



Secrétariat Général

Direction générale des
ressources humaines

Sous-direction du recrutement

MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE

Concours du second degré – Rapport de jury

Session 2015

AGRÉGATION

SECTION :

BIOCHIMIE GÉNIE BIOLOGIQUE

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

*Les rapports des jurys des concours sont établis
sous la responsabilité des présidents de jury*

SOMMAIRE

	Page
COMPOSITION DU JURY	3
RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES	4
ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ	
Composition de Biochimie	
Sujet	6
Rapport de Jury	6
Composition de Microbiologie	
Sujet	8
Rapport de Jury	8
Composition de Biologie Cellulaire et Physiologie	
Sujet	10
Rapport de Jury	10
ÉPREUVES D'ADMISSION	
Travaux Pratiques de Biochimie – Physiologie	
Sujet	13
Rapport de Jury	35
Travaux Pratiques de Microbiologie	
Sujet	45
Rapport de Jury	72
Travaux Pratiques de Chimie	
Sujet	80
Rapport de Jury	97
Épreuve orale de leçon	
Sujets	100
Rapport de Jury	101
Épreuve orale d'étude critique de dossier scientifique et/ou technique	103
Sujets	106
Rapport de Jury	
CONCLUSION GÉNÉRALE	110

COMPOSITION DU JURY

Président

M. Henri-Jean BOULOUIS, Professeur des Universités, École Nationale Vétérinaire d'Alfort

Vice-président

M. Jean-Pascal DUMON, Inspecteur Générale de l'Éducation Nationale

Secrétaire général

M. Fabien CÉZARD, Professeur Agrégé, Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS

Membres

Romain BARBE	Professeur Agrégé	Lycée Victor Hugo, BESANCON
Christophe BELOIN	Personne à Compétences Particulières	Institut Pasteur, PARIS
Joëlle BISSERY	Professeure Agrégée	Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS
Géraldine CARAYOL	Professeure Agrégée	Lycée Marie Curie, VERSAILLES
Hélène CARRIÉ	Professeure Agrégée	Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS
Fabien CÉZARD	Professeur Agrégé	Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS
Alain COUVINEAU	Personne à Compétences Particulières	Université Paris Diderot / INSERM, PARIS
Aurélie DELEUZE	Professeure Agrégée	Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS
Olivier DOUMEIX	Professeur Agrégé	Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS
Laurence DUPONT	Professeure Agrégée	Université de Versailles-Saint Quentin, VERSAILLES
Édith LALIQUÉ	Professeure Agrégée	Lycée Saint-Louis, BORDEAUX
Philippe LEJEUNE	Professeur des Universités	Institut National des Sciences Appliquées (INSA), VILLEURBANNE
Nicolas MEUNIER	Maitre de Conférences des Universités	Institut National de La Recherche Agronomique (INRA), JOUY-EN-JOSAS
Isabelle MOIZAN	Professeure Agrégée	Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS
Alain MOREL	Professeur des Universités	Université Angers / INSERM, ANGERS
Christian SALIGAUT	Professeur des Universités	Université Rennes 1 / INSERM, RENNES
Benoit SCHNEIDER	Chargé de Recherche CNRS	Université Paris Descartes / INSERM, PARIS
Lucile TIGER	Professeure Agrégée	Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS
Jérôme VINCENT	Professeur Agrégé	Lycée Albert Camus, NÎMES
Denis VIVARÈS	Professeur Agrégé	Lycée Ozenne, TOULOUSE

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits	336
Candidats présents aux épreuves d'admissibilité	98
Nombre de postes	16
Candidats admissibles	33
Candidats présents aux épreuves d'admission	30
Candidats proposés pour l'admission	16
Barre d'admissibilité	05,83
Barre d'admission	10,07

Épreuves écrites d'admissibilité

Moyenne générale des candidats présents	05,72
Moyenne générale des candidats admissibles	09,79

Composition de Biochimie

Moyenne des candidats présents	06,71
Moyenne des candidats admissibles	11,71
Note maximale	18,80

Composition de Microbiologie

Moyenne des candidats présents	05,23
Moyenne des candidats admissibles	08,24
Note maximale	18,50

Composition de Biologie cellulaire et Physiologie

Moyenne des candidats présents	04,85
Moyenne des candidats admissibles	09,41
Note maximale	18,50

Épreuves d'admission

Moyenne générale des candidats présents 09,81

Moyenne générale des candidats admis 11,92

Travaux Pratiques de Biochimie-Physiologie

Moyenne des candidats présents 10,50

Moyennes des candidats admis 11,28

Note maximale 18,20

Travaux Pratiques de Microbiologie

Moyenne des candidats présents 10,78

Moyennes des candidats admis 11,82

Note maximale 16,20

Travaux Pratiques de Chimie

Moyenne des candidats présents 10,03

Moyennes des candidats admis 12,03

Note maximale 18,10

Leçon

Moyenne des candidats présents 08,80

Moyennes des candidats admis 12,13

Note maximale 17,00

Étude critique de dossier scientifique et/ou technique

Moyenne des candidats présents 09,57

Moyennes des candidats admis 12,13

Note maximale 17,00

Ensemble du concours

Moyenne des candidats présents 09,86

Moyenne des candidats admis 11,99

ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Trafic vésiculaire dans la cellule eucaryote.

RAPPORT DU JURY DE BIOCHIMIE

Établi par Alain MOREL, Benoît SCHNEIDER.

Le sujet de Biochimie de l'agrégation de Biochimie-Génie Biologique proposé à la session 2015 portait sur un domaine d'intérêt majeur et d'actualité en biologie concernant le « trafic vésiculaire dans la cellule eucaryote ». Le devoir se devait d'être structuré, concis et pédagogique et devait offrir une vision claire et précise du champ disciplinaire proposé au plus haut niveau.

Un devoir d'agrégation débute toujours par une introduction qui définit les termes du sujet, pose la problématique générale et propose un plan logique permettant de répondre à la/les question(s) posée(s). Dans cette introduction étaient attendus des rappels quant à la composition chimique des membranes et la dynamique membranaire. Ces notions permettaient alors d'aborder le concept de trafic de membrane par un ensemble de structures vésiculaires entre différents compartiments cellulaires. Les rôles fonctionnels de ce trafic vésiculaire se devaient d'être évoqués, à l'aide d'exemples précis, en lien avec le flux de matière (sécrétion, endocytose, adressage, recyclage...). La question des mécanismes biochimiques qui sous-tendent la formation, la mobilité et la reconnaissance de ces vésicules devait être posée. Cette introduction pouvait être rédigée au regard du prix Nobel de Physiologie ou de Médecine attribué en 2013 à James E. Rothman, Randy W. Schekman et Thomas C. Südhof pour leurs découvertes sur les mécanismes moléculaires et cellulaires du trafic membranaire.

Une première partie pouvait être focalisée sur la caractérisation biochimique des vésicules présentes dans une cellule eucaryote. Bien évidemment, cette partie abordait les techniques qui permettent l'isolement et la visualisation de ces vésicules (inhibition pharmacologique d'activités enzymatiques clés pour bloquer le trafic vésiculaire et enrichir la population vésiculaire en un ou plusieurs sous-types de vésicules ; mise en évidence indirecte du trafic vésiculaire par « pulse-chase », purification des vésicules sur gradient de densité après lyse ménagée des cellules, méthodes optiques de visualisation, protéomique et lipidomique vésiculaire...). Ces outils

technologiques permettent d'aborder les caractéristiques fondamentales des vésicules cellulaires, *i.e.* la taille, l'ultrastructure, la composition biochimique de la membrane de la vésicule (lipides, protéines), la matière transportée, et de signer l'origine d'une vésicule par rapport à un compartiment membranaire. Cette première partie pouvait aussi évoquer le lien fonctionnel entre le trafic vésiculaire et le trafic des protéines en relation avec la maturation (glycosylation par exemple) de ces dernières.

Une deuxième partie pouvait être consacrée aux mécanismes biochimiques qui supportent le flux centrifuge des vésicules dans la cellule eucaryote, c'est-à-dire la sécrétion régulée et non régulée de matière depuis des compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique. A l'aide d'exemples bien choisis (sécrétion d'insuline, sécrétion d'enzymes digestives, libération de neuromédiateurs, apport de membrane plasmique, renouvellement des protéines de surface...), le devoir se devait de présenter les acteurs moléculaires qui participent à l'habillage des vésicules (protéines COP) et l'importance fonctionnelle de ces protéines dans l'initiation du trafic vésiculaire, la nature et le rôle des petites protéines G pour les échanges de vésicules entre compartiments cellulaires et l'adressage vers la membrane plasmique, les complexes majeurs de fusion v-SNARE / t-SNARE pour la fusion des vésicules avec le compartiment cible et la régulation par le calcium. Le déplacement des vésicules le long des microtubules devait bien évidemment être décrit en associant les moteurs moléculaires de type dynéine et kinésine. Il fallait aussi présenter les mécanismes par lesquels la vésicule quitte les microtubules pour rejoindre la membrane plasmique en empruntant le cytosquelette d'actine sous-cortical.

Enfin, une troisième partie permettait d'aborder le trafic vésiculaire centripète depuis la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule. Là encore, de nombreux exemples pouvaient être utilisés pour illustrer les concepts d'endocytose, pinocytose, phagocytose, transcytose... Il fallait alors s'attacher aux mécanismes biochimiques qui permettent la formation de la vésicule à la membrane plasmique et son internalisation. En particulier devait être présentée l'internalisation de matière dépendante de la signalisation de récepteurs membranaires et qui mobilise, entre autre, les arrestines, la filamine et le cytosquelette d'actine. Il fallait s'attacher à l'importance des puits recouverts de clathrine pour l'endocytose ainsi qu'au rôle d'une autre protéine de l'architecture membranaire, la cavéoline, pour la formation et la dynamique des cavéoles. On pouvait mentionner à ce stade la mobilité de certaines vésicules par « kiss-and-run » pour réguler les flux de matières ou l'activité de signalisation de certains récepteurs de surface. L'importance fonctionnelle de ces différents mécanismes pouvait être illustrée à l'aide d'exemples judicieusement choisis (importation du fer dans la cellule via la transferrine, transport des immunoglobulines, défense antibactérienne, dégradation des protéines membranaires dans les lysosomes...).

Comme tout devoir, une conclusion devait être rédigée. Celle-ci ne devait pas seulement être un résumé des chapitres précédents mais devait proposer une ouverture sur la base des notions et connaissances présentées précédemment. En particulier, il était important de mettre en avant que de nombreuses pathologies sont associées à des altérations fonctionnelles d'acteurs du trafic vésiculaire. Les mécanismes d'action de toxine (toxine botulique) et leurs conséquences pouvaient illustrer l'importance physiologique de ces processus. Et que notre connaissance de la structure des vésicules et de leur dynamique a permis d'envisager des approches thérapeutiques innovantes (utilisation des exosomes comme stratégie anti-tumorale).

À la lecture de l'ensemble des copies, les correcteurs ont très souvent noté un grand déséquilibre dans la construction des devoirs avec une introduction et une conclusion très largement négligées, sans problématique affichée et perspectives développées. Ceci atteste le plus souvent d'un manque de connaissances ou de culture sur des aspects aussi fondamentaux de la biologie. Dans de nombreuses copies, les exemples sont décrits de façon très superficielle et les mécanismes présentés sont fantaisistes illustrant un niveau de maîtrise des connaissances assez faible. Bon nombre de candidats ont toujours beaucoup de mal à organiser leurs connaissances de façon synthétique de façon logique. Toutefois, à de rares exceptions, la rédaction et l'orthographe sont correctes. Dans leur ensemble, les candidats ont fait l'effort d'une présentation soignée. L'iconographie était quelques fois d'une très grande qualité et certains devoirs se sont démarqués par des connaissances scientifiques de très haut niveau.

COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Séquençage ADN, identification et classification des Procaryotes.

RAPPORT DU JURY DE MICROBIOLOGIE

Établi par Henri-Jean BOULOUIS, Philippe LEJEUNE.

Le séquençage de l'ADN, mis au point par Maxham et Gilbert et par Sanger il y a plus de 40 ans, a atteint ces dernières années une phase de maturité. De laborieux et long, il est devenu accessible et rapide, technique de routine à la portée des laboratoires de diagnostic et de recherche. Cet accès facile au génome a donc introduit un changement de paradigme dans l'identification et la classification des êtres vivants, changement qui est au cœur de ce sujet consacré aux procaryotes.

Les plans suivis par les candidats, tous acceptables, ont été très variés, combinant les trois mots clefs du sujet au gré des connaissances qui abondaient chaque partie dans une optique d'équilibre qui n'a pas toujours été atteint.

L'introduction pouvait s'appuyer sur des notions historiques concernant le sujet sans remonter aux fondements de la microbiologie ou de la systématique des êtres vivants et sur des définitions permettant de cerner les limites du sujet. Le plan du devoir constitue logiquement la conclusion de l'introduction, ce qui, apparemment, ne semble nécessaire que pour la moitié des candidats.

La partie consacrée au séquençage de l'ADN devait reprendre *a minima* la méthode historique de Sanger, correctement expliquée dans son principe, et exposer de façon éventuellement plus succincte le principe des nouvelles générations de techniques de séquençage (technologie Illumina, ion torrent, séquençage nanopore...). La comparaison des performances de ces différentes technologies (longueur des séquences obtenues, coût, temps, profondeur de lecture, taux d'erreur...) pouvait compléter utilement cette partie. Le sujet ne portant pas sur la structure de l'ADN, cette dernière n'apportait rien à l'exposé et ne devait pas figurer dans les copies, et encore moins la localisation de l'ADN bactérien dans un schéma de procaryotes que certains candidats ont cru nécessaire d'introduire dans leur copie.

Aborder l'identification des procaryotes par le biais d'une approche phénotypique a été choisi systématiquement par tous les candidats et avait logiquement sa place dans un tel sujet. À condition d'une part de ne pas en faire la partie principale du devoir et exposer un catalogue de toutes les techniques disponibles (milieux de culture, colorations, recherche enzymatiques, ...) et d'autre part de se limiter à en exposer toutes limites et imperfections, en miroir des avantages apportés par le séquençage de l'ADN (coût, rapidité, précision, volume d'analyses,...).

Par ailleurs, le terme d'identification recouvrait autant la notion d'identification au genre ou à l'espèce que l'identification de souche dans un contexte épidémiologique. Le phénotypage, en multipliant les approches techniques a montré ses limites et le relai pris par le génotypage est actuellement incontestable. Cet aspect de l'identification n'a été abordé que par très peu de candidats.

Enfin d'un point de vue technique, l'évocation des gènes cibles utilisés en routine pour leur pouvoir discriminant les genres, espèces ou pathotypes (gènes codant l'ARN 16S, gènes de ménages, gènes codant des toxines ou gènes à l'origine d'antibiorésistance,...), rarement présente dans les copies, n'en a été que plus appréciée.

Outre l'identification d'agents infectieux, d'autres domaines d'application du séquençage ADN en rapport direct avec l'identification bactérienne pouvaient être développés, tels que la microbiologie de l'environnement et l'écologie microbienne dont l'essor a, sans conteste, bénéficié des approches métagénomique que permettent les méthodes de séquençage haut débit, ou les contrôles de qualité, passé sous silence par une majorité de candidats.

Depuis que le séquençage de l'ADN a donné accès à tout ou partie du génome, la classification des bactéries a été singulièrement modifiée. Les outils moléculaires étant relativement identiques pour l'identification et la classification, la consistance de cette dernière partie du sujet devait reposer sur les éléments qui lui sont propres : outils de l'analyse phylogénétique (et l'occasion d'introduire le rôle prépondérant de la bioinformatique dans l'analyse des données de séquençage), méthodes de construction des arbres phylogénétique, exemples de classification et de modification des classifications antérieures phénotypique (création des Archées...).

La conclusion pouvait résumer les termes du nouveau paradigme, ouvrir sur de nouvelles techniques d'identification (spectrométrie de masse) ou sur de nouvelles utilisations des séquences génomiques (identification des voies métaboliques de bactéries intracellulaires obligatoires, transfert de ces voies à des fins de biotechnologie...) et/ou souligner le fait que les méthodes phénotypiques d'identification ont encore de beaux jours devant elles...

Mais, quelque soit son contenu, il devait y avoir une conclusion, ce qui n'a pas été le cas de toutes les copies.

COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Les activités rythmiques des cellules excitables sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques.

Vous montrerez à l'aide d'exemples la diversité de ces fonctions en insistant sur les régulations des rythmes cellulaires associés, votre réflexion allant de leurs supports anatomiques jusqu'à leurs bases moléculaires.

RAPPORT DU JURY DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Établi par Christian SALIGAUT, Nicolas MEUNIER.

Le sujet portait sur la nature des différents rythmes cellulaires, leurs mécanismes, leurs régulations et les fonctions physiologiques associées.

L'introduction est apparue trop souvent négligée. Cette remarque s'avère récurrente dans les rapports annuels, certaines compositions abordant directement des exemples sans que le cadre du sujet ait été même partiellement défini. D'autres persistent dans des généralités sur l'homéostasie qui peuvent s'insérer dans n'importe quelle composition de physiologie et pointent l'absence de réflexion.

Il apparaissait important avant toute chose de bien caractériser certaines notions :

- 1) la notion de rythme, comme une activité répétitive avec une fréquence/période donnée. A ce stade la composition pouvait revenir sur la classification des rythmes biologiques, tenant compte de la période (rythmes ultra, infra, circadiens), et sur les différences entre rythme endogène et rythme entraîné par des signaux externes ;
- 2) la notion de cellule excitable (variation du potentiel de membrane en réponse à un stimulus).

Le sujet précisait clairement que la composition devait aller des bases moléculaires jusqu'aux bases anatomiques. Ainsi, il apparaissait logique d'envisager dans une première partie le niveau cellulaire (cellule unique) et les origines des activités rythmiques intracellulaires avant d'envisager dans une seconde partie les activités rythmiques relatives aux communications cellulaires (réseaux, boucles). L'extrapolation aux fonctions physiologiques impliquées pouvait se faire séparément dans un dernier chapitre ou au sein des deux premières.

Activité cellulaire rythmique

Parmi les différentes notions attendues au niveau cellulaire, il était indispensable d'aborder les principales particularités des cellules douées d'activité rythmique, avec des exemples ciblés. À ce niveau cellulaire devaient être envisagées : les activités rythmiques **1)** liées à des variations de conduction ionique, et **2)** liées à des variations d'expression génique.

Conductions ioniques et rythmes cellulaires : ce point a, d'une façon générale, été abordé dans la majorité des copies en prenant comme exemple la cellule myocardique. Les notions importantes à développer concernaient les particularités du tissu nodal, des cellules de pacemaker (principal ou subsidiaire) et de leur prépotentiel instable (existence de courant I_f , nature des ions/canaux sensibles à l'hyperpolarisation impliqués). Tout naturellement, pour cette partie, la composition devait ensuite prendre en considération la notion de propagation de l'information (PAs) des cellules de pacemaker à l'ensemble du tissu myocardique, aboutissant à la notion de fréquence cardiaque. Le contrôle de l'activité cardiaque (contrôle de la fonction cardiaque) pouvait s'appuyer sur l'organisation anatomique du système nerveux autonome, avec notamment les effets chronotropes positifs et négatifs induits par respectivement la noradrénaline et l'acétylcholine.

Activités transcriptionnelles et rythmes cellulaires : peu de copies ont fait référence à cet aspect, pourtant essentiel. Les correcteurs attendaient ici le développement de la notion d'horloge moléculaire et d'oscillateur transcriptionnel. L'exemple de référence dans la littérature concerne les cellules neuronales des NSC (noyaux suprachiasmatiques) de l'hypothalamus et leur rôle central dans la production des rythmes circadiens. La notion d'oscillateur lié à l'activation/répression de gènes méritait d'être développée et un schéma des interactions entre les facteurs clock, Per, Cry, Bmal et la régulation de leur expression était attendu. Une organisation morpho-fonctionnelle et neurochimique simplifiée des NSC (*core/shell*) et la nature des neurones impliqués (AVP, VIP, GRP) pouvait être abordée, sans développement exhaustif. La notion de centre intégrateur des NSC se faisait ensuite naturellement en abordant le contrôle des NSC en amont par les hormones, la lumière, et en abordant le rôle de l'horloge interne en aval sur certaines fonctions physiologiques. A ce stade, la composition pouvait envisager divers exemples: régulation de la sécrétion de mélatonine, de certaines hormones hypophysaires et de leur rôle dans les grandes fonctions physiologiques (reproduction et cycle sexuel, cycle veille/sommeil).

Activité rythmique générée par un réseau cellulaire

Plusieurs exemples pouvaient être ici abordés. Nous en citerons ici trois, parmi les plus représentatifs. Le réseau respiratoire des mammifères est celui qui a été le plus souvent présenté dans les devoirs. Le centre nerveux du contrôle respiratoire est en effet un modèle d'étude remarquable en neurobiologie, il permet l'analyse des bases neuronales d'un comportement intégré essentiel. Le devoir pouvait aborder la genèse du rythme respiratoire par la mise en jeu des deux oscillateurs localisés dans le tronc cérébral, qui sont fonctionnellement interconnectés pour former le générateur central du rythme respiratoire (*central pattern generator*, CPG respiratoire). Au-delà des bases nerveuses du péristaltisme qui ont été rarement présentées, d'autres systèmes pouvaient également être abordés: Le réseau locomoteur spinal, réseau neuronal de la moelle, capable à lui seul de générer l'activité locomotrice s'avérait un autre exemple de CPG. Le noyau réticulaire du thalamus peut lui aussi être comparé à un pacemaker, dont l'activité continue à osciller rythmiquement en l'absence de toute afférence. Son rôle dans le contrôle du sommeil à ondes lentes pouvait être développé. Ces deux derniers exemples sont visiblement très peu connus des candidats.

Les régulations existent aussi bien au niveau des activités rythmiques cellulaires que de celui des réseaux de cellules. Elles pouvaient donc être présentées en parallèle des exemples cités. De manière étonnante de nombreux devoirs traitent de manière très superficielle si ce n'est erronée des régulations concernant le rythme cardiaque ou le rythme respiratoire. Celles autour du péristaltisme, de la locomotion ou encore du sommeil ne sont quasiment jamais abordées.

Un certain nombre de devoirs se sont contentés d'un catalogue d'exemples étiré en nombreux hors sujets, au travers desquels le support mécanistique (moléculaire/anatomique) des rythmes n'a pas été ou pu être développé, rendant l'ensemble très superficiel. La présentation sous forme de catalogue s'est souvent par ailleurs avérée nuisible à la qualité synthétique de la composition, élément de jugement important. Une réflexion préalable à la rédaction est indispensable pour permettre la planification d'ensemble du devoir. Par exemple de nombreux devoirs ont présenté de manière exhaustive le réseau vasculaire, aspect délétère pour le candidat puisque dénotant une absence de recul vis-à-vis du sujet. La première partie du devoir, définissant bien les contours du sujet n'est donc pas à négliger et la cohérence du devoir est à privilégier dans la suite: l'aspect pédagogique est important dans cette épreuve.

La conclusion se doit d'ouvrir le sujet mais ce point est bien souvent négligé. La plupart des conclusions ne font que résumer les principaux points du devoir sans les mettre en perspectives.

Les schémas ont été nombreux, mais les légendes et annotations parfois insuffisantes.

Il y avait matière à relier nombre des exemples physiologiques à la pathologie ou à des aspects de méthodologie scientifique et ce point est à encourager. Nombre de compositions ont pris en compte certains aspects, parfois malheureusement de façon très superficielle: arythmie circadienne (*jet lag*), pacemakers cardiaques et clinique, techniques d'électrophysiologie (*patch clamp*).

Le nombre de hors sujets est toujours croissant et reflète un manque de réflexion vis-à-vis du sujet, mais probablement aussi un manque de connaissances générales en physiologie. Pourtant à niveau de connaissance égal, un devoir concis et logique sera beaucoup mieux noté qu'un devoir étiré et fourre-tout.

En bilan, un grand nombre de candidats ont des connaissances bien trop superficielles, 60% des copies ont obtenu moins de 5 / 20 et seulement 10 % ont obtenu la moyenne.

ÉPREUVES D'ADMISSION

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

**Étude de l'effet de la berbérine sur des cellules
cancéreuses de la prostate**

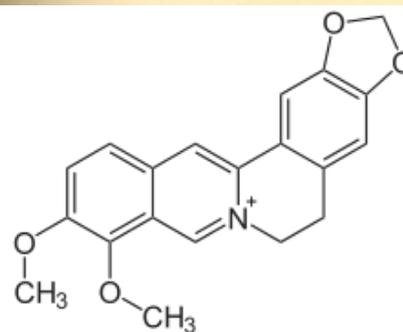
*Sujet proposé par :
Géraldine Carayol, Fabien Cézard, Alain Couvineau, Olivier Doumeix, Jérôme Vincent.*

INTRODUCTION

Le cancer de la prostate dont la prévalence est de plus de 70 000 cas par an en France, représente la troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme dans les pays occidentaux.

La recherche de nouvelles molécules à visée thérapeutique dans le traitement du cancer en général et plus particulièrement du cancer de la prostate, s'est notamment orientée vers la pharmacopée traditionnelle chinoise. Celle-ci recèle plusieurs milliers de composés dont une très grande partie est issue du monde végétal. Parmi cette pléthore de principes actifs, la berbérine, un alcaloïde extrait d'arbustes épineux du genre *Berberis*, comme *Berberis vulgaris* ou épine-vinette, fut longtemps employée par les voyageurs au long cours pour ses propriétés anti-bactériennes, anti-fongiques et surtout anti-diarrhéiques.

On se propose de tester l'effet de la berbérine sur les cellules DU145 dérivées d'une métastase cérébrale hormono-indépendante issue d'un d'adénocarcinome prostatique, et de voir si cette molécule peut être une nouvelle piste de traitement.



Structure semi-développée de la berbérine

Référence de l'image d'illustration : Otto Wilhelm Thomé, « *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz in Wort und Bild für Schule and Haus* », 1885

AVERTISSEMENT

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

CELLULES FOURNIES

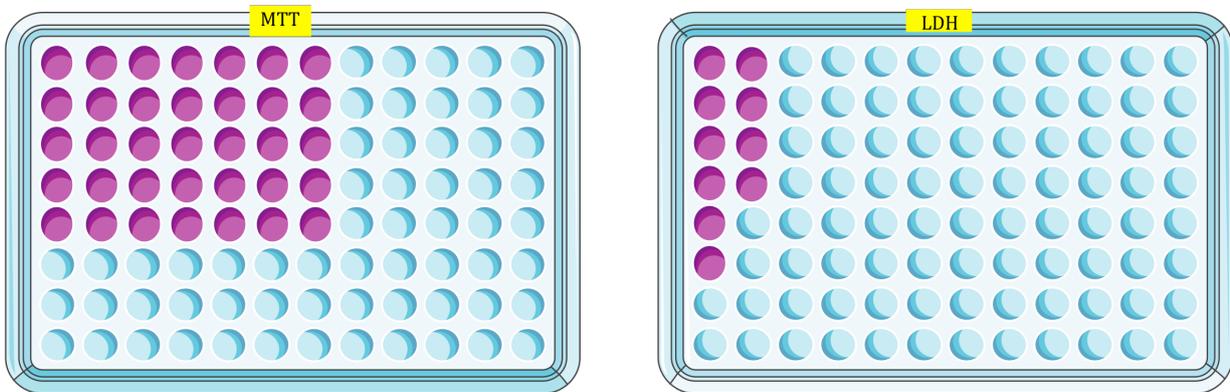
Les cellules DU145 ont été cultivées à 37 °C sous atmosphère enrichie en CO₂ dans du milieu DMEM supplémenté avec 5 % de sérum de veau foetal (SVF), 100 U·mL⁻¹ de pénicilline, 100 mg·mL⁻¹ de streptomycine et 2 mmol·L⁻¹ de L-glutamine.

Une suspension de cellules en phase exponentielle de croissance a été ajustée à la densité de 250 000 cellules·mL⁻¹ et déposée sur divers supports :

- 3 flacons de 75 cm² de surface de culture T75 :



- 2 microplaques 96 puits :



L'induction par la berbérine à diverses concentrations, de 0 à 100 µmol·L⁻¹, a été effectuée directement après ensemencement. Les cellules fournies, traitées ou non traitées, ont été incubées à 37 °C sous atmosphère enrichie en CO₂ pendant 48 heures.

Les différents supports sont maintenus dans l'incubateur à CO₂ et fournis par les examinateurs à la demande.

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE PRÉALABLE

Trois flacons T75 identiques aux flacons individuels sont à disposition à côté du microscope inversé.

Observer au microscope inversé les cellules des 3 flacons.

Q1. Faire un compte rendu des observations.

Q2. Formuler des hypothèses sur l'effet du traitement des cellules DU145 à la berbérine.

PARTIE 1

APPROCHE CELLULAIRE DE L'EFFET DE LA BERBÉRINE SUR LES CELLULES DU145

I- TEST D'EXCLUSION AU BLEU TRYPAN

I.1. Principe

Le bleu trypan est un colorant hydrosoluble. Il pénètre dans le cytoplasme des cellules mortes et les colore en bleu. Les cellules vivantes possédant une membrane plasmique intacte excluent le colorant. Elles restent incolores.

Cependant, sur une suspension obtenue par grattage des cellules, un bruit de fond est observé : les cellules vivantes légèrement endommagées par le grattage apparaissent en bleu pâle.

I.2. Mise en œuvre

À l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 2**, effectuer une numération des suspensions obtenues à partir de chaque flacon T75 selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 1**.

Q3. Calculer le nombre de cellules par flacon T75 dans chaque condition.

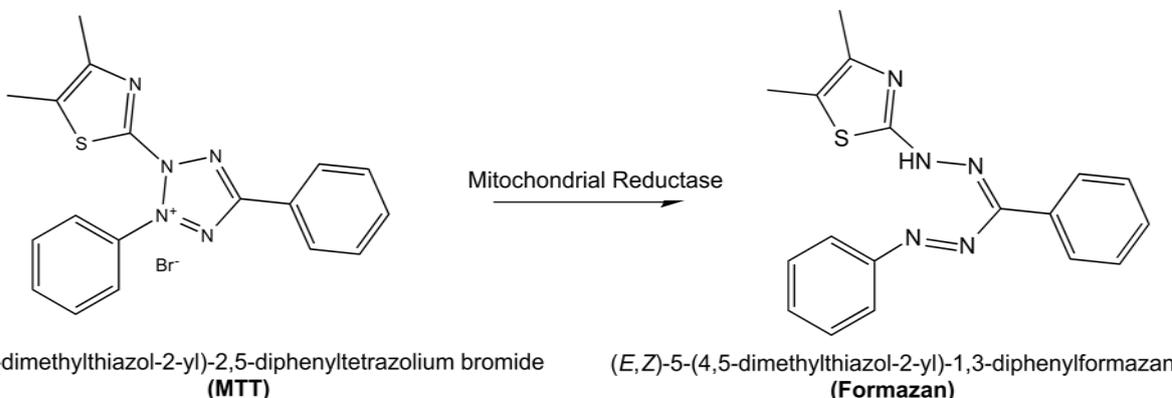
Q4. Déterminer le pourcentage de cellules mortes dans chaque condition.

Q5. Conclure.

II- TEST AU MT

II.1. Principe

Le MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium est transformé en formazan par la succinate déshydrogénase des cellules vivantes :



Les cristaux de formazan obtenus sont solubles dans l'isopropanol.
La solution absorbe à 570 nm.

La linéarité de la méthode doit être vérifiée car elle dépend du nombre de cellules par puits.

II.2. Mise en œuvre

La microplaque 96 puits étiquetée **MTT** a été ensemencée et traitée comme suit (chiffre indiqué = nombre de cellules dans 100 μL de milieu de culture avec ou sans berbérine) :

[berbérine] finale ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	13000	6500	3250	1600	800	400	200					
25	B	13000	6500	3250	1600	800	400	200					
50	C	13000	6500	3250	1600	800	400	200					
75	D	13000	6500	3250	1600	800	400	200					
100	E	13000	6500	3250	1600	800	400	200					
	F												
	G												
	H												

Le mode opératoire du test est décrit dans la **FICHE TECHNIQUE 3**.

II.3. Compte rendu

- Q6.** Tracer les courbe $A_{570\text{ nm}} = f(\text{nombre de cellules/puits})$ dans les 5 conditions testées.
- Q7.** Déterminer le nombre de cellules par puits optimal pour calculer la viabilité cellulaire qui convient pour l'ensemble des conditions. Justifier.
- Q8.** Établir la formule de calcul du pourcentage de viabilité.
- Q9.** Calculer le pourcentage de viabilité dans les différentes conditions pour le nombre de cellules par puits optimal.
- Q10.** Représenter le graphe (% viabilité) = $f([\text{berbérine}])$.
- Q11.** Conclure.

III- TEST LDH

III.1. Principe

Adapté de la fiche technique « Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit® » Thermo Scientific :

Lactate dehydrogenase (LDH) is a cytosolic enzyme present in many different cell types. Plasma membrane damage releases LDH into the cell culture media. Extracellular LDH in the media can be quantified by a coupled enzymatic reaction in which LDH catalyzes the conversion of lactate to pyruvate via NAD^+ reduction to NADH. Diaphorase then uses NADH to reduce a tetrazolium salt (INT) to a red formazan product that can be measured at 492 nm. The level of formazan formation is directly proportional to the amount of LDH released into the medium, which is indicative of cytotoxicity. Maximum LDH activity obtained after total cell lysis is required in calculations of 100% release of LDH. Intracellular LDH is a direct indicator of the number of viable cells.

III.2. Mise en œuvre

La microplaque 96 puits étiquetée **LDH** a été ensemencée et traitée comme suit (chiffre indiqué = nombre de cellules dans 100 μL de milieu de culture avec ou sans berbérine ; DMEM : 100 μL de milieu de culture complet sans cellules) :

[berbérine] finale ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	13000	6500	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
0	B	13000	6500	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
100	C	13000	6500	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
100	D	13000	6500	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
0	E	DMEM	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
100	F	DMEM	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Mettre en œuvre le test LDH selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 4**.

III.3. Compte rendu

- Q12.** Présenter un plan de la microplaque ou annoter l'enregistrement des absorbances à 492 nm en indiquant la composition qualitative des puits tests.
- Q13.** Indiquer l'origine de l'absorbance à 492 nm mesurée pour les témoins suivants :
- cellules non traitées ;
 - cellules lysées ;
 - milieu DMEM complet (sans cellules) avec ou sans berbérine.
- Q14.** Établir la formule permettant de calculer le pourcentage de LDH libérée spontanément par les cellules DU145.
- Q15.** Établir la formule permettant de calculer le pourcentage de cytotoxicité induite par la berbérine sur les cellules DU145.
- Q16.** Déterminer ce pourcentage pour les deux quantités de cellules.
- Q17.** Un effet antiprolifératif de la berbérine a-t-il une influence sur l'évolution de ce pourcentage ? Justifier.

IV- DOSAGE DES PROTÉINES

IV.1. Mise en œuvre

Mettre en œuvre le dosage des protéines selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 5**.

IV.2. Compte rendu

Q18. Présenter le protocole de dosage des protéines ainsi que les résultats obtenus.

Q19. Déterminer la concentration en protéines dans les trois lysats *protéines*.

Q20. Conclure.

V- SYNTHÈSE

Q21. Discuter l'intérêt de chacun des tests mis en œuvre (numération, test d'exclusion au bleu trypan, test au MTT, test LDH, dosage des protéines) : ces tests sont-ils redondants ou complémentaires ?

Q22. Proposer une manipulation complémentaire qui permettrait de distinguer l'effet antiprolifératif et l'effet cytotoxique de la berbérine sur les cellules DU145.

Q23. Comparer les résultats des cinq tests.

PARTIE 2

APPROCHE MOLÉCULAIRE DE L'EFFET DE LA BERBÉRINE SUR LES CELLULES DU145

I- ÉTUDE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN : TEST DES COMÈTES

I.1. Principe

Le test des comètes ou SCGE (*single cell gel electrophoresis*) est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose qui permet de détecter et de mesurer diverses altérations de l'ADN (cassures induites directement par un agent génotoxique ou indirectement lors des réparations, ou encore altérations résultant de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose).

Les cellules à analyser sont décollées de leur support de culture pour être englobées dans un gel d'agarose à bas point de fusion (*low melting point agarose*) et déposées sur une lame de microscope préalablement « glacée » (recouverte d'une sous-couche d'agarose). Elles sont ensuite soumises à l'action conjointe d'un détergent et d'un agent alcalin (pH 10) qui a pour effet de lyser les cellules et de perméabiliser les noyaux.

Ceux-ci sont soumis à une électrophorèse de faible voltage. L'ADN est ensuite révélé par addition d'un intercalant fluorescent (GelGreen).

- Si l'ADN n'a pas été endommagé, il reste sous forme surenroulée et associé à la matrice nucléaire : il sera révélé sous forme d'une sphère relativement compacte.
- Si l'ADN a été endommagé, les cassures (simple brins ou double brins) relâchent les supertours : des fragments simples et doubles brins plus légers migrent en dehors de cette sphère, formant un « halo » d'ADN qui s'étire en direction de l'anode et décrit la queue de la comète (image ci-contre).



I.2. Mise en œuvre

Mettre en œuvre le test des comètes sur les cellules non traitées et les cellules traitées à la berbérine à $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ à l'aide de la **FICHE TECHNIQUE 6**.

I.3. Compte rendu

Q24. Donner le protocole de préparation du tampon de lyse *Comètes*.

Q25. Réaliser une analyse qualitative en comparant l'aspect des cellules non traitées et des cellules traitées à la berbérine. Conclure.

Q26. Proposer une méthode d'analyse quantitative des résultats.

II- MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA CASPASE 3

II.1. Principe

Extrait de la fiche technique « Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric » de *Sigma*[®] :

<p>Product Description Caspases (Cysteine-requiring Aspartate protease) are a family of proteases that mediate cell death and are important to the process of apoptosis. Caspase 3 (also referred to as CPP32, Yama, and apopain) is a member of the CED-3 subfamily of caspases and is one of the critical enzymes of apoptosis. Caspase 3, which is an effector caspase, is the most studied of mammalian caspases. It can process procaspase 2, 6, 7, and 9 and specifically cleave most of caspase related substrates known to date, including many key proteins such as the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP),¹ the inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease (ICAD),² and gelsolin and fodrin,³ which are proteins involved in apoptosis regulation.³ This cleavage is part of the mechanism leading to cell death. In addition, caspase 3 plays a central role in mediating nuclear apoptosis including chromatin condensation and DNA fragmentation as well as cell blebbing.⁵ Caspase 3 activity is tissue, cell type, or death stimulus specific.⁵</p>	<p>The caspase 3 colorimetric assay is based on the hydrolysis of the peptide substrate acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA) by caspase 3, resulting in the release of the p-nitroaniline (pNA) moiety. p-Nitroaniline has a high absorbance at 405 nm ($\epsilon^{\text{MM}} = 10.5$). The concentration of the pNA released from the substrate is calculated from the absorbance values at 405 nm or from a calibration curve prepared with defined pNA solutions.</p> <p style="text-align: center;">$\text{Ac-DEVD-pNA} \xrightarrow{\text{Caspase 3}} \text{Ac-DEVD} + \text{pNA}$</p>
--	--

II.2. Mise en œuvre

Déterminer l'activité enzymatique de la caspase 3 dans les trois conditions de culture selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 7**.

II.3. Compte rendu

Q27. Préciser, pour la mesure de l'activité de la caspase 3 :

- le protocole de préparation du tampon de lyse et du milieu réactionnel ;
- le volume de tampon de lyse utilisé ;
- la composition et l'intérêt du témoin.

Q28. Présenter les résultats expérimentaux obtenus et déterminer la concentration d'activité catalytique (b en $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) en caspase 3 des trois lysats *caspases*.

La technique mise en œuvre dans la **FICHE TECHNIQUE 7** a été adaptée à partir d'un kit *Sigma*[®] dont un extrait est présenté dans l'annexe.

Q29. Repérer les modifications effectuées puis préciser les avantages et les inconvénients de celles-ci.

Les résultats du dosage des protéines obtenus dans la première partie sont utilisés pour calculer l'activité spécifique dans les trois conditions de culture.

Q30. Justifier l'importance du calcul de l'activité spécifique pour analyser l'effet de la berbérine sur l'activité caspase.

Q31. Justifier la nécessité d'utiliser deux tampons de lyse différents pour effectuer la mesure de l'activité caspase et le dosage des protéines en se référant aux fiches techniques correspondantes.

- Q32.** Préciser l'importance du séchage du culot dans la préparation du lysat *protéines* et du lysat *caspase* (**FICHES TECHNIQUES 5 et 7**) dans la perspective du calcul de l'activité spécifique.
- Q33.** Proposer une stratégie qui permettrait d'utiliser un tampon de lyse unique pour le dosage des protéines et la mesure de l'activité caspase.
- Q34.** Calculer l'activité spécifique (z_{sp} en $U \cdot mg^{-1}$) de la caspase 3 dans les trois conditions de culture.
- Q35.** Interpréter les résultats obtenus.

SYNTHÈSE FINALE

- Q36.** Présenter un bilan succinct de l'étude.
- Q37.** Proposer une ou plusieurs manipulations complémentaires permettant de valider l'utilisation de la berbérine en chimiothérapie anticancéreuse.

Références :

Sudheer K. Mantena et al. (2006). Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, **5(2)**, pp. 296-308.

Olive P. L., Banath J. P. (1993). Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ^{125}I dUrd. *Int. J. Radiat. Biol.*, **64(4)**, pp. 349-358.

1. Place 5 μ l of cell lysate or Caspase 3 Positive Control in the appropriate wells as indicated in Table 2.
2. Add 1x Assay Buffer to each of the wells as indicated in Table 2.
3. Add the Caspase 3 Inhibitor to the appropriate wells.
4. Start the reaction by adding 10 μ l of caspase 3 substrate to each well and mix gently by shaking. Try to avoid forming bubbles in the wells.
5. Cover the plate and incubate at 37 °C for 70 to 90 minutes. If signal is too low, continue the incubation over night.
6. Read Absorbance at 405 nm.

Table 2.
Reaction scheme for 96 Well Plate Microassay Method

	Cell lysate	Caspase 3 5 μ g/ml	1x Assay buffer	Caspase 3 inhibitor Ac-DEVD-CHO 200 μ M	Caspase 3 substrate Ac-DEVD-pNA
Reagent blank	----	----	90 μ l	----	10 μ l
Non-induced cells	5 μ l	----	85 μ l	----	10 μ l
Non-induced cells + inhibitor	5 μ l	----	75 μ l	10 μ l	10 μ l
Induced cells	5 μ l	----	85 μ l	----	10 μ l
Induced cells + inhibitor	5 μ l	----	75 μ l	10 μ l	10 μ l

DOSSIER TECHNIQUE

Le dossier technique est distribué à côté du sujet.

RISQUES BIOLOGIQUES

Cellules DU145	Cellules prostatiques d'origine humaine, de classe 1
Risque biologique classique, équivalent à une souche bactérienne de classe 1	

RISQUES CHIMIQUES

Bleu trypan

**Danger**

Provoque des lésions oculaires graves.
Provoque une irritation cutanée.
Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.

Isopropanol

**Danger**

Liquide et vapeurs très inflammables.
Provoque une sévère irritation des yeux.
Peut provoquer somnolence ou vertiges.

Triton X-100

**Danger**

Nocif en cas d'ingestion.
Provoque des lésions oculaires graves.
Toxique pour les organismes aquatiques,
entraîne des effets néfastes à long terme.

DTT

**Attention**

Provoque une sévère irritation des yeux.
Provoque une irritation cutanée.

Tampon de migration

**Danger**

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

Réactif BCA + cuivre

**Danger**

Nocif en cas d'ingestion.
Provoque des lésions oculaires graves.

Réactif MTT

**Attention**

Provoque une sévère irritation des yeux.
Provoque une irritation cutanée.
Susceptible d'induire des anomalies génétiques.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL SPÉCIFIQUE

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

- 3 grattoirs « *cell spatula* »
- 3 tubes coniques à centrifuger Falcon® de 50 mL
- Centrifugeuse pour tubes coniques Falcon®

MODE OPÉRATOIRE

Toutes les étapes ci-dessous sont à réaliser pour chaque flacon T75.

1. Transférer le milieu de culture dans un tube conique Falcon® de 50 mL par renversement.
2. Ajouter 10 mL de PBS froid dans le flacon T75.
3. Détacher les cellules à l'aide du grattoir « *cell spatula* » par des mouvements d'aller-retour sur toute la surface du fond du flacon T75.
4. Transférer la suspension dans le tube de 50 mL par renversement.
5. Rincer deux fois le flacon avec 5 mL de PBS ; transférer dans le tube de 50 mL.
6. Centrifuger à 3000 rpm pendant 5 minutes.
7. Éliminer soigneusement le surnageant : par renversement dans une poubelle DASRI, puis en retournant le tube sur du papier filtre.
8. Resuspendre le culot dans 1 mL de PBS froid. Homogénéiser soigneusement.
9. Cette suspension permettra d'effectuer différentes manipulations :
 - DOSAGE DES PROTÉINES [**FICHE TECHNIQUE 5**] : transférer 200 µL de la suspension dans un microtube, à conserver dans la glace ;
 - TEST DES COMÈTES [**FICHE TECHNIQUE 6**] : transférer 8 µL de la suspension dans un microtube, à conserver dans la glace.
Le test des comètes ne sera réalisé que sur les suspensions obtenues à partir des flacons témoin et traité avec 100 µmol·L⁻¹ de berbérine ;
 - DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA CASPASE 3 [**FICHE TECHNIQUE 7**] : transférer 600 µL de la suspension dans un microtube, à conserver dans la glace ;
 - NUMÉRATION CELLULAIRE [**FICHE TECHNIQUE 2**] : transférer le reste de la suspension dans un microtube, à conserver dans la glace.

RÉACTIFS ET MATÉRIELS

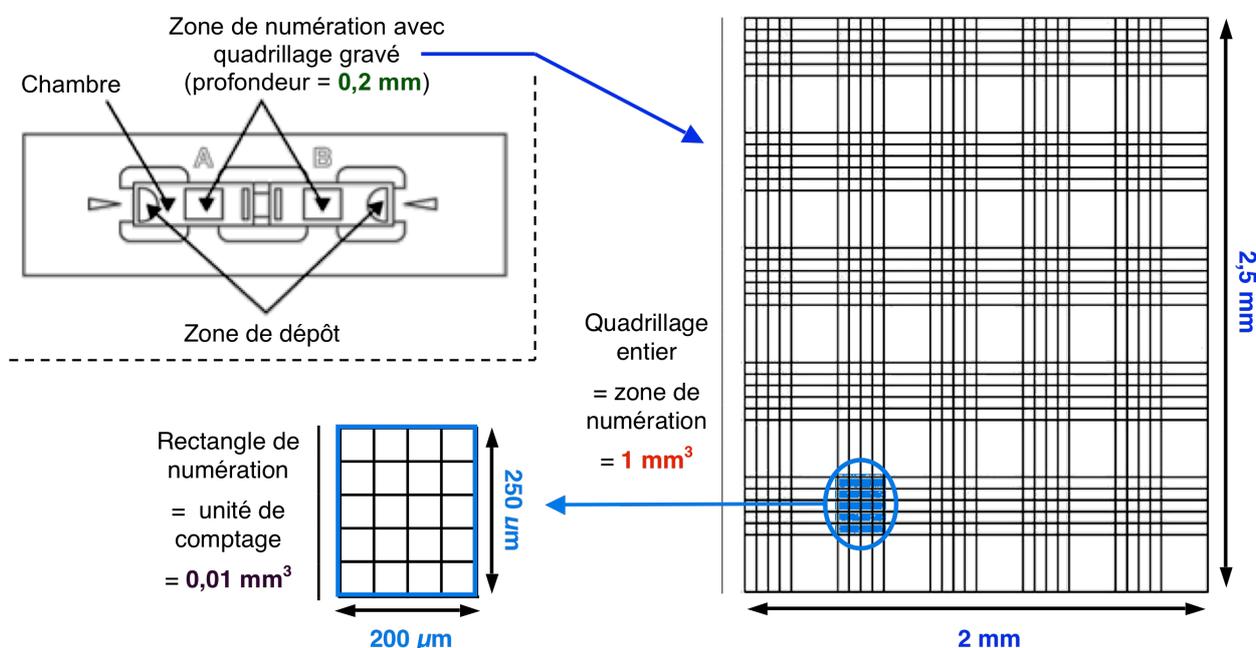
NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Bleu trypan	NaCl 8,1 g·L ⁻¹ ; K ₂ HPO ₄ 0,6 g·L ⁻¹ ; Bleu trypan 4 g·L ⁻¹	500 µL

- Hématimètre de Malassez à usage unique (2 chambres par lame) ; compte-globules
- Microscope optique

MODE OPÉRATOIRE

Toutes les étapes ci-dessous sont à réaliser pour chaque condition de culture cellulaire, à partir des suspensions obtenues après récupération des cellules [FICHE TECHNIQUE 1].

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

DONNÉES


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

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
MTT	Réactif MTT à 5 mg·mL ⁻¹ en PBS	Tube 1 mL (glace)
Isopropanol	Isopropanol	Flacon 7 mL (glace)

- Microplaque **MTT**, ensemencée sur les lignes A à E et sur les colonnes 1 à 7 [**cf. SUJET**]
- Agitateur de microplaques
- Lecteur de microplaques

MODE OPÉRATOIRE

1. Ajouter 10 µL de MTT dans chaque puits des cinq lignes de cellules (témoins et traitées).
2. Agiter la plaque quelques minutes sur un agitateur de microplaques.
3. Incuber à 37 °C dans une étuve à CO₂ entre 2 heures et 4 heures.
4. Pencher légèrement la plaque et éliminer la totalité du surnageant des puits en posant l'extrémité du cône sur la paroi latérale du puits : veiller à ne pas aspirer les cristaux.
5. Ajouter 100 µL d'isopropanol dans tous les puits, et dissoudre **totalem**ent les cristaux de formazan par aspirations-refoulements. L'ensemble des cristaux est dissout lorsque la coloration de la solution obtenue est homogène.
6. Lire l'absorbance à 570 nm contre un puits contenant 100 µL d'isopropanol.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
10X Lysis buffer (LDH)	Réactif commercial	Microtube 150 µL (glace)
Substrate mix	Réactif commercial	Microtube 650 µL (glace)
Stop solution	Réactif commercial	Microtube 650 µL (glace)

- Microplaque **LDH**, ensemencée sur les lignes A à F et sur les colonnes 1 et 2 [*cf. SUJET*]
- Lecteur de microplaques
- Épingle

MODE OPÉRATOIRE

Remarques

- Veiller à prélever délicatement les surnageants sans homogénéisation préalable.
- Pour éviter la formation de bulles lors des pipetages, placer le cône à la surface du liquide.
- Laisser vide le puits H12 pour faire le zéro du lecteur de microplaques.
- Avant lecture des absorbances, casser les bulles éventuelles avec une épingle.

Réaction

1. Transférer 50 µL de surnageant (issue de cellules non lysées ou lysées) dans un puits vide de la microplaque **LDH**.
2. Ajouter 50 µL de mélange réactionnel.
3. Homogénéiser en tapotant doucement sur le côté de la plaque.
4. Incuber à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.
5. Ajouter 50 µL de solution d'arrêt.
6. Homogénéiser en tapotant doucement sur le côté de la plaque.
7. Mesurer l'absorbance à 492 nm contre l'air (puits H12).

Lyse

1. Ajouter 10 µL de tampon de lyse 10X dans le puits contenant les cellules.
2. Incuber à 37 °C pendant 45 minutes.

DONNÉES

- Limite de linéarité du spectrophotomètre à 492 nm : 3,000.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Tampon de lyse Protéines	Tris 50 mmol·L ⁻¹ ; NaCl 150 mmol·L ⁻¹ ; Triton X-100 0,5 % (V/V) ; pH 7,5	Microtube 2 mL
SAB	Solution étalon de sérumalbumine à 2 mg·mL ⁻¹ en eau physiologique	Flacon 5 mL (glace)
Eau physiologique	NaCl 150 mmol·L ⁻¹ en eau distillée	Flacon 5 mL
BCA complet	Réactif A : carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, acide bicinchoninique, tartrate de sodium, en NaOH 0,1 mol·L ⁻¹ [50 V] Réactif B : CuSO ₄ 4 % (m/V) [1 V]	Flacon 15 mL

- Semi-microcuvettes
- Spectrophotomètre

MODE OPÉRATOIRE

Toutes les étapes ci-dessous sont à réaliser pour chaque condition de culture cellulaire, à partir des suspensions obtenues par récupération des cellules [FICHE TECHNIQUE 1].

Préparation des lysats cellulaires pour le dosage des protéines

1. Centrifuger les suspensions cellulaires pour le dosage des protéines obtenues lors de l'étape de récupération des cellules [FICHE TECHNIQUE 1] à 3000 rpm pendant 5 minutes.
2. Éliminer soigneusement le surnageant, puis sécher en retournant les tubes sur du papier filtre.
3. Resuspendre le culot cellulaire dans 100 µL de tampon de lyse *Protéines*. Homogénéiser par aspirations-refoulements.
4. Laisser dans la glace pendant 20 minutes.
5. Centrifuger à vitesse maximale pendant 15 minutes.
6. Transférer les surnageants dans des microtubes et les stocker dans la glace : le lysat obtenu est appelé « lysat *protéines* ».

Dosage des protéines

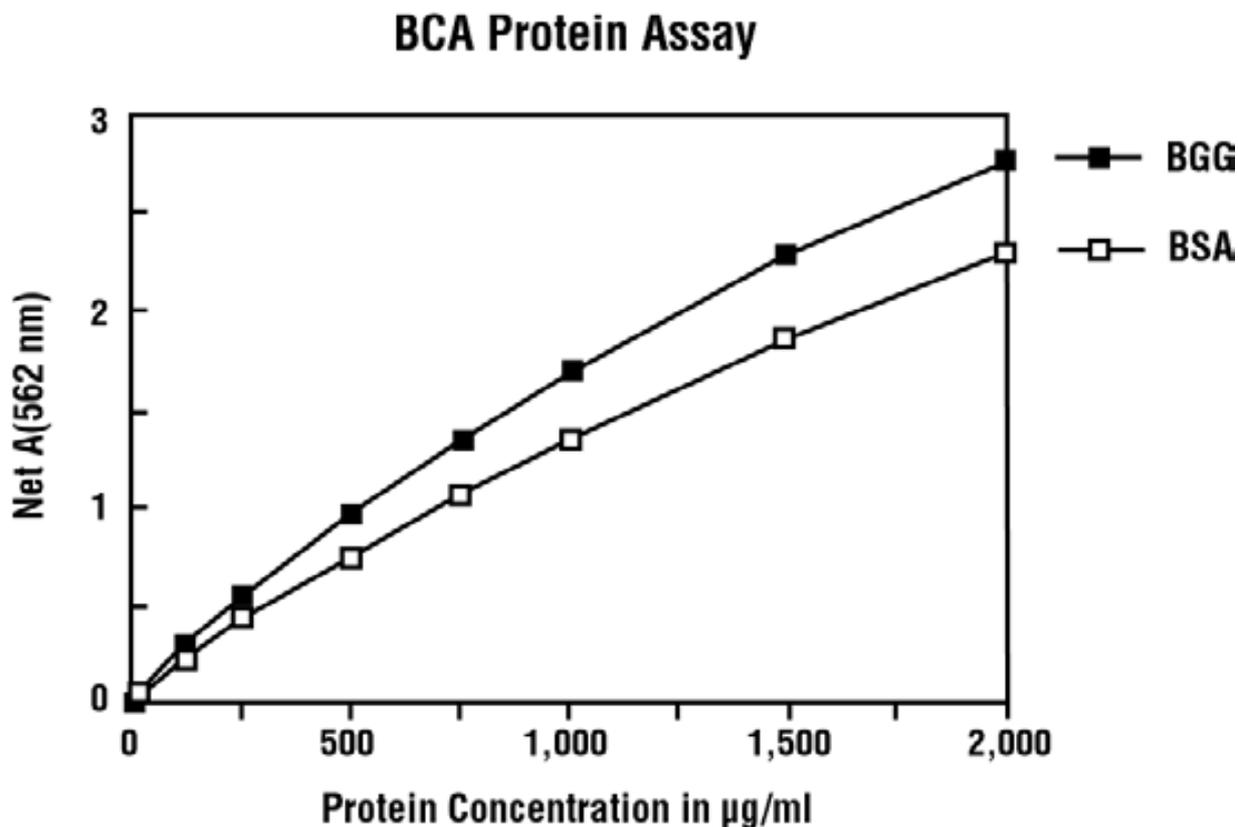
- La concentration en protéines des lysats cellulaires est en général comprise entre 1 et 8 g·L⁻¹.
- Les dilutions éventuelles de la SAB et des échantillons à doser s'effectueront respectivement dans de l'eau physiologique et du tampon de lyse.
- Un témoin échantillon sera préparé.

Adapté de *Pierce BCA Test tube protocol*

1. Pipette 0,05 mL of each standard or unknown sample into appropriately labeled test cuvettes.
2. Add 1 mL of the working reagent (complete BCA) to each cuvette and mix well.
3. Cover and incubate samples for 30 minutes at 37 °C.
4. Cool all tubes to room temperature.
5. With the spectrophotometer set to 562 nm, zero the instrument on a cuvette filled only with the blank standard. Color development continues slowly after cooling to room temperature, but no significant error is seen if all the tubes are read within 10 minutes of each other.
6. Prepare a standard curve by plotting the 562 nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

DONNÉES

COURBE D'ÉTALONNAGE STANDARD



Typical color response curves for BSA* and BGG
using the Standard Test Tube Protocol (37 °C / 30 min incubation).**

* BSA : bovine serum albumin

** BGG : bovine gamma globulin

LISTE DES SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Incompatible Substances	Amount Compatible
Buffer Systems	
N-Acetylglucosamine (10 mM) in PBS, pH 7.2	10 mM
ACES, pH 7.8	25 mM
Bicine, pH 8.4	20 mM
Bis-Tris, pH 6.5	33 mM
CellLytic™ B Reagent	undiluted no interference
Calcium chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
CHES, pH 9.0	100 mM
Cobalt chloride in TBS, pH 7.2	0.8 M
EPPS, pH 8.0	100 mM
Ferric chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
HEPES	100 mM
MOPS, pH 7.2	100 mM
Nickel chloride in TBS	10 mM
PBS; Phosphate (0.1 M), NaCl (0.15 M), pH 7.2	undiluted no interference
PIPES, pH 6.8	100 mM
Sodium acetate, pH 4.8	200 mM
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200 mM
Tricine, pH 8.0	25 mM
Triethanolamine, pH 7.8	25 mM
Tris	250 mM
TBS; Tris (25 mM), NaCl (0.15 M), pH 7.6 (Catalog Number T5030)	undiluted no interference
Tris (25 mM), Glycine (1.92 M), SDS (0.1%), pH 8.3 (Catalog Number T4904)	undiluted no interference
Zinc chloride (10 mM) in TBS, pH 7.2	10 mM
Buffer Additives	
Ammonium sulfate	1.5 M
Aprotinin	10 mg/L
Cesium bicarbonate	100 mM
Glucose	10 mM
Glycerol	10%
Guanidine•HCl	4 M
Hydrochloric acid	100 mM
Imidazole	50 mM
Leupeptin	10 mg/L
PMSF	1 mM
Sodium azide	0.20%
Sodium bicarbonate	100 mM
Sodium chloride	1 M
Sodium hydroxide	100 mM
Sodium phosphate	25 mM
Sucrose	40%
TLCK	0.1 mg/L
TPCK	0.1 mg/L
Sodium orthovanadate in PBS, pH 7.2	1 mM
Thimerosal	0.01%
Urea	3 M

Incompatible Substances (Continued)	Amount Compatible
Chelating agents	
EDTA	10 mM
EGTA	not compatible
Sodium citrate	200 mM
Detergents	
Brij™ 35	5%
Brij 52	1%
CHAPS	5%
CHAPSO	5%
Deoxycholic acid	5%
Nonidet P-40 (IGEPAL® CA-630)	5%
Octyl β-glucoside	5%
Octyl β-thioglucoopyranoside	5%
SDS	5%
Span® 20	1%
TRITON® X-100	5%
TRITON X-114	1%
TRITON X-305	1%
TRITON X-405	1%
TWEEN® 20	5%
TWEEN 60	5%
TWEEN 80	5%
Zwittergents®	1%
Reducing & Thiol Containing Agents	
Dithioerythritol (DTE)	1 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM
2-Mercaptoethanol	1 mM
Tributyl Phosphine	0.01%
Solvents	
Acetone	10%
Acetonitrile	10%
DMF	10%
DMSO	10%
Ethanol	10%
Methanol	10%

Note: This is not a complete compatibility chart. There are many substances that can affect different proteins in different ways. One may assay the protein of interest in deionized water alone, then in the buffer with possible interfering substances. Comparison of the readings will indicate if an interference exists. Refer to References for additional information on interfering substances.¹⁻⁴

Note: Reagents that chelate metal ions, change the pH of the assay, or reduce copper will interfere with the BCA assay. Examples are shown below:

1. Metal chelators such as EDTA (>10 mM) and EGTA (any level).
2. Thiol containing reagents such as cysteine (any level), DTT (>1 mM), dithioerythritol (>1 mM), and 2-mercaptoethanol (>0.01%).
3. High salt or buffers concentrations such as ammonium sulfate (>1.5 M), Tris (>0.25 M), and sodium phosphate (>0.1 M).

RÉACTIFS ET MATÉRIELS

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
LMPA 0,5 % (m/V)	Low Melting Point Agarose en PBS	Tube 600 µL à 37°C
Tampon de lyse Comètes	Trizma 10 mmol·L ⁻¹ ; DMSO ; NaCl 2,5 mol·L ⁻¹ ; EDTA 100 mmol·L ⁻¹ ; pH 10	Flacon 40 mL (glace)
Triton X-100	Triton X-100 pur	Tube de 0,7 mL
Tampon de migration	NaOH 0,05 mol·L ⁻¹ ; EDTA 1 mmol·L ⁻¹ ; pH 12,2	Déjà dans les cuves
Tampon de neutralisation	Tris-HCl 0,4 mol·L ⁻¹ ; pH 7,5	Flacon de 10 mL (glace)
GelGreen	Solution commerciale de GelGreen™ 3X en eau distillée	Microtube 1,2 mL (glace)

- Lames de microscope avec sous-couche d'agarose (*Normal Melting Point Agarose*) à 1 % (m/V)
- Grandes lamelles 24 x 50 mm : 4
- Bac de glace : surface plane, recouverte d'aluminium
- Boîtes de Petri carrées : 3
- Papier absorbant
- Petite spatule, pince à bouts fins
- Système d'électrophorèse : cuve + générateur
- Microscope à fluorescence

MODE OPÉRATOIRE

Toutes les étapes ci-dessous sont à réaliser à partir des suspensions obtenues par récupération des cellules [FICHE TECHNIQUE 1] uniquement pour le flacon T75 témoin et le flacon T75 traité avec 100 µmol·L⁻¹ de berbérine.

Identifier clairement les lames avec du blanc en précisant le numéro de poste.

Préparation des microgels

1. Mélanger 8 µL de suspension cellulaire et 75 µL de LMPA liquide maintenu à 37 °C. Pour éviter la formation de bulles, pipeter lentement et ne pas aller aux extrémités de la course du piston lors de l'aspiration-refoulement.
2. Déposer 75 µL du mélange cellules + LMPA sur une lame de microscope glacée à l'agarose.
3. Placer une lamelle 24 x 60 mm dessus ; le gel doit s'étaler sans trop de bulles.
Laisser dépasser légèrement la lamelle sur le côté de la lame pour faciliter son enlèvement ultérieur. Si des bulles importantes sont observées, déplacer légèrement la lamelle ou appuyer légèrement dessus.
4. Laisser prendre en masse sur la glace (5-10 minutes).
5. Enlever la lamelle en la faisant glisser ; ne pas la jeter.
6. Ajouter une couche supplémentaire de 75 µL de LMPA liquide maintenu à 37 °C.
7. Replacer la lamelle.
8. Laisser prendre en masse sur la glace (5-10 minutes).

Lyse des cellules

9. Compléter le tampon de lyse *Comètes* par ajout de Triton-X100 à 1 % final (V/V).
10. Enlever la lamelle.
11. Plonger la lame délicatement en tampon de lyse glacé, dans une boîte de Pétri carrée.
12. Laisser à l'obscurité à 4 °C pendant environ 1 h 30 (**réfrigérateurs hors des laboratoires : appeler un examinateur pour placer la boîte à 4 °C et pour la récupérer**).
13. Sortir délicatement la lame de la solution de lyse ; la déposer sur du papier absorbant dans une nouvelle boîte de Petri carrée.

Installation des microgels et migration

Les étapes 14 à 18 seront effectuées par un examinateur dans une salle à part : signaler lorsque les lames sont prêtes.

14. Disposer les deux lames préparées, côte à côte dans une cuve d'électrophorèse.
15. Remplir les réservoirs avec du tampon d'électrophorèse, de manière à couvrir les lames (quelques millimètres), sans qu'il y ait de bulle sur les lames.
16. Lancer la migration :
 - tension : 25 V ;
 - migration : 20 minutes.
17. Après migration, sortir délicatement les lames de la cuve d'électrophorèse et les égoutter.
18. Déposer les lames dans la boîte de Petri carrée avec du papier absorbant dans le fond.

Après migration, les lames seront rendues dans la même boîte de Petri carrée que celle dans laquelle elles ont été données.

Coloration

19. Poser la boîte contenant les lames sur la glace.
20. Rincer en tampon de neutralisation pendant au moins 5 min, en recouvrant la lame au compte-gouttes ; répéter 2 fois (3 fois en tout).
21. Déposer sur chaque lame 500 µL de GelGreen ; laisser incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
22. Dans une autre boîte de Petri carrée avec papier absorbant dans le fond, rincer en eau distillée pendant 2-3 minutes, en recouvrant la lame au compte-gouttes ; répéter 1 fois (2 fois en tout).

Observation

23. Recouvrir chaque lame d'une grande lamelle pour observation.
24. Observer au microscope à fluorescence à l'objectif x10.

Présenter à un examinateur un champ caractéristique de la lame préparée à partir des cellules traitées à la berbérine.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Tampon de lyse Caspase	HEPES 250 mmol·L ⁻¹ ; CHAPS 2 %; pH 7,4	Microtube 500 µL (glace)
Tampon caspase 10X	HEPES 250 mmol·L ⁻¹ ; CHAPS 1 %; EDTA 20 mmol·L ⁻¹ ; pH 7,4	Microtube 500 µL (glace)
DTT	DTT 1 mol·L ⁻¹ en eau distillée	Microtube 20 µL (glace)
Substrat	Substrat synthétique <i>Sigma</i> ® à 7 mmol·L ⁻¹ (acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-pNA = « Ac-DEVD-pNA »)	Microtube 75 µL (glace)

- Boîte de Petri
- Microplaque 96 puits à fond plat + couvercle
- Lecteur de microplaques

MODE OPÉRATOIRE

Toutes les étapes ci-dessous sont à réaliser pour chaque condition de culture cellulaire, à partir des suspensions obtenues par récupération des cellules [FICHE TECHNIQUE 1].

1. Centrifuger les suspensions cellulaires pour le test caspase obtenues lors de l'étape de récupération des cellules [FICHE TECHNIQUE 1] à 3000 rpm pendant 5 minutes.
2. Éliminer soigneusement le surnageant, puis sécher en retournant les tubes sur du papier filtre.
3. Compléter le tampon de lyse Caspase par ajout de DTT à concentration finale de 25 mmol·L⁻¹.
4. Resuspendre le culot cellulaire dans le volume de tampon de lyse permettant d'obtenir environ 8.10⁷ cellules·mL⁻¹, sachant qu'un T75 confluente contient environ 4.10⁶ cellules.
5. Incuber dans la glace pendant 20 minutes.
6. Centrifuger à vitesse maximale pendant 15 minutes.
7. Prélever le surnageant et le transférer dans un nouveau tube : le lysat obtenu est appelé « lysat caspase ».
8. Conserver ce lysat dans la glace.
9. Préparer 400 µL de milieu réactionnel en eau distillée sachant que :
 - le tampon caspase fourni est 10X ;
 - le DTT doit être ajouté pour obtenir une concentration finale égale à 5 mmol·L⁻¹ ;
 - la concentration en substrat doit être égale à 1 mmol·L⁻¹.
10. Dans une microplaque, introduire :
 - 90 µL de milieu réactionnel ;
 - 10 µL de lysat caspase.

Laisser vide le puits H12 pour faire le zéro du lecteur de microplaques.
Éviter la formation de bulles dans les puits.
11. Prévoir un témoin réactif.
12. Incuber à 37 °C.
13. Mesurer l'absorbance à 405 nm contre le puits H12 toutes les 45 minutes environ (remettre à l'étuve entre chaque mesure). Effectuer 4 à 6 mesures.

DONNÉES

- $\varepsilon_{405}^{\text{pNA}} = 10500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Trajet optique pour cette manipulation : $l = 3,2 \text{ mm}$

RAPPORT DU JURY DE TP DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

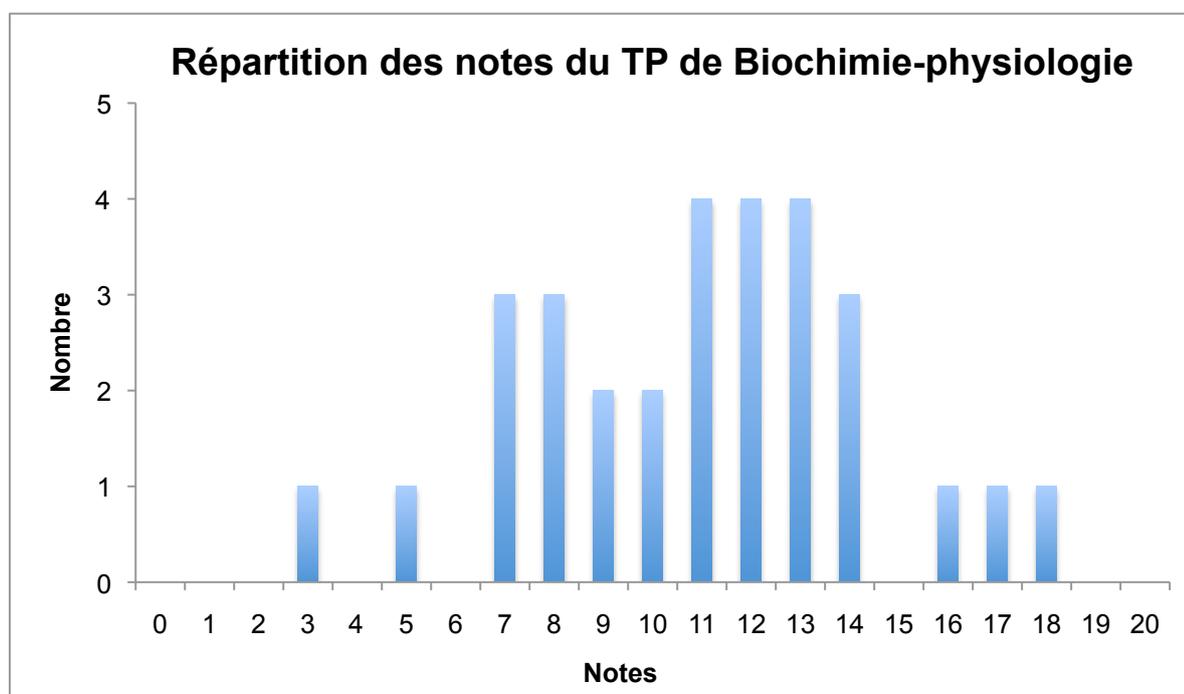
Étude de l'effet de la berbérine sur des cellules cancéreuses de la prostate

Établi par : *Géraldine CARAYOL, Fabien CÉZARD, Alain COUVINEAU, Olivier DOUMEIX, Jérôme VINCENT.*

Résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,5 / 20**
- Meilleure note : **18,2 / 20**
- Note la plus basse : **03,9 / 20**
- 18 notes sur 30 (**60 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20

Histogramme de répartition



COMMENTAIRES GÉNÉRAUX SUR L'ÉPREUVE

Description de l'épreuve

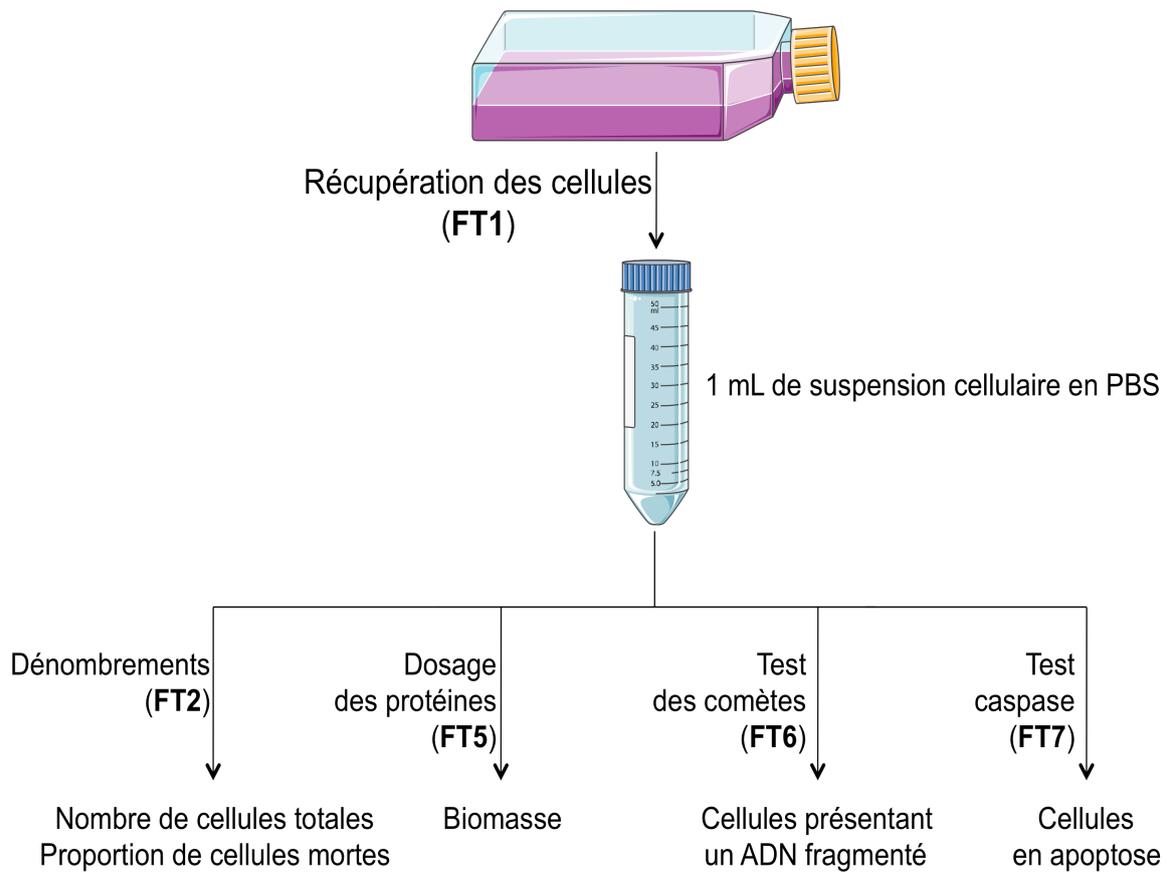
Le sujet portait sur les effets de la berbérine, molécule d'origine végétale, sur des cellules cancéreuses issues d'un adénocarcinome prostatique. Il s'agissait d'explorer les potentialités thérapeutiques de la molécule dans la perspective d'une utilisation en chimiothérapie anticancéreuse.

Le travail était centré sur deux aspects :

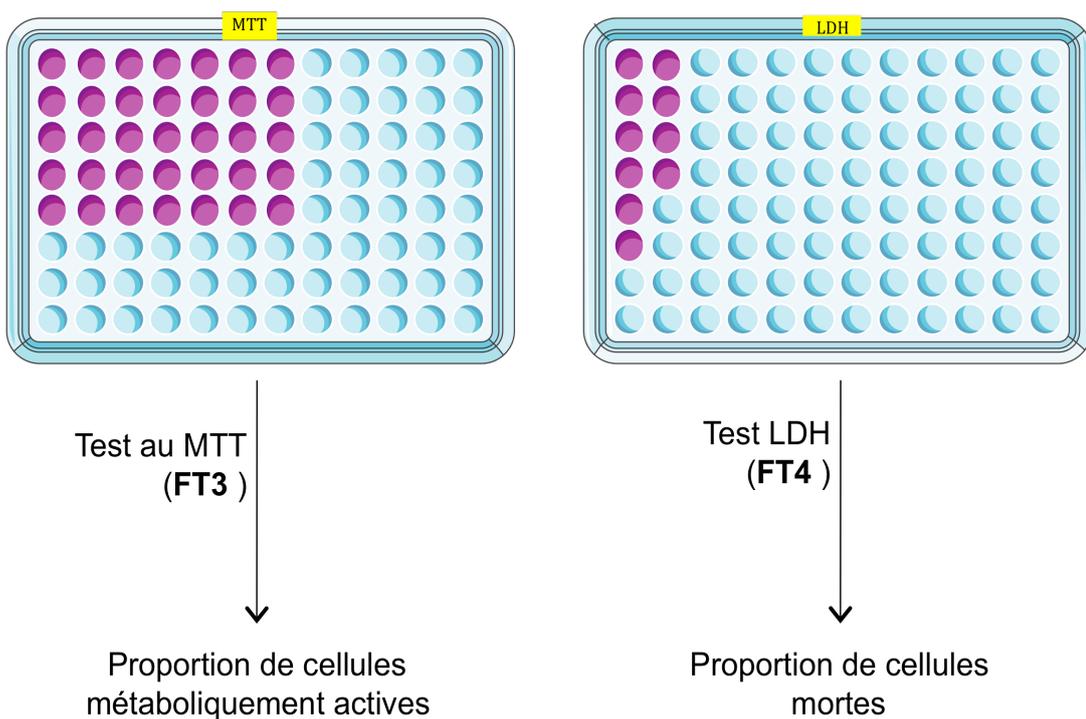
- approche cellulaire : évaluation des effets de la berbérine sur la viabilité et la prolifération cellulaires ;
- approche moléculaire : évaluation des effets génotoxiques de la berbérine et de son pouvoir pro-apoptotique via la mesure de l'activité de la caspase 3.

Les cellules, traitées ou non par différentes doses de berbérine, étaient fournies sur deux types de supports :

- **flacons** : trois flacons de 75 cm² de surface « T75 » :



- **microplaques** : deux microplaques 96 puits avec différentes concentrations de cellules.



Aspects techniques

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

- faire l'inventaire du matériel et des réactifs à disposition, pour s'assurer de la bonne identification des réactifs et les relier à une manipulation donnée ;
- prévoir les manipulations présentant des temps d'attente pendant lesquels d'autres manipulations ou la rédaction de compte-rendu pouvaient être réalisées. C'est ainsi que certains candidats ne réalisent pas les tests MTT et LDH ;
- lire les principes et les comprendre avant de se lancer dans les manipulations pour identifier les gestes critiques et comprendre le protocole ;
- optimiser le temps de manipulation. Par exemple, la préparation des lysats cellulaires pour le dosage des protéines et de la caspase 3 pouvait être traitée en parallèle, les temps d'attente et de centrifugation étant les mêmes.

D'un point de vue purement technique, les protocoles étaient pour la plupart assez guidés. Il convient de réfléchir à une utilisation raisonnée et rationnée du matériel, et notamment des cônes (par exemple, l'utilisation répétitive ne nécessite pas d'en changer entre chaque puits d'une microplaque) dans l'optique de limiter les déchets à traiter et de rapidité de manipulation. Il est de plus préférable de respecter les durées d'incubation indiquées dans les protocoles, même si certains aménagements sont possibles à la marge dans le but de terminer une manipulation dans le temps imparti.

La gestion des risques et la sécurité au laboratoire sont deux aspects importants du métier du futur enseignant. Une attitude appropriée devait donc être mise en œuvre : il ne s'agit pas de porter gants lunettes tout le long de l'épreuve (y compris lors de la rédaction du compte-rendu) mais de réfléchir à une démarche adaptée aux risques encourus.

Quelques attitudes dangereuses sont à signaler : mauvaise organisation de la paillasse entraînant une contamination non contrôlée, chewing-gum...

Aspects rédactionnels

La forme de la présentation est un aspect important de l'épreuve de TP. S'il n'est pas attendu une copie parfaite, les efforts de présentation (copie claire, questions bien numérotées sous peine d'oublier de traiter une partie, tableaux de résultats, schémas d'organisation) sont toujours valorisés dans le cadre de la sélection de futurs enseignants. Il est inutile de recopier les résultats bruts sur la copie, il était cependant indispensable d'identifier correctement ceux-ci directement sur les documents issus des lecteurs de microplaques ou des spectrophotomètres. Ces efforts peuvent également s'étendre aux fichiers informatiques construits par les candidats : graphiques avec titre, axes, unités... Le jury a apprécié la réalisation d'un schéma permettant de présenter l'ensemble des manipulations à effectuer et l'organisation choisie par le candidat.

PARTIE 1

APPROCHE CELLULAIRE DE L'EFFET DE LA BERBÉRINE SUR LES CELLULES DU145

Préparation des cellules

Le matériel biologique à disposition comprenait trois flacons de culture T75 à partir desquels les cellules étaient observées et récupérées pour la suite des manipulations.

L'observation de l'aspect morphologique des cellules pouvait se faire à n'importe quel moment, puisque trois flacons identiques à ceux fournis aux candidats étaient disponibles en permanence près du microscope inversé.

Deux aspects devaient être décrits :

- densité des cellules : elle diminuait avec l'ajout de berbérine, depuis un tapis confluent (tapis 100 % confluent, sans berbérine) à un tapis peu dense et avec des cellules flottantes (tapis 30 % confluent, à 100 µM de berbérine) ;
- morphologie des cellules : la mort cellulaire (induite par la berbérine) se traduit par une modification de l'aspect des cellules qui s'arrondissent, et finissent par se détacher les unes des autres et du support.

Lors de la récupération des cellules, il s'agissait de récupérer à la fois :

- les cellules éventuellement présentes dans le surnageant (cellules en cours de mort cellulaire ou mortes) : elles étaient nombreuses dans les flacons traités (voir morphologie) ;
- les cellules adhérentes par grattage de la surface de culture à l'aide d'un *cell spatula*.

Il convenait donc de ne pas jeter le surnageant de chaque flacon, mais bien de le conserver, et de le mélanger avec le liquide permettant de récupérer les cellules adhérentes. Il était important de récupérer l'ensemble des cellules, notamment pour apprécier l'activité caspase maximale.

Certains candidats se sont aperçus de leur erreur et l'ont mentionnée dans leur compte-rendu, en expliquant les implications pratiques que cela pourrait avoir : cette erreur n'a alors pas été sanctionnée.

Numération des cellules par test d'exclusion au bleu trypan

La numération au bleu trypan est une technique classique de biologie cellulaire. Sans aucune difficulté, elle permettait d'apprécier la richesse et l'état des suspensions cellulaires récupérées à partir des trois flacons. La concentration donnée dans le sujet n'était qu'une indication approximative permettant de poursuivre les manipulations, valable uniquement pour des cellules non traitées, et en aucun cas le résultat que l'on devait absolument obtenir.

Si les résultats et les calculs sont satisfaisants, la plupart des candidats ont compté comme mortes les cellules légèrement bleutées, alors qu'il était précisé dans le principe que la méthode de récupération par grattage entraînait un endommagement des cellules qui pouvaient apparaître colorées alors qu'elles étaient vivantes. Cela a entraîné une surévaluation de la mortalité, particulièrement sensible avec les cellules non traitées.

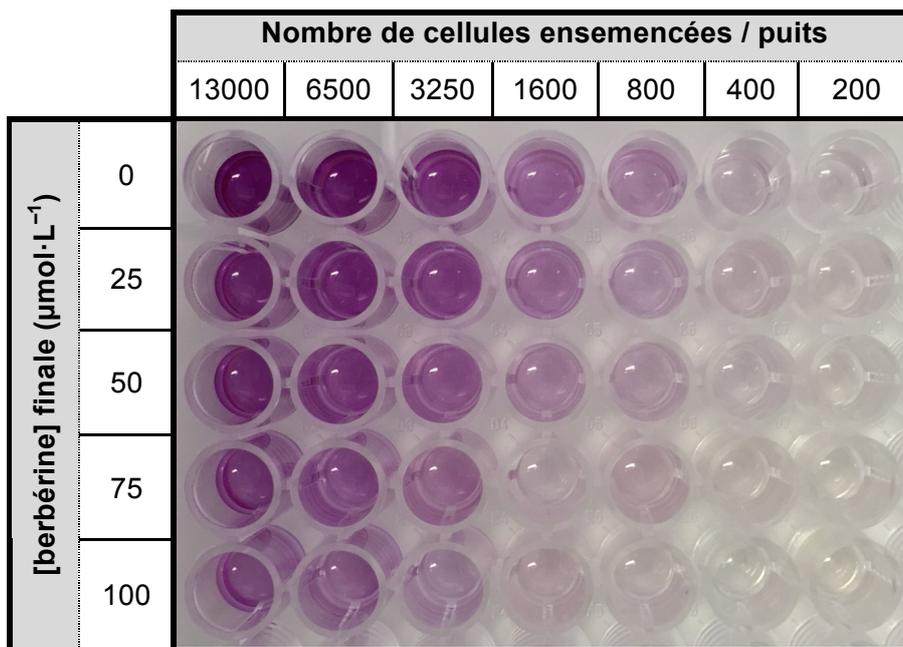
Étude de la viabilité des cellules par test au MTT

La technique, là encore très classique en biologie cellulaire, n'a posé aucune difficulté aux candidats. La seule étape délicate consistait à bien vérifier que les cristaux de formazan n'étaient pas entraînés avec le surnageant de culture lors de l'élimination de celui-ci.

La viabilité est définie comme le rapport entre les cellules vivantes après incubation et les cellules initialementensemencées, pour chaque condition de concentration en berbérine testée. Techniquement, cette viabilité se mesure grâce à l'absorbance à 570 nm, qui traduit un système mitochondrial fonctionnel (donc des cellules vivantes).

L'absorbance augmentant avec le temps, il convenait de laisser l'incubation se dérouler au moins 2 heures afin de bien voir l'effet de la berbérine sur la viabilité des cellules, sous la forme d'une double gamme :

- gamme en cellules, horizontalement ;
- gamme en berbérine, verticalement.

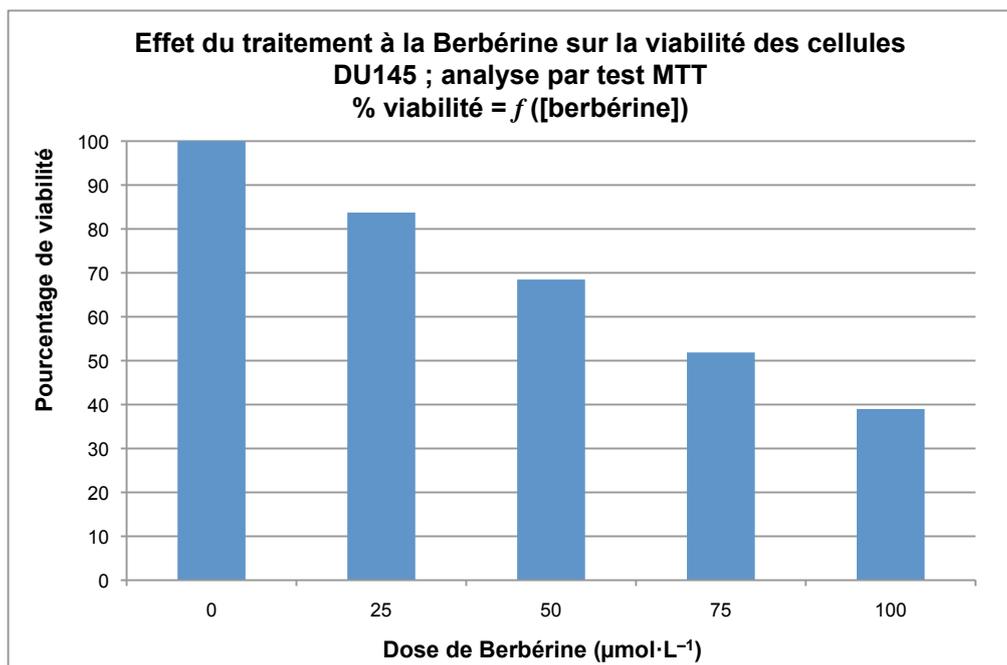


L'exploitation de ces résultats était facile :

- la courbe $A_{570\text{ nm}} = f(\text{nombre de cellules/puits})$ permet de trouver une zone linéaire (où le signal est proportionnel au nombre de cellules) qui convient pour l'ensemble des conditions. Le nombre de cellules par puits optimal correspond au nombre le plus grand compris dans la zone linéaire de l'ensemble des conditions : il fallait choisir un nombre de cellulesensemencées unique pour toutes les conditions (aux alentours de 1600 cellules par puits). Cette analyse ne peut se faire que si l'axe des abscisses (nombre de cellules par puits) est en coordonnées directes, et non en logarithme ;
- la courbe ($\% \text{ viabilité} = f([\text{berbérine}])$) ne doit alors se faire que pour le nombre de cellules par puits optimal déterminé préalablement. Le calcul du $\%$ de viabilité était simple, puisque les absorbances ont été lues contre un blanc isopropanol :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{A_{570} \text{ pour } [\text{berbérine}] = c}{A_{570} \text{ pour } [\text{berbérine}] = 0}$$

Une représentation en courbe ou en histogramme permet d'apprécier un effet-dose de la berbérine sur la viabilité cellulaire.



Étude de l'intégrité membranaire par test LDH

Cette partie présentant une difficulté particulière, car elle ne pouvait être réalisée correctement que si son principe était parfaitement compris. En effet, l'analyse approfondie du principe et du but de cette manipulation était nécessaire pour concevoir un protocole adapté.

Peu exploitée par les candidats, elle a été valorisée pour ceux qui ont pris le temps de réfléchir, notamment sur le rôle de la lyse totale, et de faire preuve d'autocritique en expliquant la conséquence de leur(s) erreur(s), dans la mesure où la manipulation ne pouvait pas être refaite.

La plaque proposée aux candidats présentait des puits en duplicates. Pour chaque condition expérimentale, les candidats devaient préalablement lyser les cellules de l'un des deux puits avant de prélever les surnageants et d'en doser la quantité de formazan produite par la LDH qui s'y trouvait.

Les candidats avaient ainsi accès :

- à la quantité de LDH relarguée spontanément par les cellules (surnageant des cellules non lysées, non stimulées), ce qui permettait de déterminer la mortalité spontanée ;
- à la quantité de LDH relarguée sous stimulation par la Berberine (surnageant des cellules non lysées stimulées), ce qui permettait de déterminer la mortalité induite par la berbérine ;
- et à la quantité de LDH totale, qui donnait une estimation du nombre de cellules totales (surnageant des cellules lysées stimulées ou non par la berbérine).

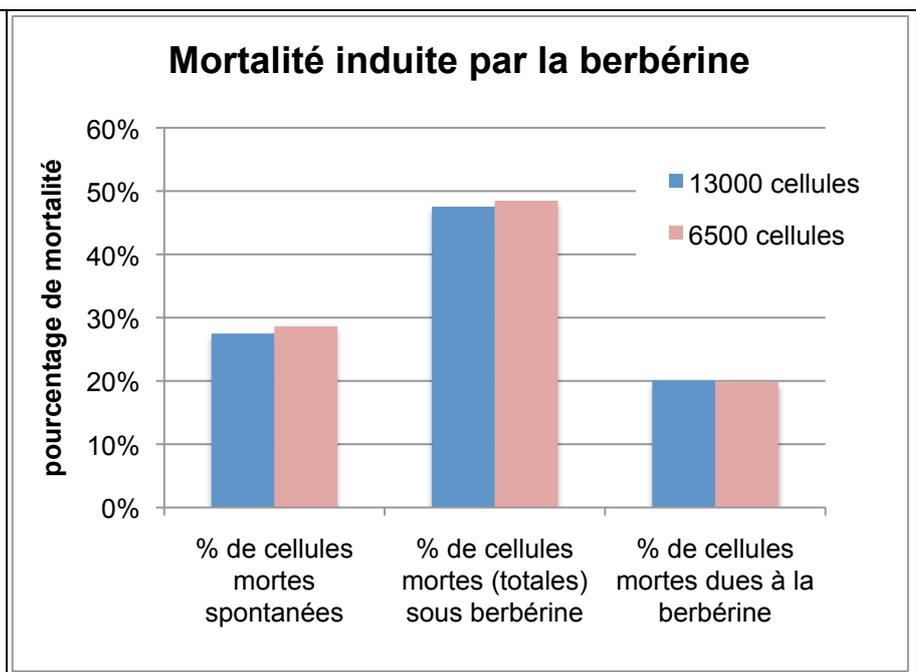
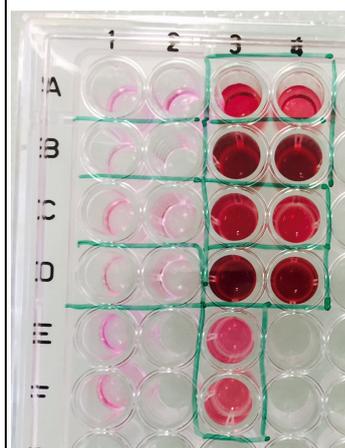
La comparaison des absorbances à 590 nm obtenues après lyse totale des cellules stimulées ou non permettait aux candidats de conclure à une inhibition de la croissance en présence de berbérine, de l'ordre de 25% pour un ensemencement de 6500 cellules.

La mortalité spontanée était déterminée par le rapport entre les absorbances à 590 nm mesurées dans le surnageant des cellules non traitées et dans le surnageant de ces mêmes cellules lysées. Elle atteignait 25%-30%.

Le rapport entre l'absorbance à 590 nm obtenue sur le surnageant de cellules traitées à la berbérine non lysées et celle des mêmes cellules préalablement lysées permettait de déterminer, après soustraction du pourcentage de mortalité spontanée, le pourcentage de mortalité induite par la berbérine. Un pourcentage de 15%-25% était attendu.

Cette expérience permettait de mettre en évidence que le traitement de cellules DU145 par la berbérine induit une mortalité excessive associée à une inhibition de la croissance, qui peut être due à une inhibition de la prolifération.

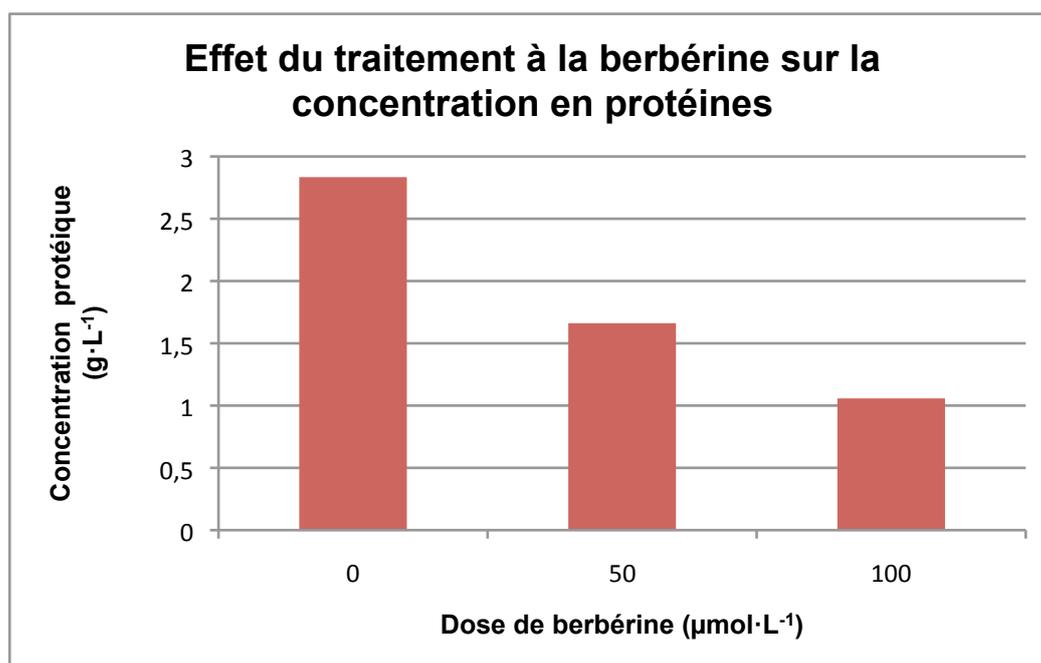
Allure de la plaque après lyse éventuelle des cellules, transfert des surnageants, ajout des réactifs et incubation (résultat obtenu par un candidat).



Dosage des protéines

Le dosage des protéines est toujours une technique extrêmement classique lorsqu'on travaille sur l'approche biochimique d'un phénomène. Le dosage proposé ici était la méthode au BCA (acide bicinchoninique). Le dosage et les dilutions pouvaient être réalisés directement dans les cuves afin de gagner du temps. La courbe d'étalonnage permettait de choisir une zone de travail, elle devait absolument être refaite car les absorbances obtenues dépendent notamment du temps d'incubation et du spectrophotomètre utilisé. Le témoin échantillon était constitué du tampon de lyse et de réactif BCA, il permettait d'éliminer l'absorbance due au tampon de lyse.

Les protéines totales étant corrélées au nombre de cellules, ce test permettait lui aussi d'évaluer la quantité de cellules en fonction de l'ajout de berbérine. Le dosage de protéines permettait également de calculer l'activité spécifique lors du dosage de la caspase 3 dans la seconde partie.



Synthèse intermédiaire

La comparaison des différents tests réalisés montrait qu'ils n'étaient pas totalement redondants mais certains se recoupaient et confirmaient les différentes observations :

- la numération des cellules totales et le dosage des protéines permettaient d'évaluer la biomasse totale ;
- la numération des cellules vivantes au bleu trypan et le test MTT donnaient accès à la viabilité cellulaire suite à l'exposition à la berbérine ;
- la numération des cellules mortes au bleu trypan et le test LDH s'intéressaient à la mortalité des cellules. Cependant, si la numération des cellules au bleu trypan donnait accès au nombre de cellules mortes au moment de l'observation, la LDH est un test cinétique qui permettait d'apprécier la mortalité cellulaire sur la durée de stimulation des cellules (48 h).

Il convenait de prendre en compte que la croissance (au sens large) est la résultante de deux phénomènes opposés : prolifération et mort cellulaire.

Afin de distinguer ces deux phénomènes, plusieurs solutions étaient envisageables, dont le test au BrDU (5-bromo deoxy uridine) qui s'incorpore au cours de la phase S lors de la réplication de l'ADN afin de quantifier la prolifération. D'autres marqueurs peuvent aussi être utilisés comme Ki67 largement employé en immunohistochimie (IHC) afin de quantifier le taux de prolifération.

PARTIE 2

APPROCHE MOLÉCULAIRE DE L'EFFET DE LA BERBÉRINE SUR LES CELLULES DU145

Étude de la fragmentation de l'ADN : test des comètes

Ce test, original dans son approche, permet d'observer (et éventuellement de quantifier) les dommages de l'ADN par l'apparition d'une « queue de comète » lors de la migration électrophorétique des noyaux cellulaires sur microgel d'agarose.

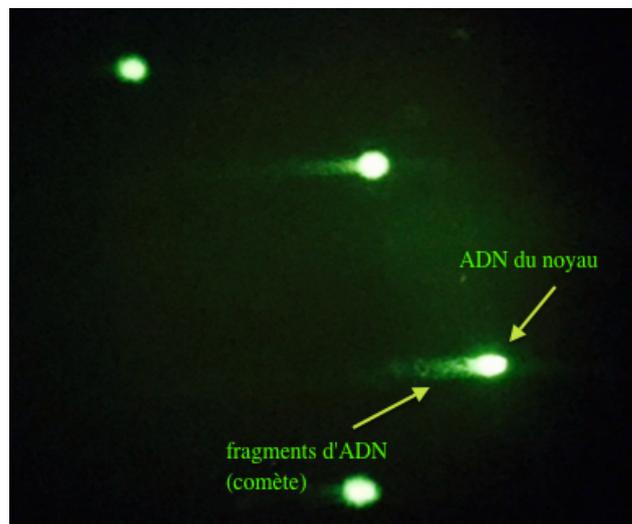
Le test n'est pas spécifique de l'apoptose mais de tout dommage de l'ADN (dont ceux dus à l'apoptose).

Ce test mis au point dans les années 80 a la particularité d'être facile à mettre en œuvre avec du matériel classique de laboratoire et consiste à inclure des cellules en culture isolées dans une matrice d'agarose à bas point de fusion (*low melting point agarose* ou LMPA) sur une lame de microscope préalablement glacée avec 1 % d'agarose, de lyser ces cellules dans un tampon contenant un détergent (Triton X-100) et en milieu alcalin (pH 10).

Après lyse des cellules, les lames sont mises à migrer dans une cuve d'électrophorèse contenant un tampon alcalin à pH 12,5. Après révélation de l'ADN avec un agent fluorescent, on peut clairement visualiser la fragmentation de l'ADN induite par l'apoptose sous forme d'une queue de comète (*voir photo*). En effet, plus l'ADN sera fragmenté, plus il y aura de petits fragments et plus ils migreront dans le gel.

Si ce test à l'avantage d'être rapide, très visuel et parfaitement adapté à l'enseignement, sa quantification reste relativement lourde car il demande l'analyse sur photo d'un grand nombre de champs avec mesure de la taille des queues de comète ou bien utiliser un vidéo-microscope couplé avec un analyseur d'images.

Résultat obtenu par un candidat :



Mesure de l'activité de la caspase 3

Les caspases étant des protéases activées spécifiquement pendant l'apoptose, cette partie permettait d'étudier un effet plus spécifique de la berbérine sur les cellules cancéreuses. Le choix de la caspase 3 a été guidé par le fait que cette caspase est au carrefour des voies d'activation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

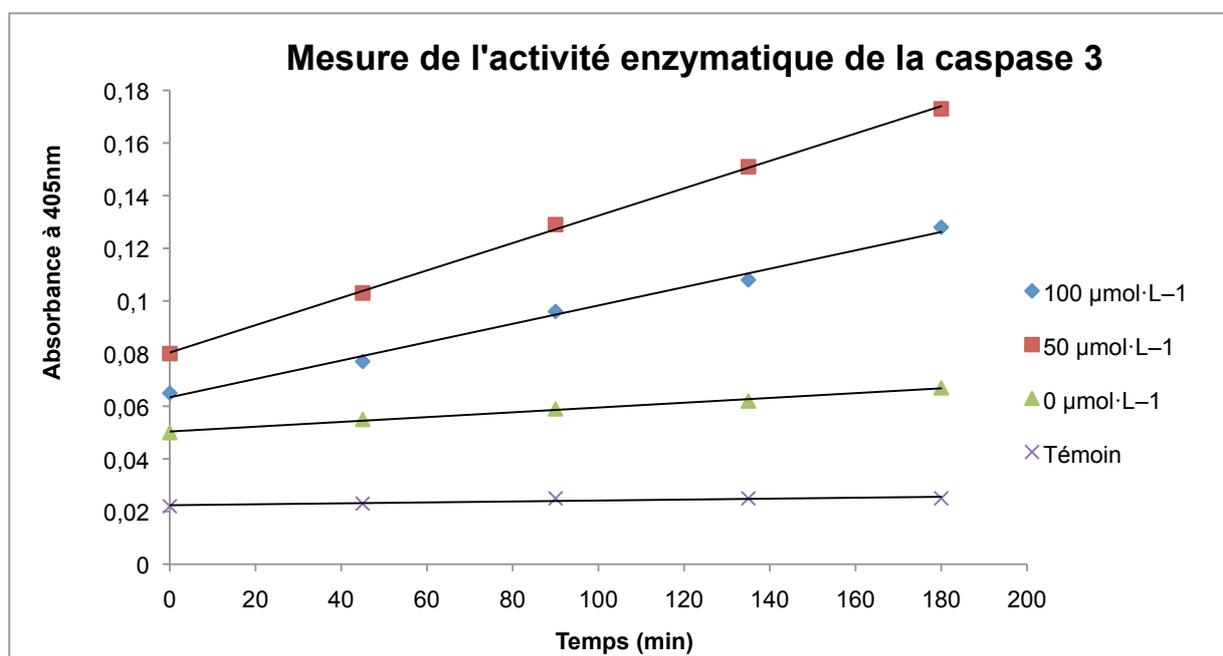
Lorsque cela a été abordé, la préparation du tampon de lyse et du milieu réactionnel a été correctement réalisée. Le calcul du volume de tampon de lyse a parfois été erroné : en utilisant les données fournies il fallait reprendre les cellules dans 30 µL de tampon de lyse.

Le témoin réactif composé de milieu réactionnel et de tampon de lyse permettait de mesurer la vitesse de transformation spontanée du substrat.

Compte tenu de la faiblesse des absorbances, il était préférable de calculer chaque vitesse indépendamment plutôt que d'enlever l'absorbance du témoin pour chaque temps.

Plusieurs modifications pouvaient être repérées entre le protocole du kit sigma et le protocole proposé :

- la quantité de lysat : le protocole effectué mettait en jeu deux fois plus de lysat afin que la réaction soit plus rapide ;
- le type de dosage : le kit initial proposait un dosage en deux points alors que le dosage effectué était en cinétique par points ; ce dernier permet de vérifier que la réaction est bien en phase linéaire ;
- la présence d'un inhibiteur de la caspase 3 : celui-ci permet de vérifier la spécificité de la vitesse mesurée et d'éliminer la vitesse de transformation du substrat qui ne serait pas due à la caspase 3.



L'activité de la caspase 3 en absence de berbérine n'était pas négligeable et pouvait être plus ou moins importante. Il était indispensable de calculer l'activité spécifique afin de standardiser les résultats en fonction de la quantité de protéines et donc du nombre de cellules.

Deux tampons de lyse différents ont été utilisés pour effectuer la mesure de l'activité caspase et le dosage des protéines. Le tampon de lyse utilisé pour la mesure de l'activité caspase contenait plusieurs substances interférentes du dosage des protéines au BCA : CHAPS, HEPES et DTT. Le DTT étant 25 fois plus concentré que la valeur maximale tolérée pour le dosage par le BCA, plusieurs stratégies auraient pu être envisagées pour l'éliminer : neutralisation des groupements thiols de DTT et dilution des échantillons pour diluer le CHAPS et l'HEPES, ultrafiltration ou dialyse pour éliminer le DTT,...

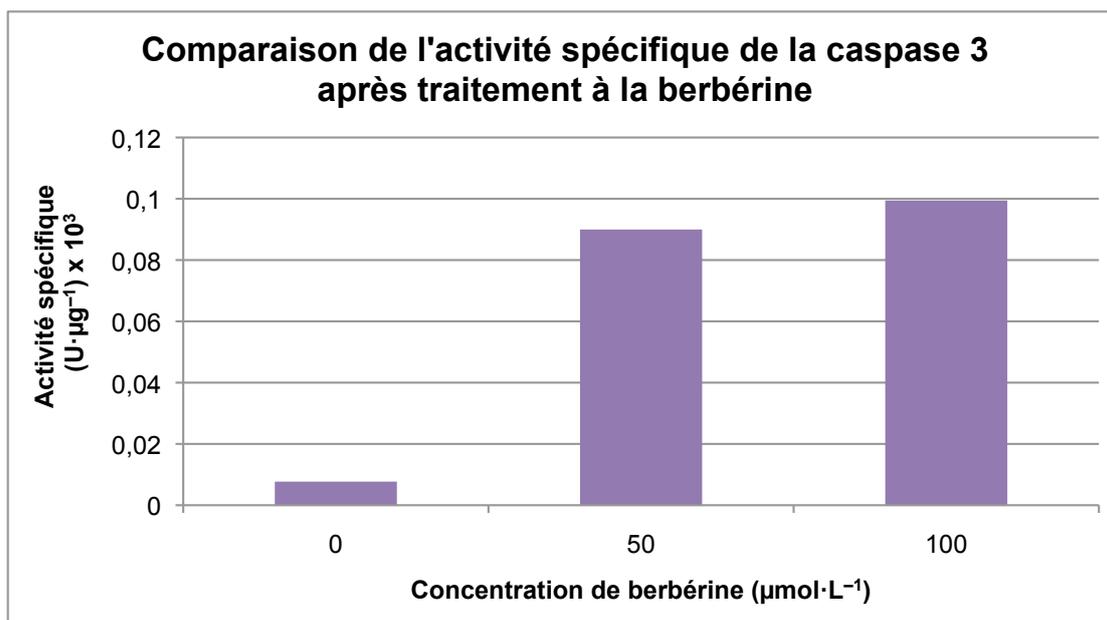
Il était indispensable de bien sécher les culots pour éviter qu'il ne reste du liquide qui aurait dilué les deux lysats de manière différente et qui aurait donc faussé les résultats.

Concentration de berbérine	0 µmol·L ⁻¹	50 µmol·L ⁻¹	100 µmol·L ⁻¹
$b_{\text{(caspase 3)}}$ en U·mL ⁻¹	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$1,49 \cdot 10^{-3}$	$1,05 \cdot 10^{-3}$
$c_{\text{protéines}}$ en g·L ⁻¹	2,83	1,66	1,06
z_{sp} en U·mg ⁻¹	$7,7 \cdot 10^{-6}$	$9,0 \cdot 10^{-5}$	$9,9 \cdot 10^{-5}$

$$b = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{\text{essai}} - \left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{\text{témoin}}}{\varepsilon \cdot \ell} \times \frac{V_{\text{milieu réactionnel}}}{V_{\text{lysate caspase}}} \times 1000 = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{\text{essai}} - \left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{\text{témoin}}}{10500 \times 0,32} \times \frac{100}{10} \times 1000$$

$$z_{\text{sp}} = b \cdot \frac{V_{\text{lysate caspase total}}}{c_{\text{protéines}} \cdot V_{\text{lysate protéine}} \times 3} = b \cdot \frac{30}{c_{\text{protéines}} \cdot 100 \times 3}$$

Le calcul de l'activité spécifique nécessitait de prendre en compte le fait que le lysat caspase avait été obtenu à partir de 600 μL de suspension initiale alors que le lysat protéines ne provenait que de 200 μL de suspension soit un facteur 3.



L'activité spécifique de la caspase 3 est dix fois plus importante lorsque les cellules ont été traitées avec de la berbérine. Celle-ci induirait donc l'activation des caspases et donc le processus d'apoptose.

SYNTHÈSE FINALE

Quelques candidats ont rédigé une synthèse finale reprenant l'ensemble des concepts étudiés dans ce TP portant sur l'action de la berbérine sur les cellules DU145 :

- la berbérine induit une mortalité excessive ;
- elle inhibe la croissance cellulaire au sens large ;
- elle induit une fragmentation de l'ADN dans les cellules et une activation des caspases, signe d'un processus d'apoptose.

Pour poursuivre l'étude dans l'optique de développer l'usage de la berbérine comme anti-tumoral, des essais *in vitro* doivent être envisagés pour vérifier l'absence de toxicité cellulaire de la berbérine sur des cellules non tumorales.

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

Étude d'un système de production d'une macromolécule exportée chez *Escherichia coli*

Sujet proposé par :

Christophe BELOIN, Joëlle BISSERY, Édith LALIQUE, Isabelle MOIZAN.

INTRODUCTION

Les bactéries ont la capacité de produire un nombre important de macromolécules de différentes natures (protéiques, saccharidiques, lipidiques, etc) qui possèdent des fonctions essentielles dans les mécanismes et structures clés de la vie bactérienne. Certaines de ces macromolécules sont exportées à l'extérieur des bactéries et influencent le comportement social de celles-ci.

Ce sujet propose d'étudier, chez la bactérie modèle *Escherichia coli*, la nature de l'une de ces macromolécules et d'analyser les phénotypes induits par la production de cette macromolécule.

TRAVAIL DU PREMIER JOUR

DONNÉES

- La linéarité du spectrophotomètre à 600 nm est vérifiée pour une suspension bactérienne dans l'intervalle $DO_{600} = 0,020 - 0,700$.
- $DO_{600} = 1 \Leftrightarrow 5,0 \cdot 10^8$ bactéries \cdot mL⁻¹.
- Une culture de nuit agitée en LB/milieu minimum M63B1Glc à 30°C-37°C présente une concentration bactérienne comprise entre $5,0 \cdot 10^8$ et $3,0 \cdot 10^9$ bactéries \cdot mL⁻¹.

MATÉRIEL UTILISABLE POUR TOUTES LES MANIPULATIONS

Milieu de culture

Eau phy (eau physiologique) stérile 50 mL en flacon

Matériel

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Semi-microcuvettes visibles + parafilm

Tubes à hémolyse stériles de 10 mL

Tubes à essai stériles à bouchon cellulose

Tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile

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

Pipettes automatiques P1000, P200, P20 + cônes adaptés

Microtubes stériles de 2 mL

Microcentrifugeuse

Microscope

Chronomètre

Pince

Poires d'aspiration

Vortex

- Les réactifs, milieux et matériels spécifiques à chaque partie sont indiqués avant les protocoles opératoires.

- Tout matériel non utilisé doit être laissé sur la paillasse.

PARTIE A

Analyse phénotypique de la production de la macromolécule étudiée lors de la croissance d'*E. coli* en milieu liquide

E. coli est une bactérie ayant la capacité de coloniser différentes niches. Elle peut vivre en communauté et former des structures appelées biofilms. Dans ces biofilms, les bactéries sont englobées dans une matrice extracellulaire qu'elles produisent. Cette matrice participe à l'architecture de ces biofilms et a un rôle protecteur vis à vis des attaques extérieures. Elle se compose de multiples éléments dont de l'eau et des macromolécules comme de l'ADN, des polysaccharides, des protéines ou complexes protéiques ou des lipides. Certaines de ces macromolécules possèdent aussi un rôle dans la dynamique des biofilms en favorisant la dissociation de ceux-ci et l'échappement des bactéries pouvant alors coloniser d'autres niches. La production de ces macromolécules peut donc avoir des effets positifs ou négatifs sur le comportement social d'*E. coli*. Cette production peut débuter à différentes étapes du cycle de vie d'*E. coli*.

Dans cette partie, on se propose d'étudier les effets de la production d'une de ces macromolécules lors de la croissance d'*E. coli* en milieu liquide. Une analyse phénotypique de mutants sera réalisée et l'effet d'enzymes hydrolytiques sur ce phénotype sera étudié.

Cultures

Précultures de 18 h à 37°C en milieu minimum **M63B1Glc**, en tubes à hémolyse de 10 mL contenant 5 mL:

A-M63 *Escherichia coli* de référence

B-M63

C-M63

Les souches **B** et **C** sont dérivées de la souche **A**.

Milieux de culture

Milieu M63B1 Glucosé stérile (**M63B1Glc-50**)

50 mL en flacon

Milieu M63B1 Glucosé stérile (**M63B1Glc-30**)

30 mL en Erlenmeyer (3 par candidat)

Réactifs

E1: solution d'enzyme à 20 g·L⁻¹ dégradant un polysaccharide

500 µL en microtube jaune, en glace

E2: solution d'enzyme à 20 g·L⁻¹ dégradant l'ADN

500 µL en microtube bleu, en glace

E3: solution d'enzyme à 20 g·L⁻¹ dégradant les lipides

500 µL en microtube orange, en glace

E4: solution d'enzyme à 20 g·L⁻¹ dégradant les protéines

500 µL en microtube vert, en glace

Matériel spécifique

Lames et lamelles

Bain thermostaté agité à 37°C avec portoir pour tubes à hémolyse

1 plaque 6 puits stérile

MANIPULATIONS

A1- Préparation des suspensions ajustées

- Vortexer 10 secondes les trois précultures fournies.
- Mesurer la densité optique à 600 nm des précultures judicieusement diluées contre un blanc adapté.
- Ensemencer les 3 Erlenmeyer de 30 mL de milieu **M63B1Glc-30** avec un volume adéquat de chacune des précultures, de manière à obtenir une DO_{600} initiale égale à environ 0,1.

A2- Inoculation des tubes pour l'observation du phénotype au cours de la croissance

- Répartir 4 mL de suspensions préalablement ajustées dans 7 tubes à hémolyse de 10 mL de la façon suivante :
 - Tubes 1 à 5 : souche **A**
 - Tube 6 : souche **B**
 - Tube 7 : souche **C**
- Effectuer immédiatement un premier prélèvement de 1 mL à t_0 pour les tubes 1, 6 et 7 et contrôler la valeur de la densité optique à 600 nm de ces prélèvements contre un blanc adapté.

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

- Introduire dans les tubes 2 à 5 le volume des solutions d'enzymes fournies afin obtenir les concentrations finales suivantes:
 - Tube 2 : **E1** à $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ final
 - Tube 3 : **E2** à $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ final
 - Tube 4 : **E3** à $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ final
 - Tube 5 : **E4** à $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ final
- Incuber les tubes en bain thermostaté à 37°C sous agitation à 110 rpm.

A3- Observation du phénotype lors de la croissance en tube

- Au bout d'un temps t compris entre 1 h 45 et 2 h, sortir les tubes du bain thermostaté. Ne pas agiter les tubes.
- Effectuer rapidement pour chacun des 7 tubes un prélèvement de 10 μL et le déposer sur une lame : ce prélèvement sera réalisé à 0,5 cm du fond du tube.
- Réaliser sans attendre l'observation microscopique à l'objectif x40 entre lame et lamelle.
- Observer l'aspect macroscopique des 7 cultures.

Deux observations microscopiques seront présentées à un examinateur.

A4- Inoculation d'une plaque pour l'observation du phénotype biofilm après croissance

- Répartir 1,5 mL des suspensions préalablement ajustées des souches **A** et **B** en duplicata dans les puits de la plaque 6 puits fournie.
- Ajouter 1,5 mL de milieu **M63B1Glc** dans ces mêmes puits.

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

- Prévoir un témoin de stérilité.
- Incuber la plaque à 30°C pendant 48 h.

COMPTE-RENDU

1. Présenter les résultats des mesures au spectrophotomètre et les calculs des volumes de préculture à ajouter pour préparer les suspensions ajustées.
2. Exposer les calculs permettant de déterminer les volumes d'enzyme ajoutés dans les tubes 2 à 5.
3. Compléter **l'annexe 1** :
 - décrire les observations microscopiques et macroscopiques effectuées.
 - discuter le(s) phénotype(s) obtenu(s) pour les souches **A**, **B** et **C**.
 - conclure sur l'effet éventuel des différentes enzymes utilisées.
 - conclure sur l'effet des mutations présentes pour les souches **B** et **C**.

PARTIE B

Visualisation de la production de la macromolécule étudiée en présence d'une substance S1 en milieu solide

La macromolécule étudiée peut être produite lors de la croissance de macro-colonies, structures organisées se formant à partir d'un spot de culture bactérienne et dans lesquelles des millions de bactéries peuvent se développer. Il est possible de révéler sa présence de part sa capacité à fixer une substance S1.

Cultures

Cultures de 18 h à 30°C en bouillon LB (+ ampicilline 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour les souches **D** et **E**), en tubes à hémolyse de 10 mL contenant 3 mL:

- A-LB** *Escherichia coli* de référence
- B-LB**
- C-LB**
- D-LB**
- E-LB**
- F-LB**
- G-LB**
- H-LB**

Les souches **B** à **H** sont dérivées de la souche **A**.

Attention, à l'exception des souches **G** et **H**, ces cultures seront aussi utilisées en **[partie C]**.

Milieus de culture

Gélose LA + Substance S1 0,02% (m/v) + Hepes 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ + Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**LA + S1**)

MANIPULATIONS

- Selon le gabarit fourni en **annexe 2**, déposer 5 μL de chaque culture fournie sur la gélose **LA + S1**. Travailler en pipetage inverse.
- Laisser sécher les dépôts.
- Incuber à 30°C pendant 48 h.

Un dépôt sera réalisé en présence d'un examinateur.

PARTIE C

Visualisation de la production de la macromolécule étudiée en présence d'une substance S2 en milieu liquide

Il est aussi possible de quantifier la présence de la macromolécule étudiée grâce à sa capacité à fixer une seconde substance S2. La substance S2 peut être dosée par mesure de l'absorbance à 490 nm.

Cultures

Cultures de 18 h à 30°C en bouillon LB (+ ampicilline 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour les souches **D** et **E**), en tubes à hémolyse de 10 mL contenant 3 mL :

A-LB *Escherichia coli* de référence

B-LB

C-LB

D-LB

E-LB

F-LB

Les souches **B** à **F** sont dérivées de la souche **A**.

Attention ces cultures seront aussi utilisées en [*partie B*].

Milieus de culture

Bouillon **LB**

50 mL en flacon

Bouillon **Tryp + S2** : Tryptone 1% (m/v) + Substance S2 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

15 mL en flacon

Réactifs

IPTG 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

50 μL en microtube rose

Matériel spécifique

Spectrophotomètre à 490 nm

MANIPULATIONS

- Mesurer la densité optique à 600 nm des différentes cultures fournies contre un blanc adapté.
- Pour chaque culture, transférer dans un microtube de 2 mL le volume nécessaire pour apporter une quantité de bactéries équivalente à celle apportée par 1,5 mL de culture à 4 unités de densité optique.
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 10 minutes.
- Resuspendre le culot dans 1 mL de milieu **Tryp + S2**.
- Pour les souches **D** et **E**, ajouter de l'**IPTG** à la concentration finale de 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Préparer un microtube témoin contenant 1 mL de milieu **Tryp + S2**.
- Incuber tous les microtubes pendant deux heures à 30°C.
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 10 minutes.
- Observer l'aspect des culots bactériens.
- Prélever les surnageants et mesurer leur absorbance à 490 nm contre l'air.

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

COMPTE-RENDU

4. Présenter un exemple de calcul du volume nécessaire pour apporter une quantité de bactéries équivalente à celle apportée par 1,5 mL de culture à 4 unités de densité optique.
5. Présenter le calcul du volume d'**IPTG** ajouté pour les souches **D** et **E**.
6. Compléter l'**annexe 3** :
 - décrire l'aspect des culots bactériens avant le prélèvement du surnageant.
 - présenter l'ensemble des résultats des mesures au spectrophotomètre.
 - commenter les résultats obtenus.

PARTIE D

Évaluation de l'interaction entre certaines protéines du complexe protéique produisant et exportant la macromolécule étudiée

La macromolécule étudiée est produite et exportée par un complexe protéique. Il est possible d'étudier les interactions entre certaines protéines de ce complexe à l'aide d'un système dit de « double-hybride » dont le principe est exposé en **annexe 4**.

La souche DHM1 porte une délétion des gènes natifs *cyaA* et *lacZ* codant, respectivement, pour l'adénylate cyclase et la β -galactosidase, ainsi qu'une construction génétique chromosomique où cette fois-ci le gène rapporteur *lacZ* a été placé sous contrôle d'un promoteur dépendant de l'AMP cyclique.

X, Y et Z sont trois protéines faisant partie du complexe protéique permettant la production et l'export de la macromolécule étudiée. Les plasmides pUT18c-X, pKT25c-Y et pKT25c-Z sont décrits en **annexe 4**.

Cultures

Préculture de 18 h à 30°C en bouillon LB + ampicilline 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en tubes à hémolyse contenant 3 mL :
I *E. coli* DHM1_pUT18c-X

Réactifs

Solution stérile froide de CaCl₂	à 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 mL en flacon, en glace
Solution de plasmide pKT25c-Y noté Y	à 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	25 μL en microtube, en glace
Solution de plasmide pKT25c-Z noté Z	à 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	25 μL en microtube, en glace
Solution d'ampicilline Amp	à 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	400 μL en microtube, en glace

Milieux de culture

Bouillon **LB+Amp** stérile : 50 mL en Erlenmeyer de 150 mL + ampicilline 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, préchauffé à 37°C en bain thermostaté avec agitation

Bouillon **LB** 50 mL en flacon

Gélose **LA** en surfusion (60°C) 120 mL en flacon

2 géloses **LA+Amp** : gélose LA + ampicilline 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, coulée en boîte de Petri

1 gélose **LA+Kan+Amp** : gélose LA + kanamycine 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + ampicilline 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, coulées en boîtes de Petri

6 géloses **LA+Xgal+Kan+Amp+IPTG** : géloses LA + X-gal 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + kanamycine 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + ampicilline 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + IPTG 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ coulées en boîtes de Petri

Matériel spécifique

Bains thermostatés à 37°C avec agitation et à 42°C sans agitation

Billes de verre stériles et récipient de récupération

Une microplaque stérile à fond rond + couvercle (à utiliser pour les [**parties D31 et D32**])

6 boîtes de Petri vides stériles

MANIPULATIONS

D1- Croissance de la souche I

Le suivi de croissance est effectué par mesure de la densité optique à 600 nm.

Lorsque la DO_{600} atteint une valeur comprise entre 0,5 et 0,6, on réalise les prélèvements destinés à la préparation des cellules compétentes [**partie D2**].

D11- Ensemencement et première mesure

- Mesurer la densité optique à 600 nm de la préculture (I) contre un blanc adapté.
- Ensemencer le milieu préchauffé (**LB+Amp**) avec un volume adéquat de la préculture, de manière à obtenir une DO_{600} initiale égale à 0,08.
- Effectuer immédiatement un premier prélèvement de 1 mL à t_0 avec une pipette graduée stérile.
La pipette pourra être laissée dans l'Erlenmeyer pour les prélèvements ultérieurs.
- Mesurer la densité optique à 600 nm de ce prélèvement contre un blanc adapté.

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

- Incuber l'Erlenmeyer en bain thermostaté à 37°C sous agitation à 140 rpm.

D12- Suivi opacimétrique de la croissance

- Toutes les **30 minutes**, prélever 1 mL de culture et mesurer la densité optique à 600 nm de chaque prélèvement.

On pourra utiliser pour les prélèvements la même pipette graduée restant dans l'Erlenmeyer.

Un prélèvement sera réalisé en présence d'un examinateur.

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

- Effectuer si nécessaire des mesures supplémentaires pour localiser précisément le moment où la densité optique est comprise entre 0,5 et 0,6 (*entre 1 h 30 et 2 h de culture*).
- Lorsque la densité optique atteint cette valeur, placer l'Erlenmeyer de culture dans la glace. La culture obtenue est nommée I'.

Indiquer à un examinateur le temps de prélèvement et la valeur de la densité optique correspondant à l'arrêt de la croissance.

D13- Dénombrement dans la masse de la culture I'

- Afin de réaliser un dénombrement dans la masse de la culture I' en milieu **LA+Amp**, déterminer les 3 dilutions à ensemercer.
- A partir de la culture I', préparer en tubes de 9 mL d'eau physiologique sous un volume total de 10 mL des dilutions en série géométrique de raison 1/10.

Une dilution sera réalisée en présence d'un examinateur.

- Ajouter dans la gélose **LA** en surfusion le volume d'**Amp** adéquat afin d'obtenir une concentration finale de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

L'incorporation de l'ampicilline doit être réalisée extemporanément dans la gélose à 45°C environ. L'ampicilline étant thermosensible, il est impératif que son incorporation ne soit pas réalisée dans une gélose dont la température serait supérieure à 45°C.

- Réaliser le dénombrement en double essai dans la masse en milieu gélosé **LA + Amp**.

Le dénombrement sera réalisé en présence d'un examinateur.

- Incuber les 6 boîtes à 30°C pendant 48 h.

D2- Transformation d'une souche bactérienne

La transformation s'effectue à partir des cellules précédemment cultivées (culture I') [**partie D1**]. Ces cellules seront rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium [**partie D21**] avant d'être transformées par des plasmides [**partie D22**].

D21- Préparation des cellules compétentes C^{comp}

- Prélever et répartir 6 x 1,5 mL de culture I' en microtubes stériles.
- Centrifuger les six microtubes pendant 2 minutes à vitesse maximale. Éliminer le surnageant.
- Ajouter de nouveau dans chaque microtube 1,5 mL de culture. Il n'est pas utile de resuspendre le culot.
- Centrifuger les six microtubes pendant 2 minutes à vitesse maximale. Éliminer soigneusement la totalité du surnageant.
- Ajouter dans chaque microtube 1 mL de solution **CaCl₂** froide. Remettre délicatement les cellules en suspension par aspirations-refoulements.

- Placer immédiatement les microtubes dans la glace, pendant 5 à 10 minutes.
- Centrifuger les six microtubes pendant 2 minutes à vitesse maximale. Éliminer soigneusement la totalité du surnageant.
- Ajouter dans chaque microtube 50 µL de solution **CaCl₂** froide. Remettre délicatement les cellules en suspension par aspirations-refoulements.
- Regrouper immédiatement (« *pooler* ») les microtubes deux à deux (au final, on dispose alors de trois microtubes contenant chacun 100 µL de cellules en **CaCl₂** froid).
- Placer les trois microtubes dans la glace pendant 30 minutes (et jusqu'à 2 heures).
- Nommer les microtubes ①, ②, ③.

D22- Transformation des cellules compétentes C^{comp}

- Compléter les différents microtubes :
 - Dans le microtube ①, ajouter un volume de solution de plasmide **Y** équivalent à 400 ng de plasmide (obtention de cellules « C^{comp}- pKT25c-Y »).
 - Dans le microtube ②, ajouter un volume de solution de plasmide **Z** équivalent à 400 ng de plasmide (obtention de cellules « C^{comp}- pKT25c-Z »).
 - Aucun plasmide n'est ajouté dans le microtube ③ (obtention de cellules « C^{comp} »).
- Rincer à chaque fois le cône par aspirations-refoulements lents de la suspension.
- Placer les trois microtubes dans la glace pendant 30 minutes.
- Homogénéiser par aspirations-refoulements.
- Réaliser un choc thermique :
 - 1 minute à 42°C en bain thermostaté.
 - Refroidir immédiatement dans la glace pendant 10 minutes.
- Ajouter 900 µL de milieu **LB** dans chaque microtube.
- Incuber les trois microtubes en bain thermostaté à 37°C pendant 30 minutes.

Les microtubes peuvent ensuite être conservés à température ambiante si la [partie D3] n'est pas réalisée tout de suite.

D3- Dénombrements des suspensions préparées

D31- Dénombrement des suspensions ① (C^{comp}-pKT25c-Y) et ② (C^{comp}-pKT25c-Z)

- Étaler 100 µL de chaque suspension bactérienne mère ① et ② non diluée sur une gélose **LA+Xgal+Kan+Amp+IPTG** selon le protocole suivant :
 - Répartir 5 à 10 billes par boîte.
 - Déposer les 100 µL de suspension bactérienne.
 - Étaler immédiatement, en effectuant des translations brusques, alternées avec des rotations de la boîte.
 - Transvaser les billes dans le récipient de récupération contenant de l'eau de Javel.
- Préparer en microplaque et en eau physiologique, sous un volume total de 150 µL, des dilutions de chaque suspension bactérienne mère ① et ② non diluée en série géométrique de raison 1/10 allant jusqu'à 10⁻⁵.

Les dilutions en microplaque seront à réaliser en présence d'un examinateur.

- Selon le gabarit fourni en annexe 2, déposer 10 µL de chaque suspension bactérienne mère ① et ② non diluée et de chaque dilution sur gélose **LA+Xgal+Kan+Amp+IPTG**. Travailler en pipetage inverse.
- Laisser sécher les gouttes.

- Centrifuger à vitesse maximale pendant 2 minutes le reste de chaque suspension bactérienne et resuspendre le culot dans 100 μL de bouillon LB qui seront étalés sur une gélose **LA+Xgal+Kan+Amp+IPTG**.

Rappel : il est fortement recommandé de ne pas laisser les BP90 trop longtemps à proximité du bec électrique.

D32- Dénombrement de la suspension ③ (C^{comp})

- Étaler 100 μL de la suspension bactérienne mère ③ non diluée à l'aide de billes stériles, en surface d'une boîte de gélose **LA+Kan+Amp**.
- Préparer en microplaque et en eau physiologique sous un volume total de 150 μL des dilutions de la suspension bactérienne mère ③ non diluée en série géométrique de raison 1/10 allant jusqu'à 10^{-7} .
- Selon le gabarit fourni en **annexe 2** déposer 10 μL de la suspension mère ③ non diluée et de chaque dilution sur gélose **LA+Amp**. Travailler en pipetage inverse. Réaliser cette numération en double essai.

Incuber l'ensemble des boîtes préparées en [**partie D3**] à 30°C pendant 48 h.

COMPTE-RENDU

7. Présenter le mode opératoire permettant l'ajustage de la souche I pour la croissance dans la [**partie D11**].
8. Présenter les résultats du suivi de croissance. Indiquer la valeur de DO_{600} et le temps correspondant à l'arrêt de cette croissance.
9. Présenter le calcul du volume d'ampicilline à ajouter à la gélose LA en surfusion pour effectuer le dénombrement.
10. Justifier les dilutions choisies pour la numération de la culture I' [**partie D13**].
11. Préciser le volume de solution plasmidique ajoutée dans chaque tube de transformation. Justifier.
12. Justifier le choix de la gélose **LA+Xgal+Kan+Amp+IPTG** utilisée pour les ensemencements des bactéries transformées.
13. A l'aide de l'**annexe 4**, émettre des hypothèses sur l'aspect que pourront avoir les colonies correspondant aux transformants issus des suspensions ① et ②.
14. Expliquer l'intérêt d'ensemencer la suspension ③ (C^{comp}) sur la gélose **LA+Kan+Amp**.

PARTIE E

Dosage du produit d'hydrolyse de la macromolécule étudiée

La nature de la macromolécule produite lors de la croissance de macro-colonies peut être précisée grâce à la mise en évidence des sous-unités libérées par une hydrolyse enzymatique choisie.

Cultures

Cultures de 18 h en spot sur gélose LB à 30°C de :

A *Escherichia coli* de référence

B

La souche **B** est dérivée de la souche **A**.

Réactifs

Tampon **MES** : tampon à 2,5 mmol·L⁻¹ pH 5,5

5 mL en tube à hémolyse de 10 mL

Tampon **MES + E** : tampon à 2,5 mmol·L⁻¹ pH 5,5 + enzyme E

5 mL en tube à hémolyse de 10 mL
en glace

Matériel spécifique

Anses calibrées

MANIPULATIONS

- Préparer deux microtubes notés A1 et B1 contenant 400 µL de tampon **MES**.
- Préparer deux microtubes notés A2 et B2 contenant 400 µL de tampon **MES + E**.
- Prélever la totalité d'un spot de la souche **A** avec une anse calibrée et le dissocier dans le microtube A1 en effectuant un mouvement rotatif de l'anse puis homogénéiser la suspension par aspirations-refoulements à la P1000.
- En faire de même avec la souche **A** dans le microtube A2.
- Répéter les deux dernières opérations pour la souche **B** avec les microtubes B1 et B2.
- Incuber à 30°C pendant 48 h.

La resuspension d'un spot sera réalisée en présence d'un examinateur.

Le sujet du jour 1 et les annexes 1 et 3 sont à remettre avec la copie.

ANNEXE 1**Tableau des résultats de la partie A**

Document à rendre avec la copie – CANDIDAT N°

- Remplir le tableau

N° tube	Composition	Aspect microscopique	Aspect macroscopique
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

- Discuter le(s) phénotype(s) obtenu(s) pour les souches A, B et C

ANNEXE 1 (suite)
Tableau des résultats de la partie A

Document à rendre avec la copie – CANDIDAT N°

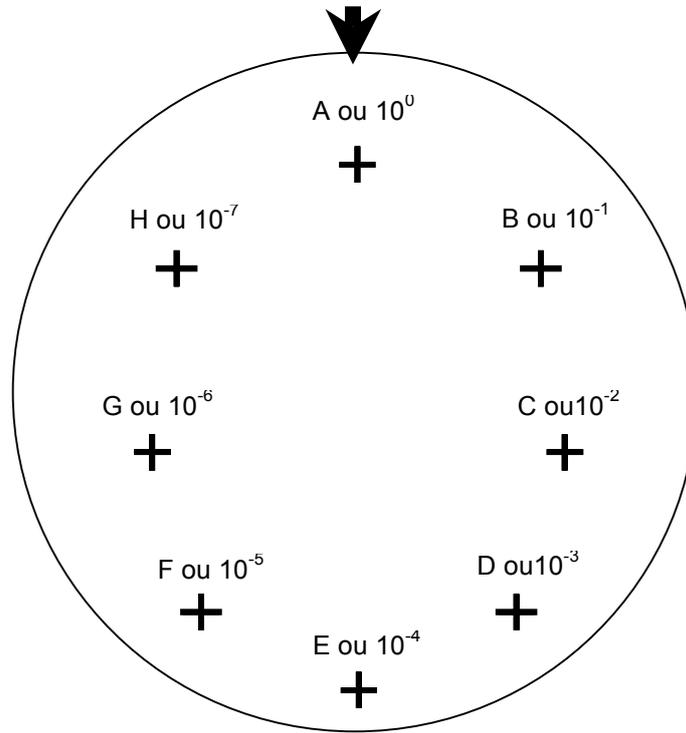
- Conclure sur l'effet des mutations présentes dans les souches B et C

- Conclure sur l'effet éventuel des différentes enzymes utilisées

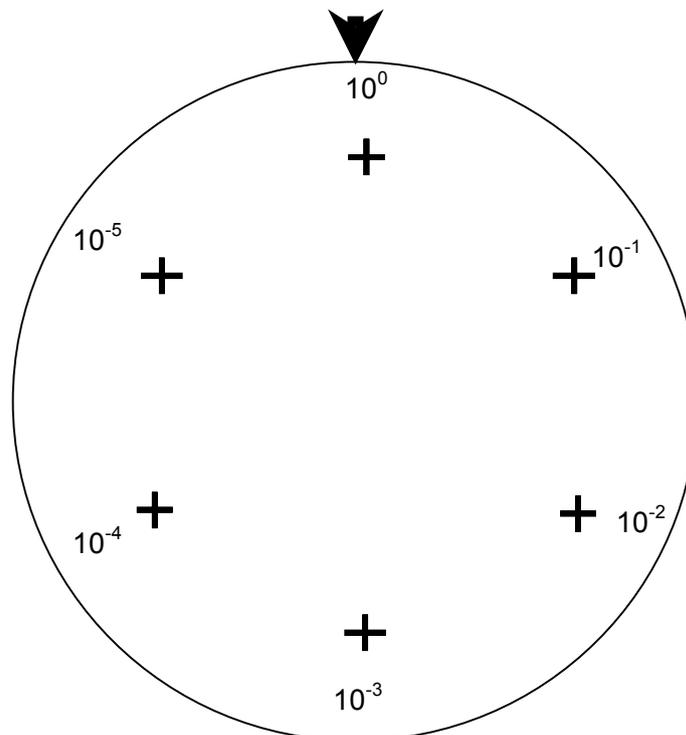
ANNEXE 2

Gabarit pour les dépôts des souches des parties B et D3

Parties B et D32



Partie D31



ANNEXE 3
Tableau de résultats de la partie C

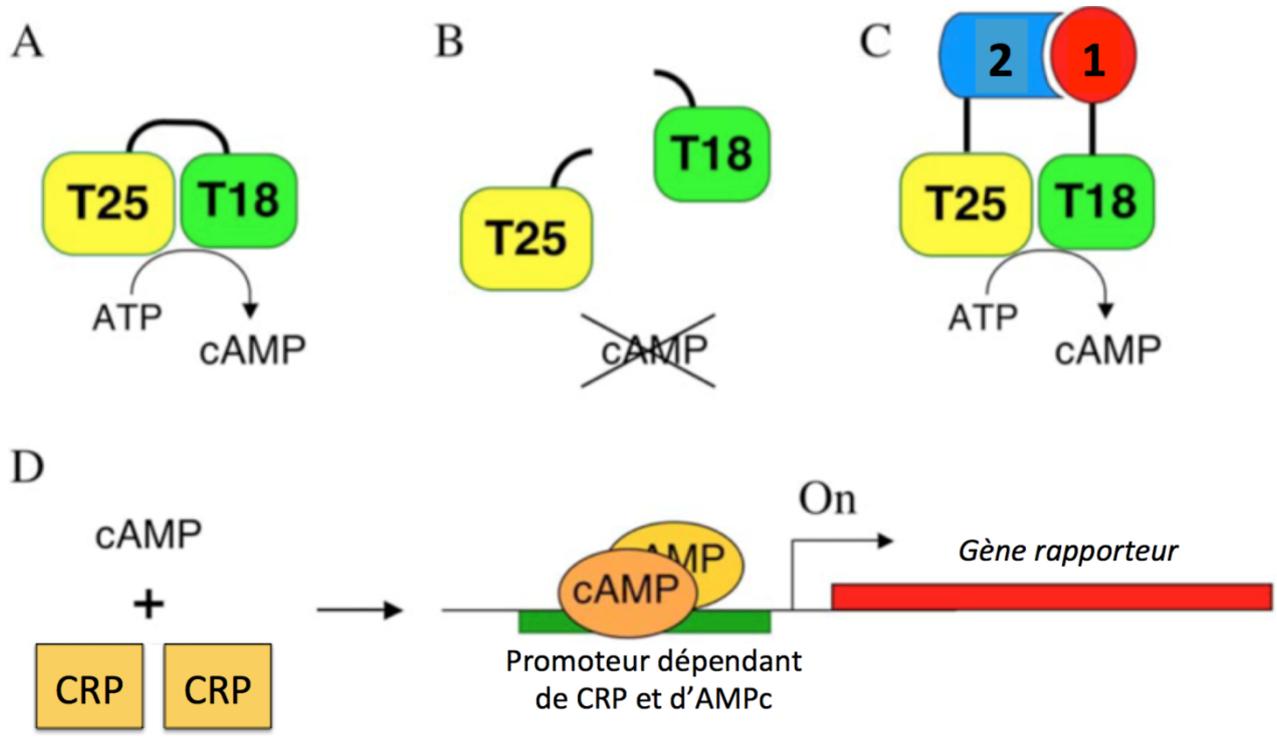
Document à rendre avec la copie – CANDIDAT N°

- Remplir le tableau

Souches	Aspect des culots	Absorbance à 490 nm
A		
B		
C		
D		
E		
F		

- Commenter les résultats obtenus

ANNEXE 4
Principe du double hybride bactérien



- A. L'adénylate cyclase CyaA est composée de deux domaines T18 et T25 qui doivent interagir pour permettre la production d'AMP cyclique à partir d'ATP.
- B. Lorsque ces deux domaines sont physiquement séparés, CyaA perd son activité enzymatique.
- C. En revanche, si deux protéines 1 et 2 qui interagissent sont fusionnées aux domaines T18 et T25, cette interaction permet le rapprochement de T18 et T25 restaurant ainsi l'activité enzymatique de CyaA et donc la production d'AMPc.
- D. Certains promoteurs sont dépendants de la présence d'AMPc qui en se liant au régulateur CRP permet l'activation de ces promoteurs. Une construction génétique peut permettre de placer ce type de promoteur en amont d'un gène rapporteur dont l'activité reflète alors la présence d'AMPc.

Plasmides présents dans la souche DHM1 :

pUT18c-X	Plasmide conférant la résistance à l'ampicilline, AmpR	Le gène codant la sous-unité T18 du gène <i>cyaA</i> est fusionné au gène codant X, et est sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose <i>p_{lac}</i> .
pKT25c-Y	Plasmide conférant la résistance à la kanamycine, KanR	Le gène codant la sous-unité T25 du gène <i>cyaA</i> est fusionné au gène codant Y, et est sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose <i>p_{lac}</i> .
pKT25c-Z	Plasmide conférant la résistance à la kanamycine, KanR	Le gène codant la sous-unité T25 du gène <i>cyaA</i> est fusionné au gène codant Z, et est sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose <i>p_{lac}</i> .

TRAVAIL DU SECOND JOUR

*Le sujet du premier jour est restitué au poste de travail ainsi que les photocopies des annexes 1 et 3.
Le compte-rendu du premier jour peut être consulté.*

La liste des souches et plasmides utilisés est présentée en annexe 5.
Le matériel utilisable pour toutes les manipulations est le même que celui indiqué en J1 (page 2).

PARTIE A

Analyse phénotypique de la production de la macromolécule étudiée lors de la croissance d'*E. coli* en milieu liquide

A4- Inoculation d'une plaque pour l'observation du phénotype biofilm après croissance

MANIPULATIONS

- Pour chaque puits, transférer délicatement la totalité du surnageant dans un tube à hémolyse.
- Vortexer et mesurer la densité optique à 600 nm de chaque surnageant éventuellement dilué.
- Ajouter dans chaque puits 2,5 mL d'eau physiologique et resuspendre soigneusement l'éventuel biofilm formé par aspirations-refoulements à la P1000.
- Vortexer énergiquement pendant 10 secondes.
- Mesurer la densité optique à 600 nm de ces suspensions.

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

COMPTE-RENDU

15. Présenter les résultats obtenus pour les souches **A** et **B**.
16. A l'aide de l'annexe 5, conclure.

PARTIE B

Visualisation de la production de la macromolécule étudiée en présence d'une substance **S1 en milieu solide**

La substance S1 correspond à du calcofluor, une molécule fluorescente se liant à certaines macromolécules de nature protéique et polysaccharidique.

Matériel spécifique

Lampe UV + protections

MANIPULATIONS

- Observer la fluorescence des spots obtenus en présence de lumière UV.

COMPTE-RENDU

17. Noter vos observations.
18. En utilisant l'annexe 5, conclure sur l'implication éventuelle des gènes/opérons mutés dans la production/export de la macromolécule étudiée.
19. Discuter du cas particulier des souches **D** et **E**.

PARTIE C

Visualisation de la production de la macromolécule étudiée en présence d'une substance S2 en milieu liquide

La substance S2, quant à elle, correspond à du rouge Congo, une molécule se liant à certaines macromolécules de type amyloïde et certains polysaccharides.

COMPTE-RENDU

20. Comparer les phénotypes obtenus en milieu liquide et solide pour les souches A à F.
21. A l'aide de ces derniers résultats et en utilisant les **annexes 3 et 5**, confirmer ou infirmer les conclusions sur l'implication éventuelle des gènes/opérons mutés dans la production/export de la macromolécule étudiée.

PARTIE D

Évaluation de l'interaction entre certaines protéines du complexe protéique produisant et exportant la macromolécule étudiée

D1- Croissance de la souche I

D13- Dénombrement dans la masse de la culture I'

COMPTE-RENDU

22. Présenter les résultats du dénombrement dans la masse des bactéries de la culture I'.
23. En utilisant les données fournies ci-dessous, exprimer le résultat du dénombrement.

On considère deux dilutions successives ayant donné au moins une boîte contenant plus de 10 colonies. On calcule le nombre N de microorganismes (ou UFC) par mL de l'échantillon, selon la formule :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 \times n_2) d} \times \frac{1}{V}$$

- Σc = nombre total de colonies comptées sur les boîtes retenues.
 n_1 = nombre de boîtes comptées à la première dilution retenue (la plus faible).
 n_2 = nombre de boîtes comptées à la seconde dilution retenue.
 d = première dilution retenue.
 V = volume de prise d'essai en mL.

D3- Dénombrements des suspensions préparées

Observer et dénombrer les colonies des géloses sur lesquelles ont été ensemencées les suspensions ① (C^{comp} -pKT25c-Y), ② (C^{comp} - pKT25c-Z) et ③ (C^{comp}).

COMPTE-RENDU

24. Présenter les résultats des dénombrements des suspensions ① (C^{comp} -pKT25c-Y), ② (C^{comp} - pKT25c-Z) et ③ (C^{comp}).
25. Interpréter le résultat obtenu pour l'ensemencement de la suspension ③ (C^{comp}) sur gélose **LA+Kan+Amp**.
26. En utilisant les résultats obtenus en [partie D13] et [partie D3], calculer le taux de mortalité lié à la préparation des bactéries compétentes.
27. En utilisant les résultats obtenus en partie [partie D3], calculer l'efficacité de transformation des plasmides pKT25c-Y et pKT25c-Z dans la souche I' (nombre de transformants par μg de plasmide).
28. Donner la couleur des colonies obtenues pour les suspensions ① (C^{comp} -pKT25c-Y) et ② (C^{comp} -pKT25c-Z) sur les géloses **LA+Xgal+Kan+Amp+IPTG**.
29. En vous aidant des **annexes 4 et 5**, conclure sur les interactions entre protéines X, Y, Z.

D4- Quantification des interactions entre les protéines X, Y et Z

L'activité β -galactosidase des deux souches est mesurée comme indiqué ci-dessous.

Les cellules sont lysées par addition de BCTMA (bromure de cétyle-triméthylammonium), détergent non dénaturant, et l'activité est déterminée en méthode enzymatique « 2 points » en utilisant un substrat chromogène, l'oNPG (orthonitrophényl- β -D-galactoside).

Culture

Cultures de 18 h à 30°C en bouillon LB, en microtube contenant 1 mL :

J	<i>E. coli</i> , DHM1_pUT18c-X_pKT25c-Y
K	<i>E. coli</i> , DHM1_pUT18c-X_pKT25c-Z

Milieus de culture

Bouillon **LB** stérile 50 mL en flacon

Réactifs

Solution de chloramphénicol Cm à 0,1 % (<i>m/V</i>)	1 mL en microtube bleu, en glace
Solution de BCTMA à 6 mg·mL ⁻¹	1 mL en microtube vert, en glace
Solution d' oNPG [<i>oNPG</i> (10 mmol·L ⁻¹), <i>MgCl</i> ₂ (1,5 mmol·L ⁻¹), β -mercaptoéthanol (15 mmol·L ⁻¹) en tampon phosphate de sodium pH 7 (0,05 mol·L ⁻¹)]	10 mL en flacon brun, en glace
Solution STOP de Na ₂ CO ₃ 1 mol·L ⁻¹ + EDTA 4 mmol·L ⁻¹	10 mL en flacon

Matériel spécifique

Bain thermostaté à 37°C sans agitation, équipé d'un portoir pour microtubes
Spectrophotomètre réglé à 420 nm

MANIPULATIONS

- Pré-incuber le microtube contenant la solution de **BCTMA** à 37°C.

D41- Préparation des suspensions bactériennes

Pour chaque culture :

- Ajouter dans chaque microtube contenant 1 mL de culture bactérienne 100 μL de chloramphénicol à 0,1 %.
- Mesurer la densité optique à 600 nm d'une dilution au 1/10 de cette suspension.

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

D42- Lyse chimique des bactéries

Pour chaque suspension :

- Introduire dans un microtube 300 μL de suspension et ajouter 30 μL de **BCTMA** pré-incubé à 37°C.
- Vortexer pendant 15 secondes.
- Laisser 5 minutes dans la glace.
- Vortexer à nouveau pendant 15 secondes.

Les microtubes peuvent ensuite être conservés dans la glace si la [**partie D43**] n'est pas réalisée tout de suite.

D43- Détermination de l'activité enzymatique

Le blanc de mesure de la réaction enzymatique (700 μL d'**oNPG** préchauffé à 37°C, 100 μL de **LB**, 375 μL de **STOP**) doit être réalisé en parallèle des échantillons traités ci-dessous.

Pour chaque lysat obtenu précédemment :

- Préparer deux microtubes contenant chacun 700 μL de solution d'**oNPG** (*ces deux microtubes correspondent à un duplicat technique*).
- Pré-incuber ces microtubes dans un bain thermostaté à 37°C pendant 5 minutes environ.

Le déclenchement de la réaction enzymatique sera réalisé en présence d'un examinateur.

- Déclencher la réaction par ajout de 100 μL de lysat.
- Incuber à 37°C pendant un temps Δt minutes.
- Arrêter la réaction par ajout de 375 μL de solution **STOP** dès l'apparition dans le milieu réactionnel d'une coloration jaune nettement visible. Rester toutefois dans des limites de 5 minutes pour le temps d'incubation Δt à 37°C. Mesurer précisément ce temps d'incubation.
- Centrifuger chaque microtube à vitesse maximum pendant 2 minutes.
- Transférer 1 mL de chaque surnageant dans une semi-microcuve.
- Mesurer l'absorbance à 420 nm contre le blanc.

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

COMPTE-RENDU

30. Préciser le rôle du chloramphénicol utilisé en [**partie D41**].
31. Discuter la pertinence de la composition du « blanc » utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique.
32. Calculer pour chaque échantillon :

$$"\Delta A_{420} \text{ normalisée}" = \frac{A_{420} \times 1000}{\Delta t} \times \frac{1}{DO_{600}}$$

La valeur de A_{420} utilisée sera la moyenne des duplicats techniques

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

33. Comparer les valeurs de « ΔA_{420} normalisée ».
34. Discuter ces résultats par rapport aux couleurs des transformants obtenus en [**partie D3**], et de vos conclusions sur les interactions entre X et Y et Z.

PARTIE E

Dosage du produit d'hydrolyse de la macromolécule étudiée

Réactifs

Kit RTU pour dosage du glucose	10 mL en flacon brun en glace
Solution étalon de glucose à $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en tampon MES GLUC	50 μL en microtube orange
Tampon MES $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 5,5	15 mL en flacon

Matériel spécifique

Spectrophotomètre réglé à 505 nm

MANIPULATIONS

- Vortexer les quatre suspensions (A1, A2, B1 et B2) énergiquement pendant 15 secondes.
- Homogénéiser les quatre suspensions par aspirations-refoulements à la P1000.
- Mesurer la densité optique à 600 nm des quatre suspensions (A1, A2, B1 et B2) judicieusement diluées contre un blanc adapté. Ces mesures seront réalisées même si des particules restent en suspension.
- En microtube, ajuster chaque suspension dans du tampon **MES** de façon à obtenir une densité optique à 600 nm de 0,5.
- Centrifuger les suspensions ajustées à vitesse maximale pendant 5 minutes.
- Effectuer le dosage du glucose dans le surnageant en suivant la fiche technique du KIT RTU (annexe 6).

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

COMPTE-RENDU

35. Présenter les résultats des mesures au spectrophotomètre, les calculs, ainsi que le mode opératoire permettant la réalisation des suspensions bactériennes ajustées à une DO_{600} de 0,5.
36. Consigner les résultats des mesures au spectrophotomètre du dosage de glucose dans un tableau.
37. A l'aide de l'annexe 6, calculer la concentration en glucose dans les surnageants des suspensions A1, A2, B1 et B2 (en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
38. L'enzyme E est en fait la même enzyme que l'enzyme E1 utilisée dans la [partie A]. Interpréter les résultats.
39. A l'aide de l'annexe 7, émettre des hypothèses quant à la nature de la macromolécule étudiée.

BILAN

COMPTE-RENDU

40. Sachant que le calcofluor se fixe sur des liaisons osidiques ($\beta 1 \rightarrow 4$), conclure sur l'identité de la macromolécule étudiée et sur la nature de l'enzyme E.
41. YedQ est une diguanylate cyclase permettant la formation de di-GMP cyclique, un activateur allostérique de certaines enzymes. A l'aide de l'ensemble des informations et résultats obtenus dans ce sujet, proposer un schéma-bilan des synthèses, export et fonction de la macromolécule étudiée ainsi que de la régulation de sa production.
42. Sachant que l'on dispose d'un anticorps reconnaissant la macromolécule étudiée, proposer une expérience permettant de déterminer si la mutation présente dans la souche **B** (Δbcs) affecte la production ou l'export de la macromolécule étudiée.
43. Proposer une expérience qui permettrait d'identifier d'autres régulateurs de la production ou de l'export de la macromolécule étudiée.

ANNEXE 5
Souches et plasmides utilisés dans le sujet

Souches	Génotype	Commentaire
A	<i>E. coli</i> , souche de référence	Souche commensale non pathogène
B	Souche dérivée de A , Δbcs	Mutant de structure de l'opéron <i>bcs</i> codant pour le complexe protéique produisant et exportant la macromolécule étudiée
C	Souche dérivée de A , $\Delta yedQ$	Mutant de régulation du gène <i>yedQ</i>
D	Souche dérivée de C , $\Delta yedQ_pyedQ$	Mutant du gène <i>yedQ</i> portant un plasmide avec une copie sauvage de <i>yedQ</i>
E	Souche dérivée de D , $\Delta yedQ_pyedQ^{mut}$	Mutant du gène <i>yedQ</i> portant un plasmide avec une copie mutée de <i>yedQ</i>
F	Souche dérivée de A , $\Delta galU$	Mutant métabolique du gène <i>galU</i> qui code pour une glucose-1P-uridyltransférase
G	Souche dérivée de A , $\Delta rpoS$	Mutant de régulation du gène <i>rpoS</i>
H	Souche dérivée de A , $\Delta csgD$	Mutant de régulation du gène <i>csgD</i>

I	<i>E. coli</i> DHM1($\Delta cyaA_ \Delta lacZ_ P_{AMPc}\text{-}lacZ$)_pUT18c-X	Souche déletée des gènes <i>cyaA</i> et <i>lacZ</i> codant pour l'adénylate cyclase et la β -galactosidase. DHM1 porte un autre gène <i>lacZ</i> sous contrôle d'un promoteur dépendant de l'AMP cyclique. Cette souche porte le plasmide pUT18c-X, AmpR
J	<i>E. coli</i> DHM1($\Delta cyaA_ \Delta lacZ_ P_{AMPc}\text{-}lacZ$)_pUT18c-X_pKT25c-Y	Souche I portant en plus le plasmide pKT25c-Y, KanR
K	<i>E. coli</i> DHM1($\Delta cyaA_ \Delta lacZ_ P_{AMPc}\text{-}lacZ$)_pUT18c-X_pKT25c-Z	Souche I portant en plus le plasmide pKT25c-Z, KanR

ANNEXE 5 (suite)
Souches et plasmides utilisés dans le sujet

Plasmides	Génotype	Commentaire
pyedQ	Plasmide conférant la résistance à l'ampicilline	Le gène <i>yedQ</i> est sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose <i>p/ac</i> .
pyedQ^{mut}	Plasmide conférant la résistance à l'ampicilline	Le gène <i>yedQ</i> muté est sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose <i>p/ac</i> .
pUT18c-X	Plasmide conférant la résistance à l'ampicilline	Le gène codant la sous-unité T18 du gène <i>cyaA</i> est fusionné au gène codant BcsX et est sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose <i>p/ac</i> .
pKT25c-Y	Plasmide conférant la résistance à la kanamycine	Le gène codant la sous-unité T25 du gène <i>cyaA</i> est fusionné au gène codant BcsY et est sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose <i>p/ac</i> .
pKT25c-Z	Plasmide conférant la résistance à la kanamycine	Le gène codant la sous-unité T25 du gène <i>cyaA</i> est fusionné au gène codant BcsZ et est sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose <i>p/ac</i> .

ANNEXE 6

Kit RTU

REF 61 269 / 61 270

07987 I - fr - 2010/07 **FR**

Glucose RTU™

IVD

Dosage enzymatique du glucose dans urines, sérum et plasma humains.

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST (1)

Le glucose constitue la principale source énergétique des cellules (glycolyse). Il est apporté par l'alimentation sous forme de polysaccharides (amidon, glycogène exogène) ou de disaccharides (saccharose, lactose, maltose). Ceux-ci sont hydrolysés au cours de la digestion en monosaccharides, dont le glucose.

Au niveau du foie et des muscles, le glucose est partiellement transformé en glycogène, polymère de stockage. En cas de besoins énergétiques accrus, il y a glycogénolyse et / ou biosynthèse de glucose (néoglucogénèse au niveau du foie).

L'homéostasie glycémique assure un apport énergétique permanent aux cellules. La régulation de la glycémie est complexe et fait intervenir des enzymes hépatiques régulatrices et des hormones (insuline, hormones thyroïdiennes, glucagon...) qui assurent une adaptation rapide.

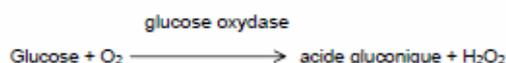
La régulation de la glycémie est en relation avec celle d'autres métabolismes dont celui des protéines et celui des acides gras.

En conditions physiologiques normales, le glucose n'est pas excrété dans les urines.

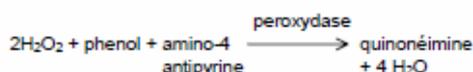
En dehors du dépistage et de la surveillance des états diabétiques, le dosage du glucose est réalisé lors d'affections pancréatiques, métaboliques ou endocriniennes. La fièvre et la dénutrition protéique entraînent également une baisse de la glycémie.

PRINCIPE

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



L'eau oxygénée formée est dosée selon la réaction de TRINDER (2).



L'intensité de la coloration (quinonéimine), mesurée à 505 nm, est proportionnelle à la quantité de glucose présente dans l'échantillon.

Code SFBC : H7

PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET

(Réf. 61 269 : 400 tests - Réf. 61 270 : 1000 tests)

Glucose RTU™	Tampon phosphate pH 6,6	225 mmol/l
- Réf. 61 269 : 4 x 100 ml (liquide)	Amino-4-antipyrine	0,3 mmol/l
- Réf. 61 270 : 4 x 250 ml (liquide)	Phénol	8,5 mmol/l
	EDTA	5 mmol/l
	Peroxydase	≥ 300 U/l
	Glucose oxydase	≥ 10 000 U/l
1 notice		

REACTIF ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactif

Calimat (Réf. 62 321).

Matériel

Equipement 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.

CONDITIONS DE STOCKAGE

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

ECHANTILLONS

Nature des échantillons (3, 4)

- Sérum ou plasma recueilli sur anticoagulant + antiglycolytique : EDTA + fluorure de sodium ou héparinate de lithium + fluorure de sodium. Conserver de préférence dans la glace jusqu'au moment de la centrifugation puis centrifuger à 1000 x g minimum pendant 10 minutes dans les meilleurs délais (1 heure au maximum après le prélèvement) pour limiter la glycolyse. Utiliser de préférence le plasma.
- Urines de 24 heures pures ou diluées, si nécessaire, dans l'eau déminéralisée.

Stabilité du sérum et du plasma (3, 4, 5, 6)

- 48 heures à 18-25°C si séparé des hématies, des globules blancs et des plaquettes.
- 4 jours à 2-8°C si séparé des hématies, des globules blancs et des plaquettes.
- 3 mois à -25 ± 6°C.

Stabilité des urines (7)

Conserver les urines de 24 heures en flacon opaque et à 2-8°C. Analyser sans délai.

Interférences

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

- de l'hémolyse, après surcharge d'échantillons en hémoglobine, jusqu'à 210 µmol/l de monomère,
- des triglycérides jusqu'à 8 mmol/l,
- de la bilirubinémie, après surcharge d'échantillons en bilirubine, jusqu'à 139 µmol/l.

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

ETALONNAGE

Utiliser Calimat (Réf. 62 321) : calibrateur multiparamétrique.

MODE OPERATOIRE MANUEL**Préparation du réactif**

Réactif prêt à l'emploi.

Stabilité après ouverture, dans le flacon d'origine

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

Réalisation du test

Longueur d'onde : _____ 505 nm (492 à 550 nm)

Zéro de l'appareil : _____ blanc réactif

	Blanc réactif	Etalon	Dosage
Etalon	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger.

Photométrer après une incubation de :

- 10 minutes à 37°C.
- 20 minutes à 20-25°C.

Stabilité de la coloration : _____ 1 heure à 20-25°C.

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

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

$$\text{Concentration de l'échantillon} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times n$$

n = concentration de l'étalon

Pour les urines, multiplier, si nécessaire, le résultat obtenu par le facteur de dilution.

FACTEUR DE CONVERSION

$$\text{mmol/l} \times 0,180 = \text{g/l}$$

$$\text{mmol/l} \times 18 = \text{mg/dl}$$

$$\text{g/l} \times 5,56 = \text{mmol/l}$$

$$\text{mg/dl} \times 0,056 = \text{mmol/l}$$

CONTROLE DE QUALITE

- LYOTROL™ N (Réf. 62 373)
- LYOTROL™ P (Réf. 62 383)
- MONOTROL™ (Réf. 62 472)
- UNITROL™ (Réf. 62 453)

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.

LIMITES DU TEST

En cas d'hyperglycémie très élevée, supérieure à 50 mmol/l, une décoloration du milieu réactionnel est visible à l'œil nu et se traduit par une instabilité de la DO lors de la mesure. Ce phénomène peut donner un résultat faussement abaissé, dans le domaine de mesure. Dans ce cas, il est nécessaire de refaire le dosage sur l'échantillon dilué au 1/10 dans une solution de NaCl à 9 g/l.

VALEURS ATTENDUES

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.

Sérum ou plasma (1, 7)

	mmol/l	g/l	mg/dl
Prématurés	1,10 – 3,30	0,20 – 0,59	20 - 59
Nouveaux nés	1,70 – 3,30	0,31 – 0,59	31 - 59
Enfants	3,30 – 5,60	0,59 – 1,01	59 - 101
Femmes	4,10 – 5,90	0,74 – 1,06	74 - 106
Hommes	4,20 – 6,10	0,76 – 1,10	76 - 110

Urines

En conditions physiologiques normales, le glucose n'est pas excrété dans les urines.

PERFORMANCES (8)

Les études du réactif Glucose RTU™ ont donné les résultats suivants.

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 0,07 mmol/l (0,013 g/l ou 1,26 mg/dl).

Linéarité

Le réactif est linéaire jusqu'à 22,2 mmol/l (4,00 g/l ou 400 mg/dl).

PrécisionPrécision intra-série

Trois échantillons sériques ont été dosés dans la même série.

	n	Moyenne (mmol/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	2,58	2,01
Niveau 2	20	7,49	1,20
Niveau 3	20	17,00	1,10

Trois échantillons urinaires ont été dosés dans la même série.

	n	Moyenne (mmol/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	1,21	3,45
Niveau 2	20	10,96	2,48
Niveau 3	20	31,50	2,15

Précision inter-séries

Trois échantillons sériques ont été dosés dans 20 séries différentes (1 série par jour).

	n	Moyenne (mmol/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	1,85	3,01
Niveau 2	20	6,44	0,87
Niveau 3	20	19,80	1,17

Corrélation

49 échantillons sériques ont été dosés comparativement à un réactif commercialisé utilisant une technique à l'hexokinase.

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

$y = 1,02 x + 0,16$ (en mmol/l) avec un coefficient de corrélation de 0,996.

APPLICATIONS DISPONIBLES SUR DEMANDE

- Applications spectrophotomètres (11897B)
- AU 400 / 640 / 2700 (13733A)
- HITACHI 704 (11899B)
- HITACHI 717 (11900C)
- HITACHI 911 (11901C)
- KONELAB 20 / 30 / 60 (12886B)
- MASCOTT PLUS / LISA (11902C)
- MEGA (12887B)
- MIRA S / MIRA PLUS (11903B)
- RA 1000 / XT (11904B)
- SELECTRA 2 / E / XL (11905C)
- Synchron® Lx / Dx C (16189A)
- TARGA / FALCOR 250 / BT 3000 plus (12888B)

ELIMINATION DES DECHETS

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

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

Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.

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. GASPART E. - P-Glucose. Variations biologiques et valeurs de référence - In SIEST G., HENNY and SCHIELE F. - *Interprétation des examens de laboratoire* - Ed. Karger, 1981 - p. 206-223 - ISBN 3-8055-2756-X.
2. TRINDER P. - Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an alternative oxygen acceptor - *Ann. Clin. Biochem.* - 1969, vol. 6, n°24, p. 24-27.
3. STAHL M., JORGENSEN L. G. M., HYLTOFT PETERSEN P., et al. - Optimization of preanalytical conditions and analysis of plasma glucose. 1. Impact of the new WHO and ADA recommendations on diagnosis of diabetes mellitus. - *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* - 2001, vol. 61, p. 169-180.
4. FOUCHER B., PINA G., DESJEUX G., et al. - Stabilité de la glycémie avant centrifugation avec ou sans antiglycolytique - *Ann. Biol. Clin.* - 2004, vol. 62, p. 601-604.
5. BOYANTON B.L., Jr., and BLICK K.E. - Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. - *Clin. Chem.* - 2002, vol. 48, n° 12, p. 2242-2247.
6. CHEVILLON I., LARROSE C., MOREAU N., et al. - Conservation des échantillons de sang avant analyse des paramètres biochimiques les plus courants. - *Ann. Biol. Clin.* - 1998, vol. 56, p. 200-204.
7. PRUDEN E.L., Mc PHERSON R.A., FUHRMAN S.A. - *Clinical guide to laboratory tests* - Ed. TIETZ N.W. / SAUNDERS W.B. COMPANY, 1995 - 3^e ed. - Section I : general clinical tests - p. 268-273 - ISBN 0-7216-5035-X.
8. VASSAULT A., GRAFMEYER D., NAUDIN C. et al. - Protocole de validation de techniques (document B) - *Ann. Biol. Clin.* - 1986, vol. 44, p. 688-745.

TABLE DES SYMBOLES

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



 bioMérieux SA
RCS LYON 673 620 399

69280 Marcy-l'Étoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com



ANNEXE 7

Données concernant la structure de quelques polysaccharides naturels

Polysaccharide	
Amidon	Polymère de D-glucose, unités reliées par des liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 4$) osidiques, avec des ramifications constituées de liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 6$) osidiques.
Alginate	Hétéropolyoside linéaire de type polyuronide constitué de deux acides uroniques : l'acide β -D-mannuronique et l'acide α -L-guluronique liés par des liaisons ($\beta 1 \rightarrow 4$) osidiques.
Dextran	Polymère de D-glucose, unités reliées par des liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 6$) osidiques, avec des ramifications constituées de liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 3$) osidiques.
Chitine	Polymère de N-acétyl-D-glucosamine, unités reliées par des liaisons ($\beta 1 \rightarrow 4$) osidiques.
Cellulose	Polymère de D-glucose, unités reliées par des liaisons ($\beta 1 \rightarrow 4$) osidiques.
Inuline	Polymère de D-fructofuranose, unités reliées par des liaisons ($\beta 2 \rightarrow 1$) osidiques, et se terminant par une unité de glucose liée par une liaison ($\beta 2 \rightarrow 1$) osidique.
PNAG	Polymère de N-acétylglucosamine, unités reliées par des liaisons ($\beta 1 \rightarrow 6$)

RAPPORT DU JURY DE TP DE MICROBIOLOGIE

Étude d'un système de production d'une macromolécule exportée chez *Escherichia coli*

Établi par : Christophe BELOIN, Joëlle BISSERY, Jean-Pascal DUMON,
Édith LALIQUÉ, Isabelle MOIZAN, Lucile TIGER.

Résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,7 / 20**
- Meilleure note : **16,2 / 20**
- Note la plus basse : **03,7 / 20**
- 17 notes sur 30 (**57 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20
 - 1 note < 4
 - 7 notes entre 6 et 8
 - 9 notes entre 8 et 11
 - 8 notes entre 11 et 14
 - 5 notes > 14

COMMENTAIRES GÉNÉRAUX SUR L'ÉPREUVE

Le sujet portait sur l'identification d'une macromolécule produite et exportée par *E. coli* et influençant son comportement social.

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

Aspects techniques et gestion du temps

Les manipulations proposées ne présentaient pas de difficultés d'un point de vue technique. La plupart d'entre elles sont des techniques de base de manipulation en microbiologie.

- examens macroscopiques et microscopiques à l'état frais ;
- ajustages de suspensions ;
- suivis de croissance par opacimétrie ;
- transformation d'une souche bactérienne ;
- dilutions en série en macro- et micro-méthodes ;
- différentes techniques de dénombrement en milieu solide ;
- dosages colorimétriques et enzymatiques.

Cette année, un grand nombre de candidats a bien respecté les consignes concernant les gestes techniques à montrer aux examinateurs. Pour rappel, un nombre de points non négligeable est attribué pour chaque geste technique évalué.

Les examinateurs ont relevé peu de grosses fautes de sécurité. Néanmoins, nous rappelons que :

- les pailles contaminées doivent être rapidement désinfectées.
- le matériel de protection fourni doit être utilisé à bon escient.
- les conditions d'asepsie doivent être respectées.
- lors du passage au spectrophotomètre les microcuvettes doivent rester obturées par du film étirable.

Il convient à nouveau de rappeler que les candidats doivent organiser leur poste de travail afin de manipuler dans des conditions optimales d'asepsie (placer judicieusement dès le début de l'épreuve portoirs, agitateur vortex et poubelle afin d'éviter de croiser les bras lors des manipulations).

De plus, les examinateurs rappellent l'importance du marquage précis des boîtes ou tubes (numéro de candidat, partie du sujet et contenu). Un marquage imprécis peut amener à des erreurs d'interprétation. Ces marquages ne doivent pas, dans la mesure du possible, se trouver sur le couvercle des boîtes.

Le sujet proposé imposait un certain nombre de mesures spectrophotométriques et d'ajustages de suspensions bactériennes. Il est à rappeler qu'au regard de la limite de linéarité fournie des spectrophotomètres, les candidats devaient être capables d'estimer les éventuelles dilutions à réaliser pour pouvoir effectuer des mesures correctes. Une mesure erronée induisait un ajustage incorrect avec une répercussion importante sur les suites des expériences.

Les observations microscopiques, les prélèvements et les inoculations ont été globalement correctement réalisés. En revanche, plusieurs techniques ne sont pas totalement maîtrisées par de nombreux candidats :

- les techniques classiques de pipetage et de dilutions en série, par exemple :
 - erreur dans le choix du matériel (pipette automatique au lieu de pipette graduée stérile) ;
 - erreur dans les volumes pipetés ;
 - mauvais positionnement de la pipette et du tube qui doivent rester verticaux lors du prélèvement ;
 - méconnaissance de la technique de pipetage inverse.
- les techniques de dénombrements, entre autres :
 - méconnaissance du volume d'inoculum (1 mL) pour la technique de dénombrement dans la masse ;
 - problème d'homogénéisation des étalements ;
 - qualité de dépôt des microgouttes.
- détermination de l'activité enzymatique de la β -galactosidase :
 - Δt approximatif ;
 - absence d'homogénéisation des mélanges réactionnels après déclenchement de la réaction.

La réalisation de l'ensemble des manipulations du sujet demandait une organisation particulièrement rigoureuse. Ainsi, la partie D, la plus longue, devait être débutée en priorité. Il est important de préparer avant toute manipulation un organigramme prenant en compte les contraintes de temps des différentes parties de l'épreuve. Un manquement à ce conseil peut engendrer notamment des erreurs grossières dues à la précipitation de fin d'épreuve, comme par exemple des mesures spectrophotométriques réalisées à une mauvaise longueur d'onde.

Aspects rédactionnels

Les efforts rédactionnels de certains candidats ont été appréciés. Néanmoins, la rédaction de certains comptes-rendus a été décevante en termes d'organisation et de présentation :

- absence ou non respect de la numérotation des questions ;
- réponse à une même question dispersée dans le compte-rendu ;
- identification imprécise des parties ;
- tableaux de résultats peu soignés voire illisibles ;

Concernant l'ajustage des cultures fournies, il est préférable de présenter les résultats et les calculs sous forme d'un tableau. Il est plus judicieux de calculer directement les volumes sans passer par un calcul de facteur de dilution ou de concentration bactérienne. Ce calcul simple de volumes devait être présenté clairement mais succinctement, il ne nécessitait pas une page d'explications, perte de temps préjudiciable pour mener à bien l'ensemble des manipulations. D'autre part, il est intéressant dans ce type de calcul de préciser si le volume ajouté est considéré comme négligeable ou pas devant le volume final.

Sur le fond, trop peu de candidats ont réussi à interpréter les expériences avec rigueur en utilisant les données fournies. Les interprétations et conclusions sont trop souvent succinctes voire absentes montrant des difficultés à s'approprier le sujet et la problématique avec suffisamment de recul. De plus, peu de candidats ont réalisé le schéma bilan de synthèse qui était explicitement demandé dans le sujet.

Le sujet de cette année proposait sur la base d'expériences simples de croissance, observations microscopiques, utilisation d'enzymes et d'un test enzymatique permettant de doser la quantité de glucose présente, d'identifier une macromolécule produite et exportée par *E. coli* et modulant la capacité de celle-ci à interagir avec ses congénères. Une caractérisation de certaines propriétés du complexe macromoléculaire produisant et exportant cette macromolécule était aussi proposée notamment une exploration des possibles interactions entre certains membres de ce complexe macromoléculaire par la technique dite de double hybride bactérien.

PARTIE A

Analyse phénotypique de la production de la macromolécule étudiée lors de la croissance d'*E. coli* en milieu liquide

Il s'agissait dans cette partie de préparer des cultures de deux souches, la souche **A** de référence et des souches **B** et **C**, mutantes, et d'observer macroscopiquement et microscopiquement l'aspect de celles-ci après 1h45-2h de croissance à 37°C. Il convenait d'anticiper le temps de croissance imposé et donc de démarrer cette expérience assez tôt dans l'épreuve.

Après cette croissance, l'observation macroscopique révélait que la souche **A** produisait des « floculats » ayant tendance à se déposer au fond du tube de culture, clarifiant ainsi la suspension bactérienne, alors que les deux souches mutantes **B** et **C** semblaient croître normalement avec une suspension trouble et une absence de floculats. Ces observations macroscopiques ont généralement été bien réalisées par les candidats.

Les observations microscopiques corrélaient avec celles macroscopiques puisque les états frais permettaient de mettre en évidence d'importants agrégats bactériens dans la culture de la souche **A**, absents des cultures des souches **B** et **C**. Certains candidats se sont concentrés à tort sur le type de motilité des bactéries qui n'était pas l'objet de cette partie A.

A ce stade, il était donc possible de faire l'hypothèse que les mutations présentes dans les souches **B** et **C** devaient toucher des gènes codant des protéines impliquées dans le processus d'agrégation observé pour la souche **A**.

Une seconde série d'expériences lancées en parallèle se proposait d'étudier l'effet de quatre enzymes différents sur ce phénotype d'agrégation. Le même type d'observations permettait de conclure que l'enzyme E1 capable de dégrader des polysaccharides était capable d'empêcher la formation, par la souche **A**, de ces floculats/agrégats. Il était donc possible d'émettre l'hypothèse que la souche **A** produisait et exportait un polysaccharide favorisant les interactions entre bactéries. Ce polysaccharide peut être dégradé par l'enzyme E1. Les souches **B** et **C** portent une mutation empêchant probablement la production ou bien l'export du polysaccharide.

Enfin, on étudiait l'influence de cette macromolécule (et donc polysaccharide) sur la formation éventuelle de biofilm. Il ne fallait pas trop anticiper les résultats et confondre formation d'agrégats et formation de biofilms, notions qui bien que reliées, relèvent de deux mécanismes différents. En J2, il convenait d'être très délicat dans la manipulation des plaques contenant les biofilms. Il s'agissait en effet d'observer une corrélation positive entre la formation de biofilm et la présence de polysaccharide. Beaucoup de candidats ayant manipulé un peu trop leur plaque ont décroché le biofilm formé par la souche **A**, et ont eu des observations macroscopiques et des mesures de DO_{600} du biofilm inconsistantes. Dans ce cas de figure, une réflexion sans a priori a permis à certains candidats de conclure à une corrélation négative entre la présence du polysaccharide et la formation de biofilm. Bien que contraire aux conclusions attendues, le jury a cependant apprécié la cohérence d'esprit de ces candidats.

PARTIE B

Visualisation de la production de la macromolécule étudiée en présence d'une substance S1 en milieu solide

Dans cette partie, on mettait en évidence la production de la macromolécule (et donc du polysaccharide) par la fluorescence générée par la fixation du calcofluor (substance S1) sur celle-ci. Il était nécessaire d'interpréter les résultats obtenus pour chaque mutant et d'en déduire l'implication éventuelle de chaque gène/opéron dans la synthèse/exportation de cette macromolécule. Il fallait préciser le rôle de chaque gène/opéron.

Les spots de souches **A**, **D** et **H** présentaient une fluorescence importante (Figure 1). Malheureusement certains candidats ayant fait des erreurs de lecture (mauvais repérage des spots), ont abouti à des conclusions erronées.

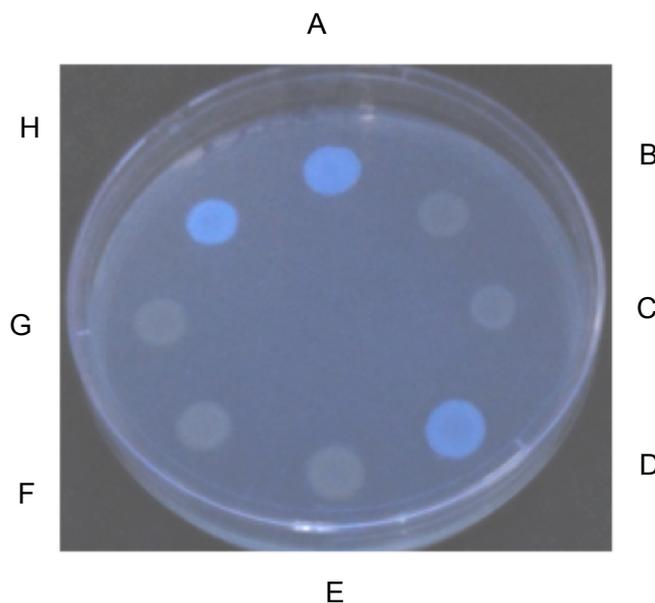


Figure 1 : observation sous lumière UV de la fluorescence pour les spots des souches A, D et H (culture en présence de calcofluor)

À l'aide de l'annexe 5, fournie en J2, qui décrivait les génotypes et certaines caractéristiques de ces souches, il était possible de confirmer que les souches **B** et **C** ne produisaient pas le polysaccharide, la première car mutée pour la fonction de synthèse ou d'export (Δbcs), la seconde car mutée pour un régulateur apparemment positif de cette synthèse ou de cet export ($\Delta yedQ$).

La souche **D** produisait ce polysaccharide car possédant un plasmide portant le gène sauvage *yedQ* sous contrôle d'un promoteur de type *plac*, et donc inductible par l'IPTG, permettant ainsi la complémentation du phénotype causé par la mutation de *yedQ*.

En revanche, la souche **E**, portant un plasmide identique mais cette fois-ci exprimant une version mutée de *yedQ* ne permettait pas la complémentation.

La souche **F**, mutée pour le gène *galU* codant pour une glucose-1P-uridylyltransférase, elle aussi ne produisait pas le polysaccharide. La production d'UDP glucose à partir de glucose 1P était donc essentielle à la production du polysaccharide.

Enfin, les souches **G** et **H**, respectivement mutées pour les gènes codant pour les régulateurs RpoS et CsgD, étaient négatives et positives pour la fixation de calcofluor, ce qui permettait de conclure que RpoS était un régulateur positif de la synthèse ou de l'export du polysaccharide, alors que ces mêmes synthèse/export devaient pouvoir se faire sans l'apport du régulateur CsgD.

PARTIE C

Visualisation de la production de la macromolécule étudiée en présence d'une substance S2 en milieu liquide

Dans cette troisième partie, très complémentaire de la partie B, on mettait en évidence la production de la macromolécule (et donc du polysaccharide) par une autre molécule affine des polysaccharides ou protéines de type amyloïde, le rouge Congo.

Seules les souches **A** et **D** devaient présenter une mesure d'absorbance à 490 nm de leur surnageant de culture réduite par rapport aux autres souches. En effet, la production de polysaccharide durant la culture de 2h entraîne une fixation accrue au rouge Congo. Donc la concentration en rouge Congo augmente dans le culot bactérien, d'où la couleur rouge des culots, et diminue dans le surnageant de culture.

Peu de candidats sont parvenus à cette conclusion. Il s'agissait en effet d'être très précis sur l'ajustement initial des cultures. Les différences de mesure d'absorbance à 490 nm attendues étaient faibles, et pouvaient devenir négligeables si les ajustements n'étaient pas parfaitement réalisés. Il était possible de corrélérer directement les résultats obtenus dans la partie B, le polysaccharide étant capable de fixer le calcofluor (S1) et le rouge Congo (S2).

PARTIE D

Évaluation de l'interaction entre certaines protéines du complexe protéique produisant et exportant la macromolécule étudiée

Dans cette partie, la plus longue du sujet, et qu'il convenait donc de commencer très tôt lors de l'épreuve, il s'agissait de mettre en évidence l'interaction ou son absence entre la protéine X et les deux protéines Y et Z faisant partie du complexe macromoléculaire produisant et exportant le polysaccharide.

Comme expliqué dans l'annexe 4 fourni en J1, les candidats utilisaient pour évaluer ces interactions un système dit de double hybride bactérien basé sur la flexibilité de l'adénylate cyclase dont les deux domaines T18 et T25 doivent interagir pour lui permettre la production d'AMP cyclique. Il est possible de restaurer cette activité perdue lorsque les deux domaines sont séparés grâce à des fusions traductionnelles mettant en jeu des protéines interagissant dans la nature. La partie D2.1 permettait la génération de cellules compétentes de la souche DHM1, ampicilline résistante, portant le plasmide pUT18c-X, exprimant sous contrôle d'un promoteur *plac*

la fusion traductionnelle T18/protéine X (BcsX) La partie D2.2 exposait la transformation des cellules compétentes par un second plasmide, pKT25-Y/pKT25-Z, conférant une résistance à la kanamycine, et exprimant les fusions traductionnelles T25/protéine Y ou Z (BcsY ou BcsZ).

Les dénombrements effectués en J1 permettaient en J2 de calculer l'effet de la préparation des cellules compétentes sur la viabilité de la souche utilisée (Figure 2), et de calculer l'efficacité de transformation de cette même souche (Figure 3).

Les candidats n'ont pas tenu compte du protocole de préparation des bactéries compétentes (provenant de 6 mL de culture l' repris après traitement dans 1 mL final) pour calculer le taux de viabilité.

La souche DHM1 portait un gène *lacZ* sous contrôle d'un promoteur dépendant de la présence d'AMP cyclique. L'interaction de la protéine X (codée dans la fusion T18-X) avec la protéine Y (codée dans la fusion T25-Z) permettait l'obtention de colonies bleues sur X-gal, alors que les colonies étaient blanches dans le cas des fusions T28-X et T25-Z. En J2, les candidats pouvaient corréliser leurs résultats de couleur de colonies grâce à la mesure de l'activité bêtagalactosidase émanant des souches contenant les différentes constructions. Ces mesures d'activité étaient réalisables aussi pour les candidats n'ayant pas abordés la partie D en J1. L'ensemble des résultats de cette partie D démontraient ainsi que les protéines X et Z n'interagissaient pas entre elles directement alors que X et Y pouvaient interagir. Comme certains candidats ont pu judicieusement le faire remarquer, ces résultats n'excluaient pas, en revanche, puisque X, Y et Z, font partie du même complexe macromoléculaire, que X puisse interagir indirectement avec la protéine Z, et ce par l'intermédiaire d'autres protéines du complexe.

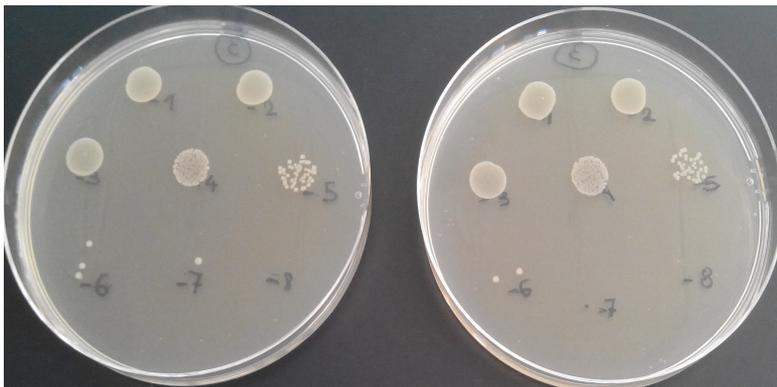


Figure 2 : dénombrement des cellules Ccomp non transformées par la technique des microgouttes

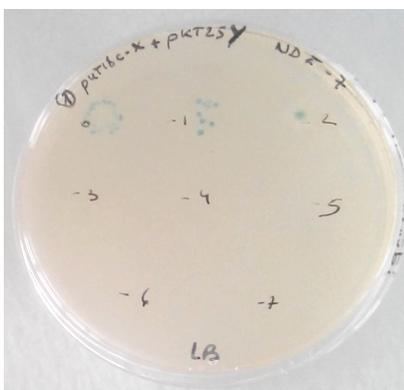


Figure 3 : dénombrement des cellules Ccomp-pKT25c-Y (colonies bleues)

PARTIE E

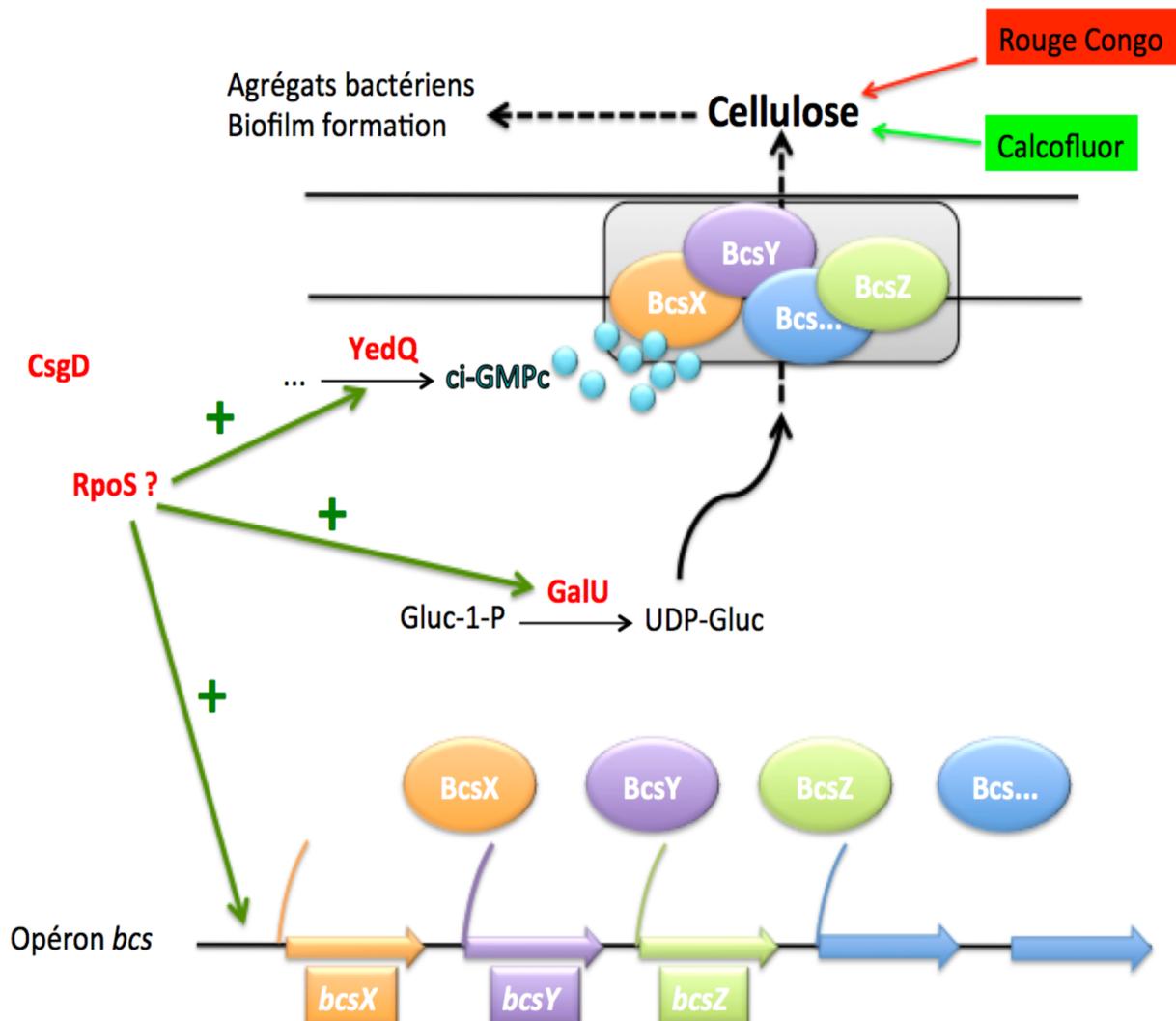
Dosage du produit d'hydrolyse de la macromolécule étudiée

Enfin, dans la partie E il s'agissait de lever le voile sur la nature des sous-unités glycosidiques formant le polysaccharide étudié. Un test enzymatique permettait de démontrer que la dégradation du polysaccharide conduisait à l'apparition de sous unités glucose, et donc de conclure que ce polysaccharide était composé au minimum de glucose. Il est à noter que certains candidats ont eu des difficultés d'interprétation lorsque les échantillons étaient mal homogénéisés. Il était possible, à l'aide de l'annexe 7 fournie en J2, de proposer que ce polysaccharide soit de l'amidon, du dextran, de la cellulose voire même de l'inuline même si seule une molécule de glucose est présente par molécule d'inuline.

BILAN

Grâce aux informations fournies sur la spécificité de reconnaissance du calcofluor (liaison osidique de type $(\beta 1 \rightarrow 4)$), il était possible de conclure que le polysaccharide était en fait la cellulose, une macromolécule produite par un grand nombre de bactéries, y compris certaines souches d'*E. coli*. L'enzyme E1/E était donc une cellulase.

Grâce à l'ensemble des informations obtenues et fournies il était possible de proposer un schéma-bilan de type :



L'opéron *bcs* permet la production des protéines BcsX, Y, Z, et d'autres protéines qui forment un complexe macromoléculaire. Dans ce complexe, BcsX interagit directement avec BcsY, et probablement indirectement avec BcsZ. Ce complexe est activé par le di-GMP cyclique, un activateur allostérique produit par la di-guanylate cyclase YedQ.

GalU produit de l'UDP-Glucose à partir de Glucose-1-P, qui est utilisé par le complexe macromoléculaire activé pour synthétiser et exporter un polymère de glucose, la cellulose qui a la propriété de fixer le calcofluor et le rouge Congo. Cette dernière favorise les interactions entre bactéries entraînant une augmentation des capacités d'*E. coli* à former des biofilms. Le régulateur RpoS est un activateur soit de la transcription de l'opéron *bcs*, soit la production d'UDP-glucose, soit de la production de di-GMP cyclique. Le régulateur CsgD n'intervient pas dans la production ou l'export de cellulose.

Pour aller plus loin, deux questions de réflexion étaient proposées :

Pour démontrer que la souche **B** était défectueuse dans la production ou l'export de cellulose, plusieurs candidats ont imaginé une expérience d'ELISA réalisée sur des cellules entières d'un côté et des cellules lysées de l'autre, et ce à l'aide d'un anticorps anti-macromolécule (anti-cellulose). En présence d'un ELISA positif seulement dans les cellules lysées, on peut conclure que la souche **B** est mutée dans l'export de la cellulose. Dans le cas d'un ELISA négatif quelque soit l'état des cellules, on peut conclure que la souche **B** est mutée dans la synthèse de la cellulose.

Pour identifier d'autres régulateurs potentiels des synthèse/export de la cellulose, de très rares candidats, ont proposé, à raison, de réaliser une mutagenèse aléatoire des gènes d'*E. coli* et de sélectionner des mutants non fluorescents sur gélose contenant du calcofluor. Ce type d'analyse peut permettre d'identifier tout type de gène impliqué dans la synthèse et l'export de la cellulose, y compris des régulateurs. Il est possible d'analyser cette banque de mutants aussi par ELISA en plaque de microtitration. Il était aussi possible de proposer d'identifier des régulateurs transcriptionnels de l'opéron *bcs* grâce au crible d'une banque de mutants réalisée dans une souche portant une construction génétique où le promoteur de l'opéron *bcs* est fusionné au gène *lacZ*, et ainsi de caractériser les mutants dont l'activité betagalactosidase est modifiée sur gélose contenant du X-gal.

Bibliographie

- BcsQ is an essential component of the *Escherichia coli* cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. Benjamin Le Quéré and Jean-Marc Ghigo. *Molecular Microbiology* (2009), volume 72(3), pp 724-740.
- A CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in *Escherichia coli*. Sandra Da Re and Jean-Marc Ghigo. *Journal of bacteriology* (2006), volume 188(8), pp 3073–3087.
- A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. Karimova G et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998), volume 95, pp 5752–5756.
- Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. Ute Römling, and Mickael Y Galperin. *Trends Microbiol.* 2015 Jun 12. pii: S0966-842X(15)00120-1. doi: 10.1016/j.tim.2015.05.005. [Epub ahead of print]

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

SUJET

Le nitrate d'ammonium

Sujet proposé par :

Romain BARBE, Hélène CARRIÉ, Aurélie DELEUZE, Laurence DUPONT.

Le nitrate d'ammonium, de formule NH_4NO_3 , a été découvert en 1659 par Johann Rudolf Glauber, chimiste allemand, qui l'avait surnommé « nitrum flammans ». C'est un solide blanc, à température et pression ambiantes, qui présente un point de fusion de 169°C .

Il est principalement utilisé en tant qu'engrais sous le nom d'ammonitrate. Très soluble dans l'eau, son utilisation contribue à une augmentation de la concentration en ions nitrate dans les milieux aquatiques. De plus, le caractère endothermique de sa réaction de dissolution dans l'eau peut être mis à profit pour la réalisation de poches de froid instantané. Enfin, le nitrate d'ammonium est également doté d'un grand pouvoir oxydant et entre dans la composition de certains explosifs. Il a été impliqué dans plusieurs accidents industriels tel que celui de l'usine AZF à Toulouse le 21 Septembre 2001 ou dans des attentats comme celui d'Oklahoma City en 1995.

Les différentes propriétés du nitrate d'ammonium seront illustrées dans ce sujet à travers trois parties :

I – Utilisation du nitrate d'ammonium en tant qu'engrais : dosage des ions nitrate dans un échantillon d'eau

II – Utilisation du nitrate d'ammonium en tant que mélange réfrigérant

III – Utilisation du nitrate d'ammonium en tant qu'explosif

L'attention des candidats est attirée sur la toxicité de certains des produits manipulés. Les mentions de danger et les conseils de prudence associés aux produits utilisés sont annexés au sujet (annexe 5).

I. Utilisation du nitrate d'ammonium en tant qu'engrais : dosage des ions nitrate dans un échantillon d'eau

1. Introduction

Les ions nitrate (NO_3^-) et nitrite (NO_2^-) sont présents de façon naturelle dans l'environnement. Ils sont le résultat d'une nitrification de l'ion ammonium (NH_4^+), présent dans l'eau et le sol, qui est oxydé en nitrite par les bactéries de type *Nitrosomonas*, puis en nitrate par les bactéries de type *Nitrobacter*.

1. Donner les configurations électroniques des atomes N et O et préciser le nombre d'électrons de valence. Définir ce qu'est un électron de valence.

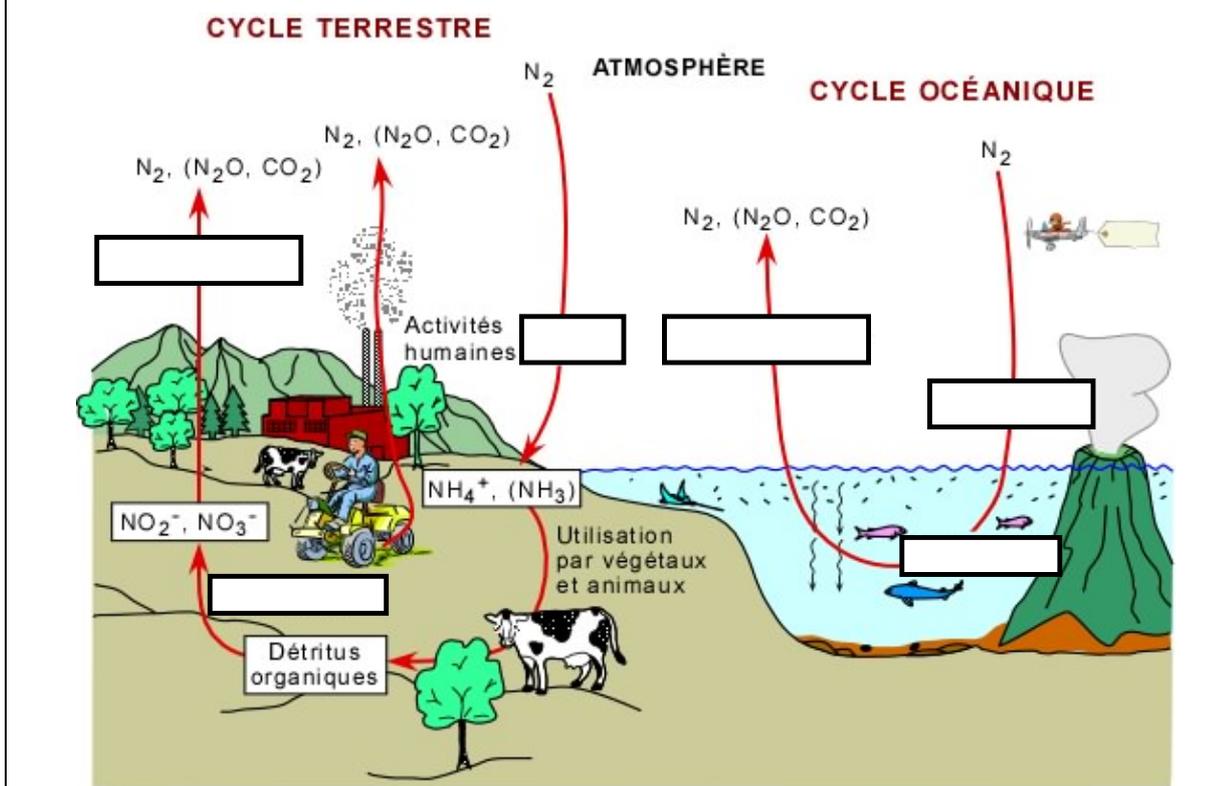
2. Donner les formules de LEWIS des ions nitrite, nitrate et ammonium. Dans chaque édifice, préciser la géométrie autour de l'azote central d'après la théorie VSEPR.

3. Ces ions sont-ils polaires ? Justifier précisément votre réponse.

Le document ci-dessous est un extrait d'une ressource pédagogique proposée par l'Université de Laval (Québec).

(Source : <http://www2.ggl.ulaval.ca/personnel/bourque/s3/cycle.azote.html>)

La vie sur terre influence profondément la composition de l'atmosphère en produisant du dioxyde de carbone CO_2 et du méthane CH_4 à travers les processus de la respiration et la fermentation reliés au recyclage du carbone. La Vie a aussi influencé la composition de l'atmosphère à travers le recyclage d'un autre élément, l'azote (N). Ce gaz est le premier en importance dans l'atmosphère terrestre (78%). Il s'y trouve sous sa forme moléculaire normale diatomique N_2 , un gaz relativement inerte (peu réactif). Les organismes ont besoin d'azote pour fabriquer des protéines et des acides nucléiques, mais la plupart ne peuvent utiliser la molécule N_2 . Ils ont besoin de ce qu'on nomme l'azote fixé dans lequel les atomes d'azote sont liés à d'autres types d'atomes comme par exemple à l'hydrogène dans l'ammoniac NH_3 ou à l'oxygène dans les ions nitrate NO_3^- . Le cycle de l'azote est très complexe ; le schéma suivant en présente une simplification.



4. À quel niveau d'enseignement, dans quelle filière de formation et dans quel thème du programme officiel pourriez-vous utiliser cette ressource pour élaborer une activité documentaire à destination de vos élèves ?
5. La figure ci-dessus est reproduite sur le document réponse qui vous est fourni. Compléter les encadrés en précisant le nom des grands phénomènes mis en jeu dans le cycle de l'azote.
6. La figure ci-dessus mentionne l'intervention d'« activités humaines » dans le cycle de l'azote. Préciser de quelle(s) activité(s) il s'agit en donnant un ou plusieurs exemples précis.
7. Quelle conséquence présente une concentration trop élevée en nitrates sur les végétaux ? Quel nom porte ce phénomène ?

Le tableau ci-dessous (*source* : Institut national de Santé Publique du Québec) présente l'influence des « activités humaines » sur la concentration en nitrates dans l'eau et l'impact de ces concentrations sur la santé humaine :

Concentration de nitrates dans l'eau potable ($C_m(\text{N})$ en $\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$)	< 0,2	0,2 – 3,0	3,0 – 10	> 10
Influence des activités humaines	Non	Possible mais impact mineur	Certaine mais avec impact modéré	Certaine avec impact majeur
Impact sur la santé	Non	Non	Non démontré	Possible

Les concentrations présentées dans le tableau ci-dessus sont exprimées en $\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$. Elles correspondent à la concentration massique en azote, notée $C_m(\text{N})$, c'est-à-dire la masse d'azote contenue dans un litre de solution.

8. Exprimer $C_m(\text{N})$ en fonction du nombre de moles d'azote, noté $n(\text{N})$, du volume total V et de la masse molaire de l'azote, notée $M(\text{N})$.
9. Démontrer la relation ci-dessous, $C_m(\text{NO}_3^-)$ représentant la concentration massique en ions nitrate :

$$C_m(\text{N}) = \frac{7}{31} \times C_m(\text{NO}_3^-)$$

10. Convertir les données du tableau ci-dessus en concentrations massiques en ions nitrate, $C_m(\text{NO}_3^-)$ exprimées en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

En Europe, les organismes de santé publique recommandent de ne pas excéder une valeur seuil de **25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en ions nitrate** dans les eaux de consommation et de **3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en ions nitrite**.

11. Cette recommandation est-elle cohérente avec les observations de l'Institut national de Santé Publique du Québec présentées dans le tableau ci-dessus ?

2. Mise en œuvre expérimentale

L'échantillon d'eau mis à disposition présente les caractéristiques suivantes :

- Concentration massique en ions nitrite : $C_m(\text{NO}_2^-) = 1,5 \text{ mg.L}^{-1}$,
- Concentration massique en ions nitrate, $C_m(\text{NO}_3^-)$ **proche du seuil de potabilité européen qui est de 25 mg.L^{-1}** .

On se propose d'analyser cet échantillon afin de déterminer s'il est propre ou non à la consommation humaine.

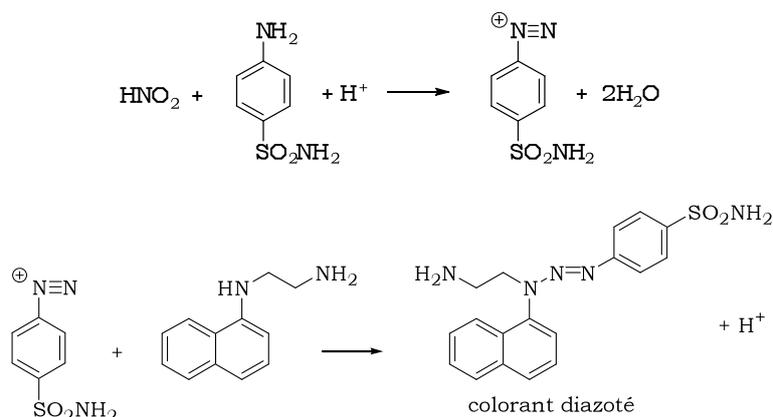
Afin de doser les ions nitrate, il convient dans un premier temps de les réduire en ions nitrite par passage sur des granules de cadmium. Cette opération a été réalisée au préalable en préparation.

12. Proposer une équation bilan pour cette réaction d'oxydoréduction. Calculer sa constante d'équilibre. Conclure.

13. Exprimer, à l'issue de ce traitement réducteur, la quantité de matière totale en ions nitrite, notée $n_{\text{tot}}(\text{NO}_2^-)$, en fonction des quantités de matière initiales en ions nitrite et nitrate de l'échantillon.

14. On suppose **dans cette question** que l'échantillon à analyser présente une concentration massique en ions nitrate égale à la valeur seuil européenne. Calculer la valeur de la concentration massique totale en ions nitrite, notée $C_{m,\text{tot}}(\text{NO}_2^-)$, dans cet échantillon, à l'issue du traitement réducteur.

Les nitrites, NO_2^- , sont dosés par **spectrophotométrie d'absorption UV - visible** après formation d'un composé coloré (rose) par réaction de diazotation avec le 4-aminobenzènesulfonamide à pH 1,9 en présence de N-(1-naphtyl)éthane-1,2-diamine. Le mélange constitué de 4-aminobenzènesulfonamide à pH 1,9 en présence de N-(1-naphtyl)éthane-1,2-diamine est nommé *réactif titrant*. Le composé de couleur rose ainsi formé est dosable par spectrophotométrie d'absorption UV - visible, l'intensité de la coloration étant proportionnelle à la concentration en ions nitrite. Les réactions mises en jeu sont présentées ci-dessous :



15. Justifier le fait que le colorant diazoté formé au cours de ces réactions soit coloré.

16. Justifier l'affirmation suivante : « l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en ions nitrite ».

Pour réaliser le dosage, il convient, dans un premier temps de construire une droite étalon $A = f(C_m(\text{NO}_2^-))$. Vous disposez pour ce faire d'une solution mère en ions nitrite NO_2^- de concentration massique égale à $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ et de 5 fioles jaugées de 50 mL.

17. Compléter le tableau présenté dans le document réponse relatif à la préparation des solutions étalon.

18. Réaliser la gamme étalon et l'analyser par spectroscopie UV-visible à une longueur d'onde que vous indiquerez sur le document réponse.

Remarque : il faut attendre **20 min au moins** après ajout du réactif titrant pour mesurer l'absorbance des solutions étalons préparées.

19. Proposer un protocole expérimental permettant d'analyser l'échantillon d'eau mis à disposition sur vos paillasses (compléter le document réponse). On précise que la concentration massique en ions nitrate de cet échantillon est proche du seuil de potabilité européen.

20. Exploiter les mesures réalisées et conclure sur la potabilité de l'eau étudiée. On s'attachera à présenter un résultat final prenant en compte les incertitudes associées aux mesures.

II. Utilisation du nitrate d'ammonium en tant que mélange réfrigérant

La dissolution du nitrate d'ammonium dans l'eau est une réaction fortement endothermique qui trouve des applications au laboratoire de chimie (un mélange eau/glace/ NH_4NO_3 permet d'avoir un milieu à -10°C) comme en médecine. Vendu sous le nom de *cold pack*, il permet en effet de refroidir et donc soulager la douleur suite à des lésions et inflammations musculaires ou tendineuses. Une telle compresse contient de l'eau et du nitrate d'ammonium dans deux poches séparées qui se percent sous l'action de l'utilisateur. Plus récemment, un brevet¹ a été déposé pour fabriquer des casques de moto se refroidissant lors d'un impact et minimisant ainsi les dommages cérébraux du motard accidenté.

21. Définir l'enthalpie standard de dissolution du nitrate d'ammonium dans l'eau.

22. En vous aidant de l'annexe 1, proposer et mettre en œuvre un protocole permettant de déterminer :

- La capacité thermique du calorimètre à votre disposition et sa valeur en eau,
- l'enthalpie de la réaction de dissolution du nitrate d'ammonium dans l'eau.

III. Utilisation du nitrate d'ammonium en tant qu'explosif

1. Explosion du nitrate d'ammonium²

Un exemple malheureusement célèbre d'explosion du nitrate d'ammonium concerne l'usine AZF de Toulouse survenue le 21 septembre 2001. Outre les très lourds dégâts matériels, 30 personnes sont décédées et 2500 ont été blessées.

A l'état pur, le nitrate d'ammonium ne détone pas spontanément mais joue le rôle de comburant. Mélangé à du fioul, il donne un explosif industriel. Normalement sûr, le nitrate d'ammonium peut

¹ WO2009095690 (A1)

² D'après le rapport d'étude n°65281 de l'INERIS : les engrais solides à base de nitrate d'ammonium

exploser à la suite d'un choc violent ou d'une surchauffe sous pression. D'autre part, le composé devient instable quand il est contaminé, même très faiblement, par exemple par l'ajout de matières organiques ou métalliques divisées.

Le nitrate d'ammonium fond à 169°C puis, en dessous de 290°C, se dissocie en ammoniac et acide nitrique.

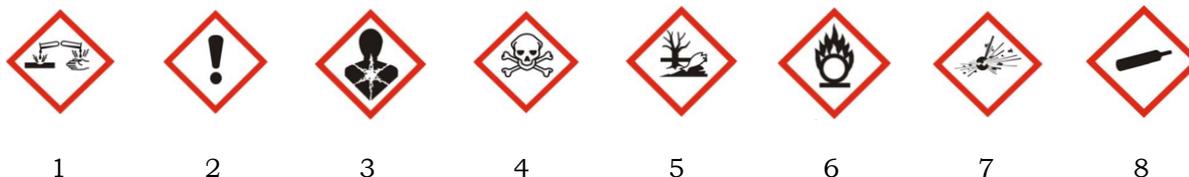
Cette dissociation est très endothermique (+ 176 kJ.mol⁻¹) et ne peut-être amorcée, puis entretenue que par un apport important de chaleur extérieur au produit.

Des réactions secondaires exothermiques dégageant des produits toxiques tels que N₂O, NO, NO₂ se mettent en place avec les produits de décomposition et la chaleur dégagée est juste suffisante pour compenser les pertes thermiques et auto-entretenir la décomposition.

Au-dessus de 290°C, les réactions de décomposition exothermiques en phase gazeuse au-dessus du nitrate d'ammonium fondu deviennent significatives. La décomposition thermique peut alors s'emballer jusqu'à la décomposition explosive : le nitrate d'ammonium liquide NH₄NO₃(l) se décompose en libérant du diazote, de l'eau et du dioxygène, tous 3 gazeux.

La présence de certaines impuretés oxydantes ou catalyseurs - chlorures et composés chlorés, bromures, iodures, cuivre, manganèse, cobalt, chrome, matières organiques - accélère la décomposition.

23. Qu'est ce qu'un « comburant » ? Choisir dans la liste ci-dessous le pictogramme correspondant à une substance comburante.



Une des réactions secondaires de décomposition du nitrate d'ammonium met en jeu les propriétés redox de l'ion nitrate et de l'ion ammonium. Le protoxyde d'azote N₂O est l'un des produits formé (le seul produit azoté).

24. Déterminer le nombre d'oxydation de l'azote dans chacune des espèces NH₄⁺, NO₃⁻ et N₂O.

25. Identifier les 2 couples redox mis en jeu dans la réaction de décomposition du nitrate d'ammonium conduisant à la formation de protoxyde d'azote. Après avoir rappelé la définition d'un oxydant et d'un réducteur, les identifier pour chaque couple.

26. En déduire l'équation de la réaction de décomposition du nitrate d'ammonium conduisant à la formation de protoxyde d'azote.

27. Qu'est ce qu'un catalyseur ? Comment agit-il sur une réaction chimique ? Représenter sur un même schéma le profil énergétique d'une réaction en l'absence de catalyseur puis en présence de catalyseur.

28. Ecrire l'équation de la réaction de décomposition explosive du nitrate d'ammonium liquide NH₄NO₃(l) en diazote, eau et dioxygène gazeux.

29. Calculer l'enthalpie standard associée à la réaction de décomposition explosive. Pourquoi les enthalpies standard de formation de N₂(g) et O₂(g) sont-elles nulles ?

Supposons une usine de volume V renfermant 300 tonnes de nitrate d'ammonium solide.

30. Calculer le volume occupé par les 300 tonnes de nitrate d'ammonium solide.

31. Calculer l'énergie libérée par la décomposition explosive des 300 tonnes de nitrate d'ammonium.

32. Déterminer le volume qu'occuperaient les gaz libérés lors de la décomposition explosive des 300 tonnes de nitrate d'ammonium sous une pression de 1 bar sachant que la température atteinte est de 1780 K. Conclure.

La détonation du nitrate d'ammonium génère une onde de surpression. Afin de déterminer les distances limites en deçà desquelles la surpression a des effets irréversibles sur la santé humaine (50 mbar) et, d'autre part, des effets létaux sur la santé humaine (140 mbar), une méthode d'équivalence TNT peut être utilisée. Dans cette méthode, les rayons d'effets à 140 et 50 mbar, exprimés en mètre, s'expriment de la manière suivante :

$$R_{140\text{mbar}} = 10 \cdot (p \cdot E_q \cdot M)^{1/3} \text{ et } R_{50\text{mbar}} = 22 \cdot (p \cdot E_q \cdot M)^{1/3}$$

Dans cette expression, M est la masse d'engrais considérée (kg), p, la portion de cette même masse qui est susceptible de détoner et E_q , le coefficient d'équivalence TNT de l'engrais.

Pour un nitrate d'ammonium répondant aux exigences de la norme française NFU42001, les coefficients à appliquer sont : $p=0,10$ et $E_q = 0,30$.

33. Calculer les valeurs de ces deux rayons dans le cas d'un hangar stockant 300 tonnes de nitrate d'ammonium.

2. Autres composés explosifs

Le nitrate d'ammonium a été, pendant les deux premières guerres mondiales, associé au 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) pour former un explosif plus facilement manipulable que le TNT seul.

Le TNT est obtenu par nitration du toluène, réaction qui va être ici étudiée.

34. Le benzène est une molécule aromatique. Préciser le sens de cette affirmation.

35. Comparer les longueurs et les angles de liaisons CC dans le benzène.

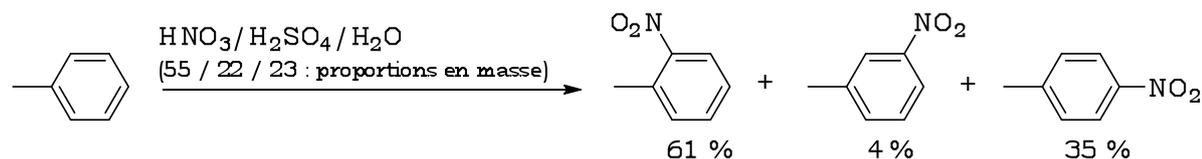
36. Le benzène, contrairement aux dérivés éthyléniques, ne subit pas de réactions d'additions électrophiles mais des réactions de substitutions électrophiles (S_EAr). Expliquer pourquoi.

Le benzène soumis à l'action d'un mélange aqueux des acides nitrique et sulfurique conduit à la formation du nitrobenzène.

37. L'électrophile mis en jeu dans cette substitution est l'ion nitronium NO_2^+ . Proposer un mécanisme de formation de cet électrophile.

38. Proposer un mécanisme pour la substitution électrophile sur le benzène.

Dans les mêmes conditions, le toluène conduit à la formation de trois isomères du nitrotoluène dont les proportions sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse :



39. Expliquer le principe de fonctionnement de la chromatographie en phase gazeuse.

40. Nommer ces trois isomères.

41. Quelle serait la proportion des produits si la réaction n'était pas régiosélective ?

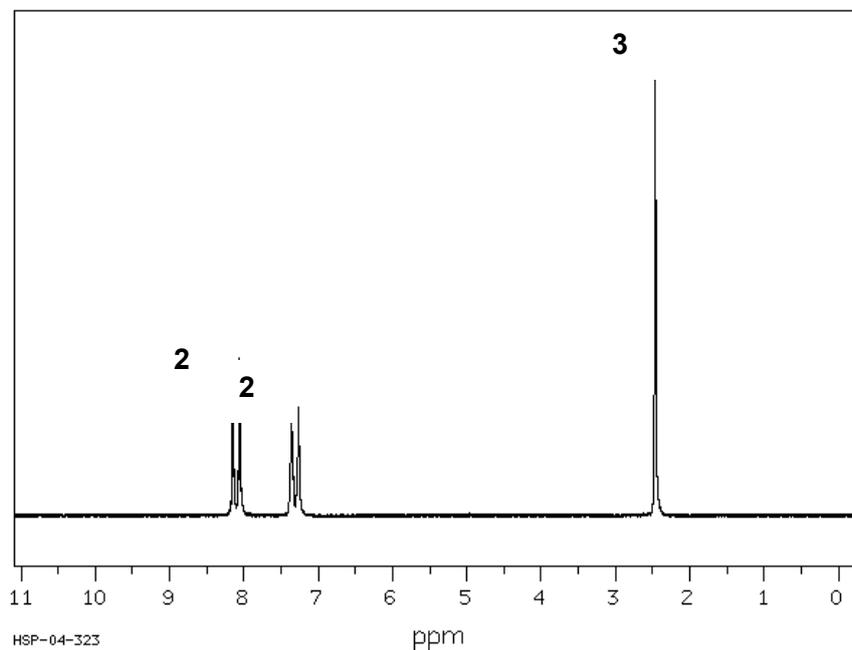
42. Justifier l'obtention d'un isomère majoritaire en comparant notamment la stabilité des intermédiaires de réaction formés.

43. Quelle est la position la plus favorisée pour la S_EAr ?

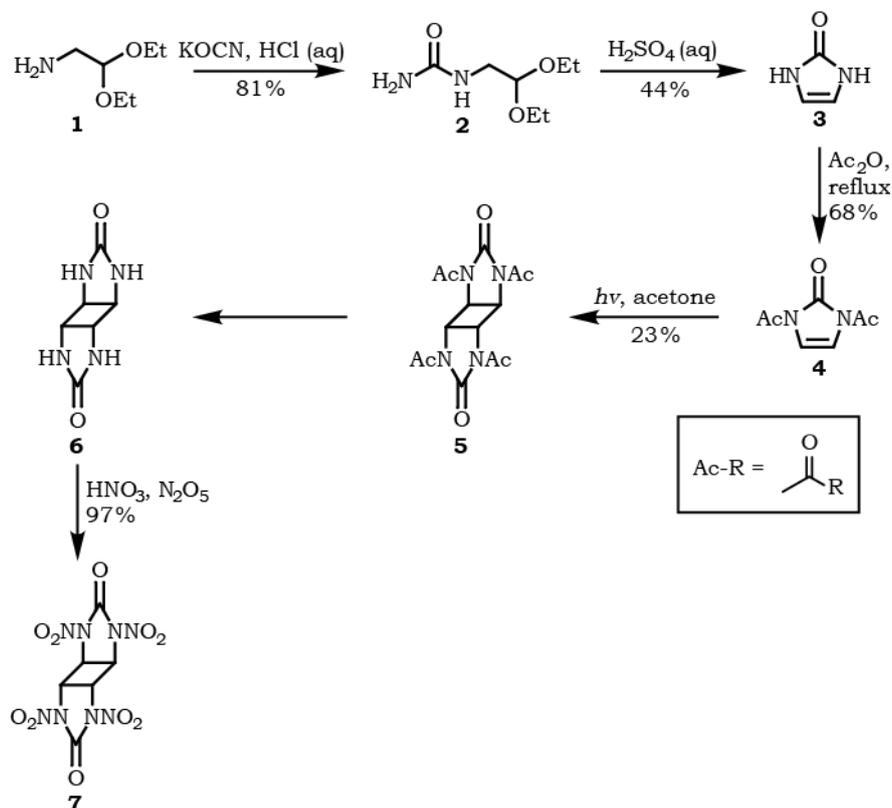
44. La réaction de nitration est 25 fois plus rapide sur le toluène que sur le benzène, mais 160 fois plus lente sur le nitrobenzène. Interpréter ces données expérimentales.

45. Conclure quant aux conditions opératoires permettant l'obtention du TNT par une triple nitration du toluène : plutôt un chauffage fort et prolongé ou au contraire une réaction menée à basse température ?

46. Donner la structure de l'isomère du nitrotoluène dont le spectre RMN du proton est donné ci-dessous (effectué dans CDCl_3 à l'aide d'un spectromètre à 90 MHz³).



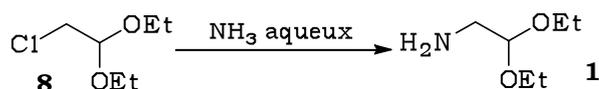
La présence de nombreux substituants nitrés sur une structure organique est souvent associée à des propriétés explosives. C'est le cas pour les dérivés du cyclobutane dont une synthèse est proposée ci-dessous⁴ :



³ <http://sdb.sdb.aist.go.jp>

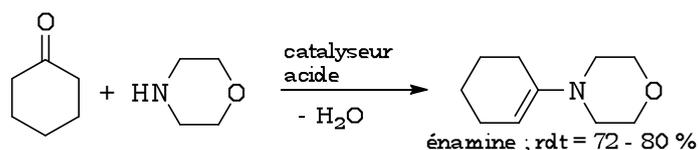
⁴ R. D. Chapman, J.W. Fischer, R. A. Hollins, C. K. Lowe-Ma and R. A. Nissan, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 9340.

La synthèse part du diéthylacétal **1** de l'aminoacétaldehyde, composé commercial dont une des synthèses possibles est la suivante⁵ :



- 47.** Expliquer pourquoi l'ammoniac (NH₃) est introduit en large excès (un peu moins de 10 équivalents).
- 48.** Ecrire le mécanisme de la réaction **8** → **1**.
- 49.** Proposer des conditions opératoires permettant la synthèse de **8** à partir du 2-chloroéthanal.

Un composé carbonyle en présence d'une amine peut conduire à une énamine. Par exemple :



- 50.** Interpréter la transformation **2** → **3**.
- 51.** Ecrire le mécanisme de la réaction **3** → **4**.
- 52.** Proposer des conditions opératoires permettant de réaliser la réaction **5** → **6**.

⁵ United States Patent 4792630

Annexe 1 – Calorimétrie

Mesures dans des conditions adiabatiques

- Un solide de masse m_1 est porté à la température θ_1 .
- Il est alors plongé dans le calorimètre contenant une masse M d'eau à la température θ_0 .
- Les échanges thermiques pour l'ensemble (calorimètre + eau + solide) conduisent à un équilibre thermique à la température θ_f .
- Le bilan énergétique relatif à cet ensemble s'écrit :

$$\Delta H_{(i \rightarrow f)} = \sum_k \Delta H_{k(i \rightarrow f)} = Q_p \text{ car la transformation est isobare}$$

Avec $Q_p = 0$ car la transformation est adiabatique

$$m_1 c_p (\theta_f - \theta_1) + (M c_{\text{eau}} + C_{\text{calo}}) (\theta_f - \theta_0) = 0$$
$$c_p = \frac{(M c_{\text{eau}} + C_{\text{calo}}) (\theta_f - \theta_0)}{m_1 (\theta_1 - \theta_f)}$$

Une manipulation préliminaire s'avère nécessaire pour déterminer la capacité thermique C_{calo} du calorimètre et de ses accessoires.

Pour cela, on remplace le solide par une masse m d'eau, à une température θ_1 et de capacité thermique massique c_{eau} . L'expression de C_{calo} est alors :

$$m c_{\text{eau}} (\theta_f - \theta_1) + (M c_{\text{eau}} + C_{\text{calo}}) (\theta_f - \theta_0) = 0$$

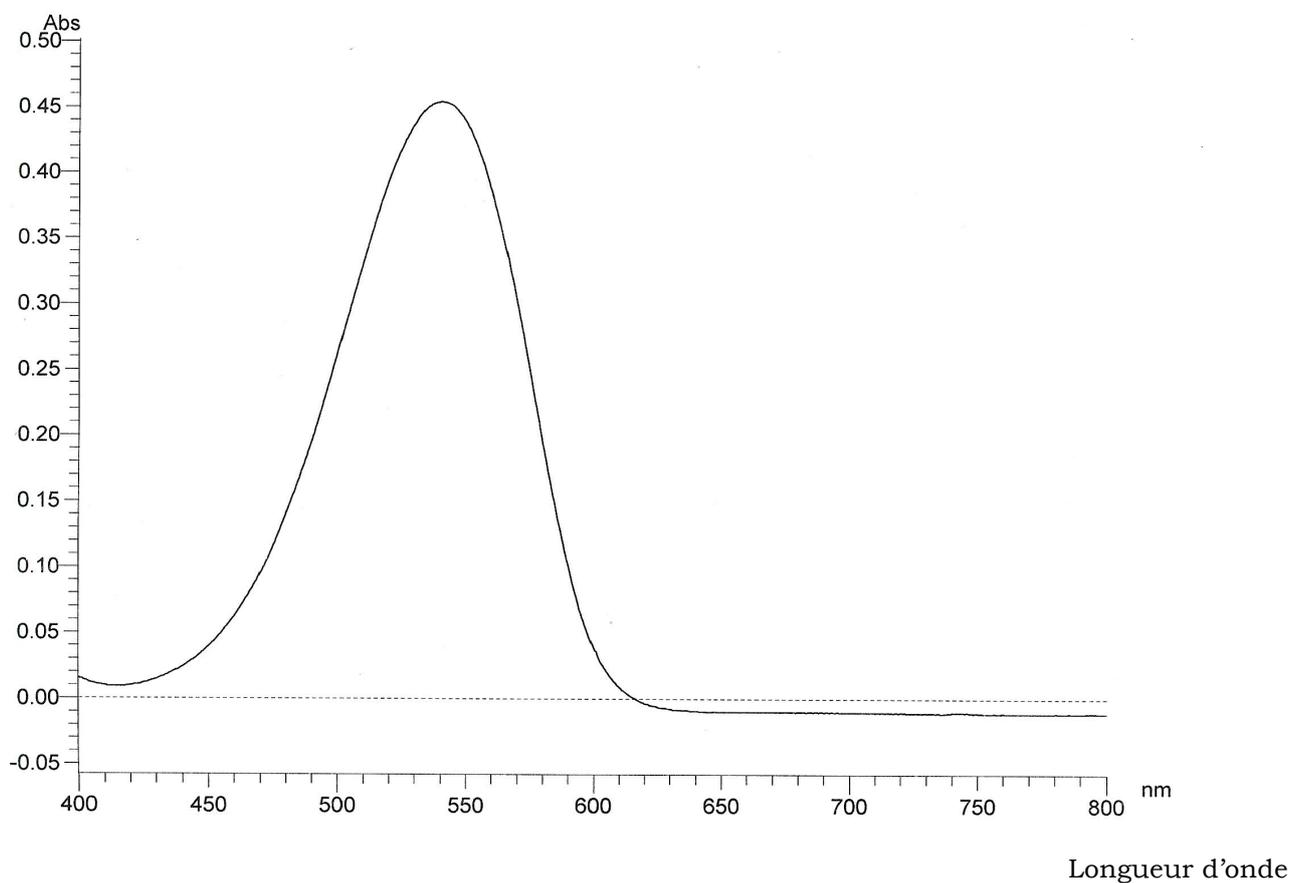
$$C_{\text{calo}} = \frac{m c_{\text{eau}} (\theta_1 - \theta_f)}{(\theta_f - \theta_0)} - M c_{\text{eau}}$$

On appelle parfois *valeur en eau du calorimètre* la grandeur m , homogène à une masse, définie par :

$$\mu = \frac{C_{\text{calo}}}{c_{\text{eau}}}$$

Référence : <http://eduscol.education.fr/rnchimie/phys/kohl/Thermo/calorim.htm> (vu le 22 mars 2015)

Annexe 2 – Spectre d'absorption moléculaire du colorant diazoté



Annexe 3 – Table de valeurs de déplacements chimiques en RMN ¹H

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

Annexe 4 – Données relatives au sujet

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

Numéros atomiques : $Z_{\text{H}} = 1$, $Z_{\text{N}} = 7$, $Z_{\text{O}} = 8$

Masses molaires en g.mol^{-1} : $M_{\text{N}} = 14,0$, $M_{\text{H}} = 1,0$, $M_{\text{O}} = 16,0$

Pour une température de 25°C :

Masse volumique du nitrate d'ammonium solide : $1,70 \text{ kg.L}^{-1}$

L'enthalpie de dissolution du nitrate d'ammonium est évaluée à 26 kJ.mol^{-1}

Capacité thermique massique de l'eau liquide $c_{\text{eau}} = 4,185 \text{ kJ.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$

Enthalpies standard de formation : $\Delta_f H^{\circ} = -366 \text{ kJ.mol}^{-1}$ pour $\text{NH}_4\text{NO}_3(\ell)$

$\Delta_f H^{\circ} = -242 \text{ kJ.mol}^{-1}$ pour $\text{H}_2\text{O}(\text{g})$

Potentiels standard: $E^{\circ}(\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}) = -0,403 \text{ V}$; $E^{\circ}(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-) = 0,835 \text{ V}$

Annexe 5 – Données de sécurité relatives aux produits utilisés - phrases H et P

	Pictogrammes	Phrases H et P
Ion nitrite	  	H301 ; H400 ; H319 ; H272 P301 + P310 ; P304 + P340 ; P273 ; P210 ; P305 + P351 + P338
N-(1-naphtyl)éthane-1,2-diamine	 	H302 ; H315 ; H319 ; H335 ; H370 P260 ; P305 + P351 + P338 ; P307 + P311
4-aminobenzènesulfonamide		H315 ; H335 ; H319 P261 ; P302+ P352 ; P280 ; P305 + P351 + P338.
nitrate d'ammonium	 	H272 ; H315 ; H319 P210 ; P220 ; P370 + P378 ; P280 ; P305 + P351 + P338

Mentions de danger

H200 : Explosif instable.
H201 : Explosif ; danger d'explosion en masse.
H202 : Explosif ; danger sérieux de projection.
H203 : Explosif ; danger d'incendie, d'effet de souffle ou de projection.
H204 : Danger d'incendie ou de projection.
H205 : Danger d'explosion en masse en cas d'incendie.
H220 : Gaz extrêmement inflammable.
H221 : Gaz inflammable.
H222 : Aérosol extrêmement inflammable.
H223 : Aérosol inflammable.
H224 : Liquide et vapeurs extrêmement inflammables.
H225 : Liquide et vapeurs très inflammables.
H226 : Liquide et vapeurs inflammables.
H228 : Matière solide inflammable.
H240 : Peut exploser sous l'effet de la chaleur.
H241 : Peut s'enflammer ou exploser sous l'effet de la chaleur.
H242 : Peut s'enflammer sous l'effet de la chaleur.
H250 : S'enflamme spontanément au contact de l'air.
H251 : Matière auto-échauffante ; peut s'enflammer.
H252 : Matière auto-échauffante en grandes quantités ; peut s'enflammer.
H260 : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables qui peuvent s'enflammer spontanément.
H261 : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables.
H270 : Peut provoquer ou aggraver un incendie ; comburant.
H271 : Peut provoquer un incendie ou une explosion ; comburant puissant.
H272 : Peut aggraver un incendie ; comburant.
H280 : Contient un gaz sous pression ; peut exploser sous l'effet de la chaleur.
H281 : Contient un gaz réfrigéré ; peut causer des brûlures ou blessures cryogéniques.
H290 : Peut être corrosif pour les métaux.
H300 : Mortel en cas d'ingestion.
H301 : Toxique en cas d'ingestion.
H302 : Nocif en cas d'ingestion.
H304 : Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires.
H310 : Mortel par contact cutané.
H311 : Toxique par contact cutané.
H312 : Nocif par contact cutané.
H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
H315 : Provoque une irritation cutanée.
H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.
H318 : Provoque des lésions oculaires graves.
H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.
H330 : Mortel par inhalation.

H331 : Toxique par inhalation.
H332 : Nocif par inhalation.
H334 : Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
H335 : Peut irriter les voies respiratoires.
H336 : Peut provoquer somnolence ou vertiges.
H340 : Peut induire des anomalies génétiques
H341 : Susceptible d'induire des anomalies génétiques
H350 : Peut provoquer le cancer
H350i : Peut provoquer le cancer par inhalation.
H351 : Susceptible de provoquer le cancer
H360 : Peut nuire à la fertilité ou au fœtus
H360F : Peut nuire à la fertilité.
H360D : Peut nuire au fœtus.
H360FD : Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H360Fd : Peut nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.
H360Df : Peut nuire au fœtus. Susceptible de nuire à la fertilité.
H361 : Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus
H361f : Susceptible de nuire à la fertilité
H361d : Susceptible de nuire au fœtus
H361fd : Susceptible de nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.
H362 : Peut-être nocif pour les bébés nourris au lait maternel.
H370 : Risque avéré d'effets graves pour les organes
H371 : Risque présumé d'effets graves pour les organes
H372 : Risque avéré d'effets graves pour les à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
H373 : Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
H300+H310 : Mortel par ingestion ou par contact cutané.
H300+H330 : Mortel par ingestion ou par inhalation.
H310+H330 : Mortel par contact cutané ou par inhalation.
H300+H310+H330 : Mortel par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.
H301+H311 : Toxique par ingestion ou par contact cutané.
H301+H331 : Toxique par ingestion ou par inhalation.
H311+H331 : Toxique par contact cutané ou par inhalation.
H301+H311+H331 : Toxique par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.
H302+H312 : Nocif en cas d'ingestion ou de contact cutané.
H302+H332 : Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation.
H312+H332 : Nocif en cas de contact cutané ou d'inhalation.
H302+H312+H332 : Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation.
H400 : Très toxique pour les organismes aquatiques.
H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

H413 : Peut être nocif à long terme pour les organismes aquatiques.

H420 : Nuit à la santé publique et à l'environnement en détruisant l'ozone dans la haute atmosphère.

Conseils de prudence

P101 : En cas de consultation d'un médecin, garder à disposition le récipient ou l'étiquette

P102 : Tenir hors de portée des enfants.

P103 : Lire l'étiquette avant utilisation.

P201 : Se procurer les instructions avant l'utilisation.

P202 : Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.

P210 : Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes – Ne pas fumer.

P211 : Ne pas vaporiser sur une flamme nue ou sur toute autre source d'ignition.

P220 : Tenir/stocker à l'écart des vêtements/.../matières combustibles.

P221 : Prendre toutes précautions pour éviter de mélanger avec des matières combustibles/...

P222 : Ne pas laisser au contact de l'air.

P223 : Éviter tout contact avec l'eau, à cause du risque de réaction violente et d'inflammation spontanée.

P230 : Maintenir humidifié avec...

P231 : Manipuler sous gaz inerte.

P232 : Protéger de l'humidité.

P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

P234 : Conserver uniquement dans le récipient d'origine.

P235 : Tenir au frais.

P240 : Mise à la terre/liaison équipotentielle du récipient et du matériel de réception.

P241 : Utiliser du matériel électrique/de ventilation/d'éclairage/.../antidéflagrant.

P242 : Ne pas utiliser d'outils produisant des étincelles.

P243 : Prendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques.

P244 : S'assurer de l'absence de graisse ou d'huile sur les soupapes de réduction.

P250 : Éviter les abrasions/les chocs/.../les frottements.

P251 : Récipient sous pression : ne pas perforer, ni brûler, même après usage.

P260 : Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aéros

P262 : Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements.

P263 : Éviter tout contact avec la substance au cours de la grossesse/pendant l'allaitement.

P264 : Se laver ... soigneusement après manipulation.

P270 : Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant le produit.

P271 : Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.

P272 : Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.

P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P281 : Utiliser l'équipement de protection individuel requis.

P282 : Porter des gants isolants contre le froid/un équipement de protection des yeux/du visage.

P283 : Porter des vêtements résistant au feu/aux flammes/ignifuges.

P284 : Porter un équipement de protection respiratoire.

P285 : Lorsque la ventilation du local est insuffisante, porter un équipement de protection respiratoire.

P231+P232 : Manipuler sous gaz inerte. Protéger de l'humidité.

P235+P410 : Tenir au frais. Protéger du rayonnement solaire.

P310 : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P311 : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P312 : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

P313 : Consulter un médecin.

P314 : Consulter un médecin en cas de malaise.

P315 : Consulter immédiatement un médecin.

P320 : Un traitement spécifique est urgent (voir ... sur cette étiquette).

P321 : Traitement spécifique (voir ... sur cette étiquette).

P322 : Mesures spécifiques (voir ... sur cette étiquette).

P330 : Rincer la bouche.

P331 : NE PAS faire vomir.

P332 : En cas d'irritation cutanée :

P333 : En cas d'irritation/éruption cutanée :

P334 : Rincer à l'eau fraîche/poser une compresse humide.

P335 : Enlever avec précaution les particules déposées sur la peau.

P336 : Dégeler les parties gelées avec de l'eau tiède. Ne pas frotter les zones touchées.

P337 : Si l'irritation oculaire persiste :

P338 : Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P340 : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

P341 : S'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

P342 : En cas de symptômes respiratoires :

P350 : Laver avec précaution et abondamment à l'eau et au savon.

P351 : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes.

P352 : Laver abondamment à l'eau et au savon.

P353 : Rincer la peau à l'eau/se doucher.

P360 : Rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau les vêtements contaminés et la peau avant de les enlever.

P361 : Enlever immédiatement les vêtements contaminés.

P362 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

P363 : Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.

P370 : En cas d'incendie :

P371 : En cas d'incendie important et s'il s'agit de grandes quantités :

P372 : Risque d'explosion en cas d'incendie.

P373 : NE PAS combattre l'incendie lorsque le feu atteint les explosifs.

P374 : Combattre l'incendie à distance en prenant les précautions normales.

P375 : Combattre l'incendie à distance à cause du risque d'explosion.

P376 : Obtenir la fuite si cela peut se faire sans danger.

P377 : Fuite de gaz enflammé : Ne pas éteindre si la fuite ne peut pas être arrêtée sans danger.

P378 : Utiliser ... pour l'extinction.

P380 : Évacuer la zone.

P381 : Éliminer toutes les sources d'ignition si cela est faisable sans danger.

P390 : Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants.

P391 : Recueillir le produit répandu.

P301+P310 : EN CAS D'INGESTION : appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P301+P312 : EN CAS D'INGESTION : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

P301+P330+P331 : EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir.

P302+P334 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : rincer à l'eau fraîche/poser une compresse humide.

P302+P350 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver avec précaution et abondamment à l'eau et au savon.

P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon.

P303+P361+P353 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher.

P304+P340 : EN CAS D'INHALATION : transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

P304+P341 : EN CAS D'INHALATION : s'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P306+P360 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES VÊTEMENTS : rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau les vêtements contaminés et la peau avant de les enlever.

P307+P311 : EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P308+P313 : EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.

P309+P311 : EN CAS d'exposition ou de malaise : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P332+P313 : En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin.

P333+P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.

P335+P334 : Enlever avec précaution les particules déposées sur la peau. Rincer à l'eau fraîche/poser une compresse humide.

P337+P313 : Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.

P342+P311 : En cas de symptômes respiratoires : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P370+P376 : En cas d'incendie : obturer la fuite si cela peut se faire sans danger.

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

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

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

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

P4xx : conseils de prudence de stockage

P402 : Stocker dans un endroit sec.

P403 : Stocker dans un endroit bien ventilé.

P404 : Stocker dans un récipient fermé.

P405 : Garder sous clef.

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

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

P410 : Protéger du rayonnement solaire.

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

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

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

P420 : Stocker à l'écart des autres matières.

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

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

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

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

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

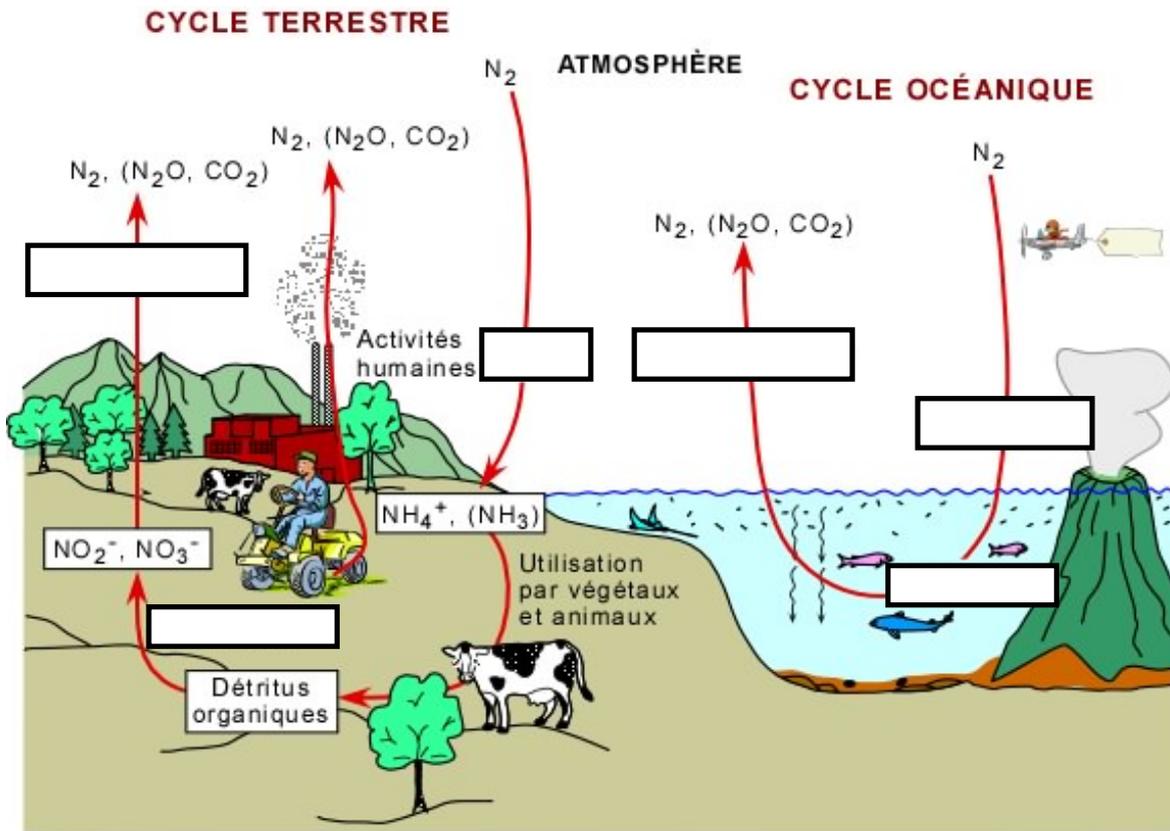
P411+P235 : Stocker à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F. Tenir au frais.

P501 : Éliminer le contenu/récipient dans ...

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

Feuille de résultats

Nom :	Numéro de poste :
--------------	--------------------------



I.2 Détermination de la concentration en ions nitrate d'une eau

Longueur d'onde de travail :	$\lambda =$
------------------------------	-------------

Gamme d'étalonnage :

Echantillon	Volume de réactif titrant	Volume de solution mère	Volume total	C _m (NO ₂ ⁻) (mg.L ⁻¹)	Absorbance A
1	5 mL	1 mL	50 mL		
2	5 mL	2 mL	50 mL		
3	5 mL	5 mL	50 mL		
4	5 mL	7,5 mL	50 mL		
5	5 mL	10 mL	50 mL		

Préparation de l'échantillon à analyser :

Volume de réactif titrant	Volume d'eau à analyser	Volume total	Absorbance A	$C_{m,tot}(\text{NO}_2^-)$ (mg.L ⁻¹)

II. Détermination de l'enthalpie de la réaction de dissolution du nitrate d'ammonium dans l'eau

Détermination de la capacité thermique du calorimètre :

$$m_{\text{eau chaude}} = \quad ; T_{\text{eau chaude}} =$$

$$m_{\text{eau froide}} = \quad ; T_{\text{eau froide}} =$$

$$T_{\text{finale}} =$$

$$C_{\text{calo}} =$$

Valeur en eau du calorimètre :

$$\mu =$$

Enthalpie de dissolution du nitrate d'ammonium :

$$m_{\text{eau}} = \quad ; T_{\text{eau}} =$$

$$m_{\text{nitrate d'ammonium}} =$$

$$T_{\text{finale}} =$$

$$\Delta_r H^\circ =$$

RAPPORT DU JURY DE TP DE CHIMIE

Le nitrate d'ammonium

Établi par : Romain BARBE, Hélène CARRIÉ, Aurélie DELEUZE, Laurence DUPONT.

L'épreuve de travaux pratiques de chimie de cette année s'intéressait à diverses utilisations du nitrate d'ammonium et permettait donc d'aborder des domaines variés de la chimie pour lesquels certains candidats ont montré une bonne maîtrise. Le jury tient à féliciter ces derniers.

La partie expérimentale mettait en jeu un dosage spectrophotométrique par étalonnage et une mesure d'enthalpie de réaction par calorimétrie.

La partie théorique s'intéressait à différents composés azotés intervenant dans le cycle de l'azote, aux réactions explosives du nitrate d'ammonium et à la synthèse de composés organiques explosifs nitrés.

Le jury a rappelé au début de l'épreuve que la note finale prend en compte à parts égales la partie expérimentale (questions 17, 18, 19, 20, 22 ; feuille de résultat et qualité des manipulations) d'une part, et la partie théorique (soit l'intégralité du reste du sujet) d'autre part. Dès lors, une copie même brillante ne pourra compenser une absence de résultats expérimentaux.

I. Utilisation du nitrate d'ammonium en tant qu'engrais : dosage des ions nitrate dans une eau

1. Introduction

Dans ces premières questions, on s'intéressait à la structure de divers ions azotés.

Les candidats ont donné une définition des électrons de valence en général très vague ; parfois ils ont comptabilisé comme électrons de valence uniquement les électrons de la dernière sous-couche en cours de remplissage, l'azote se trouve alors doté de 3 électrons de valence au lieu de 5.

L'établissement de formules de Lewis n'est pas maîtrisé par tous les candidats, la prévision de la géométrie des molécules par la méthode VSEPR non plus. Il y a parfois des confusions entre la géométrie de la molécule et la disposition des doublets (liants ou non-liants) autour d'un atome central.

La partie sur la polarité des molécules a été, de manière surprenante, extrêmement mal traitée. On ne peut pas s'intéresser à la polarité d'une molécule si l'on ne connaît pas sa géométrie.

Les questions suivantes portaient sur le cycle de l'azote. Les réponses manquent parfois de précision.

Les questions permettant de convertir les concentrations massiques en azote en concentrations massiques en nitrate sont correctement traitées dans l'ensemble.

2. Mise en œuvre expérimentale

De nombreuses erreurs simples et étourderies ont été constatées dans les copies des candidats : écriture erronée de l'équation de la réaction d'oxydoréduction ou encore addition malheureuse des concentrations massiques d'espèces n'ayant pas la même masse molaire à la question 14.

La partie expérimentale débutait par la réalisation guidée d'une gamme d'étalonnage dans le but de déterminer la concentration en nitrite d'une eau.

Les candidats, dans leur majorité, respectent les règles élémentaires de sécurité. Nous pouvons toutefois déplorer l'oubli occasionnel du port des gants lors de la manipulation de certains produits toxiques. Le port des lunettes au laboratoire est quant à lui indispensable et ce pendant toute la durée du TP.

Le matériel mis à disposition doit être choisi à bon escient : les volumes de solution mère de nitrite de sodium utilisés pour réaliser la gamme devaient être mesurés avec une burette et non pas avec une pipette Pasteur.

Le soin apporté aux manipulations est également pris en compte : on ne fait pas le zéro d'une burette en ajoutant ou retirant du liquide à l'aide d'une pipette Pasteur. Cette dernière doit en revanche être utilisée pour compléter jusqu'au trait de jauge lors de la préparation d'une solution dans une fiole jaugée. Les candidats manipulant systématiquement assis ont été sanctionnés.

Enfin, il ne faut pas pipeter directement dans les flacons et l'usage d'un bécher de prélèvement est nécessaire (même si chaque candidat dispose de ses propres solutions).

L'élaboration de la droite étalon a été menée avec succès par la majorité des candidats. De très bons coefficients de corrélation sur la régression linéaire ont été constatés dans un certain nombre de copies. Il est toutefois regrettable de constater que certaines représentations graphiques ont été inversées (représentation de C_m en fonction de A). La présence d'un titre explicite au graphique ainsi qu'aux axes a été évaluée. Ceux-ci pouvaient être enregistrés sur le logiciel de traitement (excel ou regressi) ou ajoutés à la main après impression.

La préparation de l'échantillon permettant d'analyser l'eau inconnue était laissée à l'initiative des candidats, il fallait en particulier réaliser une dilution qui permettait de se retrouver dans la gamme construite précédemment. Il était demandé de détailler le protocole de préparation des échantillons à analyser. La majorité des candidats s'est contentée de préciser un facteur de dilution sans détailler les opérations expérimentales et la verrerie utilisée, ce qui a été sanctionné.

Plusieurs candidats sont parvenus avec succès à déterminer la concentration totale en ions nitrite dans l'échantillon d'eau à analyser. Cependant, la question sur les incertitudes a été peu traitée. Enfin, il a été impossible pour bon nombre de candidats de conclure quant à la potabilité de l'eau étudiée car il était nécessaire pour ce faire de remonter à la concentration en ions nitrate initiale.

II. Utilisation du nitrate d'ammonium en tant que mélange réfrigérant

La mise en œuvre des expériences n'était pas explicitement donnée par l'énoncé, mais le texte de l'annexe 1 apportait une aide significative. Malgré cette annexe, la partie II n'a été traitée que par un faible nombre de candidats. Par ailleurs, les définitions précises des grandeurs thermodynamiques ne sont que très rarement connues.

III. Utilisation du nitrate d'ammonium en tant qu'explosif

1. Explosion du nitrate d'ammonium

Cette partie permettait de juger les connaissances des candidats sur l'oxydoréduction et la thermodynamique. Si l'ensemble est globalement correct, on pourra s'étonner du nombre de réactions redox dont les nombres stœchiométriques sont mal ajustés.

2. Autres composés explosifs

La notion d'aromaticité - comme ses implications sur la réactivité des composés aromatiques - est bien comprise mais mal définie : il faut, au minimum, préciser que l'aromaticité est associée à la délocalisation de $(4n+2)$ électron π sur l'intégralité d'un cycle plan.

Les mécanismes réactionnels, quand ils ont été écrits, sont rigoureux et soignés. En revanche, la régiosélectivité des substitutions électrophiles aromatiques a très rarement été comprise. A noter qu'en l'absence de régiosélectivité, les proportions des trois isomères ne sont pas égales car il y a deux positions ortho et méta pour une seule position para. Cette dernière (35%) était donc favorisée par rapport à la position ortho dont le pourcentage est pourtant supérieur (61%).

Les questions de fin de sujet ont été traitées par un faible nombre de candidats. Elles nécessitaient de connaître les réactions d'acétalisation, d'estérification et de S_N2 .

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

	I.1											I.2								
N° question	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
% réponses	100	100	83	80	87	77	60	90	73	87	80	93	83	73	83	90	100	100	97	90
% bonnes réponses	81	53	6	60	35	91	67	89	77	81	81	48	90	38	72	70	100	78	43	32

	II.		II.1										
N° question	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
% réponses	53	23	83	80	77	23	83	50	53	53	20	13	13
% bonnes réponses	28	30	70	60	55	29	53	82	61	85	50	65	75

	II.2																			
N° question	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
% réponses	80	53	27	23	30	70	67	53	30	30	13	33	33	27	23	7	20	13	3	
% bonnes réponses	48	78	75	54	51	71	74	25	39	33	88	60	38	30	27	50	23	50	50	

ÉPREUVE ORALE DE LEÇON

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

SUJETS

SUJETS DE BIOCHIMIE

Éléments transposables du génome.
Rôles et conséquences des complexes protéiques insolubles.
Maturation des ARN.
Transgénése des eucaryotes.
Le contrôle de qualité des protéines.
Signalisation et cancer.
Les échanges cytoplasme / mitochondrie.
Rôles du GTP.
Mécanismes cellulaires de détoxification.

SUJETS DE MICROBIOLOGIE

Mécanismes moléculaires de résistance aux antibiotiques.
La sécrétion des protéines chez les bactéries à Gram négatif.
La flore intestinale humaine : commensalisme ou symbiose ?
Méthodes de génération des fragments d'ADN d'intérêt lors d'un clonage.
Les senseurs membranaires chez les bactéries.
Les mécanismes bactériens d'échappement au système immunitaire.
Les bactéries intracellulaires obligatoires.
Les virus des fièvres hémorragiques.
Relations virus / cellule hôte eucaryote.
Le genre *Mycoplasma*.

SUJETS DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

La ménopause : physiologie, physiopathologie et thérapie.
Acides aminés et rein.
Communications et appareil digestif.
Traitements de l'information visuelle après la phototransduction.
Barrière hémato-encéphalique et pharmacologie.
Adaptation à l'altitude.
L'alcool.
Méthodes d'exploration des voies de transduction.
Pathologies et récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque.
La cytotoxicité cellulaire.
La spécificité de reconnaissance antigénique.

RAPPORT DU JURY DE LEÇONS

Établi par Henri-Jean BOULOUIS, Jean-Pascal DUMON, Philippe LEJEUNE, Nicolas MEUNIER, Alain MOREL, Christiane SALIGAUT, Benoît SCHNEIDER.

Commentaires généraux

L'épreuve de leçon permet au candidat de présenter un exposé didactique et pédagogique, dans le cadre de l'une des trois matières, explicitement nommée sur le sujet (Biochimie, ou Microbiologie, ou Biologie Cellulaire et Physiologie). Le jury rappelle donc aux candidats de ne pas négliger cette information capitale, car un même sujet peut être traité différemment selon qu'il serait abordé en leçon de Biochimie ou de Biologie Cellulaire par exemple.

Rapport sur les leçons de Biochimie

Pour les leçons de Biochimie, l'objectif, pour les candidats, est de dispenser un exposé structuré clair et exhaustif, sur un sujet de biochimie ou de biologie moléculaire et cellulaire, au plus haut niveau des connaissances actuelles. Ces exposés doivent être le résultat d'un vrai travail de synthèse, d'organisation pédagogique et donc ne pas être uniquement la somme ou la compilation d'éléments de différents manuels et ou de connaissances personnelles. En outre, la leçon doit être organisée d'un point de vue pédagogique permettant aux apprenants d'assimiler le ou les messages que vous estimez essentiels.

En aucun cas la leçon ne doit être une redite d'un seul manuel à disposition qui n'est inévitablement qu'une présentation partielle et partielle et qui peut ne pas être dans l'actualité scientifique. L'originalité de la présentation par rapport aux documents disponibles et vos connaissances et l'aspect formateur, que le candidat veut mettre en avant, sont des éléments très importants qui nécessitent une bonne connaissance du domaine et des documents.

Dans une leçon il faut toujours garder à l'esprit ce qui paraît essentiel de transmettre dans un temps limité. La leçon qui est nécessairement descriptive doit s'appuyer sur des fondements expérimentaux. De la bonne compréhension par le candidat des principes, des méthodes et des mécanismes au niveau moléculaire, nécessaires au sujet développé, dépend la bonne transmission de l'information. Une explication logique basée sur les fondamentaux de la biochimie au sens large 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 synthétiser et à transmettre un message scientifique clair lors de cet exercice. Ce défaut est la plupart du temps dû à un manque de recul et quelquefois de maîtrise des connaissances dans la présentation d'éléments de cours. La synthèse de plusieurs ouvrages peut être une difficulté voire un piège pour les candidats si ceux-ci n'ont pas déjà une expérience de leur utilisation. Enfin si dans beaucoup de cas l'exercice est plutôt réussi, l'exposé manque souvent d'attractivité, de vivacité mais aussi souvent de référence à l'actualité.

Les leçons nécessitent toujours un support sous forme de schéma et de figures qui doivent aider à la compréhension. Concernant les illustrations, il est souvent remarqué une imprécision concernant les titres, les unités et les indications qui doivent figurer.

On doit noter que dans la plupart des cas, un effort sur la présentation est fait. Sur la forme, le jury dans son ensemble remarque l'inutilité de la présentation informatique du plan et de sa redite manuscrite au tableau. Par ailleurs souvent cette reproduction au tableau semble être une perte de temps qui est le plus souvent difficile à lire en fonctions des couleurs utilisées.

Il est par ailleurs indispensable de rappeler aux candidats d'utiliser l'ensemble du temps donné pour la leçon. Enfin, les réponses aux questions doivent être concises et claires et doivent permettre au jury d'évaluer la maîtrise pédagogique des éléments apportés dans la leçon mais aussi les connaissances générales des candidats.

Rapport sur les leçons de Microbiologie

Si les leçons de bactériologie ont, pour la moitié d'entre elles, été correctement traitées, il n'en a pas été de même pour celles d'immunologie et moins encore pour celles de virologie. Les notes inférieures à la moyenne reflètent, la plupart du temps, un manque de connaissances générales sur le sujet proposé. Des notions générales solides, mêmes minimales, évitent de tomber dans l'anecdotique et le superficiel, voire le hors sujet. Elles permettent de choisir judicieusement les ouvrages dont le candidat s'inspire, en privilégiant des sources multiples, une assurance de couvrir toutes les facettes du sujet. Par ailleurs, un sujet d'actualité ne peut pas s'aborder sous le seul angle de l'actualité et les sujets transversaux ne peuvent se contenter d'un plan déséquilibré par une partie trop développée, sous prétexte d'être bien maîtrisée par le candidat.

La généralisation de l'emploi du vidéo-projecteur et la possibilité de photographier des ouvrages a eu un impact sur la pédagogie, rarement négatif. Néanmoins, il est hautement souhaitable de maîtriser cet outil : un mésusage peut agacer l'auditeur. Par ailleurs, on peut construire son plan au tableau au cours de l'exposé ou annoncer son plan en diapositives récurrentes. Faire les deux n'est pas souhaitable. De même, le recours au texte écrit sur les diapositives est un atout pour la fluidité du discours, mais en abuser peut s'avérer anti pédagogique. Enfin, citer ses sources iconographiques devrait être un réflexe.

Rapport sur les leçons de Biologie Cellulaire et Physiologie

Les leçons de Biologie Cellulaire et Physiologie ont été mieux traitées cette année qu'antérieurement à l'exception de quelques-unes où l'absence de connaissances générales dans le domaine ne permettait pas de prendre suffisamment de recul dans la présentation et/ou les questions lors de l'entretien avec le jury. Attention cependant au traitement des sujets de type « Point 1 et Point 2 » où trop souvent les candidats présentent chaque point séparément alors que la leçon invite au contraire à se focaliser sur les liens entre les deux (ex : « pathologies et récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque »).

Les outils informatiques sont globalement bien maîtrisés. Certains cèdent à la tentation de trop écrire de texte dans le diaporama qu'ils se retrouvent à lire, ce qui nuit à la pédagogie de l'ensemble. Le recours systématique au tableau pour réécrire le plan n'est pas nécessaire et peut permettre aux candidats de rendre leur discours plus fluide.

Comme les autres années, les étudiants visent moins à remplir absolument les 45 minutes de leçon, ce qui est une bonne chose. Il est en effet moins pénalisant de faire une leçon plus courte mais cohérente par rapport à une leçon lente et parsemée de redites ou hors sujets.

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

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

SUJETS

Les longs ARN non codants en 3D	McHugh CA, Chen CK, Chow A, Surka CF, Tran C, McDonel P, Pandya-Jones A, Blanco M, Burghard C, Moradian A, Sweredoski MJ, Shishkin AA, Su J, Lander ES, Hess S, Plath K, Guttman M The <i>Xist</i> lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3 <i>Nature</i> , 2015, vol. 521, p. 232-236 (+ methods)
	Dimond A, Fraser P Long noncoding RNAs <i>Xist</i> in three dimensions <i>Science</i> , 2013, vol. 341, p. 720-721
Les vaccins anticancéreux	Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Löwer M, Diekmann J, Boegel S, Schrörs B, Vascotto F, Castle JC, Tadmor AD, Schoenberger SP, Huber C, Türeci Ö, Sahin U Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer <i>Nature</i> , 2015, vol. 520, p. 692-696 (+ methods)
	Butterfield LH Cancer vaccines <i>British Medical Journal</i> , 2015, vol. 350, p. 1-14
Modification génétique programmable	Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptative bacterial immunity <i>Science</i> , 2012, vol. 337, p. 816-821
	Sternberg SH, Doudna JA Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9 <i>Molecular Cell</i> , 2015, vol. 58, p. 568-574
Position sur le chromosome et expression génétique chez <i>Escherichia coli</i>	Bryant JA, Sellars LE, Busby SJW, Lee DJ Chromosome position effects on gene expression in <i>Escherichia coli</i> K-12 <i>Nucleic Acid Research</i> , 2014, vol. 42(18), p. 11383-11392
	Dorman CJ Genome architecture and global gene regulation in bacteria: making progress towards a unified model? <i>Nature Reviews Microbiology</i> , 2013, vol. 11, p. 349-355
Chiralité des acides aminés et traduction	Englander MT, Avins JA, Fleisher RC, Liu B, Effraim PR, Wang J, Schulten K, Leyh TS, Gonzalez RL Jr, Cornish VW The ribosome can discriminate the chirality of amino acids within its peptidyl-transferase center <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i> , 2015, vol. 112(19), p. 6038-6043
	Nierhaus KH Decoding errors and the involvement of the E-site <i>Biochimie</i> , 2006, vol. 88, p. 1013-1019
Les relations entre <i>Chlamydia</i> et leur cellule-hôte	Flores R, Zhong G The <i>Chlamydia pneumoniae</i> inclusion membrane protein Cpn1027 interacts with host cell Wnt signaling pathway regulator Cytoplasmic Activation/Proliferation-associated Protein 2 (Caprin2) <i>Public Library of Science (PLOS ONE)</i> , 2015, vol. 10(5), e0127909, p. 1-16
	Bastidas RJ, Elwell CA, Engel JN, Valdivia RH Chlamydial intracellular survival strategies <i>Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine</i> , 2013, vol. 3(5), a010256, p. 1-20

Épigénétique et perturbateurs endocriniens	Wolstenholme JT, Edwards M, Shetty SRJ, Gatewood JD, Taylor JA, Rissman EF, Connely JJ Gestational exposure to bisphenol A produces transgenerational changes in behaviors and gene expression <i>Endocrinology</i> , 2012, vol. 153(8), p. 3828-3838
	Gibson DA, Saunders PTK Endocrine disruption of oestrogen action and female reproductive tract cancers <i>Endocrine-Related Cancer</i> , 2014, vol. 21(2), p. T13-T31
Croissance et bio-synthèse des acides gras chez <i>E. coli</i>: étude des interactions entre les protéines ACP et SpoT par la technique du double hybride bactérien	Angelini S, My L, Bouveret E Disrupting the acyl carrier protein/SpoT interaction <i>in vivo</i>: identification of ACP residues involved in the interaction and consequence on growth <i>Public Library of Science (PLOS ONE)</i> , 2012, vol. 7(4), e36111, p. 1-11
	Battesti A, Bouveret E The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in <i>Escherichia coli</i> <i>Methods</i> , 2012, vol. 58, p. 325-334
Mode de transmission du Mers-Cov, un coronavirus zoonotique	Barlan A, Zhao J, Sarkar MK, Li K, McCray PB Jr, Perlman S, Gallagher T Receptor variation and susceptibility to Middle East respiratory syndrome Coronavirus infection <i>Journal of Virology</i> , 2014, vol. 88(9), p. 4953-4961
	Al-Tawfiq JA, Memish ZA Middle East respiratory syndrome Coronavirus: transmission and phylogenetic evolution <i>Trends in Microbiology</i> , 2014, vol. 22(10), p. 573-579
Dimorphisme sexuel de la prévalence de Parkinson	Ferreira Cordellini M, Piazzetta G, Pinto KC, Delatre AM, Matheussi F, Carolino ROG, Escorsim Szawka R, Anselmo-Franci JA, Curte Ferraz A Effect of different doses of estrogen on the nigrostriatal dopaminergic system in two 6-hydroxydopamine-induced lesion models of Parkinson's disease <i>Neurochemical Research</i> , 2011, vol. 36, p. 955-961
	Miller IN, Cronin-Golomb A Gender differences in Parkinson's disease: clinical characteristics and cognition <i>Movement Disorders</i> , 2010, vol. 25(16), p. 2695-2703 (p. 1-13 ici)
Des souches d'<i>Escherichia coli</i> aux yeux bleus ?	Schmidl SR, Sheth RU, Wu A, Tabor JJ Refactoring and optimization of light-switchable <i>Escherichia coli</i> two-component systems <i>ACS Synthetic Biology</i> , 2014, vol. 3, p. 820-831
	Shiue E, Prather KLJ Synthetic biology devices as tools for metabolic engineering <i>Biochemical Engineering Journal</i> , 2012, vol. 65, p. 82-89
Inflammation et nécroptose	Dannappel M, Vlantis K, Kumari S, Polykratis A, Kim C, Wachsmuth L, Eftychi C, Lin J, Corona T, Hermance N, Zelic M, Kirsch P, Basic M, Bleich A, Kelliher M, Pasparakis M RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis <i>Nature</i> , 2014, vol. 513, p. 90-94 (+ methods)
	Pasparakis M, Vandenabeele P Necroptosis and its role in inflammation <i>Nature</i> , 2015, vol. 517, p. 311-320
Fluidité membranaire et adaptation thermique	Ma DK, Li Z, Lu AY, Sun F, Chen S, Rothe M, Menzel R, Sun F, Horvitz HR Acyl-CoA dehydrogenase drives heat adaptation by sequestering fatty acids <i>Cell</i> , 2015, vol. 161, p. 1152-1163
	De Mendoza D Temperature sensing by membranes <i>Annual Review of Microbiology</i> , 2014, vol. 68, p. 101-116
Cpx et la maintenance de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif	Vogt SL, Evans AD, Guest RL, Raivio TL The Cpx envelope stress response regulates and is regulated by small noncoding RNAs <i>Journal of Bacteriology</i> , 2014, vol. 196(24), p. 4229-4238
	Vogt SL, Raivio TL Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response <i>FEMS Microbiology Letters</i> , 2012, vol. 326, p. 2-11
Une molécule de jeunesse	Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, Mallozzi C, Jacobi C, Jennings LL, Clay I, Laurent G, Ma S, Brachat S, Lach-Trifilieff E, Shavlakadze T, Trendelenburg AU, Brack AS, Glass DJ GDF11 increases with age and inhibits skeletal muscle regeneration <i>Cell Metabolism</i> , 2015, vol. 22, p. 1-11
	Kaiser J "Rejuvenation factor" in blood turns back the clock in old mice <i>Science</i> , 2014, vol. 344, p. 570-571
Émotions et hypothalamus	Kunwar PS, Zelikowsky M, Remedios R, Cai H, Yilmaz M, Meiter M, Anderson DJ Ventromedial hypothalamic neurons control a defensive emotion state <i>eLife</i> , 2015, vol. 4, e06633, p. 1-30

Pathogénie du virus de l'hépatite E	Kenney SP, Meng XJ The lysine residues within the human ribosomal protein S17 sequence naturally inserted into the viral nonstructural protein of a unique strain of Hepatitis E virus are important for enhanced virus replication <i>Journal of Virology</i> , 2015, vol. 88(7), p. 3793-3803
	Panda SK, Varma SP Hepatitis E: molecular virology and pathogenesis <i>Journal of Clinical and Experimental Hepatology</i> , 2013, vol. 3(2), p. 114-124
Liaison dangereuse entre traduction et stucturation	Kim SJ, Yoon JS, Shishido H, Yang Z, Rooney LA, Barral JM, Skach WR Translational tuning optimizes nascent protein folding in cells <i>Science</i> , 2015, vol. 348(6233), p. 444-448
	Puglisi JD The delicate dance of translation and folding <i>Science</i> , 2015, vol. 348(6233), p. 399-400
NO et hémoglobine	Zhang R, Hess DT, Qian Z, Hausladen A, Fonseca F, Chaube R, Reynolds JD, Stamler JS Hemoglobin βCys93 is essential for cardiovascular function and integrated response to hypoxia <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i> , 2014, vol. 112(21), p. 1-6 (early edition)
	Allen BW, Stamler JS, Piantadosi CA Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilatation <i>Trends in Molecular Medicine</i> , 2009, vol. 15(10), p. 452-460
Signalisation et résistance aux médicaments anticancéreux	Perna D, Karreth FA, Rust AG, Perez-Mancera PA, Rashid M, Iorio F, Alifrangis C, Arends MJ, Bosenberg MW, Bollag G, Tuveson DA, Adams DJ BRAF inhibitor resistance mediated by the AKT in an oncogenic BRAF mouse melanoma model <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i> , 2015, vol. 112, p. E536-E545
	Livingstone E, Zimmer L, Piel S, Shadendorf D PLX4032: does it keep its promise for metastatic melanoma treatment? <i>Expert Opinion on Investigational Drugs</i> , 2010, vol. 19(11), p. 1439-1449
Obésité et hérédité	Masuyama H, Mitsui T, Nobumoto E, Hiramatsu Y The effect of high-fat diet exposure in utero on the obesogenic and diabetogenic traits through epigenetic changes in <i>Adiponectin</i> and <i>Leptin</i> gene expression for multiple generations in female mice <i>Endocrinology</i> , 2015, p. 1-10 (early release)
	Rissman EF, Adli M Minireview: Transgenerational epigenetic inheritance: focus on endocrine disrupting compounds <i>Endocrinology</i> , 2014, vol. 155(8), p. 2770-2780
Utilisation de la technique de "phage display" pour la mise au point de tests de détection des substances toxiques	De la Cruz S, Cubillos-Zapata C, Lopez-Calleja IM, Ghosh S, Alcocer, M, Gonzalez I, Martin R, Garcia T Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products <i>Food Control</i> , 2015, vol. 54, p. 322-330
	Frenzel A, Frode D, Meyer T, Schirmann T, Hust M Generating recombinant antibodies for research, diagnostics and therapy using phage display <i>Current Biotechnology</i> , 2012, vol. 1, p. 33-41
Des ARN non codants codant	Laressergues D, Couzigou JM, San Clemente H, Martinez Y, Dunand C, Bécard G, Combier JP Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides <i>Nature</i> , 2015, vol. 520, p. 90-93 (+ methods)
	Waterhouse PM, Hellens RP Coding in non-coding RNAs <i>Nature</i> , 2015, vol. 520, p. 41-42
<i>Helicobacter pylori</i> et CagA	Boonyanugomol W, Chomvarin C, Hahnvajanawong C, Sripa B, Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL <i>Helicobacter pylori</i> cag pathogenicity island (cagPAI) involved in bacterial internalization and IL-8 induced responses via NOD1- and MyD88-dependent mechanisms in human biliary epithelial cells <i>Public Library of Science (PLOS ONE)</i> , 2013, vol. 8(10), e77358, p. 1-12
	Salama NR, Hartung ML, Müller A Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen <i>Helicobacter pylori</i> <i>Nature Reviews Microbiology</i> , 2013, vol. 11(6), p. 385-399
Prolactine et devenir cellulaire	Ferraris J, Zarate S, Jaita G, Boutillon F, Bernadet M, Auffret J, Seilicovich A, Binart N, Goffin V, Pisera D Prolactin induces apoptosis of lactotropes in female rodents <i>Public Library of Science (PLOS ONE)</i> , 2014, vol. 9(5), e97383, p. 1-14
	Damiano JS, Wasserman E Molecular pathways: blockade of the PRLR signaling pathway as a novel antihormonal approach for the treatment of breast and prostate cancer <i>Clinical Cancer Research</i> , 2013, vol. 19(7), p.1644-1650

Antibiotique: un nouveau venu	Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schäberle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman VA, Cohen DR, Felix CR, Fetterman KA, Millet WP, Nitti AG, Zullo AM, Chen C, Lewis K A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance <i>Nature</i> , 2015, vol. 517, p. 455-459 (+ methods)
	Wright G An irresistible newcomer <i>Nature</i> , 2015, vol. 517, p. 442-443
Cerveau et thérapie cellulaire	Sil Shin E, Hwang P, Hwang YS, Francis Suh JK, Chun YI, Jeon SR Enhanced efficacy of human brain-derived neural stem cells by transplantation of cell aggregates in a rat model of Parkinson's disease <i>Journal of Korean Neurosurgical Society</i> , 2014, vol. 56(5), p. 383-389
	Buttery PC, Barker RA Treating Parkinson's disease in the 21st century: can stem cell transplantation compete? <i>The Journal of Comparative Neurology</i> , 2014, vol. 522, p. 2802-2816
Régulation du phénomène de persistance dans une population d'<i>Escherichia coli</i> par l'alarmone (p)ppGpp	Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity <i>Cell</i> , 2013, vol. 154, p. 1140-1150
	Hauryliuk V, Atkinson GC, Murakma KS, Tenson T, Gerdes K Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology <i>Nature Reviews Microbiology</i> , 2015, vol. 13, p. 298-309
Les microfilaments bactériens	Bisson-Filho AW, Discola KF, Castellen P, Blasios V, Martins A, Sforça ML, Garcia W, Zeri ACM, Erickson HP, Dessen A, Gueiros-Filho FJ FtsZ filament capping by MciZ, a developmental regulator of bacterial division <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i> , 2015, vol. 112(17), p. E2130-E2138 (+ 1-8 supporting information)
	Eun YJ, Kapoor M, Hussain S, Garner EC Bacterial filament systems: towards understanding their emergent behavior and cellular functions <i>Journal of Biological Chemistry</i> , 2015, p. 1-15 (<i>advance online publication</i>)
Prise alimentaire et cannabinoïdes	Koch M, Varela L, Kim JG, Kim JD, Hernandez-Nuno F, Simonds SE, Castorena CM, Vinanna CR, Elmquist JK, Morozov YM, Rakic P, Bechmann I, Cowley MA, Szigeti-Buck K, Dietrich MO, Gao XB, Diano S, Horvath TL Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding <i>Nature</i> , 2015, p. 1-6 (+ methods) (<i>advance online publication</i>)
	Patel S, Cone RD A cellular basis for the munchies <i>Nature</i> , 2015, vol. 519, p. 38-40

RAPPORT DU JURY D'ECD

Établi par Henri-Jean BOULOUIS, Jean-Pascal DUMON, Philippe LEJEUNE, Nicolas MEUNIER, Alain MOREL, Christiane SALIGAUT, Denis VIVARES.

Commentaires généraux

En ECD, chaque dossier comporte deux documents en anglais (langage scientifique international) : une revue présentant l'état des connaissances sur un sujet et sa mise en perspective associée à un article de recherche détaillant des résultats expérimentaux sur une des dimensions évoquée dans la revue.

Il est indispensable que les candidats aient pris connaissance des contenus des deux documents du dossier. Cette approche est essentielle : d'abord globale avec la revue, elle sera ensuite affinée avec l'article de recherche.

Cette compétence de lecture « rapide » et efficace s'acquiert lorsque de telles études de dossier ont déjà été pratiquées et lorsque l'appréhension de découverte est complétée par des connaissances générales du sujet.

Les articles scientifiques développent une argumentation expérimentale dans le but de présenter une hypothèse aux lecteurs. Cette hypothèse et les mécanismes qui en découlent, se veulent novateurs et s'avèrent souvent très différents ou complémentaires des descriptions proposés dans les ouvrages de référence.

Comme chaque année, le jury rappelle que l'objectif de l'exposé n'est pas de présenter l'ensemble des éléments contenus dans les deux documents mais de mettre en évidence d'une part, la problématique de la revue et l'aspect innovant des résultats expérimentaux présentés dans les articles auxquels elle fait référence. Il faut bien entendu présenter la démarche scientifique expérimentale et les avantages et limites des méthodes employées.

Un des objectifs de cet exercice est d'expliquer le lien entre revue et article et de dire en quoi le sujet traité est important pour la connaissance académique et ou les implications technologiques ou sociétales. Les candidats doivent donc faire l'effort d'identifier le thème général de l'étude, contenu dans le titre de l'ECD, l'hypothèse avancée par les auteurs et les innovations conceptuelles ou méthodologiques qu'ils proposent dans le corps de l'article. La rigueur du raisonnement et la construction de l'argumentaire qui ont prévalu dans l'écriture des articles doivent être mis en avant dans l'exposé qui est fait par le candidat.

Rapport sur les ECD de Biochimie

Concernant les ECD des Biochimie, le jury doit être en mesure d'apprécier la compréhension générale du sujet et la pertinence de l'apport scientifique de l'article. Il est donc essentiel que l'étude cadre le sujet de l'article dans un environnement plus large permettant de percevoir l'intérêt et le pourquoi du sujet. Il s'agit ensuite de montrer en quoi les expériences décrites ont permis de confirmer l'hypothèse proposée ou infirmer les hypothèses précédentes. Il est alors possible de développer spécifiquement telle ou telle expérience, technique, d'en expliciter les résultats, d'exercer son sens critique sur les méthodes mentionnées et sur l'interprétation des résultats proposée.

Cette année encore, le jury a constaté que certains candidats n'étaient pas en mesure d'expliquer les principes des méthodes et de justifier leurs choix pour documenter une hypothèse. Pour quelques candidats le manque de maîtrise du langage scientifique anglo-saxon reste un handicap qui pourrait être facilement levé par la lecture régulière d'articles scientifiques dont de nombreux sont disponibles sur internet. En revanche, le jury a apprécié les efforts des candidats en général pour illustrer leurs propos par les documents issus des documents et retravaillés afin qu'ils soient des appuis aux explications.

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

Rapport sur les ECD de Microbiologie

Cette année, les ECD de Microbiologie ont été plus satisfaisant que les leçons. L'accès à l'Internet devait faciliter la compréhension et l'analyse des articles et permettre aux candidats d'appréhender la problématique de l'article de recherche. Ce n'a pas été le cas pour tous les candidats. Certains se sont contentés d'aborder, et parfois superficiellement, le seul article de recherche sans introduire le sujet en utilisant l'article de revue ou l'accès internet. Il reste de cette démarche une impression de survol qui laisse le jury sur sa faim. Si l'emploi des figures et

schémas directement tirés des articles s'est avéré souvent judicieux, il ne faut pas hésiter à retravailler certains d'entre eux pour les rendre plus didactiques.

L'entretien avec le jury reste un exercice difficile pour de nombreux candidats comme pour les interrogateurs. Ces derniers sont parfois partagés entre le désir d'obtenir des réponses et la crainte de déstabiliser le candidat par des questions dont ils n'imaginent pas, avant de les poser, qu'elles seront sans réponses...

Rapport sur les ECD de Biologie Cellulaire et Physiologie

En ce qui concerne les ECD de Biologie, la qualité a été meilleure que les leçons. Les échecs sont souvent dus à un manque de maîtrise de l'anglais et des techniques modernes utilisées. Nous recommandons la lecture régulière de la littérature scientifique, notamment certains journaux généralistes comme « *PNAS* » ou « *Frontiers in...* ». Ils sont en libre accès et permettront aux candidats non seulement de s'améliorer pour cette épreuve mais aussi de réactualiser leurs connaissances. Cela s'avérera payant également pour les écrits et la leçon (où les connaissances techniques datent trop souvent des années 90...).

Attention à la copie extensive de figures complexes d'article voire de tableaux qui sont parfois présentés sans remise en forme ni remis dans leur contexte.

Rapport sur les questions relatives à la Chimie

Les questions de chimie sur les ECD dérivent du contenu des articles proposés au candidat et des points évoqués par le candidat au cours de sa présentation. Le but premier est de vérifier si le candidat maîtrise les notions de chimie qu'il évoque. Le niveau des questions posées est généralement en deçà du programme de chimie officiel. L'écart entre les candidats est resté notable cette année.

En chimie structurale, peu de candidats sont capables de donner la structure électronique fondamentale d'un élément simple appartenant aux deux premières lignes de la classification périodique, comme l'oxygène ou le carbone. Les notions de sous-couches électroniques, leur ordre de remplissage et le nombre d'électrons les saturant restent aussi assez lointains pour de nombreux candidats. Le nom des familles d'éléments chimiques dans la classification périodique est également méconnu. Il est nécessaire aussi de savoir ensuite donner le nombre d'électrons de valence pour ces éléments. La notion d'isotopie est, par contre, généralement bien connue des candidats. Il faut cependant maîtriser le vocabulaire associé (numéro atomique, proton, neutron ou nucléon) et définir les différents types de radioactivité (α , β ou γ).

Toujours en chimie structurale, l'écriture de Lewis (incluant doublets liant et non-liant) des composés inorganiques ou organiques, est dans l'ensemble mieux maîtrisée. La notion de radical reste cependant souvent lointaine pour les candidats. Le jury attend de la part du candidat, qu'il puisse donner un ordre de grandeur de la longueur d'une liaison chimique. Beaucoup de candidats citent sans difficulté les différents types interactions inter(ou intra)moléculaires et leurs ordres de grandeurs énergétiques. Le jury apprécierait que le candidat puisse justifier ces interactions (hydrophobes, Van der Waals, liaisons H..) notamment à partir de la polarité des molécules. Les notions d'aromaticité, justifiée par le critère de Hückel, et de conjugaison ne sont pas maîtrisées par beaucoup de candidats.

En chimie organique, le jury s'étonne que certains candidats ne peuvent identifier ou dessiner certaines fonctions classiques sans erreur (acide carboxylique, ester, amide, amine, etc..). Certains candidats confondent les termes fonctions et groupements. Identifier des carbones asymétriques (et de donner leur configuration absolue), ou discuter la configuration d'une double liaison fait aussi partie des exigences du jury. Des confusions ont aussi été fréquemment notées

lorsqu'il s'agissait de donner le lien stéréochimique existant entre deux molécules (énantiomères ou diastéréoisomères). La notion de chiralité est généralement bien connue des candidats. Le jury attend des candidats qu'ils maîtrisent les représentations de Cram, Haworth ou Fischer, et qu'ils puissent passer d'une représentation à l'autre. La connaissance de la structure chimique de molécules usuelles (bases azotées, sucre, glycérol, acide aminées par exemple) serait appréciée par le jury. Trop peu de candidats sont capables de donner un schéma mécanistique cohérent en chimie organique. Les candidats doivent connaître la notion de protection de fonction chimique, indispensable en vue de synthétiser une molécule d'intérêt biochimique multifonctionnelle.

En chimie inorganique, tout candidat doit être capable d'équilibrer rapidement un bilan d'oxydoréduction et identifier l'espèce oxydante et de l'espèce réductrice d'un couple. En acido-basicité, beaucoup de candidats sont capables de donner le diagramme de prédominance, et peuvent définir une solution tampon. Le respect des formes acido-basiques des molécules présentées suivant le pH du milieu biologique serait apprécié. Le candidat doit pouvoir définir un complexe avec le vocabulaire adéquat (métal, ligand) et expliquer la notion de chélation.

En thermodynamique, les fonctions d'état classiques (G, H, U et S) doivent être connues et comprises. Le jury a apprécié que certains candidats maîtrisent les notions de déplacements d'équilibre. Par contre, les notions de pression osmotique ou de diffusion passive ont rarement été bien expliquées.

Le jury attend que tout candidat puisse expliquer brièvement (même de manière vulgarisée) les techniques physiques expérimentales qu'il évoque. Le jury a ainsi apprécié que la cristallographie des rayons X, la Résonance Magnétique Nucléaire ou la microscopie de fluorescence (ainsi que les termes connexes, comme « microscopie confocale de fluorescence » ou « FRET ») soient plutôt bien expliquées par les candidats. Par contre, le phénomène de luminescence ou encore la spectrométrie de masse voire la microscopie à force atomique sont moins bien maîtrisés des candidats. Le jury apprécie, par ailleurs, qu'un candidat puisse classer énergétiquement et donner un ordre de grandeur des longueurs d'onde associées aux rayonnements γ , X, UV, visible ou IR.

Enfin, nous souhaitons féliciter les candidats qui se sont appliqués à répondre de manière réfléchie et constructive aux questions du jury.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Comme les autres années, les profils des candidats inscrits au concours et présents aux épreuves d'admissibilité et d'admission étaient très variés. À côté des étudiants ayant préparé le concours ENS se sont trouvés admissibles des enseignants du secondaire et du supérieur dont certains ont suivi une préparation dans leur académie. Le jury se réjouit de cette pluralité de candidats, exprimant l'intérêt pour ce concours d'excellence en biochimie et génie biologique.

Les résultats aux différentes épreuves d'admissibilité comme d'admission montrent qu'un concours de cette dimension doit se préparer sans négliger aucun champ mentionné dans le programme et ce dans le souci d'une actualisation des savoirs, tout en assurant les connaissances de bases qui constituent le socle indispensable à la construction d'une expertise disciplinaire. L'évolution permanente des techniques et des connaissances dans les domaines couverts par le programme demandera une remise en question permanente de la part des futurs agrégés. Juger de la capacité des candidats à assurer cette mise à niveau permanente est un des objectifs assignés à ce concours. Chaque épreuve nécessite d'autre part, comme cela a été précisé dans les rapports spécifiques, la mise en œuvre d'une méthodologie ne faisant pas l'économie d'un temps de réflexion, de bon sens, de la volonté de transmettre un message qui aidera, certes, à la structuration d'une composition (écrite ou orale), mais aussi à distinguer l'essentiel de l'accessoire. Il convient de ne pas oublier que l'agrégation est un concours d'enseignement qui évalue également l'aptitude des candidats à organiser, structurer, présenter un propos tout en faisant preuve de qualités pédagogiques et didactiques.

Les travaux pratiques et les ECD ont, cette année encore, rempli leur rôle, emblématique de notre agrégation. Ils permettent d'apprécier l'adaptabilité des candidats placés devant des sujets ou des articles innovants pour lesquels ils doivent faire preuve d'organisation, de discernement mais aussi de maîtrise des techniques. Pour les ECD, l'accès à Internet représente incontestablement une aide rassurante. Cependant, cette facilité ne peut en aucun cas pallier les manques de connaissances majeures et ne doit pas faire négliger la préparation à cette épreuve. Quant aux épreuves pratiques, leur poids n'est pas moindre que celui des autres épreuves d'admission et bien s'y préparer peut être un gage de réussite.

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

Le jury félicite les candidats lauréats de cette session 2015. Il encourage les autres candidats à persévérer dans leur projet, d'autant que tous ont fait preuve de remarquables qualités dans certaines épreuves.

Le jury tient à remercier Madame Nora MACHURÉ, Provisseure du lycée Pierre-Gilles de Gennes, ENCPB et son équipe : provisseures adjointes, enseignants, techniciens, et personnel administratif, pour l'accueil et l'aide efficace apportés tout au long de l'organisation et du déroulement de ce concours qui a eu lieu dans d'excellentes conditions.