	Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Vol. 2	Harcourt academic press		2003	0-12-492541-3
MURRAY, E.G.D. / GRANNER, D.K. / MAYES, P.A. / RODWELL, V.W.	Biochimie de Harper (2è ed)	DE BOECK/PRESSES DE LAVAL		2003	2-8041-4118-7
Pelmont, Jean	Enzymes : Catalyseurs du monde vivant	Presses Universitaires de Grenoble	Grenoble sciences	1995	2-7061-0655-7
Pelmont, Jean	Enzymes : catalyseurs du monde vivant	EDP SCIENCES	Grenoble Sciences	1995	2-86883-453-1
Price et Stevens	Fundamentals of enzymology	Oxford			0-19-850229-X
Primrose	Principes de génie génétique	De Boeck			
Ptashne, Mark /	A genetic switch : Phage lambda revisited (3rd ed.)	Blackwell Scientific Publications		2004	0-87969-716-4
Scriban, René	Biotechnologie	Tec et Doc		1999	2-7430-0309-X
Shechter, Emmanuel	Biochimie et biophysique des membranes : aspects structuraux et fonctionnels (2è éd.)	Masson	ENSEIGNT DES SCIENCES DE LA VIE	1997	2-225-83009-6

Stryer, Lubert	Biochimie (5e ed.)	Flammarion médecine- sciences		2003	
TIXIER- VIDAL, ANDREE	Biologie cellulaire de la sécrétion des protéines	PLAGE	Biologie : communicati on cell	1997	2-84054- 051-7
Voet, Donald / Voet, Judith G.	Biochimie	De Boeck		2005	
Weil	Biochimie générale (9è ed)	Dunod	Sciences sup	2001	1-10- 005573-9
Zubay, Geoffrey	Biochemistry (4th ed.)	WCB		1998	0-697- 21900-3

Physiologie

AUTEURS	DOCUMENT	EDITEUR	COLLECTI ON	DAT E	ISBN
Alberts, Bruce / BRAY, D. / LEWIS, J. / RAFF, M.	Biologie moléculaire de la cellule (4è Ed)	Flammarion			2-257- 16129-6
Alberts, Bruce / BRAY, D. / LEWIS, J. / RAFF, M.	Biologie moléculaire de la cellule (4è Ed)	Flammarion		2004	
Alberts, Bruce / BRAY, D. / LEWIS, J. / RAFF, M.	Molecular Biology of the Cell			2002	
BACH, JEAN- FRANCOIS	Immunologie	Flammarion	De la biologie à la clinique	1999	2-257- 13590-3
Bear, Mark F. / Connors, Barry W. / Paradiso, Michael A.	Neurosciences : A la découverte du cerveau	PRADEL		1998	2-907516- 92-2
Berne, Robert M. / Levy, Matthew N.	Physiology (4th ed.)	MOSBY		1998	0-8151- 0952-0
Berne, Robert M. /Levy, Matthew N. /	Principles of physiology (2nd ed.)	MOSBY		1996	0-8151- 0523-1
Boron, Boulpoep	Medical Physiology	SAUNDERS		2003	0-7216- 4360-1
Breton-Gorius, Janine / Reyes, Felix / Rochant, Henri/ Rosa, Jean	L'Hématologie de Bernard Dreyfus	Flammarion	Médecine sciences	1999	2-257- 13526-1
Calas, André / Perrin, Jean- François/ Plas, Christian/	Précis de Physiologie	Doin	Biosciences et techniques	1997	2-7040- 0748-9

Vanneste, Patrick					
Calvino, Bernard	Introduction à la physiologie	Belin	Belin-Sup sciences	2003	2-7011-3079-4
Darnell, James /Lodish, Harvey /Arnold, Berk/ Baltimore, D. /	Molecular cell biology (5th ed.)	FREEMAN		2005	
Darnell, James /Lodish, Harvey/Baltimore, D. /Arnold, Berk/	Biologie moléculaire de la cellule (3e éd.)	De Boeck		1997	2-7445-0001-1
DREWS, ULRICH	Atlas de poche d'embryologie	Flammarion		1994	2-257-10115-4
Dupouy, Jean-Paul /	Hormones et grandes fonctions. Tome 1	Ellipses-Marketing		1992	2-7298-9282-6
Dupouy, Jean-Paul /	Hormones et grandes fonctions. Tome 2	Ellipses-Marketing		1993	2-7298-9318-0
Espinosa	Immunologie	Ellipses			2-7298-2433-2
Ganong, William F. /	Physiologie médicale (19e éd.)	De Boeck Université	Sciences médicales. Série Claude Bernard	2001	2-8041-4016-4
Gilbert, Scott F./Singer, Susan R./	Biologie du développement (2e éd.)	DE BOECK & LARCIER		2004	2-8041-4534-4
Greenspan, Francis S. / Strewler, Gordon J./	Basic & Clinical Endocrinology (5th ed.)	APPLETON & LANGE		1997	0-8385-0588-0
Greger, R. / Windhorst, U.	Comprehensive Human Physiology : From Cellular Mechanisms to Integration. Volume 1	SPRINGER-VERLAG		1996	3-540-58109-X
Greger, R. / Windhorst, U.	Comprehensive Human Physiology : From Cellular Mechanisms to Integration. Volume 2	Springer		1996	3-540-58109-

Guénard, Hervé	Physiologie humaine (3e éd.)	PRADEL		2002	2-913996-04-3
Guyton, Arthur C. / Hall, John E.	Human physiology and mechanisms of disease (6th ed.)	SAUNDERS COMPANY		1997	0-7216-3299-8
Hammond, Constance	Cellular and Molecular Neurobiology	Academic Press		1996	0-12--8
HERBERT, JOHN / WILKINSON, PETER/ STOTT, DAVID	The Dictionary of Immunology : Fourth edition	Academic Press		1995	0-12-752025-2
Idelman, Simon/ Verdeti, Jean/	Endocrinologie et communications cellulaires	EDP SCIENCES	Collection Grenoble Sciences	2000	2-86883-476-0
JANEWAY, CHARLES / TRAVERS, PAUL / WALPORT, MARK	Immuno-Biology : The Immune System in Health and Disease	Elsevier		2003	
Kandel, Eric R. /Schwartz, James H. /Jessel, Thomas M.	Principles of Neural Science (4th ed.)	McGraw-Hill		2000	0-07-112000-9
Goldsby, Richard ...	Immunologie : le cours de Janis Kuby	Dunod	Sciences sup, Cours	2003	2-10-007396-6
Levick, J. R.	An introduction to Cardiovascular Physiology (2nd ed.)	BUTTERWORTH-HEINEMANN		1995	0-7506-2167-2
Marieb, Elaine N.	Anatomie et physiologie humaines	De Boeck Université		2005	
Méi, Noël	La sensibilité viscérale	TEC & DOC LAVOISIER		1998	2-7430-0248-4
Poirier, Jean / Ribadeau Dumas, J.-L.	Histologie (4e éd.)	Masson	Abrégés	1997	2-225-84162-4
Purves, Dales/ Augustine, George J./ Fitzpatrick, David/	Neurosciences	De Boeck Université	Neurosciences & cognition	2005	

Revillard, Jean- Pierre/ASSIM /	Immunologie (4e éd.)	DE BOECK		2001	2-8041- 3805-4
Richard, Daniel	Neurophysiologie	Dunod	Sciences sup, Cours	2001	2-10- 005638-7
Richard, Daniel / Orsal, Didier/	Neurophysiologie. 1, Physiologie cellulaire et systèmes sensoriels	Nathan	FAC. SCIENCES	1994	2-09- 190834-7
Richard, Daniel / Orsal, Didier/	Neurophysiologie. 2, Motricité et grandes fonctions du système nerveux central	Nathan	FAC. SCIENCES	1994	2-09- 190835-5
Roitt, Ivan Maurice/ Brostoff, Jonathan/ Male, David K.	Immunologie (3è Ed)	De Boeck		2002	2-8041- 4057-1
ROLAND, J.C. / SZOLLOSI, A. / SZOLLOSI, D. / CALLEN, J.C.	Biologie cellulaire (5è Ed)	Dunod	Sciences sup	2002	2-10- 005669-7
Silbernagl, Stephan / Despopoulos, Agamemnon	Atlas de poche de physiologie (2e éd. fr.)	Flammarion	Médecine sciences	2000	2-257- 12439-1
Tritsch, Danièle/ Chesnoy- Marchais, Dominique / Feltz, Anne	Physiologie du neurone	Doin		1999	2-7040- 0872-8
Vander, Arthur J. / Sherman, James H. / Luciano, Dorothy S.	Physiologie humaine	CHENELIERE/McG raw-Hill		2004	
Wolpert, Lewis	Biologie du développement : les grands principes	Dunod	Sciences sup. Sciences de la nature et de la vie	1999	2-10- 004189-4
ZIGMOND Michael J.	Fundamental neuroscience	Academic Press		1999	0 -12- 780870-1

Microbiologie

AUTEURS	DOCUMENT	EDITEUR	COLLECTION	DATE	ISBN
Avril, Jean-Louis/ Dabernat Henry/ Denis, F.	Bactériologie clinique (3e éd.)	Ellipses- Marketing		2000	2-7298- 9908-1
Balows, Albert / Hausler, William J. / Hermann, Kennett L.	Manual of Clinical Microbiology (5th ed.)	American society for microbiology		1991	1-55581- 030-6
BOTTON, B. / BRETON, A. / FEVRE, M. / GAUTHIER, S.	Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle (2è éd.)	Masson	BIOTECHNOLOG IES	1990	2-225- 81987-4
BOURGEOIS , C.M. / MESCLE, J.F. / ZUCCA, J.	Microbiologie alimentaire, Tome 1 : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments	TEC & DOC LAVOISIER	SCIENCES ET TEC AGRO- ALIMENTAIRES	1996	2-7430- 0037-6
BOURGEOIS , C.M. / LARPENT, J.P.	Microbiologie alimentaire, Tome 2 : aliments fermentés et fermentations alimentaires	TEC & DOC LAVOISIER	SCIENCES ET TEC AGRO- ALIMENTAIRES	1996	2-7430- 0080-5
Madigan, Michael, T. /Martingo, John /Parker,	Brock biology of microorganisms (10è Ed)	PRENTICE- HALL		2003	0-13- 066271-2
Madigan, Michael, T. /Martingo, John /Parker,	Brock biology of microorganisms (11è Ed)	PRENTICE- HALL		2005	0-13- 066271-2
Brogden, Kim/ Roth, James	Virulence mechanisms of bacterial pathogens (3rd ed.)	American society for microbiology		2000	1-55581- 174-4
CRAINIC, RADU / NICOLAS, JEAN, CLAUDE	Virologie médicale	Technique et documentatio	BIOLOGIE MEDICALE	1993	2-85206- 909-1
Dimmock	Introduction to modern virology	Blackwell Publ			

Fauquet et col	Classification et nomenclature des virus	ELSEVIER		2005	0-12-24995 1-4
FENNER, FRANCK / GIBBS, PAUL / MURPHY, FREDERICK / ROTT, RU	Veterinary Virology	Academic Press		1993	0-12-253056-X
FERRON, AZELE	Bactériologie médicale (15e éd.)	C et R	MICROBIOLOGIE	1994	2-85510-038-0
FLANDROIS, J.-P	Bactériologie médicale	PRESSES UNIVERSITAIRES	AZAY	1997	2-7297-0567-8
Flint, S. Jane/ Enquist, L.W./Krug, R.M./Racaniello, V.R./	Principles of virology : Molecular biology, pathogenesis, and control.	American society for microbiology		2000	1-55581-127-2
Freney, Jean / Renaud, François / Hansen, Willy	Précis de Bactériologie clinique	Eska		2000	2-86911-828-7
Gournier-Chateau, Nathal/ Larpent, Jean-Paul / Larpent, Jean-Luc /	Les probiotiques en alimentation animale et humaine	Technique et documentation		1994	2-85206-967-9
HASLAY, C. / LECLERC, HENRI	Microbiologie des eaux d'alimentation	Technique et Documentation		1993	2-85206-918-0
Joffin, Jean-Noël/ Joffin, Christiane	Microbiologie alimentaire (5e éd.)	C.R.D.P. Bordeaux		1999	2 86617-342-2
Joffin, Leyral	Microbiologie technique: 1/ dictionnaire des techniques	C.R.D.P. Aquitaine	Biologie technique	2001	2-86617-387-2
Knipe, David Mahan /Howley, Peter M. /	Fieldsl virology (5th ed .)	Lippincott Williams & Wilkins		2006	0-7817-1833-3
Knipe / Howley	Fields Fundamental Virology (5 th Ed))	Lippincott, Williams et Wilkins		2004	

Larpent, Jean-Paul /	Listeria (3e éd.)	Tec et Doc / Ed. médicales internationales	Monographies de microbiologie	2004	2-7430- 0657-9
LE MINOR, LEON / VERON, MICHEL	Bactériologie médicale (2è éd.)	Flammarion médecine- sciences		1990	2-257- 12418-9
LECLERC, HENRI / GAILLARD, J.-L. / SIMONET, M.	Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien	Doin		1995	2-7040- 0740-3
Lengeler, Joseph/ Drews, Gerhart/Schle gel, Hans Günter/	Biology of the prokaryotes	BLACKWELL SCIENCE		1999	0-632- 05357-7
LEVEAU, Jean-Yves / BOUIX, M.	Microbiologie industrielle : les micro- organismes d'intérêt industriel	Technique et Documentation	SCIENCES ET TECHNIQUES AGRO-ALIM	1993	2-85206- 850-8
Leyral, Vierling	Microbiologie et toxicologie des aliments	Doin		1996	
MAHY, BRIAN	A Dictionary of Virology (2è Ed)	Academic Press		1997	0-12- 465326- X
Mammette, A. /	Virologie médicale	Presses Universitaires de Lyon	AZAY	2002	2-7297- 0663-1
Mège, J.L. / Raoult, D./ Revillard, Jean-Pierre	Immunité et infection : Concepts immunopathologiques et perspectives thérapeutiques	Arnette Blackwell		1997	2-7184- 0855-3
Mims, Cedric A./ Nash, Anthony /Stephen, John/	Mims' pathogenesis of infectious disease (5th ed.)	Academic Press		2002	0-12- 498264-6
PELMONT, JEAN	Bactéries et environnement : adaptations physiologiques	PRESSES UNIVERSITAI RES	Grenoble sciences	1993	2-7061- 0502-X
Perry, Staley, Lory	Microbiologie	DUNOD		2004	2-1000 7234 X

Prescott, Lansing /Harley, John / Klein, Donald	Microbiologie	De Boeck- Wesmaël		2003	2-8041- 4256-6
Regnault, Jean-Pierre	Eléments de microbiologie et d'immunologie	Décarie		2002	2-89137- 098-8
SALYERS, ABIGAIL, / WHITT, DIXIE	Bacterial Pathogenesis, a molecular approach	AM. SOC FOR MICROBIOLO GY		1994	1-55581- 094-2
SCHAECHTE R	Microbiologie et pathologie infectieuse	De Boeck- Wesmaël		1999	2-8041- 1592-5
SEIGNEURIN , J.M. / MORAND, P.	Virologie moléculaire médicale	TEC & DOC LAVOISIER	GENIE GENETIQUE G2	1997	2-7430- 0120-8
SPECTER, STEVEN, / LANCZ, GERALD	Clinical Virology Manual (2nd ed.)	Elsevier		1992	0-8385- 1257-7
Strauss, James H./Strauss, Ellen G./	Viruses and human disease	Academic Press		2002	0-12- 673050-4
Tortora, Gérard J. /Funke, Berdell R. /Case, Christine L.	Microbiology : An introduction (6th ed.)	BENJAMIN/ CUMMINGS		1998	0-8053- 8535-5
Tortora	Introduction à la microbiologie	Renouveau Pédagogique		2004	
Trun, Trempy	Fundamentals bacterial genetics	Blackwelle Publishing		2004	0-632- 04448-9
Van Regenmortel, M.H.V /Fauquet, C.M./Bishop, D.H.L	Virus taxonomy : Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses	Academic Press		2000	0-12- 370200-3
Voyles,Bruce A.	The biology of viruses	McGraw-Hill		2002	0-07- 237031-9

Chimie

AUTEURS	DOCUMENT	EDITEUR	COLLECTI ON	DAT E	ISBN
Allinger, Norman / Cava, Michaël P. / De Jongh, A. C./ Johnson, Carl R. [et al.]	Chimie organique. 1, Structure des molécules	McGraw- Hill France		1985	2-7042-0095- 5
Allinger, Norman / Cava, Michaël P. / De Jongh, A. C./ Johnson, Carl R. [et al.]	Chimie organique. 2, Réactions	McGraw- Hill France		1985	2-7042-0096- 3
Allinger, Norman / Cava, Michaël P. / De Jongh, A. C./ Johnson, Carl R. [et al.]	Chimie organique. 3, Applications	McGraw- Hill France		1984	2-7042-0097- 1
ARNAUD, CHRISTIAN	Chimie organique (3e éd.)	Masson	Mémo- guides	1995	2-225-84686- 3
BRENON- AUDAT, FRANCOISE / RAFFLEGEA U, FABIENNE / PREVOTEAU, D.	Chimie inorganique et générale : travaux pratiques commentés : 34 thèmes et 70 expériences (2e éd.)	Dunod		1995	2-10-002499- X
BRENON- AUDAT, FRANCOISE / RAFFLEGEA U, FABIENNE / PREVOTEAU, D.	Chimie inorganique et générale : travaux pratiques commentés : 31 thèmes, 55 expériences	Dunod	J'INTEGRE	1993	2-10-001546- X
Brenon-Audat, Françoise / Busquet, Catherine / Mesnil, Claude	Thermodynamique chimique : cours 1er cycle, classes préparatoires	Hachette		1993	2-01-017972- 2

Chottard, Jean-Claude / Depezay, Jean-Claude / Leroux, Jean- Paul	Chimie fondamentale : Etudes biologiques et médicales. 1, Echanges d'énergie et équilibres	Hermann	METHODE S	1981	2-7056-5936- 6
Chottard, Jean-Claude / Depezay, Jean-Claude / Leroux, Jean- Paul	Chimie fondamentale : Etudes biologiques et médicales. 2, Structure moléculaire (2è éd.)	Hermann	METHODE S	1995	2-7056-6283- 9
Chottard, Jean-Claude / Depezay, Jean-Claude / Leroux, Jean- Paul	Chimie fondamentale : Etudes biologiques et médicales. 2, Structure moléculaire (2è éd.)	Hermann	METHODE S	1984	2-7056-5937- 4
Chottard, Jean-Claude / Depezay, Jean-Claude / Leroux, Jean- Paul	Chimie fondamentale : Etudes biologiques et médicales. 3, Réactions organiques et enzymatiques	Hermann	METHODE S	1982	2-7056-5938- 2
DUPONT, GERARD / DUTEIL, MICHEL / LEGUEUT, CHRISTINE	Cours de Chimie organique (classes préparatoires aux grandes écoles scientifiques, 1er cycle des Universités)	Ellipses- Marketing		1986	2-7298-8500- 5
DUPONT, GERARD / DUTEIL, MICHEL / LEGUEUT, CHRISTINE	Exercices de Chimie organique (Classes préparatoires, B.T.S., 1er cycle des Universités)	Ellipses- Marketing		1990	2-7298-9014- 9
Durupthy, André / Durupthy Odile Estienne Jacques	Chimie : 1ère année MPSI- PTSI	Hachette	H PREPA	2004	2-01-145647- 9
Durupthy, André / Casalot, André / Estienne, Jacques/	Chimie : 1ère année MPSI- PTSI	Hachette	H prépa exercices et problèmes corrigés	1999	2-01-145224- 4

Durupthy, André / Durupthy Odile Estienne Jacques	Chimie I : 1ère année PCSI	Hachette	H PREPA	2004	2-01-145648-7
Durupthy, André / Casalot, André / Jaubert, Alain	Chimie : 2de année MP-MP*-PSI-PSI*-PT-PT*	Hachette	H PREPA	1996	2-01-145170-1
Gray, Harry B. / Haight, Gilbert P.	Principes de Chimie	Interéditions		1982	2-7296-0063-9
Vollhardt, K. Peter C./Schore, Neil E.	Traité de Chimie organique (2è éd.)	De Boeck		1995	2-8041-2068-6
Vollhardt, K. Peter C./Schore, Neil E.	Traité de chimie organique (3è éd.)	De Boeck		1999	2-8041-3153-X

Dictionnaires langue française et bilingues français-anglais

EMBED Word.Picture.8

Secrétariat Général

Direction générale des
ressources humaines

Sous-direction du recrutement